



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104379750 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 25

(21) 申请号 201380020538. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 04. 17

C12N 15/82(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12P 21/02(2006. 01)

12164458. 7 2012. 04. 17 EP

C12N 5/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/057956 2013. 04. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/156504 DE 2013. 10. 24

(71) 申请人 格林诺瓦森生物技术股份有限公司

地址 德国布赖斯高地区弗莱堡

(72) 发明人 W. 乔斯特 M. 克纳彭伯格

D. 克劳斯尼特泽 A. 沙亚夫

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 周铁 石克虎

权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

用于增加重组蛋白分泌的方法

(57) 摘要

本发明涉及在具有细胞壁的细胞中生产重组蛋白的方法,所述方法包括在培养基中通过将蛋白表达在所述细胞中,增加所述重组蛋白穿过细胞壁的分泌的步骤,所述培养基含有表面活性聚合物和单价金属离子的组合且具有至少0.32osmol/L的渗量,所述发明进一步涉及用于所述方法的培养基和营养物混合物。

1. 在具有细胞壁的细胞中生产重组蛋白的方法,所述方法包括在培养基中通过在所述细胞中表达蛋白,分泌所述重组蛋白穿过细胞壁的步骤,所述培养基含有表面活性聚合物和单价金属离子的组合且具有至少 0.32 osmol/L 的渗量。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述分泌从所述细胞的质外体空间向培养基中进行。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述细胞是植物细胞、在植物中或在植物组织中的细胞、真菌细胞或在真菌中的细胞、或藻类细胞,特别优选是苔藓类植物细胞。

4. 根据权利要求 1-3 中的任一项所述的方法,其特征在于,在悬浮培养物中培养所述细胞。

5. 根据权利要求 1-4 中的任一项所述的方法,其特征在于,所述金属离子是碱金属离子,优选钠,和 / 或所述金属离子以至少 20 mM 的浓度存在于所述培养基中。

6. 根据权利要求 1-5 中的任一项所述的方法,其特征在于,所述表面活性聚合物是聚烷基二醇,优选聚乙二醇,和 / 或所述表面活性聚合物以至少 0.05 重量 % 的浓度存在于所述培养基中。

7. 根据权利要求 1-6 中的任一项所述的方法,其特征在于,所述培养基包含:硝酸根离子,优选以至少 0.2 mM 的浓度,磷酸根离子,优选以至少 0.05 mM 的浓度,硫酸根离子,优选以至少 0.02 mM 的浓度,钙离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,钾离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,钠离子,优选以至少 20 mM 的浓度,或它们的组合。

8. 根据权利要求 1-7 中的任一项所述的方法,其特征在于,在所述的在所述培养基中分泌所述重组蛋白的步骤之前,使所述细胞在前一步骤中具有小于 0.1 osmol/L 的渗量的培养基中生长,尤其是没有所述分泌,由此蛋白积累在所述细胞内或在所述细胞的质外体空间中。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述前一步骤中的培养基包含:硝酸根离子,优选以至少 0.2 mM 的浓度,磷酸根离子,优选以至少 0.05 mM 的浓度,硫酸根离子,优选以至少 0.02 mM 的浓度,钙离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,钾离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,或它们的组合;和 / 或以最大 20 mM 的浓度包含钠离子。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于,所述前一步骤中的培养基不包含所述表面活性聚合物,或以最大 0.08 重量 % 的浓度包含所述表面活性聚合物。

11. 根据权利要求 8-10 中的任一项所述的方法,其特征在于,所述前一步骤进行 2-30 天的时间。

12. 根据权利要求 1-11 中的任一项所述的方法,其特征在于,所述分泌步骤进行至少 2 天、优选 3-120 天的时间。

13. 适合用于根据权利要求 1-12 中的任一项所述的方法促进分泌的培养基,所述培养基以至少 0.05 重量 % 的量包含所述表面活性聚合物和以至少 20 mM 的浓度的单价金属离子,且具有至少 0.32 osmol/L 的渗量。

14. 根据权利要求 13 所述的培养基,所述培养基包含:硝酸根离子,优选以至少 0.2 mM 的浓度,磷酸根离子,优选以至少 0.05 mM 的浓度,硫酸根离子,优选以至少 0.02 mM 的浓度,钙离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,钾离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,钠离子,优选以

至少 40 mM 的浓度,或它们的组合。

15. 干燥的营养培养基混合物,其用于重构根据权利要求 13 或 14 所述的培养基。

用于增加重组蛋白分泌的方法

[0001] 本发明涉及通过使用合适的表达方法优化真菌或植物的重组表达系统。

[0002] 已经在许多出版物中描述了在植物中生产在 ng/1 至 $\mu\text{g}/1$ 的浓度范围内的重组蛋白。国际公开 W0 01/25456 A2 涉及一种在不裂解苔藓类植物(Moosen)组织或苔藓类植物细胞的情况下生产在苔藓类植物中的蛋白的方法。此外提及,在培养基中使用 PVP 可以增加生产力。作为例子,展示了 VEGF₁₂₁ (一种具有 28 kDa 的大小的小糖基化的同源二聚体)的重组生产(Baur 等人, Journal of Biotechnology 119 (2005): 332-342)。Baur 等人描述了使用 PEG 对苔藓类植物的瞬时转化。用于生产 VEGF 的培养基不含有 PVP 或 PEG。

[0003] Drake 等人, Plant Mol. Biol. 52 (2003): 233-241 描述了在烟草植物组织(即根)的培养物中抗体的重组表达。通过根分泌的过程分泌在微克(μg)范围内的抗体。基于根分泌的有效植物表达系统主要是毛状根培养物,其可以通过用发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染任意植物来刺激(Gaume 等人, Plant Cell Rep. 21 (2003): 1188-1193)。

[0004] Komarnysky 等人, Plant Physiology 124 (2000): 927-933 描述了通过吐水过程分泌重组蛋白,其中随叶子的吐水液体分泌出蛋白。每天的生产率在 $1\mu\text{g}/\text{g}$ 叶质量的范围内。

[0005] 在 Kwon 等人, Biotechnology and Bioengineering 81(7) (2003): 870-875 中描述了用于重组表达异源蛋白的烟草悬浮培养物。将经转化的植物的愈伤组织细胞用于生产人 IL-12 的细胞系。作为细胞培养基的添加剂,对 3 种聚合物稳定 IL-12 的性能进行了测试。PVP 和 PEG 不具有作用。明胶导致 IL-12 的稳定化,直至第 5 天起培养基中的蛋白酶导致浓度降低。在 Lee 等人, Journal of Biotechnology 96 (2002): 205-211 中描述了类似的结果。

[0006] LaCount 等人, Biotechnology Letters 19(1) (1997): 93-96 描述了通过用 PVP 处理以保护免于蛋白酶降解来稳定化重组生产的抗体和 GM-CSF。

[0007] Lee 和 Kim, Biotechnology Letters 24 (2002): 1779-1783 描述了 Pluronic F-68 和聚乙二醇用于保护烟草悬浮培养物中的细胞免受搅拌罐生物反应器中的机械损伤的用途。

[0008] Magnuson 等人, Protein Expression and Purification 7, (1996): 220-228 描述了在烟草细胞的悬浮培养物中表达单克隆抗体的 50 kDa 重链。通过向培养基中添加 PVP 使收率增加 35 倍。这归因于蛋白的稳定化以及阻止了在容器壁上的聚集和积累。66% 的蛋白存在于细胞质中,30% 存在于膜级分中,且仅 4% 存在于培养基中。尽管存在分泌信号序列(其仅发送穿过细胞膜的信号),但是认为具有大于 50 kDa 的摩尔质量的大蛋白过大,不能穿过细胞壁。

[0009] Schuster 等人, Biotechnol. J. 2 (2002): 1-9 描述了在苔藓类植物原生质体中生产抗体。增加与前述根据 Baur 等人的增强效率的转化相组合,在 3M- 和 W5- 培养基的混合物中培养,使收率从 0.1- 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 增加至 8.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0010] Tsoi 和 Doran, Biotechnol. Appl. Biochem. 35 (2002): 171- 180 描述了不

同的表达培养基和它们对烟草细胞悬浮培养物的抗体表达的影响。分泌的抗体的收率在 20–200 µg/50 ml 培养基之间。

[0011] US 2010/035327 A1 涉及培养基的通用添加剂,其由水稻多糖和多肽制成。据推测其会提高细胞产物的生长和分泌。但是,其中没有提及通过细胞壁分泌的问题。

[0012] David 等人, Journal of Biotechnology 150 (1) (2010): 115– 124 涉及在巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) (即没有细胞具有细胞壁)中重组生产抗体片段。

[0013] Baur 等人, Plant Biotechnology Journal 3 (3) (2005): 331– 340 描述了作为表达系统的小立碗藓(*P. patens*)以及通过使用添加剂 (PVP) 和通过表达人血清白蛋白增加的重组人生长因子 (VEGF) 的分泌。

[0014] Decker 等人, Bioprocess and Biosystems Engineering, Jan. 31 (1) (2008): 3–9 一般地讨论了苔藓类植物生物反应器中的培养条件和植物特异性的糖工程。

[0015] Twyman 等人, Trends in Biotechnology 21 (12) (2003): 570– 578 解释了植物作为重组表达系统的用途。关于收率讨论了转染系统、信号序列和 mRNA 稳定性。

[0016] 尽管已知可用于在异源蛋白的重组生产中增加植物和植物细胞的生产力的方法,但是植物系统的生产力仍然始终低于动物细胞的,例如建立的 CHO 表达系统。因此,总是需要进一步增加植物表达系统的生产力。此外,分泌型蛋白的生产是合乎需要的,由此不必破坏生产细胞并且可以将其用于其它生产。

[0017] 因此,本发明的一个目的是,提供改进的表达方法以及用于所述方法的试剂。

[0018] 本发明涉及一种在具有细胞壁细胞中生产重组蛋白的方法,所述方法包括下述步骤:在培养基中通过在所述细胞中表达蛋白,分泌该重组蛋白穿过细胞壁,所述培养基含有表面活性聚合物和单价金属离子的组合且具有至少 0.22 osmol/L 的渗量。本发明的其它方面是这种培养基以及材料组合物。具体地,所述分泌步骤是分泌的增加。所述增加通常相较于未经处理的细胞。此外,本发明如在所附权利要求中所定义。在下文中描述了特定实施方案和优选的参数,它们可以彼此组合地提供。

[0019] 对于成功且廉价的生物药物的生产而言需要成功的蛋白分泌以及增加的产物量 [mg/l 至 g/l]。此外,细胞壁由于它们的(大)分子结构会充当尺寸排阻过滤器。在植物-或真菌细胞中生产重组蛋白时,该事实会阻止大于 90 kDa 的产物分泌进培养基中,此分泌对于进一步加工而言是有利的。相反,所生产的蛋白,如果它们具有分泌信号肽,尽管被运输穿过细胞膜,但随后积累在质外体空间中,即在位于细胞膜和植物细胞壁的外边界之间的隔室中。具有至少 50 kDa 的较小蛋白的分泌也减少。本发明首先增加了蛋白的生产量,并且此外以令人惊讶的方式促进了该蛋白的分泌。根据本发明生产的蛋白可以具有任意大小。在较大蛋白的情况中产生特殊的优点。因此,根据本发明生产的蛋白优选大于 40 kDa、大于 50 kDa、大于 55 kDa、大于 60 kDa、大于 65 kDa、大于 70 kDa、大于 75 kDa、大于 80 kDa 或大于 85 kDa、大于 90 kDa。所述蛋白也可以是这种蛋白的二聚体或异聚体。

[0020] 所述单价金属离子优选地选自碱金属离子,诸如 Li、Na、K、Rb 或 Cs。特别优选地,所述单价金属离子包含或是 Na 离子。

[0021] 优选地,所述金属离子,例如 Na 离子,以至少 20 mM 的浓度,特别优选地以至少 30 mM、至少 40 mM、至少 50 mM、至少 60 mM、至少 70 mM、至少 80 mM、至少 90 mM 或至少 100 mM 的浓度存在于培养基中。优选地,以这些浓度之一存在的金属离子是钠。

[0022] 通过添加所述金属离子导致渗量的增加。这促进穿过细胞壁的分泌,但也引起对细胞的显著压力,由此减缓或完全阻止或生长。蛋白的生产也减缓。优选地,所述渗量为至少 0.33 osmol/L、至少 0.34 osmol/L、至少 0.35 osmol/L、至少 0.36 osmol/L、至少 0.37 osmol/L、至少 0.38 osmol/L 或至少 0.4 osmol/L。具体地,所述渗量在 0.32 osmol/L 至 0.6 osmol/L、或 0.35 osmol/L 至 0.55 osmol/L 的范围。

[0023] 表面活性聚合物涉及能够降低液体的表面张力或两相之间的界面张力、实现或促进分散体的形成或者充当增溶剂的物质。令人惊讶地,在渗量的情况下通过与金属离子一起使用这种聚合物,可以在具有细胞壁的细胞表达分泌型蛋白时出现显著的产量提高。所述聚合物尤其是非离子的水溶性表面活性聚合物。优选地,所述聚合物对蛋白不具有变性作用。例子是选自以下的聚合物或共聚物:聚醚诸如聚烷基二醇、聚山梨酯或聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇,水溶性的纤维素衍生物诸如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素或羟乙基纤维素,乙烯基吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物(共聚维酮)、聚乙酸乙烯酯、部分地水解的聚乙烯醇、聚乙烯醇-聚乙二醇共聚物及其混合物。

[0024] 优选地,所述聚合物中存在的羰基氧($O=R_1$)和/或醚氧(R_1-O-R_2)的比例是聚合物的分子量的至少 1 重量%。不限于特定理论,这样的氧基团在聚合物中似乎导致细胞的稳定化,使得具有高渗量的含盐培养基被更好地耐受,并从而可以实现高的生产力。优选地,所述聚合物的羰基氧和醚氧的比例为至少 1.5 重量%、至少 2.5 重量%、或至少 5 重量%,特别优选至少 10 重量%、至少 15 重量%、至少 20 重量%、至少 25 重量%。所述聚合物的羰基氧和醚氧的比例优选在 1 重量%至 50 重量%之间,优选在 10 重量%至 42 重量%之间,尤其是在 5 重量%至 38 重量%之间,例如,在聚乙二醇中 36 重量%(仅醚氧)或如在 PVP 中 14.5 重量%(仅羰基氧)。

[0025] 所述聚醚优选地是聚烷基二醇的聚合物或共聚物,例如聚乙二醇(PEG)的聚合物或共聚物,或聚丙二醇的聚合物或共聚物,或聚乙烯-聚氧化丙烯共聚物。所述聚合的烷基也可以是各个亚烷基的混合物,例如如在泊洛沙姆中。所述烷基优选地选自 C_1 - C_8 亚烷基,具体地选自 C_2 -、 C_3 -、 C_4 -、 C_5 -、 C_6 -、 C_7 - 亚烷基或其混合物。聚烷基二醇可以根据式 $[-R-O-]_n$ 来构造,其中 R 代表烷基。端位上可以彼此独立地提供 OH 基团、酯-或醚基团。所述酯-或醚基团可以彼此独立地选自如已述及的 C_1 - C_8 基团,或选自更长的有机链,诸如 C_9 - C_{18} 。它们可以经由连接基团连接,所述连接基团优选 C_1 - C_{12} - 连接基团,如芳基(例如在辛苯昔醇(Triton X-100)或壬苯醇醚中)。所述聚醚或聚烷基二醇优选地含有至少一个 OH- 基团,优选至少 2 个 OH- 基团。它们可以是端基。

[0026] 所述表面活性聚合物(例如 PEG 等)的分子量优选为至少 500 Da、特别优选地至少 1,000 Da、至少 1,500 Da、至少 2,000 Da、至少 3,000 Da、至少 4,000 Da、至少 6,000 Da、至少 8,000 Da、至少 10,000 Da、至少 20,000 Da、至少 30,000 Da。特别优选地,所述分子量在 500 Da 至 2,000,000 Da 之间,优选地在 1,000 Da 至 200,000 Da 之间,或在 1,200 Da 至 80,000 Da 之间。

[0027] 所述表面活性聚合物优选地以至少 0.05 重量%,特别优选至少 0.08%、至少 0.1% 或至少 1.5% 的浓度存在于培养基中(所有 % 数据以重量 % 给出)。

[0028] 在特定实施方案中,以悬浮培养或水培、特别是以毛状根培养来培养所述细胞。用根据本发明的培养基处理分泌细胞,以增加它们的分泌活性。

[0029] 在根据本发明的细胞的情况中,大都从细胞的质外体空间分泌到培养基中。为了分泌,任选地到质外体空间中,所述蛋白通常与用于质外体空间或用于分泌的信号序列一起表达。合适的信号序列是本领域充分已知的,例如在上述的文献中,并且可以根据本发明使用。

[0030] 根据本发明的方法特别适合增加具有细胞壁的细胞的分泌。这样的细胞可以选自植物细胞、真菌细胞或藻类细胞。本文中,“细胞”可以是指分离的细胞、单个细胞或在多细胞生物体中的细胞。植物细胞可以是植物的单个细胞或在植物中或在植物组织中的细胞。类似地,真菌细胞可以是单个细胞或在真菌中或在真菌组织中的细胞。藻类细胞优选地是绿色藻类细胞。组织可以例如选自韧皮部、木质部、叶肉、茎、叶、原植体、原丝体、绿丝体(Chloronema)、茎丝体、假根或配子托。所述细胞可以包含原生质体或实质细胞、特别是愈伤组织细胞或由其组成。

[0031] 在根据本发明的方法中待使用的细胞优选地是植物细胞,优选是苔藓类植物的细胞,尤其是选自藓类植物(Laubmoosen)和苔类植物(Lebermoosen),其中特别优选使用立碗藓属(Physcomitrella)、葫芦藓属(Funaria)、泥炭藓属(Sphagnum)和角齿藓属(Ceratodon)以及地钱属(Marchantia)和Sphaerocarpus的种。最优选地,使用苔藓类植物小立碗藓的细胞、植物或植物组织,诸如原丝体进行根据本发明的方法。进一步优选的植物是烟草、菜豆(Bohnen)或扁豆(Linsen)。优选地,所述植物是水生植物,例如属于浮萍属(Lemna)、紫萍属(Spirodela)、少根紫萍属(Landoltia)、芜萍属(Wolffia)或扁平无根萍属(Wolffiella)。

[0032] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,在基本上不含糖、维生素和植物激素或功能片段的培养基中培养细胞。合适的植物激素的例子是生长激素,例如生长素。

[0033] 优选地,在光合自养生长条件下进行根据本发明的方法。根据本发明的方法提供完全分化的植物、植物细胞或藻类在可标准化的光合自养条件(即不需要添加糖、维生素和植物激素等)下培养的可能性。

[0034] 其实当然也可以使用糖、维生素或植物激素,尤其是在用于不能光合自养生长的真菌细胞的培养基中。对真菌细胞而言,应当提供分解代谢的碳源。由于细胞的自养性能,所述培养基可以不含蛋白。优选地,所述培养基是灭菌的培养基,以减小感染的危险。还可以给该培养基补充抗生素,以保护细胞免受侵袭这些细胞的病原体的危害。

[0035] 所述培养基的pH值优选在3.5-8.5之间,特别优选地在4-8之间或在4.5-7之间或在5-6.5之间,特别是在5.5-6之间。由此,将pH值优化至最佳生长或表达条件。

[0036] 为了最佳生长或增加的蛋白生产,该培养基应当含有各自的细胞的微量营养物,尤其是矿物质。该培养基优选地包含:硝酸根离子,优选以至少0.2 mM的浓度,磷酸根离子,优选以至少0.05 mM的浓度,硫酸根离子,优选以至少0.02 mM的浓度,钙离子,优选以至少0.1 mM的浓度,钾离子,优选以至少0.1 mM的浓度,或它们的组合。该培养基也可以含有钠离子,优选以至少20 mM的浓度。

[0037] 在本发明的具体实施方案中,所述方法在所述(增加)重组蛋白在所述培养基中分泌的步骤之前还包括另一个步骤。在该前一步骤中,使所述细胞在具有小于0.1 osmol/L的渗量的培养基中生长,尤其是没有所提及的分泌(的增加),由此蛋白积累在细胞内部或在细胞的质外体空间中。所述前一步骤特别促进蛋白表达,即使在所述条件下没有增加

分泌这些蛋白。通过如上所述的随后的（增加）分泌的步骤，最后可在不破坏细胞的情况下分泌和收获增产的蛋白。通过该两步法可使产量显著增加。

[0038] 在该前一步骤中的培养基可以具有与分泌步骤中的培养基基本上相同的组成 - 区别在于由于更低的金属离子浓度而具有更低的渗量。优选地，前一步骤中的培养基含有 - 类似于或独立于分泌步骤中的培养基的组成 - 硝酸根离子，优选以至少 0.2 mM 的浓度，磷酸根离子，优选以至少 0.05 mM 的浓度，硫酸根离子，优选以至少 0.02 mM 的浓度，钙离子，优选以至少 0.1 mM 的浓度，钾离子，优选以至少 0.1 mM 的浓度，或它们的组合。由此能实现细胞的最佳生长。优选地，钠离子的浓度为最大 20 mM，特别优选最大 15 mM 或最大 10 mM。

[0039] 优选地，在所述前一步骤中的培养基不含有表面活性聚合物，或以最大 0.08 重量 % 或浓度 0.01 重量 % 或浓度 0.005 重量 % 的浓度含有表面活性聚合物。

[0040] 在所述前一步骤中，该培养基还可以基本上不含糖、维生素和植物激素或其功能片段，或者在替代实施方案中它可以含有这些物质。该培养基可以是无菌的或含有抗生素。在所述前一步骤中的培养基的 pH 值优选在 3-8 之间，特别优选地在 3.5-7 之间，或在 4-6.5 之间，或在 4.1-6 之间，特别是在 4.2-5.5 之间。

[0041] 优选地，在前一步骤的培养基中和 / 或在分泌步骤中，用气体处理细胞，尤其是用空气或氧气。用于进行气体处理的气体优选地含有二氧化碳。该气体中的二氧化碳的比例优选地在 0-10 体积 % 之间，特别优选地在 1-9 体积 % 之间或在 1.5-8 体积 % 之间，特别优选地在 1.7-5 体积 % 之间。二氧化碳充当植物的碳源，并且应当在光合自养条件下提供。

[0042] 在前一步骤中和 / 或在分泌步骤中的温度优选在 10°C 至 30°C 之间，特别优选地在 15°C 至 26°C 之间。

[0043] 以光子通量密度（以 μE 计）为单位测量的光辐照优选地是在 1-3000 之间，特别是在 100-2200 之间。

[0044] 所述前一步骤可进行 2-30 天的时间。在该时间内，实现该重组蛋白的最佳生产。

[0045] 所述（增加）分泌的步骤可进行至少 2 天的时间，优选进行 3-120 天。在该时间内，实现事先产生的或在该步骤中产生的重组蛋白的最佳分泌。

[0046] 所述两步法是基于植物细胞培养物的半连续培养，并且由向培养基中接种植物细胞、用特定物理参数温育和在该过程中添加一些培养基组分组成。在该方法的进程中，通过改变培养基条件，在给点的时间点将蛋白从质外体空间分泌进培养物上清液中。

[0047] 根据本发明的方法通常 - 但并非必然 - 开始于将细胞（例如 0.1 g/l 的干燥生物质）接种进带有培养基的合适生物反应器系统（波浪反应器、恒化器、管式反应器、摇瓶等）中，以及生产生物质直至给定的细胞密度（例如 1-3 g/l）。通过增加渗量，例如通过加入金属离子和所述聚合物（其中在大多数情况下，单独的聚合物不会造成渗量的增加，并且经常甚至造成渗量的降低），开始分泌。经这 2 个阶段由细胞产生和表达蛋白。根据本发明的方法的规模可以是任意缩放的，并且可以用在不同的反应器和量中。可以是最小的生物反应器（微孔滴定板）、摇瓶、5 L 恒化器、100 L 管式反应器和波浪生物反应器（10 L-500 L）。

[0048] 本发明进一步涉及如上所述的培养基，例如以至少 0.05 重量 % 的量包含表面活性聚合物和以至少 20 mM 的浓度包含单价金属离子，并且具有至少 0.32 osmol/L 的渗量。所

述培养基适合用于上述的方法,并且可以用在其中,尤其是在(增加)分泌的步骤中。

[0049] 所述培养基优选地包含:硝酸根离子,优选以至少 0.2 mM 的浓度,磷酸根离子,优选以至少 0.05 mM 的浓度,硫酸根离子,优选以至少 0.02 mM 的浓度,钙离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,钾离子,优选以至少 0.1 mM 的浓度,或它们的组合。所述培养基优选地包含钠离子,优选以至少 40 mM 或至少 60 mM 或至少 80 mM 的浓度。

[0050] 本发明也涉及干燥的营养培养基混合物,其用于重构如上所述的培养基。该营养培养基混合物可以通过加入水产生所述培养基的上述量和浓度。因而,本发明也涉及通过将所述成分溶解在水性溶剂、优选水中来生产所述培养基的方法。

[0051] 通过下述附图和实施例进一步解释本发明,但是不应限于本发明的这些具体实施方案。

[0052] 附图说明:

图 1 显示了通过 NaCl 增加的渗量和聚合物 PEG 对重组生产的抗体的分泌的协同效应;

图 2 显示了由于促进植物生长的矿物质(硝酸钙)产生的额外的增加生产的效应;

图 3 显示了不同的聚合物浓度的作用。

[0053] 实施例:

本发明提供了实现从植物培养物连续将重组蛋白分泌进培养基中的方法。在所述方法中,将生产植物浸没在液体培养物中,在给定的矿质培养基中光合自养地培养。所述培养基对苔藓类植物的最佳营养供给进行了优化,但是本身不会造成重组生产的较大蛋白分泌进培养基中,所述蛋白首先积累在质外体中,并且在分解苔藓类植物组织以后可以作为“细胞内的”测量。

[0054] 通过向培养基中添加渗透活性物质(“分泌组分”),诸如 NaCl 和聚乙二醇(PEG) 4000,可以消除蛋白的质外体抑制。然后可观察到积累的蛋白快速释放到培养基中,和在进一步的培养进程中新合成的蛋白的持续的和立即的分泌。

[0055] 实验实施例:锥形瓶培养物中蛋白分泌的对比

将 180 ml 无菌的 Knop- 或 WM01- 培养基装入 500 ml 锥形瓶中,调节至 pH 4.5-6 (2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液,“MES”),并接种用匀质机新鲜混合的产生试验蛋白的重组菌株的立碗藓原丝体的悬浮培养物。接种密度为 0.1 g 干重/l。将培养物以无菌的且可透气的方式密封,并用富集了 2%CO₂ 的气氛培养。在生长至 1-3 g/l 的细胞密度以后,以无菌浓缩物的形式加入分泌组分。在培养期间,定期测定参数培养物密度(g 干重/l)、细胞内的和细胞外的 IgG- 滴度(mg/l) 的。

[0056] 结果:

生产了下述试验蛋白:

表 1:分泌的试验蛋白

蛋白	分子量 [kDa]	没有分泌培养基的分泌	有分泌培养基 (NaCl, PEG) 的分泌
IgG	145	否	是
α -半乳糖苷酶	80	否	是
VEGF ₁₂₁	50	是	是
Epo	30	是	是
HSA	67	是	是

[0057] 表 2:培养基(所有浓度数据以 mg/l 给出。*除了 MES 以外):

	1	2	3	4	5	6
营养培养基	KNOP	1/10 KNOP	BM	WM01	Murashige & Skoog	Linsmaier & Skoog
KH ₂ PO ₄	250	25	250	500	170	170
NH ₄ NO ₃					1650	1650
KNO ₃					1900	1900
KCl	250	25	250	500		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	250	25	250	500	180.7	
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	1000	100	1000	2000		
CaCl					332.2	332.2
NaCl						
MES*			5 mM	5 mM		

[0058] 另外,可以加入微量元素诸如 H₃BO₃、FeSO₄、Fe-NaEDTA、CoCl₂、CuSO₄、KI、MnCl₂、MnSO₄、Na₂MoO₄、NiCl₂、Na₂SeO₃、乙酸锌或维生素诸如叶酸、肌-肌醇(myo-Inositol)、烟酸、盐酸硫胺素、盐酸吡多辛、生物素或以及甘氨酸。对于真菌培养物,加入额外的分解代谢碳水化合物源,诸如葡萄糖、甘露糖或甘露醇。

[0059] 实施例 1:借助于 PEG 和增加的渗量实现的产量增加

如所述般,在下述参数下,在小立碗藓中表达 IgG 抗体:光照节律 [h] 16/8,初始培养基 KNOP,温度 22°C,培养容器:烧瓶;培养基“1/10 KNOP NaCl”,其除了培养基“1/10 KNOP”以外还含有 100 mM NaCl。培养基“KNOP PEG”和“1/10 KNOP NaCl PEG”,其分别除了培养基“KNOP”和“1/10 KNOP NaCl”以外还含有 4.8 重量%的 PEG-4000。6 周以后的抗体生产的结果呈现在表 3 中和图 1 中。

[0060] 表 3: PEG 和 NaCl (100 mM,用于增加渗量)

	细胞内	细胞外	细胞外/ 总量
烧瓶	ng IgG / mg 干重	ng IgG / mg 干重	%
Knop, 实验1	62.3	4.8	7%
Knop, 实验2	88.5	6.6	7%
Knop, 实验3	84.1	6.4	7%
平均值	78.3	5.9	7%
1/10 Knop NaCl, 实验1	27.3	29.7	52%
1/10 Knop NaCl, 实验2	24.0	30.8	56%
1/10 Knop NaCl, 实验3	19.5	43.1	69%
平均值	23.6	34.5	59%
Knop PEG, 实验1	35.9	4.3	11%
Knop PEG, 实验2	25.0	4.5	15%
Knop PEG, 实验3	33.1	4.5	12%
平均值	31.4	4.4	13%
1/10 Knop NaCl PEG, 实验1	27.7	180.7	87%
1/10 Knop NaCl PEG, 实验2	30.1	175.3	85%
1/10 Knop NaCl PEG, 实验3	36.2	208.2	85%
平均值	31.3	188.1	86%

[0061] 对于 NaCl 和 PEG 的组合,观察到生产力增加和分泌增加,其远超仅有 NaCl 和仅有 PEG 的效应。显然存在协同效应。

[0062] 实施例 2 :借助于 PEG 和增加的渗量和硝酸盐实现的产量增加

如所述般,在下述参数下,在小立碗藓中表达 IgG1 抗体的 λ 链:光照节律 [h] 16/8, 初始培养基 KNOP, 温度 25℃, 光照强度 40 μ E/m²s, 培养容器:烧瓶;在不同的时间间隔以后的抗体生产结果呈现在表 4 中和图 2 中。

[0063] 表 4 :PEG、NaCl (渗量)和硝酸盐(浓度 IgG1,以 μ g/ml 计)

培养天数	7	14	21	28
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl	0.279	0.239	0.053	0.059
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 4.8% PEG, 48mM 甘露醇, 12mM 硝酸钙	1.719	8.947	8.882	10.872
1/10 KNOP 培养基 + 50mM NaCl, 4.8% PEG, 48mM 甘露醇, 12mM 硝酸钙	0.717	5.04	6.125	7.001
1/10 KNOP 培养基+ 无 NaCl, 4.8% PEG, 48mM 甘露醇, 12mM 硝酸钙	0.048	0.086	0.123	0.122
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 4.8% PEG	0.19	2.248	2.363	0.494
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 4.8% PEG, 甘露醇48 mM	0.214	2.041	1.453	0.213
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 4.8% PEG, 12mM 硝酸钙	0.578	6.574	8.226	11.83
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 48mM 甘露醇	0.043	0.132	0.12	0.088
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 12mM 硝酸钙	0.159	1.027	3.715	4.606
1/10 KNOP 培养基 + 100mM NaCl, 48 mM甘露醇, 12 mM硝酸钙	0.185	1.259	3.704	5.087

[0064] 根据这些结果,甘露醇对分泌行为没有影响。由于改善的植物生长,硝酸盐是有利的。在其它实验中,在1-10 mM范围内的钾-、磷酸根-、硫酸根-或钙-离子也表现出基于改善的植物生长的积极作用。在这些低浓度且没有渗量的显著增加的情况中,没有发现对分泌的影响。

[0065] 实施例3:不同的聚合物和聚合物浓度

如所述般,在下述参数下,在小立碗藓中表达 IgG1 抗体的 λ 链:光照节律 [h] 16/8, 初始培养基 KNOP/BM, 温度 25°C, 光照强度 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 培养容器:烧瓶;在不同的时间间隔以后的抗体生产结果呈现在表 5 和 6 中和图 3 中。

[0066] 表 5:培养基组成和 IgG 生产(浓度,以 mM 计)

培养基	1	2	3	4	5	6
镁离子	0.1014	0.501	0.501	0.501	0.501	0.501
钙离子	12.423 5	14.09	14.09	14.09	14.09	14.09
氯离子	100	100	100	100	100	100
硫酸根离子	0.1059	0.501	0.501	0.501	0.501	0.501
硝酸根离子	24.847	28.185	28.185	28.185	28.185	28.185
钾离子	0.1837	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075
钠离子	100	100	100	100	100	100
磷酸根离子	0.1837	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075
MES	0	2.4705	2.4705	2.4705	2.4705	2.4705
甘露醇	48	48	48	48	48	48
PEG [%] w/v	4.8	4.8	1	0.5		
pH	5.8	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9
吐温 20 [w/v]					0.05	0.01

[0067] 表 6 :IgG 生产的结果,以 $\mu\text{g/ml}$ 计

培养基编号	第7天	第14天	第21天
1	1.26	2.98	5.43
2	1.75	5.01	7.2
3	2.05	5.95	8.66
4	1.85	5.61	8.42
5	0.41	0.46	0.57
6	1.88	7.13	14.9

[0068] 基于这些结果,可以得出结论,在存在 PEG 期间,低浓度的 PEG 对分泌不具有负面影响。吐温在较低浓度时(培养基 6)的作用强于在高浓度时(培养基 5)。

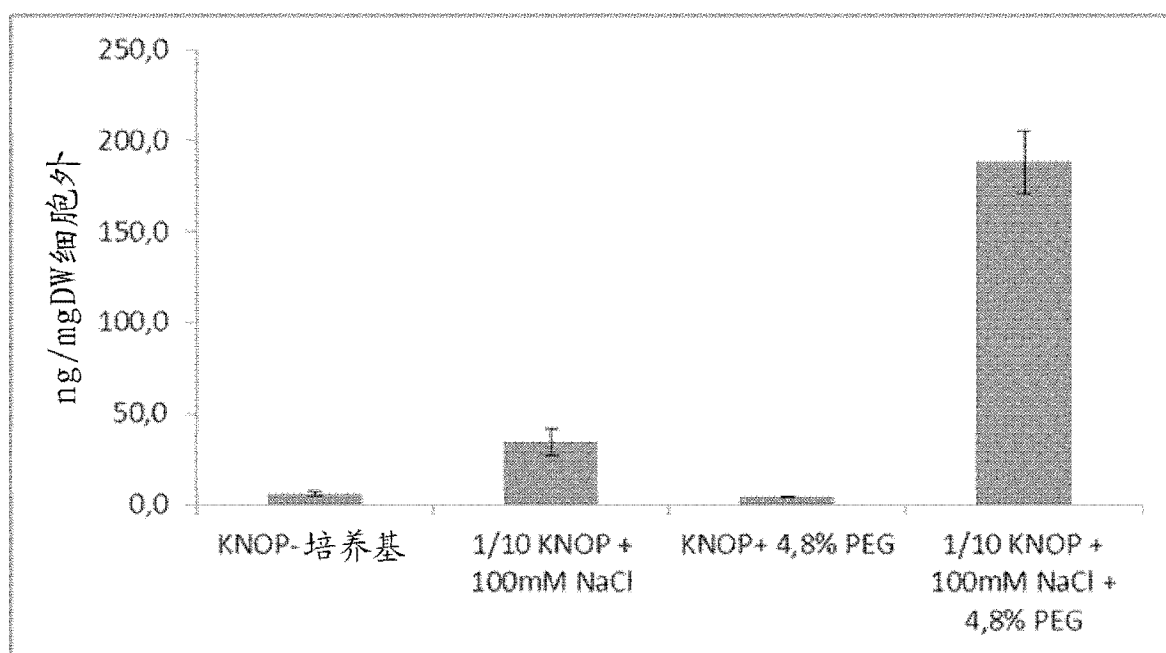


图 1

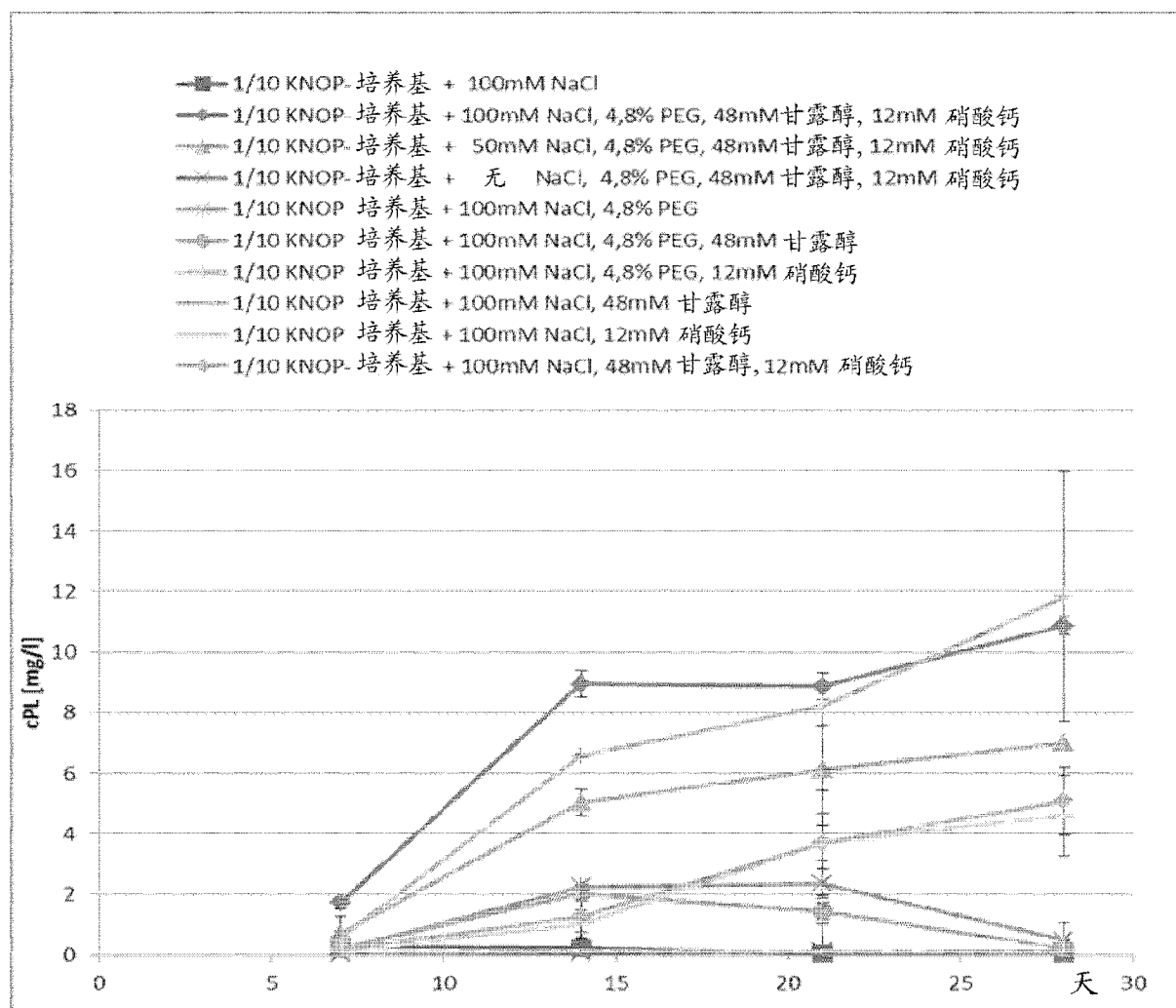


图 2

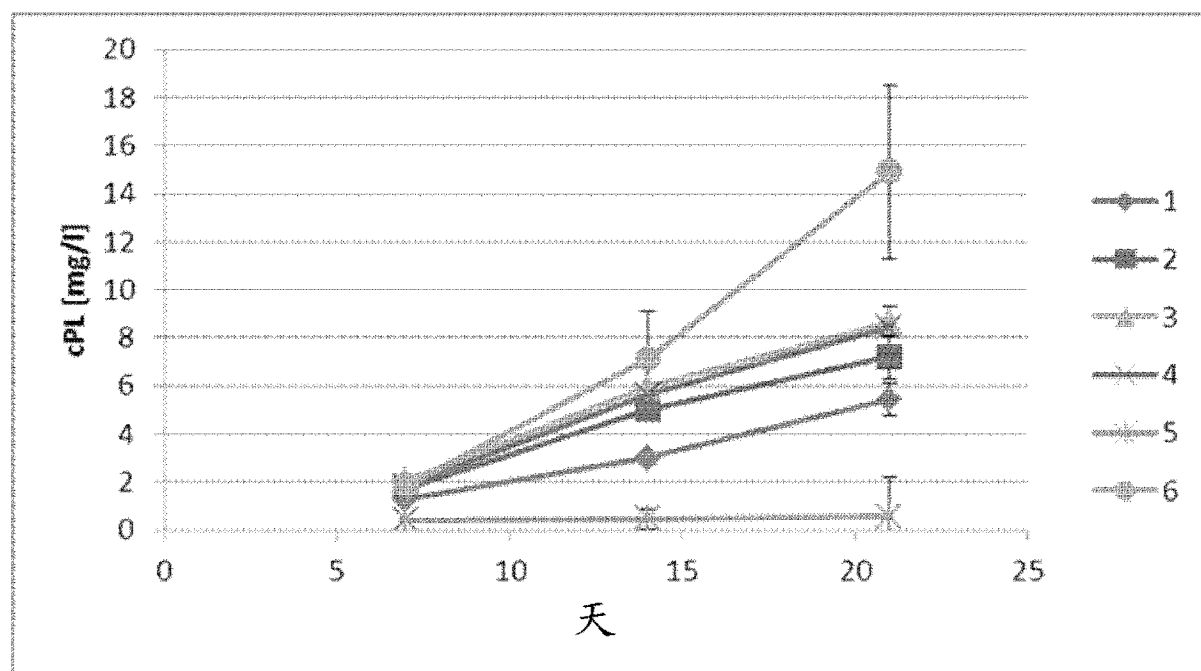


图 3