



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014025306-4 B1**



**(22) Data do Depósito: 17/04/2013**

**(45) Data de Concessão: 30/11/2021**

**(54) Título:** PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM CÉLULAS VEGETAIS COM UMA PAREDE CELULAR, MEIO DE CULTURA ADEQUADO PARA PROMOVER A SECREÇÃO E MISTURA SECA DO MESMO

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/82; C12P 21/02; C12N 5/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 17/04/2012 EP 12164458.7.

**(73) Titular(es):** ELEVA GMBH.

**(72) Inventor(es):** WOLFGANG JOST; MATHIAS KNAPPENBERGER; DOREEN CLAUSSNITZER; ANDREAS SCHAAF.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2013057956 de 17/04/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/156504 de 24/10/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 10/10/2014

**(57) Resumo:** PROCESSO PARA AUMENTAR A SECREÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES. A presente invenção refere-se a um processo para a produção de uma proteína recombinante em células com uma parede celular, compreendendo a etapa do aumento da secreção da proteína recombinante através da parede celular por meio da expressão da proteína nas células em um meio de cultura, contendo uma combinação de um polímero tensoativo e íons metálicos monovalentes e com uma osmolaridade de pelo menos 0,32 osmol/l, bem como meios de cultura e misturas de nutrientes para o processo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM CÉLULAS VEGETAIS COM UMA PAREDE CELULAR, MEIO DE CULTURA ADEQUADO PARA PROMOVER A SECREÇÃO E MISTURA SECA DO MESMO".**

[001] A presente invenção refere-se à otimização de sistemas de expressão recombinantes vegetais ou fúngicos através do uso de processos de expressão adequados.

[002] A produção de proteínas recombinantes na faixa de concentração de ng/1 a µg/1 em plantas foi descrita em várias publicações. A publicação WO 01/25456 A2 refere-se a um processo para a produção de proteínas em musgo sem romper o tecido de musgo ou as células de musgo. Além disso, menciona-se, que o uso de PVP no meio de cultura pode aumentar a produtividade. Isso é mostrado no exemplo da produção recombinante de VEGF<sub>121</sub>, um pequeno hemodímero glicosilado com um tamanho de 28 kDa (Baur e colaboradores, Journal of Biotechnology 119 (2005): 332 a 342). Baur e colaboradores descreve a transformação transiente de musgo por meio de PEG. O meio para a produção de VEGF era livre de PVP ou PEG.

[003] Drake e colaboradores, Plant Mol Biol 52 (2003): 233 a 241, descreve a expressão recombinante de anticorpos em uma cultura de tecido de planta de tabaco, a saber, raízes. Os anticorpos foram secretados através do processo da rizosecreção na faixa de µg. Sistemas eficazes de expressão de plantas, que se baseiam na rizosecreção são, na maioria, culturas de raízes de cabelo, que podem ser estimuladas através de infecções de *Agrobacterium rhizogenes* de quaisquer plantas (Gaume e colaboradores, Plant Cell Rep 21 (2003) :1188 a 1193).

[004] Komarnysky e colaboradores, Plant Physiology 124 (2000) :

927 a 933) descreve a secreção de proteínas recombinantes através do processo de gutação, no qual as proteínas são separadas das folhas com o líquido de gutação. As taxas de produção diária estavam na faixa de 1 µg/g de massa de folha.

[005] Uma cultura em suspensão de tabaco para a expressão recombinante de proteínas heterólogas é descrita em Kwon e colaboradores, Biotechnology and Bioengineering 81 (7) (2003) : 870 a 875. Células de calos (ou *callus*) de plantas transformadas foram usadas como linha de células para a produção de IL-12 humano. Como aditivo ao meio de cultura celular, três polímeros foram testados para estabilizar sua característica IL-12. PVP e PEG não tinham qualquer efeito. A gelatina levou a uma estabilização de IL-12 até que a partir do dia 5 da cultura, as proteases no meio levaram a um retrocesso da concentração. Resultados similares são descritos em Lee e colaboradores, Journal of Biotechnology 96 (2002) : 205 a 211.

[006] LaCount e colaboradores, Biotechnology Letters 19(1) (1997) : 93 a 96, descreve a estabilização de anticorpos produzidos de forma recombinante ou de GM-CSF através do tratamento com PVP para a proteção contra a degradação da protease.

[007] Lee e Kim, Biotechnology Letters 24 (2002) : 1779 a 1783, descrevem o uso de Pluronic F-68 e polietilenoglicol para a proteção de células de uma cultura em suspensão de tabaco e polietilenoglicol contra danos mecânicos em um biorreator de tanque de agitação.

[008] Magnuson e colaboradores, Protein Expression and Purification 7 (1996): 220 a 228, descreve a expressão de uma cadeia com peso de 50 kDa de um anticorpo monoclonal em uma cultura em suspensão de células de tabaco. Através da adição de PVP no meio de cultura, o rendimento aumentou em 35 vezes. Isso foi atribuído a uma estabilização da proteína, bem como ao impedimento da agregação e deposição em paredes do recipiente. 66% da proteína

foram encontrados no citoplasma, 30% na fração da membrana e apenas 4% no meio. Proteínas grandes com uma massa molar superior a 50 kDa foram considerados como sendo grandes demais para a passagem através da parede celular, apesar de sequências de sinais secretórios, que sinalizam apenas a passagem através da membrana celular.

[009] Schuster e colaboradores, Biotechnol. J. 2 (2002) : 1 a 9, descreve a produção de um anticorpo em protoplastos de musgo. O rendimento aumentou de 0,1 a 0,5 µg/ml para 8,2 µg/ml, através do cultivo em uma mistura de meio 3M e Wr com a transformação anterior de eficiência aumentada segundo Baur e colaboradores (supra).

[0010] Tsoi e Doran, Biotechnol. Appl. Biochem. 35 (2002) : 171 a 180, descrevem diversos meios para a expressão e sua influência sobre a expressão de anticorpos através de culturas em suspensão de células de tabaco. O rendimento dos anticorpos secretados situou-se entre 20 e 200 µg / 50 ml de meio de cultura.

[0011] O US 2010/035327 A1 refere-se a um aditivo de meio de cultura universal, que é preparado a partir de polissacarídeos de arroz e polipeptídeos. Esse deve aumentar tanto o crescimento, como também a secreção de produtos celulares. O problema da secreção através de uma parede celular não é abordado no mesmo.

[0012] David e colaboradores, Journal of Biotechnology 150 (1) (2010): 115 a 124, refere-se à produção recombinante de fragmentos de anticorpos em *Bacillus megaterium*, portanto, a nenhuma célula com parede celular.

[0013] Baur e colaboradores, Plant Biotechnology Journal 3 (3) (2005): 331 a 340, descreve *P. patens* como sistema de expressão e uma secreção aumentada do fator de crescimento recombinante humano (VEGF) através da utilização de aditivos (PVP) e através da expressão de albumina de soro humano.

[0014] Decker e colaboradores, Bioprocess and Biosystems Engineering Jan 31 (1) (2008): 3 a 9, descreve de modo geral as condições de cultura em biorreatores de musgo e a engenharia do glicol específica para plantas.

[0015] Twyman e colaboradores, Trends in Biotechnology 21 (12) (2003): 570 a 578, descreve a utilização de plantas como sistemas de expressão recombinantes. Em relação ao tópico do rendimento, são discutidos sistemas de transfecção, sequências sinal e a estabilidade do mRNA.

[0016] Apesar dos processos conhecidos para o aumento da produtividade de plantas e células de plantas na produção recombinante de proteínas heterólogas, os sistemas vegetais ainda são menos produtivos do que as células animais, tais como, por exemplo, os sistemas de expressão CHO estabelecidos. Por conseguinte, há uma necessidade contínua para aumentar ainda mais os sistemas de expressão vegetais. Adicionalmente, a produção de proteínas secretadas é desejável, de modo que as células produtoras não precisam ser destruídos e, além disso, podem servir para a produção.

[0017] Portanto, um objetivo da presente invenção é pôr à disposição melhores processos de expressão e meios para esse fim.

[0018] A presente invenção refere-se a um processo para a produção de uma proteína recombinante em células com uma parede celular, compreendendo a etapa da secreção da proteína recombinante através da parede celular por meio da expressão da proteína nas células em um meio de cultura contendo uma combinação de um polímero tensoativo e de íons metálicos monovalentes e com uma osmolaridade de pelo menos 0,22 osmol/L. Outros aspectos da presente invenção são tais meios de cultura, bem como composições de materiais. A etapa da secreção é

particularmente um aumento da secreção. O aumento é usualmente em comparação com as células não tratadas. A invenção é definida adiante nas reivindicações. A seguir, são descritas concretizações particulares e preferivelmente parâmetros, que podem ser previstos em combinação entre si.

[0019] Para uma produção eficiente e econômica de biofármacos, é necessária uma secreção eficiente de proteínas e um aumento da quantidade de produto [mg/l até g/l]. Além disso, as paredes celulares, condicionadas por sua estrutura (macro)molecular, representam um filtro de exclusão de tamanho. Na produção de proteínas recombinantes em células de plantas ou fungos, esse fato previne uma secreção de produtos maiores de 90 kDa no meio de cultura, que seria vantajosa para o outro processamento. Pelo contrário, as proteínas produzidas, desde que sejam providas de um peptídeo sinal secretor, são transportadas, de fato, através da membrana celular, mas depois acumulam-se no ambiente apoplástico, portanto, no compartimento entre a membrana celular e na extremidade exterior da parede celular da planta. Também proteínas menores a partir de 50 kDa são apenas pouco secretadas. A presente invenção aumenta inicialmente a produção de proteínas e, além disso, promove de maneira surpreendente a secreção dessas proteínas. Proteínas produzidas de acordo com a invenção podem ser de qualquer tamanho. As vantagens particulares ajustam-se em proteínas maiores. Por conseguinte, as proteínas produzidas de acordo com a invenção são preferivelmente maiores de 40 kDa, maiores de 50 kDa, maiores de 55 kDa, maiores de 60 kDa, maiores de 65 kDa, maiores de 70 kDa, maiores de 75 kDa, maiores de 80 kDa ou maiores de 85 kDa, maiores de 90 kDa. As proteínas podem ser também dímeros ou heterômeros de tais proteínas.

[0020] Os íons metálicos monovalentes são preferivelmente

selecionados de íons de metais alcalinos, tais como Li, Na, K, Rb ou Cs. De modo particularmente preferido, são compreendidos ou os íons de Na são íons metálicos monovalentes.

[0021] Preferivelmente, o íon metálico, por exemplo, o íon Na está presente no meio em uma concentração de pelo menos 20 mM, em particular, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 30 mM, pelo menos 40 mM, pelo menos 50 mM, pelo menos 60 mM, pelo menos 70 mM, pelo menos 80 mM, pelo menos 90 mM ou pelo menos 100 mM. O íon metálico em uma dessas concentrações é preferivelmente sódio.

[0022] Através da adição do íon metálico, a osmolaridade aumenta. Isso promove a secreção através da parede celular, mas também causa um considerável estresse sobre a célula, o que desacelera o crescimento ou esse é completamente interrompido. A produção de proteína também é desacelerada. Preferivelmente, a osmolaridade é de pelo menos 0,33 osmol/L, pelo menos 0,34 osmol/, pelo menos 0,35 osmol/L, pelo menos 0,36 osmol/L, pelo menos 0,37 osmol/L, pelo menos 0,38 osmol/L ou pelo menos 0,4 osmol/L. De modo especial, a osmolaridade situa-se na faixa de 0,32 osmol/L a 0,6 osmol/L ou também de 0,35 osmol/L a 0,55 osmol/L.

[0023] O polímero tensoativo refere-se a substâncias, que reduzem a tensão superficial de um líquido ou a tensão superficial entre duas fases e permitem ou suportam a formação de dispersões ou podem agir como promotores de dissolução. Surpreendentemente, através do uso de um tal polímero juntamente com um íon metálico com alta osmolaridade, foi possível ajustar um aumento significativo da produção na expressão de proteínas secretadas em células com parede celular. O polímero é particularmente um polímero tensoativo hidrossolúvel não iônico. Preferivelmente, esse não é desnaturante sobre proteínas. São exemplos os polímeros ou copolímeros

selecionados de poliéteres, tais como polialquilenoglicóis, polisorbato ou polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, derivados de celulose hidrossolúveis, tais como hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, carboximetilcelulose ou hidroxietilcelulose, copolímero de vinilpirrolidona/acetato de vinila (copovidonas), acetato de polivinila, álcool polivinílico parcialmente hidrolisado, copolímeros de álcool polivinílico-polietilenoglicol e misturas dos mesmos.

[0024] Preferivelmente, a porção de carbonil oxigênio ( $O=R_1$ ) e/ou éter oxigênio ( $R_1-O-R_2$ ) do polímero é de pelo menos 1% em peso, do peso molar do polímero. Sem estar restrito a uma determinada teoria, parece que tais grupos de oxigênio no polímero levam a uma estabilização da célula, de modo que o meio contendo sal com alta osmolaridade é melhor tolerado e, com isso, permite uma alta produtividade. Preferivelmente, a porção de carbonil oxigênio e éter oxigênio do polímero é de pelo menos 1,5% em peso, pelo menos 2,5% em peso ou pelo menos 5% em peso, de modo especialmente preferido, pelo menos 10% em peso, pelo menos 15% em peso, pelo menos 20% em peso, pelo menos 25% em peso. A porção de carbonil oxigênio e éter oxigênio do polímero situa-se preferivelmente entre 10% em peso e 42% em peso, em particular, entre 5% em peso e 38% em peso, por exemplo, tal como no polietilenoglicol, de 36% em peso (somente o éter oxigênio) ou tal como no PVP, de 14,5% em peso (somente o carbonil oxigênio).

[0025] O poliéter é preferivelmente um polímero ou copolímero de um polialquilglicol, por exemplo, de polietilenoglicol (PEG) ou de polipropilenoglicol ou copolímeros de polietileno-óxido de polipropileno. A alquila polimerizada pode ser também uma mistura de alquilenos individuais, tal como em um poloxâmero. Preferivelmente, a alquila é selecionada de C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alquileno, essa é particularmente selecionada de C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>-, C<sub>5</sub>-, C<sub>6</sub>-, C<sub>7</sub>-alquileno ou de misturas do mesmo. Um

polialquilglicol pode ser formado de acordo com a fórmula [-R-O-]<sub>n</sub>, em que R representa o grupo alquila. Na posição terminal podem ser previstos, independentemente uns dos outros, grupos OH, grupos éster ou éter. Os grupos éster ou éter podem ser selecionados, independentemente uns dos outros, de grupos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, tal como já foi mencionado ou, então, também de cadeias orgânicas mais longas, tais como C<sub>9</sub>-C<sub>18</sub>. Essas podem estar ligadas através de um grupo de ligação, preferivelmente um grupo de ligação C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, tal como um grupo arila (por exemplo, em octoxinol (Triton X-100) ou nonoxinol). O poliéter ou o polialquilglicol contém preferivelmente pelo menos um grupo OH, preferivelmente pelo menos 2 grupos OH. Esses podem estar em posição terminal.

[0026] O peso molar do polímero tensoativo, por exemplo, PEG e similares, é preferivelmente pelo menos 500 Da, em particular, preferivelmente pelo menos 1.000 Da, pelo menos 1.500 Da, pelo menos 2.000 Da, pelo menos 3.000 Da, pelo menos 4.000 Da, pelo menos 6.000 Da, pelo menos 8.000 Da, pelo menos 10.000 Da, pelo menos 20.000 Da, pelo menos 30.000 Da. De modo especialmente preferido, o peso molar é entre 500 Da e 2.000.000 Da, preferivelmente entre 1.000 Da e 200.000 Da ou entre 1.200 Da e 80.000 Da.

[0027] O polímero tensoativo está presente no meio preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05% em peso, de modo especialmente preferido, de pelo menos 0,08%, pelo menos 0,1% ou pelo menos 1,5% (todos os dados em % são em % em peso).

[0028] Em certas formas de concretização, as células são cultivadas em uma cultura em suspensão ou em uma cultura hidropônica, em particular, em uma cultura de raiz de cabelo. Células secretoras são tratadas com o meio de acordo com a invenção, para aumentar sua atividade secretora.

[0029] Nas células de acordo com a invenção, a secreção no meio é realizada, na maioria das vezes, a partir do compartimento apoplástico da célula. Para a secreção, opcionalmente no compartimento apoplástico, a proteína é expressa, via de regra, com uma sequência de sinalização para compartimento apoplástico ou para a secreção. Sequências de sinalização adequadas são bastante conhecidas no estado da técnica, por exemplo, na literatura inicialmente citada e podem ser usadas de acordo com a invenção.

[0030] O processo de acordo com a invenção é particularmente adequado para aumentar a secreção de células com uma parede celular. Tais células podem ser selecionadas de uma célula vegetal, de uma célula de fungo ou de uma célula de alga. "Célula", tal como é usada aqui, pode se referir a células isoladas, células isoladas ou a uma célula em um organismo multicelular. Uma célula vegetal pode ser uma célula vegetal única ou uma célula em uma planta ou em um tecido vegetal. De maneira análoga, uma célula de fungo pode ser uma célula única ou uma célula em um fungo ou em um tecido fúngicos. A célula de alga é preferivelmente uma célula de alga verde. Os tecidos podem ser selecionados, por exemplo, de floema, xilema, mesófilo, tronco, folhas, talo, protonema, cloronema, caulonema, rizoides ou gametóforos. As células podem compreender ou consistir em protoplastos ou células do parênquima, em particular, células do calo.

[0031] A célula a ser usada no processo de acordo com a invenção é preferivelmente uma célula vegetal, preferivelmente de um musgo, em particular, selecionada do grupo que consiste em musgos de folhas e musgos hepáticos, sendo que as espécies dos gêneros *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* e *Ceratodon* ou *Marchantia* e *Sphaerocarpos* são usados de forma particularmente preferida. Do modo mais preferido, o processo de acordo com a invenção é

realizado usando células, plantas ou tecido vegetal, tal como protonema do musgo de folha *Physcomitrella patens*. Outras plantas preferidas são tabaco, feijão ou lentilha. Preferivelmente, a planta é uma planta aquática, por exemplo, dos gêneros *Lemna*, *Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* ou *Wolffiella*.

[0032] De acordo com uma outra forma de concretização preferida da invenção, a célula é cultivada em um meio de cultura, que é essencialmente livre de açúcares, vitaminas e hormônios vegetais ou de fragmentos funcionais dos mesmos. Hormônios vegetais adequados são, por exemplo, hormônios do crescimento, por exemplo, auxinas.

[0033] O processo de acordo com a invenção é preferivelmente realizado em condições de crescimento fotoautotróficas. O processo de acordo com a invenção oferece a possibilidade do cultivo de plantas, células vegetais ou algas totalmente diferenciadas em condições fotoautotróficas padronizáveis, isto é, sem a necessidade de adicionar açúcares, vitaminas e hormônios vegetais e similares.

[0034] Basicamente, é claro que é possível, usar açúcar, vitaminas ou hormônios vegetais, em particular, em meios para células de fungos, que não crescem fotoautotroficamente. Para células de fungos, deveria ser prevista uma fonte de carbono catabólica. Com base na característica autotrófica das células, o meio pode ser livre de proteína. O meio é preferivelmente um meio esterilizado, para reduzir o risco de infecções. Ao meio também pode ser acrescentado um antibiótico, para proteger as células contra patógenos, que atacam essas células.

[0035] O valor de pH do meio de cultura situa-se preferivelmente entre 3,5 e 8,5, em particular, preferivelmente entre 4 e 8 ou entre 4,5 e 7 ou entre 5 e 6,5, em particular, entre 5,5 e 6. Com isso, o valor de pH é otimizado para um crescimento ou condições de expressão

ideais.

[0036] Para um crescimento ideal ou uma produção de proteína aumentada, o meio deveria conter micronutrientes para as respectivas células, em particular, substâncias minerais. O meio comprehende preferivelmente íons nitrato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,2 mM, íons fosfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05 mM, íons sulfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,02 mM, íons cálcio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons potássio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM ou combinações dos mesmos. O meio pode conter também íons sódio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 20 mM.

[0037] Em formas de concretização especiais da presente invenção, o processo contém ainda uma outra etapa da etapa mencionada (do aumento) da secreção da proteína recombinante no meio mencionado. Com essa etapa precedente, as células são deixadas crescer em um meio de cultura com uma osmolaridade inferior a 0,1 osmol/L, em particular, sem o (aumento da) secreção mencionado, com o que a proteína se acumula no interior da célula ou no compartimento apoplástico. Essa etapa precedente promove especialmente a expressão da proteína, mesmo também se essas proteínas não secretam mais nessas condições. Através da etapa seguinte (do aumento) da secreção tal como descrito acima, as proteínas cada vez mais produzidas podem, por fim, ser secretadas e coletadas sem a destruição das células. Através desse processo de duas etapas, são possíveis aumentos consideráveis da produção.

[0038] O meio de cultura nessa etapa precedente pode, basicamente, ser composto igual ao meio de cultura na etapa de secreção – com a diferença da osmolaridade mais baixa em consequência de uma concentração mais baixa do íon metálico. O

meio de cultura na etapa precedente contém preferivelmente – de maneira análoga ou independente da composição do meio na etapa de secreção – íons nitrato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,2 mM, íons fosfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05 mM, íons sulfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,02 mM, íons cálcio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons potássio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM ou combinações dos mesmos. Isso permite um ótimo crescimento das células. A concentração dos íons sódio é de no máximo 20 mM, em particular, preferivelmente no máximo 15 mM ou no máximo 10 mM.

[0039] Preferivelmente, o meio de cultura na etapa precedente mencionada é livre do polímero tensoativo ou contém o mesmo em uma concentração de no máximo 0,08% em peso ou no máximo 0,01% em peso ou no máximo 0,005% em peso.

[0040] Também nessa etapa, o meio de cultura pode ser essencialmente livre de açúcares, vitaminas e hormônios vegetais ou de fragmentos funcionais dos mesmos ou em formas de concretização alternativas, esse pode conter os mesmos. O meio de cultura pode ser estéril ou conter um antibiótico. O valor de pH do meio de cultura na etapa precedente situa-se preferivelmente entre 3 e 8, em particular, preferivelmente entre 3,5 e 7 ou entre 4 e 6,5 ou entre 4,1 e 6, em particular, entre 4,2 e 5,5.

[0041] Preferivelmente, as células no meio de cultura da etapa precedentes e/ou na etapa de secreção são gaseificadas, em particular, com ar ou oxigênio. Preferivelmente, o gás para a gaseificação contém dióxido de carbono. Preferivelmente, a porção de dióxido de carbono no gás situa-se entre 0 e 10% em volume, em particular, preferivelmente entre 1 e 9% em volume ou entre 1,5 e 8% em volume, em especial, preferivelmente entre 1,7 e 5% em volume. O

dióxido de carbono serve plantas como fonte de carbono e deveria ser previsto em condições fotoautotróficas.

[0042] A temperatura na etapa precedentes e/ou na etapa de secreção situa-se preferivelmente entre 10°C e 30°C, em especial, preferivelmente entre 15°C e 26°C.

[0043] A incidência de luz medida na densidade de fluxo de fótons (em µE) é preferivelmente entre 1 e 3.000, em particular, entre 100 e 2.200.

[0044] A etapa precedente mencionada pode ser realizada por um período de 2 a 30 dias. Nesse período, ocorre uma ótima produção da proteína recombinante.

[0045] A etapa mencionada (do aumento) da secreção pode ser realizada por um período de pelo menos 2 dias, preferivelmente por 3 a 120 dias. Nesse período, ocorre uma ótima secreção da proteína recombinante anteriormente produzida ou produzida nessa etapa.

[0046] O método de duas etapas baseia-se no cultivo semicontínuo da cultura de células de plantas e consiste na inoculação das células de plantas em um meio de cultura, na incubação com parâmetros físicos específicos, bem como na adição de alguns componentes dos meios durante o processo. Durante o método, as proteínas são secretadas em um momento definido do compartimento apoplástico para o sobrenadante da cultura, através da troca de condições do meio.

[0047] O processo de acordo com a invenção começa geralmente – mas não necessariamente – com a inoculação das células (por exemplo, 0,1 g/l de biomassa seca) em sistemas de biorreatores adequados (reator Wave, quimiostato, reator tubular, balão de agitação e assim por diante) com o meio, bem como a produção de biomassa até uma densidade celular definida (por exemplo, 1 a 3 g/l). Através do aumento da osmolaridade, por exemplo, através da adição

do íon metálico e do polímero (sendo que na maioria das vezes o próprio polímero não aumenta a osmolaridade e frequentemente até mesmo a reduz), é iniciada a secreção. Através das duas fases, as células produzem e expressam proteína. O processo de acordo com a invenção pode ser escalonado arbitrariamente e ser usado em diversos reatores e quantidades. São possíveis biorreatores pequenos (placa de microtitulação), balão de agitação, quimiostato de 5 litros, reator tubular de 100 litros, bem como biorreatores Wave (10 litros a 500 litros).

[0048] A invenção refere-se ainda a um meio de cultura, tal como descrito acima, por exemplo, compreendendo o polímero tensoativo em uma quantidade de pelo menos 0,05% em peso e um íon metálico monovalente em uma concentração de pelo menos 20 mM e com uma osmolaridade de pelo menos 0,32 osmol/L. O meio de cultura é adequado para o processo descrito acima e pode ser usado no mesmo, em particular, na etapa da secreção (aumento).

[0049] O meio de cultura compreende preferivelmente íons sódio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,2 mM, íons fosfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05 mM, íons sulfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,02 mM, íons cálcio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons potássio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM ou combinações dos mesmos. O meio compreende preferivelmente íons sódio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 40 mM ou pelo menos 60 mM ou pelo menos 80 mM.

[0050] A invenção refere-se também a uma mistura de meio nutritivo seco para a reconstituição do meio de cultura, tal como descrito acima. A mistura de meio nutritivo, através da adição de água, pode fornecer as quantidades e concentrações acima do meio de

cultura mencionado. Dessa maneira, a invenção refere-se também a um processo para a produção do meio de cultura mencionado através da dissolução das substâncias constitutivas mencionadas em um solvente aquoso, preferivelmente água.

[0051] A presente invenção é ilustrada ainda pelas seguintes figuras e exemplos, sem restringir-se a essas formas de concretização especiais da invenção.

[0052] Figuras:

a Figura 1 mostra o efeito sinergístico de uma osmolaridade aumentada por NaCl e do polímero PEG sobre a secreção de um anticorpo produzido de forma recombinante;

a Figura 2 mostra efeitos adicionais que aumentam a produção através de substâncias minerais promotoras do crescimento de planas (nitrato de Ca);

a Figura 3 mostra o efeito de diferentes concentrações poliméricas.

Exemplos:

[0053] A invenção fornece um método, que permite a secreção constante de proteínas recombinantes de culturas vegetais para o meio de cultura. Nesse caso, as plantas de produção são cultivadas submersas em cultura líquida de forma autotrófica em meios minerais definidos. Os meios de cultura são otimizados com respeito ao abastecimento ideal de nutrientes das plantas de musgo, mas não causam, por si, qualquer saída de proteínas maiores produzidas de forma recombinante para o meio, que inicialmente se acumulam no apoplastro e depois da desintegração do tecido de musgo podem ser medidas como "intracelulares".

[0054] Através da adição de substâncias osmoticamente ativas ("componentes de secreção"), tais como NaCl e polietilenoglicol (PEG) 4000 ao meio de cultura, essa retenção apoplástica das proteínas

pode ser suprimida. Deve-se observar, então, uma rápida saída das proteínas acumuladas para o meio e no outro decurso da cultura, uma secreção constante e relativamente direta de proteínas recentemente sintetizadas.

Exemplo de ensaio: Comparação da secreção de proteína e culturas em Erlenmeyer

[0055] Um balão Erlenmeyer de 500 ml foi enchido com 180 ml de meio de Knop ou WM01, o meio foi ajustado para pH 4,5 a 6 (tampão de ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico, "MES") e inoculado com uma cultura em suspensão de protonema de *Physcomitrella* recentemente homogeneizada usando um homogeneizador Turrax de uma cepa recombinante, produtora de proteína de teste. A densidade da inoculação importou em 0,1 g de peso seco/l. As culturas foram fechadas de forma estéril e permeável ao gás e cultivadas com atmosfera enriquecida com 2% de CO<sub>2</sub>. Depois do crescimento até uma densidade celular de 1 a 3 g/l, realizou-se a adição dos componentes de secreção em forma de um concentrado estéril. Durante o cultivo, determinaram-se regularmente os parâmetros densidade da cultura (g de peso seco/l), título IgG intracelular e extracelular (mg/l).

Resultados:

[0056] Foram produzidas as seguintes proteínas de teste:

Tabela 1: Proteínas de teste excretadas

proteína	MW [kDa]	secreção sem meio de secreção	secreção com meio de secreção (NaCl, PEG)
IgG	145	não	sim
alfa galactosidas e	80	não	sim
VEGF <sub>121</sub>	50	sim	sim
Epo	30	sim	sim
HSA	67	sim	sim

Tabela 2: Meios (todos os dados de concentração em mg/l, \* além de

MES):

	1	2	3	4	5	6
meios nutritivos	KNOP	1 / 20 KNOP	BM	WM01	Murashig e & Skoog	Linsmaier & Skoog
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250	25	250	500	170	170
$\text{NH}_4\text{NO}_3$					1650	1650
$\text{KNO}_3$					1900	1900
KCl	250	25	250	500	180,7	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1000	100	1000	2000		
CaCl					332,2	332,2
NaCl						
MES*			5 mM	5 mM		

[0057] Adicionalmente, podem ser acrescentados microelementos, tais como  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ , Fe-NaEDTA,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ , KI,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , acetato de Zn ou vitaminas, tais como ácido fólico, mio-inositol, ácido nicotínico tiamina-HCl, piridoxina-HCl, biotina ou também glicina. Para culturas de fungos acrescenta-se adicionalmente uma fonte de hidrato de carbono catabólica, tal como glicose ou manitol.

Exemplo 1: Aumento de produção através de PEG e osmolaridade aumentada

[0058] Um anticorpo IgG foi, tal como descrito, expresso nos seguintes parâmetros em *P. patens*: ritmo de luz [h] 16/8, meio de partida KNOP, temperatura 22°C, recipiente de cultura: balão; o meio "1/10 KNOP NaCl" contém adicionalmente ao meio "1/10 KNOP" 100 mM de NaCl. O meio "KNOP PEG" ou "1/10 KNOP NaCl PEG" contém adicionalmente ao meio "KNOP" ou "1/10 KNOP NaCl", 4,8% em peso, de PEG-4000. Os resultados da produção de anticorpos depois de 6 semanas são mostrados na tabela 3 e na figura 1.

Tabela 3: PEG e NaCl (100 mM de aumento da osmolaridade)

	intracelular	extracelular	extra / total
balão	ng de IgG / mg de peso seco	ng de IgG / mg de peso seco	%
Knop, ensaio 1	62,3	4,8	7%
Knop, ensaio 2	88,5	6,6	7%
Knop, ensaio 3	84,1	6,4	7%
média	78,3	5,9	7%
1/10 Knop, NaCl, ensaio 1	27,3	29,7	52%
1/10 Knop NaCl, ensaio 2	24,0	30,8	56%
1/10 Knop NaCl, ensaio 3	19,5	43,1	69%
média	23,6	34,5	59%
Knop PEG, ensaio 1	35,9	4,3	11%
Knop PEG, ensaio 2	25,0	4,5	15%
Knop PEG, ensaio 3	33,1	4,5	12%
média	31,4	4,4	13%
1/10 Knop NaCl PEG, ensaio 1	27,7	180,7	87%
1/10 Knop NaCl PEG, ensaio 2	30,1	175,3	85%
1/10 Knop NaCl PEG, ensaio 3	36,2	208,2	85%
média	31,3	188,1	86%

[0059] Através da combinação de NaCl e PEG, foi observado um aumento de produtividade e aumento de secreção, que excedem amplamente os efeitos de NaCl isoladamente e de PEG isoladamente. Há nitidamente um efeito sinergístico.

Exemplo 2: Aumento de produção através de PEG e osmolaridade aumentada e nitrato

[0060] Uma cadeia lambda de um anticorpo IgG1 foi, tal como descrito, expressa nos seguintes parâmetros em P. patentes: ritmo de luz [h] 16/8, meio de partida KNOP, temperatura 25°C, intensidade da luz 40 µE/m<sup>2</sup> s, recipiente de cultura: balão; os resultados da produção de anticorpos depois de diferentes intervalos de tempo são mostrados na tabela 4 e na figura 2.

Tabela 4: PEG, NaCl (osmolaridade) e nitrato (concentração IgG1 em µg/ml)

dia do cultivo	7	14	21	28
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl	0,279	0,239	0,053	0,059
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 4,8% de PEG, 48 mM de manitol, 1 mM de nitrato de Ca	1,719	8,947	8,882	10,872
1/10 de meio Knop + 50 mM de NaCl, 4,8% de PEG, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de Ca	0,717	5,04	6,125	7,001
1/10 de meio Knop + sem NaCl, 4,8% de PEG, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de Ca	0,048	0,086	0,123	0,122
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 4,8% de PEG	0,19	2,248	2,363	0,494
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 4,8% de PEG, 48 mM de manitol	0,214	2,041	1,453	0,213
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 4,8% de PEG,, 12 mM de nitrato de Ca	0,578	6,574	8,226	11,83
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 48 mM de manitol	0,043	0,132	0,12	0,088
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 12 mM de nitrato de Ca	0,159	1,027	3,715	4,606
1/10 de meio Knop + 100 mM de NaCl, 48 mM de manitol, 12 mM de nitrato de Ca	0,185	1,259	3,704	5,087

[0061] De acordo com esses resultados, o manitol não causa qualquer influência sobre o comportamento de secreção. O nitrato é favorável devido ao melhor crescimento da planta. Do mesmo modo, em outros ensaios são mostrados efeitos positivos de íons potássio, fosfato, sulfato ou cálcio, na faixa de 1 a 10 mM, que são atribuídos ao melhor crescimento da planta. Nessas baixas concentrações, sem aumentar essencialmente a osmolaridade, não se verificou qualquer efeito sobre a secreção.

#### Exemplo 3: Diferentes polímeros e concentrações de polímeros

[0062] Uma cadeia lambda de um anticorpo IgG1 foi, tal como descrito, expressa nos seguintes parâmetros em *P. patens*: ritmo de luz [h] 16/8, meio de partida KNOP/BM, temperatura 25°C, intensidade da luz 40 µE/m<sup>2</sup> s, recipiente de cultura: balão; os resultados da

produção de anticorpos depois de diferentes intervalos de tempo são mostrados nas tabelas 5 e 6 e na figura 3.

Tabela 5: Composição do meio e produção de IgG (concentrações em mM)

meio	1	2	3	4	5	6
íons de magnésio	0,1014	0,501	0,501	0,501	0,501	0,501
íons cálcio	12,4235	14,09	14,09	14,09	14,09	14,09
íons de cloreto	100	100	100	100	100	100
íons sulfato	0,1059	0,501	0,501	0,501	0,501	0,501
íons nitrato	24,847	28,185	28,185	28,185	28,185	28,185
íons potássio	0,1837	0,9075	0,9075	0,9075	0,9075	0,9075
íons sódio	100	100	100	100	100	100
íons fosfato	0,1837	0,9075	0,9075	0,9075	0,9075	0,9075
MES	0	2,4705	2,4705	2,4705	2,4705	2,4705
manitol	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
Tween 20 [w/v]					0,05	0,01

Tabela 6: Resultados da produção de IgG em µg/ml

meio nº	1	14 dias	21 dias
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

[0063] Com base nesses resultados, pode ser verificado, que baixas concentrações de PEG não têm qualquer influência negativa sobre a secreção, enquanto o PEG está presente. O Tween em concentrações mais baixas é mais eficaz do que em altas concentrações (meio 5).

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de uma proteína recombinante em células vegetais com uma parede celular, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa da secreção da proteína recombinante através da parede celular por meio da expressão da proteína nas células em um meio de cultura contendo uma combinação de um polímero tensoativo e íons metálicos monovalentes e com uma osmolaridade de pelo menos 0,32 osmol/L.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a secreção para o meio é realizada a partir do compartimento apoplástico da célula.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a célula vegetal é uma célula em uma planta ou em um tecido vegetal, uma célula de musgo sendo particularmente preferida.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a célula é cultivada em uma cultura em suspensão.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o íon metálico é um íon de metal alcalino, preferivelmente sódio, e/ou o íon metálico está presente no meio em uma concentração de pelo menos 20 mM.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o polímero tensoativo é um polialquilglicol, preferivelmente polietilenoglicol e/ou o polímero tensoativo está presente no meio em uma concentração de pelo menos 0,05% em peso.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o meio compreende íons nitrato, preferivelmente em uma concentração de

pelo menos 0,2 mM, íons fosfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05 mM, íons sulfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,02 mM, íons cálcio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons potássio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons sódio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 20 mM ou combinações dos mesmos.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que antes da referida etapa da secreção da proteína recombinante no referido meio, as células são crescidas em uma etapa anterior em um meio de cultura com uma osmolaridade inferior a 0,1 osmol/L, em particular, sem a referida secreção, causando com que a proteína se acumule no interior da célula ou no compartimento apoplástico das células.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura na referida etapa anterior comprehende íons nitrato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,2 mM, íons fosfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05 mM, íons sulfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,02 mM, íons cálcio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons potássio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM ou combinações dos mesmos; e/ou comprehende íons sódio em uma concentração de no máximo 20 mM.

10. Processo de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura, na referida etapa anterior, não comprehende o polímero tensoativo ou o comprehende em uma concentração de no máximo 0,08% em peso.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, caracterizado pelo fato de que a referida etapa

anterior é realizada por um período de 2 a 30 dias.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que a referida etapa da secreção é realizada por um período de pelo menos 2 dias, preferivelmente por 3 a 120 dias.

13. Meio de cultura adequado para promover a secreção por meio de um processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que compreende o polímero tensoativo em uma quantidade de pelo menos 0,05% em peso e íons metálicos monovalentes em uma concentração de pelo menos 20 mM com uma osmolaridade de pelo menos 0,32 osmol/L.

14. Meio de cultura de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende íons nitrato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,2 mM, íons fosfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,05 mM, íons sulfato, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,02 mM, íons cálcio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons potássio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 0,1 mM, íons sódio, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 40 mM ou combinações dos mesmos.

15. Mistura seca de meio de cultura, caracterizada pelo fato de que é para a reconstituição do meio de cultura como definido na reivindicação 13 ou 14.

1/2

Fig. 1

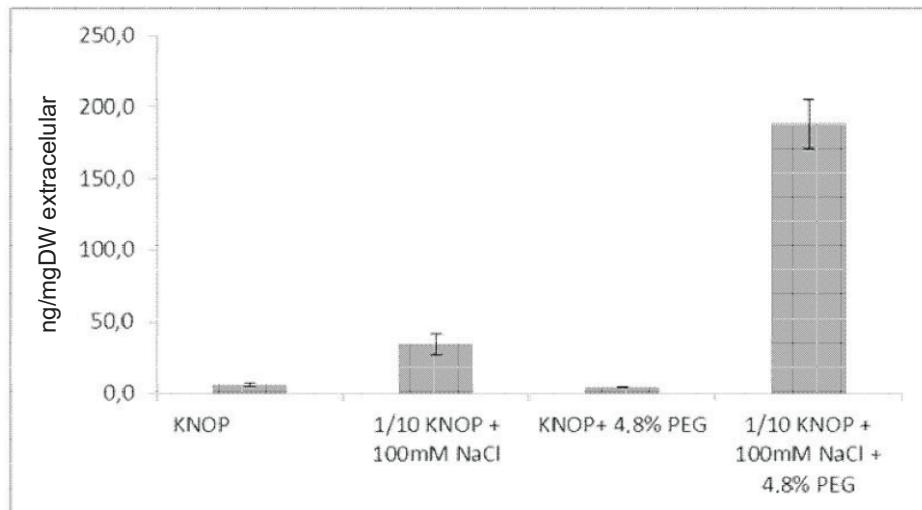
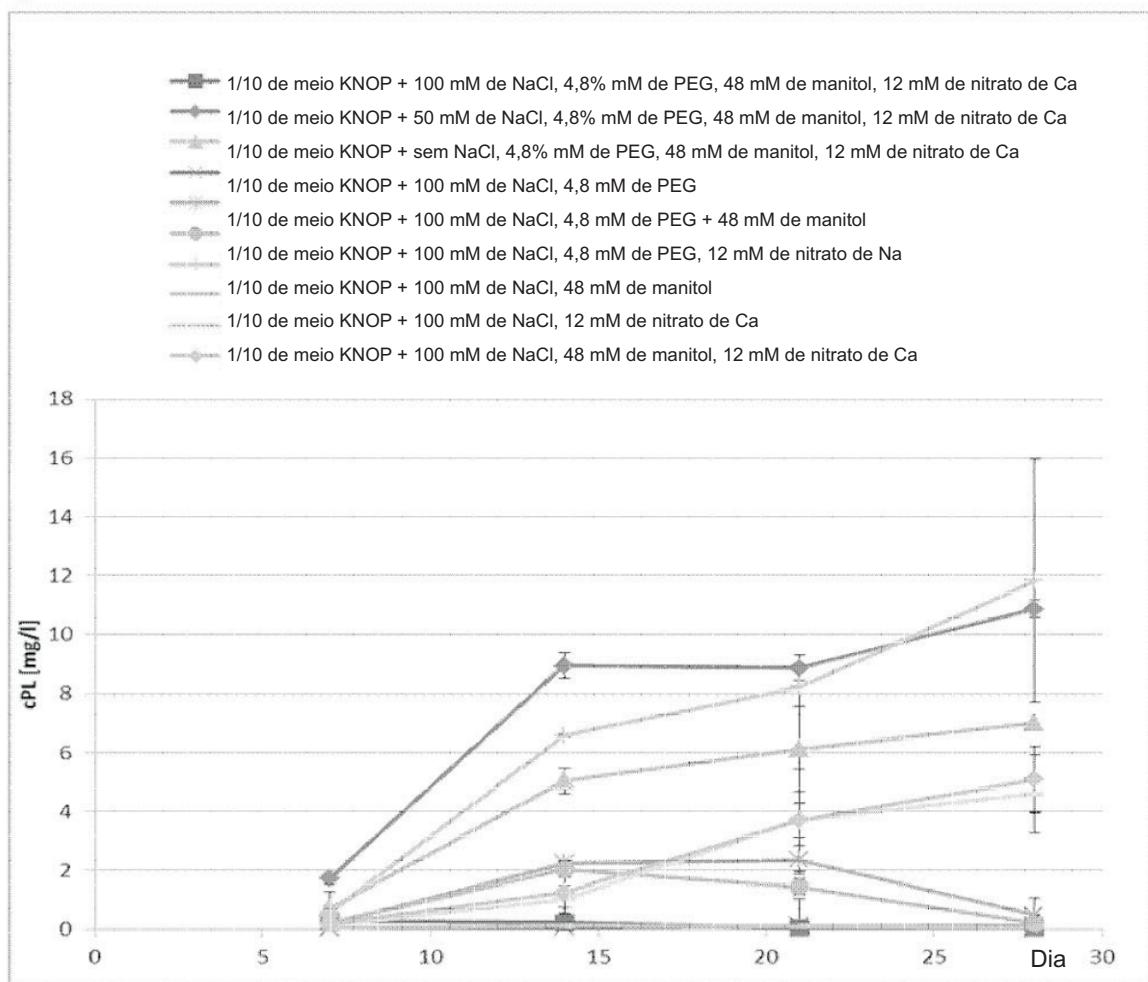


Fig. 2



2/2

Fig. 3

