

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780027778.X

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101535493A

[22] 申请日 2007.7.21

[21] 申请号 200780027778.X

[30] 优先权

[32] 2006.7.27 [33] US [31] 60/833,479

[86] 国际申请 PCT/US2007/016917 2007.7.21

[87] 国际公布 WO2008/013943 英 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.21

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 卫强·威利·孙 厄尔·珀塞尔

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司  
代理人 刘国伟

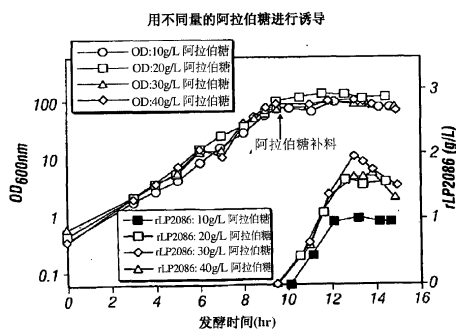
权利要求书6页 说明书23页 附图15页

## [54] 发明名称

用于生产重组蛋白质的高细胞密度补料 - 分批发酵方法

## [57] 摘要

本发明提供生产蛋白质(例如,重组脑膜炎球菌2086蛋白质)的方法、以及高密度蛋白质组合物和用于本发明方法的组合物,所述方法利用补料 - 分批发酵并在达到阈值参数后连续投入诱导物且任选地连续投入碳源(例如,恒定速度投入)以提高蛋白质产量。



1、一种生产重组蛋白质的方法，其包含：

培养表达重组蛋白质的重组细菌细胞，此包含向包含所述重组细菌细胞的培养物中连续添加碳源并在所述培养物达到阈值参数后向所述培养物中连续添加诱导物，和自所述培养物中分离所述重组蛋白质。

2、如权利要求1所述的方法，其中所述阈值参数是光密度(OD)、溶解氧(DO)、培养基中营养物的浓度、添加到培养基中的碳源的总浓度、或其任何组合。

3、如权利要求2所述的方法，其中所述阈值参数是所述培养物的光密度(OD)。

4、如权利要求3所述的方法，其包含当所述培养物的所述细胞密度达到约70至约110 OD<sub>600</sub>时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

5、如权利要求4所述的方法，其包含当所述培养物的所述细胞密度达到约70至约105 OD<sub>600</sub>时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

6、如权利要求5所述的方法，其包含当所述培养物的所述细胞密度达到约75至约85 OD<sub>600</sub>时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

7、如权利要求6所述的方法，其包含当所述培养物的细胞密度达到约80 OD<sub>600</sub>时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

8、如权利要求1所述的方法，其包含以恒定速度将所述诱导物添加到所述培养物中、通过DO恒定补料将所述诱导物添加到所述培养物中或通过pH值恒定补料将所述诱导物添加到所述培养物中。

9、如权利要求1所述的方法，其包含以约3.35 g/L/h至约16 g/L/h的恒定速度将所述诱导物添加到所述培养物中、通过DO恒定补料或通过pH值恒定补料将所述诱导物添加到所述培养物中。

10、如权利要求1所述的方法，其中添加到所述培养物中的所述诱导物的总量为约4 g/L至约40 g/L。

11、如权利要求10所述的方法，其中在诱导物补料期间添加到所述培养物中的所述诱导物的总量为约5 g/L至约20 g/L。

12、如权利要求11所述的方法，其中在诱导物补料期间添加到所述培养物中的所述诱导物的总量为约7 g/L至约15 g/L。

13、如权利要求12所述的方法，其中在诱导物补料期间添加到所述培养物中的所述诱导物的总量为约10 g/L。

14、如权利要求1所述的方法，其包含在所述方法开始后将所述诱导物连续添加到所述培养物中达约2至约8小时。

15、如权利要求14所述的方法，其包含在开始后将所述诱导物连续添加到所述培养物中达约3至约6小时。

16、如权利要求 1 所述的方法，其包含在开始将所述诱导物添加到所述培养物中之后约 2 至约 8 小时分离所述重组蛋白质。

17、如权利要求 16 所述的方法，其包含在开始将所述诱导物添加到所述培养物中之后约 3 至约 6 小时分离所述重组蛋白质。

18、如权利要求 1 所述的方法，其中所述诱导物是阿拉伯糖。

19、如权利要求 1 所述的方法，其包含在诱导之前将所述碳源连续添加到所述培养物中。

20、如权利要求 1 所述的方法，其包含在诱导之前和期间将所述碳源连续添加到所述培养物中。

21、如权利要求 1 所述的方法，其包含在将所述诱导物连续添加到所述培养物中的同时将所述碳源连续添加到所述培养物中。

22、如权利要求 1 所述的方法，其包含将所述碳源连续添加到所述培养物中直到所述培养物的所述细胞密度达到约 70 至约 110 OD<sub>600</sub>。

23、如权利要求 1 所述的方法，其中所述碳源是基于糖的碳源。

24、如权利要求 23 所述的方法，其中所述基于糖的碳源是葡萄糖。

25、如权利要求 24 所述的方法，其中所述诱导物是阿拉伯糖。

26、如权利要求 25 所述的方法，其包含在将所述阿拉伯糖连续添加到所述培养基中的同时将所述葡萄糖连续添加到所述培养基中。

27、如权利要求 25 所述的方法，其包含连续添加所述葡萄糖直到所述培养物的所述细胞密度达到约 80 OD<sub>600</sub>。

28、一种生产重组蛋白质的方法，其包含：

- a) 在诱导型启动子控制下将编码重组蛋白质的表达载体引入到细菌宿主细胞中以形成重组细菌细胞；
- b) 将所述重组细菌细胞引入到培养基中以形成细胞培养物；
- c) 以连续补料形式将碳源添加到所述细胞培养物中；
- d) 监测所述细胞培养物中的细胞生长是否达到阈值光密度(OD<sub>600</sub>)；
- e) 在达到所述阈值光密度(OD<sub>600</sub>)后，以连续补料形式将所述诱导型启动子的诱导物添加到所述细胞培养物中；和
- f) 自所述细胞培养物中分离所述重组蛋白质。

29、如权利要求 28 所述的方法，其包含在所述培养物的所述细胞密度达到约 70 至约 110 OD<sub>600</sub> 时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

30、如权利要求 29 所述的方法，其包含在所述培养物的所述细胞密度达到约 70 至约 105 OD<sub>600</sub> 时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

31、如权利要求 30 所述的方法，其包含在所述培养物的所述细胞密度达到约 75 至约 85 OD<sub>600</sub> 时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

32、如权利要求 31 所述的方法，其包含在所述培养物的所述细胞密度达到约 80

OD<sub>600</sub> 时向所述培养物中连续添加所述诱导物。

33、如权利要求 28 所述的方法，其中所述诱导物是以恒定速度添加到所述培养物中、所述诱导物是通过 DO 恒定补料添加到所述培养物中或所述诱导物是通过 pH 值恒定补料添加到所述培养物中。

34、如权利要求 33 所述的方法，其中所述诱导物是以约 3.35 g/L/h 至约 16 g/L/h 的恒定速度添加到所述培养物中、所述诱导物是通过 DO 恒定补料添加到所述培养物中或所述诱导物是通过 pH 值恒定补料添加到所述培养物中。

35、如权利要求 28 所述的方法，其中添加到所述培养物中的诱导物总量为约 4 g/L 至约 40 g/L。

36、如权利要求 35 所述的方法，其中添加到所述培养物中的诱导物总量为约 5 g/L 至约 20 g/L。

37、如权利要求 36 所述的方法，其中添加到所述培养物中的诱导物总量为约 7 g/L 至约 15 g/L。

38、如权利要求 37 所述的方法，其中添加到所述培养物中的诱导物总量为约 10 g/L。

39、如权利要求 28 所述的方法，其包含在开始诱导物补料后约 2 小时至约 8 小时自所述培养物中分离所述重组蛋白质。

40、如权利要求 39 所述的方法，其包含在开始诱导物补料后约 3 小时至约 6 小时自所述培养物中分离所述重组蛋白质。

41、如权利要求 28 所述的方法，其中在所述碳源和所述诱导物二者的恒定速度补料期间、在所述碳源和所述诱导物二者的 DO 恒定补料期间或在所述碳源和所述诱导物二者的 pH 值恒定补料期间将所述碳源添加到所述细胞培养物中。

42、如权利要求 28 所述的方法，其中所述诱导物是阿拉伯糖。

43、如权利要求 28 所述的方法，其中所述碳源是基于糖的碳源。

44、如权利要求 43 所述的方法，其中所述基于糖的碳源是葡萄糖。

45、如权利要求 28 所述的方法，其中所述碳源是葡萄糖且所述诱导物是阿拉伯糖。

46、如权利要求 45 所述的方法，其包含在将所述阿拉伯糖连续添加到所述细胞培养物中的同时将葡萄糖连续添加到所述细胞培养物中。

47、如权利要求 45 所述的方法，其包含向所述细胞培养物中连续添加葡萄糖直到所述细胞培养物的所述细胞密度达到约 80 OD<sub>600</sub>。

48、一种生产重组蛋白质的方法，其包含：

培养表达重组蛋白质的重组细菌细胞，其是通过在包含所述细菌细胞的培养物达到阈值参数后向所述培养物中连续添加诱导物来培养，其中所述细菌细胞包含对应于脑膜炎奈瑟菌血清群 B (*N. meningitidis* serogroup B) 基因的核酸序列。

49、如权利要求 48 所述的方法，其中所述阈值参数是光密度(OD)、溶解氧(DO)、

pH 值、培养基中营养物的浓度、添加到培养基中的碳源的总浓度、或其任何组合。

50、如权利要求 49 所述的方法，其中所述阈值参数是所述培养物的光密度(OD)。

51、如权利要求 50 所述的方法，其中当所述培养物的所述细胞密度达到约 70 至约 110 OD<sub>600</sub> 时开始所述诱导物连续补料。

52、如权利要求 51 所述的方法，其中当所述培养物的所述细胞密度达到约 70 至约 105 OD<sub>600</sub> 时开始所述诱导物连续补料。

53、如权利要求 52 所述的方法，其中当所述培养物的所述细胞密度达到约 75 至约 85 OD<sub>600</sub> 时开始所述诱导物连续补料。

54、如权利要求 53 所述的方法，其中当所述培养物的所述细胞密度达到约 80 OD<sub>600</sub> 时开始所述诱导物连续补料。

55、如权利要求 48 所述的方法，其中所述诱导物是以约 3.35 g/L/h 至约 16 g/L/h 的恒定速度添加到所述培养物中、所述诱导物是通过 DO 恒定补料来添加或所述诱导物是通过 pH 值恒定补料来添加。

56、如权利要求 48 所述的方法，其中在诱导期间添加到所述培养物中的诱导物总量为约 4 g/L 至约 40 g/L。

57、如权利要求 56 所述的方法，其中在诱导期间添加到所述培养物中的诱导物总量为约 5 g/L 至约 20 g/L。

58、如权利要求 57 所述的方法，其中在诱导期间添加到所述培养基中的诱导物总量为约 7 g/L 至约 15 g/L。

59、如权利要求 58 所述的方法，其中在诱导期间添加到所述培养物中的诱导物总量为约 10 g/L。

60、如权利要求 48 所述的方法，其中在所述方法开始后所述诱导物补料持续约 2 小时至约 8 小时。

61、如权利要求 60 所述的方法，其中在所述方法开始后所述诱导物补料持续约 3 小时至约 6 小时。

62、如权利要求 48 所述的方法，其中在开始诱导物补料后约 2 小时至约 8 小时收获所述重组蛋白质。

63、如权利要求 62 所述的方法，其中在开始诱导物补料后约 3 小时至约 6 小时分离所述重组蛋白质产物。

64、如权利要求 48 所述的方法，其中在将诱导物补加到所述培养物中期间继续将所述碳源补加到所述培养基中。

65、如权利要求 48 所述的方法，其中所述诱导物是阿拉伯糖。

66、如权利要求 48 所述的方法，其中所述碳源是基于糖的碳源。

67、如权利要求 66 所述的方法，其中所述基于糖的碳源是葡萄糖。

68、如权利要求 67 所述的方法，其中所述诱导物是阿拉伯糖。

69、如权利要求 68 所述的方法，其中在将阿拉伯糖以恒定速度补加到所述培养

物中期间、在所述葡萄糖和所述诱导物二者的 DO 恒定补料期间或通过所述葡萄糖和所述诱导物二者的 pH 值恒定补料，将葡萄糖以恒定补料速度补加到所述培养物中。

70、如权利要求 68 所述的方法，其中在将阿拉伯糖以恒定速度补加到所述培养物中期间，通过所述葡萄糖和所述诱导物二者的 DO 恒定补料直到所述培养物中的所述细胞密度达到约 80 OD<sub>600</sub> 或通过所述葡萄糖和所述诱导物二者的 pH 值恒定补料直到所述培养物中的所述细胞密度达到约 80 OD<sub>600</sub>，将葡萄糖以恒定补料速度补加到所述培养物中。

71、如权利要求 68 所述的方法，其中所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质包含脂蛋白(rLP2086)。

72、如权利要求 68 所述的方法，其中所述蛋白质包含未脂化蛋白质。

73、如权利要求 68 所述的方法，其中所述蛋白质包含脑膜炎球菌 2086 亚科 A 蛋白质。

74、如权利要求 68 所述的方法，其中所述蛋白质包含脑膜炎球菌 2086 亚科 B 蛋白质。

75、一种生产重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质(P2086)的方法，其包含：

- (a) 在诱导型启动子控制下将编码重组 2086 蛋白质的表达载体引入到细菌宿主细胞中以形成重组细菌细胞；
- (b) 将所述重组细菌细胞引入到培养基中以形成培养物；
- (c) 向所述培养物中添加碳源；
- (d) 监测所述培养物中的细胞生长是否达到阈值光密度(OD)；
- (e) 在所述培养物的所述细胞密度达到约 70 至 110 的光密度后，将所述诱导型启动子的诱导物连续添加到所述培养物中；和
- (f) 在开始连续添加所述诱导物后约 3 小时至约 6 小时后，自所述培养物中分离所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质。

76、一种组合物，其包含：

细菌培养物，所述细菌培养物包含基于所述细菌培养物的总体积，密度为至少约 1.5 g/L 的重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质。

77、如权利要求 76 所述的组合物，其中所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质是脂化蛋白质。

78、如权利要求 76 所述的组合物，其中所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质是未脂化蛋白质。

79、如权利要求 76 所述的组合物，其中所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质是 2086 亚科 A 蛋白质。

80、如权利要求 76 所述的组合物，其中所述重组蛋白质是 2086 亚科 B 蛋白质。

81、如权利要求 80 所述的组合物，其中所述培养物包含第二重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质。

82、如权利要求 81 所述的组合物，其中所述第二 2086 重组脑膜炎球菌蛋白质是 2086 亚科 A 蛋白质。

83、如权利要求 76 所述的组合物，其中基于所述细菌培养物的总体积，所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质的密度为至少约 1.7 g/L。

84、如权利要求 76 所述的组合物，其中基于所述细菌培养物的总体积，所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质的密度为至少约 2.0 g/L。

85、如权利要求 76 所述的组合物，其中基于所述细菌培养物的总体积，所述重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质的密度为至少约 3.0 g/L。

86、一种组合物，其包含：

细菌培养物，所述细菌培养物包含按照如权利要求 1-75 中任一权利要求所述的方法所制备的重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质。

## 用于生产重组蛋白质的高细胞密度补料-分批发酵方法

### 相关申请交叉参考案

本申请案主张 2006 年 7 月 27 日申请且名为用于生产重组蛋白质的高细胞密度补料-分批发酵方法(HIGH-CELL DENSITY FED-BATCH FERMENTATION PROCESS FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN)的美国临时专利申请案第 60/833.479 号的优先权, 其全部揭示内容均以引用方式并入本文中。

### 技术领域

概括来说, 本申请案是关于可提高细菌系统中的蛋白质表达的新颖补料-分批发酵方法, 以及高密度蛋白质组合物和所述新颖补料-分批发酵方法中所用的组合物。

### 背景技术

已利用多种发酵策略来生产供实验室、临床或商业使用的足量蛋白质。利用补料-分批发酵所提供的蛋白质产量比通过简单分批发酵方法所提供的产量高。补料-分批发酵方法在最初分批阶段后进行将一或多种营养物通过补加补充到培养物中的阶段。

通常, 在分批阶段期间, 细胞最初生长到期望浓度。在此阶段, 细胞生长旺盛且通常不产生靶蛋白质, 除非我们视启动子添加诸如阿拉伯糖、乳糖或异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)等诱导物或启动子有些泄漏。在补料期期间, 通常将碳源和其它必需物质以相对浓缩的液体流形式以一定补料速度补加到发酵罐中。在达到目标细胞密度后, 开始补加诱导物或诱导物和其它营养物。在此阶段期间, 重点是由所培育的细胞产生蛋白质。补加到发酵罐中的底物(即, 营养物和诱导物)在此阶段通常用于细胞生长和产物合成。通过补料速度来控制细胞生长以获得最佳细胞生长和蛋白质产生。在蛋白质产生阶段期间, 必须为重组生物体添加诱导物。

在于补料期结束时出现限制条件以前包含常见碳源(例如葡萄糖或另一种基于糖的碳源)和诱导物的培养基上的蛋白质表达令人满意。限制条件的实例包括生长培养基中的氧浓度降低、诸如维生素、碳、氮等营养物减少和累积毒性化合物。

补料-分批发酵策略通常涉及不同反馈控制形式, 包括控制营养物补充的间接和直接反馈。一种所述补料-分批发酵方法涉及应用通过补加营养物以将过程参数控制在规定设定点的反馈控制算法。例如, 补料的直接控制可基于营养物浓度的量度。随后在整个发酵期间反馈控制与细胞活性直接相关。已用于发酵反馈控制的控制参数包括 pH 值、在线测量的细胞密度或溶解氧张力(DOT)。

然而,应用反馈算法会伴随许多缺点。一个所述缺点是补料速度依赖于当前的过程参数。对过程的任何干扰都可能影响参数,由此歪曲补料速度和所得蛋白质产量。当将所述方法按比例放大以生产增量蛋白质时,所述缺点被扩大。

先前所用补料-分批策略的另一个缺点是当使用反馈控制时,不能准确地预先确定或控制具体生长速度,导致在产物形成依赖于生长的情况下方法产量达不到最佳。

此外,当进入到中心代谢途径中的碳通量(例如,高葡萄糖浓度)超过三羧酸(TCA)循环的最大容量后,可能累积副产物。副产物累积可能抑制发酵期间的细胞生长和蛋白质产生。

另外,补料-分批发酵方法的所述多个缺陷通常会导致营养物组份利用效率低。因此,这些方法在经济上不利,尤其在大规模商业生产蛋白质时。

如上所述,通过补料-分批发酵表达重组蛋白质的先前途径具有多个缺陷。考虑到以成本有效方式生产用于各种用途的足量蛋白质的重要性,当前需要可达成较高细胞生长、增多的产物形成(即,蛋白质产量较高)和较少的副产物累积的有效补料-分批发酵方法。

## **发明内容**

本发明是关于可达成出乎意料高的重组蛋白质产量的新颖补料-分批发酵方法。

本发明实施例提供生产重组蛋白质的方法,其包含:培养表达重组蛋白质的重组细菌细胞,此包含向包含重组细菌细胞的培养物中连续添加碳源并在培养物达到阈值参数后向培养物中连续添加诱导物;和自细胞培养物中分离重组蛋白质。

本发明的又一实施例提供生产重组蛋白质的方法,其包含:(a)在诱导型启动子控制下将编码重组蛋白质的表达载体引入到细菌宿主细胞中以形成重组细菌细胞;(b)将所述重组细菌细胞引入到培养基中以形成细胞培养物;(c)将碳源以连续补料形式添加到细胞培养物中;(d)监测细胞培养物中的细胞生长是否达到阈值光密度( $OD_{600}$ );(e)在达到阈值光密度( $OD_{600}$ )后,将诱导型启动子的诱导物以连续补料形式添加到细胞培养物中;和(f)自细胞培养物收获重组蛋白质。

本发明的再一实施例提供生产重组蛋白质的方法,其包含:培养表达重组蛋白质的重组细菌细胞,其是通过在包含所述细菌细胞的培养物达到阈值参数后向所述培养物中连续添加诱导物来培养,其中所述细菌细胞包含对应于脑膜炎奈瑟菌血清群 B (*N. meningitidis* serogroup B)基因的核酸序列。

根据再一实施例,本发明提供生产重组 2086 蛋白质(rP2086)的方法,其包含:(a)在诱导型启动子控制下将编码重组脑膜炎球菌(meningococcal) 2086 蛋白质的表达载体引入到细菌宿主细胞中以形成重组细菌细胞;(b)将所述重组细菌细胞引入到培养基中以形成培养物;(c)向培养物中添加碳源;(d)监测培养物中的细胞生长是否达到阈值光密度(OD);(e)在培养物的细胞密度达到约 70 至 110 的光密度后,向培养物

中连续添加诱导型启动子的诱导物；和(f) 在开始连续添加诱导物后约 3 小时至约 6 小时后，自培养物收获重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质。

根据另一实施例，本发明提供一种包含细菌培养物的组合物，所述细菌培养物包含基于细菌培养物的总体积，密度为至少约 1.5 g/L 的重组 2086 蛋白质(rP2086)。

根据再一实施例，本发明提供一种包含细菌培养基的组合物，所述细菌培养基包含按照本发明方法所制备的重组脑膜炎球菌 2086 蛋白质(rP2086)。

## **附图说明**

图 1：无诱导时不同恒定补料速度下的补料-分批发酵。

图 2：无诱导时不同恒定补料速度下的补料-分批发酵。

图 3：在不同光密度下进行诱导。

图 4：用不同量的阿拉伯糖进行诱导。

图 5：阿拉伯糖添加方法对 rLP2086 产量的影响。

图 6：阿拉伯糖补料速度对 rLP2086 产量的影响。

图 7：诱导时间对表达的影响。

图 8：用于生产亚科 B rLP2086 的补料-分批发酵。

图 9a 和 9b：分别为 rLP2086 亚科 B 诱导的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹(Western Blot)。

图 10：用于生产亚科 A rLP2086 的补料-分批发酵。

图 11a 和 11b：分别为 rLP2086 亚科 A 诱导的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹。

图 12a、12b 和 12c：在诱导期间双重补加葡萄糖和阿拉伯糖。

图 13a：100 L 规模的 rLP2086 亚科 B 大肠杆菌补料-分批发酵。

图 13b：100 L 规模的 rLP2086 亚科 A 大肠杆菌补料-分批发酵。

图 14a：100 L 规模的葡萄糖和阿拉伯糖双重补料的 rLP2086 亚科 B 大肠杆菌补料-分批发酵。

图 14b：100 L 规模的葡萄糖和阿拉伯糖双重补料的 rLP2086 亚科 A 大肠杆菌补料-分批发酵。

## **具体实施方式**

本发明方法是基于以下惊人发现：通过在诱导期间向培养基中连续补加诱导物的补料-分批发酵可获得出人意料高的蛋白质产量。任选地，碳源是在连续诱导物补料之前和/或期间连续补加。当由阿拉伯糖诱导时，按照本发明实施例可产生约 2-3 g/L 的重组 2086 脂蛋白(rLP2086)（其由具有对应于脑膜炎奈瑟菌血清群 B 中的 2086 基因的序列的微生物所表达）。此表示与相当分批发酵方法相比通过补料-分批发酵 2086 蛋白质的亚科 A 和 B 二者的 rLP2086 产量均有 2-3 倍增加。而且，本发明方法可容易

地适应所述和其它蛋白质的商业规模生产。

为促进对本文所述实施例的理解，可参考多个实施例且将使用特定语言来阐述其。本文所用的术语仅用于阐述具体实施例，而不意欲限制本发明的范围。除非上下文另外明确说明，否则在整篇揭示内容中所用的单数形式“一”和“所述”包括多个指示物。同样，诸如“培养基(medium)”等术语的单数形式包括“培养基”的复数形式指示物，且反之亦然。因此，例如，“培养基(culture medium)”指示物包括多种所述培养基以及单一培养基；且“培养基”指示物包括多种培养基以及单一培养基。

本文所用的术语“诱导物”是指可诱导、增强或促进重组蛋白质表达的任何试剂，由此在诱导型启动子控制下的基因表达可由所述试剂的浓度直接调节。

本文所用的术语“碳源”是指用于细胞的碳和能量来源。

术语“补料(feed)”、“补料(fed)”、“补加(feeding)”或“连续添加”在本文中可交换使用，其是指经一段时间连续地而非同时添加物质。此术语涵盖在发酵过程期间用于连续添加物质的单个开始和/或终止或多个起点和/或终点。

本文所用的术语“重组蛋白质”是指不为自编码氨基酸的重组遗传物质所表达的报道基因或标记基因（例如，绿色荧光蛋白）的任何蛋白质或其生物活性部分（例如，保留完整蛋白质的生物活性的部分），其包括肽、多肽、蛋白质、寡聚蛋白质和/或融合蛋白质。重组蛋白质产物可包括治疗性、预防性或诊断性产物。

本发明方法：

本发明方法可通过涉及在培养物达到阈值参数后向培养基中连续添加诱导物（例如阿拉伯糖）的新颖补料-分批发酵方法提供出人意料高的蛋白质产量。通常在诱导期之前将诸如葡萄糖等碳源添加到包含重组细菌细胞的培养物中。可将碳源与诱导物一起补加。诱导物也可作为第二碳源。

按照本发明实施例，在向培养基中连续补加诱导物之前和/或期间向培养基中连续添加诸如葡萄糖等碳源。因此，根据一实施例，连续补加碳源与连续补加诱导物交叠。连续补加碳源可在连续补加诱导物的全部持续时间段期间或仅在所述持续时间段的一部分期间继续。在另一实施例中，连续补加碳源与连续补加诱导物不交叠。根据本发明一实施例，可以恒定速度将诱导物和/或碳源补加到培养物中。

按照本发明实施例，所述补料-分批发酵方法涉及可产生期望蛋白质的数个步骤。在起始步骤中，制备在诱导型启动子控制下编码重组蛋白质产物的表达载体并随后将其引入到细菌宿主细胞中。将细菌宿主细胞引入到培养基中。将诱导型启动子的诱导物补加到培养物中（即，将诱导物经一段时间连续添加到培养物中）。可以恒定速度将诱导物补加到培养物中。随后，自培养物收获重组蛋白质产物。随后可将以此方式产生的重组蛋白质视需要进行纯化和/或以任何适宜方式（例如以预防性、治疗性或诊断性调配物形式）使用。

通过以恒定速度补加诱导物的补料-分批发酵可出乎意料地达成高细胞密度和增加的蛋白质产量，如下文提供实例中所阐释，与分批发酵相比所述补料-分批发酵使

重组蛋白质产物的产量增加约 2-3 倍。本发明方法适于大规模发酵以及小规模发酵。本文所用的“大规模”发酵是指在体积容量（即，工作体积）至少为约 1,000 L 的发酵罐中进行发酵，其中已留出足够的顶部空间。“小规模”发酵通常是指在体积容量通常不大于约 100 L（例如 5 L、10 L、50 L 或 100 L）的发酵罐中进行发酵。本发明补料-分批发酵方法的证实优点是其可用于以 5-10 L 发酵罐规模生产重组蛋白质产物且可按比例缩放到任何体积，例如（但不限于）100 L、150 L、250 L、500 L、1000 L 或更大。

诱导物：

本文所述方法是关于生产重组蛋白质，其中重组蛋白质的表达是在诱导型启动子的转录控制下进行，由此在诱导型启动子控制下的基因表达可由存在于培养基中的诱导物的浓度直接调节。将诱导物任选地以恒定速度连续提供到培养基中。在达到阈值参数后，将诱导物添加到培养基中。例如，重组蛋白质可受 araB 启动子（例如，ParaB）的控制，此可由以恒定速度添加到培养基中的阿拉伯糖的浓度直接调节。适于与本发明结合使用的诱导物已为所属领域的技术人员所熟知。下文提供本发明诱导物的实例，此并不具有限制意义。

启动子	诱导物
阿拉伯糖启动子，例如，ParaB	阿拉伯糖
人类血纤维蛋白溶酶原	肿瘤坏死因子，
I 型激活物抑制剂，Hpai-1	TNF
细胞色素 P-450	毒素
CYP1A1 金属应答元件，MRE	重金属，小鼠乳房
肿瘤病毒	糖皮质激素
胶原酶	佛波酯(Phorbol Ester)
促进肿瘤侵袭基因(Stromolysin)	佛波酯
SV40	佛波酯
增殖蛋白	佛波酯
$\alpha$ -2-巨球蛋白	IL-6
鼠科动物 MX 基因	干扰素，新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)
波形蛋白	血清
甲状腺刺激	甲状腺激素
激素 $\alpha$ .基因	HSP70 Ela, SV40 大 T
抗原肿瘤坏死因子	FMA
干扰素	病毒感染, dsRNA
促生长素抑制素	环状 AMP
纤维连接蛋白	环状 AMP

---

lac 启动子/操纵子

IPTG

碳源:

如所属领域的技术人员所了解,本发明涵盖使用诸如甘油、琥珀酸酯、乳酸酯或基于糖的碳源(例如,葡萄糖、乳糖、蔗糖和果糖)等任何适宜碳源。例如,可用于本发明的基于糖的碳源包括(但不限于)具支链或非具支链多糖,其包含糖类单体D-甘露糖、D-和L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡糖醛酸、唾液酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸(例如,聚甘露糖醛酸或海藻酸)、D-葡糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖和神经氨酸,包括同多糖和杂多糖,例如,乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、葡聚糖硫酸酯、葡聚糖、糊精、糖原、或酸性粘多糖的多糖亚单元(例如,透明质酸);糖醇的聚合物,例如聚山梨醇和聚甘露醇;肝素或类肝素;或其任何组合,此并不具有限制意义。葡萄糖是本发明实施例的第一碳源。当阿拉伯糖用作诱导物时,其也作为第二碳源,尽管其也可作为第一碳源。根据一实施例,所述碳源包括D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、蔗糖、L-肌醇、D-甘露醇、 $\beta$ -D-果糖、 $\alpha$ -L-鼠李糖、D-木糖、纤维素、或其任何组合中的任何一种。本发明可使用一种或多种碳源。

细菌表达系统和质粒:

本发明也提供包含表达载体(例如质粒)的重组细菌细胞,所述表达载体包含具有启动子序列和起始子序列的表达控制序列和编码期望多肽的核苷酸序列,所述核苷酸序列位于所述启动子和起始子序列的3'端。所属领域的技术人员基于本文所提供的揭示内容应了解,本发明涵盖任何适宜表达控制序列和宿主细胞/克隆载体。

适宜表达控制序列和宿主细胞/克隆载体组合已为所属领域的技术人员所熟知,且阐述于(例如)萨姆布鲁克(Sambrook, J.), 弗里奇(E.F. Fritsch)和玛尼蒂斯(T. Maniatis), 1989, 分子克隆: 实验室手册(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*), 冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港(Cold Spring Harbor), 纽约(NY)。通常,重组DNA技术涉及通过合成或分离获得编码所关注重组蛋白质的DNA序列并将其引入到合适载体/宿主细胞表达系统(所述序列在其中表达)中,优选地在阿拉伯糖诱导型启动子的控制下。所述用于将DNA插入到表达载体中的任何方法都可用于将启动子和其它调节控制元件连接到所选重组载体内的特异性位点中。随后通过习用技术用所述载体或质粒将适宜宿主细胞转化、感染、转导或转染。

多种宿主细胞-载体(质粒)系统可用于表达所关注的重组蛋白质。载体系统(例如包括阿拉伯糖诱导型启动子的系统)与所用宿主细胞相容。将编码所关注重组蛋白质产物的DNA插入到表达系统中,并将启动子(优选为阿拉伯糖诱导型启动子)和其它控制元件连接到载体内的特异性位点中,以使当将载体插入到宿主细胞(视所用宿主细胞-载体系统通过转化、转导或转染进行)中时编码所关注重组蛋白质产物的DNA被宿主细胞表达。

载体可选自上文所述病毒载体或非病毒载体中的一种,但必须与所用宿主细胞相容。可通过转化、转导或转染等(视载体/宿主细胞系统而定)将重组 DNA 载体引入到合适宿主细胞(细菌、病毒、酵母、哺乳动物细胞或其类似物)中。宿主载体系统包括但不限于经噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌。

所关注重组蛋白质产物在原核生物中的表达可在任何适宜细菌种类或菌株(例如大肠杆菌)中用含有引导融合或非融合蛋白质表达的组成型或诱导型启动子的载体来实施。

融合载体添加多个氨基酸到在其中编码的蛋白质上,到重组蛋白质的氨基或羧基末端上。所述融合载体通常用于三个目的:1) 增强重组蛋白质的表达;2) 提高重组蛋白质的溶解性;和 3) 通过在亲和纯化中作为配体帮助重组蛋白质纯化。通常,在融合表达载体中,在融合部分与重组蛋白质的连接点处引入蛋白水解切割位点以使在融合蛋白质纯化后重组蛋白质能够与融合部分分开。所述酶和其同源识别序列包括因子 Xa、凝血酶和肠激酶。

典型融合表达载体包括 P<sub>gex</sub>(法玛西亚生物技术公司(Pharmacia Biotech Inc);史密斯(Smith)和约翰逊(Johnson), 1988)、P<sub>mal</sub>(新英格兰生物实验室(New England Biolabs), 贝弗利(Beverly);马萨诸塞州(Mass.))和 P<sub>rit5</sub>(法玛西亚(Pharmacia), 皮斯卡塔韦(Piscataway), 新泽西州(N.J.)),其分别使谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、麦芽糖 E 结合蛋白质或蛋白质 A 融合到靶重组蛋白质上。

适宜诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括 pTrc(阿曼(Amann)等人,(1988)可用于在大肠杆菌中表达非融合和融合蛋白的紧密调节的 tac 启动子载体(Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*), 基因(*Gene*), 69, 301-315)和 Pet lid(斯达迪尔(Studier)等人,(1990)使用 T7 RNA 聚合酶引导克隆基因表达(Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes), 酶学方法(*Methods in Enzymology*), 185, 60-89)。由 pTrc 载体表达靶基因依赖于杂合体 trp-lac 融合启动子的宿主 RNA 聚合酶转录。由 Pet lid 载体表达靶基因依赖于由共表达的病毒 RNA 聚合酶 J7 gnl 介导的 T7 gnl 0-lac 融合启动子转录。此病毒聚合酶是在 lacUV 5 启动子的转录控制下由宿主菌株 BL21 (DE3)或 HMS I 74(DE3)自含有 T7 gnl 基因的驻留原噬菌体提供。

根据一实施例,载体构建体的调节序列是诱导型启动子。使用诱导型启动子允许在常规培养和扩展添加期间由细胞产生较低基本量的激活蛋白质。随后,可对细胞进行诱导以在产生或筛选期间表达大量期望蛋白质。诱导型启动子可自细胞或病毒基因组分离。

可由外源提供的化合物调节的诱导型启动子包括(但不限于)阿拉伯糖启动子、锌诱导型羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(dexamethasone) (Dex)诱导型小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7 聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(诺(No)等人, 1996, 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA),

93:3346-3351)、四环素抑制型系统(高森(Gossen)等人, 1992, 美国国家科学院院刊, 89:5547-5551)、四环素诱导型系统(高森等人, 1995, 科学(Science), 268:1766-1769, 也可参见哈维(Harvey)等人, 1998, 化学生物学新观点(Curr. Opin. Chem Biol), 2:512-518)、RU486 诱导型系统(王(Wang)等人, 1997, 自然生物技术(Nat. Biotech.), 15:239-243 和王(Wang)等人, 1997, 基因治疗(Gene Ther.), 4:432-441)和雷帕霉素(rapamycin)诱导型系统(玛噶瑞(Magari)等人, 1997, 临床研究期刊(J. Clin. Invest.), 100: 2865-2872)。根据本发明一实施例, 启动子是阿拉伯糖诱导型启动子。

所属领域的技术人员基于本文所提供的揭示内容应了解, 本发明涵盖使用任何适宜细菌宿主细胞。例如, 适用于此目的的细菌包括(但不限于)埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷菌属(*Serratia*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、根瘤菌属(*Rhizobia*)、透明颤菌属(*Vitreoscilla*)、副球菌属(*Paracoccus*)或其组合。本发明也涵盖任何所述适宜细菌的任何适宜菌株。此外, 所属领域的技术人员应认识到, 本发明也涵盖使用适宜突变细胞。所属领域的技术人员基于本文所提供的指导能够容易地选择适于在特定环境中使用的宿主细胞。

适宜诱导型大肠杆菌表达载体的实例包括但不限于 pTrc (阿曼(Amann)等人, 1988, 基因(*Gene*), 69:301-315)、阿拉伯糖表达载体(例如, Pbad18, 古兹曼(Guzman)等人, 1995, 细菌学杂志(*J. Bacteriol.*), 177:4121-4130)和 pETIIId (斯达迪尔(Studier)等人, 1990, 酶学方法(*Methods in Enzymology*), 185:60-89)。由 pTrc 载体表达靶基因依赖于杂合体 *trp-lac* 融合启动子的宿主 RNA 聚合酶转录。由 pETIIId 载体表达靶基因依赖于由共表达的病毒 RNA 聚合酶 T7 gn 1 介导的 T7 gn10-lac 融合启动子转录。此病毒聚合酶是在 *lacUV5* 启动子的转录控制下由宿主菌株 BL21 (DE3)或 HMS 1 74(DE3)自含有 T7 gn1 基因的驻留原噬菌体提供。P<sub>BAD</sub> 系统依赖于由 *araC* 基因调节的诱导型阿拉伯糖启动子。可在阿拉伯糖存在下诱导所述启动子。

本发明的其它实施例使用阿拉伯糖调节的表达载体或其中所关注重组蛋白质的表达是在阿拉伯糖启动子(例如, 用于大肠杆菌阿拉伯糖操纵子的启动子)控制下进行的载体 P<sub>BAD</sub> 或 P<sub>ARA</sub>, 此并不具有限制意义。

本发明涵盖编码任何期望蛋白质的核酸(核苷酸)序列。核苷酸序列可为完整或部分天然存在的核苷酸序列或完整或部分经改变的核苷酸序列、或在严格条件下与其杂交的任何序列。本文中提及对应于基因的核酸序列是指可以期望蛋白质表达的任何核酸序列。

例如, 所述经改变的核酸序列包括一个核苷酸缺失、取代(包括转换和颠换)、或插入, 且其中所述改变可能发生在参考核苷酸序列的 5'或 3'末端位置或介于所述末端位置之间的任何地方, 其各散布于参考序列中的核苷酸中或散布于参考序列内的一或多个邻近基团中。核苷酸改变的数量是通过以下来测定: 将任何序列中核苷酸的总

数与各自一致性百分比的数值百分比（除以 100）相乘并从所述序列中的所述核苷酸总数中减去乘积。

例如，本发明涵盖使用与某一核酸序列具有至少 70%一致性的核苷酸序列；其简并变体或其片段，其中所述序列在核酸序列的整个聚核苷酸区域内可包括至多  $n_n$  个核酸改变，其中  $n_n$  是改变的最大数且通过下式来计算：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y),$$

其中  $x_n$  是任何序列的核酸总数且  $y$  值为 0.70，其中在将  $x_n$  和  $y$  的任何非整数乘积四舍五入到最接近的整数之后从  $x_n$  中减去所述乘积。当然， $y$  值也可为 0.80（对于 80%）、0.85（对于 85%）、0.90（对于 90%）、0.94（对于 94%）、0.95（对于 95%）、0.96（对于 96%）、0.97（对于 97%）、0.98（对于 98%）、或 0.99（对于 99%）等。序列改变可在所述编码序列中产生无义、误义或移码突变且在所述改变后由此改变聚核苷酸所编码的多肽。

本发明涵盖使用其简并变体或片段。本文所定义的“简并变体”是由遗传密码的简并性所产生的不同于核苷酸序列（及其片段）但仍编码相同蛋白质的聚核苷酸。

所述核酸可包含 DNA、染色体 DNA、cDNA 和 RNA 且可进一步包含异源核苷酸。按照各个实施例，所述核酸可在高度严格杂交条件下与某一核酸、其补体、其简并变体、或其片段杂交。在再一些实施例中，聚核苷酸可在中等严格杂交条件下杂交。

应了解，所述核酸可自天然、合成或半合成来源获得；而且，核苷酸序列可为天然存在的序列，或可通过突变（包括单或多碱基取代、缺失、插入和倒位）与所述天然存在的序列相关联。核酸分子可为 RNA、DNA、单链或双链、线性或共价闭环形式。

严格条件的实例显示于下表严格条件中：高度严格条件是至少如（例如）条件 A-F 一样严格者；严格条件是至少如（例如）条件 G-L 一样严格者；且降低的严格条件是至少如（例如）条件 M-R 一样严格者。

#### 严格条件

严格条件	聚核苷酸杂合体	杂合体长度(bp) <sup>I</sup>	杂交温度和缓冲液 <sup>H</sup>	洗涤温度和缓冲液 <sup>H</sup>
A	DNA:DNA	>50	65EC； 1xSSC- 或 -42EC； 1xSSC, 50%甲酰胺	65EC； 0.3xSSC
B	DNA:DNA	<50	T <sub>B</sub> ； 1xSSC	T <sub>B</sub> ； 1xSSC
C	DNA:RNA	>50	67EC； 1xSSC- 或 -45EC； 1xSSC, 50%甲酰胺	67EC； 0.3xSSC
D	DNA:RNA	<50	T <sub>D</sub> ； 1xSSC	T <sub>D</sub> ； 1xSSC
E	RNA:RNA	>50	70EC； 1xSSC- 或 -50EC； 1xSSC, 50%甲酰胺	70EC； 0.3xSSC

F	RNA:RNA	<50	T <sub>F</sub> ; 1xSSC	T <sub>f</sub> ; 1xSSC
G	DNA:DNA	>50	65EC; 4xSSC- 或 -42EC; 4xSSC, 50%甲酰胺	65EC; 1xSSC
H	DNA:DNA	<50	T <sub>H</sub> ; 4xSSC	T <sub>H</sub> ; 4xSSC
I	DNA:RNA	>50	67EC; 4xSSC- 或 -45EC; 4xSSC, 50%甲酰胺	67EC; 1xSSC
J	DNA:RNA	<50	T <sub>J</sub> ; 4xSSC	T <sub>J</sub> ; 4xSSC
K	RNA:RNA	>50	70EC; 4xSSC- 或 -50EC; 4xSSC, 50%甲酰胺	67EC; 1xSSC
L	RNA:RNA	<50	T <sub>L</sub> ; 2xSSC	T <sub>L</sub> ; 2xSSC
M	DNA:DNA	>50	50EC; 4xSSC -或-40EC; 6xSSC, 50%甲酰胺	50EC; 2xSSC
N	DNA:DNA	<50	T <sub>N</sub> ; 6xSSC	T <sub>N</sub> ; 6xSSC
O	DNA:RNA	>50	55EC; 4xSSC- 或 -42EC; 6xSSC, 50%甲酰胺	55EC; 2xSSC
P	DNA:RNA	<50	T <sub>P</sub> ; 6xSSC	T <sub>P</sub> ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	>50	60EC; 4xSSC- 或 -45EC; 6xSSC, 50%甲酰胺	60EC; 2xSSC
R	RNA:RNA	<50	T <sub>R</sub> ; 4xSSC	T <sub>R</sub> ; 4xSSC

bp<sup>l</sup>: 杂合体长度是杂交聚核苷酸的杂交区的预计长度。当将聚核苷酸与未知序列的靶聚核苷酸杂交时, 杂合体长度假定为杂交聚核苷酸的长度。当杂交已知序列的聚核苷酸时, 杂合体长度可通过比对聚核苷酸序列并识别出具有最佳序列互补性的一或多个区域来测定。

缓冲液<sup>H</sup>: 可用 SSPE (1xSSPE 是 0.15 M NaCl、10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 1.25 mM EDTA, pH 值为 7.4) 代替杂交和洗涤缓冲液中的 SSC (1xSSC 是 0.15 M NaCl 和 15 mM 柠檬酸钠); 在杂交完成后实施洗涤 15 分钟。

T<sub>B</sub> 至 T<sub>R</sub>: 长度预计小于 50 个碱基对的杂合体的杂交温度应较所述杂合体的解链温度(T<sub>m</sub>)低 5-10 EC, 其中 T<sub>m</sub> 可根据以下等式确定。对于长度小于 18 个碱基对的杂合体来说, T<sub>m</sub>(EC) = 2 (A+T 碱基的数量) + 4 (G+C 碱基的数量)。对于长度介于 18 与 49 个碱基对之间的杂合体来说, T<sub>m</sub>(EC) = 81.5 + 16.6 (log<sub>10</sub>[Na<sup>+</sup>]) + 0.41 (%G+C) - (600/N), 其中 N 是所述杂合体中碱基的数量, 且 [Na<sup>+</sup>] 是杂交缓冲液中钠离子的浓度 (对于 1xSSC 来说, [Na<sup>+</sup>] = 0.165 M)。

用于聚核苷酸杂交的严格条件的额外实例提供于萨姆布鲁克(Sambrook, J.), 弗里奇(E.F. Fritsch)和玛尼蒂斯(T. Maniatis), 1989, 分子克隆: 实验室手册(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*), 冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory

Press), 冷泉港(Cold Spring Harbor), 纽约(NY), 第 9 和 11 章和最新分子生物学实验方法汇编(*Current Protocols in Molecular Biology*), 1995, 奥苏贝尔(F.M. Ausubel)等人, 编辑, 约翰威立父子(John Wiley & Sons)公司, 第 2.10 和 6.3-6.4 部分, 其以引用方式并入本文中。

本发明涵盖使用与所述聚核苷酸完全互补的聚核苷酸以及反义序列。反义序列也称为反义寡核苷酸, 其包括阻断编码本发明多肽的聚核苷酸表达的内部产生和外部投与的序列二者。本发明的反义序列包含(例如但不限于)约 15-20 个碱基对。可对反义序列进行设计以(例如)通过阻止启动子与上游非转译序列结合或通过阻止编码本发明多肽的转录物转译(通过阻止核糖体结合)抑制转录。

所属领域的技术人员应了解, 所述聚核苷酸可以任何适宜方式(例如, 通过化学合成、自 DNA 库、自生物体本身)制备或获得且可采取多种形式(例如, 单链、双链、载体、探针、引物)。术语“聚核苷酸”包括 DNA 和 RNA、以及其类似物, 例如含有经修饰主链者。随着本发明的进一步实施, 所述聚核苷酸包含 DNA 库, 例如 cDNA 库。

#### 2086 蛋白质表达系统:

本发明实施例提供能够表达脑膜炎奈瑟菌血清群 B (*Neisseria meningitidis* serogroup B) 2086 多肽的重组微生物。所述重组微生物包含具有启动子序列和起始子序列的表达控制序列和编码 2086 多肽的核苷酸序列, 所述核苷酸序列位于启动子和起始子序列的 3'端。又一方面, 本发明提供包含如本文和 WO 03/063766 和 WO 04/094596 中所述的重组 2086 聚核苷酸的宿主细胞, 所述专利案的全部内容均以引用方式并入本文中。因此, 本发明提供产生如(例如但不限于)WO 03/063766 和 WO 04/094596 中所述的重组 2086 蛋白质的方法。

在通过用含有对应 2086 聚核苷酸的质粒转化、转染或感染宿主细胞以构建表达本发明期望蛋白质或多肽的宿主细胞后, 按照本发明方法在可表达多肽的条件下对宿主细胞进行培养。随后可通过所属领域的技术人员所熟知的技术将多肽分离出来, 所分离出来的多肽基本上不含杂质宿主细胞组份。

#### 阈值参数:

可使用数个参数来监测和控制培养进程的细胞生长和重组蛋白质表达。所述参数包括(但不限于)光密度(OD)、溶解氧(DO)、pH 值、营养物/能量消耗(例如碳源)、代谢副产物(例如, 乙酸)累积、收获时间、和温度。所属领域的技术人员基于本文所提供的指导应了解, 本发明涵盖使用任何适宜参数或参数的组合。

确立阈值参数以确定将诱导物连续添加到培养物中的时间(即, 经一段时间补加到培养物中)。阈值参数是预定参数。所属领域的技术人员基于本文所提供的指导按照本发明的各个实施例可容易地确定合适阈值参数(例如预定光密度)。可使用一个阈值参数或阈值参数的组合。

可在培养期间以任何适宜时间间隔对参数或参数的组合予以监测。例如, OD<sub>600</sub>

和葡萄糖浓度可以一小时、半小时或四分之一小时时间间隔予以监测，此并不具有限制意义。

按照本发明实施例，光密度可用作开始连续补加诱导物的阈值参数。当培养物的细胞密度达到预定阈值参数（例如光密度为约 70 至约 110）时，则如本文所述向培养物中补加诱导物。可确立较为狭窄的阈值参数范围。例如，按照本发明实施例，本发明涵盖当培养物的细胞密度达到约 70 至约 105、约 75 至约 100、约 75 至约 95、约 75 至约 85、约 76 至约 84、约 78 至约 82、或约 80 的光密度时我们开始向培养物中连续添加诱导物。

本发明也涵盖使用可指示开始和/或结束补加碳源的阈值参数。

所属领域的技术人员应了解，本发明涵盖使用任何适宜装置或装置的组合来监测一或多个阈值参数。例如，可以任何适宜方式将用于测量阈值参数的探针或探针组合安装在发酵装置（“发酵罐”）上，此并不具有限制意义。

恒定补料速度：

恒定补料速度是指以此速度将一或多种诱导物和/或一或多种碳源添加到培养物中。在达到阈值参数后，将诱导物添加到培养物中。也可在达到阈值参数后将碳源添加到培养物中（且同样，在达到阈值参数后停止添加碳源）。这些阈值参数包括（但不限于）光密度(OD)、溶解氧(DO)、pH 值、培养基中营养物的浓度、添加到培养基中的第一碳源的总浓度、或其任何组合。

所属领域的技术人员基于本文所提供的指导应了解，可使用任何适宜恒定速度将诱导物和/或碳源添加到培养物中。按照本发明的各个实施例，如下文实例中所述，通过 DO 恒定来确定适宜恒定速度。例如，可通过每小时添加足量葡萄糖使浓度高达 15 和 24 g/L 来选择等效于 DO 恒定控制器的补料速度，此并不具有限制意义。

例如，可将诱导物和/或碳源以恒定速度添加到培养物中直到已将一定量的诱导物和/或碳源添加到培养物中，例如基于培养物的总体积约 4 g/L 至约 40 g/L，例如，4 g/L、5 g/L、6 g/L、7 g/L、8 g/L、9 g/L、9.5 g/L、9.75 g/L、10 g/L、10.25 g/L、10.5 g/L、11 g/L、12 g/L、13 g/L、14 g/L、15 g/L、16 g/L、17 g/L、18 g/L、19 g/L、20 g/L、21 g/L、22 g/L、23 g/L、24 g/L、25 g/L、26 g/L、27 g/L、28 g/L、29 g/L、30 g/L、31 g/L、32 g/L、33 g/L、34 g/L、35 g/L、36 g/L、37 g/L、38 g/L、39 g/L、40 g/L，此并不具有限制意义。根据各个实施例，补加到培养物中的诱导物和/或碳源的总量为约 5 g/L 至约 20 g/L、7 g/L 至约 15 g/L、8 g/L 至约 14 g/L、9 g/L 至约 11 g/L、或约 10 g/L。

拟添加到培养物中的诱导物的总量可被已添加到培养物中的碳源的总量抵消。例如，当碳源是葡萄糖且诱导物是阿拉伯糖时，添加葡萄糖可使所添加诱导物的量减小。例如，在实施例中，向培养物中总共添加 10 g/L 诱导物（即，例如阿拉伯糖）且添加 11 g/L 碳源（例如葡萄糖）。以此方式获得的蛋白质产量近似于使用总量为 20 g/L 的阿拉伯糖（即，在 1,000 L 培养物中总共 20,000 g 或 20 kg 阿拉伯糖）且不使用葡萄糖时的产量。因此，考虑到相对于葡萄糖来说阿拉伯糖价格较高，本发明方法提供的

此抵消甚为有利。

根据本发明的各个实施例，将诱导物和/或碳源添加到培养物中的恒定速度可设定在每小时约 1.5 g/L 至约 24 g/L 范围内。例如，在碳源是葡萄糖的情况下，用于添加葡萄糖的恒定速度可包括（但不限于）1.8 g 葡萄糖/L/h、3.3 g 葡萄糖/L/h、6.7 g 葡萄糖/L/h、15 g 葡萄糖/L/h、16.4 g 葡萄糖/L/h、18 g 葡萄糖/L/h、24 g 葡萄糖/L/h 等。根据各个实施例，可以约 1.5 g/L/h 至约 16 g/L/h 的恒定速度添加诸如阿拉伯糖等诱导物。

根据各个实施例，在达到阈值参数后，可继续、停止或暂时中断碳源补加。在其中在达到开始补加的阈值后将重新开始以恒定速度补加的情况下可能中断碳源补加。因此，根据一实施例，可利用开始阈值和停止阈值来调节碳源到培养物中的补加。根据另一实施例，基于阈值参数以恒定速度补加葡萄糖和阿拉伯糖二者而没有停止或重新开始补加的情况。

所属领域的技术人员基于本文所提供的指导可容易地确定拟添加到任何特定培养物中的碳源的合适总量。根据本发明一实施例，添加到培养物中的碳源的总量可在约 1 g/L 至约 100 g/L（基于以升计培养物的总体积）范围内。例如，根据一实施例，在生长期期间添加 50 g/L 葡萄糖，此以培养基中的 10 g/L 开始，在葡萄糖含量达到零时开始以恒定速度补加葡萄糖，并继续以恒定速度补加葡萄糖直到 OD 达到 80，此时除开始的 10 g/L 葡萄糖外已补加约 40 g/L 葡萄糖。根据一实施例，以浓缩形式提供总量碳源以便于衡量。可容易地将这些量转化成拟在特定环境中使用的碳源的总质量。例如，当拟向 1,000 L 培养物中添加 10 g/L 碳源时，拟添加的碳源的总量可容易地确定为  $10 \text{ g/L} \times 1,000 \text{ L} = 10,000 \text{ 克}$ （或 10 kg）总碳源。按照本文所述的各个实施例，所添加碳源的总量可作为阈值参数。

所属领域的技术人员基于本文所提供的指导可容易地确定拟添加到任何特定培养物中的诱导物的合适总量。按照各个实施例，添加到培养物中的诱导物的总量可在约 4 g/L 至约 40 g/L（基于以升计培养物的总体积）范围内。根据各个实施例，基于培养物的总体积，添加到培养物中的碳源的总量为约 5 g/L 至约 20 g/L、7 g/L 至约 15 g/L、8 g/L 至约 14 g/L、9 g/L 至约 11 g/L、或约 10 g/L。根据一实施例，以浓缩形式提供总量诱导物以便于衡量。可容易地将这些量转化成拟在特定环境中使用的诱导物的总质量。例如，当拟向 1,000 L 培养物中添加 10 g/L 诱导物时，拟添加的诱导物的总量可容易地确定为  $10 \text{ g/L} \times 1,000 \text{ L} = 10,000 \text{ 克}$ （或 10 kg）总诱导物。

新鲜培养基在接种宿主细胞时通常含有起始量的第一碳源，由此产生培养物。可监测此起始浓度且第一碳源的浓度用作阈值参数。

也可将合适量的除碳源之外的任何适宜补充物或营养物补加到培养物中。可对其它营养物或补充物予以监测并适当设定阈值。本发明涵盖使用诸如氮或无机磷酸盐来源等补充物。本发明方法所涵盖使用的化合物的非限制性实例包括  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、柠檬酸钠二水合物、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $(\text{Na})_2\text{SO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、氯霉素或其任何

组合。也涵盖使用其它碳源或来源。

光密度和对数生长期:

将细菌宿主细胞引入到新鲜培养基中可产生通常经历以下四个或多或少不同的生长期的培养物: (i) 滞后期, (ii) 对数 (对数或指数) 期, (iii) 静止期, 和(iv) 衰亡 (死亡) 期。对数期本身又可分成多个阶段, 例如对数生长期早期、对数生长期中期和对数生长期晚期。光密度与对数生长期有关。对数生长期和光密度也可用作指示开始和/或停止连续补加碳源和/或诱导物的阈值参数。

例如, 诱导或连续添加诱导物可开始于对数生长期早期、对数生长期中期和对数生长期晚期。对数生长期晚期可在 OD 为约 70 至约 110 时发生。在本发明实施例中, 按照各个实施例, 以恒定速度补加诱导物开始于培养基的对数生长期晚期或 OD 为约 70 至约 110、约 70 至约 105、约 75 至约 85、或约 80 时。

可在所属领域的技术人员通常使用的多个波长下测量 OD。通常, OD<sub>600</sub> 用作培养物中细胞生长和细胞密度的指标。除非另外说明, 否则本文所用的“OD”是指 OD<sub>600</sub>。溶解氧:

可作用于开始和/或停止补料控制器的触发因素的另一参数是溶解氧(DO) (即, DO 恒定补料分批发酵)。DO 可通过调节搅动、空气流、氧气补充和含有培养基的容器中的压力予以控制。可将 DO 的阈值设定在 5%至 80% DO 范围内, 例如, 20%、40%或 80%。在达到阈值后, 开启碳源或诱导物的补料控制器, 直到达到指示停止控制补加的阈值。所述停止阈值可为另一 DO 阈值或另一参数, 例如碳源或诱导物的量。例如, 按照本发明的各个实施例, 每当培养基中的 DO 上升到 30%或 40%以上时, 补料控制器即开启, 直到 DO 降到 20%, 或另一选择为, 直到新近添加了 0.5 g/L 或 1 g/L 碳源或诱导物。

pH 值:

可作用于开始和/或停止补料控制器的触发因素的另一参数是 pH 值 (即, pH 值恒定补料-分批发酵)。pH 值可通过向培养基中添加碱或酸来控制。可将 pH 值的阈值设定在 6.8 至 7.2 范围内, 例如 7.0。在达到阈值后, 开启碳源或诱导物的补料控制器, 直到达到指示停止控制补加的阈值。所述停止阈值可为另一 pH 值阈值或另一参数, 例如碳源或诱导物的量。例如, 按照本发明的各个实施例, 每当培养基的 pH 值上升到 6.97 时, 补料控制器即开启, 直到 pH 值降到 6.95, 或另一选择为, 直到新近添加了 1 g/L 碳源或诱导物。

收获时间:

收获时间代表在开始诱导或添加诱导物后经历时间的量。本发明涵盖任何适宜收获时间。按照本发明的各个实施例, 收获时间可在约 2 小时至约 10 小时、约 2 小时至约 8 小时、约 2.5 小时至约 7 小时、约 3 小时至约 6 小时等范围内。使用所述恒定补料速度、收获时间和诱导物总量, 所属领域的技术人员应了解如何对每个参数进行调节以达成期望结果。因为所属领域的技术人员基于补料速度和时间段可容易地确定

补料的量，所以他们应了解基于所补加的阿拉伯糖的量何时收获。以此方式，在3小时内补加的诱导物的最终浓度可达到（例如但不限于）5、10、20、30和40 g/L。

诱导物的浓度：

本发明涵盖诱导物的任何适宜浓度。可用于诱导宿主细胞的诱导物的浓度可在约0.00001%至约20% (v/v)范围内，此并不具有限制意义。

温度：

本发明实施例的培养物可在允许细胞生长的任何温度下进行培育。与充足生长有关的培育培养物的多个温度包括（但不限于）22°C、28°C、37°C、或其任何组合。

发酵装置：

所属领域的技术人员应了解，本发明涵盖使用任何适宜发酵装置（即，“发酵罐”）。例如，发酵罐可含有任何数量的桨叶（例如，鲁施顿(Rushton)桨叶）、进口和/或测量探针。按照一实施例，发酵罐经构造以包括三片鲁施顿桨叶和用于将空气引入到发酵罐中的环式或管式分布器。本发明涵盖使用手动和/或基于计算机的系统。因此，发酵系统可与计算机化系统连接以监测和控制发酵。以此方式，按照本发明实施例，所述系统可完全或部分自动化。

本发明组合物：

按照本发明实施例，本发明提供包含重组蛋白质的组合物，例如按照本发明方法所制备的组合物。本发明组合物在培养物中包含高密度的重组蛋白质，例如（并不意欲限于此）按照本发明方法制备的重组蛋白质。

所述组合物包含一种培养物，所述培养物具有基于培养物的总体积，密度为至少约1.5 g/L的重组蛋白质。根据本发明的又一实施例，基于培养物的总体积，重组蛋白质的密度为至少约1.7 g/L。根据本发明的另一实施例，基于培养物的总体积，重组蛋白质的密度为至少约2.0 g/L。根据本发明的另一实施例，基于培养物的总体积，重组蛋白质的密度为至少约3.0 g/L。

本发明实施例提供包含重组2086蛋白质的组合物。如本文所提及的2086蛋白质是由对应于脑膜炎奈瑟菌血清群B中的2086基因的聚核苷酸表达的蛋白质，包括其任何片段、衍生物或突变体。非限制性实例性2086蛋白质和聚核苷酸阐述于WO 03/063766和WO 04/094596中。

所述重组2086蛋白质组合物包含培养物中的重组2086蛋白质，其中基于培养物的总体积，重组2086蛋白质的密度为至少约1.5 g/L。根据本发明的又一实施例，基于培养物的总体积，重组2086蛋白质的密度为至少约1.7 g/L。根据本发明的另一实施例，基于培养物的总体积，重组2086蛋白质的密度为至少约2.0 g/L。根据本发明的另一实施例，基于培养物的总体积，重组2086蛋白质的密度为至少约3.0 g/L。

本发明组合物可包含任何蛋白质，例如按照本发明方法所制备的蛋白质。重组蛋白质可为脂化或未脂化蛋白质。在本发明实施例中，重组蛋白质是脂化或未脂化重组2086蛋白质。重组2086蛋白质可为2086亚科A或亚科B蛋白质、或其组合。本发

明组合物可包括一种蛋白质或多于一种蛋白质。所述蛋白质可为相关或无关蛋白质。例如，本发明组合物可包括对应于一或多种亚科 A 菌株和/或一或多种亚科 B 菌株的 2086 蛋白质。

本发明也提供包含可用于实施本发明方法的物质的组合物。按照本发明实施例，所述组合物包括培养物的必需组份，必需组份包括重组细胞和营养物。按照本发明实施例，多种组合物可以试剂盒形式一起提供。例如，可方便地将所需量的用以形成培养物的组份进行预先包装以便于在实验室或工业环境中使用，此并不具有限制意义。按照本发明的各个实施例，所述试剂盒也可包括有助于使用每一组份和合并组份方式的标签、标记和说明书。

本发明包括以下实例以阐释本发明的各个实施例。所属领域的技术人员应了解，下列实例中所揭示的技术代表本发明的发明者发现的可良好用于实施本发明的技术，且因此可认为这些技术构成用于实施本发明的多种模式。然而，所属领域的技术人员根据本揭示内容应了解，在所揭示具体实施例中可实施许多改变且仍可获得类似或同样结果，此并不背离本发明的精神和范围。

### 实例

#### 实例 1: 恒定补料速度的补料-分批发酵

大肠杆菌(pPW62)亚科 B 用作补料-分批发酵方法的模型菌株。基于结果，此方法适用于亚科 A 大肠杆菌(pPW102)。

使用下表中所列示的组份来制备用于补料-分批发酵的培养基和补料溶液。

培养基和补料溶液:

**表 1: 基础培养基**

组份	量/升
右旋糖，无水	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
柠檬酸钠，二水合物	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
(Na) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.58 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.075 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.09 g
1000x 痕量金属贮存液 (表 6)	1 mL
氯霉素	15 mg

**表 2: 1000x 痕量金属贮存液**

组份	量/升
----	-----

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	9 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4.2 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.6 g
钼酸, 铵盐, 四水合物	1.5 g

表 3: 葡萄糖浓缩物补料溶液

组份	量/升
葡萄糖	500/700 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g

表 4: 阿拉伯糖浓缩物补料溶液

组份	量/升
阿拉伯糖	250/500 g 且根据实验改变
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g

方法:

利用恒定补料速度的补料-分批发酵来达成高细胞密度大肠杆菌发酵。培养基中的起始葡萄糖浓度是 10 g/L。将发酵培养基中的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度增加到 3 g/L, 但种子培养基中保持在 1 g/L。为确定补料速度, 首先实施 DO 恒定的补料-分批发酵。借助可使搅动速度增加到最大并随后利用氧气补充的级联控制器将 DO 含量控制在 20% 下。当葡萄糖耗尽时, DO 急剧上升(大于 40%) 并将葡萄糖浓缩物添加到发酵罐中使其最终浓度为 1 g/L。在每次添加葡萄糖后, 在允许进行下一次添加之前, 使泵保持不工作达设定时间段。当实施 DO 恒定补料-分批发酵时, OD 最大值可达到约 160。随后通过每小时添加足量葡萄糖使浓度高达 18 g/L 或 24 g/L 来选择等效于 DO 恒定控制器的恒定速度。在以恒定速度补料的补料-分批发酵期间, 当 DO 急剧上升到 40% 时开始以期恒定速度补加葡萄糖。

使用 1 小瓶大肠杆菌(pPW62)/升基础培养基+ 15 µg/mL 氯霉素在 2800 mL 冯巴赫烧瓶(Fernbach flask)中开始种子培养。将烧瓶在 32°C、150 rpm 下培育过夜(约 16 hr)。最终的 OD<sub>600</sub> 一般约等于 3。使用 10% 接种量来接种每个发酵罐。每个发酵罐使用 3 片鲁施顿桨叶和环式分布器。起始设定: 温度: 36°C, pH 值: 7.00 ± 0.05 (用 7.4 N NH<sub>4</sub>OH 控制), 空气流: 约 1 vvm, DO: 20%。DO 是由搅动(最小值: 150 rpm, 最大值: 1000 rpm) 和经由气体混合单元添加 O<sub>2</sub> 的级联来控制。如果需要,

通过手动添加 PPG-2000 来控制泡沫。在灭菌之前向培养基中添加 0.35 mL/L AF。在发酵期间，每小时取样一次以监测葡萄糖、pH 值和 OD<sub>600</sub> 离线值。自 1 mL 样品制备上清液并储存用于以后通过 HPLC 分析有机酸。

结果：

恒定补料速度的补料-分批发酵：

图 1 显示恒定补料速度下 OD、葡萄糖消耗和乙酸累积的时间进程。在 24 g 葡萄糖/L/h 和 18 g 葡萄糖/L/h 恒定补料速度下获得的 OD 最大值分别为 158 和 150。当使用 24 g/L/h 补料速度时，实验期间葡萄糖累积较多，为 28 g/L。当使用 18 g/L/h 补料速度时，葡萄糖累积到 12 g/L。在两种情况下均产生较少乙酸（即，小于 1.5 g/L）。指数生长期结束时 OD 接近 100。在两种情况下具体生长速度约为 0.60 (hr<sup>-1</sup>)。

为减少葡萄糖累积，对 16.4 g/L/h 和 15 g/L/h 的低恒定补料速度进行研究。图 2 显示上文提及恒定补料速度下 OD、葡萄糖消耗和乙酸累积的时间进程。OD 的最大值分别为 142 和 147。与先前实验一样，补料速度较快的培养物葡萄糖累积较多，尽管葡萄糖累积的量比先前实验少很多。在 16.4 g/L/h 期间累积约 8 g/L 葡萄糖，而在 15 g/L/h 发酵期间累积 5.4 g/L 葡萄糖。在两种情况下均产生较少乙酸（例如小于 1.5 g/L）（参见图 2）。在两种情况下具体生长速度约为 0.60 (hr<sup>-1</sup>)。因此，具体生长速度不受介于 15 g/L/h 与 24 g/L/h 之间的补料速度影响。

在不同生长 OD 下进行诱导：

因为 15 g 葡萄糖/L/h 的恒定补料速度达成较高细胞密度和较低葡萄糖和乙酸累积，所以使用其进行阿拉伯糖诱导研究。在此实验中，将在对数生长期中期 OD 约为 55 时和在数生长期晚期 OD 约为 80 时实施诱导进行比较。通过简单地用阿拉伯糖补料代替葡萄糖补料并以 13.4 g/L/h 的恒定速度补加阿拉伯糖来诱导培养物。经 3 小时时间段将总共 40 g/L 阿拉伯糖添加到每一培养物中。诱导后，每小时取样一次以用于通过 SDS-PAGE 分析 rLP2086、通过 HPLC 分析有机酸和阿拉伯糖。

图 3 显示在 OD 约为 55 和约为 80 下诱导时 OD 和 rLP2086 产生的时间进程。在 OD 约为 80 下诱导细胞时，OD 的最大值和 rLP2086 产量二者均较高（OD 的最大值：101 相对于 84；最大产量：1.8 g/L 相对于 1.2 g/L）。

用不同量的阿拉伯糖进行诱导：

以下实验的目的是对补加到培养物中的阿拉伯糖的总量进行评价并检验降低补加到培养物中的阿拉伯糖的总量是否仍然达成较高的 rLP2086 表达。将阿拉伯糖浓缩物分别以不同补料速度经 3 小时时间段补加到 4 份不同的培养物中，使最终阿拉伯糖浓度为 10、20、30 和 40 g/L。所有培养物都在 OD<sub>600</sub> 约为 80 下进行诱导。图 4 显示 OD 和 rLP2086 产生的时间进程。表 5 概述四种条件中每一种条件的 OD 和 rLP2086 产量。其显示，添加总共 10 g/L 阿拉伯糖时 rLP2086 的最大产量为 1.2 g/L；添加总共 20 g/L 阿拉伯糖时为 1.6 g/L；添加总共 30 g/L 阿拉伯糖时为 1.7 g/L；添加总共 40 g/L 阿拉伯糖时为 2.0 g/L。介于 20 g/L 与 40 g/L 之间的阿拉伯糖补料达成类似的

rLP2086 产量，然而，10 g/L 阿拉伯糖产生很少 rLP2086（即，1.2 g/L）。这些结果表明，添加用于诱导的阿拉伯糖的总量可自 40 g/L 降低到 20 g/L，此并不会降低 rLP2086 的生产量。因此，尤其考虑到阿拉伯糖的价格较高（约为 500 美元/kg US），阿拉伯糖使用量降低将更具成本有效性。

**表 5：在不同阿拉伯糖含量下进行诱导**

批号	总阿拉伯糖补料(g/L)	rLP2086 的最大产量(g/L)
X-BRN05-027	10	1.2
X-BRN05-024	20	1.6
X-BRN05-025	30	1.7
X-BRN10-114	40	2.0

阿拉伯糖添加方法的比较：

实施以下实验以检验当使用阿拉伯糖进行诱导时连续补加策略是否优于简单分批添加策略。在 X-BRN05-039 实验中，当 OD 为约 80 时，将 20 g/L 阿拉伯糖同时添加到发酵罐中，而非经一段时间补加。图 5 显示 OD、葡萄糖和阿拉伯糖消耗、和 rLP2086 产生的时间进程。最多获得 1.3 g/L rLP2086。虽然分批添加阿拉伯糖的操作较为简单，但其较连续补加产生较少 rLP2086。因此，连续阿拉伯糖补加策略优于简单分批添加。

为检验通过降低阿拉伯糖补料速度能否使阿拉伯糖的使用更加有效，对 3.3 g 阿拉伯糖/L/h 和 6.7 g 阿拉伯糖/L/h 补料速度进行比较。图 6 显示 OD 和 rLP2086 产生的时间进程。将阿拉伯糖浓缩物经 3 小时时间段以 6.7 g/L/h 补料速度补加到一份培养物中，并经 6 小时时间段以 3.3 g/L/h 速度补加到第二份培养物中。对于两份培养物，所添加阿拉伯糖的总量均为 20 g/L。如图 6 中所示，两种条件能够产生的 rLP2086 的最大量相同（即，2.2 g/L），但其产生动力学有所差异。较高的补料速度达成较高的产生速度。分别在 6.7 g/L/h 和 3.3 g/L/h 补料速度诱导后 3 小时和 6 小时时达到 rLP2086 的最大量。使用较高补料速度（即，6.7 g/L/h）的优势在于使用较高补料速度比使用较低补料速度生产成本（例如，效用成本）低。

诱导时间对 rLP2086 表达产量的影响：

为确定最佳收获时间，将通常的补料分布（经 3 小时补加 20 g/L 阿拉伯糖）延长到经 6 小时补加 40 g/L。在实验 X-BRN05-028 和 X-BRN05-029 中，分别在 OD 约为 55 和 OD 约为 80 时诱导细胞。图 7 显示 OD 和 rLP2086 产生的时间进程。尽管阿拉伯糖补加自 3 小时延长到 6 小时，但有趣的是，仍在诱导后约 3 小时获得峰值效价。在较高 OD 下诱导的培养物中，产物效价略微较高。在 OD 约为 55 下诱导时 rLP2086 的最大产量为 2.0 g/L (X-BRN05-028)，而在 OD 约为 80 下诱导时最大产量为 2.4 g/L (X-BRN05-029)。此结果表明，应在诱导后 3 小时收获细胞。

含盐和不含盐补料溶液的比较：

为检验所添加的盐在葡萄糖和阿拉伯糖补料溶液中是否必需，将普通葡萄糖和阿

拉伯糖补料与标准葡萄糖+盐（即， $K_2HPO_4/KH_2PO_4 + (NH_4)_2SO_4$ ）和阿拉伯糖+盐补料进行比较。对于两种培养物，均经 3 小时时间段补加 20 g/L 阿拉伯糖。生长分布和 rLP2086 产量分布非常类似。当向补料中添加盐时 rLP2086 的最大产量为 1.8 g/L，且当所制备的葡萄糖和阿拉伯糖补料不含盐时最大产量为 2.0 g/L。这些结果表明，没有必要向葡萄糖和阿拉伯糖补料溶液中添加盐。

亚科 B 菌株的恒定补料速度的补料-分批发酵：

通过用 1 ml 已解冻的工作种子接种含有 15  $\mu$ g/mL 氯霉素的 1 L 基础培养基开始种子培养。使培养物在 2.8 L 冯巴赫烧瓶中生长并在 32°C 和 150 rpm 下培育约 16 小时。最终 OD<sub>600</sub> 约为 3.0。在无菌条件下将 350 mL 种子培养物转移到含有 3 g/L  $(NH_4)_2SO_4$  但不含氯霉素的 3.15 L 基础培养基中。发酵物控制如下：pH 值为 7.0 $\pm$ 0.05（借助 7.4 N  $NH_4OH$  控制），温度为 36°C，DO 为 20%，且空气流为 1 vvm。通过搅动（最小值：150 rpm，最大值：1000 rpm）和氧气添加的级联来控制 DO。自动添加消泡剂 PPG-2000 以控制泡沫。在发酵期间，每小时取样一次以监测葡萄糖和 OD 离线值。接种后，DO 自约 100%降低到 20%且随后保持在 20%。当 DO 自 20%急剧上升到大于 40%时（通常为 6 小时耗用发酵时间(EFT)），葡萄糖（不含盐）补料泵开启为 15 g/L/h 速度。如图 8 中所示，经 6 小时 EFT 葡萄糖完全耗尽，导致 DO 急剧上升。当 OD 达到约 40 时每半小时取样一次。在 OD 为 90 时停止葡萄糖补加并开始以 13.4 g/L/h 速度补加阿拉伯糖。在补加 3 小时阿拉伯糖（不含盐）（即，总共添加 20 g/L 阿拉伯糖）后，停止补加阿拉伯糖并再继续发酵 1 小时。如图 8 中所示，所达成的 OD 为 102 且基于 SDS-PAGE 分析 2.0 g/L MnB rLP2086 被表达（参见图 9）。在诱导后 3 小时（即，约 12 小时 EFT）出现峰值。SDS-PAGE 和蛋白质印迹显示所表达的蛋白质确实为亚科 B rLP2086。

补料-分批发酵方法应用于 MnB rLP2086 亚科 A 菌株：

为测试用于 rLP2086 亚科 B 的所述补料-分批发酵方法是否适用于 rLP2086 亚科 A，利用对于亚科 B 菌株所确立的程序实施此方法。图 10 显示 OD、葡萄糖和阿拉伯糖消耗、和 rLP2086 产生的时间进程。亚科 A 的生长分布和 rLP2086 产量分布与亚科 B 所获得者类似（与图 8 相比）。SDS-PAGE 和蛋白质印迹显示所表达的蛋白质确实为亚科 A rLP2086（参见图 11）。表 6 列示六个不同亚科 A 实验的 OD 最大值和 rLP2086 的最大表达产量。rLP2086 的最大表达产量的范围是 1.5-2.1 g/L（平均最大产量：1.8 $\pm$ 0.2 g/L），与来自用于生产 rLP2086 亚科 B 的补料-分批发酵的结果接近。因此，提出用于亚科 B 菌株的所述补料-分批发酵也适用于亚科 A 菌株。

表 6: 亚科 A rLP2086 的最大表达产量和 OD 最大值

批号	rLP2086 的最大产量(g/L)	OD 最大值
X-BRN10-118	1.9	104
X-BRN10-119	1.9	104
X-BRN10-120	1.6	100
X-BRN05-042	1.5	100
X-BRN05-043	2.0	77
X-BRN10-121	2.1	92

在阿拉伯糖诱导期间双重补加葡萄糖和阿拉伯糖:

为在不降低 rLP2086 产量的情况下降低所需阿拉伯糖的量,对诱导阶段期间双重补加葡萄糖和阿拉伯糖进行研究。策略为经 3 hr 补加 10 g/L 阿拉伯糖(通常量的一半),同时在诱导期期间以标准葡萄糖补料速度的 25% (3.75 g/L/h)、50% (7.5 g/L/h)和 100% (15 g/L/h)继续补加葡萄糖。所制备的所有补料(葡萄糖和阿拉伯糖)均不含添加剂。

图 12a、12b 和 12c 显示亚科 B 细胞生长、葡萄糖、阿拉伯糖、乙酸浓度、和 rLP2086 产生的时间进程。所有三个实验均在 OD 约为 80 时进行诱导。如图 12a 中所示,100% 葡萄糖补料实验的 OD 在诱导后继续上升,峰值为 117,而 50% 实验的峰值为 106(图 12b)且 25% 实验的 OD 在诱导后保持在 100 左右(图 12c)。100% 葡萄糖补料实验在诱导后 3 小时开始累积葡萄糖和阿拉伯糖。50% 葡萄糖实验仅在最后样品中显示微量葡萄糖(读数为 0.21 g/L)。在 25% 葡萄糖实验中无葡萄糖累积。三个实验中均无任何阿拉伯糖累积。100% (图 12a)和 50% (图 12b)葡萄糖补料实验分别产生约 1.5 和 1.7 g/L rLP2086,而 25% (图 12c)实验产生超过 2.1 g/L 的 rLP2086。在阿拉伯糖用尽之前 100% 实验产量达到峰值,表明 rLP2086 表达可能被葡萄糖和乙酸累积所抑制。50% 实验产量约在阿拉伯糖用尽时达到峰值且 25% 实验产量在阿拉伯糖用尽之后达到峰值,此表明只要将葡萄糖浓度控制在最低水平(在图 12b 和 12c 中无葡萄糖累积)2086 表达可不受抑制。尽管仅 10 g/L 阿拉伯糖补加到这些培养物中,但其 rLP2086 产量与补加 20 g/L 时所获得者接近。当在诱导期间将葡萄糖浓度控制在较低水平时,同时补加葡萄糖和阿拉伯糖可使阿拉伯糖消耗降低 50% 且仍然达成相同 rLP2086 产量。因此,可显著降低化学品的成本。

为检验我们能否进一步降低阿拉伯糖消耗并提高 rLP2086 产量,对不同葡萄糖补料速度、阿拉伯糖补料的总量、和诱导 OD 进行研究。表 7 列示这些条件的不同组合。已显示葡萄糖补料速度介于 2.25 与 7.5 g/L/h 之间和阿拉伯糖补料速度介于 1.7 和 6.7 g/L/h 之间不会显著影响 rLP2086 的产量。诱导 OD 介于 80 与 105 之间获得的 rLP2086 产量接近。

表 7: 在不同葡萄糖补料速度、不同阿拉伯糖添加量、和于不同 OD 下进行诱导时 OD 的最大值和 rLP2086 的最大量

批号	葡萄糖补料速度(g/L/h)	阿拉伯糖补料速度(g/L/h)	阿拉伯糖补料的量	诱导 OD	OD 的最大值	rLP2086 的最大量(g/L)
X-BRN10-127	3.75	1.7	经 3 小时 5 g/L	74	86	1.6
X-BRN05-056	3.75	3.3	经 3 小时 20 g/L	79	122	2.8
X-BRN05-058	3.75	1.7	经 6 小时 10 g/L	94	122	3.0
X-BRN10-129	3.75	6.7	经 3 小时 20 g/L	110	124	2.7
X-BRN05-059	3.75	3.3	经 6 小时 20 g/L	105	126	2.9
X-BRN05-061	5.25	3.3	经 6 小时 20 g/L	102	112	2.6
X-BRN10-130	2.25	3.3	经 6 小时 20 g/L	93	108	2.4

### 实例 3: 按比例放大到 100 L 规模的补料-分批发酵

通过用 1 ml (即, 1 小瓶) 已解冻的工作种子接种含有 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 2 X 1 L 基础培养基开始种子培养。将 2.8 L 冯巴赫烧瓶中的培养物在 32°C 和 150 rpm 下在旋转振荡器中培育约 16 小时。

在无菌条件下将两份 1 L 过夜冯巴赫烧瓶种子培养物转移到含有 70 L 基础培养基但不含氯霉素的 150 L 发酵罐中。基础培养基中的 150 L 发酵物控制如下: pH 值为  $7.0 \pm 0.05$  (借助 7.4 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  控制), 温度为 36°C, DO 为 20%, 且空气流为 1 vvm。通过搅动和氧气添加的级联来控制 DO。自动添加消泡剂 PPG-2000 以控制泡沫。在发酵期间, DO 自约 100% 降低到 20% 且保持在 20% 下。当 DO 自 20% 急剧上升到大于 40% (通常在 OD 约为 20 下) 时, 指示葡萄糖已耗尽, 开动补料泵以用 15 g 葡萄糖/L 发酵液/h 的速度递送葡萄糖浓缩物 (即, 500 g/L)。在发酵期间, 每小时取样一次以监测葡萄糖和 OD 离线值。当 OD 达到约 40 时, 每半小时取样一次。在 OD 达到约 80 后, 停止补加葡萄糖并开始以 6.7 g 阿拉伯糖/L 发酵液/h 的速度补加阿拉伯糖 (例如, 500 g/L 阿拉伯糖浓缩物), 持续 3 小时。

图 13a 显示 100 L 规模时亚科 B 细胞生长、葡萄糖消耗、乙酸累积、和 rLP2086 产生的时间进程。100 L 规模的发酵分布与所观察到的小规模的发酵分布类似。所获得 OD 的最大值为 99 且 rLP2086 的最大产量为 1.9 g/L。这些结果表明补料-分批发酵可按比例缩放。

图 13b 显示 100 L 规模时亚科 A 细胞生长、葡萄糖消耗、乙酸累积、和 rLP2086 产生的时间进程。100 L 规模的发酵分布与所观察到的小规模的发酵分布类似。所获得 OD 的最大值为 96 且 rLP2086 的最大产量为 2.0 g/L。这些结果表明补料-分批发酵可按比例缩放并且切实可行。

图 14a 显示 100 L 规模时葡萄糖和阿拉伯糖双重补料下亚科 B 细胞密度、葡萄糖、阿拉伯糖、乙酸浓度、和 rLP2086 产量的时间进程。在诱导期间，对于葡萄糖和阿拉伯糖补料，补料速度分别控制在 3.75 和 1.67 g/L/h。经 5 小时双重补加阿拉伯糖和葡萄糖。所获得 OD 的最大值为 90 且 rLP2086 的最大产量为 1.8 g/L。在诱导 4 小时后 rLP2086 达到最大产量。对于亚科 B 来说，OD 的平均最大值和 rLP2086 的平均最大产量分别为  $84.8 \pm 6.8$  和  $1.6 \pm 0.3$  g/L。这些结果表明，在诱导期期间双重补加葡萄糖和阿拉伯糖的补料-分批发酵可按比例缩放。

图 14b 显示 100 L 规模时亚科 A 细胞生长、葡萄糖消耗、乙酸累积、和 rLP2086 产生的时间进程。在与上一段落相同的条件下进行发酵并将细胞诱导 6 小时。所获得 OD 的最大值为 89 且 rLP2086 的最大产量为 1.8 g/L。在诱导 4 小时后 rLP2086 达到最大产量。对于亚科 A 来说，OD 的平均最大值是  $87.9 \pm 10.5$  且 rLP2086 的平均最大产量是  $1.8 \pm 0.2$  g/L。这些结果表明所述补料-分批发酵可按比例缩放并且切实可行。

尽管已参照多个实施例和实例对本发明予以阐述，但所属领域的技术人员应认识到，可在不背离本发明精神和范围下对其进行各种修改。

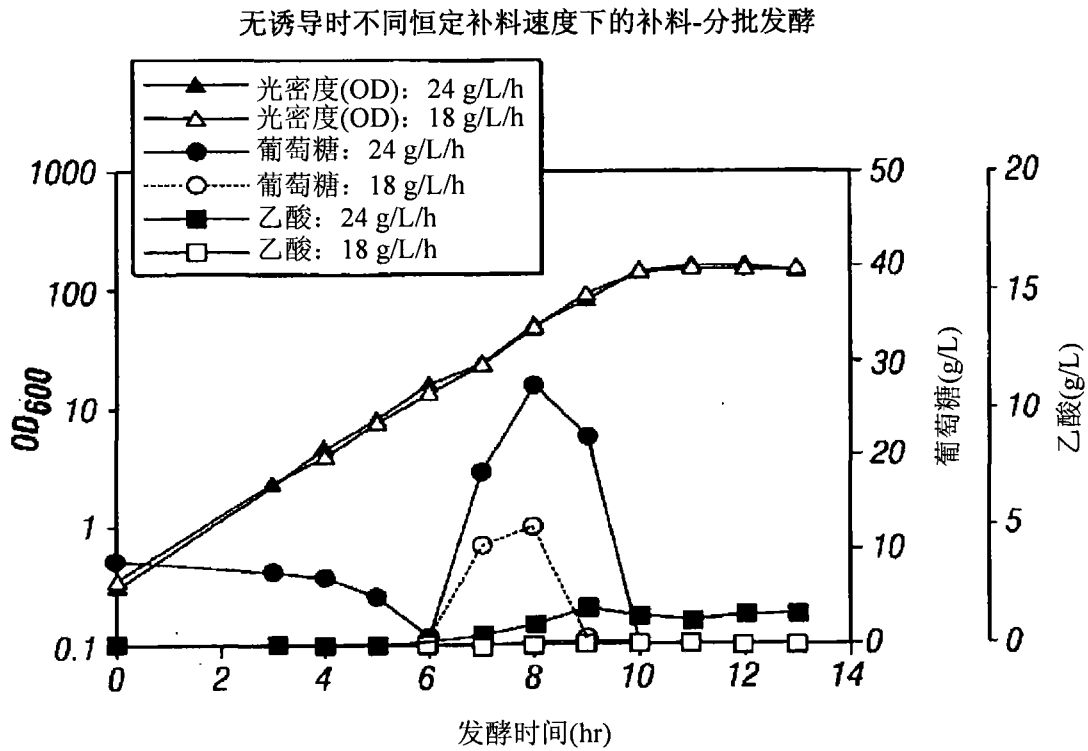


图 1

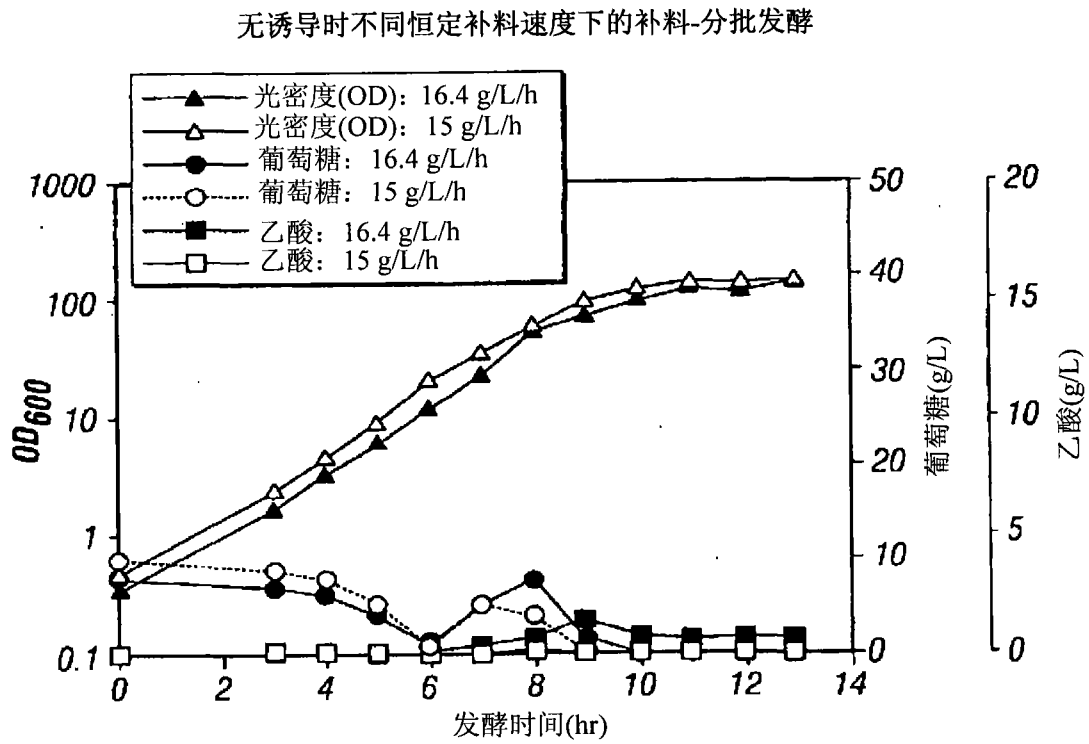


图 2

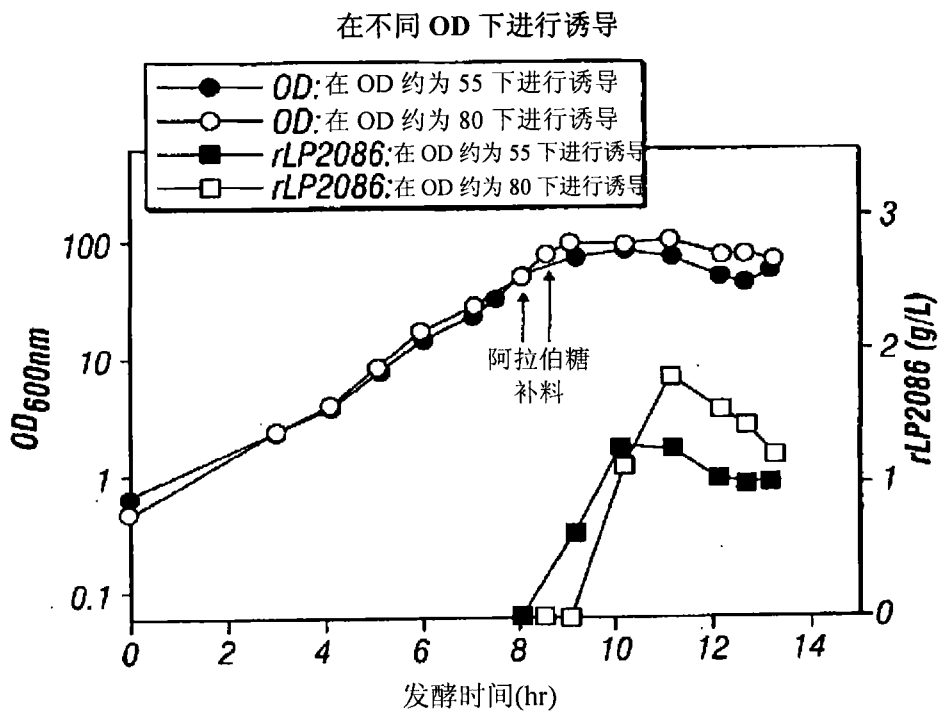


图 3

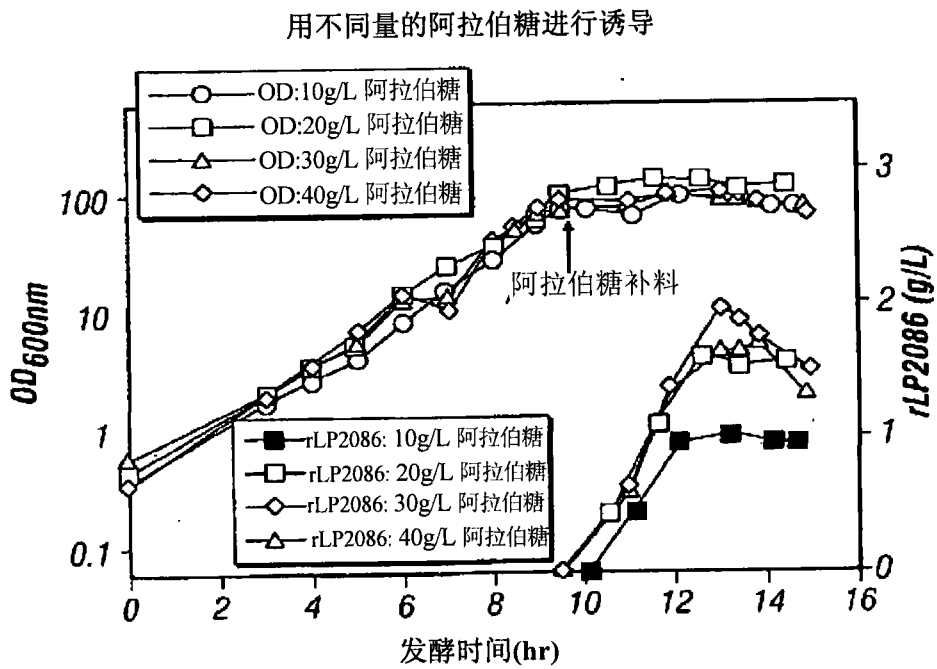


图 4

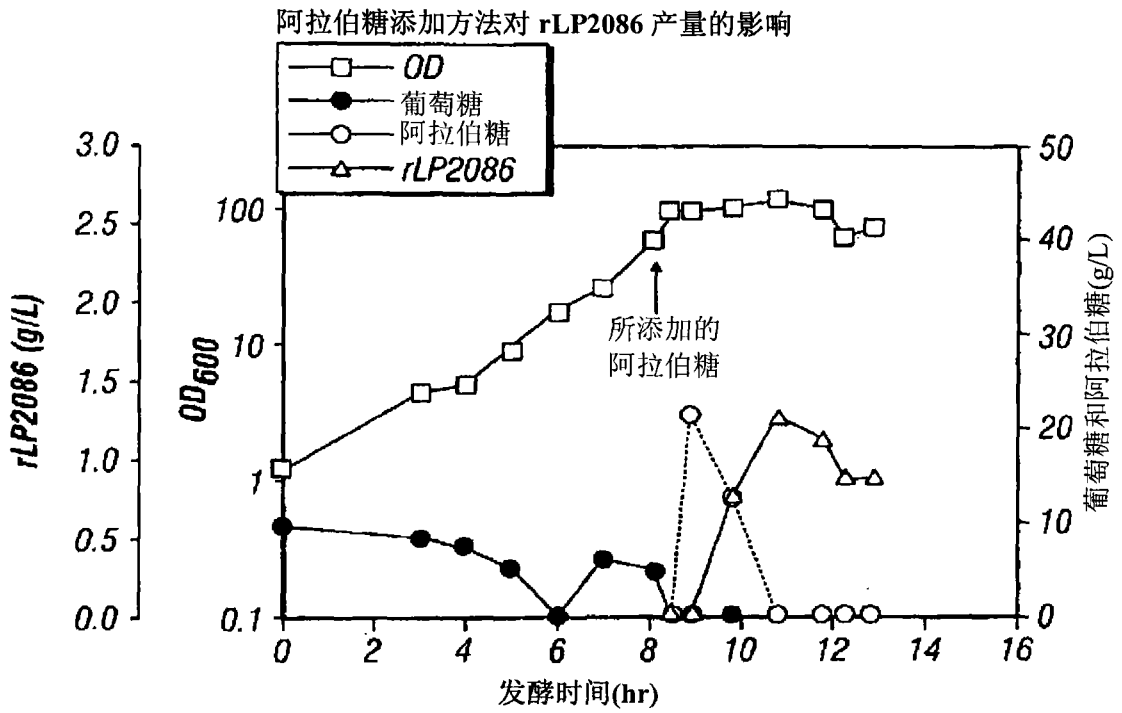


图 5

阿拉伯糖补料速度对 rLP2086 产量的影响

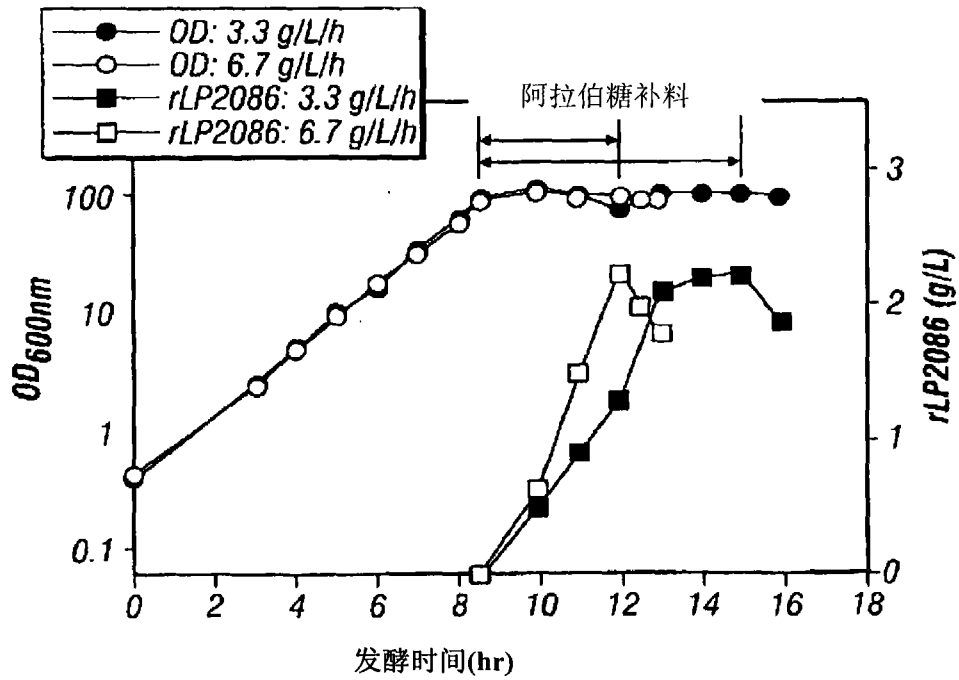


图 6

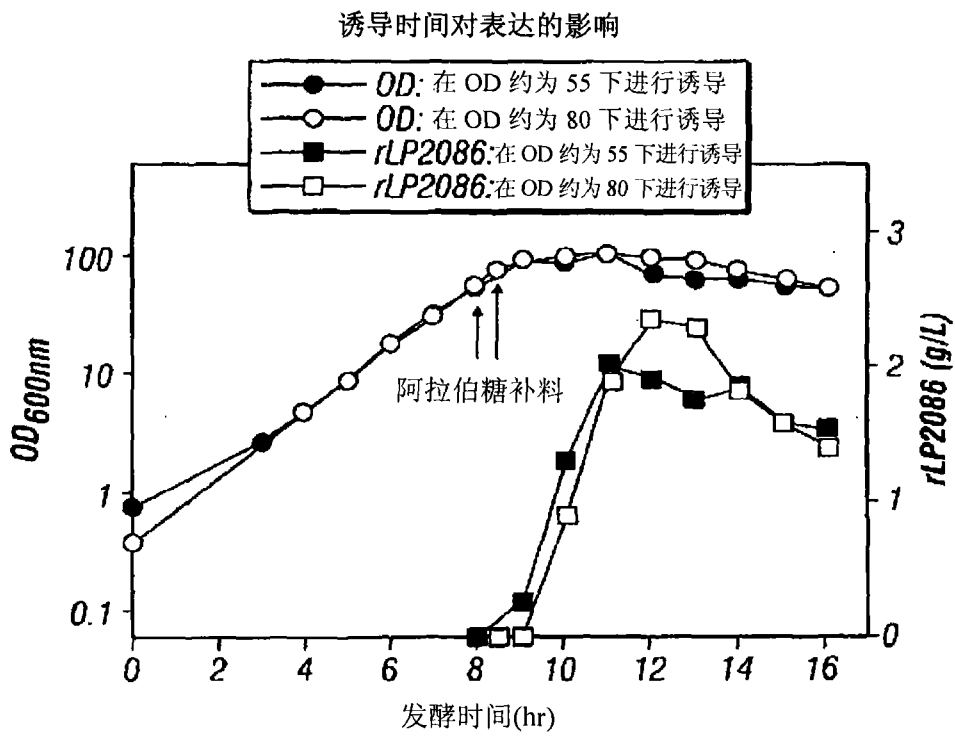


图 7

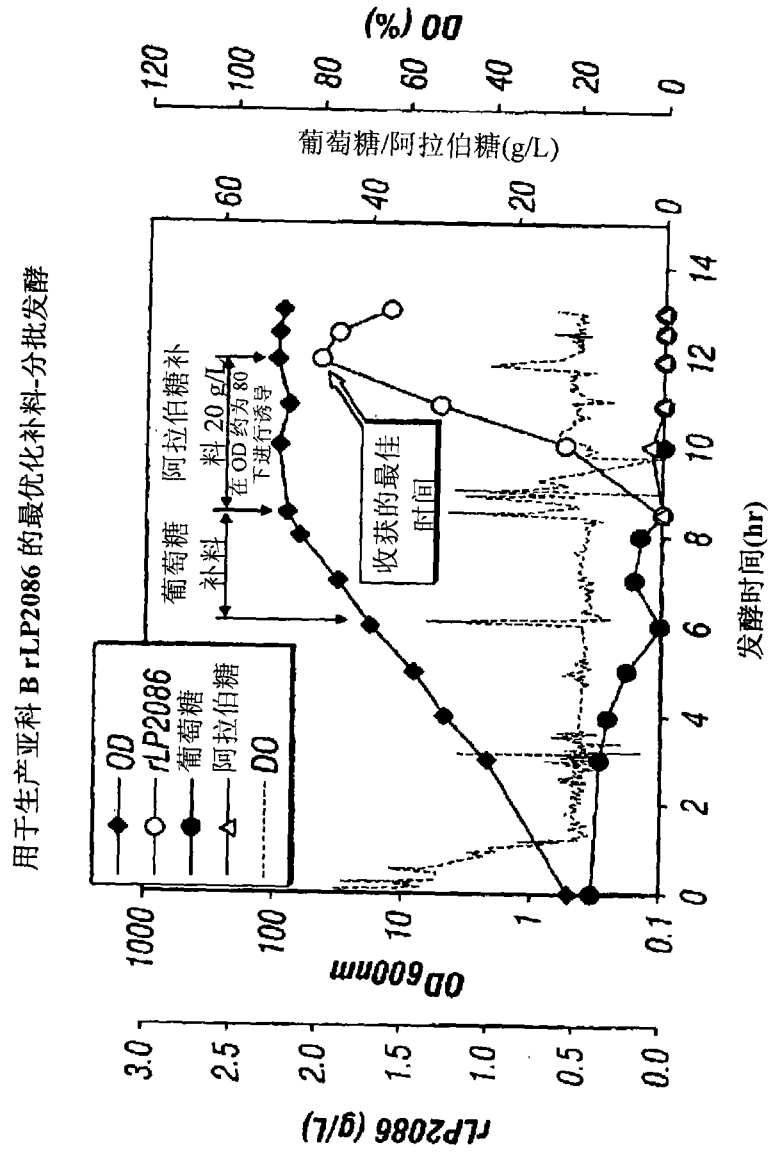
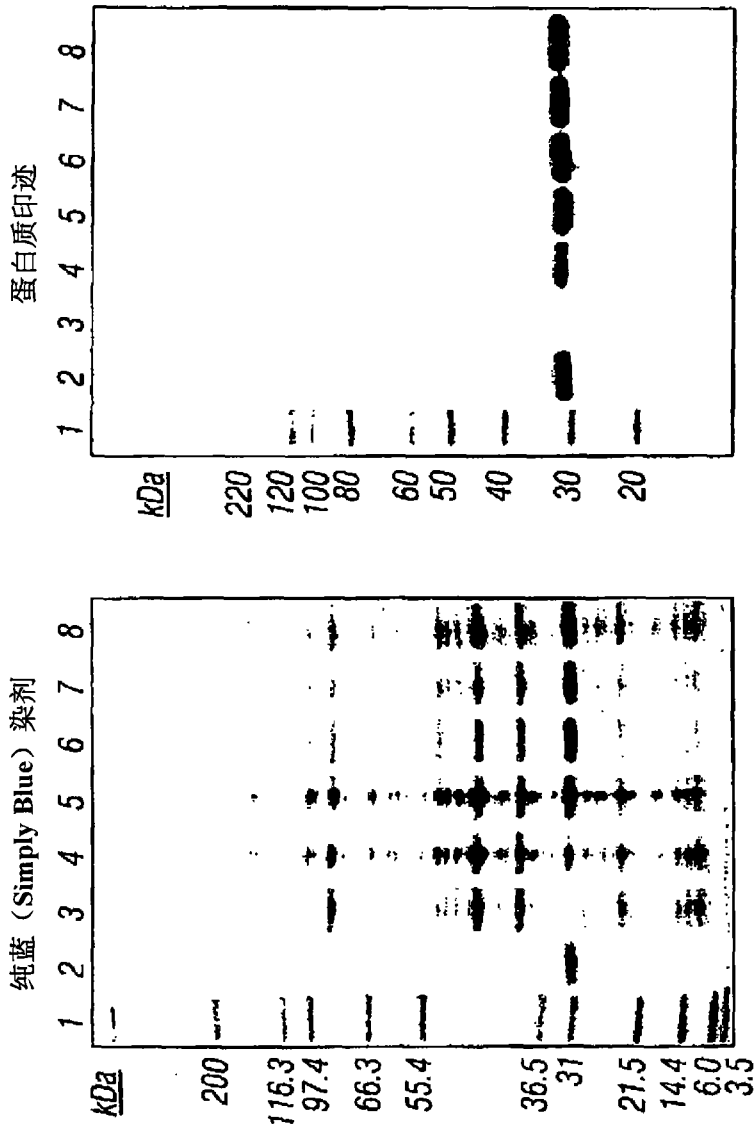


图 8

rLP2086 亚科 B 诱导的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹



泳道 1: MWt 标样; 泳道 2: rLP2086; 泳道 3: 预先诱导; 泳道 4: 诱导 1.1 hr  
; 泳道 5: 诱导 2.0 hr; 泳道 6: 诱导 3.0 hr; 泳道 7: 诱导 3.6 hr; 泳道 8: 诱导 4.0 hr

图 9B

图 9A

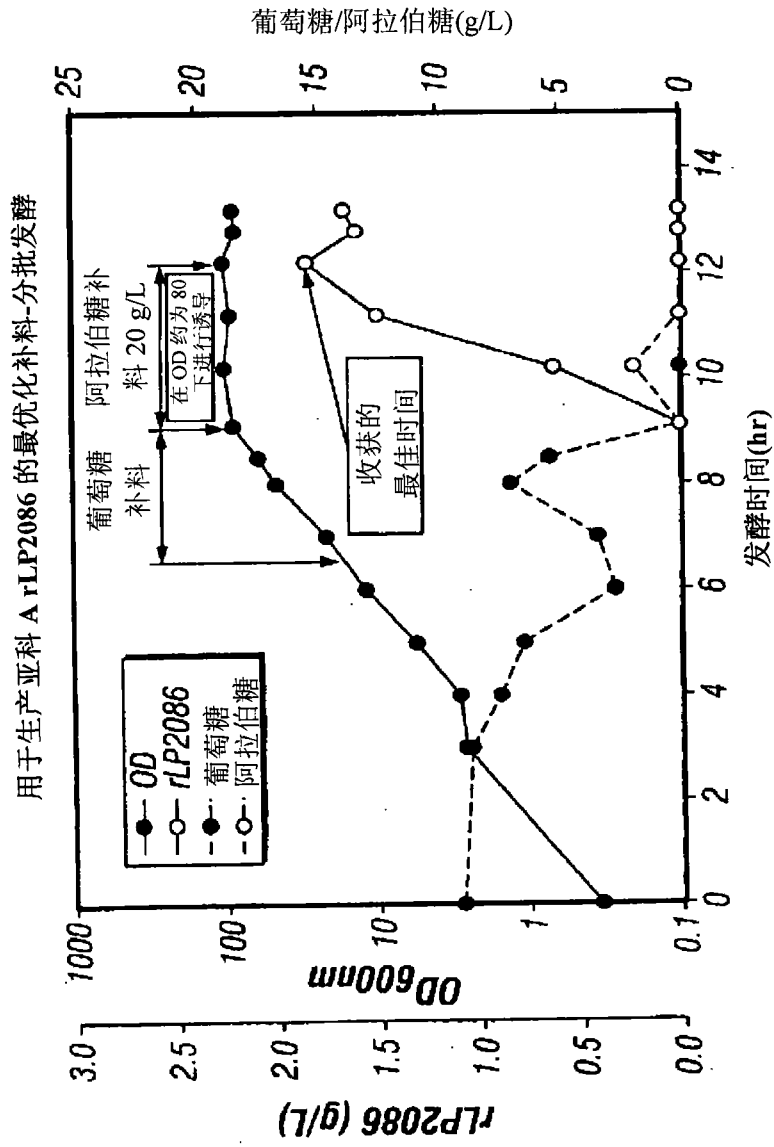
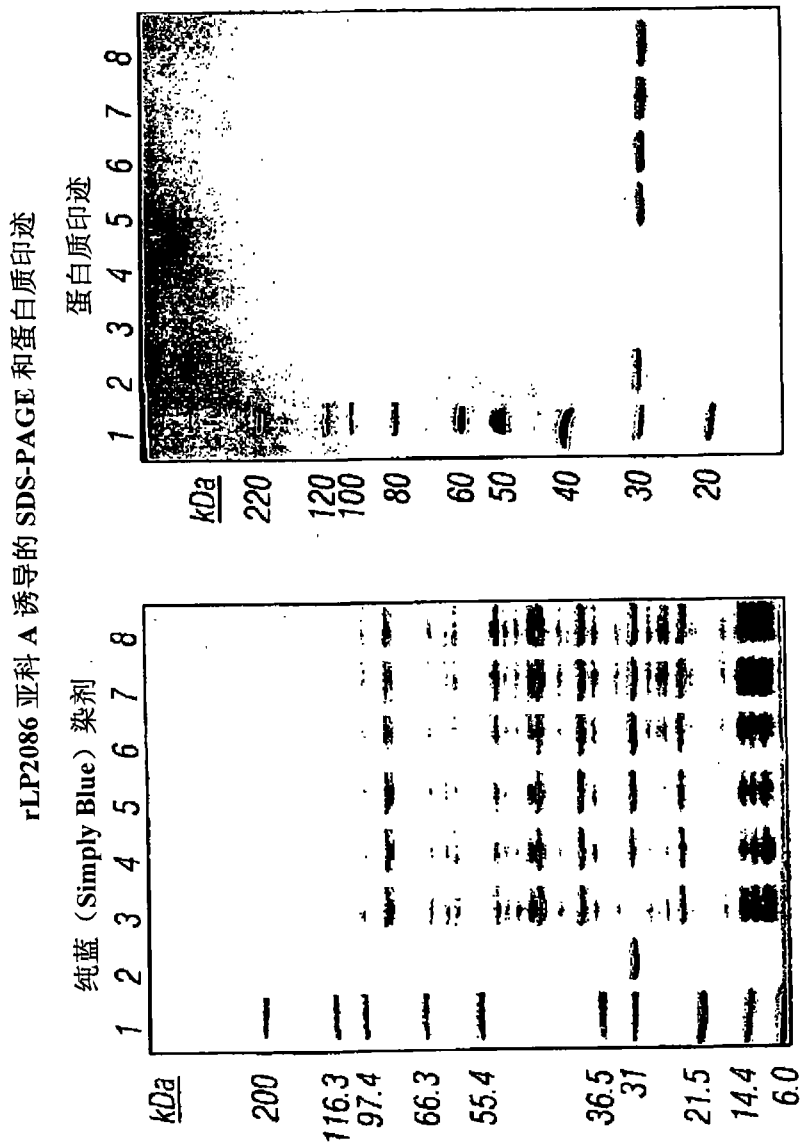


图 10



泳道 1: MWt 标样; 泳道 2: rLP2086 (A); 泳道 3: 预先诱导; 泳道 4: 诱导 1.1 hr  
; 泳道 5: 诱导 2.0 hr; 泳道 6: 诱导 3.1 hr; 泳道 7: 诱导 3.6 hr; 泳道 8: 诱导 4.0 hr

图 11A

图 11B

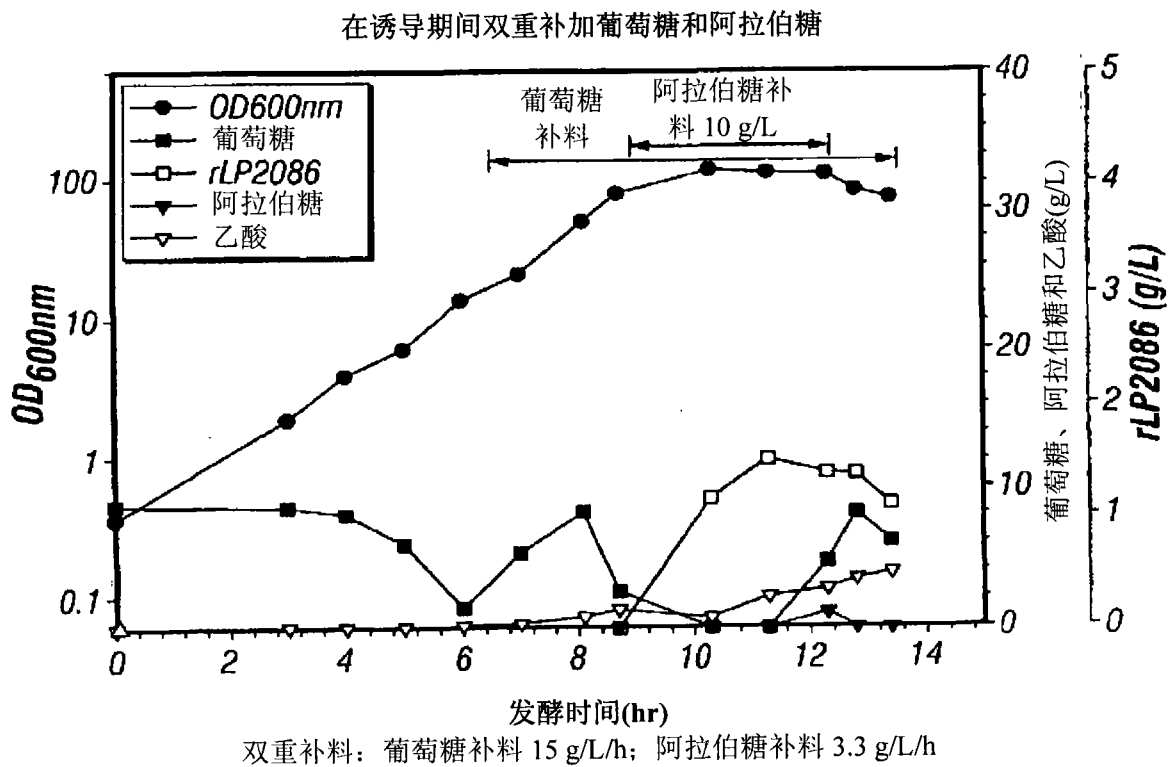
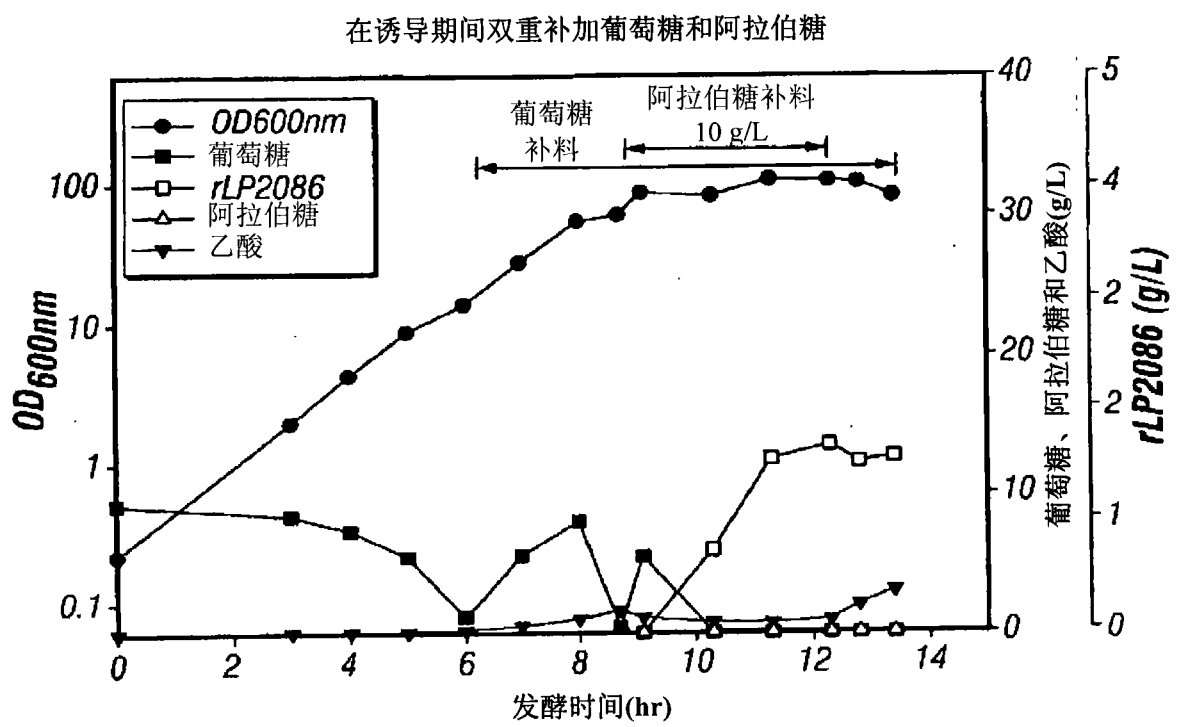


图 12A



双重补料：葡萄糖补料 15 g/L/h；阿拉伯糖补料 3.3 g/L/h

图 12B

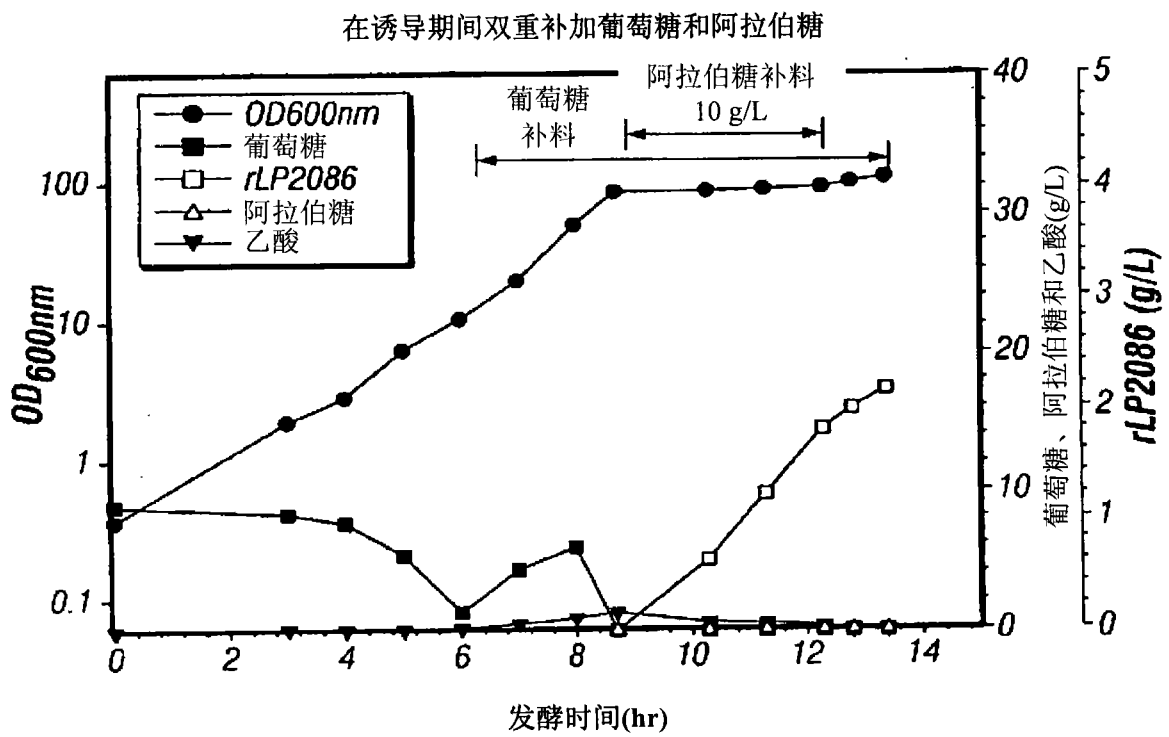


图 12C

100 L 规模的 rLP2086 亚科 B 大肠杆菌(pPW62)的补料-分批发酵

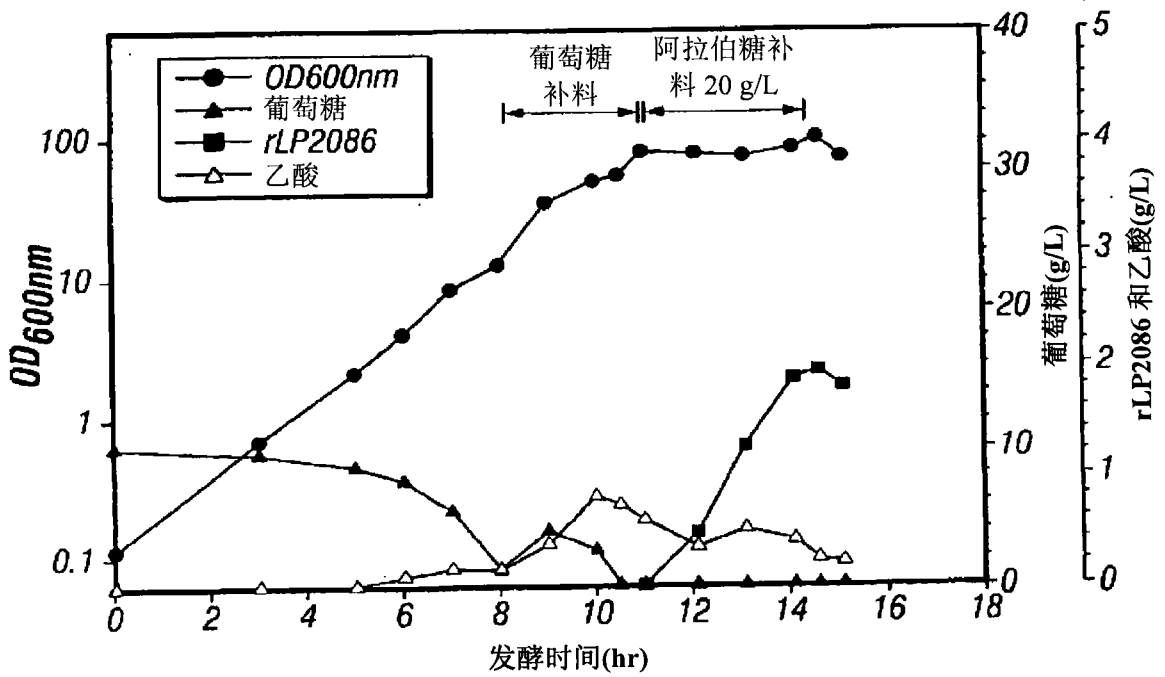


图 13A

100 L 规模的 rLP2086 亚科 A 大肠杆菌(pPW102)的补料-分批发酵

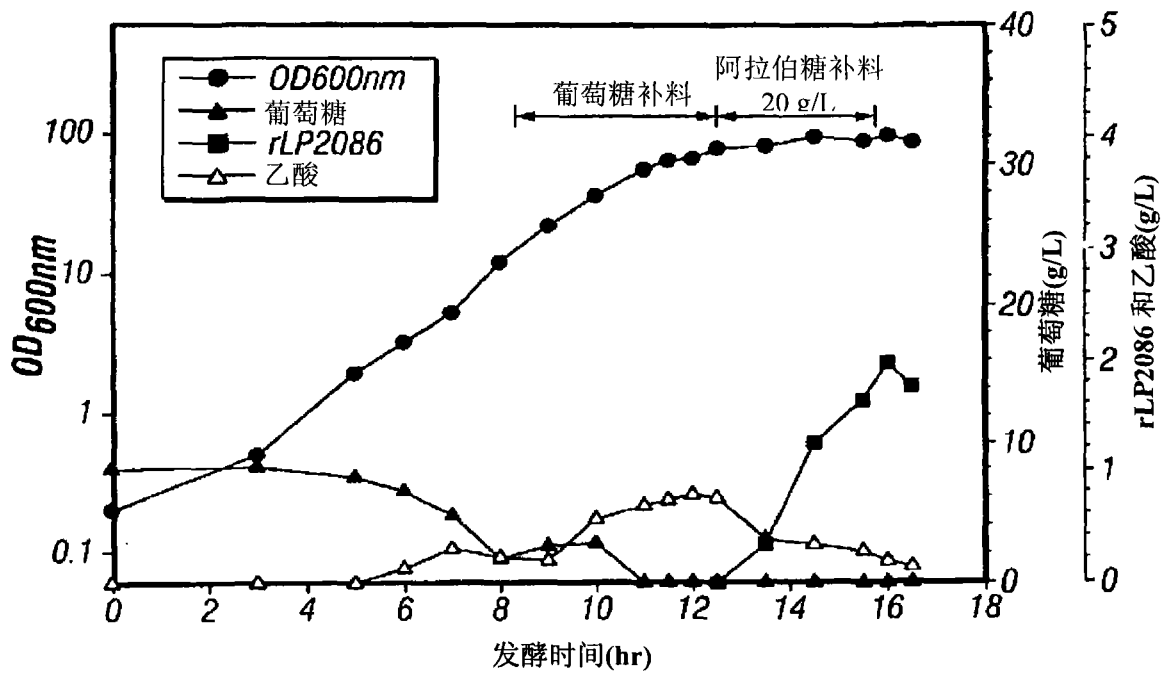


图 13B

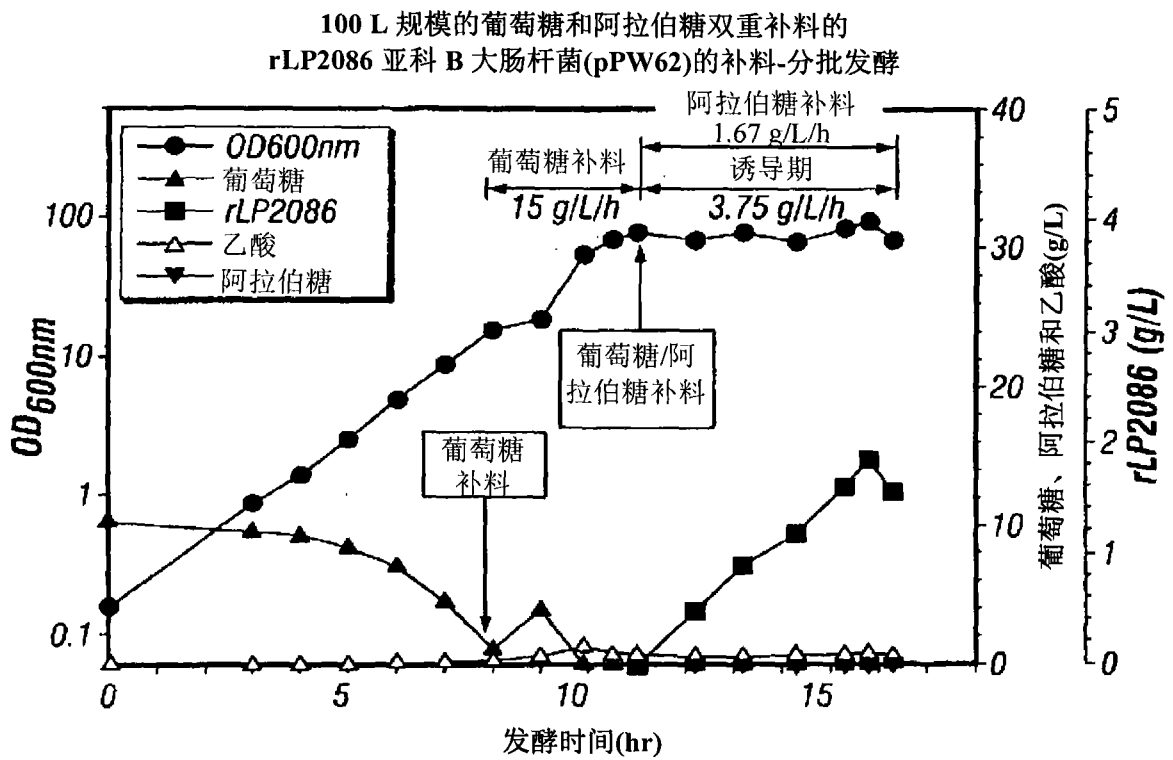


图 14A

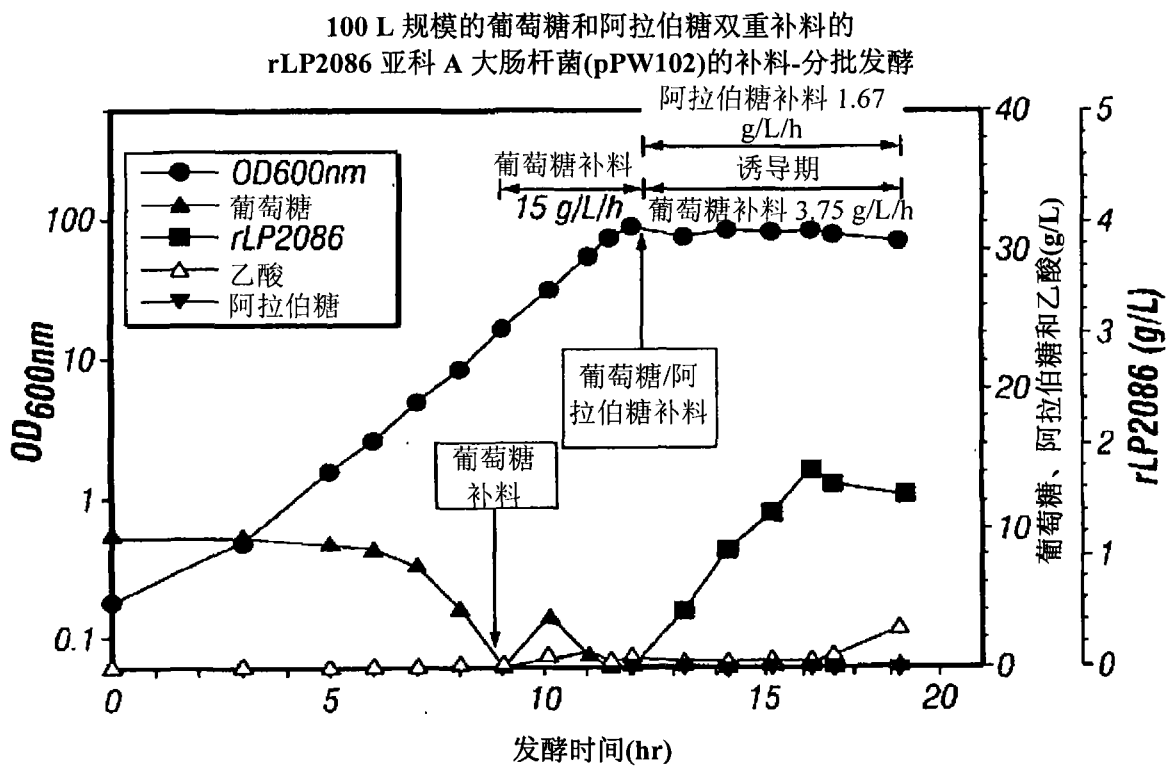


图 14B