

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6215305号
(P6215305)

(45) 発行日 平成29年10月18日(2017.10.18)

(24) 登録日 平成29年9月29日(2017.9.29)

(51) Int.Cl.

C 12 P 21/00 (2006.01)
C 12 N 1/00 (2006.01)

F 1

C 12 P 21/00
C 12 N 1/00C
F

請求項の数 23 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2015-506220 (P2015-506220)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月17日 (2013.4.17)
 (65) 公表番号 特表2015-514408 (P2015-514408A)
 (43) 公表日 平成27年5月21日 (2015.5.21)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2013/057956
 (87) 國際公開番号 WO2013/156504
 (87) 國際公開日 平成25年10月24日 (2013.10.24)
 審査請求日 平成28年3月23日 (2016.3.23)
 (31) 優先権主張番号 12164458.7
 (32) 優先日 平成24年4月17日 (2012.4.17)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 506047949
 グリーンオヴェイション・バイオテック・
 ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテ
 ル・ハフツング
 GREENOVATION BIOTEC
 H GMBH
 ドイツ79108フライブルク、ハンス-
 ブンテーシュトラーゼ19番
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 瞳
 (74) 代理人 100138900
 弁理士 新田 昌宏
 (72) 発明者 ヴォルフガング・ヨスト
 ドイツ79098フライブルク、インゴボ
 ルクードレヴィッツ、アレー31番
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換えタンパク質の分泌を増加させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

界面活性ポリマーおよび一価金属イオンの組合せを含み、少なくとも0.32 osmol/Lのオスモル濃度を有する培養培地中での植物細胞におけるタンパク質の発現によって、細胞壁を通じて組換えタンパク質を分泌させるステップを含む、細胞壁を有する細胞における組換えタンパク質の生産方法。

【請求項2】

培地への分泌が細胞のアポプラスティックスペースからもたらされる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

細胞が、コケ細胞である、請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項4】

細胞が、懸濁培養において培養される、請求項1～3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項5】

金属イオンが、アルカリ金属イオンである、請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

。

【請求項6】

アルカリ金属イオンが、ナトリウムである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

金属イオンが、培地中、少なくとも20 mMの濃度で存在する、請求項1～6のいずれか

20

1つに記載の方法。

【請求項 8】

界面活性ポリマーが、ポリアルキルグリコールである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 9】

ポリアルキルグリコールが、ポリエチレングリコールである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

界面活性ポリマーが、培地中、少なくとも 0.05 重量 % の濃度で存在する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 11】

培地が、硝酸塩イオン、リン酸塩イオン、硫酸塩イオン、カルシウムイオン、カリウムイオン、またはその組合せを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 12】

硝酸塩イオンが少なくとも 0.2 mM の濃度であり、リン酸塩イオンが少なくとも 0.05 mM の濃度であり、硫酸塩イオンが少なくとも 0.02 mM の濃度であり、カルシウムイオンが少なくとも 0.1 mM の濃度であり、カリウムイオンが少なくとも 0.1 mM の濃度であるか、またはその組合せである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

該培地中での組換えタンパク質の分泌のステップに先行して、0.1 osmol/L 未満のオスモル濃度を有する培養培地にて、細胞を成長させることによって、タンパク質が、細胞の内部またはアポプラスティックスペースに蓄積する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 14】

該先行ステップにおける培養培地が、硝酸塩イオン、リン酸塩イオン、硫酸塩イオン、カルシウムイオン、カリウムイオン、またはその組合せ；および / または最大濃度 20 mM のナトリウムイオンを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

該先行ステップにおいて、硝酸塩イオンが少なくとも 0.2 mM の濃度であり、リン酸塩イオンが少なくとも 0.05 mM の濃度であり、硫酸塩イオンが少なくとも 0.02 mM の濃度であり、カルシウムイオンが少なくとも 0.1 mM の濃度であり、カリウムイオンが少なくとも 0.1 mM の濃度であるか、またはその組合せである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

該先行ステップにおける培地が、界面活性ポリマーを含まないか、または 0.08 重量 % の最大濃度で界面活性ポリマーを含む、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 17】

該先行ステップが、2 ~ 30 日の期間にわたって行われる、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 18】

該分泌ステップが、少なくとも 2 日間の期間にわたって行われる、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 19】

期間が、3 ~ 120 日間である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも 0.05 重量 % の量の界面活性ポリマーおよび少なくとも 20 mM の濃度の一価金属イオンを含み、少なくとも 0.32 osmol/L のオスモル濃度を有する、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の方法にしたがって分泌を増加させるのに適した培養培地。

【請求項 21】

硝酸塩イオン、リン酸塩イオン、硫酸塩イオン、カルシウムイオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、またはその組合せを含む、請求項 20 に記載の培養培地。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

硝酸塩イオンが少なくとも0.2 mMの濃度であり、リン酸塩イオンが少なくとも0.05 mMの濃度であり、硫酸塩イオンが少なくとも0.02 mMの濃度であり、カルシウムイオンが少なくとも0.1 mMの濃度であり、カリウムイオンが少なくとも0.1 mMの濃度であるか、またはその組合せである、請求項21に記載の培養培地。

【請求項23】

請求項20～22のいずれか1つに記載の培養培地を再構成するための乾燥栄養培地混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、適当な発現方法を用いる、組換え植物または真菌発現系の最適化に関する。

【背景技術】

【0002】

植物におけるng/l～ μ g/lの範囲の濃度での組換えタンパク質の生産は、これまでに多くの刊行物に記載されている。公報WO 01/25456 A2は、コケ組織またはコケ細胞を溶解させることなくコケに存在するタンパク質を生産する方法に関し、さらに、培養培地中でのPVPの使用によって生産性が向上されうることに言及している。一例として、このことは、大きさが28 kDaの小さいグリコシル化ホモダイマーであるVEGF₁₂₁の組換え生産に対して示される（Baurら、Journal of Biotechnology 119（2005）：332-342）。Baurらは、PEGを用いるコケの一過性の形質転換を記載している。VEGFの生産に用いた培地は、PVPまたはPEGを含んでいなかった。

【0003】

Drakeら、Plant Mol. Biol. 52（2003）：233-241は、タバコ植物組織、すなわち、根の組織の培養物中の抗体の組換え発現を記載している。抗体は、マイクログラム（ μ g）レンジでの「rhizosecretion」の過程によって分泌された。「rhizosecretion」に基づく有効な植物発現系は、主として、任意のタイプの植物をアグロバクテリウム・リゾゲネスに感染させることによって刺激されうる毛状根培養である（Gaumeら、Plant Cell Rep. 21（2003）：1188-1193）。

【0004】

Komarnyskyら、Plant Physiology 124（2000）：927-933は、排水の過程による組換えタンパク質の分泌を記載しており、そこではタンパク質が葉の排水液中に分泌される。毎日の生産速度は、1 μ g/gの葉の塊の範囲であった。

30

【0005】

Kwonら、Biotechnology and Bioengineering 81（7）（2003）：870-875には、異種タンパク質の組換え発現のためのタバコ懸濁培養が記載されている。形質転換された植物のカルス細胞が、ヒトIL-12の生産のための細胞株として用いられた。細胞培養培地のための強力な添加物として、3つのポリマーが、そのIL-12を安定化させる能力について試験された。PVPおよびPEGは、効果がなかったが、ゼラチンは、培地中に存在するプロテアーゼが、濃度の低下を引き起こす場合、

培養の第5日までIL-12の安定化をもたらした。同様の結果が、Leeら、Journal of Biotechnology 96（2002）：205-211に記載されている。

40

【0006】

LaCountら、Biotechnology Letters 19（1）（1997）：93-96は、プロテアーゼ分解からの保護のためのPVPでの処理による、組換え的に生産された抗体およびGM-CSFそれぞれの安定化を記載している。

【0007】

LeeおよびKim、Biotechnology Letters 24（2002）：1779-1783は、攪拌槽バイオリアクター中の機械的損傷からタバコ懸濁液培養物中に存在する細胞を保護するためのブルロニックF-68およびポリエチレングリコールの使用を記載している。

【0008】

50

Magnusonら、Protein Expression and Purification 7、(1996) : 220-228は、タバコ細胞の懸濁培養物中のモノクローナル抗体の50 kDaの重鎖の発現を記載している。培養培地へのPVPの添加は、タンパク質の安定化ならびに血管壁上の凝集および蓄積の防止の原因となる、35倍増加した収量をもたらした。タンパク質の66%が細胞質に見出され、30%が膜に、培地中にはわずか4%が見出された。細胞膜を通る通路にしかシグナルを送らない分泌シグナル配列にもかかわらず、50 kDa以上の分子量を有する大きいタンパク質分子が、細胞壁を通る通路には大きすぎるとみなされた。

【0009】

Schusterら、Biotechnol. J. 2 (2002) : 1-9は、コケプロトプラストにおける抗体の生産を記載している。先のBaurら(上記)による効率増強形質転換と組み合わせた3MおよびW5培地の混合物中で培養することによって、収量は0.1 - 0.5 μg/mlから8.2 μg/mlに増加された。10

【0010】

TsoiyoobiDoran、Biotechnol. Appl. Biochem. 35 (2002) : 171- 180は、タバコ細胞の懸濁培養によって、様々な発現培地および抗体の発現に及ぼすそれらの影響を記載している。分泌された抗体の収量は、20 ~ 200 μg / 培養培地50 mlであった。

【0011】

文献US 2010/035327 A1は、米の多糖類およびポリペプチドから生産され、細胞産生物の成長と分泌の両方を増強する培養培地のための普遍的な添加剤に関する。しかしながら、細胞壁を通る分泌の問題は、ここでは取り組まれていない。20

【0012】

Davidら、Journal of Biotechnology 150 (1) (2010) : 115- 124は、巨大菌、すなわち、細胞壁の無い細胞における抗体フラグメントの組換え生産に関する。

【0013】

Baurら、Plant Biotechnology Journal 3 (3) (2005) : 331- 340は、発現系としてのヒメツリガネゴケ (P. patens) ならびに添加剤 (PVP) の使用およびヒト血清アルブミンの発現による、組換えヒト成長因子 (VEGF) の増加した分泌を記載している。

【0014】

Deckerら、Bioprocess and Biosystems Engineering, Jan. 31 (1) (2008) : 3-9は、一般に、コケバイオリアクターおよび植物特異的グリコエンジニアリングにおける培養条件を議論している。30

【0015】

Twymanら、Trends in Biotechnology 21 (12) (2003) : 570- 578は、組換え発現系としての植物の使用を説明する。収量に関して、トランスフェクション系、シグナル配列およびmRNA安定性が議論される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

異種タンパク質の組換え産生における植物および植物細胞の生産性を増加させるための既知の方法の利用可能性にもかかわらず、植物系は、依然として、たとえば樹立CHO発現系などの動物細胞よりも生産性が低い。したがって、植物発現系の生産性をさらに増加させるための一定の必要性がある。さらに、産生細胞が破壊されなくてもよく、さらに産生のために用いることができるよう、分泌タンパク質を生産するのが望ましい。40

したがって、本発明の目的は、改善された発現方法ならびにそのための手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明は、界面活性ポリマーおよび一価金属イオンの組合せを含み、少なくとも0.22 mol/Lのオスモル濃度を有する培養培地中での細胞に存在するタンパク質を発現させることによって、細胞壁を通じて組換えタンパク質を分泌させるステップを含む、細胞壁を有50

する細胞における組換えタンパク質の生産方法に関する。本発明のさらなる態様は、そのような培養培地ならびに材料組成物である。さらに詳しくは、該分泌ステップは、分泌の増加である。該増加は、通常、非処理細胞と比較して定義される。さらに、本発明は、添付の特許請求の範囲に定義されるとおりである。以下に、特定の実施態様および好ましいパラメーターを記載するが、それらは互いに組み合わされてもよい。

【0018】

生物医薬品の成功的で安価な製造は、タンパク質の成功的分泌ならびに産生物の量の増加 [mg/lからg/lへ] を必要とする。さらに、細胞壁は、それらの(巨大)分子構造により、サイズ排除フィルターとして働く。植物または真菌細胞での組換えタンパク質の産生において、この事実は、90 kDa以上のを有する産生物が培養培地へ分泌されるのを妨げ、さらなる処理のために有利である。実際にこの様式で産生されたタンパク質は、それらが分泌シグナルペプチドを備えている場合に、細胞膜を通って輸送されるが、しかしながら、それらは、アポプラスティックスペース、すなわち、細胞膜と植物細胞壁の外縁の間に位置する区画に蓄積する傾向がある。少なくとも50 kDaを有する、より小さいタンパク質の分泌もまた減少する。第一に、本発明は、タンパク質の産生を増加させ、さらに驚くべきことに、該タンパク質の分泌を増大させる。本発明にしたがって生産されたタンパク質は、任意のサイズであってよいが、特に有利であるのは、より大きいタンパク質である。したがって、本発明にしたがって生産されたタンパク質は、40 kDa以上、50 kDa以上、55 kDa以上、60 kDa以上、65 kDa以上、70 kDa以上、75 kDa以上、80 kDa以上、85 kDa以上または90 kDa以上のサイズを有するのが好ましい。該タンパク質は、このようなタンパク質の二量体またはヘテロマーであってもよい。

【0019】

一価金属イオンが、Li、Na、K、RbまたはCsなどのアルカリ金属イオンから選ばれるのが好ましい。該一価の金属イオンがNaイオンを含むか、またはNaイオンであるのが特に好ましい。

【0020】

金属イオン、たとえば、Naイオンが、少なくとも20 mMの濃度で培地中に存在するのが好ましく、なくとも30 mM、少なくとも40 mM、少なくとも50 mM、少なくとも60 mM、少なくとも70 mM、少なくとも80 mM、少なくとも90 mMまたは少なくとも100 mMの濃度が特に好ましい。これらの濃度で存在する金属イオンが、ナトリウムであるのが好ましい。

【0021】

金属イオンの添加は、オスモル濃度の増加を引き起こし、それによって、細胞壁を通る分泌が増大するが、同時に、細胞壁において著しいストレスを引き起こし、今度は、細胞増殖の減速または完全な阻止をもたらす。タンパク質の産生もまた減速される。オスモル濃度が、少なくとも0.33 osmol/L、少なくとも0.34 osmol/L、少なくとも0.35 osmol/L、少なくとも0.36 osmol/L、少なくとも0.37 osmol/L、少なくとも0.38 osmol/Lまたは少なくとも0.4 osmol/Lであるのが好ましい。さらに詳しくは、オスモル濃度は、0.32 osmol/L～0.6 osmol/Lまたは0.35 osmol/L～0.55 osmol/Lの範囲内である。

【0022】

界面活性ポリマーは、液体の表面張力または2つの相の間の界面張力を低下させる物質であり、したがって、分散の形成を可能にするか、または促進し、あるいは可溶化剤として作用することができる。驚くべきことに、高オスモル濃度でこのようなポリマーを金属イオンと組み合わせて用いることによって、細胞壁を有する細胞での分泌タンパク質の発現において、産生の有意な増加を達成することができることが見出された。さらに詳しくは、ポリマーは、非イオン性、水溶性、界面活性ポリマーである。該ポリマーが、タンパク質の変性効果を持たないのが好ましい。ポリマーまたはコポリマーの例は、ポリアルキルグリコール、ポリソルベートまたはポリビニルピロリドンなどのポリエーテル；ポリビニルアルコール；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースなどの水溶性セルロース；ビニルピロリドン-酢酸ビニルコポリマー(コポビドン)；ポリ酢酸ビニル；部分的

10

20

30

40

50

に加水分解されたポリビニルアルコール；ポリビニルアルコール - ポリエチレングリコールコポリマー；およびその混合物から選ばれる。

【0023】

ポリマーに存在するカルボニル酸素 ($O=R_1$) および / またはエーテル酸素 (R_1-O-R_2) の比率が、ポリマーのモル重量の少なくとも1重量%であるのが好ましい。特定の理論に縛られることを望むものではないが、ポリマー内のこののような酸素基の存在が、高オスモル濃度を有する塩含有培地がより良く許容され、したがって、生産性が増加されうるよう 10 に、細胞の安定化を引き起こすと考えられる。ポリマーに存在するカルボニル酸素とエーテル酸素の比率が、少なくとも1.5重量%、少なくとも2.5重量%または少なくとも5重量%であるのが好ましく、少なくとも10重量%、少なくとも15重量%、少なくとも20重量%または少なくとも25重量%であるのが特に好ましい。ポリマーに存在するカルボニル酸素とエーテル酸素の比率が、ポリエチレングリコール中、1重量% ~ 50重量%、好ましくは10重量% ~ 42重量%、特に好ましくは5重量% ~ 38重量%、たとえば、36重量% (エーテル酸素のみ) またはPVP中14.5重量% (カルボニル酸素のみ) であるのが好ましい。

【0024】

ポリエーテルが、ポリエチレングリコール (PEG) などのポリアルキルグリコールまたはプロピレングリコールのポリマーまたはコポリマーもしくはポリエチレン - ポリプロピレンオキシドコポリマーであるのが好ましい。重合アルキルは、たとえば、ポロキサマーと同様に、個々のアルキレンの混合物であってもよい。アルキルが、 C_1-C_8 アルキレン、さらに詳しくは C_2 -、 C_3 -、 C_4 -、 C_5 -、 C_6 -、 C_7 -アルキレンまたはその混合物から選ばれるのが好ましい。構造式： $[-R-O-]_n$ (ここで、Rはアルキル基を表す) にしたがって、ポリアルキルグリコールを構築してもよい。末端OH基、エステルまたはエーテル基は独立して、提供されてよい。エステルまたはエーテル基は、独立して、前述した C_1-C_8 基から、あるいは C_9-C_{18} などのより長い有機鎖から選ばれてよい。エステルまたはエーテル基は、連結基、好ましくは C_1-C_{12} 連結基、たとえば、アリール基などを介して連結してもよい(たとえば、オクトキシノール(トリトンX-100)またはノノキシノールにおいて)。ポリエーテルまたはポリアルキルグリコールが、少なくとも1つのOH基、好ましくは少なくとも2つのOH基を含むのが好ましく、それらは、末端OH基でありうる。

【0025】

たとえば、PEGなどの界面活性ポリマーの分子量が、好ましくは、少なくとも500 Da、特に好ましくは、少なくとも1,000 Da、少なくとも1,500 Da、少なくとも2,000 Da、少なくとも3,000 Da、少なくとも4,000 Da、少なくとも6,000 Da、少なくとも8,000 Da、少なくとも10,000 Da、少なくとも20,000 Daまたは少なくとも30,000 Daである。特に好ましくは、分子量は、500 Da ~ 2,000,000 Da、好ましくは1,000 Da ~ 200,000 Daまたは1,200 Da ~ 80,000 Daである。

【0026】

界面活性ポリマーは、培地中、少なくとも0.05重量%、特に好ましくは少なくとも0.08%、少なくとも0.1%または少なくとも1.5%の濃度で存在するのが好ましい(すべての%値は、重量%である)。

【0027】

特定の実施態様において、細胞は、懸濁培養または水耕培養、さらに詳しくは毛状根培養で培養される。それらの分泌活性を増加させるために、本発明にしたがって分泌細胞を、培地で処理する。

【0028】

本発明にしたがって細胞を用いると、培地への分泌は、ほとんど細胞のアポプラスティックスペースから起こる。必要に応じてアポプラスティックスペースへの分泌のために、タンパク質は、アポプラスティックスペースまたは分泌のための通常シグナル配列とともに発現される。適当なシグナル配列は、当技術分野で、たとえば、前述の文献において公知であり、本発明にしたがって用いることができる。

【0029】

10

20

30

40

50

本発明方法は、細胞壁を有する細胞の分泌を増加させるのに特に適している。このような細胞は、植物細胞、真菌細胞または藻類細胞から選ばれうる。本明細書で用いる用語「細胞」は、単離細胞、単一細胞または多細胞生物における細胞でありうる。植物細胞は、単一植物細胞または植物もしくは植物組織における細胞であってよい。同様に、真菌細胞は、単一真菌細胞または真菌もしくは真菌組織における細胞でありうる。藻類細胞が、緑藻類細胞であるのが好ましい。組織は、たとえば、木部、葉肉、茎、葉、葉状体、糸状体、クロロネマ、カウロネマ、仮根またはガメトフォアから選ぶことができる。細胞は、プロトプラストまたは実質性細胞、特にカルス細胞を含むか、またはそれらからなることができる。

【0030】

10

本発明方法で用いられる細胞は、植物細胞、好ましくは、特に、コケ類およびゼニゴケ類から選ばれるコケから得られる細胞であるのが好ましく、ここで、ヒメツリガネゴケ、ヒヨウタンゴケ、ミズゴケおよびヤノウエノアカゴケ属、ならびにゼニゴケおよびダンゴゴケがそれぞれ特に好ましい。本発明方法が、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の原糸体などの細胞、植物または植物組織を用いて行われるのが最も好ましい。さらに好ましい植物は、タバコ、マメまたはレンティルである。植物が、ウキクサ (*Lemna*)、ウキクサ (*Spirodela*)、ランドティア (*Landoltia*)、ミジンコウキクサまたはウォルフィエラ (*Wolffielia*) 属などの水生植物であるのが好ましい。

【0031】

20

本発明のさらに好ましい態様によれば、細胞は、糖類、ビタミンおよび植物ホルモンまたはそれらの機能的フラグメントを本質的に含まない培養培地中で培養される。適当な植物ホルモンの例は、たとえば、オーキシンなどの成長ホルモンである。

【0032】

本発明方法が、光独立栄養成長条件下で行われるのが好ましい。本発明方法は、糖類、ビタミン、植物ホルモンなどを必要とすることなく、標準化可能な光独立栄養条件下で、完全および分化した植物、植物細胞または藻類の培養を促進する。

【0033】

30

基本的には、糖類、ビタミンまたは植物ホルモンを、特に光独立栄養成長をすることができない真菌細胞用の培地に用いることも、もちろん可能である。真菌細胞の場合、異化の炭素源は、提供されるべきである。細胞の独立栄養特性により、培地は、タンパク質を含まなくてもよい。培地が、感染の危険性が減少されるように、滅菌された培地であるのが好ましい。細胞を苦しめる病原体から細胞を保護するために、培地に抗生物質を補足することもできる。

【0034】

培養培地のpH値が、3.5～8.5、特に好ましくは4～8または4.5～7または5～6.5、特に5.5～6であるのが好ましく、それによって、pH値が、最適成長または発現条件のために最適化される。

【0035】

40

最適成長または増加したタンパク質産生を確実にするために、培地は、各細胞用の微量栄養素、特にミネラル物質を含むべきである。培地が、好ましくは少なくとも0.2 mMの濃度の硝酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.05 mMの濃度のリン酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.02 mMの濃度の硫酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.1 mMの濃度のカルシウムイオン、好ましくは少なくとも0.1 mMの濃度のカリウムイオン、またはその組合せを含むのが好ましい。培地は、好ましくは少なくとも20 mMの濃度のナトリウムイオンを含むこともできる。

【0036】

本発明の特定の実施態様において、本発明方法は、さらに、上述の培地における組換えタンパク質の分泌（を増加させる）ステップに先行して行われるもう1つのステップを含む。該先行ステップでは、0.1 osmol/L未満のオスモル濃度を有する培養培地にて、さらに詳しくは、上述の分泌（の増加）なしで、細胞を成長させることによって、タンパク質

50

は、細胞の内部またはアポプラスティックスペースに蓄積する。さらに詳しくは、該先行ステップは、たとえタンパク質の分泌が該条件下で増加されないとしても、これらのタンパク質の発現を増大させる。以下の分泌（を増加させる）ステップを用いて、上述のように、細胞を破壊することなく、増加した量で産生されたタンパク質を分泌させ、採取することが最終的に可能である。この二段階法は、生産における著しい増加を促進する。

【0037】

該先行ステップにおける培養培地は、金属イオンの濃度が、より低いために、より低いオスモル濃度であるが、基本的に、分泌ステップの培養培地と同じ組成を有してよい。先行ステップにおける培養培地は、分泌ステップにおける培地の組成と類似しているか、または同一であって、好ましくは少なくとも0.2 mMの濃度の硝酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.05 mMの濃度のリン酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.02 mMの濃度の硫酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.1 mMの濃度のカルシウムイオン、好ましくは少なくとも0.1 mMの濃度のカリウムイオン、またはその組合せを含み、それによって最適細胞増殖を促進する。ナトリウムイオンの最大濃度は、20 mMであり、15 mMまたは10 mMが特に好ましい。

10

【0038】

該先行ステップにおける培養培地は、界面活性ポリマーを含まないか、0.08重量%または0.01重量%または0.005重量%の最大濃度で含むのが好ましい。

【0039】

別の実施態様において、培養培地は、糖類、ビタミンおよび植物ホルモンまたはそれらの機能的フラグメントを含んでもよいが、該先行ステップにおいて、培養培地は、これらの物質を本質的に含まなくてもよい。培養培地は、滅菌されることが可能であり、あるいは、抗生物質を含むことも可能である。先行ステップにおける培養培地のpH値は、3~8、特に好ましくは3.5~7、または4~6.5、または4.1~6、特に4.2~5.5であるのが好ましい。

20

【0040】

細胞が、先行ステップおよび/または分泌ステップの培養培地において気体、特に空気または酸素で処理されるのが好ましい。処理に用いる気体が、二酸化炭素を含むのが好ましい。気体中の二酸化炭素の比率は、0~10体積%、特に好ましくは1~9体積%または1.5~8体積%、特に好ましくは1.7~5体積%であるのが好ましい。二酸化炭素は、植物のための炭素源として機能し、光独立栄養条件下で提供されるべきである。

30

【0041】

先行ステップおよび/または分泌ステップにおける温度が、10 ~ 30 、特に好ましくは15 ~ 26 であるのが好ましい。

【0042】

光量子束密度（ μE ）で測定される光照射が、1~3,000、特に100~2,200であるのが好ましい。

【0043】

該先行ステップは、2~30日の期間にわたって行われてもよい。この期間内に、組換えタンパク質の最適化された産生が起こる。

40

【0044】

該分泌（を増加させる）ステップは、少なくとも2日間、好ましくは3~120日間にわたって行われてよい。この期間内に、先に産生されたように、あるいはこのステップにおいて、組換えタンパク質の最適化された産生が起こる。

【0045】

二段階法は、植物細胞培養の半連続培養に基づいており、植物細胞の培養培地への植え付け、特定の物理的パラメーターを用いるインキュベーションおよび工程中の多くの培地成分の添加からなる。工程の過程で、タンパク質は、時間内の定義された時点で、培地条件を変更することによって、アポプラスティックスペースから培養上清へ分泌される。

【0046】

50

本発明方法は、必ずしもそうである必要はないが、通常、培地ならびに定義された細胞密度（たとえば、1~3 g/l）までバイオマスの生成物を含む適當なバイオリアクターシステム（ウェイブリアクター、ケモスタッフ、チューブリアクター、振とうフラスコなど）への細胞（たとえば、0.1 g/lの乾燥バイオマス）の植え込みにより開始される。たとえば、金属イオンおよびポリマーの添加によって（ここで、ほとんどの場合、ポリマー単独では、オスモル濃度の増加を引き起こさず、低下させることが多い）、オスモル濃度を増加させることによって、分泌が開始される。これらの両方の段階において、細胞は、タンパク質を产生し、発現させる。本発明方法は、任意に拡大縮小可能であり、様々なリアクターおよび量で利用されうる。非常に小さいバイオリアクター（マイクロタイタープレート）、振とうフラスコ、5 Lケモスタッフ、100 Lチューブリアクターおよびウェイブバイオリアクター（10 L~500 L）が可能である。10

【0047】

本発明は、さらに、たとえば、少なくとも0.05重量%の量の界面活性ポリマーおよび少なくとも20 mMの濃度の一価金属イオンを含み、少なくとも0.32 osmol/Lのオスモル濃度を有する上述の培養培地に関する。該培養培地は、上述の方法に適しており、該方法で、特に分泌（を増加させる）ステップにおいて用いられてよい。

【0048】

培地が、好ましくは少なくとも0.2 mMの濃度の硝酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.05 mMの濃度のリン酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.02 mMの濃度の硫酸塩イオン、好ましくは少なくとも0.1 mMの濃度のカルシウムイオン、好ましくは少なくとも0.1 mMの濃度のカリウムイオン、またはその組合せを含むのが好ましい。培地が、少なくとも40 mMまたは少なくとも60 mMまたは少なくとも80 mMの濃度のナトリウムイオンを含むのが好ましい。20

【0049】

本発明はまた、上述の培養培地を再構成するための乾燥栄養培地混合物に関する。水の添加によって、栄養培地混合物は、上述の量および濃度の該培養培地を得ることができる。したがって、本発明はまた、該成分を水性溶媒、好ましくは水に溶解することによって、該培養培地を製造する方法に関する。

【0050】

以下の図面および実施例によって、本発明をさらに説明するが、本発明はこれらの特定の実施態様に限定されるものではない。30

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】図1は、組換え的に產生された抗体の分泌におけるNaClおよびポリマーPEGの添加によるオスモル濃度の増加の相乗効果を示す。

【図2】図2は、植物成長を刺激するためのミネラル物質（硝酸カルシウム）のさらなる產生增加効果を示す。

【図3】異なるポリマー濃度の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0052】

実施例

本発明は、植物培養物から培養培地への組換えタンパク質の連續的分泌を可能にする方法を提供する。該方法において、生産する植物は、液体培養培地に浸され、特定のミネラル培地中で光独立栄養的に培養される。培養培地は、コケ植物の最適栄養維持に関して最適化されるが、それ自体は、培地への組換え的に產生された、より大きなタンパク質の分泌を引き起こさず、タンパク質は、最初に、アポプラストに蓄積し、コケ組織の破壊の後、「細胞内」として測定されうる。

【0053】

タンパク質のアポプラスチックな拘束は、培養培地へのNaClおよびポリエチレングリコール（PEG）4000などの浸透活性物質（分泌成分）の添加によって逆転されうる。これは4050

、培地への蓄積されたタンパク質の急速な放出を引き起こし、培養のさらなる過程において、新たに合成されたタンパク質の連続的および一時的に即時の分泌を引き起こす。

【 0 0 5 4 】

実験例：エルレンマイヤーフラスコ培養におけるタンパク質分泌の比較

500 mlのエルレンマイヤーフラスコに、滅菌KnopまたはWM01培地180 mlを満たし、pH4.5～6に調節し(2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液“MES”)、試験タンパク質によって生産された組換え株からのヒメツリガネゴケ原糸体の新たにタラックスで均質にした(turraxed)懸濁培養物を接種した。接種密度は、0.1 g 乾燥重量/lであった。培養物を滅菌およびガス透過性様式で密封し、2% CO₂を補足した雰囲気下で培養した。細胞密度1～3 g/lに増殖させた後、滅菌濃縮物の形態で分泌成分を加えた。培養操作中、培養物密度(g 乾燥重量/l)、細胞内および細胞外IgG力価(mg/l)のパラメーターを一定の間隔で測定した。

【 0 0 5 5 】

結果：

以下の試験タンパク質を生産した：

表1：分泌された試験タンパク質

タンパク質	分子量 [kDa]	w/o 分泌培地での分泌	分泌培地(NaCl、PEG)を用いる分泌
IgG	145	ノー	イエス
アルファ-ガラクトシダーゼ	80	ノー	イエス
VEGF ₁₂₁	50	イエス	イエス
Epo	30	イエス	イエス
HSA	67	イエス	イエス

【 0 0 5 6 】

表2：培地(すべての濃度はmg/lで表す。*MESを除いて)：

	1	2	3	4	5	6
栄養培地	KNOP	1/10 KNOP	BM	WM01	Murashige & S koog	Linsmaier & S koog
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 ·7H ₂ O	250	25	250	500	180.7	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000	100	1000	2000		
CaCl					332.2	332.2
NaCl						
MES *			5 mM	5 mM		

10

20

30

40

50

【0057】

さらに、 H_3BO_3 、 $FeSO_4$ 、 $Fe-NaEDTA$ 、 $COCl_2$ 、 $CuSO_4$ 、 KI 、 $MnCl_2$ 、 $MnSO_4$ 、 Na_2MoO_4 、 $NiCl_2$ 、 Na_2SeO_3 、Zn酢酸塩などの微量成分または葉酸、ミオイノシトール、ニコチン酸、チアミンHCl、ピリドキシンHCl、ビオチンまたはグリシンなどのビタミンを加えてよい。真菌培養のために、グルコース、マンノースまたはマンニトールなどのさらなる異化炭水化合物源を加える。

【実施例1】

【0058】

PEGおよび増加するオスモル濃度を用いる生産における増加

記載するように、次のパラメーターを用いて、ヒメツリガネゴケにおいてIgG抗体を発現させた：光のリズム[時間]16/8、初期培地KNOP、温度22℃、培養容器：フラスコ；“1/10 KNOP”培地に加えて100 mMのNaClを含む“1/10 KNOP NaCl”培地。“KNOP PEG”および“1/10 KNOP NaCl PEG”培地はそれぞれ、“KNOP”および“1/10 KNOP NaCl”培地に加えて4.8重量%のPEG-4000を含む。6時間後の抗体産生の結果を表3および図1に示す。

【0059】

表3：PEGおよびNaCl（オスモル濃度の増加のための100 mM）

	細胞内 ng IgG / mg 乾燥重量	細胞外 ng IgG / mg 乾燥重量	追加分/合計 %
フラスコ			
Knop、実験1	62.3	4.8	7%
Knop、実験2	88.5	6.6	7%
Knop、実験3	84.1	6.4	7%
Average	78.3	5.9	7%
1/10 Knop NaCl、実験1	27.3	29.7	52%
1/10 Knop NaCl、実験2	24.0	30.8	56%
1/10 Knop NaCl、実験3	19.5	43.1	69%
平均	23.6	34.5	59%
Knop PEG、実験1	35.9	4.3	11%
Knop PEG、実験2	25.0	4.5	15%
Knop PEG、実験3	33.1	4.5	12%
平均	31.4	4.4	13%
1/10 Knop NaCl、PEG、実験1	27.7	180.7	87%
1/10 Knop NaCl、PEG、実験2	30.1	175.3	85%
1/10 Knop NaCl、PEG、実験3	36.2	208.2	85%
平均	31.3	188.1	86%

10

20

30

40

【0060】

NaClおよびPEGの組合せを用いて、NaCl単独およびPEG単独それぞれの効果をはるかに超える生産性および分泌における増加が観察された。したがって、相乗効果は非常に明白である。

【実施例2】

50

【0061】

PEGおよび増加するオスモル濃度および硝酸塩を用いる生産における増加

記載するように、次のパラメーターを用いて、ヒメツリガネゴケにおいてIgG1抗体のラムダ鎖を発現させた：光のリズム[時間]16/8、初期培地 KNOP、温度25℃、光強度40 μE/m²s、培養容器：フラスコ。異なる時間間隔後の抗体産生の結果を表4および図2に示す。

【0062】

表4：PEG、NaCl（オスモル濃度）および硝酸塩（μg/mlで表すIgG1濃度）

培養の日数	7	14	21	28
1/10 KNOP 100 mM NaCl培地+	0.279	0.239	0.053	0.059
1/10 KNOP培地+100 mM NaCl, 4.8% PEG、48 mM マンニトール、12 mM カルシウム硝酸塩	1.719	8.947	8.882	10.872
1/10 KNOP培地+50 mM NaCl, 4.8% PEG、48 mM マンニトール、12 mM カルシウム硝酸塩	0.717	5.04	6.125	7.001
1/10 KNOP培地+NaClなし, 4.8% PEG、48 mM マンニトール、12 mM カ ルシウム硝酸塩	0.048	0.086	0.123	0.122
1/10+100 mM NaCl KNOP培地, 4.8% PEG	0.19	2.248	2.363	0.494
1/10+100 mM NaCl KNOP培地, 4.8% PEG、マンニトール 48 mM	0.214	2.041	1.453	0.213
1/10+100 mM NaCl KNOP培地, 4.8% PEG、12 mM カルシウム硝酸塩	0.578	6.574	8.226	11.83
1/10+100 mM NaCl KNOP培地, 48 mM マンニトール	0.043	0.132	0.12	0.088
1/10+100 mM NaCl KNOP培地, 12 mM カルシウム硝酸塩	0.159	1.027	3.715	4.606
1/10 KNOP培地+100 mM NaCl, 48 mM マンニトール、12 mM カルシウム硝 酸塩	0.185	1.259	3.704	5.087

【0063】

これらの結果から、マンニトールは、分泌挙動に影響を及ぼさないことが分かる。硝酸塩は、植物成長を改善するために有利である。さらなる実験において、カリウム、リン酸塩、硫酸塩またはカルシウムイオンもまた、1~10 mMの範囲内で、改善された植物成長に基づいている好ましい効果を示した。これらの低度濃度およびオスモル濃度の有意な増加無しの条件においては、分泌における効果は観察されなかった。

【実施例3】

【0064】

異なるポリマーおよびポリマー濃度

記載するように、次のパラメーターを用いて、ヒメツリガネゴケにおいてIgG1抗体のラムダ鎖を発現させた：光のリズム[時間]16/8、初期培地 KNOP/BM、温度25℃、光強度40 μE/m²s、培養容器：フラスコ。異なる時間間隔後の抗体産生の結果を表5および6ならびに図3に示す。

10

20

30

40

50

【0065】

表5：培地組成およびIgG生産（mMで表す濃度）

培地	1	2	3	4	5	6
マグネシウムイオン	0.1014	0.501	0.501	0.501	0.501	0.501
カルシウムイオン	12.4235	14.09	14.09	14.09	14.09	14.09
塩化物イオン	100	100	100	100	100	100
硫酸塩イオン	0.1059	0.501	0.501	0.501	0.501	0.501
硝酸塩イオン	24.847	28.185	28.185	28.185	28.185	28.185
カリウムイオン	0.1837	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075
ナトリウムイオン	100	100	100	100	100	100
リン酸塩イオン	0.1837	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075	0.9075
MES	0	2.4705	2.4705	2.4705	2.4705	2.4705
マンニトール	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

【0066】

表6：μg/mlで表すIgG生産の結果

培地 No.	7日	14日	21日
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

【0067】

これらの結果に基づいて、低濃度のPEGは、PEGの存在下での分泌に好ましくない影響を及ぼさないと結論付けることができる。Tweenの効果は、高濃度（培地5）よりも、低濃度（培地6）の方が、より強い。

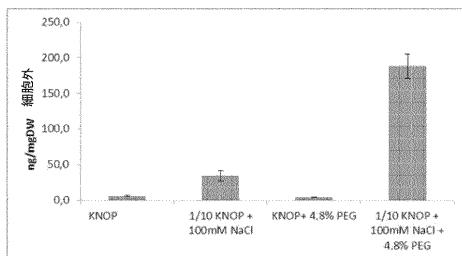
10

20

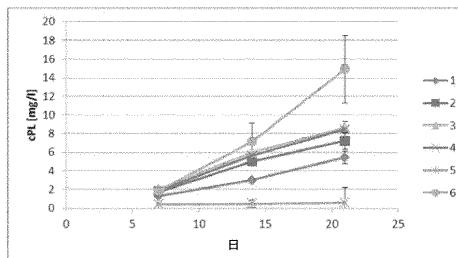
30

40

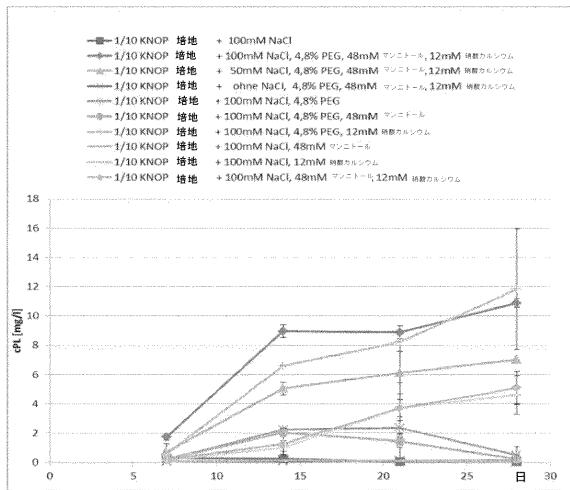
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 マティアス・クナッペンベルガー
ドイツ 8 8 4 8 7 ミーティンゲン / バルトリングен、ウルリッヒ - シュミット - シュトラーセ 6 番
(72)発明者 ドレーン・クラウスニッツァー
ドイツ 8 0 6 8 6 ミュンヘン、アグリコーラシュトラーセ 7 5 番
(72)発明者 アンドレアス・シャーフ
ドイツ 7 9 1 0 4 フライブルク、リヒャルト - ヴァーグナー - シュトラーセ 5 7 番

審査官 中村 勇介

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 3 5 3 2 7 (U S , A 1)
特開 2 0 0 0 - 2 4 5 4 7 0 (J P , A)
特開 2 0 1 0 - 0 4 1 9 9 7 (J P , A)
特開 昭 6 3 - 2 2 6 2 8 1 (J P , A)
James et al. , Production and Characterization of Biologically Active Human GM-CSF Secreted by Genetically Modified Plant Cells , Protein Expression and Purification , 2 0 0 0 年 , Vol.19 , p.131-138
Murashige et al. , A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures , Physiologia Plantarum , 1 9 6 2 年 , Vol.15 , p.473-497
Madhusudhan et al. , Osmolarity, conductivity, buffer capacity, and solubility of oxygen of plant cell culture media , Indian Journal of Experimental Biology , 1 9 9 9 年 , Vol.37 , p.66-69
Hellwig et al. , Plant cell cultures for the production of recombinant proteins , Nature Biotechnology , 2 0 0 4 年 , Vol.22 , p.1415-1422
Magnuson et al. , Enhanced Recovery of a Secreted Mammalian Protein from Suspension Culture of Genetically Modified Tobacco Cells , Protein Expression And Purification , 1 9 9 6 年 , Vol.7 , p.220-228

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)