(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113785046 B
(45)授权公告日 2024.12.03

(21)申请号 202080029811.8
(22)申请日 2020.02.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113785046 A
(43)申请公布日 2021.12.10
(30)优先权数据
19158847.4 2019.02.22 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.10.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/054426 2020.02.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/169703 EN 2020.08.27

(73)专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司
地址 比利时里克森萨特
(72)发明人 P·德霍泰 R·科克斯 Q·祖尼
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 郭慧 彭昶

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2013113729 A1,2013.08.08
审查员 崔娟娟

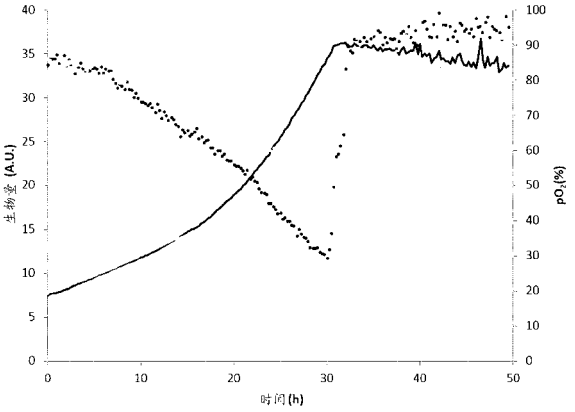
权利要求书2页 说明书20页 附图10页

(54)发明名称

发酵法

(57)摘要

本发明涉及用于大规模生产的博德特氏菌属发酵和毒力因子生产,尤其是PT生产的方法。更特别地,方法包括在接种前进行的培养基调节步骤。



CN 113785046 B

1.用于调节生长培养基的无菌方法,其包括:

a).提供无菌生长培养基;

b).将所述无菌生长培养基在28℃至35℃的温度下保持20至35小时;和

c).搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生10h^{-1}至130h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),

由此提供经调节的生长培养基,其中所述无菌方法是在不存在细菌的情况下进行且培养基无菌的方法,所述生长培养基是能够支持博德特氏菌属细胞生长的培养基。

2.权利要求1的方法,其中步骤b)在29℃至33℃、30℃至32℃、或大约31℃的温度下进行;和/或

其中步骤b)进行25至35小时、30至35小时、或大约32小时。

3.权利要求1的方法,

其中在步骤c)中,在步骤b)的持续期间连续搅拌所述无菌生长培养基,其中所述搅拌在产生60h^{-1}至130h^{-1}、或大约90h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的搅拌速度下;和/或

其中在步骤c)中,在步骤b)的持续期间连续曝气所述无菌生长培养基,其中所述曝气在产生60h^{-1}至130h^{-1}、或大约90h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的流速下;和/或

其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续搅拌和曝气所述无菌生长培养基,其中所述搅拌和曝气在产生60h^{-1}至130h^{-1}或大约90h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的搅拌速度和流速下。

4.权利要求1的方法,其中所述方法在至少10L、至少100L、至少800L或至少1000L无菌生长培养基的规模下进行。

5.前述权利要求任一项的方法,其中所述生长培养基是包含烟酸的改良Stainer Scholte培养基。

6.权利要求5的方法,其中所述生长培养基是包含大约1g/L二甲基-β-环糊精和大约10g/L酸水解酪蛋白的改良Stainer和Scholte培养基;和/或

其中所述生长培养基是包含大约40mg/L L-半胱氨酸代替L-胱氨酸;大约11.84g/L L-谷氨酸钠;大约150mg/L谷胱甘肽;和/或大约400mg/L抗坏血酸的改良Stainer和Scholte培养基。

7.培养博德特氏菌属物种的方法,其包括:

a).用至少一个博德特氏菌属细胞接种无菌条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物,其中所述无菌条件生长培养基通过权利要求1-6任一项的方法生产;和

b).将博德特氏菌属培养物保持在能够增加生物量和/或产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下。

8.生产博德特氏菌属蛋白质的方法,其包括:

a).用至少一个博德特氏菌属细胞接种无菌条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物,其中所述无菌条件生长培养基通过权利要求1-6任一项的方法生产;

b).将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

c).从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

9.权利要求7或8的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质选自百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素和腺苷酸环化酶;和/或

其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质以比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量高至少10%的产量生产。

10.权利要求7或8的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是百日咳毒素,和/或其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是丝状血凝素或进一步包含丝状血凝素,

其中与用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量相比,丝状血凝素的产量不变或更高。

11.权利要求10的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是基因脱毒的百日咳毒素,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是基因脱毒的百日咳毒素,其中S1亚基的两个催化残基Arg9和Glu129突变成Lys9和Gly129。

12.权利要求7或8的方法,其中发酵时间比用非条件生长培养基进行的相同方法的发酵时间短至少10%;和/或

其中所述博德特氏菌属培养物在发酵结束时的生物量比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的生物量高至少10%。

13.权利要求7或8的方法,其中所述方法进一步包括纯化来自博德特氏菌属培养物的一种或多种博德特氏菌属蛋白质的步骤。

发酵法

[0001] 背景

[0002] 博德特氏菌属(*Bordetella*)是许多细菌性疾病的致病物,例如百日咳博德特氏菌(也称为百日咳嗜血杆菌)是百日咳的成因,百日咳是一种在婴儿和幼儿中可能严重的呼吸系统疾病。该疾病的临床过程以快速咳嗽的发作和随后通常与特有的“鸡鸣(whooping)”声关联的吸气努力为特征。在严重情况下,缺氧可导致脑损伤;但是,最常见的并发症是继发性肺炎。

[0003] 百日咳通常被认为由百日咳博德特氏菌(*B. pertussis*)造成,但有时从具有百日咳的典型体征和症状的患者体内分离出副百日咳博德特氏菌(*B. parapertussis*)。副百日咳博德特氏菌感染的频率比百日咳博德特氏菌低,5-10%的百日咳与副百日咳博德特氏菌有关(Mertsola (1985) Eur J Clin Microbiol 4: 123;Lautrop(1971) Lancet 1 (7711):1195-1198)。副百日咳博德特氏菌与轻度临床症状相关联,这与其与百日咳博德特氏菌的血清学交叉反应结合,使得副百日咳博德特氏菌难以诊断。

[0004] 抗百日咳博德特氏菌的第一代疫苗是由全杀灭细菌组成的全细胞疫苗。这些在许多国家在20世纪50年代和20世纪60年代引入并成功地降低百日咳的发生率。全细胞百日咳博德特氏菌疫苗的问题是与它们关联的高度反应原性。含有纯化百日咳博德特氏菌蛋白质的无细胞疫苗具有较低的反应原性并已被采用于许多国家的疫苗接种计划。含有百日咳毒素(PT)、丝状血凝素(FHA)和相当经常,百日咳杆菌粘附素(PRN)的无细胞疫苗被广泛使用并提供对百日咳的严重程度的有效防护。

[0005] 通过将博德特氏菌属发酵和分离生成的毒力因子来产生用于这些疫苗的博德特氏菌属毒力因子,但是博德特氏菌属物种(*Bordetella*species)是在高浓度下难以生长的营养苛求性生物体(Doern, Clin.Infect. Dis. 2000, 30:166-173),而且其难以表达在多价百日咳疫苗中作为限制性抗原的博德特氏菌属毒力因子,特别是百日咳毒素(PT)。

[0006] 在本领域中仍然需要改进用于大规模生产的博德特氏菌属发酵和毒力因子生产,尤其是PT生产的效力。本发明人已经意外地发现,在接种前进行的培养基调节步骤显著改进在大规模下的博德特氏菌属发酵性能的几个量度,包括增加的PT产量、增加的生物量和减少的发酵时间。

[0007] 发明概述

[0008] 在本发明的第一方面,提供一种生产条件生长培养基(conditioned growth medium)的方法,其包括:

[0009] a) 提供生长培养基;

[0010] b) 将所述生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和

[0011] c) 任选搅拌和/或曝气所述生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),

[0012] 由此提供所述条件生长培养基。

[0013] 更特别地,本发明的第一方面提供一种生产无菌条件生长培养基的方法,其包括:

[0014] a) 提供无菌生长培养基;

[0015] b) 将所述无菌生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和

[0016] c) 搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),

[0017] 由此提供所述无菌条件生长培养基。

[0018] 在本发明的第二方面,提供一种条件生长培养基,其通过包括以下步骤的方法生产:

[0019] a) 提供生长培养基;

[0020] b) 将所述生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和

[0021] c) 任选搅拌和/或曝气所述生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)。

[0022] 更特别地,本发明的第二方面提供一种无菌条件生长培养基,其通过包括以下步骤的方法生产:

[0023] a) 提供无菌生长培养基;

[0024] b) 将所述无菌生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和

[0025] c) 搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)。

[0026] 在本发明的第三方面,提供一种培养博德特氏菌属物种的方法,其包括:

[0027] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种第二方面的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;和

[0028] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够增加生物量和/或产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下。

[0029] 在本发明的第四方面,提供一种生产博德特氏菌属蛋白质的方法,其包括:

[0030] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种第二方面的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;

[0031] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0032] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0033] 在本发明的第五方面,提供一种分离的博德特氏菌属蛋白质,其通过包括以下步骤的方法生产:

[0034] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种第二方面的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;

[0035] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0036] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0037] 在本发明的第六方面,提供一种免疫原性组合物,其包含通过包括以下步骤的方法生产的分离的博德特氏菌属蛋白质:

[0038] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种第二方面的条件生长培养基以产生博德特

氏菌属培养物;

[0039] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0040] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0041] 附图简述

[0042] 图1: 在条件培养基(黑)和非条件培养基(灰)中的博德特氏菌属发酵过程中的生物量(实线)和耗氧量(点)变化。

[0043] 图2: 评估调节(conditioning)工艺参数对博德特氏菌属发酵性能的四个量度: (A) PT含量;(B) FHA含量;(C) 生物量;和(D) 发酵时间的影响的实验设计的曲面图(surface plots)。结果预测对于PT产量和生物量生产而言最优调节参数是在31.2℃的温度和大约90h^{-1}的kLa下调节34.6小时。

[0044] 图3: 在1L生物反应器规模下的调节参数的验证。右图:在条件培养基中进行的博德特氏菌属发酵(方法2、3和4;细节参见实施例3)产生比在非条件培养基中进行的发酵高大于10%的PT含量。左图:在1L生物反应器规模下生物量含量不会明显受温度或kLa影响。

[0045] 图4: 在1L生物反应器规模下调节持续时间对PT含量和生物量的影响。上图:培养基调节32小时和56小时导致在发酵过程中的PT含量与非条件培养基相比增加≥10%。下图:生物量在32小时和56小时时增加。

[0046] 图5: 在20L生物反应器规模下的最优调节参数的验证。与非条件培养基(NC)或次优调节参数相比,在条件培养基中在最优工艺参数(31℃;32h;kLa 90h-1)下进行的发酵产生至少10%的PT产量增加。

[0047] 图6: 使用在800L发酵罐或培养基制备罐中调节的培养基在小规模容器(<1L)中发酵后的带有误差条(标准偏差)的平均生长曲线。

[0048] 图7: 使用(A) 在800L发酵罐中调节32小时的培养基 vs 非条件培养基或(B) 在培养基制备罐中调节32小时的培养基 vs 非条件培养基,在小规模容器(<1L)中发酵后的带有误差条(标准偏差)的平均生长曲线。

[0049] 图8: 使用在培养基制备罐中调节20或32小时的培养基,在小规模容器(<1L)中发酵后的带有误差条(标准偏差)的平均生长曲线。

[0050] 详述

[0051] 本发明基于出乎意料的观察,即在接种前加入培养基调节步骤显著改进博德特氏菌属发酵性能的几个量度,包括增加的博德特氏菌属蛋白质的产量、增加的生物量和减少的发酵时间。特别使用无菌生长培养基进行该步骤或方法。更特别地,该步骤或方法是无菌法。再更特别地,该步骤或方法是使用无菌生长培养基进行的无菌法。本文所用的术语"无菌法"是指通过排除微生物来防止污染的方法和条件。

[0052] 本文所用的术语"调节"是指在用细菌接种前处理无菌生长培养基,换言之在不存在细菌的情况下进行调节且培养基无菌的方法。调节是通常包括无菌生长培养基的曝气和/或搅拌阶段以改进后续发酵步骤的性能的方法。特别地,无菌生长培养基在调节过程的持续期间保持无菌。因此,优选地,用于生产本发明的条件生长培养基的方法是无菌法。优选地,本发明的方法是生产无菌条件生长培养基的无菌法。

[0053] 因此,本发明的一个方面是一种生产条件生长培养基的方法,其包括:提供生长培

养基;将生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和任选搅拌和/或曝气所述生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。更特别地,本发明是一种用于生产条件生长培养基的方法,特别是无菌法,其包括:提供无菌生长培养基;将无菌生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和任选搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。由无菌生长培养基通过该方法生成的条件生长培养基本身是无菌的,即不含独立复制的活生物体。

[0054] 生长培养基可以是能够支持博德特氏菌属细胞生长的任何培养基。在某些实施方案中,生长培养基是化学限定的Stainer Scholte(SS)培养基或改良Stainer Scholte培养基(MSS)。Stainer Scholte培养基的组成描述在Cohen和Wheeler, American Journal of Public Health (1946) 36: 371-376中。如果其含有基本相同浓度的与SS培养基基本相同的培养基组分、但含有1至5种培养基组分的浓度的改良、缺乏1至3种培养基组分或含有1至20种另外的培养基组分,则培养基是改良StainerScholte培养基。

[0055] 在一个具体实施方案中,改良Stainer和Scholte培养基包含二甲基-ß-环糊精(例如大约1 g/L)和酸水解酪蛋白(例如大约10 g/L)。在另外的实施方案中,改良Stainer和Scholte培养基包含L-半胱氨酸(例如大约40 mg/L)代替L-胱氨酸;提高的L-谷氨酸钠浓度(例如大约11.84 g/L);降低的谷胱甘肽浓度(例如大约150 mg/L);和/或降低的抗坏血酸浓度(例如大约400 mg/L)。因此,在一些实施方案中,生长培养基是改良Stainer Scholte培养基(MSS)。在一些实施方案中,生长培养基是包含大约1g/L的二甲基-ß-环糊精和大约10g/L的酸水解酪蛋白的改良Stainer和Scholte培养基。在一些实施方案中,生长培养基是包含大约40mg/L的L-半胱氨酸代替L-胱氨酸、大约11.84g/L的L-谷氨酸钠、大约150mg/L的谷胱甘肽和/或大约400mg/L的抗坏血酸(例如大约400 mg/L)的改良Stainer和Scholte培养基。

[0056] 影响由百日咳博德特氏菌产生毒力因子的化合物通常通过调节*bvg*(博德特氏菌属毒力基因)基因座发挥作用并因此可命名为*bvg*调节剂(参见例如EP2809343B)。因此,在一些实施方案中,生长培养基可包含选自烟酸、镁盐、硫酸盐、磷酸盐、碳酸盐、蔗糖、脯氨酸、大于100mM浓度的钠离子、防沫剂、谷胱甘肽和含硫氨基酸的至少一种*bvg*调节剂。在某些实施方案中,*bvg*调节剂是烟酸。在一些实施方案中,生长培养基是包含烟酸的改良Stainer Scholte培养基。

[0057] *调节工艺参数:温度、持续时间和kLa*

[0058] 在本发明的一个方面,在用于发酵前通过将无菌生长培养基在指定温度下保持指定时间段来实现调节。在一个实施方案中,将无菌生长培养基保持在大约28℃至大约35℃的温度下。在另一实施方案中,将无菌生长培养基保持在大约29℃至大约33℃、或大约30℃至大约32℃的温度下。在具体实施方案中,将无菌生长培养基保持在大约29、30、31、32或33℃。在另外的实施方案中,将无菌生长培养基保持在大约30.0、30.2、30.4、30.6、30.8、31.0、31.2、31.4、31.6、31.8或32.0℃。

[0059] 在某些实施方案中,将无菌生长培养基在所需温度下保持大约20至35小时。在另一实施方案中,将无菌生长培养基在所需温度下保持大约25至35小时或大约30至35小时。在具体实施方案中,将无菌生长培养基在所需温度下,例如在大约31℃下保持大约29、30、

31、32、33、34或35小时。在一个优选实施方案中,将无菌生长培养基在大约31℃下保持大约32小时。

[0060] 在某些实施方案中,在至少10L、至少100L、至少800或至少1000L生长培养基的规模下进行生长培养基调节。在特定实施方案中,在大约10-100L、大约100-500L、大约500-1000L、大约1000-1500L、大约1500-2000L、大约1000L-2500L或大约1500L-2500L的规模下进行生长培养基调节。

[0061] 在一些实施方案中,本发明的方法要求在调节工艺的全程将无菌生长培养基保持在恒定kLa。kLa,氧体积传质系数,是氧进入培养基的速率的量度。kLa越高,氧引入培养基的速率越高。几个因素,包括培养基体积和组成、搅动(例如搅拌)、曝气、压力和温度将影响特定生长培养基制备的kLa。

[0062] 可通过搅动(例如搅拌)和/或曝气(将压缩空气鼓过培养基)来将氧引入无菌生长培养基。如果在引入培养基的空气中存在不同的氧浓度,应该调整流速以将此计入考虑。例如,如果将100%氧供应引入培养基,流速相应地较低。如果将含有比空气少的氧的气体引入培养基,可施加较高流速。如果通过将压缩空气鼓过培养基来实现曝气,特别经由过滤器,更特别是具有足够小的孔隙以防止微生物或孢子随空气进入容器(例如生物反应器、发酵罐或培养基制备罐)的过滤器,优选具有大约0.2μm至大约0.45μm的截止值的过滤器无菌过滤压缩空气。

[0063] 可使用本领域中已知的方法,例如如US2008/0193475的实施例1中所述测量kLa。该方法涉及将生物反应器设置为要测量其kLa的培养基体积、温度、压力、搅动和曝气的条件、通过用氮气替换空气而排气(gassing out)、通过恢复空气曝气而进气和测量pO_2回到其稳态水平时的速率。

[0064] 通过相对于时间绘制对数(100- pO_2%)来计算kLa。该图形的直线部分的角系数对应于-kLa。通常,仅考虑20%至80% pO_2的数据。

[0065] 培养基调节步骤或方法的kLa受许多因素影响,包括培养基的搅拌速度和曝气流速。可在例如降低培养基的搅拌速度和提高曝气速率的同时保持恒定kLa,或反之亦然。在一个实施方案中,生长培养基的搅拌速度和曝气速率都在培养基调节过程中恒定。在一个实施方案中,生长培养基在调节持续期间全程连续搅拌。在另一实施方案中,生长培养基在调节持续期间全程连续曝气。在另一实施方案中,搅拌和曝气都在调节持续期间全程连续进行。

[0066] 例如在大约10-200 h^{-1}、10-150 h^{-1}、10-100 h^{-1}、10-80 h^{-1}、10-50 h^{-1}、10-40 h^{-1}、10-30 h^{-1}、20-150 h^{-1}、20-100 h^{-1}、20-50 h^{-1}、20-60 h^{-1}、20-80 h^{-1}、20-30 h^{-1}、20-40 h^{-1}、30-60 h^{-1}、60-80 h^{-1}、60-150 h^{-1}或60-200 h^{-1}的kLa下进行生长培养基调节。在特定实施方案中,在大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}、大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}、或大约90 h^{-1}的kLa下进行生长培养基调节。在一个优选实施方案中,将生长培养基的kLa保持在大约90 h^{-1}。

[0067] 对于10-30升的体积,例如通过使用1-5升/分钟的空气流速或曝气速率和200-400 rpm(每分钟的转数)的搅动速度,例如2-4升/分钟的曝气速率和250-350 rpm的搅动速度,实现10-30 h^{-1}的kLa。

[0068] 对于30-250升的体积,例如通过使用15-25升/分钟的空气流速和150-250 rpm的搅动速度,例如通过使用20-25升/分钟的空气流速和200-250 rpm的搅动速度,例如通过使

用15-20升/分钟的空气流速和200-250 rpm的搅动速度,实现30-60 h^{-1}的kLa。

[0069] 在一个具体实施方案中,在大约31℃、持续大约32h、大约90 h^{-1}的kLa下进行生长培养基调节。

[0070] 本发明进一步提供通过本发明的方法生产的条件生长培养基。条件生长培养基是无菌的。"无菌"意在表明生长培养基不含或基本不含细菌细胞,例如在接种博德特氏菌属细胞前。

[0071] 因此,在一个方面,本发明提供一种条件生长培养基,其通过包括以下步骤的方法,特别是无菌法生产:

[0072] a) 提供无菌生长培养基;

[0073] b) 将无菌生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和

[0074] c) 搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)。

[0075] 特别地,在步骤c)中,无菌生长培养基在步骤b)的持续期间连续搅拌和/或曝气。在一些实施方案中,在步骤c)中,无菌生长培养基在步骤b)的持续期间连续搅拌。在另一些实施方案中,在步骤c)中,无菌生长培养基在步骤b)的持续期间连续曝气。在一些实施方案中,在步骤c)中,无菌生长培养基在步骤b)的持续期间连续搅拌和曝气。

[0076] 博德特氏菌属发酵法

[0077] 在一个方面,本发明提供一种培养博德特氏菌属物种的方法,其包括:用至少一个博德特氏菌属细胞接种如本文所述生产的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;和将博德特氏菌属培养物保持在能够增加生物量和/或产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下。特别地,条件生长培养基在用所述至少一个博德特氏菌属细胞接种前是无菌的。

[0078] 在本发明的另一方面,提供一种生产博德特氏菌属蛋白质的方法,其包括:

[0079] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种如本文所述生产的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;

[0080] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0081] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0082] 优选地,所述生产博德特氏菌属蛋白质的方法包括:

[0083] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种如本文所述生产的无菌条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;

[0084] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0085] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0086] 在本发明的进一步方面,提供一种分离的博德特氏菌属蛋白质,其通过包括以下步骤的方法生产:

[0087] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种如本文所述生产的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;

[0088] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0089] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0090] 优选地,所述分离的博德特氏菌属蛋白质通过包括以下步骤的方法生产:

[0091] a) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种如本文所述生产的无菌条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;

[0092] b) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和

[0093] c) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0094] 在一些实施方案中,博德特氏菌属物种是百日咳博德特氏菌或副百日咳博德特氏菌。在一个实施方案中,所述至少一种博德特氏菌属蛋白质选自百日咳毒素(PT)、丝状血凝素(FHA)、百日咳杆菌粘附素(PRN;也称为69K)和腺苷酸环化酶(AC)。在一个优选实施方案中,所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是百日咳毒素,例如基因脱毒的百日咳毒素(PTg)。在一些实施方案中,百日咳毒素是基因脱毒的百日咳毒素,其中S1亚基的两个催化残基(Arg9和Glu129)突变成Lys9和Gly129(被称为PT-9K/129G突变体)。

[0095] 可通过测定例如在650 nm的光学密度(OD)(也称为OD_{650})来量化生物量。在一个实施方案中,在发酵结束时在650nm下测得的细菌密度达到至少10、至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60或至少70 OD单位。光学密度也可以以吸光度单位(A.U.)表示。发酵结束被定义为在培养中溶解氧(pO_2)达到最小并开始攀升的时刻。

[0096] 在另一实施方案中,本发明提供一种免疫原性组合物,其包含通过本发明的方法生产的分离的博德特氏菌属蛋白质。本发明的免疫原性组合物可进一步包含一种或多种可药用赋形剂、佐剂和/或另外的抗原。

[0097] 根据本发明的方法制备的条件生长培养基在博德特氏菌属培养物的发酵中提供某些优点。例如,本发明的方法可导致以比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量高至少5%、10%、15%、20%、25%或30%的产量生产至少一种博德特氏菌属蛋白质。在一个具体实施方案中,与用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量相比,PT产量增加至少10%,且丝状血凝素的产量不变或更高。用于比较的非条件生长培养基是尚未根据本发明的方法进行处理或调节的生长培养基,例如新鲜制备的生长培养基。本领域技术人员会认识到,用于比较的条件生长培养基和非条件生长培养基为相同类型,即能够同类比较。

[0098] 在另一实施方案中,发酵时间——被定义为从接种到pO_2水平达到最小并开始攀升时的时间——比用非条件生长培养基进行的相同方法的发酵时间短至少10%。

[0099] 在另一实施方案中,本发明的博德特氏菌属发酵法在发酵结束时产生的生物量比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的生物量高至少10%。

[0100] 在另一实施方案中,本发明的博德特氏菌属发酵法进一步包括纯化来自博德特氏菌属培养物的一种或多种博德特氏菌属蛋白质的步骤。

[0101] 在一个具体实施方案中,本发明提供一种生产条件生长培养基的无菌法,其包括:提供无菌改良Stainer和Scholte生长培养基;将无菌生长培养基在大约30-32℃的温度下保持大约31-33小时;和搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。更特别地,一种生产条件生长培养基的无菌法,其包括:提供无菌改良Stainer和Scholte生长培养基;将无菌生长培养基在大约30-32℃的温度下保持大约31-33小时;和搅拌和曝气所述无菌生长培养基以产生大约90 h^{-1}的氧体积传

质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。

[0102] 在一个具体实施方案中,本发明提供一种生产条件生长培养基的无菌法,其包括:提供无菌改良Stainer和Scholte生长培养基,其包含大约1g/L二甲基-β-环糊精、大约10 g/L酸水解酪蛋白、大约40 mg/L L-半胱氨酸代替L-胱氨酸、大约11.84 g/L L-谷氨酸钠;大约150 mg/L谷胱甘肽和大约400 mg/L抗坏血酸;将无菌生长培养基在大约31℃的温度下保持大约32小时;和搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。更特别地,一种生产条件生长培养基的无菌法,其包括:提供无菌改良Stainer和Scholte生长培养基,其包含大约1g/L二甲基-β-环糊精、大约10 g/L酸水解酪蛋白、大约40 mg/L L-半胱氨酸代替L-胱氨酸、大约11.84 g/L L-谷氨酸钠;大约150 mg/L谷胱甘肽和大约400 mg/L抗坏血酸;将无菌生长培养基在大约31℃的温度下保持大约32小时;和搅拌和曝气所述无菌生长培养基以产生大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。

[0103] *特定实施方案*

[0104] 实施方案1. 一种生产条件生长培养基的方法,其包括:(i) 提供生长培养基;(ii) 将生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和(iii) 任选搅拌和/或曝气所述生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。

[0105] 实施方案2. 实施方案1的方法,其中步骤b)在大约29℃至大约33℃、大约30℃至大约32℃、或大约31℃的温度下进行。

[0106] 实施方案3. 实施方案1-2的方法,其中步骤b)进行大约25至35小时、大约30至35小时、或大约32小时。

[0107] 实施方案4. 实施方案1-3的方法,其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续搅拌所述生长培养基。

[0108] 实施方案5. 实施方案4的方法,其中所述搅拌在产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}、或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的搅拌速度下。

[0109] 实施方案6. 实施方案1-5的方法,其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续曝气所述生长培养基。

[0110] 实施方案7. 实施方案6的方法,其中所述曝气在产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}、或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的流速下。

[0111] 实施方案8. 实施方案1-7的方法,其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续搅拌和曝气所述生长培养基。

[0112] 实施方案9. 实施方案8的方法,其中所述搅拌和曝气在产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的搅拌速度和流速下。

[0113] 实施方案10. 实施方案1-9的方法,其中所述方法在至少10L、至少100L或至少1000L生长培养基的规模下进行。

[0114] 实施方案11. 一种条件生长培养基,其通过实施方案1-10的方法生产。

[0115] 实施方案12. 一种培养博德特氏菌属物种的方法,其包括:(i) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种实施方案11的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;和(ii) 将博德特氏菌属培养物保持在能够增加生物量和/或产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条

件下。

[0116] 实施方案13．一种生产博德特氏菌属蛋白质的方法,其包括:(i) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种实施方案11的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物;(ii) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下;和(iii) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0117] 实施方案14．实施方案12-13的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质选自百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素和腺苷酸环化酶。

[0118] 实施方案15．实施方案12-14的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质以比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量高至少10%的产量生产。

[0119] 实施方案16．实施方案12-15的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是百日咳毒素,例如基因脱毒的百日咳毒素。

[0120] 实施方案17．实施方案12-16的方法,其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是基因脱毒的百日咳毒素,其中S1亚基的两个催化残基(Arg9和Glu129)突变成Lys9和Gly129。

[0121] 实施方案18．实施方案16的方法,其中与用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量相比,丝状血凝素的产量不变或更高。

[0122] 实施方案19．实施方案12-18的方法,其中发酵时间比用非条件生长培养基进行的相同方法的发酵时间短至少10%。

[0123] 实施方案20．实施方案12-19的方法,其中所述博德特氏菌属培养物在发酵结束时的生物量比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的生物量高至少10%。

[0124] 实施方案21．实施方案12-20的方法,其中所述方法进一步包括纯化来自博德特氏菌属培养物的一种或多种博德特氏菌属蛋白质的步骤。

[0125] 实施方案22．实施方案1-10的方法,其中所述生长培养基是无菌的。

[0126] 实施方案23．一种分离的博德特氏菌属蛋白质,其通过实施方案12-22的方法生产。

[0127] 实施方案24．一种免疫原性组合物,其包含实施方案23的分离的博德特氏菌属蛋白质。

[0128] 实施方案25．一种生产条件生长培养基的无菌法,其包括:(i) 提供无菌生长培养基;(ii) 将无菌生长培养基在大约28℃至大约35℃的温度下保持大约20至35小时;和(iii) 搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约10 h^{-1}至大约130 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供条件生长培养基。

[0129] 实施方案26．实施方案25的无菌法,其中步骤b)在大约29℃至大约33℃、大约30℃至大约32℃、或大约31℃的温度下进行。

[0130] 实施方案27．实施方案25或26的无菌法,其中步骤b)进行大约25至35小时、大约30至35小时、或大约32小时。

[0131] 实施方案28．实施方案25、26或27的无菌法,其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续搅拌所述无菌生长培养基。

[0132] 实施方案29．实施方案28的无菌法,其中所述搅拌在产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}、或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的搅拌速度下。

[0133] 实施方案30．实施方案25至29的无菌法，其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续曝气所述无菌生长培养基。

[0134] 实施方案31．实施方案30的无菌法，其中所述曝气在产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}、或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的流速下。

[0135] 实施方案32．实施方案25至31的无菌法，其中步骤c)包括在步骤b)的持续期间连续搅拌和曝气所述无菌生长培养基。

[0136] 实施方案33．实施方案32的无菌法，其中所述搅拌和曝气在产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa)的搅拌速度和流速下。

[0137] 实施方案34．实施方案25至33的无菌法，其中所述方法在至少10L、至少100L或至少1000L无菌生长培养基的规模下进行。

[0138] 实施方案35．一种条件生长培养基，其通过实施方案25至34的无菌法生产。

[0139] 实施方案36．一种培养博德特氏菌属物种的方法，其包括：(i) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种实施方案35的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物；和(ii) 将博德特氏菌属培养物保持在能够增加生物量和/或产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下。

[0140] 实施方案37．一种生产博德特氏菌属蛋白质的方法，其包括：(i) 用至少一个博德特氏菌属细胞接种实施方案35的条件生长培养基以产生博德特氏菌属培养物；(ii) 将博德特氏菌属培养物保持在能够产生至少一种博德特氏菌属蛋白质的条件下；和(iii) 从所述培养物中分离所述至少一种博德特氏菌属蛋白质。

[0141] 实施方案38．实施方案36或37的方法，其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质选自百日咳毒素、丝状血凝素、百日咳杆菌粘附素和腺苷酸环化酶。

[0142] 实施方案39．实施方案36、37或38的方法，其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质以比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量高至少10%的产量生产。

[0143] 实施方案40．实施方案36至39的方法，其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是百日咳毒素，例如基因脱毒的百日咳毒素。

[0144] 实施方案41．实施方案36至40的方法，其中所述至少一种博德特氏菌属蛋白质是基因脱毒的百日咳毒素，其中S1亚基的两个催化残基(Arg9和Glu129)突变成Lys9和Gly129。

[0145] 实施方案42．实施方案40或41的方法，其中与用非条件生长培养基进行的相同方法产生的产量相比，丝状血凝素的产量不变或更高。

[0146] 实施方案43．实施方案36至42的方法，其中发酵时间比用非条件生长培养基进行的相同方法的发酵时间短至少10%。

[0147] 实施方案44．实施方案36至43的方法，其中所述博德特氏菌属培养物在发酵结束时的生物量比用非条件生长培养基进行的相同方法产生的生物量高至少10%。

[0148] 实施方案45．实施方案36至44的方法，其中所述方法进一步包括纯化来自博德特氏菌属培养物的一种或多种博德特氏菌属蛋白质的步骤。

[0149] 实施方案46．任一前述实施方案的方法，其中所述生长培养基是任选包含烟酸的改良Stainer Scholte培养基(MSS)。

[0150] 实施方案47．实施方案46的方法，其中所述生长培养基是包含大约1g/L二甲基-

ß-环糊精和大约10g/L酸水解酪蛋白的改良Stainer和Scholte培养基。

[0151] 实施方案48. 实施方案46或47的方法,其中所述生长培养基是包含大约40mg/L L-半胱氨酸代替L-胱氨酸;大约11.84g/LL-谷氨酸钠;大约150mg/L谷胱甘肽;和/或大约400mg/L抗坏血酸(例如大约400 mg/L)的改良Stainer和Scholte培养基。

[0152] 实施方案49. 一种生产无菌条件生长培养基的无菌法,其包括:(a) 提供无菌生长培养基;(b) 将无菌生长培养基在大约29℃至大约33℃、大约30℃至大约32℃、或大约31℃的温度下保持大约25至35小时、大约30至35小时、或大约32小时;和(c) 在步骤b)的持续期间连续搅拌和/或曝气所述无菌生长培养基以产生大约60 h^{-1}至大约130 h^{-1}、或大约90 h^{-1}的氧体积传质系数(kLa),由此提供无菌条件生长培养基;其中所述生长培养基是任选包含烟酸的改良Stainer Scholte培养基(MSS)。

[0153] *总则*

[0154] 除非另行指明,本文使用的所有技术和科学术语具有本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。除非上下文清楚地另行指明,单数术语“一”和“该”包括复数指代。类似地,除非上下文清楚地另行指明,词语“或”意在包括“和”。

[0155] 另外,对于物质的浓度或含量,如溶液组分浓度或其比率,和反应条件,如温度、压力和周期时间给出的数值界限意为近似值。本文所用的术语“大约”意在表示±10%的量。除非上下文另行要求,词语“之间”当用于表示数值范围时(例如,“在X与Y之间”或“在大约X与大约Y之间”)意在包括该范围的端点(即包括X和Y)。

[0156] 术语“包含”是指“包括”。因此,除非上下文另行要求,词语“包含(comprises)”和变体,如“包含(comprise)”和“包含(comprising)”将被理解为暗示包括所述化合物或组合物(例如核酸、多肽、抗原)或步骤,或化合物或步骤的组,但不排除任何其它化合物、组合物、步骤或其组。术语“由…组成”是指“包括且限于”。术语“基本由…组成”是指该组合物或方法可包括另外的成分和/或步骤,但只有当该另外的成分和/或步骤不会实质改变所要求保护的组合物或方法的基本和新颖特征时。缩写“例如(e.g.)”衍生自拉丁语exempli gratia并在本文中用于表示非限制性实例。因此,缩写“e.g.”与术语“例如(for example)”同义。

[0157] 参考以下非限制性实施例和附图进一步描述本发明。

实施例

[0158] *实施例1:在实验室规模下的培养基调节效果的验证*

[0159] 初步观察表明在商业规模博德特氏菌属发酵法中的产量变化可能归因于在接种前的生长培养基调节中的差异。为了探索这种变化的来源,在实验室规模模型法中检查在接种前的生长培养基调节的效果。

[0160] *实验室规模模型*

[0161] 开发实验室规模模型以再现商业方法的三个步骤:1) 预培养序列(pre-culturetrain);2) 培养基调节;和3) 发酵。预培养序列步骤是指用于积累足够的生物量以用于发酵步骤的接种的预培养步骤。由于培养基调节是在不存在细菌的情况下进行的无菌工艺步骤,培养基调节独立于预培养序列步骤进行,例如在之前、之后或并行进行。在预培养中,用10^9百日咳博德特氏菌CFU接种含有30 ml新鲜培养基(MSS;衍生自Stainer和

Scholte的培养基. J. Gen. Microbial. 63:211-220 (1971),通过加入二甲基-ß-环糊精1 g/L和酸水解酪蛋白10 g/L、用L-半胱氨酸40 mg/L替代L-胱氨酸40 mg/L,和使用较高浓度的L-谷氨酸钠(11.84 g/L)、减少的谷胱甘肽(150 mg/L)和抗坏血酸(400mg/L))的第一摇瓶预培养物并在150 rpm搅拌下在35℃下孵育24小时。第一预培养物用于接种含有1000 ml新鲜培养基(MSS)的第二摇瓶预培养物。第二预培养物在150 rpm搅拌下在35℃下孵育24小时。然后使用预培养序列的等分试样接种如下所述用于发酵的条件生长培养基。

[0162] 与预培养序列并行进行培养基调节。将1升无菌生长培养基(用于预培养的相同类型)无菌转移到1升生物反应器(BioBlock platform (4 x 1L生物反应器),Eppendorf)中并在35℃、每小时鼓入20 L空气的空气流速、430 rpm的搅拌速度(60 h^{-1}的kLa)下保持40小时。作为对照,非条件生长培养基保持在4℃而未经进一步加工。条件培养基和非条件培养基的制备使用相同程序进行四次(Prep 1、Prep 2、Prep 3、Prep 4)。

[0163] 通过用预培养序列博德特氏菌属接种物接种条件培养基和非条件培养基并在小规模发酵容器(<1L)中在标准条件(35℃、至少90h^{-1}的kLa)下孵育该培养物,在小规模下进行发酵步骤。

[0164] *发酵性能的量度*

[0165] 如生物量、PT产量和发酵时间所示的发酵性能的评估对每次制备重复至少3次。在发酵全程记录生物量、溶解氧压(pO_2)和pH的在线测量。发酵开始被定义为将博德特氏菌属预培养序列添加到发酵容器中的时间。发酵结束被定义为溶解氧(pO_2)达到最小并开始攀升回到100%的时间点。pO_2的拐点表明培养物中的碳源耗尽且细胞从生长期转变到稳定期。发酵时间因此是发酵开始和发酵结束之间的时间量。

[0166] 在发酵结束时,通过离心(14000g、10min RT)回收上清液,过滤(0.22 um滤网)并储存在-20℃以供进一步分析。通过ELISA使用标准方法检测发酵结束时的百日咳毒素(PT)含量。

[0167] *结果*

[0168] 结果作为相对于非条件培养基的平均变化百分比[条件/非条件 - 1 (%)]概括在表1中。对于所有四个复制品(Preps 1-4),在发酵结束时的百日咳毒素含量在条件培养基中与非条件培养基相比增加至少10%。对于其中三个制备(Preps 2-3),条件培养基中的发酵结束时的生物量与非条件培养基相比相应增加。最后,当培养物在条件培养基中生长时,与非条件培养基相比,观察到发酵时间减少的趋势。

[0169] 表1

[0170]

	生物量	PT (ELISA)	发酵时间
Prep 1	- 7.0%	+13.2%	-7.2%
Prep 2	+52.3%	+15.2%	-4.9%
Prep 3	+27.8%	+22.6%	-12.3%
Prep 4	+44.9%	+33.0%	-5.7%

。

[0171] Prep 2的生长动力学作为这四个制备的代表性实例显示在图1中。在条件培养基(黑色实线)和非条件培养基(灰色实线)中的博德特氏菌属细胞生长(生物量)在培养的前15-20小时类似。此后,条件培养基中的细胞生长速率高于非条件培养基。随着生物量增加,

溶解氧降低,在条件培养基发酵中观察到更快速降低。在通过溶解氧的快速再增加所示的发酵结束时,生物量在条件培养基发酵条件中明显高于非条件发酵条件。

[0172] 初始小规模研究的结果表明在先的培养基调节对博德特氏菌属细胞生长和PT生产具有正面作用。特别地,对于在条件培养基中进行的发酵,观察到发酵终点生物量和PT含量的显著增加。也观察到在条件培养基中的较短发酵时间的趋势。实验室规模模型的结果证实在商业规模下作出的观察,表明调节的效果不依赖于发酵的规模。在细胞生长过程中没有观察到培养基调节对培养基的pH的显著影响(数据未显示)。

[0173] 不受制于基础理论,观察到的培养基调节效果可能与培养基调节过程中发生的生物化学修饰如一种或多种培养基组分的氧化有关,所述生物化学修饰改进在发酵步骤过程中的细胞生长和毒力因子生产率。

[0174] *实施例2:影响培养基调节的工艺参数的识别*

[0175] 为了更好地确定带来改进的博德特氏菌属发酵性能的调节参数,进行实验设计(DoE)研究。

[0176] *方法*

[0177] 在如表2中所示的每种参数具有3个水平(最小/中心/最大)的中心复合设计中评价三种调节工艺参数对后续发酵性能的影响。工艺参数是调节温度、调节持续时间和氧体积传质系数(kLa),其是曝气流速和搅拌速度的因子。

[0178] 表2:培养基调节工艺参数

[0179]

参数	最小	中心	最大
温度(℃)	28	35	40
kLa (h^{-1})	10	50	90
持续时间(小时)	3	23	43

[0180] 在经6周进行的60个流程(runs)中进行DoE(参见表3)。每周,在3 x 1L调节生物反应器中装入1L如实施例1中所述新鲜制备的无菌生长培养基并在3对不同的kLa-温度下调节。在调节过程中,各调节生物反应器在3个不同的时间点(3h、23h和43h)取样以检查调节持续时间的影响。在3和23h提取的培养基样品立即储存在4℃以稳定样品。在提取最后一个样品后,将来自3个生物反应器的9个培养基样品转移到小规模发酵容器(<1L)中并接种如实施例1中所述制备的博德特氏菌属预培养序列,以评价生长和抗原生成。

[0181] 通过测量PT和FHA含量(ELISA)、生物量含量(生长曲线和最终光学密度)和发酵时间(如实施例1中所述测量)来评估发酵性能指标。

[0182] *结果*

[0183] 结果显示在表3和图2中。调节工艺参数的变化对发酵性能指标的影响不同。培养基调节的持续时间越长,所得生物量和PT含量越好。FHA含量不受增加的调节持续时间影响。调节温度影响PT生产但不影响生长性能(生物量)。最后,kLa的变化影响生物量但不影响PT生产。

[0184] DoE的结果预测对于与相对于非条件培养基增加的PT(至少10%)相关的调节参数值的设计空间(图2A-D)。该模型还预测对PT产量和生物量生产而言最优的调节参数是在31.2℃的温度和大约90h^{-1}的kLa下调节34.6h。

[0185] 表3: 实验设计结果

[0186]

		调节参数			发酵性能量度			
流程	周	温度 (°C)	kLa (h^{-1})	持续时间 (h)	发酵时间 (h)	生物量 (A.U.)	PT (μg/mL)	FHA (μg/mL)
1	1	28	10	3	38,31	249	5,59	174,11
2	1	28	10	23	38,93	271	6,14	176,32
3	1	28	10	43	37,25	273,6	5,95	149,25
4	1	35	50	3	37,57	274,4	5,70	169,94
5	1	35	50	23	36,35	268,4	5,65	132,98
6	1	35	50	43	36,23	284,6	5,24	129,07
7	1	28	90	3	38,26	256,6	3,69	161,10
8	1	28	90	23	38,09	276,4	6,62	200,57
9	1	28	90	43	39,12	288,9	7,00	153,92
10	1	NC	NC	NC	36,92	270,1	5,12	197,32
11	2	40	10	3	39,26	288,7	6,46	206,68
12	2	40	10	23	38,95	319,1	8,69	219,92
13	2	40	10	43	40,51	306,4	7,46	226,15
14	2	35	50	3	40,24	291	7,92	162,08
15	2	35	50	23	40,40	324,9	9,52	196,83
16	2	35	50	43	41,74	334,1	9,72	228,20
17	2	40	90	3	40,63	294,6	7,44	202,25
18	2	40	90	23	41,21	308,2	8,32	204,75
19	2	40	90	43	40,74	331,5	9,56	221,69

[0187]

20	2	NC	NC	NC	40,24	289,4	6,89	205,41
21	3	35	10	3	37,61	277,8	7,20	159,27
22	3	35	10	23	37,79	296,1	7,77	190,82
23	3	35	10	43	36,60	301,5	8,91	150,98
24	3	28	50	3	38,65	283,2	7,47	202,18
25	3	28	50	23	36,86	295,2	8,49	194,52
26	3	28	50	43	36,06	296,6	7,51	203,41
27	3	35	50	3	39,00	295,8	8,07	176,65
28	3	35	50	23	36,27	295	8,55	207,20
29	3	35	50	43	36,71	309,1	8,42	181,30
30	3	NC	NC	NC	37,77	282,1	6,31	234,33
31	4	35	50	3	38,00	286,4	6,14	196,78
32	4	35	50	23	36,89	307	7,04	195,48
33	4	35	50	43	36,56	302,3	7,06	207,69
34	4	40	50	3	37,59	282	5,60	204,34
35	4	40	50	23	36,89	293,6	5,51	260,48
36	4	40	50	43	36,38	302,8	5,43	216,23
37	4	35	90	3	37,73	291,8	6,20	204,82
38	4	35	90	23	38,09	313,2	6,98	230,79
39	4	35	90	43	37,85	309,5	7,88	177,61
40	4	NC	NC	NC	39,89	275,1	5,48	NT
41	5	28	10	3	35,32	280,4	5,48	161,56
42	5	28	10	23	35,06	292,3	6,43	169,85
43	5	28	10	43	34,86	291,7	6,61	168,32
44	5	35	50	3	35,16	281,3	5,73	193,18
45	5	35	50	23	34,33	290,9	6,36	151,63
46	5	35	50	43	34,52	288,4	4,88	227,00
47	5	28	90	3	36,03	278,8	5,90	198,90
48	5	28	90	23	34,67	297,4	5,29	204,31
49	5	28	90	43	34,68	291,4	6,82	232,72
50	5	NC	NC	NC	36,06	281,4	4,26	155,67
51	6	40	10	3	37,54	284,2	4,93	177,32
52	6	40	10	23	36,86	293,4	5,91	207,68
53	6	40	10	43	39,01	292,1	4,95	202,01
54	6	35	50	3	37,74	277,4	5,94	197,46
55	6	35	50	23	36,92	293,9	5,93	171,34
56	6	35	50	43	36,60	295,3	6,48	188,03
57	6	40	90	3	38,17	282	5,28	145,18
58	6	40	90	23	38,27	295,5	5,37	152,10
59	6	40	90	43	37,78	298,8	5,69	182,37
60	6	NC	NC	NC	37,84	285,2	5,57	189,28

[0188] *NC :非条件*

[0189] *NT :未测试*。

[0190] *实施例3:在1升生物反应器规模下的调节参数的验证*

[0191] 为了验证实施例2中识别的对于10%增加的PT产量的培养基调节设计空间,使用在预测设计空间内的调节参数在1L生物反应器规模下进行培养基调节和发酵法。

[0192] *方法*

[0193] 4 x 1L-生物反应器的平台(BioBlock,Eppendorf)用于接种前的培养基调节。该平台允许4个培养基制品的并行调节并连续评价它们的发酵性能。对于调节步骤,将1L无菌

生长培养基(参见实施例1和2)无菌转移到各生物反应器并施以(下文)实验设计中描述的工艺参数。如果实验设计需要非条件培养基,则四个生物反应器之一在调节步骤的过程中保持空置以允许稍后转移非条件培养基(参见下文)。

[0194] 当达到培养基调节的预定持续时间时,停止调节。对于某些流程,将1升(1L)非条件培养基(如实施例1和2中制备)无菌转移到四个生物反应器之一中。使用下列条件以校准各生物反应器中的100%溶解氧(DO)水平:温度(35℃)、大气压、空气流速(每分钟鼓入2L空气)和搅拌速度(300 rpm或转数/分钟)。在各生物反应器中无菌加入300μL防沫剂(Simethicone 15%)。

[0195] 通过加入150 mL百日咳博德特氏菌接种物(与如实施例1和2中所述的调节步骤并行制备)实现接种。在发酵过程中,将温度(35℃)保持在恒定水平。通过加入防沫剂(Simethicone 1.5%)进行发酵过程中的泡沫控制。将溶解氧水平设定为35%以补偿在较大规模发酵时施加的排出压力(head pressure)并在DO降到低于35%时通过提高搅拌来调整。将最小搅拌速度设定为300 rpm;将最大搅拌速度设定为1100rpm。通过加入乙酸50%(w/v或重量/体积)将pH调整为7.2。

[0196] 在发酵结束时(如实施例1中定义的),通过测量光学密度和通过pH调整加入的乙酸总量(后者作为正交法来评价生物量含量)来测定生物量产量。通过ELISA使用标准方法测定在培养上清液中的百日咳毒素(PT)产量。

[0197] *实验设计*

[0198] 在实施例2中,计算带来至少10%增加的PT产量的设计空间。在这一实验中,我们比较相对于非条件培养基(表4中的方法1),在计算的PT设计空间内的3组不同工艺参数(表4中的方法2-4)下调节的培养基的发酵性能(发酵时间、生物量、PT和FHA产量)。方法2和3分别测试在$90h^{-1}$或$60h^{-1}$的kLa值下对PT产量而言最优的操作参数(在31℃下32h)。方法4测试在35℃的调节温度和$60h^{-1}$的kLa下的操作参数。该实验进行一次。

[0199] 表4

[0200]

方法	持续时间(小时)	温度(℃)	kLa (h^{-1})
1	32	4	0
2	32	31	90
3	32	31	60
4	32	35	60

[0201] *结果*

[0202] 如图3中所示,在条件培养基中进行的发酵(方法2、3和4)产生比在非条件培养基中进行的发酵高大于10%的PT含量(右图)。生物量含量在1L生物反应器规模下不受温度或kLa的显著影响(左图)。这些结果验证了在实验设计研究(实施例2)中识别的对于10%增加的PT产量的设计空间。

[0203] *实施例4:在1升生物反应器规模下的调节持续时间的影响*

[0204] 为了在更宽的时间范围内探索调节持续时间的影响,用31℃的调节温度、$90h^{-1}$的kLa值和<3h、32h或56h的调节持续时间重复实施例3(表5)。该实验一式两份进行。

[0205] 表5

[0206]

方法	持续时间(小时)	温度(℃)	kLa (h^{-1})

5	32	4	0
6	<3	31	90
7	32	31	90
8	56	31	90

[0207] *结果*

[0208] 如图4中所示,培养基调节32h和56h导致PT含量与非条件培养基相比增加≥10%(上图)。生物量在32h和56h也增加(下图)。增加的调节持续时间对PT含量和生物量的影响在32h左右达到平台。

[0209] *实施例5:在20升生物反应器规模下的最优调节参数的验证*

[0210] 也在20L生物反应器规模下进行的博德特氏菌属发酵中验证最优培养基调节参数。

[0211] *方法*

[0212] 20 L发酵罐(Biolafitte™)用于接种前的培养基调节。将10L如实施例1中制备的无菌生长培养基无菌转移到20L生物反应器中,并施以表6中概括的调节工艺参数。

[0213] 表6

[0214]

周	流程	曝气流速 (L/min)	搅拌速度 (rpm)	温度 (°C)	持续时间 (h)	kLa (h^{-1})
1	1	0	0	4	32	0
	2	14,6	450	31	32	90
2	3	**1,46**	450	31	32	≈ 10
	4	14,6	450	31	32	90
3	5	14,6	**50**	31	32	≈ 10
	6	14,6	450	31	32	90
4	7	14,6	450	**23**	32	90
	8	14,6	450	31	32	90
5	9	14,6	450	31	**3**	90
	10	14,6	450	31	32	90

[0215] 如实施例1中所述制备预培养序列,只是第一和第二预培养物一式两份制备(2 x 30mL第一预培养物;2 x 1000mL第二预培养物)。在35℃ (+/-1℃)和150 rpm下生长24 h (+/-1h)后,汇集来自第二预培养的两个一次性摇瓶。一旦第二预培养停止,汇集的预培养物就用于接种发酵罐。

[0216] 一达到调节步骤的预定持续时间,就停止调节并在接种前使用下列条件以校准100%溶解氧(DO)水平:温度(35℃)、排出压力(head pressure)(0.4巴)、空气流速(每分钟鼓入14.6 L空气)和搅拌速度(50 rpm或转数/分钟)。在各生物反应器中无菌加入3 mL防沫剂(Simethicone 15%)。

[0217] 通过加入1.5 L汇集的预培养物实现接种。在发酵过程中,将温度(35℃)和排出压力(head pressure)(0.4巴)保持在恒定水平。通过加入防沫剂(Simethicone 1.5%)进行发酵过程中的泡沫控制。将溶解氧水平设定为25%并在DO降到低于25%时通过提高搅拌来调整。将最小搅拌速度设定为50 rpm;将最大搅拌速度设定为1000 rpm。通过加入乙酸50%(w/

v或重量/体积)将pH调整为7.2。

[0218] *实验设计*

[0219] 设计该实验以比较在最优工艺参数(31℃、32h、90h^{-1}的kLa)下调节的培养基与在仅一个参数不同于最优的工艺参数下调节的培养基的发酵性能。

[0220] 在第1周,验证相对于非条件培养基(流程1),最优参数的效果(流程2)。在第2和3周,将低调节kLa的效果(流程3 - 低曝气和流程5 - 低搅拌速度)与最优操作条件(流程4和6)比较。在第4和5周,分别将低温(流程7: 23℃)和低持续时间(流程9: 3h)的效果与最优操作参数(流程8和10)比较。

[0221] *结果*

[0222] 如图5和表7A中所示,在具有最优工艺参数的条件培养基中进行的发酵产生与以下这些相比高10%的PT产量:

[0223] - 非条件培养基(第1周)

[0224] - 在由低曝气流速造成的低kLa(≈10h-1)下调节的培养基(第2周)

[0225] - 在由低搅拌速度造成的低kLa(≈10h-1)下调节的培养基(第3周)

[0226] - 用低温(23℃)调节的培养基(第4周)

[0227] - 用短持续时间(3 h)调节的培养基(第5周)

[0228] 这些数据确认在20L发酵规模下对PT产量而言培养基调节的最优操作参数。没有观察到对生物量产量、FHA产量和发酵时间的负面影响。令人惊讶地,尽管实施例1-4中描述的小规模研究没有发现低kLa对PT产量的影响,但在20L发酵规模下观察到低kLa的负面影响。因此,持续时间、温度和kLa都看起来是在20L发酵规模下产生调节效果的重要因素。

[0229] 表7A: 在20L规模下的发酵性能

[0230]

		发酵性能 (相对于非条件培养基的变化%)			
周	工艺参数	生物量 (OD)	发酵时间 (h)	PT (μg/mL)	FHA (μg/mL)
第1周	NC	0%	0%	0%	0%
	最优	9%	1%	16%	23%
第2周	低kLa (曝气)	13%	-14%	6%	21%
	最优	14%	-14%	21%	23%
第3周	低kLa (搅拌)	25%	0%	4%	-10%
	最优	18%	-6%	18%	10%
第4周	低温	19%	-3%	-5%	12%
	最优	18%	-8%	17%	12%
第5周	低持续时间	19%	6%	0%	10%
	最优	26%	-3%	10%	-1%

[0231] NC: 非条件生长培养基。

[0232] *实施例6:在大规模下的最优调节参数的验证*

[0233] 在大规模下执行培养基调节参数并在小规模发酵容器(<1L)中进行的博德特氏菌属发酵中验证。

[0234] *方法*

[0235] 800L发酵罐和2400L培养基制备罐用于接种前的大规模培养基调节。将如实施例1中制备的无菌生长培养基无菌转移到发酵罐(800L)或培养基制备罐(2400L)中并施以下列培养基调节工艺参数(表7B)。由于容器之间的差异,如曝气喷布器设计和搅动系统,在培养基制备罐中实现的Kla值低于在发酵罐中获得的那些。

[0236] 表7B

[0237]

流程	样品 No.	曝气流速 (L/min)	搅拌速度 (rpm)	温度 (°C)	持续时间 (h)
1 (800L 发酵罐)	1*	0	0	4	0
	2	150	210	35	32
2 (培养基制备罐)	3*	0	0	4	0
	4	150	80	35	20
	5	150	80	35	32

[0238] * 非条件生长培养基 (NC) - 对照。

[0239] 在不同时间点将5个无菌条件培养基的样品收集在Novaseptum取样袋中并立即储存在4℃。

[0240] 将5个样品的每一个转移到小规模发酵容器(<1L)中并接种如实施例1中所述制备的博德特氏菌属预培养序列,以评价生长和抗原生成。

[0241] 通过测量PT和FHA含量(ELISA)、生物量含量(生长曲线和最终光学密度)和发酵时间(如实施例1中所述测量)来评估发酵性能指标。

[0242] *结果*

[0243] 如图6中所示,无论用于进行调节步骤的容器的类型如何,培养基调节对后续发酵步骤过程中的生长性能的影响相当。但是,在每种情况下,使用预调节的培养基对发酵具有可论证的正面效果(图7(A)和(B))。

[0244] 与非条件培养基(对照)相比,细菌生长较快,意味着总发酵时间可平均减少大约8%。使用条件培养基,实现的最终生物量高于对照的生物量(在稳定期开始时高大约9%)。有趣的是,经过20小时和32小时调节的培养基的生长性能相当(图8)。

[0245] 在条件培养基中进行的发酵改进PT和FHA的产量。具体地,相对于对照,PT生产率在培养基调节20小时后提高7%并在培养基调节32小时后提高15%。类似地,与对照相比,FHA生产率在培养基调节20小时后提高9%并在培养基调节32小时后提高15%。

[0246] 表8:生长性能和抗原生产率的概要结果。发酵时间和在稳定期开始时的生物量直接由生长曲线确定。

[0247]

样品 No.	发酵时间 (h)	生物量 (A.U[a])	生物量 (OD[b])	PT (μg/mL)	FHA (μg/mL)	PT 生产率 (μg/mL*h)	FHA 生产率 (μg/mL*h)
1	35.2	21.9	4.26	4.16	190	0.118	5.4
2	32.5	23.6	3.64	5.02	191	0.154	5.9
3	34.1	22.2	3.6	4.86	182	0.143	5.3
4	31.6	24.3	3.86	4.81	183	0.152	5.8
5	31.6	24.3	3.80	5.19	193	0.164	6.1

[0248] a - 在稳定期开始时的值,由平均生长曲线确定;

[0249] b - 在发酵结束后在4℃下储存2天的样品上读取的OD。

[0250] 这些数据证实在条件培养基用于细菌发酵前在大规模(最多2400L)下使用无细胞培养基调节步骤的正面效果。

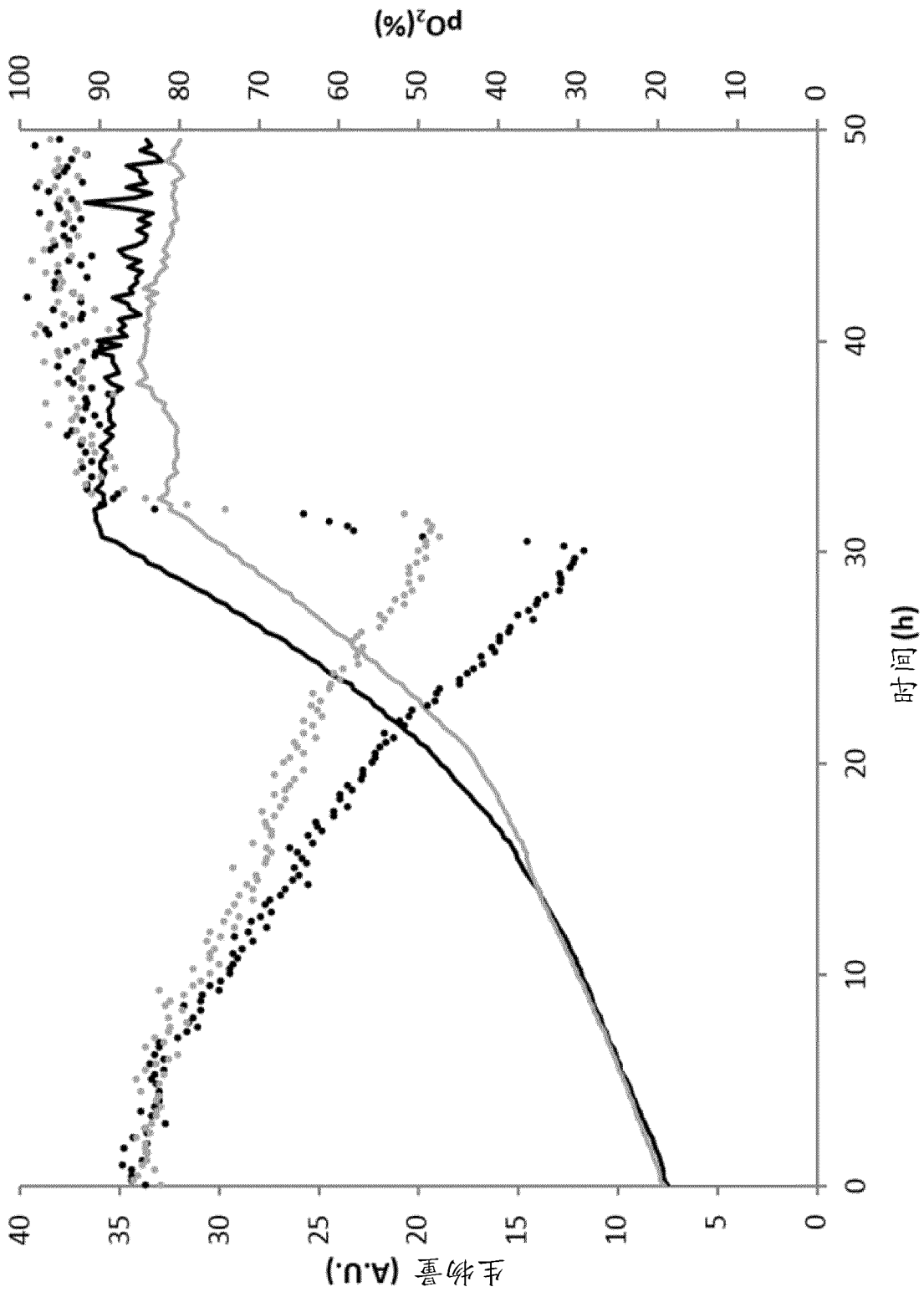

pO2(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
生物量 (A.U.)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
时间 (h)
0
10
20
30
40
50

图 1

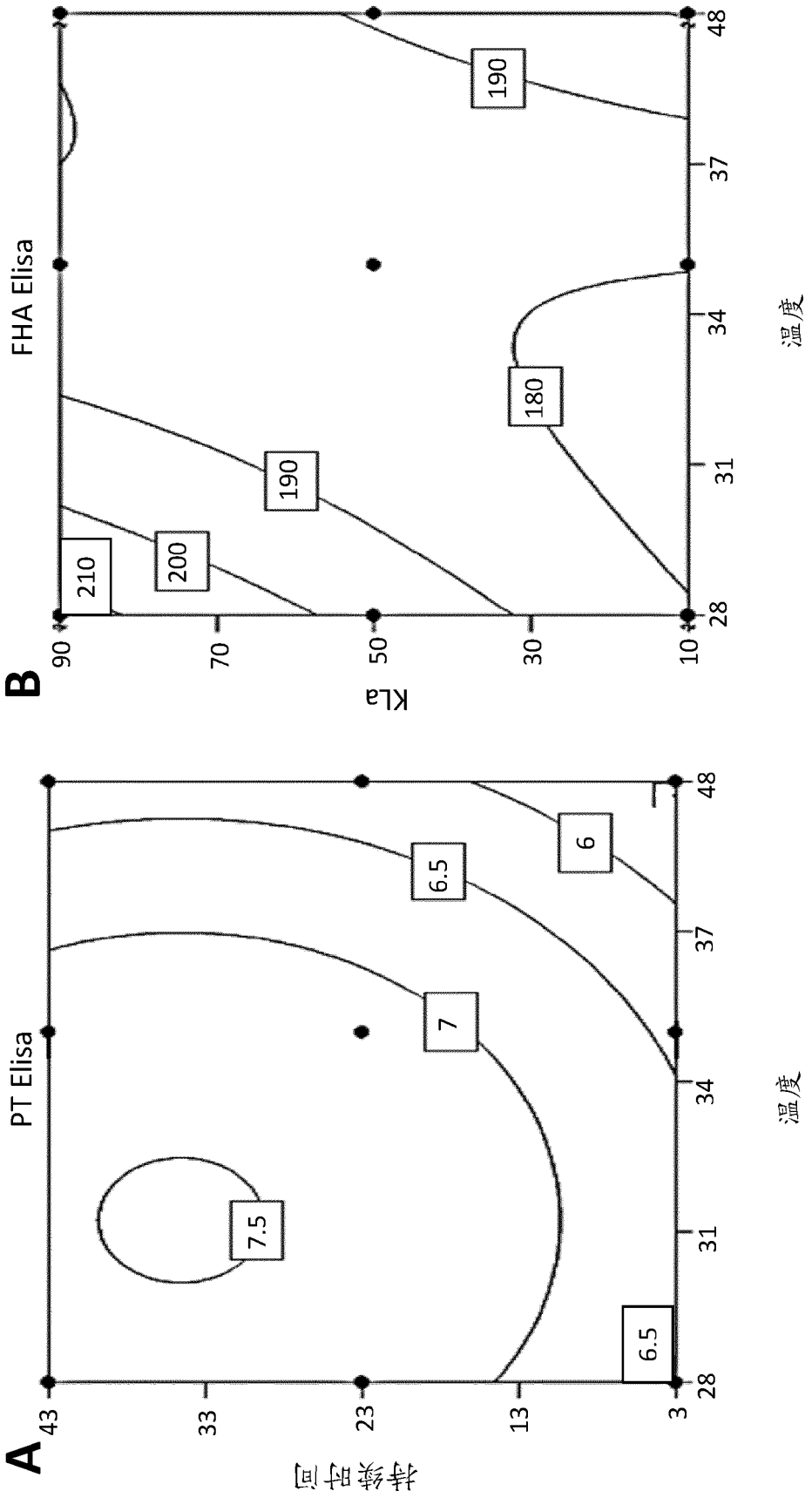

A
PT Elisa
持续时间
温度
43
33
23
13
3
28
31
34
37
48
6
6.5
7
7.5
6.5
B
FHA Elisa
KLa
温度
90
70
50
30
10
28
31
34
37
48
210
200
190
190
180

图 2

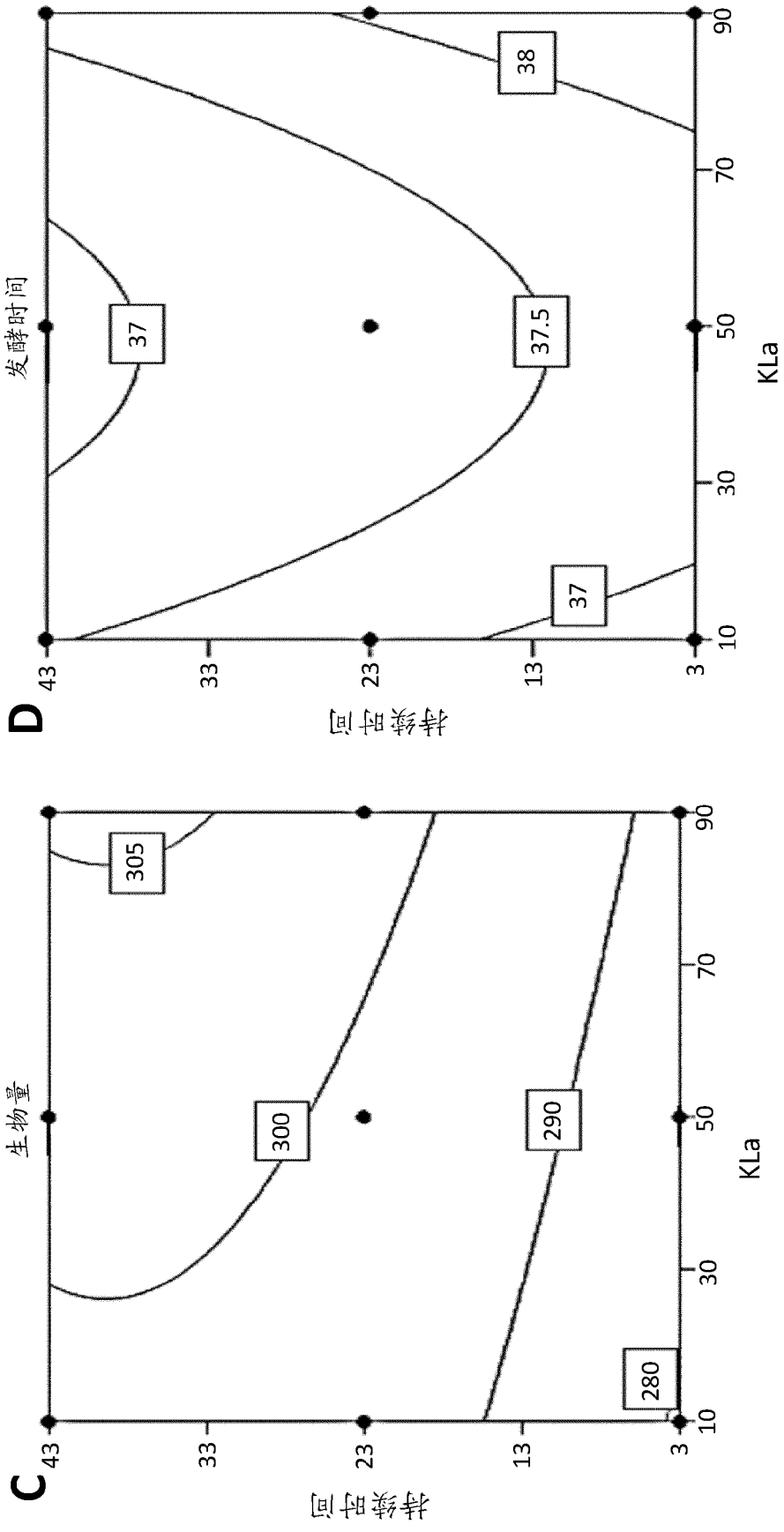


图 2(续)

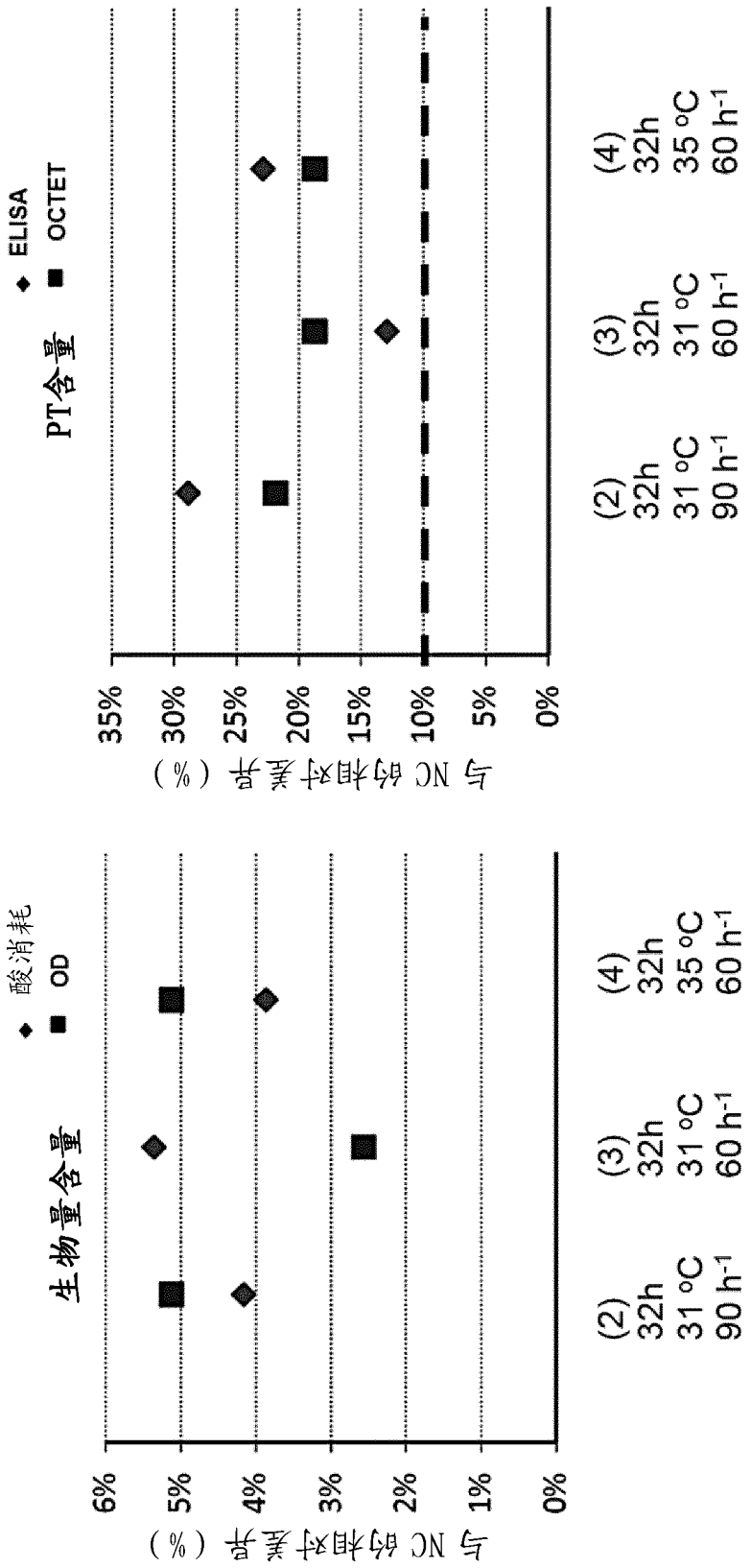

PT含量
ELISA
OCTET
与 NC 的相对差异（%）
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
(2) 32h 31 °C 90 h-1
(3) 32h 31 °C 60 h-1
(4) 32h 35 °C 60 h-1
生物量含量
酸消耗
OD
与 NC 的相对差异（%）
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
(2) 32h 31 °C 90 h-1
(3) 32h 31 °C 60 h-1
(4) 32h 35 °C 60 h-1

图 3

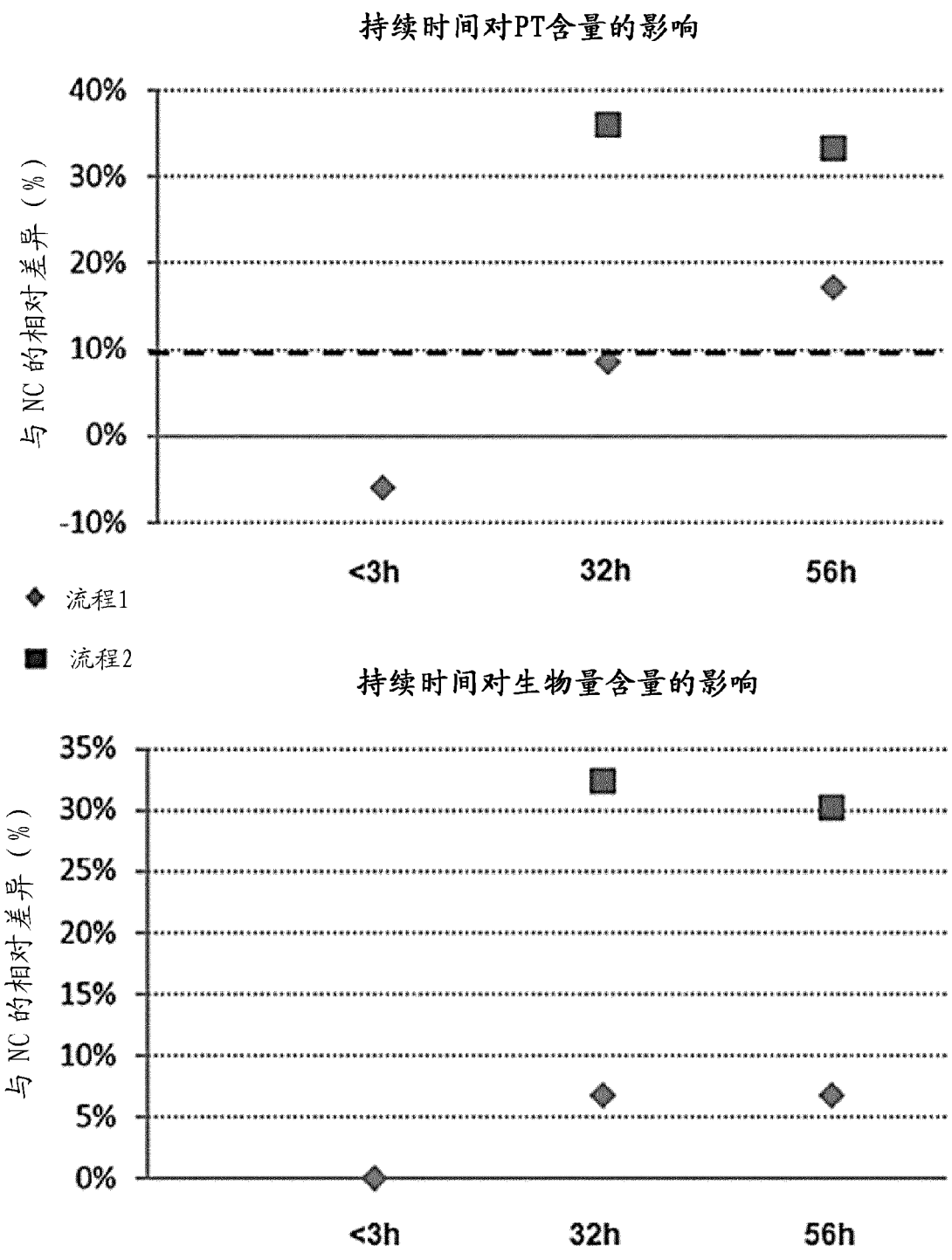

持续时间对PT含量的影响
与 NC 的相对差异（%）
40%
30%
20%
10%
0%
-10%
<3h
32h
56h
流程1
流程2
持续时间对生物量含量的影响
与 NC 的相对差异（%）
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
<3h
32h
56h

图 4

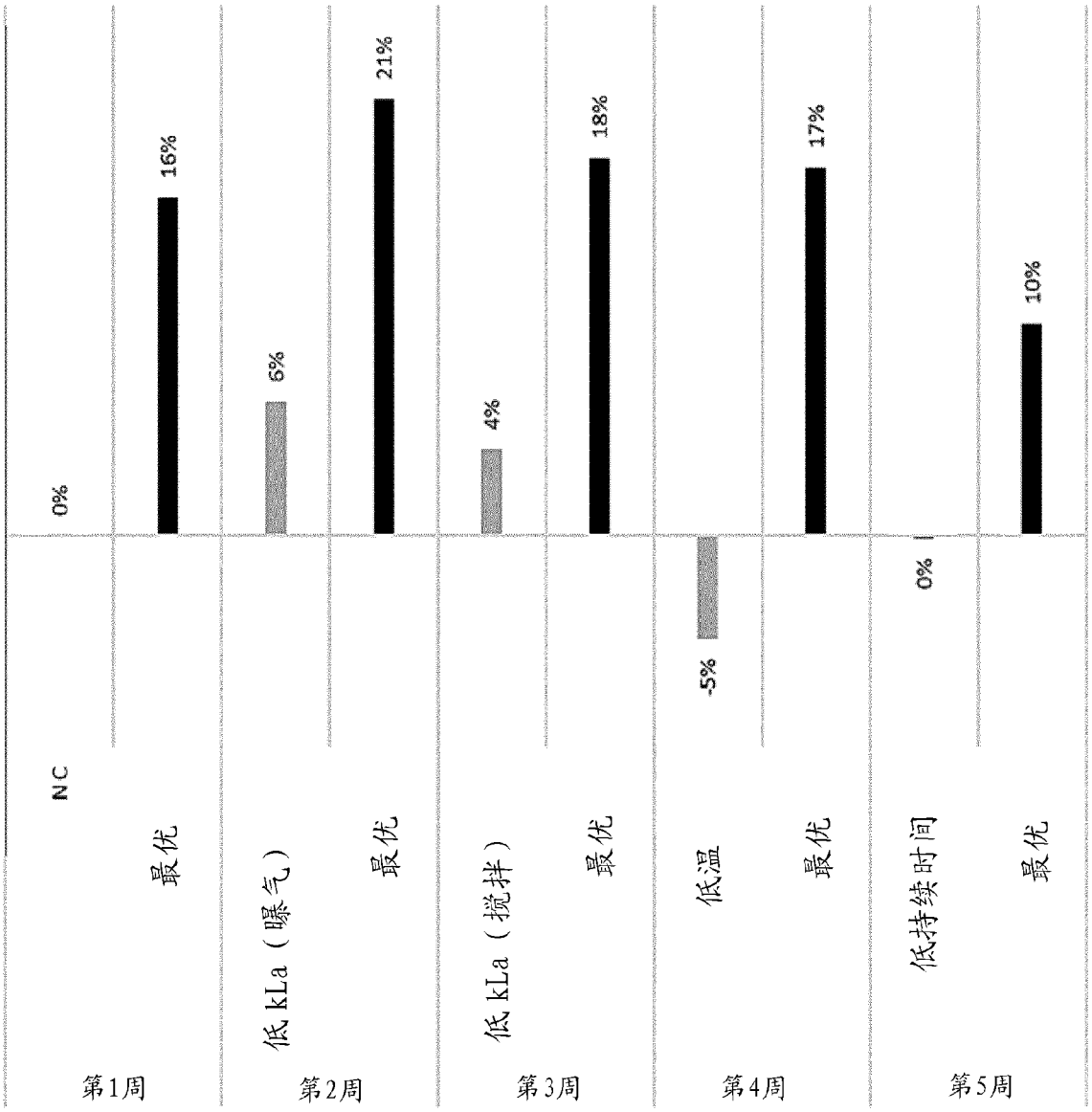

与NC的PT相对差异（%）
0%
16%
6%
21%
4%
18%
-5%
17%
0%
10%
NC
最优
低 kLa（曝气）
最优
低 kLa（搅拌）
最优
低温
最优
低持续时间
最优
第1周
第2周
第3周
第4周
第5周

图 5

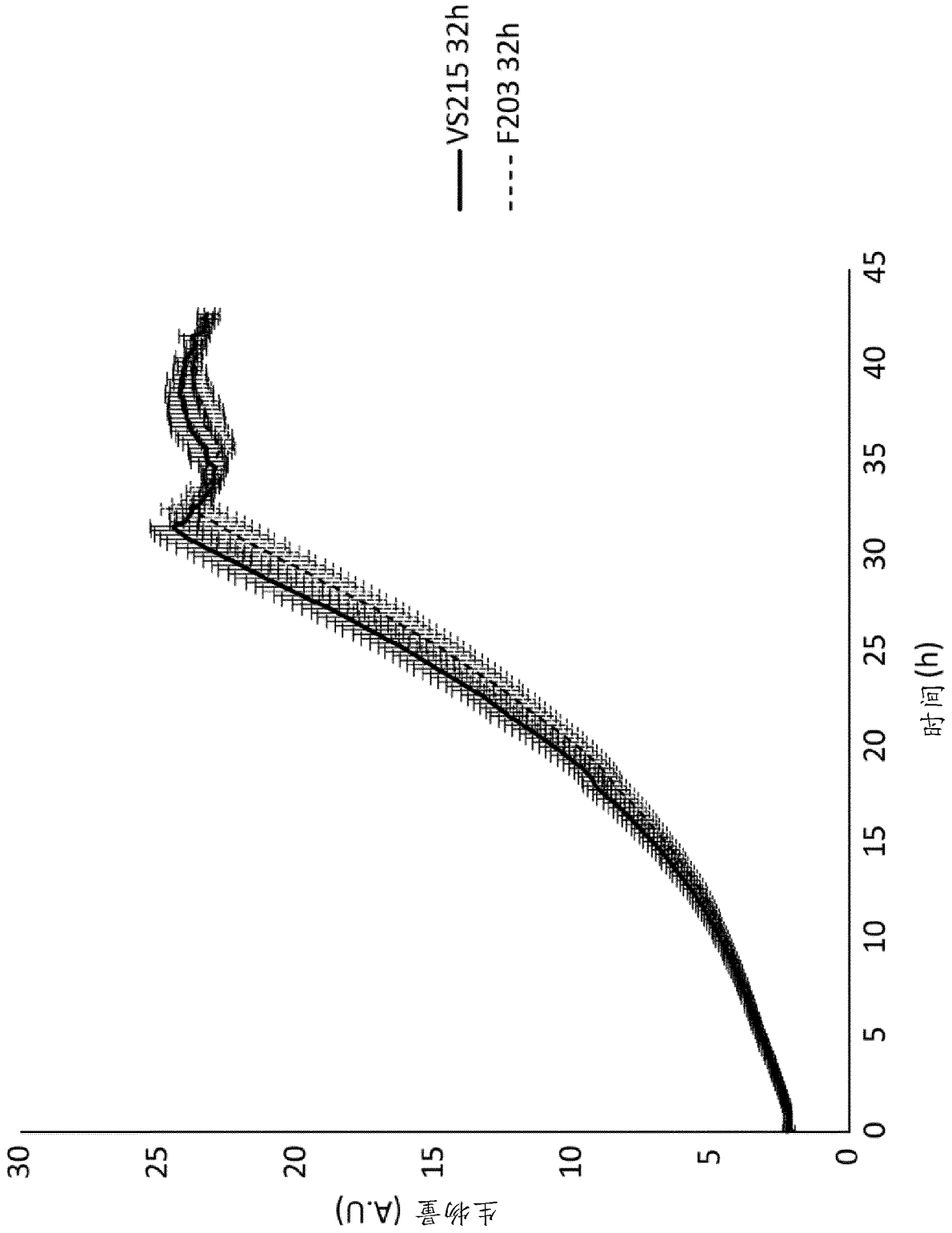


图 6

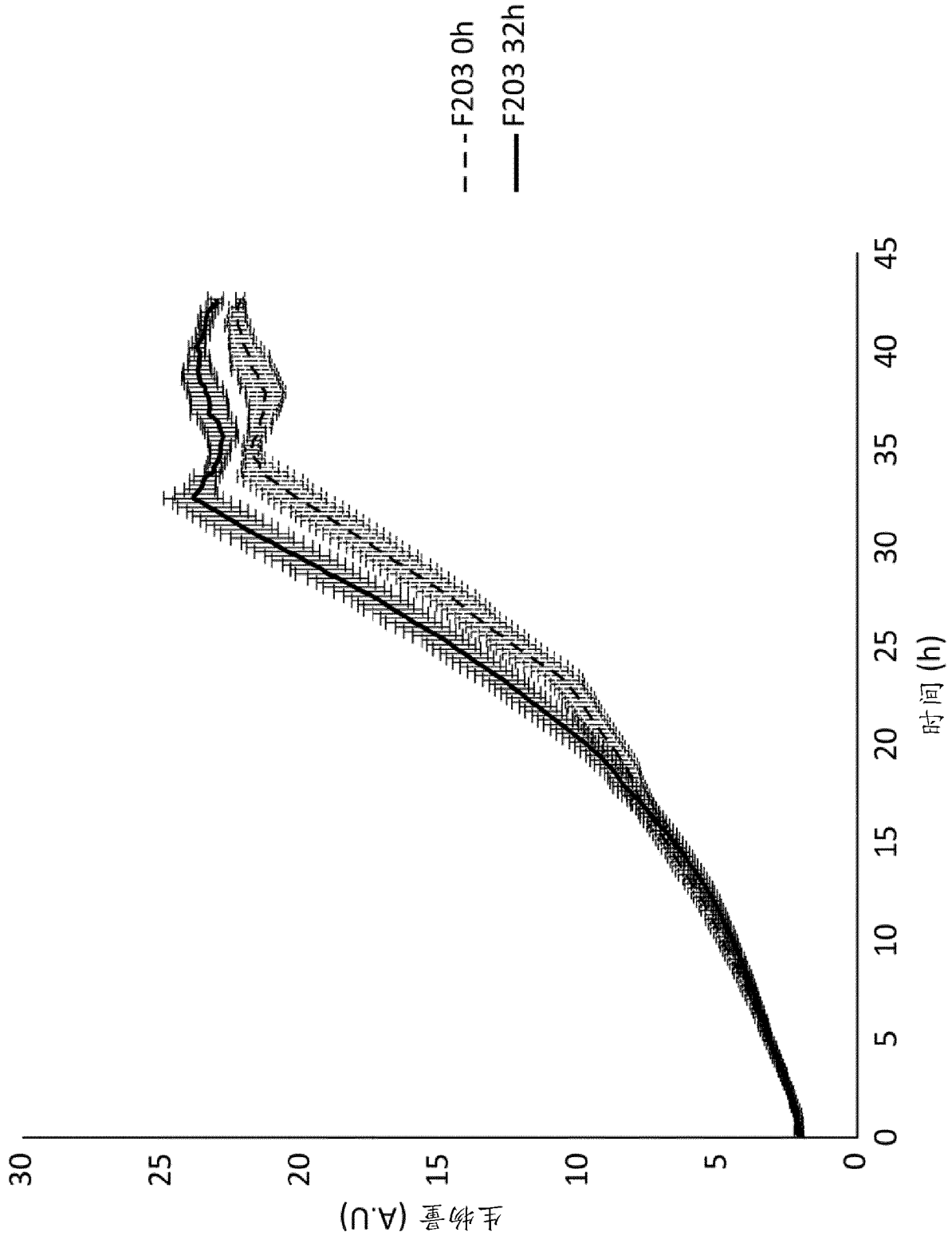


图 7(A)

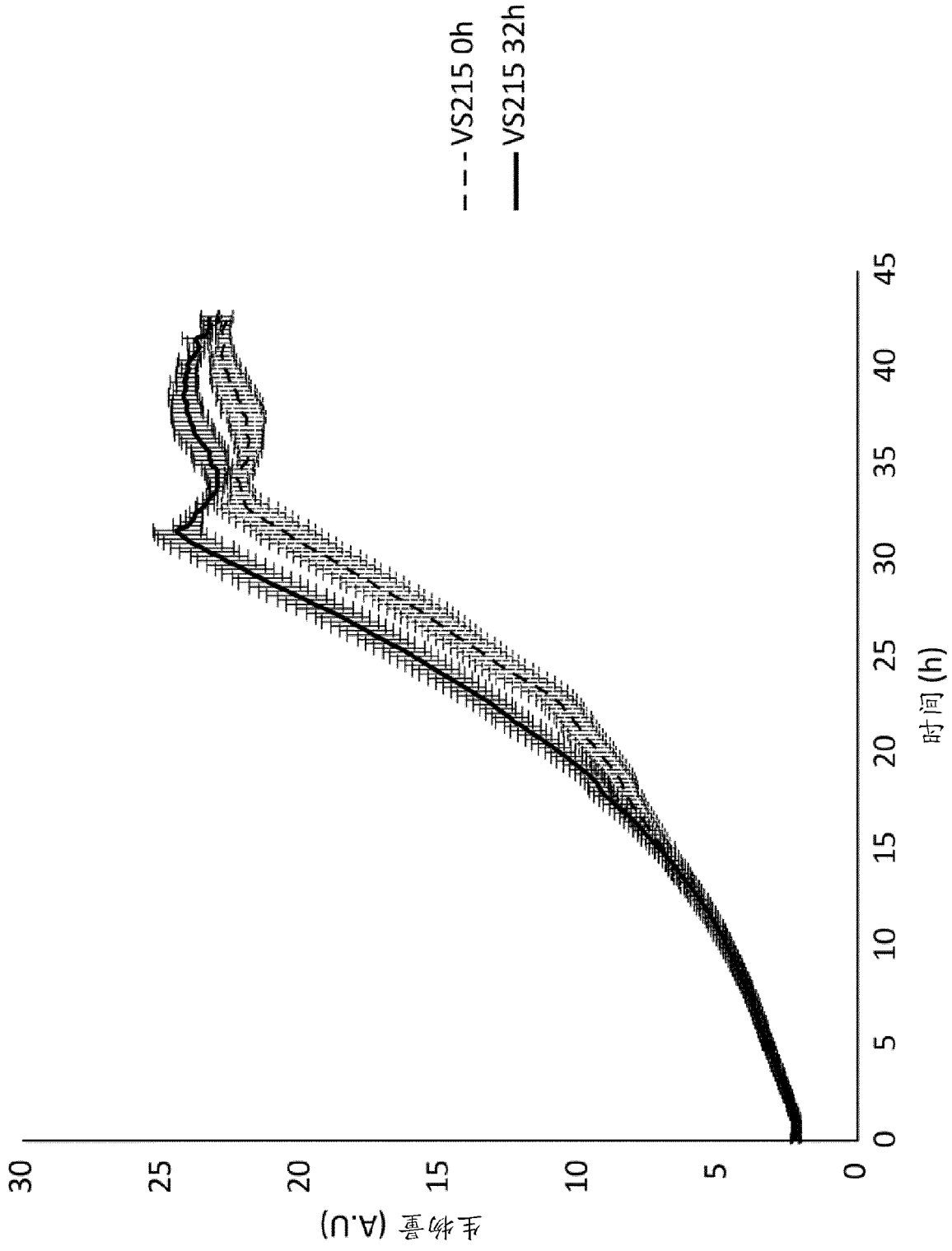


图 7(B)

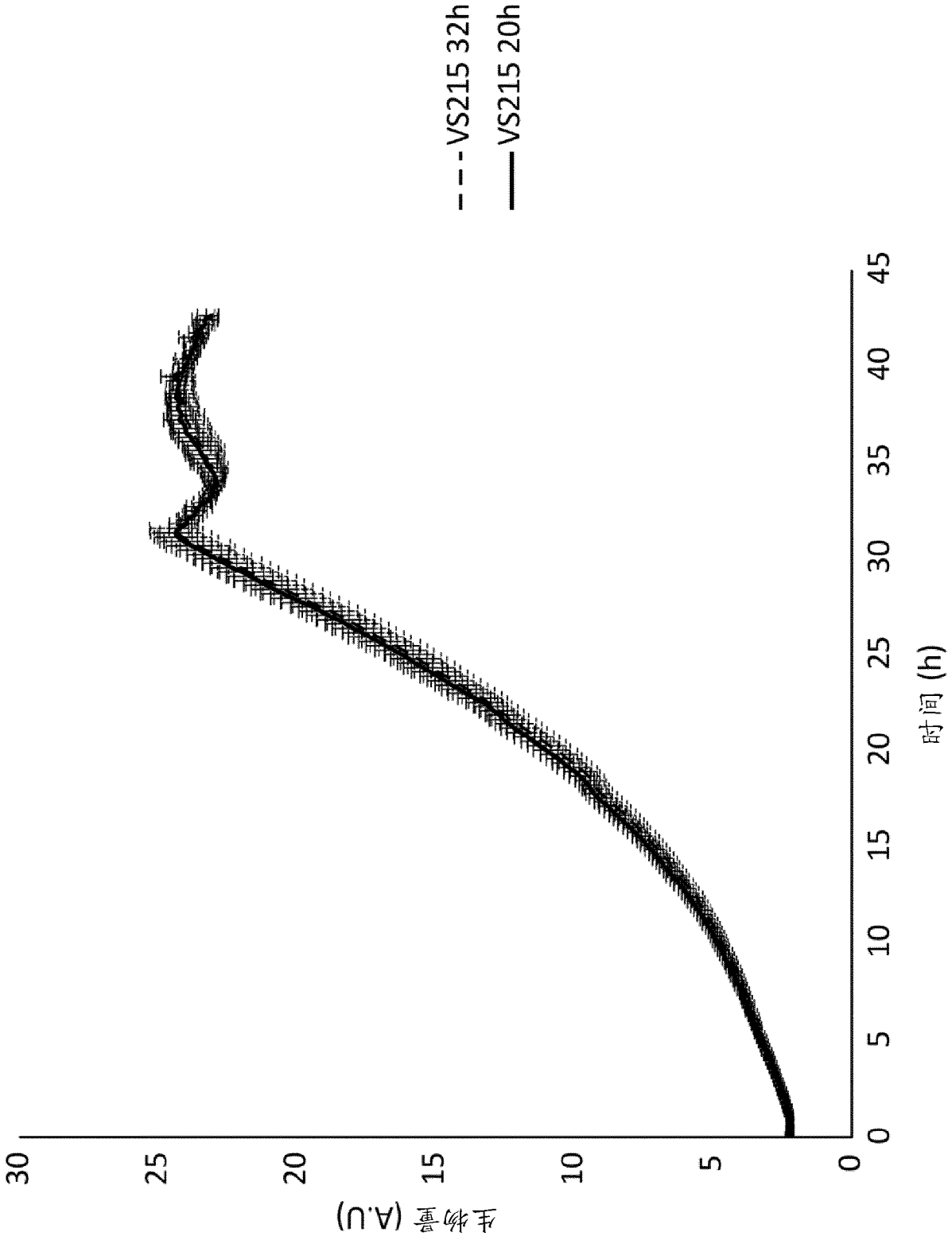


图 8