

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045614**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.12

(51) Int. Cl. **C07K 14/34** (2006.01)

(21) Номер заявки
201992527

(22) Дата подачи заявки
2018.04.19

(54) УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ КРУПНОМАСШТАБНОГО ПРОИЗВОДСТВА CRM₁₉₇

(31) 201741014335

(32) 2017.04.22

(33) IN

(43) 2020.02.28

(86) PCT/IN2018/050235

(87) WO 2018/193475 2018.10.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
**Масиламани Баламурали, Срираман
Раджан, Диксит Мандар Шириш,
Чакка Девипрасанна, Суредди
Сатиям Найду, Матур Рамеш Венкат,
Мантена Нарендер Дев, Датла
Махима (IN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A2-0616034

WO-A1-2013068568

WO-A1-2015134402

WO-A1-2011123139

ZHOU J. ET AL. "Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in B. Subtilis", JOURNAL OF TONGJI MEDICAL UNIVER, TONGJI MEDICAL UNIVERSITY, WUHAN, CN, vol. 19, no. 4, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 253-256, XP009172483, ISSN: 0257-716X, DOI: 10.1007/BF02886955, abstract

US-A1-2004087020

NAGARKAR P.P. ET AL. "The amino acid requirements of Corynebacterium diphtheriae PW 8 substrain CN 2000", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 92, no. 2, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 215-220, XP002446474, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1046/J.1365-2672.2002.01521.X, abstract page 218, right-hand column, last paragraph

(57) Изобретение относится к способу продуцирования CRM₁₉₇, включающему выращивание штамма генно-модифицированного *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇, в необезжелезненной ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей 10 или более аминокислот, где аминокислоты не являются тирозином или аспарагином, и где необезжелезненная ферментативная среда не содержит мальтозу. Также представлены способы продуцирования CRM₁₉₇ (варианты).

B1

045614

045614 B1

Область изобретения

Изобретение относится к улучшенному способу крупномасштабного производства CRM₁₉₇ с использованием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheriae* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇.

Уровень техники

CRM₁₉₇ является генетически детоксифицированной формой дифтерийного токсина. Единичная му-тация в положении 52, заменяющая глутаминовую кислоту на глицин, приводит к потере АДФ-рибозилтрансферазной активности нативного токсина. Была выяснена структурная основа CRM₁₉₇, лишенная токсичности, которая широко используется в качестве белка-носителя для конъюгатных вакцин. CRM₁₉₇, подобно дифтерийному токсину, представляет собой одну полипептидную цепь из 535 аминокислот (58,4 кДа), состоящую из двух субъединиц (связанных дисульфидными мостиками).

CRM₁₉₇ используется в качестве белка-носителя в ряде одобренных к применению конъюгатных вакцин, таких как конъюгат *Haemophilus influenzae* типа b, продаваемый под торговым наименованием Hibtiter TM, 13-валентный пневмококковый полисахаридный конъюгат, продаваемый под торговым наименованием PREVNAR 13® и т.п.

Ruth M. Drew et al., *Bacteriol.* 1951 Nov; 62 (5):549-59; описали среду с определенным химическим составом, подходящую для производства дифтерийного токсина с высоким титром, и определили потребности в аминокислотах *Corynebacterium diphtheriae*, штамма Toronto Park-Williams № 8. Среда содержит аминокислоты, которые эффективно заменяют компонент животного происхождения, т.е. гидролизат казеина. Аминокислоты включают глутаминовую кислоту, цистин, пролин, триптофан, лейцин, валин, метионин и глицин.

Rappuoli et al; *Applied and Environmental Microbiology* 1983, Vol. 46 (3):560-564 отмечают, что не-тандемные двойные лизогены являются стабильными и способны обеспечивать высокие выходы CRM₁₉₇, до трех раз превышающие выход, обеспечиваемый монолизогенами.

R Fass. et al., *Applied Microbiology and Biotechnology*; April 1995, Volume 43(1):83-88, описывают подход, обеспечивающий рост в условиях высокой плотности с целью получения мутированного дифтерийного токсина из двух штаммов *Corynebacterium diphtheriae*: C7 (β) (tox-201, tox-9) и C7 (β) (tox-107). Процедура включает использование модифицированной необезжелезненной среды, которая обеспечивает быстрый и высокоплотный рост бактерий и которая, в случае одновременного истощения глюкозы и железа, способствует увеличению выработки токсинов. Для обеспечения роста бактерий до плотности клеток с величиной поглощения 70 при 600 нм (15-20 г/л сухого веса) подавали обогащенный кислородом воздух. Максимальная концентрация токсина в культуральном супернатанте составляла 150 мг/л.

Parag P. Nagarkar et al., *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92, 215-220; описывают схему использования аминокислот во время роста дифтерии *Corynebacterium* и показывают, что только четыре из девяти протестированных аминокислот, а именно цистин, гистидин, аспарат и метионин, являются критическими для роста дифтерии *Corynebacterium* и выработки ею токсинов.

В европейском патенте № 1849860 B1 раскрыто использование белкового материала неживотного происхождения, такого как белки из соевых бобов, семян хлопчатника, картофеля и т.д., в качестве питательной среды для культивирования патогенных бактерий.

В патенте США № 6962803 B2 раскрыт способ очистки дифтерийного токсина путем ферментации штамма микроорганизма, способного продуцировать дифтерийный токсин, причем указанный способ включает добавление глюкозы в растущую культуру, и такое добавление глюкозы поддерживает рост микроорганизмов на уровне, эффективном для продуцирования дифтерийного токсина. Также указано, что помимо источника углерода существуют другие минимальные требования к питательным веществам, необходимым для роста, которые включают металлические микроэлементы, фосфат, источник азота, обычно казиминокислоты и дрожжевой экстракт.

В публикации заявки на патент США № 2011/0097359 A1 раскрыта среда для культивирования штамма *Corynebacterium diphtheriae* для производства дифтерийного токсина или его аналога, причем среда по существу не содержит продуктов животного происхождения и содержит воду; источник углеводов; источник азота; и количество свободных аминокислот в исходной концентрации, при этом исходная концентрация каждой свободной аминокислоты не ограничивает уровень продуцирования дифтерийного токсина или его аналога. Также указано, что источник углеводов не содержит глюкозы.

В WO 2006/100108 A1 раскрыт ферментативный процесс, включающий этап выращивания штамма *Corynebacterium diphtheriae* в среде внутри ферментера в условиях перемешивания, достаточных для поддержания гомогенной культуры и ограниченной аэрации, такой что pO₂ в культуре падает до менее чем 4% в течение большей части этапа ферментации. Далее раскрыто, что за счет степени аэрации pH внутри ферментера поддерживается на уровне от 7,0 до 7,8, без необходимости добавления кислоты или основания.

Процесс получения CRM₁₉₇ обычно чувствителен к небольшим изменениям компонентов процесса, а также параметров процесса. Во всем мире CRM₁₉₇ получают из *Corynebacterium diphtheriae*, хотя коммерческий успех такого производства ограничен. Ни в одном из указанных выше документов не раскрыт

способ производства CRM₁₉₇ с высоким выходом, например >150 мг/л, с использованием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria*. Авторы настоящего изобретения разработали модель метаболического потока для крупномасштабного производства CRM₁₉₇ с использованием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria*.

Задача изобретения

Главная задача настоящего изобретения состоит в предоставлении улучшенного способа крупномасштабного производства CRM₁₉₇.

Другой целью настоящего изобретения является предоставление улучшенного способа крупномасштабного производства CRM₁₉₇, который является экономически эффективным и может использоваться для производства конъюгатных вакцин.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает улучшенный способ производства CRM₁₉₇ с высоким выходом путем использования генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇, включающий выращивание штамма в ферментативной среде, содержащей одну или более аминокислот и не содержащей компонентов животного происхождения.

Настоящее изобретение обеспечивает улучшенный способ производства CRM₁₉₇, который включает культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами.

Настоящее изобретение также обеспечивает улучшенный способ производства CRM₁₉₇, который включает культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана конструкция плазмиды, обозначенной как pBE33.

Фиг. 2 представляет собой блок-схему модели метаболического потока.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к улучшенному способу крупномасштабного производства CRM₁₉₇ с использованием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇, включающему выращивание штамма в ферментативной среде, содержащей более 10 аминокислот и не содержащей компоненты животного происхождения.

Генно-модифицированный штамм *Corynebacterium diphtheriae* (C7Ep) по настоящему изобретению относится к *Corynebacterium diphtheriae*, содержащему в форме эписом многочисленные копии гена CRM₁₉₇, регулируемые тем же механизмом, что и ген CRM₁₉₇ хозяина, а фоновым генотипом указанного штамма является одиночный лизоген.

Аминокислоты, используемые в настоящем изобретении, выбирают из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамин, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, валина и их солей, причем каждую аминокислоту используют в количестве примерно от 0,05 до 2 г/л.

Изучено влияние аминокислот, витаминов и условий процесса продуцирования CRM₁₉₇. Было обнаружено, что некоторые аминокислоты оказывают негативное влияние на рост бактерий. Однако установлено, что продуцирование CRM₁₉₇ увеличивается, если в оптимальной концентрации используется более 10 аминокислот. Концентрация аминокислот была оптимизирована в экспериментах на основе плана Плакетта-Бермана (Plackett Burman).

План Плакетта-Бермана представляет собой план проведения экспериментов по изучению зависимости некоторого измеряемого количества от нескольких независимых переменных (факторов) для минимизации дисперсию оценок этих зависимостей, используя ограниченное количество экспериментов. Результаты показали, что аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, валин при температуре от 35 до 36°C оказывают положительное влияние на синтез CRM₁₉₇, а аминокислоты, такие как аланин, изолейцин, валин и при температуре от 35 до 36°C оказывают негативное влияние на синтез CRM₁₉₇. Для достижения крупномасштабного производства CRM₁₉₇ выполняли несколько уровней плана экспериментов при различных концентрациях. Использование тирозина и аспарагина приводило к снижению общего выхода CRM₁₉₇, и, следовательно, эти аминокислоты не являются частью изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ферментативная среда содержит комбинацию фенилаланина, аргинина и одной или более других аминокислот, причем количество используемых фенилаланина и аргинина составляет примерно менее чем 1 г/л.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ферментативная среда содержит комбинацию фенилаланина, аргинина и одной или более других аминокислот, причем фенилаланин находится в количестве от примерно 0,25 до 0,75 г/л, а аргинин - от примерно 0,1 до 0,5 г/л.

В настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇ с использо-

ванием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇, включающий выращивание штамма в ферментативной среде, содержащей более 10 аминокислот, дополнение среды витаминами в диапазоне от примерно 0,05 до 20 мг на литр, причем среда не содержит компонентов животного происхождения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения аминокислоты, витамины, микроэлементы и т.п. добавляют в ферментативную среду в качестве питательных веществ во время культивирования.

Различные питательные вещества, используемые в настоящем изобретении в качестве добавок, включают витамины, выбранные из никотиновой кислоты, тиамин, пантотеновой кислоты, биотина, рибофлавина, фолиевой кислоты; пимелиновой кислоты; фосфата, источника азота и металлических микроэлементов, и т.п., и каждый витамин используется в количестве от примерно 0,05 до 20 мг на литр.

Ферментативная среда, используемая в настоящем изобретении, является обезжелезненной средой и совсем не содержит компонентов животного происхождения. Кроме того, указанная среда также не содержит традиционных сред Леффлера на основе мяса и обезжелезненных сред YC с низким содержанием железа на основе казаминовой кислоты. Компоненты ферментативной среды по настоящему изобретению включают дрожжевой экстракт (YC), растительный пептон, калия дигидрофосфат (KН₂РO₄), триптофан, глюкозу, раствор YC с солями микроэлементов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения состав среды для культивирования генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ включает базовую ферментативную среду, содержащую дрожжевой экстракт, растительный пептон, калия дигидрофосфат (KН₂РO₄), триптофан, глюкозу, раствор YC с солями микроэлементов; одну или более аминокислот, витамины, микроэлементы и т.п.

Подходящие металлические микроэлементы включают калий, магний, кальций, хлорид, холин, медь, марганец, сульфат, цинк и т.п.

В настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇ с использованием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇, включающий добавление в ферментативную среду питательных веществ на основе модели метаболического потока.

Модель метаболического потока относится ко всей сети теплообмена, массопереноса, скорости переноса кислорода (OTR), скорости поглощения кислорода (OUR) и кинетики переноса ионов, где OTR поддерживается за счет перемешивания, обратного избыточного давления и закачивания чистого кислорода. Эта модель показана на фиг 2.

Разработка модели метаболических потоков.

Эта модель создана на основе интерпретации онлайн данных о накоплении в процессе ионов водорода, в качестве основной переменной, с последующей конверсией растворенного кислорода в CO₂, что сопровождается выделением тепла в указанном процессе. Например, модель работает в условиях ограничения источника углерода. Источник углерода подают порциями, и в процессе оценивают ответ. Исходя из ответа, корректируют образование ионов водорода. Затем оптимизируют питательные вещества для получения постоянного значения pH, растворенного кислорода (DO) и скорости теплопередачи (например, для pH 7,4; остаточного DO >2-20; скорости теплопередачи HTR).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ включает добавление в среду глюкозы в течение всего процесса ферментации.

Настоящее изобретение не включает использование мальтозы в качестве источника углерода и этап обезжелезивания.

CRM₁₉₇, полученный в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать для изготовления конъюгатных вакцин, таких как пневмококковый конъюгат, тифозный конъюгат, Hib-конъюгат и т.п.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, включающий культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока, при этом аминокислоты выбирают из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глютаминовой кислоты, глютамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, валина и их солей.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, включающий культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, причем каждую аминокислоту используют в количестве от примерно 0,05 до 2 г/л.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, включающий культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacte-*

gium diphtheria с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока, причем каждую аминокислоту используют в количестве от примерно 0,05 до 2 г/л.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, включающий культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей базовую среду, более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока, причем каждую аминокислоту используют в количестве от примерно 0,05 до 2 г/л.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, который включает культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока, причем аминокислоты выбирают из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, валина и их солей, причем каждую аминокислоту используют в количестве от примерно 0,05 до 2 г/л.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, включающий культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, причем аминокислоты выбирают из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, валина и их солей, причем каждую аминокислоту используют в количестве от примерно 0,05 до 2 г/л.

В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, включающий

i) культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментационной среде без компонентов животного происхождения, содержащей базовую среду и более 10 аминокислот, выбранных из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, валина и их солей, и

ii) дополнение среды глюкозой и питательными веществами, основывающееся на модели метаболического потока.

В другом варианте осуществления во время ферментативного процесса температуру поддерживают в диапазоне от 30 до 40°C, а pH поддерживают на уровне от 7,0 до 8,0, предпочтительно от 7,4 до 7,6, используя 20% ортофосфорную кислоту и 12,5% гидроксид аммония. Ферментативный процесс длится от 15 до 24 ч, предпочтительно от 16 до 20 ч.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к композиции и способу ферментации, в которых отсутствуют тирозин и аспарагин. В одном из вариантов осуществления способ по настоящему изобретению не содержит обезжелезненную среду YC с низким содержанием железа на основе казामीновой кислоты, мальтозу в качестве источника углерода и этап обезжелезивания.

В настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, который включает культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащую комбинацию фенилаланина и аргинина в количестве примерно менее 1 г/л и одну или более других аминокислот.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇, который включает культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока, где выход полученного CRM₁₉₇ составляет более 150 мг/л.

В одном из вариантов настоящее изобретение обеспечивает возможность изготовления конъюгатной вакцины, включающего конъюгирование полисахаридов из *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *meningococcus*, *Haemophilus influenzae* с CRM₁₉₇, полученным в соответствии с настоящим изобретением.

В настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇ с высоким выходом с использованием генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇, включающий выращивание штамма в среде без компонентов животного происхождения, содержащей более 10 аминокислот, и дополнение среды питательными веществами на основе модели метаболического потока.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении предоставляется улучшенный способ производства CRM₁₉₇ с выходами, такими как 150 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л, 500 мг/л, 1 г/л, 1,5 г/л, 2 г/л, 2,5 г/л, 3 г/л, 3,5 г/л, 4 г/л, 4,5 г/л и 5 г/л.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к генно-модифицированному штамму *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β 197), в который методом электропорации переносят плазмиду pBE33.

Количественную оценку CRM₁₉₇, полученного в соответствии с настоящим изобретением, выполняют с помощью ферментно-связанного иммуно-сорбентного анализа (IC-ELISA).

Разработка генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheriae* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в плазмидном векторе экспрессии.

Corynebacterium diphtheriae C7 (β-197) ATCC 53821, ген, кодирующий CRM₁₉₇, существует в виде единственной копии, а секреция мутантного белка CRM₁₉₇ в культуральную среду находится под контролем железа. Выход CRM₁₉₇ увеличивается в три раза, если использовать штамм *Corynebacterium diphtheriae* C7, содержащего две копии коринефага-бета (ATCC 39255). Это позволяет предположить, что количество копий гена связано с увеличенной продуктивностью. Для достижения промышленных масштабов производства CRM₁₉₇ с помощью *Corynebacterium diphtheriae* желательнее повысить уровень экспрессии. Интеграция большего количества копий в бактериальный геном технически сложна. Интегранты с большим количеством копий фага генетически нестабильны и теряют дополнительные копии гена CRM. Авторы настоящего изобретения намеревались повысить уровни экспрессии CRM₁₉₇ путем увеличения копий гена CRM₁₉₇, доставляемых на плаزمиде, которые наряду с нативными регуляторными элементами CRM₁₉₇ содержат селективный маркер устойчивости к антибиотику. Соответственно, авторы изобретения разработали штамм *Corynebacterium diphtheriae* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ и оценили стабильность этого штамма. Модифицированный штамм имел более высокие уровни экспрессии CRM₁₉₇ по сравнению с немодифицированными штаммами *Corynebacterium*.

Настоящее изобретение более конкретно проиллюстрировано со ссылкой на приведенные ниже примеры. Однако следует понимать, что настоящее изобретение никоим образом не ограничено этими примерами, и включает их вариации в пределах параметров, раскрытых в настоящем описании, как известно специалистам в данной области техники.

Пример 1. Улучшение экспрессии CRM₁₉₇ за счет эписомальной копии CRM₁₉₇.

Получали вектор, который может стабильно реплицироваться в *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β-197). Выделение нативной плазмиды из дифтерии *Corynebacterium* C7 выполняли согласно протоколу выделения крупной плазмиды, описанному в T.C Currier et al., Anal Biochem. 1976; 76 (2):431441. Используя препарат нативной плазмидной ДНК амплифицировали участок инициации репликации 1,87Kb (oriR). Одновременно амплифицировали последовательность kanR 1,033Kb, используя матричную ДНК pUC4-KIXX, и тупой конец лигировали с oriR с образованием pBE30. Кроме того, из геномной ДНК *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β-197) амплифицировали последовательность гена CRM₁₉₇ размером 2.13 Kb, содержащую промоторную область pTox (Boyd et al., 1988), sru и предсказанную терминаторную последовательность, и клонировали в уникальный сайт рестрикции SpeI, сконструированный в pBE30. Мутацию GAG в этом ампликоне подтверждали с помощью аллель-специфического анализа ПЦР (Pushnova et al., Analytical Biochemistry. 1998; 260:24-29) и секвенирования ДНК. Полученную таким образом плазмиду назвали pBE33 (фиг. 1).

Плазмиду pBE33 переносили методом электропорации согласно процедурам, оптимизированным для *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β-197). Трансформированные колонии *Corynebacterium diphtheriae* C7 (β-197) (pBE33) подтверждали ПЦР-скринингом специфических колоний и выделением плазмиды и рестрикционным расщеплением. Экспрессию CRM₁₉₇ в колониях анализировали с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттингом. CRM₁₉₇ в среде количественно определяли методом ИФА и ВЭЖХ и представляли в виде концентрации CRM₁₉₇, выраженной на литр культуральной среды.

Пример 2. Продуцирование CRM₁₉₇ генно-модифицированным штаммом *Corynebacterium diphtheriae* C7Er в базовой среде без компонентов животного происхождения.

В этом процессе использовали штамм *Corynebacterium diphtheriae* C7Er. Инокулят получали во встряхиваемой колбе методом двухэтапного культивирования. Среда для культивирования во встряхиваемой колбе содержала 10 г/л дрожжевого экстракта (YE), 15 г/л растительного пептона, 4,3 г/л K₂HPO₄, 50 мг/л триптофана, 4,0 г/л глюкозы, 0,8 мг/л никотиновой кислоты, 0,08 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л CuSO₄·5H₂O, 12,5 мг/л ZnSO₄·5H₂O, 6,25 мг/л MnCl₂·4H₂O, 0,5 г/л цистина, 25 мг/л канамицина и 4,0 г/л глюкозы.

Для запуска процесса в среду ферментера объемом 20 л добавляли 5% инокулята. Среда для культивирования ферментера содержала 15 г/л YE, 30 г/л растительного пептона, 4,3 г/л K₂HPO₄, 50 мг/л триптофана, 0,8 мг/л никотиновой кислоты, 0,08 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л CuSO₄·5H₂O, 12,5 мг/л ZnSO₄·5H₂O, 6,25 мг/л MnCl₂·4H₂O, 0,5 г/л цистина, 25 мг/л канамицина, 4,0 г/л глюкозы.

Всю партию культуры перемешивали при 300 об/мин. Температуру поддерживали на уровне 35°C, а pH поддерживали на уровне 7,4, используя 20% ортофосфорную кислоту и 5 н NaOH. Культуру аэри-

ровали потоком 1,0 об/об/мин воздуха. Культуру обогащали кислородом для поддержания растворенного кислорода (DO) на уровне 20%. После первых нескольких часов уровень DO продолжал падать ниже 20%, когда был достигнут предел обогащения O₂. Уровень DO в остальной части партии оставался близким к нулю и повышался в последние часы. Когда уровень остаточной глюкозы в бульоне падал ниже 0,5 г/л, вводили подпитку, содержащую 40% глюкозы, со скоростью 2 г/л/час. Партию собирали через 14 ч культивирования при достижении плотности клеток, равной примерно 90 единиц оптической плотности при 600 нм. Пену в реакторе контролировали, используя 30% органический пеногаситель. Продукция CRM₁₉₇ достигала титра от 60 до 65 мг/л ферментативного бульона.

Ферментация, проводимая в сходных условиях с использованием немодифицированного штамма *Corynebacterium diphtheriae* C7 CRM₁₉₇, давала примерно 35-40 мг/л CRM₁₉₇, что ниже выхода, наблюдаемого в случае генно-модифицированного штамма. Это показывает влияние дополнительных копий гена на увеличение продуцирования CRM₁₉₇.

Пример 3. Продуцирование CRM₁₉₇ генно-инженерным штаммом *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep в базовой среде без компонентов животного происхождения с использованием модели баланса метаболического потока.

В этом процессе использовали штамм *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep. Инокулят получали во встряхиваемой колбе методом двухэтапного культивирования. Среда для культивирования во встряхиваемой колбе содержала 10 г/л YE, 15 г/л растительного пептона, 4,3 г/л KН₂РO₄, 50 мг/л триптофана, 4,0 г/л глюкозы, 0,8 мг/л никотиновой кислоты, 0,08 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л CuSO₄·5H₂O, 12,5 мг/л ZnSO₄·5H₂O, 6,25 мг/л MnCl₂·4H₂O, 0,5 г/л цистина, 25 мг/л канамицина, 4,0 г/л глюкозы.

Для запуска процесса в среду ферментера объемом 20 л добавляли 5% инокулята. Среда для культивирования ферментера содержала 15 г/л YE, 30 г/л растительного пептона, 4,3 г/л KН₂РO₄, 50 мг/л триптофана, 0,8 мг/л никотиновой кислоты, 0,08 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л CuSO₄·5H₂O, 12,5 мг/л ZnSO₄·5H₂O, 6,25 мг/л MnCl₂·4H₂O, 0,5 г/л цистина, 25 мг/л канамицина и 4,0 г/л глюкозы.

Всю партию культуры перемешивали при 300 об/мин. Температуру поддерживали на уровне 35°C, а pH поддерживали на уровне 7,4 с использованием 20% ортофосфорной кислоты и 12,5% гидроксида аммония. Культуру аэрировали потоком воздуха 1,0 об/об/мин. Культуру обогащали кислородом для поддержания DO на уровне 20%. Вводили модель, которая отслеживала уровень метаболической конверсии в заданный момент времени, эта модель брала данные из онлайн-параметра остаточного DO в соответствии с изменениями с учетом pH, CO₂, тепловыделения. В лог-фазе уровни DO продолжали падать ниже 20%, несмотря на достижение предела обогащения O₂. Уровень DO в остальной части партии оставался близким к нулю и повышался в последние часы. Когда уровень остаточной глюкозы в бульоне падал ниже 0,5 г/л, вводили подпитку, содержащую 40% глюкозы, для соответствия модели метаболического потока. Партию собирали через 14 ч культивирования при достижении плотности клеток, равной примерно 90 единиц оптической плотности при 600 нм. Пену в реакторе контролировали, используя 30% органический пеногаситель. Продукция CRM₁₉₇ достигала титра 150 мг/л ферментативного бульона.

Пример 4. Продуцирование CRM₁₉₇ согласно настоящему изобретению.

Инокулят получали методом трехэтапного культивирования. Первые два этапа выполняли во встряхиваемых колбах. Среда для культивирования во встряхиваемых колбах содержала 10 г/л YE, 15 г/л растительного пептона, 4,3 г/л KН₂РO₄, 50 мг/л триптофана, 4,0 г/л глюкозы, 2 мл/л раствора YC с солями микроэлементов, 1 мл/л цистиновой добавки, 25 мг/л канамицина, 4,0 г/л глюкозы.

Состав базовой среды для посева ферментера был следующим: 15 г/л YE, 30 г/л растительного пептона, 4,3 г/л KН₂РO₄, 50 мг/л триптофана, 0,8 мг/л никотиновой кислоты, 0,08 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л CuSO₄·5H₂O, 12,5 мг/л ZnSO₄·5H₂O, 6,25 мг/л MnCl₂·4H₂O, 0,5 г/л цистина, 25 мг/л канамицина, 4,0 г/л глюкозы.

Ниже приведен состав среды в ферментере (табл. I) и ингредиенты, который был разработан в соответствии с планом Плаккета-Бермана.

Таблица I

№	Компоненты среды	Кол-во	Единицы	№	Компоненты среды	Кол-во	Единицы
1	Аланин	0,1	г/л	18	Валин	1	г/л
2	Аргинин	0,1	г/л	19	Калий	2	г/л
3	Аспарагиновая кислота	0,5	г/л	20	Магний	1	г/л
4	Цистеин	0,5	г/л	21	Тиамин	0,1	мг/л
5	Глутаминовая кислота	1	г/л	22	Биотин	4	мг/л
6	Глутамат	0,1	г/л	23	Кальций	2	мг/л
7	Глицин	0,5	г/л	24	Хлорид	0,5	мг/л
8	Гистидин	1	г/л	25	Холин	0,1	мг/л
9	Изолейцин	1	г/л	26	Медь	10	мг/л
10	Лейцин	0,5	г/л	27	Фолиевая кислота	1,6	мг/л
11	Лизин	0,1	г/л	28	Марганец	1	мг/л
12	Метионин	1	г/л	29	Никотинаминовая кислота	100	мг/л
13	Фенилаланин	0,5	г/л	30	Пантотеновая кислота	50	мг/л
14	Пролин	0,1	г/л	31	Пимелиновая кислота	20	мг/л
15	Серин	0,1	г/л	32	Рибофлавин	50	мг/л
16	Треонин	0,1	г/л	33	Сульфат	20	мг/л
17	Триптофан	0,1	г/л	34	Цинк	7	мг/л

В ферментер объемом 20 л с указанными выше компонентами в базовой среде (15 г/л YE, 30 г/л растительного пептона, 4,3 г/л KH_2PO_4 , 50 мг/л триптофана, 0,8 мг/л никотиновой кислоты, 0,08 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 12,5 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ мг/л, 6,25 мг/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г/л цистина, 25 мг/л канамицина, 4,0 г/л глюкозы) добавляли 5% инокулята из посевного ферментера для запуска процесса. Температуру поддерживали на уровне 35°C, и pH поддерживали на уровне 7,4-7,6 с использованием 20% ортофосфорной кислоты, 12,5% гидроксида аммония, и используя модель, основанную на модуляции метаболического потока (фиг. 2) подачи глюкозы и OTR.

Культуру аэрировали потоком воздуха 1,0 об/об/мин. Культуру обогащали кислородом для поддержания DO на уровне 20%. В лог-фазе уровни DO продолжали падать ниже 20%, несмотря на достижение предела обогащения O_2 . Уровень DO в остальной части партии оставался близким к нулю и повышался в последние часы. Когда остаточная глюкоза в бульоне падала ниже 0,5 г/л, подавали 40% раствор глюкозы со скоростью 4,5 г/л/час. Периодически добавляли витамины и микроэлементы в следующих количествах: 6,425 мг/л никотиновой кислоты, 0,465 мг/л пимелиновой кислоты, 25 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 12,5 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6,25 мг/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08 мг/л тиамина, 0,25 мг/л пантотеновой кислоты, 0,006 мг/л биотина, 0,3 мг/л рибофлавина, 0,06 мг/л фолиевой кислоты. Партию собирали через 18 часов культивирования при достижении плотности клеток примерно 132 единиц OD при 600 нм. Пену в реакторе контролировали, используя 30% органический пеногаситель. Продукция CRM₁₉₇ достигла титра 450-500 мг/л ферментативного бульона.

Пример 5. Сравнение выходов CRM₁₉₇ при использовании нативного *Corynebacterium diphtheriae* C7 и генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheriae* C7Ep.

Ферментацию выполняли в базовой среде без компонентов животного происхождения, используя ранее полученные улучшения процесса на основе модели, и среды и способы в соответствии с настоящим изобретением с использованием нативного штамма *Corynebacterium diphtheria* C7 и генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria*.

Для оптимизации процесса использовали один лизогенный штамм *Corynebacterium diphtheriae* C7 и генно-модифицированный штамм с эпизодически размещенными дополнительными копиями гена CRM₁₉₇ (C7Ep). В типичной необезжелезненной среде YC, содержащей компоненты животного происхождения, C7 давал от 22 до 25 мг/л CRM₁₉₇, тогда как C7Ep давал от 40 до 45 мг/л. Когда среда была модифицирована путем замены компонентов животного происхождения растительным пептоном, штамм C7

давал от 40 до 45 мг/л CRM₁₉₇, в то время как С7Ер давал 65 мг/л CRM₁₉₇. При изменении условий процесса путем изменения параметров штамм С7Ер продуцировал от 120 до 150 мг/л CRM₁₉₇. Модель была разработана с использованием исходных данных базового процесса. Окончательный результат оптимизированного метода обеспечил выход 120 мг/л CRM₁₉₇ у С7 и >500 мг/л CRM₁₉₇ у С7Ер. Сравнение результатов приведено в табл. II.

Таблица II

Сравнение выхода, полученного при использовании нативного штамма С7 - *Corynebacterium diphtheriae*, с выходом, полученным при использовании эписомально модифицированного С7Ер, при различных условиях процесса

№	Организм	Выходы CRM ₁₉₇ в мг/л согласно результатам ИФА		
		Базовая среда без компонентов животного происхождения	Улучшения, полученные в предыдущих моделях	Среда и процесс по настоящему изобретению
1	<i>Corynebacterium</i> С7 (нативный)	20 –25	35–40	110–120
2	<i>Corynebacterium</i> С7 Ер (с дополнительными копиями гена, введенными в форме эписом)	60–65	120–150	> 500

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продуцирования CRM₁₉₇, включающий выращивание штамма генно-модифицированного *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в необезжелезненной ферментативной среде без компонентов животного происхождения и, содержащей 10 или более аминокислот, где аминокислоты не являются тирозином или аспарагином, и где необезжелезненная ферментативная среда не содержит мальтозу.

2. Способ по п.1, включающий добавление в ферментативную среду питательных веществ.

3. Способ по п.2, в котором добавление в ферментативную среду питательных веществ осуществляется с использованием метаболического потока.

4. Способ по п.1, в котором 10 или более аминокислот выбирают из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глютаминовой кислоты, глютамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана и валина.

5. Способ по п.4, в котором 10 или более аминокислот присутствуют в необезжелезненной ферментативной среде в количестве от 0,05 до 2 г/л.

6. Способ по п.1, в котором необезжелезненная ферментативная среда содержит фенилаланин и аргинин в количестве менее чем 1 г/л.

7. Способ по п.2, в котором питательные вещества выбирают из группы, состоящей из никотиновой кислоты, тиамин, пантотеновой кислоты, биотина, рибофлавина, фолиевой кислоты, пимелиновой кислоты, фосфата, источника азота и металлических микроэлементов.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором состав необезжелезненной ферментативной среды включает базовую ферментативную среду, которая содержит дрожжевой экстракт (УС), растительный пептон, дигидрофосфат калия (КН₂РO₄), триптофан, глюкозу и раствор УС с солями микроэлементов.

9. Способ по п.1, дополнительно включающий добавление в необезжелезненную ферментативную среду глюкозы.

10. Способ продуцирования CRM₁₉₇, включающий:

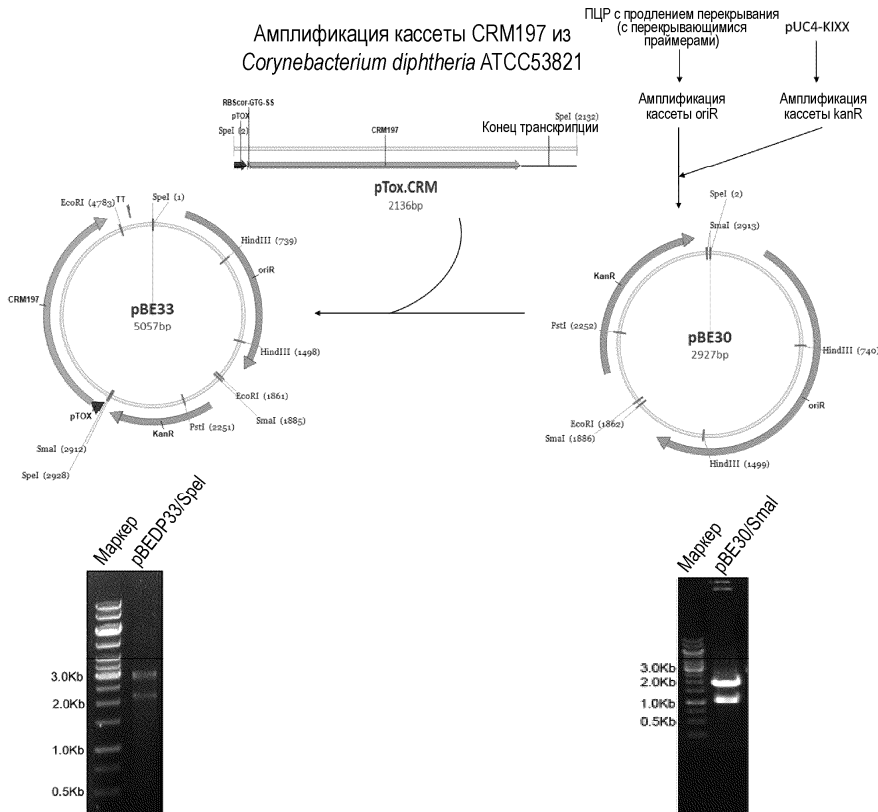
i) культивирование генно-модифицированного штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в необезжелезненной ферментативной среде, содержащей базовую среду и 10 или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глютаминовой кислоты, глютамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана и валина, и

ii) добавление в необезжелезненную ферментативную среду глюкозы и питательных веществ с использованием метаболического потока, где необезжелезненная ферментативная среда не содержит мальтозу.

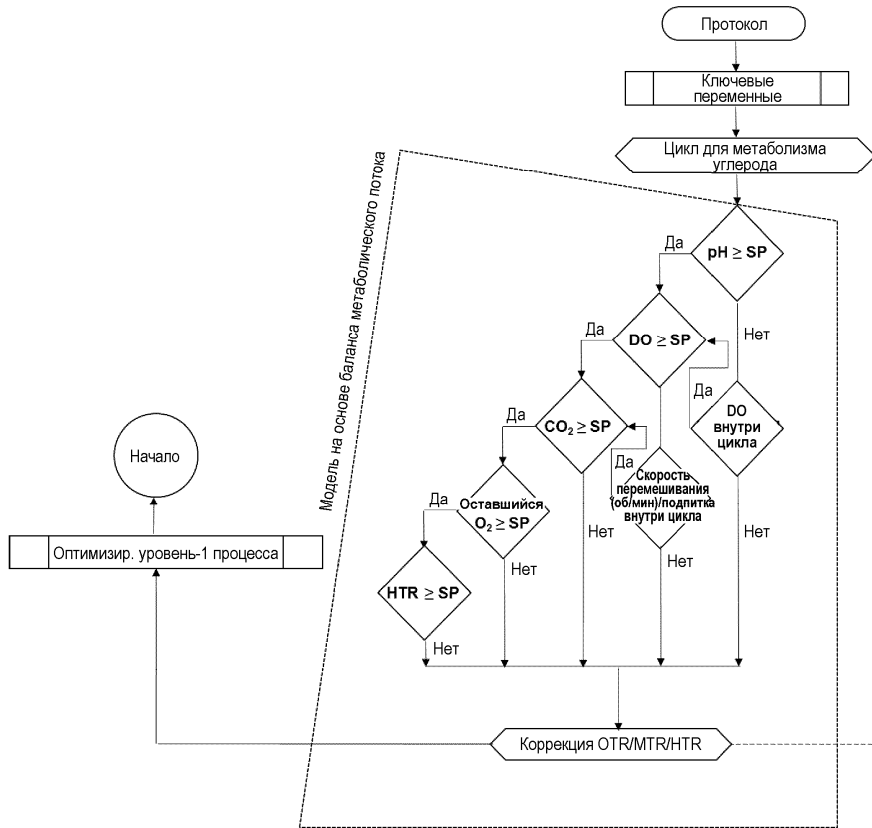
11. Способ продуцирования CRM₁₉₇, включающий культивирование штамма *Corynebacterium diphtheria* с увеличенным количеством копий гена CRM₁₉₇ в необезжелезненной ферментативной среде без компонентов животного происхождения, содержащей 10 или более аминокислот, и дополнение необезжелезненной ферментативной средой с питательными веществами с использованием метаболического потока, причем каждая из 10 или более аминокислот присутствует в необезжелезненной ферментативной среде в количестве от примерно 0,05 до 2 г/л, где аминокислоты не являются тирозином или аспарагином, и где необезжелезненная ферментативная среда не содержит мальтозу.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором способ осуществляют при температуре от 30 до 40°C и при pH в диапазоне от 7,0 до 8,0.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором способом продуцируют от 50 мг/л до 150 мг/л, 200 мг/л, 300 мг/л, 500 мг/л, 1 г/л, 1,5 г/л, 2 г/л, 2,5 г/л, 3 г/л, 3,5 г/л, 4 г/л, 4, 5 г/л, 5 г/л CRM₁₉₇.



Фиг. 1



Фиг. 2

