(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104822826 B
(45)授权公告日 2019.04.30

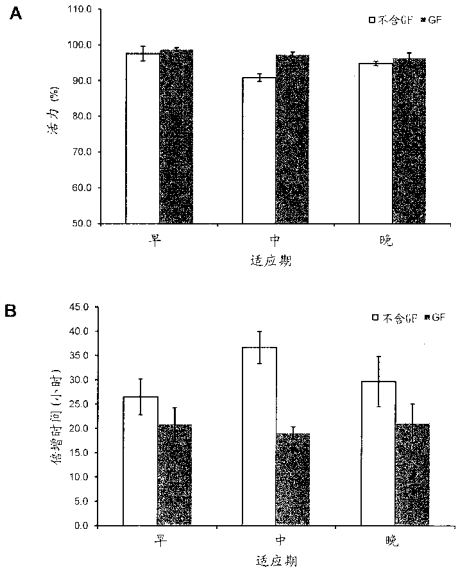
(21)申请号 201380064761.7
(22)申请日 2013.10.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104822826 A
(43)申请公布日 2015.08.05
(30)优先权数据
61/713,812 2012.10.15 US
61/888,647 2013.10.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/064758 2013.10.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/062535 EN 2014.04.24
(73)专利权人 百时美施贵宝公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 田军 M.博里斯 李正剑 N.阿布亚布西 区玉翠 钱南新 戴晓萍
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李慧惠 杨思捷
(51)Int.Cl.
C12N 5/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
(56)对比文件
Jong Kwang Hong,et al.Growth factor withdrawal in combination with sodium butyrate addition extends culture longevity and enhances antibody production in CHO cells.《Journal of Biotechnology》.2011,第155卷225－231.
审查员 徐丹
权利要求书1页 说明书18页 附图16页

(54)发明名称

用于蛋白产生的哺乳动物细胞培养过程

(57)摘要

本发明描述由动物细胞或哺乳动物细胞培养物产生蛋白的方法和过程。在一个方面,所述方法包括在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中生长细胞。在另一个方面,所述方法包括在生产期过程中添加生长因子。所述方法维持培养细胞的高活力,并且可以产生增加终末滴度的蛋白产物和高品质的蛋白产物。



CN 104822826 B

1.在CHO细胞的细胞培养生产期过程中减少目标蛋白聚集的方法,其包括:

a) 使表达所述目标蛋白的CHO细胞适应不含生长因子、蛋白和肽的培养基;和

b) 将已适应的CHO细胞在不含生长因子、蛋白和肽的培养基中培养。

2.权利要求1的方法,其中所述目标蛋白是可溶性aCD40L蛋白。

用于蛋白产生的哺乳动物细胞培养过程

发明领域

[0001] 本发明涉及用于培养哺乳动物细胞的新过程，所述哺乳动物细胞产生蛋白产物。所述细胞培养过程的进行导致高细胞活力和/或细胞密度，并且也可以导致高产物品质和生产率。

[0002] 发明背景

[0003] 优选使用动物细胞培养，尤其是哺乳动物细胞培养用于表达用于治疗性和/或预防性应用的重组产生的蛋白。

[0004] 通常，在基于哺乳动物细胞培养的系统中的蛋白表达水平显著低于微生物表达系统(例如细菌或酵母表达系统)。然而，细菌和酵母细胞的以下能力有限：最佳表达高分子量蛋白产物、正确折叠具有复杂立体结构的蛋白、和/或提供成熟所表达糖蛋白必需的翻译后修饰，由此影响产物的免疫原性和清除率。

[0005] 由于培养动物或哺乳动物细胞，特别是产生重组产物的动物或哺乳动物细胞的限制，已研究了多种参数的操作，包括采用大规模培养容器；改变基本培养条件，诸如孵育温度、溶解氧浓度、pH等；使用不同类型的培养基和对于培养基的添加剂；和增加所培养细胞的密度。此外，用于哺乳动物细胞培养的过程开发会受益于延长运行时间的能力的进步，以增加终产物浓度，同时维持高产物品质。细胞培养过程，特别是非连续性过程的运行时间通常受限于细胞的剩余活力，这通常随着运行过程而下降。因此期望高细胞活力的最大可能延长，同时维持产物品质。蛋白纯化问题(concerns)为最大限度地降低活细胞密度和维持高细胞活力提供了另一个动机。培养物中细胞碎片和死细胞内容物的存在可以对在培养运行结束时分离和/或纯化蛋白产物的能力造成负面影响。通过使细胞在培养中维持活力较长时间段，由此存在细胞蛋白和酶对培养基污染的伴随减少，所述污染可以引起通过细胞产生的期望蛋白的降解和品质的最终降低。

[0006] 已研究多种参数以在细胞培养中达到高细胞活力。一种参数涉及在37℃初始培养后单独降低培养温度(例如，Roessler等人，*Enzyme and Microbial Technology*，18:423-427 (1996)；Etcheverry，T.等人 (1998)的美国专利号5,705,364和5,721,121；Furukawa，K.等人 (1999)的美国专利号 5,976,833；Adamson，L.等人的美国专利号5,851,800；Genentech，Inc.的WO 99/61650和WO 00/65070；Biogen，Inc.的WO 00/36092和Girard等人的美国专利号4,357,422)。

[0007] 所研究的其他参数涉及向培养物中添加组分。发现向CHO 111-10PF细胞系中添加硫酸葡聚糖和聚乙烯硫酸盐(polyvinyl sulfate)相对于对照培养物增加第3天活细胞密度和活力(Zhangi等人，*Biotechnol. Prog.*，16:319-325 (2000))。然而，未报道硫酸葡聚糖或聚乙烯硫酸盐在死亡期过程中的效应。还报道硫酸葡聚糖和聚乙烯硫酸盐在防止细胞聚集方面是有效的。

[0008] 由于其大小、结构复杂性和生物生产的性质，蛋白治疗剂是固有异质的(Chirino等人，*Nat. Biotechnol.*，22:1383-1391 (2004))。甚至在“纯”蛋白溶液中，也存在一定百分比的低分子量片段、高分子量种类和不同程度的化学修饰。高分子量种类的形成通常

是由于蛋白聚集，其是在制造生物制品过程中遇到的常见问题。通常，认为聚集体的存在是不期望的，因为担忧聚集体可以导致免疫原性反应或可以在施用时引起不良事件(Cromwell等人，*AAPS J.*，8:E572-E579 (2006))。尽管一些类型的生物制品聚集体可以正常发挥功能，但维持产物品质的一致性仍然重要，因为产物一致性是监管审批的先决条件。

[0009] 蛋白聚集体可以由于几种机制产生，且可以在制造过程期间的每一阶段发生。在细胞培养中，分泌蛋白可以暴露于不利于蛋白稳定性的条件；但更经常地，由于未折叠蛋白分子的相互作用或通过负责正确折叠的分子伴侣对新生肽链的无效识别，大量蛋白的积累可以导致细胞内聚集(Cromwell等人，*AAPS J.*，8:E572-E579 (2006))。在细胞的内质网(ER)中，新合成蛋白的二硫键在氧化环境中形成。在正常条件下，蛋白巯基可逆地氧化为蛋白二硫化物和次磺酸，但更高氧化态诸如蛋白半胱氨酸的亚磺酸和磺酸形式是不可逆的(Thomas等人，*Exp. Gerontol.*，36:1519-1526 (2001))。过氧化蛋白可以含有不正确的二硫键或具有与其他内腔ER蛋白的混合二硫键；在任一情况下，其导致蛋白不正确的折叠和聚集。因此在ER中维持适当受控的氧化环境是至关重要的。在这点上，Cuozzo等人 (*Nat. Cell Biol.*，1:130-135 (1999)) 首先证实，在酵母中，谷胱甘肽可以针对ER过氧化进行缓冲，且后来由Chakravarthi等人 (*J. Biol. Chem.*，279:39872-39879 (2004))证实，在哺乳动物细胞中，也需要谷胱甘肽来调节进入分泌途径的蛋白内天然二硫键的形成。

[0010] 随着培养物中产物浓度的增加，在细胞培养过程中可以观察到产物品质降低。培养中细胞产生的蛋白的高丰度最佳地伴随蛋白的高品质，所述蛋白最终回收用于预期用途。

[0011] 重组产生的蛋白产物对于用作治疗剂、治疗和预防剂在医学和临床上变得越来越重要。因此，可靠细胞培养过程的开发满足本领域中的期望和所需的目标，所述细胞培养过程经济且有效地达到与高水平的产物品质结合的最终蛋白产物浓度增加。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供通过动物或哺乳动物细胞培养用于产生蛋白的新过程。这些新过程达到增加的活细胞密度、细胞活力、生产率和降低的蛋白聚集。

[0014] 本发明的一个方面涉及在整个培养过程中在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中细胞生长。在这个方面，本发明的细胞培养过程可以有利地达到由经培养的细胞产生的蛋白的增强的比生产率。更具体地，根据本发明，在细胞培养期过程中利用的不含生长因子/蛋白/肽的培养基维持培养物中细胞的高细胞活力，且可以在整个培养运行中提供高数量和品质的所产生产物。同样，根据本发明的一个方面，在培养过程中利用的不含生长因子/蛋白/肽的培养基可以有利地允许延长培养的生产期。在延长的生产期过程中，期望产物的滴度增加；产物品质维持在高水平；蛋白聚集水平维持在较低水平且细胞活力也维持在高水平。此外，与本发明的培养过程有关的延长的生产期允许产物生产超过在标准生产期过程中产生的产物生产。

[0015] 本发明的另一个方面涉及在接种后将一种或多种生长因子添加至不含生长因子/蛋白/肽的细胞培养物。根据本发明，在接种后将一种或多种生长因子添加至不含生长因子/蛋白/肽的细胞培养物维持培养物中的细胞的高细胞活力，并且可以在整个培养运行中提供高数量和品质的所生产产物。在生长因子补料细胞培养的产生阶段过程中，期望产物

的滴度增加;产品品质维持在高水平;蛋白聚集水平维持在较低水平且细胞活力也维持在高水平。

[0016] 在一个具体方面,本发明提供这样的过程(或方法),其中通过在补料培养基中添加胰岛素和/或IGF来降低蛋白聚集水平。根据这个具体方面,添加胰岛素和或IGF维持培养物的高细胞活力,由此产物优选重组产物的滴度增加,并且产物品质维持在高水平。

[0017] 在本发明的一个方面,在接种时或在接种后的初始死亡期开始前、或初始生长期过程中、或初始生长期的后半部分过程中、或初始生长期结束时或约结束的时候,将一种或多种生长因子添加至培养物。根据本发明的这个方面,生长期延长一段时间和/或死亡期的开始延迟一段时间,诸如几天。

[0018] 在阅读本发明的详述和考虑附图(drawings/figures)后将理解本发明的进一步方面、特征和优点。

[0019] 附图(drawings/figures)描述

[0020] 图1A和1B显示使CHO细胞(克隆A)适应在没有生长因子(GF)的培养基中生长。如实施例1中所述,将细胞在有(实心柱;GF)或没有(空心柱;不含GF)生长因子(GF)的培养基中每3或4天传代。在适应的不同阶段的(A)细胞活力和(B)倍增时间。早:第1至4代;中:第5至8代;晚:第9至12代。

[0021] 图2显示克隆B的活细胞密度(VCD)、百分比活力和倍增时间。该研究中使用的CHO细胞系最初从DG44亲本细胞亚克隆并且在不含生长因子/蛋白/肽的基础培养基(不含GF)或具有生长因子(GF)胰岛素的基础培养基中培养,如实施例1中所述。

[0022] 图3显示当在有(INS)和没有胰岛素(INS-F)的情况下生长克隆A细胞时,来自mTOR通路的蛋白的表达/磷酸化的变化,如实施例2中所述。

[0023] 图4A-D显示在具有1mg/L胰岛素的基础培养基中和具有10mg/L胰岛素的补料培养基(INS)或不具有胰岛素的基础或补料培养基(不含INS)中生长的克隆A的活细胞密度(VCD)、百分比活力、aCD40L蛋白滴度、百分比aCD40L单体,如实施例3中所述。

[0024] 图5A-D显示使用克隆A的分批补料培养方法评估的不同龄或群体加倍的不含GF和GF细胞。比较的是因素,包括分批补料培养的峰值活细胞密度(A)、终末活力(B)、均一化的蛋白滴度(C)和均一化的比生产率(D),如实施例3中所述。注:不含GF的细胞维持与GF细胞的那些相比相对稳定的因素。

[0025] 图6A-D显示不含GF培养改善了克隆B的终末活力和蛋白滴度,并且降低了高分子种类。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(GF)的细胞类似的代数。不含GF和含GF的细胞遵循相同过程以分批补料模式培养,如实施例3中所述。使用的基础培养基和补料培养基两者是化学上确定的。对于分批补料培养过程,在第14天的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。在培养结束时(第14天),从不含GF和GF细胞产生的蛋白的(D) 总高分子种类(HMW)。

[0026] 图7A-C显示不含GF的培养改善了克隆C的细胞生长、终末活力和蛋白滴度。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(GF)的细胞类似的代数。不含GF和含GF的细胞遵循相同过程以分批模式培养,如实施例3中所述。用于培养的培养基是化学上确定的。分批培养过程的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。

[0027] 图8A-D显示不含GF的培养改善了克隆D的终末活力，并且降低了高分子种类。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(GF)的细胞类似的代数。不含GF和含GF的细胞遵循相同过程以分批补料模式培养，如实施例3中所述。用于培养的基础培养基和补料培养基是化学上确定的。对于分批补料培养过程，在第14天的(A)峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。在培养结束时(第14天)，从不含GF和GF细胞产生的蛋白的(D) 总高分子种类(HMW)。

[0028] 图9A-D显示反向添加(added back)至不含GF的培养物的GF改善了克隆B的细胞生长、终末活力和蛋白滴度。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(GF)的细胞类似的代数。不含GF和含GF的细胞在有或没有GF的化学上确定的基础和补料培养基中以分批补料模式培养，如实施例4中所述。不含GF:细胞培养基中不存在GF;不含GF+ INS:在具有1 mg/L胰岛素的基础培养基中和具有10 mg/L胰岛素的补料培养基中培养的不含GF的细胞;类似地，不含GF + LR3:基础培养基中的4 μg/L LONG®R3(LR3)和补料培养基中的40 μg/L LR3;GF:基础培养基中的1 mg/L胰岛素和补料培养基中的10 mg/L胰岛素;GF + LR3:基础培养基中的1 mg/L胰岛素和4 μg/L LR3和补料培养基中的10 mg/L胰岛素和40 μg/L LR3。在上述条件下以分批补料模式培养的细胞的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。在培养结束时(第14天)，在指定条件下产生的蛋白的(D) 总高分子种类(HMW)。

[0029] 图10A-C显示反向添加至不含GF的培养物的GF改善了克隆C的细胞生长、终末活力和蛋白滴度。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(GF)的细胞类似的代数。不含GF和含INS的细胞在有或没有GF的化学上确定的基础和补料培养基中以分批补料模式培养，如实施例4中所述。不含GF + INS:在具有1 mg/L胰岛素的基础培养基中和具有10 mg/L胰岛素的补料培养基中培养的不含GF的细胞;类似地，不含GF + INS + LR3:基础培养基中的1 mg/L胰岛素和4 μg/L LR3和补料培养基中的10 mg/L胰岛素和40 μg/L LR3;GF + INS + LR3:在基础培养基中存在1 mg/L胰岛素和4 μg/L LR3和补料培养基中存在10 mg/L胰岛素和40 μg/L LR3的情况下培养的GF细胞。在上述条件下以分批补料模式培养的细胞的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。

[0030] 图11A-C显示反向添加至具有较低GF浓度的培养物的GF改善了克隆C的终末活力，并且维持了细胞生长和蛋白滴度。适应在具有较低胰岛素浓度(0.01 mg/L;低INS)的培养基中生长的细胞在与总是在具有较高胰岛素浓度(1 mg/L;高INS)的相同培养基中培养的细胞类似的代数。使用与实施例4中所述的相同的分批补料过程，低INS细胞在具有0.01 mg/L胰岛素的基础培养基中和具有10 mg/L胰岛素的补料培养基中培养;高INS细胞在具有1 mg/L胰岛素的基础培养基中和具有10 mg/L胰岛素的补料培养基中培养。对于在上述条件下培养的细胞，在第14天的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。

[0031] 图12A-C显示反向添加至不含GF的培养物的GF改善了克隆D的终末活力和蛋白滴度。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(1 mg/L;GF)的细胞类似的代数。不含GF和含GF的细胞在有或没有GF的化学上确定的基础和补料培养基中以分批补料模式培养，如实施例4中所述。不含GF + INS + LR3:没有GF的基础培养

基中和具有10 mg/L胰岛素和40 μg/L LONG®R3 (LR3)的补料培养基中培养的不含GF的细胞;类似地,GF + INS + LR3:在基础培养基中存在1 mg/L胰岛素和补料培养基中存在10 mg/L胰岛素和40 μg/L LR3的情况下培养的GF细胞。对于在上述条件下培养的细胞,在第14天的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度。

[0032] 图13A-D显示GF反向添加策略最大限度地降低对于类似过程表现所需的GF浓度。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的克隆B细胞在与总是暴露于胰岛素(1 mg/L;GF)的细胞类似的代数,如实施例4中所述。用相同的过程,不含GF的细胞在具有不同浓度的胰岛素的化学上确定的培养基中以分批补料模式培养:0 mg/L (不含GF)、0.002 mg/L (不含GF + 2 μg/L)、0.1 mg/L (不含GF + 100 μg/L)或1 mg/L (不含GF + 1000 μg/L)。GF细胞在具有1 mg/L胰岛素的基础培养基中培养。补料培养基中的胰岛素浓度是对应条件的基本培养基中的胰岛素浓度的10倍。对于在上述条件下培养的细胞,在第14天的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度,和(D) 均一化的比生产率(Qp)。

[0033] 图14A-D显示可以将不同GF反向添加至不含GF的培养物以加强细胞生长和蛋白滴度。使克隆B细胞适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长,如实施例4中所述。适应的不含GF的细胞在没有GF(不含GF)或具有4 μg/L的不同GF的化学上确定的基础和补料培养基中以分批补料模式培养。bFGF:碱性成纤维细胞生长因子;PDGF-bb:血小板衍生的生长因子,两条B链;INS:胰岛素;LR3:LONG®R3,重组IGF1类似物。补料培养基中的GF的浓度是对应条件的基本培养基中的GF的浓度的5倍。对于在上述条件下培养的细胞,在第14天的(A) 峰值活细胞密度(峰值VCD)、(B) 终末细胞活力和(C) 均一化蛋白滴度,和(D) 均一化的比生产率(Qp)。

[0034] 图15A-B显示GF反向添加策略改善克隆C的过程稳健性(robustness)。适应在没有生长因子(不含GF)的培养基中生长的细胞在与总是暴露于胰岛素(1 mg/L;GF)的细胞类似的代数。不含GF和含INS的细胞在化学上确定的基础和补料培养基中以分批补料模式培养,如实施例4中所述。不含GF的细胞的基础培养基不存在GF,并且INS细胞的基础培养基含有1 mg/L胰岛素。对于每种条件,在第3天开始每天应用不同的补料体积:FV1:初始体积的3.6%的补料体积(FV);FV2:初始体积的4.3%的补料体积;和FV3:初始体积的5%的补料体积。对于每种条件,补料培养基含有胰岛素和LR3两者。对于FV1:胰岛素为10 mg/L,并且对于LR3,胰岛素为42 μg/L。调节FV2和FV3中的胰岛素和LR3的浓度,使得将相同量(克)的胰岛素和LR3添加至培养容器,尽管补料量是不同的。对于在上述条件下培养的细胞,(A) 在第14天的均一化的蛋白滴度和(B) 均一化的终末活力。注:不含GF的细胞维持针对过程扰动(补料体积增加)相对稳定的终末活力和蛋白滴度。

[0035] 图16显示在5L反应器中生长的克隆B的活细胞密度(VCD)、百分比活力、aCD40L蛋白滴度、百分比aCD40L高分子量(HMW),其中在接种后将生长因子胰岛素(INS)和/或LONG®R3 (LR3)反向添加至基础和补料培养基,如实施例5中所述。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明描述用于在哺乳动物或动物细胞培养物中产生蛋白(优选重组蛋白产物)的新过程。这些过程达到增加的活细胞密度、细胞活力、生产率和降低的蛋白聚集。

[0038] 中国仓鼠卵巢(CHO)细胞已经是用于产生重组治疗剂的主要细胞类型之一。对于

用化学上确定的细胞培养基在CHO细胞中大规模制造此类治疗剂，生长因子(GF)被广泛用于促进细胞生长和生产率。然而，生长因子的使用，由于来自生长因子的复杂的细胞信号传导，不仅显著增加制造成本，而且还可能影响过程表现和稳健性。

[0039] 下表描述用于例举本发明的克隆。每个克隆都是表达融合蛋白的具有DHFR选择系统的CHO细胞系。

[0040]

	A	B	C	D
克隆	40A6	63C2	D7	Aba
分子	融合蛋白-1	融合蛋白-1	融合蛋白-2	融合蛋白-3
细胞系	CHO	CHO	CHO	CHO
选择系统	DHFR	DHFR	DHFR	DHFR

[0041] 在不含生长因子的细胞培养条件下生长的细胞

[0042] 本发明的一个实施方案显示，对于CHO细胞培养，可以去除来自生长因子的信号传导。实施例1显示，表达结构域融合抗体的两种不同的二氢叶酸还原酶(DHFR)克隆可以通过将它们在不含生长因子(不含GF)的培养基中连续培养长达九代而使它们适应所述培养基(参见图1和2) 。有趣地，如实施例2中显示，调节细胞生长和蛋白产生的mTOR通路不受生长因子去除显著影响，如靶向参与mTOR通路的138蛋白的抗体阵列所显示(参见图3)。

[0043] 实施例3中描述的分批补料培养的产生测定发现，不含GF的条件使峰值活细胞密度从GF条件的13.0 × 10^6个细胞/ml增加至15.7 × 10^6个细胞/ml，并且改善了培养的较后期的细胞活力，在第8天从GF条件的59.4％改善至96.2%，并且在第14天从35.6%改善至65.1%。作为结果，蛋白滴度增加80.9％。此外，蛋白品质在不含GF的条件下增强，因为高分子种类从GF条件的14.3%降低至4.8％(参见图4)。

[0044] 此外，图5 - 8显示，细胞的生成稳定性在三种不同的克隆中在不含GF的条件下得到改善。在GF条件下培养细胞后，生产率下降，而在不含GF的条件下培养的细胞维持它们的生产率。

[0045] 总体而言，我们的结果表明，不含蛋白和肽的化学上确定的培养基能够繁殖CHO细胞，递送与GF条件相当的生产率，更好地维持克隆的生产稳定性。

[0046] 已经发现(参见图4、6、7和8)，在不含生长因子的条件下生长细胞增加了培养的较后期的细胞活力，且增加蛋白滴度，同时减少目标蛋白的聚集。

[0047] 因此，在其他实施方案中，本发明涉及用于增加培养的较后期的细胞活力的细胞培养过程，其包括在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中培养表达目标蛋白的宿主细胞，其中末期细胞活力与包含生长因子/蛋白/肽的培养基中生长的细胞中的末期细胞活力相比增加。

[0048] 在另一个实施方案中，本发明涉及用于增加目标蛋白的产生的细胞培养过程，其包括在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中培养表达目标蛋白的宿主细胞，其中蛋白滴度与包含生长因子/蛋白/肽的培养基中生长的细胞中的蛋白滴度相比增加。

[0049] 在另一个实施方案中，本发明涉及用于减少蛋白聚集的百分比的细胞培养过程，其包括：在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中培养表达目标蛋白的宿主细胞，其中高分子量种类的百分比与包含生长因子/蛋白/肽的培养基中生长的细胞中的高分子量种类的百

分比相比降低。

[0050] 生长因子反向添加至不含生长因子的细胞培养条件

[0051] 在一个实施方案中，本发明涉及细胞培养过程，其包括：在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中培养表达目标蛋白的宿主/接种细胞；且将一种或多种生长添加至生产细胞培养物。

[0052] 生长因子是能够刺激细胞生长和细胞分化的天然存在的物质。通常它是蛋白或类固醇激素。生长因子对于调节多种细胞过程是重要的。生长因子通常充当细胞的信号传导分子。它们经常促进细胞分化和成熟，其在生长因子之间变化。

[0053] 可用于本发明的细胞培养过程中的生长因子包括，但不限于，胰岛素(GIBCO ® rHu AOF胰岛素, Biocon)，血小板衍生的生长因子(PDGF)，碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)，表皮生长因子(EGF) (LONG ® EGF, RepliGen Bioprocessing)，胰岛素样生长因子(IGF) (LONG ® R3IGF-1, RepilGen Bioprocessing)，转化生长因子α(TGF-α) (LONG ® TGF-α, RepliGen Bioprocessing)，促红细胞生成素，类固醇，血清，神经生长因子(NGF)，成纤维细胞生长因子(FGF)和集落刺激因子(CSF)。所述化合物从所列出的来源可容易获得，或通过本领域技术人员已知的方式可容易获得。

[0054] 在一个实施方案中，生长因子包括但不限于：胰岛素和/或胰岛素样生长因子(IGF)。

[0055] 在本发明的一个实施方案中，生长因子在接种时添加或可以是基础培养基的组分。接种在第0天时发生。

[0056] 在本发明的一个实施方案中，生长因子在接种后某一时间添加，即其在基础培养基中不存在且在接种时不存在。在一个具体实施方案中，生长因子在培养第1天时或以后添加。

[0057] 根据本发明，生长因子可以在指定时间段过程中一次、两次、三次或任何次数添加至细胞培养物。可以联合使用一种或多种生长因子。即，生长因子的任何给定单次添加可以包括一种或多种其他生长因子的添加。类似地，如果存在生长因子的多于一次添加，则可以在不同添加时添加不同的生长因子。可以在生长因子添加前、同时或之后，在指定时间段过程中或不在指定时间段过程中，将额外化合物和物质(包括生长因子)添加至培养物。在一个具体实施方案中，在接种后添加生长因子与基础培养基。在另一个实施方案中，添加生长因子与补料培养基。在一个具体实施方案中，添加生长因子与(在接种后)基础培养基且与补料培养基。在另一个具体实施方案中，添加一种生长因子。

[0058] 根据本发明，可以通过任何方式将生长因子添加至细胞培养物。添加生长因子的方式包括但不限于以其所获得的形式溶于水中、溶于酸中、溶于基础培养基中、溶于补料培养基中、溶于合适培养基中、或其任何组合。

[0059] 在本发明的一个实施方案中，胰岛素作为其中胰岛素溶于1 M HCL中的溶液添加，所述溶液随后用水稀释用于进一步使用(即诸如将胰岛素添加至补料培养基)。

[0060] 在本发明的一个实施方案中，添加生长因子以使培养物中的浓度达到适当水平。作为非限制性实例，添加胰岛素物以维持1μg/L - 10mg/L的浓度。在本发明的另一个实施方案中，添加胰岛素物以维持4μg/L - 10mg/L的浓度。在本发明的又另一个实施方案中，添加胰岛素物以维持40μg/L - 10mg/L的浓度。

[0061] 在本发明的一个实施方案中，以约1μg/L至10 mg/L的量将生长因子添加至基础培养基。在本发明的另一个实施方案中，以约1μg/L至1 mg/L的量将生长因子添加至基础培养基。在一个非限制性实例中，可以约2μg/L至100 μg /L的量将胰岛素添加至基础培养基，可以约2μg/L、10μg/L、100 μg/L或1mg/mL的量将胰岛素添加至基础培养基。其他非限制性实例包括，可以约4μg/L的量将IGF、bFGF和/或PDGF添加至基础培养基。

[0062] 在本发明的一个实施方案中，以约1μg/L至10 mg/L的量将生长因子添加至补料培养基。在本发明的另一个实施方案中，以基础培养基的量的5倍至10倍的量将生长因子添加至补料培养基。在一个非限制性实例中，可以约10 mg/L的量将胰岛素添加至补料培养基，和/或可以约40 μg/L的量将胰岛素样生长因子添加至补料培养基。

[0063] 根据本发明，培养可以在添加生长因子后运行任何时间长度。培养运行时间可以由本领域技术人员基于下述相关因素进行测定：诸如可回收蛋白的数量和品质、和上清液中由于细胞裂解导致的污染性细胞种类(例如蛋白和DNA)的水平，这将使目标蛋白的回收复杂。

[0064] 在本发明增加细胞活力的细胞培养过程和方法的特定实施方案中，生长因子在接种后的初始死亡期开始前某一时间添加。或者，生长因子在接种后的初始生长期过程中的某一时间添加，或者生长因子在初始生长期的后半部分过程中添加，或者生长因子在初始生长期结束时或约结束时添加。

[0065] 初始生长期是指在不存在指定添加生长因子的情况下观察到的生长期。初始死亡期是指在不存在指定添加生长因子的情况下观察到的死亡期。

[0066] 初始生长期可以在初始死亡期开始时结束，或在初始生长期和初始死亡期之间可以存在任何长度的稳定期。

[0067] 例如，在其中初始生长期是第0天至第6天且初始死亡期在第7天开始的细胞培养中，在特定实施方案中，生长因子在接种后且在第7天前某一时间添加。在具体实施方案中，生长因子在接种后且不迟于第6天添加。在具体实施方案中，生长因子在第1天和第6天之间添加。在另一个具体实施方案中，生长因子在第3-6天时与补料培养基一起添加。在其他具体实施方案中，生长因子在约第2天时或在第2天时添加。

[0068] 已发现(参见图9和10)当实施本发明时，细胞培养物的活力延长。如果培养物中的细胞活力对于在诸如添加生长因子的条件存在的情况下高于在所述条件不存在的情况下一段时间，则所述条件引起延长的细胞活力。

[0069] 因此，在其他实施方案中，本发明涉及用于延长培养物中的细胞活力的细胞培养过程，其包括：在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中培养表达目标蛋白的宿主细胞；和将生长因子添加至细胞培养物；其中细胞培养物的终末细胞活力与包含生长因子/蛋白/肽的培养基中生长的细胞中的终末细胞活力相比延长。

[0070] 细胞培养过程，尤其是非连续性过程的运行时间通常受剩余活细胞密度限制，所述剩余活细胞密度在死亡期过程中降低。较长运行时间可以允许达到较高产物滴度。产物品质问题也为减少死亡率提供动机，因为培养物中细胞碎片和死细胞内容物的存在可以对在培养运行结束时分离和/或纯化蛋白产物的能力造成负面影响。

[0071] 已经发现(参见图9、10和12)，通过实施本发明实现的延长细胞活力导致增加的蛋白滴度。

[0072] 因此，在其他实施方案中，本发明涉及用于增加培养物中的蛋白产生的细胞培养过程，其包括：在不含生长因子/蛋白/肽的培养基中培养表达目标蛋白的宿主细胞；和将生长因子添加至细胞培养物；其中蛋白滴度与包含生长因子/蛋白/肽的培养基中生长的细胞中的蛋白滴度相比增加。

[0073] 关于蛋白纯化和分析的技术与程序

[0074] 在本发明所涵盖的培养方法中，根据需要使用本领域已知且实践的分离和纯化方法，通常在总细胞培养期结束时收集、回收、分离和/或纯化、或基本上纯化由细胞产生的蛋白。优选地，从培养基或上清液中分离由培养细胞分泌的蛋白；然而，使用已知的方法，也可以从宿主细胞例如细胞裂解物中回收蛋白。

[0075] 说明性地，对于蛋白回收、分离和/或纯化，离心细胞培养基或细胞裂解物，以去除微粒细胞和细胞碎片。通过合适纯化技术从污染性可溶蛋白和多肽中分离或纯化出期望多肽产物。以下程序提供示例性但非限制性的蛋白纯化方法：在免疫亲和或离子交换柱上的分离或分级；乙醇沉淀；反相HPLC；在树脂(诸如二氧化硅)或阳离子交换树脂(例如DEAE)上的层析；层析聚焦；SDS-PAGE；硫酸铵沉淀；使用例如SEPHADEX® G-75、SEPHAROSE®的凝胶过滤；用于去除免疫球蛋白污染物的蛋白A SEPHADEX® 层析；等。可以使用其他添加剂诸如蛋白酶抑制剂(例如PMSF或蛋白酶K)来抑制纯化过程中的蛋白降解。技术人员应理解，用于给定目的多肽的纯化方法可能需要修改，所述修改允许在细胞培养中重组表达的多肽中的变化。

[0076] 细胞、蛋白和细胞培养

[0077] 在本发明的细胞培养过程或方法中，可以将细胞维持在如本领域常规已知的多种细胞培养基，即基础培养基中。例如，所述方法适用于与维持在细胞培养基中的大量细胞一起使用，所述细胞培养基可以补充有营养素等。通常，“化学上确定的细胞培养基”(也称为“化学上确定的培养基”)是本领域从业者所理解且已知是指营养溶液的术语，在所述营养溶液中生长细胞，优选动物或哺乳动物细胞，且所述营养溶液通常提供来自以下的至少一种或多种组分：能源(通常以碳水化合物诸如葡萄糖的形式)；所有必需氨基酸，且通常是二十种基础氨基酸加上半胱氨酸；维生素和/或通常以低浓度需要的其他有机化合物；脂质或游离脂肪酸，例如亚油酸；和微量元素，例如通常以非常低浓度(通常在微摩尔范围中)需要的无机化合物或天然存在的元素。细胞培养基也可以经补充以含有多种任选组分，诸如盐，例如钙、镁和磷酸盐，和缓冲剂(例如HEPES)；核苷和碱基，例如腺苷、胸苷、次黄嘌呤；抗生素，例如庆大霉素；和细胞保护剂，例如PLURONIC®多元醇 (PLURONIC® F68)。

[0078] 本发明的一个实施方案是利用不含生长因子、蛋白和肽，例如，胰岛素、转铁蛋白、表皮生长因子、血清、水解蛋白、激素、bFGF、IGF、PDGF且不含动物来源的产品或成分的化学上确定的细胞培养基的细胞培养过程。

[0079] 如技术人员所理解，动物或哺乳动物细胞在这样的培养基中进行培养，所述培养基适合于所培养的特定细胞，并且可以通过本领域技术人员无需过度实验进行确定。可以利用商购可得的培养基，且包括例如最小必需培养基(MEM, Sigma, St. Louis, MO)；Ham's F10培养基(Sigma)；Dulbecco氏改良Eagles培养基(Dulbecco's Modified Eagles Medium)(DMEM,Sigma)；RPMI-1640培养基(Sigma)；HYCLONE®细胞培养基(HyClone,Logan,UT)；和化学上确定的(CD)培养基，其经配制用于特定细胞类型，例如CD-CHO培养基

(Invitrogen,Carlsbad,CA)。EX-CELL® CD-CHO (SAFC, Saint Louis)。

[0080] 根据需要或期望且如本领域技术人员已知且使用常规技术实践的,可以向上述示例性培养基中以适当浓度或量添加上述补充性组分或成分,包括任选组分。

[0081] 此外,适合于本发明方法的细胞培养条件是通常采用且已知用于分批、分批补料、或连续培养细胞的条件,除了温度以外,还应当注意pH,例如约6.5至约7.5;溶解氧(O_2),例如在约5-90%之间的空气饱和度和二氧化碳(CO_2),搅动和湿度。作为说明性但非限制性实例,用于本发明的分批补料过程的合适细胞培养基包含改良的CD-CHO培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA)。也可以采用补料培养基,诸如改良的eRDF培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA)。本发明的一个实施方案利用还含有生长因子例如胰岛素的补料培养基。

[0082] 动物细胞、哺乳动物细胞、培养细胞、动物或哺乳动物宿主细胞、宿主细胞、重组细胞、重组宿主细胞等是关于可以根据本发明的过程培养的细胞的所有术语。此类细胞通常是获得自或衍生自哺乳动物的细胞系,并且当置于含有适当营养素的培养基中的单层培养物或悬浮培养物中时能够生长且存活。

[0083] 根据本发明方法可以培养多种类型的细胞。所述细胞通常是动物或哺乳动物细胞,其可以向培养基中表达并分泌、或可以经分子工程改造以表达并分泌大量特定目标蛋白。应当理解,由宿主细胞产生的蛋白对于宿主细胞可以是内源或同源的。或者,蛋白对于宿主细胞是异源即外源的,例如由中国仓鼠卵巢(CHO)宿主细胞产生并分泌的人蛋白。在一个实施方案中,哺乳动物蛋白即最初获得自或衍生自哺乳动物生物体的那些通过本发明的方法来获得,且优选由细胞分泌到培养基内。

[0084] 目标蛋白可以包括融合蛋白和多肽,嵌合蛋白和多肽,以及任何上述蛋白和多肽的片段或部分、或突变体、变体、或类似物也包括在可以通过本发明的方法产生的合适蛋白、多肽和肽中。

[0085] 适合于具有、表达和产生蛋白用于后续分离和/或纯化的动物或哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO),诸如CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin等人, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556 (1986);和Kolkekar等人, *Biochemistry*, 36:10901-10909 (1997)), CHO-K1 Tet-On细胞系 (Clontech), 命名为ECACC 85050302的CHO (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK),、CHO克隆13(GEIMG, Genova, IT)、CHO克隆B(GEIMG, Genova, IT)、命名为ECACC 93061607的CHO-K1/SF(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)、命名为ECACC 92052129的 RR-CHOK1(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)、二氢叶酸还原酶阴性CHO细胞(CHO/-DHFR, Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980))、dp12.CHO细胞(美国专利号 5,721,121)和FUT8 (α-1,6-岩藻糖基转移酶)敲除CHO细胞系,Ms704 (Naoko Yamane-Ohnuki等人,2004年8月6日在线公开于Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20151);通过SV40转化的猴肾CV1细胞(COS细胞, COS-7, ATCC® CRL-1651);人胚肾细胞(例如293细胞、或亚克隆用于在悬浮培养中生长的293细胞,Graham等人, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC® CCL-10);猴肾细胞(CV1, ATCC® CCL-70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC® CRL-1587; VERO, ATCC® CCL-81);小鼠塞尔托利氏细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980));人宫颈癌细胞

(HELA, ATCC® CCL-2);犬肾细胞(MDCK, ATCC® CCL-34);人肺细胞(W138, ATCC® CCL-75);人肝细胞瘤细胞(HEP-G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562, ATCC® CCL-51);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC® CRL-1442);TRI细胞(Mather, *Ann. NY Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982));MCR 5细胞;FS4细胞。在本发明的一个实施方案中,细胞是CHO细胞,诸如CHO/-DHFR细胞和CHO/-GS细胞。

[0086] 适合于在本发明的方法和过程中培养的细胞可以含有例如经由转化、转染、感染或注射引入的表达载体(构建体),诸如质粒等,所述载体具有编码用于在培养过程中表达并产生的蛋白的编码序列或其部分。此类表达载体含有转录和翻译所插入编码序列的必需元件。可以使用本领域技术人员众所周知并实践的方法来构建表达载体,其含有编码所产生蛋白和多肽的序列,以及适当的转录和翻译控制元件。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术、和体内遗传重组。此类技术描述于:Sambrook, J.等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY (1989)和Ausubel, F.M.等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (1989)。

[0087] 控制元件或调节序列是载体的那些非翻译区,例如增强子、启动子、5'和3'非翻译区,其与宿主细胞蛋白相互作用以实施转录和翻译。此类元件可以在其强度和特异性方面不同。取决于所用载体系统和宿主细胞,可以使用任何数量的合适转录和翻译元件,包括组成型和诱导型启动子。在哺乳动物细胞系统中,来自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子是优选的。用于在蛋白表达系统中使用的构建体经设计为含有至少一个启动子、增强子序列(任选的,用于哺乳动物表达系统)、和基因表达的正确转录和调节必需或需要的其他序列(例如转录起始和终止序列、复制起始位点、多腺苷酸化序列)。

[0088] 如本领域技术人员应当理解,用于正确转录、表达和分离真核(例如哺乳动物)表达系统中产生的蛋白的适当载体例如质粒组分的选择是本领域技术人员已知且常规确定和实践的。可以将通过根据本发明的方法培养的细胞的蛋白表达置于启动子的控制下,所述启动子诸如病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)、Rous肉瘤病毒(RSV)、磷酸甘油激酶(PGK)、胸苷激酶(TK)、或α-肌动蛋白启动子。此外,经调节启动子赋予通过特定化合物或分子的诱导性。此外,如果需要或期望,可以使用组织特异性启动子或调节元件(Swift, G.等人, *Cell*, 38:639-646 (1984))。

[0089] 可以通过本领域技术人员已知的多种基因转移方法将表达构建体引入细胞中,所述方法例如常规基因转染方法,诸如磷酸钙共沉淀、脂质体转染、显微注射、电穿孔、和感染或病毒转导。方法的选择在本领域技术人员的能力之内。对于本领域技术人员显而易见的是,可以将携带用于在细胞中表达的DNA序列的一种或多种构建体转染到细胞内,使得随后在细胞中产生和/或从细胞中获得表达产物。

[0090] 在特定方面,含有适当对照和调节序列的哺乳动物表达系统优选用于在本发明的蛋白表达哺乳动物细胞中使用。用于哺乳动物表达载体中使用的常用真核控制序列包括与哺乳动物细胞相容的启动子和控制序列,诸如,例如巨细胞病毒(CMV)启动子(CDM8载体)和禽肉瘤病毒(ASV)、(πLN)。其他常用启动子包括来自猿猴病毒40(SV40)的早期和晚期启动子(Fiers等人, *Nature*, 273:113 (1973)),或其他病毒启动子,诸如衍生自多瘤病毒、腺病毒2和牛乳头瘤病毒的那些。也可以使用诱导型启动子,诸如hMTII (Karin等人,

Nature, 299:797-802 (1982))。

[0091] 适合于真核宿主细胞的表达载体的实例包括但不限于用于哺乳动物宿主细胞的载体(例如BPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2 (Maniatis);pIRES (Clontech);pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1 (Life Technologies);pVPakc载体、pCMV载体、pSG5载体(Stratagene)、逆转录病毒载体(例如pFB载体(Stratagene))、pcDNA-3(Invitrogen)、腺病毒载体;腺伴随病毒载体、杆状病毒载体、酵母载体(例如pESC载体(Stratagene))、或上述任何的经修饰形式。载体也可以含有在启动子区序列上游或下游的用于最佳化基因表达的增强子序列。

[0092] 在重组载体(例如质粒)中也可以使用选择标记,以便为具有(优选已稳定整合)该载体的细胞赋予抗性,以允许其在适当选择培养基中的选择。可以使用多种选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV TK), (Wigler等人, *Cell*, 11:223 (1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT), (Szybalska等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202 (1992))和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等人, *Cell*, 22:817 (1980))基因,所述基因分别可以用于tk-、hgprt-或aprt-细胞(APRT)中。

[0093] 也可以使用抗代谢物抗性作为选择标记基因的以下非限制性实例的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357 (1980);和O'Hare等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527 (1981));谷氨酰胺合成酶(GS),其赋予对甲硫氨酸砜亚胺(methionine sulphoximine)的抗性;gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072 (1981));neo,其赋予对氨基葡糖苷G418的抗性(*Clinical Pharmacy*, 12:488-505; Wu等人, *Biotherapy*, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science*, 260:926-932 (1993); Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-121 (1993); *TIB TECH*, 11(5):155-215 (May 1993); 和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人, *Gene*, 30:147 (1984))。重组DNA技术领域中通常已知的方法可以常规应用,以选择期望的重组细胞克隆,且此类方法描述于例如:Ausubel等人, 编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, *A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); 在第12和13章中, Dracopoli等人, 编辑, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin等人, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981),所述文献以其整体通过引用并入本文。

[0094] 此外,可以通过载体扩增来增加所表达蛋白分子的表达水平(关于综述,参见Bebbington, C.R.等人, 第8章: "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells", Glover, D.M., 编辑, *DNA Cloning*, Vol. 3: A Practical Approach, pp. 163-188, IRL Press Limited, 出版 (1987))。当表达蛋白的载体系统中的标记是可扩增的时,存在于宿主细胞培养物中的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。因为扩增区域与蛋白编码基因结合,所以蛋白的产生将伴随地增加(Crouse等人, *Mol. Cell. Biol.*, 3:257 (1983))。

[0095] 具有谷氨酰胺合酶(GS)或二氢叶酸还原酶(DHFR)编码核酸作为选择标记的载体可以分别在药物甲硫氨酸砜亚胺或甲氨蝶呤存在的情况下进行扩增。基于谷氨酰胺合酶的载体的优点是谷氨酰胺合酶阴性的细胞系(例如鼠骨髓瘤细胞系,NSO)的可用性。通过提供

额外抑制剂来防止内源性基因发挥功能，谷氨酰胺合酶表达系统也可以在谷氨酰胺合酶表达细胞(例如CHO细胞)中发挥功能。

[0096] 表达DHFR作为选择标记的载体包括但不限于pSV2-dhfr质粒(Subramani等人，*Mol. Cell. Biol.* 1:854 (1981))。表达谷氨酰胺合酶作为选择标记的载体包括但不限于Stephens等人，*Nucl. Acids. Res.*，17:7110 (1989)中所述的pEE6表达载体。谷氨酰胺合酶表达系统及其组分详细描述于以下PCT公开中：WO 87/04462; WO 86/05807; WO 89/01036; WO 89/10404; 和WO 91/06657，所述公开以其整体通过引用并入本文。此外，可以根据本发明使用的谷氨酰胺合酶表达载体是从供应商商购可得的，所述供应商包括例如Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH)。

[0097] 细胞培养类型

[0098] 出于理解但非限制性的目的，技术人员应当理解，用于蛋白生产的细胞培养和培养运行可以包括三种一般类型；即，连续培养、分批培养和分批补料培养。例如，在连续培养中，在培养期过程中向细胞提供新鲜培养基补充物(即补料培养基)，同时每天去除旧培养基且例如每天或连续收获产物。在连续培养中，补料培养基可以每天添加且可以连续添加，即作为滴注或输注。对于连续培养，细胞可以与期望一样长地保留在培养中，只要细胞保持为活的且维持环境和培养条件。

[0099] 在分批培养中，最初在培养基中培养细胞，且在培养运行过程中或结束前既不去除、更换、也不补充这种培养基，即不用新培养基“补料”细胞。在培养运行结束时收获期望产物。

[0100] 对于分批补料培养，在运行过程中通过用新鲜培养基补充培养基来增加培养运行时间，即在培养期过程中用新培养基(“补料培养基”)“补料”细胞。分批补料培养可以包括多种补料方案和时间，例如每天、每隔一天、每两天等、每天超过一次、或少于每天一次等等。此外，分批补料培养可以用补料培养基连续补料。

[0101] 然后在培养/生产运行结束时收获期望产物。

[0102] 本发明的一个实施方案涵盖分批补料细胞培养，其中在接种后某一时间添加生长因子诸如胰岛素和/或IGF。

[0103] 根据本发明，在用于大规模或小规模蛋白生产的条件下，使用常规用于动物或哺乳动物细胞培养的培养容器和/或培养装置，可以实施细胞培养，且可以由细胞产生蛋白。如本领域技术人员应当理解，组织培养皿、T形瓶和旋转瓶通常以实验室规模使用。对于在更大规模上的培养(例如500 L、5000 L等，例如如共同转让的美国专利号7,541,164和7,332,303、和2006年12月19日提交的美国专利申请系列号12/086,786中所述，所述专利的内容以其整体通过引用并入本文)，可以使用包括但不限于流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养或搅拌罐生物反应器系统的程序。微载体可以与或可以不与滚瓶或搅拌罐生物反应器系统一起使用。此类系统可以分批、连续或分批补料模式操作。此外，培养装置或系统可以配备有或不配备有使用滤器、重力、离心力等的细胞分离器。

[0104] 细胞培养期和相关参数

[0105] 术语“接种”是指向起始培养基中添加细胞以开始培养。

[0106] 培养的“生长期”是在其过程中在任何时间点的活细胞密度高于任何先前时间点的时期。

[0107] 培养的“稳定期”是在其过程中经任何长度的时间段活细胞密度都大致恒定(即在测量误差内)的时期。

[0108] 培养的“死亡期”是跟在生长期之后或生长期和稳定期之后的时期,且在此过程中任何时间点的活细胞密度都低于在该时期过程中的任何先前时间点。

[0109] 在本发明的一个实施方案中,在生产期过程中特别是在延长的生产期中补充(“补料”)培养基,以支持连续蛋白产生,且获得足量高品质蛋白产物。补料可以在每天基础上或根据其他时间表发生,以支持细胞活力和蛋白生产。

[0110] 根据本发明的培养过程可以导致更多活细胞存活,直到培养期结束时。相应地,在一些实施方案中,存活细胞越多,产生期望产物的细胞越多。这进而导致在培养过程结束时更大积累量的产物,其中通过个别细胞的蛋白生产速率(即细胞比生产率)保持相同。如本领域已知的细胞比生产率或细胞比速率通常是指每个细胞或每细胞质量或体积的量度所产生的产物的比表达速率。细胞比生产率以例如每天每个细胞所产生蛋白的克数来测量,且可以根据涉及以下公式的积分方法来测量:

[0111] $dP/dt = q_p X$,或

[0112] $P = q_p \int_0^t X dt$

[0113] 其中q_p是细胞比生产率常数;X是细胞数目或细胞体积或细胞质量当量;且dP/dt是蛋白生产速率。因此,q_p可以获得自与活细胞的时间积分($\int_0^t X dt$“活细胞天数”)相比的产物浓度曲线。根据该公式,当针对活细胞天数绘制所产生的蛋白产物的量时,斜率等于细胞比速率。活细胞可以通过几种量度来测定,例如生物量、O_2摄取速率、乳酸脱氢酶(LDH)、细胞压积或浊度(例如Etcheverry, T.等人的美国专利号5,705,364)。

[0114] 通过本发明的培养方法产生aCD40L融合蛋白

[0115] 在由本发明涵盖的其他实施方案中,采用本发明的细胞培养方法来产生可溶性aCD40L融合蛋白,如本文所述的克隆A和克隆B所例举。

[0116] 可溶性aCD40L是特异性结合人CD40L的抗体多肽。抗体多肽是包含可变结构域的结构域抗体(dAb)。可溶性aCD40L可用于治疗涉及CD40L活化的疾病,诸如自身免疫性疾病。2012年6月4日提交的美国专利申请序列号61/655,110描述了aCD40L dAb,且以其整体通过引用并入本文。

[0117] 在另一个实施方案中,可溶性aCD40L通过重组工程改造的宿主细胞来产生。可溶性aCD40L蛋白可以通过用含有编码可溶性aCD40L的DNA序列的载体转染的CHO细胞重组产生。在根据本发明的过程培养时,可溶性aCD40L融合蛋白以大量产生。本发明提供高水平的可回收蛋白产物(例如,如实施例3、4和5;图4、6和9中显示的可溶性aCD40L蛋白产物)的产生。

[0118] 通过本发明的培养方法产生肌生成抑制素融合蛋白

[0119] 在本发明涵盖的其他实施方案中,本发明的细胞培养方法用于产生可溶性肌生成抑制素融合蛋白,如本文所述的克隆C所例举。

[0120] 在另一个实施方案中,肌生成抑制素融合蛋白由重组工程改造的宿主细胞产生。肌生成抑制素融合蛋白可以由用含有编码肌生成抑制素融合蛋白的DNA序列的载体转染的CHO细胞重组产生。当根据本发明的过程培养时,大量产生肌生成抑制素融合蛋白。本发明提供高水平的可回收的肌生成抑制素融合蛋白产物的产生,如实施例3和4;图7和10所显

示。

[0121] 通过本发明的培养方法产生CTLA4Ig融合蛋白

[0122] 在本发明涵盖的其他实施方案中，本发明的细胞培养方法用于产生可溶性CTLA4Ig融合蛋白，如本文所述的克隆D所例举。CTLA4Ig是一种可溶性融合蛋白，其由连接至人免疫球蛋白G1(IgG1)的修饰的Fc(铰链、CH2和CH3结构域)部分的人细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)的细胞外结构域组成。CTLA4表明在患有中度至重度活动性类风湿关节炎的成年患者中减少体征和症状、诱导主要的临床反应、抑制结构性损伤的恶化和改善身体机能。CTLA4Ig融合蛋白可以由用含有编码CTLA4Ig的DNA序列的载体转染的CHO细胞重组产生，如Linsley, P.S.等人的美国专利号5,844,095所描述，其以其整体通过引用并入本文。

[0123] 在另一个实施方案中，可溶性CTLA4Ig由重组工程改造的宿主细胞产生。可溶性CTLA4Ig蛋白可以由用含有编码可溶性CTLA4Ig的DNA序列的载体转染的CHO细胞重组产生。当根据本发明的过程培养时，大量产生可溶性CTLA4Ig融合蛋白。本发明提供高水平的可回收的可溶性CTLA4Ig蛋白产物的产生，如实施例3和4;图8和12所显示。

实施例

[0124] 以下实施例描述本发明的具体方面，以举例说明本发明且为本领域技术人员提供本方法的描述。所述实施例不应解释为限制本发明，因为所述实施例仅提供在理解和实践本发明及其各方面中有用的具体方法和范例。

[0125] 如下文所述的实施例1-5描述与细胞培养过程相关的实验，所述细胞培养过程涉及在有和没有生长因子的情况下的本发明的培养过程。

[0126] 实施例1

[0127] CHO细胞能够在不含GF的条件下生长

[0128] 1．解冻新小瓶的早先代的细胞，并且在平台培养基(含有1或10 mg/L胰岛素)中培养2代。

[0129] 2．在第3代，将细胞转移至不含胰岛素的基础培养基，并且每3至4天以0.6x10^6个细胞/ml的密度保持分瓶(splitting)。

[0130] 3．在不含胰岛素的条件下的前几代中，细胞生长可以显著减缓且活力可以下降(~90%)。同时，铵产生可以由于葡萄糖摄取不足和作为能源的氨基酸的氧化而增加。作为结果，烧瓶中的pH可以增加。CO_2水平可以需要相应地调整/增加，以便将pH控制在7.0-7.3的范围中。这对于将细胞维持在健康状态是非常重要的。

[0131] 4．通常，保持至新代的耗竭的培养基应当小于30％。在细胞生长太慢无法满足该标准的情况下，可以将细胞离心下来，并且以期望数目转移至新烧瓶，所述新烧瓶含有30％耗竭的培养基和70％新鲜培养基。

[0132] 5．当细胞完全适应时，细胞生长将恢复且活力将回到高于95％。取决于具体克隆，使细胞适应不含胰岛素的条件可能需要长达7~9代。

[0133] 6．细胞培养参数：振荡速度：150 rpm；摇瓶：250 ml或500 ml有挡板的摇瓶(Corning Inc.)，其具有100 ml或200 ml工作体积；温度：37℃；CO_2：通常6%，可以调节以便将pH控制在7.0~7.3(高达8% CO_2)。

[0134] 图1和图2显示分别使克隆A和克隆B适应在不含生长因子的培养基中生长。对于其他克隆C和D看到类似的结果。

[0135] 实施例2

[0136] 去除胰岛素没有急剧影响mTOR通路

[0137] 本研究的目的是使用抗体阵列以比较在有或没有生长因子胰岛素的情况下生长的细胞中参与mTOR的蛋白的磷酸化/表达水平，从而表明从分子和细胞生物学观点来看该细胞能够在不含GF的条件下生长。

[0138] 抗体阵列样品制备

[0139] 克隆A在不含胰岛素或含有胰岛素的基础培养基下培养。在第3天，对于每种条件采样5x 10^6个活细胞。将细胞在4℃以500g持续5 min离心下来。将细胞用10 ml冰冷1xPBS洗涤，并且在4℃以500g持续5 min离心下来。将细胞在样品处理过程中始终保持在冰上或4℃。倾倒PBS后，将细胞立即冷冻在-70℃，并且储存在-70℃，直到抗体阵列分析。

[0140] 抗体阵列方案

[0141] 蛋白提取

[0142] 用冰冷1X PBS洗涤细胞。将裂解珠粒和提取缓冲液添加至样品。通过涡旋剧烈混合30秒。在冰上孵育混合物10分钟。以10分钟时间间隔重复涡旋30秒，持续60分钟。在涡旋之间，在冰上孵育混合物。在4℃以10,000 x g离心混合物，持续20分钟。将上清液转移至干净试管。使用离心柱来将上清液中的缓冲液改变为标记缓冲液。测量蛋白浓度。注:提取缓冲液和标记缓冲液中包括磷酸酶抑制剂。

[0143] 蛋白标记

[0144] 将100 μL DMF添加至1 mg生物素试剂，以得到10 μg/μL的最终浓度。将标记缓冲液添加至蛋白样品以使体积达到75 μL。将3 μL生物素/DMF与标记缓冲液添加至蛋白样品。混合且在室温在混合的情况下孵育两小时。添加35 μL终止试剂。在室温在混合的情况下孵育30分钟。

[0145] 偶联

[0146] 封闭:将抗体微阵列淹没在封闭缓冲液中。在室温振荡40分钟。用MILLI-Q®级水冲洗玻片。

[0147] 在室温在定轨振荡器上，将玻片在具有6 mL偶联溶液中的85μg标记蛋白样品的偶联室中孵育2小时。从偶联室取出玻片。用新鲜洗涤缓冲液洗涤玻片三次。用去离子水充分冲洗。

[0148] 检测

[0149] 将30 μl Cy3-链霉抗生物素蛋白(1 mg/ml)添加至60-ml含有检测缓冲液的瓶中。将玻片淹没在30 ml Cy3-链霉抗生物素蛋白溶液中。在室温在黑暗中在定轨振荡器上孵育45分钟。用新鲜洗涤缓冲液洗涤玻片三次。用去离子水充分冲洗。用压缩氮气干燥玻片。在Axon GenePix阵列扫描仪上扫描。

[0150] 阵列数据

[0151] 对于阵列上的每个点，从阵列图像提取中值点强度。使用中值强度，测定每种抗体的重复点的平均信号。该数据被标记为*阵列上的重复点的平均信号*。*阵列上的重复的CV*是每种抗体的重复点的变异系数。对于均一化，在每个阵列玻片内，测定阵列中的所有抗体的

平均信号的平均值。此值被表示为*平均信号*。

[0152] 均一化数据 = 重复点的平均信号/平均信号。

[0153] 使用均一化数据，测定对照和处理样品之间的倍数变化。

[0154] *信号倍数变化* = 处理/对照。

[0155] 实施例3

[0156] 不含GF/蛋白/肽的培养基改善过程表现

[0157] 细胞：克隆A、B、C和D。

[0158] 摇瓶中的细胞培养参数：

[0159] 振荡速度：150 rpm；摇瓶：250 ml或500 ml有挡板的摇瓶(Corning Inc.)，其具有100 ml或200 ml工作体积；温度：37℃；CO_2：通常6%。

[0160] 反应器中的细胞培养参数：

[0161] 搅拌120 rpm；具有1.3L初始培养体积的5L反应器；温度：37℃；控制在50%的溶解氧(DO)；在7.0至7.3的pH。

[0162] 接种密度：0.3或0.6x10^6个细胞/ml。

[0163] 基础：用于克隆A、B和C的171培养基，有或没有胰岛素；用于克隆D的127G培养基，有或没有胰岛素。

[0164] 补料：154A-1或154A-1衍生的培养基(用于克隆A和B的M154A1B)，有或没有胰岛素。

[0165] 补料策略：在第3天开始补料，补料3.64％初始培养体积，直至第14天。

[0166] 采样：在指定的时间点，取样品，以便用CEDEX ® 测量细胞密度和活力，用HPLC测量滴度，且用大小排阻层析(SE)测量高分子种类。

[0167] 实施例4

[0168] GF反向添加至不含GF的条件加强细胞生长和蛋白产生

[0169] 细胞：产生aCD40L融合蛋白的克隆B。

[0170] 细胞培养参数：

[0171] 搅拌：120 rpm；具有1.3L初始培养体积的5L反应器；温度：37℃；控制在50%的溶解氧(DO)。

[0172] 基础：有或没有胰岛素的培养基。

[0173] 补料：有或没有胰岛素和LONG ® R3。

[0174] 不含INS：基础中没有胰岛素，补料中没有胰岛素且没有LONG ® R3。

[0175] INS：基础中的1 mg/L胰岛素，补料中的10 mg/L胰岛素。

[0176] INS反向添加：将1 mg/L胰岛素和10 mg/L胰岛素分别反向添加至基础和补料。接种物是不含胰岛素的细胞。

[0177] 补料策略：在第3天开始补料，补料3.64％初始培养体积，直至第14天。

[0178] 采样：在指定的时间点，取样品，以便用CEDEX ® 测量细胞密度和活力，用HPLC测量滴度，且用大小排阻层析(SE)测量高分子种类。

[0179] 实施例5

[0180] 不含GF/蛋白/肽的培养基改善过程表现

[0181] 细胞：产生aCD40L融合蛋白的克隆63C2。

[0182] 细胞培养参数：

[0183] 搅拌：120 rpm；具有1.3L初始培养体积的5L反应器；温度：37℃；控制在50%的溶解氧(DO)。

[0184] 基础：有或没有胰岛素。

[0185] 补料：有或没有胰岛素和LONG®R3。

[0186] 不含INS + LR3：将4μg/L LR3和40μg/L LR3分别添加至基础补料培养基。接种物是不含GF的。

[0187] INS + LR3：分别地，将4μg/L LR3与1mg/L胰岛素添加至基础培养基，将40μg/L LR3与10mg/L胰岛素添加至补料培养基。接种物在具有1 mg/L胰岛素的基础培养基中。

[0188] 补料策略：在第3天开始补料，补料3.64％初始培养体积，直至第14天。

[0189] 采样：在指定的时间点，取样品，以便用CEDEX®测量细胞密度和活力，用HPLC测量滴度，且用大小排阻层析(SE)测量高分子种类。

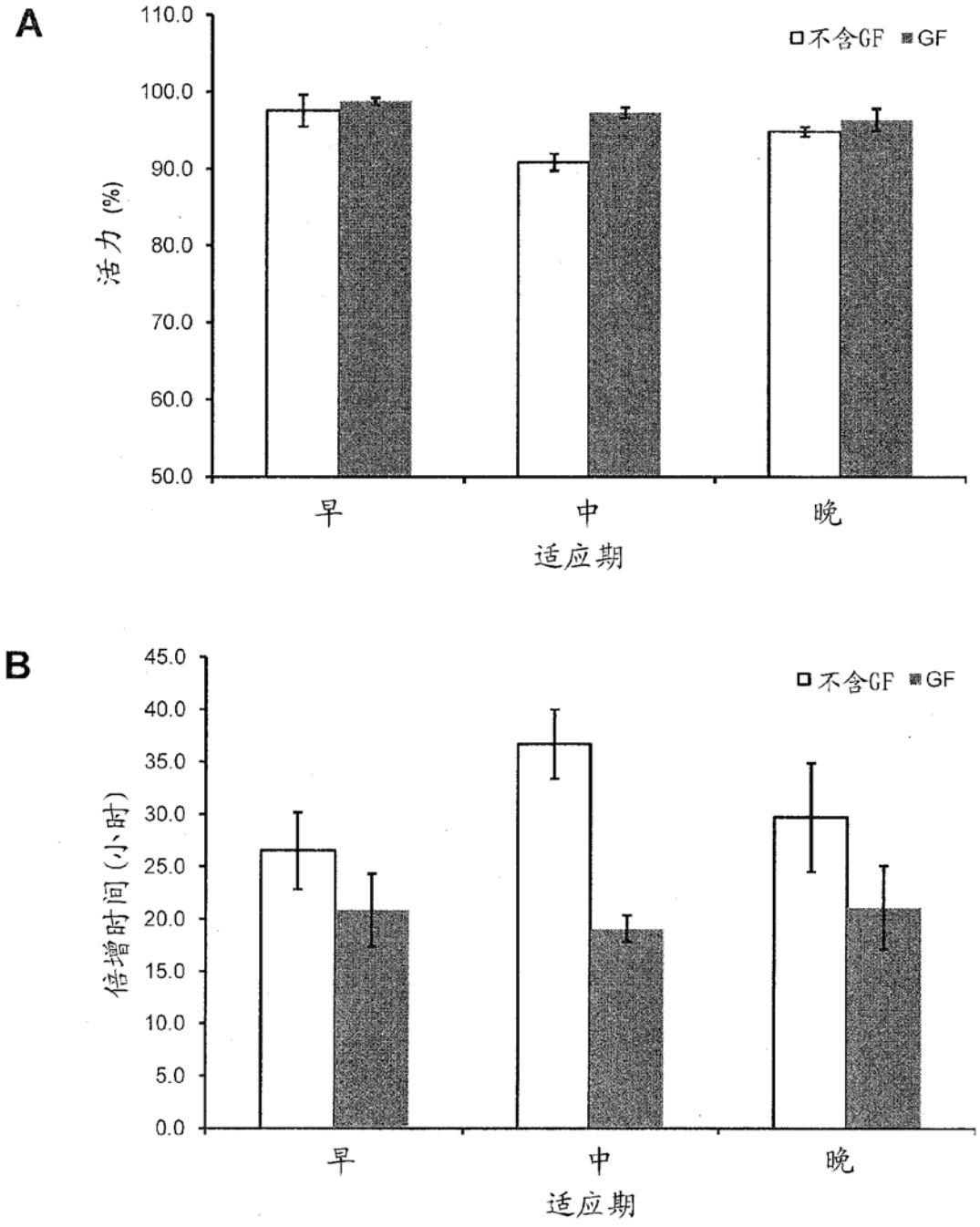

A
110.0
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
活力 (%)
不含GF
GF
早
中
晚
适应期
B
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
倍增时间 (小时)
不含GF
GF
早
中
晚
适应期

图 1

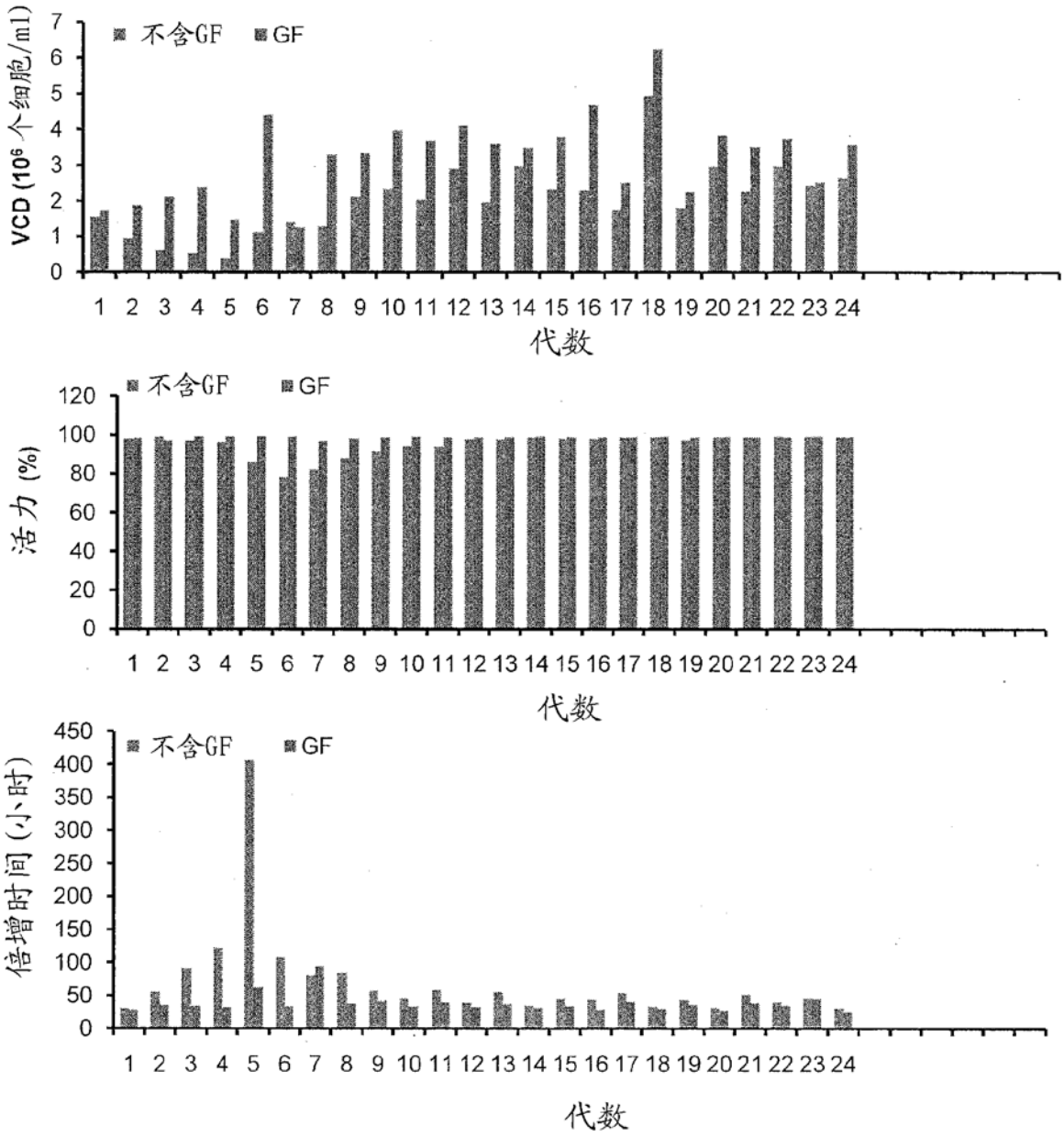


图 2

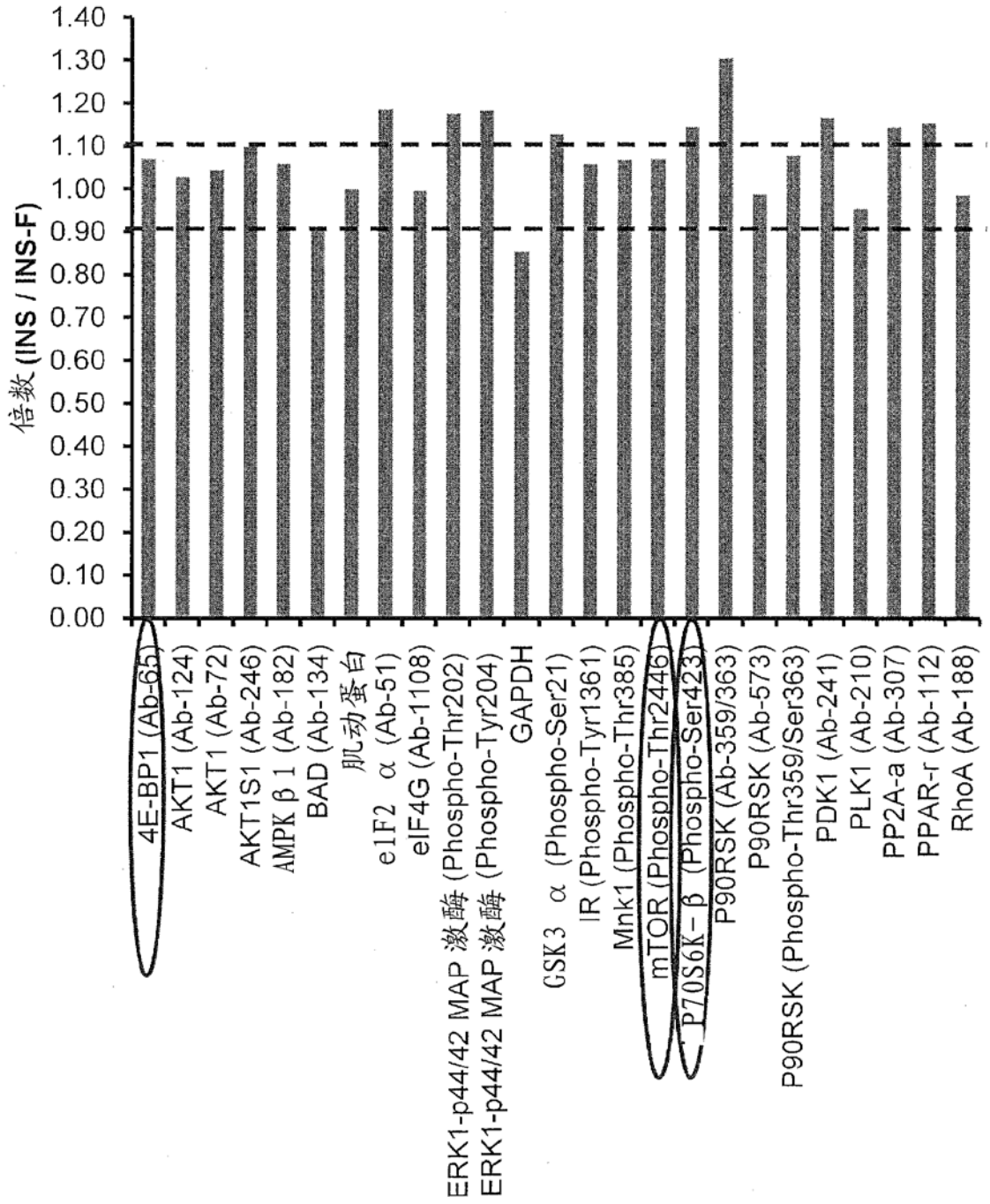

倍数 (INS / INS-F)
1.40
1.30
1.20
1.10
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
4E-BP1 (Ab-65)
AKT1 (Ab-124)
AKT1 (Ab-72)
AKT1S1 (Ab-246)
AMPK β 1 (Ab-182)
BAD (Ab-134)
肌动蛋白
e1F2 α (Ab-51)
eIF4G (Ab-1108)
ERK1-p44/42 MAP 激酶 (Phospho-Thr202)
ERK1-p44/42 MAP 激酶 (Phospho-Tyr204)
GAPDH
GSK3 α (Phospho-Ser21)
IR (Phospho-Tyr1361)
Mnk1 (Phospho-Thr385)
mTOR (Phospho-Thr2446)
P70S6K- β (Phospho-Ser423)
P90RSK (Ab-359/363)
P90RSK (Ab-573)
P90RSK (Phospho-Thr359/Ser363)
PDK1 (Ab-241)
PLK1 (Ab-210)
PP2A-a (Ab-307)
PPAR-r (Ab-112)
RhoA (Ab-188)

图 3

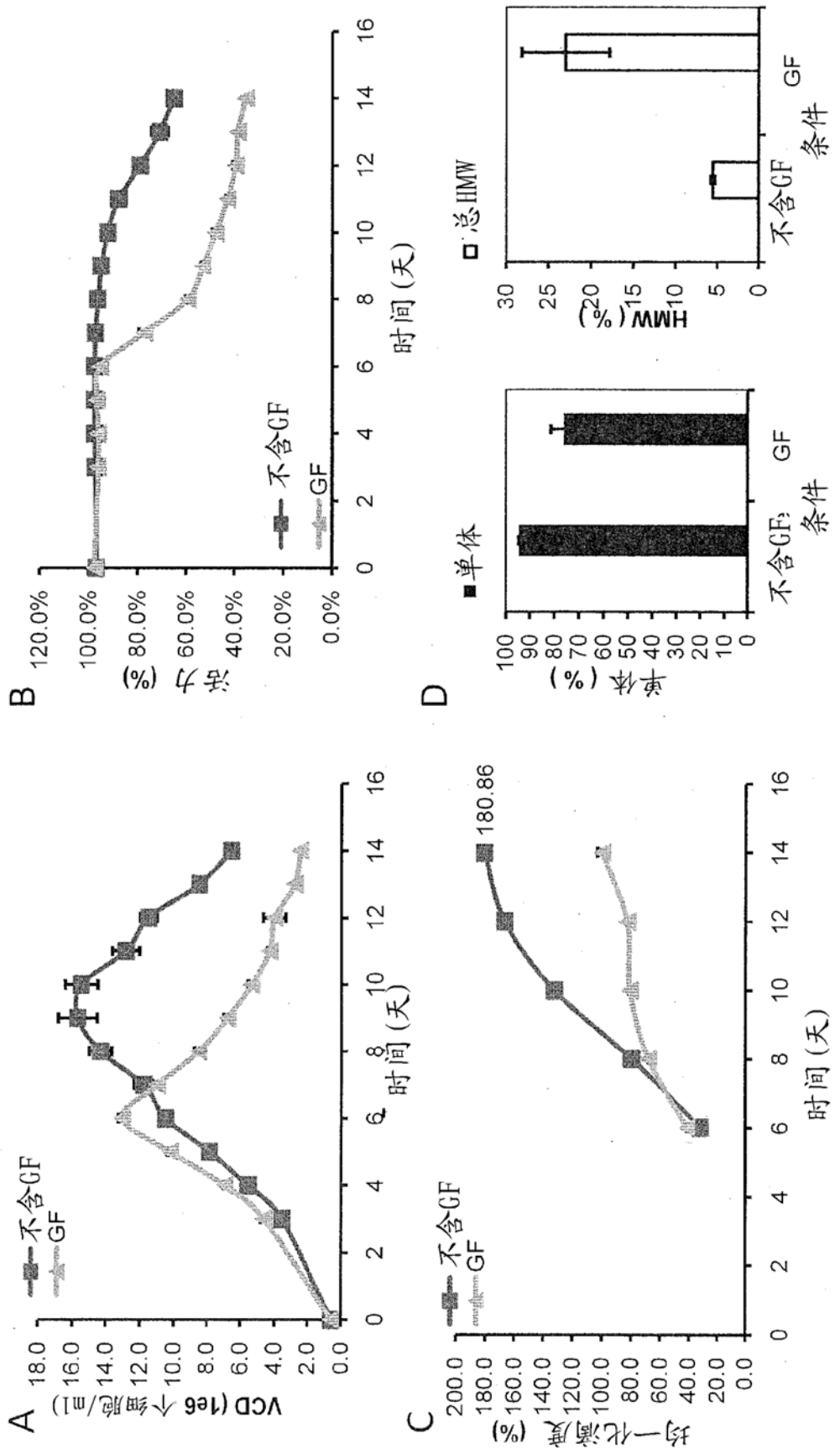

A
VCD (1e6 个细胞/ml)
不含GF
GF
时间 (天)
B
活力 (%)
不含GF
GF
时间 (天)
C
均一化滴度 (%)
180.86
不含GF
GF
时间 (天)
D
单体 (%)
单体
不含GF
GF
条件
HMW (%)
总HMW
不含GF
GF
条件

图 4

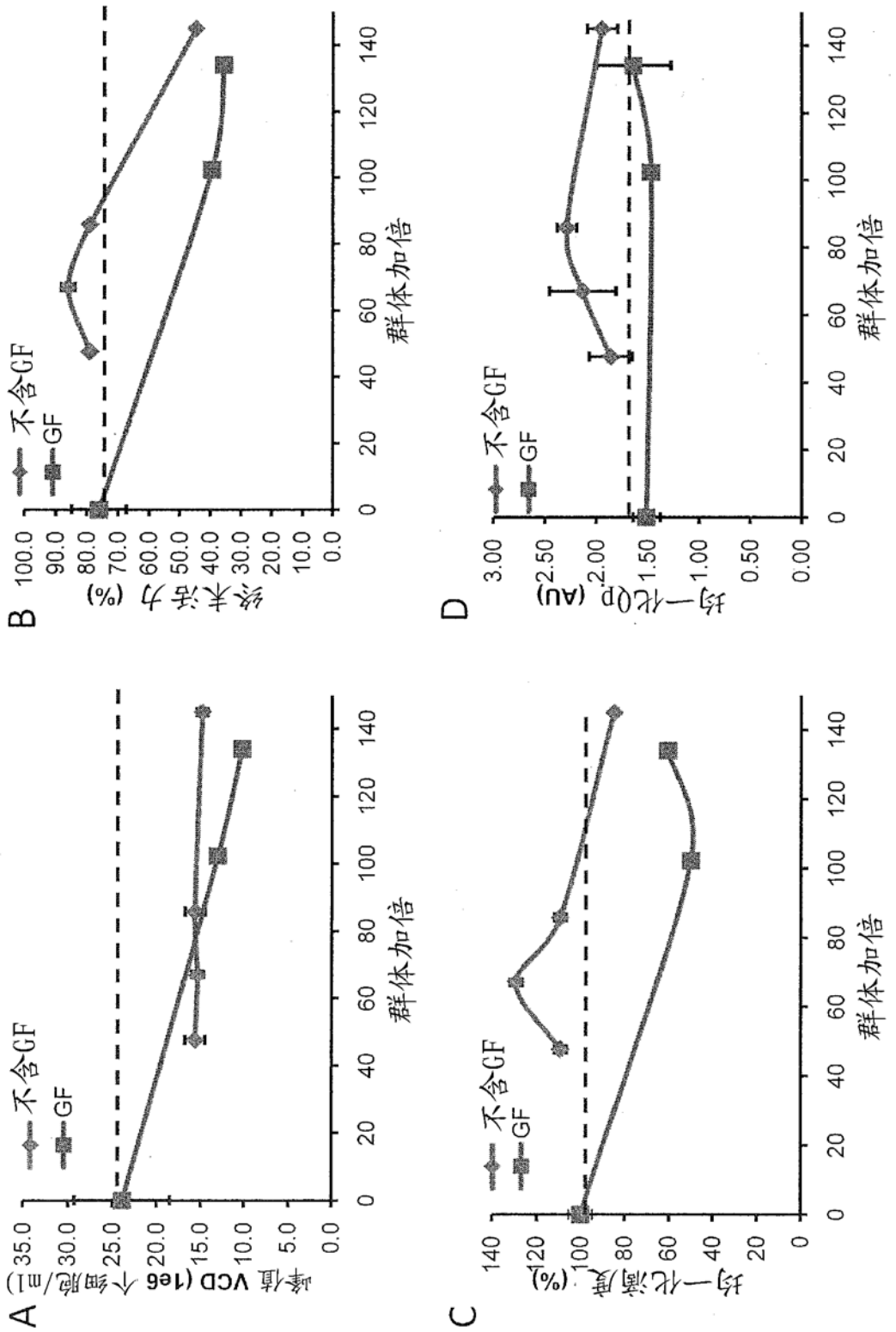

A
峰值 VCD (1e6 个细胞/ml)
群体加倍
不含GF
GF
B
终末活力 (%)
群体加倍
不含GF
GF
C
均一化活度 (%)
群体加倍
不含GF
GF
D
均一化QP (AU)
群体加倍
不含GF
GF

图 5

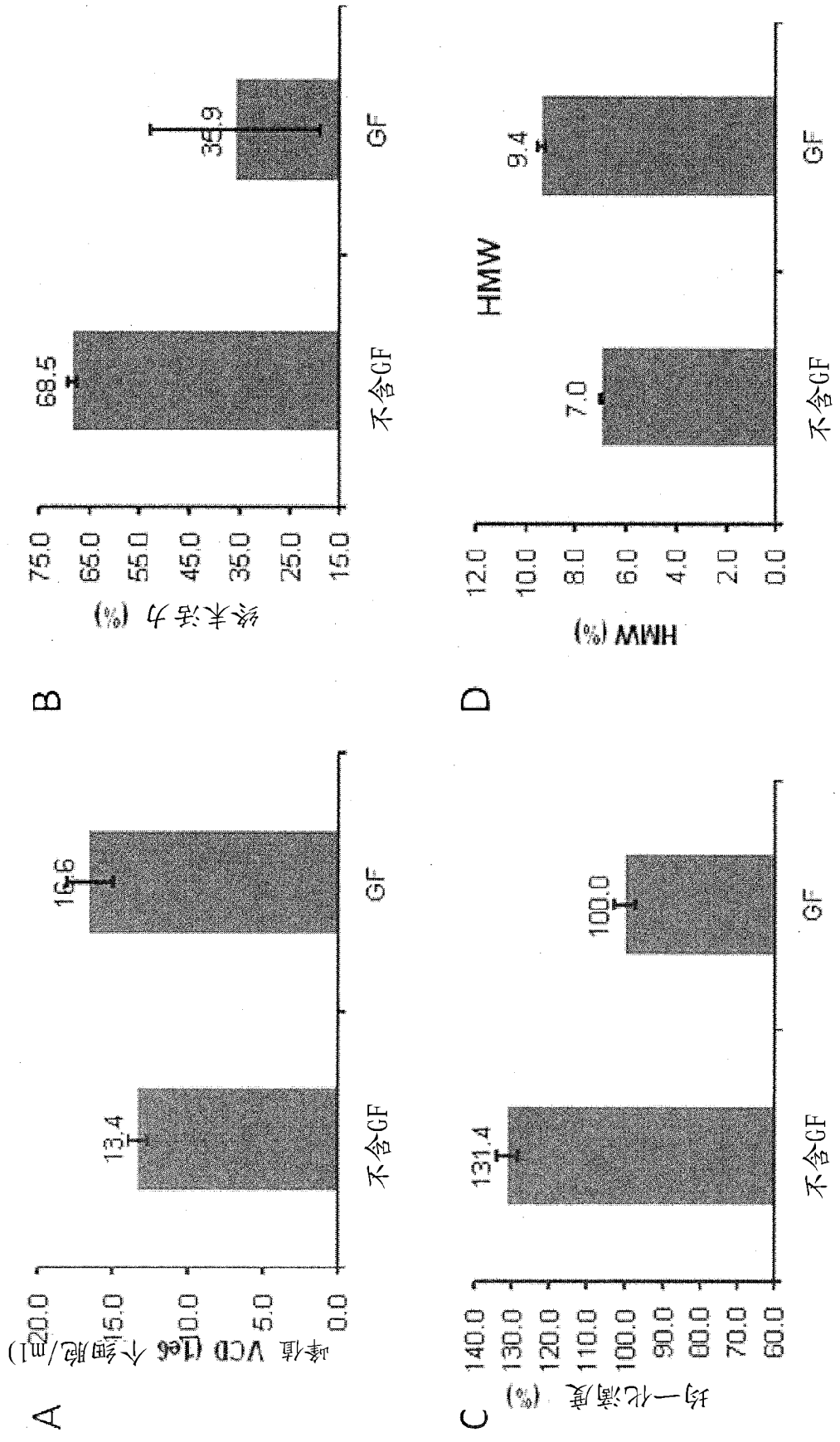

A
峰值 VCD (Le6 个细胞/ml)
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
13.4
16.6
不含GF
GF
B
终末活力 (%)
75.0
65.0
55.0
45.0
35.0
25.0
15.0
68.5
35.9
不含GF
GF
C
均一化滴度 (%)
140.0
130.0
120.0
110.0
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
131.4
100.0
不含GF
GF
D
HMW (%)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
HMW
7.0
9.4
不含GF
GF

图 6

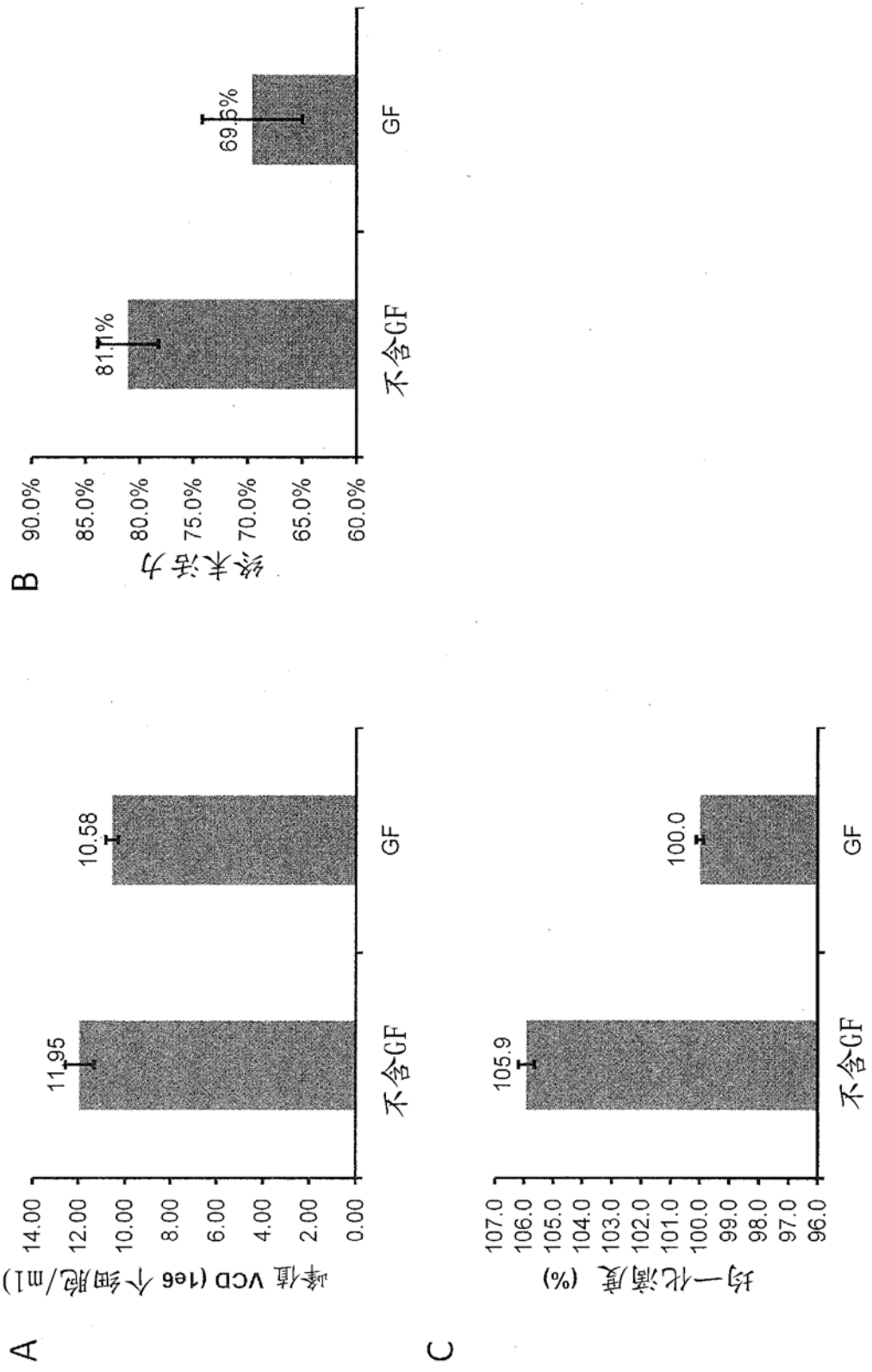

A
峰值 VCD (1e6 个细胞/ml)
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
11.95
10.58
不含GF
GF
B
终末活力
90.0%
85.0%
80.0%
75.0%
70.0%
65.0%
60.0%
81.1%
69.6%
不含GF
GF
C
均一化滴度 (%)
107.0
106.0
105.0
104.0
103.0
102.0
101.0
100.0
99.0
98.0
97.0
96.0
105.9
100.0
不含GF
GF

图 7

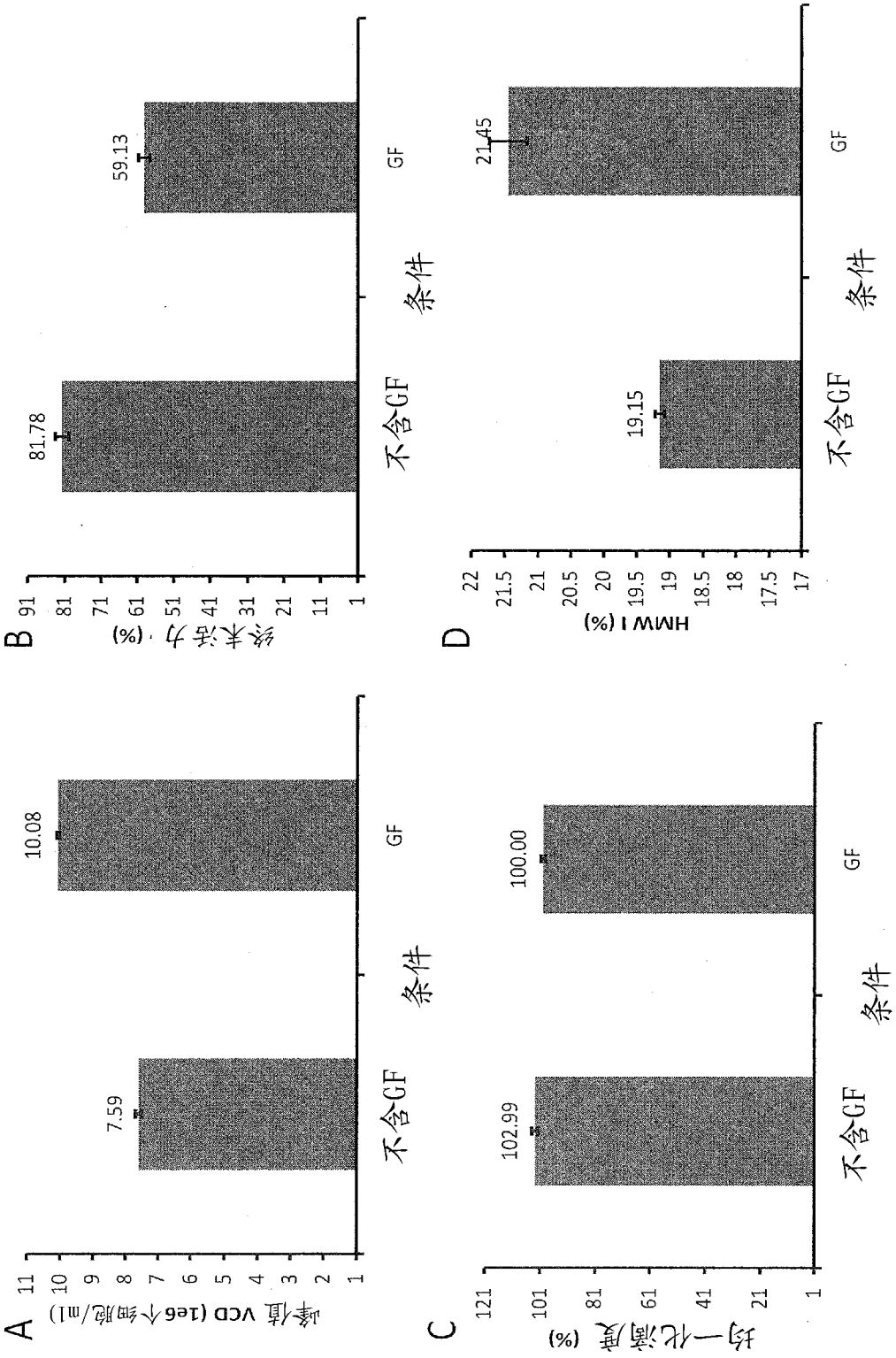

A
峰值 VCD (1e6个细胞/ml)
7.59
10.08
不含GF
GF
条件
B
终末活力 (%)
81.78
59.13
不含GF
GF
条件
C
均一化滴度 (%)
102.99
100.00
不含GF
GF
条件
D
HMW I (%)
19.15
21.45
不含GF
GF
条件

图 8

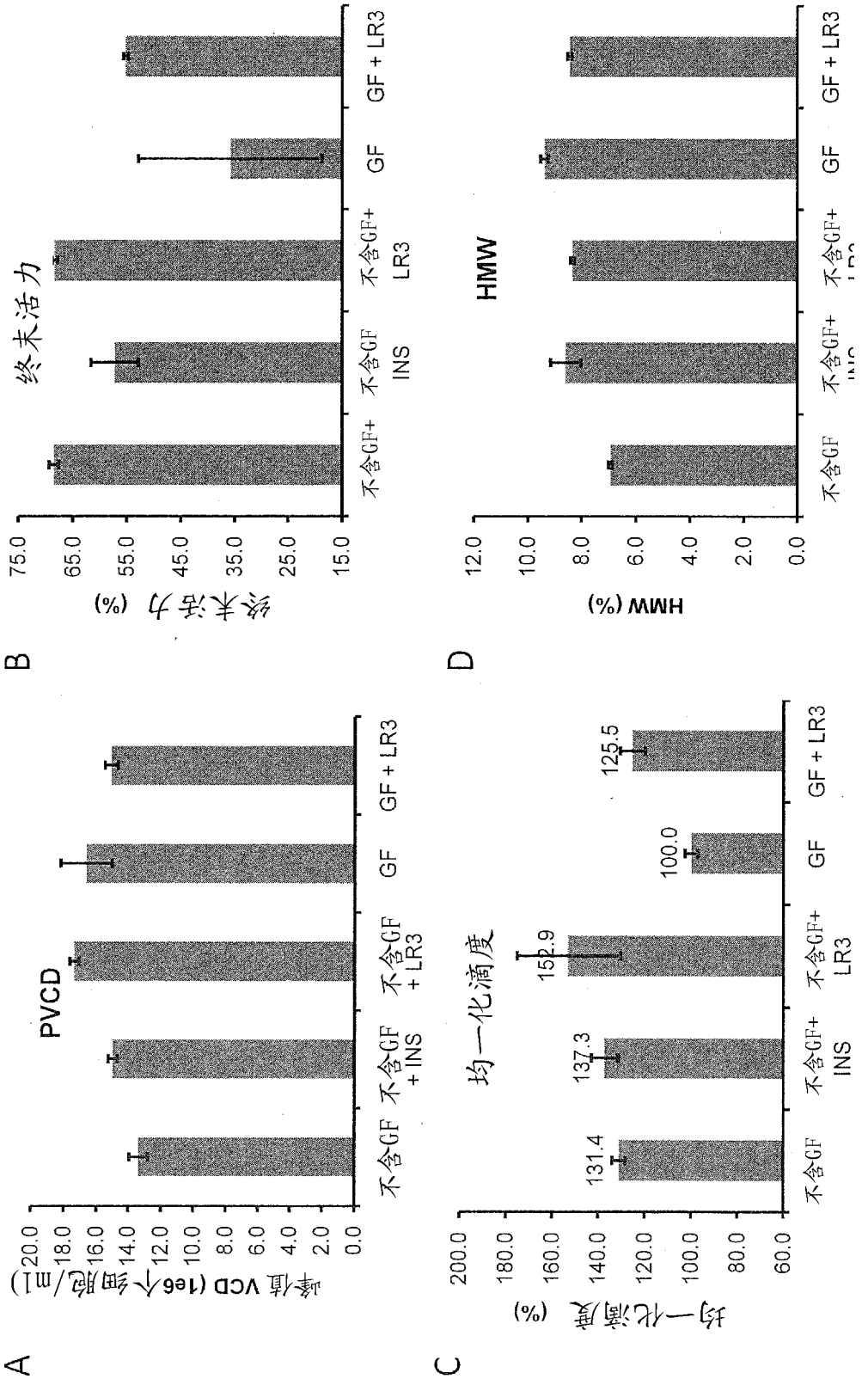

A
峰值 VCD (1e6个细胞/ml)
PVCD
不含GF
不含GF + INS
不含GF + LR3
GF
GF + LR3
B
终末活力 (%)
终末活力
不含GF+ INS
不含GF
不含GF+ LR3
GF
GF + LR3
C
均一化滴度 (%)
均一化滴度
131.4
137.3
152.9
100.0
125.5
不含GF
不含GF+ INS
不含GF+ LR3
GF
GF + LR3
D
HMW (%)
HMW
不含GF
不含GF+ INS
不含GF+ LR3
GF
GF + LR3

图 9

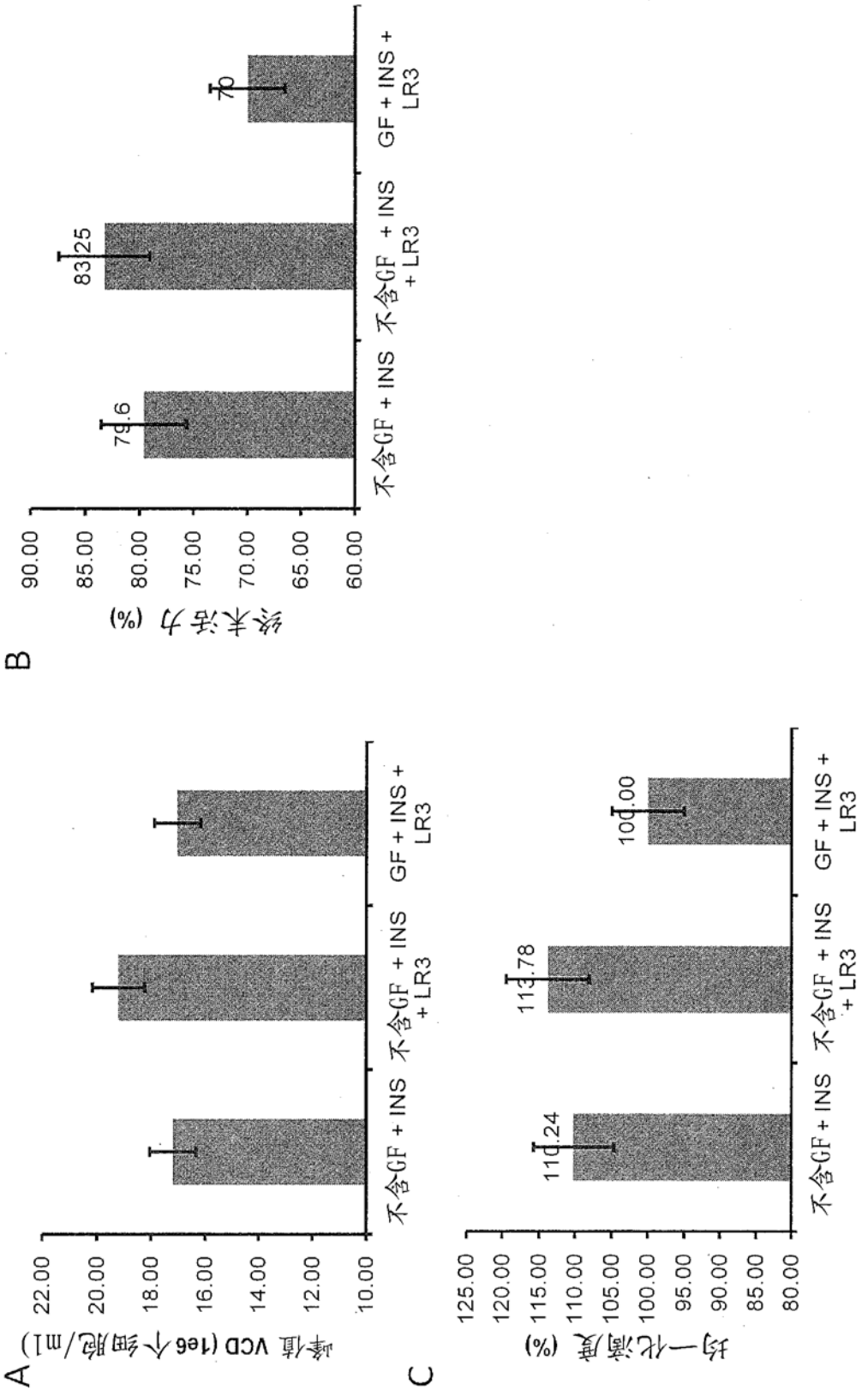

A
峰值 VCD (1e6 个细胞/ml)
22.00
20.00
18.00
16.00
14.00
12.00
10.00
不含GF + INS
不含GF + INS + LR3
GF + INS + LR3
B
终末活力 (%)
90.00
85.00
80.00
75.00
70.00
65.00
60.00
79.6
83.25
不含GF + INS
不含GF + INS + LR3
GF + INS + LR3
C
均一化滴度 (%)
125.00
120.00
115.00
110.00
105.00
100.00
95.00
90.00
85.00
80.00
110.24
113.78
100.00
不含GF + INS
不含GF + INS + LR3
GF + INS + LR3

图 10

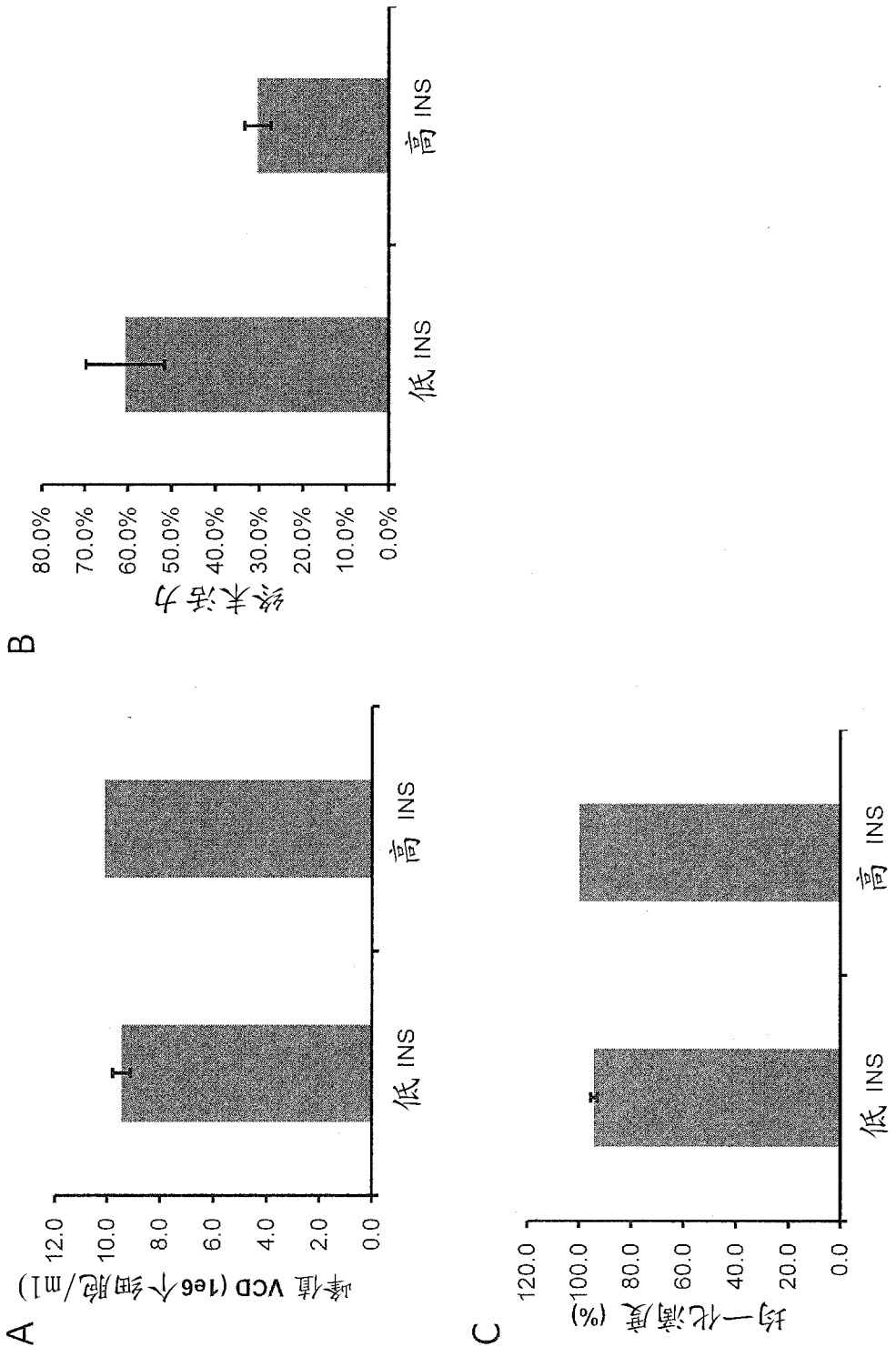

A
峰值 VCD (1e6个细胞/ml)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
低 INS
高 INS
B
终末活力
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
低 INS
高 INS
C
均一化滴度 (%)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
低 INS
高 INS

图 11

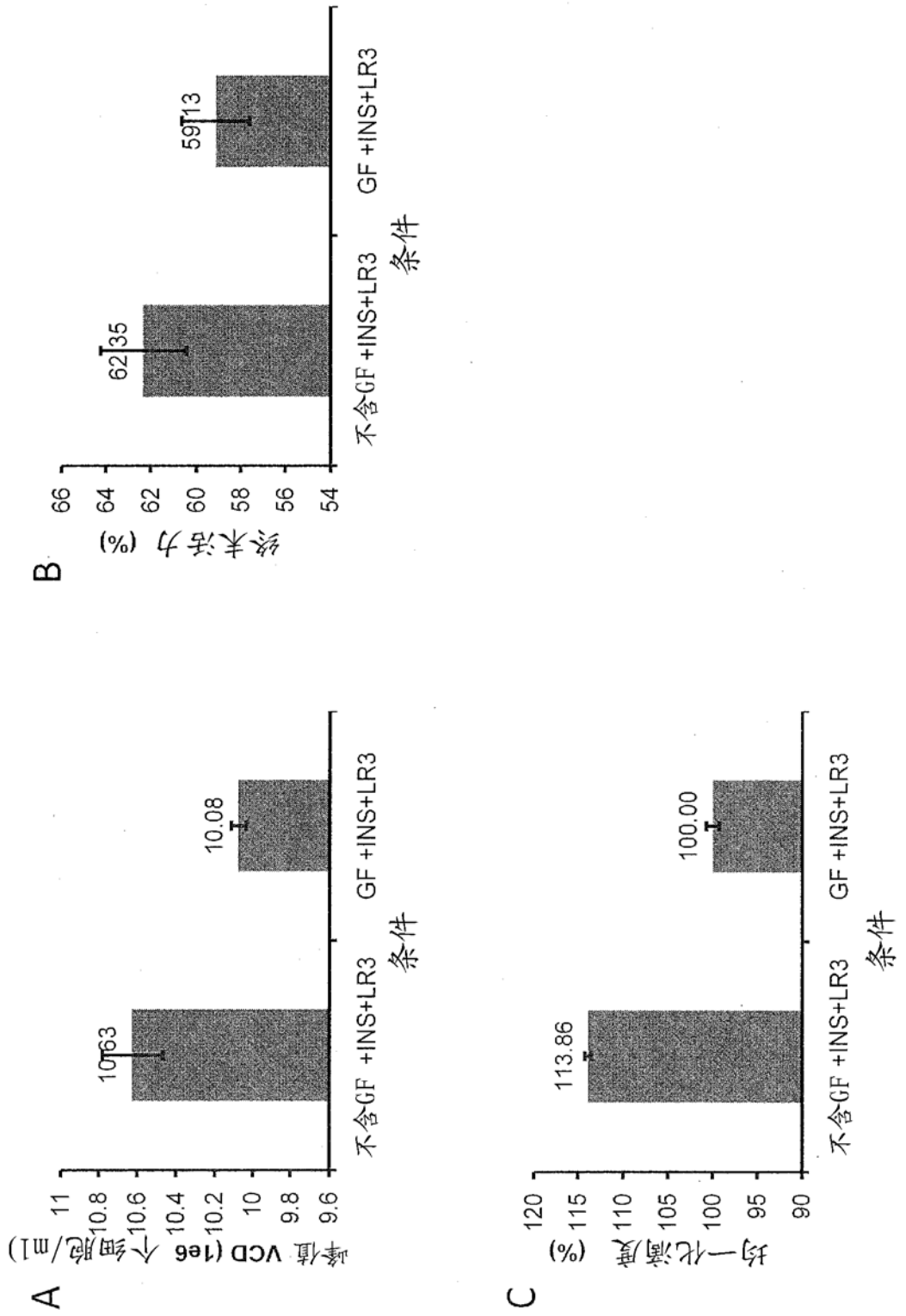

A
峰值 VCD (1e6 个细胞/ml)
11
10.8
10.6
10.4
10.2
10
9.8
9.6
10.63
10.08
不含GF +INS+LR3
GF +INS+LR3
条件
B
终末活力 (%)
66
64
62
60
58
56
54
62.35
59.13
不含GF +INS+LR3
GF +INS+LR3
条件
C
均一化滴度 (%)
120
115
110
105
100
95
90
113.86
100.00
不含GF +INS+LR3
GF +INS+LR3
条件

图 12

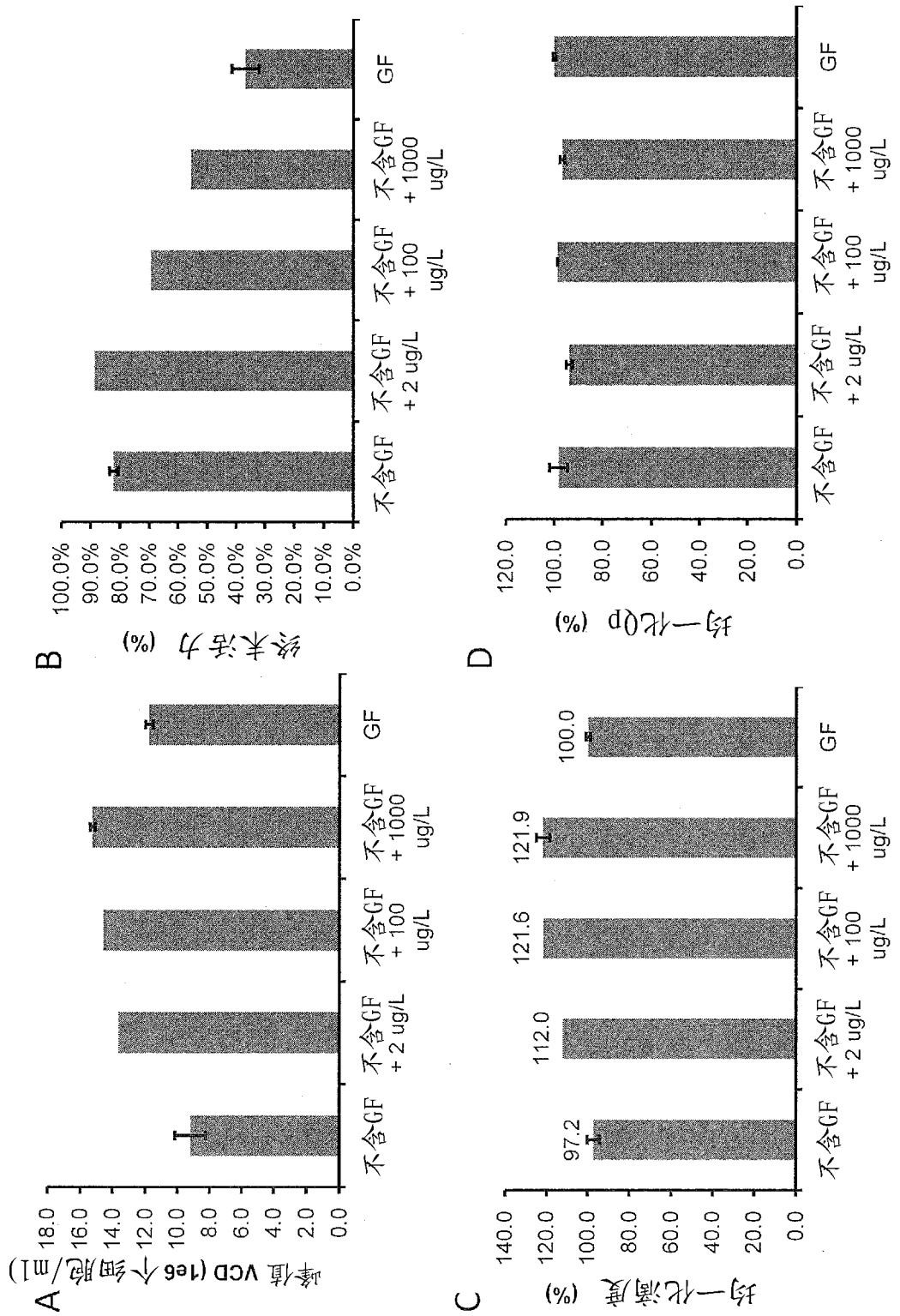

A
峰值 VCD (1e6 个细胞/ml)
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
不含GF
不含GF + 2 ug/L
不含GF + 100 ug/L
不含GF + 1000 ug/L
GF
B
终末活力 (%)
100.0%
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
C
均一化滴度 (%)
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
97.2
112.0
121.6
121.9
100.0
D
均一化Qp (%)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0

图 13

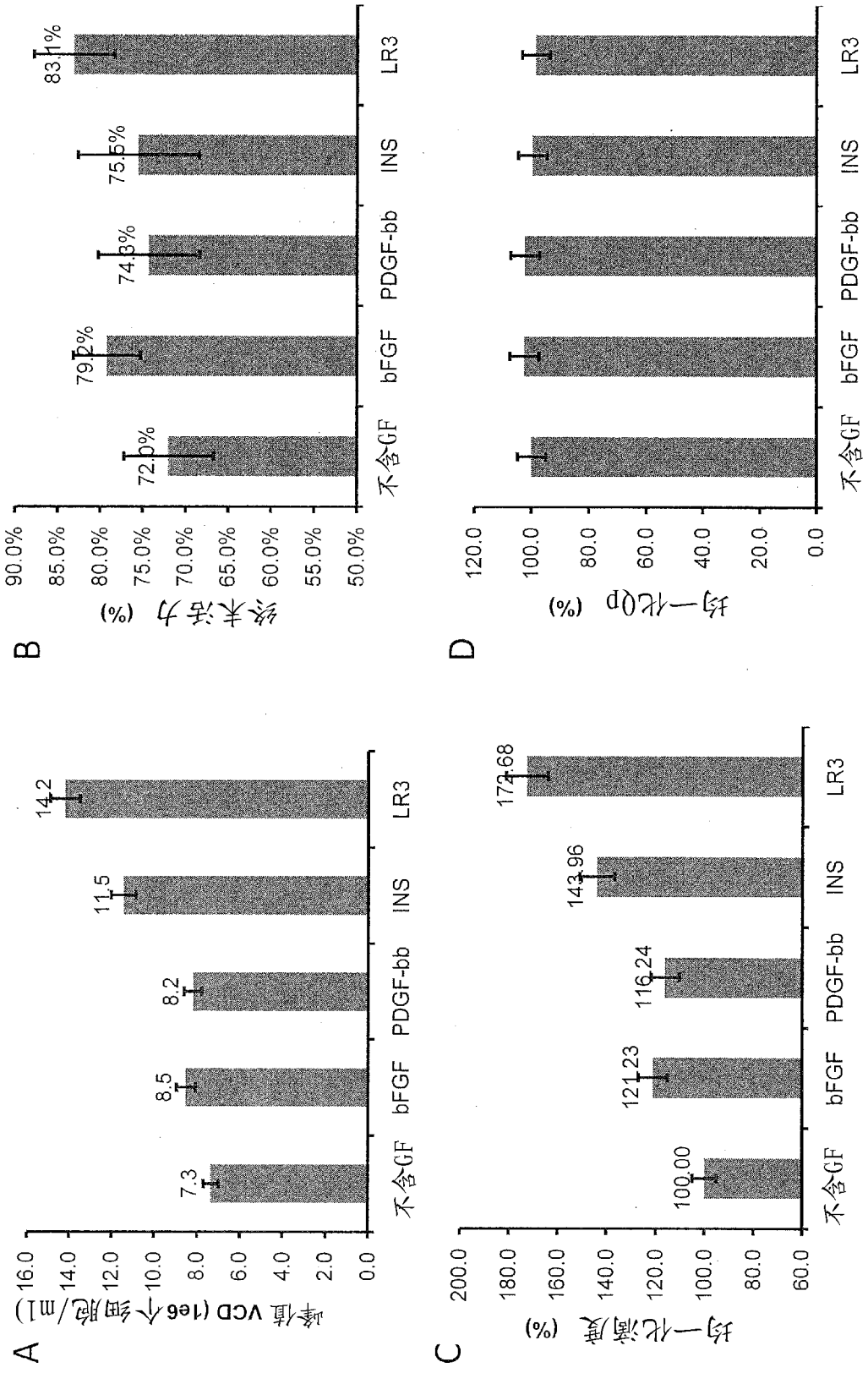

A
峰值 VCD (1e6 个细胞/ml)
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
7.3
8.5
8.2
11.5
14.2
不含GF
bFGF
PDGF-bb
INS
LR3
B
终末活力 (%)
90.0%
85.0%
80.0%
75.0%
70.0%
65.0%
60.0%
55.0%
50.0%
72.0%
79.2%
74.3%
75.5%
83.1%
C
均一化滴度 (%)
200.0
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
100.00
121.23
116.24
143.96
174.68
D
均一化Qp (%)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0

图 14

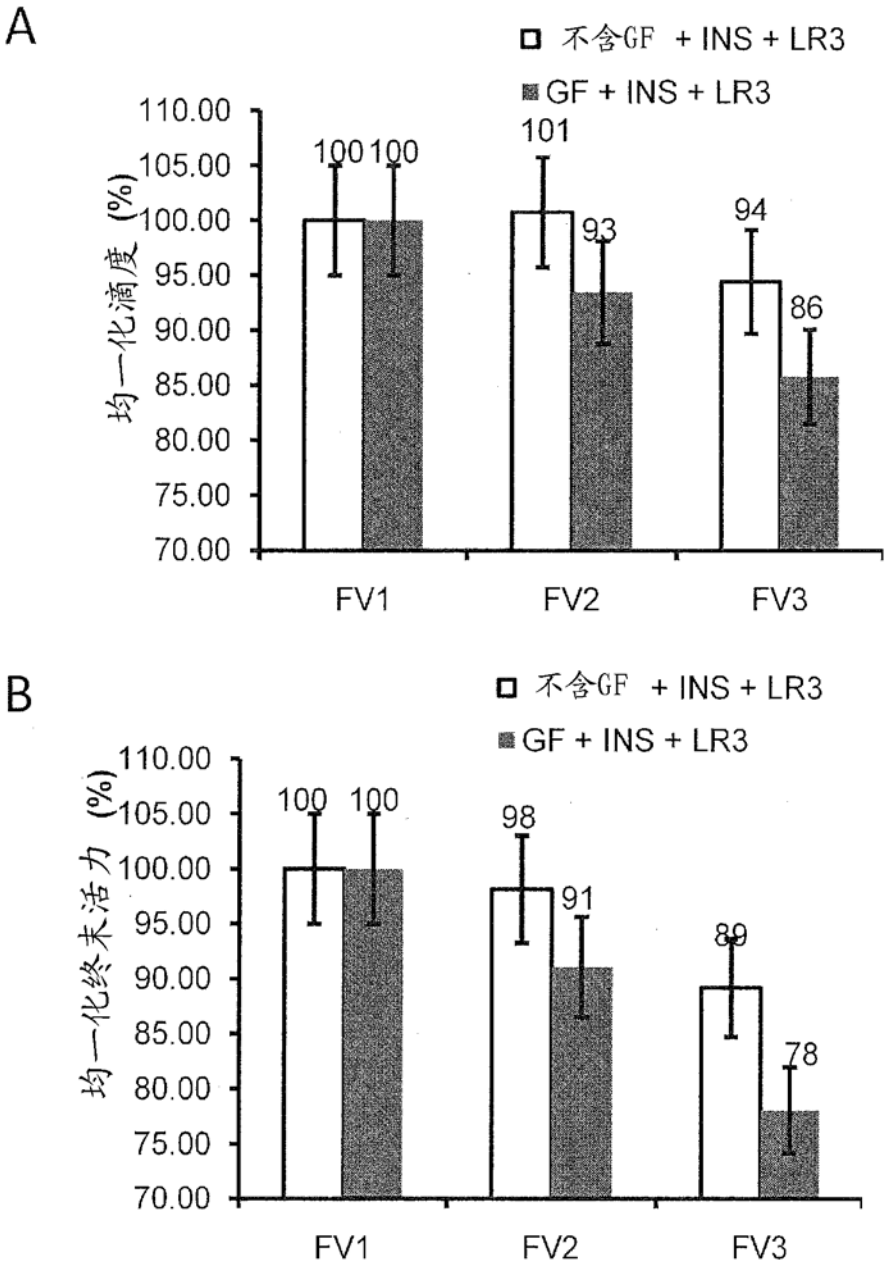

A
不含GF + INS + LR3
GF + INS + LR3
均一化滴度 (%)
110.00
105.00
100.00
95.00
90.00
85.00
80.00
75.00
70.00
100 100
101
93
94
86
FV1
FV2
FV3
B
不含GF + INS + LR3
GF + INS + LR3
均一化终末活力 (%)
110.00
105.00
100.00
95.00
90.00
85.00
80.00
75.00
70.00
100 100
98
91
89
78
FV1
FV2
FV3

图 15

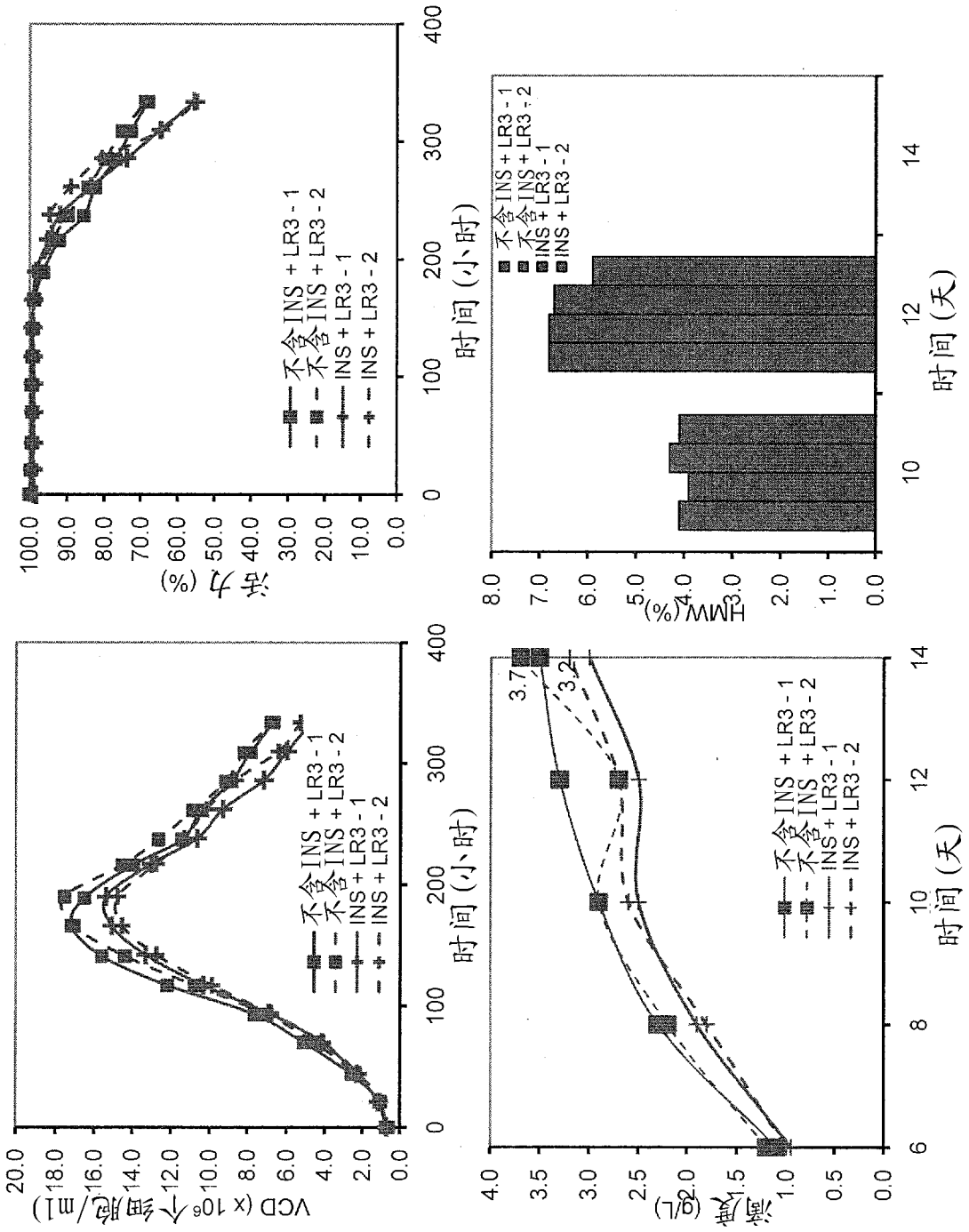

活力 (%)
时间 (小时)
不含INS + LR3 - 1
不含INS + LR3 - 2
INS + LR3 - 1
INS + LR3 - 2
HMW (%)
时间 (天)
VCD (x 10⁶ 个细胞/ml)
滴度 (g/L)
3.7
3.2

图 16