



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102858952 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201180021024. X

US 5232848 A, 1993. 08. 03, 全文.

(22) 申请日 2011. 04. 25

WO 2006/113629 A1, 2006. 10. 26, 全文.

(30) 优先权数据

WO 2006/026445 A1, 2006. 03. 09, 第 45-49

61/327, 836 2010. 04. 26 US

页表 1 和表 2.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

SCOTT 等 . FEEECT OF CHOLINE, HIGH

2012. 10. 26

POTASSIUM, AND LOW SODIUM ON NUMBER OF

(86) PCT国际申请的申请数据

NEURONS IN CULTURES OF DISSOCIATED CHICK

PCT/EP2011/056508 2011. 04. 25

GANGLIA. 《EXPERIMENTAL NEUROLOGY》. 1971, 第

31 卷 (第 2 期), 摘要部分.

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 张锦广

W02011/134920 EN 2011. 11. 03

(73) 专利权人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C·莱斯特 P·迈斯纳 J·施密特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 凌立 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 5/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2006/026445 A1, 2006. 03. 09, 第 45-49

页表 1 和表 2.

权利要求书1页 说明书14页 附图3页

(54) 发明名称

改进的细胞培养基

(57) 摘要

本申请描述用于哺乳动物细胞培养以及多肽产生的优化培养基。该细胞培养基的特征在于低钠钾离子比,本申请还涉及用这类细胞培养基产生多肽的方法。在另一方面,该多肽产生方法还可以包括温度变动和/或pH变动来进一步优化生长和产物产率。

1. 用于培养哺乳动物细胞的无血清细胞培养基,其特征在于钠离子与钾离子的摩尔比在 10:1 和 1:1 之间,培养基中的离子含量低于 250mM。
2. 权利要求 1 的细胞培养基,其中所述培养基是无蛋白质培养基。
3. 权利要求 1 或 2 的细胞培养基,其中所述钠离子与钾离子的摩尔比在 8:1 和 6:1 之间。
4. 权利要求 1 的细胞培养基,其中钠离子的浓度在 50mM 和 90mM 之间。
5. 权利要求 1 的细胞培养基,其中钾离子的浓度在 8mM 和 12mM 之间。
6. 权利要求 1 的细胞培养基,其中总氨基酸浓度在 40mM 和 100mM 之间。
7. 权利要求 1 的细胞培养基,其中总离子浓度与总氨基酸浓度间的摩尔比在 1.9 和 4 之间。
8. 用于产生重组多肽的方法,其包括在权利要求 1 至 7 的任一项中定义的培养基中培养哺乳动物细胞,并表达所述重组多肽。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述培养条件包括至少一次温度变动和 / 或至少一次 pH 变动。
10. 权利要求 8 或 9 的方法,其中通过补料分批方法来进行培养。
11. 权利要求 8 的方法,其中所述产生的多肽是糖基化的。
12. 权利要求 8 的方法,其中所述多肽是抗体或抗体片段。
13. 权利要求 8 的方法,其中所述哺乳动物细胞选自 CHO 细胞、HEK 细胞和 SP2/0 细胞。
14. 用于产生权利要求 1 的细胞培养基的方法,其中将不同的成分相互混合。
15. 权利要求 14 的方法,其中按 7mM 和 15mM 之间的浓度加入氯化钠。
16. 权利要求 14 或 15 的方法,其中按 8mM 和 12mM 之间的浓度加入氯化钾。

改进的细胞培养基

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术的一般领域,尤其涉及细胞的培养及其在以工业规模生产多肽中的用途。

[0002] 本发明提供细胞培养基,其适合用于培养具有高细胞存活率 (viability) 的细胞,优选如 CHO 细胞的哺乳动物细胞,其特征在于它们的钠离子与钾离子的摩尔比。在用于尤其是通过在哺乳动物细胞培养系统中重组表达多肽来产生多肽时,尤其是以工业规模来产生多肽时,本发明的细胞培养基允许获得高多肽生产力。

背景技术

[0003] 在过去二十年中,用重组技术制备多肽已发展为标准方法。通过克隆编码各多肽的基因、然后用该待表达的基因转化适宜的表达宿主、最后产生和纯化所获得的重组多肽产物来获得重组多肽提供了一类全新的通过生物学设计和产生的药物。

[0004] 在重组 DNA 技术后使用生物工程领域中发展的产生方法,制药产业中已制备了数目越来越多的药物活性化合物。

[0005] 这类生物产物包括单克隆抗体,其已发展为包括自身免疫病、炎性障碍、免疫抑制、肿瘤学等的多种医学领域中重要的治疗选择。

[0006] 这类生物来源药物的发展需要以工业规模生产,从而提供大量重组多肽。优选的表达系统是哺乳动物细胞培养物,其优于大多数其他基于昆虫细胞、酵母等的真核系统,或甚至传统的原核表达系统。

[0007] 但是,尤其是在工业规模,哺乳动物细胞培养包括巨大的挑战。用于哺乳动物细胞培养的生产设施需要彻底优化许多方法条件。

[0008] 用于控制总体产生方法的最重要的方法参数之一是在其中培养细胞并进行多肽产生的培养基。适宜的细胞培养基必须为细胞培养物提供所有必需营养物,这在不向培养基中加入动物来源的成分(如血清或蛋白质,例如生长因子)时尤其困难。

[0009] 因此,研发了多种不同的细胞培养基。在一些情况下,焦点在一般组成上,且提出了具有多种不同物质的培养基(US5 122 469,EP0 481 791,EP0 283 942)。在其他情况下,提出了用特定成分改善细胞培养。主要目标是改善细胞的生长或存活,或改善重组表达的多肽的数量和质量。

[0010] 现有技术文件中提到的具体方面是特定痕量离子(例如 WO 02/066603,EP0 872 487,EP1 360 314 A2)、诸如抗坏血酸的维生素(例如 US6 838 284)、糖类(EP1 543 106)或特定氨基酸的含量与其他特征组合(例如 EP0 501 435,US5 830 761,US7 294 484)的贡献等。

[0011] 细胞培养基中的主要离子及其浓度基本保持恒定,且未被考虑和改变。所有经典的培养基类型(例如 DMEM、DMEM/F12、BME 或 RPMI 1640)都使用浓度范围相对窄且固定的大量离子(一般而言)及单价阳离子 Na^+ 和 K^+ (具体而言)。这与以下事实一致,大量离子(一般而言)及单价阳离子 Na^+ 和 K^+ (具体而言)的离子平衡是几乎所有哺乳动物细胞的

普遍特性。

[0012] 更具体而言,钠离子和钾离子的跨膜梯度是哺乳动物细胞的基本特性,细胞内具有高浓度的钾离子,而细胞外具有高浓度的钠离子。钠钾泵是细胞膜的主要离子泵之一,其是生电泵,且有助于建立和维持钠和钾的跨膜离子梯度 (Kaplan, Membrane cation transport and control of proliferation of mammalian cells. Annu Rev Physiol. ;40: 19-41 (1978))。该泵使用约 30% 的细胞能量,是细胞的主要耗能过程之一。许多基本的生物化学过程与钠离子的电化学梯度偶联,例如 Na^+/Ca^+ 交换或氨基酸转运入细胞。因此,细胞外的钠离子和钾离子浓度是具有重要意义的参数,其影响这些离子的跨膜梯度和细胞的基本状态。

[0013] 根据哺乳动物细胞内部和外部的典型钠离子浓度 (Alberts 等, Molecular Biology of the Cell (1994)), 大多数情况下,选择约 145mM 的钠浓度,同时选择约 5mM 的钾离子浓度。对于大多数培养基类型,这导致钠离子和钾离子之间的比值在约 20-30 的范围内 (见下文表 1 和例如 US5135866)。

[0014] 只有很少的现有技术文件在描述适合用于哺乳动物细胞培养或重组蛋白质产生的细胞培养基时提到了钠离子与钾离子的具体比值。这些文件提出了具有特别高的比值的培养基组合物,US 5232848 中在约 30.7 的高范围内,或在约 25 和 35 之间的范围内,从而达到甚至更高的值 (EP0 283 942, EP0 389 786)。其他培养基,如 HAM' s-F12 或 US 2008/0261259 中提出的确定成分的动物细胞培养基也明确提出了更高的值 (例如在 US 2008/0261259 中为 27.9 至 57.5)。只有非常少的文件公开了具有低于 20 的钠钾离子比的培养基,如 11.5-30 (US7 294 484) 或约 15 的比值 (US6 180 401)。这些文件仍使用高于 10 的比值,且未将具体优势分配给将该参数变为所提到的值。

[0015] 除了与特定离子间的离子平衡相关的作用外,还应考虑主要离子对培养基的总体重量摩尔渗透压浓度的贡献。大多数常规培养基 (例如 DMEM、MEM α 或 Fischer' s 培养基) 的特征在于高量的氯化钠。

[0016] WO 02/101019 研究培养基中高含量的葡萄糖与利用更高重量摩尔渗透压浓度的组合。通过减少或甚至彻底去除诸如氯化钠的物质,从而维持重量摩尔渗透压浓度在给定水平,达到了约 2-40g/l 之间的高葡萄糖浓度。

[0017] 鉴于以上挑战和现有不足,工业生物技术领域中存在对改进的培养基的持续需要,该培养基允许以工业规模产生重组多肽。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供具有降低的 Na^+/K^+ 比 (即,低于约 10 的值的 Na^+/K^+ 比) 的细胞培养基。这是通过减少总钠离子数目和增加总钾离子含量的方式达到的。已发现,这种低比值产生了几种有益作用,尤其是改善哺乳动物细胞的存活率、生长和生产力。

[0020] 因此,本发明提供用于哺乳动物细胞的培养及多肽产生的优化细胞培养基,其特征在于钠离子与钾离子 (测量为摩尔含量) 的比值在约 10 : 1 和约 1 : 1 之间,备选地在约 8 : 1 和约 6 : 1 之间。此特征的实现可以包括约 50mM 和约 90mM 之间的钠离子浓度及约 8mM 和约 12mM 之间的钾离子浓度。

[0021] 在另一方面,该细胞培养基的优化包括选择约 40mM 和约 100mM 之间、备选地约 50mM 和约 100mM 之间的总氨基酸含量。此特征可以与总离子浓度和总氨基酸浓度之间约

1.9 至约 4 的特别低的摩尔比组合。

[0022] 在另一方面,本发明提供用本发明的细胞培养基培养哺乳动物细胞来产生希望的重组多肽的方法。该方法涉及在本发明的培养基中培养哺乳动物细胞,并表达重组多肽。

[0023] 该方法的一些实施包括培养条件,其中在培养期间变动温度和/或培养基的 pH 至少一次。作为另一选择,通过补料分批方法来完成流加。

[0024] 希望的多肽产物包括糖基化的多肽,且尤其是抗体和抗体片段。

[0025] 用于本发明的方法的哺乳动物细胞优选选自 CHO 细胞、HEK 细胞和 SP2/0 细胞。

[0026] 在另一方面,本发明涉及用于产生本发明的细胞培养基的方法,其中,将不同的成分相互混合。具体而言,向培养基组合物加入的氯化钠的浓度可以在约 7mM 和约 15mM 之间。向培养基组合物加入的氯化钾的浓度可以在约 8mM 和约 12mM 之间。

[0027] 附图简述

[0028] 参考以下实施例和附图将可以更好地理解本发明。但是,实施例并非旨在限制本发明的范围。

[0029] 图 1 作为培养时间的函数显示摇瓶培养物中产生 mAb1 的 CHO 细胞克隆的活细胞密度(见实施例 1),使用本发明所述具有降低的 Na^+/K^+ 比的培养基。此外,还描绘了恒定温度对温度变动的作用。

[0030] 图 2 显示使用具有降低的 Na^+/K^+ 比的培养基的产生 mAb1 的 CHO 细胞的存活率(见实施例 1),及第 3 天恒定温度对温度变动的作用。

[0031] 图 3 作为培养时间的函数显示具有温度变动和无温度变动的产生 mAb1 的 CHO 细胞克隆的摇瓶培养物的产物效价(见实施例 1)。细胞培养在本发明的具有降低的 Na^+/K^+ 比的培养基中。

[0032] 图 4 显示产生 mAb2 的克隆中乳酸浓度随培养时间的变化(见实施例 2)。细胞培养在本发明的具有降低的 Na^+/K^+ 比的培养基中。

[0033] 图 5 作为培养时间的函数显示具有 CHO 细胞克隆的 300L 生物反应器中的活细胞密度。培养条件包括温度梯度(第 5 天)及由具有设定点和死区的 pH 调节引起的两次 pH 变动(也见实施例 2)。细胞培养在本发明的具有降低的 Na^+/K^+ 比的培养基中。

[0034] 图 6 作为培养时间的函数显示具有 CHO 细胞克隆的 300L 生物反应器中的产物效价。该方法将温度变动与两次 pH 变动组合(也见图 5 和实施例 2)。细胞培养在本发明的具有降低的 Na^+/K^+ 比的培养基中。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明的细胞培养基用于培养哺乳动物细胞,优选 CHO 细胞、HEK 细胞和 SP2/0 细胞,且用于以这类细胞产生重组多肽。尤其优选 CHO 细胞。术语细胞培养基指营养物的水溶液,其可以用于培养细胞延长的时间。通常,细胞培养基包含以下成分:能量来源,其通常将是糖类化合物,优选葡萄糖;氨基酸,优选碱性组的氨基酸,包括所有必需氨基酸;维生素和/或以低浓度需要的其他有机化合物;游离脂肪酸;和无机化合物,包括痕量元素,无机盐;缓冲化合物;及核苷和碱基。

[0037] 本发明的细胞培养基可以用于多种细胞培养方法。可以以贴壁培养,例如以单层培养,或优选以悬浮培养来进行细胞的培养。

[0038] 由于安全性和污染问题,细胞培养基在制药工业领域中,例如在产生治疗活性重

组多肽中的用途一般不允许使用任何生物来源的材料。因此,本发明的细胞培养基优选是无血清和 / 或无蛋白质培养基。术语“无血清和 / 或无蛋白质培养基”表示化学成分完全确知的培养基,其不包含来自动物来源的添加剂,如组织水解物,例如胎牛血清等。此外,还优选不向本发明的细胞培养物中加入蛋白质,尤其是生长因子,如胰岛素、转铁蛋白等。优选地,本发明的细胞培养基也不补充水解蛋白质来源,如大豆、小麦或稻蛋白胨或酵母水解物等。

[0039] 调节培养基的重量摩尔渗透压浓度和 pH 至允许细胞生长的值为例如约 pH 6.8 和约 pH 7.2 之间的值。开始培养时,培养基的重量摩尔渗透压浓度通常在约 280mOsm 和约 365mOsm 之间,但也可以在培养及加入流加溶液期间逐渐增加至低于 600mOsm/kg 或约 600mOsm/kg 的值。优选地,本发明的培养基具有约 285mOsm/kg 和约 365mOsm/kg 之间的初始重量摩尔渗透压浓度。

[0040] 在细胞存活和生长的范围内选择细胞培养的温度。用于细胞培养的典型温度在约 30°C 和约 38°C 之间。例如,细胞最初在约 36°C 至约 37°C 的温度下培养,该温度最适于 CHO 细胞。但是,精确的温度可以调节至细胞的需要,且还可以在培养期间改变,以允许它们最佳的存活率、生长或产生。

[0041] 本发明的第一方面涉及细胞培养物中钠离子和钾离子之间的离子平衡。本发明描述了钠离子与钾离子的摩尔比,其在约 10 : 1 和约 1 : 1 之间。在本发明的其他实施中,在约 9 : 1 和约 5 : 1 之间选择该比值。备选地,该比值在约 8 : 1 和约 6 : 1 之间。

[0042] 此处通过它们的摩尔含量来定义钠离子和钾离子的浓度及它们的比值。通过在加入各种盐并使其溶解在培养基溶液中之后计算生长培养基中这些离子的总数目来确定钠离子和钾离子的浓度。

[0043] 为了达到所需的钠浓度,通常向培养基中加入不同的盐。常用的钠盐是例如 NaCl、磷酸二氢钠或磷酸氢二钠盐、碳酸钠、柠檬酸钠、痕量离子(例如亚硒酸钠),但不限于这些实例。为调节 pH 而向培养基中加入的碱氢氧化钠 (NaOH) 对钠离子的总含量也有贡献。在这方面,术语离子指解离状态。因此,计算离子的摩尔含量意味着考虑该离子的化合价。因此,向培养基中加入 1mM 氯化钠 (NaCl) 将贡献 1mM 的钠离子,而 1mM 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 将相应地贡献 2mM 的钠离子。根据本发明,用于培养基的钠浓度在约 50mM 和约 90mM 之间。备选地,选择钠离子浓度为约 65mM 至约 85mM。

[0044] 用于培养基的钾盐通常是 KCl,但也可以包括例如 K_2SO_4 或磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。钾盐不限于这些具体实例。备选地,用于培养基的钾浓度在约 8mM 和约 12mM 之间,或约 10.7mM。

[0045] 表 1 显示传统上用来培养哺乳动物细胞的培养基的实例。这些经典培养基(如 DMEM、DMEM/F12、BGJ 等)具有特别高的 Na/K 离子比。

[0046] 本发明的培养基的特征在于低于约 10 : 1 的特别低的 Na/K 比(见表 2)。本发明的培养基适合用于培养 CHO 及其他哺乳动物细胞,且显示改善的细胞生长和 / 或允许改善的多肽产生。这类培养基的两个实例显示在表 3 中,其描述了两个培养基实例的组成及可以如何达到低 Na/K 比。钠离子与钾离子的低比值与其他培养基特征之间的协同效应对细胞生长和重组蛋白质产生甚至具有附加的有利作用。

[0047] 除钠离子和钾离子的具体浓度及其具体比值外,本培养基的特征还在于向培养基

成分的混合物中加入浓度特别低的氯化钠 (NaCl)。优选地,使用约 7mM 至约 15mM 的浓度。此低量的氯化钠是不常见的。在本发明的一些实施中,氯化钠浓度 (以 mM 表示) 甚至低于所加入的各钾盐的浓度 (以 mM 表示)。此外,本发明的培养基通常显示低总含量的氯离子。如表 2 的实例所示,这导致初始氯浓度在约 36mM 和 46mM 之间。大多数情况下,诸如 NaCl 或 CaCl_2 的无机盐促成此值,但诸如氯化胆碱或氨基酸 (例如 L- 组氨酸盐酸或 L- 赖氨酸盐酸) 的培养基成分也可以增加其总浓度。

[0048] 本发明的培养基组合物的另一优势是低 Na/K 摩尔比与约 40mM (备选地约 50mM) 和约 100mM 之间的起始氨基酸浓度组合在一起。经典培养基使用相对低的氨基酸浓度和 / 或高 Na/K 比。两种特征的组合可以提供有利于细胞生长和多肽产生的附加作用。

[0049] 表 2 显示本发明的这些参数的不同实施。除它们的总氨基酸含量外,针对细胞生长优化的本发明的适宜培养基优选包含以下范围的初始氨基酸浓度。

[0050]

氨基酸	浓度 (mmol/L)
精氨酸,游离碱	4.0-6.0, 优选 4.5-5.5
天冬酰胺一水合物	3.0-6.0, 优选 4.0-5.5
天冬氨酸	2.5-4.0, 优选 3.0-3.6
甘氨酸	0.3-0.8, 优选 0.5-0.7
组氨酸, HCl H_2O	0.6-1.0, 优选 0.7-0.9
异亮氨酸	2.0-5.0, 优选 2.9-4.0
亮氨酸	3.0-7.0, 优选 3.5-6.0
赖氨酸 HCl	2.0-4.0, 优选 2.5-3.5
甲硫氨酸	1.0-1.5, 优选 1.2-1.4
苯丙氨酸	1.0-2.0, 优选 1.3-1.8
脯氨酸	2.5-6.0, 优选 3.0-5.5
丝氨酸	3.0-8.0, 优选 4.0-7.0
苏氨酸	2.0-3.5, 优选 2.5-3.1
色氨酸	0.4-1.0, 优选 0.5-0.8
缬氨酸	2.5-5.0, 优选 3.0-4.5

酪氨酸	1.0-2.0, 优选 1.2-1.8
半胱氨酸	0.5-1.0, 优选 0.6-0.9
谷氨酰胺	5.5-9.5, 优选 6.2-8.2

[0051] 通过上表中定义的氨基酸进一步指定的本发明的培养基可以有利地用于本发明的改进的细胞培养方法。

[0052] 在尤其优选的实施方案中, 针对产生优化本发明的培养基, 且其优选包含以下范围的初始氨基酸浓度。

[0053]

氨基酸	浓度 (mmol/L)
精氨酸, 游离碱	4.0-6.0, 优选 4.5-5.5
天冬酰胺一水合物	9.0-11.0, 优选 9.5-10.5
天冬氨酸	2.5-4.0, 优选 3.0-3.6
甘氨酸	0.3-0.8, 优选 0.5-0.7
组氨酸, HCl H ₂ O	1.0-1.5, 优选 1.1-1.3
异亮氨酸	5.5-7.0, 优选 6.0-6.9
亮氨酸	8.0-10.0, 优选 9-9.2
赖氨酸 HCl	3.0-6.0, 优选 4.0-5.0
甲硫氨酸	1.5-2.5, 优选 1.5-2.0
苯丙氨酸	2.0-3.5, 优选 2.5-3.0
脯氨酸	7.5-9.0, 优选 8.0-8.5
丝氨酸	10.5-13.0, 优选 11.0-11.9
苏氨酸	3.5-5.5, 优选 4.0-5.0
色氨酸	0.9-2.0, 优选 1.0-1.4
缬氨酸	5.5-7.5, 优选 6.0-6.8
酪氨酸	1.0-3.0, 优选 2.0-2.5
半胱氨酸	0.5-2.0, 优选 1.0-1.3

谷氨酰胺	5.5-9.5, 优选 6.2-8.2
谷氨酸	0.5-2.5, 优选 1.0-1.2

[0054] 包含上表中定义的氨基酸的生产培养基可以有利地用于本发明改进的细胞培养方法。

[0055] 在本发明的另一方面,除钠离子和钾离子之间的具体比值外,培养基中的总离子浓度(促成培养基的总离子强度)和氨基酸之间的总体平衡也很重要。营养生长培养基中总离子浓度和氨基酸之间的比值基本上由大量无机盐(例如氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠等,其是大多数类型的用于动物细胞的细胞培养基的主要成分)主导。痕量离子的盐、氨基酸或维生素也导致此值(例如硫酸铜、L-精氨酸盐酸、L-组氨酸盐酸、氯化胆碱、D-泛酸钙等)。也调节这些离子的浓度可以是对细胞有利的。因此,我们在此将总离子浓度定义为向培养基中加入的可以在水性培养基溶液中电离的所有主要的有机和无机盐加上碱 NaOH 和酸 HCl 的总和。不包括痕量元素。因此,1mM 的 NaCl、NaOH 或诸如赖氨酸-HCl 或氯化胆碱的有机盐各可以贡献 2mM 的离子。1mM 的 MgCl₂相应地可以增加 3mM 的离子,而 1mM 的有机盐柠檬酸三钠贡献 4mM 的离子。

[0056] 根据本发明,因此选择离子和氨基酸之间的摩尔比在约 1.9 和 4 之间。在一些实施中,选择该比值在约 2.0 和 3.9 之间。这些具体的低比值不仅通过培养基中相对高的氨基酸含量来达到,也通过培养基中相对低的离子摩尔含量来达到。培养基中的离子含量一般低于 250mM。例如,选择该值在约 150mM 和 220mM 之间,或备选地在约 170mM 和 200mM 之间。

[0057] 总之,所描述的具体的培养基特征对细胞代谢和生理具有重要作用,同时也影响诸如重量摩尔渗透压浓度或例如营养成分利用率的一般参数。因此,不同培养基特征的平衡导致独特的特性,该特性导致对细胞的意外协同效应。

[0058] 具有低 Na/K 比的培养基广泛适用于培养不同的哺乳动物细胞和以大规模生产制备重组多肽/蛋白质。本文所用的多肽和蛋白质指用 DNA 构建体或编码目的产物的构建体转染细胞后由各哺乳动物细胞表达的重组多肽。可以按照本发明来产生可以在宿主细胞中表达的任意多肽。取决于具体的产物和所使用的细胞系,通过本发明的方法产生一种或多种多肽后,它分泌到细胞外、结合于细胞或保留在细胞内。可以通过标准方法直接或在裂解细胞后从培养物上清回收多肽产物。还通过技术人员已知的标准技术来进行进一步的分离和纯化。本发明的多肽还可以包含在药物组合物中。

[0059] 本发明的另一方面涉及用于产生重组多肽的方法,其包括在本发明的培养基中培养哺乳动物细胞,其中培养条件包括至少一次温度变动和/或至少一次 pH 变动。

[0060] 因此,在本发明的另一方面,在培养过程中改变温度且包含在某些时间点起始的一次或多次温度变动可以是有利的。温度的改变/变动不是指温度的自发波动,而是指有意地使温度改变至少 1°C 或备选地至少 2°C,且其中第二温度保持至少 1 天。可以通过改变培养物的温度设定点来实施改变/变动。时间点的选择依赖于培养物的生长状态、起始培养后预定的天数或细胞的代谢需要。因此,可以在起始培养后约 1 至 10 天的时期内变动温度。优选在细胞的生长期期间或此阶段快结束时进行温度变动。取决于培养瓶体积,该改变可以快速发生或更慢地发生并持续几个小时。在一个实例中,在培养物的生长期期间

实施温度变动,此时密度在最大密度的约 40%和约 90%之间。在另一实例中,第一温度在约 33°C和约 38°C之间,而在其他实例中,第一温度在约 36°C和约 38°C之间。第二温度在约 30°C和约 37°C之间,或备选地在约 32°C和约 34°C之间。

[0061] 在本发明的另一方面,通过包含一次或多次 pH 变动来改变培养过程中的 pH 可以是有利的。在本发明的其他方面,温度变动还可以与一次或多次 pH 变动组合。虽然选择对快速扩大细胞有利的第一 pH(例如 pH 7.0),但是,一旦达到某个细胞密度,改变培养物的 pH 是有利的。通过改变生物反应器 / 培养瓶的 pH 设定点或通过死区组合定义 pH 设定点来实现此 pH 改变或变动。pH 改变不是指 pH 的小波动,而是指有意的改变。选择第二 pH 值(例如 pH 6.8)来减少细胞死亡和允许优质多肽的高细胞比生产率。第二 pH 可以保持至培养结束或者可以引入附加的 pH 变动。在一个实施中,使 pH 改变至少 0.2 可以是有用的。在一个实施方案中,选择第一 pH 在 pH 6.8 和 pH 7.5 之间。在另一实施方案中,选择第一 pH 在 pH 6.8 和 pH 7.2 之间。pH 变动后达到的第二 pH 可以在 pH 6.0 和 pH 7.5 之间,或备选地在 pH 6.5 和 pH 6.8 之间。

[0062] 本发明的细胞培养基可以用于多种细胞培养方法。可以以贴壁培养,例如以单层培养,或优选以悬浮培养来进行细胞的培养。

[0063] 可以例如通过工业生物技术中建立的多种发酵方法来使用细胞的大规模培养。使用本发明的细胞培养基,可以利用连续和不连续的细胞培养方法。还可以利用其他已知的反应器技术,例如灌流技术。分批方法是一个优选的实施方案。

[0064] 分批细胞培养包括补料分批培养或简单分批培养。术语“补料分批细胞培养”指这样的细胞培养,其中,最初在培养瓶中提供哺乳动物细胞和细胞培养基,并在培养过程中连续地或以离散增加的形式向培养物中流加附加的培养营养物,在培养结束前定期收集或不收集细胞和 / 或产物。术语“简单分批培养”指这样的方法,其中,在起始培养过程时在培养瓶中提供包括哺乳动物细胞和细胞培养基的所有用于细胞培养的成分。

[0065] 根据本发明的一个优选实施方案,在补料分批方法中进行培养物的流加。这种流加对替换培养期间培养基中减少的培养基成分和营养物而言,是有益于细胞的。通常,流加溶液包含氨基酸、至少一种糖类作为能源、痕量元素、维生素或特定离子。根据细胞的需要加入流加溶液,其或者基于针对具体细胞系或细胞克隆和产物确定的预定时间表,或者在培养过程中测量。用浓缩流加溶液来避免大的体积增加和培养基的稀释尤其有利。在一些实施方案中,具有至少两种不同的流加溶液也可以是有用的。这允许独立地对细胞施用两个或多个不同组的营养物和成分,从而更好地就某些营养物的最佳供给调节流加条件。

[0066] 在本发明的另一实施方案中,向细胞培养基中加入的两种流加溶液之一是包含二肽半胱氨酸和氨基酸酪氨酸的流加物。优选地,该流加物在高于 10 的碱性 pH 的水溶液中包含各自的浓度在约 6.5g/l 至约 8.0g/l 的范围内和约 9g/l 至约 11g/l 的范围内的二肽半胱氨酸和氨基酸酪氨酸。在具体实施方案中,该浓缩流加物在高于 10 的 pH 下包含各自的浓度为 10.06g/l-酪氨酸和 7.25g/l 半胱氨酸的二肽半胱氨酸和氨基酸酪氨酸。

[0067] 上述包含半胱氨酸和酪氨酸的流加培养基可以根据所测量的各氨基酸的消耗加入,或者根据固定的时间表,按例如每天为初始细胞培养基重量的约 0.2wt% 至约 0.8wt%、优选每天为初始细胞培养基重量的约 0.4wt% 加入。

[0068] 在一些实例中,其他流加溶液包含除酪氨酸和半胱氨酸外的也存在于基础培养基

中的所有其他氨基酸。在一些实例中,该其他流加溶液可以由具体的选定成分(例如氨基酸或糖类)组成。在本发明的另一优选实施方案中,此浓缩流加培养基优选包含以下浓度范围的选定氨基酸。

[0069]

氨基酸	流加培养基浓度 (mmol/L)
精氨酸,游离碱	12.0-17, 优选 13.5-16.0
组氨酸, HCl H ₂ O	5.5-7.5, 优选 5.9-7.0
异亮氨酸	21-28.0, 优选 22.0-27
亮氨酸	32-42, 优选 34.5-40.0
赖氨酸 HCl	17.0-22.0, 优选 17.5-21.5
甲硫氨酸	5.5-8.0, 优选 6.0-7.5
苯丙氨酸	8.5-12.0, 优选 9.0-10.5
脯氨酸	18.0-24, 优选 18.5-22.0
丝氨酸	39.0-49.0, 优选 39.5-46.5
苏氨酸	14.5-19.0, 优选 15.0-18.5
色氨酸	3.0-5.0, 优选 3.5-4.9
缬氨酸	23.0-29.0, 优选 23.8-27.5
谷氨酰胺	175.0-220.0, 优选 176.0-201

[0070] 优选地,还向此浓缩流加培养基中加入诸如葡萄糖的糖类,优选的浓度在约 1200mmol/l 和约 1400mmol/l 之间,或备选地在约 1300mmol/l 和约 1395mmol/l 之间。

[0071] 刚刚描述的优选包含诸如葡萄糖的糖类的流加培养基可以根据所测量的各氨基酸的消耗加入,或者根据固定的时间表,按例如每天为初始细胞培养基重量的约 1wt% 至约 4wt%, 优选每天为初始细胞培养基重量的约 2wt% 加入。

[0072] 在本发明的细胞培养基中培养的细胞包括哺乳动物细胞和非哺乳动物细胞。非哺乳动物细胞包括昆虫细胞等。但是,优选哺乳动物细胞。术语细胞、细胞系和细胞培养物在本文中可互换使用。

[0073] 哺乳动物细胞的实例包括人成视网膜细胞;人宫颈癌细胞、人胚肾细胞系、人肺细胞、人肝细胞、PER.C6 细胞(人成视网膜细胞衍生的细胞系)、人肝癌细胞系和诸如 AGE1.HN 的人细胞系;SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系;猴肾细胞、非洲绿猴肾细胞、中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR、幼仓鼠肾细胞;小鼠支持细胞;小鼠乳房肿瘤、犬肾细胞;buffalo 大鼠肝细胞;

TRI 细胞 ;MRC 5 细胞 ;FS4 细胞 ;CHO 细胞是用于实施本发明的优选细胞系。

[0074] 在本发明的一个优选实施方案,这些细胞可以是 CHO 细胞的不同株系,如野生型 CHO K1、CHO dhfr-(Dux1) 或 CHO dhfr-(DG44),但也可以是 HEK 细胞、Sp2/0 细胞。通常用编码一种或多种目的多肽的一个或多个 DNA 构建体转染这些细胞。可以按照本发明来产生可以在这些宿主细胞中表达的任意多肽。

[0075] 可以与本发明的细胞培养基一起使用的另一类细胞包括常用于产生单克隆或多克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0076] 可以从细胞培养物和本发明的细胞培养基产生的多肽不受限制。多肽可以是重组的或不是重组的。本文所用的术语“多肽”涵盖由通过肽键连接的超过两个氨基酸的链组成的分子;包含两条或多条这类链的分子;包含例如通过糖基化额外修饰的一条或多条这类链的分子。术语多肽旨在涵盖蛋白质。

[0077] 通过细胞培养物和本发明的细胞培养基产生的多肽的优选种类是重组抗体。

[0078] 术语“抗体”以最广泛的含义使用,且明确涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、纳米抗体(nanobody)、修饰抗体、抗体的亚基、抗体衍生物、人工抗体、抗体与蛋白质的组合、及长度足以显示希望的生物学活性的抗体片段。本文使用的单克隆抗体可以是人抗体。

[0079] 但是,也可以用细胞培养物和本发明的细胞培养基来产生抗体以外的多肽,例如多肽,如跨膜蛋白质、受体、激素、生长因子、蛋白酶、凝固和抗凝固蛋白质、抑制蛋白质、白细胞介素、转运因子、融合蛋白质等。

[0080] 从这类细胞培养方法获得的产物可以用于制备药物制剂。术语“药物制剂”指适宜或适合对哺乳动物,尤其是对人施用的组合物。此外,本发明的一种或多种蛋白质可以与生物活性剂的其他成分一起施用,所述其他成分如可药用表面活性剂、赋形剂、载体(carrier)、稀释剂和介质(vehicle)。

[0081] 表 1 总结了市售培养基和来自现有技术其他细胞培养基的组成;值基于公开的;因此诸如 NaOH 的添加物不包含在该值之内。因此,钠浓度或钠钾比被低估,且甚至进一步偏离本发明的值。

[0082] 表 1

[0083]

培养基	Na ⁺ (mM)	NaCl (mM)	K ⁺ (mM)	Na/K 比	Cl ⁻ (mM)	总离子 (mM)	总 AA (mM)	离子/AA 比
市售培养基								
DMEM/F12	123	120.6	4.2	29	129.1	290	7.0	41.4
Ham's F12	147.0	130.1	3.0	49	135.0	305	4.0	76.2
MEM α	145.4	117.2	5.3	27	127.0	310.2	9.0	34.5
RPMI 1640	138.7	103.4	5.3	26	109.0	283.6	6.6	42.9
BME	144.4	117.2	5.3	27	126.4	307.1	1.4	219
Fischer's	152.3	136.8	5.3	28	144.9	317	5.6	56.6
其他培养基								
US 7294484	48/125/86	19/95/64	4.2	12/30/21	未测定	ND	>70	ND
WO 02/101019 培养基 A/B	10.9/8.1	0/0	20.2/19.9	0.5/0.4	48/31	122.8/78.9	78.1/59.5	1.6/1.3

[0084] 表 2 公开本发明的细胞培养基制剂,其特征在于它们特别低的钠钾离子比。

[0085] 表 2

[0086]

培养基	Na ⁺ (mM)	NaCl (mM)	K ⁺ (mM)	Na/K 比	Cl ⁻ (mM)	总离子 (mM)	总 AA (mM)	离子/AA 比
培养基 1	83.6	14.6	10.7	7.8	36.2	195.7	51.1	3.8
培养基 2	69.5	8.6	10.7	6.5	45.5	191.2	90.5	2.1
培养基 3	79.7	8.6	10.7	7.4	41.4	190.6	90.7	2.1
培养基 4	73.4	8.6	10.7	6.9	39.9	177.5	80.2	2.2
培养基 5	67.2	8.6	10.7	6.3	38.3	164.3	69.7	2.4
培养基 6	60.9	8.6	10.7	5.7	36.8	151.1	59.2	2.6

[0087] 表 3 公开本发明的化学成分确知细胞培养基的实例的组成。这些细胞培养基的单一成分可从标准商业来源获得。

[0088] 表 3

[0089]

成分	培养基 1 终浓度 (mg/l)	培养基 2 终浓度 (mg/l)	培养基 3 终浓度 (mg/l)	培养基 4 终浓度 (mg/l)	培养基 5 终浓度 (mg/l)	培养基 6 终浓度 (mg/l)
CaCl ₂ , 无水	131	133.2	130.6	130.6	130.6	130.6
KCl, 无水	800	800	800	800	800	800
MgCl ₂ , 无水	155	250.4	250.2	226.4	202.6	178.9
NaCl	850.6	500	500	500	500	500
磷酸氢二钠, 无水	710	1065	1775	1508.8	1242.5	976.3
碳酸氢钠, 无水	2500	2000	2000	2000	2000	2000
L-精氨酸, 游离碱	871	871	-	-	-	-
L-精氨酸 x HCl	-	-	1053	1053	1053	1053
L-天冬酰胺, H ₂ O	616	1501	1501	1279.8	1058.5	837.3
L-天冬氨酸	461	461	461	461	461	461
L-半胱氨酸	200.1	304.5	304.5	228.4	152.3	76.1
L-谷氨酸 Na 盐合物	-	182	-	-	-	-
L-谷氨酸	-	-	182	136.5	91	45.5
L-组氨酸, HCl-H ₂ O	168	268	268	243	218	193
L-异亮氨酸	394	894	894	769	644	519
L-亮氨酸	499	1199	1199	1025	850	675
L-赖氨酸, HCl	621	821	821	772	722	672
L-甲硫氨酸	179	279	279	255	230	205
L-苯丙氨酸	264	464	464	414	364	314
L-脯氨酸	368	968	968	818	668	518
L-丝氨酸	432	1232	1232	1032	832	632
L-苏氨酸	333	533	533	484	434	384
L-色氨酸	102	252	252	214.5	177	139.5
L-缬氨酸	375	775	775	676	576	476
L-酪氨酸	277.7	422.5	422.5	316.9	211.3	105.6
甘氨酸	38	38	38	38	38	38
L-谷氨酰胺	1169.2	1169.2	1169.2	1169.2	1169.2	1169.2
生物素	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
D-泛酸钙	4	4	4	4	4	4
叶酸	5	5	5	5	5	5
肌醇	40	140	140	115	90	65
烟酰胺	4	4	4	4	4	4
吡哆醇, HCl	2	2	2	2	2	2
核黄素	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
维生素 B12	2	2	2	2	2	2
硫胺素, HCl	4	4	4	4	4	4
腐胺, 2HCl	10	110	110	85	60	35
氯化胆碱	40	240	240	190	140	90
亚硒酸钠 (Na ₂ SeO ₃)	0.03	0.03	-	-	-	-
七水合亚硒酸钠 (Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O)	-	-	0.02	0.02	0.02	0.02
四水合氯化锰	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
四水合铜酸铵	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
氯化锌, 无水	3	3	3	3	3	3
二水合氯化铜	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
六水合氯化钴	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

[0090]

乙醇胺	10	100	100	77.5	55	32.5
单硫代甘油	2	-	-	-	-	-
HEPES, 酸形式	17870	4766	4766	3574.5	2383	1191.5
二水合柠檬酸三钠	911.7	1235.2	911.2	911.2	911.2	911.2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	54.1	54.1	54.1	54.1	54.1	54.1
Pluronic F68	1000	1000	1000	1000	1000	1000
D-葡萄糖, 无水	10000	10000	10000	10000	10000	10000
HCl	-	327.6	-	-	-	-
NaOH	799.2	339.9	519.9	419.9	319.9	220

实施例

[0091] 在下文所述的实施例中,使用化学成分确知的细胞培养基 1 和 2,其具有以上表 3 中详述的组成。这些细胞培养基的单种成分可从标准商业来源获得。

[0092] 以下表 4 显示包含 L- 酪氨酸和半胱氨酸的浓缩流加培养基的组成。该流加培养基可以根据所测量的各氨基酸的消耗加入,或者根据固定的时间表,按例如每天 0.4% wt 加入。

[0093] 表 4

[0094]

成分	流加培养基 (g/l)
NaOH 32%	18.7mL
L- 酪氨酸	10.06
半胱氨酸	7.25

[0095] 以下表 5 显示示例性浓缩流加培养基的组成。该流加培养基可以根据所测量的氨基酸的消耗加入,或者根据固定的时间表,按例如每天 2% wt 加入。

[0096] 表 5

[0097]

成分	流加培养基 (g/l)
L- 精氨酸,游离碱	2.72
L- 组氨酸, HCl-H ₂ O	1.44
L- 异亮氨酸	3.44
L- 亮氨酸	5.20
L- 赖氨酸, HCl	3.72

[0098]

L- 甲硫氨酸	1.08
---------	------

L- 苯丙氨酸	1. 72
L- 脯氨酸	2. 44
L- 丝氨酸	4. 76
L- 苏氨酸	2. 08
L- 色氨酸	0. 88
L- 缬氨酸	3. 16
L- 谷氨酰胺	29. 23
一水合 D- 葡萄糖	275. 00
25% HCl	8. 25ml
32% NaOH	5. 6ml

[0099] 对于实施例的实验,使用亲本 CHO 细胞系,其通过适应无血清、无蛋白质培养基条件衍生自 dhfr (+) CHO-K1 细胞系 ATCC CCL-61 (Kao 等, Genetics, 1967, 55, 513-524 ;Kao 等, PNAS, 1968, 60, 1275-1281 ;Puck 等, J. Exp. Med. , 1985, 108, 945-959)。分别转染此亲本细胞系的两个整份试样来表达两种不同的单克隆抗体 mAb1 和 mAb2。

[0100] 实施例 1

[0101] 在实施例 1 中,用产生 mAb1 的 CHO 克隆平行接种包含培养基 1 的两个摇瓶培养物。摇瓶培养物在 37℃ 的二氧化碳培养箱中孵育。在第 3 天,将一个摇瓶转移至设置在 33℃ 的二氧化碳培养箱。两个摇瓶都用两种流加溶液类似地流加。根据固定时间表补充流加物,从第 5 天开始,每天加入 0.4% 的第一流加溶液 (表 2) 和 2% 的第二流加溶液 (表 3),并持续至培养结束。

[0102] 与整个实验过程中维持在 37℃ 的培养物相比,温度变动至 33℃ 使得能够更长时间地维持培养物的活细胞密度和存活率 (图 1 和 2),并达到更高的产物效价 (图 3)。此实施例显示了在基于 CHO 细胞系的细胞培养物产生方法期间实施温度变动至 33℃ 的益处。

[0103] 实施例 2

[0104] 在此实施例中,用产生 mAb2 的 CHO 克隆接种包含培养基 2 的 300L 生物反应器。在第 5 天,将生物反应器的温度从 36.5℃ 变动至 33℃。pH 设定点为 6.90,死区为 0.10。结果,在 pH 7.00 起始培养,pH 在第 2 和第 4 天之间向下漂变至 6.80,然后由于细胞对乳酸的消耗而逐渐回到 7.00 (图 4)。与具有恒定的 pH 7.00 的情况相比,变动至 pH 6.80 使得能够减少碱的加入。与第一次变动后使 pH 保持在 6.80 的情况相比,回到 pH 7.00 使得能够降低培养基中 CO₂ 的浓度。在组合温度变动和 pH 变动的此方法中,达到了高的活细胞密度,并最小化活细胞密度随时间的降低 (图 5),允许在第 14 天达到高效价 (图 6) 的优质产物。与实施例 1 中类似地应用流加。

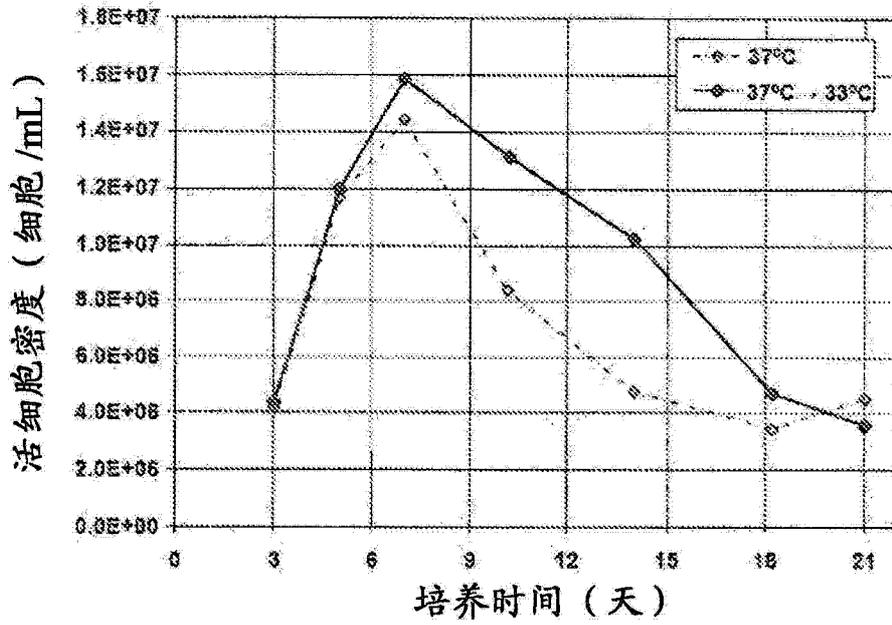


图 1

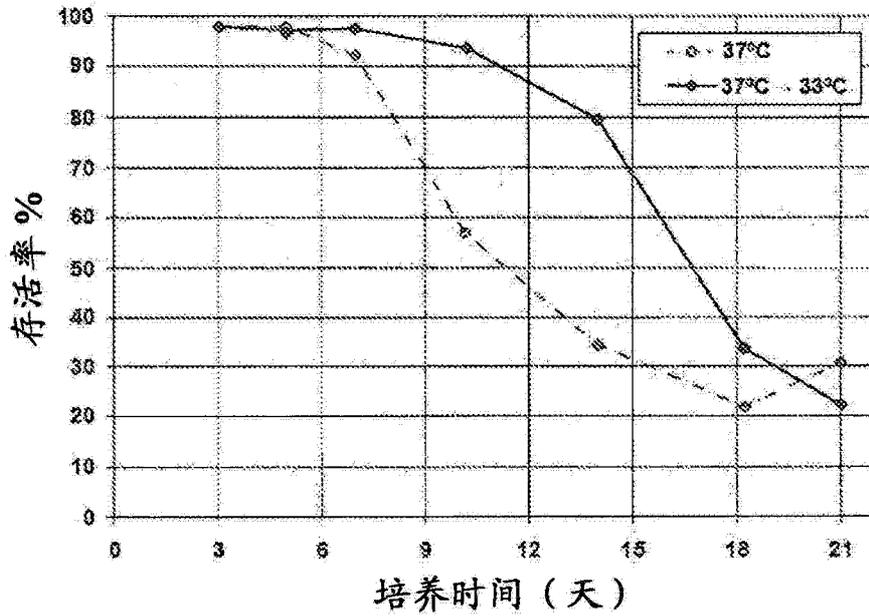


图 2

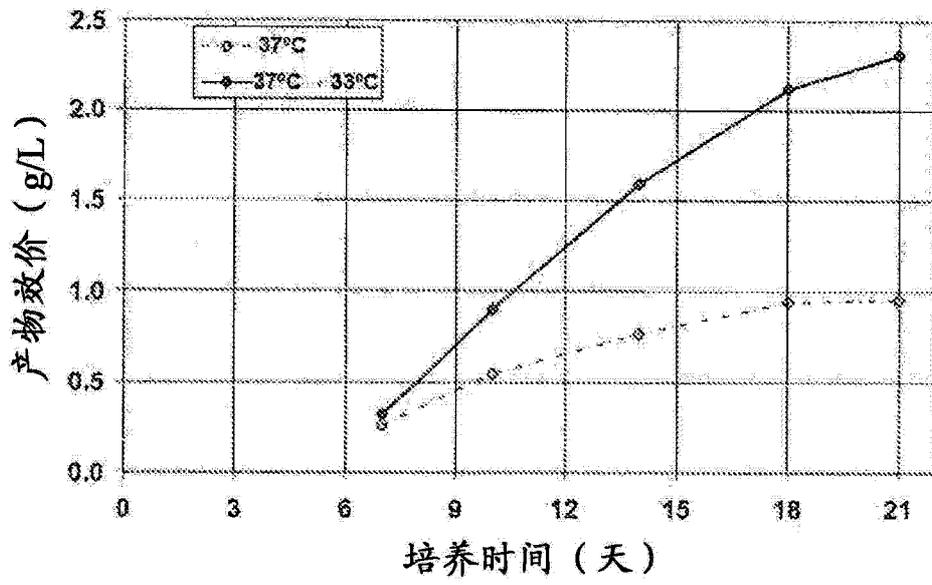


图 3

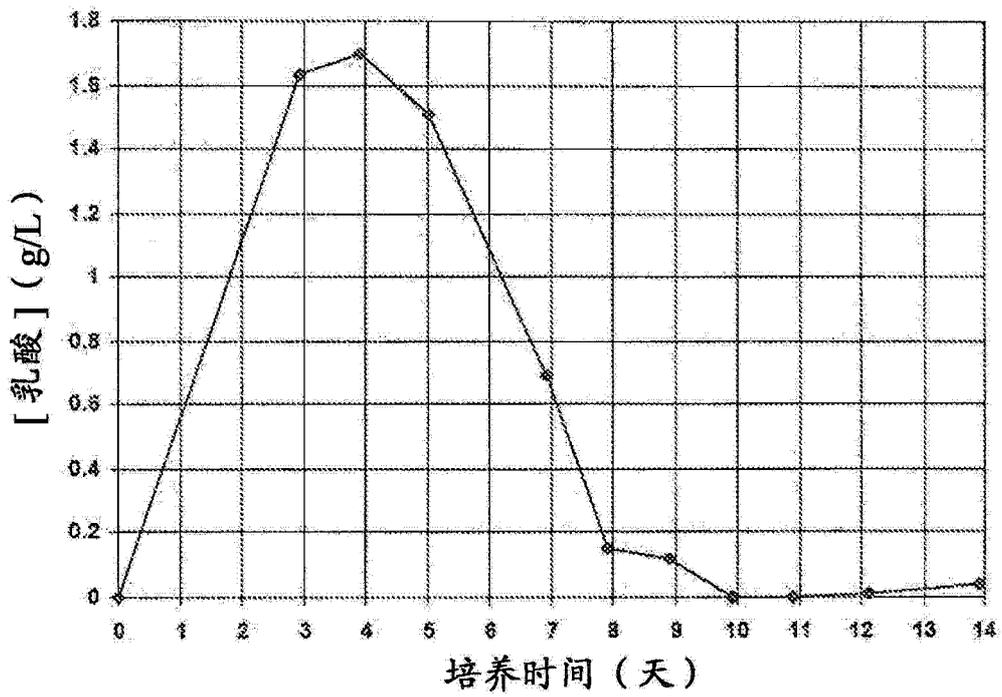


图 4

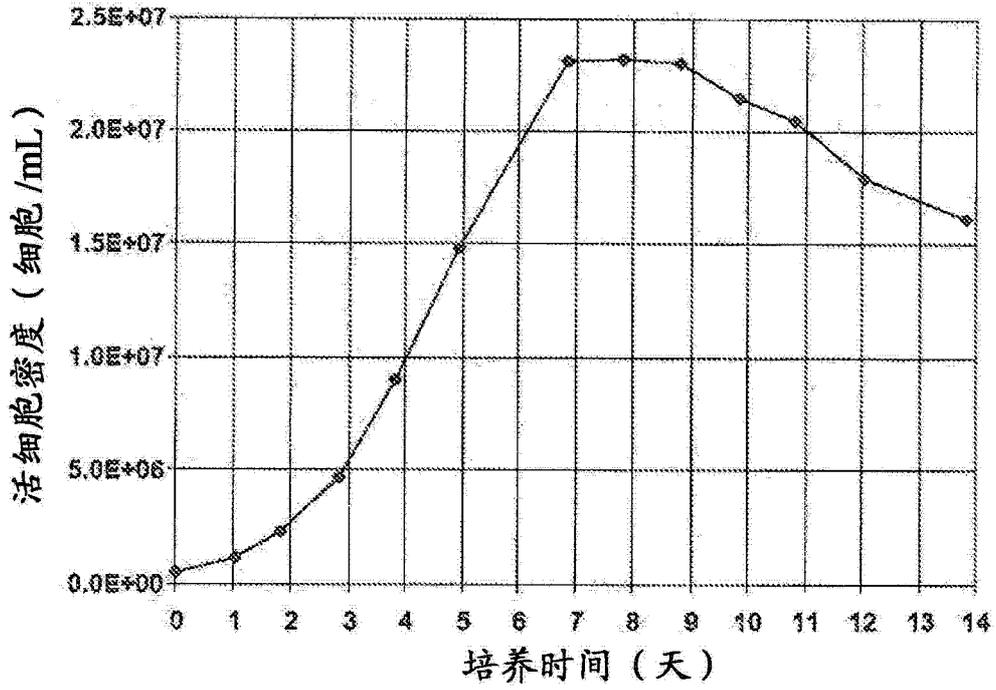


图 5

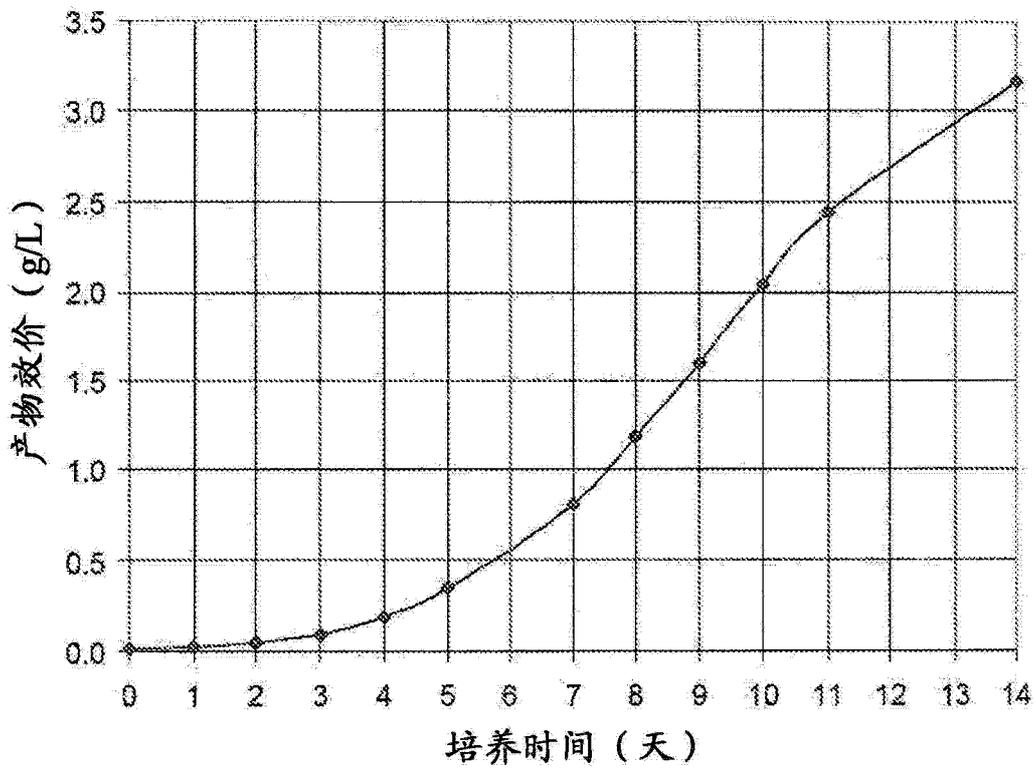


图 6