



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106536746 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201580039329.1

(22)申请日 2015.06.03

(30)优先权数据

1827/MUM/2014 2014.06.03 IN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2015/054196 2015.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/186075 EN 2015.12.10

(71)申请人 鲁宾有限公司

地址 印度孟买

(72)发明人 斯里达尔·科特科塔

索勒布·拉斯托姆·莫迪

(74)专利代理机构 北京弘权知识产权代理事务所(普通合伙) 11363

代理人 郭放 许伟群

(51)Int.Cl.

C12P 21/00(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

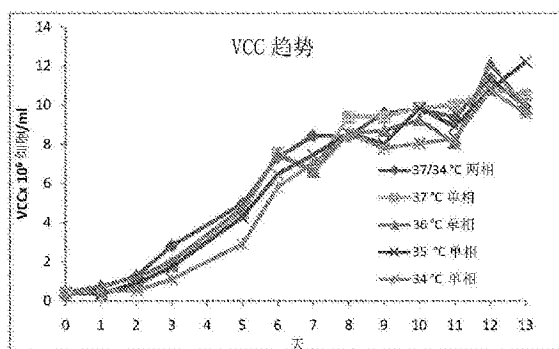
权利要求书3页 说明书12页 附图4页

(54)发明名称

用于生产蛋白的细胞培养方法

(57)摘要

本发明提供用于生产单克隆抗体和融合蛋白的哺乳动物细胞培养方法,其中将哺乳动物细胞在特别是维持单相温度的合适的细胞培养条件下培养。



1. 在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;
 - b) 将所述具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;
 - c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中所述合适的条件是单相温度条件;以及
 - d) 从细胞培养物中获得所述糖基化蛋白。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中单相温度选自约32℃至约37℃的范围。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中单相温度选自约34℃至约37℃的范围。
4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中单相温度是约33℃。
5. 根据权利要求2或3所述的方法,其中单相温度是约34℃。
6. 根据权利要求2或3所述的方法,其中单相温度是约35℃。
7. 根据权利要求2或3所述的方法,其中单相温度是约36℃。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中单相温度不包含温度变化。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述哺乳动物细胞选自CHO细胞。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述CHO细胞是dhfr-CHO细胞。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中以分批进料模式将所述哺乳动物细胞在生产生物反应器中培养。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述细胞培养方法不具有区分的生长期和生产期。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述合适的条件进一步包括选自6.7至7.4的pH。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述合适的条件进一步包括pH为约7。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述合适的条件进一步包括约250至约550mOsm/Kg的渗透压。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述渗透压是约270mOsm/Kg。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述哺乳动物细胞在含血清的培养基或者不含血清的培养基中培养。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中将所述哺乳动物细胞在不含血清的培养基中培养。
19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述哺乳动物细胞在基本上不含链烷酸或其盐的培养基中培养。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述链烷酸或其盐选自丁酸、丁酸钠或二丁基cAMP。
21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述合适的条件进一步包括约30%至约70%的溶解氧浓度。
22. 根据权利要求1所述的方法,其中接种体的合适浓度选自约 4×10^6 细胞/mL至约 7×10^6 细胞/mL。
23. 根据权利要求1所述的方法,其中至少通过72小时获得接种体的合适浓度。
24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述蛋白是选自融合蛋白和单克隆抗体及其片段的糖基化蛋白。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述融合蛋白和单克隆抗体及其片段选自阿昔单抗, 阿巴西普, 阿达木单抗, 阿瑞鲁单抗, 阿托珠单抗, 阿柏西普, 阿仑单抗, 阿法西普, 培化阿珠单抗, 阿那白滞素, 阿西莫单抗, 阿塞西普, 托珠单抗, 阿托木单抗, 巴利昔单抗, 贝奈西普, 贝妥莫单抗, 贝利木单抗, 贝索单抗, 贝伐珠单抗, 比西单抗, 贝拉西普, 维汀-布仑妥昔单抗, 博达路单抗, 卡那单抗, 卡罗单抗, 依库珠单抗, 依决洛单抗, 依法珠单抗, 依芬古单抗, Elocate, 厄妥索单抗, 依那西普, 伊瑞西珠, 法索单抗, 法勒珠单抗, 芳妥珠单抗, 吉妥单抗, 吉仑妥昔单抗, 戈利木单抗, 替伊莫单抗, 伊戈伏单抗, 英西单抗, 英夫利昔单抗, 易普单抗, 拉贝珠单抗, 美泊珠单抗, 莫维珠单抗, 莫罗单抗-CD3, 那他珠单抗, 尼妥珠单抗, 疏诺莫单抗, 奥比妥珠单抗, 奥法木单抗, 奥马珠单抗, 奥戈伏单抗, 帕利珠单抗, 帕尼单抗, 派土莫单抗, 帕妥珠单抗, 雷莫芦单抗, 雷珠单抗, 雷昔库单抗, 利妥昔单抗, 利那西普, 罗维珠单抗, 鲁利珠单抗, 硫索单抗, 他珠单抗, 替非珠单抗, 托珠单抗, 曲妥珠单抗, ado-曲妥珠单抗 emtansine, 托西莫单抗, TRBS07, 尤特克单抗, 维多珠单抗, 维西珠单抗, 伏妥昔单抗, 扎芦木单抗, 扎木单抗。

26. 根据权利要求24或25所述的方法, 其中所述融合蛋白是依那西普。

27. 根据权利要求1所述的方法, 其中培养条件维持高的活细胞数量。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述活细胞数量选自约 5×10^6 至约 13×10^6 细胞/mL。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中所述活细胞数量是 11×10^6 细胞/mL。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其提高糖基化蛋白的期望确认。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其提高TNFR-Fc融合蛋白例如依那西普的期望确认。

32. 根据权利要求1所述的方法, 其中将所述哺乳动物细胞在生产生物反应器中培养至少约10天至约13天。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中将所述哺乳动物细胞在生产生物反应器中培养至少约11天。

34. 在哺乳动物细胞培养物中生产融合蛋白和单克隆抗体及其片段的方法, 所述方法包括以下步骤:

- a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;
- b) 将所述具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;
- c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养, 其中所述合适的条件是单相温度条件; 以及
- d) 从细胞培养物中获得所述糖基化蛋白, 其中所述合适的条件是
 - i) 单相温度选自约 34°C 至约 37°C ,
 - ii) pH选自6.7至7.4,
 - iii) 渗透压为约250mOsm/Kg至约550mOsm/Kg。

35. 在哺乳动物细胞培养物中生产融合蛋白和单克隆抗体及其片段的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体；
b) 将所述具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中；
c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养，其中所述合适的条件是单相温度条件；以及

d) 从细胞培养物中获得所述糖基化蛋白，
其中所述合适的条件是

i) 单相温度选自约34℃至约37℃，

ii) pH选自6.7至7.4，

iii) 渗透压为约250mOsm/Kg至约550mOsm/Kg，

其中培养基基本上不含链烷酸或其盐；以及

其中所述细胞培养方法不具有区分的生长期和生产期。

36. 在哺乳动物细胞培养物中生产TNFR-Fc融合蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体；
b) 将所述具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中；
c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养，其中所述合适的条件是单相温度条件；以及

d) 从细胞培养物中获得所述糖基化蛋白，
其中所述合适的条件是

i) 单相温度选自约34℃至约37℃，

ii) pH选自6.7至7.4，

iii) 渗透压为约250mOsm/Kg至约550mOsm/Kg。

37. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述细胞选自CHO DUKX-B11、CHO S、CHO K1或CHO DG44。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的方法获得的融合蛋白或单克隆抗体及其片段。

用于生产蛋白的细胞培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生产糖基化蛋白的单相哺乳动物细胞培养条件。更具体地,它涉及在具有单相温度条件的哺乳动物细胞培养条件下生产单克隆抗体和融合蛋白。更具体地,本发明涉及在用于生产蛋白(优选糖基化蛋白)的合适的细胞培养条件下培养哺乳动物细胞的方法。更具体地,它还涉及以用于生产糖基化蛋白的特别是维持单相温度的合适的细胞培养条件下进行的细胞培养方法。

背景技术

[0002] 用于生物制药应用的治疗性蛋白的生产通常涉及已知的用于生产高水平糖基化蛋白的哺乳动物细胞培养物的使用。哺乳动物细胞培养条件的控制和优化对于糖基化蛋白的成功商业生产是至关重要的。照惯例,针对很多糖基化蛋白的哺乳动物细胞培养方法是两相的;区别在于初始的生长期和随后的生产期。这个双重生产期提供高的细胞密度和更好的产品滴度(product titer)。

[0003] 而且,控制和优化细胞培养条件一直是巨大的挑战,因为这些条件极大地影响细胞存活率、期望的产率、纯度和异质性。治疗性蛋白分子的物化性质和药物动力学性质极度地依赖于培养条件。

[0004] US7294481公开了用于生产融合蛋白即TNFR:Fc的方法。在生产期期间,在25至34℃的温度下培养宿主细胞,与在37℃下进行的生产期相比,其显示出所生产的TNFR:Fc的二硫化物加扰(disulfide scrambling)减少。另外,它公开了在链烷酸或其盐的存在下进行生产期。

[0005] 可以以很多方式实现生产期的开始,其中温度和pH变化是最常见的。所使用的其他方法是加入诱导剂、改变进料底物或改变渗透压。

[0006] 本发明涉及通过在培养期间维持合适的培养条件的细胞培养方法。特别地,哺乳动物细胞在选自约34℃至约37℃的单一温度下生长。本发明涉及以分批进料(fed-batch)模式通过在培养期间维持合适的培养条件的细胞培养方法。

发明内容

[0007] 在一个实施方案中,本发明涉及生产糖基化蛋白的单相哺乳动物细胞培养方法。

[0008] 在另一个实施方案中,本发明涉及生产糖基化蛋白的单相温度哺乳动物细胞培养方法。

[0009] 在另一个实施方案中,本发明涉及生产糖基化蛋白的单相温度哺乳动物细胞培养方法,其中温度设定在34℃至37℃之间。

[0010] 在另一个实施方案中,本发明涉及生产融合蛋白和单克隆抗体的、具有单相温度条件的哺乳动物细胞培养方法。

[0011] 在另一个实施方案中,本发明涉及在用于哺乳动物细胞培养的单相温度下生产糖基化蛋白的方法,其中细胞培养物基本上不含链烷酸或其盐。

[0012] 在另一个实施方案中,本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0013] a) 在种子扩大培养(seed development)期间制备具有合适细胞浓度的接种体;

[0014] b) 将具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器(production bioreactor)中;

[0015] c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中合适的条件是单相温度条件;以及

[0016] d) 从细胞培养物中获得糖基化蛋白。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0018] a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;

[0019] b) 将具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;

[0020] c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中合适的条件是单相温度条件;以及

[0021] d) 从细胞培养物中获得糖基化蛋白,

[0022] 其中在步骤(c)期间单相温度不具有温度变化(temperature shift)。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0024] a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;

[0025] b) 将具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;

[0026] c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中合适的条件是单相温度条件;以及

[0027] d) 从细胞培养物中获得糖基化蛋白,

[0028] 其中在步骤(c)中生产生物反应器不具有任何区分的生长期和生产期。

[0029] 在另一个实施方案中,本发明涉及用单相温度条件进行以生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中该温度维持于在约32℃至约37℃之间的一个设定点。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明涉及用单相温度条件进行以生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中该温度维持于在约34℃至约37℃之间的一个设定点。

[0031] 在某个实施方案中,本发明涉及用单相温度条件进行以生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中该温度维持在约33℃。

[0032] 在某个实施方案中,本发明涉及用单相温度条件进行以生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中该温度维持在约34℃。

[0033] 在某个实施方案中,本发明涉及用单相温度条件进行以生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中该温度维持在约35℃。

[0034] 在某个实施方案中,本发明涉及用单相温度条件进行以生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中该温度维持在约36℃。

[0035] 由本发明的方法生产的融合蛋白和单克隆抗体用于生物制药应用。

[0036] 以下阐明的本发明的一个或多个实施方案的细节仅仅是说明性的,并不意欲限制本发明的范围。本发明的其他的特征、目的和优势将从该描述中显而易见。

附图说明

- [0037] 图1描绘了在依那西普生产期间所观察到的CHO细胞的比较生长趋势。
- [0038] 图2描绘了在依那西普生产期间所观察到的CHO细胞的比较存活率趋势。
- [0039] 图3描绘了在贝伐单抗生产期间所观察到的CHO细胞的比较生长趋势。
- [0040] 图4描绘了在贝伐单抗生产期间所观察到的CHO细胞在不同时间点的比较存活率趋势。
- [0041] 图5描绘了在利妥昔单抗生产中CHO细胞的生长趋势。
- [0042] 图6描绘了在利妥昔单抗生产中CHO细胞的存活率趋势。
- [0043] 图7描绘了在曲妥珠单抗生产中CHO细胞的生长趋势。
- [0044] 图8描绘了在曲妥珠单抗生产中CHO细胞的存活率趋势。

具体实施方式

[0045] 定义；

[0046] 本文所涉及的术语“抗体”包括整个抗体和任何抗原结合片段或其单链。“抗体”是指包含由二硫键互连的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合片段。每个重链由重链可变区(这里缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每个轻链由轻链可变区(这里缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH区和VL区可以进一步细分成高变区,称为互补决定区(CDR),其是序列高变的和/或涉及抗原识别和/或通常形成结构上定义的环(structurally defined loop),穿插有称为框架区(FR或FW)的更保守的区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FW组成,从氨基端至羧基端以如下顺序排列:FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。FW1、FW2、FW3、FW4的氨基酸序列一起构成这里涉及的VH或VL的“非CDR区”或“非扩展CDR区”。

[0047] “宿主细胞”被遗传工程化(engineered)是指使得重组DNA或RNA以提高的水平或以降低的水平表达基因,或者表达基因的突变形式。换句话说,已经用重组多核苷酸分子转染、转化或转导细胞,因此细胞被改变以使细胞改变期望多肽的表达。“遗传工程”的常规方法是现有技术中已知的。

[0048] “生产培养基(production medium)”指被设计用于在生产期期间培养细胞的细胞培养基。

[0049] 如本文使用的,“单相”是指不涉及维持培养的任何培养条件改变的细胞培养方法。培养条件包括但不限于温度、pH、渗透压或化学赋形剂。

[0050] 如本文使用的,“单相温度”是指在生产生物反应器中使用单个温度设定点进行的细胞培养方法(称为传代(passage)“N”)。而且在生产生物反应器的运行期间将温度维持在单个设定点以获得单相生长条件。抑制单相移动(shift)。单相温度在约34℃至约37℃之间。

[0051] 如本文使用的,“糖基化蛋白”是指作为离散单元(discrete unit)起作用的一种或多种哺乳动物多肽。“糖基化蛋白”包括用于生物制药应用的融合蛋白和单克隆抗体。融合蛋白的实例包括但不限于依那西普、阿巴西普、阿法西普(alefacept)、利纳西普(rilonacept)、贝拉西普(belatacept)、阿柏西普等。单克隆抗体的实例包括但不限于利妥

昔单抗 (rituximab)、曲妥珠单抗、贝伐珠单抗、阿达木单抗 (adalimumab)、狄诺塞麦、帕利珠单抗 (palivizumab)、西妥昔单抗、奥马珠单抗 (omalizumab)、那他珠单抗 (natalizumab)、帕尼单抗 (panitumumab)、尤特克单抗 (ustekinumab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、帕妥珠单抗 (pertuzumab) 等。

[0052] 如本文使用的,“细胞密度”是指在给定体积的培养基中存在的细胞的数量。

[0053] 如本文使用的,“哺乳动物细胞培养物”是指在适合于细胞群生存和/或生长的条件下在培养基中悬浮的细胞群。它指在多细胞生物或组织之外的哺乳动物细胞的生长和增殖。对于哺乳动物细胞合适的培养条件是现有技术中已知的。可以将哺乳动物细胞在悬浮液中或者在附着于固体基质时培养。

[0054] 如本文使用的,“分批进料培养”是指培养细胞的方法,其中在培养过程开始之后的某一时间向培养物提供另外的组分。所提供的组分通常包括在培养过程期间已经被消耗的细胞营养补充剂。

[0055] 如本文使用的,哺乳动物细胞培养方法涉及重组哺乳动物细胞系例如CHO DUKX-B11、CHO S、CHO K1、CHO DG44的使用。

[0056] 如本文使用的,在将种子接种到单相的生产生物反应器中之后,起始VCC (活细胞计数) 选自 0.1×10^6 细胞/mL至 10×10^6 细胞/mL和存活率 $>90\%$,更优选地为 0.3×10^6 细胞/mL至 5×10^6 细胞/mL和存活率 $>90\%$,甚至更优选地为 1×10^6 细胞/mL至 2×10^6 细胞/mL和存活率 $>90\%$ 。在该过程期间可以在合适的时间间隔测量VCC。

[0057] 如本文使用的,关于温度的“约”是指温度值的偏差,其中它涵盖 $\pm 1^\circ\text{C}$,例如约 33°C 涵盖 32°C 至 34°C 的温度。

[0058] 如本文使用的,关于pH的“约”是指pH值的偏差,其中它涵盖 ± 0.5 ,例如约pH6.7涵盖6.2至7.2的pH。

[0059] 在另一个实施方案中,本发明涉及使用单相温度条件进行哺乳动物细胞培养以生产融合蛋白和单克隆抗体的方法。

[0060] 在另一个实施方案中,本发明涉及使用单相温度条件进行的生产糖基化蛋白的哺乳动物细胞培养方法,其中细胞培养物基本上不含有链烷酸或其盐。

[0061] 在另一个实施方案中,本发明涉及使用在约 34°C 至约 37°C 的单相温度条件进行的生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其提高糖基化蛋白的期望确认。

[0062] 在另一个实施方案中,在发酵器或生物反应器中以分批、分批进料和连续模式在合适的培养基中进行哺乳动物细胞培养,优选分批进料模式。本发明涉及用于生产糖基化蛋白的培养哺乳动物细胞的方法。更具体地,本发明涉及在哺乳动物细胞培养过程期间维持的特定的培养条件。

[0063] 虽然文献中已经开发并报道了从哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的很多方法,但是这些方法通常是两相的,需要两组的温度和/或溶解氧和/或pH。在两相细胞培养条件中,重组宿主细胞首先在促进快速细胞增殖的温度下生长,称为生长期。这通常由在 34°C 至 37°C 下生长细胞然后降低温度至 22°C 至 34°C 以减少细胞生长同时促进重组蛋白的生产来实现,称为生产期。

[0064] 细胞培养方法需要各种参数以便以有效和高效的方式进行该方法。然而,本发明的主要方面是在培养期间使用单相温度,其中单相温度不具有温度变化并且产生期望质量

和数量的具有显著细胞存活率的糖基化蛋白。

[0065] 本发明通过使用本领域已知的技术研究温度对蛋白生产、其质量和细胞存活率的影响。温度选自37℃或36℃或35℃或34℃或33℃。

[0066] 在另一个实施方案中,约34℃至约37℃的单相温度条件提高糖基化蛋白的期望确认。

[0067] 在另一个实施方案中,本发明涉及在单相细胞培养条件下用于生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中哺乳动物细胞在维持在约32℃至约37℃之间的温度下培养。

[0068] 在另一个实施方案中,本发明涉及在单相细胞培养条件下用于生产糖基化蛋白的细胞培养方法,其中哺乳动物细胞在维持在约34℃至约37℃之间的温度下培养。

[0069] 在本发明的一个实施方案中,单相温度设定在约33℃。

[0070] 在本发明的一个实施方案中,单相温度设定在约34℃。

[0071] 在本发明的一个实施方案中,单相温度设定在约35℃。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,单相温度设定在约36℃。

[0073] 在本发明的另一个实施方案中,单相温度设定在约37℃。

[0074] 在一个实施方案中,本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0075] a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;

[0076] b) 将具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;

[0077] c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中合适的条件是单相温度条件;以及

[0078] d) 从细胞培养物中获得糖基化蛋白。

[0079] 在一个实施方案中,本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0080] a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;

[0081] b) 将具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;

[0082] c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中合适的条件是单相温度条件;以及

[0083] d) 从细胞培养物中获得糖基化蛋白,

[0084] 其中在步骤(c)期间单相温度不具有温度变化。

[0085] 在一个实施方案中,本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中生产糖基化蛋白的方法,该方法包括以下步骤:

[0086] a) 在种子扩大培养期间制备具有合适细胞浓度的接种体;

[0087] b) 将具有合适细胞浓度的接种体接种到生产生物反应器中;

[0088] c) 在合适的条件下将细胞在生产生物反应器中培养,其中合适的条件是单相温度条件;以及

[0089] d) 从细胞培养物中获得糖基化蛋白,

[0090] 其中在步骤(c)中生产生物反应器不具有任何区分的生长期和生产期。

[0091] 在另一个实施方案中,进行种子扩大培养步骤以发育具有合适细胞浓度的接种体。需要至少约72小时以发育成具有期望细胞浓度的接种体,然后将接种体接种到生产生

物反应器中用于进一步的扩增(scale up)和蛋白生产。

[0092] 在另一个实施方案中,在生产发酵器或生产生物反应器中进行细胞培养方法。可以在9至40天的总时期内培养细胞。在另一个实施方案中,至少在第15天之前,优选地在第13天,更优选地在第12天以及最优选地在第11天收获蛋白。在另一个实施方案中,在细胞存活率达到小于 $\leq 90\%$ 之前收获蛋白。在另一个实施方案中,在细胞存活率达到小于 $\leq 70\%$ 之前收获蛋白。在另一个实施方案中,在细胞存活率达到小于 $\leq 50\%$ 之前收获蛋白。在优选的实施方案中,合适的培养条件是不具有温度变化的单相温度。温度选自约 33°C 至约 37°C ,优选地选自约 33°C 至约 36°C 。

[0093] 在另一个实施方案中,在培养期间合适的条件可以进一步选自pH、渗透压、溶解氧浓度和细胞密度。

[0094] 以合适的细胞浓度开始种子制备(seed preparation),合适的细胞浓度选自合适的培养基中的 0.1×10^6 细胞/mL至 0.5×10^6 细胞/mL。在优选的实施方案中,以合适的培养基中 0.3×10^6 细胞/mL开始种子制备。在另一个优选的实施方案中,以合适的培养基中 0.3×10^6 细胞/mL开始种子制备并且进一步补充有合适浓度的谷氨酰胺和甲氨蝶呤。谷氨酰胺和甲氨蝶呤的合适浓度分别选自3mM至6mM,优选4mM,和70nM至100nM,优选80nM。

[0095] 在另一个实施方案中,谷氨酰胺的合适浓度是6mM。

[0096] 在某个实施方案中,种子培养物(seed culture)维持在约3%至8% CO_2 ,优选5% CO_2 ,溶解氧浓度选自约30%至约70%,优选50%,相对湿度选自约70%至约90%,优选85%,搅拌速度选自约0.2m/s至约0.4m/s,优选0.3m/s,以及温度选自约 34°C 至约 37°C 之间,优选 37°C 。在某个实施方案中,通过以0.00至0.03vvm喷射空气和以0.00至0.09vvm喷射氧气来维持溶解氧浓度的浓度。在某个实施方案中,通过稀释到至少 0.1×10^6 细胞/mL将种子培养物进一步传代扩增。可以在种子培养的间隔期间进行稀释。在另一个实施方案中,至少在第3天或在72小时进行稀释。

[0097] 在优选的实施方案中,通过补充进料进一步扩增种子培养物直到培养物生长至合适的细胞浓度。通过补充进料进一步扩增种子培养物直到培养物在合适的时间段内生长至合适的细胞浓度。可以通过在至少5天内补充进料进一步扩增种子培养物,并且细胞即接种体的合适的浓度选自约 4×10^6 细胞/mL至约 7×10^6 细胞/mL,优选 5×10^6 细胞/mL。

[0098] 在实施方案中,将进料补充至在合适的生物反应器或发酵器中在合适的培养条件下培养的细胞。在某个实施方案中,在合适的培养条件下培养细胞,合适的培养条件为:选自约3%至6% CO_2 ,优选5% CO_2 ,溶解氧浓度选自约30%至约70%,优选50%,相对湿度选自约70%至约90%,优选85%,搅拌速度选自约0.2m/s至约0.4m/s,优选0.3m/s,以及温度选自约 34°C 至约 37°C 之间,优选 37°C 。在某个实施方案中,通过以0.03vvm至0.09vvm喷射空气来维持溶解氧浓度的浓度。

[0099] 在实施方案中,在种子培养期间细胞的存活率维持至少 $>70\%$,优选 $>80\%$,更优选 $>90\%$ 。

[0100] 在优选的实施方案中,细胞取自一个细胞库并且在包含具有或不具有甲氨蝶呤的生长培养基的摇瓶(shake flask)中培养至起始活细胞浓度(VCC)为 0.3×10^6 细胞/mL。然后将种子培养瓶保持在 37°C 的设定温度、5% CO_2 浓度、120rpm和约85%相对湿度下。在随后的传代期间通过在每72小时之后稀释到 0.3×10^6 细胞/mL使种子体积得到体积扩增。在生

物反应器(或瓶)中,在第1天和第3天向N-1种子额外地补充10%的进料(feed)并孵育120小时。来自VCC为2至 2.5×10^6 细胞/mL和存活率>90%的N-2生物反应器(或瓶)的对数期(log phase)细胞用于接种N-1生物反应器(或瓶)。将N-1生物反应器维持在 ~ 0.3 m/s的叶尖速度(tip speed),并通过分别以0.00至0.03vvm喷射空气和以0.00至0.09vvm喷射氧气使溶解氧维持在溶解氧饱和度的约50%,以实现最终的VCC为2至 10×10^6 细胞/mL和存活率>90%,更优选为4至 8×10^6 细胞/mL和存活率>90%,甚至更优选为5至 6×10^6 细胞/mL和存活率>90%。

[0101] 从种子培养物中获得的合适浓度的细胞称为接种体,其转移到生物反应器或发酵器以在高密度下开始培养。在某个实施方案中,接种体的合适浓度选自约 4×10^6 细胞/mL至约 7×10^6 细胞/mL,优选 5×10^6 细胞/mL。

[0102] 用具有合适细胞浓度的接种体启动分批(batch)或生产生物反应器,该合适细胞浓度选自合适的培养基中的 4×10^6 细胞/mL至 7×10^6 细胞/mL。在优选的实施方案中,种子密度是 1.2×10^6 细胞/mL(其可以通过稀释由种子制备获得的 5×10^6 细胞/mL细胞/mL或 6×10^6 细胞/mL细胞/mL来获得)。在另一个优选的实施方案中,种子密度是 1×10^6 细胞/mL。在某个优选的实施方案中,在合适的培养基中培养细胞并且进一步补充合适浓度的谷氨酰胺。谷氨酰胺的合适浓度选自3mM至6mM,优选4mM。

[0103] 在某个实施方案中,将生产生物反应器维持在约pH值是约6至约8、优选约6.7至7.4、更优选7,3%至6%CO₂、优选5%CO₂,溶解氧浓度选自约30%至约70%、优选50%,搅拌速度选自约0.2m/s至约0.5m/s、优选0.3m/s,以及温度选自约34℃至约37℃之间、优选34℃。在某个实施方案中,通过以0.03vvm至0.09vvm喷射空气来维持溶解氧浓度的浓度。

[0104] 碳酸氢钠和CO₂气体用于控制培养物的pH。

[0105] 在实施方案中,基于剩余葡萄糖水平在分批/生物反应器培养期间进行进料。将葡萄糖水平调整到至少2g/L,如果葡萄糖水平低于2g/L,则补充进料以维持合适的葡萄糖水平。每12小时或18小时或24小时监测培养物的葡萄糖浓度。

[0106] 在实施方案中,进料可以包含约30至约35g/L的葡萄糖。

[0107] 在另一个实施方案中,进料可以包含约180至约220mM的L-谷氨酰胺,优选200mM的L-谷氨酰胺溶液。在一个实施方案中,在第2天然后随后地每2天直到第11天都将L-谷氨酰胺溶液以初始体积的1%加入到培养物中。在另一个实施方案中,在第4天然后在第7天和在第9天都将L-谷氨酰胺溶液以初始体积的1%加入到培养物中。

[0108] 在另一个实施方案中,将D-葡萄糖作为进料补充到培养物中。D-葡萄糖的浓度选自约60g至约90g,优选80g。在某个实施方案,至少在9天以后或者至少从第10天开始将D-葡萄糖作为进料补充到培养物中。

[0109] 在另一个实施方案中,至少在10天以后或者11天以后或者12天以后或者13天以后收获期望的蛋白。

[0110] 在另一个实施方案中,当培养物存活率降低到低于40%至70%,优选低于50%时进行培养物的收获。

[0111] 在另一个实施方案中,在单相生产生物反应器中,以起始VCC(在接种种子之后)为0.1至 10×10^6 细胞/mL和存活率>90%,更优选地VCC为0.3至 5×10^6 细胞/mL和存活率>90%,甚至更优选地VCC为1至 2×10^6 细胞/mL和存活率>90%,以最终分批体积(batch volume)的

约55%，将N-1种子接种到包含生长培养基的生物反应器中开始生产生物反应器过程。通过添加8%碳酸氢钠(NaHCO_3)或者 CO_2 气体将培养物的pH维持在pH范围为6.7至7.4之间。根据叶尖速度设定搅拌速度为0.3至0.5m/s，通过以0.00至0.03vvm喷射空气和以0.00至0.09vvm喷射氧气控制溶解氧浓度维持在50%的溶解氧饱和度。在整个生产生物反应器方法(单相)中，温度设定于34℃至37℃之间的单一设定点，优选34℃。基于剩余葡萄糖水平进行反应器的进料。每24小时监测培养物的葡萄糖浓度，如果葡萄糖水平低于2g/L则通过添加进料来调整葡萄糖浓度至3g/L。进料含有33.5g/L葡萄糖。在48小时以及之后每48小时直到240小时都将200mM的L-谷氨酰胺溶液以初始体积的1%添加到培养物中。在264小时或者如果培养物的存活率降低至低于90%时，以先达到的条件为准，收获培养物。

[0112] 在生物反应器中开始细胞培养过程，其中活细胞浓度选自约 1×10^6 细胞/mL至 2×10^6 细胞/mL，优选 1.2×10^6 细胞/mL。在另一个实施方案中，活细胞浓度是 1×10^6 细胞/mL。在某个实施方案中，用于培养细胞的合适条件选自pH为6.7至7.4，优选7.0。在另一个实施方案中，渗透压选自约250至约550mOsm/Kg。在另一个实施方案中，溶解氧选自约30%至约70%，优选在50%的设定点。

[0113] 在优选的实施方案中，在生产生物反应器中生长和生产期是不区分的。

[0114] 在另一个实施方案中，生产期可以是分批的或者分批进料的。

[0115] 在实施方案中，通过本领域技术人员已知的技术来净化(clarify)收获的蛋白。在优选的实施方案中，收获的蛋白质存在于从生物反应器或发酵器获得的液体培养基(broth)中。以合适的浓度加入EDTA溶液，可以是5mM，然后使用POD系统通过深度过滤进行净化。

[0116] 培养基组成对于提高培养物寿命和生产力是非常重要的。基础细胞培养基配方是本领域熟知的。根据待培养的宿主细胞的需求，本领域技术人员将向这些基础培养基配方中加入诸如氨基酸、盐、糖、维生素、激素、生长因子、缓冲剂、抗生素、脂质、痕量元素等成分。培养基可以或不可以包含血清和/或蛋白。包括无血清和/或限定(defined)培养基的各种组织培养基是用于细胞培养商业上可获得的。为了本发明的目的，组织培养基限定为体外细胞培养中适合于动物细胞优选哺乳动物细胞生长的培养基。典型地，组织培养基包含缓冲剂、盐、能量来源、氨基酸、维生素和痕量必需元素。使用在培养中能够支持适当的真核细胞生长的任何培养基；本发明广泛地应用于培养物中的真核细胞，尤其是哺乳动物细胞，培养基的选择对于本发明不是决定性的。适用于本发明的组织培养基可从例如ATCC(Manassas, Va.)商业获得。例如，使用如下培养基中的任何一种或组合：RPMI-1640培养基，RPMI-1641培养基，达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)，Eagle最小必需培养基(Minimum Essential Medium)，F-12K培养基，Ham F12培养基，Iscove改良的达尔伯克培养基，McCoy 5A培养基，Leibovitz L-15培养基，和无血清培养基例如EX-CELL™ 300系列。在优选的实施方案中，培养基是EX-CELL™ 302培养基。

[0117] 在另一个优选的实施方案中，混合进料培养基包括BalanCD CHO Feed 2、EX-CELL 302粉末培养基、 NaHCO_3 、L-谷氨酰胺粉粉末、MEM氨基酸(50×)、MEM非必需氨基酸(100×)、MEM维生素溶液(100×)。

[0118] 在本发明的方法和组合物中，细胞可以在无血清、无蛋白质、无生长因子和/或无蛋白胨的培养基中生长。应用于培养基的术语“无血清”包括不包含血清例如胎牛血清的任

何哺乳动物细胞培养基。

[0119] 本领域技术人员还可以选择使用很多个性化培养基配方中的一种,这些个性化培养基已经被开发以使特定培养的宿主细胞的细胞生长、细胞存活率和/或重组多肽生产最大化。根据本发明的方法可以与商购的细胞培养基或者与单独配制的配合特定细胞系使用的细胞培养基组合使用。

[0120] 在优选的实施方案中,培养基是不含血清的。在另一个优选的实施方案中,培养基基本上不含链烷酸或其盐。链烷酸和其盐选自丁酸、丁酸钠或二丁基cAMP。

[0121] 在实施方案中,糖基化蛋白质选自阿昔单抗,阿巴西普、阿达木单抗,阿瑞鲁单抗(Abrilumab),阿托珠单抗(Afutuzumab),阿柏西普,阿仑单抗(Alemtuzumab),阿法西普,培化阿珠单抗(Alacizumab pegol),阿那白滞素(Anakinra),阿西莫单抗(Arcitumomab),阿塞西普(Atacicept),托珠单抗(Atlizumab),阿托木单抗(Atorolimumab),巴利昔单抗(Basiliximab),贝奈西普(Baminercept),贝妥莫单抗(Bectumomab),贝利木单抗(Belumumab),贝索单抗(Besilesomab),贝伐珠单抗,比西单抗(Biciromab),贝拉西普,维汀-布仑妥昔单抗(Brentuximab vedotin),博达路单抗(Brodalumab),卡那单抗(Canakinumab),卡罗单抗喷地肽(Capromab pendetide),卡妥索单抗(Catumaxomab),赛妥珠单抗,西妥昔单抗,泰坦-克利妥珠单抗(Clivatuzumab tetraxetan),达利珠单抗(Daclizumab),狄诺塞麦,依库珠单抗(Eculizumab),依决洛单抗(Edrecolomab),依法珠单抗(Efalizumab),依芬古单抗(Efungumab),Eloctate,厄妥索单抗(Ertumaxomab),依那西普,伊瑞西珠(Etaracizumab),法索单抗(Fanolesomab),法勒珠单抗(Farletuzumab),芳妥珠单抗(Fontolizumab),吉妥单抗(Gemtuzumab ozogamicin),吉仑妥昔单抗(Girentuximab),戈利木单抗(Golimumab),替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan),伊戈伏单抗(Igovomab),英西单抗(Imciromab),英夫利昔单抗,易普单抗(Ipilimumab),拉贝珠单抗(Labetuzumab),美泊珠单抗(Mepolizumab),莫维珠单抗(Motavizumab),莫罗单抗-CD3(Muromonab-CD3),那他珠单抗,尼妥珠单抗,疏诺莫单抗(Nofetumomab merpentan),奥比妥珠单抗(Obinutuzumab),奥法木单抗,奥马珠单抗,奥戈伏单抗(Oregovomab),帕利珠单抗,帕尼单抗,派土莫单抗(Pemtumomab),帕妥珠单抗,雷莫芦单抗(Ramucirumab),雷珠单抗,雷昔库单抗(Raxibacumab),利妥昔单抗,利纳西普,罗维珠单抗(Rovelizumab),鲁利珠单抗(Ruplizumab),硫索单抗(Sulesomab),他珠单抗(Tacatuzumab tetraxetan),替非珠单抗(Tefibazumab),托珠单抗,曲妥珠单抗,ado-曲妥珠单抗emtansine(Ado-Trastuzumab Emtansine),托西莫单抗(Tositumomab),TRBS07,尤特克单抗,维多珠单抗(Vedolizumab),维西珠单抗(Visilizumab),伏妥昔单抗(Votumumab),扎鲁木单抗(Zalutumumab),扎木单抗(Zanolimumab)。

[0122] 多肽的纯化可以包括含有与多肽结合的试剂的亲合柱;在如伴刀豆球蛋白A-琼脂糖、肝素-**TOYOPEARL®** (Toyo Soda Manufacturing Co.,Ltd.,日本)或者汽巴克隆蓝(Cibacrom blue)3G**ASEPHAROSE®** (Pharmacia Fine Chemicals,Inc.,纽约)的这些亲和树脂上的一个或多个柱步骤(column step);涉及洗脱的一个或多个步骤;和/或免疫亲和层析。可以以利于纯化的形式表达多肽。例如,它可以表达为融合多肽,例如麦芽糖结合多肽(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或硫氧还蛋白(TRX)的那些。用于这种融合多肽的表达和纯化的试剂盒可以分别从New England BioLab(Beverly,Mass.)、Pharmacia

(Piscataway, N.J.) 和Invitrogen商购。多肽可以用表位标记然后通过使用针对这种表位的特异性抗体来纯化。一种这样的表位(**FLAG®**)从Kodak (New Haven, Conn.) 商购。还可以使用包含多肽结合蛋白(例如抗重组多肽、抗亲和纯化表达的多肽的单克隆抗体)的亲和柱。其他类型的亲和纯化步骤可以是蛋白A(Protein A)或蛋白G(Protein G)柱,其中亲和试剂结合包含Fc结构域的蛋白。可以使用传统技术,例如以高盐洗脱缓冲剂从亲和柱上去除多肽然后透析到低盐缓冲剂中以供使用或者根据所使用的亲和基质通过改变pH或其他成分而从亲和柱上去除多肽,或者可以使用亲和部分(affinity moiety)的天然存在的底物而竞争性地去除多肽。

[0123] 虽然可以通过以下实施例的方式说明以上详细的某些实施方案和本发明,但是本领域技术人员将清楚地理解在实施方案和实施例中可以进行很多修改而不脱离其教导。

[0124] 实施例

[0125] 通过将二氢叶酸还原酶(dhfr)和转染到dhfr缺陷型CHO细胞(DUKX-B11, ATCC CRL-9096)的感兴趣基因的共转染接着随后进行dhfr/MTX-介导的基因扩增来建立CHO细胞系。根据与重组r-DNA技术相关的本领域已知的技术来制备克隆品。

[0126] 实施例1:通过单相方法生产依那西普

[0127] 种子扩大方法(Seed Expansion process)

[0128] 在补充有4mM L-谷氨酰胺和MTX的生长培养基中,以 0.3×10^6 细胞/mL从细胞库复活(revival)小瓶之后开始种子扩大。在整个种子扩大培养阶段MTX的浓度维持在80nM。在摇瓶中将种子培养物维持在37℃、5%CO₂浓度、120rpm以及约80%相对湿度。

[0129] 在对数期通过每72小时之后稀释至 0.3×10^6 细胞/mL而在每个随后的传代中充分地扩大种子体积。用 0.3×10^6 细胞/mL引发N-2种子,并且在24小时和72小时额外地补充(起始体积的)10%的混合进料并且培养120小时。

[0130] 来自VCC为 5.5×10^6 细胞/mL和存活率>95%的N-2瓶的对数期细胞用于接种具有初始种子密度为 1.2×10^6 细胞/mL的N-1瓶。

[0131] 将N-1种子瓶运行120小时,其中在24小时和72小时用(起始体积的)10%混合进料来进料以获得 6.6×10^6 细胞/mL的活细胞密度和大于>95%的存活率。

[0132] 生产生物反应器方法

[0133] 在单相生产生物反应器中,以起始VCC(在种子接种之后)为 1.2×10^6 细胞/mL和存活率>98%,以最终批量体积的约55%将N-1种子接种到包含生长培养基的生物反应器中来开始分批方法。通过添加8%碳酸氢钠(NaHCO₃)或CO₂气体将培养物pH维持在pH范围为6.7至7.4之间。根据叶尖速度设定搅拌速度范围为0.3至0.5m/s,并且通过以0.00至0.03vvm喷射空气和以0.00至0.09vvm喷射氧气来控制溶解氧浓度维持在50%的溶解氧饱和度。在整个生产生物反应器方法(单相)中将温度设定在单一设定点34℃之间。基于剩余葡萄糖水平进行反应器的进料。每24小时监测培养物的葡萄糖浓度,并且如果剩余葡萄糖水平低于2g/L,则每24小时添加进料(进料含有33.5g/L葡萄糖)来调节至3g/L。在48小时并且之后每48小时直到240小时都将200mM的L-谷氨酰胺溶液以初始体积的1%加入到培养物中。培养物到达约 11×10^6 细胞/mL的峰值VCC。在264小时收获培养物。

[0134] 实施例2:通过单相方法生产贝伐单抗

[0135] 种子扩大方法

[0136] 在补充有6mM L-谷氨酰胺的生长培养基中,以 0.4×10^6 细胞/mL从细胞库复活小瓶之后开始种子的扩大。在摇瓶中将种子培养物维持在37℃、8%CO₂浓度、150rpm以及约80%相对湿度。

[0137] 在对数期通过每72小时之后稀释至 0.4×10^6 细胞/mL而在每个随后的传代中充分地扩大种子体积。

[0138] 将N-1种子烧瓶运行72小时以获得 5.5×10^6 细胞/mL的活细胞密度和大于>95%的存活率。

[0139] 生产生物反应器方法

[0140] 在单相生产生物反应器中,以起始VCC(在种接种之后)为 1×10^6 细胞/mL和存活率>98%,以最终分批体积的约69%将N-1种子接种到包含生长培养基的生物反应器中来开始分批方法。通过添加8%碳酸氢钠(NaHCO₃)或CO₂气体将培养物pH维持在pH范围为6.8至7.4之间。根据叶尖速度设定搅拌速度范围为0.3至0.5m/s,并且通过以0.00至0.03vvm喷射空气和以0.00至0.09vvm喷射氧气来控制溶解氧浓度维持在50%的溶解氧饱和度。在整个生产生物反应器方法(单相)中将温度设定在单一设定点34℃之间。基于剩余葡萄糖水平进行反应器的进料。每24小时监测培养物的葡萄糖浓度,并且如果剩余葡萄糖水平低于2g/L则每24小时添加进料(进料含有33.5g/L葡萄糖)来调节至4g/L。在96小时、168小时和216小时将200mM的L-谷氨酰胺溶液以初始体积的1%加入到培养物中。培养物到达约 11×10^6 细胞/mL的峰值VCC。在264小时收获培养物。

[0141] 实施例3:通过单相方法生产利妥昔单抗

[0142] 种子扩大方法

[0143] 将来自液氮的一瓶利妥昔单抗解冻,将细胞接种在包含生长培养基的125mL摇瓶中并于37℃、120rpm下在CO₂孵育摇床中培养。随着适合于接种生产生物反应器的培养物体积的增加,每72小时±24小时进行细胞传代。在每个传代中,接种密度维持在 0.3×10^6 细胞/mL,最终VCC目标为 $3.0 \pm 1.0 \times 10^6$ 细胞/mL。

[0144] 生产生物反应器方法

[0145] 在单相生产生物反应器中,以起始VCC(在种接种之后)为 $0.5 \pm 0.2 \times 10^6$ 细胞/mL和存活率>90%、更优选VCC为 0.5×10^6 细胞/mL和存活率>95%,以最终分批体积的约40±5%,将N-1种子接种到包含生长培养基的生物反应器中来开始分批方法。根据叶尖速度设定搅拌速度范围为0.4至0.6m/s。在整个生产生物反应器方法(单相)中,将温度设定在单一设定点即36℃。在第2、3、5、6、7和8天进行生产生物反应器的进料用于细胞培养物的维持、生产力和产物质量属性。在整个细胞培养期间将谷氨酰胺和葡萄糖分别维持在约2mM和2g/L用于细胞培养维持。在≤312小时或者如果培养物存活率降低至小于50%时,以先到达的为准,收获培养物。

[0146] 实施例4:通过单相方法生产阿达木单抗

[0147] 种子扩大方法

[0148] 将来自液氮的一瓶阿达木单抗解冻,将细胞接种在包含生长培养基的125mL摇瓶中并于37℃、120rpm下在CO₂孵育摇床中培养。随着适合于接种生产生物反应器的培养物体积的增加,每72小时±24小时进行细胞传代。在每个传代中,接种密度维持在 0.3×10^6 细胞/mL,最终VCC目标为 $3.0 \pm 1.0 \times 10^6$ 细胞/mL。

[0149] 生产生物反应器方法

[0150] 在单相生产生物反应器中,以起始VCC(在种接种之后)为 $0.5 \pm 0.2 \times 10^6$ 细胞/mL和存活率>90%、更优选VCC为 0.5×10^6 细胞/mL和存活率>95%,以最终分批体积的约 $60 \pm 10\%$,将N-1种子接种到包含生长培养基的生物反应器中来开始分批方法。根据叶尖速度设定搅拌速度范围为 0.6 ± 0.2 m/s。在整个生产生物反应器方法中,将温度设定在单一设定点 36°C 。在第3、6、9和11天进行进料用于细胞培养物的维持、生产力和产物质量属性。在整个细胞培养期间将谷氨酰胺和葡萄糖分别维持在约2mM和2g/L用于细胞培养维持。将收获标准设定在 $\leq 50\%$ 细胞存活率或288小时 ± 12 小时,以先到达的为准。

[0151] 实施例5:通过单相方法生产曲妥珠单抗

[0152] 种子扩大方法

[0153] 将来自液氮的一瓶曲妥珠单抗解冻,将细胞接种在包含生长培养基的125mL摇瓶中并在 37°C 、120rpm、 $5\% \text{CO}_2$ 、85%相对湿度下在 CO_2 孵育摇床中培养。随着适合于接种生产生物反应器的培养物体积的增加,每72小时 ± 24 小时进行细胞传代。在每个传代中,接种密度维持在 0.3×10^6 细胞/mL,最终VCC目标为约 $3.0 \pm 1.0 \times 10^6$ 细胞/mL。

[0154] 生产生物反应器方法

[0155] 在单相生产生物反应器中,以起始VCC(在种接种之后)为 $0.5 \pm 0.2 \times 10^6$ 细胞/mL和存活率>90%、更优选VCC为 0.5×10^6 细胞/mL和存活率>95%,以最终分批体积的 $40 \pm 5\%$,将N-1种子接种到包含生长培养基的生物反应器中来开始分批方法。根据叶尖速度设定搅拌速度范围为0.4至0.6m/s。在整个生产生物反应器方法中,温度是 34°C 。在第2、4、6、8和10天进行反应器的进料用于维持细胞培养物的寿命、生产力和产物质量属性。在整个细胞培养期间将谷氨酰胺和葡萄糖分别维持在约2mM和2g/L用于细胞培养的维持。在 ≤ 312 小时或者当培养物存活率降低至小于50%进行培养物的收获,以先到达的为准。

[0156] 在该申请中所引用的所有专利、专利申请和公开文献出于所有目的通过引用方式以其整体并入本文,具有与单独表示的专利、专利申请和公开文献相同的范围。

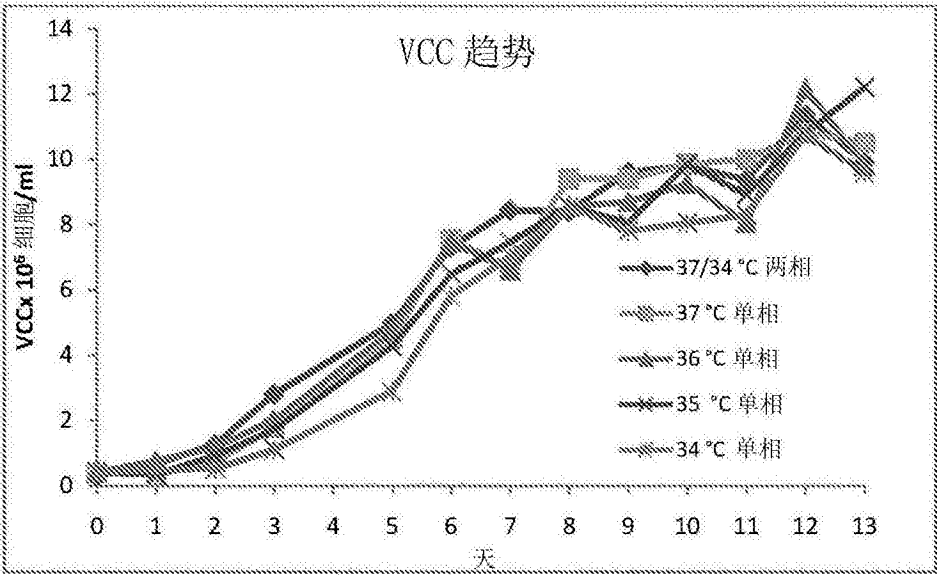


图1

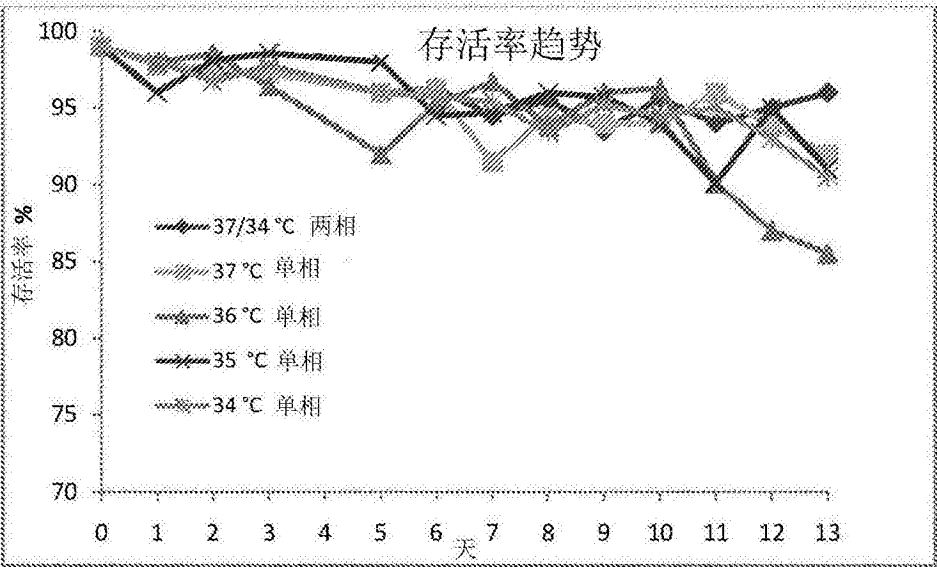


图2

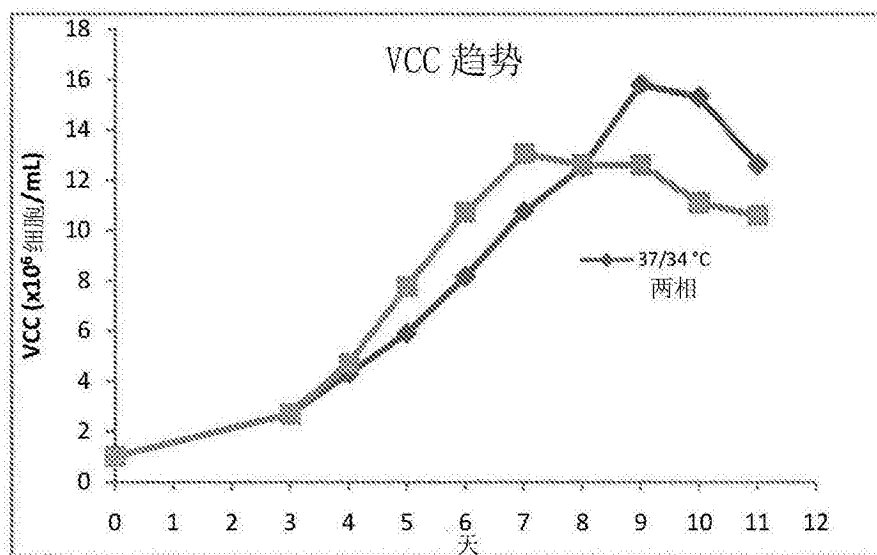


图3

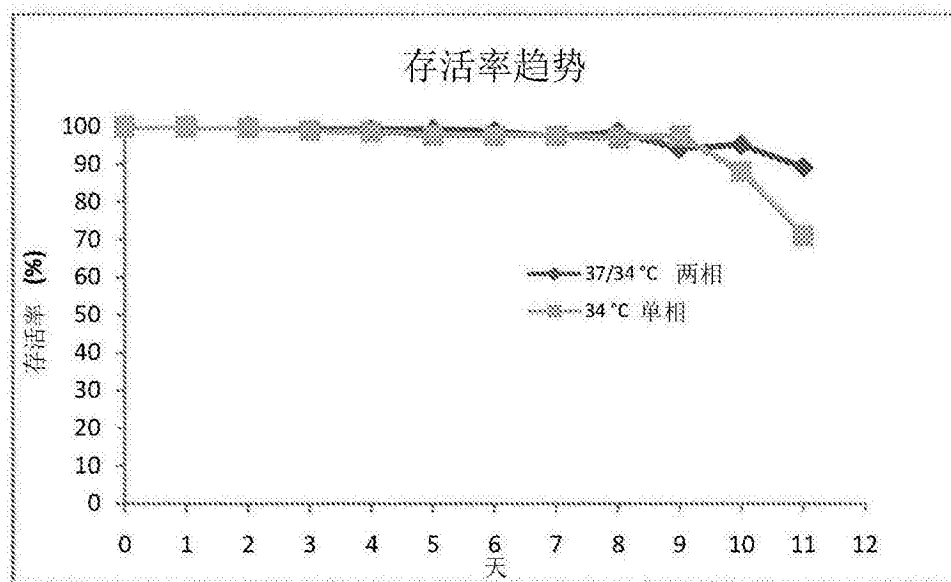


图4

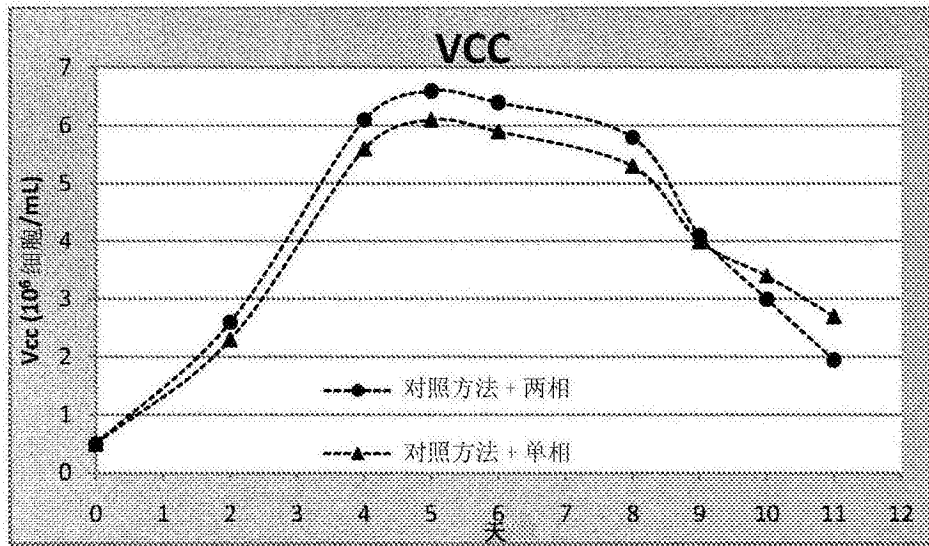


图5

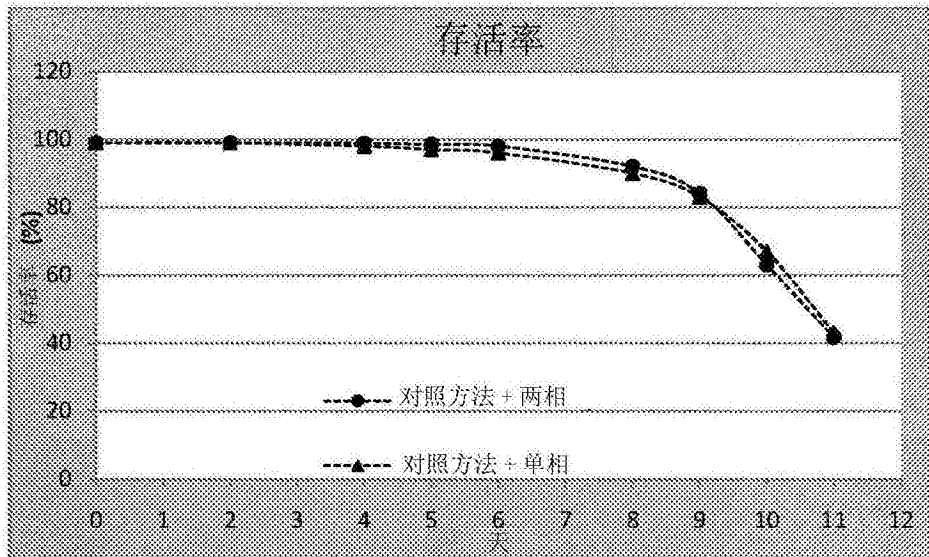


图6

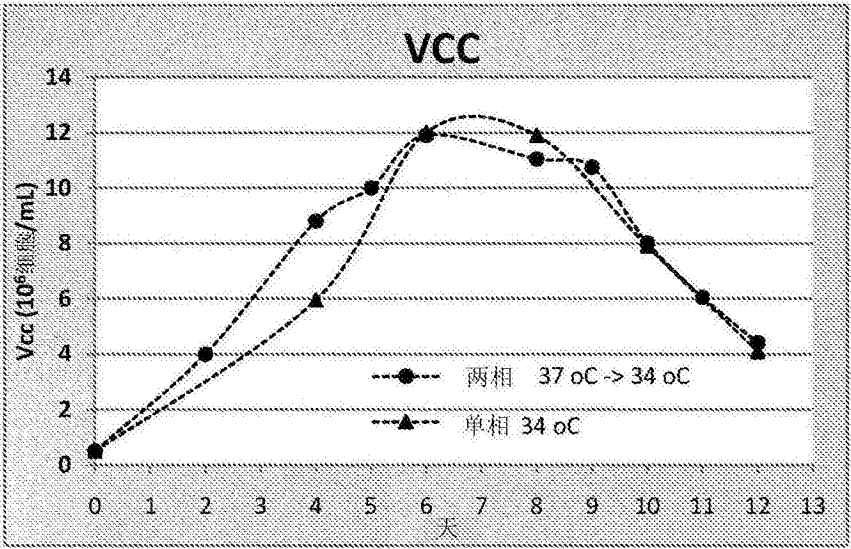


图7

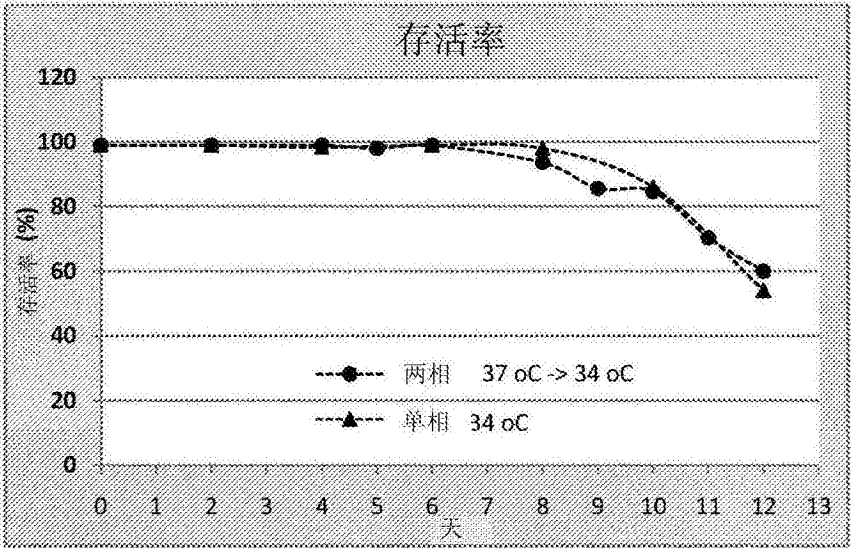


图8