(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117897401 A
(43)申请公布日 2024.04.16

(21)申请号 202280059449.8
(22)申请日 2022.09.09
(30)优先权数据
63/242623 2021.09.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.03.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/076158 2022.09.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/039502 EN 2023.03.16
(71)申请人 美国安进公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 K·M·达里斯 H·T·N·乐 E·吉斯莱森 T·P·蒙罗
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 罗文锋 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 14/65(2006.01)

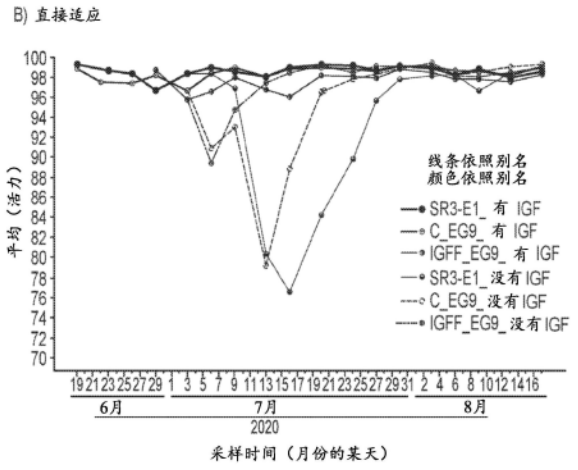
权利要求书1页 说明书29页 附图5页

(54)发明名称

平台宿主对IGF培养基的适应

(57)摘要

提供了在缺乏IGF-1的培养基中的哺乳动物细胞培养中生产重组目的蛋白的方法。还提供了用于生产能够在缺乏IGF-1的培养基中生长的哺乳动物细胞的方法。



CN 117897401 A

1.一种从哺乳动物细胞培养来生产目的蛋白的方法,该方法包括:

(a)在具有0.05mg/L或更少的胰岛素样生长因子(IGF-1)的第二细胞培养基中培养表达目的蛋白的哺乳动物细胞以表达该目的蛋白,其中该哺乳动物细胞已经直接适应了在具有0.03mg/L或更少的IGF-1的第一细胞培养基中生长并且包含编码该目的蛋白的异源核酸;以及

(b)回收通过该哺乳动物细胞生产的目的蛋白。

2.如权利要求1所述的方法,其中该第二细胞培养基含有少于0.03mg/L的IGF-1。

3.如权利要求2所述的方法,其中该第二细胞培养基不含IGF-1。

4.如权利要求1所述的方法,其中该第一细胞培养基不含IGF-1。

5.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中该哺乳动物细胞具有与尚未直接适应缺乏IGF-1的培养基的相同谱系的哺乳动物细胞相当的生长速率。

6.如权利要求5所述的方法,其中该哺乳动物细胞的倍增时间少于30小时。

7.如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中在该培养的第10天,所表达的目的蛋白的滴度为至少50mg/L。

8.如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中该目的蛋白是抗原结合蛋白。

9.如权利要求8所述的方法,其中该目的蛋白选自由单克隆抗体、双特异性T细胞接合子、免疫球蛋白、Fc融合蛋白和肽体组成的组。

10.如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中哺乳动物细胞培养工艺利用补料分批培养工艺、灌注培养工艺、或其组合。

11.如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中通过在含有0.03mg/L或更少的IGF-1的无血清培养基中,为至少100L的生物反应器接种至少0.5×10^6至3.0×10^6个细胞/mL来建立该哺乳动物细胞培养。

12.如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中这些哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

13.如权利要求12所述的方法,其中这些CHO细胞缺乏二氢叶酸还原酶($DHFR^-$)或是谷氨酰胺合成酶敲除(GSKO)型。

14.如权利要求1所述的方法,其中将回收的目的蛋白纯化并配制成药学上可接受的配制品。

15.如权利要求14所述的纯化的、配制的目的蛋白。

16.一种用于使哺乳动物细胞直接适应IGF^-培养基的方法,该方法包括:

a)在包含0.03mg/L或更少的IGF-1的细胞培养基中培养哺乳动物细胞群;

b)通过单细胞克隆从该哺乳动物细胞群获得单个细胞;

c)将这些单个细胞进行扩增和传代,直到这些单个细胞恢复至90%或更多并且倍增时间小于30小时。

17.如权利要求16所述的方法,其中该细胞培养基不包含IGF-1。

18.如权利要求16或17所述的方法,其中这些哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

19.如权利要求18所述的方法,其中这些CHO细胞缺乏二氢叶酸还原酶($DHFR^-$)或是谷氨酰胺合成酶敲除(GSKO)型。

平台宿主对IGF⁻培养基的适应

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及用于使哺乳动物细胞系适应具有减少量的胰岛素样生长因子(IGF-1)的细胞培养基的方法以及使用这些细胞生产重组蛋白。

背景技术

[0002] 生物配制品由于其广泛的应用而在世界范围内被用于多种应用中,诸如治疗和诊断。哺乳动物细胞系是这些生物配制品的主要表达系统,而中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是主要的细胞工厂。参见Lalonde等人,2017,J Biotechnol[生物技术杂志]251:128-140。特别是随着生物仿制药的出现,上市速度和成本效益现在比以往任何时候都更重要。

[0003] 制造生物配制品的成本由于它们利用多步工艺的生产的复杂性而非常高昂,该多步工艺涉及选择最佳的细胞系、大量培养生产细胞、以及从细胞收获物中纯化所需的生物配制品。虽然由于对生产的各方面的改进,这些成本正在下降,但作为一线疗法而广泛采用时,其成本仍可能令人望而却步。

[0004] 为了使患者更容易获得生物治疗剂,降低制造过程的商品成本是有吸引力的建议。高昂的成本的一个领域是原料药工艺中使用的细胞培养基。IGF-1是通过胰岛素样生长因子/胰岛素受体(IGFR/IR)途径的信号传导支持细胞生长的关键蛋白补充物;然而,其构成了培养基原料成本的很大比例。

[0005] 因此,需要降低与从宿主细胞生产重组蛋白相关的成本。实现这一目的的一种方式是通过减少或消除对某些细胞培养基补充物诸如IGF-1的需要来降低商品成本。已经通过为细胞培养基补充血小板衍生的生长因子BB,在间充质干细胞中观察到增强的胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)表达。参见美国专利申请公开号US20200245388。还已使用表达载体采用IGF-1R的组成型表达。参见美国临时专利申请号63/108,084。宿主细胞系的逐渐适应已经被用来使细胞适应无蛋白质和无脂质培养基。参见美国专利号9,340,814。

[0006] 仍然存在对IGF-1补充需求减少或没有需求并且在对生长和生产率的影响极低的情况下产生重组蛋白的宿主细胞系的需要。此类细胞系将有益于生物配制品的工艺开发。

发明内容

[0007] 本披露提供了用于从哺乳动物细胞培养来生产目的蛋白的方法,该方法包括(a)在具有0.05mg/L或更少的胰岛素样生长因子(IGF-1)的第二细胞培养基中培养哺乳动物细胞以表达该目的蛋白,其中该哺乳动物细胞已经直接适应了在具有0.03mg/L或更少的IGF-1的第一细胞培养基中生长并且包含编码目的蛋白的异源核酸;以及(b)回收通过该哺乳动物细胞生产的目的蛋白。

[0008] 在某些实施例中,第二细胞培养基含有0.03mg/L或更少的IGF-1。在某些实施例中,第一细胞培养基不含IGF-1。在某些实施例中,第二细胞培养基不含IGF-1。

[0009] 在某些实施例中,已经直接适应的哺乳动物细胞具有与尚未直接适应的相同谱系的哺乳动物细胞相当的生长速率。例如,直接适应的哺乳动物细胞可以具有小于30小时的

倍增时间,诸如在20至30小时之间。

[0010] 在某些实施例中,采用本文所述的方法,在培养的第10天,所表达的目的蛋白的滴度为至少50mg/L。

[0011] 在某些实施例中,该目的蛋白是抗原结合蛋白。在某些实施例中,目的蛋白选自由单克隆抗体、双特异性T细胞接合子、免疫球蛋白、Fc融合蛋白和肽体组成的组。

[0012] 在某些实施例中,哺乳动物细胞培养工艺利用补料分批培养工艺、灌注培养工艺、或其组合。

[0013] 在某些实施例中,通过在含有0.03mg/L或更少的IGF-1的无血清培养基中,为至少100L的生物反应器接种至少0.5×10^6至3.0×10^6个细胞/mL来建立哺乳动物细胞培养。在本实施例的某些方面,生物反应器为至少500L或至少2000L。

[0014] 在某些实施例中,这些哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施例中,这些CHO细胞缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR$^-$)或是谷氨酰胺合成酶敲除(GSKO)型。

[0015] 在某些实施例中,将回收的目的蛋白纯化并配制成药学上可接受的配制品。

[0016] 本披露还提供了使用本文所述的方法制备的纯化的、配制的目的蛋白。

[0017] 本披露还提供了用于使哺乳动物细胞直接适应IGF-培养基的方法,该方法包括:a)在包含0.03mg/L或更少的IGF-1的细胞培养基中培养哺乳动物细胞群;b)通过单细胞克隆从该哺乳动物细胞群获得单个细胞;c)将这些单个细胞进行扩增和传代,直到这些单个细胞恢复至90%或更大的活力并且倍增时间小于30小时。

[0018] 在某些实施例中,该细胞培养基不含IGF-1。

[0019] 在某些实施例中,这些哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在某些实施例中,这些CHO细胞缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR$^-$)或是谷氨酰胺合成酶敲除(GSKO)型。

附图说明

[0020] 图1A-1B描绘了A)在110个群体倍增水平(PDL)的延长的时间段内,GSKO宿主细胞系对无Long R3 IGF-1的专有细胞培养基的逐渐适应;以及B)在1.5个月的时间段内,GSKO宿主细胞对无Long R3 IGF-1的专有细胞培养基的直接适应。

[0021] 图2A-2B展示了与GSKO对照相比,GSKO IGF$^-$适应性单细胞克隆的宿主的倍增时间。将GSKO单细胞克隆的宿主细胞系进行扩增和传代,直到这些细胞系恢复至>90%并且倍增时间为约24小时。

[0022] 图3展示了用单克隆抗体转染后25μM MSX恢复的GSKO IGF$^-$适应性单细胞克隆的宿主的恢复图。IGF$^-$适应性细胞系(灰色)在与对照(由黑线指定)相似的时间段内恢复。

[0023] 图4A-4D:用单克隆抗体转染的单细胞克隆的GSKO宿主细胞系以1e6或3e6个细胞/mL接种并且在15D补料分批生产中对这些宿主细胞系进行评估。不同深浅的灰色和黑色代表从中衍生单细胞克隆的宿主的亲本宿主池。这些形状区分了单个细胞系。转染的细胞系显示出可变的生长和生产率水平,其中几种细胞系在具有IGF-1的GSKO细胞系范围内。A)GSKO单细胞克隆的转染的细胞系在15D补料分批(FB)生产中的活细胞密度图。B)GSKO单细胞克隆的转染的细胞系在15D FB生产中的活力图。C)GSKO单细胞克隆的转染的细胞系在15D FB生产中的滴度图。D)GSKO单细胞克隆的转染的细胞系在15D FB生产中的Qp(体积比生产率)图。

具体实施方式

[0024] 本发明部分基于以下的发现:CHO宿主细胞可以直接适应在IGF-培养基(缺乏IGF-1的培养基)中生长,从而避免了对培养基中高水平的胰岛素样生长因子1(IGF-1)补充的需要。GSKO CHO宿主直接适应了无IGF-1的平台培养基并且克隆了单细胞以创建稳健的宿主细胞系,这些宿主细胞系保留或超过在含有IGF-1的细胞培养基中生长的亲本宿主细胞系的生长和生产率特性。本发明部分源于减少每克原料药的成本的努力,因为IGF-1(一种通过IGF-1R途径的信号传导支持细胞生长的蛋白补充物)占高达约30%的培养基成本。在无IGF-1补充的情况下可以存活和生长的直接适应的CHO细胞可以降低大规模重组蛋白生产中IGF-1的高成本。IGF-适应性宿主细胞池和随后的单细胞克隆的IGF-宿主已经显示出与不需要另外的补充物的平台CHO宿主相似的性能。

[0025] 本文披露的直接适应的细胞显示出与原始CHO细胞的增殖速率相同的增殖速率或超过这些原始CHO细胞的增殖速率。此外,直接适应的细胞显示出与原始CHO细胞相同的重组蛋白生产效率或超过这些原始CHO细胞的重组蛋白生产效率。通过使用本发明的直接适应性细胞系,可以以更便宜和更稳定的方式生产生物药物。

[0026] 本发明特别适用于在缺乏IGF-1的细胞培养基中商业生产目的蛋白。本文所述的方法可以采用更便宜但维持相似的生产的无IGF-1培养基。

[0027] 本发明使用的细胞系(也称为"宿主细胞")直接适应了在缺乏IGF-1或具有0.03mg/L或更少的IGF-1的细胞培养基中生长,并且将具有所需的特性的单克隆进行扩增、传代和选择。在某些实施例中,细胞系还表达具有商业或科学意义的蛋白。细胞系通常源自来自原代培养物的谱系,其可在培养中维持无限时间。对细胞系进行基因工程化涉及用重组的多核苷酸分子转染、转化或转导细胞以便使宿主细胞表达目的蛋白。用于对细胞和/或细胞系进行基因工程化以表达例如目的蛋白的方法和载体是本领域技术人员熟知的;例如,各种技术在Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Ausubel等人编辑(Wiley&Sons[约翰威立父子公司],纽约,1988,和季度更新);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](冷泉实验室出版社,1989);Kaufman,R.J.,Large Scale Mammalian Cell Culture[大规模哺乳动物细胞培养],1990,第15-69页中说明。

[0028] 定义

[0029] 尽管在本申请中使用的术语是本领域中的标准术语,但是本文提供了某些术语的定义以确保权利要求的含义的清楚性和确定性。单位、前缀和符号可能会用它们的国际单位制(SI)接受形式表示。本文列举的数字范围包括定义范围的数字,并且包括并支持所定义范围内的每个整数。除非另外指示,否则本文描述的方法和技术可根据本领域中熟知的常规方法且如贯穿本说明书所引用及论述的各种通用和更特定参考文献中所描述来进行。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约(2001)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Greene Publishing Associates[格林出版联合公司](1992);以及Harlow和Lane Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册]Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约(1990)。

[0030] 如本文所用,除非另外明确说明,否则术语“一”和“一个(种)”意指一个或多个。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语将包括复数且复数术语将包括单数。通常,结合本文中所描述的细胞及组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质及核酸化学及杂交而使用的命名法及其技术是本领域中所熟知且通常使用的那些命名法及技术。

[0031] 在本申请中所引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和专著,都通过援引清楚地特此并入。在本发明的实施例中描述的内容可以与本发明的其他实施例组合。

[0032] 本披露提供了表达“目的蛋白”的方法。“目的蛋白”包括天然存在的蛋白质、重组蛋白和工程化蛋白(例如,在自然界中不存在并且已经由人类设计和/或产生的蛋白质)。目的蛋白可以是,但不必是,已知或怀疑具有治疗相关性的蛋白。

[0033] 如本文所用,术语“多肽”和“蛋白”(例如,如在目的蛋白或目的多肽的上下文中所用)在本文中可互换用于指氨基酸残基的聚合物。这些术语还适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。这些术语还可涵盖已例如通过添加碳水化合物残基以形成糖蛋白而经修饰或经磷酸化的氨基酸聚合物。多肽和蛋白可由天然存在的和非重组的细胞产生,或者多肽和蛋白可由基因工程改造的或重组的细胞产生。多肽和蛋白可包含具有天然蛋白的氨基酸序列的分子,或具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、添加和/或取代的分子。

[0034] 术语“多肽”和“蛋白”涵盖仅包含天然存在的氨基酸的分子,以及包含非天然存在的氨基酸的分子。非天然存在的氨基酸(其可以根据需要取代在本文披露的任何序列中发现的任何天然存在的氨基酸)的实例包括:4-羟基脯氨酸、γ-羧基谷氨酸、ε-N,N,N-三甲基赖氨酸、ε-N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、σ-N-甲基精氨酸、和其他类似的氨基酸和亚氨基酸(例如,4-羟基脯氨酸)。本文使用的多肽表示法中,按照标准用法和惯例,左手方向是氨基末端方向,右手方向是羧基末端方向。

[0035] 可插入蛋白或多肽序列中或取代蛋白或多肽序列中的野生型残基的非天然存在的氨基酸的实例的非限制性列表包括β-氨基酸、高氨基酸、环状氨基酸及具有衍生化侧链的氨基酸。实例包括(呈L形式或D形式;缩写如括号中所示):瓜氨酸(Cit)、高瓜氨酸(hCit)、Nα-甲基瓜氨酸(NMeCit)、Nα-甲基高瓜氨酸(Nα-MeHoCit)、鸟氨酸(Orn)、Nα-甲基鸟氨酸(Nα-MeOrn或NMeOrn)、肌氨酸(Sar)、高赖氨酸(hLys或hK)、高精氨酸(hArg或hR)、高谷氨酰胺(hQ)、Nα-甲基精氨酸(NMeR)、Nα-甲基亮氨酸(Nα-MeL或NMeL)、N-甲基高赖氨酸(NMeHoK)、Nα-甲基谷氨酰胺(NMeQ)、正亮氨酸(Nle)、正缬氨酸(Nva)、1,2,3,4-四氢异喹啉(Tic)、八氢吲哚-2-甲酸(Oic)、3-(1-萘基)丙氨酸(1-Nal)、3-(2-萘基)丙氨酸(2-Nal)、1,2,3,4-四氢异喹啉(Tic)、2-二氢茚基甘氨酸(IgI)、对碘苯丙氨酸(pI-Phe)、对氨基苯丙氨酸(4AmP或4-氨基-Phe)、4-胍基苯丙氨酸(Guf)、甘氨酰基赖氨酸(缩写“K(Nε-甘氨酰基)”或“K(甘氨酰基)”或“K(gly)”)、硝基苯丙氨酸(硝基phe)、氨基苯丙氨酸(氨基phe或氨基-Phe)、苯甲基苯丙氨酸(苯甲基phe)、γ-羧基谷氨酸(γ-羧基glu)、羟基脯氨酸(羟基pro)、对羧基苯丙氨酸(Cpa)、α-氨基己二酸(Aad)、Nα-甲基缬氨酸(NMeVal)、N-α-甲基亮氨酸(NMeLeu)、Nα-甲基正亮氨酸(NMeNle)、环戊基甘氨酸(Cpg)、环己基甘氨酸(Chg)、乙酰基精氨酸(乙酰基arg)、α,β-二氨基丙酸(Dpr)、α,γ-二氨基丁酸(Dab)、二氨基丙酸(Dap)、环己

基丙氨酸(Cha)、4-甲基-苯丙氨酸(MePhe)、β,β-二苯基丙氨酸(BiPhA)、氨基丁酸(Abu)、4-苯基-苯丙氨酸(或联苯丙氨酸;4Bip)、α-氨基-异丁酸(Aib)、β-丙氨酸、β-氨基丙酸、哌啶甲酸、氨基己酸、氨基庚酸、氨基庚二酸、锁链素、二氨基庚二酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基精氨酸、羟基赖氨酸、别羟基赖氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基缬氨酸、4-羟基脯氨酸(Hyp)、γ-羧基谷氨酸、ε-N,N,N-三甲基赖氨酸、ε-N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰基丝氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、ω-甲基精氨酸、4-氨基-O-邻苯二甲酸(4APA)及其他类似氨基酸,以及特别列出的那些氨基酸中的任一者的衍生化形式。

[0036] 如本文所用,与核酸结合使用的术语“异源”意指具有宿主细胞内非天然存在的核酸。这可以包括突变的序列,例如不同于天然存在的序列的序列。这可以包括来自其他物种的序列。这还可以包括在基因组中与宿主细胞中天然存在的不同的位置具有序列。这通常不包括可能在宿主细胞中发生的天然突变。例如通过表达盒的稳定整合,已经含有编码目的蛋白的异源核酸的细胞将被认为含有异源核酸序列。为清楚起见,具有编码抗原结合蛋白的核酸的CHO细胞或其衍生物(例如DHFR-或GS敲除型)将被认为具有异源核酸。

[0037] 本披露考虑了以下两者:(1)首先,直接适应如本文所述的IGF-培养基从而产生例如主细胞库或工作细胞库,并且然后进一步修饰以并入编码例如抗体的核酸序列的宿主细胞(例如CHO细胞);以及(2)已经具有编码目的异源蛋白(例如抗体)的核酸,然后直接适应如本文所述的IGF-培养基的细胞,例如主细胞库或工作细胞库。

[0038] 如本文所用,术语“生物反应器”意指可用于细胞培养物生长的任何容器。本披露的细胞培养物可以在生物反应器中生长,可以基于在生物反应器中生长的细胞产生的目的蛋白的应用来选择生物反应器。生物反应器可以具有任何尺寸,只要其可用于细胞培养;典型地,生物反应器的大小适合在其内部生长的细胞培养物的体积。典型地,生物反应器将为至少1升并且可以是2、5、10、50、100、200、250、500、1,000、1500、2000、2,500、5,000、8,000、10,000、12,000升或更大,或介于之间的任何体积。在培养期间可以控制生物反应器的内部条件,包括但不限于pH和温度。本领域的普通技术人员将意识到并且将能够基于相关考虑因素来选择用于实践本文披露的方法的合适的生物反应器。

[0039] 如本文所用,“细胞培养”或“培养”意指细胞在多细胞生物体或组织外部的生长和繁殖。对于哺乳动物细胞的合适培养条件是本领域已知的。参见例如Animal cell culture:A Practical Approach[动物细胞培养:一种实用方法],D.Rickwood编辑,Oxford University Press[牛津大学出版社],纽约(1992)。哺乳动物细胞可以悬浮培养或附着在固体底物上培养。可使用带有或不带有微载体的流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶、摇瓶或搅拌釜式生物反应器。在一个实施例中,使用500L至2000L的生物反应器。在一个实施例中,使用1000L至2000L的生物反应器。

[0040] 术语“细胞培养基(cell culture medium)”(也称为“培养基(culture medium)”、“细胞培养基(cell culture media)”、“组织培养基”),是指用于生长细胞(例如动物或哺乳动物细胞)的任何营养液,并且其通常提供以下至少一种或多种组分:能源(通常为碳水化合物,诸如葡萄糖的形式);所有必需氨基酸中的一种或多种,通常是二十种碱性氨基酸,再加上半胱氨酸;典型地以低浓度需要的维生素和/或其他有机化合物;脂质或游离脂肪酸;和微量元素,例如无机化合物或天然存在的元素,其典型地以极低浓度(通常在微摩尔

范围内)需要。

[0041] 营养溶液可任选地补充另外的任选组分以优化细胞生长,诸如激素和其他生长因子,例如转铁蛋白、表皮生长因子、血清等;盐,例如钙盐、镁盐和磷酸盐,和缓冲剂,例如HEPES;核苷和碱基,例如腺苷、胸苷、次黄嘌呤;以及蛋白和组织水解产物,例如水解的动物或植物蛋白(蛋白胨或蛋白胨混合物,其可以从动物副产品、纯化的明胶或植物材料获得);抗生素,例如庆大霉素(gentamycin);细胞保护剂或表面活性剂,诸如Pluronic®F68(也称为Lutrol®F68和Kolliphor®P188;非离子三嵌段,其由聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))中心疏水链与侧翼的两条聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链组成;聚胺,例如腐胺、亚精胺和精胺(参见例如,国际专利申请公开号WO 2008/154014)和丙酮酸盐(参见例如美国专利号8,053,238),这取决于待培养的细胞的需求和/或所需的细胞培养参数。

[0042] 细胞培养基包括那些典型地用于和/或已知可用于任何细胞培养过程的培养基,例如但不限于分批、延长分批、补料分批和/或灌注或连续培养细胞。

[0043] “基础”(或分批)细胞培养基是指典型地用于引发细胞培养并且足够完全以支持细胞培养的细胞培养基。

[0044] “补料分批培养”是指悬浮培养的形式,并且意指其中在培养过程开始后的一个或多个时间向培养物中提供附加组分的培养细胞的方法。所提供的组分通常包含对细胞而言在培养过程中已经耗尽的营养补充物。另外或替代性地,附加组分可以包括补充组分(例如,细胞周期抑制化合物)。补料分批培养通常在某一时刻停止,并且收集培养基中的细胞和/或组分并任选地纯化。

[0045] “生长”细胞培养基是指典型地在指数生长时期(“生长阶段”)用于细胞培养,并且在该阶段期间足够完全以支持细胞培养的细胞培养基。生长细胞培养基还可以含有赋予掺入到宿主细胞系中的选择性标记抗性或存活性的选择剂。这样的选择剂包括但不限于遗传霉素(G418)、新霉素、潮霉素B、嘌呤霉素、博来霉素、蛋氨酸亚磺酰亚胺、甲氨蝶呤、无谷氨酰胺的细胞培养基、缺乏甘氨酸的细胞培养基、次黄嘌呤和胸苷、或单独的胸苷。

[0046] “灌注”细胞培养基是典型地用于通过灌注或连续培养方法来维持的细胞培养,并且足够完全以在该过程中支持细胞培养的细胞培养基。灌注细胞培养基配制品可以比基础细胞培养基配制品更丰富或更浓,以适应用于去除用过的培养基的方法。灌注细胞培养基可在生长阶段和生产阶段期间使用。

[0047] “生产”细胞培养基是指这样的细胞培养基,其典型地在指数生长结束和开始产生蛋白的过渡期,“过渡”和/或“产物”阶段期间用于细胞培养,并且足够完全以在该阶段期间维持期望的细胞密度、活力和/或产物滴度。

[0048] 浓缩细胞培养基可以含有维持细胞培养所必需的一些或全部营养物;具体而言,浓缩培养基可以含有鉴定为或已知在细胞培养的生产阶段过程中被消耗的营养物。浓缩培养基可基于几乎任何细胞培养基配制品。这样的浓缩补料培养基可以含有细胞培养基的一些或所有组分,例如它们正常量的约2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100x、200X、400X、600X、800X或甚至约1000X。

[0049] 用于制备细胞培养基的组分可完全研磨成粉末培养基配制品;根据需要与要添加到细胞培养基中的液体补充物一起部分研磨;或以完全液体形式添加到细胞培养物中。

[0050] 细胞培养物还可以补充有特定营养物的独立浓缩补料,这些营养物可能难以配制在细胞培养物中或在细胞培养物中快速耗尽。此类营养物可以是氨基酸诸如酪氨酸、半胱氨酸和/或胱氨酸(参见例如国际专利申请公开号WO 2012/145682)。例如,可以将酪氨酸浓溶液独立地补料到在含有酪氨酸的细胞培养基中生长的细胞培养物中,使得细胞培养物中酪氨酸的浓度不超过8mM。在另一个实例中,将酪氨酸和胱氨酸浓溶液独立地补料到在缺乏酪氨酸、胱氨酸或半胱氨酸的细胞培养基中生长的细胞培养物中。独立的补料可以在生产阶段开始之前或在生产阶段时开始。独立的补料可以通过在与浓缩补料培养基的同一天或不同天分批补料至细胞培养基来完成。也可以在与灌注介质的同一天或不同天灌注独立的补料。

[0051] “无血清”适用于不含动物血清诸如胎牛血清的细胞培养基。各种组织培养基,包括限定的培养基,是可商购的,例如,可以使用以下细胞培养基中的任一种或组合:RPMI-1640培养基、RPMI-1641培养基、杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)、伊格尔最小必需培养基、F-12K培养基、Ham F12培养基、伊斯科夫改良杜尔贝科培养基、McCoy 5A培养基、Leibovitz L-15培养基和无血清培养基诸如EX-CELL™ 300系列(堪萨斯州莱内克萨的JRH生物科学公司(JRH Biosciences,Lenexa,Kansas))、MCDB 302(密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich Corp.,St.Louis,MO))等。此类培养基的无血清形式也是可用的。根据待培养细胞的需求和/或所需的细胞培养参数,细胞培养基可以补充附加的或增加浓度的组分,诸如氨基酸、盐、糖、维生素、激素、生长因子、缓冲液、抗生素、脂质、微量元素等。也可以使用定制的细胞培养基。

[0052] “细胞密度”是指给定体积的培养基中的细胞数目。“活细胞密度”是指给定体积的培养基中的活细胞数目,如通过标准活力测定法(诸如台盼蓝染料排除法)所测定。

[0053] “细胞活力”意指培养物中的细胞在给定的一组培养条件或实验变化下存活的能力。该术语还指在特定时间,相对于当时培养物中的细胞总数(活的和死的)而言,活的那部分细胞。

[0054] “生长停滞”,也可称为“细胞生长停滞”,是细胞数目停止增加或细胞周期不再进展的点。可通过测定细胞培养物的活细胞密度来监测生长停滞。处于生长停滞状态的一些细胞的大小可增加但数目不增加,因此生长停滞的培养物的细胞压积可增加。如果细胞健康不衰退,通过逆转导致生长停滞的条件,可以在一定程度上逆转生长停滞。

[0055] “细胞压积”(PCV),也称为“细胞压积百分比”(%PCV),是以百分比表示的由细胞占据的体积与细胞培养物的总体积的比率(参见Stettler等人,2006,Biotechnol Bioeng.[生物技术与生物工程]12月20日:95(6):1228-33)。细胞压积是细胞密度和细胞直径的函数;细胞压积的增加可由细胞密度或细胞直径或两者的增加引起。细胞压积是细胞培养物中固体含量的量度。在收获和下游纯化期间去除固体。矿石固体意味着在收获和下游纯化步骤期间从所需产物中分离固体材料的更多努力。此外,所需产物可被捕集在固体中并在收获过程中损失,导致产物收率降低。由于宿主细胞大小不同并且细胞培养物还含有死细胞和垂死细胞以及其他细胞碎片,与细胞密度或活细胞密度相比,细胞压积是描述细胞培养物内固体含量的更准确的方式。例如,细胞密度为50×10^6个细胞/ml的2000L培养物根据细胞的大小将具有截然不同的细胞压积。另外,当处于生长停滞状态时,一些细胞的大小将增加,因此生长停滞之前和生长停滞之后的细胞压积将可能不同,这是由于细胞大小增加

导致的生物量增加。

[0056] “滴度”意指在给定量的培养基体积中由细胞培养物产生的目的多肽或蛋白(其可以是天然存在的或重组的目的蛋白)的总量。滴度可以以每毫升培养基(或其他体积量度)中多肽或蛋白的毫克数或微克数为单位表示。“累积滴度”是在培养过程中由细胞产生的滴度,并且可以例如通过测量每日滴度并使用那些值来计算累积滴度来确定。

[0057] 如本文所用,术语“宿主细胞”应理解为包括经基因工程改造以表达目的多肽的细胞。对细胞系进行基因工程化涉及用编码重组多核苷酸分子的核酸(“目的基因”)转染、转化或转导细胞,和/或以其他方式改变(例如,通过同源重组和基因活化或重组细胞与非重组细胞的融合)以引起宿主细胞表达所需的重组多肽。用于对细胞和/或细胞系进行基因工程化以表达目的多肽的方法和载体是本领域技术人员熟知的;例如,各种技术在Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学现代方法],Ausubel等人编辑(Wiley&Sons[约翰威立父子公司],纽约,1988,和季度更新);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](冷泉实验室出版社,1989);Kaufman,R.J.,Large Scale Mammalian Cell Culture[大规模哺乳动物细胞培养],1990,第15-69页中说明。该术语包括亲本细胞的后代,无论后代是否与原始亲本细胞在形态上或遗传构成方面相同,只要存在目的基因即可。细胞培养物可包含一种或多种宿主细胞。

[0058] IGF-1是分子结构类似于胰岛素的多肽蛋白激素。另外,IGF-1在成年哺乳动物的生长和合成代谢中起重要作用。

[0059] IGF-1R具有ATP结合位点,该位点用于提供用于自磷酸化的磷酸酯。已经在IGF1R激酶结构域的晶体内鉴定了酪氨酸残基1165和1166的自磷酸化复合物的结构。参见Xu等人,2015,Science Signaling[科学信号]8(405):rs13。响应于配体结合,α链诱导β链的酪氨酸自磷酸化。该事件触发细胞内信号传导级联,细胞内信号传导级联虽然是细胞类型特异性的,但常常促进细胞存活和细胞增殖。参见Jones等人,1995,Endocrine Reviews[内分泌综述]16(1):3-34和LeRoith等人,1995,Endocrine Reviews[内分泌综述]16(2):143-63。正是对细胞增殖的这种影响使得为细胞培养基补充IGF-1在重组蛋白的大规模生产中是常见现象。

[0060] IGF-1可商购并且典型地在约0.1mg/L浓度下被用作细胞培养基的补充物。至少有三种可以包括在细胞培养基中的IGF-1的可商购形式,包括天然IGF-1(70个氨基酸,7.6kDa,可从例如,R&D系统公司(R&D Systems)获得)、Long R3 IGF-1(83个氨基酸,9.1kDa,可从例如,西格玛密里博公司(MilliporeSigma)和瑞普利金公司(Repligen)获得)和Short™ AE-IGF-1(72个氨基酸,7.9kDa,可从例如,CellRx公司获得)。

[0061] 用于使哺乳动物细胞直接适应IGF-培养基的方法

[0062] 通过使哺乳动物细胞直接适应IGF-培养基(缺乏IGF-1的培养基),已经发现可以在大规模重组蛋白制造中减少或省略IGF-1,同时保持相似的生长速率和生产率。使哺乳动物细胞直接适应IGF-培养基意味着使用已经生长或先前已经生长(并且随后冷冻)在含有IGF-1(包括血清中可获得的IGF-1)的细胞培养基中的细胞培养物,并且直接将这些细胞在缺乏IGF-1的细胞培养基中培养。在直接适应中,这些细胞仅适应具有IGF-1浓度(可以包括无IGF-1)的单细胞培养基。这与逐渐适应相反,逐渐适应涉及连续减少存在于细胞培养基中的IGF-1的量并且允许细胞在减少IGF-1浓度的每一步中恢复。

[0063] 本披露提供了用于使哺乳动物细胞直接适应IGF-培养基的方法,该方法包括:a)在包含0.03mg/L或更少的IGF-1的细胞培养基中培养哺乳动物细胞群;b)通过单细胞克隆从该哺乳动物细胞群获得单个细胞;以及c)将这些单个细胞进行扩增和传代,直到这些单个细胞恢复至90%或更多并且倍增时间小于30小时。基于特征诸如活力、生长和转染能力选择最佳克隆。

[0064] 缺乏IGF-1的细胞培养基通常意指与标准细胞培养条件相比含有减少水平的IGF-1的细胞培养基。例如,用于直接适应的细胞培养基(本文有时候称为第一细胞培养基)可以含有0.03mg/L或更少、0.02mg/L或更少、0.01mg/L或更少、或无IGF-1。IGF⁻培养基是指缺乏IGF-1的细胞培养基。

[0065] 在本文披露的方法中,可以使用任何哺乳动物细胞系。适用于在培养中生长的多种哺乳动物细胞系可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(弗吉尼亚州马纳萨斯)和商业供应商处获得。行业中通常使用的细胞系的实例包括由SV40(COS-7、ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(293细胞或亚克隆用于在悬浮培养中生长的293细胞(Graham等人,1977,J.Gen Virol.[普通病毒学杂志]36:59);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);小鼠塞托利细胞(TM4,Mather,1980,Biol.Reprod.[生殖生物学]23:243-251);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝癌细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,1982,Annals N.Y Acad.Sci.[纽约科学院年报]383:44-68);MRC 5细胞或FS4细胞;哺乳动物骨髓瘤细胞,以及许多其他细胞系和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0066] 用于商业应用的蛋白的大规模生产通常在悬浮培养中进行。因此,用于生成本文描述的重组哺乳动物细胞的哺乳动物宿主细胞可以但不必适于在悬浮培养中生长。已知多种适应于在悬浮培养中生长的宿主细胞,包括来自CHO-S、DG44和DXB11细胞系的小鼠骨髓瘤NS0细胞和CHO细胞。其他合适的细胞系包括小鼠骨髓瘤SP2/0细胞、幼仓鼠肾BHK-21细胞、人PER.C6®细胞、人胚肾HEK-293细胞和源自或工程化自本文披露的任何细胞系的细胞系。

[0067] CHO细胞广泛用于生产复合重组蛋白,包括CHOK1细胞(ATCC CCL61)。二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷突变体细胞系(Urlaub等人,1980,Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]77:4216-4220)DXB11和DG-44是理想的CHO宿主细胞系,因为有效的DHFR可选择和可扩增基因表达系统允许在这些细胞中高水平表达重组蛋白(Kaufman R.J.,1990,Meth Enzymol[酶方法学]185:537-566)。还包括利用基于谷氨酰胺合成酶(GS)的蛋氨酸亚砜亚胺(MSX)选择的谷氨酰胺合成酶(GS)-敲除CHOK1SV细胞系。其他合适的CHO宿主细胞可包括但不限于以下(括号中的是ECACC登录号):CHO(85050302)、CHO(无蛋白)(00102307)、CHO-K1(85051005)、CHO-K1/SF(93061607)、CHO/DHFR-(94060607)、CHO/DHFR-无AC(05011002)、RR-CHOKI(92052129)。

[0068] 将在含有其常规和优选组分的细胞培养基中的哺乳动物细胞系的细胞培养物用于直接适应。典型地,该细胞培养基包括含有IGF-1的血清。当在指数生长期时,优选地培养并且任选地冷冻这些细胞。

[0069] 将哺乳动物细胞在缺乏IGF-1的细胞培养基中传代。在某些实施例中,IGF-1的浓度是0.03mg/L或更少。在某些实施例中,IGF-1的浓度是0mg/L。优选地,例如在伯克利光学技术公司(Berkley Lights(BLI))的Beacon仪器上克隆单细胞。将这些细胞进行扩增并传代直到它们适应了IGF-培养基,例如它们具有90%或更大的活力并且它们能够以正常生长速率增殖,例如30小时或更短的倍增时间。

[0070] 本文所述的采用IGF-直接适应的方法和细胞系允许减少用于制造目的蛋白的细胞培养基中IGF-1的量。典型地,细胞培养基中IGF-1的浓度为0.1mg/L。在本文披露的方法中,细胞培养基中IGF-1的浓度可减至小于等于0.05、0.04、0.03、0.02或0.01mg/L。在某些实施例中,细胞培养基中不需要IGF-1,即细胞培养基中IGF-1的浓度为0mg/L。

[0071] 在本文所述的方法中,细胞具有与无IGF-适应的情况下相同谱系的细胞相当的生长速率。在某些实施例中,对于生产的前5天,生长速率为0.015-0.04 1/小时。在某些实施例中,在种子培植中生长速率为0.022-0.025 1/小时。在某些实施例中,细胞的倍增时间为20-30或23-35小时。

[0072] 在本文所述的方法中,细胞以与尚未适应无IGF-1的细胞培养基的相同谱系的细胞相当的滴度生产重组目的蛋白。在某些实施例中,培养第10天后,目的蛋白的滴度为至少50mg/L、100mg/L、150mg/L、200mg/L、250mg/L、300mg/L、350mg/L、400mg/L、450mg/L、500mg/L、550mg/L或600mg/L。

[0073] 表达目的蛋白的哺乳动物宿主细胞的产生

[0074] 细胞中目的蛋白的表达可以通过熟知的方法瞬时地或者通过稳定表达实现(Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology[分子生物学基本方法],第2版,Appleton&Lange,Norwalk,Conn.[康涅狄格州诺沃克的阿普尔顿和兰格公司],1994;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约,2001)。

[0075] 稳定整合的方法是本领域公知的。简言之,通常通过将异源多核苷酸或含有异源多核苷酸的载体瞬时引入宿主细胞中来实现稳定整合,这有利于所述异源多核苷酸稳定整合到细胞基因组中。典型地,异源多核苷酸侧翼为同源臂,即与整合位点上游和下游区域同源的序列。在它们引入哺乳动物宿主细胞之前,可以将环状载体线性化以利于整合到细胞基因组中。将载体引入细胞中的方法是本领域公知的,包括用生物学方法(诸如病毒递送)转染,用化学方法(诸如使用阳离子聚合物、磷酸钙、阳离子脂质或阳离子氨基酸)转染;用物理方法(诸如电穿孔或显微注射)转染;或用混合方法(诸如原生质体融合)转染。

[0076] 为了稳定转染哺乳动物细胞,已知取决于所使用的表达载体及转染技术,仅一小部分细胞可将外来DNA整合至其基因组中。为了鉴定及选择这些整合体,通常将编码选择性标记(例如,针对抗生素抗性)的基因随目的基因一起引入宿主细胞中。优选的选择性标记包括赋予对药物(诸如G418、潮霉素及甲氨蝶呤)的抗性的那些。除其他方法以外,可通过药物选择(例如,已并入有选择性标记基因的细胞将存活,而其他细胞则死亡)来鉴定经所引入的核酸稳定转染的细胞。

[0077] 稳定整合的特定方法使用重组酶介导的盒交换(RMCE;Bode和Baer,2001,Curr Opin Biotechnol.[当前生物技术观点]12:473-80,以及Bode等人,2000,Biol.Chem.[生物化学]381:801-813)进行基因组中位点特异性整合(也称为“靶向整合”)。位点特异性重组

酶诸如Flp和Cre介导它们的靶序列的两个拷贝之间的重组,分别称为FRT和loxP。使用两种不相容的靶序列,例如与F3组合的FRT(Schlake和Bode,1994,Biochemistry[生物化学],33:12746-51)以及倒置的识别靶位点(Feng等人,1999,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]292:779-85)允许将DNA片段插入至预定的携带相似构型的靶序列的染色体位点。还参见欧洲专利号EP 1781796B1和欧洲专利申请公开号EP 2789691A1。

[0078] 可以通过核酸酶(例如,锌指蛋白(ZFP)、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白9(Cas9))介导RMCE插入至基因组的特异性位点,这些核酸酶可以被工程化以在基因组中产生单链和双链断裂(SSB/DSB)。修复DSB有两种主要的且不同的途径--同源重组和非同源末端连接(NHEJ)。同源重组需要存在同源序列作为模板(例如含有RMCE的“供体”)来引导细胞修复过程,并且修复的结果无错误且可预测。在不存在用于同源重组的模板(或“供体”)序列时,典型地,细胞试图经由非同源末端连接(NHEJ)的不可预测的和易错的过程修复DSB。

[0079] 载体可以是适合用于将编码信息的蛋白转移和/或转运至宿主细胞和/或特定位置和/或宿主细胞内的区室的任何分子或实体(例如,核酸、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒衣壳、病毒体、裸DNA、复合DNA等)。载体可以包括病毒和非病毒载体、非附加型哺乳动物载体。载体通常被称为表达载体,例如,重组表达载体和克隆载体。可以将载体引入宿主细胞以允许载体自身的复制,并从而扩增其中含有的多核苷酸的拷贝。克隆载体可含有序列组分,这些序列组分通常包括但不限于复制起点、启动子序列、转录起始序列、增强子序列和选择性标记。这些元件可以由本领域普通技术人员适当选择。

[0080] 载体可用于对宿主细胞进行转化且含有指导和/或控制(连同宿主细胞一起)与其可操作地连接的一个或多个异源编码区的表达的核酸序列的载体。表达构建体可以包括但不限于影响或控制转录、翻译且在存在内含子时影响与其可操作地连接的编码区的RNA剪接的序列。“可操作地连接”意指该术语所适用的组分呈允许其执行其固有功能的关系。例如,在与蛋白编码序列“可操作地连接”的载体中的控制序列(例如启动子)的排列使得该控制序列的正常活性导致该蛋白编码序列的转录,从而导致所编码的蛋白的重组表达。

[0081] 可选择在所采用的特定宿主细胞中具有功能性的载体(即,该载体与宿主细胞机构相容,从而允许可发生基因的扩增和/或表达)。在一些实施例中,所使用的载体采用使用诸如二氢叶酸还原酶的蛋白报导序列的蛋白片段互补测定(参见例如美国专利号6,270,964)。合适的表达载体是本领域已知的,并且也是可商购的。

[0082] 典型地,用于宿主细胞中的载体均将含有用于质粒维持及用于克隆及表达外源核苷酸序列的序列。此类序列典型地将包含以下核苷酸序列中的一个或多个:启动子、一个或多个增强子序列、复制起点、转录和翻译控制序列、转录终止序列、含有供体和受体剪接位点的完整内含子序列、各种改善糖基化或产量的前序列(pre-sequence/pro-sequence)、用于多肽分泌的天然或异源信号序列(前导序列或信号肽)、核糖体结合位点、聚腺苷酸序列、内部核糖体进入位点(IRES)序列、表达增强序列元件(EASE)、来自腺病毒2的三联体前导序列(TPA)和VA基因RNA、用于插入编码待表达多肽的多核苷酸的多接头区域以及选择性标记元件。可以从起始载体(诸如可商购的载体)构建载体,可以单独获得其他元件并将其连接到载体中。用于获得各组分的方法是本领域技术人员熟知的。

[0083] 载体组分可以是同源的(即,来自于与宿主细胞相同的物种和/或品系)、异源的

(例如,来自于除宿主细胞物种或品系以外的物种)、杂合的(即,来自于多于一个来源的侧接序列的组合)、合成的或天然的。可通过本领域熟知的方法获得这些载体中有用的组分的序列,诸如先前通过作图和/或通过限制性核酸内切酶鉴定的那些。另外,它们可以通过聚合酶链式反应(PCR)和/或通过用合适的探针筛选基因组文库来获得。

[0084] 核糖体结合位点通常是mRNA翻译起始所必需的,且以夏因-达尔加诺(Shine-Dalgarno)序列(原核生物)或科扎克(Kozak)序列(真核生物)表征。该元件典型地位于启动子的3'且在待表达的多肽的编码序列的5'。

[0085] 复制起点有助于宿主细胞中载体的扩增。它们可以作为可商购的原核载体的一部分包括在内,也可以基于已知序列化学合成并连接到载体中。各种病毒来源(例如,SV40、多瘤病毒、腺病毒、水泡性口炎病毒(VSV)或乳头瘤病毒(诸如HPV或BPV))可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。

[0086] 哺乳动物宿主细胞表达载体的转录和翻译控制序列可以从病毒基因组中切除。常用的启动子和增强子序列源自多瘤病毒、腺病毒2、猿猴病毒40(SV40)和人巨细胞病毒(CMV)。例如,可以使用即时早期基因1的人CMV启动子/增强子。参见例如Patterson等人,1994,Applied Microbiol.Biotechnol.[应用微生物学与生物技术]40:691-98。源自SV40病毒基因组的DNA序列,例如,SV40来源、早期和晚期启动子、增强子、剪接序列和聚腺苷酸位点可用于提供其他遗传元件,用于在哺乳动物宿主细胞中表达结构基因序列。病毒早期和晚期启动子是特别有用的,因为它们都容易从病毒基因组中作为片段获得,也可以包含病毒复制起点(Fiers等人,1978,Nature[自然]273:113;Kaufman 1990,Meth.in Enzymol.[酶方法学]185:487-511)。也可以使用更小或更大的SV40片段,前提是包括了从Hind III位点向位于SV40病毒复制起点的BglI位点延伸的约250bp序列。

[0087] 转录终止序列典型地位于多肽编码区的3′端且用于终止转录。通常,原核细胞中的转录终止序列是富含G-C的片段,后接聚T序列。虽然序列可自文库中容易地克隆或甚至作为载体的一部分而商购得到,但其还可使用本领域技术人员已知的那些核酸合成方法容易地合成。

[0088] 选择性标记基因编码在选择性培养基中生长的宿主细胞的存活及生长所必需的蛋白。典型的选择标记基因编码如下蛋白质:(a)赋予针对抗生素或其他毒素(例如,对于原核宿主细胞,胺苄青霉素、四环素或卡那霉素)的抗性;(b)补充细胞的营养缺陷;或(c)提供不可得自复杂培养基或限定培养基的重要营养物。特定的可选择标记物为卡那霉素抗性基因、胺苄青霉素抗性基因及四环素抗性基因。有利地,新霉素抗性基因还可用于在原核及真核宿主细胞二者中进行选择。

[0089] 可以使用其他可选择基因扩增有待表达的基因。扩增是使生长或细胞存活必要的蛋白质产生所需的基因在连续数代重组细胞的染色体内串联性复制的过程。适用于哺乳动物细胞的适合的可选择标记物的实例包括谷氨酰胺合酶(GS)、二氢叶酸还原酶(DHFR)和无启动子胸苷激酶基因。使哺乳动物细胞转化株处于选择压力下,其中由于载体中存在可选择基因,所以仅转化株唯一适于存活。通过在连续增加培养基中选择剂的浓度的条件下培养经转化细胞,由此使选择性基因和编码目的蛋白的DNA扩增来施加选择压力。因此,由经扩增的DNA合成增加量的目的多肽。

[0090] 在一些情况下,诸如在真核宿主细胞表达系统中需要糖基化时,可操纵各种前序

列以改善糖基化或产率。例如,可以改变特定信号肽的肽酶裂解位点,或添加原序列,这些序列还可影响糖基化。最终蛋白产物可以在-1位(相对于成熟蛋白的第一个氨基酸)具有一个或多个易于表达的另外的氨基酸,这些氨基酸可能未完全移除。例如,最终蛋白质产物可能具有一个或两个在肽酶裂解位点中发现的附接至氨基末端的氨基酸残基。替代性地,当酶在成熟多肽内的此类区域裂解时,使用一些酶裂解位点可能产生期望的多肽的略微截短的形式。

[0091] 表达和克隆典型地将含有被宿主生物体识别且可操作地连接至编码目的蛋白的分子的启动子。启动子为位于控制结构基因转录的结构基因起始密码子(一般在约100至1000bp内)上游(即,5')的非转录序列。启动子通常分组为两种类别中的一个:诱导型启动子及组成型启动子。诱导型启动子起始处于其控制下的DNA应答于培养条件的某种变化(如营养素的存在或不存在,或者温度变化)以提高的水平转录。另一方面,组成型启动子一致地转录其可操作地连接的基因,即,对基因表达具有极小控制或无控制。许多由多种潜在宿主细胞识别的启动子是熟知的。

[0092] 用于哺乳动物宿主细胞的适合启动子是熟知的,且包括但不限于获自病毒基因组的那些启动子,这些病毒为诸如多瘤病毒、传染性上皮瘤病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、B型肝炎病毒及猿猴病毒40(SV40)。其他适合哺乳动物启动子包括异源哺乳动物启动子,例如热休克启动子及肌动蛋白启动子。

[0093] 其他感兴趣的启动子包括但不限于:SV40早期启动子(Benoist和Chambon,1981,Nature[自然]290:304-310);CMV启动子(Thornsen等人,1984,Proc.Natl.Acad.U.S.A.[美国国家科学院院刊]81:659-663);劳斯氏肉瘤病毒3'长末端重复序列中包含的启动子(Yamamoto等人,1980,Cell[细胞]22:787-797);疱疹病毒胸苷激酶启动子(Wagner等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]78:1444-1445);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);来自金属硫蛋白基因的启动子和调控序列(Prinster等人,1982,Nature[自然]296:39-42);以及原核启动子,诸如β-内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff等人,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]75:3727-3731);或tac启动子(DeBoer等人,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.[美国国家科学院院刊]80:21-25)。有意义的还有以下动物转录控制区,它们表现出组织特异性并已用于转基因动物中:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等人,1984,Cell[细胞]38:639-646;Ornitz等人,1986,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.[冷泉港定量生物学研讨会]50:399-409;MacDonald,1987,Hepatology[肝脏病学]7:425-515);在胰脏β细胞中具有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan,1985,Nature[自然]315:115-122);在淋巴样细胞中具有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等人,1984,Cell[细胞]38:647-658;Adames等人,1985,Nature[自然]318:533-538;Alexander等人,1987,Mol.Cell.Biol.[分子细胞生物学]7:1436-1444);在睾丸、乳房、淋巴和肥大细胞中具有活性的小鼠乳房肿瘤病毒控制区(Leder等人,1986,Cell[细胞]45:485-495);在肝中具有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert等人,1987,Genes and Devel.[基因与发育]1:268-276);在肝中具有活性的α-胎蛋白基因控制区(Krumlauf等人,1985,Mol.Cell.Biol.[分子细胞生物学]5:1639-1648;Hammer等人,1987,Science[科学]253:53-58);在肝中具有活性的α1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等人,1987,Genes and Devel.[基因与发育]1:161-171);在骨髓细胞中具有活性的β球蛋白

基因控制区(Mogram等人,1985,Nature[自然]315:338-340;Kollias等人,1986,Cell[细胞]46:89-94);在脑中的少突胶质细胞中具有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead等人,1987,Cell[细胞]48:703-712);在骨骼肌中具有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Sani,1985,Nature[自然]314:283-286);和在下丘脑中具有活性的促性腺激素释放激素基因控制区(Mason等人,1986,Science[科学]234:1372-1378)。

[0094] 可将增强子序列插入该载体中以增加高等真核生物的转录。增强子为DNA的顺式作用元件,长度通常为约10-300bp,作用于启动子以增加转录。增强子在方向及位置方面为相对独立的,已见于转录单元的5'及3'位置。已知可得自哺乳动物基因的几种增强子序列(例如,球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、α-胎蛋白及胰岛素)。然而,典型地使用来自于病毒的增强子。本领域中已知的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子和腺病毒增强子是用于激活真核启动子的示例性强化元件。尽管增强子可以定位于载体中编码序列的5'或3',但其典型地位于启动子5'的位点处。

[0095] 可将编码适当天然或异源信号序列(前导序列或信号肽)的序列并入表达载体中,以促进目的蛋白的细胞外分泌。信号肽或前导序列的选择取决于待产生目的蛋白的宿主细胞的类型,且异源信号序列可替换天然信号序列。在哺乳动物宿主细胞中具有功能性的信号肽的实例包括以下:美国专利号4,965,195中所描述的白介素-7的信号序列;Cosman等人,1984,Nature[自然]312:768中所描述的白介素-2受体的信号序列;欧洲专利号0367 566中所述的白介素-4受体信号肽;美国专利号4,968,607中所描述的I型白介素-1受体信号肽;欧洲专利号0460 846中所述的II型白介素-1受体信号肽。

[0096] 经证实会改善来自哺乳动物表达载体的异源基因表达的另外的控制序列包括诸如源自CHO细胞的表达增加序列元件(EASE)的元件(Morris等人,在Animal Cell Technology[动物细胞技术],第529-534页(1997)中;美国专利号6,312,951B1、6,027,915和6,309,841B1)和来自腺病毒2的三联体前导序列(TPL)和VA基因RNA(Gingeras等人,1982,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]257:13475-13491)。病毒来源的内部核糖体进入位点(IRES)序列使双顺反子mRNA得以有效翻译(Oh和Sarnow,1993,Current Opinion in Genetics and Development[遗传学与发育新见]3:295-300;Ramesh等人,1996,Nucleic Acids Research[核酸研究]24:2697-2700)。

[0097] 构建后,可将一种或多种载体插入合适的细胞中以进行扩增和/或多肽表达。表达载体向所选细胞的转化可以通过熟知的方法完成,包括转染、感染、磷酸钙共沉淀、电穿孔、核转染、显微注射、DEAE-右旋糖酐介导的转染、阳离子脂质介导的递送、脂质体介导的转染、微弹轰击、受体介导的基因递送,聚赖氨酸、组蛋白、壳聚糖和肽介导的递送。该方法将部分随所用宿主细胞的类型而变化。这些方法及其他适合方法是熟练技术人员熟知的,并且阐述于手册和其他技术出版物中,例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约(2001)。

[0098] 术语"转化"是指细胞遗传特征的改变,当细胞被修饰以含有新的DNA或RNA时,则该细胞就被转化了。例如,细胞经由转染、转导或其他技术引入新的遗传材料,由其原始状态进行基因修饰,则该细胞就被转化了。转染或转导后,转化DNA可以通过物理整合进入细胞染色体与细胞的DNA重组,或者可以作为一个不被复制的游离元件被暂时维持,或者可以

作为质粒独立复制。当转化DNA随着细胞的分裂而复制时,细胞被认为已经“稳定地转化”了。

[0099] 术语“转染”是指通过细胞吸收外来或外源性DNA。许多转染技术在本领域中是熟知的,并在本文中披露。参见例如Graham等人,1973,Virology[病毒学]52:456;Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],同上;Davis等人,1986,Basic Methods in Molecular Biology[分子生物学基本方法],爱思唯尔;Chu等人,1981,Gene[基因]13:197。

[0100] 术语“转导”是指外来DNA经由病毒载体被引入细胞的过程。参见Jones等人,(1998).Genetics:principles and analysis.[遗传学:原理和分析]Boston:Jones&Bartlett Publ.[波士顿:琼斯和巴特利特出版社]。

[0101] 细胞培养过程的描述

[0102] 在本文所述的方法中,使用减少量的IGF-1或不使用IGF-1可在生产运行的任何或所有阶段进行。有时用于生产的细胞培养基在本文中是指第二细胞培养基。该第二细胞培养基不必具有与第一细胞培养基相同浓度的IGF-1。第二细胞培养基可以具有的IGF-1浓度是0.05mg/L或更少、0.03mg/L或更少、0.02mg/L或更少、0.01mg/L或更少或无IGF-1。例如,IGF-1可在种子规模、生产规模(N)或其间任何规模(例如N-1、N-2等)减少至0.03mg/L或更少。在生产规模上,IGF-1可在初始细胞培养基和/或灌注培养基或补料分批补料培养基中适当地减少。

[0103] 所披露的方法适用于在搅拌釜反应器中生长的贴壁培养物或悬浮培养物(包括传统的分批和补料分批细胞培养物,其可以但不必包含旋转过滤器)、灌注系统(包括交替切向流(“ATF”)培养物、声学灌注系统、深度过滤器灌注系统和其他系统)、中空纤维生物反应器(HFB,其在一些情况下可以用于灌注过程)以及各种其他细胞培养方法(参见例如Tao等人,2003,Biotechnol.Bioeng.[生物技术与生物工程]82:751-65;Kuystermans和Al-Rubeai,(2011)“Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells[用于从哺乳动物细胞产生抗体的生物反应器系统]”在Antibody Expression and Production[抗体表达和生产]中,Cell Engineering[细胞工程]7:25-52,Al-Rubeai(编辑)Springer[斯普林格];Catapano等人,(2009)“Bioreactor Design and Scale-Up[生物反应器设计与扩大]”在Cell and Tissue Reaction Engineering:Principles and Practice[细胞与组织反应工程:原理与实践]中,Eibl等人(编辑)Springer-Verlag[斯普林格-维拉格],其通过援引以其全文并入本文)。

[0104] 在重组蛋白生产阶段间,期望有一种受控系统,细胞在其中生长至所需密度,然后细胞的生理状态转换为生长停滞的高生产率状态,其中细胞使用能量和底物生产重组目的蛋白而不是产生更多的细胞。存在各种实现该目标的方法,包括温度变换和氨基酸饥饿,以及使用细胞周期抑制剂或其他可以阻止细胞生长而不引起细胞死亡的分子。

[0105] 重组蛋白的生产始于在培养板、烧瓶、管、生物反应器或其他合适的容器中建立表达该蛋白的细胞的哺乳动物细胞生产培养物。典型地使用较小的生产生物反应器,在一个实施例中,生物反应器为500L至2000L。在另一个实施例中,使用1000L-2000L的生物反应器。用于接种生物反应器的种子细胞密度可对生产的重组蛋白的水平具有积极影响。在一个实施例中,生物反应器用在无血清培养基中至少0.5×10^6至超过3.0×10^6个活细胞/mL接

种。在另一个实施例中,接种量为1.0×10^6个活细胞/mL。

[0106] 然后哺乳动物细胞经历指数生长阶段。可以在无补充补料的情况下维持细胞培养物,直至达到期望的细胞密度。在一个实施例中,细胞培养在有或无补充补料的情况下维持长达三天。在另一个实施例中,可以以期望的细胞密度接种培养物以开始生产阶段而没有短暂的生长阶段。在本文的任何实施例中,从生长阶段到生产阶段的转换也可以通过任何前述方法引发。

[0107] 在介于生长阶段与生产阶段之间的过渡阶段,以及在生产阶段期间,细胞压积百分比(%PCV)可以等于或小于35%。例如,在生产阶段期间维持的所需的细胞压积等于或小于35%、等于或小于30%、等于或小于20%、等于或小于15%、或等于或小于10%。

[0108] 在介于生长阶段与生产阶段之间的过渡阶段的以及在生产阶段期间维持的所需活细胞密度可根据项目而不同。它可以基于来自历史数据的等效细胞压积而决定。例如,活细胞密度可以是至少约10×10^6个活细胞/mL至80×10^6个活细胞/mL、至少约10×10^6个活细胞/mL至70×10^6个活细胞/mL、至少约10×10^6个活细胞/mL至60×10^6个活细胞/mL、至少约10×10^6个活细胞/mL至50×10^6个活细胞/mL、至少约10×10^6个活细胞/mL至40×10^6个活细胞/mL、至少约10×10^6个活细胞/mL至30×10^6个活细胞/mL、至少约10×10^6个活细胞/mL至20×10^6个活细胞/mL、至少约20×10^6个活细胞/mL至30×10^6个活细胞/mL、至少约20×10^6个活细胞/mL至至少约25×10^6个活细胞/mL、或至少约20×10^6个活细胞/mL。

[0109] 在生产阶段期间较低的细胞压积有助于减轻溶解氧喷射问题,溶解氧喷射问题可阻碍较高细胞密度的灌注培养。较低的细胞压积还允许较小的培养基体积,这允许使用较小的培养基存储容器并且可以与较慢的流速组合。与较高的细胞生物质培养相比,较低的细胞压积对收获和下游加工也具有较小的影响。所有这些都降低了与制造重组蛋白治疗剂相关的成本。

[0110] 在通过哺乳动物细胞培养生产重组蛋白的商业过程中典型地使用三种方法:分批培养、补料分批培养和灌注培养。分批培养是一种不连续的方法,其中细胞在固定体积的培养基中生长很短的一段时间,接着完全收获。使用分批方法生长的培养物经历细胞密度的增加直至达到最大细胞密度,接着随着培养基组分的消耗和代谢副产物(诸如乳酸盐和氨)水平的积聚,活细胞密度下降。收获通常发生在达到最大细胞密度时(例如,5×10^6个细胞/mL或更高,取决于培养基配方、细胞系等)。分批过程是最简单的培养方法,然而活细胞密度受到营养物可用性的限制,并且一旦细胞处于最大密度,则培养物衰退并且产量降低。不能够延长生产阶段,这是因为废弃产物的积聚和营养物的消耗迅速导致培养物衰退(通常约3-7天)。

[0111] 补料分批培养通过提供团式或连续培养基补料以补充已经消耗的那些培养基组分而改进了分批过程。由于补料分批培养在整个运行中接受额外的营养物,所以与分批方法相比,它们具有获得更高的细胞密度(>10至30×10^6个细胞/ml,取决于培养基配方、细胞系等)和增加的产物滴度的潜力。与分批过程不同,可以通过操纵补料策略和培养基配方来产生和维持双相培养物,以区分实现期望的细胞密度的细胞增殖期(生长阶段)与悬浮或缓慢细胞生长阶段(生产阶段)。因此,与分批培养相比,补料分批培养具有获得更高产物滴度的潜力。典型地,在生长阶段使用分批方法,在生产阶段使用补料分批方法,但是在整个过程中可以使用补料分批补料策略。然而,与分批过程不同,生物反应器体积是限制补料量的

限制因素。此外,与分批方法一样,代谢副产物的积聚将导致培养物衰退,这限制了生产阶段的持续时间,约10至21天。补料分批培养是不连续的,收获典型地发生在代谢副产物水平或培养物活力达到预定水平时。与不进行补料的分批培养相比,补料分批培养可以产生更大量的重组蛋白。参见例如美国专利号5,672,502。

[0112] 灌注方法通过添加新鲜培养基并同时去除用过的培养基提供了对分批方法和补料分批方法的潜在改进。典型的大规模商业细胞培养策略致力于达到60-90(+)$\times10^6$个细胞/mL的高细胞密度,其中反应器体积的几乎三分之一到一半以上是生物质。利用灌注培养,已经实现了>1×10^8个细胞/mL的极端细胞密度,并且预测了甚至更高的密度。典型的灌注培养开始于持续一天或两天的分批培养启动,接着向培养物中连续、分步和/或间歇性添加新鲜补料培养基,并在培养的整个生长阶段和生产阶段同时去除用过的培养基并保留细胞和另外的高分子量化合物诸如蛋白(基于过滤分子量截断值)。可以使用各种方法,诸如沉降、离心或过滤来去除用过的培养基,同时维持细胞密度。已经报道了每天一工作容积的一个分数至每天多个工作容积的灌注流速。

[0113] 灌注过程的优点是生产培养物可以比分批培养或补料分批培养方法维持更长的时间。然而,需要增加培养基的制备、使用、储存和处置以支持长期灌注培养,特别是具有高细胞密度的那些,还需要甚至更多的营养物,并且与分批和补料分批方法相比,所有这些驱使生产成本甚至更高。另外,较高的细胞密度可在生产过程中引起问题,诸如维持溶解氧水平和增加气体处理的问题,包括供给更多的氧气和去除更多的二氧化碳,这将导致更多的起泡和对改变消泡策略的需要;以及在收获和下游加工期间,其中去除过量细胞材料所需的努力可导致产物损失,从而否定了由于细胞质量增加而增加滴度的益处。

[0114] 还提供了一种大规模细胞培养策略,该策略结合了生长阶段的补料分批补料和其后生产阶段的连续灌注。该方法以细胞培养物维持在小于或等于35%的细胞压积的生产阶段为目标。

[0115] 在一个实施例中,使用具有团式补料的补料分批培养在生长阶段期间维持细胞培养物。然后可以在生产阶段期间使用灌注补料。在一个实施例中,当细胞达到生产阶段时开始灌注。在另一个实施例中,在细胞培养的第3天或约第3天至第9天或约第9天开始灌注。在另一个实施例中,在细胞培养的第5天或约第5天至第7天或约第7天开始灌注。

[0116] 在生长阶段期间使用团式补料允许细胞过渡到生产阶段,导致对作为引发和控制生产阶段的手段的温度变换的依赖性较小,然而在生长阶段与生产阶段之间可发生约36℃至约31℃的温度变换。在一个实施例中,该变换为36℃至32℃。

[0117] 如本文所述,生物反应器可以用在无血清培养基中至少0.5×10^6至超过3.0×10^6个活细胞/mL接种,例如1.0×10^6个活细胞/mL。

[0118] 灌注培养是其中细胞培养物接收新鲜灌注供给培养基同时除去耗过培养基的培养。灌注可以是连续的、分步的、间歇的、或任何这些中的任何一种或全部的组合。灌注率可以每天低于一工作容积至多个工作容积。细胞保留在培养物中,并且去除的用过的培养基基本上不含细胞或具有比培养物显著更少的细胞。细胞培养物表达的重组蛋白也可以保留在培养物中。灌注可以通过许多方式完成,包括离心、沉降或过滤,参见例如Voisard等人,2003,Biotechnology and Bioengineering[生物技术和生物工程]82:751-65。过滤方法的实例是交替切向流过滤。通过中空纤维过滤器模块泵送培养基来维持交替切向流。参见例

如美国专利号6,544,424;Furey,2002,Gen.Eng.News.[基因工程新闻]22(7):62-63。

[0119] “灌注流速”是在给定时间内从生物反应器通过(添加和去除)的培养基的量,通常表示为工作容积的某一分数或多个工作容积。“工作容积”是指用于细胞培养的生物反应器容积的量。在一个实施例中,灌注流速为每天一个工作容积或更少。可以配制灌注补料培养基以使灌注营养物浓度最大化,从而使灌注速率最小化。

[0120] 细胞培养物可以补充含有在细胞培养物生产阶段过程中被消耗的组分(诸如营养物和氨基酸)的浓缩补料培养基。

[0121] 浓缩补料培养基可基于几乎任何细胞培养基配方。这样的浓缩补料培养基可以含有细胞培养基的大多数组分,例如它们正常量的约5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100x、200X、400X、600X、800X或甚至约1000X。浓缩补料培养基常常用于补料分批培养过程。

[0122] 根据本发明的方法可用于改善多阶段培养过程中重组蛋白的生产。在多级过程中,在两个或更多个不同阶段培养细胞。例如,细胞可以首先在一个或多个生长阶段,在使细胞增殖和活力最大化的环境条件下培养,然后转移到生产阶段,在使蛋白生产最大化的条件下培养。在通过哺乳动物细胞生产蛋白的商业过程中,通常存在多个,例如至少约2、3、4、5、6、7、8、9或10个生长阶段,这些生长阶段在最终生产培养之前在不同培养容器中发生。

[0123] 生长阶段和生产阶段可以在一个或多个过渡阶段之前,或由一个或多个过渡阶段隔开。在多阶段过程中,根据本发明的方法可以至少在商业细胞培养的最终生产阶段的生长和生产阶段中采用,但是它也可以在先前的生长阶段中采用。生产阶段可以大规模进行。大规模过程可以在至少约100、500、1000、2000、3000、5000、7000、8000、10,000、15,000、20,000升的体积中进行。在一个实施例中,生产在500L、1000L和/或2000L生物反应器中进行。

[0124] 生长阶段可以在比生产阶段更高的温度下进行。例如,生长阶段可以在约35℃至约38℃的第一温度下进行,并且生产阶段可以在约29℃至约37℃,任选地约30℃至约36℃或约30℃至约34℃的第二温度下进行。此外,可以在温度变化之前和/或之后的同时添加蛋白质产生的化学诱导剂,如像咖啡因、丁酸酯和六亚甲基双乙酰胺(HMBA)。如果在温度变化后添加诱导剂,则可以在温度变化后1小时至5天,任选地在温度变化后1至2天添加诱导剂。细胞培养可维持数天或甚至数周,同时细胞产生期望的一种或多种蛋白质。

[0125] 可以使用本领域已知的任何分析技术监测和评价来自细胞培养物的样品。可以在培养持续期间监测包括重组蛋白及培养基质量和特征在内的多种参数。可以间歇性地以期望的频率,包括连续监测,实时或接近实时采集和监测样品。

[0126] 典型地,在最终生产培养物之前的细胞培养物(N-x至N-1)用于生成种子细胞,这些种子细胞将用于接种生产生物反应器,N-1培养物。种子细胞密度可对生产的重组蛋白的水平具有积极影响。产物水平倾向于随着种子密度的增加而增加。滴度的提高不仅与更高的种子密度有关,而且可能受进入生产的细胞的代谢和细胞周期状态的影响。

[0127] 种子细胞可通过任何培养方法产生。一种这样的方法是使用交替切向流过滤的灌注培养。N-1生物反应器可以使用交替切向流过滤来运行以提供高密度的细胞来接种生产生物反应器。N-1阶段可用于使细胞生长至密度>90×10^6个细胞/mL。N-1生物反应器可用于生成团式种子培养物或者可用作滚动种子储备培养物,其可维持在高种子细胞密度下接种多个生产生物反应器。生产的生长时期的持续时间范围可以是7至14天,并且可以设计成在

接种生产生物反应器之前维持细胞处于指数生长。优化灌注速率、培养基配方和时间以使细胞生长并将它们以最有利于优化其生产的状态递送至生产生物反应器。对于接种生产生物反应器,可以实现>15×10^6个细胞/mL的种子细胞密度。接种时更高的种子细胞密度可减少或甚至消除达到期望的生产密度所需的时间。

[0128] 在某些实施例中,本披露的哺乳动物宿主细胞和方法可用于生成高产率的目的蛋白。高产率或高体积生产率是细胞产生高水平目的蛋白的能力。使用适于哺乳动物宿主细胞并且含有氨基酸、维生素或微量元素,同时含有减少量的IGF-1或缺乏IGF-1的补料培养基,在补料分批或灌注条件下生长10天的培养物中,特定产率将取决于目的蛋白并且可以是至少0.05g/L、至少0.1g/L、至少0.15g/L、至少0.2g/L、至少0.25g/L、至少0.3g/L、至少0.35g/L、至少0.4g/L、至少0.45g/L、至少0.5g/L、至少0.6g/L、至少0.7g/L、至少0.8g/L、至少0.9g/L、至少1g/L、至少1.5g/L、至少2g/L或更高。在具体实施例中,本披露的宿主细胞和方法表达目的蛋白并且当在上述培养条件下生长时能够产生至少0.5g/L、至少0.6g/L、至少0.7g/L、至少0.8g/L、至少0.9g/L、至少1g/L、至少1.5g/L、至少2g/L或更多,优选高达约3g/L、4g/L、5g/L或10g/L。

[0129] 还可以根据基于每天每个细胞产生的蛋白的量(表示为pg/细胞/天)测定的细胞系的单位生产率来测量产率。使用适于哺乳动物宿主细胞并且含有氨基酸、维生素或微量元素,同时含有减少量的IGF-1或缺乏IGF-1的补料培养基,在补料分批或灌注条件下生长10天的培养物中,本披露的哺乳动物宿主细胞能够产生至少1pg/细胞/天、至少2pg/细胞/天、至少3pg/细胞/天、至少4pg/细胞/天、至少5pg/细胞/天、至少6pg/细胞/天、至少7pg/细胞/天、至少8pg/细胞/天、至少9pg/细胞/天、至少10pg/细胞/天、至少11pg/细胞/天、至少12pg/细胞/天、至少13pg/细胞/天、至少14pg/细胞/天、至少15pg/细胞/天、至少20pg/细胞/天、至少25pg/细胞/天或更多、优选高达50pg/细胞/天。在具体实施例中,本披露的哺乳动物宿主细胞表达目的蛋白并且在上述培养条件下具有至少10pg/细胞/天、至少11pg/细胞/天、至少12pg/细胞/天、至少13pg/细胞/天、至少14pg/细胞/天、至少15pg/细胞/天、至少20pg/细胞/天、至少25pg/细胞/天或更高、优选高达50pg/细胞/天的单位生产率。

[0130] 本文所述的方法可以用于培养表达目的蛋白的细胞。所表达的蛋白质可以被分泌到培养基中,从培养基中可以回收和/或收集这些蛋白质。此外,可以使用已知的过程和从商业供应商获得的产品,从这样的培养物或组分(例如从培养基)中纯化或部分纯化蛋白质。然后可以“配制”(意指缓冲液交换、灭菌、成批包装、和/或包装用于最终使用者)纯化的蛋白质。用于药物组合物的合适的配制品包括Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第18版.1995,Mack Publishing Company[麦克出版公司],伊斯顿,宾夕法尼亚州中所述的那些。

[0131] 目的蛋白

[0132] 目的多肽和蛋白可能具有科学意义或商业意义,包括基于蛋白的治疗法。目的蛋白尤其包括分泌型蛋白、非分泌型蛋白、胞内蛋白或膜结合蛋白。目的多肽和蛋白可以使用细胞培养方法通过重组动物细胞系产生,并且可以被称为“重组蛋白”。所表达的一种或多种蛋白质可以在细胞内产生或被分泌到培养基中,从培养基中可以回收和/或收集这些蛋白质。术语“分离的蛋白”或“分离的重组蛋白”是指目的多肽或蛋白,该目的多肽或蛋白从会干扰其治疗、诊断、预防、研究或其他用途的蛋白或多肽或其他污染物中纯化出来。目的

蛋白包括通过结合靶、特别是下面列出的那些中的靶而发挥治疗作用的蛋白,包括从其衍生的靶、与其相关的靶及其修饰。

[0133] 目的蛋白包括“抗原结合蛋白”。“抗原结合蛋白”是指包括抗原结合区或抗原结合部分的蛋白或多肽,该抗原结合区或抗原结合部分对与其结合的另一分子(抗原)具有亲和力。抗原结合蛋白涵盖抗体、肽体、抗体片段、抗体衍生物、抗体类似物、融合蛋白(包括单链可变片段(scFv)、双链(二价)scFv和IgGscFv(参见例如Orcutt等人,2010,Protein Eng Des Sel[蛋白工程、设计与选择]23:221-228)、异源IgG(参见例如Liu等人,2015,J Biol Chem[生物化学杂志]290:7535-7562)、突变蛋白和XmAb®(加利福尼亚州蒙罗维亚的Xencor公司(Xencor,Inc.,Monrovia,CA))。抗原结合蛋白的实例包括人抗体、人源化抗体;嵌合抗体;重组抗体;单链抗体;双抗体;三抗体;四抗体;Fab片段;$F(ab')_2$片段;IgD抗体;IgE抗体;IgM抗体;IgG1抗体;IgG2抗体;IgG3抗体;或IgG4抗体,及其片段。还包括双特异性T细胞接合子(BiTE®)、具有延长(诸如半衰期延长)的双特异性T细胞接合子(例如HLE BiTE、HeteroIg BITE以及其他)、嵌合抗原受体(CAR、CAR T)和T细胞受体(TCR)。

[0134] 如本文所用,术语“抗原结合蛋白”以其最广泛的含义使用,并且意指包含与抗原或靶标结合的部分,任选地包含允许抗原结合部分采用促进抗原结合蛋白与抗原结合的构象的支架或框架部分的蛋白。抗原结合蛋白可包含例如替代性蛋白支架或具有接枝的CDR或CDR衍生物的人工支架。此类支架包括但不限于抗体衍生的支架,其包含被引入以例如稳定抗原结合蛋白的三维结构的突变;以及全合成支架,其包含例如生物相容性聚合物。参见例如Korndorfer等人,2003,Proteins:Structure,Function,and Bioinformatics[蛋白质:结构、功能和生物信息学],53(1):121-129;Roque等人,2004,Biotechnol.Prog.[生物技术进展]20:639-654。另外,可以使用肽抗体模拟物(“PAM”),以及基于利用纤连蛋白组分作为支架的抗体模拟物的支架。

[0135] 抗原结合蛋白可以具有例如天然存在的免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是四聚体分子。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻链”(约25kDa)和一条“重链”(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约100至110个或更多个氨基酸的可变区,该可变区主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分限定恒定区,主要负责效应子功能。人轻链分类为κ轻链及λ轻链。重链分类为μ、δ、γ、α或ε,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0136] 天然存在的免疫球蛋白链展现出由三个高变区(还称作互补决定区或CDR)连接的相对保守的框架区(FR)的相同的一般结构。从N-末端到C-末端,轻链和重链二者包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。可以根据Kabat等人在Sequences of Proteins of Immunological Interest[具有免疫学意义的蛋白序列],第5版,US Dept.of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部],PHS,NIH,NIH公开号91-3242,(1991)中的定义对每个结构域进行氨基酸分配。根据需要,CDR也可以根据替代性命名方案,诸如Chothia的命名方案重新定义(参见Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917;Chothia等人,1989,Nature[自然]342:878-883或Honegger和Pluckthun,2001,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]309:657-670)。

[0137] 在本披露的上下文中,当解离常数(K_D)≤10^{-8}M时,称抗原结合蛋白“特异性结合”或“选择性结合”其靶抗原。当K_D≤5×10^{-9}M时,抗体以“高亲和力”特异性结合抗原,当K_D≤5

$\times 10^{-10}$M时,抗体以“极高的亲和力”特异性结合抗原。

[0138] 除非另有说明,否则术语“抗体”包括任何同种型或亚类的糖基化免疫球蛋白和非糖基化免疫球蛋白,或者其与完整抗体竞争特异性结合的抗原结合区。另外,除非另有说明,否则术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白或其与完整抗体竞争特异性结合的抗原结合部分。抗原结合部分可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促裂解或化学裂解产生,并且可形成目的蛋白的元件。除非另外说明,否则抗体包括人的、人源化的、嵌合的、多特异性的、单克隆的、多克隆的、特异性IgG(heteroIgG)、双特异性的抗体、及其寡聚物或抗原结合片段。抗体包括IgG1型、IgG2型、IgG3型或IgG4型。还包括具有抗原结合片段或抗原结合区的蛋白,诸如Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、双抗体、Fd、dAb、最大抗体(maxibody)、单链抗体分子、单结构域V_HH、互补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体、三抗体、四抗体和至少包含足以使特异性抗原与靶多肽结合的免疫球蛋白的一部分的多肽。

[0139] 抗原结合蛋白可具有一个或多个结合位点。如果存在多于一个结合位点,则这些结合位点可以彼此相同或者可以不同。例如,天然存在的人免疫球蛋白典型地具有两个相同的结合位点,而“双特异性”或“双功能”抗体具有两个不同的结合位点。

[0140] Fab片段是具有V_L、V_H、C_L和C_H1结构域的单价片段;F(ab’)$_2$片段是具有由二硫桥在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段;Fd片段具有V_H和C_H1结构域;Fv片段具有抗体单臂的V_L和V_H结构域;并且dAb片段具有V_H结构域、V_L结构域、或V_H或V_L结构域的抗原结合片段(美国专利号6,846,634、6,696,245,美国专利申请公开号2005/0202512、2004/0202995、2004/0038291、2004/0009507、2003/0039958,Ward等人,1989,Nature[自然]341:544-546)。

[0141] 单链抗体(scFv)是以下抗体,其中V_L和V_H区经由接头(例如,氨基酸残基的合成序列)连接以形成连续的蛋白链,其中该接头足够长以允许蛋白链自身折回并形成单价抗原结合位点(参见例如Bird等人,1988,Science[科学]242:423-26和Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:5879-83、美国专利号7,741,465、和6,319,494以及Eshhar等人,1997,Cancer Immunol Immunotherapy[癌症免疫学免疫疗法]45:131-136)。scFv保留了亲本抗体与靶抗原特异性相互作用的能力。

[0142] 双抗体是包含两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包含通过接头连接的V_H和V_L结构域,该接头太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对,因此允许每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对(参见例如,Holliger等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:6444-48;和Poljak等人,1994,Structure[结构]2:1121-23)。如果双抗体的两条多肽链相同,则由它们配对产生的双抗体将具有两个相同的抗原结合位点。具有不同序列的多肽链可用于制备具有两个不同抗原结合位点的双抗体。类似地,三抗体和四抗体是分别包含三条和四条多肽链并分别形成三个和四个可以相同或不同的抗原结合位点的抗体。

[0143] 为了清楚起见,并且如本文所述,注意抗原结合蛋白可以但不必是人来源的(例如,人抗体),并且在一些情况下将包含非人蛋白,例如大鼠或鼠类蛋白,并且在其他情况下抗原结合蛋白可以包含人蛋白和非人蛋白的杂交体(例如,人源化抗体)。

[0144] 目的蛋白可以包括人抗体。术语“人抗体”包括具有一个或多个源自人免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的所有抗体。在一个实施例中,所有可变结构域和恒定结构域都源自人免疫球蛋白序列(全人抗体)。此类抗体可以以多种方式制备,包括通过用目的抗原免

疫接种经基因修饰以表达源自人重链和/或轻链编码基因的抗体的小鼠，诸如源自Xenomouse®、UltiMab™、或Velocimmune®系统的小鼠、或源自UniRat®的大鼠。也可以采用基于噬菌体的方法。

[0145] 替代性地，目的蛋白可包括人源化抗体。“人源化抗体”的序列与源自非人物种的抗体的序列不同之处在于一个或多个氨基酸取代、缺失和/或添加，使得与非人物种抗体相比，当向人类受试者施用时，人源化抗体不太可能诱导免疫应答和/或诱导不太严重的免疫应答。在一个实施例中，将非人物种抗体的重链和/或轻链的框架和恒定结构域中的某些氨基酸突变以产生人源化抗体。在另一个实施例中，来自人抗体的一个或多个恒定结构域融合至非人物种的一个或多个可变结构域。如何制备人源化抗体的实例可以在美国专利号6,054,297、5,886,152和5,877,293中找到。

[0146] 还包括经修饰的蛋白，诸如经非共价键、共价键或者共价键和非共价键两者化学修饰的蛋白。还包括进一步包含一种或多种译后修饰的蛋白，其可以通过细胞修饰系统或由酶和/或化学方法离体引入或以其他方式引入的修饰制得。

[0147] 目的蛋白还可以包括重组融合蛋白，这些重组融合蛋白包括例如多聚化结构域，诸如亮氨酸拉链、卷曲螺旋、免疫球蛋白的Fc部分等。还包括包含分化抗原的全部或部分氨基酸序列的蛋白(称为CD蛋白)或其配体或与这些中的任一个基本上相似的蛋白。

[0148] 在一些实施例中，目的蛋白可以包括集落刺激因子，诸如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。此类G-CSF剂包括但不限于Neupogen®(非格司亭)和Neulasta®(培非格司亭)。还包括红细胞生成刺激剂(ESA)，诸如Epogen®(依伯汀α)、Aranesp®(达贝泊汀α)、Dynepo®(依伯汀δ)、Mircera®(甲氧基聚乙二醇-依伯汀β)、Hematide®、MRK-2578,INS-22,Retacrit®(依伯汀ζ)、Neorecormon®(依伯汀β)、Silapo®(依伯汀ζ)、Binocrit®(依伯汀α)、依伯汀αHexal、Abseamed®(依伯汀α)、Ratioepo®(依伯汀θ)、Eporatio®(依伯汀θ)、Biopoin®(依伯汀θ)、依伯汀α、依伯汀β、依伯汀ζ、依伯汀θ和依伯汀δ、依伯汀ω、依伯汀ι、组织纤溶酶原激活剂、GLP-1受体激动剂、以及任何前述物质的分子或其变体或类似物和生物仿制药。

[0149] 在一些实施例中，目的蛋白可以包括与一种或多种CD蛋白、HER受体家族蛋白、细胞粘附分子、生长因子、神经生长因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子、骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白、凝血和凝血相关蛋白、集落刺激因子(CSF)、其他血液和血清蛋白血型抗原特异性结合的蛋白；受体、受体相关蛋白、生长激素、生长激素受体、T细胞受体；神经营养因子、神经营养蛋白、松弛素(relaxin)、干扰素、白介素、病毒抗原、脂蛋白、整合素、类风湿因子、免疫毒素、表面膜蛋白、转运蛋白、归巢受体、地址素、调节蛋白和免疫粘附素。

[0150] 在一些实施例中，目的蛋白单独或以任何组合结合以下的一种或多种蛋白：CD蛋白(包括但不限于CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD34、CD38、CD40、CD70、CD123、CD133、CD138、CD171和CD174)、HER受体家族蛋白(包括例如HER2、HER3、HER4和EGF受体)、EGFRvIII、细胞粘附分子(例如LFA-1、Mol、p150,95、VLA-4、ICAM-1、VCAM和αv/β3整合素)、生长因子(包括但不限于例如血管内皮生长因子(“VEGF”))；VEGFR2、生长

激素、促甲状腺激素、卵泡刺激素、黄体生成素、生长激素释放因子、甲状旁腺激素、米勒管抑制物质(mullerian-inhibiting substance)、人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1-α)、促红细胞生成素(EPO)、神经生长因子(诸如NGF-β)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(包括例如aFGF和bFGF)、表皮生长因子(EGF)、Cripto、转化生长因子(TGF)(尤其包括TGF-α和TGF-β(包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4或TGF-β5))、胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II(IGF-I和IGF-II)、des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)和骨诱导因子、胰岛素和胰岛素相关蛋白(包括但不限于胰岛素、胰岛素A链、胰岛素B链、胰岛素原和胰岛素样生长因子结合蛋白);(凝血蛋白和凝血相关蛋白,尤其如,VIII因子、组织因子、范威尔邦德(von Willebrand)因子、蛋白C、α-1-抗胰蛋白酶、纤溶酶原激活剂(诸如尿激酶和组织纤溶酶原激活剂(“t-PA”))、邦巴辛(bombazine)、凝血酶、血小板生成素和血小板生成素受体、集落刺激因子(CSF)(尤其包括以下物质:M-CSF、GM-CSF和G-CSF)、其他血液和血清蛋白(包括但不限于白蛋白、IgE和血型抗原)、受体和受体相关蛋白(包括例如flk2/flt3受体、肥胖(OB)受体、生长激素受体和T细胞受体);神经营养因子,包括但不限于骨源性神经营养因子(BDNF)和神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-5或神经营养蛋白-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6);松弛素A链、松弛素B链和松弛素原、干扰素(包括例如干扰素α、干扰素β和干扰素γ)、白介素(IL)(例如IL-1至IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-23、IL-12/IL-23、IL-2Ra、IL1-R1、IL-6受体、IL-4受体和/或IL-13受体、IL-13RA2或IL-17受体、IL-1RAP);病毒抗原,包括但不限于AIDS包膜病毒抗原、脂蛋白、降钙素、胰高血糖素、心钠素、肺表面活性剂、肿瘤坏死因子-α和肿瘤坏死因子-β、脑啡肽酶、BCMA、IgKappa、ROR-1、ERBB2、间皮素、RANTES(受激活调节的正常T细胞表达与分泌因子)、小鼠促性腺激素相关肽、DNA酶、FR-α、抑制素和激活素、整合素、蛋白A或D、类风湿因子、免疫毒素、骨形态发生蛋白(BMP)、超氧化物歧化酶、表面膜蛋白、衰变加速因子(DAF)、AIDS包膜、转运蛋白、归巢受体、MIC(MIC-a、MIC-B)、ULBP 1-6、EPCAM、地址素、调节蛋白、免疫粘附素、抗原结合蛋白、生长激素、CTGF、CTLA4、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)-1、MUC1、CEA、c-MET、密蛋白(Claudin)-18、GPC-3、EPHA2、FPA、LMP1、MG7、NY-ESO-1、PSCA、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GM2、BAFF、OPGL(RANKL)、肌生成抑制素、Dickkopf-1(DKK-1)、Ang2、NGF、IGF-1受体、肝细胞生长因子(HGF)、TRAIL-R2、c-Kit、B7RP-1、PSMA、NKG2D-1、程序性细胞死亡蛋白1和配体、PD1和PDL1、甘露糖受体/hCGβ、丙型肝炎病毒、间皮素dsFv[PE38]缀合物、嗜肺军团菌(lly)、IFNγ、γ干扰素诱导蛋白10(IP10)、IFNAR、TALL-1、胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/Kexin 9型(PCSK9)、干细胞因子、Flt-3、降钙素基因相关肽(CGRP)、OX40L、α4β7、血小板特异性(血小板糖蛋白IIb/IIIb(PAC-1)、转化生长因子β(TFGβ)、透明带精子结合蛋白3(ZP-3)、TWEAK、血小板来源的生长因子受体α(PDGFRα)、硬化蛋白(sclerostin)以及任何前述物质的生物活性片段或变体。

[0151] 在另一个实施例中,目的蛋白包括阿昔单抗、阿达木单抗、阿德木单抗、阿柏西普、阿仑单抗、阿利库单抗、阿那白滞素、阿塞西普、巴利昔单抗、贝利木单抗、贝伐单抗、生物素单抗(biosozumab)、博纳吐单抗、本妥昔单抗、布罗达单抗、莫坎妥珠单抗、康纳单抗、西妥昔单抗、塞妥珠单抗、可那木单抗、达利珠单抗、迪诺舒单抗(denosumab)、依库丽单抗、依决洛单抗、依法利珠单抗、依帕珠单抗、依那西普、依伏库单抗、加利昔单抗、盖尼塔单抗、吉妥珠单抗、戈利木单抗、替伊莫单抗、英夫利昔单抗、易普利姆玛、乐地单抗、鲁昔单抗、左旋单

抗(lxdkizumab)、马帕木单抗、磷酸莫特沙尼(motesanib diphosphate)、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奈西立肽、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、奥普瑞白介素、帕利珠单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、培克珠单抗、兰尼单抗、利妥木单抗、利妥昔单抗、罗米司亭、洛莫索珠单抗、沙格司亭、托珠单抗、托西莫单抗、曲妥单抗、优特克单抗、维多珠单抗、维西珠单抗、伏洛昔单抗、扎木单抗、扎鲁木单抗、以及任何前述物质的生物仿制药。

[0152] 根据本发明所述的目的蛋白涵盖所有前述内容,并且进一步包括包含上述任何抗体的1、2、3、4、5或6个互补决定区(CDR)的抗体。可以将一个或多个CDR共价或非共价并入分子中以使其成为抗原结合蛋白。抗原结合蛋白可并入CDR作为较大多肽链的一部分,可共价连接CDR与另一多肽链,或者可以非共价并入CDR。CDR容许抗原结合蛋白与特定目的抗原特异性结合。还包括这样的变体,其包括与目的蛋白的参考氨基酸序列具有70%或更高、特别是80%或更高、更特别是90%或更高、再更特别是95%或更高、具体是97%或更高、更具体是98%或更高、再更具体是99%或更高同一性的氨基酸序列的区。在这方面的同一性可以使用多种熟知的且容易获得的氨基酸序列分析软件来确定。优选的软件包括实施史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法的那些软件,这些软件被认为是搜索和比对序列问题的令人满意的解决方案。还可以采用其他算法,特别是在速度是重要考虑因素的情况下。可以用于此方面的用于DNA、RNA和多肽的比对和同源性匹配的常用程序包括FASTA、TFASTA、BLASTN、BLASTP、BLASTX、TBLASTN、PROSRCH、BLAZE和MPSRCH,后者是用于在MasPar制造的大规模并行处理器上执行的史密斯-沃特曼算法的实施方式。

[0153] 目的蛋白还可以包括基因工程化受体,诸如嵌合抗原受体(CAR或CAR-T)和T细胞受体(TCR),以及包含与该靶向抗原相互作用的抗原结合分子的其他蛋白。通过掺入与靶抗原相互作用的抗原结合分子,CAR可以被工程化以结合抗原(诸如细胞表面抗原)。CAR典型地将抗原结合结构域(诸如scFv)与一个或多个共刺激(“信号传导”)结构域和一个或多个激活结构域串联在一起。

[0154] 优选地,抗原结合分子是其抗体片段,且更优选地是一个或多个单链抗体片段(“scFv”)。scFv优选用于嵌合抗原受体中,因为它们可以工程改造以作为单链的一部分与其他CAR组分一起表达。参见Krause等人,1988,J.Exp.Med.[实验医学杂志],188(4):619-626;Finney等人,1998,J Immunol[免疫学杂志]161:2791-2797。

[0155] 嵌合抗原受体包含一个或多个共刺激(信号传导)结构域以增加其效力。参见美国专利号7,741,465和6,319,494,以及Krause等人和Finney等人(同上),Song等人,2012,Blood[血液]119:696-706;Kalos等人,2011,Sci Transl.Med.[科学转化医学]3:95;Porter等人,2011,N.Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]365:725-33,以及Gross等人,2016,Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.[药理学与毒理学年评]56:59-83。合适的共刺激结构域可以源自(除其他来源外)CD28、CD28T、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3(α、β、δ、ε、γ、ξ)、CD4、CD5、CD7、CD8、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD 33、CD37、CD40、CD 45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1(CDl la/CD18)、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT(肿瘤坏死因子超家族成员14;TNFSF14)、NKG2C、Igα(CD79a)、DAP-10、Fcγ受体、MHC I类分子、TNF、TNFr、整合素、信号传导淋巴细胞活化分子、BTLA、Toll配体受体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80

(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL-2Rβ、IL-2Rγ、IL-7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRT AM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、41-BB、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83配体、或其片段或组合。共刺激结构域可包含细胞外部分、跨膜部分和细胞内部分的一个或多个。

[0156] CAR还包括一个或多个激活结构域。CD3ζ是天然T细胞上T细胞受体的元件并且已显示是CAR内重要的细胞内激活元件。

[0157] CAR是跨膜蛋白,包含细胞外结构域,典型地包含能够识别并结合目的抗原的抗原结合蛋白,并且还包括“铰链”区域。另外是跨膜结构域和细胞内(胞质)结构域。

[0158] 细胞外结构域有益于淋巴细胞对来自本文所述的任何蛋白或其任何组合的抗原的信号传导和有效应答。细胞外结构域可以衍生自合成或天然来源,诸如本文所述的蛋白。细胞外结构域通常包含铰链部分。这是细胞外结构域的一部分,有时称为“间隔”区。铰链可衍生自如本文所述的这些蛋白,特别是上述共刺激蛋白,以及免疫球蛋白(Ig)序列或其他合适的分子,以实现距靶细胞所需的特殊距离。

[0159] 跨膜结构域可以与该CAR的细胞外结构域融合。它可以类似地融合到CAR的细胞内结构域。该跨膜结构域可以衍生自合成或天然来源,诸如本文所述的蛋白,特别是上述共刺激蛋白。

[0160] 细胞内(胞质)结构域可以与跨膜结构域融合,并且可以提供免疫细胞的正常效应子功能中的至少一种的激活。T细胞的效应子功能例如可以是包括细胞因子的分泌的细胞溶解活性或辅助活性。细胞内结构域可以衍生自本文所述的蛋白,特别是衍生自CD3。

[0161] “Fc”区,当该术语在本文所用时,包含含有抗体的C_H2和C_H3结构域的两个重链片段。这两个重链片段由两个或更多个二硫键及C_H3结构域的疏水性相互作用维持在一起。包含Fc区的目的蛋白(包括抗原结合蛋白和Fc融合蛋白)形成本披露的另一方面。

[0162] “半抗体”是包含完整重链、完整轻链和与完整重链的Fc区配对的第二重链Fc区的免疫功能性免疫球蛋白构建体。可以但不必采用接头连接重链Fc区和第二重链Fc区。在特定的实施例中,半抗体是本文披露的抗原结合蛋白的单价形式。在其他实施例中,可以采用成对的带电残基将一个Fc区与第二个Fc区缔合。在本披露的上下文中,半抗体可以是目的蛋白。

[0163] 可以使用多种已知技术制备根据本发明的多核苷酸、多肽、载体、宿主细胞、免疫细胞、组合物等。

[0164] 本发明在范围上不受本文描述的特定实施例的限制,这些特定实施例旨在作为本发明各个方面的单个说明,并且功能上等效的方法和组分也在本发明的范围内。实际上,除了本文中显示和描述的那些之外,根据前述描述和附图,本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见。这类改变旨在落入所附权利要求书的范围内。

[0165] 实例

[0166] 实例1

[0167] 对于常规培养,细胞在选择性培养基中悬浮培育。将培养物维持在通气的125mL或250mL锥型摇瓶(康宁生命科学公司(Corning Life Sciences),洛厄尔,马萨诸塞州)、50mL通气旋转管(TPP公司,特拉萨丁根(Trasadingen),瑞士)或Axygen®24孔深孔板(爱思进公司(Axygen),联合市,加利福尼亚州)中在36℃、5% CO_2和85%相对湿度下。在大容量自动CO_2培养箱(马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA))中以25mm轨道直径以120rpm振荡锥型烧瓶,并在大容量ISF4-X培养箱(瑞士巴塞尔的科耐(Kuhner AG,Basel,Switzerland))中以225rpm、50mm轨道直径振荡旋转管。

[0168] CHO GSKO宿主细胞对无IGF-1培养基的适应

[0169] 使谷氨酰胺合成酶敲除(GSKO)型宿主细胞系适应无IGF-1(Long R3 IGF-1)的培养基。使用两种不同的方法使这些宿主细胞适应。第一种方法是逐渐适应无IGF-1(Long R3 IGF-1)的专有培养基。这种培养基不是GSKO宿主细胞的标准的非选择性宿主细胞培养基,因此首先使细胞适应不同的含有100% IGF-1(Long R3 IGF-1)基质的专有培养基,并且然后以下列增量逐渐去除IGF-1:75%、50%、25%、10%和最终无IGF-1。适应期延长超过110个群体倍增水平(PDL)。参见图1A。这些适应性细胞系的表现不如具有IGF-1的亲本宿主好(数据未显示),可能是由于专有培养基不同的渗透压。因此,将这些细胞转回至无IGF-1的GSKO宿主的平台非选择性培养基。这些宿主均使用伯克利光学技术公司(BLI)的Beacon仪器进行贮藏和单细胞克隆。总共获得了158个克隆。

[0170] 第二种方法是直接适应。使GSKO宿主细胞系对无IGF-1的专有培养基直接适应。这些宿主均使用伯克利光学技术公司(BLI)的Beacon仪器进行贮藏和单细胞克隆。完全恢复需要约1.5个月的时间。参见图1B。总共获得了44个克隆。

[0171] 使用伯克利光学技术公司程序进行单细胞克隆:

[0172] 为了确保经克隆衍生的细胞库,使用Beacon仪器(伯克利光学技术公司,埃默里维尔,加利福尼亚州)在特定的条件下对IGF-适应性细胞系进行单细胞克隆。无Long R3 IGF-1的专有培养基被用于对两种宿主进行单细胞克隆和扩大。Beacon仪器是允许单细胞操作、细胞培养、和生产率分析的微型细胞培养平台。在这种仪器上,在受控的温度、无菌环境、和生长培养基的连续灌注下,细胞在由超过1000个称为“纳米笔(nanopens)”的单独的容器组成的纳米流体芯片上隔离培养。在整个培养期间保持层流以确保没有交叉污染。光电定位(OEP)技术通过使用光激活表面晶体管建立局部电荷来排斥细胞实现细胞操作。采用OEP以温和地引导单个细胞进出纳米笔。一体化显微镜功能允许活细胞成像、单细胞的装载、成像、和培养物的输出以及经由软件自动操作和控制,确保可追溯性。使用重复的仪器上显微成像验证单细胞克隆的单细胞来源。参见Le等人,2020,Biotech J[生物技术杂志]15:1900247和Le等人,2018,Biotechnol Prog[生物技术进展]34:1438-1446。

[0173] 对于在GSKO背景下的IGF-细胞系,将非克隆细胞池导入至新的纳米流体芯片上并且使用OEP将单细胞分离至单独的纳米笔中。使用一体化显微成像鉴定含有单细胞来源的细胞的纳米笔。在单独的纳米笔中将克隆培养3天。然后针对生长分析纳米笔。验证细胞群的克隆衍生物并且针对不同的生长曲线进行选择。将选择的克隆独立地从芯片输出至96孔微量滴定板的各个孔中。在这个方法中建立了严格质量控制步骤来确保没有可检测的交叉污染。克隆衍生物的统计学测定显示,克隆衍生细胞系的分离具有高的可靠性。参见Le等人,2020,Biotech J[生物技术杂志]15:1900247。

[0174] 输出后,使用无Long R3 IGF-1的专有(+gln)非选择性生长培养基括大单细胞衍生的细胞系。将细胞系传代直到它们实现>90%的活力并且稳定生长。然后将细胞系贮藏在无Long R3 IGF-1和DMSO的非选择性生长培养基中,并且长期冷冻储存在<-80℃。

[0175] GSKO-IGF适应性单细胞宿主具有24小时的倍增时间(图3A-3B)。最初基于在严格的转染/补料分批评估中的表现缩小用于进一步评价的单细胞宿主,并且然后进一步通过用表现良好的单克隆抗体转染进行评价,作为在10-15天的补料分批评估中的评估。

[0176] 实例2

[0177] 在转染和10D-15D FB(10至15天分批补料)生产实验中测试了这些IGF-适应性宿主细胞在缺乏IGF-1补充的情况下生长和表达治疗剂的能力。

[0178] 在CS9 GSKO背景下的单细胞克隆的IGF-适应性细胞系中测试单克隆抗体分子的转染和恢复

[0179] 在概念验证实验中通过转染和补料分批评估测试了GSKO IGF-适应性宿主,在单细胞克隆之前获得良好的结果(数据未示出)。对于在GSKO背景下的IGF-单细胞克隆的适应性细胞系,除了含有专有ILT转座酶的质粒外,还使用平台长持续时间电穿孔方案转染了表现良好的单克隆抗体的环状pGS1.1PB质粒。转染的细胞系在无Long R3IGF-1的专有非选择性培养基中在36℃和5% CO_2下恢复3天。使经过转染的细胞在无Long R3 IGF-1的专有培养基+25μM MSX的选择性生长培养基(-谷氨酰胺)中在36℃和5% CO_2下每3至4天传代一次,直至它们恢复到>90%。(图3)。然后在15D补料分批生产运行中评估这些GSKO IGF-细胞系。

[0180] 补料分批生产细胞培养

[0181] 进行了15天的补料分批生产以评估在GSKO背景下适应了无Long R3 IGF-1的培养基的转染细胞系的生长和生产率。将培养物以3×10^6个细胞/mL(基于GSKO)接种在无Long R3 IGF-1的基础生产培养基上,并且在第3、6、8、10和13天为GSKO培养物补料另外的营养物。在第15天或当活力下降至50%-60%时收获GSKO培养物(图4A-4D)。对生产上清液的滴度进行分析(蛋白质A HPLC)。

[0182] 转染的细胞系显示出可变的生长和生产率水平,其中几种细胞系在具有IGF-1的GSKO细胞系范围内。

[0183] 实例3

[0184] 使用实例2中的方法(除了使用不同的环状piggyBAC兼容的含有ITR的载体外),在转染和10D-15D FB(10至15天分批补料)生产实验中测试了这些IGF-适应性宿主细胞在缺乏IGF-1补充的情况下生长和表达不同形式的治疗剂的能力。平均值来自重复运行的实验。NA表明已经收获了培养物,因此没有可用的数据。

[0185] BiTE-双特异性T细胞接合子

[0186] Fusion-融合蛋白

[0187] Hetero-Ig-异源Ig双特异性抗体

[0188] mAb-单克隆抗体

[0189] 3-chain Ab-三链不对称抗体样分子

[0190] 表1-4分别显示IVCD、活力%、滴度和Qp。

[0191] 表1:IVCD

[0192]

	BiTE		融合		异源-IgG		mAb		3 -链- Ab	
	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF
第 13 天	1039	1162	1081	1115	1311	1054	1086	1137	1165	1269
第 15 天	1221	NA	1210	1233	1540	1067	NA	NA	1365	1430

[0193] 表2:活力%

[0194]

	BiTE		融合		异源-IgG		mAb		3 -链- Ab	
	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF
第 10 天	94	82	96	89	96	73	88	77	95	73
第 13 天	79	48	87	69	91	57	76	67	90	53
第 15 天	66	NA	0.7	55.4	84	49	NA	NA	79	44

[0195] 表3:滴度

[0196]

	BiTE		融合		异源-IgG		mAb		3 -链- Ab	
	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF
第 10 天	0.24	0.12	2.7	2.2	2.2	2.7	3.1	2.7	0.82	1.2
第 13 天	0.5	0.2	4.5	3.1	3.7	3.7	4.3	4.1	1.4	1.7
第 15 天	0.53	NA	2.5	4.8	4.4	2.6	NA	NA	1.6	1.5

[0197] 表4:Qp

[0198]

	BiTE		融合		异源-IgG		mAb		3 -链- Ab	
	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF	-IGF	+IGF

[0199]

第 13 天	4.3	1.7	41.5	36	32	46	40	44.3	11.7	27
第 15 天	4.25	NA	20.6	39	30	65	NA	NA	11.5	25.3

[0200] IGF-适应性细胞系显示出生长和生产率可变的水平但是与具有IGF-1的GSKO细胞系相当。

[0201] 实例4

[0202] 通常在如实例2所述的15D FB(15天分批补料)生产实验中,在生产规模为200L的生物反应器中使用表达单克隆抗体的载体测试IGF-适应性转染的宿主细胞系。

[0203] 生长和滴度与相似的生产运行中观察到的未适应IGF-条件的细胞系相当。

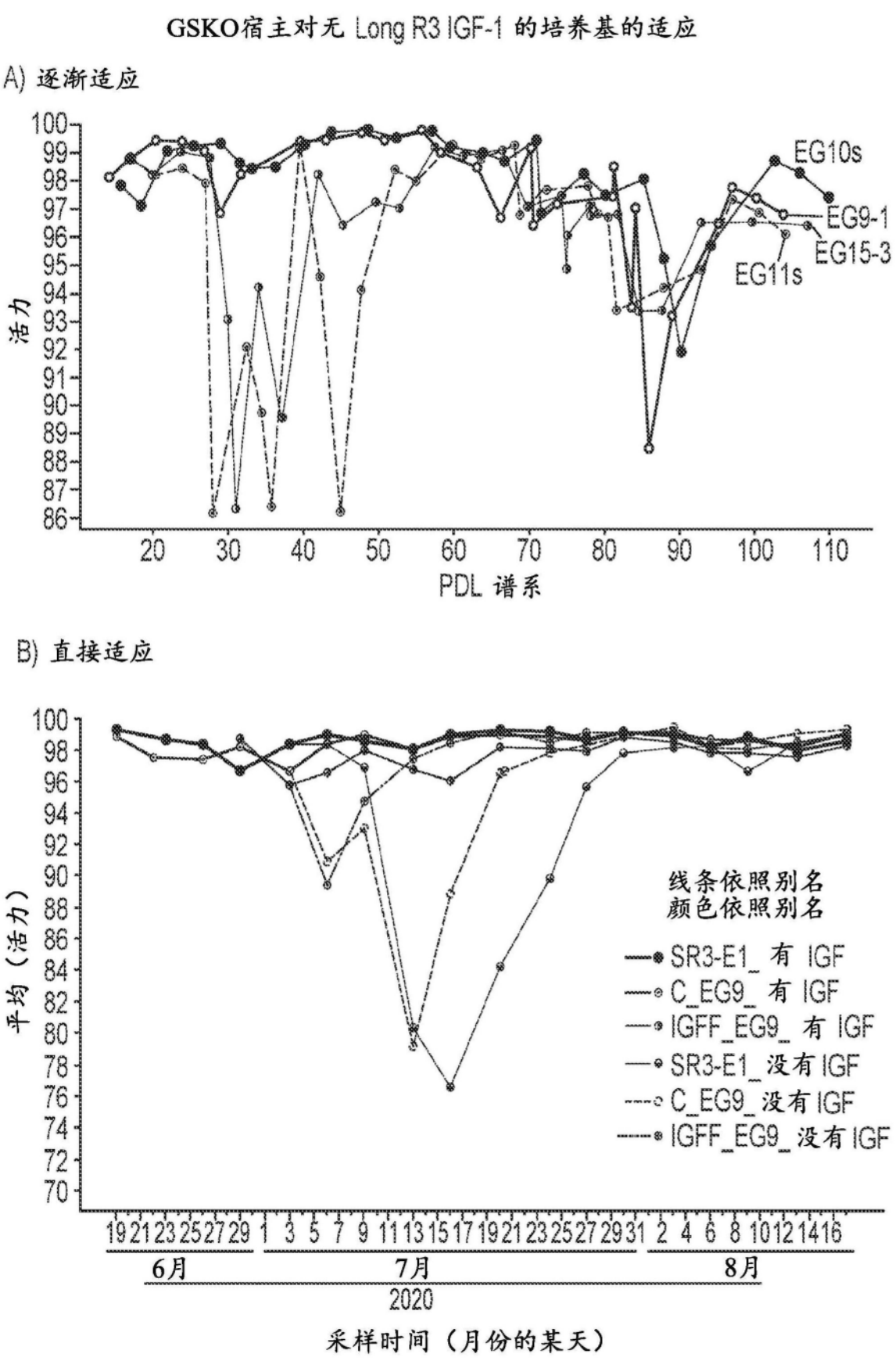

GSKO宿主对无 Long R3 IGF-1 的培养基的适应
A) 逐渐适应
活力
PDL 谱系
EG10s
EG9-1
EG15-3
EG11s
B) 直接适应
平均（活力）
线条依照别名
颜色依照别名
SR3-E1_ 有 IGF
C_EG9_ 有 IGF
IGFF_EG9_ 有 IGF
SR3-E1_ 没有 IGF
C_EG9_ 没有 IGF
IGFF_EG9_ 没有 IGF
6月
7月
8月
2020
采样时间（月份的某天）

图1

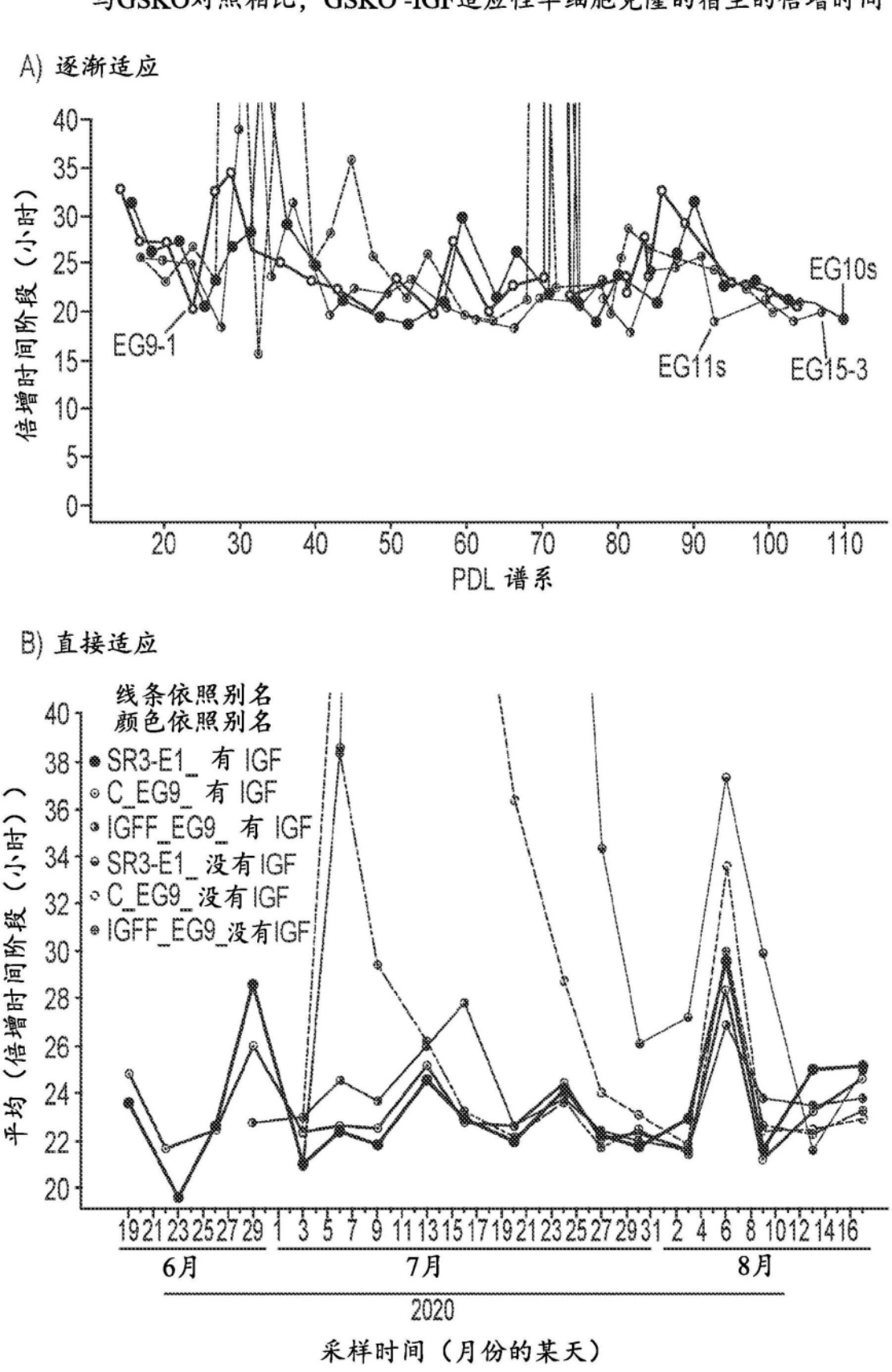

与GSKO对照相比，GSKO -IGF适应性单细胞克隆的宿主的倍增时间
A) 逐渐适应
倍增时间阶段（小时）
PDL 谱系
EG9-1
EG10s
EG11s
EG15-3
B) 直接适应
线条依照别名
颜色依照别名
SR3-E1_ 有 IGF
C_EG9_ 有 IGF
IGFF_EG9_ 有 IGF
SR3-E1_ 没有IGF
C_EG9_没有IGF
IGFF_EG9_没有IGF
平均（倍增时间阶段（小时））
6月
7月
8月
2020
采样时间（月份的某天）

图2

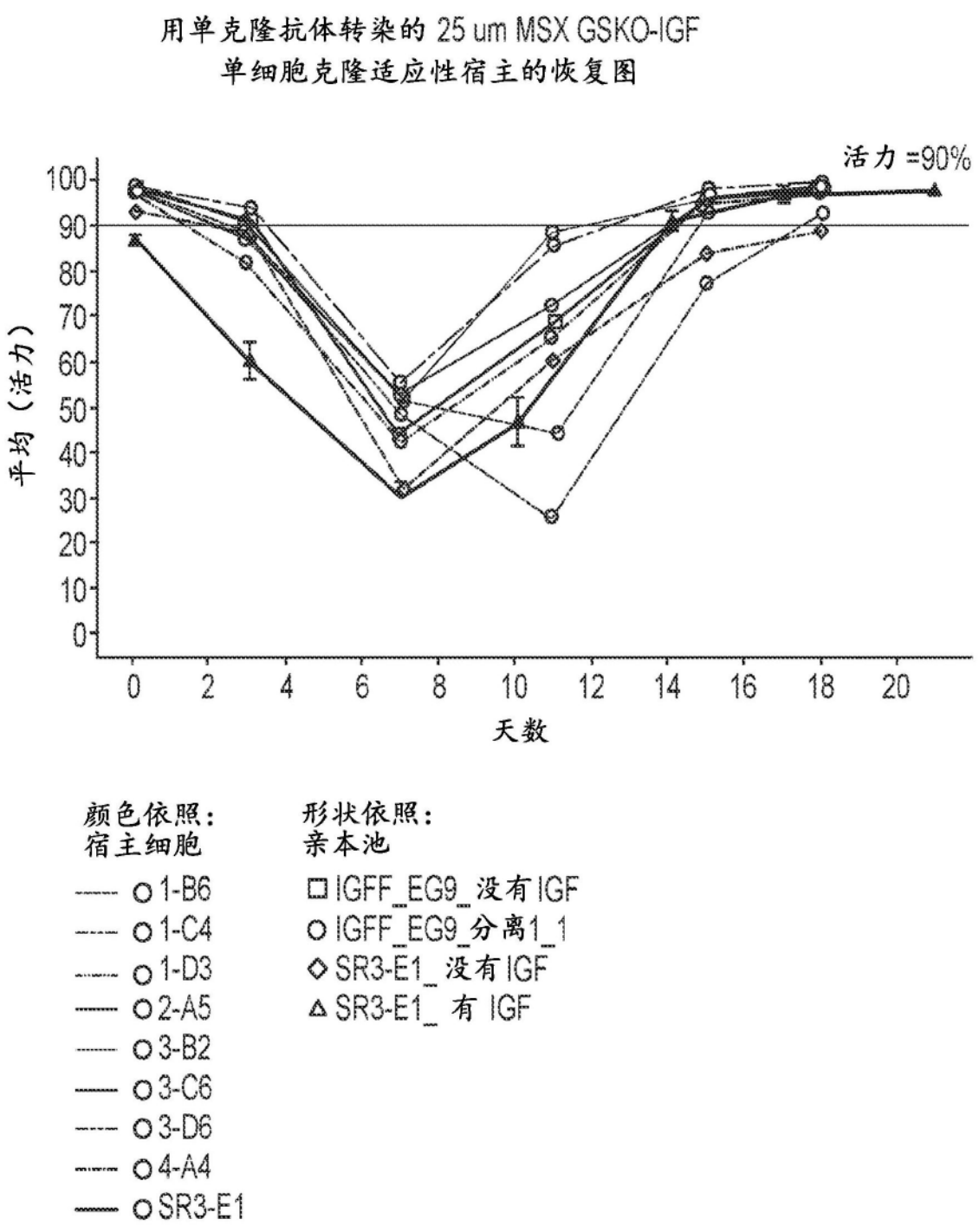
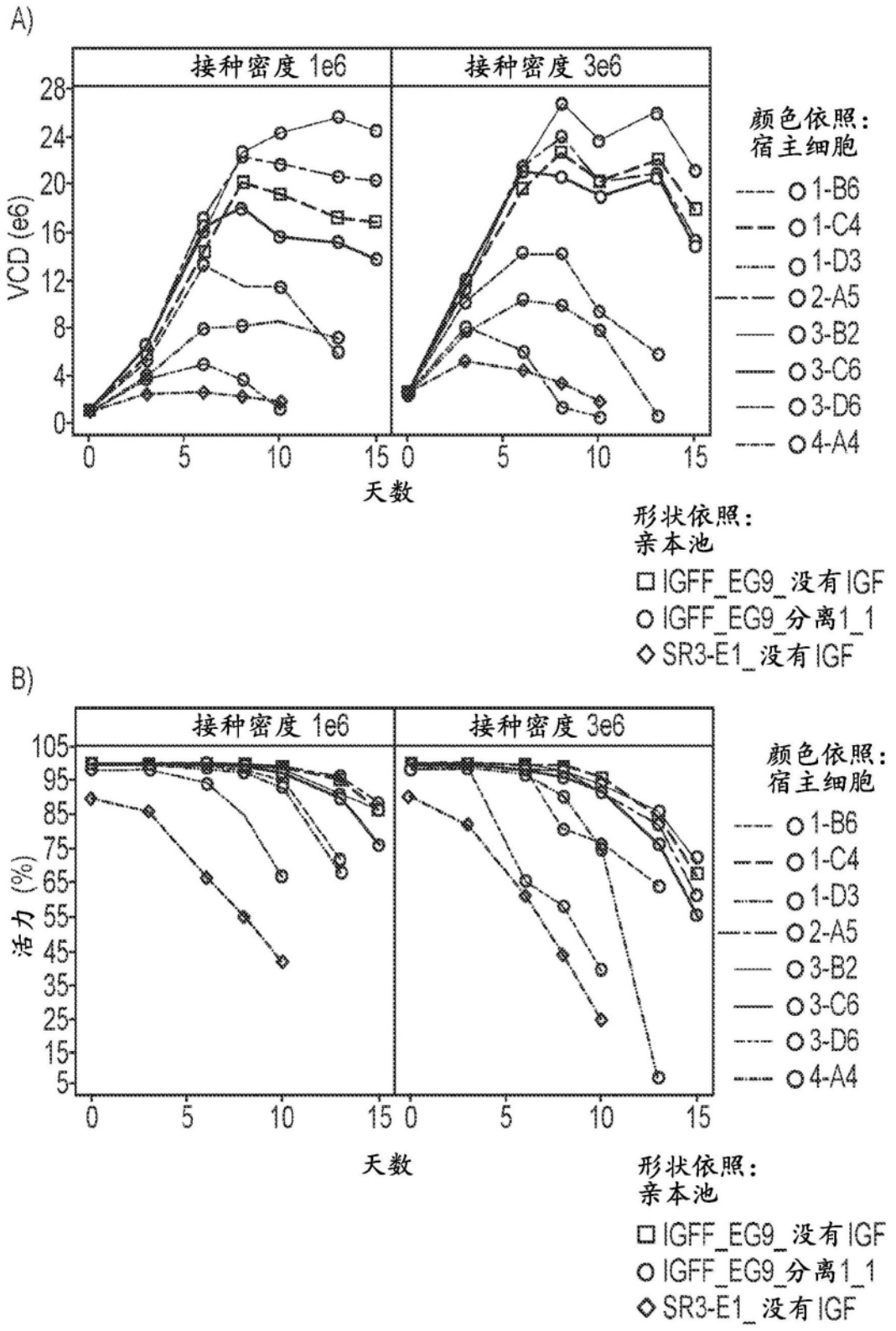

用单克隆抗体转染的 25 um MSX GSKO-IGF
单细胞克隆适应性宿主的恢复图
活力 =90%
平均（活力）
天数
颜色依照：
宿主细胞
1-B6
1-C4
1-D3
2-A5
3-B2
3-C6
3-D6
4-A4
SR3-E1
形状依照：
亲本池
IGFF_EG9_没有IGF
IGFF_EG9_分离1_1
SR3-E1_ 没有IGF
SR3-E1_ 有 IGF

图3

在15 D补料分批生产中用单克隆抗体转染的
25uM MSX CS9-IGF 单细胞克隆的宿主的生长和生产率图



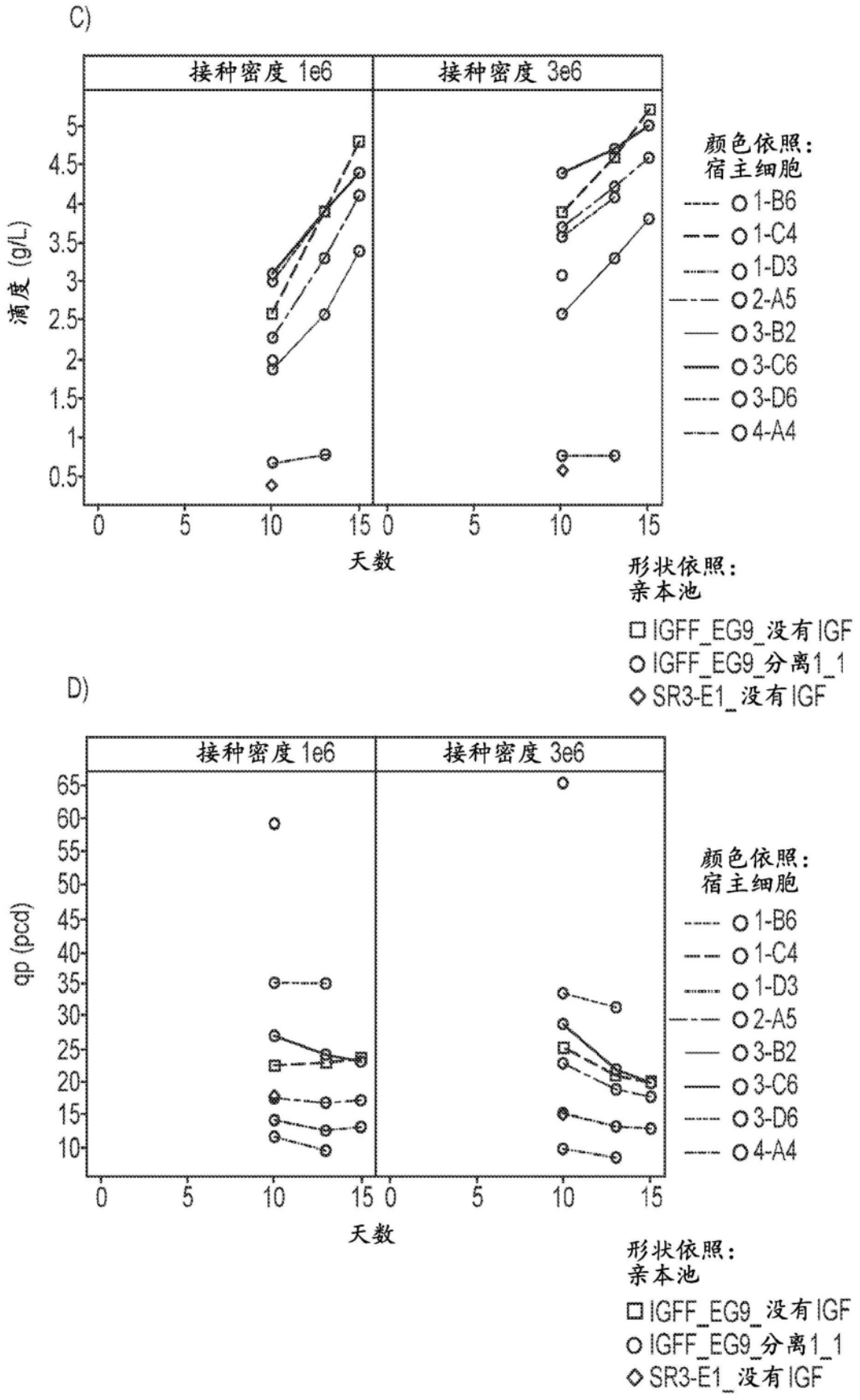

C)
接种密度 1e6
接种密度 3e6
滴度 (g/L)
天数
颜色依照:
宿主细胞
1-B6
1-C4
1-D3
2-A5
3-B2
3-C6
3-D6
4-A4
形状依照:
亲本池
IGFF_EG9_没有IGF
IGFF_EG9_分离1_1
SR3-E1_没有IGF
D)
接种密度 1e6
接种密度 3e6
qp (pcd)
天数
颜色依照:
宿主细胞
1-B6
1-C4
1-D3
2-A5
3-B2
3-C6
3-D6
4-A4
形状依照:
亲本池
IGFF_EG9_没有IGF
IGFF_EG9_分离1_1
SR3-E1_没有IGF

图4