

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: **AT 409 493 B**

(12)

## PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 985/99 (51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 5/00**  
(22) Anmeldetag: 02.06.1999  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.01.2002 (61) Zusatz zu Patent Nr.: 407 255  
Längste mögliche Dauer: 20.06.2017  
(45) Ausgabetag: 26.08.2002

(73) Patentinhaber:  
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

### (54) STABILER REKOMBINANTER ZELLKLON

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung, insbesondere zur großtechnischen Herstellung, eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen, welches die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellen eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons, welcher erhältlich ist durch Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium, Umadaptieren der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten, und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten-Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
- Vermehren des stabilen Zellklons in serum- und proteinfreiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur,
- Herstellen der Zellkultur, enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor, und
- Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand,

und dadurch gekennzeichnet ist, dass ein serum- und proteinfreies Medium verwendet wird, das eine oder mehrere

Aminosäuren enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin.

**AT 409 493 B**

Die vorliegende Erfindung betrifft einen stabilen rekombinanten Zellklon, der im serum- und proteinfreien Medium für mindestens 40 Generationen stabil ist, eine Biomasse, erhalten durch Vermehrung des stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Kultivierungsbedingungen und ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mittels der Biomasse. Desweiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung von stabilen rekombinanten Zellklonen. Weiters betrifft die Erfindung die Herstellung eines rekombinanten Proteins in einem serum- und proteinfreien synthetischen Minimalmedium.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein serum- und proteinfreies Medium zur Kultivierung von Zellen, die ein rekombinantes Protein exprimieren.

Die Herstellung von rekombinanten Proteinen, insbesondere von biomedizinischen Produkten, wie Blutfaktoren, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Um ein optimales Wachstum von rekombinanten Zellen zu ermöglichen, wird dem Medium zumeist Serum zugegeben. Aufgrund der hohen Kosten von Serum und um mögliche Verunreinigungen durch virale oder molekulare Pathogene durch das Serum im Kultivierungsmedium zu vermeiden, wurde eine Reihe von serumfreien Medien entwickelt, die insbesondere keine Zusätze bovinen oder humanen Ursprungs enthalten sollten. Die Verwendung solcher Medien beim Herstellungsprozeß erlaubt neben der geringen Kontaminationsgefahr der hergestellten Produkte durch virale und molekulare Pathogene auch eine einfachere Reinigung der exprimierten Proteine.

Rekombinante Zellen werden zumeist in serumhaltigem Medium bis zu einer hohen Zelldichte, etwa für eine "Working Cell Bank" angezogen, und anschließend während der Produktionsphase auf serumfreies Medium umadaptiert.

Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 3:133-140) selektionierten serum-unabhängige Zellklone in serumfreiem Medium, das Insulin und Transferrin enthielt. Es zeigte sich jedoch, daß nach 16 Tagen die Lebendzellzahl und die Expressionsrate ständig abnahm. Durch Koamplifikation mit einem Markergen versuchten Miyaji et al. (1990, Cytotechnology 4:173-180) die Expressionsrate und die Produktivität der rekombinanten Zellen zu verbessern.

Yamaguchi et al. (1992, Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:600-604) etablierten Serum-unabhängige rekombinante CHO-Subklone durch Kultivierung Serum-abhängiger Zellen auf Mikrotiterplatten als Monolayer für 3 bis 4 Wochen in serumfreiem Medium, das humanes Serumalbumin, Insulin und Transferrin enthielt. Etwa 0,1% der Zellen waren Serum-unabhängig. Ein Teil der Subklone wuchs auch in Suspensionskultur in serumfreiem Medium, wobei die Zellen jedoch aggregierten und klumpten. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug 1,5 Tage. Es werden jedoch weder Angaben über die Stabilität der erhaltenen Serum-unabhängigen Klone noch über die Langzeitkultivierung dieser Klone unter serumfreien Bedingungen gemacht.

Medien, die die Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität und ein Wachstum von Zellen während der serumfreien Phase erlauben, enthalten oftmals zusätzlich Substanzen, wie Wachstumsfaktoren, wie Insulin oder Transferrin, oder Adhärenzfaktoren, die die Serumkomponenten ersetzen.

Um die Zugabe von Polypeptidfaktoren, wie Insulin oder Transferrin, zu vermeiden und proteinfreie Kultivierungsbedingungen zu erlauben, wurden verschiedene Techniken entwickelt. So wurden speziell definierte, komplette proteinfreie Medien entwickelt, die ein Zellwachstum auch unter proteinfreien Bedingungen erlauben.

Die WO 97/05240 beschreibt die Herstellung von rekombinanten Proteinen unter proteinfreien Bedingungen, wobei die Zellen neben dem gewünschten Protein einen Wachstumsfaktor co-exprimieren.

Die JP 2696001 beschreibt die Verwendung von proteinfreiem Medium für die Herstellung von Faktor VIII in CHO-Zellen unter Zugabe eines nicht-ionischen Oberflächenmittels oder Cyclodextrin zur Steigerung der Produktivität der Wirtszellen. Um die Wirksamkeit dieser Zusätze zu steigern, wird die Zugabe von beispielsweise Butyrat und Lithium empfohlen. Wie aus der Beschreibung hervorgeht, hat die Zugabe des Pluronic F-68 einen deutlichen Anstieg der Zellzahl zur Folge.

Die WO 96/26266 beschreibt die Kultivierung von Zellen in einem Medium, das ein Glutamin enthaltendes Proteinhydrolysat enthält, dessen Gehalt an freien Aminosäuren kleiner als 15% des Gesamtproteingewichts ist und dessen Peptide ein Molekulargewicht von kleiner 44kD aufweisen. Als Kultivierungsmedium für die Zellkulturen wird als Basismedium synthetisches Minimalmedium verwendet, dem neben Proteinhydrolysat auch unter anderem fötales Kälberserum, Gentamycin

und Mercaptoethanol zugesetzt wird. Die Verwendung dieses serumhaltigen Mediums für die rekombinante Herstellung von Blutfaktoren wird nicht erwähnt.

Die US 5,393,668 beschreibt spezielle synthetische Oberflächen, die ein Wachstum von adhären-  
 5 Zellen unter proteinfreien Bedingungen erlauben.

Um die Zellproliferation zu stimulieren, wurden CHO-Zellen, die humanes Insulin überexprimie-  
 10 ren, auf einem artifizialen Substrat, an das kovalent Insulin gebunden ist, vermehrt (Ito et al., 1996., PNAS, USA 93:3598-3601).

Die EP 0 872 487 beschreibt die Herstellung von rekombinanten Faktor VIII in proteinfreiem  
 15 Medium, enthaltend rekombinantes Insulin, dem Polyole zugegeben werden. Gemäß der Beschrei-  
 bung führt die Zugabe von Pluronic-F68 zu einer erhöhten Faktor VIII-Produktivität von BHK-  
 Zellen, die Zugabe von Kupfer-Ionen verstärkt diese Produktionssteigerung.

Reiter et al. (1992, Cytotechnology 9:247-253) beschreiben die Immobilisierung von in serum-  
 20 haltigem Medium angezüchteten r-CHO-Zellen bei einer hohen Dichte auf Trägern und anschlie-  
 ßender Perfusion der immobilisierten Zellen in proteinfreiem Medium während der Produktionspha-  
 se, wobei eine kontinuierliche Freisetzung von Protein in den Zellkulturüberstand festgestellt wur-  
 25 de. Die Zellen wurden dabei jedoch für weniger als 10 Generationen in proteinfreiem Medium  
 perfundiert.

Katinger et al. (1996, Adv. In Mol.Cell.Biol., 15a:193-207) beschreiben die Herstellung von sta-  
 30 bilen Zellkulturen, wobei die Zellen an makroporösen Trägern immobilisiert werden. Es wird betont,  
 daß Perfusionskulturen mit porösen Trägermaterialien gegenüber anderen Verfahren zu bevorzu-  
 gen wären. Stabile Klone, die rekombinante Proteine wie FVIII oder von Willebrand-Faktor expri-  
 mieren, werden nicht beschrieben, die Zellen werden stets in serumhaltigem Medium angezüchtet  
 und erst später in serum- und proteinfreies Medium überführt.

Bisherige Verfahren zur erfolgreichen Herstellung einer großtechnischen "large-scale"-Zellkul-  
 35 tur unter proteinfreien Bedingungen werden für kontinuierliche Zelllinien, insbesondere VERO-  
 Zellen, beschrieben (WO 96/15231). Die Zellen werden dabei unter serum- und proteinfreien  
 Bedingungen von der Original-Ampulle bis zum großtechnischen Maßstab von 1200 l angezogen.  
 Es handelt sich dabei jedoch nicht um rekombinante Zellen, sondern um Wirtszellen, die für die  
 40 Produktion von Virusantigenen in einem lytischen Prozeß eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu adhären-ten VERO-Zellen sind beispielsweise CHO-Zellen nur bedingt haf-  
 45 tungsabhängig. Mittels konventioneller Methoden unter serumhaltigen Bedingungen angezogene  
 CHO-Zellen können sowohl an glatte als auch an poröse Mikroträger binden (US 4,978,616, Reiter  
 et al., 1992, Cytotechnology 9:247-253). Werden CHO-Zellen unter serumfreien Bedingungen  
 angezogen, so verlieren sie diese Eigenschaft und haften nicht an glatten Trägern, wie etwa Cyto-  
 50 dex 3, oder lösen sich leicht von diesen ab, sofern nicht Adhärenzfördernde Zusätze, wie bei-  
 spielsweise Fibronectin, Insulin oder Transferrin in das Medium gegeben werden. Aufgrund der  
 geringen Adhärenz von CHO-Zellen an Träger unter serumfreien Bedingungen erfolgt die Produk-  
 tion von rekombinanten Proteinen daher zumeist in Suspensionskultur. Der Produktionsprozeß  
 kann dabei in einem kontinuierlichen oder batch-weisen Verfahren ablaufen. Die rekombinante  
 55 Zellkultur wird dabei bis zu einer optimalen Zelldichte im Bioreaktor angezogen, gegebenenfalls die  
 Proteinexpression induziert und zum Ernten das Medium, enthaltend die exprimierten Proteine,  
 jedoch auch rekombinante Zellen, in gewissen Abständen dem Reaktionsstank und damit dem  
 Produktionsprozeß entzogen. Durch den ständigen Verlust an Biomasse sinkt die Produktionseffi-  
 zienz im Bioreaktor ab und erhöht sich erst nach Zugabe von frischem Medium langsam wieder, da  
 die Zellen auf die gewünschte Zelldichte hochwachsen müssen. Es gibt daher, trotz des kontinuier-  
 lichen Prozesses, immer wieder eine Verzögerungsphase, in der die Produktionsrate bei diesem  
 System absinkt. Zudem ist die Wachstums- und Produktionskapazität durch die maximal erreich-  
 bare Zelldichte in einem solchen System begrenzt.

Bei der Adaptierung von unter serumhaltigen Bedingungen angezüchteten Zellen auf protein-  
 60 freies Medium wurde immer wieder festgestellt, daß die Ausbeute an exprimiertem Protein und die  
 Produktivität von rekombinanten CHO-Zellen nach Adaption in proteinfreiem Medium im Vergleich  
 zu serumhaltigen Bedingungen stark absinkt (Paterson et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol.  
 40:691-658).

Dies ist auf eine Instabilität oder reduziertes Wachstum der rekombinanten Klone aufgrund der  
 65 geänderten Kulturbedingungen zurückzuführen. Aufgrund der veränderten Fermentationsbedin-

gungen wird - trotz Einsetzen eines stabilen Ursprungsklons - immer wieder ein Großteil der Zellen zu Zellen mit verringerter Expression oder auch Nicht-Produzenten, die während des Produktionsprozesses Produkt-Produzenten überwuchern, wodurch die Fermenterkultur letztlich zu einem Großteil aus Nicht-Produzenten bzw. solchen Zellen mit geringer Expression besteht.

5 Dies hat zur Folge, daß die maximale Produktionskapazität der Fermentationskultur kontinuierlich absinkt und eine maximale Produktproduktion auf eine bestimmte Anzahl von Generationen oder Zellpassagen beschränkt ist.

Es besteht daher ein Bedarf an einem System, bei dem eine kontinuierliche Produktion, insbesondere bei der großtechnischen Herstellung von rekombinanten Proteinen unter serum- und proteinfreien Bedingungen über einen möglichst langen Zeitraum möglich ist.

10 Es wäre weiterhin wünschenswert, einen rekombinanten Zellklon zu erhalten, der für viele Generationen in der Produktionsphase unter proteinfreien Bedingungen stabil ist und rekombinantes Protein exprimiert.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes Verfahren für die Herstellung von rekombinanten Proteinen unter serum- und proteinfreien Kultivierungs- und Produktionsbedingungen zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel ist es, einen stabilen rekombinanten Zellklon zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel besteht darin, eine Steigerung der Produktivität eines rekombinanten Zellklons durch Einsatz eines protein- und serumfreien Mediums zu erreichen.

20 Die Aufgabe wird gemäß dem Stammpatent AT 407 255 B gelöst durch Zurverfügungstellen eines rekombinanten Zellklons, erhältlich aus einer Zellkultur, die nach Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium und Umadaptierung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium erhalten wird. Die Zellen werden dabei für mindestens 40 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium unter produktionsäquivalenten Bedingungen weiterkultiviert.

25 Vorzugsweise erfolgt die Kultivierung der Zellen dabei ohne Selektion auf das Selektionsmarker- und/oder Amplifikationsgen, beispielsweise in Abwesenheit MTX bei CHO-dhfr-Zellen.

Unter Ursprungszellklon wird im Rahmen dieser Erfindung ein rekombinanter Zellklon-Transfektant verstanden, der nach Transfektion von Wirtszellen mit einer rekombinanten Nukleotidsequenz unter Laborbedingungen stabil rekombinantes Produkt exprimiert. Der Ursprungsklon wird zur Optimierung des Wachstums in serumhaltigem Medium angezüchtet. Zur Erhöhung der Produktivität wird der Ursprungsklon gegebenenfalls in Gegenwart eines Selektionsmittels und Selektion auf den Selektionsmarker und/oder Amplifikationsmarker angezogen. Für die großtechnische Produktion wird der Ursprungszellklon unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen bis zu einer hohen Zelldichte angezogen und kurz vor der Produktionsphase auf serum- und/oder protein-

30 freies Medium umadaptiert. Die Kultivierung erfolgt dabei vorzugsweise ohne Selektionsdruck. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Kultivierung des rekombinanten Ursprungszellklons bereits von Anfang an in serum- und proteinfreiem Medium erfolgen, wodurch eine Umadaptierung nicht mehr notwendig ist. Gegebenenfalls kann auch in diesem Fall ein Selektionsmittel verwendet werden und die Selektion auf den Selektions- und/oder Amplifikationsmarker erfolgen. Ein Verfahren dafür ist beispielsweise in der EP 0 711 835 beschrieben.

35 Es wurde gefunden, daß unter diesen Bedingungen ein Großteil von mehr als 95% der Zellen in einer solchen auf serum- und proteinfreiem Medium umadaptierten Zellkultur zu Nicht-Produkt-Produzenten werden. Mittels Immunfluoreszenz mit produkt-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, daß abhängig von der Generationszeit der Zellen in serum- und proteinfreiem Medium die Anzahl der Nicht-Produzenten in einer Kultur ansteigt und die Produkt-Produzenten überwächst, wodurch die Produktionskapazität der Kultur absinkt.

40 Die nach Umadaptierung auf serum- und proteinfreies Medium erhaltene Zellkultur wird auf diejenigen Zellklone der Zellpopulation getestet, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen, gegebenenfalls in Abwesenheit eines Selektionsdruckes, stabil Produkte produzieren. Dies kann beispielsweise durch Immunfluoreszenz mit markierten, spezifischen, gegen das rekombinante Polypeptid oder Protein gerichteten Antikörpern erfolgen. Die als Produkt-Produzenten identifizierten Zellen werden aus der Zellkultur isoliert, und unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen erneut vermehrt. Die Isolierung der Zellen kann dabei durch Vereinzelung der Zellen und Testen auf Produkt-Produzenten erfolgen.

55 Gegebenenfalls wird die Zellkultur, enthaltend die stabilen Zellen, erneut auf stabile rekomb-

binante Klone getestet und diese aus der Zellkultur isoliert und auskloniert. Anschließend werden die unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhaltenen stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen weitervermehrt.

Der rekombinante Zellklon gemäß der Stammerfindung zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50, insbesondere mehr als 60 Generationen stabil ist und rekombinantes Produkt exprimiert.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Stammerfindung liegt der stabile rekombinante Zellklon in isolierter Form vor. Ausgehend vom stabilen Zellklon wird unter serum- und proteinfreien Bedingungen eine Zellkultur durch Vermehrung der stabilen Zellen gewonnen.

Der erfindungsgemäße stabile rekombinante Zellklon ist vorzugsweise von einer rekombinanten Säugerzelle abgeleitet. Rekombinante Säugerzellen können dabei alle Zellen sein, die für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierende Sequenzen enthalten. Umfaßt sind dabei alle kontinuierlich wachsenden Zellen, die sowohl adhärent als auch nicht-adhärent wachsen. Besonders bevorzugt sind rekombinante CHO-Zellen oder BHK-Zellen. Rekombinante Polypeptide oder Proteine können Blutfaktoren, Wachstumsfaktoren oder andere biomedizinisch relevante Produkte sein.

Gemäß der Stammerfindung sind stabile rekombinante Zellklone bevorzugt, die die kodierende Sequenz für einen rekombinanten Blutfaktor wie Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C, eine aktivierte Form eines dieser Faktoren, oder vWF enthalten, und in der Lage sind, diesen stabil über mehrere Generationen zu exprimieren. Besonders bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, die vWF oder ein Polypeptid mit vWF-Aktivität, Faktor VIII oder ein Polypeptid mit VIII-Aktivität, vWF und Faktor VIII, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Der unter serum- und proteinfreien Bedingungen selektionierte Zellklon der Stammerfindung zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß er für mindestens 40, vorzugsweise für mindestens 50 Generationen, besonders bevorzugt für mehr als 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium stabil ist.

Um eine Masterzellbank anzulegen, werden 30 Generationen benötigt. Um eine durchschnittliche Batchkultur mit 1000 l-Maßstab durchzuführen, sind mindestens etwa 40 Generationen erforderlich. Damit ist es erstmals möglich, ausgehend von einem Einzelklon eine "Master Cell Bank" (MCB), eine "Working Cell Bank" (WCB) mit etwa 8 bis 10 Generationen und damit eine Zellkultur im Produktionsmaßstab (Produktionsbiomasse) mit bis zu 20 bis 25 Generationen unter diesen Bedingungen herzustellen, da bisherige Zellklone einige Generationen nach Wachstum auf serum- oder proteinfreiem Medium instabil wurden, wodurch a) keine einheitliche Zellkultur mit Produkt-Produzenten und b) keine stabile Produktproduktivität über einen längeren Zeitraum möglich war.

Der Zellklon gemäß der Stammerfindung ist damit unter Produktionsbedingungen in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40 Generationen stabil. Bisher beschriebene Verfahren zeigten lediglich eine Generationszahl von weniger als 10 Generationen Produktproduktivität unter proteinfreien Bedingungen (Reiter et al., 1992, *supra*).

Als Stabilitätskriterium gilt eine Mindestanzahl von mindestens 40 Generationen, vorzugsweise mehr als 50, besonders bevorzugt mehr als 60 Generationen im Produktionsprozeß, während dem eine stabile Expression der Proteine stattfindet und sich die Zellen morphologisch-phänotypisch nicht verändern und keine tumorogenen Eigenschaften aufweisen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß der Zellklon gemäß der Stammerfindung unter serum- und proteinfreien Bedingungen eine erhöhte Produkt-Produktivität selbst im Vergleich zum Ursprungszellklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert wurde, aufweist.

Weiters wurde überraschenderweise gefunden, daß die Produktivität der kultivierten Zellen dadurch gesteigert werden kann, daß dem serum- und proteinfreien Medium zusätzlich Aminosäuren und/oder gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton zugegeben wird. Dabei wird die Steigerung der Produktivität nicht dadurch bewirkt, daß es zu einer erhöhten Zellwachstumsrate kommt, sondern die Kultivierungsbedingungen wirken sich direkt auf die Produktivität der Zellen aus, die ein rekombinantes Protein exprimieren.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Stammerfindung eine Zellkultur zur Verfügung, die mindestens 90%, vorzugsweise mehr als 95%, besonders bevorzugt mehr als 98% stabile rekombinante Zellen enthält, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen für mindestens 40 Genera-

tionen, insbesondere für mindestens 50 Generationen, stabil sind und ein rekombinantes Produkt exprimieren.

Unter Zellkultur wird im Rahmen der Stammerfindung eine Master Cell Bank (MCB), eine Working Cell Bank (WCB-Arbeitszellbank) oder eine Produktionsbiomasse in einem großtechnischen Produktionsbioreaktor verstanden.

Gemäß der Stammerfindung wird die Zellkultur insbesondere durch Kultivieren eines stabilen rekombinanten Zellklons der oben beschriebenen Art unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhalten.

Die Zellkultur gemäß der Stammerfindung ist dabei erhältlich durch Vermehren des isolierten stabilen Zellklons vom Einzelklon, der Saatzellen bis zu der MCB, der WCB oder einer Biomasse im Produktionsmaßstab im Bioreaktor unter serum- und proteinfreien Bedingungen, vorzugsweise ohne Selektionsdruck auf das Selektions- und/oder Markergen. Es hat sich insbesondere gezeigt, daß die rekombinanten Zellen in einer Zellkultur, die ausgehend vom stabilen rekombinanten Klon gemäß der Stammerfindung erhalten werden, für mindestens 40 Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen stabil sind.

Die gemäß der Stammerfindung zur Verfügung gestellte Zellkultur, die von einem serum- und proteinunabhängigen stabilen Zellklon hergestellt ist, weist unter proteinfreien Kultivierungs- und Produktionsbedingungen mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98%, stabile rekombinante Zellen auf. Unter stabilen rekombinanten Zellen werden dabei insbesondere rekombinante Säugerzellen verstanden, die vom stabilen Zellklon abgeleitet sind. Bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, vorzugsweise CHO-dhfr<sup>-</sup>-Zellen, CHO-K1-Zellen, und BHK-Zellen, die einen Blutfaktor, vorzugsweise rekombinanten vWF, Faktor VIII, Faktor VIII und vWF, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Die Zellkultur gemäß der Stammerfindung kann die stabilen rekombinanten Zellen als Suspensionskultur enthalten. Die Zellen können auch an einen Träger, insbesondere einen Mikroträger, immobilisiert sein, wobei insbesondere poröse Mikroträger bevorzugt sind. Als besonders geeignet haben sich dabei poröse Träger, wie etwa Cytoline® oder Cytopore®, gezeigt.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Stammerfindung ein Verfahren zur großtechnischen Herstellung eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen, unter Einsatz des stabilen Zellklons gemäß der Stammerfindung zur Verfügung. Das Verfahren umfaßt dabei die Schritte des Bereitstellens eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons der oben beschriebenen Art zur Herstellung einer Zellkultur. Dabei erfolgt die Vermehrung des isolierten stabilen Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen vom stabilen Einzel-Zellklon bis zur Zellkultur. Insbesondere erfolgt auch die Subkultivierung der stabilen Zellklone unter proteinfreien Bedingungen, insbesondere ohne Zugabe einer Protease, wie etwa Trypsin. Dadurch ist gewährleistet, daß zu keinem Zeitpunkt während der Herstellung einer in der Produktion eines rekombinanten Produktes eingesetzten Zellkultur, eine Kontamination, gegebenenfalls verursacht durch die Zugabe von serum- oder proteinhaltigen Zusätzen humanen oder tierischen Ursprungs zur Zellkultur, erfolgt. Damit wird erstmals ein Verfahren beschrieben, das vom Ausgangsklon über die Herstellung einer Working Cell Bank bis zur Produktionsbiomasse und die anschließende Produktion die Herstellung von rekombinantem Protein unter serum- und proteinfreien Bedingungen erlaubt.

Die Herstellung der rekombinanten Produkte mit der Zellkultur gemäß der Stammerfindung, die mehr als 90%, vorzugsweise mehr als 95%, besonders bevorzugt mehr als 98% stabile Produktproduzenten-Zellen enthält, kann als Suspensionskultur oder mit an Träger-immobilisierten Zellen erfolgen. Der Prozeß kann dabei im batchweisen, kontinuierlichen Verfahren oder durch Perfusionstechnik mit serum- und proteinfreiem Medium erfolgen.

Weiters kann der Prozeß der Kultivierung im Chemostat-Verfahren durchgeführt werden, wie aus dem Stand der Technik hinlänglich beschrieben (Werner et al., J. Biotechnol., 1992, 22, S. 51-68). Beispielsweise kann ein gerührter Bioreaktor oder ein Airlift-Reaktor verwendet werden.

Die exprimierten rekombinanten Proteine werden anschließend aus dem Zellkulturüberstand gewonnen, mit aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren gereinigt und weiterverarbeitet.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Stammerfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons zur Verfügung, umfassend die Schritte der

- Vermehrung eines rekombinanten Ursprungsklons bis zur Zellkultur in serumhaltigem Medium, vorzugsweise ohne Selektionsdruck

- Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten
- Klonieren der stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen, wobei die Klonierung durch allgemein bekannte Techniken, wie Vereinzelung der Zellen durch Ausverdünnen und Anzüchten der Einzelklone erfolgen kann
- Vermehrung der isolierten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen und gegebenenfalls Austesten der Zellkultur auf Produktproduzenten.

5  
10 Dabei werden nur solche rekombinanten Zellklone als stabil angesehen, die für mindestens 10, vorzugsweise mindestens 20, und insbesondere mindestens 50 Generationen, in proteinfreiem Medium stabil rekombinantes Protein exprimieren.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Stammerfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines stabilen rekombinanten Zellklons zur Verfügung, umfassend die Schritte

- Vermehren einer nicht-rekombinanten Ausgangszelle oder Zelllinie unter serum- und proteinfreien Bedingungen und Klonieren eines stabilen nicht-rekombinanten Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen
- Transfizieren des stabilen Zellklons mit einer rekombinanten Nukleinsäure und Isolieren von stabilen rekombinanten Zellklonen
- Kultivieren der stabilen Zellklon-Transfektanten in serum- und proteinfreiem Medium unter gegebenenfalls produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der stabilen rekombinanten Zellen auf Produktions- und Produktstabilität.

15  
20 Ein besonders bevorzugter Aspekt der Stammerfindung stellt die Gewinnung eines stabilen Zellklons zur Verfügung, umfassend die folgenden Schritte

- Vermehrung eines rekombinanten Ursprungsklons bis zur Zellkultur in serum- und proteinfreiem Medium, vorzugsweise ohne Selektionsdruck
- Kultivierung der Zellen unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen
- Testen der Zellkultur unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf Produktproduzenten
- Klonieren der stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen, wobei die Klonierung durch allgemein bekannte Techniken, wie Vereinzelung der Zellen durch Ausverdünnen und Anzüchten der Einzelklone erfolgen kann
- Vermehrung der isolierten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen und gegebenenfalls Austesten der Zellkultur auf Produktproduzenten.

25  
30  
35 Dabei werden nur solche rekombinanten Zellklone als stabil angesehen, die für mindestens 10, vorzugsweise mindestens 20, und insbesondere mindestens 50 Generationen, in proteinfreiem Medium stabil rekombinantes Protein exprimieren.

Weiters bevorzugt ist die Verwendung eines serum- und proteinfreien Mediums zur Steigerung der Produktivität eines Zellklons, der ein rekombinantes Protein exprimiert, dem zusätzlich eine definierte Aminosäuremischung und/oder gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton zugegeben wurde.

40 Die vorliegende Zusatzerfindung betrifft eine weitere Verbesserung der Stammerfindung. Der Gegenstand der Zusatzerfindung besteht in der Verwendung eines protein- und serumfreien Mediums bei der Kultivierung des isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons gemäß der Stammerfindung, welchem Medium Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe von L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin zugesetzt wurden. Die Aminosäuren können dem Medium einzeln oder in Kombination zugesetzt werden.

45 Demgemäß betrifft die vorliegende Zusatzerfindung ein Verfahren zur Herstellung, insbesondere zur großtechnischen Herstellung, eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen, welches die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellen eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons, welcher erhältlich ist durch Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium, Umadaptieren der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten, und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten-Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
- Vermehren des stabilen Zellklons in serum- und proteinfreiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur,

- Herstellen der Zellkultur, enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor, und
- Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand,

welches Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass ein serum- und proteinfreies Medium verwendet wird, das eine oder mehrere Aminosäuren enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin.

Selbstverständlich gelten für die Zusatzfindung (entsprechend adaptiert) die selben Definitionen und bevorzugten Abwandlungen wie für die Stammerfindung.

Besonders bevorzugt wird bei der vorliegenden Zusatzfindung demgemäß auch die Verwendung eines serum- und proteinfreien Mediums, das synthetisches Minimalmedium, enthaltend ein Hefe- oder Sojaextrakt, umfasst, wobei gereinigtes ultrafiltriertes Sojapepton besonders bevorzugt ist.

Das Verfahren gemäß der Zusatzfindung eignet sich (neben den bereits zur Stammerfindung genannten bevorzugten rekombinanten Proteine) besonders zur Herstellung von Faktor VIII-Protein oder einem rekombinanten Polypeptid mit Faktor VIII-Aktivität sowie einem rekombinanten Willebrand Faktor-Protein oder einem rekombinanten Polypeptid mit vWF-Aktivität als rekombinantes Produkt.

Bevorzugterweise wird dem Medium gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton zugesetzt.

Besonders bevorzugt ist die kombinierte Zugabe aller in dieser Gruppe angeführten Aminosäuren, nämlich L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin.

Die Steigerung der Produktivität durch Zugabe der Aminosäuremischung, die dadurch erreicht werden kann, war besonders überraschend, da in den synthetischen Minimalmedien, wie sie im Stand der Technik beschrieben sind, beispielsweise DMEM/HAM's F12, bereits Aminosäuren in geringen Konzentrationen enthalten sind.

Als serum- und proteinfreies Medium kann jedes bekannte synthetische Medium eingesetzt werden. Konventionelle synthetische Minimalmedien können anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, eine Kohlehydratquelle und Wasser enthalten. Beispielsweise kann es DMEM/HAM's F12-Medium sein. Der Gehalt an Soja- oder Hefeextrakt kann zwischen 0,1 und 100 g/l, besonders bevorzugt zwischen 1 und 5 g/l, liegen. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann Sojaextrakt, beispielsweise Sojapepton verwendet werden. Das Molekulargewicht des Sojapeptons beträgt weniger als 50kD, bevorzugt weniger als 10kD.

Als besonders vorteilhaft für die Produktivität der rekombinanten Zelllinien hat sich - wie erwähnt - die Zugabe von ultrafiltriertem Sojapepton erwiesen, dessen durchschnittliches Molekulargewicht 350 Dalton beträgt (Fa. Quest). Es ist ein Sojaisolat mit einem Gehalt an Gesamtstickstoff von ca. 9,5% und einem Gehalt an freien Aminosäuren von ca. 13%.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung eines gereinigten, ultrafiltrierten Sojapeptons mit einem Molekulargewicht von  $\leq 1000$  Dalton, bevorzugt  $\leq 500$  Dalton, besonders bevorzugt  $\leq 350$  Dalton.

Die Ultrafiltration kann gemäß Verfahren erfolgen, wie sie im Stand der Technik ausführlich beschrieben sind, beispielsweise unter Verwendung von Membranfiltern mit definierter Ausschlußgrenze.

Die Reinigung des ultrafiltrierten Sojapeptons kann durch Gelchromatographie, beispielsweise mittels Sephadex-Chromatographie, beispielsweise Sephadex G25 oder Sephadex G10, oder äquivalente Materialien, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie, Größenausschlußchromatographie oder "reversed phase"-Chromatographie erfolgen. Es handelt sich dabei um Verfahren, wie sie dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt sind.

Besonders bevorzugt wird ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: synthetisches Minimalmedium (1 bis 25 g/l), Sojapepton (0,5 bis 50 g/l), L-Glutamin (0,05 bis 1 g/l),  $\text{NaHCO}_3$  (0,1 bis 10 g/l), Ascorbinsäure (0,0005 bis 0,05 g/l), Ethanolamin (0,0005 bis 0,05 g/l), Na-Selenit (1 bis 15  $\mu\text{g/l}$ ).

Dem Medium kann gegebenenfalls ein nichtionisches Oberflächenmittel, wie etwa Polypropylen glycol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 oder PLURONIC F-108) als Entschäumer zugegeben werden.

Dieses Mittel wird allgemein angewendet, um die Zellen vor den negativen Auswirkungen der Belüftung zu schützen, da ohne Zugabe eines Oberflächenmittels die aufsteigenden und zerplatzenen Luftblasen zur Schädigung jener Zellen führen können, die sich an der Oberfläche dieser



Luftblasen befinden. ("sparging") (Murhammer und Goochee, 1990, Biotechnol.Prog. 6:142-148)

Die Menge an nichtionischem Oberflächenmittel kann dabei zwischen 0,05 und 10 g/l liegen, besonders bevorzugt ist jedoch eine möglichst geringe Menge zwischen 0,1 und 5 g/l.

Weiters kann das Medium auch Cyclodextrin oder ein Derivat davon enthalten.

5 Der Zusatz von nichtionischem Oberflächenmittel oder von Cyclodextrin ist jedoch nicht erfindungswesentlich.

Vorzugsweise enthält das serum- und proteinfreie Medium einen Proteaseinhibitor, wie etwa Serinproteaseinhibitoren, die Gewebekultur-tauglich und synthetischen oder pflanzlichen Ursprungs sind.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden dem oben angeführten Medium zusätzlich folgende Aminosäuren zugegeben: L-Asparagin (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,05 g/l, besonders bevorzugt 0,015 bis 0,03 g/l), L-Cystein (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,005 bis 0,05 g/l, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,03 g/l), L-Cystin (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,05 g/l, besonders bevorzugt 0,015 bis 0,03 g/l), L-Prolin (0,001 bis 1,5 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,07 g/l, besonders bevorzugt 0,02 bis 0,05 g/l), L-Tryptophan (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,05 g/l; besonders bevorzugt 0,015 bis 0,03 g/l) und L-Glutamin (0,05 bis 1 g/l, bevorzugt 0,1 bis 1 g/l).

Die oben genannten Aminosäuren können dem Medium einzeln oder in Kombination zugesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die kombinierte Zugabe der Aminosäure-Mischung enthaltend 20 alle oben genannten Aminosäuren.

In einer besonderen Ausführungsform wird ein serum- und proteinfreies Medium verwendet, das zusätzlich eine Kombination der oben genannten Aminosäuremischung und gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton enthält.

25 Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß, beispielsweise zur Inaktivierung von Viren oder anderen Pathogenen, das Medium ohne negative Effekte ca. 5 bis 20 Minuten, bevorzugt 15 Minuten, auf 70°C bis 95°C, bevorzugt 85 bis 95°C, erhitzt werden kann.

Die Parameter für die Kultivierung der Zellen, wie O<sub>2</sub>-Konzentration, Perfusionsgeschwindigkeit oder Mediumswechsel, pH, Temperatur und Kultivierungstechnik sind dabei abhängig von den jeweils eingesetzten Zelltypen und können vom Fachmann in einfacher Weise ermittelt werden. 30 Beispielsweise kann die Kultivierung von CHO-Zellen in einem Rührtank und Perfusion mit proteinfreiem Medium mit einer Perfusionsrate von 1 bis 10 Volumenwechsel/Tag, einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,8, vorzugsweise 7,4, einer O<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 40% bis 60%, vorzugsweise bei 50% und einer Temperatur zwischen 34°C und 38°C, vorzugsweise 37°C, erfolgen.

Die Kultivierung der Zellen kann aber auch mittels Chemostat-Verfahren bei einem pH-Wert 35 zwischen 6,9 und 7,8, bevorzugt 7,1, einer O<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 10% und 60%, bevorzugt 20%, und einer Verdünnungsrate D von 0,25 bis 1,0, bevorzugt 0,5, erfolgen.

40 Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Zusatzerfindung auch eine Zellkultur, umfassend einen isolierten, stabilen rekombinanten Zellklon, welcher erhältlich ist durch Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium, Umadaptieren der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten, und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen, und einem serum- und proteinfreien Medium, das eine oder mehrere Aminosäuren enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin.

45 Bevorzugterweise enthält die Zellkultur gemäß der Zusatzerfindung ein Medium gemäß den oben beschriebenen bevorzugten Varianten für die Zusatzerfindung.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt werden soll, näher erläutert.

## 50 Kurze Beschreibung der Figuren

Figur 1: zeigt die mikroskopische Aufnahme einer Arbeitszellbank eines Ursprungsklons zum Zeitpunkt der Umadaptierung von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium (A), nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium (B) und nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium (C). 55

**Figur 2:** zeigt die mikroskopische Aufnahme einer Zellkultur, ausgehend von einem stabilen rekombinanten Zellklon unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf der Stufe der Arbeitszellbank (A), nach 10 Generationen (B) und nach 60 Generationen (C)

**Figur 3:** zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) Faktor VIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/1/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

**Figur 4:** zeigt einen Vergleich der Faktor VIII-Produktivität (mU/ml) bei Kultivierung im Batch-Verfahren von r-Faktor VIII-exprimierenden CHO-Zellen in folgenden Medien:

Mix 1: Serum- und proteinfreies Medium ohne Sojapepton, enthaltend eine Mischung ausgewählter Aminosäuren (wie in Beispiel 6 aufgelistet)

Mix 2: Serum- und proteinfreies Medium enthaltend ultrafiltriertes Sojapepton

Mix 3: Serum- und proteinfreies Medium, ultrafiltriertes Sojapepton und Aminosäuren

Mix 4: Serum- und proteinfreies Medium, enthaltend Aminosäuren und gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton.

**Figur 5:** zeigt die Faktor VIII Produktivität (U/l) bei kontinuierlichem Wachstum von r-Faktor VIII-exprimierenden CHO-Zellen in serum- und proteinfreiem Medium nach Beginn der Zugabe von gereinigtem, ultrafiltriertem Sojapepton am 6. Tag der Kultivierung. Den Daten ist zu entnehmen, daß es durch Zugabe des Sojapeptons zu einem deutlichen Anstieg der Faktor VIII-Produktivität und damit der volumetrischen Produktivität des Bioreaktor-Systems kommt, ohne zu einem deutlichen Anstieg des Zellwachstums zu führen.

#### Beispiele:

##### Beispiel 1:

##### **Stabilität von rVWF-CHO-Zellen nach Umstellen von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium**

CHO-dhfr<sup>-</sup>-Zellen wurden Plasmid phAct-rVWF und pSV-dhfr, co-transfiziert und vWF exprimierende Klone, wie in Fischer et al. (1994, FEBS Letters 351:345-348) beschrieben, subkloniert. Von den Subklonen, die stabil rVWF exprimierten, wurde unter serumhaltigen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von MTX, eine Arbeitszellbank (Working Cell Bank, WCB) angelegt und die Zellen unter serumhaltigen Bedingungen auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®) immobilisiert. Nachdem eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml Trägermatrix erreicht wurde, erfolgte die Umstellung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium. Die Zellen wurden für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte bei der Arbeitszellbank vor der Mediumumstellung, nach 10 und 60 Generationen im serum- und proteinfreien Medium. Während die Arbeitszellbank noch 100% rVWF-Produzenten aufwies (Figur 1 A), sank der Anteil der rVWF-Produzenten nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium auf etwa 50% ab (Figur 1 B). Nach 60 Generationen wurden mehr als 95% der Zellen als Nicht-Produzenten identifiziert (Figur 1 C).

##### **Beispiel 2: Klonierung von stabilen rekombinanten CHO-Klonen**

Von der Zellkultur, enthaltend rVWF-CHO-Zellen gemäß Beispiel 1 (dieser mit r-VWF-CHO F7 bezeichnete stabile Zellklon wurde bei der ECACC (European Collection of Cell Cultures), Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK, gemäß Budapester Vertrag am 22. Jänner 1998 hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer 98012206), die für 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium kultiviert worden war (Figur 1 C), wurde eine Verdünnung angelegt und jeweils 0,1 Zellen/well einer Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM/HAM's F12 ohne Serum- oder Proteinzusätze und ohne Selektionsdruck für etwa 3 Wochen kultiviert und die Zellen mit Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern getestet. Ein als positiv identifizierter Zellklon wurde als Aus-

gangsklon für die Herstellung einer Saat-Zellbank eingesetzt. Von der Saat-Zellbank wurde eine Master-Zellbank (MCB) in serum- und proteinfreiem Medium angelegt und Einzelampullen für die weitere Herstellung einer Arbeitszellbank weggefroren. Ausgehend von einer Einzelampulle wurde eine Arbeitszellbank in serum- und proteinfreiem Medium hergestellt. Die Zellen wurden auf poröse Mikroträger immobilisiert und für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium auf Produktivität getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte auf der Stufe der Arbeitszellbank und nach 10 und 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium. Sowohl auf Stufe der Arbeitszellbank (Figur 2 A), als auch nach 10 (Figur 2 B) und 60 Generationen (Figur 2 C) wurden annähernd 100% der Zellen als positive stabile rekombinante Klone identifiziert, die rvWF exprimieren.

**Beispiel 3:  
Zellspezifische Produktivität der rekombinanten Zellklone**

Von definierten Stufen während der Kultivierung von rekombinanten Zellen wurde eine definierte Zellzahl entnommen und mit frischem Medium für 24 h inkubiert. Die rvWF:Risto-CoF-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen bestimmt. Tabelle 1 zeigt, daß die zellspezifische Produktivität bei den erfindungsgemäßen stabilen rekombinanten Zellklonen auch nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium stabil war, und sogar im Vergleich zum Ursprungsklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert war, erhöht war.

**Tabelle 1**

Zellklon	zellspezifische Produktivität der Arbeitszellen mU rvWF/10 <sup>6</sup> Zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 10 Generationen mU rvWF/10 <sup>6</sup> Zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 60 Generationen mU rvWF/10 <sup>6</sup> Zellen/Tag
rvWF-CHO #808.68 Ursprungszellklon	55	30	< 10
r-vWF-CHO F7 *) stabiler Klone	62	65	60

\*) hinterlegt am 22.1.1998 (ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK); Hinterlegungsnummer 98012206)

**Beispiel 4:  
Zusammensetzung eines synthetischen serum- und proteinfreien Mediums**

Komponente	g/l	Bevorzugte Menge in g/l
Synthetisches Minimalmedium (DMEM/HAM's F12)	1 - 100	11,00 - 12,00
Sojapepton	0,5 - 50	2,5
L-Glutamin	0,05 - 1	0,36
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 - 10	2,00
Ascorbinsäure	0,005 - 0,05	0,0035
Ethanolamin	0,005 - 0,05	0,0015
Na-Selenit	1 - 15 µg/l	8,6 µg/l
optional: Synperonic F68	0,01 - 10	0,25

**Beispiel 5:****Kultivierung von rFVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Minimalmedium**

Eine Zellkultur, enthaltend rFVIII-CHO-Zellen, wurde in einem 10 l-Rührtank und Perfusion kultiviert. Dabei wurde ein Medium gemäß Beispiel 4 verwendet. Die Zellen wurden dabei auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®, Pharmacia) immobilisiert und für mindestens 6 Wochen kultiviert. Die Perfusionsrate betrug 4 Volumenwechsel/Tag, der pH-Wert lag bei 6,9-7,2, die O<sub>2</sub>-Konzentration bei etwa 20-50% und die Temperatur bei 37°C.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) Faktor VIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

**Tabelle 2**

Kultivierungstage	Zellspezifische Produktivität (mU/10 <sup>6</sup> Zellen/Tag)	Immunfluoreszenz (% FVIII-positive Zellen)
15	702	n.a.
21	1125	n.a.
28	951	> 95%
35	691	> 95%
42	970	n.a.

Tabelle 2 zeigt die Stabilität und spezifische Produktivität der rFVIII exprimierenden Zellen. Für diese Ergebnisse wurden nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen Proben entnommen, bei 300 g abzentrifugiert und in frischem serum- und proteinfreiem Medium resuspendiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Faktor VIII-Konzentration in den Zellkulturüberständen und die Zellzahl bestimmt. Ausgehend von diesen Daten wurde die spezifische FVIII-Produktivität berechnet.

Es wurde eine stabile durchschnittliche Produktivität von 888 mEinheiten/10<sup>6</sup> -Zellen/Tag erreicht. Diese stabile Produktivität wurde auch durch Immunfluoreszenz mit markierten anti-FVIII-Antikörpern nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen in serum- und proteinfreiem Medium bestätigt.

**Beispiel 6:****Vergleich der Produktivität von rekombinanten FVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Medium, enthaltend weitere Medienkomponenten.**

Eine rFVIII-CHO-Zellen enthaltende Zellkultur wurde im Batch-Ansatz kultiviert. Dabei wurde ein Medium gemäß Beispiel 4 verwendet, dem folgende Aminosäuren zugegeben wurden:

Aminosäure:	mg/l	Bevorzugte Menge in mg/l
L-Asparagin	1 - 100	20
L-Cystein.HCl.H <sub>2</sub> O	1 - 100	15
L-Cystin	1 - 100	20
L-Prolin	1 - 150	35
L-Tryptophan	1 - 100	20
L-Glutamin	50 - 1000	240

Die Zellen wurden bei 37°C gezüchtet, pH 6,9-7,2. Die Zellen wurden im Batch-Verfahren über 24-72 Stunden gezüchtet.

Die Produktivität der rekombinanten FVIII-CHO-Zellen wurde in folgenden Medienzusammen-

setzungen gemessen:

Mix 1 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium ohne Sojapepton, enthaltend zusätzlich eine Aminosäuremischung gemäß der oben genannten Tabelle.

Mix 2 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium, enthaltend Sojapepton.

Mix 3 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium, enthaltend Sojapepton und zusätzlich eine Aminosäuremischung gemäß der oben genannten Tabelle.

Mix 4 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium, enthaltend zusätzlich eine Aminosäuremischung gemäß der oben genannten Tabelle und 2,5 g/l gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton. Die Reinigung des ultrafiltrierten Sojapepton erfolgte chromatographisch über eine Sephadex®-Säule.

**Beispiel 7:**

**Kultivierung von rekombinanten FVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Medium in Chemostat-Kultur.**

Eine rFVIII-CHO-Zellen enthaltende Zellkultur wurde in einem 10 l gerührten Bioreaktor-Tank kultiviert. Dabei wurde ein Medium gemäß Beispiel 4, ohne Sojapepton, enthaltend eine Aminosäuremischung gemäß Beispiel 6 verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C gezüchtet, pH 6,9-7,2; die Sauerstoffkonzentration lag bei 20-50% Luftsättigung. Zur Bestimmung des Faktor VIII-Titers und der Zellkonzentration im Kulturüberstand wurden alle 24 Stunden Proben entnommen. Die Gesamt-Zellkonzentration war vom 2. bis zum 14. Tag konstant. Ab dem 6. Tag wurde dem Medium ultrafiltriertes Sojapepton zugegeben. Die Faktor VIII-Produktivität ist in Figur 5 dargestellt, die Messung erfolgte mittels eines CHROMOGENIX CoA FVIII:C/4-Systems. Immunfluoreszenz mit markierten anti-FVIII-Antikörpern. Das Fehlen von Sojapepton in der kontinuierlichen Kultur führt nach wenigen Tagen zu einem deutlichen Abfall der Faktor VIII-Produktivität, während die Zugabe des Sojapeptons einen fast 10-fachen Anstieg der Produktivität zu Folge hat. Da diese Zugabe jedoch nicht die Zellzahl erhöht, ist damit deutlich gezeigt, daß ultrafiltriertes Sojapepton eine deutliche Steigerung der Produktivität zur Folge hat, die aber unabhängig ist vom Zellwachstum.

**PATENTANSPRÜCHE:**

1. Verfahren zur Herstellung, insbesondere zur großtechnischen Herstellung, eines rekombinanten Produktes unter serum- und proteinfreien Bedingungen, welches die folgenden Schritte umfasst:
  - Bereitstellen eines isolierten, stabilen rekombinanten Zellklons, welcher erhältlich ist durch Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium, Umadaptieren der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten, und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten-Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen,
  - Vermehren des stabilen Zellklons in serum- und proteinfreiem Medium vom Ausgangsklon bis zur Zellkultur,
  - Herstellen der Zellkultur, enthaltend stabile Zellen im Bioreaktor, und
  - Ernten der Proteine aus dem Kulturüberstand nach Patent Nr. 407 255,
 dadurch gekennzeichnet, dass ein serum- und proteinfreies Medium verwendet wird, das eine oder mehrere Aminosäuren enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein serum- und proteinfreies Medium verwendet wird, das synthetisches Minimalmedium, enthaltend ein Hefe- oder Sojaextrakt, umfasst.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Sojaextrakt ein gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass rekombinantes Faktor VIII-Protein oder ein rekombinantes Polypeptid mit Faktor VIII-Aktivität als rekombinantes Produkt hergestellt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass rekombinantes von Willebrand Faktor (vWF)-Protein oder ein rekombinantes Polypeptid mit Faktor vWF-Aktivität als rekombinantes Produkt hergestellt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass dem Medium gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton zugesetzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium ein Gemisch an Aminosäuren, enthaltend L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin enthält.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Cyclodextrin oder ein Derivat davon und/oder einen Proteaseinhibitor enthält.
9. Zellkultur umfassend einen isolierten, stabilen rekombinanten Zellklon, welcher erhältlich ist durch Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium, Umadaptieren der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium, Testen der Zellkultur auf stabile Produkt-Produzenten, und Klonieren eines stabilen Produkt-Produzenten-Zellklons unter serum- und proteinfreien Bedingungen, und einem serum- und proteinfreien Medium, das eine oder mehrere Aminosäuren enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan und L-Glutamin.
10. Zellkultur nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Medium, wie in den Ansprüchen 2 bis 8 definiert, umfasst.

**HIEZU 5 BLATT ZEICHNUNGEN**

FIG. 1

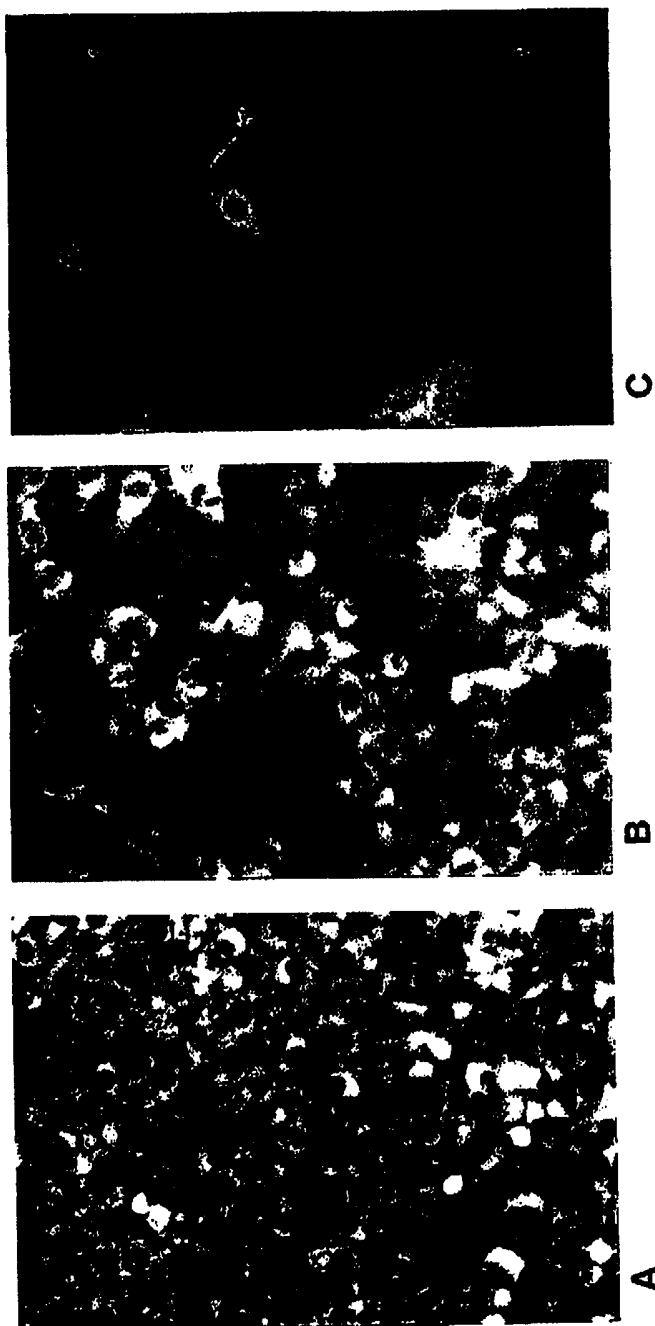
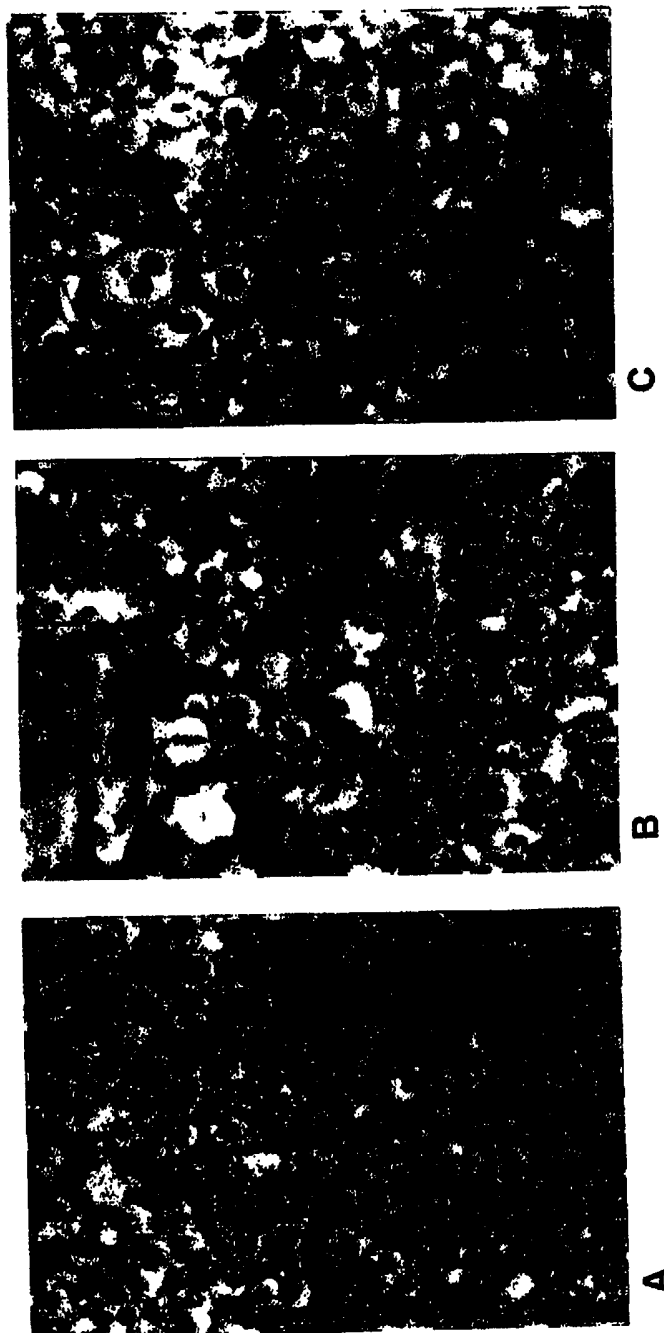


FIG. 2





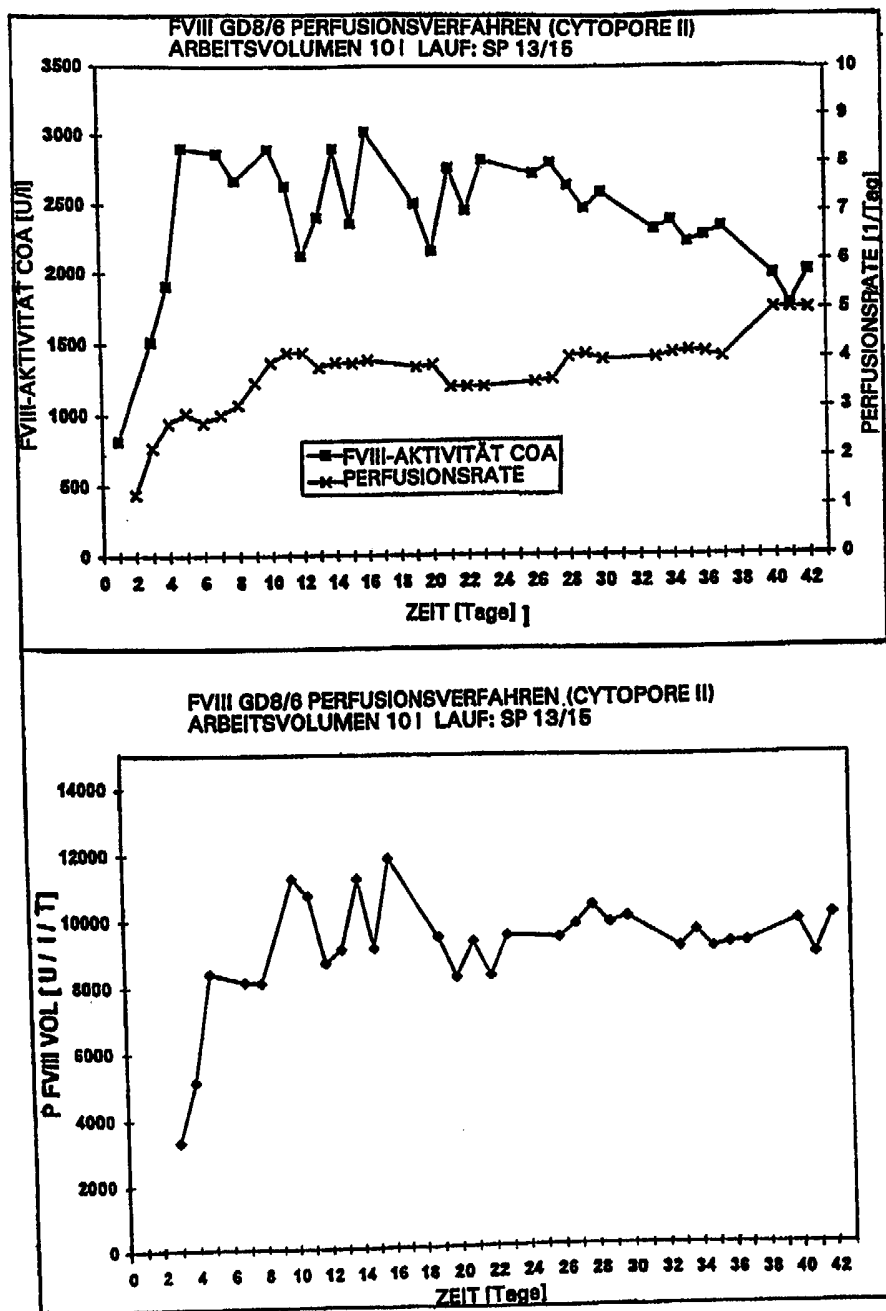


FIG. 3

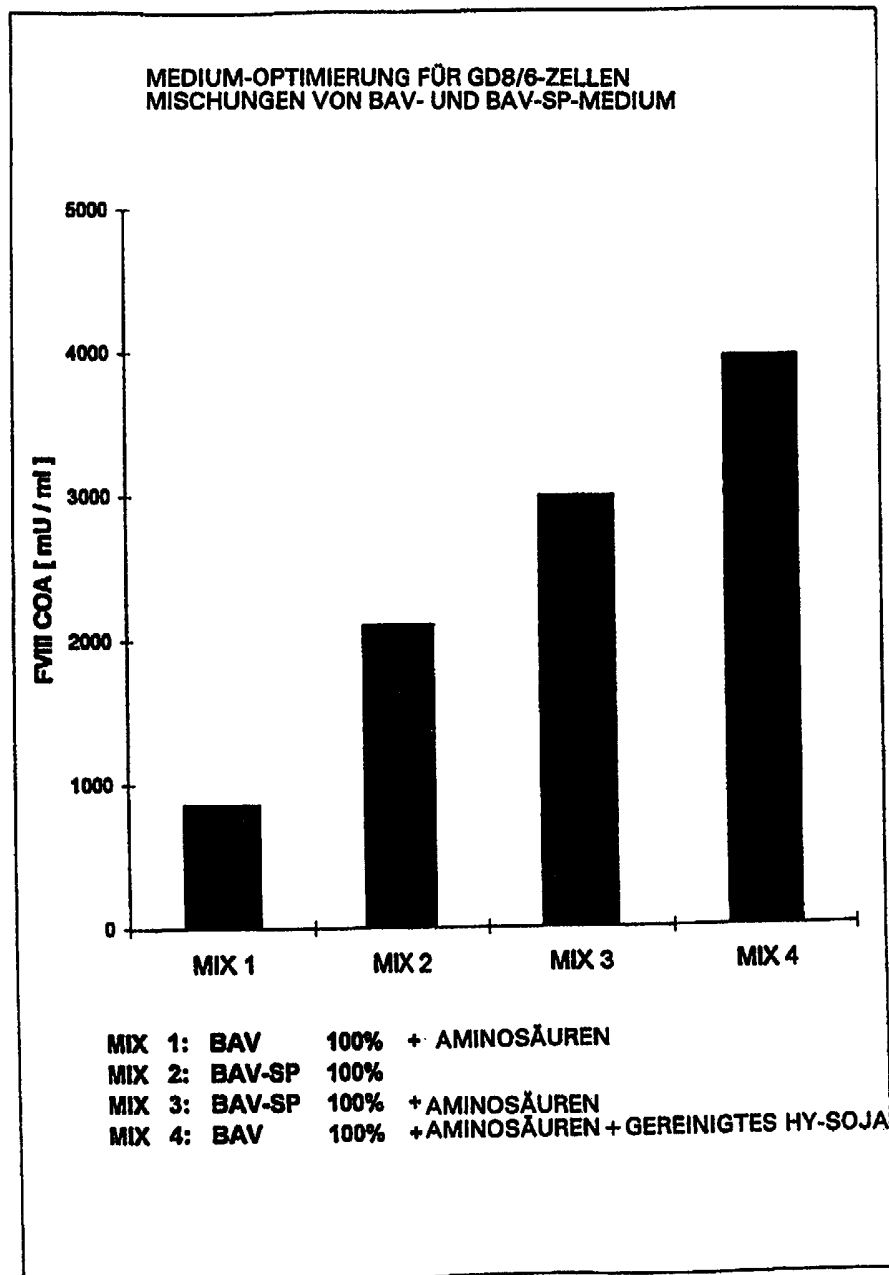


FIG. 4

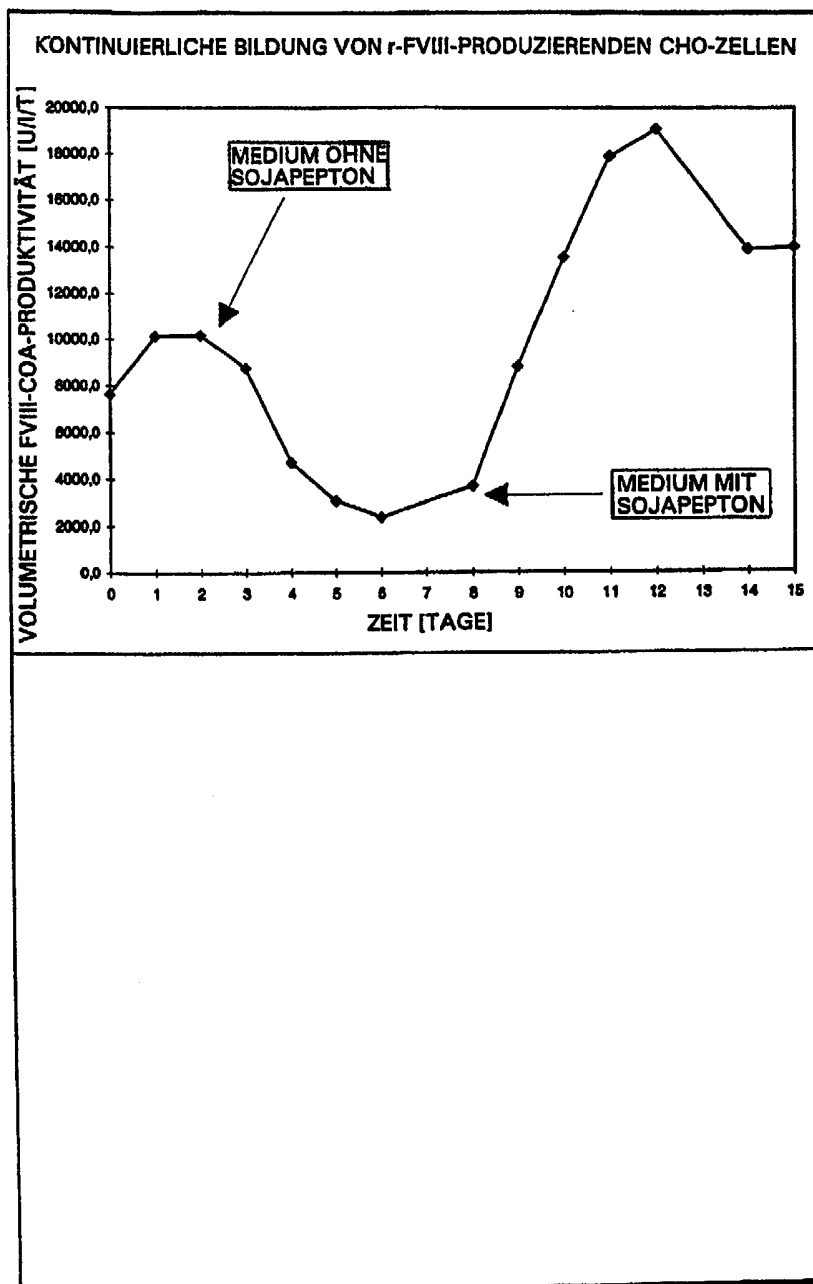


FIG. 5