



(51) МПК
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12M 47/10 (2019.08); *C12M 33/14* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2016138799, 14.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 14.04.2015

Дата регистрации:
 14.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 16.04.2014 EP 14164862.6

(43) Дата публикации заявки: 16.05.2018 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 14.01.2020 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 16.11.2016

(86) Заявка РСТ:
 EP 2015/058037 (14.04.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2015/158696 (22.10.2015)

Адрес для переписки:
 190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,
 "ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ЛАУСТСЕН Мадс (DK)

(73) Патентообладатель(и):

КМК БИОЛОГИКС А/С (DK)

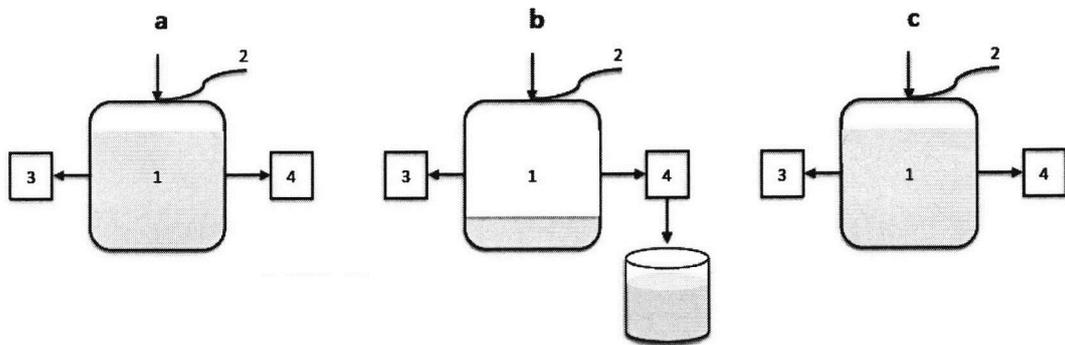
(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: EP 2014760 A1, 14.01.2009. WO 2011/
 003153 A1, 13.01.2011. WO 2010/056584 A1,
 20.05.2011. SU 1182817 A1, 10.02.2014.

(54) СПОСОБ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ С ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТЬЮ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен способ получения продукта, выбранного из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки и микроорганизма, в биореакторной системе с отъемно-доливной ферментацией. Способ включает ферментацию клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизма в культуральном сосуде. В ходе ферментации содержащую примеси среду удаляют из культурального сосуда через фильтрующий

примеси элемент, добавляют первую свежую среду для замены или частичной замены удаленной среды, удаляют определенный содержащий продукт и примеси объем среды из культурального сосуда через выход для сбора продукта и добавляют вторую свежую среду в культуральный сосуд для замены или частичной замены удаленной среды. Изобретение обеспечивает увеличение продуктивности биореактора и концентрации продукта в собранной среде. 14 з.п. ф-лы, 1 ил.



ФИГ. 1

RU 2710967 C2

RU 2710967 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12P 21/02 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12M 1/12 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12M 47/10 (2019.08); *C12M 33/14* (2019.08)

(21)(22) Application: **2016138799, 14.04.2015**

(24) Effective date for property rights:
14.04.2015

Registration date:
14.01.2020

Priority:

(30) Convention priority:
16.04.2014 EP 14164862.6

(43) Application published: **16.05.2018 Bull. № 14**

(45) Date of publication: **14.01.2020 Bull. № 2**

(85) Commencement of national phase: **16.11.2016**

(86) PCT application:
EP 2015/058037 (14.04.2015)

(87) PCT publication:
WO 2015/158696 (22.10.2015)

Mail address:
**190000, Sankt-Peterburg, BOX-1125,
"PATENTIKA"**

(72) Inventor(s):
LAUSTSEN Mads (DK)

(73) Proprietor(s):
KMK BIOLOGIKS A/S (DK)

(54) METHOD FOR DETACHABLE-TOPPING FERMENTATION WITH HIGH CELL DENSITY

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology. Disclosed is a method of producing a product selected from a biopolymer expressed by a cell, a cell and a microorganism in a bioreactor system with detachable-top fermentation. Method involves fermentation of cells expressing a biopolymer, cells or microorganism in a culture vessel. During fermentation, the impurity-containing medium is removed from the culture vessel through the filtering impurity element, adding a first fresh medium for replacement or partial

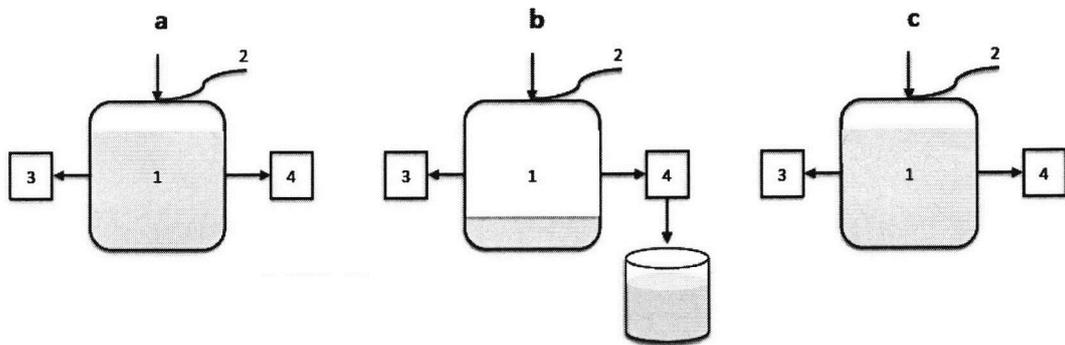
replacement of the removed medium, certain volume of medium containing a product and admixtures is removed from the culture vessel through the product collection outlet and a second fresh medium is added to the culture vessel for replacement or partial replacement of the removed medium.

EFFECT: invention ensures increase in the bioreactor productivity and concentration of the product in the collected medium.

15 cl, 1 dwg

RU 2 710 967 C2

RU 2 710 967 C2



ФИГ. 1

RU 2710967 C2

RU 2710967 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу отъемно-доливной ферментации с высокой плотностью клеток. Способы согласно настоящему изобретению подходят для приготовления посевных культур с высокой плотностью клеток и для применения в способе производства для получения полипептида, в частности, для получения активных фармацевтических субстанций для лекарственного средства.

Уровень техники

Традиционно клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих, например, для получения белка культивируют как первичную культуру в виде суспензионных культур в биореакторах, также называемых ферментерами. В подобных биореакторах можно точно контролировать условия внутренней среды посредством регулирования поступления питательных веществ к клеткам и удаления примесей, и средства для перемешивания могут перемешивать культуральную среду в реакторе для обеспечения однородного распределения клеток.

Биореактор может работать как замкнутая система при периодическом или периодическом с подпиткой процессе или как непрерывная система в случае так называемого хемостата или при перфузионном процессе.

При периодическом режиме работы культуральная среда обычно содержит среду с необходимыми питательными веществами, например, глюкозой, витаминами, аминокислотами и минералами. В процессе ферментации эти вещества поглощаются, так что среда становится все более и более обедненной питательными веществами. В то же время концентрация примесей возрастает, что в конечном итоге приводит к ингибированию роста клеток. При периодическом процессе с подпиткой один или более питательных веществ подают (добавляют) в биореактор в процессе культивирования для достижения лучших условий роста и более высоких плотностей клеток. При повторяющихся периодических процессах клетки, оставленные в сосуде после сбора, можно использовать в качестве инокулята для следующей партии.

В непрерывной системе, такой как хемостат, постоянно добавляют свежую среду, тогда как среду, содержащую продукт, клетки и примеси, постоянно удаляют для сохранения постоянного объема культуры. Изменяя скорость, с которой добавляют среду в биореактор, можно контролировать скорость роста микроорганизма или клеток. Для клеток с высокой скоростью роста, таких как дрожжи и бактериальные клетки, в хемостате, как правило, удаляют клетки из среды вместе с культуральной жидкостью для того, чтобы поддерживать требуемую плотность клеток.

Перфузионный процесс представляет собой особый тип непрерывного процесса, при котором суспензионную культуру клеток непрерывно снабжают свежей средой, добавляя ее в биореактор, в то время как истощенную культуральную среду непрерывно собирают. Клетки непрерывно фильтруют или отделяют иным способом от собираемого потока и возвращают в биореактор для поддержания единой плотности клеток.

Постоянное добавление свежей среды и удаление примесей обеспечивает клетки оптимальной средой для достижения высоких концентраций клеток и тем самым высокой продуктивности. Это позволяет удлинять время жизни здоровых культур, потенциально при высокой плотности клеток, а также обеспечивает короткое время пребывания продукта в биореакторе. Это является более выгодным для качества продукта и необходимо для получения нестабильных полипептидов. Другим преимуществом перфузионного режима является то, что он позволяет использовать биореакторы меньшего размера по сравнению с периодическими процессами с подпиткой, что обеспечивает преимущества, такие как сокращенное время операции по очистке на

месте и возможность использования одноразовых биореакторов вместо реакторов из нержавеющей стали по причине меньших рабочих объемов. Более того, продукт можно непрерывно собирать посредством удаления среды (с продуктом, клетками и примесями) или через так называемый слив.

5 Отъемно-доливной процесс очень напоминает повторяющуюся периодическую ферментацию. При периодической ферментации клетки выращивают в культуральном сосуде и среду собирают в конце рабочего цикла. При отъемно-доливном процессе осуществляют сбор из культурального сосуда до того, как какое-нибудь из питательных веществ истощится. Вместо удаления всего содержимого из сосуда удаляют только
10 часть объема резервуара (как правило, 30-80% объема резервуара). После сбора добавляют приблизительно тот же самый объем свежей среды обратно в сосуд. Затем позволяют клеткам снова расти в сосуде и осуществляют другой 30-80% сбор через установленное число часов или дней.

Процесс можно проводить в две фазы, причем первую фазу проводят идентично
15 простому периодическому процессу культивирования. После первого сбора культуральный сосуд снова работает как при простом периодическом процессе; однако время культивирования партии короче, чем у первой партии, по причине более высокой исходной плотности клеток. Эти короткие «повторяющиеся фазы периодического культивирования» можно продолжать неограниченное количество раз. Культуральный
20 сосуд может работать в пределах широкого диапазона количества циклов и широкого диапазона отъемно-доливных объемов. Европейский патент EP 2451963 описывает подобные отъемно-доливные процессы для получения витамин К зависимых белков. Однако EP 2451963 не раскрывает отъемно-доливные процессы с использованием специальных биореакторов, оборудованных фильтрующими примеси элементами или
25 специализированными модулями для сбора продукта.

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение потребности в улучшенном и более эффективном применении и управлении отъемно-доливными процессами культивирования клеток в крупномасштабных биореакторных системах.

Раскрытие сущности изобретения

30 Задача, решаемая настоящим изобретением, состоит в обеспечении способа отъемно-доливной ферментации с высокой плотностью клеток для улучшения плотностей клеток и тем самым увеличения продуктивности биореактора и концентрации продукта в собранной среде, где выход продукта (например, посевной культуры или полипептида) может быть улучшен в связи с, например, оптимизированными условиями для роста
35 клеток.

Решение основано на том, что автор настоящего изобретения обнаружил, что, имея биореактор с фильтрующим примеси элементом, который позволяет удалять из культурального сосуда примеси с молекулярной массой (ММ) ниже ММ продукта, вместе с тем оставляя продукт внутри культурального сосуда, в то время как свежую
40 среду добавляют через вход культурального сосуда для замены или частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент, и что культивируя клетки в культуральном сосуде до высоких плотностей клеток, а затем осуществляя повторяющийся отъемно-доливной процесс ферментации, можно получить повышенную плотность клеток в биореакторе в ходе ферментативного процесса и, в частности,
45 можно получить значительно более высокую концентрацию представляющего интерес продукта в собранной среде и тем самым получить экономические показатели производства, которые превосходят экономические показатели производства сопоставимых ферментативных процессов в биореакторах, не имеющих фильтрующего

примеси элемента.

Один аспект настоящего изобретения относится к способу получения продукта, выбранного из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки и микроорганизма, в биореакторной системе, при этом биореакторная система включает:

5 культуральный сосуд (1), включающий клетки в подходящей культуральной среде; вход культурального сосуда (2) для обеспечения поступления среды в культуральный сосуд (1);

10 фильтрующий примеси элемент (3), который позволяет удалять из культурального сосуда (1) примеси с молекулярной массой (ММ) ниже ММ продукта, вместе с тем оставляя продукт внутри культурального сосуда (1), и при этом фильтрующий примеси элемент (3) находится в жидкостном соединении с культуральной средой внутри культурального сосуда (1); и

выход для сбора продукта (4), который позволяет удалять среду, содержащую продукт и примеси, из культурального сосуда (1);

15 при этом указанный способ включает следующие этапы:

(а) осуществление ферментации указанных клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизма в культуральном сосуде (1) в подходящей культуральной среде в подходящих условиях и в течение достаточного времени, пока клетки, экспрессирующие биополимер, не достигнут определенной плотности клеток или биополимер не достигнет определенной концентрации, пока клетки не достигнут определенной плотности клеток или пока микроорганизм не достигнет определенной плотности микроорганизма, при этом в ходе ферментации среду, содержащую примеси, удаляют через фильтрующий примеси элемент (3), и первую свежую среду добавляют через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3);

(b) удаление определенного объема среды, содержащей продукт и примеси, из культурального сосуда (1) через выход для сбора продукта (4), и

30 (с) добавление второй свежей среды в культуральный сосуд (1) через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через выход для сбора продукта (4) на этапе (b); и

(d) необязательно, в ходе этапа (b), в ходе этапа (с) или в ходе обоих этапов (b) и (с) удаление среды, содержащей примеси, через фильтрующий примеси элемент (3) и добавление третьей свежей среды через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3);

35 (е) необязательно повторение этапов (b) и (с),

(f) необязательно повторение этапа (d), и

(g) необязательно, очистка продукта из определенного объема среды, содержащей продукт, выбранный из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки или микроорганизма, и примеси.

40 Дополнительные цели настоящего изобретения станут очевидными в свете настоящего описания, фигур и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

45 Фигура 1 представляет собой схематическое изображение способа получения продукта в биореакторной системе согласно настоящему изобретению. На фигуре 1a показан культуральный сосуд в режиме наращивания. На фигуре 1b среда, содержащая продукт и примеси, удалена. На фигуре 1с новая свежая среда добавлена в культуральный сосуд для замены потребленных питательных веществ и удаленной среды.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Перед обсуждением подробных вариантов реализации настоящего изобретения предложено определение специфических терминов, относящихся к главным аспектам и вариантам реализации настоящего изобретения. Всем терминам дано определение в соответствии с обычным пониманием данных терминов специалистом в данной области техники.

Используемый в настоящей заявке термин «биополимер» относится к полипептиду, белку или вирусной частице, которая может быть нативной или биологически или искусственно модифицирована и включать фрагменты, мультимеры, агрегаты, конъюгаты, гибридные продукты и т.д.

Используемый в настоящей заявке термин «клетка» охватывает как прокариотические, так и эукариотические клетки.

Используемый в настоящей заявке термин «микроорганизм» предназначен охватывать всех прокариотов, а именно бактерий и архей; и различные формы эукариот, включающие простейших, грибы, водоросли, микроскопические растения (зеленые водоросли) и животных, таких как коловратки, планарии, а также вирусы.

Используемый в настоящей заявке термин «биореактор» относится к любому устройству или системе, которая поддерживает биологически активную внутреннюю среду. В одном из случаев, но не ограничиваясь только им, биореактор представляет собой сосуд, в котором протекает химический процесс, в котором участвуют организмы или биологически активные субстанции, полученные от подобных организмов. Этот процесс может быть как аэробным, так и анаэробным. Биореакторы обычно являются цилиндрическими, колеблясь по размеру от нескольких литров до кубических метров, и часто выполнены из нержавеющей стали, но могут быть также сделаны из других материалов, таких как материалы для одноразового применения.

Термин «биореактор» также может относиться к устройству или системе, предназначенной для выращивания клеток или тканей в контексте культуры клеток. В зависимости от режима работы биореакторы можно подразделить на биореакторы периодического, периодического с подпиткой или непрерывного действия (например, модель реактора непрерывного действия с перемешиванием). Примером биореактора является перфузионная система. Биореактор может быть оборудован одним или несколькими входами для добавления новой свежей или концентрированной среды к клеткам и одним или несколькими выходами для сбора продукта или опорожнения реактора. Дополнительно, биореактор может быть оборудован по меньшей мере одним выходом, сконструированным таким образом, чтобы можно было присоединить к биореактору устройство для разделения. Как правило, можно осуществлять точный мониторинг и контроль условий внутренней среды в биореакторе, таких как скорости потока газа (то есть воздуха, кислорода, азота, диоксида углерода), температура, рН и уровни растворенного кислорода и скорость перемешивания/скорость циркуляции.

Используемый в настоящей заявке термин «примеси» относится к нежелательным химическим или биологическим соединениям, продуцируемым клетками или микроорганизмами, присутствующими в биореакторе, или которые появляются в результате гибели или повреждения оболочки клеток или микроорганизмов в ходе процесса ферментации. Примеси могут включать, например, этанол, бутанол, молочную кислоту, смесь ацетона и этанола, газообразные соединения, пептиды, липиды, аммиак, ароматические соединения, и фрагменты ДНК и РНК, а также компоненты культуральной среды или продукты деструкции биополимера.

Используемый в настоящей заявке термин «вход» предназначен охватывать любые средства, что позволяют вводить текучую среду, такую как культуральная среда, буфер

или вода, в культуральный сосуд, контейнер, резервуар или модуль, и представляет собой отверстие, которое, как правило, оснащено переходником, к которому можно присоединить, например, трубку или кран.

Используемый в настоящей заявке термин «выход», предназначен охватывать любые средства, что позволяют текучей среде, такой как культуральная среда, буфер или вода, покидать культуральный сосуд, контейнер, резервуар или модуль, и представляет собой отверстие, которое, как правило, оснащено переходником, к которому можно присоединить, например, трубку или кран.

Термин «текучая среда», используемый в настоящей заявке, предназначен определять любое вещество, которое течет, и, следовательно, включает жидкости и газы, способные течь. Используемый в настоящей заявке термин «находиться в жидкостном соединении» означает, что текучая среда, такая как жидкость, например, культуральная среда или буфер, может протекать между контейнером, резервуаром или модулем (например, фильтрующим примеси элементом) и другим контейнером, резервуаром, сосудом или модулем (например, культуральным сосудом). Жидкостное соединение может быть прервано одним или несколькими кранами и/или удерживающими контейнерами, так что поток текучей среды через жидкостное соединение можно запустить и остановить тогда, когда необходимо.

Используемый в настоящей заявке термин «среда» относится к культуральной среде. Многочисленные культуральные среды известны и доступны коммерчески. Подобные среды, как правило, имеют состав, который адаптирован для культивирования определенных типов клеток и может включать соли, аминокислоты, витамины, липиды, поверхностно-активные вещества, буферы, факторы роста, гормоны, цитокины, следовые элементы и углеводы.

Используемые в настоящей заявке термины «ферментация», «осуществление ферментации клеток» и «культивирование» относятся в широком смысле к массовому выращиванию клеток и микроорганизмов в или на среде для роста. Используемые в настоящей заявке «ферментация», «осуществление ферментации клеток» и «культивирование» можно использовать взаимозаменяемо и представляют собой процесс, посредством которого выращивают клетки в контролируемых условиях, главным образом вне их естественной среды.

Подробное описание изобретения

Автор настоящего изобретения обнаружил, что используя биореакторную систему, оборудованную фильтрующим примеси элементом, позволяющим удалять из культурального сосуда примеси с размером ниже размера продукта и среду, в то время как новую среду добавляют в культуральный сосуд для замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент в ходе отъемно-доливного процесса ферментации, можно получить значительно более высокие концентрации представляющего интерес продукта в собранной среде, а также увеличенную продуктивность на литр потраченной среды. Этот способ также может называться в настоящей заявке способом отъемно-доливной ферментации с высокой плотностью клеток.

Продукт

Используемый в настоящей заявке термин «продукт» относится к биополимеру, экспрессируемому клеткой, к клетке и к микроорганизму.

Термин «биополимер» относится к полипептиду, белку или вирусной частице, которая может быть нативной или биологически или искусственно модифицированной, включая фрагменты, мультимеры, агрегаты, конъюгаты, гибридные продукты и т.д. В одном из вариантов реализации биополимер представляет собой полипептид, такой как

рекомбинантный белок. Используемые в настоящей заявке термины «белок» и «полипептид» можно использовать взаимозаменяемо и относятся к цепи аминокислот длиннее, чем примерно 30 аминокислотных остатков. Белки могут существовать в виде мономеров или мультимеров, включающих две или более собранных в комплекс единицы полипептидных цепей, фрагментов белков, полипептидов, олигопептидов или пептидов.

Примеры представляющих интерес полипептидов, которые можно получить с использованием способов согласно настоящему изобретению, включают рекомбинантные терапевтические белки, такие как антитела или их фрагменты, факторы свертывания крови, цитокины, ферменты, пептидные гормоны и т.д. Конкретные примеры подобных белков включают гормон роста человека, фолликулостимулирующий гормон, фактор VIII, фактор VII, фактор IX, эритропоэтин (ЭПО), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), альфа-галактозидазу А, α -L-идуронидазу (рекомбинантная α -L-идуронидаза человека (rhIDU); ларонидаза), N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу (рекомбинантная N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза человека (rhASB); галсульфаза), ДНКазу, тканевой активатор плазминогена (ТРА), глюкоцереброзидазу, интерфероны (ИФ), такие как интерферон- α , интерферон- β и интерферона- γ , инсулин, производные инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1, IGF-1), тенектеплазу, антигемофильный фактор, фактор свертывания крови человека и этанерцепт; и антитела, такие как трастузумаб, инфликсимаб, базиликсимаб, белимумаб, даклизумаб, адалимумаб, абциксимаб, афутузумаб, алемтузумаб, цетуксимаб, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эдреколомаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, меполизумаб, мотавизумаб, натализумаб, офатумумаб, омализумаб, ореговомаб, паливизумаб, пемтумомаб, пертузумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тефибазумаб и занолимумаб.

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения биополимер представляет собой рекомбинантный белок, такой как гормон роста человека, фолликулостимулирующий гормон, фактор VIII, фактор VII, фактор IX, эритропоэтин (ЭПО), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), интерферон (ИФ), инсулин, производное инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1.

В еще одном дополнительном варианте реализации настоящего изобретения биополимер представляет собой антитело или его фрагмент, где фрагмент может быть, например, Fab-фрагментом, Fv-фрагментом или одноцепочечным Fv (scFv)-фрагментом, фактор свертывания крови, цитокин, фермент или пептидный гормон.

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения продукт представляет собой фактор свертывания крови, такой как фактор свертывания крови VIIa.

Полипептиды, как правило, экспрессируют в клетках млекопитающих под контролем регуляторных последовательностей, называемых промоторными последовательностями. Клетки, экспрессирующие полипептид, могут находиться под контролем конститутивного промотора (то есть нерегуляторных последовательностей; это позволяет осуществлять непрерывную транскрипцию ассоциированного гена) или под контролем индуцируемого промотора (регуляторные последовательности, индуцируемые наличием или отсутствием биотических или абиотических факторов). Примером конститутивного промотора является промотор EF-1 α китайского хомячка. В одном из вариантов реализации биополимер экспрессируют под контролем регуляторных последовательностей EF-1 α китайского хомячка.

Применяя конструкцию биореактора и способ согласно настоящему изобретению, возможно осуществлять экспрессию полипептидов с высокой продуктивностью. Таким

образом, в одном из вариантов реализации клетки экспрессируют полипептид, например, антитело, и имеют продуктивность, составляющую по меньшей мере 1 грамм/л/день и предпочтительно выше, например, 2 или 3 грамм/л/день или более.

5 Выделенный представляющий интерес продукт (например, полипептид), полученный с применением системы и способа согласно настоящему изобретению, можно очистить с помощью способов, известных в данной области техники для заданного продукта, включить в состав конечной коммерчески значимой композиции (например, фармацевтической композиции), представляющей интерес, и упаковать в подходящий контейнер.

10 Используемый в настоящей заявке «продукт» может также представлять собой клетку. Клетка является основной структурной и функциональной единицей всех известных живых организмов. Существует два типа клеток: эукариотическая клетка и прокариотическая клетка. Прокариотические клетки обычно независимы, тогда как эукариотические клетки могут существовать как в виде одноклеточных организмов, так и входить в состав многоклеточных организмов. Прокариотическая клетка устроена проще и, следовательно, меньше по размерам, чем эукариотическая клетка, она не обладает ядром и большинством других органелл эукариотов. Существует два вида прокариот: бактерии и археи; у них похожая структура. Растения, животные, грибы, 15 слизевики, простейшие и водоросли, все они являются эукариотами. Главная разница между прокариотами и эукариотами состоит в том, что эукариотические клетки содержат мембраносвязанные компартменты, в которых протекают специфические метаболические активности. Самым главным среди них является клеточное ядро, ограниченный мембраной компартмент, который вмещает ДНК эукариотической клетки.

25 В одном из вариантов реализации продукт выбирают из клетки, такой как клетка млекопитающего.

В дополнительном варианте реализации клетка, экспрессирующая биополимер, представляет собой по меньшей мере одну клетку, выбранную из группы, состоящей из *E. coli*, бактерий рода *Bacillus*, дрожжей рода *Saccharomyces*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Fusarium* 30 или *Kluyveromyces*, клеток СНО (клеток яичника китайского хомячка), гибридом, клеток ВНК (клеток почки новорожденного хомячка), миеломных клеток, клеток НЕК-293, клеток PER.C6[®], амниоцитов, включая амниоциты человека, такие как линии клеток CAP[®] и CAP-T[®], лимфобластных клеток человека и клеток мыши, таких как клетки NS0.

35 В еще одном дополнительном варианте реализации клетки, экспрессирующие биополимер, выбирают из клеток млекопитающих, таких как клетки СНО, NS0, PER.C6[®], ВНК или НЕК.

Используемый в настоящей заявке термин «микроорганизм» включает всех прокариотов, а именно бактерий и архей; и различные формы эукариот, включающие простейшие, грибы, водоросли, микроскопические растения (зеленые водоросли) и животных, таких как коловратки, планарии, а также вирусы. В одном из вариантов реализации настоящего изобретения микроорганизм выбирают из гриба, дрожжей, гриба рода *Humicola*, сахаромецета, аспергиллы, бациллы, лактобактерии.

45 Используемый в настоящей заявке «продукт» может представлять собой вирус. Вирус является мелким инфекционным агентом, который реплицируется только внутри живых клеток организма. Вирусы могут инфицировать все виды организмов, начиная от животных и растений до бактерий и архей. Популяции вирусов не растут за счет деления клеток, потому что они бесклеточные. Вместо этого, они используют механизмы

и метаболизм клетки-хозяина для получения множества копий самих себя, и они собираются внутри клетки. Вакцинация может быть эффективным способом предотвращения инфекций, вызываемых вирусами. Вакцины могут состоять из живых аттенуированных или убитых вирусов или из вирусных белков (антигенов). Живые вакцины содержат ослабленные формы вируса, которые не вызывают заболевания, но, тем не менее, обеспечивают иммунитет. Подобные вирусы называются аттенуированными. Биотехнологию и приемы генной инженерии используют для получения субъединичных вакцин. В данных вакцинах используют только капсидные белки вируса. Вакцина против гепатита В является примером такого типа вакцины. В одном варианте реализации настоящего изобретения продукт представляет собой вирус или часть вируса.

Биореактор

Используемый в настоящей заявке термин «биореактор» относится к любому устройству или системе, которая поддерживает биологически активную внутреннюю среду, например, для культивирования клеток для получения биологического продукта. Биореакторы могут варьироваться по размеру от нескольких литров до нескольких кубических метров (то есть нескольких 1000 литров) и могут представлять собой традиционный биореактор на основе культурального сосуда из, например, нержавеющей стали или стекла, или «одноразовый» биореактор на основе материала для одноразового использования, такого как одноразовый мешок.

В то время как в прошлом биореакторы, как правило, были традиционного типа чаще всего на основе резервуаров из нержавеющей стали, одноразовые биореакторы на основе одноразовых мешков, как правило, сделанных из многослойного пластикового материала, становятся все более распространенными. Для перемешивания в некоторых одноразовых биореакторах используют мешалки, схожие с мешалками биореакторов традиционного типа, но при этом мешалки, встроены в пластиковый мешок, в то время как другие одноразовые биореакторы перемешивают с помощью качательного движения. Одноразовые биореакторы с мешалками могут иметь объем до нескольких тысяч литров, например, от 2000 до 5000 литров, тогда как одноразовые биореакторы, перемешиваемые с помощью качания, как правило, имеют объем до примерно 1000 литров.

Одноразовые биореакторы имеют несколько преимуществ по сравнению с биореакторами традиционного типа, включающими сниженные требования к чистке и стерилизации вместе со значительной сопутствующей экономией затрат. Дополнительно, могут быть упрощены сложные процедуры квалификации и валидации для фармацевтического производства, и существует сниженный риск перекрестной контаминации. Кроме того, поскольку одноразовые биореакторы содержат меньше частей по сравнению с биореакторами традиционного типа, начальные и эксплуатационные затраты снижены.

В зависимости от режима работы биореактор можно отнести к биореактору периодического, периодического с подпиткой или непрерывного действия. Примерами биореакторов непрерывного действия являются хемостат и перфузионный биореактор. Биореактор, как правило, оборудован одним или несколькими входами для добавления культуральной среды к клеткам и одним или несколькими выходами для сбора продукта или опорожнения биореактора. Дополнительно, биореактор может быть оборудован по меньшей мере одним выходом, сконструированным таким образом, чтобы можно было присоединить к биореактору фильтрующий примеси элемент. Как правило, можно осуществлять точный мониторинг и контроль условий внутренней среды в биореакторе,

таких как скорости потока газа (то есть воздуха, кислорода, азота, диоксида углерода), температура, рН и уровни растворенного кислорода и скорость перемешивания/скорость циркуляции.

Биореактор необязательно также может включать отдельный вход для добавления 5 компонентов, таких как витамины или факторы роста. В этом случае подобные компоненты можно добавлять к культуральному сосуду в дополнении к среде, и они могут быть либо в концентрированном, либо в разбавленном виде.

Культуральный сосуд

Термин «культуральный сосуд», используемый в настоящей заявке, относится к 10 неотъемлемой части биореакторной системы, в которой выращивают клетки в подходящих условиях на подходящей культуральной среде. Культуральный сосуд может быть одноразовым сосудом, например, одноразовым мешком, или традиционным сосудом многоразового использования, как правило, сосудом из нержавеющей стали или стекла, как объяснено выше. Сосуды из нержавеющей стали, как правило, оснащены 15 встроенными блоками портов, тогда как в одноразовых мешках используют предварительно стерилизованные пластиковые камеры для культивации, которые выбрасывают после использования. Это устраняет необходимость в крупногабаритных и дорогих установках для очистки на месте (clean-in-place, CIP) и обработки паром на месте (steam-in-place, SIP), вместе с тем снижая время производственного цикла.

Культуральный сосуд согласно настоящему изобретению, как правило, имеет объем 20 по меньшей мере 50 литров, предпочтительно по меньшей мере 100 л, более предпочтительно по меньшей мере 250 л и еще более предпочтительно по меньшей мере 500 л. Во многих случаях объем будет еще выше, например, по меньшей мере 1000 л или по меньшей мере 2000 л.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения способ включает 25 осуществление ферментации клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизмов в культуральном сосуде (1) в по меньшей мере 50 л, например, в по меньшей мере 75 л, например, в по меньшей мере 100 л, например, в по меньшей мере 200 л, например, в по меньшей мере 300 л, например, в по меньшей мере 500 л 30 подходящей культуральной среды.

Фильтрующий примеси элемент

Были разработаны многочисленные специализированные фильтры и способы 35 фильтрации для разделения материалов в соответствии с их химическими и физическими свойствами. Известные фильтры включают фильтры с плоской фильтрующей поверхностью, гофрированные фильтры, многосекционные кассеты и трубчатые формы, такие как полое волокно. Для изобретения, описываемого в настоящей заявке, можно применять любую систему с технологией ультрафильтрации при условии, что можно обеспечить стерильность.

Примерами систем фильтрации, пригодных для применения при получении 40 полипептидов и удалении примесей, как описано в настоящей заявке, являются системы, такие как картриджные системы, системы из плит и рам и половолоконные системы. Система может работать путем прокачки жидкости через мембрану, вибрации (например, как поставляется PallSep™) или изменения тангенциального потока (ATF), и как полимерные, так и керамические мембраны хорошо подходят для процесса фильтрации. 45 Специалист в данной области техники сможет выбрать мембрану с подходящими свойствами.

Половолоконные мембраны успешно применяют в ряде различных отраслей, и имеют несколько преимуществ, которые включают высокую плотность упаковки

5 мембраны, способность выдерживать противодействие пермеата, таким образом обеспечивая гибкость при разработке системы и ее работе. Половолоконные картриджи могут работать в направлении изнутри наружу в ходе фильтрации, позволяя технологической текучей среде (ретентату) течь через центр полого волокна и позволяя
10 проходить через стенку волокна за пределы мембранного волокна. Тангенциальный поток может помочь ограничить загрязнение мембран. Другие приемы работы, которые можно применять с половолоконными мембранными системами, включают обратную промывку пермеатом и обратный поток ретентата.

Соответственно, фильтрующий примеси элемент можно расположить во внешнем
10 фильтрующем модуле, прикрепленном к биореактору. Альтернативно, фильтр для примесей можно расположить внутри биореактора. Фильтрующий элемент также может содержать насосы и системы для предотвращения загрязнения фильтра, такие как система ATF или система PallSep™, в которой контролируемое колебание в горизонтальной плоскости двигает мембранные элементы сквозь подаваемую текучую
15 среду. Колебание создает колебательную энергию на поверхности мембраны, давая сдвиг (выше, чем обычно создаваемый в традиционных фильтрующих системах с тангенциальным потоком), который ограничен до небольшого пограничного слоя над поверхностью мембраны и который не прикладывается к общей массе текучей среды. Это гарантирует, что даже в случае поступающих потоков с высоким содержанием
20 твердых частиц мембраны не покроются задержанными частицами.

В одном из вариантов реализации фильтрующий примеси элемент выбирают из мембранного фильтра, установки для гравитационного разделения и установки для разделения центрифугированием.

Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящий тип фильтра
25 для удаления примесей и размер пор мембраны с подходящим номинальным отсечением по молекулярной массе (НОММ) с учетом обеспечения возможности примесей перфузировать наружу из фильтра для примесей и осуществлять сбор представляющего интерес полипептида через выход для сбора продукта.

Фильтр для примесей часто выбирают с НОММ в диапазоне от 1000 до 30000 (1-30
30 кДа), например, в диапазоне от 2000 до 20000 (2-20 кДа) или в диапазоне от 2000 до 15000 (2-15 кДа). Однако если продукт представляет собой клетку фильтр для примесей можно выбрать с НОММ в диапазоне от 1000 до 500000 (1-500 кДа), но обычно предпочтительно, чтобы фильтр для примесей имел отсечение, составляющее менее 20000 (20 кДа). Таким образом, в одном из вариантов реализации фильтрующий примеси
35 элемент представляет собой мембранный фильтр, имеющий размер пор с НОММ по меньшей мере 1000, например, в пределах диапазона от 2000 до 15000.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения фильтр для примесей имеет размер пор с максимумом номинального отсечения по молекулярной массе (НОММ), составляющим по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 20%,
40 например, по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50% от молекулярной массы биополимера.

В другом варианте реализации фильтр для примесей представляет собой мембранный
45 фильтр, имеющий размер пор с максимумом номинального отсечения по молекулярной массе (НОММ), составляющим 80% от молекулярной массы (ММ) представляющего интерес продукта (например, полипептида). Например, если ММ представляющего интерес полипептида составляет 100000 (100 кДа), предпочтительный максимум отсечения фильтра для примесей в этом случае будет составлять 80000 (80 кДа). Более предпочтительно, чтобы фильтр для примесей имел размер пор с максимумом НОММ,

составляющим 50% от ММ представляющего интерес полипептида. Таким образом, в одном из вариантов реализации фильтр для примесей имеет размер пор с максимумом номинального отсечения по молекулярной массе (НОММ), составляющим 80% от ММ биополимера, например, с максимумом, составляющим 50%.

5 В ходе удлиненного рабочего цикла можно заменять фильтры и повторно стерилизовать систему, не останавливая ферментацию.

Выход для сбора продукта

В одном из вариантов реализации выход для сбора продукта представляет собой в самом простом виде просто выход, ведущий к контейнеру или мешку, подходящему для сбора продукта вместе с примесями и культуральной средой для хранения или 10 дополнительной последующей обработки. Выход для сбора продукта также может находиться в жидкостном соединении с устройством для разделения, способным, например, отделять биополимер от клеток, клеточного дебриса и примесей крупнее биополимера.

15 Когда клетки, присутствующие в биореакторе, достигают удовлетворительной плотности клеток или когда присутствует достаточное количество продукта в потоке, выходящем через выход для сбора продукта, можно начинать сбор продукта. Это можно определить путем измерения плотности клеток, например, используя спектрофотометр или измеряя количество представляющего интерес продукта 20 известными средствами, например, с использованием подходящего способа количественного определения белка в случае полипептидного продукта.

Культуральная среда

Используемый в настоящей заявке термин «среда» главным образом относится к культуральной среде. Многочисленные культуральные среды известны и доступны 25 коммерчески. Подобные среды, как правило, имеют состав, который адаптирован для культивирования определенных типов клеток и могут содержать соли, аминокислоты, витамины, липиды, поверхностно-активные вещества, буферы, факторы роста, гормоны, цитокины, следовые элементы и углеводы. Примеры солей включают соли магния, например, $MgCl_2 \times 6H_2O$, и соли железа, например, $FeSO_4 \times 7H_2O$, соли калия, например, 30 KH_2PO_4 , KCl , соли натрия, например, NaH_2PO_4 или Na_2HPO_4 , и соли кальция, например, $CaCl_2 \times 2H_2O$. Примерами аминокислот являются 20 встречающихся в природе аминокислот, например, гистидин, глутамин, треонин, серин, метионин. Примеры витаминов включают аскорбат, биотин, холин, мио-инозитол, D-пантотенат и 35 рибофлавин. Примеры липидов включают жирные кислоты, например, линолевая кислота и олеиновая кислота. Примеры поверхностно-активных веществ включают Твин® 80 и Плуроник® F68. Примером буфера является ГЭПЭС (HEPES). Примеры факторов роста/гормонов/цитокинов включают инсулиноподобный фактор роста (ИФР, IGF), гидрокортизон и (рекомбинантный) инсулин. Примеры следовых элементов 40 включают Zn, Mg и Se. Примеры углеводов включают глюкозу, фруктозу, галактозу и пируват. Примерами других компонентов, которые могут быть включены в культуральную среду, являются соевый пептон и этаноламин. Специалисту в данной области техники знакомы подходящие культуральные среды и добавки для сред, а также подходящие условия, в отношении определенных экспрессирующих клеток и 45 представляющих интерес полипептидов.

Противовспениватели и пеногасители на основе силикона или неионные поверхностно-активные вещества, такие как соблок-полимеры из мономеров этиленоксида/пропиленоксида, можно добавлять в культуральную среду в процессе

ферментации.

pH, температура, концентрация растворенного кислорода и осмолярность культуральной среды будут зависеть от конкретного типа клетки и будут выбраны такими, чтобы быть оптимальными для роста и продуктивности рассматриваемых 5 клеток. Специалисту в данной области техники известно, как определить оптимальные условия, такие как pH, температура, концентрация растворенного кислорода и осмолярность, для заданной культуры. Как правило, оптимальная pH для клеток млекопитающих находится между 6,6 и 7,6, оптимальная температура находится между 30 и 39°C, и оптимальная осмолярность находится между 260 и 400 мОсм/кг. Для систем 10 микроорганизмов pH может находиться между 3 и 8 и температура составлять от 20 до 45°C.

Растворимость различных компонентов культуральной среды варьируется в значительной степени, так многие из компонентов будут иметь высокую растворимость и, таким образом, легко растворяться в воде, тогда как другие компоненты, такие как 15 определенные витамины, аминокислоты, липиды и факторы роста, имеют низкую растворимость в воде. По этой причине культуральную среду обычно получают смешиванием всех компонентов как готовую к применению композицию.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения первую, вторую и необязательно третью свежую среду получают из разных компонентов, имеющих 20 различные концентрации.

В другом варианте реализации первую, вторую и необязательно третью свежую среду выбирают из одной и той же композиции культуральной среды.

Первую, вторую и необязательно третью свежую среду обычно предварительно нагревают до той же температуры, что и культуральную среду, которую удалили из 25 культурального сосуда через фильтр для примесей (3) или выход для сбора продукта (4), и обычно добавляют в культуральный сосуд сразу же после удаления.

Поскольку настоящее изобретение, как описано, предпочтительно работает с использованием высокой плотности клеток, можно с успехом культуральную среду с 30 высокой плотностью клеток от одной ферментации применять для перезапуска (то есть посева) новой ферментации. Высокая плотность жизнеспособных клеток в данном контексте, как правило, представляет собой плотность, составляющую по меньшей мере 10 миллионов клеток/мл, предпочтительно по меньшей мере 20 миллионов клеток/мл, более предпочтительно по меньшей мере 30 миллионов клеток/мл, например, по 35 меньшей мере 40 миллионов клеток/мл, например, по меньшей мере 50 миллионов клеток/мл.

Процесс ферментации

Запуск процесса ферментации обычно происходит путем добавления культуры клеток с высокой плотностью клеток к культуральной среде в культуральном сосуде (то есть посев). В ходе начала ферментации, когда уровни продукта и примесей являются 40 низкими, фильтрующий примеси элемент можно перекрыть, так чтобы никакая жидкость не проходила через фильтрующий примеси элемент. Когда плотность клеток повышается и, таким образом, также уровни примесей, можно начинать перфузию жидкости наружу через фильтр для примесей и можно добавлять новую свежую среду в культуральный сосуд с той же скоростью, как скорость среды через фильтрующий примеси элемент, 45 для восполнения потребленных питательных веществ и удаленной среды. Клетки выращивают затем в течение достаточного времени, пока клетки не достигнут определенной плотности клеток, перед тем, как удалят среду с продуктом, клетками и примесями.

В одном из вариантов реализации продукт выбирают из биополимера, экспрессируемого клеткой. В другом варианте реализации изобретения продукт выбирают из клетки. В дополнительном варианте реализации продукт выбирают из микроорганизма.

5 Используемое в настоящей заявке «достаточное время» для осуществления ферментации клеток на этапе (а) будет зависеть от скорости роста клеток, размера культурального сосуда и количества культуры клеток для посева для начала ферментации.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения достаточное время для 10 осуществления ферментации клеток на этапе (а) может составлять, например, от 1 до 3 дней, например, от 4 до 5 дней, например, от 6 до 7 дней, например, от 8 до 9 дней или даже больше.

Когда клетки, присутствующие в биореакторе, достигают удовлетворительной 15 плотности клеток или когда присутствует достаточное количество продукта в потоке, выходящем через выход для сбора продукта, можно начинать сбор продукта. Это можно определить путем измерения плотности клеток, например, используя спектрофотометр или измеряя количество представляющего интерес продукта известными средствами, например, с использованием подходящего способа количественного определения белка в случае полипептидного продукта.

20 В одном из вариантов реализации настоящего изобретения определенная плотность клеток на этапе (а) представляет собой плотность клеток, составляющую по меньшей мере 30 миллионов клеток/мл, предпочтительно по меньшей мере 40 миллионов клеток/мл, более предпочтительно по меньшей мере 50 миллионов клеток/мл, например, по 25 меньшей мере 60 миллионов клеток/мл, например, по меньшей мере 70 миллионов клеток/мл, например, по меньшей мере 80 миллионов клеток/мл.

В другом варианте реализации определенный уровень биополимера на этапе (а) представляет собой уровень, составляющий по меньшей мере 0,010 г/л, например, по 30 меньшей мере 0,050 г/л, например, по меньшей мере 0,10 г/л, например, по меньшей мере 0,50 г/л, например, по меньшей мере 1,0 г/л, например, по меньшей мере 5,0 г/л.

30 В одном варианте реализации настоящего изобретения способ включает в ходе этапа (а) осуществление ферментации клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизма в культуральном сосуде (1) в подходящей культуральной среде в 35 подходящих условиях и в течение достаточного времени, пока клетки, экспрессирующие биополимер, не достигнут определенной плотности клеток или биополимер не достигнет определенной концентрации, пока клетки не достигнут определенной плотности клеток или пока микроорганизм не достигнет определенной плотности микроорганизма, без удаления примесей через фильтрующий примеси элемент (3).

В ходе ферментации клеток на этапе (а), как правило, среду, содержащую примеси, 40 объемом примерно 0,5-1 объем реактора в день, перфузируют наружу через фильтрующий примеси элемент (3), которую заменяют или частично заменяют добавлением первой свежей среды через вход в культуральный сосуд (2). Термин «объем реактора» в данном контексте должен пониматься как соответствующий рабочему 45 объему культурального сосуда конкретной биореакторной системы.

Используемый в настоящей заявке термин «заменен или частично заменен» относится к тому, что либо тот же самый объем среды, выходящей через выход для сбора продукта (4) заменен первой свежей средой, добавленной через фильтрующий примеси элемент (3), либо в некоторых случаях может быть выгодно заменить только часть объема 45 среды, выходящей через фильтрующий примеси элемент (3) второй свежей средой,

добавленной через вход культурального сосуда (2), так как это может быть способом контроля количества продукта в культуральном сосуде, например, количества биополимера, или плотности клеток у клетки, или плотности микроорганизма.

5 В одном из вариантов реализации настоящего изобретения на этапе (а) по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90% первой свежей среды добавляют через вход культурального сосуда (2) для частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3).

10 В другом варианте реализации первую свежую среду добавляют через вход культурального сосуда (2) для замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3) на этапе (а).

15 В дополнительном варианте реализации способ включает на этапе (а), что клетки, экспрессирующие биополимер, достигают плотности клеток, которая выше, чем плотность клеток, получаемая с использованием биореакторной системы без фильтрующего примеси элемента (3) в идентичных условиях.

В еще одном дополнительном варианте реализации способ включает на этапе (а), что клетки достигают плотности клеток, которая выше, чем плотность клеток, получаемая с использованием биореакторной системы без фильтрующего примеси элемента (3) в идентичных условиях.

20 В дополнительном варианте реализации способ включает на этапе (а), что микроорганизм достигает плотности клеток, которая выше, чем плотность клеток, получаемая с использованием биореакторной системы без фильтрующего примеси элемента (3) в идентичных условиях.

25 Когда на этапе (а) клетки, экспрессирующие биополимер, достигают определенной клеточной плотности или биополимер достигает определенной концентрации, клетки, достигают определенной клеточной плотности или микроорганизм достигает определенной плотности микроорганизма, определенный объем среды, содержащей продукт и примеси, удаляют из культурального сосуда (1) через выход для сбора продукта (4).

30 Определенный объем среды, содержащей продукт и примеси, который удаляют из культурального сосуда, может быть определен специалистом в данной области техники с учетом характеристик отдельной биореакторной системы и линии клеток. Как правило, он будет в диапазоне от примерно 30% до примерно 80% среды в культуральном сосуде, например, от примерно 0,3 до примерно 0,8 объемов реактора.

35 В одном из вариантов реализации настоящего изобретения способ включает на этапе (b) удаление по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% среды, содержащей продукт и примеси, из культурального сосуда (1) через модуль для сбора продукта (4).

40 После удаления определенного объема среды, содержащей продукт и примеси, из культурального сосуда на этапе (b) вторую свежую среду добавляют в культуральный сосуд (1) через вход культурального сосуда (2) на этапе (c) для замены или частичной замены среды, удаленной через выход для сбора продукта (4) на этапе (b).

45 Используемый в настоящей заявке термин «заменен или частично заменен» относится к тому, что либо тот же самый объем среды, выходящей через выход для сбора продукта (4) заменен второй свежей средой, добавленной через вход культурального сосуда (2), либо в некоторых случаях может быть выгодно, заменить только часть объема среды, выходящей через выход для сбора продукта (4) второй свежей средой, добавленной

через вход культурального сосуда (2), так как это может быть способом контроля количества продукта в культуральном сосуде, например, количества биополимера, или плотности клеток у клетки, или плотности микроорганизма.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения на этапе (с) по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90% второй свежей среды добавляют через вход культурального сосуда (2) для частичной замены среды, удаленной через вход для сбора продукта (3) на этапе (b).

В другом варианте реализации вторую свежую среду добавляют через вход культурального сосуда (2) для замены среды, удаленной через выход для сбора продукта (3) на этапе (b).

Согласно настоящему изобретению этапы (b) и (с) можно повторять по меньшей мере от 2 до 20 раз без удаления примесей через фильтрующий примеси элемент (3).

В дополнительном варианте реализации способ дополнительно включает этап (е), при этом этапы (b) и (с) повторяют от по меньшей мере 2 до 30 раз.

В еще одном дополнительном варианте реализации способ включает предшествующее этапу а) осуществление ферментации клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизма в культуральном сосуде (1) в подходящей культуральной среде в подходящих условиях и в течение достаточного времени, пока клетки, экспрессирующие биополимер, не достигнут определенной плотности клеток или биополимер не достигнет определенной концентрации, клетки не достигнут определенной плотности или микроорганизм не достигнет определенной плотности микроорганизма, без удаления примесей через фильтрующий примеси элемент (3).

После нескольких циклов удаления среды, содержащей продукт и примеси, из культурального сосуда через выход для сбора продукта (4) и добавления новой среды через вход культурального сосуда (2) примеси могут начать накапливаться в культуральном сосуде с возрастающей скоростью. В подобной ситуации может быть выгодно удалить среду, содержащую примеси, через фильтрующий примеси элемент и добавить третью свежую среду через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3) в ходе этапа (b), в ходе этапа (с) или в ходе обоих этапов (b) и (с).

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает этап d).

В другом варианте реализации настоящего изобретения способ включает на этапе (d), что третью свежую среду добавляют через вход культурального сосуда (2) для замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3).

В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения на этапе (d) по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90% третьей свежей среды добавляют через вход культурального сосуда (2) для частичной замены среды, удаленной через вход для сбора продукта (3) в ходе этапа (b), в ходе этапа (с) или в ходе обоих этапов (b) и (с).

В дополнительном варианте реализации способ включает этап (f), при этом этап (d) повторяют от по меньшей мере 2 до 30 раз.

В зависимости от типа клеток и условий роста, клетки могут удваиваться за время от менее 1 часа и до нескольких дней. Линии клеток млекопитающих могут удваиваться каждые примерно 14-48 часов, но линии клеток, адаптированные к высокопроизводительной экспрессии полипептидов в биореакторах, как правило,

удваиваются каждые от примерно 15 до примерно 36 часов. Если клетки удваиваются каждые 24 часа, среду, содержащую продукт и примеси, объемом в половину (то есть 0,5) объема реактора, можно удалять ежедневно через выход для сбора продукта (4) и 0,5 объема реактора можно заменять новой свежей средой для восполнения
5 потребленных питательных веществ и удаленной среды, и, таким образом, поддерживая постоянную продуктивность в биореакторной системе.

Если время удвоения меньше, чем 24 часа, можно удалять ежедневно больший объем среды (объем реактора), содержащей продукт и примеси, и заменять новой свежей средой. Если время удвоения больше, чем 24 часа, можно удалять ежедневно меньший
10 объем реактора, вместе с тем поддерживая постоянную продуктивность в биореакторной системе. Специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящие линии клеток и контролировать рост клеток для оптимального режима получения представляющего интерес продукта.

Специалисты в данной области техники осознают, что температура культуральной
15 среды в культуральном сосуде является решающим фактором для продуктивности клеток, причем температура в диапазоне примерно 30-38°C часто бывает оптимальной, и что может быть выгодным использовать снижение температуры в процессе ферментации. Подобные процедуры хорошо известны, в частности, для клеток млекопитающих, таких как клетки СНО, и, как правило, включают начальную фазу
20 ферментации с первой температурой, например, примерно 37°, чтобы достичь требуемой плотности клеток, с последующим снижением температуры до, например, примерно 32-35° для оставшейся части ферментации, чтобы повысить экспрессию полипептидного продукта и уменьшить деление клеток.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения способ включает на этапе
25 (а) осуществление ферментации клеток в культуральном сосуде (1) в подходящей среде с температурой в диапазоне примерно 30-38°C.

Процесс постоянно находится под мониторингом, как известно в данной области техники и если иначе не объяснено в настоящей заявке, так что условия роста, концентрация культуральной среды, плотность клеток, рН и т.д. поддерживают в
30 пределах требуемых спецификаций.

Продукт, получаемый согласно настоящему изобретению, можно отделить от культуральной среды и примесей.

Если продукт представляет собой клетки или микроорганизмы, они могут быть выделены фильтрацией, центрифугированием или седиментацией согласно стандартным
35 способам. Если продукт представляет собой биополимер, он может быть очищен от клеток и примесей с помощью процесса осветления с последующей дополнительной очисткой с использованием хроматографических систем. Специалист в данной области техники знает подходящие способы для очистки продукта согласно настоящему изобретению.

В одном из вариантов реализации способ дополнительно включает этап (g) очистку
40 продукта из определенного объема среды, содержащей продукт, выбранный из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки или микроорганизма, и примеси.

Способ согласно настоящему изобретению может быть особенно полезным для работы с несколькими культуральными сосудами, соединенными последовательно,
45 например, с двумя, например, с тремя или более предпочтительно с 4 культуральными сосудами в общем блоке, также включающем оборудование для очистки продукта. В данной ситуации, например, 4 культуральных сосуда работают так, что культуральный сосуд 4 функционирует для получения посевных культур для других культуральных

сосудов, например, работает в режиме наращивания.

Культуральные сосуды 1, 2 и 3 могут затем работать в режиме, при котором клетки имеют время удвоения примерно три дня и при котором среду, содержащую продукт и примеси, удаляют из культурального сосуда 1 на 1 день и подают на оборудование для очистки и заменяют среду, удаленную для очистки, на новую свежую среду. Среду, содержащую продукт и примеси, удаляют из культурального сосуда 2 на 2 день и подают на оборудование для очистки и заменяют среду, удаленную для очистки, на новую свежую среду. Среду, содержащую продукт и примеси, удаляют из культурального сосуда 3 на 3 день и подают на очистное оборудование и заменяют среду, удаленную для очистки, на новую свежую среду, и этот процесс повторяют в течение нескольких циклов, пока продуктивность одного из культуральных сосудов не снизится до неприемлемого уровня, после чего клетки в культуральном сосуде используют для посева при новой ферментации и процесс продолжается.

Все ссылки на патенты и не патенты, приводимые в настоящей заявке, настоящим полностью включены посредством ссылки.

Любая комбинация из описанных выше элементов во всех их возможных комбинациях охватывается настоящим изобретением, если иное не указано в настоящей заявке или если это явно не противоречит контексту.

Единичные формы терминов, используемые в настоящей заявке, должны толковаться как покрывающие как единичные формы, так и множественные формы термина, если не указано иначе или если это явно не противоречит контексту.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения продукта, выбранного из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки и микроорганизма, в биореакторной системе с отъемно-доливной ферментацией, при этом биореакторная система включает:

культуральный сосуд (1), содержащий клетки или микроорганизмы в подходящей культуральной среде;

вход культурального сосуда (2) для подачи среды в культуральный сосуд (1);

фильтрующий примеси элемент (3), который позволяет удалять из культурального сосуда (1) примеси с молекулярной массой (ММ) ниже ММ продукта, вместе с тем оставляя продукт внутри культурального сосуда (1), и при этом фильтрующий примеси элемент (3) находится в жидкостном соединении с культуральной средой внутри культурального сосуда (1); и

выход для сбора продукта (4), который позволяет удалять среду, содержащую продукт и примеси, из культурального сосуда (1);

при этом указанный способ включает следующие этапы:

(а) осуществление ферментации указанных клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизмов в культуральном сосуде (1) в подходящей культуральной среде в подходящих условиях и в течение достаточного времени, пока клетки, экспрессирующие биополимер, не достигнут определенной плотности клеток или биополимер не достигнет определенной концентрации, пока клетки не достигнут определенной плотности клеток или пока микроорганизмы не достигнут определенной плотности микроорганизмов, при этом в ходе ферментации среду, содержащую примеси, удаляют через фильтрующий примеси элемент (3), и первую свежую среду добавляют через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3);

(b) удаление определенного объема среды, содержащей продукт и примеси, из

культурального сосуда (1) через выход для сбора продукта (4), и

(с) добавление второй свежей среды в культуральный сосуд (1) через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через выход для сбора продукта (4) на этапе (b); и

5 (d) необязательно, в ходе этапа (b), в ходе этапа (с) или в ходе обоих этапов (b) и (с) удаление среды, содержащей примеси, через фильтрующий примеси элемент (3) и добавление третьей свежей среды через вход культурального сосуда (2) для замены или частичной замены среды, удаленной через фильтрующий примеси элемент (3);

(е) необязательно повторение этапов (b) и (с),

10 (f) необязательно повторение этапа (d), и

(g) необязательно, очистка продукта из определенного объема среды, содержащей продукт, выбранный из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки или микроорганизма, и примеси.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап (а) проводят как первую фазу
15 идентично простому периодическому процессу культивирования, причем в ходе этапа (а) осуществление ферментации клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизмов в культуральном сосуде (1) в подходящей культуральной среде в подходящих условиях и в течение достаточного времени, пока клетки, экспрессирующие биополимер, не достигнут определенной плотности клеток или биополимер не достигнет
20 определенной концентрации, пока клетки не достигнут определенной плотности клеток или пока микроорганизмы не достигнут определенной плотности микроорганизмов, без удаления примесей через фильтрующий примеси элемент (3).

3. Способ по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что включает предшествующее этапу а) осуществление ферментации клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или
25 микроорганизма в культуральном сосуде (1) в подходящей культуральной среде в подходящих условиях и в течение достаточного времени, пока клетки, экспрессирующие биополимер, не достигнут определенной плотности клеток или биополимер не достигнет определенной концентрации, пока клетки не достигнут определенной плотности клеток или пока микроорганизм не достигнет определенной плотности микроорганизма, без
30 удаления примесей через фильтрующий примеси элемент (3).

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что первую, вторую и необязательно третью свежую среду выбирают из одной и той же композиции культуральной среды.

5. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий этап d).

35 6. Способ по любому из пп. 1-5, дополнительно включающий этап (е), отличающийся тем, что этапы (b) и (с) повторяют от по меньшей мере 2 до 30 раз.

7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий этап (f), отличающийся тем, что этап (d) повторяют от по меньшей мере 2 до 30 раз.

8. Способ по любому из пп. 1-7, дополнительно включающий этап (g), очистку
40 продукта из определенного объема среды, содержащей продукт, выбранный из биополимера, экспрессируемого клеткой, клетки или микроорганизма, и примеси.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что на этапе (а) осуществляют ферментацию клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизмов в культуральном сосуде (1) в по меньшей мере 50 л, например, в по меньшей мере 75 л,
45 например, в по меньшей мере 100 л, например, в по меньшей мере 200 л, например, в по меньшей мере 300 л, например, в по меньшей мере 500 л подходящей культуральной среды.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что на этапе (а) осуществляют

ферментацию клеток, экспрессирующих биополимер, клеток или микроорганизмов в культуральном сосуде (1), пока клетки не достигнут плотности клеток, составляющей по меньшей мере 30 миллионов клеток/мл, предпочтительно по меньшей мере 40 миллионов клеток/мл, более предпочтительно по меньшей мере 50 миллионов клеток/мл, в частности, по меньшей мере 60 миллионов клеток/мл, например, по меньшей мере 70 миллионов клеток/мл, например, по меньшей мере 80 миллионов клеток/мл.

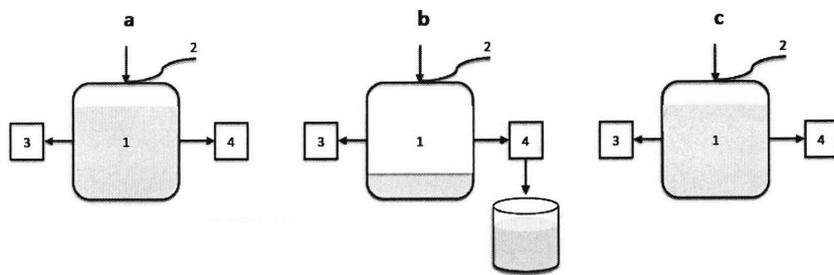
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что на этапе (b) удаляют по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80% среды, содержащей продукт и примеси, из культурального сосуда (1) через выход для сбора продукта (4).

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что клетку, экспрессирующую биополимер, выбирают из клеток млекопитающих, таких как клетки CHO, NS0, PER.C6[®], ВНК или НЕК.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что биополимер представляет собой рекомбинантный белок, такой как гормон роста человека, фолликулостимулирующий гормон, фактор VIII, фактор VII, фактор IX, эритропоэтин (ЭПО), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), интерферон (ИФ), инсулин, производное инсулина, инсулиноподобный фактор роста 1.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что биополимер представляет собой антитело или его фрагмент, где фрагмент выбран из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента или одноцепочечного Fv (scFv)-фрагмента, или фактор свертывания крови, такой как фактор свертывания крови VIIa.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что фильтр для примесей имеет размер пор с максимумом номинального отсечения по молекулярной массе (НОММ), составляющим по меньшей мере 10%, например, по меньшей мере 20%, например, по меньшей мере 30%, например, по меньшей мере 40%, например, по меньшей мере 50% от молекулярной массы биополимера.



Фиг. 1