(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118742652 A
(43)申请公布日 2024.10.01

(21)申请号 202380022778.X

(22)申请日 2023.02.20

(30)优先权数据
2022-024815 2022.02.21 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/006038 2023.02.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/157970 JA 2023.08.24

(71)申请人 中外制药株式会社
地址 日本
申请人 味之素株式会社

(72)发明人 高尾信方 樋口拓哉 风吕光俊平

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张国梁 张莹

(51)Int.Cl.
C12P 21/02(2006.01)
C12N 5/02(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)

权利要求书3页 说明书18页 附图1页

(54)发明名称

灌流培养方法

(57)摘要

提供能够改善重组蛋白的制备中的生产率的灌流培养方法等。具体地,提供用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸和/或柠檬酸铁铵。

CN 118742652 A

1.用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。

2.用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的每一细胞的重组蛋白产生的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。

3.权利要求1或2中所述的方法,其中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生提高。

4.权利要求3中所述的方法,其中,重组蛋白产生提高10%以上。

5.权利要求1或2中所述的方法,其包括在培养开始1小时后添加胱氨酸。

6.权利要求1或2中所述的方法,其包括在培养开始6小时后添加胱氨酸。

7.权利要求1或2中所述的方法,其包括在培养开始24小时后添加胱氨酸。

8.权利要求1或2中所述的方法,其包括在培养开始72小时后添加胱氨酸。

9.权利要求1或2中所述的方法,其中,灌流培养中的初始培养基的半胱氨酸源浓度是0.1mM～2.1mM。

10.用于灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞的方法,其包括:

用包含0.1mM～2.1mM的半胱氨酸源浓度的细胞培养初始培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;和

在培养开始72小时后,在细胞培养基中添加胱氨酸。

11.权利要求10中所述的方法,其中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生能力提高。

12.权利要求11中所述的方法,其中,重组蛋白产生能力提高10%以上。

13.用于制备重组蛋白的方法,其包括:

用包含0.1mM～2.1mM的半胱氨酸源浓度的细胞培养初始培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;

在培养开始72小时后,在细胞培养基中添加胱氨酸;和

回收重组蛋白。

14.权利要求13中所述的方法,其中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生提高。

15.权利要求14中所述的方法,其中,重组蛋白产生提高10%以上。

16.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是0.5mM～10mM。

17.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是1mM～10mM。

18.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是1.5mM～10mM。

19.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是2mM～10mM。

20.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其包括添加调整为pH10以上的含胱氨酸液。

21.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,重组蛋白是抗体。

22.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,具有重组蛋白产生能力的动物细胞包含编码重组蛋白的核酸。

23.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,动物细胞是哺乳动物细胞。

24.权利要求23中所述的方法,其中,哺乳动物细胞是CHO细胞。

25.权利要求24中所述的方法,其中,CHO细胞是CHO-K1细胞、CHO-S细胞、CHO-DXB11细胞或CHO-DG44细胞。

26.权利要求1、2和10至15的任一项中所述的方法,其中,灌流培养中的细胞培养基包含柠檬酸铁铵。

27.用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂,其包含胱氨酸作为有效成分。

28.用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

29.用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的每一细胞的重组蛋白产生的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

30.权利要求28或29中所述的方法,其中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,重组蛋白产生提高。

31.权利要求30中所述的方法,其中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。

32.权利要求30中所述的方法,其中,重组蛋白产生提高10%以上。

33.用于灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

34.用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

35.权利要求33或34中所述的方法,其中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,细胞增殖速度降低。

36.权利要求35中所述的方法,其中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。

37.权利要求35中所述的方法,其中,细胞增殖速度降低10%以上。

38.用于减少具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞,

所述排出的培养液的量是排液步骤中排出的培养液的量,排液步骤是从培养槽排出培养液、在所述培养槽中加入与该排出的培养液等量的新鲜培养基的步骤。

39.权利要求38中所述的方法,其中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,排出的培养液的量减少。

40.权利要求39中所述的方法,其中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。

41.权利要求39中所述的方法,其中,排出的培养液的量减少10%以上。

42.用于制备重组蛋白的方法,其包括:

用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;和

回收重组蛋白。

43.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其中,细胞培养基包含给

予30mg/L～200mg/L的铁浓度的量的柠檬酸铁铵。

44.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其中,细胞培养基包含给予40mg/L～200mg/L的铁浓度的量的柠檬酸铁铵。

45.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其中,细胞培养基包含给予50mg/L～150mg/L的铁浓度的量的柠檬酸铁铵。

46.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其中,重组蛋白是抗体。

47.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其中,具有重组蛋白产生能力的动物细胞包含编码重组蛋白的核酸。

48.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其中,动物细胞是哺乳动物细胞。

49.权利要求48中所述的方法,其中,哺乳动物细胞是CHO细胞。

50.权利要求49中所述的方法,其中,CHO细胞是CHO-K1细胞、CHO-S细胞、CHO-DXB11细胞或CHO-DG44细胞。

51.权利要求28、29、33、34和38至42的任一项中所述的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。

52.用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂,其包含柠檬酸铁铵作为有效成分。

53.用于具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养的细胞培养基,其包含胱氨酸和柠檬酸铁铵。

灌流培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及动物细胞的灌流培养方法。此外,本发明还涉及用于制备重组蛋白的方法和用于提高重组蛋白产生的方法、以及用于提高重组蛋白产生的试剂。进一步,本发明还涉及用于降低动物细胞的细胞增殖速度的方法。

背景技术

[0002] 近年来,治疗用抗体等重组蛋白在药物领域的重要性越来越高,被批准为药物的重组蛋白的大部分通过培养产生重组蛋白的动物细胞而制备。但是,重组蛋白的制备与低分子化合物的制备相比需要高的成本,此外,产物也需要更高的品质。

[0003] 因此,以提高重组蛋白的生产率、品质为目的的细胞培养条件的控制和优化对于成功商业生产重组蛋白是极重要的事项。

[0004] 作为用于提高通过动物细胞的培养制备重组蛋白的生产率的培养步骤的连续化方法之一,应用从培养槽连续过滤和排出培养液、将含有营养成分的新鲜培养基连续地供给培养槽的灌流培养方法。根据该方法,能够在将营养成分浓度和废物浓度维持恒定的同时提高细胞密度,因此能够提高每培养槽容量的蛋白质生产速度。此外,在灌流培养方法中,能够从培养槽马上回收产生的重组蛋白,因此回收高品质的重组蛋白是可能的,即使培养液中不稳定的蛋白也能够高效地回收。

[0005] 以改善灌流培养中的生产率为目的,从培养细胞的改良、细胞培养基的改良、灌流培养方法的改良等各方面尝试各种改良。

[0006] 例如,国际公开2018/178069号记载了通过控制细胞培养基中的钾离子和钠离子的摩尔比改善灌流培养中的生产率的方法。

[0007] 专利文献

[0008] 国际公开第2018/178069号

[0009] 发明概述

[0010] 在灌流培养中,由于培养基成分和产物也与废物一起连续地被抽出,因此可产生培养基损失引起的成本的增加和产物浓度的降低引起的纯化成本的增加。

[0011] 本发明的目的是,改善重组蛋白的制备中的生产率。

[0012] 即,根据本发明,提供以下所示方式。

[0013] [1]

[0014] 用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。

[0015] [2]

[0016] 用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的每一细胞的重组蛋白产生的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。

[0017] [3]

[0018] [1]或[2]中记载的方法,其中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半

胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生提高。

[0019] [4]

[0020] [3]中记载的方法,其中,重组蛋白产生提高10%以上。

[0021] [5]

[0022] [1]至[4]的任一项中记载的方法,其包括在培养开始1小时后添加胱氨酸。

[0023] [6]

[0024] [1]至[4]的任一项中记载的方法,其包括在培养开始6小时后添加胱氨酸。

[0025] [7]

[0026] [1]至[4]的任一项中记载的方法,其包括在培养开始24小时后添加胱氨酸。

[0027] [8]

[0028] [1]至[4]的任一项中记载的方法,其包括在培养开始72小时后添加胱氨酸。

[0029] [9]

[0030] [1]至[8]的任一项中记载的方法,其中,灌流培养中的初始培养基的半胱氨酸源浓度是0.1mM～2.1mM。

[0031] [10]

[0032] 用于灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞的方法,其包括:

[0033] 用包含0.1mM～2.1mM的半胱氨酸源浓度的细胞培养初始培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;和

[0034] 在培养开始72小时后,在细胞培养基中添加胱氨酸。

[0035] [11]

[0036] [10]中记载的方法,其中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生能力提高。

[0037] [12]

[0038] [11]中记载的方法,其中,重组蛋白产生能力提高10%以上。

[0039] [13]

[0040] 用于制备重组蛋白的方法,其包括:

[0041] 用包含0.1mM～2.1mM的半胱氨酸源浓度的细胞培养初始培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;

[0042] 在培养开始72小时后,在细胞培养基中添加胱氨酸;和

[0043] 回收重组蛋白。

[0044] [14]

[0045] [13]中记载的方法,其中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生提高。

[0046] [15]

[0047] [14]中记载的方法,其中,重组蛋白产生提高10%以上。

[0048] [16]

[0049] [1]至[15]的任一项中记载的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是0.5mM～10mM。

[0050] [17]

[0051] [1]至[15]的任一项中记载的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是1mM～10mM。

[0052] [18]

[0053] [1]至[15]的任一项中记载的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是1.5mM～10mM。

[0054] [19]

[0055] [1]至[15]的任一项中记载的方法,其中,添加后的胱氨酸浓度是2mM～10mM。

[0056] [20]

[0057] [1]至[19]的任一项中记载的方法,其包括添加调整为pH10以上的含胱氨酸液。

[0058] [21]

[0059] [1]至[20]的任一项中记载的方法,其中,重组蛋白是抗体。

[0060] [22]

[0061] [1]至[21]的任一项中记载的方法,其中,具有重组蛋白产生能力的动物细胞包含编码重组蛋白的核酸。

[0062] [23]

[0063] [1]至[22]的任一项中记载的方法,其中,动物细胞是哺乳动物细胞。

[0064] [24]

[0065] [23]中记载的方法,其中,哺乳动物细胞是CHO细胞。

[0066] [25]

[0067] [24]中记载的方法,其中,CHO细胞是CHO-K1细胞、CHO-S细胞、CHO-DXB11细胞或CHO-DG44细胞。

[0068] [26]

[0069] [1]至[25]的任一项中记载的方法,其中,灌流培养中的细胞培养基包含柠檬酸铁铵。

[0070] [27]

[0071] 用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂,其包含胱氨酸作为有效成分。

[0072] [28]

[0073] 用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

[0074] [29]

[0075] 用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的每一细胞的重组蛋白产生的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

[0076] [30]

[0077] [28]或[29]中记载的方法,其中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,重组蛋白产生提高。

[0078] [31]

[0079] [30]中记载的方法,其中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。

[0080] [32]

[0081] [30]或[31]中记载的方法,其中,重组蛋白产生提高10%以上。

[0082] [33]

[0083] 用于灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

[0084] [34]

[0085] 用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。

[0086] [35]

[0087] [33]或[34]中记载的方法,其中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,细胞增殖速度降低。

[0088] [36]

[0089] [35]中记载的方法,其中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。

[0090] [37]

[0091] [35]或[36]中记载的方法,其中,细胞增殖速度降低10%以上。

[0092] [38]

[0093] 用于减少具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞,

[0094] 前述排出的培养液的量是排液步骤中排出的培养液的量,排液步骤是从培养槽排出培养液、在前述培养槽中加入与该排出的培养液等量的新鲜培养基的步骤。

[0095] [39]

[0096] [38]中记载的方法,其中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,排出的培养液的量减少。

[0097] [40]

[0098] [39]中记载的方法,其中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。

[0099] [41]

[0100] [39]或[40]中记载的方法,其中,排出的培养液的量减少10%以上。

[0101] [42]

[0102] 用于制备重组蛋白的方法,其包括:

[0103] 用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;和

[0104] 回收重组蛋白。

[0105] [43]

[0106] [28]至[42]的任一项中记载的方法,其中,细胞培养基包含给予30mg/L～200mg/L的铁浓度的量的柠檬酸铁铵。

[0107] [44]

[0108] [28]至[42]的任一项中记载的方法,其中,细胞培养基包含给予40mg/L～200mg/L的铁浓度的量的柠檬酸铁铵。

[0109] [45]

[0110] [28]至[42]的任一项中记载的方法,其中,细胞培养基包含给予50mg/L～150mg/L的铁浓度的量的柠檬酸铁铵。

[0111] [46]

[0112] [28]至[45]的任一项中记载的方法,其中,重组蛋白是抗体。

[0113] [47]

[0114] [28]至[46]的任一项中记载的方法,其中,具有重组蛋白产生能力的动物细胞包含编码重组蛋白的核酸。

[0115] [48]

[0116] [28]至[47]的任一项中记载的方法,其中,动物细胞是哺乳动物细胞。

[0117] [49]

[0118] [48]中记载的方法,其中,哺乳动物细胞是CHO细胞。

[0119] [50]

[0120] [49]中记载的方法,其中,CHO细胞是CHO-K1细胞、CHO-S细胞、CHO-DXB11细胞或CHO-DG44细胞。

[0121] [51]

[0122] [28]至[50]的任一项中记载的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。

[0123] [52]

[0124] 用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂,其包含柠檬酸铁铵作为有效成分。

[0125] [53]

[0126] 用于具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养的细胞培养基,其包含胱氨酸和柠檬酸铁铵。

[0127] 本发明能够改善重组蛋白的制备中的生产率。

[0128] 附图简述

[0129] [图1]显示半胱氨酸源的差异引起的重组蛋白的生产率的差异的图。

[0130] [图2]显示铁源的差异引起的抗体生产速度(SPR)和细胞增殖速度的差异的图。

[0131] 用于实施发明的方式

[0132] [术语的说明]

[0133] 本公开中,除非另有说明,各术语具有以下所示含义。

[0134] 本公开中的“重组蛋白”指应用任意的基因重组技术制备的任意长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链状也可以是支链状,可以包含修饰氨基酸,可以包含非氨基酸。此外,重组蛋白可以经受二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过保护基等衍生化、切割、或与标记成分(例如,放射性同位素)或药物(例如,毒素、细胞毒性药物、放射性同位素)结合等化学或生物学修饰。在其结构的一部分中包含重组蛋白部分的所有分子都包含在本发明的重组蛋白中。应用的基因重组技术只要是人工操纵基因的技术则没有特别限定,典型的实例是编码重组蛋白的核酸向宿主细胞的导入。

[0135] 作为重组蛋白的实例,列举应用基因重组技术制备的酶、激素、细胞因子、凝血因子(或血凝相关蛋白)、细胞外蛋白、Notch配体、抗体、抗体模拟物和免疫粘附素,但不限于这些。这些重组蛋白主要用于药物、农药、食品和其它化工领域,但不限于特定用途。

[0136] 作为酶的实例,列举碱性磷酸酶、β-内酰胺酶、半乳糖苷酶、葡萄糖苷酶、葡萄糖脑苷脂酶、超氧化物歧化酶、和DNase。

[0137] 作为激素的实例,列举肾素、生长激素(人生长激素或牛生长激素等)、甲状旁腺激

素、促甲状腺激素、降钙素、促性腺激素(例如,促卵泡激素、促黄体生成素)、胰高血糖素、胰岛素(胰岛素A链和胰岛素B链)、和胰岛素原。

[0138] 作为细胞因子的实例,列举肿瘤坏死因子(例如,TNF-α和-β)、血管内皮生长因子(VEGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子(例如,NT-3～NT-6)、神经生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(例如,aFGF、bFGF)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(例如,TGF-α、TGF-β1～TGF-β5)、激活素(例如,激活素A、激活素C、激活素E)、胰岛素样生长因子(例如,IGF-I、IGF-II)、肝细胞生长因子(HGF)、角质形成细胞生长因子、干细胞因子(SCF)、骨形成蛋白(BMP)、RANTES、促红细胞生成素(EPO)、血小板生成素(TPO)、干扰素-α、-β和-γ、集落刺激因子(例如,M-CSF、GM-CSF、G-CSF)、和白细胞介素(例如,IL-1～IL-13)。

[0139] 作为凝血因子和血凝相关蛋白的实例,列举第VII因子、第VIII因子、第VIIIC因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、组织因子、血管性血友病因子、蛋白C、蛋白S、纤溶酶原激活因子(例如,尿激酶、人尿或人组织纤溶酶原激活因子(t-PA))、凝血酶、凝血酶原、血小板生成素、血栓调整素、抗凝血酶III、纤维蛋白原、血清白蛋白。

[0140] 作为细胞外蛋白的实例,列举纤连蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白、骨桥蛋白、层粘连蛋白、它们的部分序列。

[0141] 作为Notch配体的实例,列举DLL1、DLL3、DLL4、Jagged-1、Jagged-2。Notch配体例如可以构成为与Fc区的融合蛋白。

[0142] 本公开中的“抗体”指具有与抗原的结合性的免疫球蛋白分子,包括具有包含轻链和重链的多肽链的全长抗体和其一部分(Fv、Fab、Fab’、F(ab’)$_2$、VHH片段等片段),但不限于此。各自的重链或轻链可包含可变区(与对抗原识别和结合相关)和恒定区(与定位和细胞间相互作用相关)。最通常的全长抗体包含2个重链恒定区(CH)、2个重链可变区(VH)、2个轻链恒定区(CL)、和2个轻链可变区(VL)。可变区包含为赋予抗体抗原特异性的序列的互补性决定区(CDR)、和框架区(FR)。

[0143] 抗体包括单克隆抗体、由2种以上的抗体或抗原结合部位形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、具有期望的生物活性的抗体片段和包含抗体的抗原结合部位的融合蛋白。此外,抗体包括嵌合抗体(例如人源化抗体)、(完全)人抗体、多价抗体、和改变抗体。

[0144] 抗体可以是任何类别(例如,IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)、任何亚类(同种型)。

[0145] 抗体可以经受与其它分子(低分子或高分子的毒素(细胞毒性药物)、放射性同位素等,但不限于此)结合等化学或生物学修饰,经受这些修饰的抗体也包括在本发明的抗体中。

[0146] 本公开中的“抗体模拟物”指可以特异性地与抗原结合、但在结构上与抗体无关的蛋白。具体地,作为抗体模拟物,列举蛋白A的Z结构域(亲和体;Affibody)。更具体地,作为抗体模拟物,列举ZHER2 affibody。

[0147] 重组蛋白不限于上述实例,还包括例如,上述细胞因子等的受体、转铁蛋白、各种CD蛋白、肿瘤相关抗原(例如,HER2、HER3或HER4受体、CA125)、疫苗用等的病毒抗原(例如,病毒的包膜蛋白)等。此外,包含上述任一蛋白的融合蛋白也包括在重组蛋白中。

[0148] 本公开中的“具有重组蛋白产生能力的”意味着具有通过基因重组技术产生蛋白的能力。产生的重组蛋白可以分泌在细胞外、即培养基中,也可以在细胞内蓄积,优选分泌

在细胞外。

[0149] 典型地,通过将编码重组蛋白的核酸导入宿主细胞内,可以给予宿主细胞产生(表达)重组蛋白的能力。即,典型的具有重组蛋白产生能力的细胞是包含编码重组蛋白的核酸的细胞。作为将核酸导入宿主细胞内的方法,在该技术领域中已知各种方法,可以应用在实施时间点公知的任意方法。作为这样的方法的实例,列举用包含编码重组蛋白的核酸的载体转化宿主细胞的方法。载体优选以可表达形式(例如与启动子、增强子、核糖体结合序列和/或转录终止序列等调整序列可操作地连接的形式)包含编码重组蛋白的核酸的表达载体,可以是质粒。

[0150] 将载体导入宿主细胞的方法的实例包括通过电穿孔法、粒子枪法、磷酸钙法或脂质转染法以物理或化学方式在宿主细胞内导入载体的方法,或使病毒载体感染宿主细胞的方法。在宿主细胞内导入的载体内的核酸可以通过CRISPR/Cas9等基因组编辑技术整合到宿主细胞中的基因组。或者,代替将编码重组蛋白的核酸导入宿主细胞内,可以通过经CRISPR/Cas9等基因组编辑技术等、将基因组DNA上的基因序列直接改变,从而编码目标重组蛋白、改变控制序列等而控制目标内源性蛋白的产生(例如,提高)。以这种方式产生的所有蛋白也包括在本发明的重组蛋白中。

[0151] 作为本公开中的“动物细胞”,可以应用任意的动物细胞,优选适于在重组蛋白的产生中应用的株化细胞。作为动物(动物物种),列举哺乳动物(哺乳类)、鸟类、两栖动物、昆虫。作为优选的动物,列举昆虫和哺乳动物,特别优选哺乳动物。

[0152] 作为昆虫细胞的实例,列举草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)的细胞。作为草地贪夜蛾的细胞,列举来自草地贪夜蛾卵巢的Sf9细胞、Sf21细胞、SF+细胞。

[0153] 作为哺乳动物细胞,优选应用人或猴等灵长类的细胞、小鼠、大鼠或仓鼠等啮齿类的细胞。

[0154] 哺乳动物细胞包括HL-60(ATCC编号CCL-240)、HT-1080(ATCC编号CCL-121)、HeLa(ATCC编号CCL-2)、293(ECACC编号85120602)、Hep G2(ATCC编号HB8065);VERO(ATCC编号CCL-1651)、CV1(ATCC编号CCL70)和COS-7(ATCC编号CRL-1651);NIH3T3(ATCC编号CRL-1658)、NS0(ATCC编号CRL-1827);中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、BHK21(也简称为BHK细胞;ATCC编号CRL-10)、MDCK(ATCC编号CCL-34)等的细胞株、由这些细胞株诱导的亚株(例如,作为BHK细胞的亚株的BHK TK-细胞、作为CHO细胞的亚株的CHO-K1细胞、CHO-S细胞、CHO-DXB11细胞(也称为CHO-DUKX细胞或DuxB11细胞)和CHO-DG44细胞),但不限于此。

[0155] 本公开中的“细胞培养基”和“培养基”指包含为了增殖或维持细胞而使用的营养源的溶液,在提及销售/提供方式的情形中,也包含用于制备该溶液的原液、粉末(颗粒)。营养源包括对细胞的增殖、生存必需的成分或有用的成分,作为这样的成分的实例,列举糖类等碳水化合物、脂质、核酸、维生素、必需和非必需氨基酸、必需元素、pH调整剂和溶剂(水)。培养基可以是无血清培养基,可以是不含动物性蛋白的培养基。

[0156] 细胞培养基可以相应于培养的细胞和目的,从可商购的培养基和文献中记载的公知的培养基适当选择,也可以混合应用2种以上的培养基、相应于培养的目的和细胞改变组成,添加动物血清、动物蛋白胨、其它动物来源成分和营养/生长因子或激素。细胞培养基调整至适合细胞的生存和增殖的pH和盐浓度。细胞培养基的pH例如为5.0～9.0,优选在6.0～8.0,更优选在6.5～7.5的范围应用较多。

[0157] 作为商业上可利用的培养基的实例,包括RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute 1640)培养基、L-15培养基、MEM(Eagle最小必需培养基)、DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)、Iscoves改良DMEM、Ham F10培养基和F12培养基。

[0158] 本公开中的“化学定义的细胞培养基”(CDM)指不含动物血清和蛋白胨等动物来源产物、所有的成分被化学定义的培养基。化学定义的细胞培养基也与通常的细胞培养基相同,相应于培养的细胞株和目的,可以从可商购的培养基和文献中记载的公知培养基适当选择,也可以混合应用2种以上的培养基,添加动物血清等动物成分和营养/生长因子或激素。溶液调整至对细胞的生存和增殖最适的pH和盐浓度。

[0159] 作为商业上可利用的化学定义的细胞培养基的实例,可以列举AmpliCHO CD培养基、Dynamis(注册商标)培养基、EX-CELL(注册商标)Advanced(注册商标)CHO流加培养基、CD FortiCHO(注册商标)培养基、CP OptiCHO(注册商标)、BalanCD(注册商标)CHO增殖A培养基、ActiPro(注册商标)、MEM(Eagle最小必需培养基)、DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)、RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute 1640)培养基和CELLiST(注册商标)Basal Media(BASAL3、BASAL10)、Feed Media(FEED2)。

[0160] 本公开中的“灌流培养”指下列培养方法:通过在培养中将细胞保持在培养槽(也称为反应器、培养器)内,同时将细胞培养基连续或间歇地从培养槽排出,将包含营养成分的培养基(新鲜培养基)连续或间歇地导入培养槽(培养基的灌流),从而将溶剂量维持为大致恒定、同时培养细胞。

[0161] 为了在培养中将细胞保持在培养槽内,需要将细胞与培养基分离、将细胞留在培养槽内的作业。作为该细胞和培养基的分离方式,可以应用半透膜、应用滤器的过滤(交替切向流灌流过滤系统等)、重力沉降、离心分离或声学分离等。此外,具有适于灌流培养的分离功能等的培养槽/培养装置或培养系统也广为人知,可商业上利用。

[0162] 灌流培养中应用的细胞培养基可以应用与其它方式的细胞培养中应用的细胞培养基相同的那种。此外,培养开始时的培养基(初始培养基)和其后的灌流中应用的培养基(灌流培养基)可为相同组成也可为不同组成(增减一部分成分、添加另一成分)。

[0163] 本公开中应用的“胱氨酸”包括胱氨酸(L-胱氨酸)、培养基添加后作为胱氨酸起作用的胱氨酸盐、和它们的水合物。但是,在提及胱氨酸浓度的情形中,意味着胱氨酸(L-胱氨酸)的浓度。

[0164] 作为胱氨酸盐,列举胱氨酸二盐酸盐、胱氨酸二钠盐、胱氨酸二钠盐一水合物等。作为水合物,列举胱氨酸二钠盐一水合物。也可将多个胱氨酸或胱氨酸盐组合应用。

[0165] 本公开中应用的“半胱氨酸源”意味着,在经过按需要分解等过程后,可在细胞内作为半胱氨酸利用的化合物。作为半胱氨酸源的具体实例,列举半胱氨酸、胱氨酸、谷胱甘肽。

[0166] 本公开中应用的“半胱氨酸源浓度”指半胱氨酸源的半胱氨酸换算的浓度。例如,在胱氨酸的情形中,半胱氨酸源浓度是胱氨酸浓度的二倍,在谷胱甘肽的情形中,半胱氨酸源浓度与谷胱甘肽浓度相等。

[0167] 本公开中应用的“柠檬酸铁铵”只要是由柠檬酸离子和铁离子和铵离子组成的柠檬酸铁(III)铵或其水合物,则没有特别限定。关于柠檬酸铁铵,根据各离子的含有比例已知为绿色和红褐色,但都可以适用于本公开的实施方式。

[0168] 本公开中应用的“其它铁源”指可作为细胞培养基的铁源利用的、柠檬酸铁铵以外的含铁离子分子。作为其它铁源的实例，包括磷酸铁、焦磷酸铁、硝酸铁、硫酸亚铁、氯化铁、乳酸亚铁、柠檬酸铁、柠檬酸亚铁钠、乙二胺四乙酸铁钠、葡聚糖铁和它们的水合物、以及它们的任意的组合。

[0169] 关于本公开中的“铁浓度”(铁离子浓度)，在能够从获得源(市售源等)得到铁源中的铁含量的值(或者铁源的分子式等可与铁含量相关的信息)的情形中，最优选应用该值计算铁浓度的理论值，在其不能的情形中，可以应用公知的方法，定量溶液中的铁浓度(铁离子浓度)。

[0170] 作为定量溶液中的铁浓度的方法，可以列举适当进行还原等必需处理后的菲咯啉分光光度法、火焰原子吸收光谱法、电加热原子吸收光谱法和ICP发射光谱法。

[0171] 在添加柠檬酸铁铵的情形中，通过计算求得铁浓度的理论值时，不能从获得源获得铁含量的值等，柠檬酸铁铵的分子式也不清楚或未确定的情形中，为了简便，可以应用17.5质量％(红褐色的情形中)或15质量％(绿色的情形中)作为柠檬酸铁铵的铁含量。

[0172] 本公开中的“培养基添加物”指培养基中添加的任意的物质或包含物质的组合物。培养基添加物可以补充添加的培养基中已经存在的成分，也可以新追加添加的培养基中不存在的成分。培养基添加物典型地以液体形式或粉末形式(包括颗粒形式)提供。此外，添加的目的不特别限定。

[0173] 除非另有明确说明，本公开中使用的单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”可包括复数的对象。

[0174] 本公开中使用的“和/或”包括由“和”表示的关联性和由“或”表示的关联性双方。

[0175] 本公开中的“包含”包括“主要由.....组成”、“实质上由.....组成”和“由.....组成”，“主要由.....组成”包括“实质上由.....组成”和“由.....组成”，“实质上由.....组成”包括“由.....组成”。

[0176] 关于本公开中各自的数值范围，分别包含“～”、“至”所示上限值和下限值。例如，应用数值A和B的“A～B”或“A至B”的记载意味着A以上且B以下。此外，本公开中阶段性记载的数值范围中“A～B”、“A至B”或“A以上且B以下”的记载独立包含“优选A以上”、“优选B以下”双方，可以将这些下限值或上限值置换为其它数值范围的上限值或下限值。此外，本公开中记载的数值范围的下限值或上限值可以置换为该数值范围内的数值、即实施例所示数值。

[0177] [实施方式]

[0178] 以下，应用用于实施发明的方式，详细说明本发明，但本发明不限于此。

[0179] 这些实施方式可以单独，也可以组合多个。此外，关于各实施方式的定义和细节，也可以参考前述的“术语的说明”。

[0180] 本公开中应用的公知的技术和程序是本领域技术人员充分理解的，可以按照常规方法实施。

[0181] 在某实施方式中，提供用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法，其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。该方法中，通过灌流培养时的重组蛋白产生提高，重组蛋白制备的生产率提高。

[0182] 作为重组蛋白产生的指标，例如，可以应用每培养槽的重组蛋白产生速度(每单位

时间的产生量)、每单位培养容积(培养基容积)的重组蛋白产生速度(每单位时间的产生量)、每单位细胞的重组蛋白产生速度(每单位时间的产生量),但不限于此。作为它们的实例,分别列举每1日的重组蛋白产生量、每1日、1L的重组蛋白产生量、和每1日、1细胞的重组蛋白产生量。在某实施方式中,在上述指标中至少一个中,蛋白产生提高。

[0183] 蛋白的量可以通过相应于各个蛋白的公知的定量方法来定量。作为蛋白的定量方法,例如,列举组合HPLC等色谱与蛋白的吸光(例如,280nm的吸光)、根据吸光系数(基于来自氨基酸序列的计算值、BSA等参考蛋白的值等)和吸光峰面积定量的方法、用色谱(例如HPLC)等根据纯化/粗纯化的蛋白的吸光定量的方法。关于纯化/粗纯化的蛋白,也可以应用BCA法、Bradford法或Lowry法等定量。

[0184] 在某实施方式中,提供用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的每一细胞的重组蛋白产生的方法,其包括在细胞培养基中添加胱氨酸。作为每一细胞的重组蛋白产生的指标,可以应用每一细胞的重组蛋白产生速度(例如,每1日、1细胞的蛋白产生量)。在重组蛋白是抗体的情形中,优选应用抗体生产速度(SPR)。该方法中,通过提高灌流培养时的每一细胞的重组蛋白产生,重组蛋白制备的成本被抑制,生产率提高。

[0185] 每一细胞的重组蛋白产生可以通过相应于各个蛋白的定量方法定量蛋白、同时通过计测细胞数计算。蛋白的定量方法可以应用任何方法,细胞数的计测可以手动计测,也可以应用机械计测,或者可以通过应用能够量化细胞数的试剂的生物/化学方法量化,也可以组合它们而计测。

[0186] 由于通过每一细胞的重组蛋白产生提高,重组蛋白相对于来自细胞的杂质/污染物的比率(纯度)增加,因此其后的纯化步骤变得更简便,能够抑制成本。此外,产生时间点的蛋白的品质的改善可以与最终制品的品质的改善相关,最终制品的品质的改善从成为药物制品时的安全性等观点出发也是优选的。

[0187] 特别地,与其它培养方法相比,灌流培养由于回流细胞培养基而消耗更多的培养基,因此具有可与成本增加有关的改善点。通过每一细胞的重组蛋白产生提高,使用相同量的细胞培养基时,可以得到更多量的重组蛋白(用较少量的培养基即可产生相同量的重组蛋白),可以与进一步的成本降低/生产率的提高相关。

[0188] 在某实施方式中,提供用于灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞的方法,其包括:用细胞培养初始培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;和在细胞培养基中添加胱氨酸。该方法中,可以培养具有重组蛋白的高产生能力的细胞。

[0189] 该方法中,也可以应用与初始培养基不同的灌流培养用的灌流培养基,与该灌流培养基共同或单独添加胱氨酸。

[0190] 在某实施方式中,提供用于制备重组蛋白的方法,其包括:用细胞培养初始培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞;在细胞培养基中添加胱氨酸;和回收重组蛋白。该方法中,可以以优异的生产率制备重组蛋白。

[0191] 该方法中,也可以应用与初始培养基不同的灌流培养用的灌流培养基,与该灌流培养基共同或单独添加胱氨酸。

[0192] 本公开的实施方式中的灌流培养(灌注培养)不限于特定的灌流培养方法,可以应用在实施时间点公知的任意的灌流培养法。关于细胞分离手段和培养基的供给手段、培养条件(CO_2浓度、DO、培养温度、培养时间等)/培养规模和培养槽,也没有特别限定,考虑培养

的细胞的性质和产生的重组蛋白的性质等后,可以从公知的条件等适当选择而实施。作为示例的培养条件,列举培养温度30～40℃、CO_2浓度0～40％、DO20～70％、培养时间1～90日、培养液量10mL～2000L、和/或灌流量每1日0.1～30培养量。动物细胞优选在表达重组蛋白的条件下或适于重组蛋白的表达的条件下培养。

[0193] 关于灌流培养中应用的细胞培养基,不限于特定的那种,可以考虑培养的细胞和产生的重组蛋白适当选择。细胞培养基优选化学定义的细胞培养基(CDM)。此外,初始培养基和灌流培养基可为相同或类似的组成,也可为不同的组成。本公开的实施方式中,在没有特别提及称为“培养基”或“细胞培养基”时,其意味着作为灌流培养开始时的培养基的“初始培养基”、和作为为了灌流新加入培养基的“灌流培养基”双方。

[0194] 本公开的实施方式中,作为具有重组蛋白产生能力的动物细胞的典型实例,列举包含编码重组蛋白的核酸的动物细胞。编码重组蛋白的核酸可以整合至基因组。

[0195] 作为本公开的实施方式中的动物细胞,可以应用任意的动物细胞,优选株化细胞,特别是重组蛋白的制备中有用的动物细胞株。

[0196] 动物细胞优选昆虫细胞和哺乳动物细胞,更优选哺乳动物细胞,但不限于此。

[0197] 作为合适的昆虫细胞株的实例,可以列举Sf9细胞、Sf21细胞、SF+细胞。

[0198] 作为合适的哺乳动物细胞株的实例,可以列举BHK21细胞和CHO细胞,特别优选中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)。CHO细胞包括由CHO细胞衍生的各种亚株(例如,CHO-K1细胞、CHO-S细胞、CHO-DXB11细胞(也称为CHO-DUKX细胞或DuxB11细胞)或CHO-DG44细胞)。

[0199] 本公开的实施方式中,成为对象的重组蛋白不限于特定的那种,可以将任意的重组蛋白作为对象。重组蛋白的合适实例是抗体。

[0200] 关于本公开的实施方式中的胱氨酸,只要是添加后在培养基中作为胱氨酸(L-胱氨酸)起作用则任何均可,从提高胱氨酸的可溶性的观点出发,优选在培养基中加入pH调整为10以上的含胱氨酸液。

[0201] 关于添加胱氨酸的时期和对象培养基没有特别限定,可以在培养开始前的初始培养基中添加,也可以在灌流培养基和/或培养开始后的初始培养基中添加。此外,胱氨酸可以对培养基一次添加,也可以分多次添加。胱氨酸优选在培养开始后在培养基中添加,进一步更优选在灌流培养基中添加。特别是在胱氨酸浓度高的情形中,通过培养开始后添加胱氨酸,可与更好的细胞生长有关。在培养开始后添加胱氨酸的情形中,例如,可以在培养开始1小时后添加,优选在培养开始6小时后、更优选在24小时后、进一步更优选在72小时后添加。添加时,可以将胱氨酸直接添加于培养基,也可以添加溶解/悬浮了胱氨酸的溶液/悬浮液或培养基。在灌流培养基中添加胱氨酸时,可以预先制备含胱氨酸培养基,将其作为灌流培养基使用。

[0202] 添加的胱氨酸的量在起到发明的效果的范围内没有特别限定,例如,列举添加后(添加后即刻)的培养基中的胱氨酸浓度为0.5mM～10mM的量。添加后(添加后即刻)的培养基中的胱氨酸浓度优选0.7mM～10mM或0.8mM～10mM、更优选1mM～10mM、进一步更优选1.5mM～10mM、特别优选2mM～10mM、特别更优选2.1mM～10mM、或2.5mM～10mM。胱氨酸添加量在这些范围内时,可以发挥特别优异的效果。在添加浓度比上述范围低的胱氨酸后、追加添加胱氨酸使得成为上述范围内也包括在上述实施方式中。

[0203] 本公开的实施方式中的胱氨酸在动物细胞中作为半胱氨酸源应用。因此,根据本

公开的某实施方式。可以限制培养基中的半胱氨酸源浓度。

[0204] 即,在本公开的又一实施方式中,初始培养基和/或灌流培养基的半胱氨酸源浓度例如0.1mM～3mM、优选0.1mM～2.1mM、更优选0.1mM～1.5mM。优选初始培养基的半胱氨酸源浓度是上述的范围内。更优选,初始培养基和灌流培养基的半胱氨酸源浓度是上述的范围。以在这些半胱氨酸源浓度的半胱氨酸源中追加的方式,进一步,可以以前述任一方式添加胱氨酸。

[0205] 在另一实施方式中,半胱氨酸源是胱氨酸以外的半胱氨酸源,胱氨酸以外的半胱氨酸源是上述浓度范围内。此时,除了上述浓度范围的胱氨酸以外的半胱氨酸源,可以添加胱氨酸。胱氨酸以外的半胱氨酸源优选半胱氨酸。

[0206] 在另一实施方式中,初始培养基和/或灌流培养基不含胱氨酸以外的半胱氨酸源,可以仅含有胱氨酸作为半胱氨酸源。

[0207] 由于半胱氨酸可对培养基稳定性给予不利影响,因此初始培养基中的半胱氨酸源浓度低在培养基稳定性方面有利。

[0208] 特别地,由于与其它培养方法(例如,流加培养(Fed-batch培养))相比,灌流培养的培养基使用量变得极多,因此需要预先制备大量的培养基,该大量调整时培养基稳定性的高度是非常有利的特性。即,该效果在灌流培养中可以说是特别期望的效果。

[0209] 本公开的实施方式中的“提高重组蛋白产生”或“重组蛋白产生提高”意味着,与在本公开外的条件实施时比较,重组蛋白产生提高,优选与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生提高。

[0210] 即,在本公开的又一实施方式中,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,重组蛋白产生或重组蛋白产生能力提高。如实施例所示,令人惊讶地,与添加以半胱氨酸换算与胱氨酸等摩尔浓度的半胱氨酸的情形比较,本公开的实施方式的方法中,重组蛋白产生或重组蛋白产生能力提高。

[0211] 胱氨酸是二个半胱氨酸以S-S键连接的,以半胱氨酸换算等摩尔浓度意味着胱氨酸浓度是半胱氨酸的一半的摩尔浓度。

[0212] 在本公开的又一实施方式中,重组蛋白产生或重组蛋白产生能力提高10％以上。重组蛋白产生或重组蛋白产生能力优选提高20％以上、更优选提高30％以上、进一步更优选提高40％以上。

[0213] 此外,作为本公开的又一实施方式可实现的重组蛋白的产生能力,例如,列举5～20g/L/日、优选5.5～20g/L/日、更优选6～20g/L/日、进一步更优选7～20g/L/日。作为重组蛋白的产生能力的其它指标,例如,列举20～200pg/细胞/日、优选24～150pg/细胞/日、进一步更优选25～120pg/细胞/日。此外,作为其它范围,可以列举20～40pg/细胞/日、23或24～40pg/细胞/日、或25～40pg/细胞/日。

[0214] 通过本公开的实施方式制备重组蛋白时,除前述步骤,还可以进一步包括各种追加步骤,它们也包括在本公开的实施方式中。作为追加步骤,列举纯化重组蛋白、化学或生物修饰重组蛋白。

[0215] 重组蛋白的纯化通常组合应用多个方法,优选应用色谱。特别地,在重组蛋白是抗体情形中,优选应用亲和色谱、蛋白A色谱等。

[0216] 作为重组蛋白的化学或生物修饰,列举二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸

化、酰胺化、通过保护基等衍生化、切断、或与标记成分或药物(毒素等)等结合,但不限于此。作为一个实例,与毒素等药物结合的抗体的制备方法也包括在本公开的重组蛋白的制备方法中,该情形中,作为追加步骤,可以进一步包括使抗体与药物结合。该情形中,与药物结合的抗体包括在本公开的重组蛋白中。

[0217] 在本公开的又一实施方式中,后述的柠檬酸铁铵涉及的实施方式与上述实施方式组合。

[0218] 即,在本公开的又一实施方式中,细胞培养基包含柠檬酸铁铵。关于应用柠檬酸铁铵的实施方式的细节,可以参考后述的说明,可以组合后述的各种实施方式。

[0219] 本公开的另一实施方式是用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂,其包含胱氨酸作为有效成分。该试剂通过提高灌流培养时的重组蛋白产生,可以提高重组蛋白制备的生产率。

[0220] 上述试剂的实施方式只要包含胱氨酸作为有效成分,则不限于特定方式,可以仅由胱氨酸组成,或者可以是包含载体、pH调整剂、培养基等的组合物的形式即可。此外,试剂可以是液体形式,也可以是固体例如粉末形式(包含颗粒形式)。

[0221] 上述试剂的实施方式以提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生为用途。用途优选在试剂的销售用小册子、使用说明书、与制品相关的网站等中记载。该情形中,用途可作为试剂的效果记载。此外,作为试剂的具体使用方法,列举培养前(培养基制备时)或培养中作为培养基添加物的使用。

[0222] 关于上述试剂的实施方式的细节和其又一实施方式,可以参考前述方法的实施方式的细节和各实施方式,其构成和细节也在本实施方式中引用。

[0223] 作为与上述试剂的实施方式有关的实施方式,列举胱氨酸作为用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂的使用、或胱氨酸用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的使用,这些实施方式也可以与上述试剂的实施方式同样地实施。

[0224] 关于迄今应用胱氨酸的实施方式进行说明,本发明人等发现,作为铁源的柠檬酸铁铵也有助于重组蛋白的生产率提高。

[0225] 即,本公开的某实施方式是用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。该方法中,灌流培养时的重组蛋白产生提高,重组蛋白制备的生产率提高。

[0226] 本公开的某实施方式是用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的每一细胞的重组蛋白产生的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。该方法中,通过灌流培养时的每一细胞的重组蛋白产生提高,重组蛋白制备的成本被抑制,生产率提高。

[0227] 本公开的实施方式中的“提高重组蛋白产生”或“重组蛋白产生提高”意味着,与在本公开之外的条件实施时比较,重组蛋白产生提高,优选与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,重组蛋白产生提高。

[0228] 即,在本公开的又一实施方式中,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,重组蛋白产生或重组蛋白产生能力提高。如实施例所示,令人惊讶地,与细胞培

养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,本公开的实施方式的方法中,重组蛋白产生或重组蛋白产生能力提高。

[0229] 在本公开的又一实施方式中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。与应用通常的柠檬酸亚铁钠作为铁源的情形比较,本实施方式产生优异的效果。

[0230] 在本公开的又一实施方式中,重组蛋白产生或重组蛋白产生能力提高10%以上。重组蛋白产生或重组蛋白产生能力优选提高20%以上、更优选提高30%以上、进一步更优选提高40%以上。

[0231] 此外,作为本公开的又一实施方式可实现的重组蛋白的产生能力,例如,列举5~20g/L/日、优选5.5~20g/L/日、更优选6~20g/L/日、进一步更优选7~20g/L/日。作为重组蛋白的产生能力的其它指标,例如,列举20~200pg/细胞/日、优选24~150pg/细胞/日、进一步更优选25~120pg/细胞/日。此外,作为其它范围,可以列举20~40pg/细胞/日、23或24~40pg/细胞/日、或25~40pg/细胞/日。

[0232] 在某实施方式中,提供用于灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。该方法中,可以培养具有重组蛋白的高产生能力的细胞。

[0233] 本公开的某实施方式是用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞。该方法中,通过降低灌流培养中的细胞增殖速度,重组蛋白制备的生产率提高。

[0234] 本公开的某实施方式可以提高重组蛋白的产生、同时抑制细胞增殖,该情形中,可以维持期望的重组蛋白的产生量,同时抑制所需培养基量等。此外,可以降低相同量的重组蛋白中的细胞来源的杂质,有助于纯化成本的削减和品质的提高。

[0235] 本公开的实施方式中的“降低细胞增殖速度”或“细胞增殖速度降低”意味着,与在本公开之外的条件实施时比较,细胞增殖速度降低,优选与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,细胞增殖速度降低。

[0236] 在本公开的又一实施方式中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。与通常的柠檬酸亚铁钠作为铁源比较,本实施方式产生优异的效果。

[0237] 在本公开的又一实施方式中,细胞增殖速度降低10%以上。细胞增殖速度优选降低20%以上、更优选降低30%以上、进一步更优选降低40%以上。

[0238] 本公开的某实施方式是用于减少具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量的方法,其包括用包含柠檬酸铁铵的细胞培养基灌流培养具有重组蛋白产生能力的动物细胞,前述排出的培养液的量是排液步骤中排出的培养液的量,排液步骤是从培养槽排出培养液、在前述培养槽中加入与该排出的培养液等量的新鲜培养基的步骤。该方法中,通过排出的培养液的量减少,重组蛋白制备的生产率提高。排出的培养液的减少通过抑制细胞增殖导致。

[0239] 本公开的实施方式中的“减少排出的培养液的量”或“排出的培养液的量减少”意味着,与在本公开之外的条件实施时比较,具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量减少。作为排出的培养液的量的指标,应用排液步骤全体或其中一定时间排出的培养液的总量、单位时间内排出的培养液的量(培养液的排出速度),但不限于

此。

[0240] 本公开的某实施方式可以提高重组蛋白的产生,同时减少排出的培养液的量,该情形中,可以维持期望的重组蛋白的产生量,同时抑制所需培养基量等。此外,关于分泌至细胞外的重组蛋白,通过排出的培养液的量减少,以更高浓度生产成为可能,在其后的品质、纯化成本方面也有利。

[0241] 与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,本公开的又一实施方式减少具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量。本实施方式中,如实施例所示,令人惊讶地,与细胞培养基包含其它铁源代替柠檬酸铁铵的情形比较,排出的培养液的量减少。

[0242] 在本公开的又一实施方式中,其它铁源是柠檬酸亚铁钠。与通常的柠檬酸亚铁钠作为铁源比较,本实施方式产生优异的效果。

[0243] 在本公开的又一实施方式中,排出的培养液的量减少10%以上。排出的培养液的量优选减少20%以上、更优选减少30%以上、进一步更优选减少40%以上。

[0244] 本公开的实施方式中的柠檬酸铁铵也可表述为柠檬酸铁(III)铵或柠檬酸铁铵。柠檬酸铁铵在初始培养基和/或灌流培养基中添加。添加时,可以将柠檬酸铁铵直接添加于培养基,也可以添加溶解/悬浮了柠檬酸铁铵的溶液/悬浮液或培养基。

[0245] 添加的柠檬酸铁铵的量在产生发明的效果的范围内没有特别限定,例如,列举添加后的培养基中来自柠檬酸铁铵的铁浓度(铁离子浓度)为10mg/L～300mg/L的量。本公开中,有时应用例如"给予10mg/L～300mg/L的铁浓度的量"的表述来表示这样的铁浓度。铁浓度优选20mg/L～200mg/L或30mg/L～200mg/L、更优选40mg/L～200mg/L或40mg/L～150mg/L、进一步更优选50mg/L～200mg/L或50mg/L～150mg/L。柠檬酸铁铵在这些范围内时,可以发挥特别优异的效果。

[0246] 在另一实施方式中,关于添加的柠檬酸铁铵的量,在产生发明的效果的范围内没有特别限定,例如,细胞培养基包含50mg/L～1500mg/L的柠檬酸铁铵。柠檬酸铁铵的浓度优选100mg/L～1000mg/L或150mg/L～1000mg/L、更优选200mg/L～1000mg/L或200mg/L～750mg/L、进一步更优选250mg/L～1000mg/L或250mg/L～750mg/L。柠檬酸铁铵在这些范围内时,可以发挥特别优异的效果。

[0247] 在某实施方式中,细胞培养基除上述的柠檬酸铁铵还可以包含其它铁源。

[0248] 包含其它铁源时,其量没有特别限定,作为示例的铁源的量,列举包含柠檬酸铁铵的培养基中的铁浓度为1mg/L～400mg/L、10mg/L～300mg/L、20mg/L～200mg/L、30mg/L～200mg/L、40mg/L～200mg/L、40mg/L～150mg/L、50mg/L～200mg/L或50mg/L～150mg/L的量。

[0249] 关于上述的柠檬酸铁铵涉及的实施方式的细节和又一实施方式,可以参考前述胱氨酸涉及的实施方式的细节和具体实施方式,其构成和细节也在柠檬酸铁铵涉及的实施方式中引用。

[0250] 例如,关于柠檬酸铁铵涉及的实施方式中的重组蛋白、具有重组蛋白产生能力的动物细胞、灌流培养、或重组蛋白产生量的增加,可以参考前述的胱氨酸涉及的实施方式中的重组蛋白、具有重组蛋白产生能力的动物细胞、灌流培养、或重组蛋白产生量的增加的说明。

[0251] 本公开的另一实施方式是用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培

养中的重组蛋白产生的试剂,其包含柠檬酸铁铵作为有效成分。该试剂通过提高灌流培养时的重组蛋白产生,可以提高重组蛋白制备的生产率。

[0252] 此外,本公开的另一实施方式是用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度的试剂、或用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量的试剂,其包含柠檬酸铁铵作为有效成分。

[0253] 上述试剂的实施方式只要包含柠檬酸铁铵作为有效成分,则不限于特定方式,可以仅由柠檬酸铁铵组成,或者可以是包含载体、pH调整剂、培养基等的组合物的形式即可。此外,试剂可以是液体形式,也可以是固体、例如粉末形式(包括颗粒形式)。

[0254] 上述试剂的实施方式分别以提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生、降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度、或减少具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量为用途。用途优选在试剂的销售用小册子、使用说明书、与制品相关的网站等中记载。该情形中,用途可作为试剂的效果记载。此外,作为试剂的具体使用方法,列举培养前(培养基制备时)或培养中作为培养基添加物的使用。

[0255] 关于上述实施方式的细节和又一具体实施方式,可以参考前述方法的实施方式的细节和各实施方式(包括引用胱氨酸涉及的实施方式的部分),其构成和细节也在本实施方式中引用。

[0256] 作为与上述试剂的实施方式有关的实施方式,列举:柠檬酸铁铵作为用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的试剂的使用、柠檬酸铁铵用于提高具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的重组蛋白产生的使用、柠檬酸铁铵作为用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度的试剂的使用、柠檬酸铁铵用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中的细胞增殖速度的使用、柠檬酸铁铵作为用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量的试剂的使用、或柠檬酸铁铵用于降低具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养中排出的培养液的量的使用,这些实施方式也可以与上述试剂的实施方式同样地实施。

[0257] 本公开的另一实施方式是用于具有重组蛋白产生能力的动物细胞的灌流培养的细胞培养基,其包含胱氨酸和柠檬酸铁铵。该培养基通过发挥上述胱氨酸涉及的实施方式和柠檬酸铁铵涉及的实施方式的作用和效果双方,可以提高重组蛋白制备的生产率。培养基可以用作初始培养基,也可以用作灌流培养基。此外,培养基包括液体培养基和粉末培养基双方。

[0258] 关于上述实施方式的细节和又一具体实施方式,可以参考前述方法的实施方式的细节和各实施方式(包括引用胱氨酸涉及的实施方式的部分),其构成和细节也在上述实施方式中引用。

[0259] 另外,通过上述实施方式等说明的各方法等不限定本发明,是意图示例而公开的。本发明的技术的范围由权利要求范围的记载确定,本领域技术人员可在权利要求范围内记载的发明的技术范围内进行各种设计变更。

[0260] 例如,在某实施方式中,提供本公开的实施方式中制备的重组蛋白。此外,另一实施方式涉及:包含该重组蛋白的药物组合物或药物、该重组蛋白在药物制备中的使用、或者

包括施用该重组蛋白的疾病的治疗方法。此外,另一实施方式也涉及药物组合物或药物制剂的制备方法,其包括本公开的实施方式涉及的任一步骤、或本公开的实施方式涉及的任一方法,包括由其得到重组蛋白,进一步包括混合该重组蛋白和载体。

实施例

[0261] 以下,通过实施例说明本发明,但这些实施例不限定本发明。另外,除非特别说明,实施例中提及的市售试剂/机器等按照制造商的使用说明或规定方法使用。

[0262] [材料和方法]

[0263] (细胞)

[0264] 关于所有的实验,使用产生人源化IgG抗体的CHO细胞株(DXB-11株;G.Urlaub et al,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220,1980)。

[0265] (细胞培养条件)

[0266] 灌流培养

[0267] 在总容量2L的生物反应器中加入化学定义的细胞培养基,向其中接种上述CHO细胞株,以培养液量1L、37℃开始培养。DO控制为50％、pH控制为7.15±0.05。从培养第1日,在化学定义的灌流培养基中,应用具有2.0μm的中空纤维滤器(Repligen,MA,US)的交替切向流灌流过滤系统(Refine Technologies,Hanover,NJ),以每1日1.0～5.0培养量实施灌流。

[0268] 重复培养

[0269] 将足够量的上述CHO细胞株培养液离心除去上清后,悬浮于化学定义的灌流培养基使得成为$100x10^5$细胞/mL,用125mL三角烧瓶(Corning,NY,US),以培养液量20mL、37℃开始培养。至培养第4日每1日离心培养液除去上清后,再悬浮于化学定义的新鲜灌流培养基使得成为$100x10^5$细胞/mL,以培养液量20mL、37℃继续培养。

[0270] (分析方法)

[0271] 活细胞密度/生存率测定应用Vi-CELL(Beckman Coulter,CA,US)测定,效价将培养液的离心上清应用Protein A-HPLC法(基于从氨基酸序列计算的吸光系数和A280的峰面积计算)测定。

[0272] [实施例1]

[0273] 通过半胱氨酸和胱氨酸的半胱氨酸源增强评价

[0274] 本例证明,与增强半胱氨酸作为半胱氨酸源相比,增强胱氨酸提高生产率。应用条件(1)(包含3.379mM半胱氨酸的灌流培养基)、条件(2)(包含5.333mM半胱氨酸的灌流培养基)、条件(3)(包含1.942mM半胱氨酸、1.696mM胱氨酸的灌流培养基),通过灌流培养(自培养开始72时间后添加胱氨酸)实施评价。另外,将浓缩1.25倍的CELLiST(注册商标)Basal media(味之素株式会社:BASAL10)和CELLiST(注册商标)Feed media(味之素株式会社:FEED2)以94:6混合的那种作为细胞培养初始培养基和灌流培养基使用。图1显示结果。与条件(1)相比,增强半胱氨酸源的条件(2)、条件(3)均提高生产率,令人惊讶地,以半胱氨酸换算相同的mol浓度增强的条件(2)、条件(3)中,作为胱氨酸增强的条件(3)进一步提高生产率。

[0275] [实施例2]

[0276] 通过柠檬酸亚铁钠和柠檬酸铁铵的铁源增强评价

[0277] 本例证明,通过增强柠檬酸铁铵作为铁源,生产率大幅提高,另一方面,增殖性被抑制。细胞培养初始培养基和灌流培养基以不含铁源的形式制备,通过添加相应量的柠檬酸亚铁钠和柠檬酸铁铵各浓缩液,调整铁终浓度。另外,作为细胞培养初始培养基和灌流培养基使用CELLiST(注册商标)Basal media(味之素株式会社:BASAL10)。评价用重复培养实施。结果示于图2。通过增强铁源提高生产率,令人惊讶地,作为柠檬酸铁铵增强的一方生产率进一步提高,另一方面,增殖性钝化。

[0278] 另外,本公开中引用的专利、专利申请和出版物的公开内容其全体通过参考在本公开中引用。

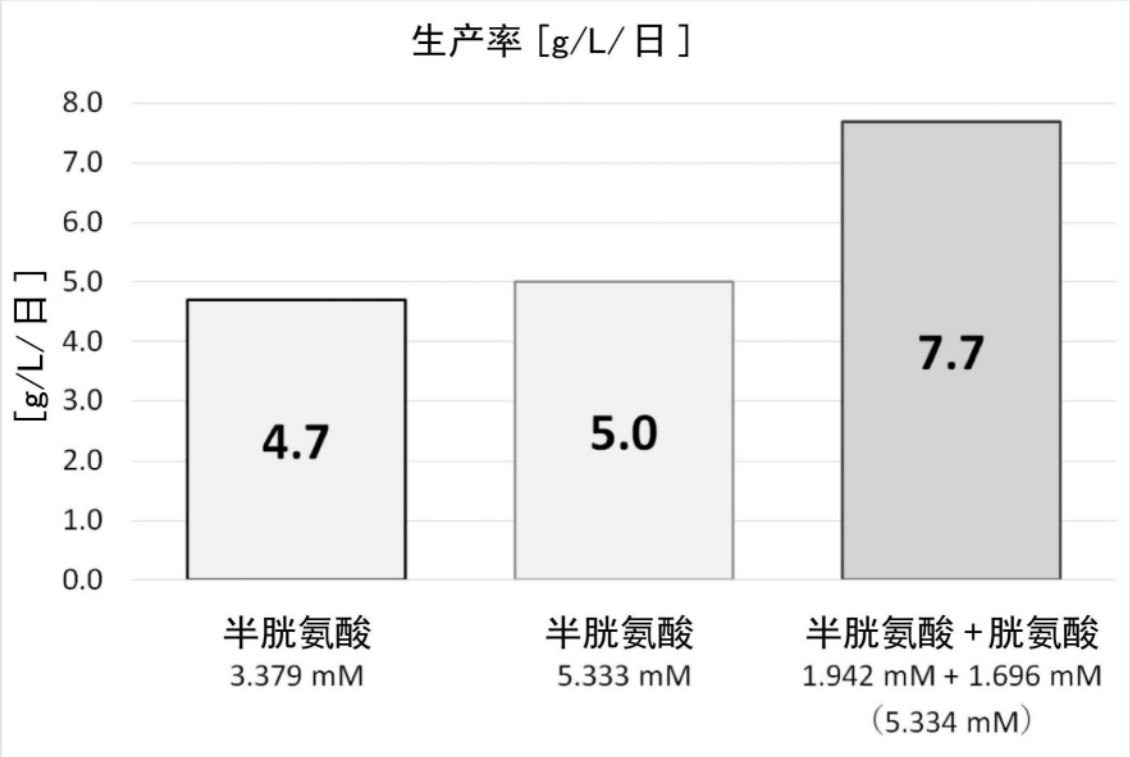

生产率 [g/L/日]
[g/L/日]
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
4.7
5.0
7.7
半胱氨酸
3.379 mM
半胱氨酸
5.333 mM
半胱氨酸 + 胱氨酸
1.942 mM + 1.696 mM
(5.334 mM)

图1

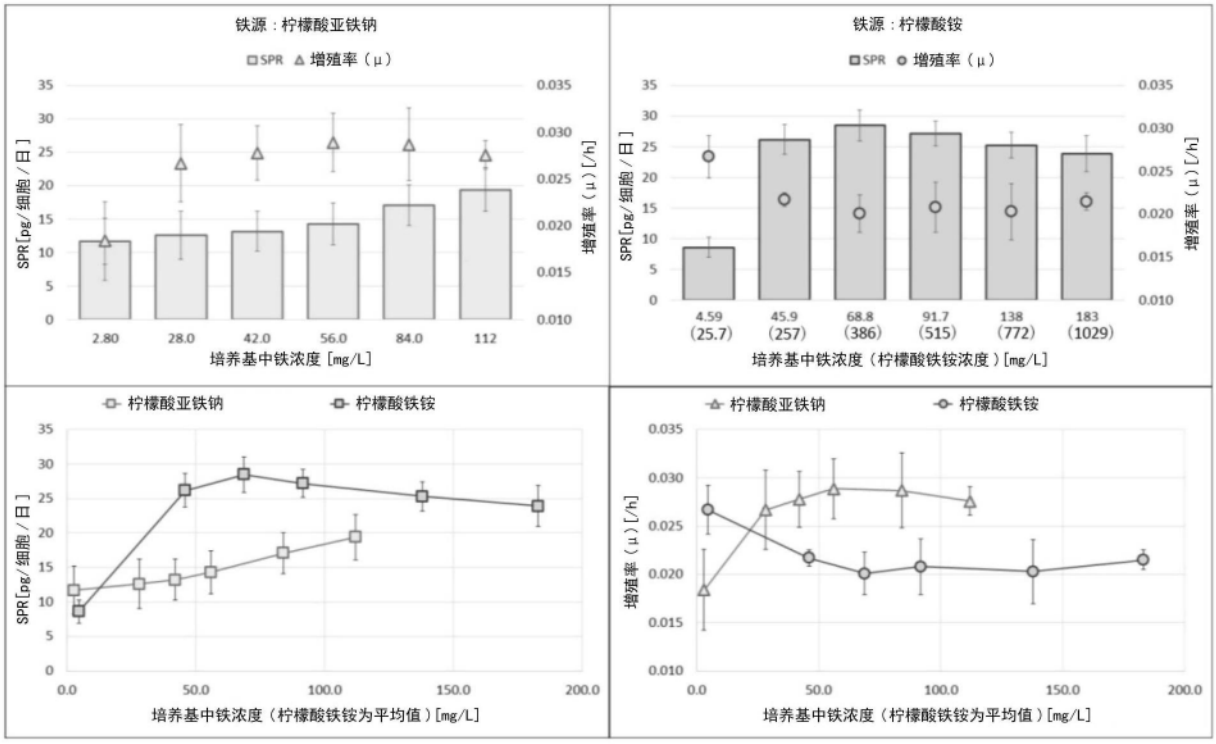

铁源：柠檬酸亚铁钠
SPR 增殖率（μ）
SPR[pg/细胞/日]
增殖率（μ）[/h]
2.80
28.0
42.0
56.0
84.0
112
培养基中铁浓度 [mg/L]
铁源：柠檬酸铵
SPR 增殖率（μ）
4.59 (25.7)
45.9 (257)
68.8 (386)
91.7 (515)
138 (772)
183 (1029)
培养基中铁浓度（柠檬酸铁铵浓度）[mg/L]
柠檬酸亚铁钠
柠檬酸铁铵
培养基中铁浓度（柠檬酸铁铵为平均值）[mg/L]

图2