

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Juni 2004 (10.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/048556 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 5/06**,
C12P 21/02, 21/08

[DE/DE]; Weststr. 33a, 52441 Linnich (DE). **ESSERS, Ruth** [DE/DE]; Schönauer Friede 152, 52072 Aachen (DE). **ZÖRNER, Kerstin** [DE/DE]; Im Kromsfeld 28, 51789 Lindlar (DE). **GÄTGENS, Jochen** [DE/DE]; Elsenkamp 39, 52428 Jülich (DE). **NOLL, Thomas** [DE/DE]; Kopernikusstrasse 16, 52428 Jülich (DE). **WANDREY, Christian** [DE/DE]; Wolfshovener Str. 139, 52428 Jülich (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003693

(74) Gemeinsamer Vertreter: **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH**; Fachbereich Patente, 52425 Jülich (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. November 2003 (07.11.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 55 508.7 27. November 2002 (27.11.2002) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

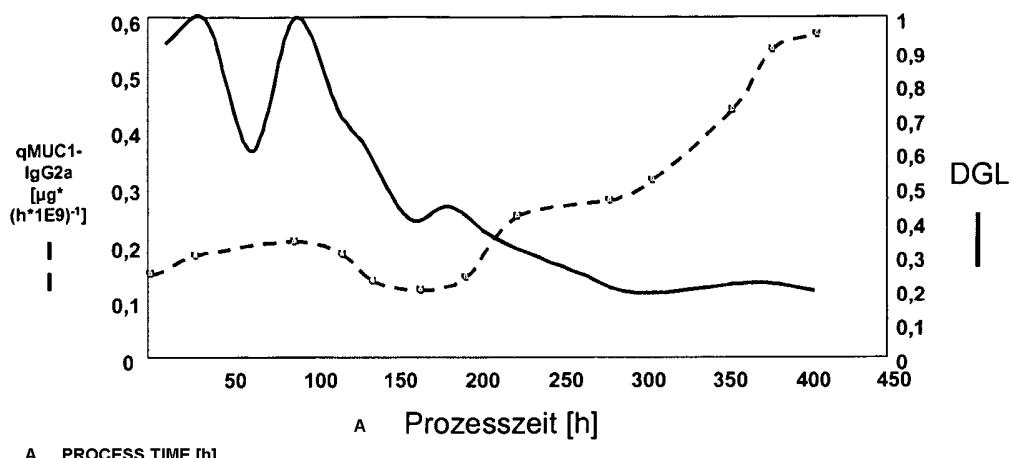
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH** [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LINK, Thomas**

(54) Title: METHOD FOR CULTURING CELLS IN ORDER TO PRODUCE SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN ZUR PRODUKTION VON SUBSTANZEN



A... PROCESS TIME [h]

WO 2004/048556 A1

(57) Abstract: The invention relates to a method for culturing cells in order to produce substances. According to the invention, the culturing of a cell line that produces substances ensues while supplying a nutrient medium in such a manner whereby setting a glucose limitation in the culture solution. The extent of glucose limitation DGL equals $q\text{Glc}/q\text{Glc}_{\max}$ ($q\text{Glc}$ = currently observed specific glucose consumption rate; $q\text{Glc}_{\max}$ equals a specific glucose consumption rate maximally known for these cells). DGL lies between the limits of 0 and 1, whereby 0 represents a complete limitation and 1 represents no limitation whatsoever i.e. a complete surplus of glucose. According to the invention, the DLG is greater than or equal to the DGL that leads to the exclusive preservation of the cell and is = 0.5.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen zur Produktion von Substanzen. Erfundungsgemäß erfolgt die Kultivierung einer Substanzen produzierenden Zelllinie unter Zufuhr eines Nährmediums in der Weise, daß sich in der Kulturlösung eine Glukoselimitierung einstellt. Der Grad der Glukoselimitierung DGL = $q\text{Glc}/q\text{Glc}_{\max}$ ($q\text{Glc}$ = momentane beobachtete spezifische Glukoseverbrauchsrate; $q\text{Glc}_{\max}$ = maximal für diese Zellen bekannten spezifischen Glukoseverbrauchsrate). DGL liegt in den Grenzen zwischen 0 und 1, wobei 0 völlige Limitierung bedeutet und 1 bedeutet keinerlei Limitierung, bzw. völliger Glukoseüberschuß. Erfundungsgemäß ist der DLG größer gleich dem DGL, welcher zur ausschließlichen Erhaltung der Zelle führt und $\leq 0,5$.



Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur Kultivierung von Zellen zur
Produktion von Substanzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen zur Produktion von Substanzen nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Bei der Produktion von Substanzen, insbesondere Proteinen, werden Zellkulturen in fermentativen Prozessen eingesetzt. Es können dabei Prozesse unterschieden werden, bei denen die Zellkulturen genetisch unverändert sind und eigene Stoffwechselprodukte bilden und bei denen die Organismen genetisch so modifiziert sind, daß sie entweder eigene Substanzen, beispielsweise Proteine, vermehrt, oder fremde Substanzen beispielsweise Proteine produzieren. Die produzierenden Organismen werden dabei mit einem Nährmedium versorgt, welches das Überleben der Organismen garantiert und die Produktion der gewünschten Zielverbindung ermöglicht. Für diese Zwecke sind eine Vielzahl von Kulturmedien bekannt, die eine Fermentation ermöglichen. Einer der wichtigsten Bestandteile der Kulturmedien ist die Glukose. Nach dem Stand der Technik ist man regelmäßig bemüht in einem Fermentationsansatz eine Mindestkonzentration an Glukose aufrecht zu erhalten, um die Ausbeute an Zielverbindung zu optimieren. Die japanische Patentanmeldung 001 101 882 A offenbart ein Kultivierungsverfahren für Säugetierzellen bei dem eine Mindestkonzentration von 0,2 mmol/l an Glukose aufrechterhalten wird. Die US 544 39 68 offenbart ein Kultivierungsverfahren,

bei dem eine Glukoselimitierung erfolgt. Das Verfahren führt jedoch nicht zu einer höheren spezifischen Produktionsrate der Zellen gegenüber der nicht limitierenden Fütterung.

5

Es ist die Aufgabe der Erfindung ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen zu schaffen mit dem die Produktivität einer einzelnen Zelle an Produkt gesteigert wird und bei dem hohe Zelldichten ermöglicht werden. Es soll eine hohe Raum-/Zeit-Ausbeute an Produkt ermöglicht werden.

10

Das Verfahren soll besonders einfach in der Durchführung, mit minimalem Meß- und Regelaufwand verbunden, und besonders wirtschaftlich sein.

15

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe überraschenderweise dadurch gelöst, daß die Kultivierung einer, Substanzen produzierende, Zelllinie unter Zufuhr eines Nährmediums in der Weise erfolgt, daß sich in der Kulturlösung eine Glukoselimitierung einstellt. Der Grad der Glukoselimitierung kann definiert werden, als das Verhältnis der beobachteten spezifischen Glukoseverbrauchsrate zur maximal für diese Zellen bekannte spezifische Glukoseverbrauchsrate. Der Grad der Glukoselimitierung $DGL = qGlc/qGlc_{max}$ ($qGlc$ = momentane beobachtete, spezifische Glukoseverbrauchsrate; $qGlc_{max}$ = maximal für diese Zellen bekannten spezifischen Glukoseverbrauchsrate). DGL liegt in den Grenzen zwischen $DGL_{Erhaltung}$ und 1, wobei $DGL_{Erhaltung}$ völlige Wachstumslimitierung bedeutet und 1 bedeutet keinerlei Limitierung bzw. völliger Glukoseüberschuß.

20

25

30

Zusammen mit der Glukoselimitierung erfolgt ein kontinuierlicher Rückgang der Restglukosekonzentration auf eine stationäre Konzentration in der Kulturlösung, die größer 0 mmol/l, jedoch kleiner als 1 mmol/l, bevorzugt 5 kleiner als 0,5 mmol/l ist. Es ist zu beobachten, daß mit Sinken des DGL ein weiterer Anstieg der Lebendzell-dichte im Kulturgefäß erfolgen kann. Mit zunehmender Glukoselimitierung konvergiert die Zelldichte dann gegen einen Maximalwert. Daraus resultiert, daß der Grad 10 der Glukoselimitierung gegen einen minimalen Wert konvergiert, dabei ist der DGL erfindungsgemäß größer oder gleich dem DGL, welcher zur Erhaltung der Zelle führt, (maintenance Stoffwechsel)

DGL_{Erhaltung} = qGlc_{Erhaltung}/qGlc_{max} (qGlc_{Erhaltung}= bei reinem 15 Erhaltungsstoffwechsel beobachtete spezifische Glukose-verbrauchsrate; qGlc_{max} = maximal für diese Zellen be-kannten spezifischen Glukoseverbrauchsrate), und klei-ner 0,5, vorzugsweise kleiner 0,4, besonders bevorzugt kleiner 0,3.

20 Charakteristisch ist jedoch, daß mit der Abnahme der Glukosekonzentration keine Abnahme der Zellkonzentrati-on in der Lösung erfolgt. Mit zunehmender Glukoselimi-tierung, also bei sinkendem DGL-Wert, erhöht sich die 25 spezifische Produktivität einer Zelle. Da die Lebend-zelldichte im Kulturgefäß nicht absinkt, führt dies zu einer Erhöhung der Raum-Zeit Ausbeute. Mit Eintreten der Glukoselimitierung geht phänomenologisch eine Er-niedrigung der spezifischen Laktatbildungsraten einher. 30 Die Laktatbildungsraten konvergiert gegen einen Minimal-wert. Dies führt dazu, daß die Restlaktatkonzentration im Kulturgefäß absinkt, maximal gegen 0 geht. Mit der

Glukoselimitierung kommt es also zu einer Umstellung des Zellmetabolismus.

Wichtig ist dabei, daß es vor Einsetzen der Glukoselimitierung zu keiner weiteren Limitierung durch andere Substrate kommt. Daher muß das Wachstumsmedium so beschaffen sein, daß Glukose zuerst limitiert ist.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Raum-/Zeit-Ausbeute bei gegebener Zelldichte erhöht.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird die pro Zelle zur Verfügung stehende Menge an Glukose derart vermindert, daß die Glukose überwiegend in den Erhaltungsstoffwechsel und verbunden damit das Produkt und weniger in Zellwachstum eingeht. Das erfindungsgemäße Ver-

fahren bedarf dabei nicht einer Regelung der Glukosezufütterung, so daß das Verfahren besonders einfach ist, da auf eine aufwendige Glukoseregelung verzichtet werden kann. Dadurch, daß ein geringer Medienzufluß nötig ist, werden Kosten für Glukose gespart, da weniger Glu-

kose benötigt wird. Zudem wird eine sehr hohe Produktkonzentration erreicht. Dies kann zur Senkung der Aufarbeitungskosten führen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht insbesondere die Steigerung der Produktion von Proteinen, ohne daß eine Zelllinie für die Umsetzung

des erfindungsgemäßen Verfahrens zusätzlich genetisch verändert werden muß. Die Erhöhung des Produkttiters ermöglicht die Produktion einer gewünschten Menge an Produkten in einem kleineren Kultivierungsvolumen, was zu geringeren Investitionskosten führt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit folgenden Verfahrensschritten durchgeführt werden:

Die Zellen sollen vorzugsweise in kontinuierlicher Verfahrensweise mit Zellrückhaltung, z. B. Spinfilter (Perfusionskultur) kultiviert werden. Dabei sind alle gängigen Arten von Kulturgefäßen, wie zum Beispiel
5 Rührkessel, und Zellrückhaltemechanismen, wie beispielsweise Spinfilter, Ultraschall oder Settler geeignet. Vorzugsweise sollte das Kultursystem hohe Zelldichten ermöglichen. Vorzugsweise wird eine Zellrückhaltung realisiert, damit die Zelldichte bei Auftreten
10 der Glukoselimitierung nicht absinken kann. Dies führt dazu, daß bei steigender Lebendzelldichte und gleichbleibender Glukosezufütterung, der DGL weiter verringert wird. Die hohe Zelldichte ermöglicht ein Absinken des DGL unter einen Wert von 0,4 bei einer eingestellten Durchflußrate in einer Größenordnung der maximalen
15 Wachstumsrate. So können beispielhaft Durchflußraten von 0,03 - 0,05 h⁻¹ für die verwendete CHO MUC2-GFP-C-term Zelle, sowie die verwendete CHO/MUC1-IgG2a PH3744/25 Zelle angewendet werden.

Um eine Verringerung des DGL zu erreichen, kann die Fütterungsstrategie mit Glukose demnach wie folgt erfolgen: Die Menge an zugefütterter Glukose wird nicht mit zunehmender Lebendzelldichte erhöht, um eine Glukoselimitierung zu vermeiden. Vielmehr wird die Menge an zugefütterter Glukose während des Prozesses von Beginn an konstant gehalten. Dabei sollte die Menge an zugefütterter Glukose so gewählt sein, daß der DGL die erforderlichen Werte unterschreitet, nämlich DGL kleiner
25 ≤ 0,5, vorzugsweise ≤ 0,4, besonders bevorzugt ≤ 0,3. Daraus resultiert, daß die Menge zugefütterter Glukose vorzugsweise nicht größer als 50 %, besonders bevorzugt nicht größer als 35 % dessen ist, was die im System bei
30

herkömmlicher, nicht glukoselimitierter Prozeßführung zu erwartende Lebendzellzahl maximal verbrauchen kann. Nach Umstellung des Zellmetabolismus (Laktatstoffwechsel und Produktivität) kann die Menge zugefütterter Glukose 5 langsam erhöht werden, sollte dabei jedoch nicht einen DGL von größer als 0,5, vorzugsweise größer als 0,4 ermöglichen. Dies führt zu einer weiteren Erhöhung der Lebendzelldichte bei gleichbleibend hoher Produktivität und damit erhöhter Raum-/Zeit-Ausbeute. Die Menge zugeführter Glukose kann in einem kontinuierlichen Prozeß 10 durch die Medienzuflußrate und die Glukosekonzentration im Zufütterungsmedium beeinflußt werden. Maßgeblich ist, daß der Massenfluß an zugeführter Glukose während des Prozesses nicht oder nur in solchem Maße erhöht wird, daß der DGL einen Wert von kleiner 0,5, vorzugsweise kleiner 0,4 erreicht oder unterschreitet und dieser dann nicht mehr überschritten wird.

20 Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Im Folgenden soll die Erfindung in ihren Einzelheiten dargestellt werden.

25 Die Figuren zeigen beispielhafte Versuchsergebnisse.

Es zeigt:

Fig.1: Zunahme der vitalen Zellzahl [ml^{-1}] und Darstellung der Mediendurchflußrate [h^{-1}] gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC1-IgG2a aus CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 Zellen im Perfusionssreaktor.

Fig.2: Spezifische Produktivität an MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{h} \cdot \text{E}9$ Zellen]) und DGL gegen die Prozeßzeit im Perfusionsreaktor.

5 Fig.3: Zunahme der vitalen Zellzahl [ml^{-1}] und mM Restglukose, aufgetragen gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC1-IgG2a aus CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 Zellen im Perfusionsreaktor.

10 Fig.4: Glukose- und Laktatkonzentration sowie Konzentration von Glukose im Medienzulauf [mmol/l], aufgetragen gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC1-IgG2a aus CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 Zellen im Perfusionsreaktor.

15

Fig.5: Zunahme der Konzentration an MUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{ml}$] und qMUC1-IgG2a [$\mu\text{g}/\text{h} \cdot \text{E}9$ Zellen]) gegen die Zeit [h] für die Produktion von MUC1-IgG2a aus CHO MUC1/IgG2a PH3744/25 Zellen im Perfusionsreaktor.

20
25 Fig.6: Zunahme der vitalen Zellzahl [ml^{-1}] und Darstellung der Mediendurchflußrate [h^{-1}] gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC2-GFP-C-term aus CHO MUC2-GFP-C-term Zellen im Perfusionsreaktor.

30

Fig.7: Spezifische Produktivität an MUC2-GFP-C-term [nmol/h*E9 Zellen]) und DGL gegen die Prozeßzeit im Perfusionsreaktor.

5

Fig.8: Zunahme der vitalen Zellzahl [ml^{-1}] und Restglukose [mM], aufgetragen gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC2-GFP-C-term aus CHO MUC2-GFP-C-term Zellen im Perfusionsreaktor

10

Fig.9: Glukose- und Laktatkonzentration sowie Konzentration von Glukose im Medienzulauf [mmol/l], aufgetragen gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC2-GFP-C-term aus CHO MUC2-GFP-C-term Zellen im Perfusionsreaktor

15

Fig.10 Zunahme der Konzentration an MUC2-GFP-C-term [nM] und qMUC2-GFP-C-term [nmol/h*E9 Zellen]) gegen die Zeit [h] für die Produktion von MUC2-GFP-C-term aus CHO MUC2-GFP-C-term Zellen im Perfusionsreaktor.

20

Weiterhin zeigt Tabelle 1 die Versuchsdaten aus der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit der CHO MUC1/IgG2a PH 3744/25 Zelle.

25

In Tabelle 2 sind die Versuchsdaten aus der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit der CHO MUC2-GFP-C-term Zelle dargestellt.

5 Die erfindungsgemäße Verfahrensweise kann mit verschiedenen Produktionszelllinien durchgeführt werden. Die Zelllinien können als Wildtyp oder als genetisch modifizierte, rekombinante Zellen eingesetzt werden. Die genetische Modifikation kann beispielsweise durch Insertion von zusätzlichen Genen des gleichen Organismus oder eines anderen Organismus in die DNA, oder einen Vektor erfolgen, oder in der Verstärkung der Aktivität bzw. Expression eines Gens durch Einbringen eines wirksameren Promotors, zum Beispiel aus CMV. Die Gene können für verschiedene Proteine kodieren, beispielsweise für Proteine, wie Fusionsproteine oder für Antikörper.

10

15

Folgende Zelllinien können beispielhaft genannt werden: Säugerzellen, wie CHO Zelllinien, wie zum Beispiel

20 CHO-K1, BHK, wie BHK-21, Hybridoma, NS/0, andere Myelomazellen und Insektenzellen oder andere höhere Zellen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Zellen, die nicht vorzugsweise wachstumsgekoppelt produzieren.

25 Eine rekombinante CHO Zelllinie deren Produktivität mit der erfindungsgemäßen Verfahrensweise gesteigert werden kann ist die Zelllinie CHO MUC1/IgG2a, PH 3744/25, mit der das Glycoprotein MUC1-IgG2a sekretiert werden kann.

30 Eine weitere CHO Zelllinie, nämlich CHO MUC2-GFP-C-term, ist befähigt ein Fusionsprotein MUC2-GFP-C-term gesteigert zu sekretieren, wenn sie der erfindungsgemäßen Verfahrensweise unterzogen wird.

Als Kulturmedium kann prinzipiell jedes glukosehaltige Medium eingesetzt werden, welches bezüglich anderer Komponenten nicht limitierend ist. Beispielhaft kann ProCHO4-CDM genannt werden. Es können auch Medien basierend auf bekannten Rezepturen, wie zum Beispiel IMDM, DMEM oder Ham's F12 eingesetzt werden, die so auf die erfindungsgemäße Verfahrensweise optimiert wurden, daß lediglich Glukoselimitierung auftritt. Dies kann zum Beispiel dadurch erreicht werden, daß andere Komponenten im Verhältnis zur Glukose höher konzentriert werden. Generell ist es auch möglich die Glukose separat vom Medium zu dosieren.

Der PH Bereich liegt vorzugsweise zwischen 6,7 - 7,7, besonders bevorzugt zwischen 7 - 7,3. Jedoch sind auch andere pH-Bereiche denkbar.

Der Temperaturbereich liegt vorzugsweise zwischen 35 °C - 38,5 °C, besonders bevorzugt bei 37 °C für CHO MUC1- IgG2a. Es sind aber auch andere Temperaturbereiche denkbar, wie beispielsweise < 35 °C, bei denen es nicht zur irreversiblen Zerstörung des Produkts kommt.

Mit dem erfindungsgemäßen Kultivierungsverfahren können Substanzen, wie Glykoproteine, Fusionsproteine, Antikörper, Proteine im Allgemeinen produziert werden, von denen beispielhaft MUC1-IgG2a, MUC2-GFP-C-term, EPO, Interferone, Cytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, PA, Immunglobuline oder Fragmente von Immunglobulinen, genannt werden können.

Figur 1 zeigt den Verlauf der Lebendzelldichte (cv) an CHO/MUC1-IgG2a Zellen und der Mediendurchflußrate (D) gegen die Prozeßzeit (h) im Perfusionsreaktor. In ihr ist:

5

- Die Mediendurchflußrate (1/h) und
- die Lebendzelldichte (1/ml).

Figur 2 zeigt die spezifische Produktivität an

10 MUC1-IgG2a (qMUC1-IgG2a) und DGL gegen die Prozeßzeit im Perfusionsreaktor. In ihr ist:

- Die spezifische Produktivität ($\mu\text{g}/\text{hE}9$ Zellen),
— DGL(degree of glucose limitation)

15

Figur 3 zeigt eine Graphik, in der auf der linken Seite die vitale Zellzahl [ml^{-1}] und auf der rechten Seite die Konzentration der Restglukose [mM] gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC1-IgG2 in CHO MUC/IgG2a

20 PH3744/25 aufgetragen ist. In ihr ist:

- vitale Zellzahl und
 Glukose.

25

In Figur 4 ist die Glukose- und Laktatkonzentration sowie die Glukosekonzentration im Medienzulauf [mmol/l] gegen die Prozeßzeit [h] aufgetragen. In ihr sind die Kurven mit

30

- Laktatkonzentrationskurven und
 Glukosekonzentrationskurven.

× 23,9mmol/l Konzentration an Glukose im Medienzulauf
(Durchflußrate von D = 0,035 h⁻¹).

5 In Figur 5 ist die Konzentration von MUC1-IgG2a [µg/ml] auf der linken Seite sowie qMUC1-IgG2a [µg/(h*E9 Zellen)] auf der rechten Seite der Graphik gegen die Zeit [h] aufgetragen. In ihr sind:

- 10 ● q spezifische Produktivität an MUC1-IgG2a (µg/hE9 Zellen) und
◊ Konzentration an MUC1-IgG2a (mg/l).

15 Figur 6 zeigt den Verlauf der Lebendzelldichte (cv) an CHO/MUC2-GFP Zellen und der Mediendurchflußrate (D) gegen die Prozeßzeit (h) im Perfusionsreaktor. In ihr ist:

- 20 ■ Die Mediendurchflußrate (1/h) und
● die Lebendzelldichte (1/ml).

Figur 7 zeigt die spezifische Produktivität an MUC2-GFP-C-term (qMUC2-GFP-C-term) und DGL gegen die Prozeßzeit im Perfusionsreaktor. In ihr ist:

- 25 ----- Die spezifische Produktivität (nmol/hE9 Zellen),
———— DGL(degree of glucose limitation)

30 Figur 8 zeigt eine Graphik, in der auf der linken Seite die vitale Zellzahl [ml⁻¹] und auf der rechten Seite die Konzentration der Restglukose [mM] gegen die Prozeßzeit [h] für die Produktion von MUC2-GFP-C-term in

CHO MUC/IgG2a PH3744/25 aufgetragen ist. In ihr ist:

- vitale Zellzahl und
- Glukose.

5

In Figur 9 ist die Glukose- und Laktatkonzentration sowie die Glukosekonzentration im Medienzulauf [mmol/l] gegen die Prozeßzeit [h] aufgetragen. In ihr sind die Kurven mit

10

- Laktatkonzentrationskurven und
- Glukosekonzentrationskurven.

15 $\times 23,9\text{ mmol/l}$ Konzentration an Glukose im Medienzulauf (Durchflußrate von $D = 0,035 \text{ h}^{-1}$).

20

In Figur 10 ist die Konzentration von MUC2-GFP-C-term [nM] auf der linken Seite sowie qMUC2-GFP-C-term [nmol/(h*E9 Zellen)] auf der rechten Seite der Graphik gegen die Zeit [h] aufgetragen. In ihr sind:

- q spezifische Produktivität an MUC2-GFP-C-term (nmol/hE9 Zellen) und
- Konzentration an MUC2-GFP-C-term (nM) .

25

Figur 1 zeigt die erfindungsgemäße Verfahrensweise beispielhaft betreffend die Glukosezufütterung. In kontinuierlicher Perfusionskultur wird eine konstante Menge Glukose zugefüttert. Im gezeigten Beispiel wird dies durch eine konstante Mediendurchflußrate erreicht, wobei die Glukosekonzentration im Medienzulauf konstant

ist. Die Mediendurchflußrate wird nicht mit zunehmender Lebendzelldichte erhöht. Der Prozeß wurde als Batch begonnen, bevor die kontinuierliche Verfahrensweise begann.

5

Figur 2 zeigt, daß bei dieser Verfahrensweise der DGL im Verlaufe des Prozesses sinkt, und schließlich einen Wert unter 0,4 erreicht. Während dies geschieht, steigt die spezifische Produktivität an und erreicht schließlich einen Wert der um das 4-fache höher ist, als der vor Unterschreiten des DGL-Wertes von 0,4.

10

Aus Figur 3 wird ersichtlich, daß bei dem erfindungsmaßen Verfahren die Lebendzelldichte gegen einen Maximalwert läuft, der dann gehalten werden kann, während die Restglukosekonzentration im Verlauf gegen null geht. Dies tritt ein, obwohl Glukose zugeführt wird. Während des Absinkens der Restglukosekonzentration, beginnt die spezifische Glukoseaufnahmerate der Organismen zu sinken. Während dessen kann die Lebendzellzahl noch ansteigen. Parallel zum Rückgang der spezifischen Glukoseaufnahmerate sinkt auch die spezifische Laktatbildungsrage, was zunächst zu einem verlangsamten Anstieg, dann zu einem Abfall der Laktatkonzentration im Kulturgefäß führt. Schließlich läuft die Laktatkonzentration im Kulturgefäß gegen null, wie aus Figur 4 zu entnehmen ist. Es liegt also eine deutliche Umstellung des Zellmetabolismus vor. Wie Figur 5 zu entnehmen ist, findet verbunden mit der Umstellung des Zellmetabolismus ein Anstieg der spezifischen Produktivität auf etwa das 4-fache gegenüber dem Zeitpunkt vor der Umstellung des Zellmetabolismus statt. Der Anstieg der spezifischen Produktivität bei mindestens gleichblei-

15

20

25

30

benden, oder sogar noch ansteigenden Zelldichten während der beschriebenen Phase führt schließlich zu einem markanten Anstieg des Produkttitors im Kulturüberstand, wie Figur 5 zu entnehmen ist, und damit zu einer erhöhten Raum-/Zeit-Ausbeute.

5 Tabelle 1 zeigt Daten zur Fermentation von MUC1-IgG2a.

Analog zu den Figuren 1 bis 5 beschreiben Figuren 6 bis
10 10 die Ergebnisse der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit CHO MUC2-GFP-C-term Zellen.

Tabelle 2 zeigt Daten zur Fermentation von
15 MUC2-GFP-C-term.

Produktionstechnisch kann das erfindungsgemäße Verfahren außer nach dem eben beschriebenen Perfusionsverfahren auch als Fed-Batch (Zufütterungsverfahren) betrieben werden.

In einem Fed-Batch-Betrieb wird die Produktionskultur einmal oder wiederkehrend, bzw. chargenweise oder kontinuierlich mit glukosehaltigem Medium oder einer separaten Glukoselösung in einer Art und Weise versorgt,
20 daß der DGL vorzugsweise den Wert von 0,5, besonders bevorzugt 0,4 und noch besser 0,3 unterschreitet. Möglicher ist hier auch ein repetitiver Fed-Batch.

Sowohl in der perfusiven Verfahrensweise als auch im
25 Fed-Batch kann der Prozeß in allen allgemein bekannten Verfahrensweisen begonnen werden. So kann vor Beginn der erfindungsgemäßen Verfahrensweise die Kultur als Batch, Fed-Batch oder in kontinuierlicher Verfahrens-

weise mit oder auch ohne Zellrückhaltung betrieben werden.

Prozess-zeit	cv	D	Glu-kose Feed	Glukose	Laktat	MUC1-IgG2a	qMUC1-IgG2a	DGL
h	1/ml	1/h	mmol/l	mmol/l	mmol/l	µg/ml	µg/(h*E9)	
0	2,23E+05	0	0	22,07	2,5	2,62		
16,63	2,83E+05	0	0	20,89	5,1	3,59	0,21	0,92
40,52	6,48E+05	0	0	16,75	10,84	5,77	0,14	0,99
68	1,78E+06	0	0	8,74	20,1	14,21	0,17	0,61
94	2,14E+06	0,035	23,89	8,08	19,48	15,49	0,30	1,00
120	3,70E+06	0,035	23,89	5,84	22,35	18,02	0,22	0,72
136,5	4,68E+06	0,035	23,89	4,30	22,02	19,95	0,17	0,62
163,5	7,02E+06	0,035	23,89	3,17	22,66	22,67	0,14	0,40
187,5	6,96E+06	0,035	23,89	1,79	20,77	22,44	0,11	0,44
215,5	8,85E+06	0,035	23,89	1,04	17,46	28,24	0,13	0,35
264,75	1,30E+07	0,035	23,89	-	8,45	67,03	0,22	0,24
287	1,54E+07	0,035	23,89	-	5,25	89,42	0,22	0,20
310	1,64E+07	0,035	23,89	-	2,77	113,28	0,25	0,19
331	2,27E+07	0,035	23,89	-	1,24	133,80	0,24	0,14
352,4	1,45E+07	0,035	23,89	-	0,82	152,87	0,29	0,21
376,3	1,42E+07	0,035	23,89	-	0,53	182,52	0,45	0,22
404,4	1,58E+07	0,035	23,89	-	0,44	218,51	0,51	0,20
428	1,78E+07	0,035	23,89	-	0,58	241,75	0,50	0,17
448,4	2,08E+07	0,035	23,89	-	0,55	305,39	0,55	0,15
473,63	1,35E+07	0,035	23,89	-	0,55	290,52	0,60	0,23
496,8	9,30E+06	0,035	23,89	-	0,51	274,94	0,85	0,33
521,82	1,53E+07	0,035	23,89	-	0,56	301,12	0,87	0,20

Tabelle 1:
Daten zur Fermentation von MUC1-IgG2a

Prozeßzeit h	Vitale Zellzahl 1/ml	D 1/h	Glukose Feed mmol/l	Glukose mmol/l	Laktat mmol/l	MUC2- GFP -Cterm nM	qProdukt nmol/(h*E9)	DGL
0,5	7,50E+04	0	0	21,37	3,12	0,00		
106	1,80E+06	0	0	4,25	21,1	1,66	0,01	0,44
106,01		0,035	23,89			8,92		
130	2,20E+06	0,035	23,89	9,36		7,71	0,14	0,66
154	2,90E+06	0,035	23,89	8,32	18,23	10,72	0,05	1,00
182,38	6,83E+06	0,035	23,89	5,58	19,28	14,08	0,17	0,53
212,9	1,19E+07	0,035	23,89	1,65	18,78	26,15	0,12	0,33
237,2	1,44E+07	0,035	23,89	0,54	13,84	38,37	0,11	0,26
254	1,48E+07	0,035	23,89	0,52	9,81	50,08	0,13	0,24
278	1,20E+07	0,035	23,89	-	5,19	65,63	0,20	0,35
302	1,40E+07	0,035	23,89	-	2,05	81,53	0,27	0,29
326	1,20E+07	0,035	23,89	-	0,7	88,03	0,30	0,34
349,9	2,16E+07	0,035	23,89	-	0,33	104,60	0,28	0,19
374	1,20E+07	0,035	23,89	-	0,26	104,03	0,28	0,34
		0,035	23,89	-		84,47		
		0,035	23,89	-		75,16		
446	1,10E+07	0,035	23,89	-	0,19	64,81		0,37
470	1,10E+07	0,035	23,89	-	0,53	52,36		0,37
494	1,40E+07	0,035	23,89	-	0,32	69,63	0,24	0,29
518	1,30E+07	0,035	23,89	-		79,34	0,26	0,32
		0,035	23,89	-	0,35	93,94		
		0,035	23,89	-	0,35	104,57		
595,8	1,01E+07	0,035	23,89	-	0,25	113,89		

Tabelle 2:
Daten zur Fermentation von MUC2-GFP-Cterm

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Kultivierung von Zellen zur Produktion von Substanzen,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß eine Substanzen produzierende Zelle unter Glukoselimitierung (DGL) kultiviert wird, wobei der DGL ($DGL = qGlc/qGlc_{max}$ mit $qGlc$ = beobachtete momentane spezifische Glukoseverbrauchsrate und $qGlc_{max}$ = maximal für diese Zellen bekannten spezifischen Glukoseverbrauchsrate) größer als der DGL ist, welcher zur ausschließlichen Erhaltung
10 (DGL_{Erhaltung}) der Zelle führt, und $\leq 0,5$ ist, wobei der DGL_{Erhaltung} = $qGlc_{Erhaltung}/qGlc_{max}$ ist, mit $qGlc_{Erhaltung}$ = bei reinem Erhaltungsstoffwechsel beobachtete spezifische Glukoseverbrauchsrate und $qGlc_{max}$ = maximal für diese Zellen bekannten spezifischen Glukoseverbrauchsrate.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß die DGL $\leq 0,4$ oder $\leq 0,3$ ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die Menge zugefütterter Glukose nicht größer als 50 % dessen ist, was die ohne Glukoselimitierung maximal erwartete Zellzahl maximal verbrauchen kann.
- 30 4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,

daß die Menge zugefütterter Glukose nicht größer als 35 % dessen ist, was die ohne Glukoselimitierung maximal erwartete Zellzahl maximal verbrauchen kann.

5

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,
daß eine Komponente aus der Gruppe der Zelllinien CHO, wie z. B CHO-K1, BHK, wie z. B BHK-21, Hybridoma, Myelomazellen, wie z. B. NS/0, andere Säugerzellen und Insektenzellen oder andere höhere Zellen eingesetzt wird.

10

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
daß die produzierten Substanzen Proteine oder Polypeptide sind.

15

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die produzierten Substanzen Fusionsproteine, MUC1-IgG2a, MUC2-GFP-C-term, EPO, Interferone, Cytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, PA, Immunglobuline, Fragmente von Immunglobulinen oder andere Glykoproteine sind.

20

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein glukosehaltiges Medium eingesetzt wird,
welches bezüglich anderer Nährstoffkomponenten nicht vor Eintreten der Glukoselimitierung limitierend ist.

30

9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Glukose separat von anderen Substraten ge-
füttert wird.

5

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß es in einem pH-Bereich von 6,7 - 7,7 durchge-
führt wird.

10

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es in einem Temperaturbereich bei dem es nicht
zur irreversiblen Zerstörung des Produkts kommt
15 durchgeführt wird.

15

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß es in kontinuierlicher Verfahrensweise mit zu-
mindest partieller Zellrückhaltung betrieben wird.
20

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß es im Fed-Batch Verfahren durchgeführt wird.

25

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es als Batch gestartet und als Fed-Batch oder
kontinuierlicher Prozeß fortgeführt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit nicht wachstumsgekoppelt produzierenden
5 Zellen durchgeführt wird.

1/10

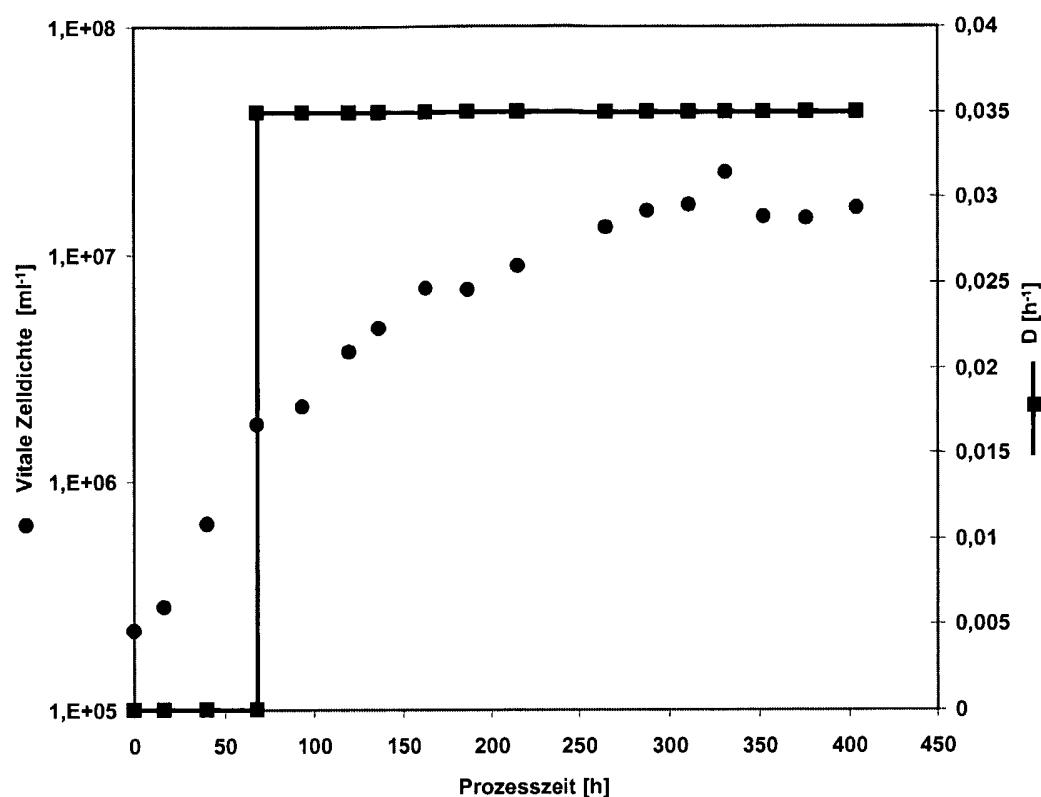


Fig. 1

2/10

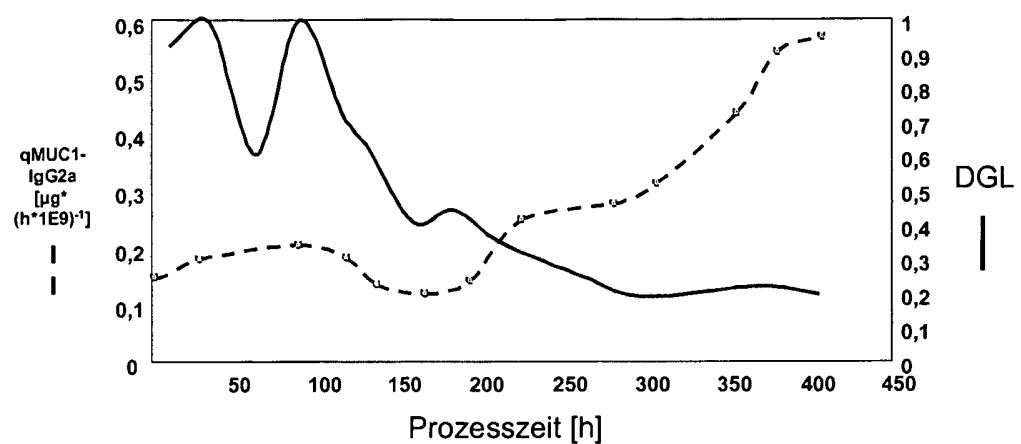


Fig. 2:

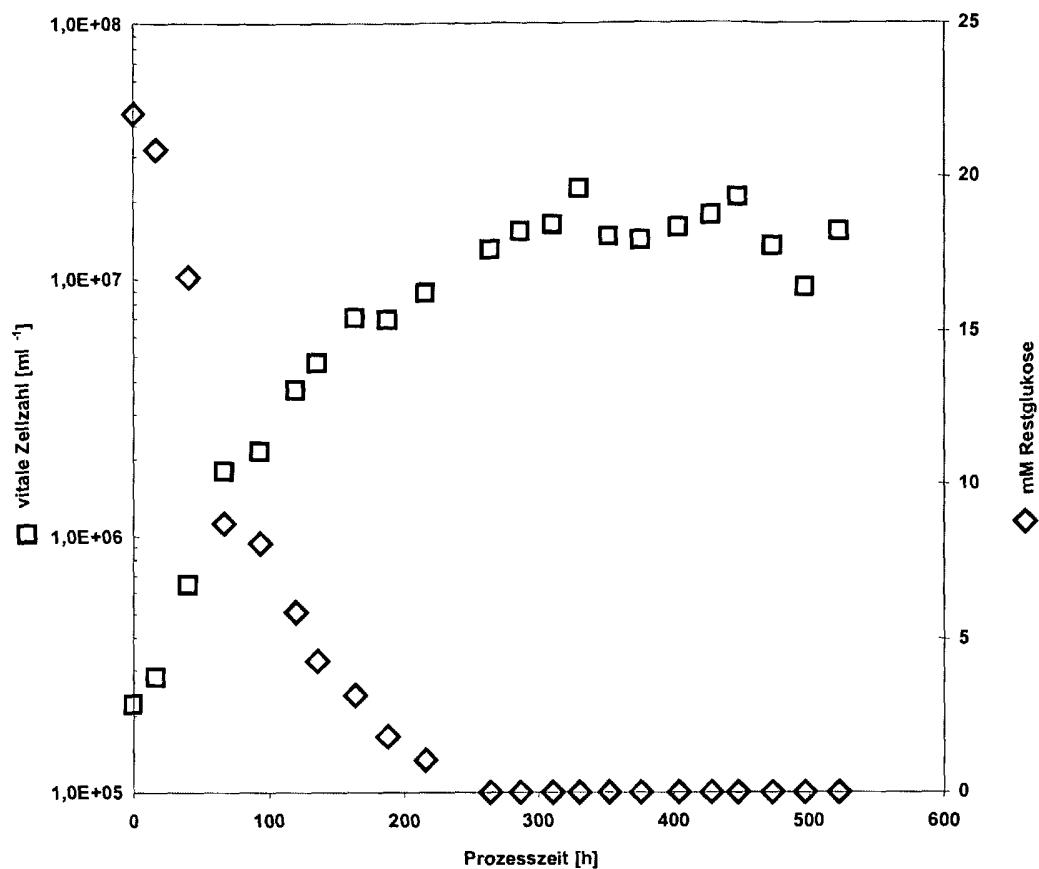
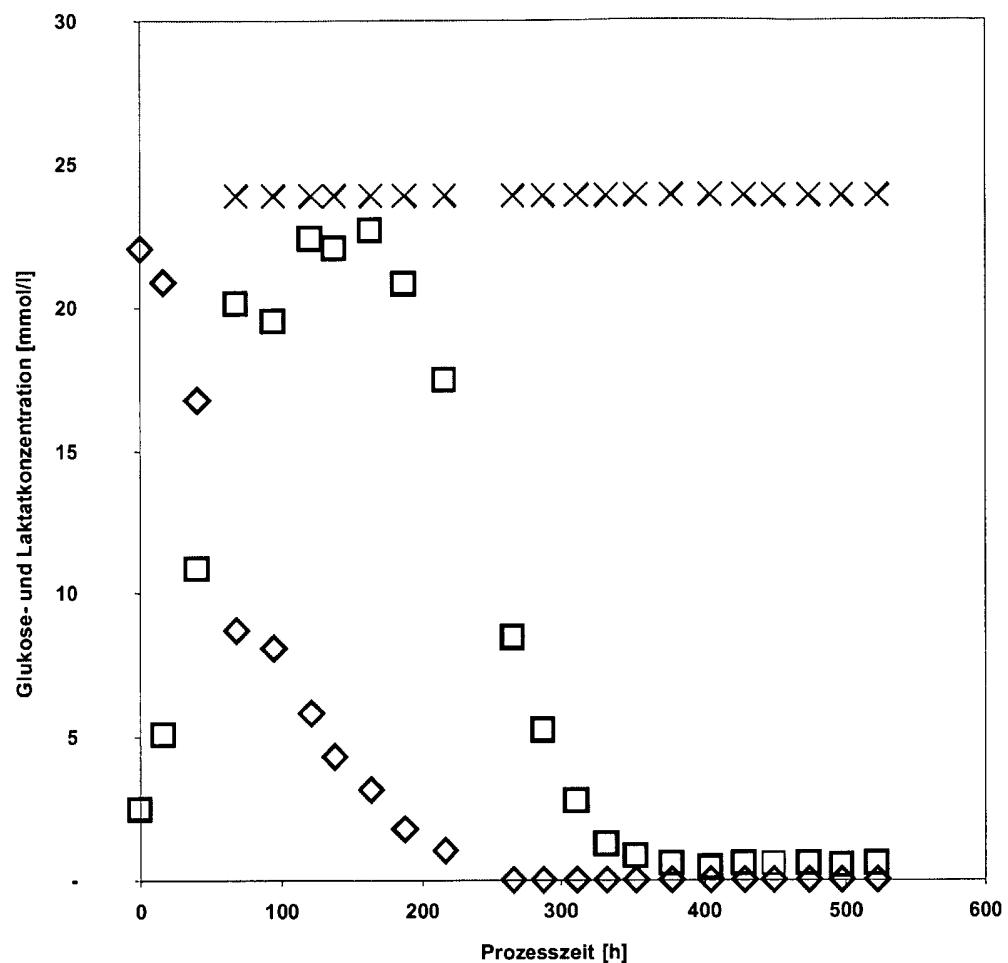


Fig. 3

4/10

**Fig. 4**

5/10

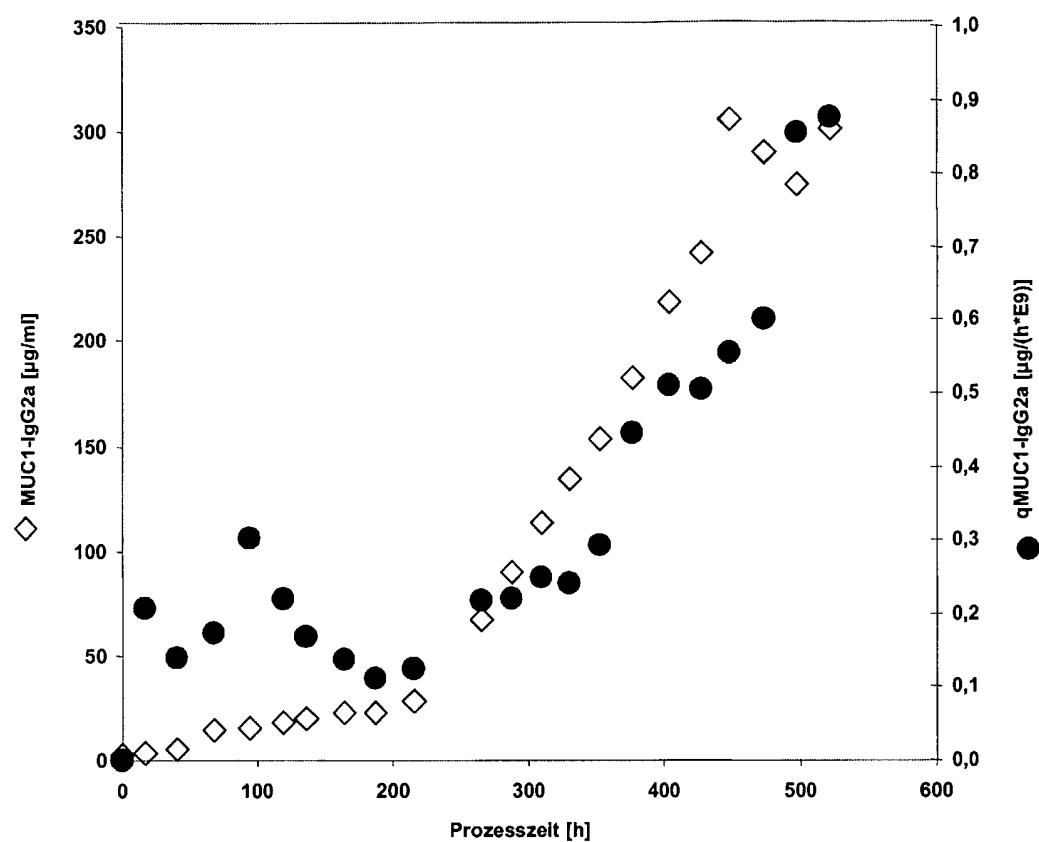
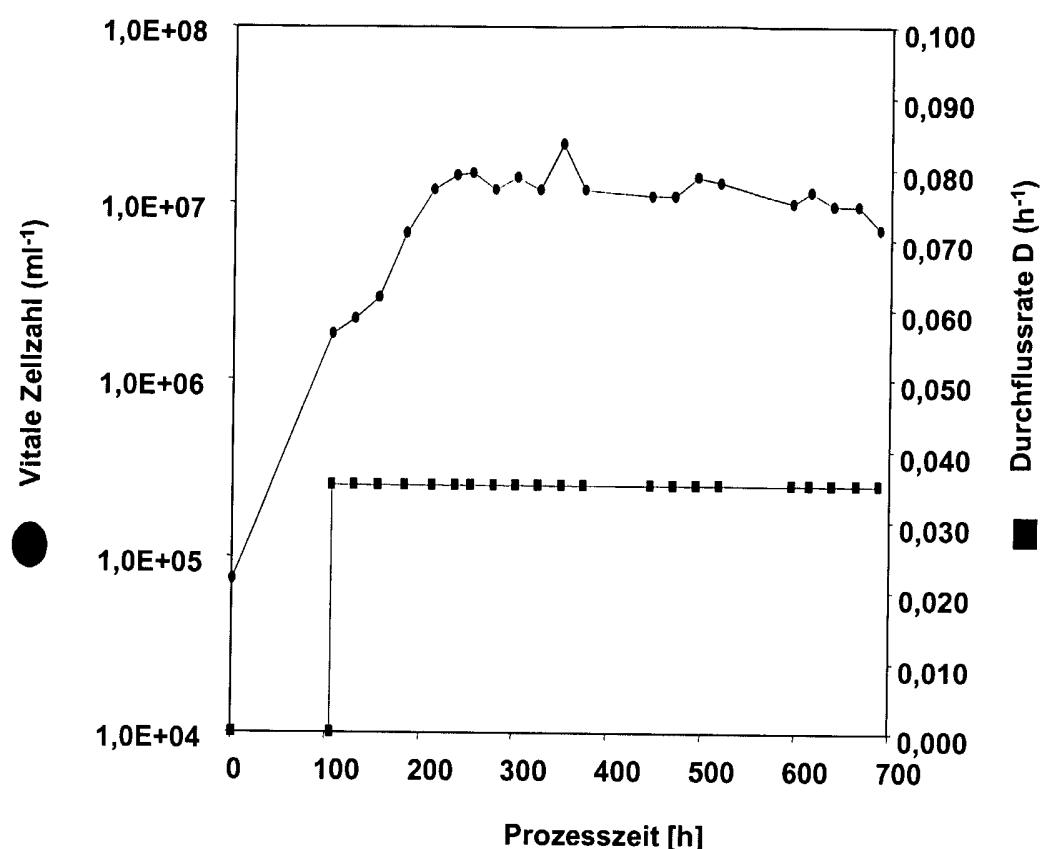


Fig. 5

**Fig. 6**

7/10

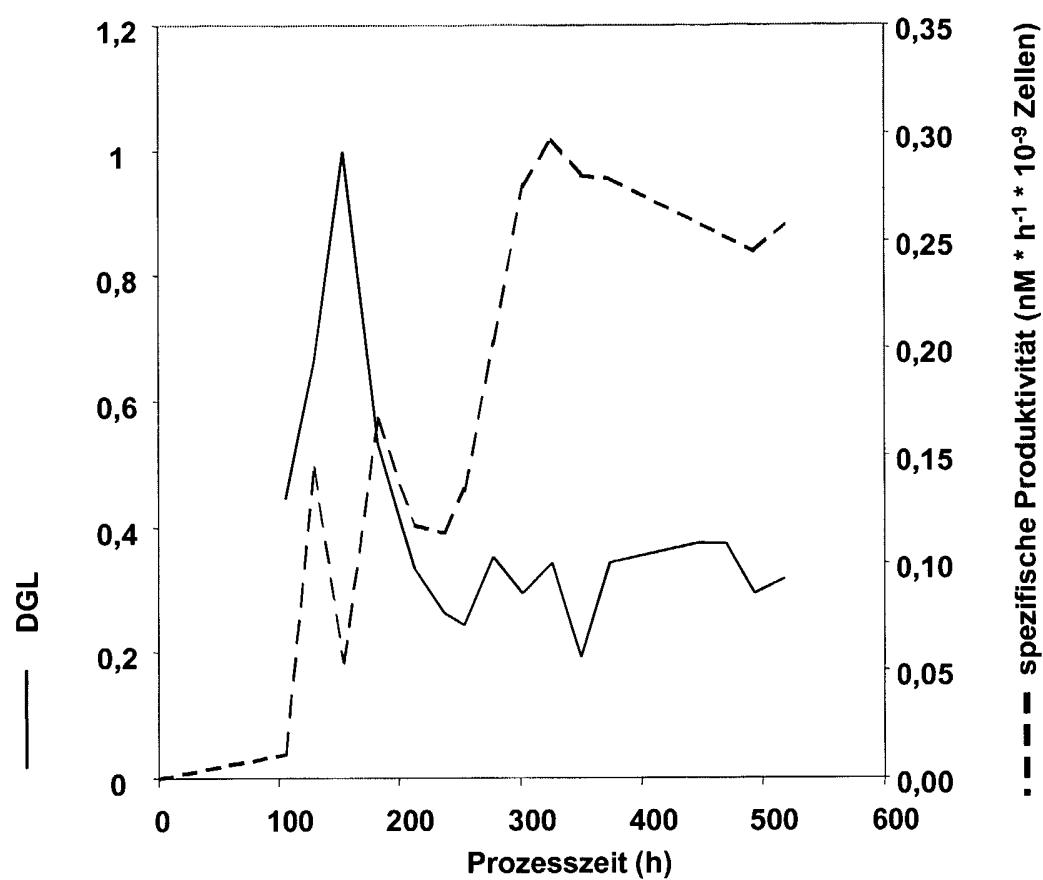
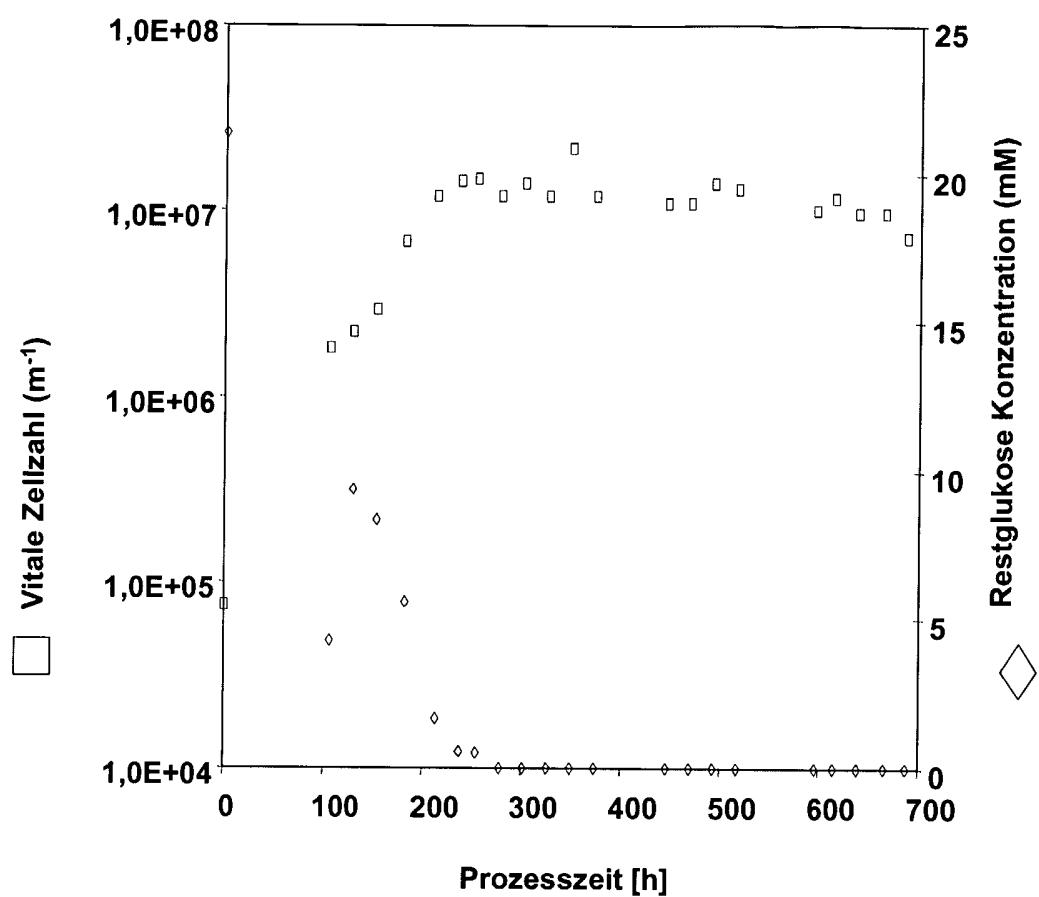
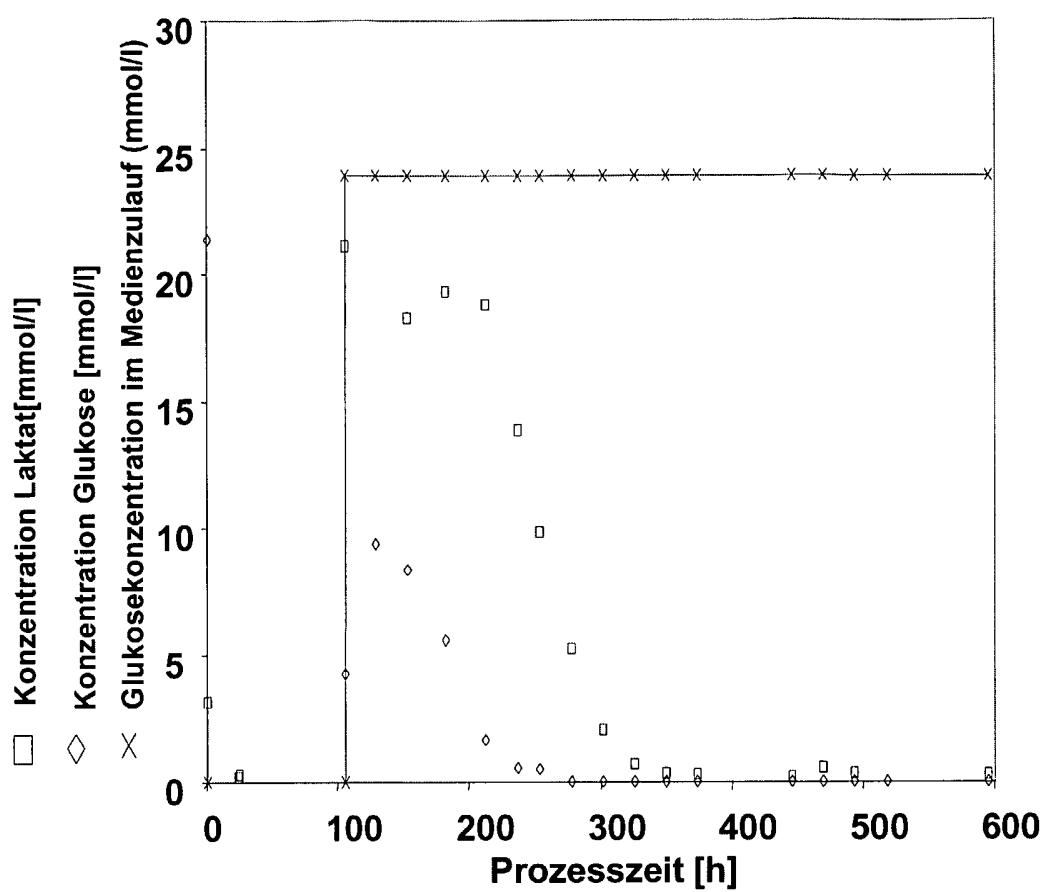


Fig. 7

8/10

**Fig. 8**

9/10

**Fig. 9**

10/10

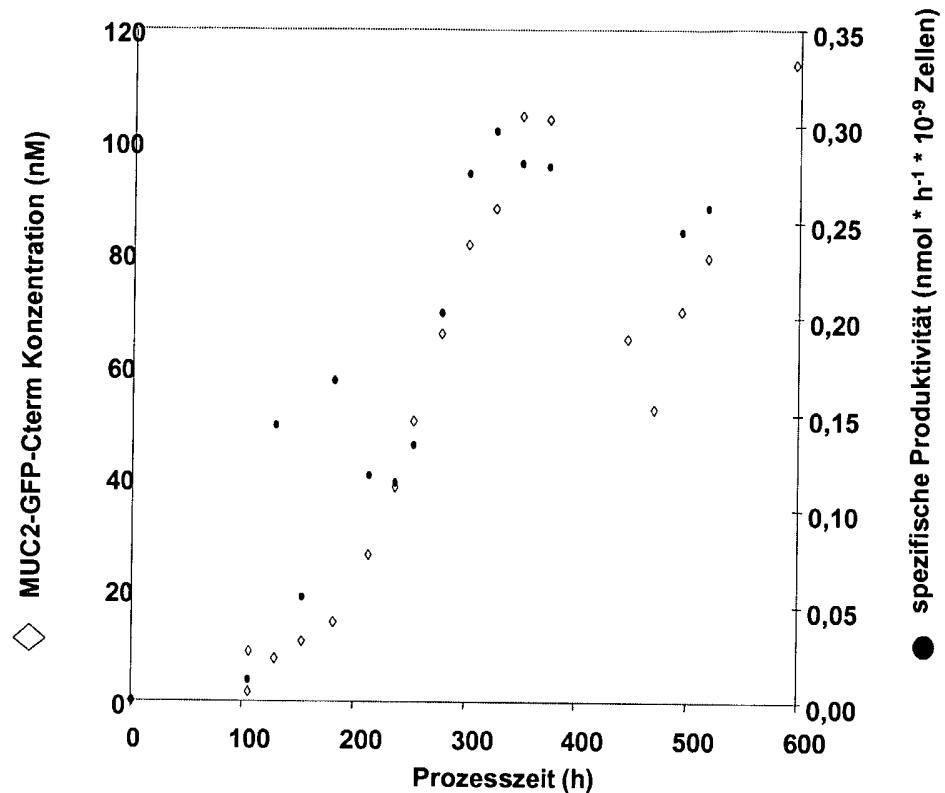


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/03693

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N5/06	C12P21/02	C12P21/08
-------	----------	-----------	-----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93/22448 A (TEIJIN LIMITED) 11 November 1993 (1993-11-11) the whole document -----	1-15
A	US 2001/009767 A1 (OHMAN L. ET AL.) 26 July 2001 (2001-07-26) the whole document -----	1-15
A	US 4 657 863 A (MAXWELL P.C. ET AL.) 14 April 1987 (1987-04-14) the whole document -----	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

8 April 2004

28/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/03693

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9322448	A	11-11-1993	CA	2111561 A1		11-11-1993
			DE	69311873 D1		07-08-1997
			DE	69311873 T2		12-02-1998
			EP	0592692 A1		20-04-1994
			WO	9322448 A1		11-11-1993
			JP	8508875 T		24-09-1996
			US	5443968 A		22-08-1995
<hr/>						
US 2001009767	A1	26-07-2001	AU	5148296 A		16-10-1996
			EP	0817837 A1		14-01-1998
			US	6210966 B1		03-04-2001
			WO	9630500 A1		03-10-1996
<hr/>						
US 4657863	A	14-04-1987	CA	1198071 A1		17-12-1985
			EP	0098750 A2		18-01-1984
			JP	59021387 A		03-02-1984
<hr/>						

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03693

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/06 C12P21/02 C12P21/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 93/22448 A (TEIJIN LIMITED) 11. November 1993 (1993-11-11) das ganze Dokument -----	1-15
A	US 2001/009767 A1 (OHMAN L. ET AL.) 26. Juli 2001 (2001-07-26) das ganze Dokument -----	1-15
A	US 4 657 863 A (MAXWELL P.C. ET AL.) 14. April 1987 (1987-04-14) das ganze Dokument -----	1-15

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

8. April 2004

28/04/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03693

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9322448	A	11-11-1993	CA DE DE EP WO JP US	2111561 A1 69311873 D1 69311873 T2 0592692 A1 9322448 A1 8508875 T 5443968 A		11-11-1993 07-08-1997 12-02-1998 20-04-1994 11-11-1993 24-09-1996 22-08-1995
US 2001009767	A1	26-07-2001	AU EP US WO	5148296 A 0817837 A1 6210966 B1 9630500 A1		16-10-1996 14-01-1998 03-04-2001 03-10-1996
US 4657863	A	14-04-1987	CA EP JP	1198071 A1 0098750 A2 59021387 A		17-12-1985 18-01-1984 03-02-1984