



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105209603 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 30

(21) 申请号 201480022766. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 21

C12N 5/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/768, 085 2013. 02. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/017803 2014. 02. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/130872 EN 2014. 08. 28

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·杨 Y·杨 J·滕特拉库尔

W·周

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 陈静

权利要求书8页 说明书43页 附图22页

(54) 发明名称

微载体灌注培养方法及其用途

(57) 摘要

本发明提供哺乳动物细胞的方法和利用这些培养方法的多种方法。



1. 一种培养哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:

提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20%至约 30%的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

在约 32℃至约 39℃并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和

在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述第一液体培养基占据约 25%至约 30%的摇瓶容积。

4. 权利要求 1 的方法,其中在所述一段时间的开始时,所述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞/mL- 0.5×10^6 细胞/mL。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述 CHO 细胞含有编码重组蛋白的核酸。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。

11. 权利要求 1 的方法,其中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是随时间增加的。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述第一液体培养基与第二液体培养基相同。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述第一液体培养基与第二液体培养基不同。

14. 权利要求 1 的方法,其中所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述哺乳动物细胞悬浮于约 40mL 至约 80mL 的第一液体培养基中。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述第一液体培养基和 / 或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基和无蛋白质的培养基。

17. 权利要求 1 的方法,其中在所述一段时间的最初 48-96 小时后,在每个 24 小时的时段中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积为第一液体培养基的体积的约 30%至约 95%。

18. 权利要求 1 的方法,其中在去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒的一段时间。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述多个微载体的平均直径为约 150 μ m 至约 800 μ m。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述多个微载体含有一个或多个孔。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μm 至约 35 μm 。

22. 权利要求 1 的方法,其中所述摇瓶以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

23. 一种培养哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:

(a) 提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20%至约 30%的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

(b) 在约 35°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间,并在所述一段时间的最初 48-96 小时后,在随后的每个 24 小时的时段中,

(i) 连续地或周期性地从摇瓶去除第一体积的基本不含微载体的第一液体培养基,其中所述第一体积是第一液体培养基体积的约 10%至约 95%;和

(ii) 向摇瓶添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;

(c) 在细胞浓度达到约目标细胞密度后,于约 32°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育约 2 天至约 7 天的第二时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (b) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (c) 中使用的那些是基本不同类型的;和

(d) 于约 35°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育大于 2 天的第三时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (c) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (d) 中使用的那些是相同类型的。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述第一液体培养基占据约 25%至约 30%的摇瓶容积。

25. 权利要求 23 的方法,其中在所述第一段时间的开始时,所述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞/mL- 0.5×10^6 细胞/mL。

26. 权利要求 23 的方法,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述 CHO 细胞含有编码重组蛋白的核酸。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述重组蛋白是分泌的免疫球蛋白、分泌的酶、分泌的生长因子、分泌的蛋白片段或分泌的工程化蛋白。

29. 权利要求 23 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段、和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。

30. 权利要求 23 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。

31. 权利要求 23 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。

32. 权利要求 23 的方法,其中所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。

33. 权利要求 23 的方法,其中所述第一液体培养基的体积是约 40mL 至约 80mL。

34. 权利要求 23 的方法,其中所述第一时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是含血清液体培养基或含动物来源组分的液体培养基,而所述第二时间段和第三时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是无血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基或无蛋白质的培养基。

35. 权利要求 23 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个期间,在从摇瓶去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒。

36. 权利要求 23 的方法,其中所述多个微载体的平均直径为约 200 μm 至约 800 μm 。
37. 权利要求 23 的方法,其中所述多个微载体含有一个或多个孔。
38. 权利要求 23 的方法,其中所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μm 至约 35 μm 。
39. 权利要求 23 的方法,其中在所述第三时间段去除的第一体积的第一液体培养基含有显著数量 (substantial number) 的微载体。
40. 权利要求 23 的方法,其中在所述第三时间段去除的第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。
41. 权利要求 23 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是第一液体培养基体积的约 70%。
42. 权利要求 23 的方法,其中所述摇瓶在 (b)、(c) 和 (d) 中以相对于台面或水平约 45 度的角度温育。
43. 一种生产重组蛋白的方法,所述方法包括:
- 提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞含有编码重组蛋白的核酸,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;
- 在约 32°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和
- 在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;和
- 从所述哺乳动物细胞或从所述第一和 / 或第二液体培养基回收重组蛋白。
44. 权利要求 43 的方法,其中所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。
45. 权利要求 44 的方法,其中所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。
46. 权利要求 43 的方法,其中所述重组蛋白是从第一和 / 或第二液体培养基回收的。
47. 权利要求 43 的方法,其中去除的第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。
48. 权利要求 43 的方法,其中所述第一液体培养基占据约 25% 至约 30% 的摇瓶容积。
49. 权利要求 43 的方法,其中在所述一段时间的开始时,所述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞 / mL - 0.5×10^6 细胞 / mL。
50. 权利要求 43 的方法,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。
51. 权利要求 50 的方法,其中所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。
52. 权利要求 51 的方法,其中所述重组蛋白分泌至第一和 / 或第二液体培养基中。
53. 权利要求 43 的方法,其中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。
54. 权利要求 43 的方法,其中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。
55. 权利要求 43 的方法,其中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二

液体培养基是周期性地进行。

56. 权利要求 43 的方法,其中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是随时间增加的。

57. 权利要求 43 的方法,其中所述第一液体培养基与第二液体培养基相同。

58. 权利要求 43 的方法,其中所述第一液体培养基与第二液体培养基不同。

59. 权利要求 43 的方法,其中所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。

60. 权利要求 43 的方法,其中所述哺乳动物细胞悬浮于约 40mL 至约 80mL 的第一液体培养基中。

61. 权利要求 43 的方法,其中所述第一液体培养基和 / 或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基和无蛋白质的培养基。

62. 权利要求 43 的方法,其中在所述一段时间的最初 48-96 小时后,在每个 24 小时的时段中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积为第一液体培养基的体积的约 30%至约 95%。

63. 权利要求 43 的方法,其中在去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒的一段时间。

64. 权利要求 43 的方法,其中所述多个微载体的平均直径为约 200 μm 至约 800 μm 。

65. 权利要求 64 的方法,其中所述多个微载体含有一个或多个孔。

66. 权利要求 65 的方法,其中所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μm 至约 35 μm 。

67. 权利要求 43 的方法,其中所述摇瓶以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

68. 一种生产重组蛋白的方法,所述方法包括:

(a) 提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,所述哺乳动物细胞含有编码重组蛋白的核酸,其中所述第一液体培养基占据约 20%至约 30%的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

(b) 在约 35°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间,并在所述一段时间的最初 48-96 小时后,在随后的每个 24 小时的时段中,

(i) 连续地或周期性地从摇瓶去除第一体积的基本不含微载体的第一液体培养基,其中所述第一体积是第一液体培养基体积的约 10%至约 95%;和

(ii) 向摇瓶添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;

(c) 在细胞浓度达到约目标细胞密度后,于约 32°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育约 2 天至约 7 天的第二时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (b) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (c) 中使用的那些是基本不同类型的;和

(d) 于约 35°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育大于 2 天的第三时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (c) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (d) 中使用的那些是相同类型的;和

(e) 从所述哺乳动物细胞或从所述第一、第二和 / 或第三时间段期间使用的第一和 / 或第二液体培养基回收重组蛋白。

69. 权利要求 68 的方法,其中所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。

70. 权利要求 68 的方法,所述重组蛋白是从所述第一、第二和第三时间段的一个或多个期间使用的第一和 / 或第二液体培养基回收的。

71. 权利要求 68 的方法,其中所述第一液体培养基占据约 25%至约 30%的摇瓶容积。

72. 权利要求 68 的方法,其中在所述第一时间段开始时,所述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞 /mL- 0.5×10^6 细胞 /mL。

73. 权利要求 68 的方法,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

74. 权利要求 68 的方法,其中所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。

75. 权利要求 74 的方法,其中所述重组蛋白分泌至所述第一时间段、第二时间段和第三时间段一个或多个期间使用的第一和 / 或第二液体培养基中。

76. 权利要求 68 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。

77. 权利要求 68 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。

78. 权利要求 68 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。

79. 权利要求 68 的方法,其中所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。

80. 权利要求 68 的方法,其中所述第一液体培养基的体积是约 40mL 至约 80mL。

81. 权利要求 68 的方法,其中所述第一时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是含血清液体培养基或含动物来源组分的液体培养基,而所述第二时间段和第三时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是无血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基或无蛋白质的培养基。

82. 权利要求 68 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个期间,在从摇瓶去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒。

83. 权利要求 68 的方法,其中所述多个微载体的平均直径为约 $200 \mu\text{m}$ 至约 $800 \mu\text{m}$ 。

84. 权利要求 83 的方法,其中所述多个微载体含有一个或多个孔。

85. 权利要求 84 的方法,其中所述一个或多个孔的平均直径为约 $25 \mu\text{m}$ 至约 $35 \mu\text{m}$ 。

86. 权利要求 68 的方法,其中在所述第三时间段去除的第一体积的液体培养基含有显著数量的微载体。

87. 权利要求 68 的方法,其中在所述第三时间段去除的第一体积的液体培养基是基本不含微载体的。

88. 权利要求 68 的方法,其中在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是第一液体培养基体积的约 70%。

89. 权利要求 68 的方法,其中所述摇瓶在 (b)、(c) 和 (d) 中以相对于台面或水平约 45 度的角度温育。

90. 一种测试用于制备重组蛋白的制造过程的方法,所述方法包括:

提供含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的摇瓶,所述哺乳动物细胞含有编码重组蛋白的核酸,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

在约 32℃ 至约 39℃ 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;

在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;

检测细胞中的或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白;和

将细胞中的或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量与重组蛋白的参考水平进行比较。

91. 权利要求 90 的方法,其中所述第一体积的第一液体培养基是基本不含哺乳动物细胞的。

92. 权利要求 90 的方法,其中所述重组蛋白的参考水平是用不同的培养方法生产的重组蛋白的水平。

93. 权利要求 92 的方法,其中所述不同的培养方法利用不同的第一或第二液体培养基、不同的哺乳动物细胞、不同的温度、不同的搅拌水平、不同的摇瓶或不同的微载体。

94. 权利要求 92 的方法,其中所述不同的培养方法利用不同的原料成分、抗结块剂或化学成分确定的液体培养基。

95. 权利要求 90 的方法,其中所述方法用于进行高通量细胞培养实验来执行实验设计 (design-of-experiment ;DOE) 或质量源于设计 (quality-by-design ;QBD) 研究。

96. 权利要求 90 的方法,其中所述第一液体培养基占据约 25% 至约 30% 的摇瓶容积。

97. 权利要求 90 的方法,其中所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。

98. 权利要求 90 的方法,其中所述哺乳动物细胞悬浮于约 40mL 至约 80mL 的第一液体培养基中。

99. 权利要求 90 的方法,其中所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

100. 权利要求 90 的方法,其中所述重组蛋白是分泌的免疫球蛋白、分泌的酶、分泌的生长因子、分泌的蛋白片段或分泌的工程化蛋白,并且其中所述重组蛋白是从第一或第二培养基回收的。

101. 权利要求 90 的方法,其中所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。

102. 权利要求 101 的方法,其中所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。

103. 权利要求 90 的方法,其中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。

104. 权利要求 90 的方法,其中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。

105. 权利要求 90 的方法,其中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。

106. 权利要求 90 的方法, 其中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是随时间增加的。

107. 权利要求 90 的方法, 其中所述第一液体培养基和 / 或第二液体培养基选自下组: 化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基和无蛋白质的培养基。

108. 权利要求 90 的方法, 其中所述摇瓶以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

109. 一种测试用于在生产重组蛋白的方法中使用的第一或第二液体培养基、存在于第一或第二液体培养基中的原料成分或补充物或哺乳动物细胞来源的效力的方法, 所述方法包括:

提供摇瓶, 其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞, 其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

在约 32℃ 至约 39℃ 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间; 和

在所述一段时间的最初 48-96 小时后, 连续地或周期性地去掉第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基, 其中所述第一和第二体积大致相等;

检测细胞中的或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白;

将细胞中的或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量与通过不同的方法生产的重组蛋白的参考水平进行比较, 所述不同的方法使用了一种或多种不同的第一或第二液体培养基、存在于第一或第二液体培养基中的不同的原料成分或补充物或不同的哺乳动物细胞来源; 和

鉴定与重组蛋白量的增加有关的所述第一或第二液体培养基、存在于第一或第二液体培养基中的不同的原料成分或补充物或哺乳动物细胞来源, 将其鉴定为用于在生产重组蛋白的方法中使用是有效的, 其中所述重组蛋白量的增加是与参考水平相比。

110. 一种对生产重组蛋白的制造工艺进行优化的方法, 所述方法包括:

提供摇瓶, 其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞, 其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

在约 32℃ 至约 39℃ 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间; 和

在所述一段时间的最初 48-96 小时后, 连续地或周期性地去掉第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基, 其中所述第一和第二体积大致相等;

检测细胞中的或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白;

将细胞中的或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量与通过不同的方法生产的重组蛋白的参考水平进行比较; 和

鉴定并去除或修改制造工艺中任何与产生的重组蛋白量的减少有关的培养组分或参数, 所述重组蛋白量的减少是与参考水平相比; 或是鉴定并增加制造工艺中任何与产生的重组蛋白量的增加有关的培养组分或参数, 所述重组蛋白量的增加是与参考水平相比。

111. 权利要求 110 的方法, 其中所述摇瓶以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温

育。

112. 一种测试第一或第二液体培养基中、用于产生第一或第二液体培养基的原料成分中或哺乳动物细胞来源中污染物的存在的方法,所述方法包括:

提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20%至约 30%的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;

在约 32℃至约 39℃并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和

在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;

检测细胞中的或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白;

将细胞中的或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量与通过不同的方法生产的重组蛋白的参考水平进行比较,所述不同的方法使用不同的第一或第二液体培养基、用于产生第一或第二液体培养基的不同的原料成分或不同的哺乳动物细胞来源;和

当产生的重组蛋白水平低于参考水平时,将第一或第二液体培养基、用于产生第一或第二液体培养基的原料成分或哺乳动物细胞来源鉴定为含有污染物。

113. 权利要求 112 的方法,其中所述污染物是生物污染物。

114. 权利要求 113 的方法,其中所述生物污染物选自下组:分枝杆菌、真菌、细菌、病毒和不想要的哺乳动物细胞。

115. 权利要求 112 的方法,其中所述摇瓶以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

微载体灌注培养方法及其用途

[0001] 相关文献的交叉引用

[0002] 本发明要求申请日为 2013 年 2 月 22 日的美国临时专利申请 No. 61/768, 085 的优先权, 其全部内容在此通过提述并入。

技术领域

[0003] 本发明涉及分子生物学方法、细胞培养工艺开发方法、以及重组蛋白的制造方法。

[0004] 发明背景

[0005] 含有编码重组蛋白的核酸的哺乳动物细胞经常用于生产治疗上或商业上重要的蛋白质。虽然有几种高通量 (HT) 的细胞培养系统已在生物技术工业中用于补料分批工艺数年, 但是没有已知存在的使用摇瓶和微载体用于基于灌注的细胞培养的 HT 模型。

[0006] 含有微载体的摇瓶已在短期分批 (非灌注) 培养工艺中使用, 用于生产病毒疫苗。这些制造病毒疫苗的方法中的细胞密度低, 这是由于微载体造成了剪切应力。此外, 病毒产品难以从培养物进行回收。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明 (至少部分上) 基于如下发现, 即在以本文描述的具体方式培养哺乳动物细胞导致实质性改进的活细胞密度和重组蛋白产生, 并能有效地模拟 (比如精确地按比例缩小的模型) 大规模连续灌注生物反应器的重组蛋白生产。因此, 本说明书包括了培养哺乳动物细胞的方法, 其包括: 提供摇瓶, 其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞, 其中所述第一液体培养基占据例如约 20% 至约 30% 的摇瓶体积, 并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多种微载体; 在约 32°C 至约 39°C (例如约 32°C 至约 37°C) 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间; 和在所述一段时间的最初 48-96 小时后, 连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基, 其中所述第一和第二体积大致相等。还提供了多种利用这些培养方法的方法。

[0009] 本文提供了培养哺乳动物细胞的方法。这些方法包括: 提供摇瓶, 其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞, 其中所述第一液体培养基占据例如约 20% 至约 30% 的摇瓶体积, 并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多种微载体; 在约 32°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间; 和在所述一段时间的最初 48-96 小时后, 连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基, 其中所述第一和第二体积大致相等。在这些方法的任一种的一些实施方案中, 第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。在这些方法的任一种的一些实施方案中, 其中所述第一液体培养基占据约 25% 至约 30% 的摇瓶容积。在这些方法的任一种的一些实施方案中, 在所述一段时间的开始时, 所述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞/mL- 0.5×10^6 细胞/mL。在这些方法的任一种的一些实施方案中, 所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在这些方法的任一种的一些实施方案中, 所述 CHO 细胞含有编码重组蛋白的核酸。在这些方法的任一种的一些实施方案中, 其中所

述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是随时间增加的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基与第二液体培养基相同。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基与第二液体培养基不同。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞悬浮于约 40mL 至约 80mL 的第一液体培养基中。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基和 / 或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基和无蛋白质的培养基。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述一段时间的最初 48-96 小时后,在每个 24 小时的时段中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积为第一液体培养基的体积的约 30% 至约 95%。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒的一段时间。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体的平均直径为约 150 μm 至约 800 μm 。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体含有一个或多个孔。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μm 至约 35 μm 。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0010] 此处还提供培养哺乳动物细胞的方法,所述方法包括:(a) 提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;(b) 在约 35°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育第一时间段,并在所述第一时间段的最初约 48-96 小时后,在随后的每个 24 小时的时段中,(i) 连续地或周期性地从摇瓶去除第一体积的基本不含微载体的第一液体培养基,其中所述第一体积是第一液体培养基体积的约 10% 至约 95%;和 (ii) 向摇瓶添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;(c) 在细胞浓度达到约目标细胞密度后,于约 32°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育约 2 天至约 7 天的第二时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (b) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (c) 中使用的那些是基本不同类型的;和 (d) 于约 35°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育大于 2 天的第三时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (c) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (d) 中使用的那些是相同类型的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,其中所述第一液体培养基占据约 25% 至约 30% 的摇瓶容积。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一段时间的开始时,第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞/mL- 0.5×10^6 细胞/mL。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述 CHO 细胞含

有编码重组蛋白的核酸。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是分泌的免疫球蛋白、分泌的酶、分泌的生长因子、分泌的蛋白片段或分泌的工程化蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,其中所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基的体积是约 40mL 至约 80mL。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是含血清液体培养基或含动物来源组分的液体培养基,而所述第二时间段和第三时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是无血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基或无蛋白质的培养基。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段一个或多个的期间,在从摇瓶去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体的平均直径为约 200 μm 至约 800 μm 。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体含有一个或多个孔。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μm 至约 35 μm 。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第三时间段去除的第一体积的第一液体培养基含有显著数量的微载体。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第三时间段去除的第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是第一液体培养基体积的约 70%。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶在 (b)、(c) 和 (d) 的一个或多个中以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0011] 本文还提供生产重组蛋白的方法。这些方法包括:提供含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的摇瓶,所述哺乳动物细胞含有编码重组蛋白的核酸,其中所述第一液体培养基占据约 20%至约 30%的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;在约 32°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;和从所述哺乳动物细胞或从所述第一和 / 或第二液体培养基回收重组蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是从第一和 / 或第二液体培养基回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除的第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基占据约 25%至约 30%的摇瓶容积。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述一段时间的开始时,所

述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞/mL– 0.5×10^6 细胞/mL。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白分泌至第一和 / 或第二液体培养基中。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是随时间增加的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基与第二液体培养基相同。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基与第二液体培养基不同。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞悬浮于约 40mL 至约 80mL 的第一液体培养基中。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基和 / 或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基和无蛋白质的培养基。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述一段时间的最初 48–96 小时后,在每个 24 小时的时段中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积为第一液体培养基的体积的约 30% 至约 95%。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒的一段时间。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体的平均直径为约 200 μm 至约 800 μm 。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体含有一个或多个孔。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μm 至约 35 μm 。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0012] 还提供了生产重组蛋白的方法,所述方法包括:(a) 提供含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的摇瓶,所述哺乳动物细胞含有编码重组蛋白的核酸,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;(b) 在约 35°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育第一时间段,并在所述第一时间段的最初 48–96 小时后,在随后的每个 24 小时的时段中,(i) 连续地或周期性地从摇瓶去除第一体积的基本不含微载体的第一液体培养基,其中所述第一体积是第一液体培养基体积的约 10% 至约 95%;和 (ii) 向摇瓶添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;(c) 在细胞浓度达到约目标细胞密度后,于约 32°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育约 2 天至约 7 天的第二时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (b) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (c) 中使用的那些是基本不同类型的;和 (d) 于约 35°C 至约 39°C 处伴随旋转搅拌将摇瓶温育大于 2 天的第三时间段,并在每个 24 小时的时段中进行步骤 (b) (i) 和 (b) (ii),其中步骤 (c) 中所使用的第一和第二液体培养基与步骤 (d) 中使用的那些是相同类型的;和 (e) 从所述哺乳动物细胞或从所述第一、第二和 / 或第三时间段期

间使用的第一和 / 或第二液体培养基回收重组蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是从所述第一、第二和第三时间段的一个或多个期间使用的第一和 / 或第二液体培养基回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基占据约 25% 至约 30% 的摇瓶容积。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段的开始时,所述第一液体培养基含有 0.1×10^6 细胞 / mL - 0.5×10^6 细胞 / mL。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白分泌至所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个期间使用的第一和 / 或第二液体培养基中。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶是透气性的且容积为约 20 mL 至约 1 L。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基的体积是约 40 mL 至约 80 mL。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是含血清液体培养基或含动物来源组分的液体培养基,而所述第二时间段和第三时间段中使用的第一液体培养基和第二液体培养基是无血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基或无蛋白质的培养基。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个期间,在从摇瓶去除第一体积的第一液体培养基之前中止搅拌至少 30 秒。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体的平均直径为约 200 μ m 至约 800 μ m。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述多个微载体含有一个或多个孔。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述一个或多个孔的平均直径为约 25 μ m 至约 35 μ m。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第三时间段去除的第一体积的第一液体培养基含有显著数量的微载体。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第三时间段去除的第一体积的第一液体培养基是基本不含微载体的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,在所述第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个中去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是第一液体培养基体积的约 70%。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶在 (b)、(c) 和 (d) 的一个或多个中以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0013] 本文还提供用于测试用于制备重组蛋白的制造过程的方法。这些方法包括:提供含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞的摇瓶,所述哺乳动物细胞含有编码重组蛋白的核酸,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0 g/L 至约 15.0 g/L 的多个微载体;在约 32°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125 RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或

周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;检测细胞中的或第一和/或第二培养基中的重组蛋白;和将细胞中的或第一和/或第二培养基中存在的重组蛋白的量与重组蛋白的参考水平进行比较。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一体积的第一液体培养基是基本不含哺乳动物细胞的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白的参考水平是用不同的培养方法生产的重组蛋白的水平。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述不同的培养方法利用不同的第一或第二液体培养基、不同的哺乳动物细胞、不同的温度、不同的搅拌水平、不同的摇瓶或不同的微载体。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述不同的培养方法利用不同的原料成分、抗结块剂或化学成分确定的液体培养基。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述方法用于进行高通量细胞培养实验来执行实验设计 (design-of-experiment; DOE) 或质量源于设计 (quality-by-design; QBD) 研究。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基占据约 25% 至约 30% 的摇瓶容积。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶是透气性的且容积为约 20mL 至约 1L。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞悬浮于约 40mL 至约 80mL 的第一液体培养基中。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述哺乳动物细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是分泌的免疫球蛋白、分泌的酶、分泌的生长因子、分泌的蛋白片段或分泌的工程化蛋白,并且其中所述重组蛋白是从第一或第二培养基回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是从哺乳动物细胞回收的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述重组蛋白是免疫球蛋白、酶、生长因子、蛋白片段或工程化蛋白。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是同时进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是连续进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基是周期性地进行的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,去除的第一液体培养基的第一体积和添加的第二液体培养基的第二体积是随时间增加的。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述第一液体培养基和/或第二液体培养基选自下组:化学成分确定的液体培养基、无血清液体培养基、含血清液体培养基、无动物来源组分的液体培养基和无蛋白质的培养基。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0014] 还提供了测试用于在生产重组蛋白的方法中使用的第一或第二液体培养基、存在于第一或第二液体培养基中的原料成分或补充物或哺乳动物细胞来源的效力的方法。这些方法包括:提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;在约 32°C 至约 39°C 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;检测细胞中的或第一和/或第二培养基中的重组蛋白;将细胞中的或第一和/或第二培养基中存在的重组蛋白的量与通过不同的方法生产的重组蛋白的参

考水平进行比较,所述不同的方法使用了一种或多种不同的第一或第二液体培养基、存在于第一或第二液体培养基中的不同的原料成分或补充物或不同的哺乳动物细胞来源;和鉴定与重组蛋白量的增加有关的所述第一或第二液体培养基、存在于第一或第二液体培养基中的不同的原料成分或补充物或哺乳动物细胞来源,将其鉴定为用于生产重组蛋白的方法中是有效的,其中所述重组蛋白量的增加是与参考水平相比。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0015] 本文还提供对生产重组蛋白的制造工艺进行优化的方法。这些方法包括:提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;在约 32℃ 至约 39℃ 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;检测细胞中的或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白;将细胞中的或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量与通过不同的方法生产的重组蛋白的参考水平进行比较;和鉴定并去除或修改制造工艺中任何与产生的重组蛋白量的减少有关的培养组分或参数,所述重组蛋白量的减少是与参考水平相比;或是鉴定并增加制造工艺中任何与产生的重组蛋白量的增加有关的培养组分或参数,所述重组蛋白量的增加是与参考水平相比。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0016] 还提供了测试第一或第二液体培养基中、用于产生第一或第二液体培养基的原料成分中或哺乳动物细胞来源中污染物的存在的方法,所述方法包括:提供摇瓶,其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞,其中所述第一液体培养基占据约 20% 至约 30% 的摇瓶容积并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体;在约 32℃ 至约 39℃ 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间;和在所述一段时间的最初 48-96 小时后,连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等;检测细胞中的或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白;将细胞中的或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量与通过不同的方法生产的重组蛋白的参考水平进行比较,所述不同的方法使用不同的第一或第二液体培养基、用于产生第一或第二液体培养基的不同的原料成分或不同的哺乳动物细胞来源;和当产生的重组蛋白水平低于参考水平时,将第一或第二液体培养基、用于产生第一或第二液体培养基的原料成分或哺乳动物细胞来源鉴定为含有污染物。在这些方法的任一种的一些实施方案中,其中所述污染物是生物污染物。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述生物污染物选自下组:分枝杆菌、真菌、细菌、病毒和不想要的哺乳动物细胞。在这些方法的任一种的一些实施方案中,所述摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度进行温育,或以相对于台面或水平约 45 度的角度进行温育。

[0017] 如用于本文,名词前的词语“一”或“多个 (plurality)”代表一个或多个该特定名词。例如,短语“一哺乳动物细胞”代表“一个或多个哺乳动物细胞”,而短语“多个微载体”意为“一个或多个微载体”。

[0018] 术语“哺乳动物细胞”意指任何来自或源自任何哺乳动物（例如，人、仓鼠、小鼠、绿猴、大鼠、猪、牛或兔）的细胞。在一些实施方案中，哺乳动物细胞可以是例如永生化细胞、分化的细胞或未分化的细胞。

[0019] 术语“目标细胞密度”意为每个培养基体积特定的细胞浓度，其用于在培养物中产生重组蛋白。目标细胞密度可以根据所培养的具体哺乳动物细胞而变化。例如，目标细胞密度可以是约 1.0×10^6 细胞/mL 至约 50×10^6 细胞/mL（例如约 2.0×10^6 细胞/mL 至约 3.0×10^6 细胞/mL）。

[0020] 术语“基本不含”意指至少或约 90% 不含（例如，至少或约 95%、96%、97%、98%，或至少或约 99% 不含或约 100% 不含）特定物质（例如，哺乳动物细胞或微载体）的组合物（例如液体培养基）。

[0021] 术语“培养”或“细胞培养”意指在一组受控的物理条件下在液体培养基中个维持哺乳动物细胞或使哺乳动物细胞生长。

[0022] 术语“摇瓶”意指能保持有一定体积的液体培养基的容器（例如无菌容器），其具有至少一个透气性表面（例如具有至少一个透气性元件（例如膜）的末端，其还可起到无菌屏障的作用）和 / 或至少一个通气帽，并且其形状至少一部分是近似截头圆锥形的（frustoconical）。例如，摇瓶可以是细胞培养瓶，如 T-瓶（T-flask）、锥形瓶（Erlenmeyer flask）或其本领域内公认的任何修改版本。

[0023] 术语“液体培养基”意指含有足以允许哺乳动物细胞在体外在介质中生长的营养物的流体。例如，液体培养基可以含有下列一种或多种：氨基酸（例如 20 种氨基酸）、嘌呤（例如次黄嘌呤），嘧啶（例如胸苷）、胆碱、肌醇、硫胺素、叶酸、生物素、钙、烟酰胺、吡哆醇、核黄素、胸苷、氰钴胺素、丙酮酸（盐）、硫辛酸、镁、葡萄糖、钠、钾、铁、铜、锌、硒、及其他必需微量金属元素（trace metal）和碳酸氢钠。液体培养基可以含有来自哺乳动物的血清。在一些例子中，液体培养基不含血清或来自哺乳动物的另一提取物（确定的液体培养基）。在一些实施方案中，液体培养基可含有微量金属元素、哺乳动物生长激素和 / 或哺乳动物生长因子。液体培养基的非限制性实例在本文中描述，并且另外的实例是本领域已知的，并且是市售的。

[0024] 短语“基本不同类型的液体培养基”意指含有与另一液体培养基基本不同的营养物概貌（profile）的液体培养基。例如，含有一种或多种哺乳动物血清、哺乳动物蛋白或哺乳动物蛋白级分或提取物（例如含血清的液体培养基）的液体培养基与不含任何哺乳动物血清、哺乳动物蛋白或哺乳动物蛋白级分或提取物的液体培养基（例如无动物来源组分的培养基、无血清的液体培养基、化学成分确定的液体培养基和无蛋白质的液体培养基）是基本不同类型的液体培养基。

[0025] 术语“基本相同类型的液体培养基”意指含有与另一液体培养基大致相同的营养物概貌的液体培养基。例如，若液体培养基 A 和液体培养基 B 均含有一种或多种哺乳动物血清、哺乳动物蛋白和哺乳动物蛋白级分或提取物（例如含血清的液体培养基），则它们是基本相同的。在另一个实例中，若液体培养基 A 和液体培养基 B 均不含任何哺乳动物血清、哺乳动物蛋白和哺乳动物蛋白级分或提取物（例如无动物来源组分的培养基、无血清的液体培养基、化学成分确定的液体培养基和无蛋白质的液体培养基），则它们是基本相同的。

[0026] 术语“微载体”意指尺寸为 $20 \mu\text{m}$ 至约 $1000 \mu\text{m}$ 的含有表面的颗粒（例如有机聚

合物),所述表面是容许性(permissive)的或是促进哺乳动物细胞(例如本文描述的或本领域已知的哺乳动物细胞的任一种)附着的。微载体可以含有一个或多个孔(例如平均直径为约 10 μm 至约 100 μm 的孔)。微载体的非限制性实例在本文中描述。微载体的其他例子是本领域已知的。微载体可以含有例如聚合物(例如纤维素、聚乙二醇或聚-(乳酸-羟基乙酸共聚物))。

[0027] 术语“无动物来源组分的液体培养基”意指不含任何源自动物的组分(例如蛋白质或血清)的液体培养基。

[0028] 术语“无血清液体培养基”意指不含哺乳动物血清的液体培养基。

[0029] 术语“含血清液体培养基”意指含有哺乳动物血清的液体培养基。

[0030] 术语“化学成分确定的液体培养基”意指其中基本上全部化学成分均已知的液体培养基。例如,化学成分确定的液体培养基不含胎牛血清、牛血清白蛋白或人血清白蛋白,因为这些制备物通常含有白蛋白和脂质的复杂混合物。

[0031] 术语“无蛋白质液体培养基”意指不含任何蛋白质(例如任何可检测的蛋白)的液体培养基。

[0032] “旋转搅拌”是本领域所熟知的术语,其意指为了例如增加摇瓶所含的液体培养基中的溶解 O_2 浓度而使摇瓶进行的圆形方式的运动,例如顺时针或逆时针运动。搅拌可以用任何本领域已知方法来进行,例如,以圆形或椭圆形运动来移动摇瓶的设备,如旋转摇床(rotary shaker)。能用于进行旋转搅拌的示例性装置在本文中描述。这些装置的其他实例是本领域已知的,并且是市售的。

[0033] 术语“免疫球蛋白”意指含有免疫球蛋白的至少 15 个氨基酸(例如,至少 20、30、40、50、60、70、80、90 或 100 个氨基酸)的氨基酸序列的多肽(例如可变结构域序列、框架序列或恒定结构域序列)。例如,免疫球蛋白可包括轻链免疫球蛋白的至少 15 个氨基酸,例如重链免疫球蛋白的至少 15 个氨基酸。免疫球蛋白可以是分离的抗体(例如 IgG、IgE、IgD、IgA 或 IgM)。免疫球蛋白可以是 IgG 的亚类(例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)。免疫球蛋白可以是抗体片段,例如, Fab 片段、 $\text{F(ab}')_2$ 片段或 scFv 片段。免疫球蛋白也可以是双特异性抗体或三特异性抗体,或二聚体、三聚体或多聚体抗体,或双抗体、Affibody[®] 或 Nanobody[®]。免疫球蛋白还可以是含有至少一个免疫球蛋白结构域的工程化蛋白(例如融合蛋白)。免疫球蛋白的非限制性实例在本文描述,并且免疫球蛋白的其他实例是本领域已知的。

[0034] 术语“蛋白片段”或“多肽片段”意指多肽序列的一部分,其长度为至少或约 4 个氨基酸、至少或约 5 个氨基酸、至少或约 6 个氨基酸、至少或约 7 个氨基酸、至少或约 8 个氨基酸、至少或约 9 个氨基酸、至少或约 10 个氨基酸、至少或约 11 个氨基酸、至少或约 12 个氨基酸、至少或约 13 个氨基酸、至少或约 14 个氨基酸、至少或约 15 个氨基酸、至少或约 16 个氨基酸、至少或约 17 个氨基酸、至少或约 18 个氨基酸、至少或约 19 个氨基酸或至少或约 20 个氨基酸,或长度超过 20 个氨基酸。重组蛋白片段可以使用任何本文描述的方法产生。

[0035] 术语“工程化蛋白”意指不是由生物体(例如,哺乳动物)内存在的内源核酸天然编码的多肽。工程化蛋白的实例包括酶(例如具有导致工程化的酶的稳定性和/或催化活性增加的一个或多个氨基酸取代、缺失、插入或添加)、融合蛋白、抗体(例如,二价抗体、三

价抗体或双抗体)和含有至少一种重组支架序列的抗原结合蛋白。

[0036] 术语“回收(recover)”或“回收(recovering)”在一些语境中意指将重组蛋白的至少部分从细胞培养基中存在的一种或多种其他组分(例如哺乳动物细胞或培养基蛋白)或从哺乳动物细胞裂解物中存在的一种或多种其他组分(例如DNA、RNA或其他蛋白)纯化或分离(按重量计,例如至少或约5%纯、例如至少或约10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少或约95%纯)。从液体培养基或从哺乳动物细胞裂解物回收蛋白的非限制性方法在本文中描述,并且是本领域已知的。

[0037] 术语“分泌的蛋白”或“分泌的重组蛋白”意指这样的蛋白质或重组蛋白,当其在哺乳动物细胞内被翻译时最初含有至少一个分泌信号序列,并且在哺乳动物细胞中通过(至少部分通过)酶促切割分泌信号序列释放到胞外空间(例如液体培养基)中。

[0038] 短语“梯度灌注”是本领域已知的,其意指在培养期间随递增的时间段(例如,约24小时的时间段、约1分钟至约24小时的时间段或大于24小时的时间段)从初始培养物去除的和对其添加的培养基体积的增量变化(例如增加或减少)(例如,每日的培养基再补料速率)。每天去除和替换的培养基所占分数可以根据所培养的具体细胞、初始接种密度和特定时间的细胞密度而变化。

[0039] 术语“补料分批培养”意指向初始细胞培养物递增或连续添加第二液体培养基,而不实质性地或显著地从细胞培养物去除第一液体培养基。在一些实例中,所述第二液体培养基与所述第一液体培养基相同。在其他实例中,所述第二液体培养基浓缩自所述第一液体培养基,和/或作为干粉添加。

[0040] 术语“反应器角度”意指在本文所述培养方法期间,含有哺乳动物细胞的摇瓶放置的距水平位置的偏向角。例如,当含有哺乳动物细胞的摇瓶相对于实验台或地面垂直立置,反应器角度为90°,而当含有哺乳动物细胞的摇瓶相对于实验台或地面水平放置,反应器角度为0°。在另一个实例中,当含有哺乳动物细胞的摇瓶置于垂直和水平位置(相对于实验台或地面)之间等距处时,反应器角度为45°。

[0041] “比生产率(specific productivity rate)”或“SPR”如本文所用意指每天每个哺乳动物细胞产生的重组蛋白的质量或酶活性。重组抗体的SPR通常测量为质量/细胞/天。重组酶的SPR通常测量为单位/细胞/天或(单位/质量)/细胞/天。

[0042] “体积生产率”或“VPR”如本文所用意指每天每体积的培养物(例如每L的生物反应器、容器或管体积)产生的重组蛋白的质量或酶活性。重组抗体的VPR通常测量为质量/L/天。重组酶的VPR通常测量为单位/L/天或质量/L/天。

[0043] 除非另行限定,本文使用的科技术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文描述了用于本发明中的用途的方法和材料;也可以使用其他本领域已知的合适的方法和材料。所述材料、方法和实例仅为说明性的而不意图进行限制。将本文提及的全部出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献通过提述以其整体并入。如有冲突,以包括定义在内的本发明说明书为准。

[0044] 本发明的其他特征和优势从如下详述和附图以及从请求范围中将是显而易见的。

附图说明

[0045] 图 1 是显示了示例性的瓶架 (rack) 示意图,所述瓶架能用于将摇瓶置于相对于台面或水平面约 45 度的角度,其能在本文所述方法的任一种中使用。

[0046] 图 2 是显示随时间经过的重组人 α -半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行 ($n = 5$) 和 2000-L 生物反应器细胞培养工艺运行 ($n = 9$) 中的平均活细胞浓度的图表。阴影区域代表数据的标准差。

[0047] 图 3 是显示随时间经过的重组人 α -半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行 ($n = 5$) 中活细胞的平均百分比的图表。阴影区域代表数据的标准差。

[0048] 图 4 是显示随时间经过的重组人 α -半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行 ($n = 5$) 中悬浮细胞的平均浓度 (未粘附在液体培养基中微载体上的细胞浓度) 的图表。阴影区域代表数据的标准差。

[0049] 图 5 是显示随时间经过的重组人 α -半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行 ($n = 5$) 和 2000-L 生物反应器细胞培养工艺运行 ($n = 9$) 中的平均体积生产率的图表。阴影区域代表数据的标准差。

[0050] 图 6 是显示随时间经过的重组人 α -半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行 ($n = 3$) 中和重组人 α -半乳糖苷酶 2000-L 生物反应器细胞培养工艺运行 ($n = 3$) 中的累积体积生产率 (单位 /L) 的图表。

[0051] 图 7 是随时间经过的摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行的活细胞浓度的示意图,其含有:不同类型的液体培养基 (液体培养基 A 或 B)、不同的微载体浓度 (1.0g/L 或 1.5g/L 的微载体浓度) 和 / 或不同的旋转频率 (85RPM 或 125RPM)。

[0052] 图 8 是生长期和收获期卫星摇瓶培养研究的示意图。

[0053] 图 9 是随时间经过的生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的活细胞浓度的图表。误差线代表数据的 ± 1 标准差 ($n = 2$)。“1”代表当搅拌频率从 85RPM 增加至 95RPM 时的时间点。将生长期卫星摇瓶培养数据移动 -1 天,以便更精确地将其数据与 40-L 生物反应器培养数据进行比较。

[0054] 图 10 是随时间经过的生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的活细胞百分比的图表。误差线代表数据的 ± 1 标准差 ($n = 2$)。“1”代表当搅拌频率从 85RPM 增加至 95RPM 时的时间点。将生长期卫星摇瓶培养数据移动 -1 天,以便更精确地将其数据与 40-L 生物反应器培养数据进行比较。

[0055] 图 11 是随时间经过的生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的悬浮细胞浓度的图表。误差线代表数据的 ± 1 标准差 ($n = 2$)。“1”代表当搅拌频率从 85RPM 增加至 95RPM 时的时间点。将生长期卫星摇瓶培养数据移动 -1 天,以便更精确地将其数据与 40-L 生物反应器培养数据进行比较。

[0056] 图 12 是随时间经过的生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的重组人 α -半乳糖苷酶滴度 (单位 /L) 的图表。误差线代表数据的 ± 1 标准差 ($n = 2$)。将生长期卫星摇瓶培养数据移动 -1 天,以便更精确地将其数据与 40-L 生物反应器培养数据进行比较。

[0057] 图 13 是随时间经过的生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的重组人 α -半乳糖苷酶的比生产率 (单位每 1×10^6 细胞) 的图表。误差线代表数据的 ± 1 标准差 ($n = 2$)。将生长期卫星摇瓶培养数据移动 -1 天,以便更精确地将其数据与 40-L 生物反

反应器培养数据进行比较。

[0058] 图 14 是随时间经过的生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养的从葡萄糖生成乳酸盐的产量（乳酸盐的摩尔数 / 葡萄糖摩尔数）的图表。误差线代表数据的 ± 1 标准差 ($n = 2$)。将生长期卫星摇瓶培养数据移动 -1 天, 以便更精确地将其数据与 40-L 生物反应器培养数据进行比较。

[0059] 图 15 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养的活细胞浓度的图表。显示了平均数据 (40-L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0060] 图 16 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的活细胞百分比的图表。显示了平均数据 (40-L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0061] 图 17 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的悬浮细胞浓度的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0062] 图 18 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的重组人 α -半乳糖苷酶 (单位 /L) 的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0063] 图 19 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中的重组人 α -半乳糖苷酶 (单位每 1×10^6 细胞) 的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0064] 图 20 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养的每克葡萄糖的重组人 α -半乳糖苷酶 (单位 /g) 的产量的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0065] 图 21 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养的从葡萄糖生成乳酸盐的产量（乳酸盐的摩尔数 / 葡萄糖摩尔数）的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0066] 图 22 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中存在的凋亡细胞百分比的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0067] 图 23 是随时间经过的收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中存在的非凋亡细胞百分比的图表。显示了平均数据 (40L, $n = 3$; 68mL 以 95RPM, $n = 3$; 60mL 以 95RPM, $n = 2$; 以及 60mL 以 110RPM, $n = 2$), 误差线代表数据的 ± 1 标准差。

[0068] 图 24 是显示收获期卫星摇瓶培养 CD- 水解产物研究设计的示意图。

[0069] 图 25 是随时间经过的每个收获期卫星摇瓶培养和每个 40-L 生物反应器培养中的活细胞浓度的图表。

[0070] 图 26 是随时间经过的每个收获期卫星摇瓶培养和每个 40-L 生物反应器培养中的

活细胞百分比的图表。

[0071] 图 27 是随时间经过的每个收获期卫星摇瓶培养和每个 40-L 生物反应器培养中的悬浮细胞浓度的图表。

[0072] 图 28 是随时间经过的每个收获期卫星摇瓶培养和每个 40-L 生物反应器培养中存在的重组人 α -半乳糖苷酶滴度 (单位 /L) 的图表。

[0073] 图 29 是随时间经过的每个收获期卫星摇瓶培养和每个 40-L 生物反应器培养的重组人 α -半乳糖苷酶比生产率 (SPR) (单位 / $[1 \times 10^9$ 细胞 $\cdot$ 天]) 的图表。

[0074] 发明详述

[0075] 本发明提供了改进的在摇瓶中培养哺乳动物细胞的方法,所述方法使用多个微载体和分批再补料灌注。本文所述的培养方法能达到哺乳动物细胞的高浓度水平,进而改进培养方法的总体效率并提供高产量的想要的细胞产物,如重组蛋白。例如,所述方法能提供大于 2×10^6 细胞/mL、大于 3×10^6 细胞/mL、大于 4×10^6 细胞/mL、大于 5×10^6 细胞/mL、大于 6×10^6 细胞/mL、大于 7×10^6 细胞/mL、大于 8×10^6 细胞/mL、大于 9×10^6 细胞/mL、大于 10×10^6 细胞/mL、大于 12×10^6 细胞/mL、大于 14×10^6 细胞/mL、大于 16×10^6 细胞/mL、大于 18×10^6 细胞/mL、大于 20×10^6 细胞/mL、大于 25×10^6 细胞/mL、大于 30×10^6 细胞/mL、大于 35×10^6 细胞/mL、大于 40×10^6 细胞/mL、大于 45×10^6 细胞/mL 或大于 50×10^6 细胞/mL 的活哺乳动物细胞浓度 (例如在第一和 / 或第二液体培养基中,或在第一、第二和第三时间段的一个或多个中的第一和 / 或第二液体培养基中)。例如,所述培养方法能得到 1×10^6 细胞/mL 至 3×10^6 细胞/mL、 3×10^6 细胞/mL 至 5×10^6 细胞/mL、 5×10^6 细胞/mL 至 7×10^6 细胞/mL、 7×10^6 细胞/mL 至 9×10^6 细胞/mL、 9×10^6 细胞/mL 至 11×10^6 细胞/mL、 10×10^6 细胞/mL 至 12×10^6 细胞/mL、 11×10^6 细胞/mL 至 13×10^6 细胞/mL、 12×10^6 细胞/mL 至 14×10^6 细胞/mL、 14×10^6 细胞/mL 至 16×10^6 细胞/mL、 16×10^6 细胞/mL 至 18×10^6 细胞/mL、 18×10^6 细胞/mL 至 20×10^6 细胞/mL、 20×10^6 细胞/mL 至 25×10^6 细胞/mL、 25×10^6 细胞/mL 至 30×10^6 细胞/mL、 30×10^6 细胞/mL 至 35×10^6 细胞/mL、 35×10^6 细胞/mL 至 40×10^6 细胞/mL、 40×10^6 细胞/mL 至 45×10^6 细胞/mL、 45×10^6 细胞/mL 至 50×10^6 细胞/mL 或大于 50×10^6 细胞/mL 的活哺乳动物细胞浓度。在一些实例中,本文所述的方法导致重组蛋白生物活性的增加 (例如与通过不同方法产生的重组蛋白的生物活性相比)。

[0076] 多种不同的确定细胞密度或活细胞密度的方法都是可以使用的,并且是本领域所熟知的。例如,可以对含有微载体的细胞培养物样品进行处理以将细胞从微载体表面释放,并且任选地能将被释放的细胞稀释于生理缓冲液中,并将细胞悬液 (例如经稀释的细胞悬液) 置于血细胞计数器中并用光学显微镜进行计数。在另一个方法中,活细胞密度可以用类似的方法来确定,但在生理缓冲液中包括染料,所述染料被非活细胞选择性地占据 (例如台盼蓝,如来自 Beckman Coulter 的 Vi-CELL 方法 (参见 Beckman Coulter 网站))。在又一个实例中,细胞密度或活细胞密度能用荧光辅助的流式细胞术 (例如来自 Merck Millipore 的 GUAVA (参见 Millipore 网站)) 和其他细胞计数方法来确定。

[0077] 在一些实例中,培养方法导致了显著提高的比生产率。例如,本文所提供的方法达到的比生产率能够比用本领域已知培养方法 (例如不同的摇瓶培养方法) 所达到的比生产率大至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、110 倍、120 倍、130 倍、140 倍、150 倍、160 倍、170 倍、180 倍、190

倍或 200 倍。本文所述方法所达到的体积生产率能够是至少 300 单位 /L/ 天、至少 400 单位 /L/ 天、至少 500 单位 /L/ 天、至少 600 单位 /L/ 天、至少约 800 单位 /L/ 天、至少约 1,000 单位 /L/ 天、至少约 1,200 单位 /L/ 天、至少约 1,400 单位 /L/ 天、至少约 1,600 单位 /L/ 天、至少约 1,800 单位 /L/ 天、至少约 2,000 单位 /L/ 天、至少约 2,200 单位 /L/ 天、至少约 3,000 单位 /L/ 天、至少 4,000 单位 /L/ 天、至少 5,000 单位 /L/ 天、至少 6,000 单位 /L/ 天、至少 7,000 单位 /L/ 天、至少 8,000 单位 /L/ 天、至少 9,000 单位 /L/ 天、至少 10,000 单位 /L/ 天或高于 10,000 单位 /L/ 天（例如在第一和 / 或第二液体培养基中,或在第一、第二和第三时间段的一个或多个中所使用的第一和 / 或第二液体培养基中）。在一些实施方案中,本方法所达到的生产率能够是至少 0.2g/L、至少 0.5g/L、至少 0.75g/L、至少 1.0g/L、至少 1.25g/L、至少 1.5g/L、至少 1.75g/L、至少 2.0g/L、至少 2.5g/L、至少 3.0g/L、至少 3.5g/L、至少 4.0g/L、至少 4.5g/L 或至少 5.0g/L（例如在第一和 / 或第二液体培养基中,或在第一、第二和第三时间段中所使用的第一和 / 或第二液体培养基中）。

[0078] 重组蛋白的生物学活性可以用多种本领域已知方法来评估,并取决于具体的重组蛋白的活性。例如,作为免疫球蛋白（例如,抗体或抗体片段）的重组蛋白的生物活性可以通过测量所述抗体与其特异性表位的亲和力来测定（例如,使用 Biocore 或竞争性酶联吸附测定法）。所述重组蛋白可以是酶（例如,重组半乳糖苷酶,例如,重组 α -半乳糖苷酶）,而生物活性可以通过测量酶的活性测定（例如,通过测量可检测底物的浓度的减少或可检测产物的浓度的增加（例如,使用分光光度法或光发射）来测定酶的催化速率常数）。例如,重组半乳糖苷酶的生物活性可以通过测量神经酰胺三己糖苷（GL-3）或半乳糖二糖基神经酰胺（galabiosylceramide）水平的减少,或神经酰胺二己糖苷或半乳糖水平的增加来检测。

[0079] 培养哺乳动物细胞的方法

[0080] 在本文所述方法的示例性的方法中,提供摇瓶。向摇瓶添加第一液体培养基,从而使所述培养基占据约 10% 至约 40%,例如约 20% 至约 30%（例如约 20% 至约 22%、约 22% 至约 24%、约 24% 至约 26%、约 26% 至约 28%、约 28% 至约 30%、约 20% 至约 25% 或约 25% 至约 30%）的摇瓶容积。向第一液体培养基添加（即在将培养基添加至摇瓶之前或之后）至少一个哺乳动物细胞和多个微载体（摇瓶中的终浓度是约 1.0g/L 至约 15.0g/L,例如摇瓶中的终浓度是约 1.0g/L 至约 2.5g/L、约 1.0g/L 至约 2.0g/L、约 1.0g/L 至约 1.75g/L、约 1.0g/L 至约 1.5g/L、约 1.0g/L 至约 1.25g/L、约 2.5g/L to 5.0g/L、约 5.0g/L 至约 7.5g/L、约 7.5g/L 至约 10.0g/L、约 10.0g/L 至约 12.5g/L、约 12.5g/L 至约 15.0g/L、约 1.0g/L 至约 5.0g/L、约 5.0g/L 至约 10.0g/L、约 10.0g/L 至约 15.0g/L、约 2.5g/L 至约 3.5g/L、约 3.0g/L 至约 4.0g/L、约 4.0g/L 至约 5.0g/L、约 5.0g/L 至约 6.0g/L、约 6.0g/L 至约 7.0g/L、约 7.0g/L 至约 8.0g/L、约 8.0g/L 至约 9.0g/L、约 9.0g/L 至约 10.0g/L、约 10.0g/L 至约 11.0g/L、约 11.0g/L 至约 12.0g/L、约 12.0g/L 至约 13.0g/L、约 13.0g/L 至约 14.0g/L 或约 14.0g/L 至约 15.0g/L）。本领域技术人员能够理解,向摇瓶添加液体培养基、哺乳动物细胞以及液体培养基的步骤可以按任意顺序发生。在约 32°C 至约 39°C（例如 32°C 至 34°C、32°C 至 37°C、34°C 至 37°C、37°C 至 39°C）将摇瓶温育一段时间,并在旋转振动装置上以约 85RPM 至约 125RPM（例如约 85RPM 至约 120RPM、约 85RPM 至约 110RPM、约 85RPM 至约 100RPM、约 85RPM 至约 95RPM、约 85RPM 至约 105RPM、约 90RPM 至约 110RPM、约 95RPM

至约 115RPM、约 100RPM 至约 120RPM、约 105RPM 至约 125RPM、约 110RPM 至约 125RPM 或约 100RPM 至约 125RPM) 进行搅拌。例如,细胞可以在培养箱中温育,如抛掷(轨道)直径为 25mm 或约 3mm 至约 50mm 的摇动培养箱,并相应地修改 RPM。在一段温育时间的最初 48-96 小时后,在所述时间段连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基(例如含有任意哺乳动物细胞浓度的,例如基本不含哺乳动物细胞和/或微载体的或是制成基本不含哺乳动物细胞和/或微载体的第一体积的第一液体培养基),并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基。通常,第一和第二体积是大致相等的,但可以有少量变化,例如第一与第二体积相比多至约 10% 的变化。在一些实施方案中,添加的第二体积的第二液体培养基比去除的第一体积的第一液体培养基少(例如最多约少 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 或 10%) 或多(例如最多约多 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9% 或 10%)。如本领域所知,术语“温育”可以包括短时间段(例如 10 秒至约 10 分钟、10 秒至约 20 分钟、10 秒至约 30 分钟、10 秒至约 40 分钟、约 10 秒至约 50 分钟或 10 秒至约 1 小时),其中将含有哺乳动物细胞和液体培养基的摇瓶从培养箱中移走,以便去除第一体积的第一液体培养基和添加第二体积的第二液体培养基。

[0081] 在另一个示例性的方法中,首先提供摇瓶。向摇瓶添加第一液体培养基,以使所述培养基占据约 10% 至约 40%,例如约 20% 至约 30% (例如约 20% 至约 22%、约 22% 至约 24%、约 24% 至约 26%、约 26% 至约 28%、约 28% 至约 30%、约 20% 至约 25% 或约 25% 至约 30%) 的摇瓶容积。向第一液体培养基添加(即在将培养基添加至摇瓶之前或之后)至少一个哺乳动物细胞和多个微载体(摇瓶中的终浓度是约 1.0g/L 至约 15.0g/L,例如摇瓶中的终浓度是约 1.0g/L 至约 2.5g/L、约 1.0g/L 至约 2.0g/L、约 1.0g/L 至约 1.75g/L、约 1.0g/L 至约 1.5g/L、约 1.0g/L 至约 1.25g/L、约 2.5g/L to 5.0g/L、约 5.0g/L 至约 7.5g/L、约 7.5g/L 至约 10.0g/L、约 10.0g/L 至约 12.5g/L、约 12.5g/L 至约 15.0g/L、约 1.0g/L 至约 5.0g/L、约 5.0g/L 至约 10.0g/L、约 10.0g/L 至约 15.0g/L、约 2.5g/L 至约 3.5g/L、约 3.0g/L 至约 4.0g/L、约 4.0g/L 至约 5.0g/L、约 5.0g/L 至约 6.0g/L、约 6.0g/L 至约 7.0g/L、约 7.0g/L 至约 8.0g/L、约 8.0g/L 至约 9.0g/L、约 9.0g/L 至约 10.0g/L、约 10.0g/L 至约 11.0g/L、约 11.0g/L 至约 12.0g/L、约 12.0g/L 至约 13.0g/L、约 13.0g/L 至约 14.0g/L 或约 14.0g/L 至约 15.0g/L)。如上文所看到的,向摇瓶添加液体培养基、哺乳动物细胞以及液体培养基的步骤可以任意顺序发生。然后,在第一时间段中,在约 35°C 至约 39°C (例如 35°C 至 37°C、36°C 至 39°C 或 37°C 至 39°C) 伴随约 85RPM 至约 125RPM (例如约 85RPM 至约 120RPM、约 85RPM 至约 110RPM、约 85RPM 至约 100RPM、约 85RPM 至约 95RPM、约 85RPM 至约 105RPM、约 90RPM 至约 110RPM、约 95RPM 至约 115RPM、约 100RPM 至约 120RPM、约 105RPM 至约 125RPM、约 110RPM 至约 125RPM 或约 100RPM 至约 125RPM) 的旋转搅拌对摇瓶进行温育。例如,细胞可以在培养箱中温育,如抛掷(轨道)直径为约 3mm 至约 50mm 的摇动培养箱。在所述第一时间段的最初 48-96 小时后,在每个随后的 24 小时时段里,(i) 连续地或周期性地从摇瓶去除第一体积的基本不含微载体的第一液体培养基,其中所述第一体积是第一液体培养基体积的约 10% 至约 95% (例如约 10% 至 20%、约 20% 至约 30%、约 30% 至约 40%、约 40% 至约 50%、约 50% 至约 60%、约 60% 至约 70%、约 70% 至约 80%、约 80% 至约 95%、约 50% 至约 95%、约 50% 至约 90% 或约 60% 至约 90%); 和 (ii) 向摇瓶添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一和第二体积大致相等。如上文所看到的,所述第一和第二体积大致相

等,但有少量变化,例如第一与第二体积相比多至约10%的变化。当细胞浓度达到约目标细胞密度时(例如约 1.0×10^6 细胞/mL、约 1.5×10^6 细胞/mL、约 2.0×10^6 细胞/mL、约 2.2×10^6 细胞/mL、约 2.4×10^6 细胞/mL、约 2.6×10^6 细胞/mL、约 2.8×10^6 细胞/mL、约 3.0×10^6 细胞/mL、约 3.2×10^6 细胞/mL、约 3.4×10^6 细胞/mL、约 3.6×10^6 细胞/mL、约 3.8×10^6 细胞/mL、约 4.0×10^6 细胞/mL、约 1.0×10^6 细胞/mL to 4.0×10^6 细胞/mL、约 2.0×10^6 细胞/mL至约 4.0×10^6 细胞/mL、约 2.0×10^6 细胞/mL至约 4.0×10^6 细胞/mL、约 4.0×10^6 细胞/mL至约 6.0×10^6 细胞/mL、约 6.0×10^6 细胞/mL至约 8.0×10^6 细胞/mL、约 8.0×10^6 细胞/mL至约 10.0×10^6 细胞/mL、约 10.0×10^6 细胞/mL至约 15.0×10^6 细胞/mL、约 15.0×10^6 至约 20.0×10^6 细胞/mL、约 20.0×10^6 细胞/mL至约 25.0×10^6 细胞/mL、约 25.0×10^6 细胞/mL至约 30.0×10^6 细胞/mL、约 30.0×10^6 细胞/mL至约 35.0×10^6 细胞/mL、约 35.0×10^6 细胞/mL至约 40.0×10^6 细胞/mL、约 40.0×10^6 细胞/mL至约 45.0×10^6 细胞/mL或约 45.0×10^6 细胞/mL至约 50.0×10^6 细胞/mL),于约 32°C 至约 39°C (例如约 32°C 至约 35°C 、约 32°C 至约 37°C 、约 32°C 至约 38°C 、约 34°C 至约 39°C 、约 34°C 至约 37°C 、约 35°C 至约 38°C 、约 35°C 至约 39°C 、约 36°C 至约 39°C 或约 37°C 至约 39°C)伴随旋转搅拌将摇瓶温育约2天至约7天(例如约2天至约4天、约3天至约5天、约4天至约6天和约5天至约7天)的第二时间段,并在每个24小时时段中,进行如上所述的步骤(i)和(ii),其中第一时间段中使用的第一和第二液体培养基与第二时间段中所使用的那些是基本不同类型的。然后,在大于2天(例如2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100天、大于100天、110天、120天、130天、140天、150天、160天、170天、180天、190天或200天或最多100天、125天、150天、175天、200天、225天、250天、275天或300天)的第三时间段中在约 35°C 至约 39°C (例如约 35°C 至约 37° 、 36°C 至约 38°C 、约 37°C 至约 39°C 或约 36°C 至约 39°C)伴随旋转搅拌将摇瓶进行温育,并在每个24小时时段中,进行如上所列出的步骤(i)和(ii),其中第二时间段中使用的第一和第二液体培养基与第三时间段中所使用的那些是相同类型的。

[0082] 这些培养方法的每个方面的多种非限制性的实例在下文描述。本文提供的方法的示例性的方面能无限制地在任何组合中使用。

[0083] 哺乳动物细胞

[0084] 本文提供的方法可以用于培养多种不同的哺乳动物细胞。在本文所述所有方法的一些实例中,哺乳动物细胞是贴壁细胞。能够用本文描述的任何方法培养的哺乳动物细胞的非限定性实例包括:中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如CHO DG44细胞、CHO-K1s细胞)、Sp2.0、黑素瘤细胞(例如,NS/0)、B细胞、杂交瘤细胞、T细胞、人胚肾(HEK)细胞(例如HEK 293E和HEK 293F)、非洲绿猴肾上皮细胞(Vero)细胞和Madin-Darby犬(可卡犬(Cocker Spaniel))肾上皮细胞(MDCK)细胞。能够使用本文描述的方法培养的其他哺乳动物细胞是本领域已知的。在本文所述方法的任一种的非限制性实例中,在本文所述培养方法的任一种开始时摇瓶中存在的哺乳细胞浓度为约 0.1×10^6 细胞/mL至约 0.5×10^6 细胞/mL(例如约 0.25×10^6 细胞/mL至约 0.5×10^6 细胞/mL)。

[0085] 哺乳动物细胞可以含有编码重组蛋白（例如由哺乳动物细胞分泌的重组蛋白）的重组核酸（例如稳定整合到哺乳动物细胞的基因组的核酸）。编码示例性重组蛋白的重组核酸的非限定性实例在下文描述，因为重组蛋白可以使用本文描述的方法产生。在一些情况中，置于用于培养的摇瓶中的哺乳动物细胞来自较大的培养。例如，摇瓶中的哺乳动物细胞可以源自大规模生物反应器培养，即，可以使用本所述方法的任一种来制备卫星培养物。

[0086] 培养基

[0087] 液体培养基是本领域已知的。所述第一和 / 或第二组织培养基（例如第一时间段或第二和第三时间段中使用的第一和第二液体培养基）可以补充有哺乳动物血清（例如胎牛血清和牛血清）和 / 或生长激素或生长因子（例如胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子）。作为另一种选择或另外地，第一和 / 或第二液体培养基（例如第一和 / 或第二液体培养基，例如第一时间段或第二和第三时间段中使用的第一和 / 或第二液体培养基）可以是化学成分确定的液体培养基、无动物来源组分的液体培养基、无血清液体培养基或含血清的液体培养基。化学成分确定的液体培养基、无动物来源组分的液体培养基、无血清液体培养基和含血清液体培养基的非限定性实例是市售的。

[0088] 液体培养基通常含有能量源（例如碳水化合物，如葡萄糖）、必需氨基酸（例如基本组的二十种氨基酸加上半胱氨酸）、维生素和 / 或其他以低浓度需要的有机化合物、游离脂肪酸和 / 或微量元素。如有需要，第一和 / 或第二液体培养基（例如第一时间段或第二和第三时间段中使用的第一和第二液体培养基）可以补充有例如哺乳动物激素或生长因子（例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子）、盐和缓冲液（例如钙、镁和磷酸盐）、核苷和碱基（例如腺苷、胸苷和次黄嘌呤）、蛋白质和组织水解物和 / 或这些添加剂的任意组合。

[0089] 在本文描述的方法中特别有用的液体培养基的非限定性实例包括，例如，CD CHO、Opti CHO 和 Forti CHO（全部可从 Life Technologies ;Grand Island, NY 获得）、Hycell CHO 培养基（Thermo Fisher Scientific, Inc. ;Waltham, MA）、Ex-cell CD CHO 融合培养基（Sigma-Aldrich Co. ;St. Louis, MO）和 PowerCHO 培养基（Lonza Group, Ltd. ; Basel, Switzerland）。在本方法中也可能有用的培养基组分包括但不限于化学成分确定的（CD）水解物，例如，CD 蛋白胨、CD 多肽（两个或多个氨基酸）和 CD 生长因子。液体组织培养基和培养基组分的其他实例是本领域已知的。

[0090] 技术人员会理解本文描述的第一液体培养基和第二液体培养基可以是相同类型的培养基或是不同类型的培养基。例如，在所述方法（所述方法包括第一时间段、第二时间段和第三时间段）的实例中，第一时间段中使用的第一和第二液体培养基与第二和第三时间段中使用的第一和第二液体培养基是基本不同的，并且第二和第三时间段中使用的第一和第二液体培养基是基本相同的。例如，第一时间段中使用的第一和第二液体培养基可以选自含血清的液体培养基或含哺乳动物蛋白或哺乳动物蛋白级分或提取物的液体培养基，并且第二和第三时间段中使用的第一和第二液体培养基可以选自：无动物来源组分的液体培养基、无血清的液体培养基、化学成分确定的液体培养基和无蛋白质的液体培养基。

[0091] 微载体

[0092] 在本文所述的方法中，将多个微载体添加至液体培养基（例如第一和 / 或第二液体培养基）。例如，所述多个微载体的平均直径可以是约 20 μm 至约 1mm（例如约 20 μm 至约

250 μm 、约 100 μm 至约 250 μm 、约 150 μm 至约 250 μm 、约 250 μm and 500 μm 、约 200 μm 至约 300 μm 、约 750 μm and 1mm、约 200 μm 至约 800 μm 、约 200 μm 至约 500 μm 、约 500 μm 至约 800 μm), 其中所述微载体具有表面, 所述表面是容许性 (permissive) 的或是促进哺乳动物细胞 (例如本文描述的或本领域已知的哺乳动物细胞的任一种) 附着的。在一些实例中, 微载体可以含有一个或多个孔 (例如一个或多个平均直径为约 10 μm 至约 100 μm (例如约 10 μm 至 20 μm 、约 20 μm 至约 30 μm 、约 30 μm 至约 40 μm 、约 50 μm 至约 60 μm 、约 60 μm 至约 70 μm 、约 70 μm 至约 80 μm 、约 80 μm 至约 90 μm 、约 90 μm 至约 100 μm 、约 10 μm 至约 45 μm 、约 45 μm 至约 80 μm 、约 25 μm 至约 35 μm 或约 30 μm) 的孔)。在一些实施方案中, 所述多个微载体的表面和 / 或所述多个微载体中一个或多个孔的表面是涂覆有促进哺乳动物细胞附着至微载体的试剂的 (例如附着至微载体的外表面和 / 或微载体中的孔的表面)。此类可用于促进哺乳动物细胞附着的试剂的实例包括但不限于明胶、胶原、多聚-L- 鸟氨酸、聚苯乙烯和层粘连蛋白。

[0093] 在一些实例中, 所述微载体的平均有效细胞结合表面积为约 0.5 m^2/g 干物质 (dry) 至 2.0 m^2/g 干物质 (例如约 0.75 m^2/g 干物质至 1.25 m^2/g 干物质、约 1.0 m^2/g 干物质至约 1.5 m^2/g 干物质、约 1.25 m^2/dry 至约 1.5 m^2/g 干物质、约 1.5 m^2/g 干物质和约 2.0 m^2/g 干物质和约 1.1 m^2/g 干物质)。在一些实例中, 所述微载体的平均体积为约 10mL/g 干物质至约 70mL/g 干物质 (例如约 10mL/g 干物质至约 20mL/g 干物质、约 20mL/g 干物质至约 30mL/g 干物质、约 30mL/g 干物质至约 40mL/g 干物质、约 40mL/g 干物质至约 50mL/g 干物质、约 50mL/g 干物质至约 60mL/g 干物质、约 60mL/g 干物质至约 70mL/g 干物质、约 10mL/g 干物质至约 40mL/g 干物质、约 30mL/g 干物质至约 40mL/g 干物质、约 40mL/g 干物质至约 70mL/g 干物质或约 40mL/g 干物质)。在一些实施方案中, 所述微载体的平均相对密度是 0.8g/mL 至约 1.2g/mL (例如约 0.8g/mL 至约 0.9g/mL、约 0.9g/mL 至约 1.0g/mL、约 1.0g/mL 至约 1.1g/mL、约 1.0g/mL、约 1.1g/mL 至约 1.2g/mL、约 0.95g/mL 至约 1.05g/mL 或约 1.03g/mL)。

[0094] 在一些实施方案中, 所述微载体大致是球形或椭圆形的形状。在其他实例中, 所述微载体具有经刮擦的或粗糙的表面, 其带有增加微载体的外表面总面积的小突起。在一些实施方案中, 微载体具有网络状结构。在一些实例中, 微载体是吸湿性的。在一些实例中, 微载体含有纤维素。

[0095] 在一些实施方案中, 微载体具有的外表面和 / 或微载体孔具有的表面是带正电荷的 (例如, 由于 N, N- 二乙基氨基乙基基团的存在而带正电荷)。在一些实例中, 微载体具有网络或网状或网样结构。微载体可具有约 0.5me/g 至约 2.5me/g (例如约 0.5me/g 至约 1.5meq/g、约 0.75meq/g 至约 1.25meq/g、约 1.1meq/g、约 1.5meq/g 至约 2.5meq/g、约 1.5meq/g 至约 2.0meq/g、约 1.8meq/g、约 0.5meq/g 至约 1.0meq/g 或约 1.0meq/g 至约 1.5meq/g) 的平均电荷密度。

[0096] 在一些情况中, 微载体可以含有天然聚合物和 / 或合成聚合物。合成聚合物的非限定性实例包括聚乙二醇 (PEG)、聚环氧乙烷 (polyethylene oxide)、聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine)、二甘醇 (diethyleneglycol)、三甘醇 (triethyleneglycol)、聚亚烷基二醇 (polyalkylene glycol)、聚氧化烯 (polyalkaline oxide)、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol)、多聚磷酸钠 (sodium polyphosphate)、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone)、聚乙烯基甲基醚 (polyvinylmethylether)、聚

甲基噁唑啉 (polymethyloxazoline)、聚乙基噁唑啉 (polyethyloxazoline)、聚羟丙基噁唑啉 (polyhydroxypropyloxazoline)、聚羟基丙基甲基丙烯酸酰胺 (polyhydroxypropyl methacrylamide)、聚甲基丙烯酸酰胺 (polymethacrylamide)、聚二甲基丙烯酸酰胺 (polydimethylacrylamide)、聚甲基丙烯酸羟丙基酯 (polyhydroxypropylmethacrylate)、聚丙烯酸羟乙酯 (polyhydroxyethyl acrylate)、羟甲基纤维素 (hydroxymethylcellulose)、羟乙基纤维素 (hydroxyethylcellulose)、聚甘油 (polyglycerine)、聚天冬酰胺 (polyaspartamide)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物 (polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer) (泊洛沙姆 (poloxamer))、羧酸 (例如, 丙烯酸、甲基丙烯酸、衣康酸和马来酸)、聚氧乙烯类 (polyoxyethylenes)、聚环氧乙烷 (polyethyleneoxide)、不饱和烯属一元二羧酸 (unsaturated ethylenic monodicarboxylic acids)、聚乳酸 (polylactic acid; PLA)、聚环氧丙烷 (polypropylene oxide)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly(lactide-co-glycolide)) (PLGA)、聚(ε-己内酯)、聚(乙基乙烯) (poly(ethylethylene))、聚丁二烯 (polybutadiene)、聚乙二醇酸 (polyglycolide)、聚甲基丙烯酸酯 (polymethylacrylate)、聚乙烯基丁基醚 (polyvinylbutylether)、聚苯乙烯、聚环戊二烯基甲基降冰片烯 (polycyclopentadienyl methylbornene)、聚乙烯丙烯 (polyethylenepropylene)、聚乙烯乙烯 (polyethylethylene)、聚异丁烯 (polyisobutylene)、聚硅氧烷 (polysiloxane)、丙烯酸甲酯 (methyl acrylate)、丙烯酸乙酯 (ethyl acrylate)、丙烯酸丙酯 (propyl acrylate)、丙烯酸正丁酯 (n-butyl acrylate)、丙烯酸异丁酯 (isobutyl acrylate)、丙烯酸 2-乙酯 (2-ethyl acrylate)、丙烯酸叔丁酯 (t-butyl acrylate)、甲基丙烯酸酯类 (methacrylates) (例如, 甲基丙烯酸乙酯 (ethyl methacrylate)、甲基丙烯酸正丁酯 (n-butyl methacrylate) 和甲基丙烯酸异丁酯 (isobutyl methacrylate))、丙烯腈类 (acrylonitriles)、甲基丙烯腈 (methacrylonitrile)、乙烯基类 (vinyl) (例如, 乙酸乙烯酯 (vinyl acetate)、叔碳酸乙烯酯 (vinylversatate)、丙酸乙烯酯 (vinylpropionate)、乙烯基甲酰胺 (vinylformamide)、乙烯基乙酰胺 (vinylacetamide)、乙烯基吡啶 (vinylpyridines) 和乙烯基咪唑 (vinylimidazole))、氨基烷基类 (aminoalkyls) (例如, 氨基烷基丙烯酸酯 (aminoalkylacrylates)、氨基烷基甲基丙烯酸酯 (aminoalkylsmethacrylates) 和氨基烷基(甲基)丙烯酸酰胺 (aminoalkyl(meth)acrylamides))、苯乙烯、聚亚烷基二醇 (polyalkylene glycol)、多碱氧化物 (polyalkaline oxide) 和乳酸。天然聚合物的非限定性实例包括纤维素、卵磷脂和透明质酸。微载体可以含有不同聚合物以相同或不同比例混合的混合物 (例如, 本文描述的或本领域已知的一种或多种聚合物的任意组合)。本文描述的任何微载体都可以含有核心和外层, 所述核心含有一种或多种聚合物 (例如本文描述的或本领域已知的任何聚合物), 所述外层含有一种或多种不同的聚合物 (例如本文描述的或本领域已知的任何聚合物)。

[0097] 能够在本文描述的任何方法中使用的非限定性示例性微载体包括 CytoPore™ 1 和 CytoPore™ 2 (可从 GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, New Jersey 获得)。能够在本文描述的任何方法中使用的微载体的其他实例是公众可以获得的和本领域已知的。

[0098] 摇瓶

[0099] 所述摇瓶可以是无菌的且体积为约 125mL 至约 3L (例如 3-L、2.5-L、2-L、1.5-L、

1-L、750-mL、500-mL、400-mL、300-mL、250-mL、200-mL、150-mL 或 125-mL 摇瓶)。例如,摇瓶的体积可以是约 250mL 至约 300mL、约 300mL 至约 400mL、约 400mL 至约 500mL、约 500mL 至约 600mL、约 600mL 至约 700mL、约 700mL 至约 800mL、约 800mL 至约 900mL、约 900mL 至约 1L、约 100mL 至约 500mL、约 500mL 至约 1L、约 600mL 至约 1L、约 1L 至约 3L、约 1L 至约 2L、约 2L 至约 3L、约 1.5L 至约 2.5L。摇瓶可以包含至少一个透气性的表面(例如至少一个具有透气性膜的表面,其还可起到无菌屏障的作用)和/或至少一个通气帽。摇瓶在其外表面上可以具有允许摇瓶稳固放置于组织培养培养箱(例如旋转培养箱)中的结构。

[0100] 摇瓶的内表面可以有至少一个涂层(例如至少一个明胶、胶原、多聚-L-鸟氨酸、聚苯乙烯和层粘连蛋白的涂层)。能用于本文所述任何的方法任一种的示例性的摇瓶可以购自 Corning Inc. (Tewsbury, MA)、Presens (Brøndby, Denmark)、Nalge-Nunc International (Rochester, NY)。示例性的摇瓶包括 T-瓶、锥形瓶或其本领域内公认的任何修改版本。摇瓶的其他实例(例如不同形状和尺寸的摇瓶)和摇瓶的内表面涂层的其他实例是本领域已知的且可以用于本方法中。

[0101] 搅拌

[0102] 本文描述的方法涉及对含哺乳动物细胞、多个微载体和第一和/或第二液体培养基的培养物进行搅拌。搅拌可以约 85RPM 至约 125RPM(例如约 85RPM 至约 120RPM、约 85RPM 至约 110RPM、约 85RPM 至约 100RPM、约 85RPM 至约 95RPM、约 85RPM 至约 105RPM、约 90RPM 至约 110RPM、约 95RPM 至约 115RPM、约 100RPM 至约 120RPM、约 105RPM 至约 125RPM、约 110RPM 至约 125RPM、约 100RPM 至约 125RPM、约 95RPM 至约 105RPM、约 95RPM 至约 105RPM、约 105RPM 至约 115RPM 或约 115RPM 至约 125RPM) 的频率进行(例如在培养箱中进行,如抛掷(轨道)直径为约 3mm 至约 50mm 的摇动培养箱)。

[0103] 如本领域所能够理解的,搅拌的水平(例如 RPM 速度)可依赖于摇瓶的大小和形状(例如摇瓶的直径)、用于进行搅拌的培养箱的抛掷(轨道)直径以及所述多个微载体的平均尺寸、形状、密度和浓度而变化。例如,较小的抛掷(轨道)直径可能需要更高水平的搅拌(例如较高的 RPM 速度),而较大的抛掷(轨道)直径可能需要较低水平的搅拌(例如较低的 RPM 速度)来达到要获得最优的细胞密度和重组蛋白生产所必需的条件。在另一实例中,直径较大的摇瓶可能需要较低的 RPM 速度,而直径较小的摇瓶可能需要较高的 RPM 速度来达到要获得最优的细胞密度和重组蛋白生产所必需的条件。搅拌频率可以依赖细胞培养条件(例如微载体的浓度、密度和/或尺寸和/或表面形状)而变化。如本领域所能够理解的,如果第一和/或第二液体培养基中存在的微载体(例如所述第一、第二和第三时间段中使用的第一和/或第二液体培养基)质量高、密度高、外表面积大或速率相对较高,由这些微载体产生的剪切力能对培养中的细胞存活力和重组蛋白生产具有负面影响。此外,本领域技术人员理解,搅拌速率应当高到足以避免显著的和/或不想要的微载体沉积(settling)于摇瓶底部。

[0104] 在一些实施方案中,可以用旋转培养箱以约 25mm 至约 50mm 的抛掷(轨道)直径和约 85RPM 至约 125RPM(例如约 85RPM 至约 120RPM、约 85RPM 至约 110RPM、约 85RPM 至约 100RPM、约 85RPM 至约 95RPM、约 85RPM 至约 105RPM、约 90RPM 至约 110RPM、约 95RPM 至约 115RPM、约 100RPM 至约 120RPM、约 105RPM 至约 125RPM、约 110RPM 至约 125RPM、约 100RPM 至约 125RPM 或本文所述的 RPM 范围中的任何值)的搅拌来进行温育。在一些实施方案中,用

旋转培养箱以约 3mm 至约 25mm 的抛掷（轨道）直径和约 85RPM 至约 125RPM（例如约 85RPM 至约 120RPM、约 85RPM 至约 110RPM、约 85RPM 至约 100RPM、约 85RPM 至约 95RPM、约 85RPM 至约 105RPM、约 90RPM 至约 110RPM、约 95RPM 至约 115RPM、约 100RPM 至约 120RPM、约 105RPM 至约 125RPM、约 110RPM 至约 125RPM、约 100RPM 至约 125RPM 或本文所述的 RPM 范围中的任何值）的搅拌来进行温育。

[0105] 例如，搅拌可以用旋转的圆形摇动以约 85RPM 至约 125RPM（例如约 85RPM 至约 120RPM、约 85RPM 至约 110RPM、约 85RPM 至约 100RPM、约 85RPM 至约 95RPM、约 85RPM 至约 105RPM、约 90RPM 至约 110RPM、约 95RPM 至约 115RPM、约 100RPM 至约 120RPM、约 105RPM 至约 125RPM、约 110RPM 至约 125RPM、约 100RPM 至约 125RPM 或本文所述的 RPM 范围中的任何值）的频率来进行。作为另一种选择或另外地，可以用椭圆形旋转摇动或水平和 / 或垂直摆动摇瓶来对摇瓶进行搅拌。搅拌可以连续地或周期性地进行的。

[0106] 可以用带有机械装置的湿润气氛的受控培养箱（例如湿度约为或大于 20%，例如约为或大于 30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 或湿度为 100%）来进行搅拌，所述机械装置提供对一个或多个摇瓶的搅拌，所述摇瓶含有哺乳动物细胞、多个微载体和液体培养基（例如第一和 / 或第二液体培养基，和第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的的第一和 / 或第二液体培养基）。

[0107] 反应器角度

[0108] 在一些实施方案中，摇瓶可以距水平约 25 度至约 90 度（例如约 25 度至约 55 度、约 25 度至约 90 度、约 35 度至约 90 度、约 45 度至约 90 度或约 35 至约 65 度）的反应器角度进行温育。例如，可以将摇瓶置于距水平约 60 度至约 85 度、距水平约 70 度至约 85 度、距水平约 25 度至约 60 度、约 25 度至约 55 度、距水平约 30 度至约 55 度、距水平约 40 度至约 55 度或距水平约 40 度至约 50 度的反应器角度。可以将摇瓶置于距水平约 45 度至约 50 度或距水平约 40 度至约 45 度。可以将摇瓶置于明确地且稳固地（securely）将摇瓶以距水平约 25 度至约 90 度的反应器角度放置（例如明确地将容器以约 25 度至约 90 度、约 35 度至约 90 度、约 45 度至约 90 度、约 35 度至约 65 度或距水平约 40 度至约 55 度的反应器角度放置）的装置中。对摇瓶的放置可以用任何本领域已知方法来进行，例如通过使用支架或锁定元件来进行。

[0109] 温度

[0110] 本文所述的培养方法可以在 32℃ 至约 39℃ 的温度进行，例如约 32℃ 至约 37℃。例如，在一些方法中，从培养运行开始至结束，摇瓶可以在约 37℃ 的温度进行温育。本文所述方法的一些实例包括第一时间段、第二时间段和第三时间段，在所述第一时间段期间摇瓶在约 35℃ 至约 39℃，例如约 35℃ 至约 37℃ 进行温育，在所述第二时间段期间摇瓶在约 32℃ 至约 39℃，例如约 32℃ 至约 37℃ 进行温育，在所述第三时间段期间摇瓶在约 35℃ 至约 39℃，例如约 35℃ 至约 37℃ 进行温育。技术人员会理解，温度在培养方法中的特定时间点处可以变化（例如在第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个期间），例如基于按小时或按天的变化。例如，温度可以在用哺乳动物细胞初始接种摇瓶后约 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天或约 20 天或更多天或是在本文所述第一、第二和 / 或第三时间段内的任意时间点发生变化或移动（例如提高或降低）。例如，温度可以上移（例如多至或约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、

0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 或 10.0℃的变化)。例如,温度可以下移(例如多至或约 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 或 10℃的变化)。

[0111] 培养基去除和替换

[0112] 本文所述的方法包括从摇瓶去除第一体积的第一液体培养基(例如含有任意浓度的哺乳动物细胞和任意重组蛋白的,例如基本不含细胞和/或微载体的第一体积的第一液体培养基),和向摇瓶添加第二体积的第二液体培养基,其中所述第一体积和第二体积大致相等。去除和添加可以同时或序贯地进行,或以二者的组合进行。此外,去除和添加可以连续地进行(例如以在任何给定的时间段内(例如在 24 小时时段内、在约 1 小时至约 24 小时的递增的时间段内或大于 24 小时的递增的时间段内)去除和替换摇瓶容积或第一液体培养基体积的 0.1%至 800%(例如 1%至 700%、1%至 600%、1%至 500%、1%至 400%、1%至 350%、1%至 300%、1%至 250%、1%至 100%、100%至 200%、5%至 150%、10%至 50%、15%至 40%、8%至 80%、至 4%至 30%)的体积),或是周期性地(例如每隔两天 1 次 (once every third day)、每隔一天 1 次、每天 1 次、每天 2 次、每天 3 次、每天 4 次、每天 5 次或每天多于 5 次),或是以二者的组合进行。当周期性地进行时,去除或替换(例如约 24 小时时段内、约 0.1 小时至约 24 小时的递增的时间段内或大于 24 小时的递增的时间段内)的体积可以是例如摇瓶容积或第一液体培养基体积的 0.1%至 800%(例如 1%至 700%、1%至 600%、1%至 500%、1%至 400%、1%至 300%、1%至 200%、1%至 100%、100%至 200%、5%至 150%、10%至 50%、15%至 40%、8%至 80%和 4%至 30%)。在一些情况下,在整个或部分的培养期,去除的第一体积的第一液体培养基和添加的第二体积的第二液体培养基在可以每个 24 小时时段(或是约 0.1 小时至约 24 小时的递增的时间段或大于 24 小时的递增的时间段)内可以保持大致相同。如本领域所知的,第一体积的第一液体培养基的去除速率(体积/时间单位)和第二体积的第二液体培养基的添加速率(体积/时间单位)可以是变化的。第一体积的第一液体培养基的去除速率(体积/时间单位)和第二体积的第二液体培养基的添加速率(体积/时间单位)可以是大致相同的或可以是不同的。

[0113] 或者,在培养期间,去除的或添加的体积可以在每个 24 小时时段(或是约 0.1 小时至约 24 小时的递增的时间段或大于 24 小时的递增的时间段)内变化(例如逐渐增加)。例如,在培养期间,每个 24 小时时段(或是约 1 小时至 24 小时以上的递增的时间段或大于 24 小时的递增的时间段)内去除的第一液体培养基的体积和添加的第二液体培养基的体积可以是增加的(例如逐渐增加或是通过交错增量增加),从摇瓶容积或第一液体培养基体积的 0.5%至约 20%增至摇瓶容积或第一液体培养基体积的约 25%至约 150%。

[0114] 在本文所述方法的一些实例中,在 48-96 小时的培养期后,在每个 24 小时时段中,去除的第一液体培养基的第一体积(例如在第一、第二和/或第三时间段中去除的)和添加的第二液体培养基的第二体积(例如在第一、第二和/或第三时间段中添加的)是第一液体培养基体积的约 10%至约 95%(例如约 10%至约 20%、约 10%至约 20%、约 20%至约 30%、约 30%至约 40%、约 40%至约 50%、约 50%至约 60%、约 60%至约 70%、约 70%至约 80%、约 80%至约 90%、约 85%至约 95%、约 60%至约 80%或约 70%)。

[0115] 技术人员会理解,所述第一液体培养基和第二液体培养基可以是同类型的培养基。在其他实例中,所述第一液体培养基和第二液体培养基可以是基本不同的(substantially different)。在一些包含了第一时间段、第二时间段和第三时间段的实施方案中,第一时间段中使用的第一和第二液体培养基与第二时间段中使用的第一和第二液体培养基相比是基本不同类型的培养基,而第二时间段中使用的第一和第二液体培养基与第三时间段中使用的第一和第二液体培养基相比是相同类型的培养基。如本领域会理解的,第一时间段中使用的第一和第二液体培养基不一定要完全相同(只要它们是相同类型的培养基);第二时间段和/或第三时间段中使用的第一和第二液体培养基中的任一种都不一定是完全相同的(同样地,只要它们是相同类型的培养基并且与第一时间段中使用的第一和第二液体培养基是基本不同培养基类型的)。

[0116] 例如,可以通过离心(例如慢速摆动桶离心)摇瓶或用任何其他自动化系统、并从上清去除第一体积的第一液体培养(例如基本不含细胞和/或微载体的第一体积的第一液体培养基),从而去除第一体积的第一液体培养基。作为另一种选择或另外地,可以通过第一体积的第一液体培养基的渗漏作用(seeping)或重力流,经过带有排除哺乳动物细胞和/或微载体的分子量截留的无菌膜来去除第一体积的第一液体培养基。作为另一种选择或另外地,可以通过停止搅拌或显著减降低搅拌速率一段时间(至少10秒(例如至少30秒、40秒、50秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、40分钟、50分钟或1小时))并从摇瓶的顶部去除或抽取第一体积的第一液体培养基(例如从一部分液体培养基去除,所述部分液体培养基中微载体未因重力而沉淀),从而去除第一体积的第一液体培养基。在停止搅拌期间,摇瓶可以置于培养箱中。本领域技术人员会理解,当第一液体培养基已从摇瓶移除时,可以将摇瓶从培养箱移开一段短时间(例如少于30分钟、20分钟、15分钟、10分钟、8分钟、6分钟、4分钟、2分钟或1分钟)。

[0117] 可以例如通过灌注泵向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基。可以以手动的(例如通过直接将第二体积的第二液体培养基吸移至第一液体培养基上)或自动的方式向第一液体培养基添加第二液体培养基。

[0118] 在一些情况下,去除第一体积的第一液体培养基(例如基本不含哺乳动物细胞和/或微载体的第一体积的第一液体培养基)和向第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养不在用哺乳动物细胞接种摇瓶至少1小时内(例如2小时内、3小时内、4小时内、5小时内、6小时内、7小时内、8小时内、9小时内、10小时内、12小时内、14小时内、16小时内、18小时内、24小时内、36小时内、48小时内、72小时内、96小时内或96小时后)进行。

[0119] CO₂

[0120] 本文描述的方法可以进一步包括在含有至多或大约15% CO₂(例如至多或大约14% CO₂、12% CO₂、10% CO₂、8% CO₂、6% CO₂、5% CO₂、4% CO₂、3% CO₂、2% CO₂或至多或大约1% CO₂)的气氛中温育摇瓶。另外,本文描述的任何方法可包括在湿润气氛(例如,至少或大约20%、30%、40%、50%、60%、70%、85%、80%、85%、90%或至少或大约95%湿度,或大约100%湿度)中温育摇瓶。

[0121] 示例性设备

[0122] 能够用于进行本文描述的培养方法的设备的非限制性实例包括:Appropriate Technical Resources(Maryland, USA)分销的INFORS Multiron摇动培养箱(INFORS;

Basel, Switzerland), 和 Kuhner 摇动培养箱 (Kuhner AG ;Basel, Switzerland)。能够用于进行培养方法的设备的非限制性实例包括具有约 3mm 至约 50mm (例如, 约 1mm 至约 25mm 或约 25mm 至约 50mm) 的抛掷 (轨道) 直径的旋转培养箱。摇动培养箱和滚动培养箱的其他实例是本领域已知的。

[0123] 产生重组蛋白的方法

[0124] 本文还提供产生重组蛋白的方法, 其包括培养使用本文描述的方法能够产生重组蛋白的细胞。在执行所述方法之后, 可以从哺乳动物细胞 (例如, 附着于所述微载体的哺乳动物细胞) 和 / 或从第一或第二培养基 (例如, 在第一、第二和第三时间段中的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基) 回收所述重组蛋白。在一些实施方案中, 在培养方法期间任何给定的时间点 (例如在培养的第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100 天或在超过 100 天的培养中的一天或数天, 或是在第一时间段、第二时间段和第三时间段的一个或多个期间的任何时间点) 从第一和 / 或第二液体培养基回收重组蛋白。

[0125] 技术人员会理解可以以任意组合使用多种培养参数 (例如, 本文描述的摇瓶、体积、替换培养物体积的速率或频率、搅拌频率、微载体类型、温度、培养基和 CO₂ 浓度) 中的任何参数来进行这些方法。另外, 本文描述的或本领域已知的任何哺乳动物细胞都可以用于产生重组蛋白。

[0126] 可以使用分子生物学和分子遗传学中已知的多种多样的方法将编码重组蛋白的核酸引入哺乳动物细胞。非限定性实例包括转染 (例如, 脂质转染)、转导 (例如, 慢病毒、腺病毒或逆转录病毒感染) 和电穿孔。在一些情况中, 编码重组蛋白的核酸不是稳定地整合在哺乳动物细胞的染色体中的 (瞬时转染); 而在其他方法中核酸是整合的。作为另一种选择或者此外, 编码重组蛋白的核酸可以存在于质粒和 / 或哺乳动物人工染色体 (例如, 人的人工染色体) 中。作为另一种选择或者此外, 可以使用病毒载体 (例如, 慢病毒、逆转录病毒或腺病毒载体) 将核酸引入细胞中。可以将核酸与启动子序列 (例如, 强启动子, 如 β -肌动蛋白启动子和 CMV 启动子或诱导型启动子) 可操作地连接。如有需要, 含有核酸的载体可以还含有选择标记 (例如, 为哺乳动物细胞赋予潮霉素、嘌呤霉素或新霉素抗性的基因)。

[0127] 在一些情况中, 重组蛋白是分泌蛋白并且由哺乳动物细胞释放至胞外培养基 (例如第一和 / 或第二液体培养基, 例如第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基) 中。例如, 编码可溶性重组蛋白的核酸序列可以含有编码在重组蛋白的 N 或 C 末端的分泌信号肽的序列, 其通过哺乳动物细胞中存在的酶被切割, 并且随后释放至胞外培养基 (例如第一和 / 或第二液体培养基, 或第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基) 中。在其他情况中, 所述重组蛋白是不被分泌的可溶性蛋白, 并且所述重组蛋白从哺乳动物细胞内回收 (例如从附着至微载体的哺乳动物细胞内回收, 例如从附着至微载体的哺乳动物细胞在其从微载体脱离后进行回收)。

[0128] 能够通过本文提供的方法产生的重组蛋白的非限定性实例包括免疫球蛋白 (包

括轻链和重链免疫球蛋白、抗体或抗体片段（例如本文描述的任何抗体片段）、酶（例如半乳糖苷酶（例如 α -半乳糖苷酶）、Myozyme 或 Cerezyme）、蛋白质（例如人促红细胞生成素、肿瘤坏死因子（TNF）或干扰素 α 或 β ）或免疫原性或抗原性蛋白或蛋白片段（例如用于在疫苗中使用的蛋白质）。在一些实施方案中，重组蛋白是工程化的抗原结合多肽，其含有至少一个多功能重组蛋白支架（参见例如，在 Gebauer 等, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009；和美国专利申请公开号 2012/0164066（通过提述以其整体并入本文）中描述的重组抗原结合蛋白）。作为抗体的重组蛋白的非限定性实例包括：帕尼单抗（panitumumab）、奥马珠单抗（omalizumab）、abagovomab、阿昔单抗（abciximab）、actoxumab、阿达木单抗（adalimumab）、adecatumumab、阿非莫单抗（afelimomab）、afutuzumab、alacizumab、alacizumab、阿仑单抗（alemtuzumab）、alirocumab、altumomab、amatuximab、anatumomab、apolizumab、atinumab、托珠单抗（tocilizumab）、basilizumab、beatumomab、贝利单抗（belimumab）、贝伐单抗（bevacizumab）、biciromab、canakinumab、西妥昔单抗（cetuximab）、达珠单抗（daclizumab）、densumab、艾库组单抗（eculizumab）、依决洛单抗（edrecolomab）、依法利珠单抗（efalizumab）、efungumab、ertumaxomab、etaracizumab、戈利木单抗（golimumab）、英夫利昔单抗（infliximab）、他珠单抗（natalizumab）、帕利珠单抗（palivizumab）、帕尼单抗（panitumumab）、培妥珠单抗（pertuzumab）、兰尼单抗（ranibizumab）、利妥昔单抗（rituximab）、托珠单抗（tocilizumab）和曲妥单抗（trastuzumab）。能够通过本领域描述的方法产生的治疗性抗体的其他实例是本领域已知的。能够通过本发明的方法产生的重组蛋白的其他非限定性实例包括：阿葡糖苷酶 α （alglucosidase alfa）、laronidase、阿贝西普（abatacept）、加硫酶（galsulfase）、促黄体素 α 、抗血友病因子、阿加糖酶- β （agalsidase beta）、干扰素 β -1a、阿法达贝泊汀（darbepoetin alfa）、替奈普酶（tenecteplase）、伊纳西普（etanercept）、凝血因子 IX、促卵泡激素、干扰素 β -1a、伊米昔酶（imiglucerase）、阿法链道酶（dornase alfa）、阿法依伯汀（epoetin alfa）和阿替普酶（alteplase）。

[0129] 分泌的可溶性重组蛋白可以通过将液体培养基从微载体或其结合的哺乳动物细胞去除或以其他方式在物理上分开而从液体培养基（例如第一和 / 或第二液体培养基，例如第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基）回收。用于从哺乳动物细胞去除液体培养基的多种不同的方法是本领域已知的，包括，例如，离心、过滤、移液和 / 或抽吸。然后可以使用多种生物化学技术从液体培养基回收并进一步纯化分泌的重组蛋白，所述技术包括多种类型的层析（例如，亲和层析、分子筛层析、阳离子交换层析或阴离子交换层析）和 / 或过滤（例如，分子量截留过滤）。

[0130] 为了回收胞内重组蛋白，可以裂解哺乳动物细胞（例如附着至微载体的哺乳动物细胞）。在一些实例中，哺乳动物细胞在被裂解前从微载体表面释放。用于从微载体表面释放附着细胞的方法是本领域已知的（例如涡旋和搅拌）。在其他实例中，在哺乳动物细胞仍附着在微载体上时将哺乳动物细胞裂解（例如用下文列出的示例性方法的任一种来裂解）。

[0131] 用于裂解哺乳动物细胞的多种多样的方法是本领域已知的，包括，例如，超声处理和 / 或洗涤剂、酶和 / 或化学裂解。可以使用多种本领域已知的生物化学方法从哺乳动物细胞裂解液纯化重组蛋白，所述方法通常以离心去除细胞碎片的步骤开始，然后是一个或

多个额外步骤（例如，一种或多种类型的层析（例如，亲和层析、分子筛层析、阳离子交换层析或阴离子交换层析）和 / 或过滤（例如，分子量截留过滤））。

[0132] 在一些实施方案中，回收的重组蛋白是按重量计至少或约 50% 纯的，例如，按重量计至少或约 55% 纯的，按重量计至少 60% 纯的，按重量计至少 65% 纯的，按重量计至少 70% 纯的，按重量计至少 75% 纯的，按重量计至少 80% 纯的，按重量计至少 85% 纯的，按重量计至少 90% 纯的，按重量计至少 95% 纯的，按重量计至少 96% 纯的，按重量计至少 97% 纯的，按重量计至少 98% 纯的，或按重量计至少或大约 99% 纯的或按重量计大于 99% 纯的。

[0133] 在一些实施方案中，回收的重组蛋白是重组人蛋白，其与人中同样的天然蛋白相比具有一个或多个不同生物学特性（例如糖基化类型或数量上的差异、磷酸化的差异、酰化的差异、金属取代或金属化学计量学的差异和 / 或辅因子结合的差异）。

[0134] 本文还提供由本文所述方法的任一种产生的重组蛋白。

[0135] 用于测试制造工艺的方法

[0136] 本文还提供用于测试制备重组蛋白的制造工艺的方法。这些方法包括执行本文所述的产生重组蛋白的方法，在所述方法期间和 / 或之后，检测或测量至少一个（例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或十一个）培养读数（例如，细胞中或第一和 / 或第二培养基（例如第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的的第一和 / 或第二液体培养基）中的重组蛋白、葡萄糖消耗、活细胞浓度、乳酸产生、体积生产率、从葡萄糖产生乳酸的产率、谷氨酰胺浓度、谷氨酸浓度、培养基的 pH、溶解 CO₂ 的分压或浓度、溶解 O₂ 的分压或浓度、代谢物质量转移和代谢物质量平衡）；并将所述至少一个培养读数与所述至少一个（例如，两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或十一个）培养读数的参考水平（例如，细胞中或第一和 / 或第二培养基（例如第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的的第一和 / 或第二液体培养基）中的重组蛋白、葡萄糖消耗、活细胞浓度、乳酸产生、体积生产率、从葡萄糖产生乳酸的产率、谷氨酰胺浓度、谷氨酸浓度、培养基的 pH、溶解 CO₂ 的分压或浓度、溶解 O₂ 的分压或浓度、代谢物质量转移和代谢物质量平衡的参考水平）进行比较。

[0137] 熟练的操作者会理解本文描述的多种培养参数中的任何参数（例如摇瓶、体积、替代培养物体积的速率或频率、搅拌频率、温度、培养基和 CO₂ 暴露）能够以任何组合使用以进行这些方法。另外，本文描述的或本领域已知的任何哺乳动物细胞都可以用于所述方法中。

[0138] 至少一种培养读数的参考水平（例如细胞中或第一和 / 或第二培养基中的（例如第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的的第一和 / 或第二液体培养基）中的重组蛋白、葡萄糖消耗、活细胞浓度、乳酸产生、体积生产率、从葡萄糖产生乳酸的产率、谷氨酰胺浓度、谷氨酸浓度、培养基的 pH、溶解 CO₂ 的分压或浓度、溶解 O₂ 的分压或浓度、代谢物质量转移和代谢物质量平衡的水平）可以是使用不同培养方法产生的水平，所述不同的培养方法例如利用至少一种不同的培养参数（例如，不同的第一和 / 或第二液体培养基（例如第一、第二和第三时间段的一个或多个中不同的第一和 / 或第二液体培养基）、不同的哺乳动物细胞、不同的频率和 / 或搅拌类型、不同类型或浓度的微载体、不同的分批再补料或灌注速率（例如，在培养的最初 48-96 小时后在每个 24 小时时间段内 10% 至 95% 的摇瓶容积

或第一液体培养基体积) 和任何本文描述的其他培养参数) 的培养方法。

[0139] 本文描述的方法可以用于测试制造工艺的任何组分或特征的效果。例如, 本文描述的方法可以用于测试不同的原料、微载体、搅拌水平、摇瓶、抗结块剂、培养基(例如化学成分确定的培养基) 或营养元素或化合物对至少一个培养读数的效果(例如本文描述的任意培养读数, 例如对重组蛋白产生和 / 或哺乳动物细胞生长的效果)。例如, 本文提供测试第一或第二液体培养基、第一或第二液体培养基中存在的原料成分或补充剂或哺乳动物细胞来源用于在产生重组蛋白的方法中的用途的效力的方法, 其包括提供摇瓶, 所述摇瓶含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞, 其中所述第一液体培养基占据摇瓶容积的约 10% 至约 40%, 例如约 20% 至约 30%, 并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体; 在约 31°C 至约 40°C (例如约 32°C 至约 37°C) 并伴随约 85 转每分钟 (RPM) 至约 125RPM 的旋转搅拌将所述摇瓶温育一段时间; 和在所述一段时间的最初 48-96 小时后, 连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基, 其中所述第一和第二体积大致相等; 检测或测定至少一种培养读数(例如本文描述的任意培养读数, 例如细胞中或第一和 / 或第二液体培养基中的重组蛋白); 将所述至少一个培养读数与通过不同培养方法产生的至少一个培养读数(例如本文描述的任意培养读数, 例如细胞中或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白) 的参考水平进行比较, 所述不同培养方法使用不同的第一或第二液体培养基、第一或第二液体培养基中存在的不同的原料成分或补充物或不同的哺乳动物细胞来源中的一个或多个; 和鉴定与所述至少一个培养读数相比于参考水平的有益变化(例如, 增加或减少)(例如, 增加的重组蛋白量) 相关的第一或第二液体培养基、第一或第二液体培养基中存在的原料成分或补充剂或哺乳动物细胞来源, 将其鉴定为对于在产生重组蛋白的方法中的使用而言是有效的。例如, 相比于参考水平的重组蛋白水平的增加、活细胞浓度的增加、体积生产率的增加和葡萄糖消耗的增加表明该第一或第二液体培养基、第一或第二液体培养基中存在的该原料成分或补充剂或该哺乳动物细胞来源对于在产生重组蛋白的方法中的使用而言是有效的。

[0140] 本文描述的方法还可用于测试改变本文描述的或本领域已知的多种细胞培养参数(例如, 摇瓶的容积或形状、搅拌频率、第一和 / 或第二液体培养基中由多个微载体产生的剪切力、培养接种密度、第一和 / 或第二液体培养基的 pH(例如在第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基的 pH)、溶解 O₂ 浓度或分压、摇瓶的内表面涂层、微载体的浓度、尺寸、形状、表面特性、密度和有孔性中的一个或多个、液体培养基(例如第一和 / 或第二液体培养基, 例如在第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基) 内的多种成分、搅拌的量和 / 或类型、哺乳动物细胞类型或细胞系、溶解 CO₂ 浓度或分压、温度、液体培养基的体积(例如第一和 / 或第二液体培养基的体积) 和 / 或去除第一体积的第一培养基和向第一培养基添加第二体积的第二培养基的速率或频率(例如在第一、第二和第三时间段的一个或多个中去除第一体积的第一培养基和添加第二体积的第二培养基的速率或频率)) 中的任何参数的效果。所述方法还可用于测试用于制备液体培养基(例如第一和 / 或第二液体培养基, 例如在第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的第一和 / 或第二液体培养基) 的水质和 / 或液体培养基中的不同微量金属元素对至少一种培养读数的效果(例如本文描述的任意培养读数, 例如对重组蛋白产生和 / 或哺乳动物细胞生长的效果)。所述方法还可用于测试生长因子或生长激素对

至少一个培养读数的效果（例如本文描述的任意培养读数，例如对重组蛋白产生和 / 或哺乳动物细胞生长的效果）（例如第一时间段中存在的生长因子或生长激素的效果）。所述方法还可用于测试用于制备第一和 / 或第二液体培养基（例如在第一、第二和第三时间段的一个或多个中使用的的第一和 / 或第二液体培养基）的过滤方法和过滤器。所述方法还可用于测试液体培养基稳定性和液体培养基对于至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如对重组蛋白产生和 / 或哺乳动物细胞生长的效果）的效果。所述方法还可用于筛选多种重组细胞系和细胞库产生期望的重组蛋白（例如期望的分泌的治疗蛋白）的能力。如本文所注意到的，所述方法还可用于筛选任何细胞培养方法参数，包括但不限于，搅拌的类型和频率、由微载体产生的剪切力、灌注速率和体积、培养物接种密度等等。

[0141] 本文描述的方法还可用于测试第一或第二液体培养基、用于生成第一或第二液体培养基的原料成分或哺乳动物细胞来源中污染物的存在。例如，本文提供测试第一或第二液体培养基、用于生成第一或第二液体培养基的原料成分或哺乳动物细胞来源中污染物的存在的方法，所述方法包括提供摇瓶，其含有置于第一液体培养基中哺乳动物细胞，所述第一液体培养基占据约 10% 至约 40% 的摇瓶容积（例如约 20% 至约 30% 的摇瓶容积）并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体；在约 32℃ 至约 39℃（例如约 32℃ 至约 37℃）并伴随约 85 转每分钟（RPM）至约 125RPM 的搅拌将所述摇瓶温育一段时间；和在所述一段时间的最初约 48-96 小时后，连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基，其中所述第一和第二体积大致相等；检测或确定至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如细胞中或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量）；将所述至少一个培养读数与通过不同培养方法产生的至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如细胞中或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白）的参考水平比较，所述不同培养方法使用不同的第一或第二液体培养基、生成所述第一或第二液体培养基的不同原料成分或不同的哺乳动物细胞来源中的一个或多个；和当所述至少一个培养参数的水平相比于参考水平有不利变化（例如增加或减少）时，将该第一或第二液体培养基、用于生成该第一或第二液体培养基的原料成分或该哺乳动物细胞来源鉴定为含有污染物。例如，与参考水平比较重组蛋白产量的减少（例如，细胞中或第一和 / 或第二培养基中的重组蛋白的减少）、体积生产率的减少或活细胞浓度的减少是不利的变化，其表明在该第一或第二液体培养基、用于生成该第一或第二液体培养基的原料成分或该哺乳动物细胞来源中存在污染物。一些方法进一步包括一种或多种测定该第一或第二液体培养基、用于生成该第一或第二液体培养基的原料成分或该哺乳动物细胞来源中存在的污染物的身份的测定法。污染物可能是生物污染物（例如分枝杆菌、真菌、细菌、病毒或不想要的哺乳动物细胞）。污染物可以是无机污染物。污染物也可能是物理上未表征的物质。

[0142] 所述方法可用于进行高通量细胞培养实验来执行对细胞培养方法的实验设计（design-of-experiment ;DOE）或质量源于设计（quality-by-design ;QBD）优化。例如，本文提供对生产重组蛋白的制造工艺进行优化的方法，所述方法包括提供摇瓶，其含有置于第一液体培养基中的哺乳动物细胞，所述第一液体培养基占据约 10% 至约 40% 的摇瓶容积（例如约 20% 至约 30% 的摇瓶容积）并含有浓度为约 1.0g/L 至约 15.0g/L 的多个微载体；在约 32℃ 至约 39℃（例如约 32℃ 至约 37℃）并伴随约 85 转每分钟（RPM）至约 125RPM

的搅拌将所述摇瓶温育一段时间；和在约 48-96 的第一时间段后，连续地或周期性地去除第一体积的第一液体培养基并向所述第一液体培养基添加第二体积的第二液体培养基，其中所述第一和第二体积大致相等；检测至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如细胞中或第一和 / 或第二液体培养基中的重组蛋白的量）；将所述至少一个培养读数与通过不同培养方法产生的至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如细胞中或第一和 / 或第二培养基中存在的重组蛋白的量）的参考水平比较；和鉴定并去除或改变制造工艺中与相比于至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如产生的重组蛋白）的参考水平的至少一个培养读数的不利变化（例如增加或减少）相关的任何培养组分或参数，或鉴定并向制造工艺添加与相比于至少一个培养读数（例如本文描述的任意培养读数，例如产生的重组蛋白）的参考水平的至少一个培养读数的有利变化（例如增加或减少）相关的任何培养组分或参数。例如，产生的重组蛋白量、体积生产率或活细胞浓度的增加是培养读数中的有利变化，而产生的重组蛋白量、体积生产率或活细胞浓度的减少是培养读数中的不利变化。在一些情况中，所述方法用于以高通量方式鉴定能够用于重组蛋白的规模放大（例如生物反应器）生产的优化的细胞培养条件。

[0143] 在本节描述的方法的任一种中，至少一个培养读数的参考水平可以来自较大规模培养（例如灌注生物反应器，例如 2000-L 灌注生物反应器、40-L 灌注生物反应器或 12-L 灌注生物反应器）。在本节描述的方法的任一种的一些实施方案中，使用本文描述的方法的任一种将哺乳动物细胞培养在摇瓶中，经历与实施较大规模培养相同的时间段（平行培养）。例如，在本文描述的方法的任一种中用于接种摇瓶的接种物也用于在大致相同的时间接种较大规模灌注生物反应器。

[0144] 在一个实施方案中，用于接种摇瓶的接种物获取自较大规模培养（例如较大规模灌注生物反应器）。例如，在任意时间点将来自较大规模培养的小份试样（例如来自较大规模灌注生物反应器的小份试样 (aliquot)）取出（例如在本文所述的生长期、过渡期或收获期期间取出）并用于接种摇瓶（例如用于起始卫星摇瓶培养）。小份试样可以在生长期期间自较大规模培养取出并用于接种 (inoculate) 或接种 (seed) 含有液体培养基和多个微载体（例如本文所述的）的摇瓶，随后将所述摇瓶在复制了或类似于较大规模培养中采用的生长期条件的条件下进行温育。作为另一种选择或者此外，小份试样可以取自过渡期期间的较大规模培养并用于接种 (inoculate) 或接种 (seed) 含有液体培养基和多个微载体（例如本文所述的）的摇瓶，随后将所述摇瓶在复制了或类似于较大规模培养中采用的过渡期条件的条件下温育。作为另一种选择或者此外，小份试样可以取自收获期期间的较大规模培养并用于接种 (inoculate) 或接种 (seed) 含有液体培养基和多个微载体（例如本文所述的）的摇瓶，并随后将所述摇瓶在复制了或类似于较大规模培养中采用的收获期条件的条件下温育。在这些方法的任一种中，可以改变在用于在摇瓶中培养哺乳动物细胞的方法中的一个或多个培养参数（与在较大规模培养中用于培养所述哺乳动物细胞的培养参数或组分相比），测量至少一个培养读数，并将所述至少一个培养读数与针对所述较大规模培养所测定的至少一个培养读数进行比较。正如本领域技术人员能够理解的，这些方法能够用于测试特定培养参数或组分对培养方法中一个或多个具体阶段期间的至少一个培养读数的效果（例如，一个或多个培养参数和 / 或培养组分对生长期、过渡期和 / 或收获期期间至少一个培养读数的效果）。

[0145] 在一些实施方案中,可以执行这些方法以确定较大规模生物反应器中是否存在污染物,其通过确定或检测摇瓶培养中的至少一个培养读数,将所述至少一个培养读数与至少一个培养读数的参考水平(例如来自基本不含污染的培养物的至少一个培养读数的水平)相比,并且当与所述至少一个培养读数的参考水平相比摇瓶培养中的至少一个培养读数指示摇瓶中存在污染物时,将较大规模生物反应器鉴定为含有污染物。例如,所述污染物可以是生物污染物,如病毒、真菌、不想要的哺乳动物细胞或细菌,如分枝杆菌。例如,所述污染物可以是水疱疹病毒(vesivirus)。

实施例

[0146] 本发明通过如下实施例进一步描述,所述实施例不限制本发明在权利要求中所描述的范围。

[0147] 实施例 1:示例性的使用摇瓶和微载体的培养方法

[0148] 人重组形式的人 α -半乳糖苷酶可以用已经建立的重组工程技术在 CHO 细胞系中生产。目前重组人 α -半乳糖苷酶的制造生产利用 2000-L 连续灌注微载体细胞培养工艺技术。通常,生产细胞培养工艺包括三个阶段:生长期、过渡期和收获期。存在对于高通量细胞培养工艺系统的需求,其会精确地模拟 2000-L 生物反应器细胞培养工艺运行中的细胞培养工艺条件。本实施例中描述了摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺,其模拟重组人 α -半乳糖苷酶 2000-L 生物反应器灌注细胞培养工艺。

[0149] 材料与方法

[0150] 重组人 α -半乳糖苷酶细胞培养

[0151] 用编码分泌形式的人重组 α -半乳糖苷酶的核酸来稳定转化用于实验的细胞。在细胞库培养扩大工艺期间使用生长培养基(925 培养基,含有 10% DBS, pH 7.3, 和 0.1% Pluronic F-68)。

[0152] 设备

[0153] 用 Multiron 摇动培养箱(Appropriate Technical Resources, Inc., Model number AG CH-4103)来培养细胞。用 Beckman Coulter Vi-Cell XR 细胞存活率分析仪(型号 XR, 货号 #731050)来测量培养中的活细胞密度和活细胞百分比。

[0154] 方法

[0155] 用于示例性的摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行的接种物是从解冻的小瓶的产生重组人 α -半乳糖苷酶的 CHO 细胞的种子培养扩大产生的。将解冻的细胞在含有 10% DBS, pH 7.3, 和 0.1% Pluronic F-68 的 925 培养基中扩大培养 5 天后,将种子培养物用于接种含有无菌微载体浆料(CytoPore2, GE Healthcare, Piscataway, NJ; 终浓度为 1.5g/L; 平均尺寸 200-280 μ m; 平均孔尺寸 30 μ m) 和生长培养基(含有 6% DBS, pH 7.0, 和 0.1% Pluronic F-68 的 925 培养基)的摇瓶(摇瓶中终浓度为 0.25×10^6 活细胞/mL), 其启动细胞培养的生长期。将培养维持在 37°C 或 36°C、95RPM、80% 相对湿度和 5% CO₂。当培养达到 2.5×10^6 至 3.0×10^6 活细胞/mL 的目标细胞密度时,通过将液体培养基改成不同的生产培养基(925 培养基, pH 6.85-7.05, 和 0.1% Pluronic F-68) 并将温度移至 32°C 来启动过渡期。过渡期 5 天后,将温度移回至 37°C 或 36°C,并用生产液体培养基来维持培养物。培养基更换是在生长期的第三天起始的,并持续直到培养结束,每天分批再补料更换培

养开始时摇瓶中初始体积的液体培养基的 70%。从生长期的第三天开始,每天在生物安全罩 (biosafety hood) 中进行培养基更换,其通过简短停止搅拌摇瓶、使微载体沉淀至摇瓶底部来进行。在一些情况下,当微载体沉淀至摇瓶底部时,将摇瓶置于瓶架中,所述瓶架将摇瓶置于相对于水平或台面 45 度的位置,从而改进培养基更换。这种瓶架的非限制性实例示于图 1 中。在微载体已沉淀至摇瓶底部后,将体积为摇瓶中存在的液体培养基初始体积的 70% 的液体培养基从摇瓶去除,然后迅速将与去除的液体培养基体积基本相同体积的液体培养基添加至摇瓶。在预先确定的培养日,分析如下的培养参数:活细胞和悬浮细胞密度以及活细胞百分比、 pCO_2 、 pO_2 、pH、葡萄糖和乳酸浓度和谷氨酰胺和谷氨酸浓度。收集滴度样品并保持在 $-20^{\circ}C$ 直至进行测定来测量重组人 α -半乳糖苷酶活性。每个运行使用一式三套的瓶子,总共进行了两个完整的细胞培养工艺运行。计算所得数据的平均差和标准差,并示于图 2-6 的每一个中。

[0156] 结果与讨论

[0157] 生长期持续时间和过渡密度

[0158] 生长期期间的细胞培养性能对于成功生产重组蛋白是至关重要的。表 1 提供了在两个用上文所述接种物启动的摇瓶微载体分批再补料细胞工艺运行的生长期终点处所达到的生长期持续时间和活细胞密度的概要。生长期持续时间在两个细胞培养工艺运行之间是一致的,其在生长 8 天后达到的活细胞密度为 2.5×10^6 细胞/mL 至 3.0×10^6 细胞/mL (示例性的用于开始过渡期的目标活细胞密度范围)。

[0159] 表 1. 两个重组人 α -半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行的过渡期开始处的生长期持续时间和活细胞密度概要

[0160]

实验	生长持续时间	过渡密度 (E6活细胞/mL)	重复
CCCD-HT-03	192小时(G8)	2.6+/-0.5	n=3
CCCD-HT-11	195小时(G8)	2.9+/-0.4	n=3

[0161] 细胞培养生长

[0162] 通过一些不同的量度来监控细胞培养物的生长和健康性能。通过对活细胞浓度的测量来追踪细胞生长(图 2)。所得的结果显示在整个生长期和过渡期早期细胞浓度一直增长,并在生长期终点处达到约 3.0×10^6 细胞/mL 的最大活细胞浓度。因为培养是适应于无血清培养基的(从过渡期的开端开始,经过整个收获期),收获期早期期间的活细胞浓度有轻微的降低。此后,培养物稳定下来,并在大部分的收获期维持 2.0×10^6 至 4.0×10^6 的活细胞浓度,并在收获期晚期期间活细胞密度进一步增加。在大部分的收获期中,活细胞的百分比大于 80% (图 3)。

[0163] 通过测量培养物中的悬浮细胞浓度,在细胞培养工艺运行全程中还监测到了细胞分离(图 4)。培养物中的悬浮细胞浓度在收获期开始处达到顶峰,这最可能的是由于血清剥夺 (serum withdrawal) 对细胞的影响。在细胞培养工艺运行全程中悬浮细胞浓度维持在低浓度 (0.1×10^6 至 0.3×10^6 细胞/mL)。

[0164] 培养生产率

[0165] 在细胞培养工艺运行全程监测体积生产率（单位 /L/ 天），以获得对摇瓶微载体分批再补料模型的生产率性能的了解。如图 5 所示，培养生产率在过渡期晚期 / 收获期早期处达到顶峰。然而，随着培养适应于血清的缺乏，观察到了生产率的急剧下降。细胞培养在收获期早期从这个低谷恢复，培养生产率在收获期全程得到提高。约在收获期的半途处（收获期的约第 20 天），细胞培养生产率维持在稳定水平（体积生产率（VPR）在 600 单位 /L/ 天以上）直至运行结束。申请人注意到活细胞浓度未出现与观察到的细胞培养生产率低谷期对应的低谷期（图 2），。

[0166] 当把这个示例性的摇瓶微载体分批再补料工艺的生产率概貌与 2000-L 工艺相比时，观察到了两个独特的差异。第一，与示例性的摇瓶微载体分批再补料工艺相比，2000-L 工艺中过渡期晚期 / 收获期早期过程中的生产率峰更高。第二，2000-L 工艺的低谷期延至收获期中期，而不是在示例性的摇瓶微载体分批再补料工艺中观察到的收获期早期。2000-L 工艺中低谷后培养生产率的恢复也比示例性的摇瓶微载体分批再补料工艺中更慢。这些性能差异可能是由于两种培养工艺中使用的培养基更换方法不同。2000-L 灌注工艺中的培养基更换以连续方式进行，其中细胞连续暴露于经调整的 / 新鲜的培养基。另一方面，本实施例中所描述的示例性的摇瓶微载体分批再补料模型中每天进行一次培养基更换，其中去除了第一液体培养基的体积的 70% 并用约相同体积的第二液体培养基来替换，所述替换以大剂量方式 (bolus fashion) 进行。然而，本实施例中所描述的示例性的摇瓶细胞培养工艺运行的累积体积生产率和 2000-L 生物反应器细胞培养工艺运行显示出相似的趋势（图 6）。

[0167] 培养物代谢

[0168] 在细胞培养工艺运行期间，通过葡萄糖和乳酸盐浓度测量来监测细胞代谢。从收获期样品的葡萄糖和乳酸盐分析来计算葡萄糖消耗速率和乳酸盐产生速率。收获期间较低的乳酸盐水平说明了培养的细胞对葡萄糖的有效利用。总体来看，葡萄糖消耗和乳酸盐的产生与细胞生长曲线是一致的（图 2）。培养物最有活力的时期发生在两个不同的培养阶段：i) 当细胞增殖与含血清培养基一起出现时，和 ii) 向着收获期的末端，当出现再生长期时（通过活细胞密度和代谢活性二者的增强而注意到）。谷氨酰胺和谷氨酸浓度概貌说明了收获期早期过程中谷氨酰胺的消耗和谷氨酸的生产的减少，这对应于所观察到的低谷期。

[0169] 培养 pH、pCO₂ 和 pO₂

[0170] 在采样期间用血液气体分析仪来监测培养 pH、pCO₂ 和 pO₂ 概貌。pH 和 pCO₂ 概貌均与活细胞浓度概貌一致。pCO₂ 概貌显示 pCO₂ 水平维持在 30-35mmHg，其对应于培养箱的 5% CO₂ 的设定。

[0171] 结果总结

[0172] 本实施例中描述的示例性的重组 α - 半乳糖苷酶摇瓶微载体分批再补料细胞培养工艺运行，实现了一些有益的结果，例如在仅仅 7-9 天内得到了 2.5x10⁶ 活细胞 /mL 至 3.0x 10⁶ 活细胞 /mL 的过渡期细胞密度，在整个收获期将活细胞浓度维持在 2.0x 10⁶ 细胞 /mL 至 6.0x 10⁶ 细胞 /mL 的成就，在整个培养工艺期间低悬浮细胞浓度 (<0.5x 10⁶ 细胞 /mL) 的成就（除了从培养物去除血清后不久出现的悬浮细胞密度短期上升），以及培养生

产率在过渡期晚期达到顶峰的成就。注意到当收获期早期过程中培养生产率经历短暂低谷时,从这个低谷的恢复是迅速的,收获期全程的体积生产率为 600 单位 /L/ 天以上。

[0173] 摇瓶微载体细胞培养工艺运行的可变性程度可以归因于液体培养基 / 原材料的小差异和实验可变性。然而,培养性能趋势应当更相似。这种示例性的摇瓶微载体分批再补料工艺已经用于一些其他的应用,如用于支持生物反应器运行(40-L 和 2000-L 细胞培养工艺运行)的卫星培养、对重组人 α -半乳糖苷酶生产的微量金属和转变温度研究以及细胞培养工艺的理解和开发。

[0174] 生物技术领域技术人员会理解,本实施例中所描述的用于生产 α -半乳糖苷酶的示例性的摇瓶微载体分批再补料工艺可以延伸至其他应用,如对细胞培养工艺的测试和设计改进,以及对制造工艺的监控或故障排查。本文所述的小规模摇瓶微载体工艺还允许将较大生物反应器工艺所需的资源和材料最小化。

[0175] 实施例 2. 确定微载体浓度和搅拌频率对摇瓶中活细胞浓度的影响的实验

[0176] 进行了一套实验来检测不同微载体浓度和不同搅拌频率对摇瓶中哺乳动物细胞培养生长表现的影响。

[0177] 方法

[0178] 在如实施例 1 中所述的生长期条件下培养细胞,区别仅在于使用不同的微载体浓度和不同的旋转搅拌频率。

[0179] 通过将解冻的细胞库置于带有 50mL 生长培养基的 250-mL 尺寸的摇瓶中,来制备用于接种盛有微载体的摇瓶的培养物。所得的种子培养物在摇瓶中于 37°C、125RPM、6% CO₂ 和 80% 相对湿度进行温育,直至将它们用于接种含有微载体的摇瓶。接种之后,用下文所述的参数来培养含有微载体的摇瓶。在所有实验中均使用含有 10% Dulbecco's 牛血清、pH 7.0、0.1% Pluronic F-68 的 925 培养基。

[0180] 表 2. 细胞培养条件

[0181]

培养基	A	B
规模	250mL, 光滑摇瓶, 60mL 工作体积	
U载体类型	CytoPore 2	CytoPore 2
[载体], g/L	1.0, 1.5, 2.0	1.0, 1.5, 2.0
接种密度	0.25 x 10 ⁶ 活细胞/mL	
G-期培养基	含有 10% 血清的 925 培养基	含有 10% 血清的 925 培养基
温度(°C)	37°C	37°C
搅拌(RPM)	125 或 85	
%RH	80%	
# 重复次数	2	

[0182] 微载体制备于磷酸盐缓冲盐水中,并进行高压灭菌。然后在无菌条件下将所得的无菌微载体添加至每个摇瓶中,以在每个细胞瓶中达到 1g/L、1.5g/L 或 2g/L 的终浓度。然后将摇瓶微载体培养物培养 6 天,并确定随时间经过的活细胞密度。

[0183] 结果

[0184] 图 7 中的数据显示,当以 85RPM 或 125RPM 的频率搅拌时,哺乳动物细胞能在含有微载体的摇瓶中生长。数据还显示当使用 85RPM 或 125RPM 的搅拌频率时,含有 1.0g/L 和 1.5g/L 微载体的摇瓶具有较高的活细胞密度。

[0185] 实施例 3. 作为 40-L 生物反应器工艺的模型的摇瓶培养

[0186] 这项研究是设计来用于探索本文所述的摇瓶培养方法用于 40-L 重组人 α -半乳糖苷酶生物反应器的卫星培养的用途,以及用于比较卫星摇瓶培养中所达到的性能和产量以及 40-L 生物反应器培养中达到的性能和产量。

[0187] 程序

[0188] 规模降低模型描述

[0189] 这些实验中使用的 40-L 生物反应器是不锈钢的、搅拌罐容器,其开发用于模拟 2000-L 制造生产生物反应器。这种全自动的容器是经过原地蒸汽灭菌的,并具有与 2000-L 生产生物反应器相似的控制基本构架和实用构型。

[0190] 250-mL 卫星摇瓶培养采用带有通气帽的一次性的 γ -灭菌的 Corning 非致热聚碳酸酯锥形瓶。在 Appropriate Technical Resources, Inc. (ATR) 培养箱中,于受控的 CO_2 、湿度和温度温育卫星摇瓶培养物。ATR 培养箱同时控制和监控卫星摇瓶培养的环境条件。

[0191] 方法

[0192] 40-L 生物反应器培养

[0193] 为本研究而取样的 40-L 重组人 α -半乳糖苷酶生物反应器培养物用两个工作细胞库 (09TP040 和 09TP038) 进行接种。含有编码重组人 α -半乳糖苷酶的核酸的重组细胞首先在悬浮培养中生长,直至将其用于接种含有终浓度为 1.5g/L 的 Cytopore II 微载体的 40-L 生物反应器。在含有 10% 血清的培养基中培养细胞,所述培养基在 N-1 期下降至含 6% 血清的培养基。在 40-L 生物反应器中,于含 6% 血清的培养基中培养细胞直至生长期结束。在生长期结束时以 1.2RV/ 天的速率去除和替换含血清的生长培养基进行 120 小时,以将 40-L 生物反应器培养物转换为不含血清的生产培养基。操作 40-L 生物反应器,以模拟具有受控参数 (溶解氧、pH、温度和 pCO_2) 的 2000-L 生产生物反应器,其维持在制造规格 / 范围内,并将除氮喷雾、覆盖物浓度和表面积比体积之外的物理参数 (灌注速率、搅拌、喷雾气体排出速度和锥冲洗率 (cone flush rate)) 规模调整至匹配 2000-L 生物反应器。

[0194] 在卫星摇瓶培养研究中对 40-L 生物反应器中调查了多种实验条件。取样用于收获期卫星培养物的 40-L 生物反应器培养物使用细胞系 WCB 09TP040,并在向无血清生产培养基添加或不添加微量 A 元素 (Trace A Elements (Invitrogen)) 的情况下进行操作。将无微量 A 元素的 40-L 生物反应器培养数据列入与卫星摇瓶培养数据的比较,这是由于其与微量 A 元素 40-L 生物反应器培养数据和卫星摇瓶培养数据均相似的性能。取样用于生长期卫星培养物的 40-L 生物反应器培养物使用细胞系 WCB 09TP038 并辐照 (irradiated) 生长培养基中的血清。

[0195] 250mL 摇瓶卫星培养

[0196] 250-mL 卫星摇瓶培养物在重组人 α -半乳糖苷酶 40-L 生物反应器培养的两个时间点开始:生长期和收获期 (图 8)。用取样口 (sample port) 从 40-L 生物反应器培养去除无菌的 250-mL 活细胞培养含有微载体的样品。然后将来自该样品的充分混合的培养物无菌转移至带有搅拌子的 250-mL 摇瓶或无菌的平底容器,其用于合并 (pool) 来自多个反

应器的培养物。如果培养物首先进行了合并,则将来自这个合并物的充分混合的样品转移至 250-mL 摇瓶。当培养物被转移至 250-mL 摇瓶,则取样品用于细胞计数、代谢物和滴度。在取样后,如果在 40-L 生物反应器培养物中尚在进行灌注,在摇瓶上进行再补料然后将它们转移至 ATR 摇动培养箱。

[0197] 卫星摇瓶培养工作体积和培养箱转动 RPM 是多样化的。将工作体积从初始的 68mL 减少至 60mL,然后再到 50mL。在接种后第 0 天检查瓶重量,然后每天检查以验证在分批再补料后瓶体积保持恒定。将旋转的频率从 95RPM 增加至 110RPM,以确定更有效的混合是否对培养性能具有有益效果。据此前的实验观察,在 95RPM 处,微载体趋于集中在 250-mL 摇瓶的中心,而在 110RPM 处,微载体更为均匀分布至整个摇瓶。在实验全程用恒定的频率对收获期卫星摇瓶培养物进行搅拌。与实验条件无关的是,生长期卫星摇瓶培养最初以 85RPM 开始,然后在生长第 3 天攀升至 95RPM。选择这种搅拌策略来将适应摇瓶生长条件的前几天期间对这些培养物的剪切应力最小化,然后将其增加以提供充分的混合。

[0198] 对于所有卫星摇瓶培养,将 ATR 培养箱维持在 5.0% CO₂、37℃ 和 80% 相对湿度 (RH)。5.0% CO₂ 浓度比不上 40-L 生物反应器培养 CO₂ 浓度,但选择了前者是因为没有 pH 控制和操作容易。卫星摇瓶培养的温度停留在 37℃ 的标准培养箱温度,而不是匹配 36℃ 的 40-L 生物反应器培养温度。假设这对卫星摇瓶培养性能没有大的影响。

[0199] 为了复制卫星摇瓶培养中 40-L 灌注生物反应器培养的生产条件,每天进行 0.7X 瓶容积分批再补料,从而用新鲜培养基来取代用过的培养基。通过用专门的瓶架将 250-mL 摇瓶倾斜并保持在 45° 角度,来完成分批再补料。允许附着 / 含有细胞的微载体沉淀约 1 分钟,然后将用过的培养基取出,并用新鲜培养基取代。新鲜的培养基在使用前储存于 4℃,并在再补料之前,在 ATR 摇动培养箱中的 250-mL 摇瓶中将其平衡约 1-3 小时至 5.0% CO₂ 和 37℃。在每日再补料之前,每 2-3 天对所有卫星摇瓶培养取样,用于 pH、pO₂ 和 pCO₂ (Bayer 248 血液气体分析仪)、活细胞密度 (Vicell XR)、活细胞百分比 (活细胞 / 总细胞; Vicell XR)、代谢物浓度 (葡萄糖、乳酸盐、谷氨酰胺、谷氨酸; YSI 2700)、细胞凋亡 (番石榴连接蛋白测定 (Guava Nexin Assay)) 和重组人 α -半乳糖苷酶的滴度。

[0200] 收获期卫星摇瓶培养取样自两个 40-L 生物反应器: IDs P403-38 和 P407-33。通过对生产培养基添加微量 A 元素 (Invitrogen) 来操作 40-L 生物反应器培养。在收获第二天,从由 P407-33 生物反应器培养取出的培养物开始三个收获期卫星培养,并以 68mL 的工作体积将其直接转移至三个 250-mL 摇瓶。在收获第 4 天,从由 P403-38 生物反应器培养取出的培养物开始两个收获期卫星摇瓶培养,并在收获第四天,从由 P407-33 生物反应器培养取出的培养物开始两个卫星收获期摇瓶培养。从这些 40-L 生物反应器培养取出的样品被直接以 60mL 的工作体积转移至 250-mL 收获期卫星摇瓶培养,而没有进行合并。在转移后对所有收获期卫星摇瓶培养进行采样,然后以 0.7X 摇瓶容积进行再补料,然后置于 ATR 培养箱中。收获期卫星摇瓶培养中使用的培养基与 40-L 生物反应器培养中使用的培养基是不同货号的,但其组成是相同的并且含有 1X 微量 A 元素 (Invitrogen)。将这些收获期卫星摇瓶培养维持直至工艺结束 (收获第 53 天)。

[0201] 用于生长期卫星摇瓶培养的培养物取样自两个 40-L 生物反应器培养: IDs P405-29 和 P408-29,所述取样是在 G0 (接种日) 的接种后约 1 小时内进行的。将两个 40-L 生物反应器培养样品合并,然后以 2 个工作体积转移至 4 个 250-mL 摇瓶 (表 3)。在 G4 (比

开始 40-L 灌注生物反应器培养 (G3) 晚一天) 开始进行分批再补料, 这是由于卫星摇瓶培养细胞计数和代谢物消耗中观察到 1 天的滞后。这些生长期卫星摇瓶培养从 G0-G8 维持, 但在收获期早期终止, 这是由于过渡偏差造成了超出可接受范围的高过渡细胞密度和在 37°C 额外的一天。仅使用来自这个实验的生长数据。

[0202] 表 3. 用于 250-mL 摇瓶卫星研究的条件

[0203]

阶段	持续时间	实验条件	培养箱条件
生长期	G0 - G8	条件 1: 60 mL w/v, 95 RPM	5.0% CO ₂ , 37 °C, 和 80% RH

[0204]

		条件 2: 50 mL w/v, 95 RPM	
收获期	H2 - H53	条件 1: 68 mL w/v, 95 RPM 条件 2: 60 mL w/v, 95 RPM 条件 3: 60 mL w/v, 110 RPM	5.0% CO ₂ , 37 °C, 和 80% RH

[0205] 结果

[0206] 生长期卫星培养

[0207] 生长期卫星摇瓶培养中所有条件的活细胞生长都滞后, 这是由于转移压力 (transfer stress) 和搅拌变化, 但在恢复之后, 其活细胞生长与平行培养的 40-L 母反应器培养物是相似的 (图 9)。生长期卫星摇瓶培养中具有细胞生长初始日的滞后。这种生长滞后最可能是由对培养物的压力引起的, 所述压力是在从 40-L 生物反应器培养的转移过程期间发生的。此前已经观察到摇瓶模型需要额外的生长天数来达到 3.0×10^6 细胞 /mL 的过渡密度。当在生长第 2 天将搅拌从 85RPM 改变为 95RPM 时, 观察到了额外的一天滞后。在 50-mL 生长期卫星摇瓶培养中观察到了较大效果。在培养物存活率数据中也观察到了这种滞后 (图 10), 并认为这种滞后的原因是额外的剪切应力, 所述剪切应力是因为 50-mL 生长期卫星摇瓶培养的工作体积与瓶容积的比率较小。增加的剪切应力最可能导致 50-mL 生长期卫星摇瓶培养中增加的悬浮细胞浓度 (图 11)。

[0208] 生长期卫星摇瓶培养中所有条件中的生产趋向于与平行培养的 40-L 母生物反应器培养物相似 (图 12)。在生长期卫星摇瓶培养中观察到的较低的滴度是由于细胞浓度较低。比生产率最初比生长期卫星摇瓶培养稍高, 但随着生长期卫星摇瓶培养恢复, 其与 40-L 生物反应器培养数据靠拢 (图 13)。由于细胞浓度较低, 50-mL 生长期卫星摇瓶培养具有与 68-mL 生长期卫星摇瓶培养相比较低的滴度, 这通过两种类型的生长期卫星摇瓶培养之间重组人 α -半乳糖苷酶的相似比生产率而得到了支持 (图 13)。

[0209] 生长期卫星摇瓶培养的葡萄糖、乳酸盐、谷氨酸和谷氨酰胺代谢最初趋向于与来自 40-L 生物反应器培养的数据相似, 但从第 5 天开始偏离。生长期卫星摇瓶培养中的葡萄糖和谷氨酰胺浓度随着第 3 天的第一批再补料而增高, 然后随细胞继续生长而下降, 并且乳酸盐生产增加至超出 40-L 生物反应器培养范围。生长期卫星摇瓶培养中的乳酸盐生产在第 5 天较高, 然后保持在比 40-L 生物反应器培养更高。生长期卫星摇瓶培养中由乳酸盐

至葡萄糖的产率保持与 40-L 生物反应器培养相似,这说明葡萄糖 / 乳酸盐代谢与生长期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中类似 (图 14)。生长期卫星摇瓶培养中的谷氨酸浓度从 40-L 生物反应器培养偏离,然后在第 8 天出现靠拢。40-L 生物反应器培养在生长第 5 天温度下降,这抑制了细胞代谢和生长。在生长期卫星摇瓶培养中没有出现类似的温度移动,这导致了生长第 8 天的代谢偏离。生长期卫星摇瓶培养中较高的乳酸盐生产导致了第 5 天葡萄糖和谷氨酰胺的偏离。与 60-mL 生长期卫星摇瓶培养相比,50-mL 生长期卫星摇瓶培养中的乳酸盐生产受到抑制,但这最可能是由于该培养物中细胞密度较低的结果。

[0210] 生长期卫星摇瓶培养中的 pH 最初与 40-L 生物反应器培养是相似的,但所述 pH 在第 3 天由于缺乏主动 pH 控制而发生偏离,并且由于较高的乳酸盐生产而保持在比 40-L 生物反应器培养更低。40-L 生物反应器培养用添加 NaOH 来将 pH 维持在高于 6.80。在第 4 天生长期卫星摇瓶培养 pH 增加回至 40-L 生物反应器培养的范围,这是由于在第 3 天再补料抑制 / 稀释了乳酸盐。生长期卫星摇瓶培养中的 pO_2 和 pCO_2 与 40-L 生物反应器培养是非常不同的,这是由于缺乏对这些参数的主动控制。生长期卫星摇瓶培养中 pCO_2 较低,这是由于更有效的清除 (sweep) 和 5.0% CO_2 培养箱设定点。生长期卫星摇瓶培养中的 pO_2 比 40-L 生物反应器培养更高,但其随着生长期卫星摇瓶培养中细胞生长的增高而降低。较低的 pO_2 代表了 60-mL 生长期卫星摇瓶培养中较高的细胞量 (cell mass)。

[0211] 收获期卫星摇瓶培养

[0212] 收获期卫星摇瓶培养中所有条件的活细胞生长与平行培养的 40-L 母生物反应器培养是相似的 (图 15)。在转移至 250-mL 收获期卫星摇瓶培养后 2-3 天内,活细胞浓度出现初始下降。在 60-mL 收获期卫星摇瓶培养这种下降更加显著。在重组人 α -半乳糖苷酶 40-L 生物反应器培养中,这种下降比相应的活细胞浓度低谷早 6-8 天 (图 15)。收获期卫星摇瓶培养中的存活率遵循与 40-L 生物反应器培养相同的趋势,并且收获期卫星摇瓶培养中的存活率在低谷期期间降低 (图 16)。这种活细胞浓度低谷被认为是由于对无血清培养基的适应,并且分批再补料工艺可能增强这种有害作用。低谷期期间,收获期卫星摇瓶培养中的悬浮细胞浓度与 40-L 生物反应器培养相比也较低 (图 7)。这说明了较低的总细胞浓度,但也可能说明所述分批再补料工艺更有效地从收获期卫星摇瓶培养洗涤细胞和较小的聚集体。随着收获期卫星摇瓶培养进入低谷期,更有效地去除细胞也可能有助于活细胞浓度更快降低。

[0213] 与条件无关的是,收获期卫星摇瓶培养从低谷期开始恢复,所述恢复在 H27-28 处,与 40-L 生物反应器培养同时发生 (图 15)。40-L 生物反应器培养显示出较强的活细胞密度增高,但这个时期内用于细胞计数的仪器可能存在问题,并因而收获期卫星摇瓶培养数据和 40-L 生物反应器培养数据的差异可能被夸大了。同样更困难的是将代表性的充分混合的样品与伴随微载体的收获期卫星摇瓶培养拉开 (pull),并且这可能也已导致测得的细胞浓度的差异。这一类误差在较高的细胞密度处得到增强,因为微载体变得更重。

[0214] 这个时间框架期间在收获期卫星摇瓶培养中的悬浮细胞计数也开始增长,并且这些数据与 40-L 生物反应器培养中观察到的悬浮细胞计数是一致的 (图 17)。含有 60mL 培养基且以 110RPM 搅拌的收获期卫星摇瓶培养物与其他收获期卫星摇瓶培养物相比具有较高的悬浮细胞浓度。这说明这种搅拌有更多的剪切应力,这导致脱离的细胞水平的增加。含有 60mL 培养基且以 95RPM 搅拌的收获期卫星摇瓶培养在离开低谷 (trough) 时也具有稍微

较高的悬浮细胞浓度,这说明在较低的工作体积处剪切应力的增加可能使得脱离的细胞比用更大工作体积的培养基的收获期卫星摇瓶培养更多。然而,滴度产量(图 18)表明 60-mL 收获期卫星摇瓶培养中的细胞量(cell mass)比 Vicell 活细胞计数所表现的那些更多。这种较高的细胞量和生长可能也增加了较高的悬浮细胞计数。所有收获期卫星摇瓶培养里的收获期中晚期中的存活率是变化的,但其保持较高并且与来自 40-L 生物反应器培养的数据相当(图 16)。

[0215] 收获期卫星摇瓶培养中的滴度产生与 40-L 生物反应器培养相似(图 18)。在收获期卫星摇瓶培养中的头 3-5 天后,生产率增加至比 40-L 生物反应器培养中所观察到的生产率更高的水平。收获期卫星摇瓶培养中的比生产率也增加至超出 40-L 生物反应器培养中所观察到的范围(图 19),这是由于对收获期卫星摇瓶培养中比 40-L 生物反应器培养中更高的温度的生长响应,或是对更高的百分比氧的响应(图 16)。收获期卫星摇瓶培养中每克葡萄糖的产物产率最初与 40-L 生物反应器培养是相似的,但随着收获期卫星摇瓶培养中乳酸盐生产的增加而出现差异(图 20)。收获期卫星摇瓶培养中来自有氧葡萄糖的产物产率在收获期晚期中较低,这说明葡萄糖在收获期卫星摇瓶培养中并未有效利用。较高的 RPM 收获期卫星摇瓶培养产生较少的乳酸盐且具有与 40-L 生物反应器培养相比更为相当的每克葡萄糖产物产率,以及具有较高的消耗有氧葡萄糖的产物产率。这说明,这些收获期卫星摇瓶培养中使用的较高的搅拌速率(RPM)提高了对葡萄糖的利用。

[0216] 不管条件如何,所有的收获期卫星摇瓶培养在与 40-L 生物反应器培养于 H9-10 处相同的时间段进入生产低谷。与其他收获期卫星摇瓶培养相比,含有 68mL 培养基并以 95RPM 搅拌的收获期卫星摇瓶培养,在低谷前较高的生产增加之后,其低谷更深(图 18)。这可能是由于生长增加(此前从任一的较低剪切应力发现其负面地影响 40-L 生物反应器培养中的低谷深度)、在低谷期前较长地暴露于较高的 O_2 而导致的,或是因为它们是在 40L 生物反应器培养的活跃生长期期间取样而导致的。

[0217] 60-mL 收获期卫星摇瓶培养具有与 40-L 生物反应器培养相似的低谷深度,并且比 68-mL 收获期卫星摇瓶培养更早进入低谷恢复(图 18)。这些培养物在静止/衰退生长期期间取样自 40-L 生物反应器培养。这可能避免了低谷前收获期卫星摇瓶培养中扩大的细胞生长。由于较低的工作体积而造成的较高的剪切应力可能也抑制了低谷前的细胞生长。

[0218] 所有收获期卫星摇瓶培养都与 40-L 生物反应器培养相似地进入低谷恢复(图 18)。在收获期卫星摇瓶培养中还观察到了较大量级的比生产率的增加,但其趋向于与 40-L 生物反应器培养相似(图 19)。不管条件如何,所有收获期卫星摇瓶培养在收获晚期衰退前的低谷至峰生产恢复程度和恢复长度都是相似的。收获期卫星摇瓶培养中的收获期晚期衰退趋向于与 40-L 生物反应器培养相似,但前者更为陡峭。这可能是由于随着收获期卫星摇瓶培养代谢在这一相同的时间框架附近开始大大偏离 40-L 生物反应器培养的营养物的积累或是消耗(图 21)。

[0219] 收获期卫星摇瓶培养的葡萄糖、乳酸盐、谷氨酸和谷氨酰胺代谢趋向于与 40-L 生物反应器培养相似,但其规模变化是不同的。收获期卫星摇瓶培养中的葡萄糖消耗随着培养物进入低谷期而减少,然后随着培养物恢复而增加,这与 40-L 生物反应器培养相似。然而,收获期卫星摇瓶培养中的乳酸盐生产在低谷期之前和之后要高很多。乳酸盐生产的增加导致收获期卫星摇瓶培养中葡萄糖和谷氨酸消耗增加至大大超出 40-L 生物反应器培养

中所观察到的范围。对于以 95RPM 搅拌的收获期卫星摇瓶培养,由于乳酸盐生产高,收获期晚期谷氨酸变得有限。收获期卫星摇瓶培养中的谷氨酰胺消耗维持在高于 40-L 生物反应器培养,但具有与之相似的趋势。收获期卫星摇瓶培养中从葡萄糖生成乳酸盐的产率也比 40-L 生物反应器培养中的范围更高,这说明收获期卫星摇瓶培养中的代谢有变化。

[0220] 68-mL 收获期卫星摇瓶培养具有延迟的乳酸盐生产增加,这与滴度产生增加的延迟是一致的(图 18)。不管搅拌频率如何,60-mL 收获期卫星摇瓶培养的乳酸盐生产较早达到顶峰,这与这些培养物中的滴度产生峰相对应。这说明乳酸盐生产是由于收获期卫星摇瓶培养在培养恢复期间在低谷后(post-trough)被激发的代谢导致的。然而观察到以 110RPM 搅拌收获期卫星摇瓶培养抑制乳酸盐生产、葡萄糖消耗和谷氨酸消耗,而对滴度产生没有抑制性作用。这可能是由于提高的细胞与细胞相互作用动力学(kinetics)、聚集和/或提高的氧可用性(这是由于更充分的混合)造成的。当细胞量增加时,收获期卫星摇瓶培养中观察到了较高的乳酸盐生产,这说明收获期卫星摇瓶培养中可能存在局部化的缺氧事件,其将培养向无氧代谢推动,或是在细胞生长期间较低的旋转速度促进了异常的聚集体形成和微载体粘附。

[0221] 与以 110RPM 的频率搅拌的收获期卫星摇瓶培养相比,以 95RPM 的频率搅拌的收获期卫星摇瓶培养中较低的 pO_2 测量结果,支持了氧气在乳酸盐抑制中所起的作用。收获期卫星摇瓶培养中 pO_2 的水平从未降至 40-L 生物反应器培养水平以下,但混合不良使得细胞量集中于摇瓶的底部中心处,这可能在局部位点产生了没有得到测量的较低 pO_2 浓度。用于血液气体分析仪(BGA)测量的取样方法涉及允许培养物沉淀,然后测试顶层上清。这种技术可能提供了比培养物中存在的高细胞浓度的局部位点更高 pO_2 的值。

[0222] 收获期卫星摇瓶培养中的凋亡细胞群体趋于与 40-L 生物反应器培养相似。收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养中随着培养物进入低谷期,细胞凋亡有一个初始的上升。然后,随着培养物恢复,接着是细胞凋亡的降低和稳定化(图 22 和 23)。60-mL 收获期卫星摇瓶培养最初具有较高的凋亡细胞百分比,然后在低谷期期间与收获期卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养靠拢。60-mL 收获期卫星摇瓶培养是从 40-L 生物反应器培养取样的,其取样比 68-mL 收获期卫星摇瓶培养更接近低谷期,并且这可能导致了较高的凋亡群体。以 110RPM 的频率搅拌的收获期卫星摇瓶培养表现为在收获期晚期具有较低的凋亡群体,但在 H41 之后未产生数据,这可能在测定的噪声之内。

[0223] 收获期卫星摇瓶培养中的 pH、 pO_2 和 pCO_2 与 40-L 生物反应器培养极为不同,这是由于对这些参数缺乏主动控制。由于 pCO_2 概貌低很多,收获期卫星摇瓶培养 pH 最开始比 40-L 生物反应器培养高很多,然后主要由乳酸盐的生产来驱动。收获期卫星摇瓶培养中的 pO_2 比 40-L 生物反应器培养更高,但其趋势随细胞浓度变化,当培养物进入低谷时增高,而在收获期晚期随着收获期卫星摇瓶培养恢复而朝着 40-L 生物反应器培养的水平降低。收获期卫星摇瓶培养中的 pCO_2 浓度比 40-L 生物反应器培养中低很多,这是由于收获期卫星摇瓶培养极高的清除效率(sweep efficiency)和培养箱 5.0% CO_2 的低设定值。收获期卫星摇瓶培养之间 pCO_2 概貌的差异是由于培养箱差异而造成的。

[0224] 总结

[0225] 这些数据证明用于重组人 α -半乳糖苷酶 40-L 生物反应器工艺的卫星培养的 250-mL 摇瓶模型的成功使用。在生长和收获期期间成功完成了对活的(live)重组人 α -半

乳糖苷酶微载体细胞培养从 40-L 生物反应器至 250-mL 卫星摇瓶培养的转移。

[0226] 收获期 250-mL 卫星摇瓶培养与母 40-L 生物反应器培养平行地运行,并产生了相当的细胞生长和滴度产生。收获期卫星摇瓶培养中的细胞浓度较低,这说明重组人 α -半乳糖苷酶的比生产率比 40-L 生物反应器培养中更高,但这可能还是由于从收获期卫星摇瓶培养物获得微载体的代表性样本困难而导致的。生长期卫星摇瓶培养显示出与 40-L 生物反应器培养相比在细胞生长和生产的最初一日上有一天的滞后,然后在搅拌变化后有一天的滞后。卫星摇瓶培养较慢的生长可以归因于从 40-L 生物反应器培养转移期间的应力,以及由于搅拌变化引起的剪切应力的增加。与 40-L 生物反应器培养相比,250-mL 卫星摇瓶培养中的比生产率较高,但这在细胞计数中可能由于不准确而表现失实。另一方面,当卫星摇瓶培养中的乳酸盐生产增加到高于 40-L 生物反应器培养的水平时,卫星摇瓶培养中利用有氧葡萄糖的产物产率低于 40-L 生物反应器培养中所观察到的产率。

[0227] 在卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养之间观察到了培养 pH、 pO_2 和 pCO_2 的明显差异,这是由于卫星摇瓶培养中缺乏对这些参数的主动控制。与 40-L 生物反应器培养相比, pCO_2 浓度低很多, pO_2 较高,而 pH 波动到正常操作范围外。在 250-mL 卫星摇瓶培养中还使用了较高的温度设定点。有趣的是,这些差异对培养物生长、生产率和凋亡几乎没有可观测的影响,这说明在 40-L 生物反应器培养中此类参数可能也更有弹性。然而,这些参数差异可能是卫星摇瓶培养葡萄糖、乳酸盐、谷氨酸和谷氨酰胺代谢差异的原因。

[0228] 两个其他参数,40-L 生物反应器培养和 250-mL 卫星摇瓶培养之间的混合/搅拌和灌注速率也不同,这可能促进了培养物代谢中所观察到的差异。这得到了以较高频率搅拌的卫星摇瓶培养中提高的葡萄糖、乳酸盐和谷氨酸代谢的支持。以较高频率搅拌的卫星摇瓶培养中,收获期晚期利用有氧葡萄糖的产物产率较高而谷氨酸消耗较低。这说明导致较低的有效葡萄糖消耗的机制和对其他碳/氮源的利用可以通过改进的混合策略来加以抑制。

[0229] 综上所述,这些数据表明 250-mL 摇瓶培养物(如本文所述)能用于精确模拟较大的生物反应器培养中实现的生长和重组蛋白生产。

[0230] 实施例 4. 用于测试多种培养基的卫星摇瓶培养

[0231] 为了缓和病毒污染的风险和促进持续的细胞培养性能,使哺乳动物细胞培养工艺过度到远离使用动物来源的培养基组分。在这项研究中,在重组人 α -半乳糖苷酶收获阶段卫星摇瓶培养(本文中描述)中对化学成分确定的、无动物组分的 CD 水解产物补充剂进行了评估。水解产物补充剂是未确定的水解产物的合成替代方案,并且含有纯来源的可溶氨基酸、肽、维生素和必需元素,并且其也被配制在添加至基本培养基时具有最小 pH 和摩尔渗透压浓度(osmolality)影响。在这项研究中,在 8 个瓶中测试了四种不同的培养基,所述测试使用了来自 2 个销售商的 CD 水解产物补充剂:Sigma-Aldrich 和 Becton, Dickinson, and Co. (BD)。四个条件是 1X CD 水解产物(来自 Sigma-Aldrich)、1X CD 水解产物(BD)、10%酵母提取物(BD,在瓶中 1.5g/L)和对照(无补充剂的 925 培养基)。在 H27 从 P404 和 P407(40-L 重组人 α -半乳糖苷酶生物反应器培养物)取收获期重组人 α -半乳糖苷酶培养物,并将其用于接种 8 个卫星摇瓶(在 H28)。使用配制的培养基的第一批再补料(有或没有 CD 水解产物或酵母提取物)在 H29 进行。

[0232] 流程

[0233] 250-mL 卫星摇瓶培养

[0234] 以 40-L 生物反应器的规模将这项研究使用的培养物从种子复苏培养至收获期。在收获期第 27 天将充分混合的微载体细胞培养样品 (400mL) 从两个 40-L 生物反应器培养转移至一个摇瓶 (图 24)。随后在 H28 用该培养物接种 8 个 250-mL 摇瓶 (每个测试的培养基 2 个)。在 H29 用经调整的培养基 (有或没有 CD 水解产物补充剂) 进行第一再补料。对于四种培养基的每一种,用工作体积为 50mL 摇瓶按一式两份来与 40L 生物反应器培养平行地运行 (表 4)。在 36℃、95RPM、5% CO₂和 80%湿度将卫星摇瓶培养物维持在 ATR 培养箱中。

[0235] 在实验过程期间,制成了 2 批培养基在整个实验过程中使用。一批是在卫星摇瓶培养开始前的 H28 制成。第二批在 H37 制成,但用于取样后在 H42 的第一再补料。因此,图上反映第二批培养基的第一个点是 H44。密切监控如下参数以评估每个培养物的健康:细胞生长和存活率、代谢和生产率。

[0236] 表 4. 卫星摇瓶研究中测试的四个生长培养基

[0237]

条件 #	条件详情	培养基配制	配制后的pH (于36°C)	配制后的摩尔渗透压浓度
1	1x CD-水解产物(Sigma)	- 制备 20x 的储液(400mL DI 水, 17.36 g 补充剂粉剂, NaOH 逐滴至 pH ~7, DI 水补至 500mL 体积, 最终 pH 7.016) - 要得到 1x 浓度(1.74 g/L), 将 50mL 补充剂添加至 1L 的 925 培养基, 并进行无菌过滤。	7.113	282
2	1x CD-水解产物(BD)	- 获取自 BD 的储液为 50x - 要得到 1x 浓度, 将 20mL 补充剂添加至 1L 的 925 培养基, 并进行无菌过滤。	7.103	282
3	10% 酵母提取物 (瓶中 1.5g/L)	- 我们从 BD 获取的酵母提取物提取物为 10% 溶液 (10g/100mL) - 要得到 1.5 g/L 的终浓度, 将 15mL 的 10%提取物(获取时的原液)添加至 1L 的 925 培养基, 并进行无菌过滤。	7.125	284
4	对照 (925 培养基)	925 培养基配制, 由 45 NYA 支持服务制成(PN 1974-03)	7.122	281

[0238] 结果

[0239] 来自 Sigma-Aldrich 的 1X CD 水解产物补充剂显示出最高的活细胞密度,在低谷恢复后达到 20x 10⁶细胞 /mL 的密度。925 对照卫星摇瓶培养和 40-L 生物反应器培养对应物的数据一直是相似的。阳性对照 (10%酵母提取物补充剂) 也显示出比对照更高的生长,

达到 10×10^6 细胞/mL 的密度, 虽然其没有用来自 Sigma-Aldrich 的 CD 水解产物补充的培养物那么高。虽然来自 BD 的 CD 水解产物补充剂也在 H29 的再补料后显示出细胞生长, 但在 H36 后停止生长且培养物开始进入平台期或是下坠 (图 25)。

[0240] 在来自 Sigma-Aldrich 的 CD 水解产物补充剂和 10% 酵母提取物处观察到了最高的存活率 (>95%)。阴性对照培养 (仅有 925 培养基) 和来自 BD 的 CD 水解产物补充剂显示了相对高的存活率直至 H36, 之后二者都开始衰退 (图 26)。当对照摇瓶 (仅有 925 培养基) 中保持相对低的总悬浮细胞浓度, 以及更低的活细胞浓度时, 用 BD CD 水解产物补充的瓶中悬浮细胞浓度增加, 然后降低, 并且悬浮细胞浓度在 Sigma Aldrich CD 水解产物补充的瓶中保持在相对较低, 这与高活细胞浓度 (这显示 Sigma Aldrich CD 水解产物补充的培养物是健康的) 有关系。用 10% 酵母提取物补充的卫星摇瓶培养物具有最高的悬浮细胞浓度 (图 27)。

[0241] 葡萄糖浓度概貌反映了活细胞密度生长概貌, 其中在 Sigma Aldrich CD 水解产物补充的培养物和 10% 酵母提取物补充的培养物中消耗葡萄糖最多。葡萄糖消耗在 H36 从阳性转变为阴性, 此时 BD CD 水解产物补充的培养物中的细胞生长衰退。

[0242] 在卫星摇瓶培养开始时所有条件的乳酸盐浓度都高, 这是由于 CO_2 下降 (至 5%) 导致的, 其在 ATR 培养箱中无法主动控制。随着 Sigma Aldrich CD 水解产物补充的和 10% 酵母提取物补充的卫星摇瓶培养中葡萄糖代谢的攀升, 乳酸盐浓度也在增长。在 BD CD 水解产物补充的卫星摇瓶培养和酵母提取物补充的卫星摇瓶培养中的乳酸盐浓度在 H36 后随着代谢衰退而下降。所有卫星摇瓶培养中的谷氨酰胺消耗趋于与 40-L 生物反应器培养相似, 虽然其消耗比 Sigma Aldrich CD 水解产物补充的卫星摇瓶培养和酵母提取物补充的卫星摇瓶培养 (其中活细胞密度更高) 中更高。

[0243] 四种不同培养基的滴度概貌揭示了 Sigma Aldrich CD 水解产物补充剂将滴度推高至 $\sim 3700\text{U/L}$ 直到 H42 (四个测试的培养基中最高的), 然后在 H52 前显示出稳定的衰退至 $\sim 1500\text{U/L}$ 。仅有 925 培养基的对照的卫星摇瓶培养滴度显示出稳定的增长, 在 H52 前增多至 $\sim 1500\text{U/L}$, 这与 40-L 母反应器培养相似。10% 酵母提取物补充剂引起滴度的最初攀升, 其在 H42 后下降。与其他参数相一致的是, BD CD 水解产物补充的培养物在 H36 后下坠。来自 Sigma-Aldrich 的和 BD 的 CD 水解产物补充剂都提供了直接的低谷恢复 (图 28)。

[0244] 所有测试的培养基的比生产率 (SPR) 均是相似的, 除了对照的 925 培养基之外, 所述 925 培养基显示出与母 40-L 生物反应器培养相似的趋势。所有其他测试的培养基的 SPR 各自是相似的, 且与对照瓶是相似的, 虽然它们在约 H40 时下降 (图 29)。

[0245] 最终, 累积体积生产率 (VPR) 概貌显示了重组人 α -半乳糖苷酶的基于摇瓶培养的稀释系数的累积生产率。这些数据显示, 含有来自 Sigma-Aldrich 的 CD 水解产物补充剂的卫星摇瓶培养显示了最高的生产率, 其速率仅在 $\sim$ H45 后轻微降低。在含有酵母提取物的卫星摇瓶培养 (阳性对照) 中观察到了较低的累积 VPR, 而在含有来自 BD 的 CD 水解产物补充剂的卫星摇瓶培养中甚至观察到了进一步降低的累积 VPR, 其中累积 VPR 在 H38 后维持平稳 (产物滴度下降)。对照的卫星摇瓶培养显示了累积 VPR 随着滴度增长的稳定增长, 虽然其未达到与含有来自 Sigma-Aldrich 的 CD 水解产物补充剂的卫星摇瓶培养相似的水平。

[0246] 卫星摇瓶培养中的 pH 和 pO_2 与 40-L 生物反应器培养极为不同, 这是由于缺乏对这

些参数的主动控制。卫星摇瓶培养在这期间的 CO_2 比母 40-L 生物反应器培养 (85–95mmHg) 低很多 (35–45mmHg)。这是由于卫星摇瓶培养极高的清除效率和低于 5.0% CO_2 的 ATR 培养箱设定点。Sigma CD 水解产物补充的卫星摇瓶培养和酵母提取物补充的卫星摇瓶培养 pH 从高 pH 开始 (约 7.1), 并在 H53 下降至约 6.4–6.6, 这是直接响应于乳酸盐浓度的。BD CD 水解产物补充的卫星摇瓶培养物最初显示出 pH 随着代谢恢复 (pick up) 而下降, 但培养物在 H36 开始衰退, pH 也随着乳酸盐浓度下降而增长。

[0247] pO_2 趋势证实了用 Sigma-Aldrich CD 水解产物补充的卫星摇瓶培养和用 10% 酵母提取物补充的卫星摇瓶培养的培养性能, 其显示 pO_2 浓度随着活细胞浓度增加而持续下降。与 H36 后衰退的代谢和细胞生长相一致的是, BD CD 水解产物补充的卫星摇瓶培养在这个点后显示出氧浓度的增长。对照的卫星摇瓶培养显示出相对平坦的趋势, 当活细胞密度在收获 24 天内从 2.5×10^6 增长到 5.0×10^6 , pH 和 pO_2 在卫星摇瓶培养持续期间仅有轻微降低。

[0248] Sigma-Aldrich CD 水解产物补充剂导致了本项研究过程期间最高的细胞生长和滴度性能的增长。得到结论, 1X 浓度的 BD CD 水解产物补充剂对培养没有益处, 这是因为其走出低谷期之后并未完全恢复, 并在约 H36 时观察到严重且不可逆的培养物衰退。

[0249] 总体而言, 可以得到结论, 向 925 培养基添加 CD 水解产物补充剂提高了重组人 α -半乳糖苷酶收获期中期的生产率。测试的不同的培养基中, 来自 Sigma-Aldrich 的 CD 水解产物补充剂在 H28 和 H52 得到了最高的细胞生长和滴度的增长。在测试的浓度处, 来自 BD 的 CD 水解产物补充剂并没有帮助从低谷完全恢复。在测试的浓度处, CD 水解产物的确表现出提高收获期中期生产率, 但这个效果在收获期晚期减小。

[0250] 这些数据证明本文所述方法能用于测试用于产生液体培养基的不同培养基、不同补充剂和不同原料成分对于制造重组蛋白的方法的效果。

[0251] 其他实施方式

[0252] 应当理解的是, 当已对本发明进行描述并辅以其详细说明时, 上文的描述仅是意在阐述, 而非限制本发明的范围。本发明的范围在说明书所附的权利要求书中进行限定。其他的方面、优点和改良均在所附的权利要求书范围之内。



图 1

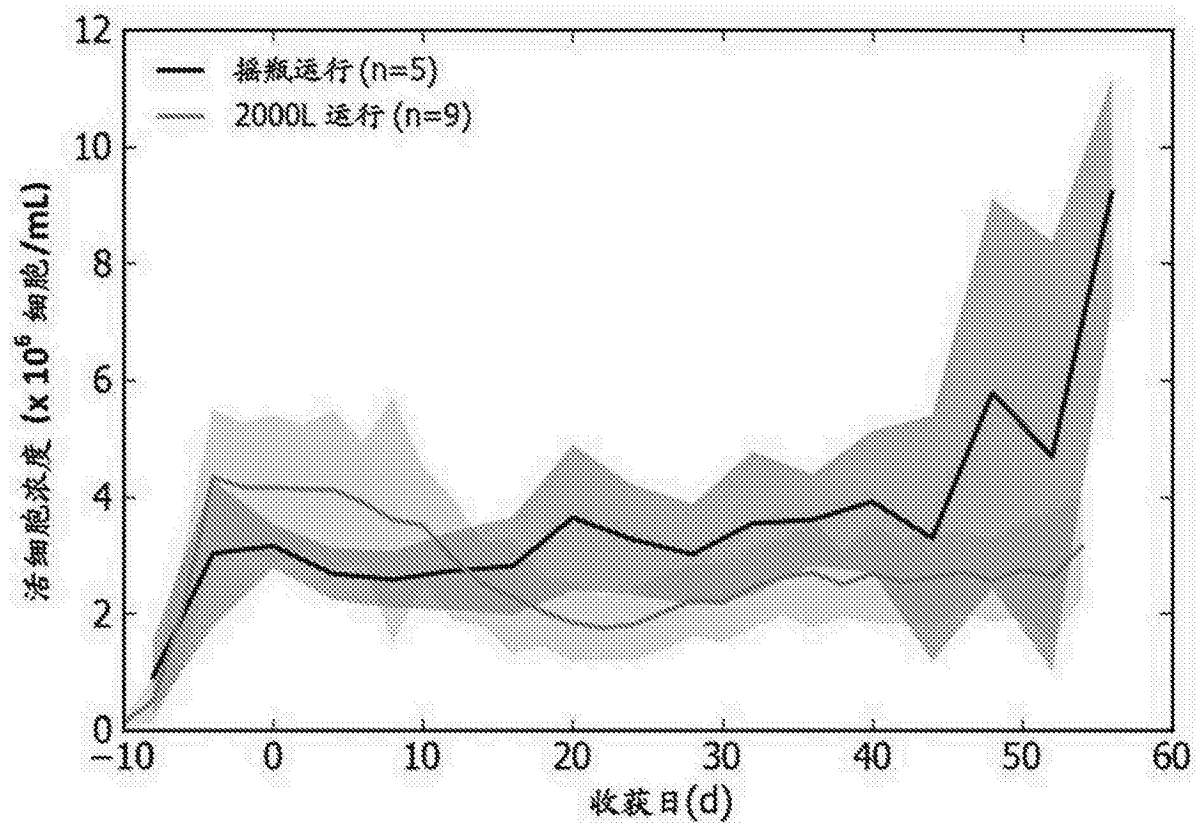


图 2

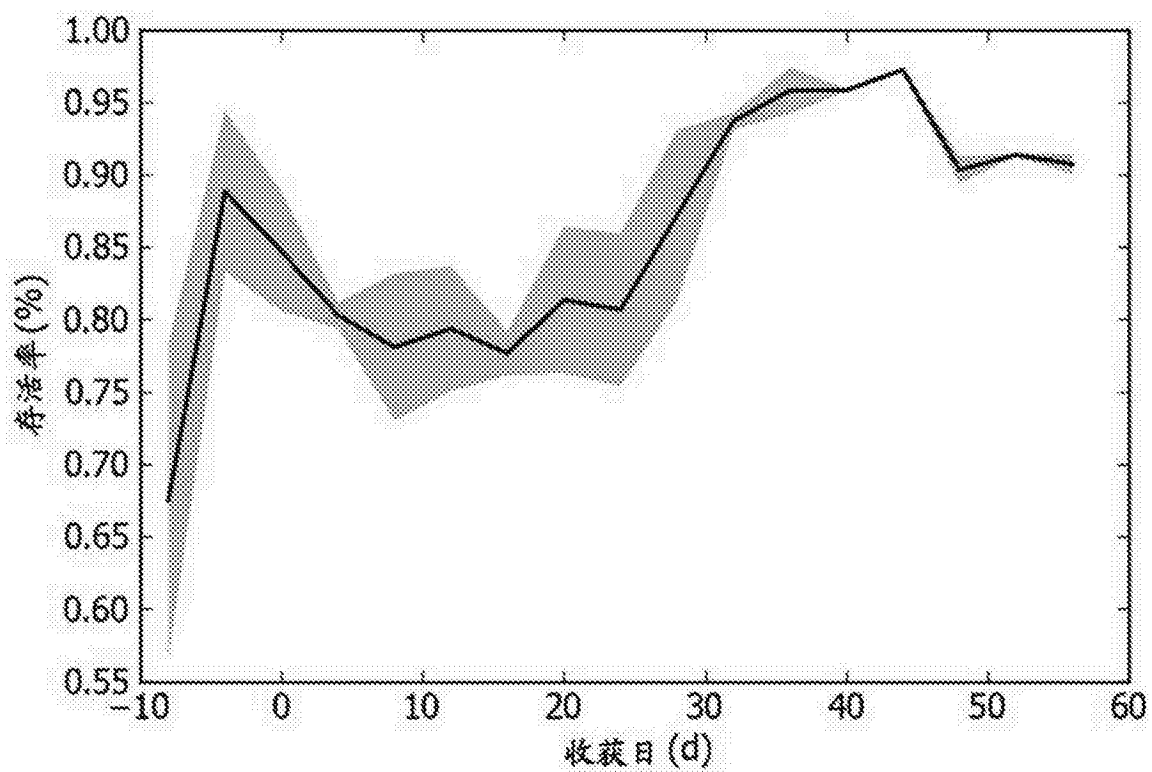


图 3

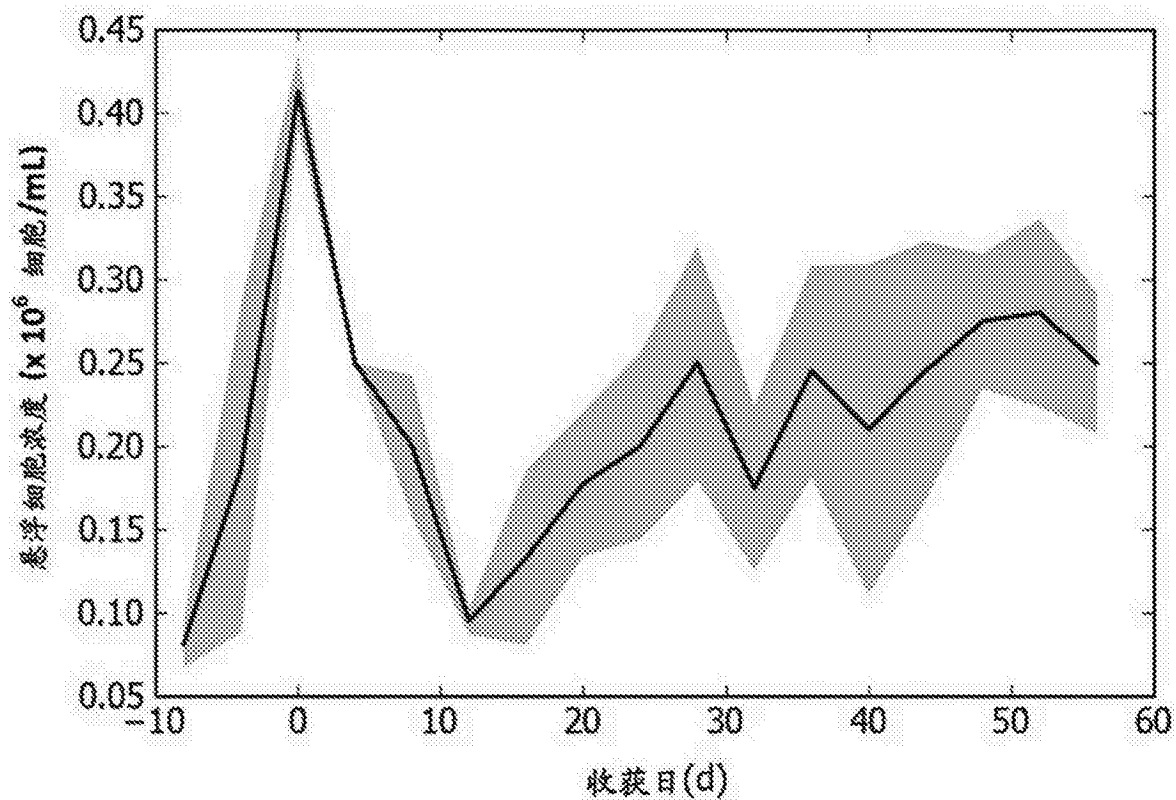


图 4

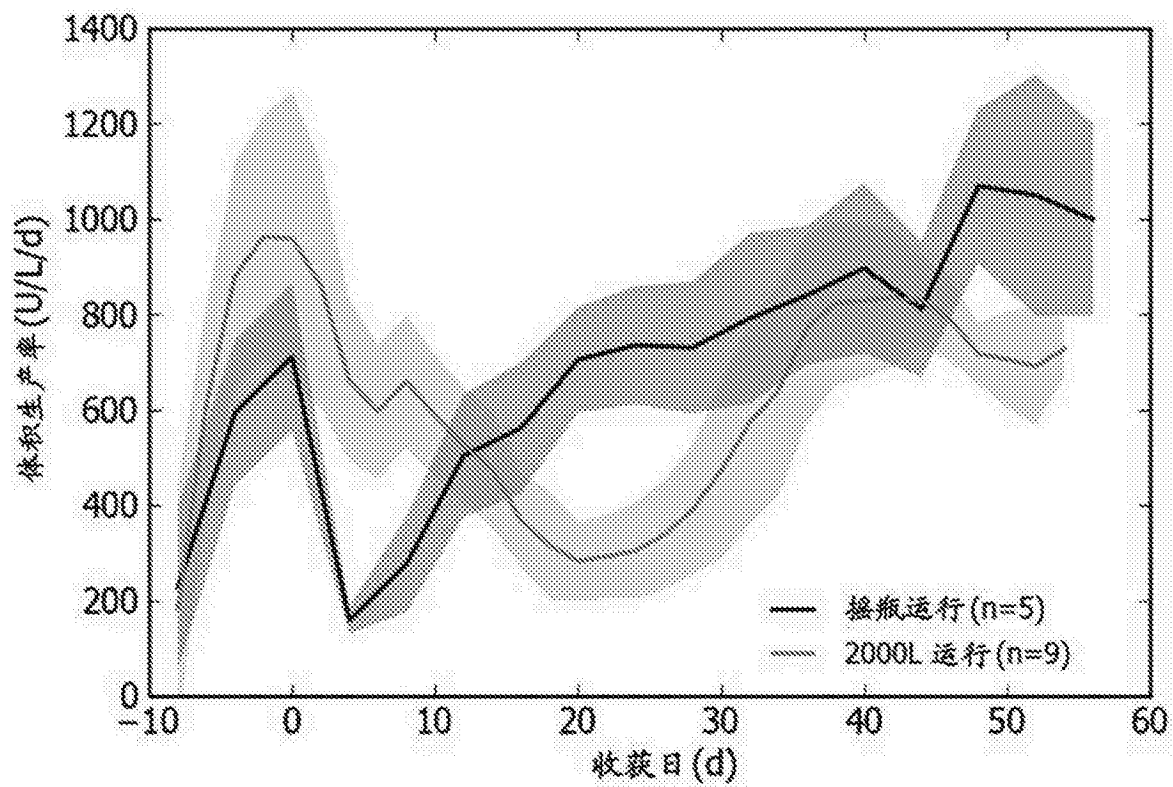


图 5

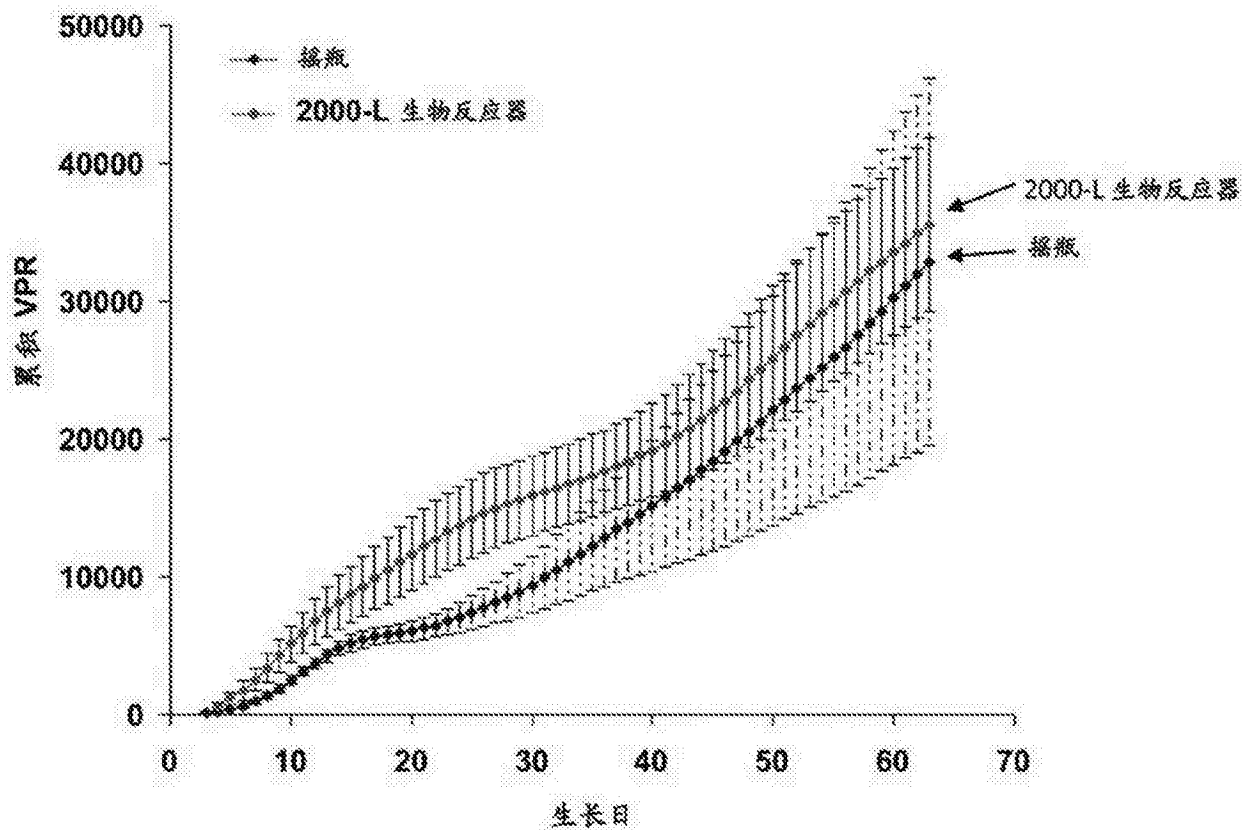


图 6

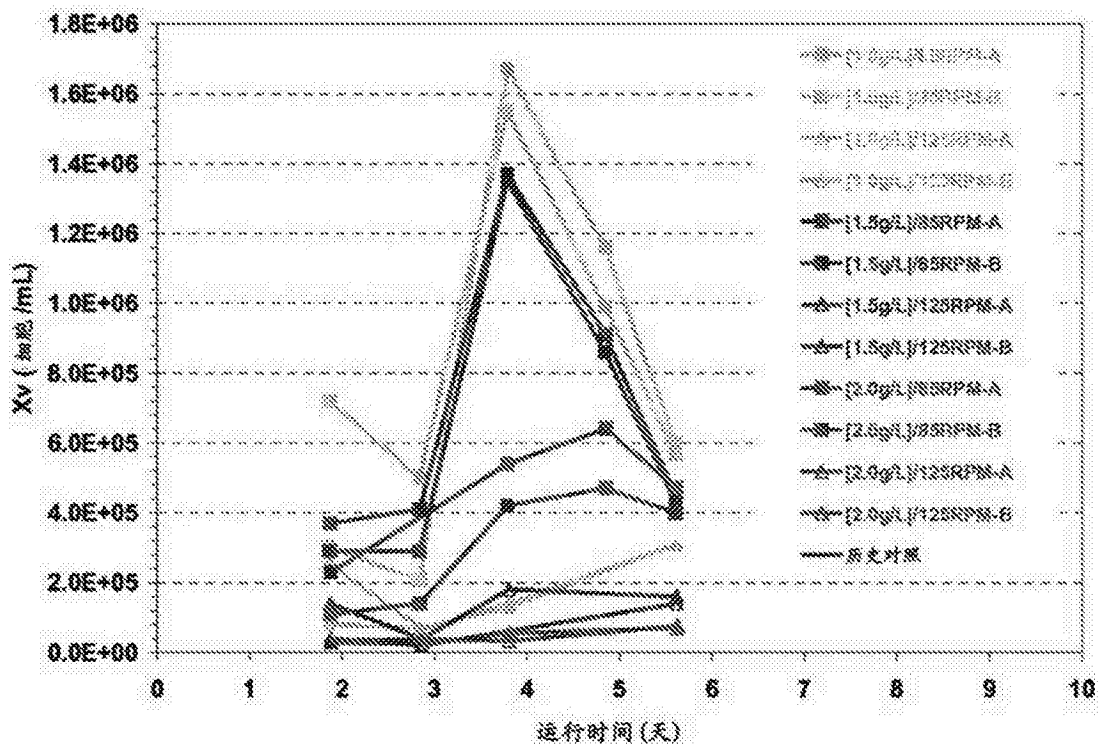


图 7

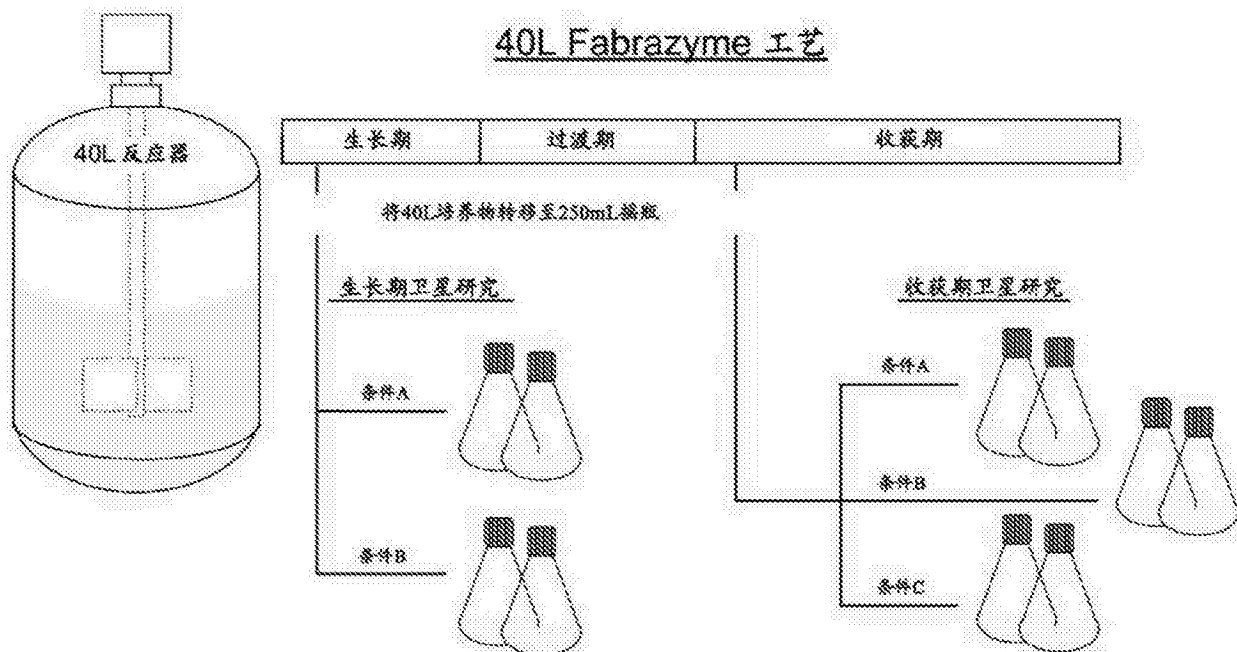


图 8

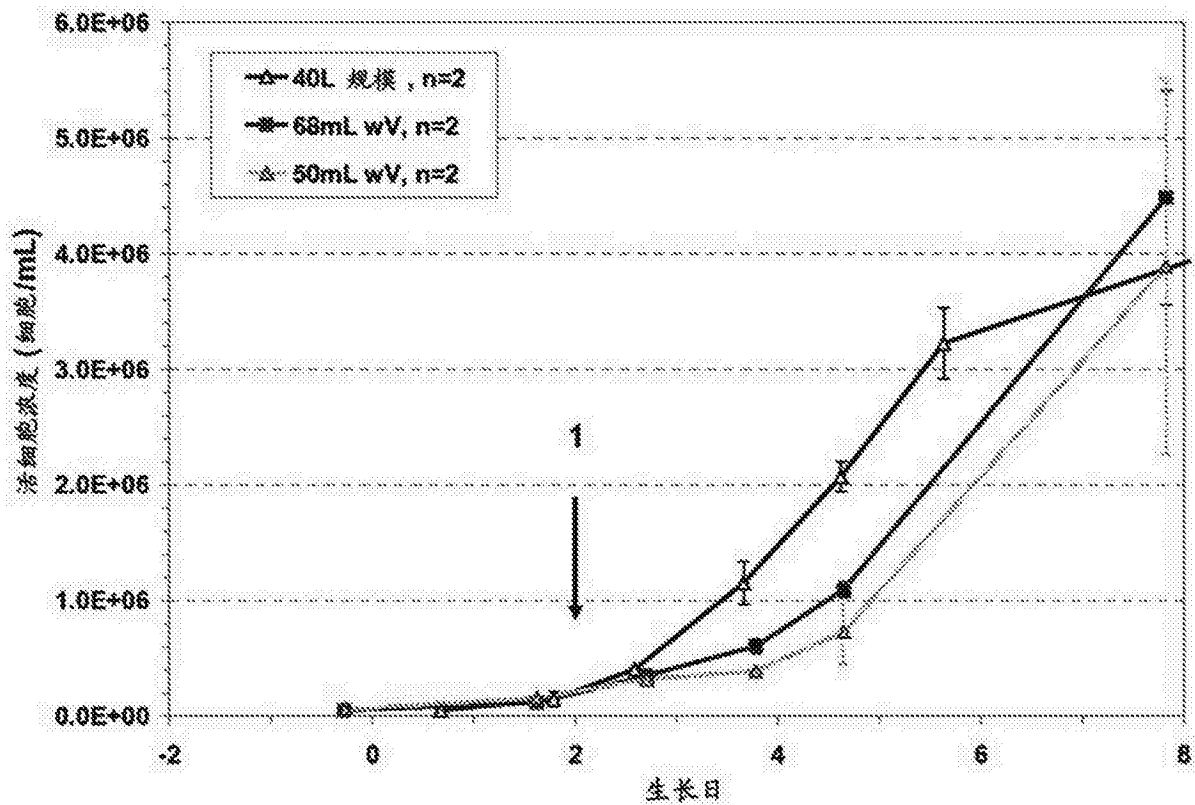


图 9

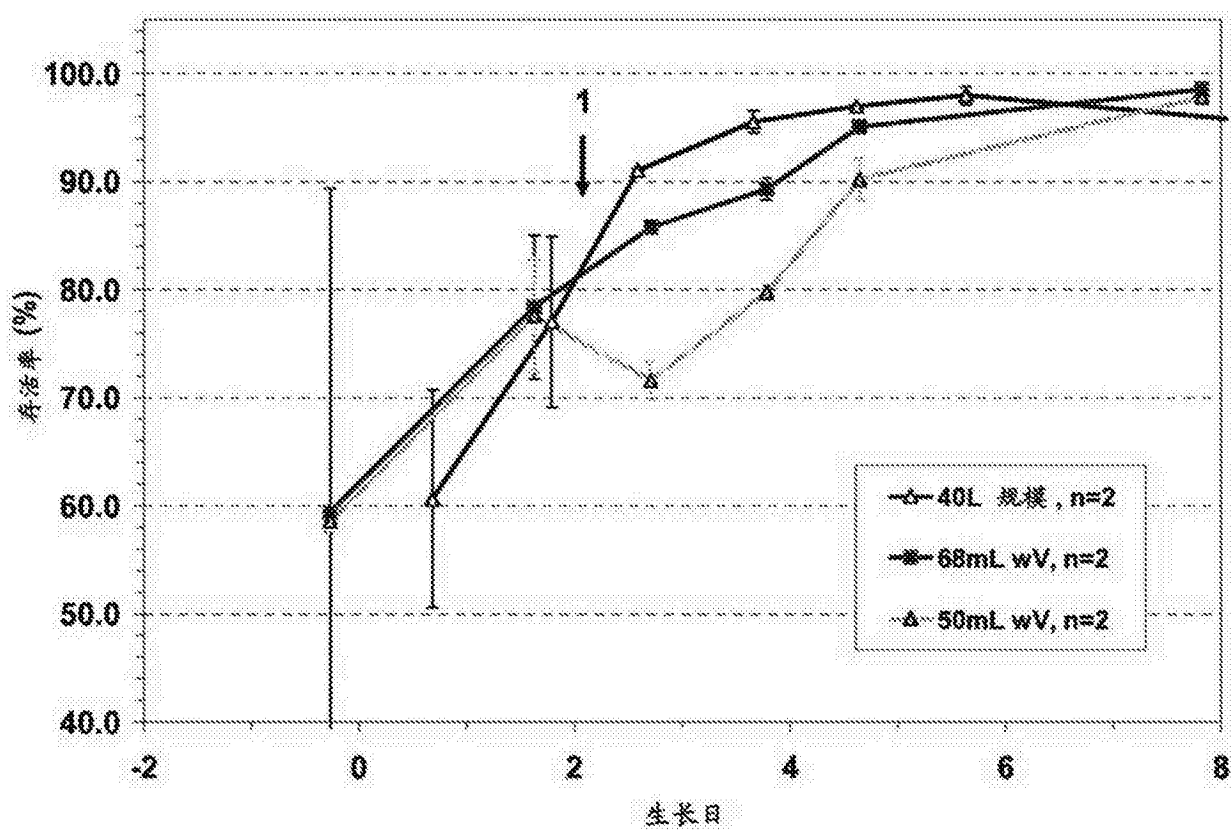


图 10

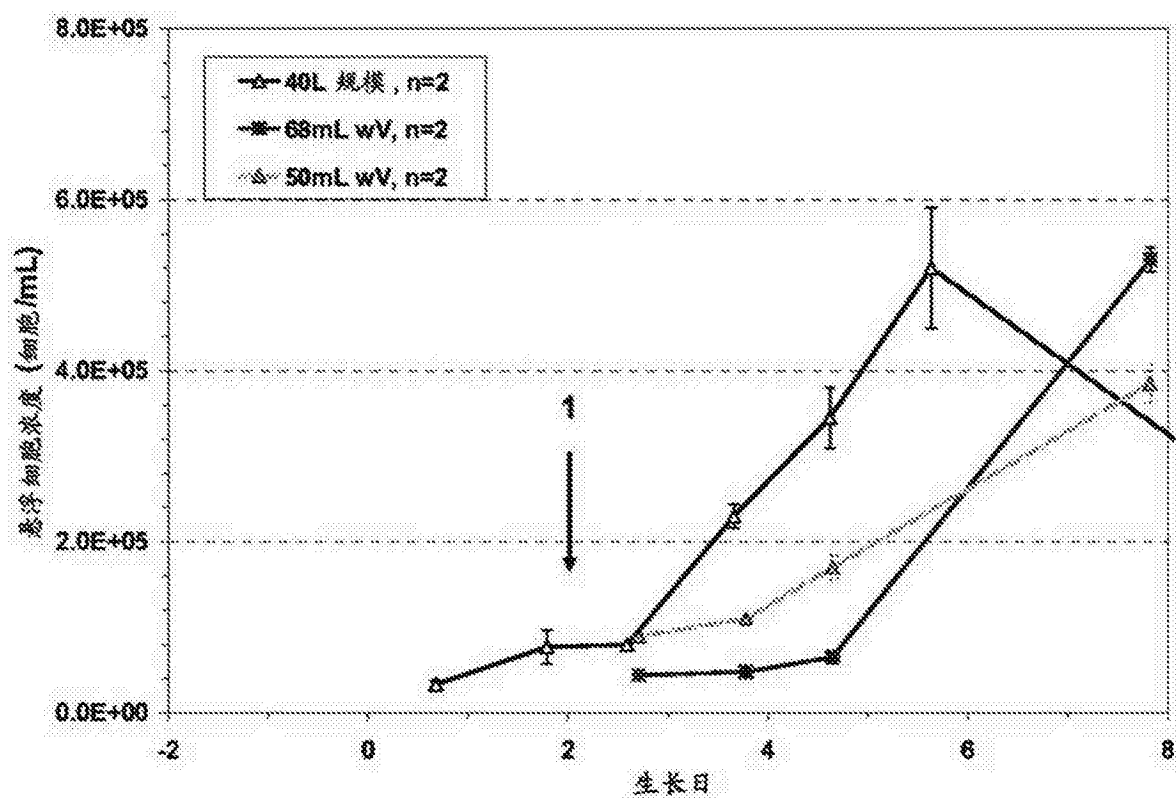


图 11

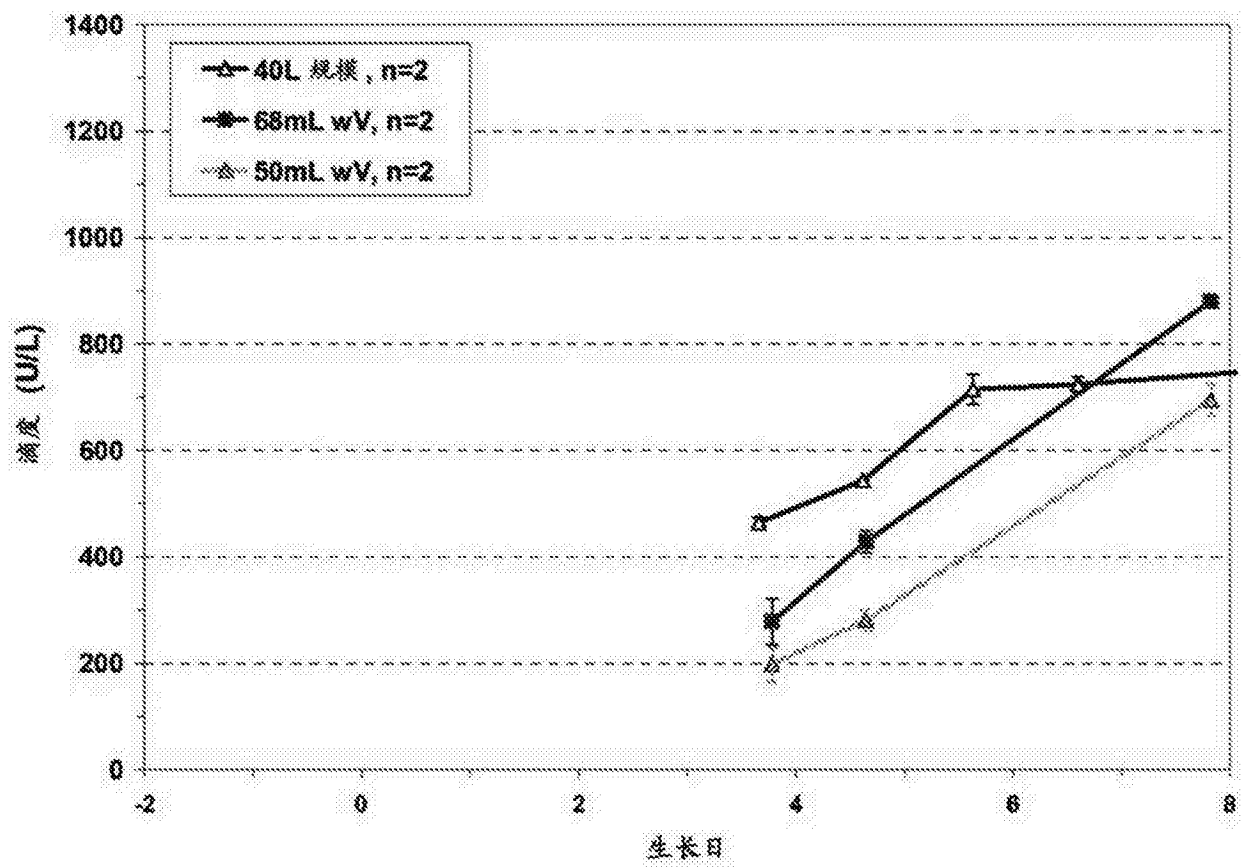


图 12

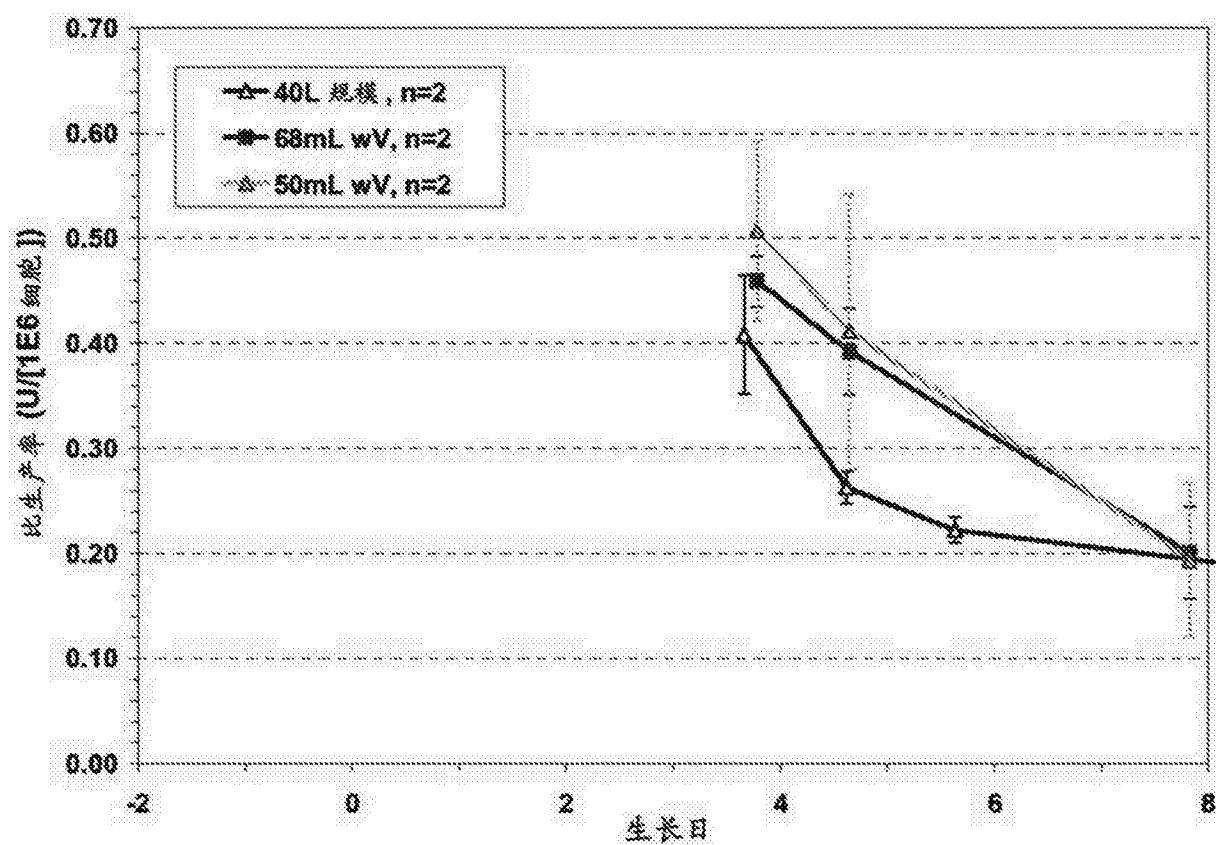


图 13

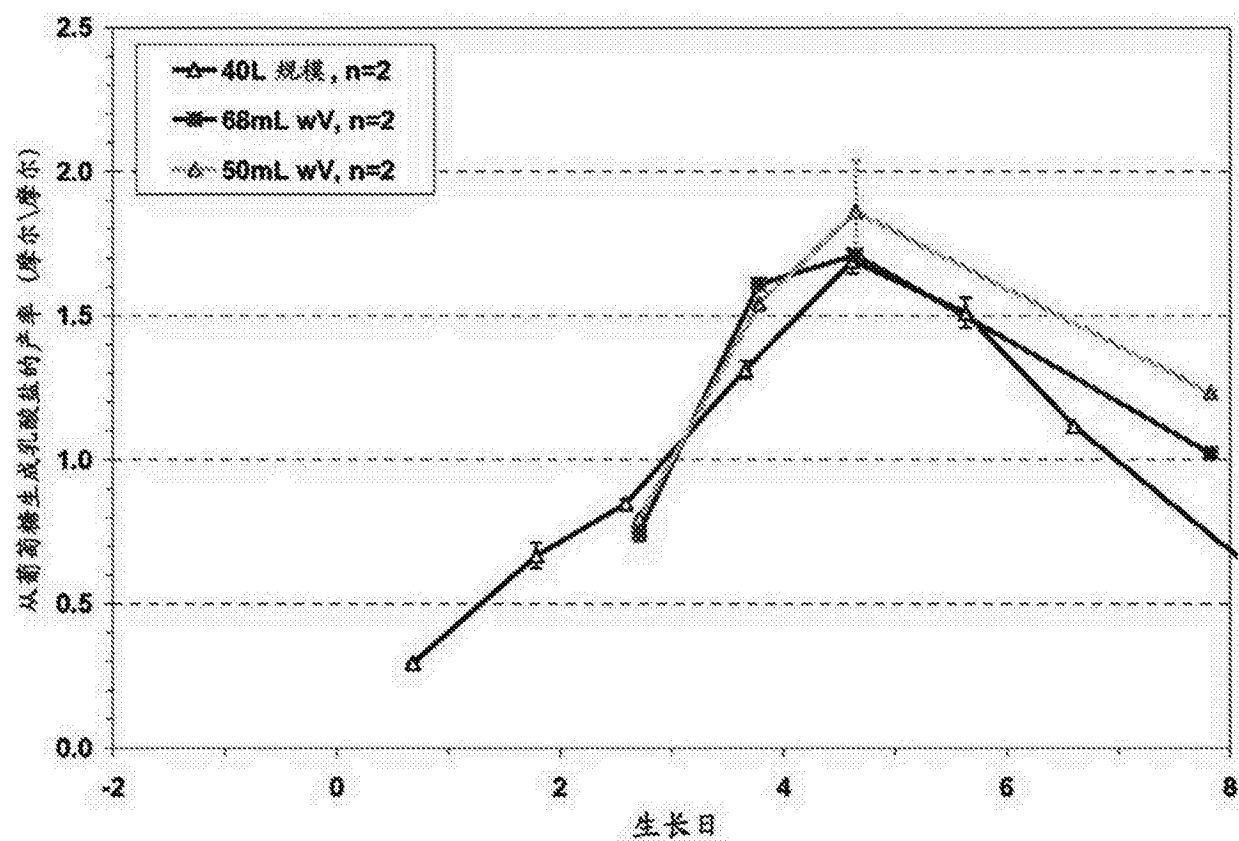


图 14

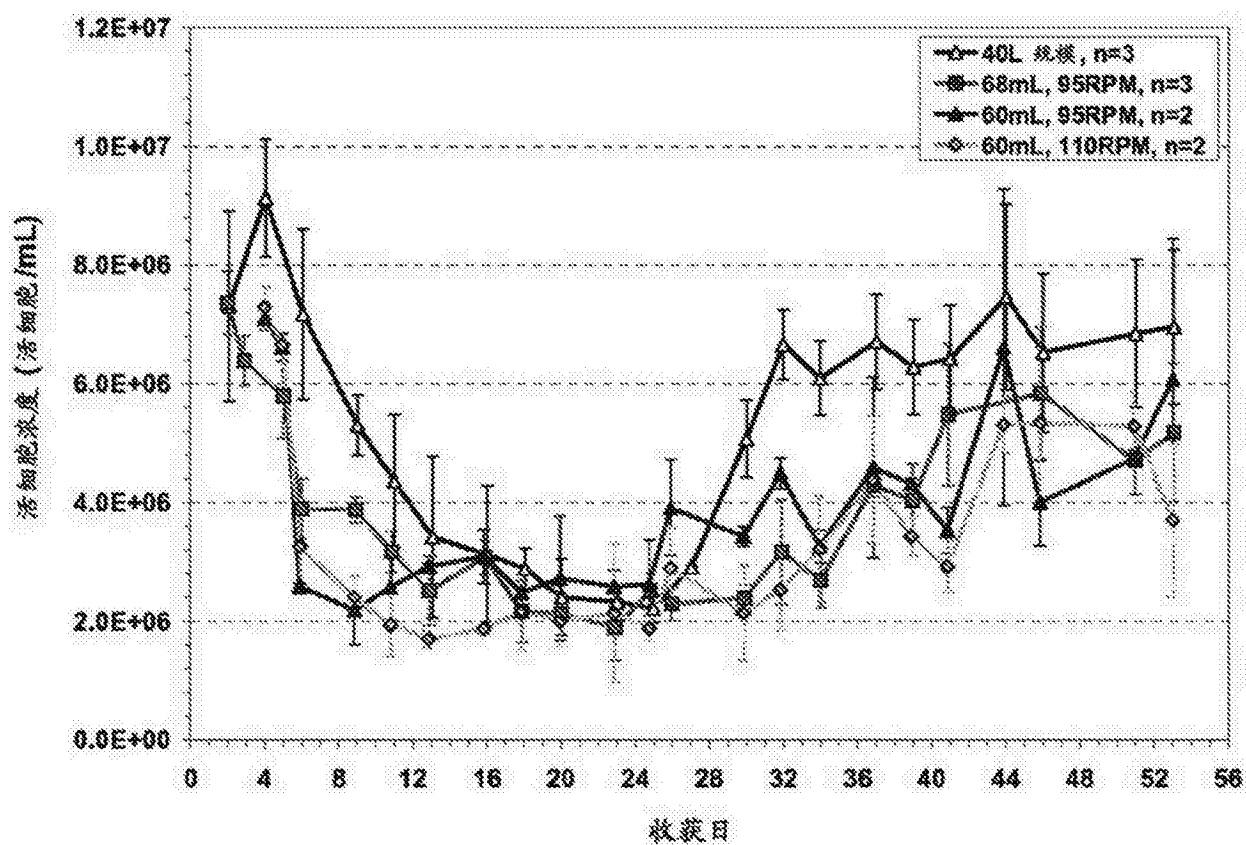


图 15

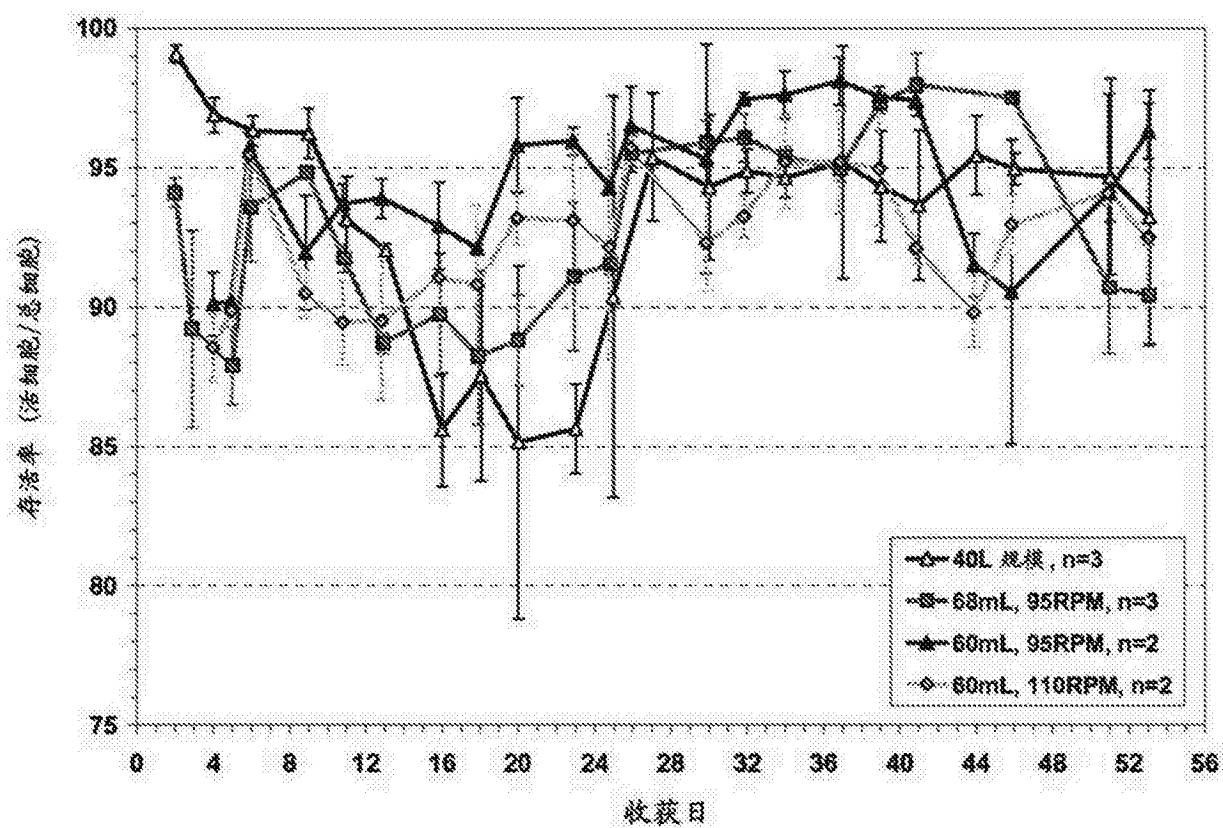


图 16

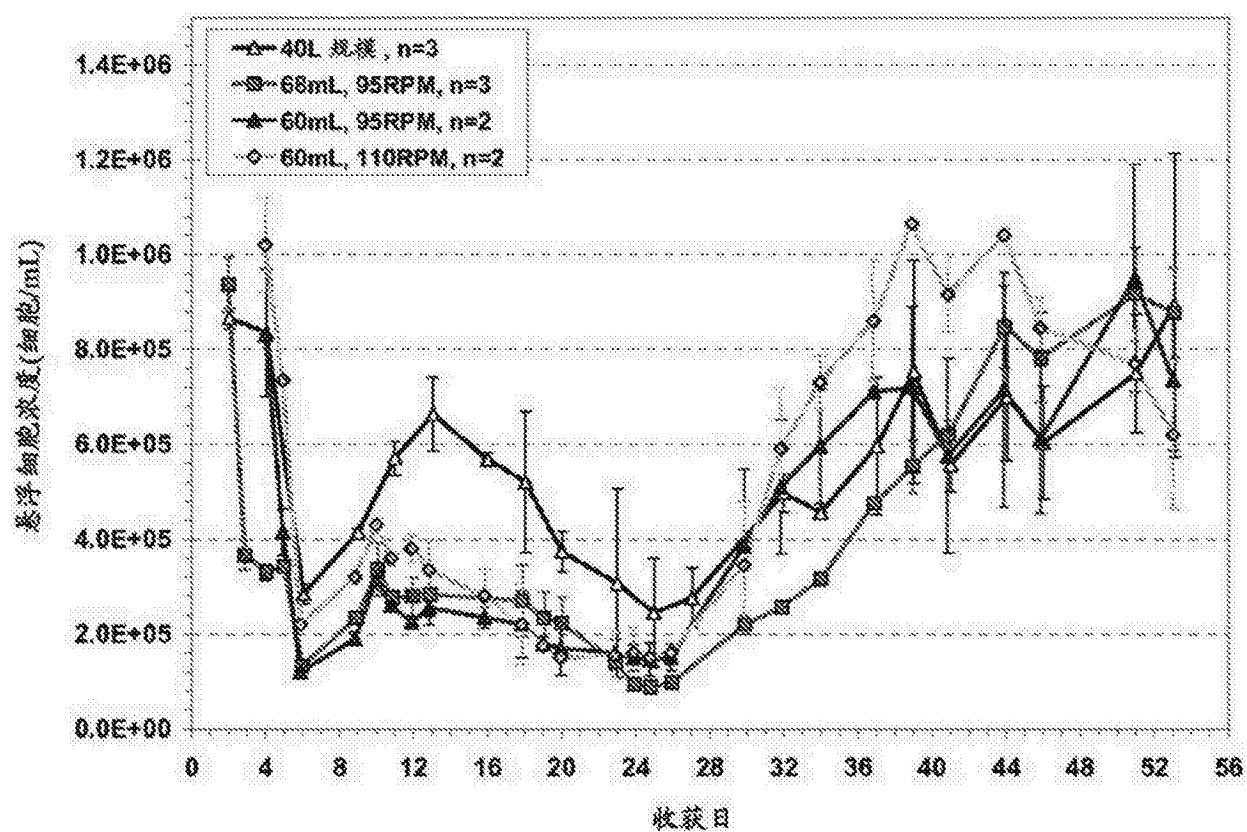


图 17

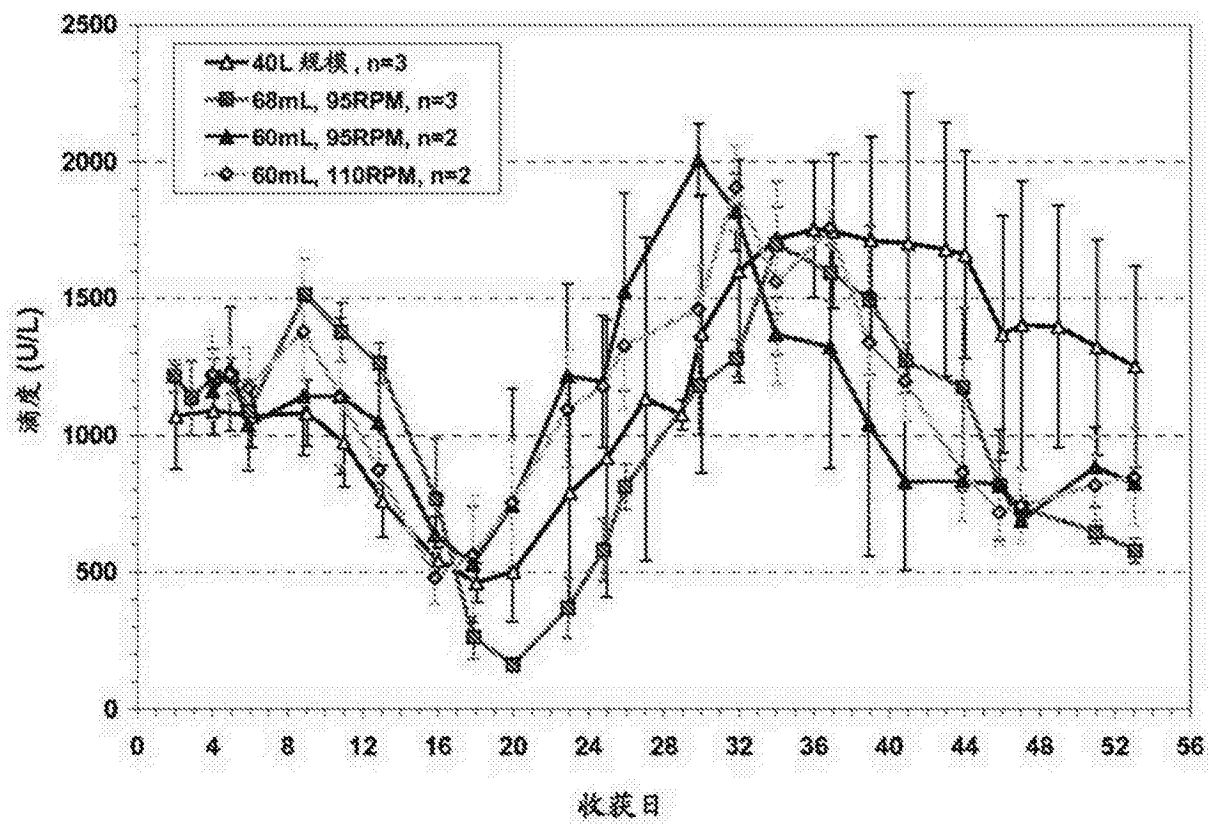


图 18

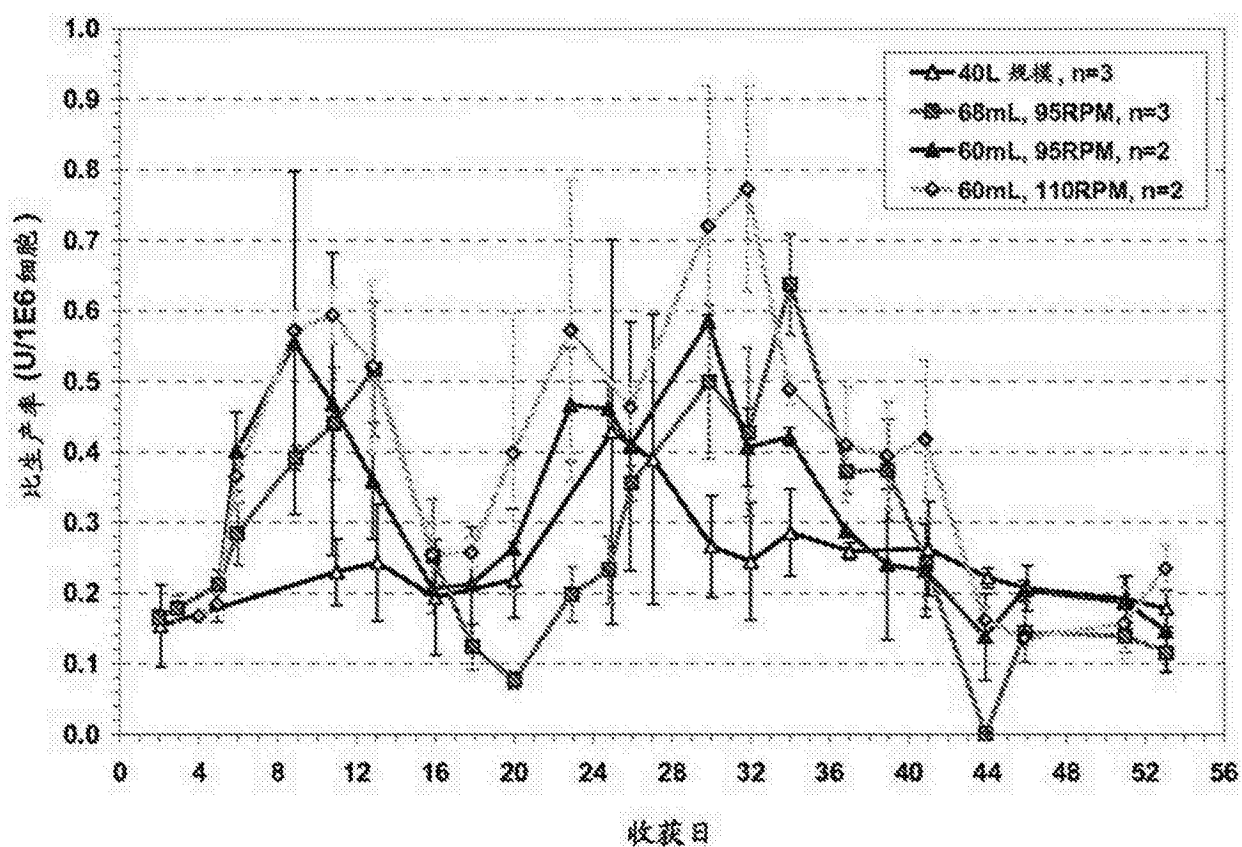


图 19

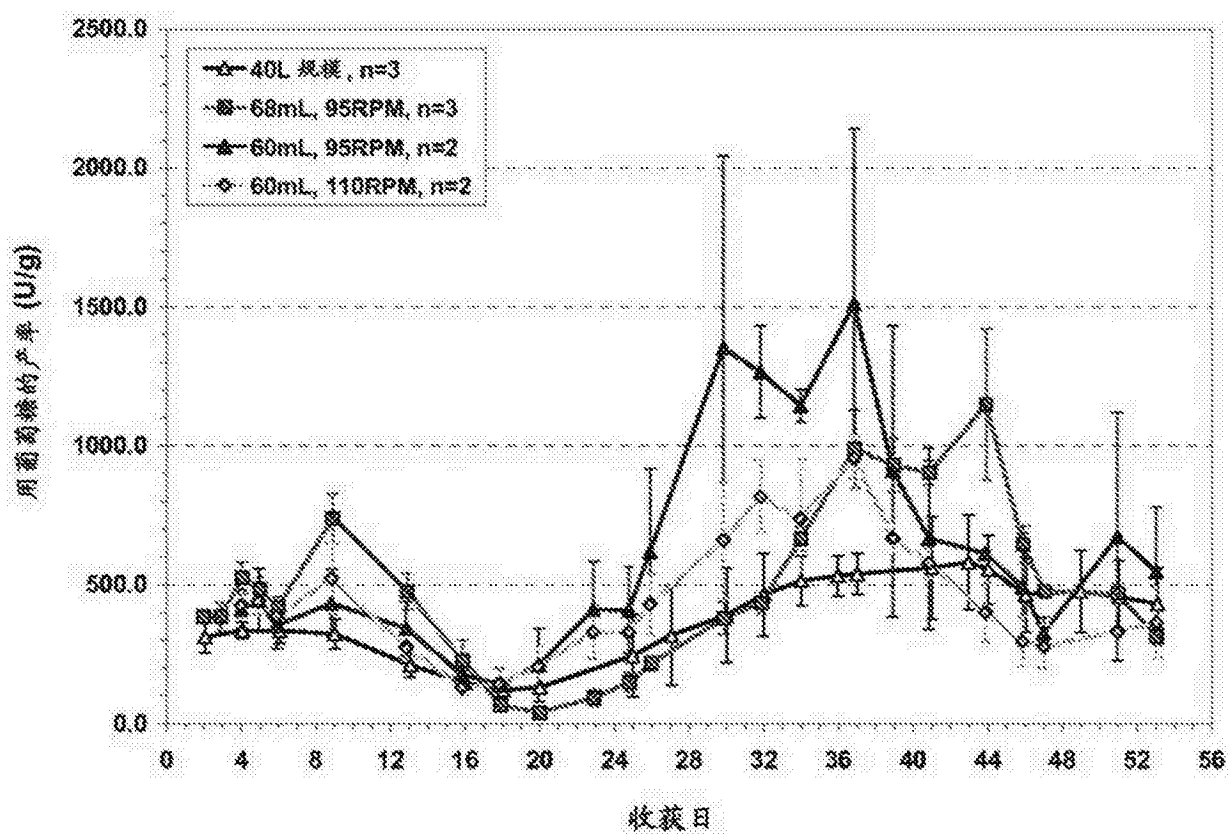


图 20

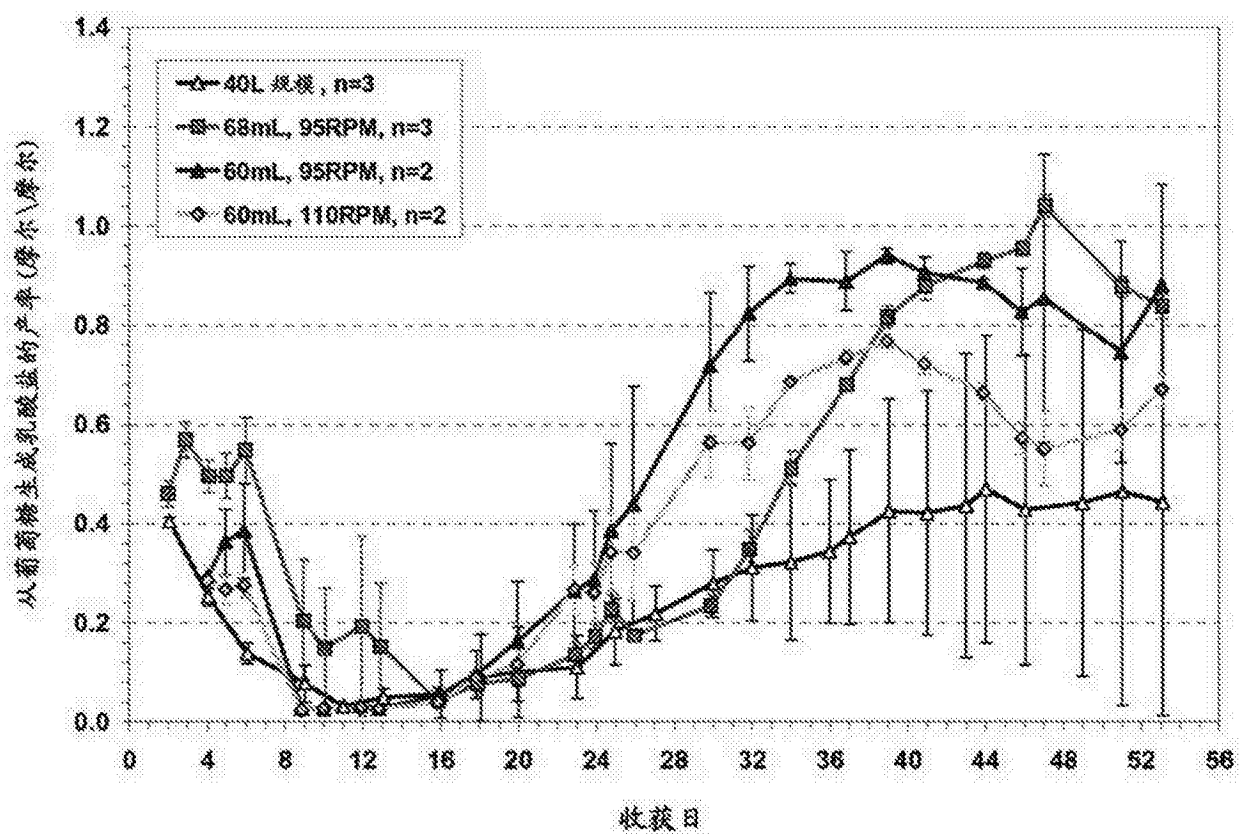


图 21

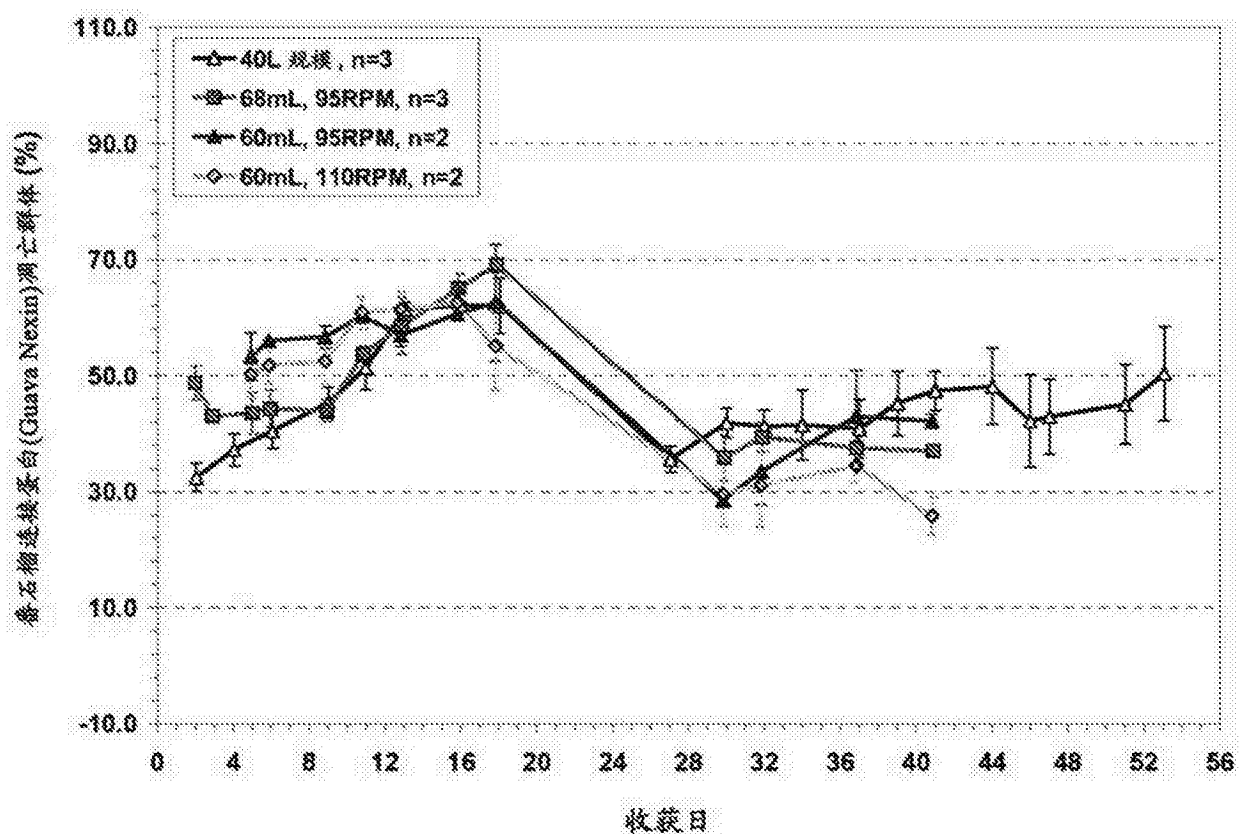


图 22

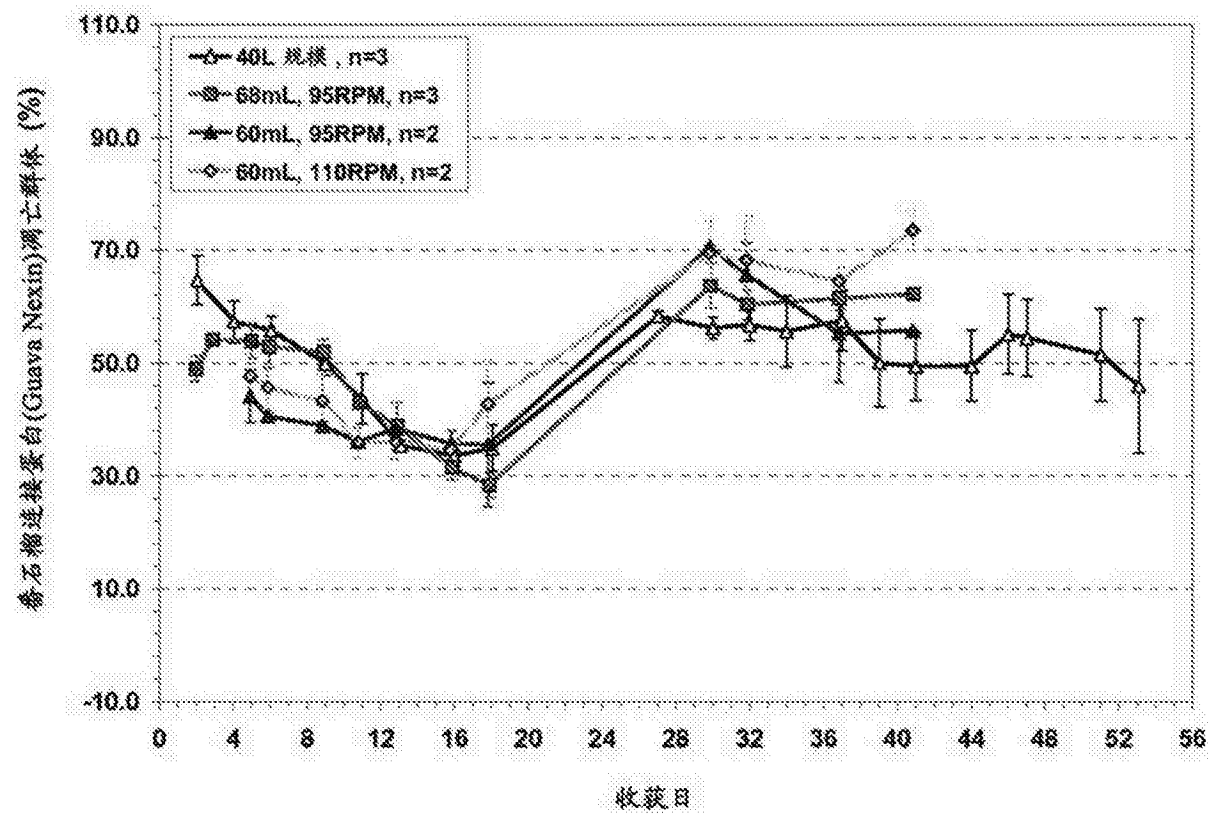


图 23

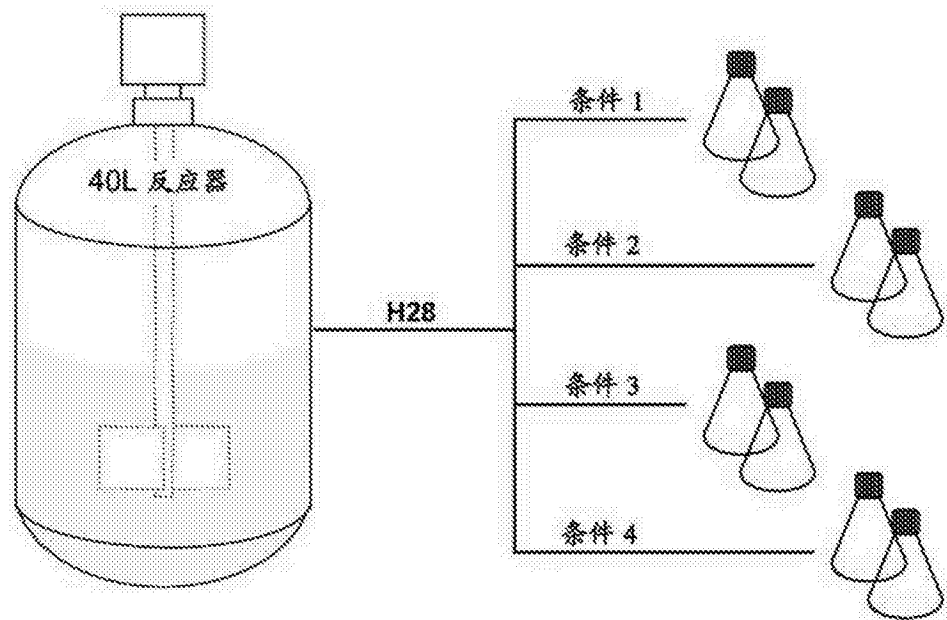


图 24

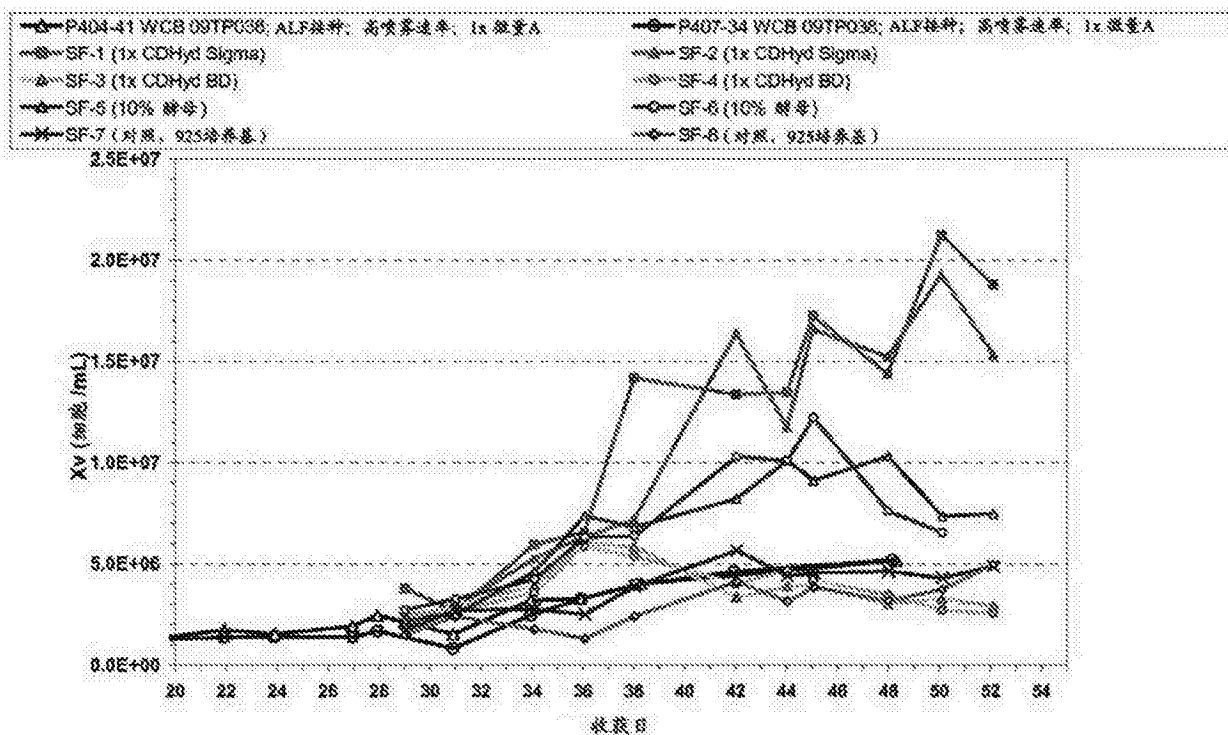


图 25

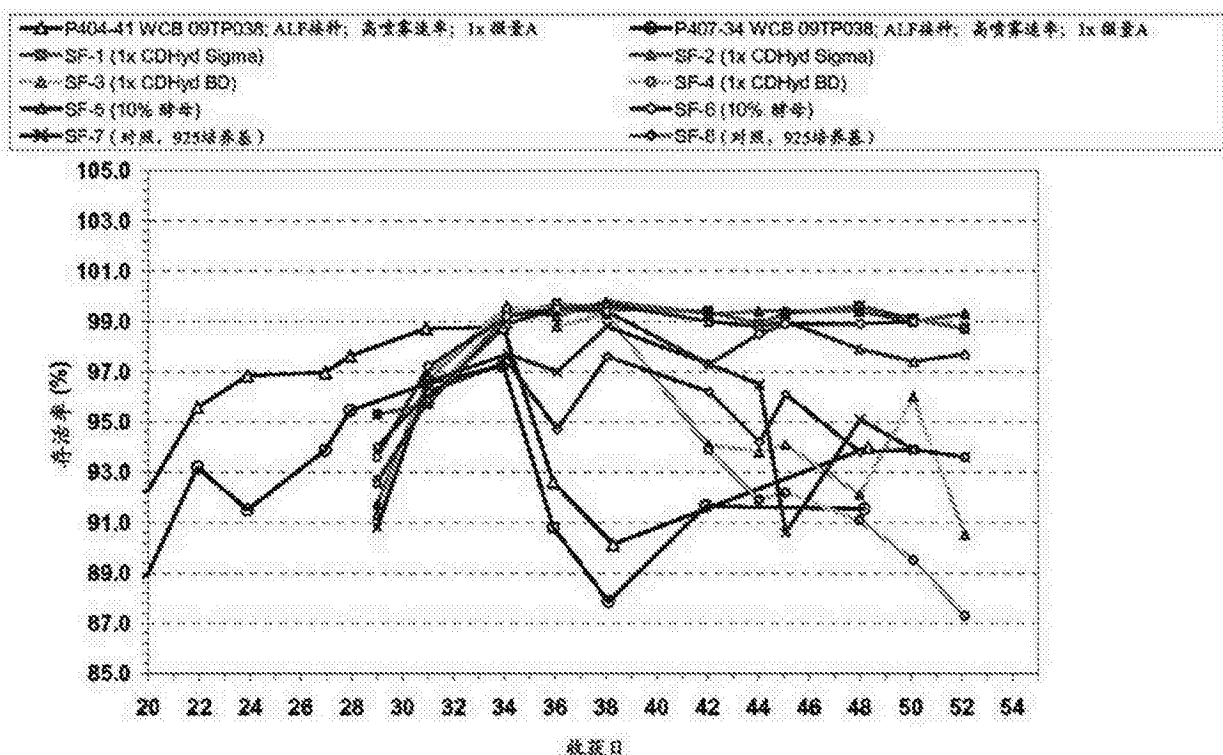


图 26

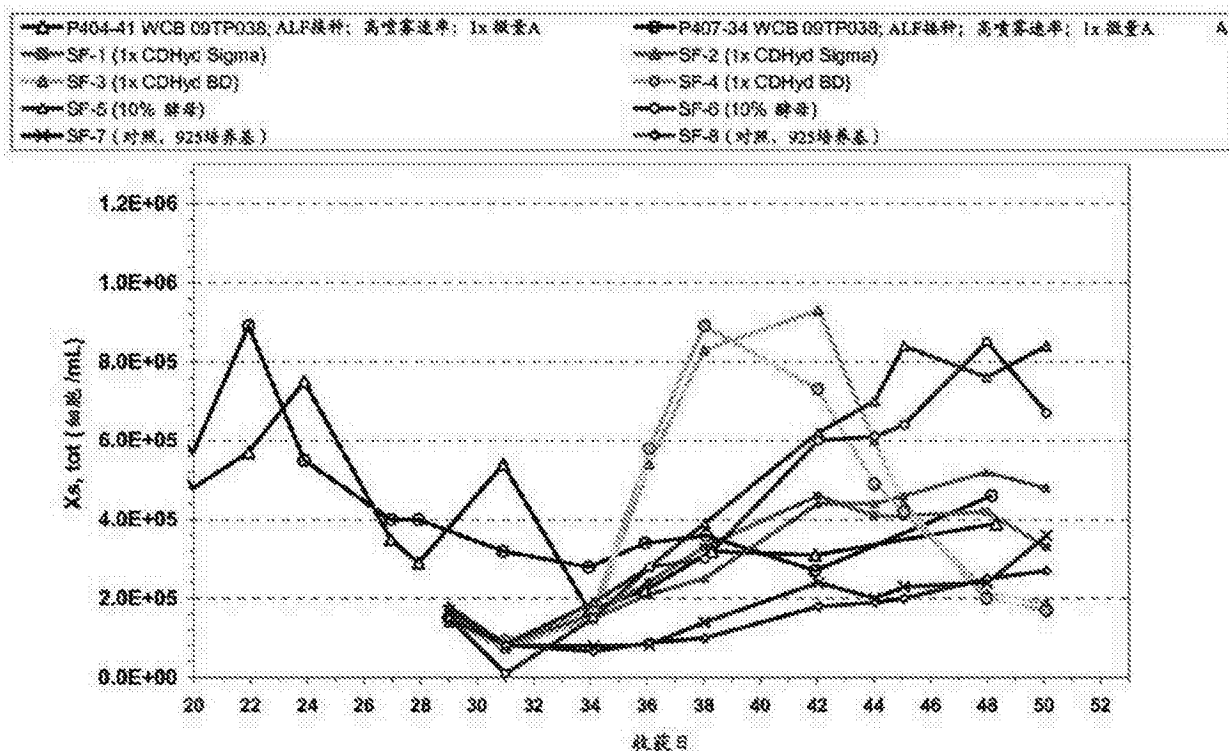


图 27

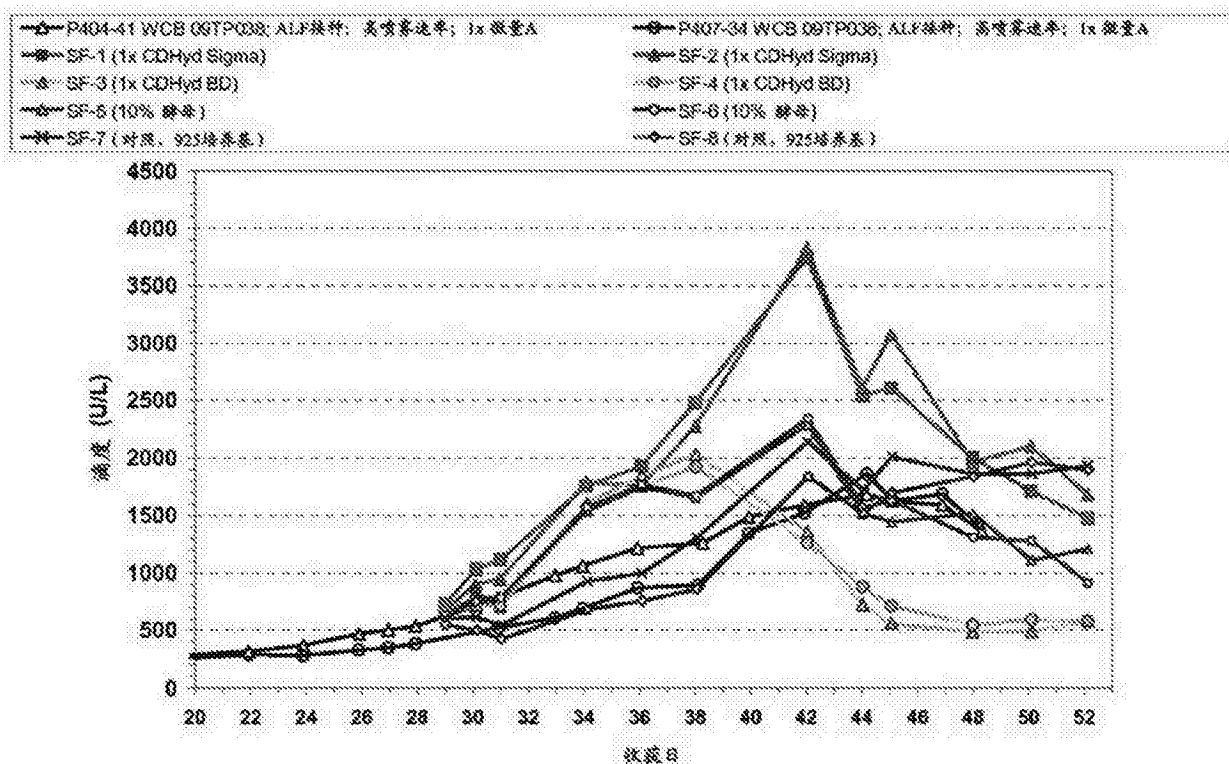


图 28

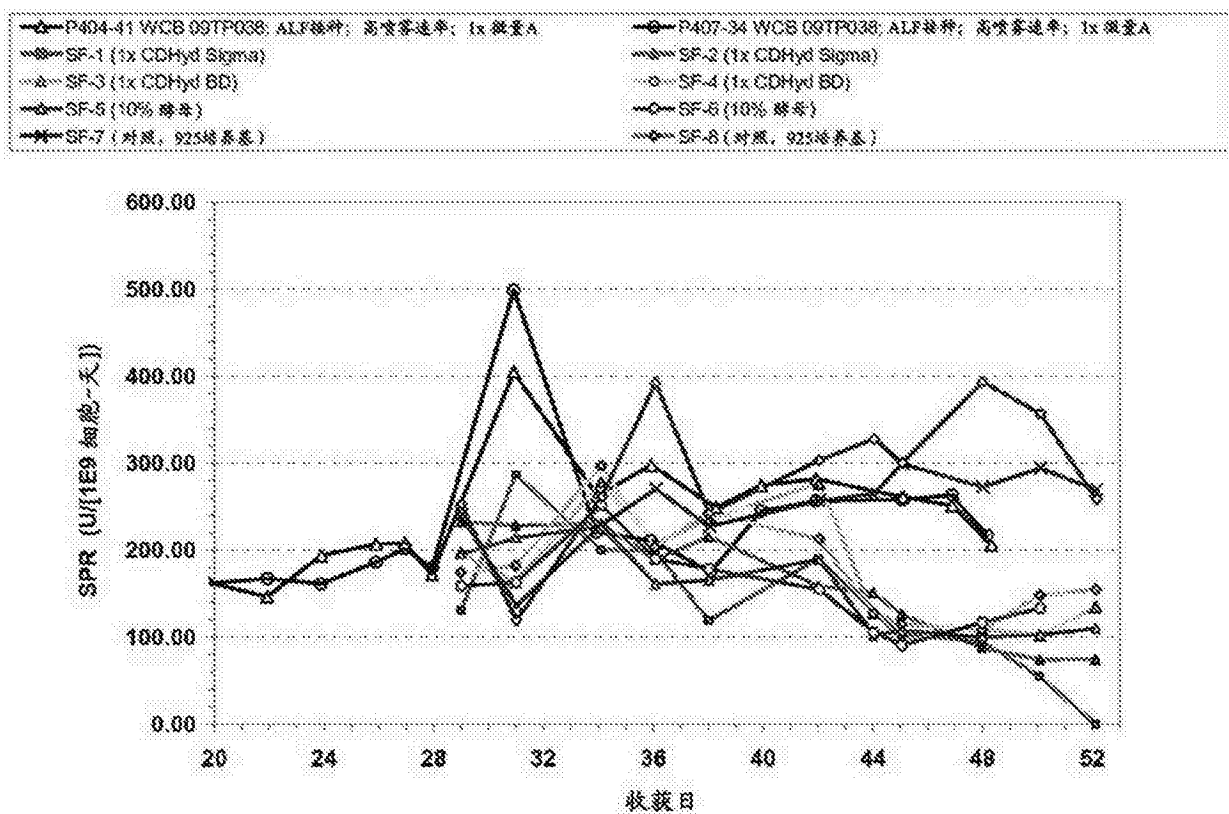


图 29