



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118974268 A

(43) 申请公布日 2024.11.15

(21) 申请号 202380031813.4

(22) 申请日 2023.03.30

(30) 优先权数据

2022-058476 2022.03.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/013100 2023.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/190829 JA 2023.10.05

(71) 申请人 富士胶片株式会社

地址 日本

(72) 发明人 黑泽乔 稻田淳史 中居真一

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

专利代理师 王灵菇

(51) Int.Cl.

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图5页

(54) 发明名称

产物的制造方法及产物

(57) 摘要

本发明的课题在于提供一种在通过细胞培养制造产物的制造方法中能够抑制膜堵塞的方法以及通过上述方法制造的产物。根据本发明,提供一种产物的制造方法,其包括培养细胞的步骤,其中,产物的生产时的细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上且 300×10^6 cells/mL的灌注培养,灌注培养期间为13天以上且500天以下,在上述灌注培养期间中的至少1天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的 X [mol/L/day]被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内,所添加的碱水溶液的pH为 $7 < \text{pH} < 13$ 。

1. 一种产物的制造方法,其包括培养细胞的步骤,其中,
所述细胞的培养为产物的生产时的细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上且 300×10^6 cells/mL的灌流培养,灌流培养期间为13天以上且500天以下,
在所述灌流培养期间中的至少1天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内,所添加的碱水溶液的pH为 $7 < \text{pH} < 13$,其中,X的单位为mol/L/day。
2. 根据权利要求1所述的产物的制造方法,其中,
所述灌流培养中的细胞密度为 100×10^6 cells/mL以上且 300×10^6 cells/mL以下。
3. 根据权利要求1或2所述的产物的制造方法,其中,
所述灌流培养期间为18天以上且500天以下。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的产物的制造方法,其中,
用于生产产物的培养期间为5天以上且450天以下。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的产物的制造方法,其中,
在所述灌流培养期间中的至少13天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X被控制在 $0 \leq X < 0.008$ 的范围内,其中,X的单位为mol/L/day。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的产物的制造方法,其中,
在所述灌流培养期间中的至少13天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X为0,其中,X的单位为mol/L/day。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的产物的制造方法,其中,
在所述灌流培养期间中的50%以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内,其中,X的单位为mol/L/day。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的产物的制造方法,其中,
所述灌流培养中的细胞培养液的连续分离方法为膜过滤。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的产物的制造方法,其中,
所述膜过滤为被称为ATF的交替切向流过滤。
10. 根据权利要求8或9所述的产物的制造方法,其中,
作为过滤时的通量的Y为 $0 < Y \leq 10$,其中,Y的单位为L/m²/hour。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的产物的制造方法,其中,
所述培养中的培养液的平均pH为6.7~7.2。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的产物的制造方法,其中,
所述培养中的培养液的最低pH为6.6以上。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的产物的制造方法,其中,
通过一边在线测定培养液中的pH,一边自动添加碱水溶液来控制所述培养中的培养液的pH。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的产物的制造方法,其中,
在所述灌流培养中,在达到细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上的目标细胞密度之后,通过取出包含细胞的培养液,将细胞密度维持在所述目标细胞密度 $\pm 40\%$ 以内,在细胞密度维持在所述目标细胞密度 $\pm 40\%$ 以内的期间,回收产物。
15. 根据权利要求1至13中任一项所述的产物的制造方法,其包括如下步骤:

在所述灌流培养中,在达到细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上的目标细胞密度之后,通过每1天取出至少1次以上包含细胞的培养液,将细胞密度调整在所述目标细胞密度 $\pm 10\%$ 以内。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述细胞密度维持在 80×10^6 cells/mL以上的期间的溶解 CO_2 浓度为60~180mmHg。
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述碱为 NaHCO_3 和/或 Na_2CO_3 。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述碱为 NaHCO_3 。
19. 根据权利要求1至18中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述碱水溶液的浓度Z为 $0 < Z < 5$,其中,Z的单位为mol/L。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的产物的制造方法,其中,在灌流培养中所添加的培养基的pH为7.0~8.0。
21. 根据权利要求1至20中任一项所述的产物的制造方法,其中,在不添加碱而进行培养的情况下,当培养液的pH下降时,通过供给追加了碱的培养基来控制培养液的pH。
22. 根据权利要求1至21中任一项所述的产物的制造方法,其包括如下步骤:当培养液的pH低于6.85时,供给追加了 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0$ mol/L的碱的培养基。
23. 根据权利要求1至22中任一项所述的产物的制造方法,其中,在所述灌流培养中添加含有聚二甲基硅氧烷的消泡剂,作为所述碱添加速度的X和作为所述聚二甲基硅氧烷添加速度的B满足 $B < -0.79X + 0.0228$,其中,X的单位为mol/L/day,B的单位为g/L/day。
24. 根据权利要求1至23中任一项所述的产物的制造方法,其中,在所述灌流培养的整个期间中,不进行碱添加。
25. 根据权利要求1至24中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述细胞为动物细胞。
26. 根据权利要求1至25中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述细胞为CHO细胞。
27. 根据权利要求1至26中任一项所述的产物的制造方法,其中,所述产物为抗体。
28. 一种产物,其通过权利要求1至27中任一项所述的产物的制造方法来制造。

产物的制造方法及产物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种产物的制造方法,其包括培养细胞的步骤,且控制碱添加速度及碱水溶液的pH。本发明还涉及一种通过上述制造方法来制造的产物。

背景技术

[0002] 关于细胞的培养,为了增加具有有用性质的细胞,以用于使细胞生产产物等为目的而进行。例如,在专利文献1中记载有一种哺乳动物细胞培养过程期间的含有免疫球蛋白的Fc区的重组蛋白质的高甘露糖糖型含量的调节方法,其包括如下步骤:在生物反应器中的无血清培养基中,确立表达重组蛋白质的哺乳动物细胞培养;在产生阶段期间,维持哺乳动物细胞;及使细胞培养与莫能菌素接触。

[0003] 并且,在专利文献2中记载有一种包括使用pH设定点控制pH的步骤的用于培养哺乳动物细胞的流加方法,其包括:第一培养阶段,包括将哺乳动物细胞在第一pH下播种到培养培养基中,并在第一pH下培养细胞的步骤,并且pH设定点维持在第一pH;及第二培养阶段,包括在高于第一pH的第二pH下培养细胞的步骤,并且设定点维持在第二pH,第二pH比第一pH高至少0.1pH单位,第二培养阶段具有至少6小时的持续期间。

[0004] 而且,在专利文献3中记载有一种用于培养永生化人血细胞(优选为起源于骨髓性白血病的细胞或源自其的细胞的悬浮物)的方法,其提供高生产率、高细胞存活率及增殖速度以及高批次之间的一致性,并且能够在不改变这些参数的情况下扩大生产规模。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:日本特表2016-534732号公报

[0008] 专利文献2:日本特表2021-503916号公报

[0009] 专利文献3:日本特表2014-500032号公报

发明内容

[0010] 发明要解决的技术课题

[0011] 在灌流培养中通常使用的ATF(Alternating tangential flow filtration:交替切向流过滤)方式由于液体从膜的2次侧向1次侧逆流的逆清洗效果,与TFF(Tangential flow filtration:切向流过滤)方式相比,不易发生膜堵塞。然而,随着提高生产率的开发的推进,细胞密度的高密度化也在推进,即使在ATF方式中,膜堵塞也成为课题。用于抑制膜堵塞的通常的对策是增大膜面积,但存在市售的膜的面积小及装置大型化的问题。

[0012] 本发明要解决的课题在于提供一种在通过细胞培养制造产物的方法中能够抑制膜堵塞的方法。而且,本发明要解决的课题还在于提供一种通过上述方法制造的产物。

[0013] 用于解决技术课题的手段

[0014] 本发明人等为了解决上述课题而进行了深入研究的结果,发现通过控制用于pH控制的碱水溶液的pH及添加速度,能够抑制膜堵塞,从而完成了本发明。

[0015] 即,根据本发明,提供以下发明。

[0016] <1>一种产物的制造方法,其包括培养细胞的步骤,其中,

[0017] 产物的生产时的细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上且 300×10^6 cells/mL的灌流培养,灌流培养的期间为13天以上且500天以下,

[0018] 在上述灌流培养的期间中的至少1天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X [mol/L/day]被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内,所添加的碱水溶液的pH为 $7 < \text{pH} < 13$ 。

[0019] <2>根据<1>所述的产物的制造方法,其中,

[0020] 上述灌流培养中的细胞密度为 100×10^6 cells/mL以上且 300×10^6 cells/mL以下。

[0021] <3>根据<1>或<2>所述的产物的制造方法,其中,

[0022] 上述灌流培养的期间为18天以上且500天以下。

[0023] <4>根据<1>至<3>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0024] 用于生产产物的培养期间为5天以上且450天以下。

[0025] <5>根据<1>至<4>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0026] 在上述灌流培养的期间中的至少13天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X [mol/L/day]被控制在 $0 \leq X < 0.008$ 的范围内。

[0027] <6>根据<1>至<5>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0028] 在所述灌流培养的期间中的至少13天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X [mol/L/day]为0。

[0029] <7>根据<1>至<6>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0030] 在上述灌流培养的期间中的50%以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X [mol/L/day]被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内。

[0031] <8>根据<1>至<7>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0032] 上述灌流培养中的细胞培养液的连续分离方法为膜过滤。

[0033] <9>根据<1>至<8>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0034] 上述膜过滤为被称为ATF的交替切向流过滤。

[0035] <10>根据<8>或<9>所述的产物的制造方法,其中,

[0036] 作为过滤时的通量(flux)的Y[L/m²/hour]为 $0 < Y \leq 10$ 。

[0037] <11>根据<1>至<10>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0038] 上述培养中的培养液的平均pH为6.7~7.2。

[0039] <12>根据<1>至<11>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0040] 上述培养中的培养液的最低pH为6.6以上。

[0041] <13>根据<1>至<12>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0042] 通过一边在线测定培养液中的pH,一边自动添加碱水溶液来控制上述培养中的培养液的pH。

[0043] <14>根据<1>至<13>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0044] 在上述灌流培养中,在达到细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上的目标细胞密度之后,通过取出包含细胞的培养液,将细胞密度维持在上述目标细胞密度 $\pm 40\%$ 以内,在细胞密度维持在上述目标细胞密度 $\pm 40\%$ 以内的期间,回收产物。

[0045] <15>根据<1>至<13>中任一项所述的产物的制造方法,其包括如下步骤:

[0046] 在上述灌流培养中,在达到细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上的目标细胞密度之后,通过每1天取出至少1次以上包含细胞的培养液,将细胞密度调整在上述目标细胞密度 $\pm 10\%$ 以内。

[0047] <16>根据<1>至<15>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0048] 上述细胞密度维持在 80×10^6 cells/mL以上的期间的溶解 CO_2 浓度为60~180mmHg。

[0049] <17>根据<1>至<16>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0050] 上述碱为 NaHCO_3 和/或 Na_2CO_3 。

[0051] <18>根据<1>至<17>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0052] 上述碱为 NaHCO_3 。

[0053] <19>根据<1>至<18>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0054] 上述碱水溶液的浓度Z[mol/L]为 $0 < Z < 5$ 。

[0055] <20>根据<1>至<19>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0056] 在灌流培养中所添加的培养基的pH为7.0~8.0。

[0057] <21>根据<1>至<20>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0058] 在不添加碱而进行培养的情况下,当培养液的pH下降时,通过供给追加了碱的培养基来控制培养液的pH。

[0059] <22>根据<1>至<21>中任一项所述的产物的制造方法,其包括如下步骤:

[0060] 当培养液的pH低于6.85时,供给追加了 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0$ mol/L的碱的培养基。

[0061] <23>根据<1>至<22>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0062] 在上述灌流培养中添加含有聚二甲基硅氧烷的消泡剂,

[0063] 作为上述碱添加速度的X[mol/L/day]和作为上述聚二甲基硅氧烷添加速度的B[g/L/day]满足 $B < -0.79X + 0.0228$ 。

[0064] <24>根据<1>至<23>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0065] 在上述灌流培养的整个期间中,不进行碱添加。

[0066] <25>根据<1>至<24>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0067] 上述细胞为动物细胞。

[0068] <26>根据<1>至<25>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0069] 上述细胞为CHO细胞。

[0070] <27>根据<1>至<26>中任一项所述的产物的制造方法,其中,

[0071] 上述产物为抗体。

[0072] <28>一种产物,其通过<1>至<27>中任一项所述的产物的制造方法来制造。

[0073] 发明效果

[0074] 根据本发明,能够抑制灌流培养中的膜堵塞。

附图说明

[0075] 图1表示细胞培养装置。图1所示的装置整体为细胞培养装置。

[0076] 图2表示碱添加速度与从培养开始到膜堵塞为止的天数之间的关系。

[0077] 图3表示碱添加速度与微粒密度之间的关系。

[0078] 图4表示碱添加速度与LDH之间的关系。

[0079] 图5表示碱添加速度、聚二甲基硅氧烷添加速度及从培养开始到膜堵塞为止的天数之间的关系。

具体实施方式

[0080] 以下,对本发明的内容进行详细说明。在本说明书中,使用“~”表示的数值范围是指包括“~”的前后所记载的数值分别作为最小值及最大值的范围。

[0081] 本发明涉及一种产物的制造方法,其包括培养细胞的步骤,其中,

[0082] 产物的生产时的细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上且 300×10^6 cells/mL以下的灌流培养,灌流培养的期间为13天以上且500天以下,

[0083] 在上述灌流培养的期间中的至少1天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的X [mol/L/day]被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内,所添加的碱水溶液的pH为 $7 < \text{pH} < 13$ 。

[0084] 根据本发明,能够抑制灌流培养中的膜堵塞。根据本发明,尤其在使用ATF/TFF等膜的灌流培养中能够提高生产率。

[0085] 在此,每1天的碱添加是指,在培养液中作为碱水溶液而与培养基不同地直接添加的碱添加,即使在灌流培养时在添加到培养槽中的培养基中假设含有碱,也不属于此处所述的碱添加。并且,在本说明书中,当没有添加到培养基等的记载时,碱添加是指直接添加到培养液中。

[0086] 在本发明中,产物的生产时的细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上,优选为 $80 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mL,进一步优选为 $90 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mL,进一步优选为 $100 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mL,进一步优选为 $110 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mL,进一步优选为 $120 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mL。有时标记成M来代替 10^6 。尤其,通过将细胞密度设为 $120 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mL,膜堵塞变得明显,从而能够显著地获得本发明的效果。

[0087] 优选为,在本发明中,在后述的灌流培养中,在达到细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上的目标细胞密度之后,通过取出包含细胞的培养液,将细胞密度维持在上述目标细胞密度 $\pm 40\%$ 以内,从而能够在细胞密度维持在上述目标细胞密度 $\pm 40\%$ 以内的期间,回收产物。

[0088] 优选为,在上述灌流培养中,在细胞密度达到 80×10^6 cells/mL以上的目标细胞密度之后,通过取出每1天至少1次以上包含细胞的培养液,能够将细胞密度调整在上述目标细胞密度 $\pm 10\%$ 以内。

[0089] 在本发明中,培养细胞的方法的方式为灌流培养。灌流培养是向细胞培养液中供给新鲜的培养基并去除培养细胞的培养基的一部分的培养方法。通过进行该灌流培养,能够从培养槽中去除从细胞排出的废物。作为灌流培养,能够一边向培养槽中连续供给培养基,一边回收连续分离了培养液内的细胞的液体。

[0090] 根据灌流培养,通常能够实现高活细胞密度。典型的灌流培养以持续1天或2天的分批培养开始,之后,向培养物连续、阶段性和/或间歇地添加新鲜的供给培养基,并同时去除使用过的培养基。在灌流培养中,也能够使用沉淀、离心分离或过滤等方法分离细胞,在维持活细胞密度的同时去除使用过的培养基。灌流培养的优点在于,与分批培养法或补料分批培养相比,生产目标蛋白质的培养可维持更长期间。

[0091] 灌流可以为连续的、阶段性的、间歇的或它们的组合中的任意方式。优选为连续的

方式。动物细胞被保持于培养物中,且被去除的使用过的培养基实质上不包含细胞或者可以具有远远少于培养物的细胞。通过选择膜孔径,能够将通过细胞培养表达的产物保持或回收于培养物中。

[0092] 灌流培养中的细胞培养液的连续分离方法优选为膜过滤,更优选为交替切向流过滤(Alternating Tangential Flow Filtration:ATF)。

[0093] 作为过滤时的通量的 $Y[L/m^2/hour]$ 优选为 $0 < Y \leq 10$,更优选为 $0 < Y \leq 5$,进一步优选为 $0 < Y \leq 2$ 。

[0094] 过滤时的通量是指每单位时间、单位过滤面积透过膜的培养液量,由以下式定义。

[0095] [数式1]

通过过滤膜的流量[L/hour]

$$[0096] \quad \text{过滤时的通量}[L/m^2/hour] = \frac{\text{通过过滤膜的流量}[L/hour]}{\text{过滤膜的面积}[m^2]}$$

[0097] 灌流比并无特别限定,但通常为 $0.3vvd \sim 5.0vvd$,优选为 $0.5vvd \sim 2.0vvd$,更优选为 $0.5vvd \sim 1.4vvd$ 。 vvd 是指每1天的细胞培养液体积的细胞培养液更换为新鲜培养基的量,即为供给培养基的volume/培养液的volume/Day。

[0098] 关于用于从培养液中取出产物的方法,能够用泵从过滤膜的2次侧抽出,但也可以使用能够利用的其他送液装置。所提取的培养液例如进行产物的回收、死细胞的去除等处理。并且,所提取的培养液在产物的回收、死细胞的去除等处理后,可以废弃一部分,也可以返回到培养容器。当通过上述处理而培养液发生损失时,例如能够通过向培养容器供给新鲜培养基来补偿。

[0099] 在灌流培养中,在细胞密度达到 $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上的目标细胞密度之后,通过取出每1天至少1次以上包含细胞的培养液,能够将细胞密度调整在上述目标细胞密度 $\pm 10\%$ 以内。

[0100] 为了不使该培养中的活细胞密度过度,通过将培养液的一部分连同细胞一起提取来减少活细胞密度的方法被称为细胞扩散(cell bleeding)(细胞扩散(cell bleed)),通过添加与提取的培养液相同量的新鲜培养基,能够维持培养液量。1天1次以上也包括连续自动进行细胞扩散的情况。

[0101] 灌流培养的期间(该期间为开始灌流起的培养期间,且为也包括细胞成为高密度之前的期间的期间。)并无特别限定,通常为1天以上且1000天以下,优选为7天以上且1000天以下,更优选为18天以上且500天以下,进一步优选为25天以上且200天以下,进一步优选为30天以上且100天以下。将播种作为第0天,灌流可以从2天后开始。

[0102] 用于生产细胞密度为 $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上的产物的培养期间优选为5天以上且990天以下,也可以为5天以上且450天以下,更优选为10天以上且450天以下,进一步优选为15天以上且190天以下,进一步优选为20天以上且90天以下。

[0103] 在本发明中,在灌流培养的期间中的至少13天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的 $X[mol/L/day]$ 被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内,优选被控制在 $0 \leq X < 0.015$ 的范围内,更优选在 $0 \leq X < 0.0127$,更优选被控制在 $0 \leq X < 0.008$ 的范围内。

[0104] 在本发明中,在灌流培养的期间中的至少13天以上的期间内,作为每1天的碱添加速度的 $X[mol/L/day]$ 可以为0。 X 为0的情况是指,不进行来自于与培养基供给不同的管线的

碱添加。

[0105] 在本发明中,优选为,灌流培养期间中的50%以上(优选为70%以上,更优选为80%以上,进一步优选为90%以上,最优选为100%)的期间内,作为每1天的碱添加速度的 X [mol/L/day]被控制在 $0 \leq X < 0.029$ 的范围内。

[0106] 作为碱,并无特别限定,但优选为 Na_2CO_3 、 NaOH 或 NaHCO_3 ,更优选为 NaHCO_3 和/或 Na_2CO_3 ,尤其优选为 NaHCO_3 。碱能够作为水溶液(例如, Na_2CO_3 水溶液、 NaOH 水溶液或 NaHCO_3 水溶液)添加。

[0107] 当将 Na_2CO_3 或 NaHCO_3 分别添加到细胞培养液中时,添加了 NaHCO_3 的细胞培养液的粘度具有降低的倾向。即,可以说 NaHCO_3 相较于 Na_2CO_3 ,使培养液凝胶化的作用较弱,容易抑制膜堵塞,因此尤其优选使用 NaHCO_3 。

[0108] 碱添加开始时期为从培养开始7天以后,优选为6天以后,进一步优选为5天以后。

[0109] 所添加的碱水溶液的pH为 $7 < \text{pH} < 13$,优选为 $7.5 < \text{pH} < 12$,更优选为 $7.5 < \text{pH} < 10$,进一步优选为 $8 < \text{pH} < 10$ 。

[0110] 关于碱水溶液的pH测定,在碱溶解于水中的时刻进行测定。关于pH的测定,能够用通常市售的pH传感器来测定。例如,有Mettler TOLEDO公司的pH计(Seven Excellence、Seven Direct、Five Easy)。

[0111] 所添加的碱水溶液的浓度 Z [mol/L] 优选为 $0 < Z < 5$,更优选为 $0 < Z < 3$,进一步优选为 $0 < Z < 2$ 。

[0112] 在灌流培养的整个期间,也能够完全不添加碱而进行培养。然而,有时不添加碱会导致培养液pH降低,从而使产物的品质变差(表3)。在这种情况下,需要一种在维持产物的品质的同时不会促进膜堵塞的方法。

[0113] 当培养液pH低于某一值 M 时,通过在培养基中追加 N [mol/L]的碱,能够抑制膜堵塞且改善抗体品质。即,在不添加碱而进行培养的情况下,当培养液的pH下降时,通过供给追加了碱的培养基,能够控制培养液的pH。 N 的分母为调液后的培养基体积。此时,对增加了碱的培养基重新进行调液,使用热焊机,将装有旧培养基(向培养槽供给中的培养基)的容器和与培养槽连接的软管与装有新培养基的容器无菌地转接并开始供给。或者,也可以在装有与培养槽连接的培养基的容器中无菌地追加碱。培养液pH的某一值 M 为6.85,优选为6.80,进一步优选为6.75。

[0114] 作为追加到培养基中的碱的量的 N [mol/L] 为 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \text{ mol/L}$,优选为 $2.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \text{ mol/L}$,进一步优选为 $1.0 \times 10^{-2} \sim 2.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ 。此处的追加到培养基中的碱是指在供给到培养槽之前追加到培养基中的碱,而不是直接添加到培养液中的碱。作为一例,当培养液的pH低于6.85时,能够供给追加了 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \text{ mol/L}$ 的碱的培养基。

[0115] 如此,在不直接向培养液中添加碱而进行培养的情况下,当培养液的pH下降时,通过供给提高了pH的培养基,能够控制培养液的pH。可以预先准备提高了该pH的培养基,也可以在观察到培养液的pH发生了变化时开始准备。在pH开始低于 M 的24小时以内,能够将供给培养基切换为提高了pH的培养基来进行灌流培养。优选为12小时以内,更优选为6小时以内,进一步优选为3小时以内,进一步优选为1小时以内,进一步优选为30分钟以内,进一步优选为5分钟以内。

[0116] 相对于培养液量,调液量优选为0.5~10倍量。作为追加到培养基中的碱,并无特

别限定,但优选为 Na_2CO_3 、 NaOH 或 NaHCO_3 ,更优选为 NaHCO_3 和/或 Na_2CO_3 ,尤其优选为 NaHCO_3 。

[0117] 在灌流培养中所添加的培养基的pH优选为7.0~8.0,更优选为7.0~7.8,进一步优选为7.0~7.6。

[0118] 关于培养基的pH,在5% CO_2 且37℃孵化下保管1天之后,能够用通常市售的pH传感器来测定。例如,有Mettler TOLED0公司的pH计(Seven Excellence、Seven Direct、Five Easy)。

[0119] 优选为,培养中的培养液的平均pH为6.7~7.2,更优选为6.8~7.0。

[0120] 优选为,培养中的培养液的最低pH为6.6以上,更优选为6.7以上,进一步优选为6.8以上。

[0121] 优选为,培养中的培养液的pH能够通过一边在线测定培养液中的pH,一边自动添加碱水溶液来控制。

[0122] 优选为,在灌流培养中能够添加消泡剂。作为消泡剂的消泡成分,优选为硅酮系,尤其优选为聚二甲基硅氧烷。作为消泡剂的消泡成分,优选包含聚二甲基硅氧烷,更优选在聚二甲基硅氧烷中包含微粉末二氧化硅。作为消泡剂,例如能够使用Cytiva公司制造的HyClone ADCF Antifoam Agent。进一步优选为,作为碱添加速度的 $X[\text{mol/L/day}]$ 和作为每1天的聚二甲基硅氧烷添加速度的 $B[\text{g/L/day}]$ 优选满足 $B < -0.79X + 0.0228$ 。此时,B不会成为负值。因此,成为 $X \leq 0.0288$ 。

[0123] B的分母为培养槽、ATF中所包含的培养液的体积。

[0124] 通过满足该关系,能够更有效地抑制膜堵塞。

[0125] 将本发明中的能够用于细胞的培养的细胞培养装置的一例示于图1中。在图1中,培养容器14是容纳包含细胞的培养液的容器。在培养容器14的内部的培养液中培养细胞。

[0126] 培养基从培养基供给配管1供给到培养容器。

[0127] 用于抑制发泡的消泡剂从消泡剂供给配管2供给到培养容器。

[0128] 碱从碱供给配管3供给到培养容器。在不添加碱的情况下,可以没有碱供给配管3。

[0129] 二氧化碳(CO_2)及空气从送气管4导入到培养容器的内部的培养液的上部。

[0130] 从喷射器送气配管5送入氧(O_2)和/或空气,氧和/或空气经由孔径 $20\mu\text{m}$ 的喷射器15导入到培养液中。通过喷射器15,能够调节培养液内的溶解氧浓度。作为喷射器,并无特别限定,例如,能够使用气体释放部的平均孔径为 $1\mu\text{m}$ 以上且 $300\mu\text{m}$ 以下(作为一例,孔径为 $20\mu\text{m}$)且释放含有30体积%以上的氧的气体的喷射器。

[0131] 排气管6为用于排气的管,其末端可以连接有排气过滤器(图中未示出)。

[0132] 采样管7是用于采集(采样)培养液或提取培养液(细胞扩散)的管。在自动连续进行细胞扩散的情况下,可以另外设置配管(未图示)。

[0133] pH传感器8以与培养液接触的方式安装。

[0134] 溶解氧传感器9以与培养液接触的方式安装。

[0135] 在细胞培养装置中能够设置压力传感器10、11及13。

[0136] 在细胞培养装置中设置有中空纤维膜12。

[0137] 在培养容器14的内部可以设置有具有搅拌叶片16的搅拌部件。通过使搅拌叶片16旋转来搅拌培养容器14的内部的培养液,从而保持培养液的均匀性。通过利用搅拌叶片16搅拌培养液,利用喷射器释放的气泡也被搅拌。具有搅拌叶片的搅拌部件的位置、搅拌叶片

的尺寸等并无特别限定,只要根据所使用的细胞种类、培养液的量、供给的氧的量、喷射器的位置、数量、尺寸等进行设计即可。并且,为了快速地搅拌从喷射器排出的气泡,且抑制气泡的合并,优选在距离喷射器近的位置配置搅拌叶片16。

[0138] 在本发明中,也可以使从培养容器提取的细胞悬浮液通过分离膜,分离成细胞含有液和透过液。该操作能够使用细胞培养装置来进行。在该操作中,将从培养容器中提取的细胞悬浮液分离成具有比上述细胞悬浮液高的细胞浓度的细胞含有液和具有比上述细胞悬浮液低的细胞浓度的透过液。细胞浓度能够通过Beckman Coulter制造的生死细胞分析仪Vi-CELL XR来测定。

[0139] 上述膜分离处理工序优选为切向过滤,更优选为Alternating tangential flow (ATF) filtration和Tangential flow filtration,最优选为Alternating tangential flow filtration。作为能够进行Alternating tangential flow filtration的过滤器,有Repligen公司制造的SuATF10-S02PES和F2 RF02PES等。

[0140] 作为细胞培养中所使用的培养基,能够使用在通常的动物细胞的培养中使用的培养基。例如,能够使用CD OptiCHO (ThermoFisher公司制造)、Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)、Eagle最低必须培养基(MEM)、RPMI-1640培养基、RPMI-1641培养基、F-12K培养基、Ham F12培养基、Iscob改良Dulbecco培养基(IMDM)、McCoy5A培养基、Leibovitz L-15培养基及EX-CELL (商标) 300系列(JRH Biosciences公司)、CHO-S-SFMII (Invitrogen公司)、CHO-SF (Sigma-Aldrich公司)、CD-CHO (Invitrogen公司)、IS CHO-V (Irvine Scientific公司)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich公司)等。或者,可以使用自制培养基。

[0141] 培养基中可以添加胎牛血清(FCS)等血清,也可以不添加血清。培养基中可以补充氨基酸、盐、糖类、维生素、激素、生长因子、缓冲液、抗生素、脂质、微量元素、植物蛋白质的水解物等追加成分。也能够使用不含蛋白质的培养基。

[0142] 培养温度一般为30℃~40℃,优选为32℃~39℃,更优选为36℃~38℃,并且可以在培养过程中改变培养温度。

[0143] 培养能够在CO₂浓度为0~40体积%,优选为2~25体积%,进一步优选为3~20体积%的气氛下进行。

[0144] 培养液的量优选为0.5L以上,更优选为50L以上,进一步优选为200L以上。

[0145] 在培养中,根据需要能够添加培养基的更换、通气、搅拌。在进行培养液的搅拌时,搅拌转速并无特别限定,但每单位体积的搅拌功率通常为10~300kW/m³,优选为20~200kW/m³,更优选为30~100kW/m³。

[0146] 培养液中的溶解氧浓度能够适当设定,并无特别限定,但通常为10~100%,优选为30~90%。

[0147] 并且,细胞密度维持在80×10⁶cells/mL以上的期间的溶解CO₂浓度优选为60~180mmHg,更优选为80~160mmHg,进一步优选为100~140mmHg。

[0148] 细胞培养能够使用具有本说明书中上述的结构的细胞培养装置来进行。作为细胞培养装置,可以是发酵槽型罐培养装置、气升型培养装置、培养瓶型培养装置、搅拌瓶型培养装置、微载体型培养装置、流化床型培养装置、中空纤维型培养装置、转瓶型培养装置、或填充槽型培养装置等中的任一个。从培养环境的均匀化等观点出发,培养容器优选为一次性培养槽。

[0149] 用于生产细胞密度为 80×10^6 cells/mL以上的产物的培养液的粘度优选为 $1.2\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上且小于 $15\text{mPa} \cdot \text{s}$,更优选为 $1.4\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上且小于 $12\text{mPa} \cdot \text{s}$,进一步优选为 $1.6\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上且小于 $10\text{mPa} \cdot \text{s}$,尤其优选为 $1.6\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上且小于 $5\text{mPa} \cdot \text{s}$,最优选为 $1.6\text{mPa} \cdot \text{s}$ 以上且小于 $3\text{mPa} \cdot \text{s}$ 。

[0150] 本发明中的细胞的种类并无特别限定,可以举出动物细胞、植物细胞、酵母等真核细胞、枯草芽孢杆菌等原核细胞及大肠杆菌等。细胞优选为动物细胞(更优选为哺乳动物细胞)、或昆虫细胞,最优选为哺乳动物细胞。作为细胞,可以是原代细胞,也可以是株化细胞。

[0151] 作为细胞,能够举出中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HEK细胞(源自Human Embryonic Kidney的细胞)、BHK细胞、293细胞、C127细胞、骨髓瘤细胞(NS0细胞等)、PerC6细胞、SP2/0细胞、杂交瘤细胞、COS细胞(源自非洲绿猴肾的细胞)、3T3细胞、HeLa细胞、Vero细胞(非洲绿猴肾上皮细胞)、MDCK细胞(源自犬肾小管上皮细胞的细胞)、PC12细胞、WI38细胞等。细胞可以为胚胎干细胞(ES细胞)或人工多能干细胞(iPS细胞)等干细胞。其中,优选为CHO细胞、HEK细胞、BHK细胞、杂交瘤,更优选为CHO细胞、HEK细胞,最优选为CHO细胞。CHO细胞被广泛用于产生重组蛋白质,例如细胞因子、凝血因子及抗体。优选使用缺失了二氢叶酸还原酶(DHFR)的CHO细胞,作为DHFR缺陷型CHO细胞,例如能够使用CHO-DG44。

[0152] 作为细胞的生存率,优选高,优选为85%以上,更优选为90%以上,尤其优选为95%以上,最优选为99%以上。

[0153] 这些细胞可以是导入了编码想要表达的蛋白质(例如为抗体等)的外来基因的细胞。作为细胞,优选为产生抗体的细胞。能够使用表达载体,以将编码想要表达的蛋白质的外来基因导入到细胞中。通过将包含编码想要表达的蛋白质的DNA、表达调节序列(例如,增强子、启动子和终止子等)及根据需要的选择标记基因的表达载体导入细胞中,能够制作导入了编码想要表达的蛋白质的外来基因的细胞。作为表达载体并无特别限定,能够根据细胞的种类、用途等来适当地选择。

[0154] 作为启动子,只要是能够在哺乳动物细胞中发挥功能的启动子,都能够使用。例如,能够举出巨细胞病毒(CMV)的IE(immediate early)基因的启动子、SV40的早期启动子、逆转录病毒的启动子、金属硫蛋白启动子、热休克启动子、SR α 启动子、莫洛尼小鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus)的启动子及增强子等。并且,可以将人CMV的IE基因的增强子与启动子一同使用。

[0155] 作为选择标记基因,例如,能够使用耐药基因(新霉素抗性基因、二氢叶酸还原酶(DHFR)基因、嘌呤霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、潮霉素抗性基因、放线菌酮抗性基因等)或荧光基因(编码绿色荧光蛋白GFP等的基因)等。

[0156] 将表达载体导入细胞的方法并无特别限定,例如能够使用磷酸钙法、电穿孔法、脂质体法、基因枪法及脂质体转染法等。

[0157] 基于本发明的产物的制造方法包括使用细胞培养装置培养细胞并从上述细胞生产物的步骤。

[0158] 根据本发明,提供一种通过基于本发明的产物的制造方法来制造的产物。

[0159] 在本发明中,产物的种类并无特别限定,但优选为蛋白质,更优选为重组蛋白质。作为产物,例如可以举出重组多肽链、重组分泌多肽链、抗原结合蛋白、抗体(例如人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、小鼠抗体、双特异性抗体等)、Fc融合蛋白、片段化免疫球蛋白、单链

抗体(scFv)。并且,此外也可以是腺病毒、腺伴随病毒、慢病毒等。

[0160] 产物优选为抗体,更优选为人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或小鼠抗体。作为片段化免疫球蛋白,可以举出Fab、F(ab')₂、Fv等。抗体的种类也不受特别限定,可以为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等IgG、IgA、IgD、IgE、IgM等任一类,但用作医药时,优选IgG及IgM。

[0161] 人抗体包括具有衍生自人免疫球蛋白序列的一个或多个可变及恒定区的所有抗体。在一实施方式中,可变结构域及恒定结构域全部都衍生自人免疫球蛋白序列(完全人抗体)。

[0162] 人源化抗体具有与通过一个或多个氨基酸取代、缺失、和/或添加衍生自非人物种的抗体的序列不同的序列,以在给药于人对象时,与非人物种抗体相比,人源化抗体诱发免疫应答的可能性降低和/或严重免疫应答的诱发变少。在一例中,非人物种抗体的重链和/或轻链的骨架结构域及恒定结构域内的某一特定的氨基酸发生突变以产生人源化抗体。在另一例中,来自人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域融合。

[0163] 嵌合抗体是指连接来源互不相同的可变区与恒定区的抗体。例如,由小鼠抗体的重链及轻链的可变区和人抗体的重链及轻链的恒定区组成的抗体为小鼠/人异源嵌合抗体。通过将编码小鼠抗体的可变区的DNA与编码人抗体的恒定区的DNA连接并将其编入表达载体中,能够制作表达嵌合抗体的重组载体。通过培养由上述载体转化的重组细胞并使其表达所编入的DNA,从而能够获取在培养中生产的嵌合抗体。

[0164] 双特异性抗体是识别两种不同抗原特异性的抗体。存在各种形式的双特异性抗体。作为制作双特异性抗体的方法,报道有如下:使用N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯或S-乙酰巯基琥珀酸酐等交联剂将两个免疫球蛋白分子结合而制作的方法、将免疫球蛋白分子的Fab片段彼此结合而制作的方法等。另外,也能够通过将编码双特异性抗体的基因导入细胞中而使其表达。

[0165] Fc融合蛋白表示具有Fc区的蛋白质,包括抗体。

[0166] Fab为具有VL、VH、CL及CH1结构域的单价片段。

[0167] F(ab')₂为具有在铰链区通过二硫醚交联结合的两个Fab片段的二价片段。

[0168] Fv片段具有抗体的单臂的VL及VH结构域。

[0169] 单链抗体(scFv)为VL及VH区经由接头(linker)(例如,氨基酸残基的合成序列)接合而形成连续的蛋白链的抗体,在此,接头具有足以使蛋白链在其自身上折回而形成单价抗原结合部位的长度。

[0170] 作为抗体并无特别限定,例如可举出抗IL-6受体抗体、抗IL-6抗体、抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗GPIIb/IIIa抗体、抗TNF抗体、抗CD25抗体、抗EGFR抗体、抗Her2/neu抗体、抗RSV抗体、抗CD33抗体、抗CD52抗体、抗IgE抗体、抗CD11a抗体、抗VEGF抗体及抗VLA4抗体等。

[0171] 产物的回收可以仅回收培养液,例如,也可以使用过滤器或离心分离机,回收从培养液中除去了至少一部分细胞的液体,可以无特别限制地使用公知的方法。提高产物的纯度,或者改变溶剂,例如欲改变形成为粉末状等方式时,能够对培养液或上述液体进行进一步处理。

[0172] 并且,还能够灌装的同时回收培养液的一部分或灌装的同时对灌装中的培养液的一部分使用过滤器或离心分离机从培养液回收除去了细胞的至少一部分的液体。

[0173] 产物能够通过纯化处理进行纯化。所得到的产物能够纯化至高纯度。产物的分离及纯化使用在通常的蛋白质中使用的分离及纯化方法即可。例如,能够通过适当地选择及组合亲和色谱等色谱柱、过滤器、超滤、盐析、透析、十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳等电聚焦电泳等来分离及纯化产物,但不限于于这些。上述中所得到的产物的浓度测定能够通过吸光度测定或酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等来进行。并且,当产物为抗体时,抗体的力价(Titer)也能够利用Roche公司的Cedex Bio等市售的分析设备来测定。

[0174] 作为用于亲和色谱中的柱,可以举出蛋白A柱、蛋白G柱。作为除亲和色谱以外的色谱,例如可以举出离子交换色谱、疏水性色谱、凝胶过滤、反相色谱、吸附色谱等。这些色谱能够使用HPLC(high performance liquid chromatography:高效液相色谱)或FPLC(fast protein liquid chromatography:快速蛋白液相色谱)等液相色谱来进行。

[0175] 另外,通过在纯化之前或纯化之后使适当的多肽修饰酶作用于产物,还能够修饰产物或者局部地去除肽。作为多肽修饰酶,例如使用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、赖氨酰肽链内切酶、蛋白激酶、葡萄糖苷酶等。

[0176] 通过本发明制造的产物能够用于例如生物医药品及再生医疗等。

[0177] 利用以下实施例对本发明进行进一步具体的说明,但本发明不受实施例的限定。

[0178] 实施例

[0179] <抗体产生细胞的建立>

[0180] 构建包含编码IgG1及IgG4的核酸序列的载体,通过将所构建的载体导入CHO-DG44细胞中来制作出表达IgG1的CHO-DG44细胞(IgG1细胞)和表达IgG4的CHO-DG44细胞(IgG4细胞)。遵照日本特表2016-517691号公报的实施例2进行了载体的构建及向细胞中的导入。如上所述,准备产生单克隆抗体的CHO细胞,并在以下实验中使用。

[0181] <细胞培养>

[0182] 实施例及比较例中,使用图1所示的细胞培养装置进行了实验。作为概要,通过灌流培养使产生抗体的CHO细胞增殖至 120×10^6 cells/mL,从达到 120×10^6 cells/mL的细胞密度的时刻开始细胞扩散,评价了中空纤维膜的堵塞天数等。详细内容如下。

[0183] 向2L玻璃培养槽(产品名称,ABLE公司制造)中投入了1L的培养基。培养基为CD OptiCHO(Thermo Fisher Scientific.K.K.制造),在该培养基中添加了0.9质量%的POLOXAMER(POLOXAMER-188)。

[0184] 在第0天,以 0.5×10^6 cells/mL播种了细胞。

[0185] 以搅拌转速150rpm、从上面为空气(Air) 38mL/分+CO₂2mL/分、从下面为培养液中的氧浓度成为80%的方式由设置于培养槽中的喷射器通过自动控制来供给O₂。

[0186] 读取培养槽中的pH,以使培养槽中的pH成为7.0,当pH低于7.0时,自动添加1.0mol/L NaHCO₃水溶液,并开始pH控制。

[0187] 在播种后第2天培养之后,以0.8vvd的灌流比连续供给培养基的同时,用Repligen公司制造的ATF2连续过滤细胞培养液并回收了回收液。

[0188] 进一步在第5天将灌流比变更为1.6vvd。

[0189] 而且,在第6天将消泡剂中的聚二甲基硅氧烷添加速度设为7.2mg/day/L。

[0190] 而且,到第7天培养液的pH下降,开始向培养液中自动添加碱水溶液。

[0191] 而且,在第9至11天,当细胞密度达到 120×10^6 cells/mL时,一边抽出一部分培养液,一边进行细胞扩散,以使细胞密度维持在 120×10^6 cells/mL。

[0192] 继续培养直至发生膜堵塞而ATF无法动作为止。

[0193] 按照下述表中所记载的方式变更所使用的培养基、聚二甲基硅氧烷添加速度、pH控制等而进行了多个实验。

[0194] <评价方法>

[0195] (1) 细胞密度、Viability(活力)的测定

[0196] 提取培养槽内的培养液,使用Beckman Coulter公司的Cell Viability Analyzer Vi-cell XR进行了测定。另外,Vi-cell软件使用Vi-cell XR2.04,测定时的参数如下设定。

[0197] Min diameter(最小直径): $6\mu\text{m}$ 、Max diameter(最大直径): $50\mu\text{m}$

[0198] Dilution(稀释):当细胞浓度为 10×10^6 cells/mL以下时,不对样品进行稀释而将Dilution设为1。

[0199] 当细胞浓度高于 10×10^6 cells/mL时,将样品稀释10倍而将Dilution设为10。Cell brightness(细胞亮度):75%,Cell sharpness(细胞清晰度):100

[0200] Viable cell spot brightness(活细胞斑点亮度):75%

[0201] Viable cell spot area(活细胞斑点面积):5%

[0202] Minimum circularity(最小圆度):0

[0203] Decluster degree(去簇度):中等

[0204] (2) pH、溶解 CO_2 的测定

[0205] 提取培养槽内的培养液,使用SIEMENS公司的RAPIDLab 348EX进行了测定。在生产期中,调整了送气配管的二氧化碳(CO_2)流量,以使溶解 CO_2 成为120mmHg。

[0206] (3) 微粒(碎片)密度的测定

[0207] 提取培养槽内的培养液,用Beckman Coulter公司的ISOTON稀释了10000倍。用Beckman Coulter公司的精密粒度分布测定装置Multisizer 4e对上述稀释培养液测定了1.46~ $20\mu\text{m}$ 的粒度分布。

[0208] (4) 乳酸脱氢酶(LDH)测定

[0209] 提取培养液,以300G/5分钟分离了细胞和上清液。利用Roche公司的Cedex Bio测定了上清液。

[0210] (5) 抗体品质的测定

[0211] 提取培养槽内的培养液,用Cytiva公司的Whatman(Pore Size $0.2\mu\text{m}$,25mm Diameter)过滤细胞。在pH6.0下平衡化的MabSelect Sure柱上负载上述培养上清液,并在pH3.2下洗脱抗体。

[0212] 关于抗体电荷的评价,用阳离子交换高速液相色谱法(HPLC)测定了上述抗体回收液。

[0213] 关于甘露糖5(M5)的评价,通过用肽-N-糖苷酶F对所获得的抗体回收液的抗体进行消化处理来切出N型糖链,并使用2-氨基苯甲酰胺进行了荧光标记。

[0214] 用C18(ODS)反相HPLC柱测定了上述处理后的抗体的M5。

[0215] (6) 评价的基准

[0216] 以下示出各评价的基准。

[0217] 膜堵塞的评价:

[0218] S:从培养开始到堵塞为止的天数为30天以上,从灌流开始到堵塞为止的天数为28天以上,从细胞扩散开始到堵塞为止的天数为20天以上的情况。

[0219] A:从培养开始到堵塞为止的天数为20~29天,从灌流开始到堵塞为止的天数为18~27天,从细胞扩散开始到堵塞为止的天数为10~19天的情况。

[0220] B:从培养开始到堵塞为止的天数为15~19天,从灌流开始到堵塞为止的天数为13~17天,从细胞扩散开始到堵塞为止的天数为5~9天的情况。

[0221] C:从培养开始到堵塞为止的天数为14天以下,从灌流开始到堵塞为止的天数为12天以下,从细胞扩散开始到堵塞为止的天数为4天以下的情况。

[0222] 抗体电荷的评价:

[0223] A:满足Acidic(酸性)峰的面积的比例 X 为 $14\% \leq X \leq 22\%$ 、Basic(碱性)峰的面积的比例 X 为 $11\% \leq X \leq 19\%$ 这两者。

[0224] B:符合Acidic峰的面积的比例 X 为 $10\% \leq X < 14\%$ 或 $22\% < X \leq 26\%$ 及Basic峰的面积的比例 X 为 $6\% \leq X < 11\%$ 或 $19\% < X \leq 23\%$ 中的任意一个以上。

[0225] C:符合Acidic峰的面积的比例 X 为 $X < 10\%$ 或 $26\% < X$ 及Basic峰的面积的比例 X 为 $X < 6\%$ 或 $23\% < X$ 中的任意一个以上。

[0226] 峰的面积的比例是指Acidic成分的色谱的峰面积或Basic成分的色谱的峰面积相对于所有色谱的峰面积的合计的比例。

[0227] 抗体M5的评价:

[0228] A:M5的峰面积的比例 X 为 $0\% \leq X \leq 5\%$

[0229] B:M5的峰面积的比例 X 为 $5\% < X \leq 6\%$

[0230] C:M5的峰面积的比例 X 为 $6\% < X$

[0231] 峰面积的比例是指M5(Mannose5:甘露糖5)成分的色谱的峰面积相对于所有色谱的峰面积的合计的比例。

[0232] <测定及评价的结果>

[0233] 将测定及评价的结果示于表2及表3中。

[0234] 如表3所示,在实施例5、10、11中,能够确认到所制造的抗体的品质良好。

[0235] 将实施例1~3、5及7~9中的碱添加速度与直至膜堵塞为止的天数之间的关系示于图2中。从图2的结果可知,通过降低碱添加速度,能够抑制膜堵塞。

[0236] 将实施例1~3、5及7~9中的碱添加速度与微粒密度之间的关系示于图3中。将微粒密度设为1~6 μm 的细胞密度的累计个数。微粒是源自细胞(14 μm)的残渣/碎片,是细胞损伤的指标。从图3的结果可知,通过降低碱添加速度,能够抑制细胞损伤。

[0237] 将实施例1~3、5及7~9中的碱添加速度与LDH之间的关系示于图4中。LDH是从受损细胞中泄漏的酶成分,通常用作细胞损伤的指标。从图4的结果可知,通过降低碱添加速度,能够抑制细胞损伤。

[0238] 并且,将实施例1~9、11及比较例1中的碱添加速度、消泡剂添加速度及直至膜堵塞为止的天数之间的关系示于图5中。可知消泡剂添加速度和碱添加速度越高,则越容易发生膜堵塞。作为碱添加速度的 X [$\mu\text{mol/L/day}$]和作为消泡剂即聚二甲基硅氧烷添加速度的 B [g/L/day]满足 $B < -0.79X + 0.0228$ 的区为膜堵塞的评价为S的区。

[0239]

[表 1]

| | 细胞密度 ×10 ⁶ cells/mL | 培养基 | | | | 碱 | | | NaHCO ₃ 合计 量 (mol/L/day) | |
|-------|-----------------------------------|-----|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----|-------------------------------------|-----------------------------------|---|-------------|
| | | pH | NaHCO ₃ 浓度 (mol/L) | 每 1 天培养基添 加量 (vvd) | NaHCO ₃ (mol/L day) | pH | NaHCO ₃ 浓度 (mol/L) | NaHCO ₃ (mol/L/day) | | |
| 实施例 1 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0 | 0.01488 | 0.028568028 |
| 实施例 2 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.012704727 | 0.01488 | 0.041272755 |
| 实施例 3 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.010335359 | 0.01488 | 0.038903387 |
| 实施例 4 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0 | 0.00504 | 0.028568028 |
| 实施例 5 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.006892854 | 0.012 | 0.035460882 |
| 实施例 6 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.012650178 | 0.0312 | 0.041218206 |
| 实施例 7 | 120 | 7.2 | 0.010201167 | 1.2 | 0.0122414 | 8.5 | 1 | 0.014804876 | 0.01488 | 0.027046276 |
| 实施例 8 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.007366625 | 0.012 | 0.035934652 |
| 实施例 9 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.00576506 | 0.00504 | 0.034333088 |
| 比较例 1 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 8.5 | 1 | 0.035 | 0.01488 | 0.063568028 |

[0240]

[表 2]

| | 膜堵塞 | | | | 平均 pH | 最小 pH | 微粒密度 (1-6µm 累计) (个/mL) | Viability (%) | LDH (U/L) |
|-------|----------------|----------------|---------------|----|-------|-------|------------------------|---------------|-----------|
| | 从培养开始到膜堵塞为止的天数 | 从灌流开始到膜堵塞为止的天数 | 从生产期到膜堵塞为止的天数 | 评价 | | | | | |
| 实施例 1 | 34 | 32 | 24 | S | 6.89 | 6.83 | 1.3E+08 | 95.9 | 1251.4 |
| 实施例 2 | 16 | 14 | 6 | B | 6.96 | 6.92 | 2.1E+08 | 95.4 | 3100.614 |
| 实施例 3 | 26 | 24 | 16 | A | 6.94 | 6.91 | 2.4E+08 | 95.3 | 3222.917 |
| 实施例 4 | 32 | 30 | 22 | A | 6.88 | 6.82 | - | - | - |
| 实施例 5 | 34 | 32 | 24 | S | 6.92 | 6.90 | 1.5E+08 | 96.2 | 1374.183 |
| 实施例 6 | 23 | 21 | 13 | A | 6.93 | 6.90 | - | - | - |
| 实施例 7 | 19 | 17 | 9 | B | 6.86 | 6.84 | 1.8E+08 | 92.4 | 5172.14 |
| 实施例 8 | 34 | 32 | 24 | S | 6.91 | 6.89 | 2.0E+08 | 95.4 | 1867.038 |
| 实施例 9 | 31 | 29 | 21 | A | 6.90 | 6.78 | 1.7E+08 | 95.7 | 1608.909 |
| 比较例 1 | 14 | 12 | 4 | C | 7.02 | 6.95 | - | - | - |

[0241]

[表 3]

| | 细胞密度 ×10 ⁶ cells/mL | 培养基 | | | | 培养液中的 pH | | 抗体的品质 | | | | | | | |
|--------|-----------------------------------|-----|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------|-------|-----------|-----------|-----|--------|-----|-------|------|------|
| | | pH | NaHCO ₃ 浓度 (mol/L) | 每 1 天培养基添 加量 (L/day/L- WV) | NaHCO ₃ mol/day | 平均 pH | 最小 pH | 电荷的评 价 | 糖链的评 价 | 电荷 | 糖链 | | | | |
| 实施例 10 | 120 | 7.2 | 0.010201167 | 1.2 | 0.0122414 | 6.75 | 6.70 | B | B | 11% | Acidic | 21% | Basic | M5 | 5.5% |
| 实施例 11 | 120 | 7.3 | 0.01700988 | 1.2 | 0.020411856 | 6.83 | 6.77 | A | A | 15% | A | 18% | A | 2.5% | |
| 实施例 5 | 120 | 7.4 | 0.02380669 | 1.2 | 0.028568028 | 6.92 | 6.90 | A | A | 14% | A | 17% | A | 1.5% | |

[0242] 符号说明

[0243] 1 培养基供给配管

| | | |
|--------|----|---------|
| [0244] | 2 | 消泡剂供给配管 |
| [0245] | 3 | 碱供给配管 |
| [0246] | 4 | 送气配管 |
| [0247] | 5 | 喷射器送气配管 |
| [0248] | 6 | 排气管 |
| [0249] | 7 | 采样管 |
| [0250] | 8 | pH传感器 |
| [0251] | 9 | 溶解氧传感器 |
| [0252] | 10 | 压力传感器 |
| [0253] | 11 | 压力传感器 |
| [0254] | 12 | 中空纤维膜 |
| [0255] | 13 | 压力传感器 |
| [0256] | 14 | 培养容器 |
| [0257] | 15 | 喷射器 |
| [0258] | 16 | 搅拌叶片 |

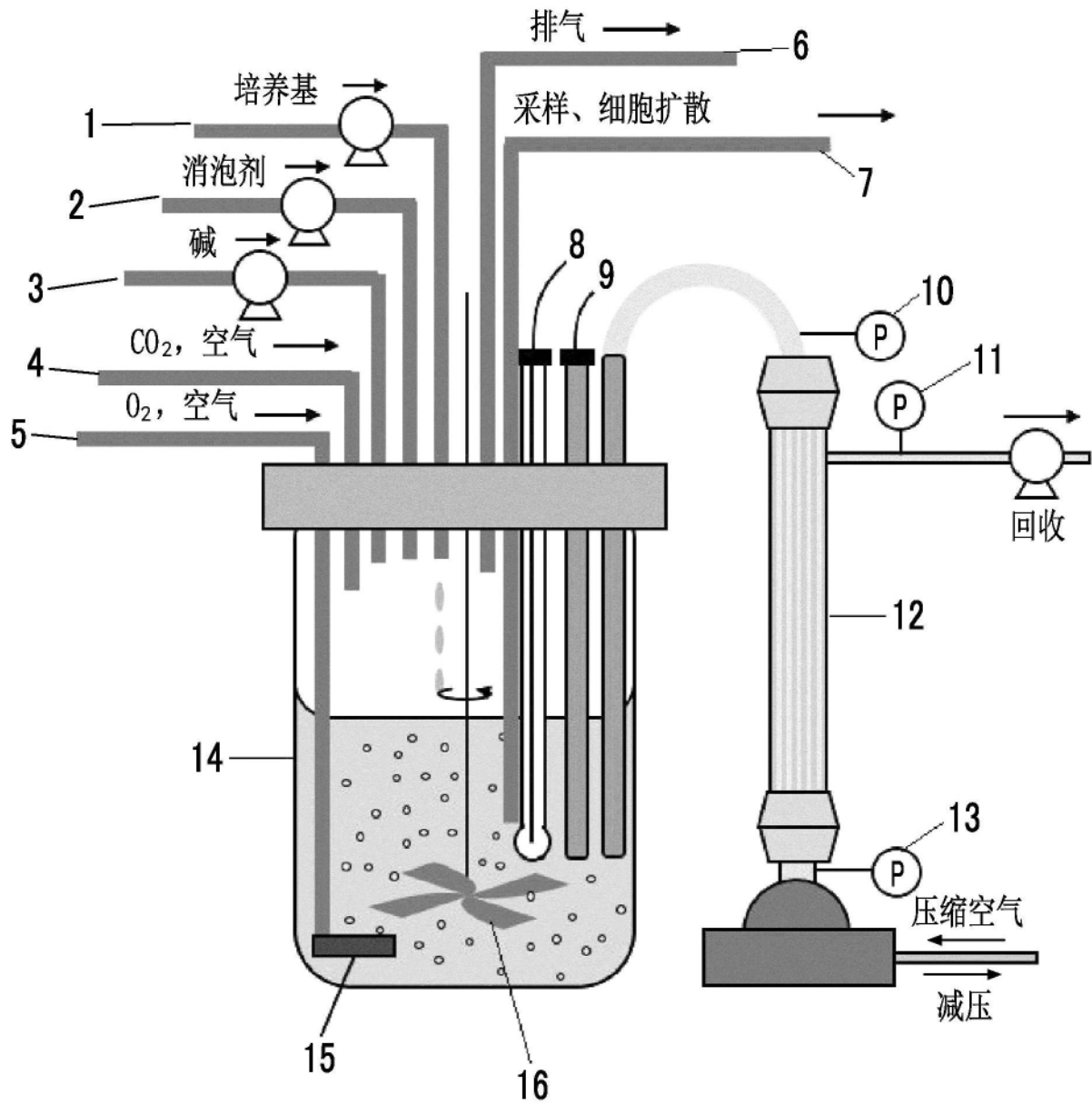


图1

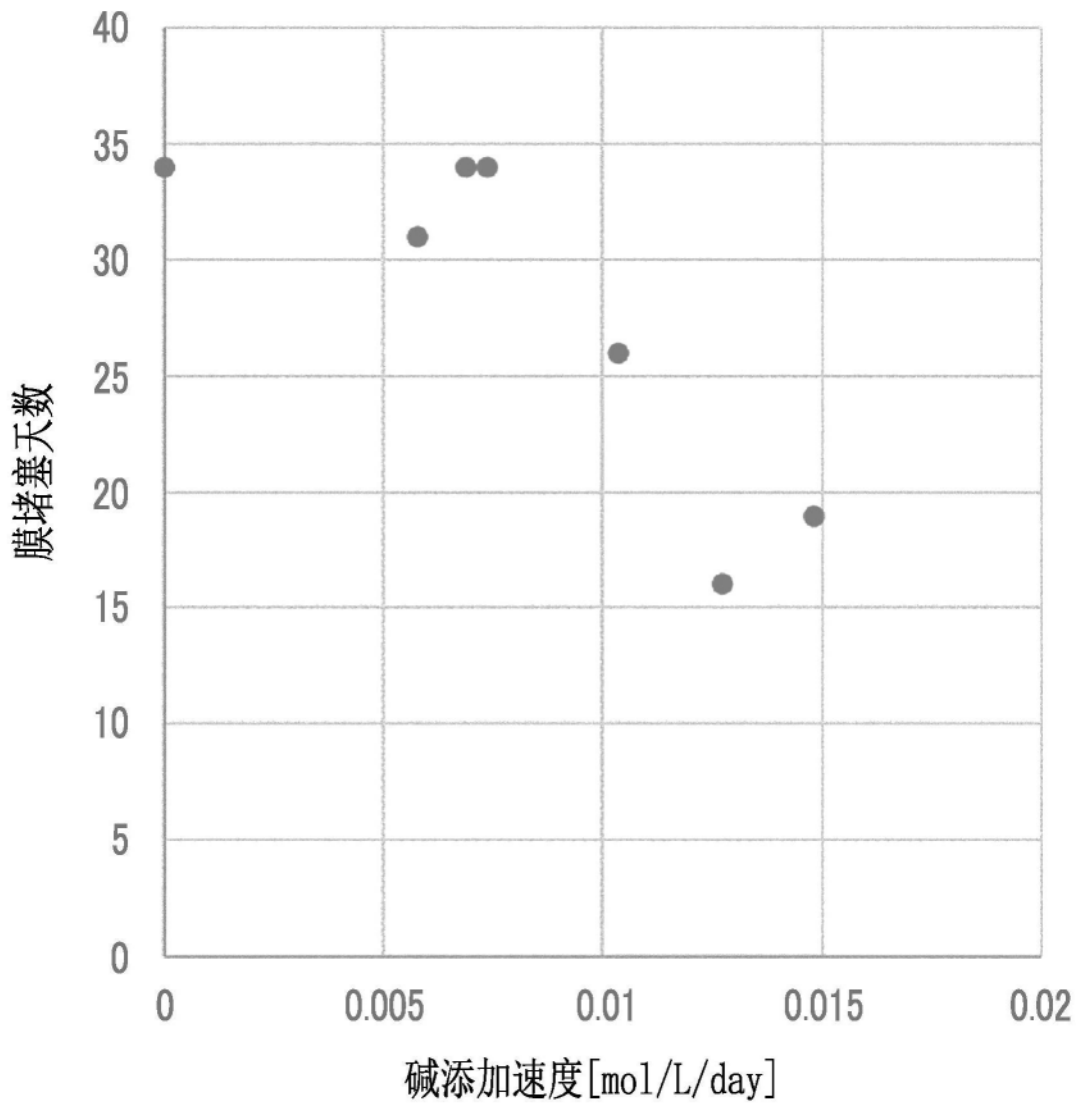


图2

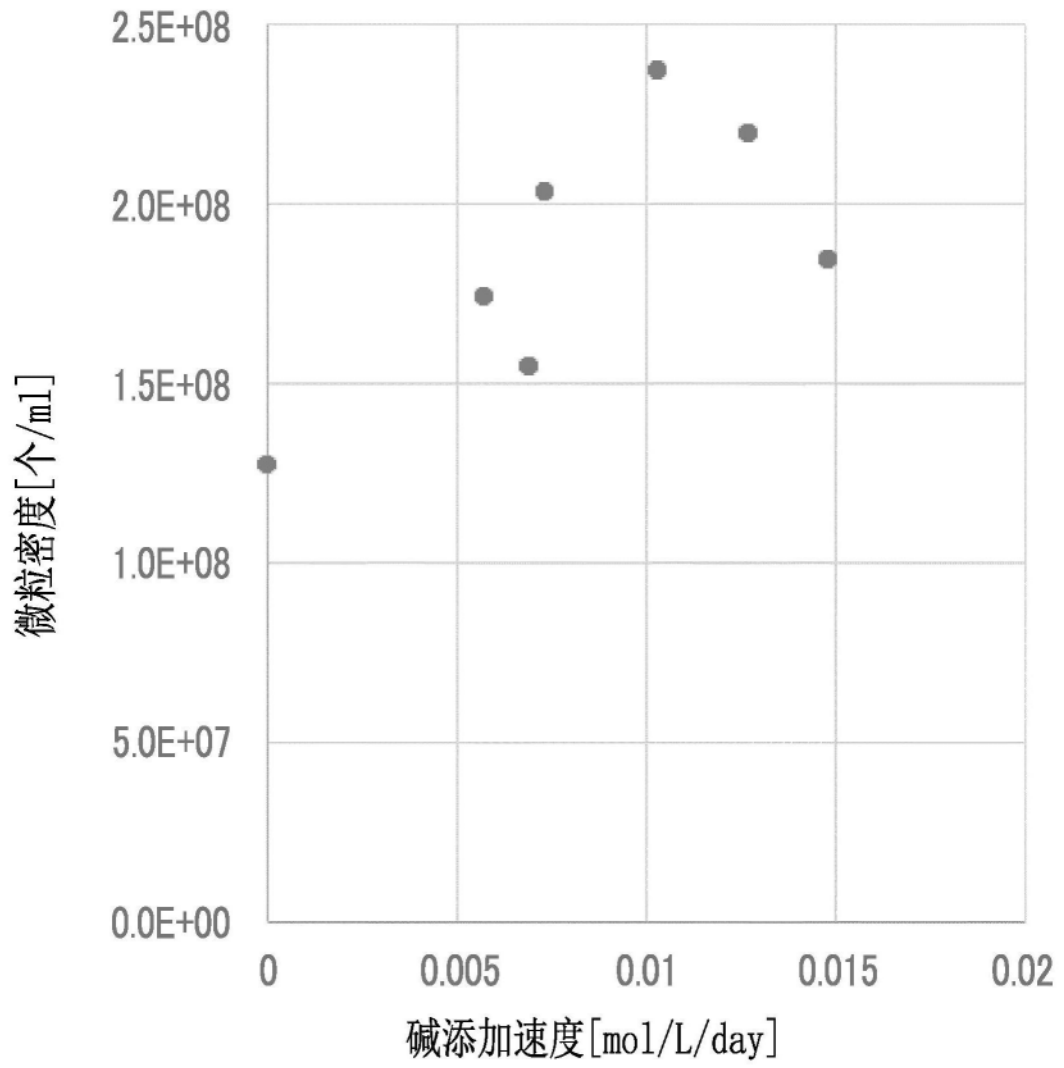


图3

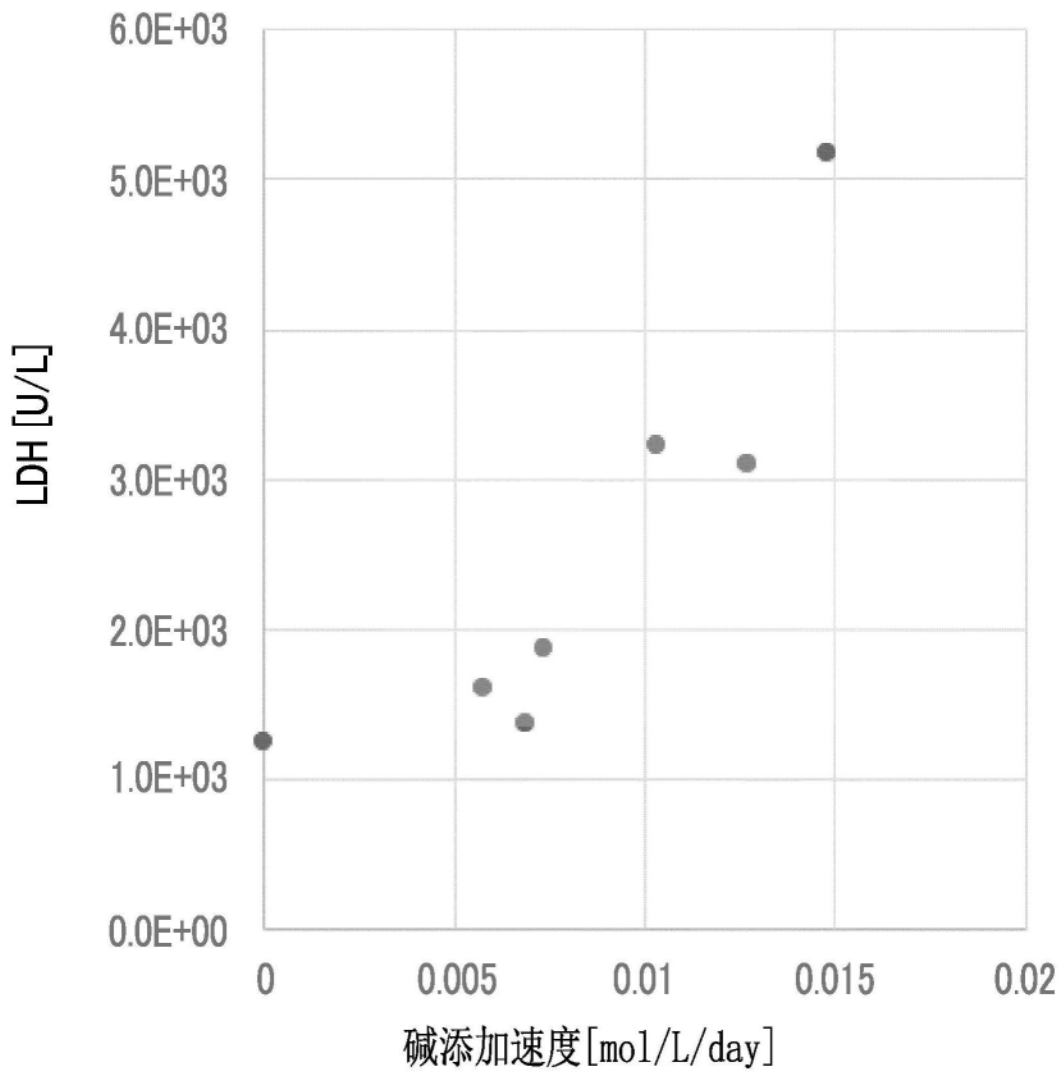


图4

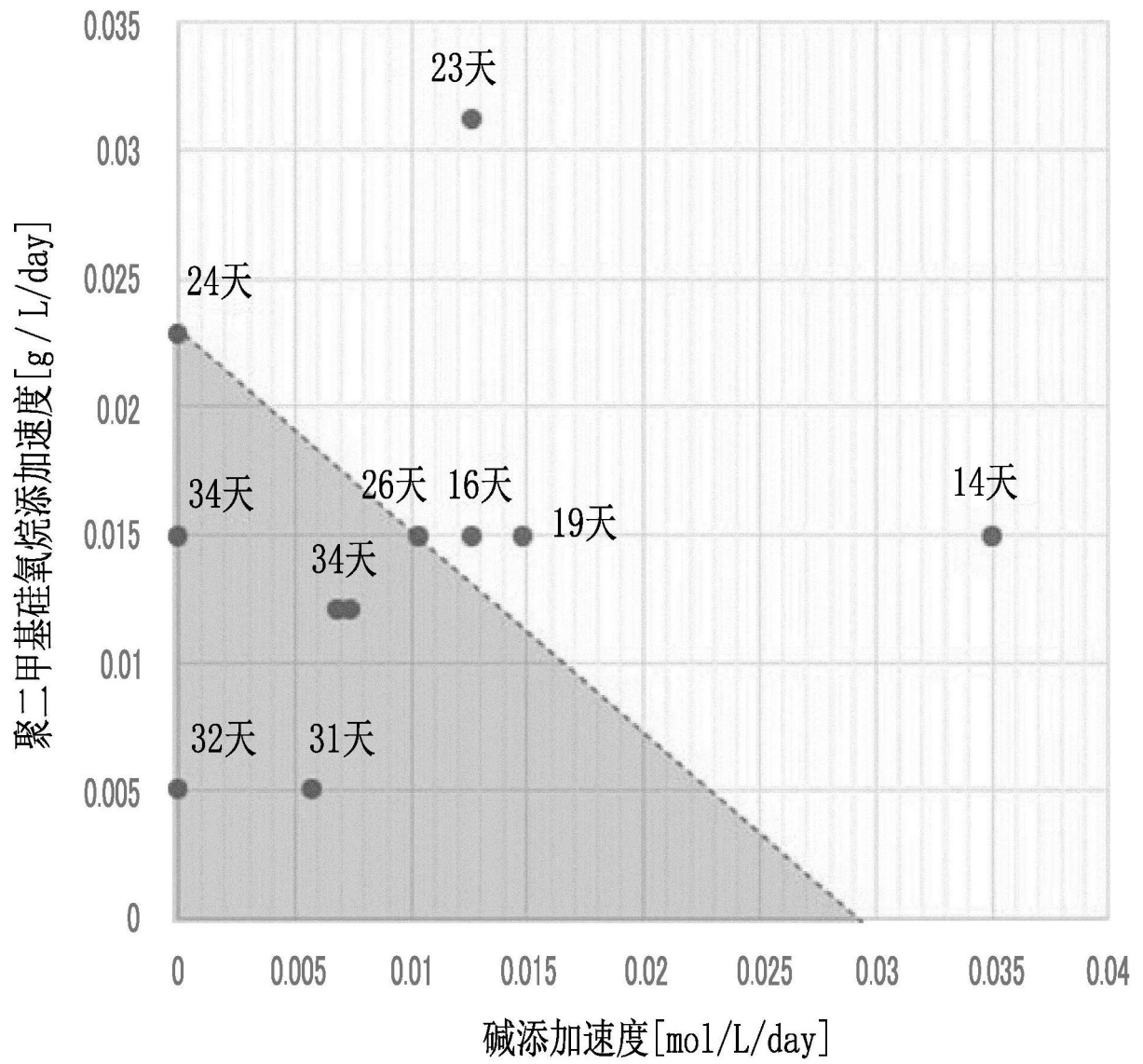


图5