

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02819597.3

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1309825C

[22] 申请日 2002.9.20 [21] 申请号 02819597.3

[30] 优先权

[32] 2001.10.2 [33] DK [31] PCT/DK01/00632

[32] 2001.10.2 [33] DK [31] PCT/DK01/00634

[32] 2002.3.26 [33] DK [31] PA200200460

[86] 国际申请 PCT/DK2002/000612 2002.9.20

[87] 国际公布 WO2003/029442 英 2003.4.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.2

[73] 专利权人 诺和诺德医疗保健公司

地址 瑞士苏黎士

[72] 发明人 I·M·克努森

[56] 参考文献

WO9513361A1 1995.5.18

US5654197A 1997.8.5

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 4 页 说明书 27 页 附图 2 页

[54] 发明名称

在真核细胞中生产重组蛋白的方法

[57] 摘要

本发明提供了在微载体真核细胞培养中生产多肽的方法，该方法包括步骤(i)在适合所述多肽表达的条件和设定点温度下，培养微载体上的表达所述多肽的细胞；(ii)将培养物冷却到低于所述设定点的预定温度；(iii)沉淀该微载体；和(iv)收集全部或部分培养基。

1. 一种在真核细胞中生产多肽的方法，包括步骤(i)在适合所述多肽表达的条件和设定点温度下，培养微载体上的表达所述多肽的细胞；(ii)将培养物冷却到低于所述设定点的预定温度；(iii)沉淀该微载体；和(iv)收集全部或部分培养基。
2. 根据权利要求1的方法，其中进一步包括，在所述收集后，向培养容器中添加新鲜培养基的步骤。
3. 根据权利要求1或2的方法，其中进一步包括从收集的培养基中回收所述多肽的步骤。
4. 根据权利要求1的方法，其中预定温度低于设定点 5°C - 30°C 。
5. 根据权利要求4的方法，其中预定温度低于设定点 5°C - 20°C 。
6. 根据权利要求5的方法，其中预定温度低于设定点 5°C - 15°C 。
7. 根据权利要求6的方法，其中预定温度低于设定点 10°C 。
8. 根据权利要求1的方法，其中，在沉淀前，将培养物冷却到 18°C - 32°C 的温度。
9. 根据权利要求7的方法，其中将培养物冷却到 20°C - 30°C 的温度。
10. 根据权利要求9的方法，其中将培养物冷却到 22°C - 28°C 的温度。
11. 根据权利要求10的方法，其中将培养物冷却到 24°C - 28°C 的温度。
12. 根据权利要求11的方法，其中将培养物冷却到 25°C - 27°C 的温度。
13. 根据权利要求1的方法，其中所述真核细胞是昆虫细胞。
14. 根据权利要求1的方法，其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。
15. 根据权利要求14的方法，其中所述哺乳动物细胞选自HEK, BHK和CHO细胞。
16. 根据权利要求15的方法，其中所述哺乳动物细胞是CHO细胞。

17. 根据权利要求1的方法,其中所述多肽是因子VII或因子VII相关多肽。

18. 根据权利要求17的方法,其中所述多肽是野生型人因子VII。

19. 根据权利要求17的方法,其中所述多肽是因子VII相关多肽,该多肽选自由下列组成的组: L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII; S52A-因子VII, S60A-因子VII; R152E-因子VII, S344A-因子VII, 缺乏Gla结构域的因子VIIa; 和 P11Q/K33E-VII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; 和在氨基酸序列233Thr至240Asn中具有置换、插入或缺失的FVII, 在氨基酸序列304Arg至329Cys中具有置换、插入或缺失的FVII。

20. 根据权利要求1的方法,其中所述多肽产生水平至少是15mg/L培养物。

21. 根据权利要求1的方法,其中所述多肽是人因子VII,所述细胞是CHO细胞,所述载体是大孔载体,所述培养设定点是36℃,并在使载体沉淀前将培养物冷却到26℃。

22. 一种真核细胞的培养方法,包括步骤(i)培养微载体上的细胞,其中培养所采取的条件和设定点温度适合于维持培养物;(ii)将培养物冷却到低于所述设定点的预定温度;(iii)沉淀该微载体;和(iv)收集全部或部分培养基。

23. 根据权利要求22的方法,其中进一步包括在所述收集后向培养容器中添加新鲜培养基的步骤。

24. 根据权利要求22至23中任一项的方法,其中所述预定温度

低于设定点 5℃-30℃。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述预定温度低于设定点 5℃-20℃。

26. 根据权利要求 25 的方法, 其中所述预定温度低于设定点 5℃-15℃。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述预定温度低于设定点 10℃。

28. 根据权利要求 22 至 23 的方法, 其中将所述培养物冷却到 18℃-32℃。

29. 根据权利要求 28 的方法, 其中将所述培养物冷却到 20℃-30℃ 的温度。

30. 根据权利要求 29 的方法, 其中将所述培养物冷却到 22℃-28℃ 的温度。

31. 根据权利要求 30 的方法, 其中将所述培养物冷却到 24℃-28℃ 的温度。

32. 根据权利要求 31 的方法, 其中将所述培养物冷却到 25℃-27℃ 的温度。

33. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述真核细胞是昆虫细胞。

34. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

35. 根据权利要求 34 的方法, 其中所述哺乳动物选自 HEK、BHK 和 CHO 细胞组成的组。

36. 根据权利要求 35 的方法, 其中所述哺乳动物细胞是 CHO 细胞。

37. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述细胞产生期望的因子 VII 或因子 VII 相关多肽。

38. 根据权利要求 37 的方法, 其中所述期望多肽是野生型人因子 VII。

39. 根据权利要求 38 的方法, 其中所述期望多肽是因子 VII 相关多肽, 其选自由下列组成的组: L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-

FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII; S52A-因子 VII, S60A-因子 VII; R152E-因子 VII, S344A-因子 VII, 缺乏 G1a 结构域的因子 VIIa; 和 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; 和在氨基酸序列 233Thr 至 240Asn 中具有置换、插入或缺失的 FVII, 在氨基酸序列 304Arg 至 329Cys 中具有置换、插入或缺失的 FVII。

40. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述期望多肽的产生水平为至少 15mg/L 培养物。

41. 一种用于收集由微载体培养中生长的真核细胞所产生的多肽的方法, 所述方法包括 (i) 将培养物冷却到低于培养设定点的预定温度, 随后 (ii) 沉淀该微载体。

在真核细胞中生产重组蛋白的方法

发明领域

本发明涉及培养真核细胞的方法和在这种细胞的大规模或工业规模培养物中生产重组蛋白的方法。

发明背景

微载体培养在细胞培养领域中广泛使用。在微载体培养中，细胞或者通过连接固定到固体微载体表面，或者通过连接或物理包埋固定到大孔微载体内部结构上或其内部。当使用微载体培养时，需要在收集培养上清的同时将携带细胞的载体保留在培养容器中的方法。一种基于微载体的方法类型是连续灌注法，其中不断收集培养上清并且不断添加新培养基。在这个方法类型中，通常通过重力沉淀器或培养容器中内部过滤器来保留微载体。另一种基于微载体的方法类型是半连续方法，其中有规律间隔进行分批式收集培养上清和添加新培养基。在这个方法类型中，通过停止培养容器内的搅拌器，使携带细胞的载体沉淀到容器底部，可很容易保留微载体。当含细胞的载体沉淀后，收集部分培养上清并用新培养基替换，其后再次开始搅拌。然而，沉淀过程中不搅拌会使细胞缺乏氧气或营养。本发明提供了改良方法，它提高了细胞对于沉淀在容器底部时的状况的承受能力，因此对培养物的总体性能具有积极的作用。

发明概述

本发明提供了培养细胞的改良方法，尤其是生产期望多肽的方法，其特征在于它包括在载体沉淀和收集含产物的培养上清之前的冷却步骤。

在一个方面，本发明提供了在真核细胞中生产多肽的方法，包括

步骤(i)在适合所述多肽表达的条件和设定点温度下培养微载体上的表达所述多肽的细胞;(ii)将培养物冷却到低于所述设定点的预定温度;(iii)沉淀微载体;和(iv)收集全部或部分培养基。

在一些实施方案中,该方法进一步包括在所述收集后向培养容器中添加新鲜培养基的步骤。

在一些实施方案中,该方法进一步包括从收集的培养基中回收所述多肽的步骤。

在另一个方面,本发明提供了真核细胞的培养方法,包括步骤(i)在适合维持培养物的条件和设定点温度下培养微载体上的细胞;(ii)将培养物冷却到低于所述设定点的预定温度;(iii)沉淀微载体;和(iv)收集全部或部分培养基。

在一些实施方案中,该方法进一步包括在所述收集后向培养容器中添加新鲜培养基的步骤。

在一些实施方案中,该方法是一种大规模或工业规模方法。

本发明的另一个方面提供了收集由在微载体培养中生长的真核细胞产生的多肽的方法,所述方法包括(i)将培养物冷却到低于培养设定点的预定温度,随后(ii)沉淀微载体。

在一些实施方案中,在允许微载体沉淀前,使培养物从生长温度冷却到低于培养设定点温度约 5°C - 30°C 的温度,或低于设定点约 5°C - 20°C 的温度,或低于设定点约 5°C - 15°C 的温度,或低于培养设定点温度约 5°C 、 10°C 、 15°C 或 20°C 的温度。

在一些实施方案中,在允许培养物沉淀前,使培养物冷却到约 18°C - 32°C ,或约 20°C - 30°C ,或约 22°C - 28°C ,或约 24°C - 28°C ,或约 25°C - 27°C 。

在一些实施方案中,使用的细胞是昆虫细胞。在一些实施方案中,使用的细胞是哺乳动物细胞。在其中的一些实施方案中,使用的细胞是BHK细胞;在其它实施方案中,所述细胞是CHO细胞;在其它实施方案中,所述细胞是HEK细胞;在其它实施方案中,所述细胞是COS细胞;在其它实施方案中,所述细胞是HeLa细胞。优选的是BHK和

CHO 细胞，尤其是 CHO 细胞。

在一些实施方案中，所述微载体是固体载体；在一些实施方案中，所述微载体是大孔载体；在一些实施方案中，所述微载体是具有表面正电荷的大孔载体。

在一些实施方案中，所述细胞产生期望的多肽，尤其是凝血因子，最优选人因子 VII 或人因子 VII 相关多肽，包括但不限于，野生型因子 VII，L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII ; S52A-因子 VII, S60A-因子 VII ; R152E-因子 VII, S344A-因子 VII, 缺乏 Gla 结构域的因子 VIIa; 和 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; 和在氨基酸序列 233Thr 至 240Asn 中具有置换、插入或缺失的 FVII, 在氨基酸序列 304Arg 至 329Cys 中具有置换、插入或缺失的 FVII。

在一些实施方案中，表达的蛋白质是人因子 VII。在其它实施方案中，表达的蛋白质是与野生型 FVII 相比生物活性基本相同或提高的因子 VII。在其它实施方案中，表达的蛋白质是与野生型 FVII 相比生物活性得到修饰或降低的因子 VII 相关多肽。在其它实施方案中，表达的蛋白质是 FVIII、FIX、FX、FII、蛋白 C、纤溶酶原激活物 (t-PA, u-PA)、PDGF、VEGF、生长激素、胰岛素、白介素、干扰素或抗体或所述蛋白质的片段。

在一些实施方案中，培养的真核细胞是重组细胞，其中转化或转染了由体外基因重组制备的载体。在一些实施方案中，细胞是表达内源性因子 VII 基因的人细胞。

在一些实施方案中，期望多肽以至少约 15mg/L 培养物的水平产

生。

在一些实施方案中，实施本发明所使用的细胞是通过细胞粘附而附着在固体载体表面或大孔载体内部结构里面的贴壁依赖性细胞。在其它实施方案中，实施本发明所使用的细胞是通过物理包埋而滞留在大孔载体的内部结构里面的悬浮细胞。

在特别优选的实施方案中，宿主细胞是已经改造而表达人因子 VII 或人因子 VII 相关多肽和已经适应在缺乏血清或其它动物来源成分下生长的 BHK21 或 CHO 细胞。

在一组实施方案中，培养基是缺乏动物来源成分的培养基。在其它实施方案中，培养基缺乏动物来源成分和蛋白（“无蛋白”）。

在一个实施方案中，细胞是 CHO 细胞，多肽是人因子 VII，载体是大孔载体，培养基是无动物来源成分和无蛋白培养基，细胞是 CHO 细胞，培养温度设定点是大约 36℃，载体沉淀前培养物冷却到的温度是大约 26℃。

附图说明

图 1 图示了 FFF 1235, FFF 1239 和 FFF 1242 培养物中的 FVII 滴度（概述在 500L 培养容器内，在 Cytopore 载体上培养 CHO 细胞）。

图 2 至图 4 显示了 FFF 1235, FFF 1239 和 FFF 1242 培养物中的细胞计数和 FVII 滴度：FFF 1235, 细胞计数和 FVII 滴度（图 2）；FFF 1239, 细胞计数和 FVII 滴度（图 3）；和 FFF 1242, 细胞计数和 FVII 滴度（图 4）。

发明详述

本发明提供了基于微载体培养真核细胞的方法，尤其是用于以大规模或工业量生产这种细胞表达的期望多肽。培养方法类型是基于微载体的方法类型，载体沉淀后分批式收集培养上清。

已经发现在含细胞的载体沉淀前进行冷却步骤对培养的总性能具有积极的作用。

不希望受科学理论的限制，据信冷却步骤可增加细胞承受它们沉淀在培养容器底部时的状况的能力。这继而又对培养物的总体性能具有积极作用。在沉淀期间，500L培养容器中沉淀持续约一小时，不能进行氧气控制，溶解氧的浓度迅速降低。

当使用这里所述的微载体方法时，载体沉淀前，培养容器的温度控制环临时失活；然而，对培养容器不进行主动冷却。温度控制环失活的唯一目的是防止细胞沉淀在培养容器底部时局部过分加热。失活不会使培养容器实际冷却，通常温度降低少于 1°C。已经发现利用根据本发明的冷却步骤，冷却到低于培养温度设定点以下如 10°C，例如冷却到 26°C，细胞的氧需求（由耗氧量测定）可降低大约 50%。冷却到 20°C，细胞的氧需求降低大约 75%。将培养物冷却到低于培养温度设定点的预定温度（如，低于设定点约 5°C-30°C，或约 5°C-20°C，或约 5°C-15°C，或约 5°C、10°C、15°C 或 20°C）。

载体沉淀之前立即应用根据本发明的冷却步骤。这里使用的“之前立即”是指当培养容器的内容物一冷却至预定温度时，就立即停止冷却并停止搅拌容器，以允许含细胞的载体沉淀到容器底部。

通常的冷却步骤持续时间需要 10 至 240 分钟，如 20 至 180 分钟，或 30 至 120 分钟，这取决于培养容器的大小、期望降低的温度和使用的冷却方法；然而，任何冷却步骤持续时间都包括在本发明中。因此，通常在使含细胞的微载体沉淀前约 10-240 分钟开始冷却步骤。例如，通过向培养容器夹套提供冷却水，使 500 L 培养容器的温度从 36°C 的培养温度降低至 26°C，通常需要花费大约 30 分钟；通过向培养容器夹套提供冷却水，使 5000 L 培养容器的温度从 36°C 的培养温度降低至 26°C，通常也需要花费大约 30 分钟。

通常步骤实施如下：使培养容器的温度控制环失活，并冷却培养容器，例如使冷却水通向培养容器夹套的阀门保持持续开启。不断监测温度，当培养容器的内容物达到低于设定点温度的预定温度，如，低于培养设定点 10°C，则停止冷却。其后，停止搅拌培养容器，由此使含细胞的载体沉淀。沉淀后，收集部分培养上清或培养基，并且向

培养容器中加入新鲜培养基来替换收集的培养基。在收集了培养上清和加入了新鲜培养基后，开始搅拌，通过激活温度控制环，使温度再次调整到培养设定点。加入的新鲜培养基通常预热至接近培养设定点的温度，如，至大约 30℃，或高于之，依实际的设定点而定。

实施本发明时，可以使用任何冷却培养物的有效方法。冷却培养容器可以例如通过向培养容器夹套提供足够时间的冷却水直到达到期望温度，或者可以给培养容器配备冷却线圈，冷却线圈可以单独或与上述冷却夹套联合使用。

细胞培养程序：在搅拌培养容器系统中实施本发明的细胞培养，并使用基于微载体的方法类型。在基于微载体的方法中，细胞已经迁移到载体（大孔载体）的内部结构内或它们已贴在载体（固体载体）表面，或二者皆有。在基于微载体的方法中，开始时将真核细胞、微载体和培养基提供到培养容器内。接下来几天，如果培养体积未能从开始达到容器的最终工作体积，则可以补入另外的培养基。在接下来的时期，周期性收集含产物的培养上清并用新的培养基替换，直到培养最终终止。当收集含产物的上清时，停止搅动（如搅拌）培养基，使含细胞的载体沉淀，随后取出部分含产物的培养基。

增殖步骤：达到生产期之前，即有规律收集含产物的培养上清进行进一步下游加工之前，根据可能适合于所述具体细胞的任何方案或规则使细胞增殖。增殖期可以是单步骤或多步骤程序。在单步骤增殖程序中，从贮器中取出细胞并直接接种到将进行生产的含微载体的培养容器中。在多步骤增殖程序中，从存器中取出细胞并通过一系列尺寸不断增加的培养容器增殖，直到到达将进行生产的含微载体的最终培养容器。增殖步骤期间，细胞在优化利于生长的条件下生长。培养条件，如温度、pH、溶解氧等等是已知对该特定细胞最佳的，并且对本领域技术人员或熟练人员来说很明显（如见 *Animal Cell Culture: A Practical Approach* 2nd Ed., Rickwood, D. and Hames, B. D., eds., Oxford University Press, New York (1992)）。

在本发明的一个实施方案中，细胞培养工艺在一个培养容器中操

作：将细胞直接接种到将进行生产的含微载体的培养容器中；使细胞增殖直到达到合适的细胞密度，启动生产期。

本发明的另一个实施方案中，细胞培养工艺在至少两个不同的培养容器中进行：一个或多个种子培养容器（第一增殖步骤），随后是生产培养容器（最后增殖步骤后是生产期）。在第一增殖步骤中，将表达期望多肽的细胞接种到含培养基的种子培养容器并使之增殖，直到细胞达到最低交叉接种（cross-seeding）密度。随后，将经过增殖的种子培养物转移到含（a）培养基和（b）微载体的生产培养容器内。在这个培养容器中，在某条件下培养细胞，从而细胞迁移到固体载体表面上或大孔载体的外和内表面，并且它们继续在大孔载体的外和内表面生长。在这个最后增殖步骤中，它们继续生长，直到细胞完全定居到载体中。在这个最后增殖步骤期间，使微载体沉淀到培养容器底部，从而进行培养基更换，接着去除预定百分比釜体积的培养基，向容器中加入相应百分比釜体积的新鲜培养基。然后将微载体重新悬浮于培养基中，以预定间隔重复这个培养基去除和更换过程，例如每隔 24 小时。更换的培养基量依赖于细胞密度而定，通常可以是釜体积的 10-95%，优选 25%至 80%，如下表 1 所示。

人们会理解在增殖期是多步骤程序的方法中，增殖可以在尺寸不断增加的培养容器中进行，直到获得足够用于最后培养容器的细胞。例如，可以循序使用一个或多个 5L、50L、或 500L 的种子培养容器。种子培养容器通常具有 5L-1000L 的容量。通常，细胞以大约 $0.2-0.4 \times 10^6$ 个细胞/mL 的初始密度接种到种子培养容器内，使之增殖，直到培养物达到大约 1.0×10^6 个细胞/mL 的细胞密度。通常，最小交叉接种密度是 $0.8-1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL。

适合生产期望多肽如因子 VII 的一些设定点并不必然适合细胞的最初生长，无论在种子培养中还是在微载体上都可能如此。例如，两个时期的温度、DOT（dissolved oxygen tension）和/或 pH 可能不同。在增殖期间进行培养基更换的目的是保持细胞存活和生长，而并非收集培养上清进行下游加工。

下表 1 概括了最终培养容器（含微载体）中用于最后增殖步骤的可能培养条件。

设定点	范围	优选范围	更优选值
pH	6-8	6.6-7.6	7.0
温度	28-40℃	34-38℃	36-37℃
溶解氧张力	10-90% 饱和	20-80% 饱和	50% 饱和
每天更换培养基:			
在何时更换培养基的百分比	在 $0.4-1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 10-35% 培养基	在 $0.4-1.0 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 25% 培养基	在 0.5×10^6 个细胞/mL 时更换 25% 培养基
在何时更换培养基的百分比	在 $0.7-3.0 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 30-70% 培养基	在 $0.7-3.0 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 50% 培养基	在 1.0×10^6 个细胞/mL 时更换 50% 培养基
在何时更换培养基的百分比	在 $1.0-12.0 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 60-90% 培养基	在 $1.0-12.0 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 80% 培养基	在 $2.0-10 \times 10^6$ 个细胞/mL 时更换 80% 培养基

表 1

生产期: 当细胞密度达到适合开始生产期的值时, 即, 适合含产物培养上清进行下游加工时, 每 24 小时收集 60-95% 培养上清, 优选收集 80% 培养上清。通常此细胞密度值是 $1-12 \times 10^6$ 个细胞/mL。在此点可以改变设定点, 并设置为适合生产期望多肽的值。

通过使微载体沉淀到釜底部来进行培养基更换, 其后取出选定百分比釜体积的培养基, 并向容器中加入相应百分比釜体积的新鲜培养基。通常更换 25-90% 釜体积; 优选用新鲜培养基替换 80% 釜体积。接着使微载体重新悬浮于培养基中, 通常每 10 至 48 小时重复此培养基取出和更换过程; 优选每 24 小时进行。

表 2 显示了此工艺的概要。

设定点		优选范围	更优选值
pH	6-8	6.6-7.6	对于 CHO 是 7.0, 对于 BHK 是 6.7-6.9
温度	26-40°C	30-37°C	36°C
溶解氧张力	10-90% 饱和	20-80% 饱和	50%
更换培养基的百分比	每 10-48 小时更换 25-90% 培养基	每 10-48 小时更换 80% 培养基	每 24 小时更换 80% 培养基

表 2

任选地，可以在进入生产期时和生产期期间使培养的温度设定点下调。

当进入生产期时，通常将温度、工作 pH 和培养基更换频率改变为最优于生产的值。生长和生产期中温度范围和值的实例可分别见表 1 和 2。对于 CHO 细胞系，生产期间优选大约 36°C 的温度。

微载体：这里使用的微载体是足够小而能够用于悬浮培养（伴有不对细胞引起明显剪切损害的搅拌速度）的颗粒。它们是固体、多孔的，或表面覆盖有多孔涂层的固体核心。微载体可以是例如但不限于基于纤维素或葡聚糖，并且它们的表面（在多孔载体情况下是外部和内部表面）可以带正电荷。

在一组实施方案中，该微载体的总体颗粒直径在大约 150 和 350 μm 之间；并且正电荷密度为大约 0.8-2.0 meq/g。在一组实施方案中，微载体是固体载体。有用的固体微载体包括但不限于 Cytodex 1™ 和 Cytodex 2™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)。固体载体尤其适合于贴壁细胞（贴壁依赖性细胞）。

在另一组实施方案中，微载体是大孔载体。这里使用的大孔载体是如基于纤维素的颗粒，它们具有下列性质：(a) 足够小而能够用于悬浮培养（伴有不对细胞引起明显剪切损害的搅拌速度）；和 (b) 它们具有足够大小的孔和内部空间而能够使细胞迁移进入该颗粒的内部

空间。在一个实施方案中，它们的表面（外表面和内表面）可以带有正电荷。在一组实施方案中，该微载体：(a) 总体颗粒直径在大约 150 和 350 μm 之间；(b) 具有平均开口直径约 15-40 μm 的孔；和 (c) 具有约 0.8-2.0 meq/g 之间的正电荷密度。在一些实施方案中，正电荷由 DEAE (N,N-二乙基氨基乙基) 基团提供。有用的大孔载体包括但不限于 Cytopore1™ 和 Cytopore2™ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)。特别优选的是 Cytopore1™ 载体，其具有 230 μm 的平均颗粒直径，30 μm 的平均孔大小和 1.1 meq/g 的正电荷密度。

大规模培养条件：这里使用的大规模培养容器具有至少大约 100L 的容量，优选至少大约 500L，更优选至少大约 1000L，最优选至少大约 5000L。在细胞培养工艺是在至少两个不同培养容器中操作的情况下，如在一个或多个种子培养容器（第一增殖步骤）后有生产培养容器（最后增殖步骤后是生产期），那么该方法通常包括将大约 50L 增殖种子培养物（大约 1.0×10^6 个细胞/ml）转移到含 150L 培养基的 500L 培养容器中。在适当条件下维持大规模培养，适当的温度、pH、溶解氧张力 (DOT) 和搅拌速度，通过向培养容器中加入培养基逐步来增加体积。在微载体工艺的情况下，培养容器也包括对应于 1 至 10g/L 微载体终浓度的量的微载体。转移后，在最初 24 小时内，细胞通常迁移到载体表面或进入载体内部。术语“大规模工艺”可以与“工业规模工艺”互换使用。此外，术语“培养容器”可以与“釜”、“反应器”、“发酵罐”、“生物反应器”互换使用。

细胞：在实施本发明时，优选培养的细胞是真核细胞，更优选已建立的真核细胞系，包括但不限于 CHO（如 ATCC CCL61）、COS-1（如 ATCC CRL1650）、幼仓鼠肾细胞系（BHK）和 HEK293（如 ATCC CRL1573；Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977）细胞系。优选的 BHK 细胞系是 tk⁻ ts13 BHK 细胞系 (Waechter 和 Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982)，以下称作 BHK 570 细胞。BHK 570 细胞系可从美国通常培养物保藏中心，12301 Parklawn Dr. , Rockville, MD 20852 得到，ATCC 登记号 CRL10314。tk⁻ ts13

BHK 细胞系也可以从 ATCC 得到，登记号 CRL 1632。

优选的 CHO 细胞系可从 ATCC 得到的 CHO K1 细胞系，登记号 CC161。

其它适合的细胞系包括但不限于大鼠 Hep I (大鼠肝细胞瘤; ATCC CRL 1600)，大鼠 Hep II (大鼠肝细胞瘤; ATCC CRL 1548)，TCMK (ATCC CCL 139)，人肺 (ATCC HB 8065)，NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1)；DUKX 细胞 (CHO 细胞系) (Urlaub 和 Chasin, Proc Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980) (DUKX 细胞也称作 DXB11 细胞)，和 DG44 (CHO 细胞系) (Cell, 33: 405, 1983, 和 Somatic Cell and Molecular Genetics 12: 555, 1986)。也有用的是 3T3 细胞，Namalwa 细胞和骨髓瘤细胞以及骨髓瘤细胞与其它细胞的融合细胞。在一些实施方案中，该细胞可以是突变或重组细胞，如表达可催化蛋白质翻译后修饰的酶 (如，糖基化酶如糖基转移酶和/或糖苷酶，或加工酶如前肽) 在量或质上与它们所来源的细胞类型不同的细胞。合适的昆虫细胞系也包括但不限于鳞翅目细胞系，如 *Spodoptera frugiperda* 细胞或 *Trichoplusia ni* 细胞 (如见 US 5,077, 214)。

在一些实施方案中，用于实施本发明的细胞能够在悬浮培养物中生长。这里使用的能悬浮培养的细胞是可悬浮生长、而不会形成大的坚硬聚集体的那些细胞，即单分散的或以每个聚集体仅少量细胞的松散聚集体生长的细胞。能悬浮培养的细胞包括但不限于未经适应或操作即生长在悬浮液中的细胞 (如造血细胞或淋巴细胞) 和已经对贴壁依赖性细胞 (如上皮或成纤维细胞) 进行了逐步适应化而能进行悬浮生长的细胞。

用于实施本发明的细胞可以是贴壁细胞 (也已知是固定依赖性 or 贴壁依赖性细胞)。这里使用的贴壁细胞是需要将自身粘贴或固定到合适表面来增殖和生长的那些细胞。在本发明的一个实施方案中，使用的细胞是贴壁细胞。在这些实施方案中，增殖期和生产期都包括微载体的使用。使用的贴壁细胞在增殖期间应该能够迁移到载体上 (和进入载体内部结构，如果使用大孔载体的话)，当转移到生产生物反应器时能够迁移到新的载体处。如果贴壁细胞自己不足以迁移到新的载体，

则通过将含细胞的微载体接触蛋白水解酶或 EDTA 可使它们从载体上释放下来。使用的培养基（尤其是不含动物来源成分的培养基）应该还含有适合支持贴壁细胞的成分；适合培养贴壁细胞的培养基可从商业供应商获得，如 Sigma。

细胞也可以是适应悬浮或能够悬浮的细胞。如果使用这种细胞，细胞的增殖可以在悬浮液中进行，因此仅在生产培养容器本身在最后增殖期和生产期使用微载体。在适应悬浮的细胞的情况下，使用的微载体通常是大孔载体，其中细胞通过物理包埋到载体内部结构里而贴壁。

培养基：术语“细胞培养基”和“培养基”是指用于真核生物生长的营养溶液，其中通常提供一种或多种下列种类中的至少一种成分：（1）有助于培养基重量摩尔渗透压浓度的盐如钠、钾、镁和钙盐；（2）能量来源，通常是碳水化合物的形式如葡萄糖；（3）所有必需氨基酸，通常是二十个氨基酸的基本组；（4）以低浓度需要的维生素和/或其它有机化合物；和（5）微量元素，其中微量元素定义为通常需求浓度很低的无机化合物（通常在微摩尔浓度范围）。该营养溶液可以任选补充下列任何种类中的一种或多种成分：（a）动物血清；（b）激素和其它生长因子，如胰岛素、转铁蛋白质和表皮生长因子；和（c）蛋白质和组织的水解产物。

本发明包括在含有动物来源成分（如血清或血清成分）的培养基以及缺乏动物来源成分的培养基中培养真核细胞。包括动物来源成分（如，胎牛血清（FBS））的细胞培养基可以含有 5%以上血清或 0-5%血清，如，0-1%血清或 0-0.1%血清。优选缺乏动物来源成分的培养基。这里使用的“动物来源”成分是完整动物中产生的任何成分（如，从血清中分离和纯化的蛋白质），或使用完整动物中产生的成分而制备的任何成分（如使用从动物分离和纯化的酶水解植物来源材料而制备的氨基酸）。相比之下，具有动物蛋白的序列（即具有动物基因组起源），但在细胞培养物中体外生成的蛋白质不是“动物来源”成分，该体外生成是在缺乏完整动物中产生的、从完整动物分离和纯化的成分的培

培养基中进行的（如，在重组酵母或细菌细胞或在已建立的连续真核细胞系中生成的，可以是重组体或非重组体）（如，酵母或细菌细胞中产生的胰岛素，或已建立的哺乳动物细胞系，如 CHO、BHK 或 HEK 细胞中产生的胰岛素，或 Namalwa 细胞中产生的干扰素）。例如，具有动物蛋白的序列（即具有动物基因组起源）、但在缺乏动物来源成分的培养基中在重组细胞内生成的蛋白质（如酵母或细菌细胞产生的胰岛素）不是“动物来源成分”。因此，缺乏动物来源成分的细胞培养基可以含有重组产生的动物蛋白，然而，这种培养基不含有如动物血清或从动物血清中纯化的蛋白质或其它产物。这种培养基可以含有例如一种或多种来源于植物的成分。可以使用本发明条件下支持细胞生长和维持的任何细胞培养基，尤其是缺乏动物来源成分的培养基。通常，该培养基含有水、重量摩尔渗透压浓度调节剂、缓冲液、能源、氨基酸、无机或重组铁源、一种或多种合成或重组生长因子、维生素和辅因子。在一个实施方案中，该培养基缺乏动物来源成分，并缺乏蛋白质（“无蛋白质”）。缺乏动物来源成分和/或蛋白质的培养基可从商业供应商得到，如，Sigma, JRH Biosciences, Gibco 和 Gemini。

除了常规成分，适合产生因子 VII 或因子 VII 相关多肽的培养基含有维生素 K，它是因子 VII 中谷氨酸残基 γ 羧化所需，浓度为大约 0.1-50mg/升，优选大约 0.5-25mg/升，更优选大约 1-10mg/升，最优选大约 5mg/升。

适合用于本发明的培养基可从商业供应商得到，例如 Gibco 和 JRH Biosciences。

在一个实施方案中，培养基包括表 3 所示，并非必要地补充了一种或多种表 4 所示的成分。

下表（表 3）是适合用于本发明培养基的组成。可以非必要地向培养基中加入表 4 所列的一种或多种成分。表 4 列出了优选范围。在一个实施方案中，使用的培养基是 318-X 培养基；在另一个实施方案中，它是 CHO-K 培养基。

成分	范围 (mg/L)	在 CHO-K 中 的浓度 (mg/L)	在 318-X 中 的浓度 (mg/L)
氯化钠	0-70000	6122	6996
氯化钾	0-3118	311.8	311.8
磷酸二氢钠一水合物	0-625	62.5	62.5
碳酸氢钠	0-27	-	2.7
无水磷酸氢二钠	0-710	71.02	-
七水磷酸氢二钠	0-1340	-	134
无水氯化镁	0-287	28.64	-
六水氯化镁	0-610	-	61
无水硫酸镁	0-488	48.84	-
七水硫酸镁	0-1000	-	100
无水氯化钙	0-1166	116.6	116.6
五水硫酸铜	0-0.014	0.0013	0.0013
七水硫酸亚铁	0-4.17	0.147	0.417
九水硝酸铁	0-0.5	0.05	0.05
柠檬酸铁	0-123	0.4	12.24
七水硫酸锌	0-0.44	0.432	0.432
无水葡萄糖	0-45000	4501	4500
亚油酸	0-12	1.189	0.336
胰岛素	0-50	5	5
DL 68 硫辛酸	0-9	0.473	0.84
L 丙氨酸	0-50	4.45	4.45
氯化 L 精氨酸	0-5500	547.8	447.5
L 天冬酰胺一水合物	0-6010	407.5	607.5
L 天门冬氨酸	0-1100	6.65	106.65
盐酸 L 半胱氨酸一水合物	0-1200	117.65	77.56
L 谷氨酸	0-2500	251.35	107.35
甘氨酸	0-190	18.75	18.75
盐酸 L 组氨酸一水合物	0-2200	211.48	101.48
L 异亮氨酸	0-750	54.47	74.47
L 亮氨酸	0-1800	179.05	159.05
盐酸 L 赖氨酸	0-2400	231.25	131.25
L 甲硫氨酸	0-1380	137.24	97.24
L 苯丙氨酸	0-1600	155.48	85.48
L 脯氨酸	0-1150	17.25	117.25
L 丝氨酸	0-4300	266.25	426.25
L 苏氨酸	0-1800	173.45	73.45

L 色氨酸	0-2100	39.02	209.02
L 酪氨酸二钠二水合物	0-900	55.79	85.79
L 缬氨酸	0-1800	177.85	125.85
二盐酸化 L 胱氨酸	0-320	31.29	31.29
次黄嘌呤钠	0-25	2.39	2.39
二盐酸化腐胺	0-1	0.081	0.081
丙酮酸钠	0-2300	220	55
D-生物素	0-3	0.1313	0.259
D-泛酸钙	0-60	4.08	6
叶酸	0-70	4.65	6.65
L 肌醇	0-700	39.1	65.6
烟酰胺	0-50	3.085	4.2
氯化胆碱	0-450	29.32	42
盐酸吡哆醇	0-25	0.117	2.2
核黄素	0-3	0.219	0.219
盐酸硫胺素	0-35	2.67	3.17
胸腺嘧啶核苷	0-4	0.365	0.365
维生素 B12	0-50	2.68	4.68
盐酸吡哆醛	0-60	6	2
谷胱苷肽	0-50	2.5	5
亚硒酸钠	0-0.5	0.02175	0.0232
L 抗坏血酸	0-50	27.5	5
Pluronic F68	0-10000	1000	1000
维生素 K	0-50	5	5
葡聚糖 T70	0-1000	-	100
HY-SOY	0-5000	500	-
表 3			

任选成分:

成分	范围 (mg/L)
植物水解产物 HyPep4601、4602、4605、5603、 7401	0-5000
脂类 油酸	0-15
生长因子	0-50

HGR、IGF、EGF	
-------------	--

表 4

在另一个实施方案中，使用的培养基具有下列组成（318-U 培养基）：

成分	Mg/L
氯化钠	6122
氯化钾	311.8
磷酸二氢钠一水合物	62.5
无水磷酸氢二钠	71.02
无水氯化镁	28.64
无水硫酸镁	48.84
无水氯化钙	116.6
五水硫酸铜	0.0013
七水硫酸亚铁	0.417
九水硝酸铁	0.05
七水硫酸锌	0.432
无水葡萄糖	4501
亚油酸	1.189
DL 68 硫辛酸	0.473
L 丙氨酸	4.45
盐酸 L 精氨酸	547.5
L 天冬酰胺一水合物	407.5
L 天冬氨酸	6.65
盐酸 L 半胱氨酸一水合物	117.65
L 谷氨酸	251.35
L 谷氨酰胺	365
甘氨酸	18.75

盐酸 L 组氨酸一水合物	211.48
L 异亮氨酸	54.47
L 亮氨酸	179.05
盐酸 L 赖氨酸	231.25
L 甲硫氨酸	137.24
L 苯丙氨酸	155.48
L 脯氨酸	17.25
L 丝氨酸	266.25
L 苏氨酸	173.45
L 色氨酸	39.02
L 酪氨酸二钠二水合物	55.79
L 缬氨酸	177.85
二盐酸化 L 胱氨酸	31.29
次黄嘌呤钠	2.39
二盐酸化腐胺	0.081
丙酮酸钠	220
D-生物素	0.1313
D-泛酸钙	4.08
叶酸	4.65
L 肌醇	39.1
烟酰胺	3.085
氯化胆碱	29.32
盐酸吡哆醇	0.117
核黄素	0.219
盐酸硫胺素	2.67
胸腺嘧啶核苷	0.365
维生素 B12	2.68
盐酸吡哆醛	3

谷胱苷肽	2.5
亚硒酸钠	0.02175
L 抗坏血酸, 游离酸	27.5
碳酸氢钠	2440
HySoy (大豆蛋白水解产物)	500
乙醇胺	1.22
胰岛素	5
葡聚糖 T70	100
Pluronic F68	1000
维生素 K1	5
成分	ML/L
铁/柠檬酸盐复合物 (50 mM/1 M)	0.4
巯基乙醇	0.0035

表 5

优选培养基是缺乏动物来源成分的培养基, 或缺乏动物来源成分并缺乏蛋白的培养基 (“无蛋白”)。

在一个实施方案中, 培养基是商业可得到的缺乏动物来源成分的非蛋白 CHO 培养基 (JRH Biosciences), 细胞系是 CHO 细胞。在一个实施方案中, 培养基是 318-X 培养基, 细胞系是 BHK 细胞系; 在另一个实施方案中, 培养基是 318-U 培养基, 细胞系是 BHK 细胞系。在另一个实施方案中, 培养基是 CHO-K 培养基, 细胞系是 CHO 细胞系。

在一些实施方案中, 用于实施本发明的细胞适应在缺乏动物来源成分的培养基如缺乏血清的培养基中悬浮生长。Scharfenberg, et al., Animal Cell Technology Developments towards

the 21st Century, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995 (BHK 和 CHO 细胞) ; Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11: 117-120, 1997 (昆虫细胞) ; Keen, *Cytotechnol.* 17: 203-211, 1995 (骨髓瘤细胞) ; Berg et al., *Biotechniques* 14: 972-978, 1993 (人肾 293 细胞) 描述了这种适应化步骤。在特别优选的实施方案中, 宿主细胞是已经改造而表达人因子 VII 并且已适应在缺乏血清或动物来源成分下生长的 BHK21 或 CHO 细胞。

培养容器: 培养容器可以通过传统叶轮型形式来完成搅拌的传统搅拌釜反应器 (CSTR), 或通过从容器底部引入空气来完成搅拌的空气提升式反应器。需要控制在指定范围的参数是 pH、溶解氧张力 (DOT) 和温度。pH 可以由如改变顶部空间气体中二氧化碳 (CO₂) 浓度和需要时向培养液体中添加碱来控制。溶解氧张力可以通过如喷入空气或纯氧或其混合物来维持。温度控制介质是水, 需要时加热或冷却。水可以通过环绕容器的夹套或通过浸入培养物中的管道圈。

加工步骤: 一旦从培养容器中取出培养基, 即可对其进行一个或多个加工步骤以获得期望蛋白, 包括但不限于离心或过滤以去除没有固定在载体上的细胞; 亲和层析、疏水相互作用层析; 离子交换层析; 大小排阻层析; 电泳步骤 (如制备型等电聚焦 (IEF)、差异溶解度 (如, 硫酸铵沉淀)) 或提取等等。通常见 Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, New York, 1982; 和 *Protein Purification*, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989。

因子 VII 或因子 VII 相关多肽的纯化可以包括如在抗因子 VII 抗体柱中进行的亲和层析 (如见 Wakabayashi et al., *J. Biol. Chem.* 261: 11097, 1986 ; Thim et al., *Biochem.* 27: 7785, 1988) 和使用因子 XIIa 或具有胰蛋白酶样特异性的其它蛋白酶, 如因子 IXa、激肽释放酶、因子 Xa 和凝血酶蛋白水解切割进行的活化。如见 Osterud et al., *Biochem.* 11: 2853 (1972); Thomas, U. S. Patent No. 4,456,591; Hedner et al., *J. Clin. Invest.* 71: 1836 (1983)。可供选择地,

因子 VII 可以通过离子交换层析柱活化, 如 Mono Q® (Pharmacia) 等。

大规模生产多肽: 在一些实施方案中, 用于实施本发明的细胞是表达内源性因子 VII 基因的人细胞。在这些细胞中, 内源性基因可以是完整的或经过原位修饰的, 或因子 VII 基因外部的序列经过原位修饰而改变了内源性因子 VII 基因的表达。

在其它实施方案中, 改造任何真核生物来源的细胞以表达来自重组基因的人因子 VII。这里使用的“因子 VII”或“因子 VII 多肽”包括野生型因子 VII (即具有美国专利 4,784,950 公开的氨基酸序列的多肽), 以及与野生型因子 VII 相比其生物活性基本相同或有所提高的因子 VII 变体。术语“因子 VII”意指包括未切割(酶原)形式的因子 VII 多肽, 以及经过蛋白水解加工而得到其相应生物活性形式的多肽, 它们可被称作因子 VIIa。通常, 在残基 152 和 153 之间切割因子 VII 而得到因子 VIIa。

这里使用的“因子 VII 相关多肽”包括多肽, 包括变体, 其中因子 VIIa 生物活性与野生型因子 VIIa 活性相比实质性改变或降低。这些多肽包括但不限于导入了可修饰或破坏多肽生物活性的特定氨基酸序列改变的因子 VII 或因子 VIIa。

因子 VIIa 在血液凝固中的生物活性源自其(i)结合组织因子(TF)和(ii)催化因子 IX 或因子 X 的蛋白水解切割以产生活化因子 IX 或 X (分别是因子 IXa 或 Xa) 的能力。为了本发明, 使用因子 VII 缺陷的血浆和组织促凝血酶原激酶测定试剂促进血液凝固的能力, 由此可以量化因子 VIIa 的生物活性, 如美国专利 5,997,864 所述。在这个方法中, 生物活性表示为相对于对照样品而言凝血时间的缩短, 通过与含 1 单位/ml 因子 VII 活性的人血清库标准相比而转换为“因子 VII 单位”。可供选择地, 因子 VIIa 生物活性可以由下列定量: (i) 测定在包括包埋在脂膜内的 TF 和因子 X 的系统中, 因子 VIIa 产生 Xa 的能力 (Persson et al., J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997); (ii) 测定在含水系统中因子 X 的水解; (iii) 使用基于表面胞质共振的设备测定其与 TF 的物理结合 (Persson, FEBS Letts. 413: 359-363, 1997)

和 (iv) 测定合成底物的水解。

与野生型因子 VIIa 相比生物活性基本相同或有所提高的因子 VII 变体包括当在上述凝血实验、蛋白水解实验或 TF 结合实验中的一个或多个实验中测试时, 显示出在相同细胞类型中产生的因子 VIIa 的比活性的至少约 25%, 优选至少约 50%, 更优选至少约 75% 和最优选至少约 90% 的那些变体。与野生型因子 VIIa 相比生物活性实质性降低的因子 VII 变体是当在上述凝血实验、蛋白水解实验或 TF 结合实验中的一个或多个实验中测试时, 显示出比活性低于在相同细胞类型中产生的野生型因子 VIIa 的比活性的约 25%, 优选低于约 10%, 更优选低于约 5% 和最优选低于约 1% 的那些变体。相对于野生型因子 VII 其生物活性实质性改变的因子 VII 变体包括但不限于显示 TF 非依赖型因子 X 水解活性的因子 VII 变体和结合 TF 但不切割因子 X 的变体。

无论显示与野生型因子 VII 基本相同或更好的生物活性, 或者显示相对于野生型因子 VII 而言实质性改变或降低了的生物活性, 因子 VII 的变体包括但不限于具有通过插入、缺失或置换一个或多个氨基酸而与野生型因子 VII 序列不同的氨基酸序列的多肽。

具有与野生型因子 VII 基本相同生物活性的因子 VII 变体的非限制性实例包括 S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); 美国专利 5,580,560 中公开的显示蛋白水解稳定性增加的 FVIIa 变体; 在残基 290 和 291 之间或残基 315 和 316 之间发生蛋白水解切割的因子 VIIa (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48: 501-505, 1995); 氧化形式的因子 VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363: 43-54, 1999); PCT/DK02/00189 中公开的 FVII 变体; 和 WO 02/38162 (Scripps 研究院) 公开的显示蛋白水解稳定性增加的 FVII 变体; WO 99/20767 (明尼苏达大学) 公开的具有经修饰型 Gla 结构域并显示膜结合增强的 FVII 变体; 和 WO 01/58935 (Maxygen ApS) 公开的 FVII 变体。

与野生型 FVIIa 相比生物活性增加的 FVII 变体的非限制性实例包括 WO 01/83725、WO 02/22776; WO 02/38162 (Scripps 研究院) 中

公开的 FVII 变体; NN ans ϕ gninger; 和 JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.) 公开的活性增加的 FVIIa 变体。

相对于野生型因子 VII 而言活性实质性降低或改变的因子 VII 变体的非限制性实例包括 R152E-FVIIa (Wildgoose et al., Biochem 29: 3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., J. Biol. Chem. 270: 66-72, 1995), FFR-FVIIa (Holst et al., Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15: 515-520, 1998), 和缺乏 Gla 结构域的因子 VIIa (Nicolaisen et al., FEBS Letts. 317: 245-249, 1993)。

因子 VII 或因子 VII 相关多肽的实例包括但不限于野生型因子 VII, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, S336G-FVII; S52A-因子 VII, S60A-因子 VII; R152E-因子 VII, S344A-因子 VII, 缺乏 Gla 结构域的因子 VIIa; 和 P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; 和在氨基酸序列 233Thr 至 240Asn 中具有置换、添加或缺失的 FVII, 在氨基酸序列 304Arg 至 329Cys 中具有置换、添加或缺失的 FVII。

本发明也包括培养、尤其是大规模培养表达一个或多个感兴趣蛋白的真核细胞, 所述感兴趣蛋白的表达或者是来自于内源性基因, 或者是在将编码该蛋白的重组基因导入这种细胞后进行的。这种蛋白包括但不限于因子 VIII; 因子 IX; 因子 X; 蛋白 C; 组织因子; 凝乳酶; 生长激素, 包括人生长激素; 牛生长激素; 生长激素释放因子; 甲状旁腺激素; 促甲状旁腺激素; 脂蛋白; α -1 抗胰蛋白酶; 胰岛素 A 链; 胰岛素 B 链; 胰岛素原; 促卵泡激素; 降钙素; 黄体生成素; 胰高血糖素; 心房肽; 肺表面活性剂; 纤溶酶原激活剂, 如尿激酶或者人尿

或组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA); 铃蟾肽; 凝血酶; 造血生长因子; 肿瘤坏死因子 α 和 β ; 脑啡肽酶; 人巨噬细胞炎性蛋白 (MIP-1- α); 血清白蛋白如人血清白蛋白; 米勒抑制物质; 松弛素 A 链; 松弛素 B 链; 松弛素原; 小鼠促性腺激素相关肽; 微生物蛋白; 如 β 内酰胺酶; DNA 酶; 抑制素; 活化素; 血管内皮细胞生长因子 (VEGF); 激素或生长因子的受体; 整联蛋白; 蛋白 A 或 D; 类风湿因子; 神经营养因子如骨衍生神经营养因子 (BDNF), 神经营养素-3, -4, -5 或 -6 (NT-3, NT-4, NT-5, 或 NT-6) 或神经生长因子如 NGF- β ; 血小板衍生生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子如 α -FGF 和 β -FGF; 表皮生长因子 (EGF); 转化生长因子 (TGF) 如 TGF- α 和 TGF- β , 胰岛素样生长因子-I 和-II (IGF-I 和 IGF-II); CD 蛋白如 CD-3, CD-4, CD-8, 和 CD-19; 红细胞生成素; 骨诱导因子; 免疫毒素; 骨形成蛋白 (BMP); 干扰素如干扰素- α , - β 和 - γ ; 集落刺激因子 (CSFs), 如 M-CSF, GM-CSF 和 G-CSF; 白介素 (IL), 如 IL-1 至 IL-10; 超氧化物歧化酶; T 细胞受体; 表面膜蛋白; 衰变加速因子; 病毒抗原如 AIDS 包膜的一部分; 转运蛋白; 归巢受体; 地址素; 调节蛋白; 抗体和上述任何多肽的片段。

下列实施例旨在非限制性阐述本发明。

实施例

实施例 1: CHO 细胞的制备

Persson 和 Nielsen. 1996. FEBS Lett. 385: 241-243 已经描述了表达人 FVII 的质粒载体 pLN174。简单说, 它携带编码人 FVII (包括前肽) 的 cDNA 核苷酸序列, 处于用于转录所插入 cDNA 的小鼠金属硫蛋白启动子的控制下, 并且含有处于 SV40 早期启动子控制下的小鼠二氢叶酸还原酶 cDNA 作为选择性标记。

为了构建编码 γ 羧化识别序列的质粒载体, 使用含编码 FVII (包括其前肽) 的 cDNA 的克隆载体 pBluescript II KS+ (Stratagene) (pLN171)。(Persson et al., 1997. J. Biol. Chem. 272:

19919-19924)。通过对该克隆载体进行反向 PCR 介导的诱变，将编码终止密码子的核苷酸序列插入到编码 FVII 的 cDNA 内，FVII 前肽之后。经 NaOH 处理使模板质粒变性，随后用 Pwo (Boehringer Mannheim) 和 Taq (Perkin-Elmer) 聚合酶和下列引物进行 PCR：

5'-AGC GTT TTA GCG CCG GCG CCG GTG CAG GAC-3'

5'-CGC CGG CGC TAA AAC GCT TTC CTG GAG GAG CTG CGG CC-3'

用 DpnI 消化所得混合物，以消化残留模板 DNA，用 PCR 产物转化大肠杆菌。通过测序筛选克隆中突变的存在。将正确克隆的 cDNA 以 BamHI-EcoRI 片段转移到表达质粒 pcDNA3 (Invitrogen) 中。所得质粒被称作 pLN329。采用 Fugene6 方法 (Boehringer-Mannheim)，用等量 pLN174 和 pLN329 转染 CHO K1 细胞 (ATCC CC161)。添加氨甲喋呤至 $1 \mu\text{M}$ 和 G-418 至 0.45mg/ml 来选择转染体。经有限稀释法克隆转染体库并测定来自该克隆的 FVII 表达。

进一步亚克隆高产量克隆，选择出在含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle's 培养基中 FVII 表达水平为 2.4pg/细胞/天 的克隆 E11。使该克隆适应在商业可获得的无动物来源成分的 CHO 培养基 (JRH Bioscience) 中进行的无血清悬浮培养。

实施例 2: 因子 VII 的制备

实验条件总结

本实施例中，在所有三个培养中，均向用于 CHO 细胞的市售无动物来源成分的无蛋白培养基 (JRH Biosciences) 中补充胰岛素 (5mg/L) 和维生素 K1 (5mg/L)。

培养容器的大小是 500 L。方法类型是标准 Cytopore 1 微载体培养，其中载体沉淀后，每日分批式更换 80% 培养基 (400L)。

在 FFF1239 和 FFF1242 培养中，每天载体沉淀前更换培养基时立即实施冷却步骤 (对于 FFF1239，冷却到 26°C ；对于 FFF1242，冷却到 26°C ，直到第 19 天；随后冷却到 20°C ，直到第 53 天)。在所有三个培养的整个过程中，对于培养参数温度、pH 和溶解氧使用标准设定

点。温度设定点是 36.0℃。pH 设定点是 7.10 时调低 pH (向顶部空间添加 CO₂ 气体) 和 6.80 时调高 pH (向培养液中添加碳酸钠溶液)。溶解氧的设定点是用空气 50% 饱和。

结果概述和结论

三个培养的第一个中, 将高产 CHO 克隆 FFF1235 (如实施例 1 所述) 以标准微载体方法培养, 并且不进行冷却步骤。如从图 1 看到的, FVII 滴度对时间的图形是“钟形”, 即在这个培养中, 从第 18-20 天起看到 FVII 滴度下降。显而易见此下降是由培养容器中总细胞密度下降引起的, 即由培养容器中细胞的损失引起。

FFF1239 和 FFF1242 中, 载体沉淀前实施的冷却步骤期间, 冷却水通向夹套的阀门持续保持开放。冷却水温度是 10-15℃, 它是决定冷却步骤持续时间的唯一参数。从 36.0℃ 分别冷却降至 26.0℃ 和 20.0℃, 各消耗大约 30 分钟和 55 分钟。将在旧培养基收集后添加到培养容器中的新培养基预热到 30℃。加入新培养基后, 以设定点 36.0℃ 激活培养容器的温度控制环, 随后经约 120 分钟加热至设定点, 不论载体沉淀前的目标温度是多少 (26.0℃ 或 20.0℃) 均如此。

每日实施冷却步骤的 FFF1239 和 FFF1242 两个培养的总模式与 FFF1235 培养相似。在 FFF1239 和 FFF1242 中, 载体沉淀前立即实施的每日冷却步骤确实对细胞密度和 FVII 滴度有积极作用。尽管图形仍然是“钟形”, 但是冷却步骤确实增加了细胞密度和 FVII 滴度的峰值 (FFF1239 的 FVII 峰滴度是 36mg/L, 而 FFF1235 的是 22mg/L), 并延长了具有高细胞密度和高 FVII 滴度的期间 (FVII 滴度高于 15mg/L 的时间, 对于 FFF1235 而言是 8-9 天, 而在 FFF1239 中延长到 13-14 天)。可以看到, 冷却至 26℃ 使细胞密度和 FVII 滴度达到最高。

结果

附图说明

图 1 图示了 FFF1235、FFF1239 和 FFF1242 的 FVII 滴度。

图 2 至图 4 显示了 FFF1235、FFF1239 和 FFF1242 培养的细胞计数和 FVII 滴度。

从 FFF1239 和 FFF1242 培养得出的总体结论是载体每日沉淀前的冷却步骤确实对培养物的总体性能具有积极作用，并且 26℃ 优于 20℃。

这里提及的所有专利、专利申请和参考文献以其完整形式引入本文作为参考。

按照上面的详细描述，本领域技术人员将能得到本发明很多变型的启示。这种显而易见的变型包括在所附权利要求的全部意欲保护的范围内。

 序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 在真核细胞中生产重组蛋白的方法

<130> 6480.504-WO

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

agcgttttag cgccggcgcc ggtgcaggac

30

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

cgccggcget aaaacgcttt cctggaggag ctgcggcc

38

图1

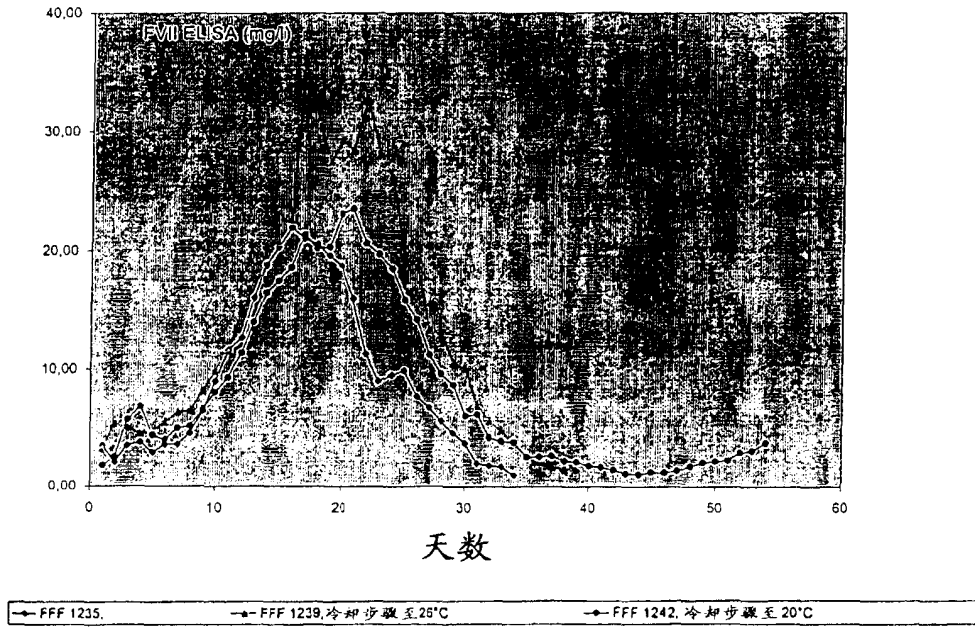


图2

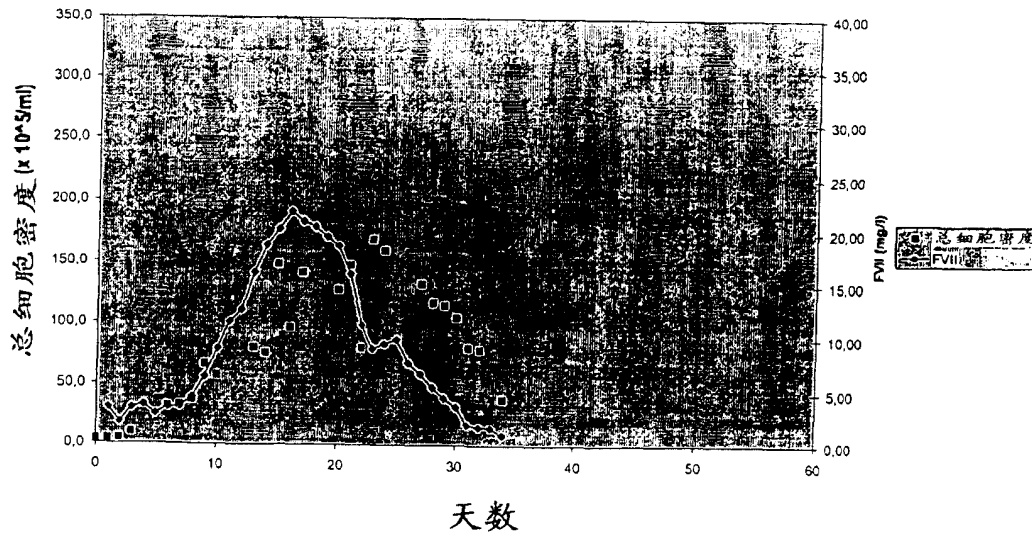


图 3

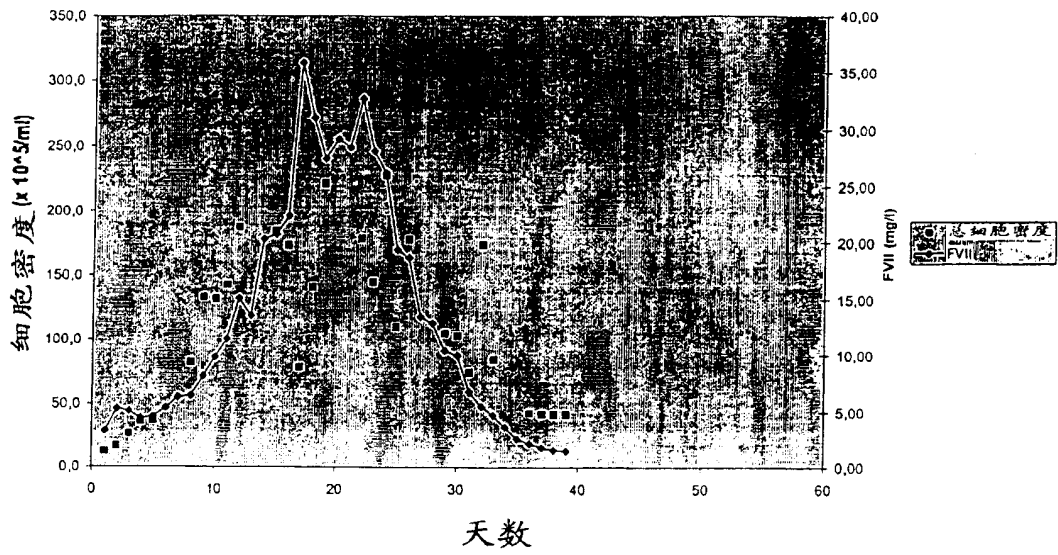


图 4

