

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103154233 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201180048224.4 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2011.10.05 C12M 3/06 (2006.01)
(30) 优先权数据 C12N 5/00 (2006.01)
10186545.9 2010.10.05 EP C12N 9/64 (2006.01)
61/392713 2010.10.13 US
(85) PCT申请进入国家阶段日
2013.04.03
(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2011/067372 2011.10.05
(87) PCT申请的公布数据
W02012/045769 EN 2012.04.12
(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克保健股份有限公司
地址 瑞士苏黎世
(72) 发明人 J. 罗班
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 孔青 李炳爱

权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

生产蛋白质的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种通过连续灌流培养悬浮中的细胞培养物生产止血蛋白的方法,所述细胞培养物向所述培养物悬液中表达所述止血蛋白,其中所述细胞培养物流经过滤组件,所述过滤组件通向收获孔,所述过滤组件具有允许所述止血蛋白通过的0.1-2.9 μ m的筛目大小,并且其中流经该过滤组件的流动为交替式切向流。本发明还涉及由本发明方法生产的蛋白质。

1. 通过连续灌流培养悬浮中的细胞培养物生产止血蛋白的方法,所述细胞培养物向所述培养物悬液中表达所述止血蛋白,

其中所述细胞培养物流经过滤组件,所述过滤组件通向收获孔,所述过滤组件具有允许所述止血蛋白通过的 0.1-2.9 μm 的筛目大小,并且

其中流经该过滤组件的流动为交替式切向流。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述止血蛋白是因子 IX。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述止血蛋白是因子 VIII。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述止血蛋白是因子 VII。

5. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法以大规模发酵(至少 500L)进行。

6. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述灌流率为每天 0.7-10 倍体积。

7. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中从所述方法中以每天 0-0.5 倍体积的速率移出未过滤的细胞培养物悬液。

8. 权利要求 2 所述的方法,其中从所述方法中以每天 0.01-0.2 倍体积的速率移出未过滤的细胞培养物悬液。

9. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中从所述方法中连续或不连续地移出未过滤的细胞培养物悬液。

10. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述细胞浓度保持低于 80×10^6 个细胞/ml,优选低于 50×10^6 个细胞/ml。

11. 由权利要求 1-10 中任一项所述的方法生产的重组蛋白。

生产蛋白质的方法

[0001] 发明技术领域

本发明涉及一种通过连续灌流培养悬浮中的细胞培养物生产止血蛋白的方法,所述细胞培养物向所述培养物悬液中表达所述止血蛋白,其中所述细胞培养物流经过滤组件,所述过滤组件通向收获孔,所述过滤组件具有允许止血蛋白得以通过的 0.1-2.9 μm 的筛目大小,其中所述流经该过滤组件的流动为交替式切向流。本发明还涉及通过本发明方法生产的蛋白质。

[0002] 发明背景

止血蛋白是凝血级联的组分。如果缺乏任何一种止血蛋白,轻则会引发健康并发症(health complications),重则患上危及生命的疾病。止血蛋白缺乏症起初是通过补充动物源性的止血蛋白来治疗的。

[0003] 典型地,已通过连续灌流发酵法或者反复分批发酵法生产重组止血蛋白。这些发酵方法提供高质量的产物。然而,对于提供在不降低质量标准的情况下产生较高量的产物的方法,仍存在着持续的需求。本发明提供了这样的方法。

[0004] 发明概述

因此,本发明的第一方面提供了一种通过连续灌流培养悬浮中的细胞培养物生产止血蛋白的方法,所述细胞培养物向所述培养物悬液中表达所述止血蛋白,所述细胞培养物流经过滤组件,所述过滤组件通向收获孔,所述过滤组件具有允许止血蛋白得以通过的 0.1-2.9 μm 的筛目大小,并且其中所述流经该过滤组件的流动为交替式切向流。包含于所述过滤组件内的筛目的大小允许止血蛋白通过所述过滤组件,但不允许细胞或细胞碎片通过。

[0005] 与先前使用的方法相比,本发明的第一方面的方法允许在显著更高的滴度下生产高质量的止血蛋白。

[0006] 此外,从实验室规模发酵(5L 左右)到大规模发酵(至少 500L)均获得在不损害生长、生产力和产物质量的情况下的更高滴度的优势。本发明使得能够在不损害产物质量的情况下产生数量高达现有技术方法的 10 倍的所需蛋白。

[0007] 本发明使得能够对工艺参数实施仔细控制,使得方法能够在某一细胞密度下运行,以便在生物反应器的物理特性内的高浓度下提供高质量产物。

附图说明

[0008] 图 1:在实验室规模和中试工厂规模(大于 500L)下关于因子 IX 的活细胞浓度和存活率,使用用泄放(bleed)进行的 ATF。

[0009] 图 2:在用于因子 IX 的先前方法(“半连续方法”)与 ATF 方法之间的大规模(大于 500L)产量比较(在相对比例尺上)。

[0010] 图 3:实验室规模下关于因子 IX 细胞系的活细胞浓度和存活率,使用在没有泄放下进行的 ATF。

[0011] 图 4:实验室规模下,使用 ATF 的关于因子 VIII 的活细胞浓度和存活率。

[0012] 图 5:实验室规模下,使用 ATF 的关于因子 VII 的活细胞浓度和存活率。

[0013] 发明详述

本发明的方法中,止血蛋白优选为因子 VII (FVII)、因子 VIII (FVIII) 或因子 IX (FIX) 之一。本领域存在数量众多的描述诸如 FVII、FVIII 或 FIX 等止血蛋白的生产的文献。细胞系、细胞培养和蛋白生产技术为公知的并描述于如下文献中:例如,关于 FVII 的 US 2006/0166915 和 WO 2004/000366,关于 FVII 和 FIX 的 US 2009/0130060 和 WO 2006/018204,关于 FIX 的 WO 2009/130198 和 US 4,770999,以及关于 FVIII 的 US 20100120094、WO 97/43436、WO 88/08035、WO 87/04187、WO 90/02175、US 20050227913 和 EP 1707634。所有这些文献均通过引用结合并描述止血蛋白生产的公知原理,所述生产的方法步骤可依据本发明使用。为了根据本发明重组地生产蛋白,使用在培养时表达该蛋白(在适当条件下)的细胞系。这样的细胞系(含有编码止血蛋白例如 FVII、FVIII 或 FIX 的重组核酸)是本领域已知的,例如幼仓鼠肾细胞(BHK)、包括无限增殖化人细胞(如 PER. C6 细胞)在内的人细胞、大鼠细胞和小鼠细胞。根据本发明,所述细胞培养物优选是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系的培养物,该细胞系在培养中表达目的止血蛋白。更优选地,所述培养物是 CHO-K1 细胞系。

[0014] 所述细胞培养物以悬液存在。可用于所述培养物和目的蛋白重组生产的培养基的例子是公知的。合适的例子可以在包括上述专利文献在内的现有技术和本申请文件的实施例部分中找到。

[0015] 本发明是一种连续灌流培养细胞的方法。术语“灌流培养细胞的方法”具有本领域的常规意义,意指:培养过程中,细胞通过分离装置得以保留;存在具有比分离前低的细胞密度的液体(自培养物)流出,并且存在细胞培养基流入(至培养物)。本发明涉及所需蛋白的生产。自所述方法收获的澄清液体具有与所述细胞培养物处于相同范围的所需蛋白的浓度。本发明中,优选至少一种细胞培养基组分是连续加入的。培养基的其它组分可以连续、半连续或以其他方式加入。

[0016] 本发明的分离装置是过滤组件。该过滤组件优选是管状膜形式的中空纤维过滤器。这样的过滤器/膜在本领域是普遍已知的,可以从例如 General Electric (其前身是 Amersham) 得到。选择所述过滤器使得筛目大小为 0.1 到 2.9 微米。这是本发明的一个显著特征,因为选择该筛目大小以尽可能地防止细胞碎片通过过滤器。本发明优选使用的过滤器包括由 PS (聚砜) 或者 PES (聚醚砜) 制得的过滤器。

[0017] 自早至 2000 年以来,交替式切向流(ATF)一直有被述及。ATF 系统通常由隔膜和过滤器(如上所述)组成,该过滤器可与任何类型的生物反应器(不锈钢、玻璃、一次性使用的生物反应器等等)连接。通过改变过滤器的孔径大小,所生产的产物可在生物反应器中浓缩,或连续移出。ATF 意味着所述过滤组件处有交替式切向流出现,也就是说,存在一种与过滤组件的膜表面处于同一方向(即与其相切)的流动,并且存在另一种处于与所述过滤器表面基本垂直的方向的流动。切向流可以通过本领域已知的方法获得,例如美国专利第 6,544,424 中记载的方法,该专利的内容通过引用结合。

[0018] 优选的生物反应器为经典的搅拌式生物反应器,该反应器设置有泄放孔(bleed port)、ATF 孔(收获孔)、培养基孔、底孔、气孔和用于其它添加物的附加孔。

[0019] 先前未曾想到可在方法中使用 ATF 以生产具有与在其它方法中生产时类似的质

量(质量如例如 GLA 分布或活化型或二醇分布 (glycol-profile) 或重链)的止血蛋白,而使用其它方法生产的材料具有显著较低的产量,例如日产量水平或体积产量水平或者主体产物浓度(bulk product concentration)。

[0020] 系统的参数通常是本领域描述的那些参数。细胞培养基的 pH、温度、溶解氧浓度和摩尔渗透压浓度原则上并不关键,并且取决于所选的细胞和正在生产的产物。可改变参数以使产物质量和数量最大化。通常需要平衡。按照本发明,灌流率优选为每天 0.7 至 10 倍体积,更优选每天 0.9 至 4 倍体积。

[0021] 该方法可经“泄放”以移出未经过滤的细胞培养物悬液,以便平衡正被收获的液体的体积和正被添加至培养物的液体体积。该泄放率可变化。未经过滤的液体优选以每天 0-0.2 倍体积(该方法的总体积)的速率从该方法中移出。未经过滤的细胞培养物悬液可从该方法中连续移出(连续泄放)。或者,未经过滤的细胞培养物悬液可从该方法中不连续地移出(脉冲泄放)。对于因子 IX 而言,优选的泄放率是每天 0.01-0.2 倍体积(该方法的总体积)。该泄放在生产阶段期间应用以保持高细胞存活率,如例如高于 80%。

[0022] 所需的止血蛋白经由收获孔从所述系统中收获。其最优选在下游处理中进行纯化。可组合数个下游处理步骤。本发明蛋白的典型下游处理在本领域已有描述,例如包括上面所提到的专利文献在内的现有技术。本发明的方法中,流经过滤组件的液体含有所需蛋白,该蛋白通过流过滤与悬液培养物中的细胞和细胞碎片分离。该液体为澄清的经过过滤的悬液,其含有所产生的止血蛋白。所述经过过滤的悬液优选以每天 0.7-10 倍体积(该方法的总体积)、优选每天 0.7-1.0 倍体积或 0.8-1.4 倍体积或 1.0-1.2 倍体积的速率收获。

[0023] 该方法的生产力在一定程度上取决于该方法的参数,并且在其它方面取决于表达止血蛋白的细胞克隆。本发明的益处为与使用同一细胞克隆的非 ATF 方法中的产量相比更高的产量。

[0024] 在该方法的起始和该方法期间的细胞存活率应该大于 80%,优选大于 90%。该方法期间应该测量细胞存活率,并且若细胞存活率降至低于所需水平的话,则调整所有培养物中的条件。

[0025] 细胞密度可以有所不同。合适接种物为在 $3-6 \times 10^5$ 个细胞 /ml 的范围内的。

[0026] 培养物中的靶细胞密度低于 80×10^6 个细胞 /ml。更高的细胞密度产生较低的产物数量和 / 或质量。在 FIX 的一个优选的实施方案中,培养物中的细胞密度低于 8×10^6 个细胞 /ml。

[0027] 悬液温度优选保持在 35.5-37.5°C 左右,最优选 36.5°C 左右。悬液 pH 优选保持在 6.95 \pm 0.45 左右。

[0028] 悬液中的溶解氧浓度是重要的。优选其为 20% 至 120% 左右,优选 30% 至 70% 左右,优选 45% 至 55% 左右,优选 50% 左右。可通过任何方式实现通风。典型且优选的方式包括通过喷雾器的通风,其使用空气和氧气的混合物(优选 100% 氧气),同时在顶部空间具有恒定的气流。

[0029] 特别地,本发明涉及一种如权利要求 1 所述的方法,用于生产因子 VII 或因子 VIII 或因子 IX 蛋白。

[0030] 本发明的第二方面提供通过本发明第一方面的方法生产的 FVII、FVIII 或者 FIX 蛋白。第一方面的所有优选特征同样适用于第二方面。

[0031] 由于止血蛋白在本领域是已知的,可依照该蛋白的标准去测量该蛋白的质量。FVII 和 FIX 质量的测量通常涉及 GLA 分布(Gla10-12)。FVIII 质量的测量通常涉及组合的轻链和重链 (heavy claim)。

实施例

[0032] 实施例 1

实施例 1 描述了使用本发明的方法在 5 L 生物反应器(实验室规模)中于 ATF 灌流装置中进行的因子 IX 蛋白培养。使用 ATF 灌流装置进行了培养。该培养导致产生稳定的细胞密度、存活率和产物产量。泄放范围为 0-20%。

[0033] 至于产物的质量,在方法中活化 FIX (“FIXa”)保持稳定和低水平。随着 FIX 浓度升高,关于 GLA 11&12 的 GLA 分布 (FIX 的富含谷氨酸的 γ -羧基谷氨酸结构域) 轻微地从 90-95% 降至 80-85%。在不损害产物质量的情况下,所达到的 FIX 产量是所使用的现有技术(非 ATF)方法的 10 倍左右。

[0034] 品系详情

细胞类型为表达 FIX 的 CHO-K1 品系。

[0035] 培养基:

所用的培养基为支持细胞和产物的生长和产出的商业培养基。这类培养基通常补充有胰岛素、维生素 K1、谷氨酰胺和葡萄糖。

[0036] 方法概述

遵循用于 FIX 培养的方法以建立本发明的 ATF 方法。该方法包括解冻细胞库小瓶并将细胞转移至具有低搅动 (< 30 rpm) 的 T- 瓶或摇瓶中。细胞扩繁在摇瓶中进行直到产生足够的细胞以便接种 5 L 生物反应器。在所有方法步骤,细胞均在无血清培养基中悬浮培养。生物反应器中,以分批方式进行培养达头 2-3 天。当满足开始灌流、脉冲和收获的标准时,连续供应培养基。通过推注(bolus)或连续加入谷氨酰胺和葡萄糖(如果需要的话)。将收获物通过离心和 / 或过滤 GMO 净化,并转移至初级回收。

[0037] 生物反应器参数 - 5L Biostat B plus 的准备与测试

pH 电极用 4.0 和 7.4 缓冲液校准,并用 7.0 缓冲液校验,然后装配罐。将罐用 PBS (9.6 g/l) 杀菌,随后将其用培养基更换。在 PBS 溶液中用氮气 (0%) 和空气 (100%) 对氧电极进行校准。

[0038] 最终将 pH 电极重新校准至外部 pH 测量结果。将罐、管道系统和过滤器针对渗漏进行检查。

[0039] 方法操作条件

根据下表 1 中的规定调整方法参数的设定值。

[0040] 表 1 :5L Biostat B plus 的方法操作条件

参数	单位	设定值
温度	°C	34-38)
pH		6.7-7.5
DOT (溶解氧张力)	空气饱和 %	10-90
搅拌速度	rpm	100-150
工作体积	L	4
碱(用于 pH 控制的碳酸钠)	M	1-3

CO ₂ (顶部空间)	NA	视需要而定
氧气或空气或混合物(喷射)	%	0-100%

接种

接种细胞的浓度靶定在 $3-6 \times 10^5$ 个细胞 /ml 的范围内。接种后,连接碱长达 2 天。

[0041] 生长期

当细胞浓度达到实验生长期时,开始灌流和泄放。泄放率 / 收获率之比为 10/90 (%)。培养过程中每天更换收获瓶。

[0042] 当细胞浓度高于细胞浓度靶标 (6×10^6 个细胞 /ml) 时,立即应用脉冲泄放策略。取决于细胞的浓度,脉冲泄放大小为生物反应器的工作体积的 0-20%。

[0043] 将收获率保持恒定并每日检查。

[0044] 收获

将细胞培养物自罐收获至蓝盖瓶中。将培养物用 0.22 μ m 的过滤器过滤除菌。将约 1L 的收获物转移至无菌袋中并冷冻。

[0045] 结果

细胞浓度保持稳定在约 $7-8 \times 10^6$ 个细胞 /ml。

[0046] 培养中存活率保持在约 85% 和 90%。其导致产生约 0.07% 的 FIXa 含量。

[0047] 至于 GLA 分布, Gla-11 和 Gla-12 保持高于 80%。

[0048] 在连续泄放中仍获得高生产力和稳定产物。

[0049] 实施例 2

实施例 2 描述了使用本发明的方法在 ATF 灌流装置中大规模(大于 500L)进行的因子 IX 蛋白培养。大规模的方法(实施例 2)使用与上文在实施例 1 中描述的相同的品系、培养基和一般方法步骤进行。对于方法参数(即生物反应器参数、操作条件等)而言,它们亦与上文在实施例 1 中所描述的相似。

[0050] 表 2:实验室规模和大规模下,先前方法(“半连续方法”)和 ATF 方法的关于因子 IX 的产物质量数据。

生物反应器	方法	GLA11+12 (%)	FIXa (%)
实验室规模	半连续方法	90	~0.03
大规模(大于 500L)	半连续方法	90-93	0.02-0.06
实验室规模	ATF	80-90	0.06-0.13
大规模(大于 500L)	ATF	87-96	0.02-0.15

[0051] 结果

表 2 表明与先前方法(“半连续方法”)相比,使用 ATF 方法保持了所产生的因子 IX 的质量。然而,ATF 方法产生高得多的量 / 产量(如图 2 所示)。

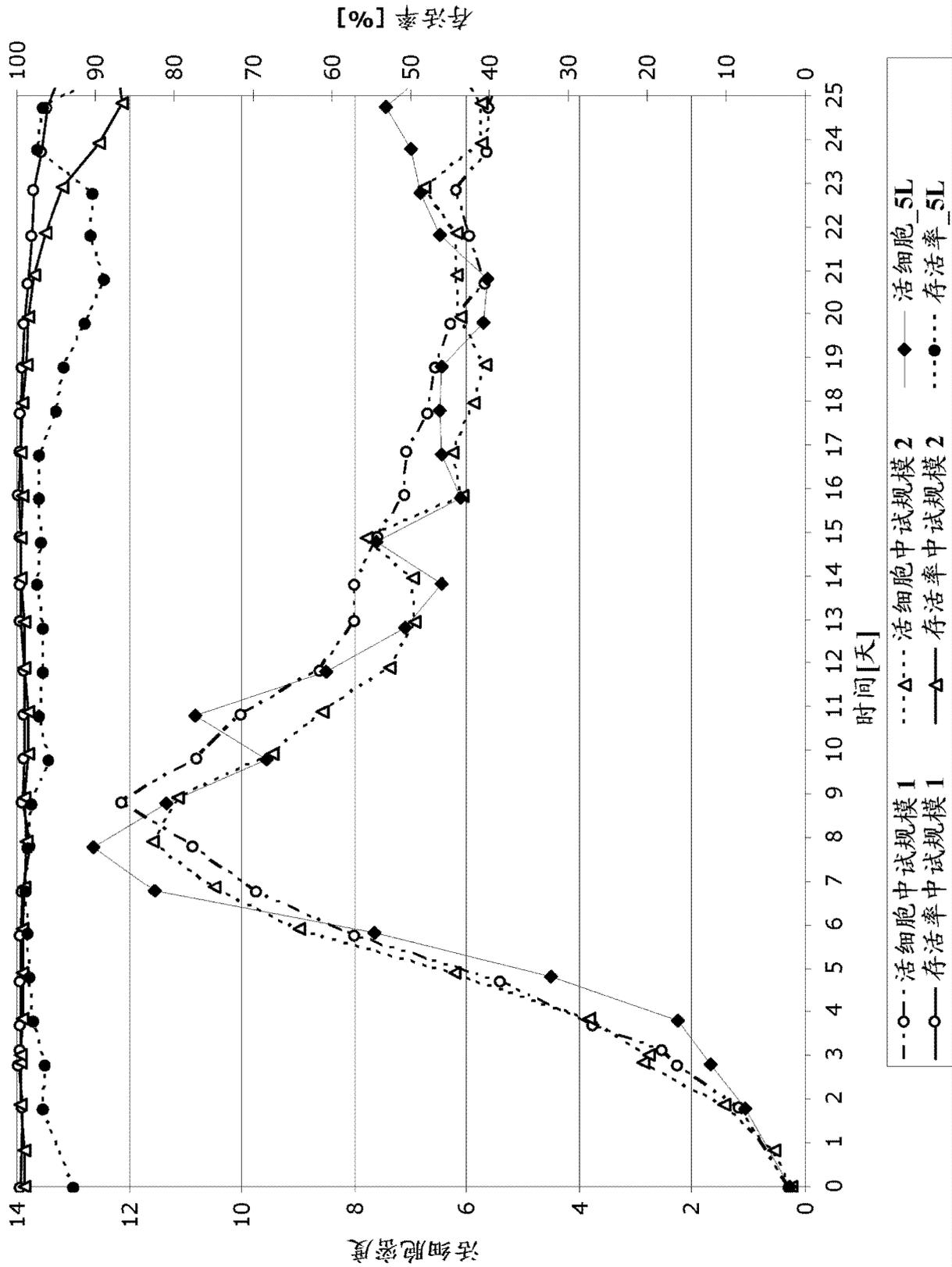


图 1

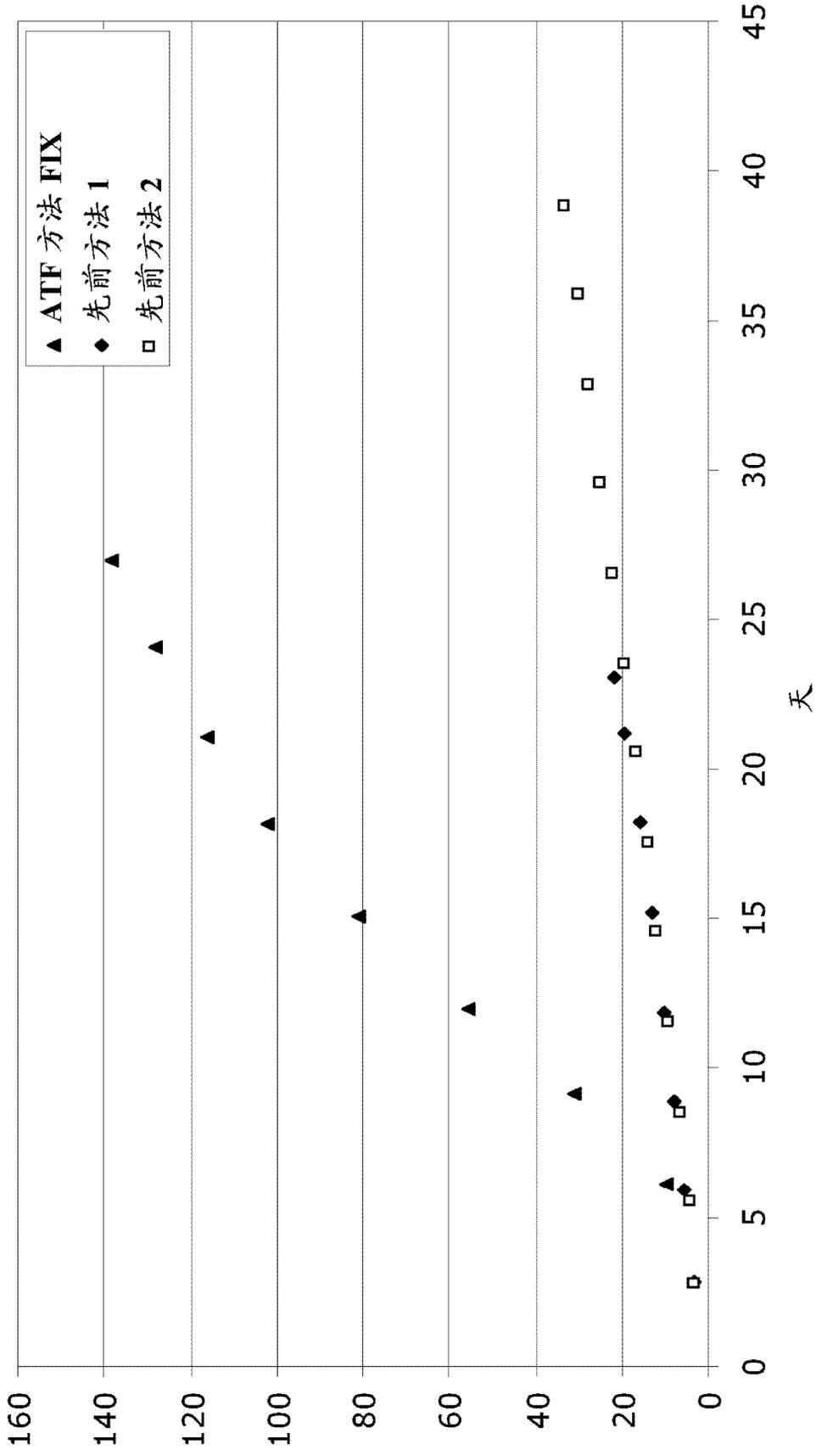


图 2

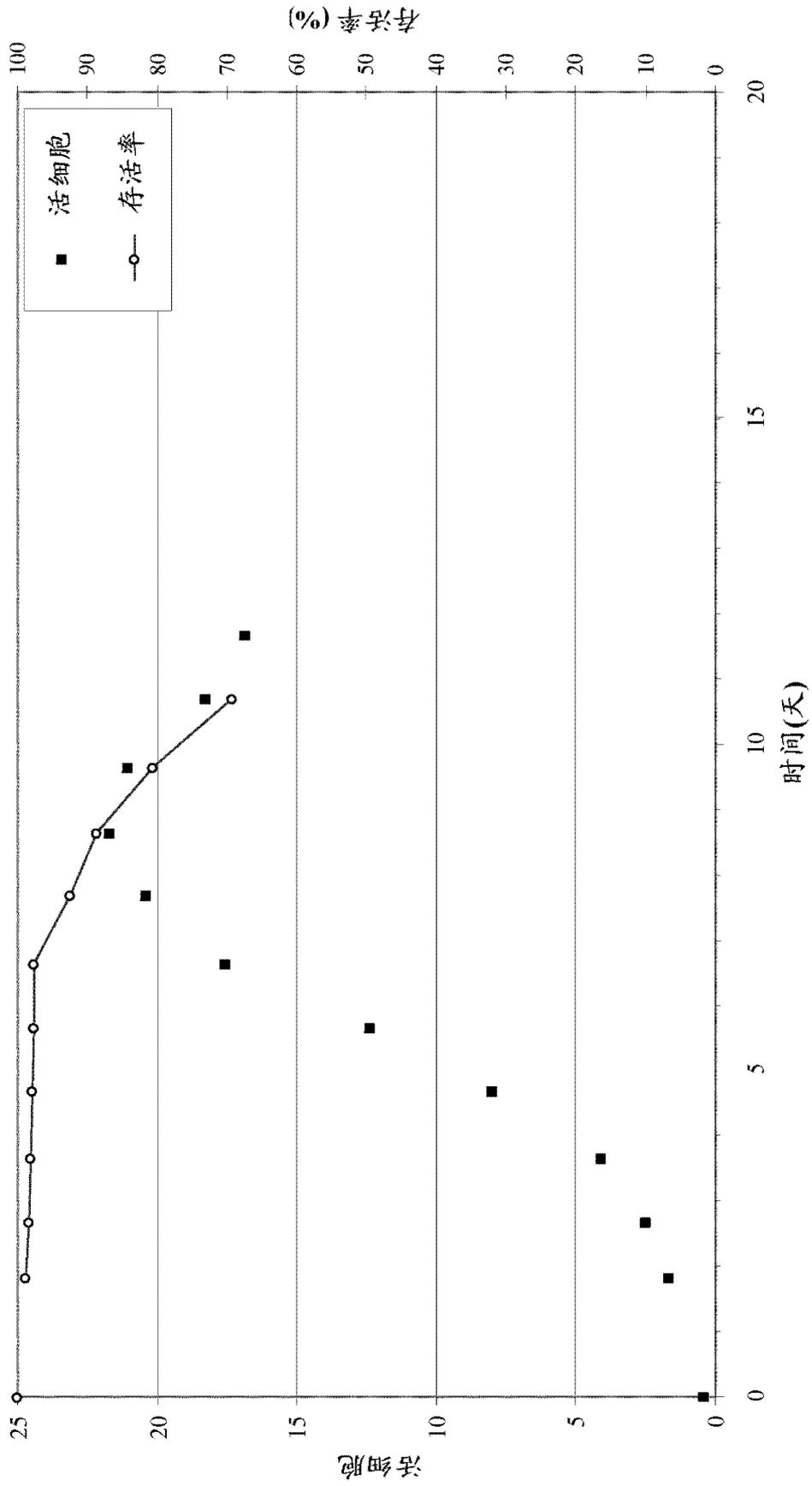


图 3

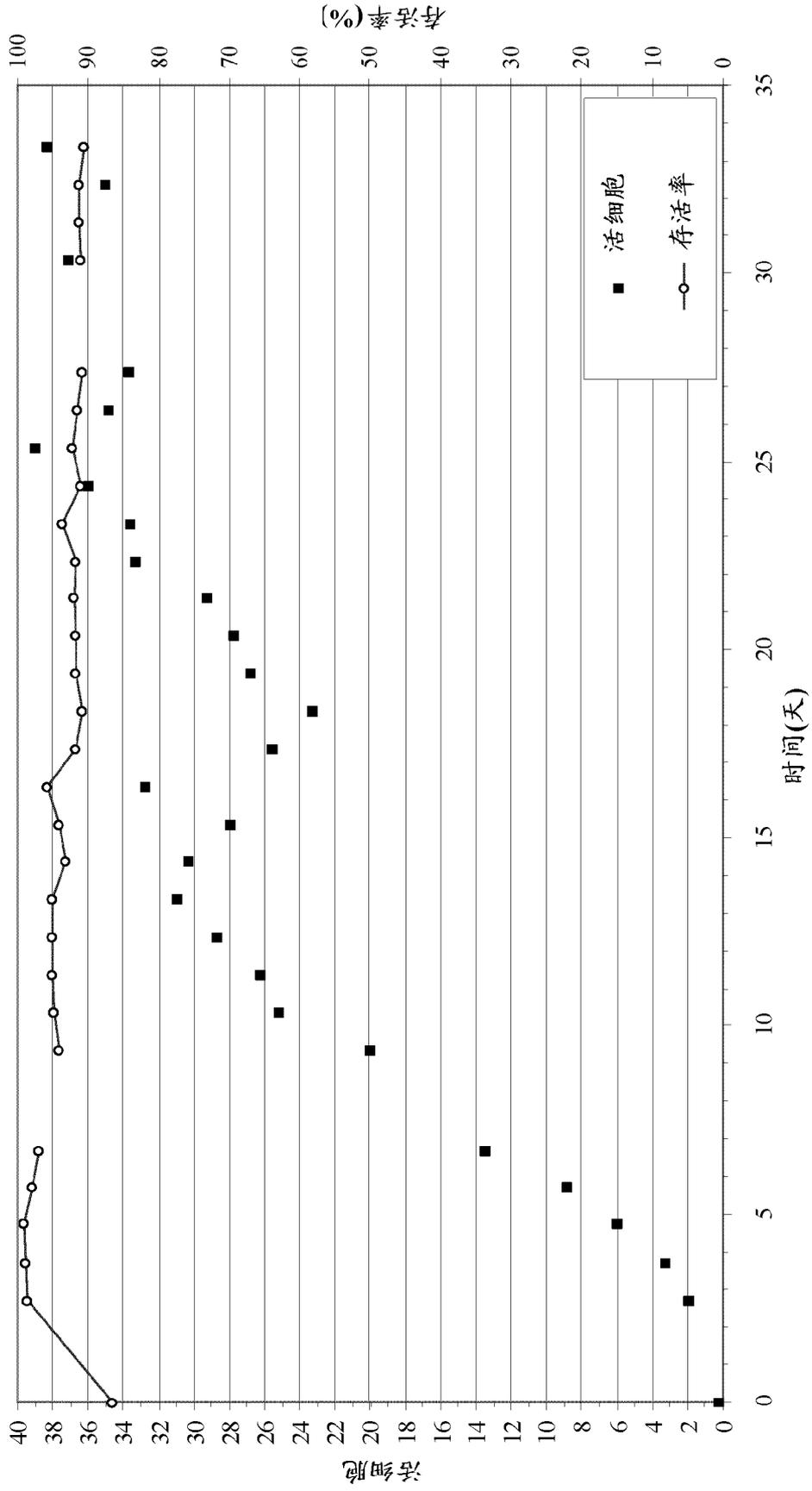


图 4

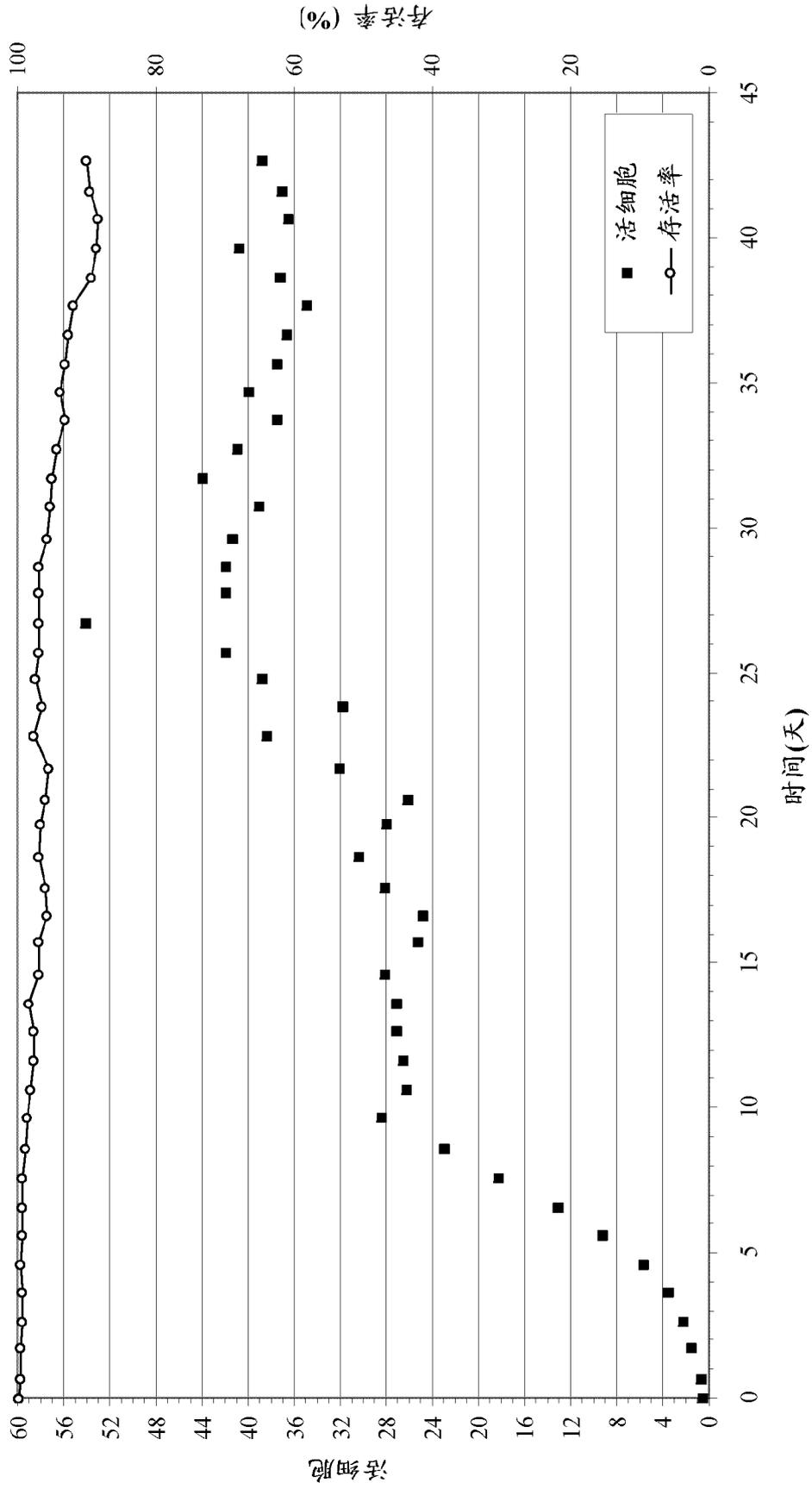


图 5