



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102827905 B

(45)授权公告日 2016.08.31

(21)申请号 201210189727.X

(22)申请日 2005.08.26

(30)优先权数据

60/604,941 2004.08.27 US

60/605,074 2004.08.27 US

60/605,097 2004.08.27 US

(62)分案原申请数据

200580036899.1 2005.08.26

(73)专利权人 辉瑞爱尔兰药品合伙公司

地址 爱尔兰科克郡

(72)发明人 D·德拉波 Y-T·卢安

J·R·梅瑟 W·王

D·R·拉斯科

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 张莉 黄革生

(51)Int.Cl.

C12P 21/02(2006.01)

(56)对比文件

US 2004142382 A1, 2004.07.22,

WO 9524484 A1, 1995.09.14,

WO 02101019 A2, 2002.12.19,

WO 02101019 A2, 2002.12.19,

审查员 苏保卫

权利要求书7页 说明书61页 附图37页

(54)发明名称

多肽的生产

(57)摘要

本发明提供在细胞培养物中大规模生产蛋白质和/或多肽的改良系统,特别是在具有下列一项或多项特征的培养基中:i)累积氨基酸浓度大于约70mM;ii)累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于约2;iii)累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于约0.2;iv)累积无机离子与累积总氨基酸的摩尔比率为约0.4至1;或v)谷氨酰胺与天冬酰胺的组合累积浓度在约16mM和36mM之间。此类系统的应用使能够产生高水平的蛋白质,并减少某些不良因子如铵盐和/或乳酸盐的蓄积。此外,(本发明)还提供了包括温度改变的培养方法,通常包括当培养物达到其最大细胞密度约20-80%时降低温度。备选地或额外地,本发明提供了使培养物中乳酸盐和/或铵盐水平达到峰值后降低的方法。

1. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法,包括步骤:

提供细胞培养物,其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因可在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞;以及

含有谷氨酰胺的培养基,该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2,且

该培养基具有选自以下的培养基特征:(i)累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于0.2,(ii)累积无机离子与累积总氨基酸的摩尔比率为0.4至1,(iii)每单位体积谷氨酰胺与天冬酰胺的组合累积量大于16mM,及其组合;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间,以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

2. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法,包括步骤:

提供细胞培养物,其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因可在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞;以及

含有谷氨酰胺的培养基,该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2,且

所述培养基具有选自以下的两项培养基特征:(i)累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于0.2,(ii)累积无机离子与累积总氨基酸的摩尔比率为0.4至1,(iii)每单位体积谷氨酰胺与天冬酰胺的组合累积量大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间,以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

3. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法,包括步骤:

提供细胞培养物,其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因可在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞;以及

含有谷氨酰胺的培养基,该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2;且

累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于0.2;且

所述培养基具有选自以下的培养基特征:(i)累积无机离子与累积总氨基酸的摩尔比率为0.4至1,和(ii)每单位体积谷氨酰胺与天冬酰胺的组合累积量大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间,以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

4. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法,包括步骤:

提供细胞培养物,其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因可在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞;以及

含有谷氨酰胺的培养基,该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2;且

累积无机离子与累积总氨基酸的摩尔比率为0.4至1,

累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于0.2,且每单位体积谷氨酰胺与天冬酰胺的组合累积量大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间,以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

5. 权利要求1的方法,其中所述改变至少一个培养条件步骤中的所述细胞培养条件选自:(i)温度,(ii)pH,(iii)重量摩尔渗透压浓度,(iv)化学诱导物水平,及其组合。

6. 权利要求1的方法,其中所述培养基的起始谷氨酰胺浓度小于或等于13mM。

7. 权利要求1的方法,其中所述培养基的起始谷氨酰胺浓度小于或等于10mM。

8. 权利要求1的方法,其中所述培养基的起始谷氨酰胺浓度小于或等于7mM。

9. 权利要求1的方法,其中所述培养基的起始谷氨酰胺浓度小于或等于4mM。

10. 权利要求1的方法,其中所述培养基中谷氨酰胺的每单位体积总累积量小于或等于13mM。

11. 权利要求1的方法,其中所述培养基中谷氨酰胺的每单位体积总累积量小于或等于10mM。

12. 权利要求1的方法,其中所述培养基中谷氨酰胺的每单位体积总累积量小于或等于7mM。

13. 权利要求1的方法,其中所述培养基中谷氨酰胺的每单位体积总累积量小于或等于4mM。

14. 权利要求1的方法,其中仅在细胞培养初始向起始培养基提供谷氨酰胺。

15. 权利要求1的方法,其中培养基中可溶性铁的浓度大于5 μ M。

16. 权利要求1的方法,其中周期性测量所述培养物中的活细胞密度。

17. 权利要求1的方法,其中周期性测量所述培养物的存活力。

18. 权利要求1的方法,其中周期性测量所述培养物中的乳酸盐水平。

19. 权利要求1的方法,其中周期性测量所述培养物中的铵盐水平。

20. 权利要求1的方法,其中周期性测量所述培养物的滴度。

21. 权利要求1的方法,其中周期性测量所述培养物的摩尔渗透压浓度。

22. 权利要求16-21中任一项所述的方法,其中所述测量每日进行。

23. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 2×10^2 细胞/mL。

24. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 2×10^3 细胞/mL。

25. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 2×10^4 细胞/mL。

26. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 2×10^5 细胞/mL。
27. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 2×10^6 细胞/mL。
28. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 5×10^6 细胞/mL。
29. 权利要求1的方法,其中所述哺乳动物细胞的起始密度至少为 10×10^6 细胞/mL。
30. 权利要求1的方法,其中提供的步骤包括提供至少1000L培养物。
31. 权利要求1的方法,其中提供的步骤包括提供至少2500L培养物。
32. 权利要求1的方法,其中提供的步骤包括提供至少5000L培养物。
33. 权利要求1的方法,其中提供的步骤包括提供至少8000L培养物。
34. 权利要求1的方法,其中提供的步骤包括提供至少10,000L培养物。
35. 权利要求1的方法,其中提供的步骤包括提供至少12,000L培养物。
36. 权利要求1的方法,其中所述第一组条件包括为30至42摄氏度的第一温度范围。
37. 权利要求1的方法,其中所述第一组条件包括为32至40摄氏度的第一温度范围。
38. 权利要求1的方法,其中所述第一组条件包括为34至38摄氏度的第一温度范围。
39. 权利要求1的方法,其中所述第一组条件包括为36至37摄氏度的第一温度范围。
40. 权利要求1的方法,其中所述第一组条件包括为37摄氏度的第一温度范围。
41. 权利要求1的方法,其中所述第二组条件包括为25至41摄氏度的第二温度范围。
42. 权利要求1的方法,其中所述第二组条件包括为27至38摄氏度的第二温度范围。
43. 权利要求1的方法,其中所述第二组条件包括为29至35摄氏度的第二温度范围。
44. 权利要求1的方法,其中所述第二组条件包括为29至33摄氏度的第二温度范围。
45. 权利要求1的方法,其中所述第二组条件包括为30至32摄氏度的第二温度范围。
46. 权利要求1的方法,其中所述第二组条件包括为31摄氏度的第二温度范围。
47. 权利要求1的方法,还包括继第一次改变至少一个培养条件后的第二次改变步骤,包括改变至少一个培养条件,从而向培养物应用第三组条件。
48. 权利要求47的方法,其中第二次改变步骤包括改变选自以下的至少一个培养条件:
(i)温度,(ii)pH,(iii)重量摩尔渗透压浓度,(iv)化学诱导物水平,及其组合。
49. 权利要求47的方法,其中所述第三组条件包括为25至40摄氏度的第三温度范围。
50. 权利要求47的方法,其中所述第三组条件包括为27至37摄氏度的第三温度范围。
51. 权利要求47的方法,其中所述第三组条件包括为29至34摄氏度的第三温度范围。
52. 权利要求47的方法,其中所述第三组条件包括为30至32摄氏度的第三温度范围。
53. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为0-8天。
54. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为1-7天。
55. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为2-6天。
56. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为3-5天。
57. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为4天。
58. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为5天。
59. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间为6天。
60. 权利要求1的方法,其中所述第一段时间和所述第二段时间的总长度为至少5天。
61. 权利要求1的方法,其中在维持所述培养物第二段时间的步骤中,乳酸盐水平继培养物中乳酸盐水平达到最大水平后下降。

62. 权利要求1的方法, 其中在维持所述培养物第二段时间的步骤中, 铵盐水平继培养物中铵盐水平达到最大水平后下降。

63. 权利要求1的方法, 其中产生多肽的总量比在除了缺少所述培养基特征外的相同培养基中相同条件下生产的多肽总量高至少1.5倍。

64. 权利要求1的方法, 其中产生多肽的总量比在除了缺少所述培养基特征外的相同培养基中相同条件下生产的多肽总量高至少2倍。

65. 权利要求1的方法, 其中还向所述细胞培养物提供增补成分。

66. 权利要求65的方法, 其中所述增补成分于多个时间间隔加入。

67. 权利要求65的方法, 其中所述增补成分选自激素和/或其他生长因子; 选自钠、氯、钙、镁和磷的特定离子; 缓冲液、维生素、核苷或核苷酸、微量元素; 氨基酸; 脂质; 或葡萄糖或其他能源。

68. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法, 包括步骤:

提供细胞培养物, 其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因可在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞; 以及

含有谷氨酰胺的限定培养基, 且该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2;

且该培养基具有至少两项选自以下的培养基特征: (i) 起始氨基酸浓度大于70mM, (ii) 起始谷氨酰胺与天冬酰胺的摩尔比率小于2, (iii) 谷氨酰胺与总氨基酸的摩尔比率小于0.2, (iv) 无机离子与总氨基酸的摩尔比率为0.4至1, 以及(v) 谷氨酰胺与天冬酰胺的组合浓度大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间, 以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件, 从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间, 使多肽在细胞培养物中累积。

69. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法, 包括步骤:

提供细胞培养物, 其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞; 以及

含有谷氨酰胺的限定培养基, 且该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2;

且该培养基具有至少三项选自以下的培养基特征: (i) 起始氨基酸浓度大于70mM, (ii) 起始谷氨酰胺与天冬酰胺的摩尔比率小于2, (iii) 谷氨酰胺与总氨基酸的摩尔比率小于0.2, (iv) 无机离子与总氨基酸的摩尔比率为0.4至1, 以及(v) 谷氨酰胺与天冬酰胺的组合浓度大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间, 以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

70. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法,包括步骤:

提供细胞培养物,其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞;以及

含有谷氨酰胺的限定培养基,且该培养基具有每单位体积大于8mM的天冬酰胺累积总量、每单位体积大于70mM的累积氨基酸量、和累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于2;

且该培养基具有至少四项选自以下的培养基特征:(i)起始氨基酸浓度大于70mM,(ii)起始谷氨酰胺与天冬酰胺的摩尔比率小于2,(iii)谷氨酰胺与总氨基酸的摩尔比率小于0.2,(iv)无机离子与总氨基酸的摩尔比率为0.4至1,以及(v)谷氨酰胺与天冬酰胺的组合浓度大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间,以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

71. 在大规模生产细胞培养物中生产多肽的方法,包括步骤:

提供细胞培养物,其包括;

含有目的多肽编码基因且该基因在细胞培养条件下表达的哺乳动物细胞;以及

含有谷氨酰胺的限定培养基,

其特征在于:(i)起始每单位体积中天冬酰胺的总量大于8mM,(ii)起始氨基酸浓度大于70mM,(iii)谷氨酰胺与天冬酰胺的摩尔比率小于2,(iv)谷氨酰胺与总氨基酸的摩尔比率小于0.2,(v)无机离子与总氨基酸的摩尔比率为0.4至1,以及(v)谷氨酰胺与天冬酰胺的组合浓度大于16mM;

将所述培养物在起始生长阶段在第一组培养条件下维持足够长的第一段时间,以使所述细胞增殖至活细胞密度达到所述培养物在此第一组培养条件下可达到的最大可能活细胞密度的20%-80%范围;

改变至少一个培养条件,从而应用第二组培养条件;

将所述培养物在第二组培养条件下维持第二段时间,使多肽在细胞培养物中累积。

72. 权利要求1-4或68-71中任一项的方法,其中:

乳酸盐水平低于在除了缺少所述培养基特征外的相同培养基中相同条件下的观测水平;

铵盐水平低于在除了缺少所述培养基特征外的相同培养基中相同条件下的观测水平;且

产生多肽的总量至少与在除了缺少所述培养基特征外的相同培养基中相同条件下所观测的一样高。

73. 权利要求1的方法,其中在生产所述多肽的过程中不向所述培养物中添加额外成分。

74. 权利要求1的方法,其中在生产所述多肽的过程中不向所述培养物中添加额外的谷氨酰胺。

75. 权利要求1的方法,其中在转变为第二组培养条件的所述步骤前,所述培养物中谷氨酰胺浓度基本耗尽。

76. 权利要求1的方法,其中在转变为第二组培养条件的所述步骤的同时,所述培养物中谷氨酰胺浓度基本耗尽。

77. 权利要求1的方法,其中用甘氨酸替代所述培养物中的谷氨酰胺。

78. 权利要求1的方法,其中每单位体积所述培养基中组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和脯氨酸的累积总量大于25mM。

79. 权利要求1的方法,其中每单位体积所述培养基中组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和脯氨酸的累积总量大于35mM。

80. 权利要求1的方法,其中每单位体积所述培养基中组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和脯氨酸的起始总量大于25mM。

81. 权利要求1的方法,其中每单位体积所述培养基内组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和脯氨酸的起始总量大于35mM。

82. 权利要求1的方法,其中所述培养基具有选自以下的培养基特征:

- (i) 每单位体积中组氨酸累积总量大于1.7mM;
- (ii) 每单位体积中异亮氨酸累积总量大于3.5mM;
- (iii) 每单位体积中亮氨酸累积总量大于5.5mM;
- (iv) 每单位体积中甲硫氨酸累积总量大于2.0mM;
- (v) 每单位体积中苯丙氨酸累积总量大于2.5mM;
- (vi) 每单位体积中色氨酸累积总量大于1.0mM;
- (vii) 每单位体积中酪氨酸累积总量大于2.0mM; 和
- (viii) 每单位体积中脯氨酸累积总量大于2.5mM。

83. 权利要求1的方法,其中所述培养基具有选自以下的培养基特征:

- (i) 每单位体积中组氨酸起始量大于1.7mM;
- (ii) 每单位体积中异亮氨酸起始量大于3.5mM;
- (iii) 每单位体积中亮氨酸起始量大于5.5mM;
- (iv) 每单位体积中甲硫氨酸起始量大于2.0mM;
- (v) 每单位体积中苯丙氨酸起始量大于2.5mM;
- (vi) 每单位体积中色氨酸起始量大于1.0mM;
- (vii) 每单位体积中酪氨酸起始量大于2.0mM; 和
- (viii) 每单位体积中脯氨酸起始量大于2.5mM。

84. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积丝氨酸累积总量大于7mM。

85. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积丝氨酸累积总量大于10mM。

86. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积天冬酰胺累积总量大于8mM。

87. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积天冬酰胺累积总量大于12mM。

88. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积天冬酰胺起始总量大于8mM。

89. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积天冬酰胺起始总量大于12mM。

90. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积磷的累积总量大于2.5mM。
91. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积磷的累积总量大于5mM。
92. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积谷氨酸的累积总量小于1mM。
93. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积泛酸钙的累积总量大于8mg/L。
94. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积泛酸钙的累积总量大于20mg/L。
95. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积烟酰胺的累积总量大于7mg/L。
96. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积烟酰胺的累积总量大于25mg/L。
97. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积吡哆醇和吡哆醛的累积总量大于5mg/L。
98. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积吡哆醇和吡哆醛的累积总量大于35mg/L。
99. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积核黄素的累积总量大于1.0mg/L。
100. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积核黄素的累积总量大于2.0mg/L。
101. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积盐酸硫胺素的累积总量大于7mg/L。
102. 权利要求1的方法,其中所述培养基中每单位体积盐酸硫胺素的累积总量大于35mg/L。
103. 权利要求1—21、23—71和73—102中任一项的方法,其中所述多肽为抗GDF-8。
104. 权利要求1—21、23—71和73—102中任一项的方法,其中所述多肽为抗LewY。

多肽的生产

[0001] 本申请是申请日为2005年8月26日的、发明名称为“多肽的生产”的中国专利申请200580036899.1(PCT/US2005/030437)的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2004年8月27日递交的临时专利申请号60/605,097、60/604,941和60/605,074的优先权,均在此处整体引用作为参考。

[0004] 发明背景

[0005] 蛋白质和多肽作为治疗物质已日益重要。大多数情况下,治疗性蛋白质和多肽产生于细胞培养物中,所述细胞经过基因工程操作和/或选择以产生非比寻常的高水平特定目的蛋白质或多肽。细胞培养条件的调控和优化对于蛋白质和多肽的成功商业化生产至关重要。

[0006] 许多在细胞培养物中生产的蛋白质和多肽均系分批或补料分批方法产生,其中将细胞培养一段时间,然后终止培养并分离产生的蛋白质或多肽。细胞培养条件能显著影响所产生蛋白质或多肽的最终数量和质量。例如,常规分批或补料分批培养方法常常导致产生对细胞增殖、存活力以及目的蛋白质和多肽的产生或稳定性有不良影响的代谢废物。尽管已经努力改善分批或补料分批培养方法中蛋白质和多肽的生产,仍然有进一步改进的需要。

[0007] 此外,也投入了大量的精力以发展用于培养细胞(特别是哺乳动物细胞)的限定培养基(即由已知单个成分组合的、缺乏血清或其他动物性副产物的培养基)。细胞在限定培养基中的生长特性相对于血清来源培养基中可能有很大差别。尤其需要发展出在限定培养基的细胞培养物中产生蛋白质和多肽的改良系统。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了在细胞培养物中大规模生产蛋白质和/或多肽的改良系统。例如,本发明提供了利用培养基进行商业规模(如500L或更多)培养的方法,所述培养基具有下列一项或多项的特征:i)每单位体积中累积氨基酸量大于约70mM;ii)累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于约2;iii)累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于约0.2;iv)累积无机离子与累积总氨基酸的比率为约0.4至1;或v)每单位体积谷氨酰胺与天冬酰胺浓度的组合累积量大于约16mM。本领域普通技术人员理应知道上文所用的“累积”是指,在细胞培养过程中加入的特定成分的总量,包括在培养起始时加入的成分以及其后加入的成分。在本发明的某些优选实施方案中,期待将培养期间的“补料”减少到最小,因此需要最大化培养起始时的量。当然培养基成分在培养期间被代谢,因此如果在不同时间加入某些成分(例如全部于起始时加入和一些通过补料加入),则特定成分累积量相同的培养基的绝对水平会有所差异。

[0010] 根据本发明,此类培养基的应用能提高蛋白质产生的水平,并减少某些不良因子如铵盐和/或乳酸盐的蓄积。

[0011] 本领域的普通技术人员知道,本发明的培养基配方包括限定和非限定培养基。在本发明的某些优选实施方案中,培养基为成分已知并受控的限定培养基。

[0012] 在本发明的某些优选实施方案中,培养方法包括将第一组培养条件变为第二组培养条件,从而改变细胞的代谢。在某些实施方案中,当培养物达到其最大细胞密度约20-80%时实施这一改变。在某些实施方案中,所述改变包括改变培养物的维持温度(或温度范围)。备选地或额外地,本发明提供了调整的方法,以使培养物中乳酸盐和/或铵盐水平在达到峰值后随时间而下降。在其他实施方案中,所述改变包括改变pH值、摩尔渗透压浓度或化学物诱导物如链烷酸或其盐的水平。

[0013] 本发明的细胞培养物可任选添加营养素和/或其他培养基成分,包括激素和/或其他生长因子、特定离子(如钠、氯、钙、镁和磷)、缓冲液、维生素、核苷或核苷酸、微量元素(终浓度通常极低的无机化合物)、氨基酸、脂质或葡萄糖或其他能源。在本发明的某些实施方案中,向培养基中添加化学诱导物如六亚甲基二乙酰胺(“HMB”)和丁酸钠(“NaB”)是有利的。这些任选增补剂可在培养起始时加入,或者稍后加入以补充消耗的营养素或以备他用。一般而言,期望根据本发明需要选择初始培养基成分以使添加降至最低。

[0014] 可监测本发明的多种培养条件,包括pH、细胞密度、细胞存活力、乳酸盐水平、铵盐水平、摩尔渗透压浓度或表达的多肽或蛋白质的滴度。

[0015] 附图简述

[0016] 图1显示了利用抗GDF-8细胞对摇瓶中培养基1和培养基2的比较。

[0017] 图2显示了培养基1中抗GDF-8细胞的细胞生长和存活力。

[0018] 图3显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和无谷氨酰胺补料培养条件下的细胞生长。

[0019] 图4显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和无谷氨酰胺补料培养条件下的细胞存活力。

[0020] 图5显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和无谷氨酰胺补料培养条件下的铵盐水平。

[0021] 图6显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和无谷氨酰胺补料培养条件下的乳酸盐水平。

[0022] 图7显示了在对照和无谷氨酰胺补料培养条件下的抗GDF-8滴度。

[0023] 图8显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和谷氨酰胺饥饿的补料培养条件下的细胞密度。

[0024] 图9显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和谷氨酰胺饥饿的补料培养条件下的细胞存活力。

[0025] 图10显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和谷氨酰胺饥饿的培养条件下的铵盐水平。

[0026] 图11显示了抗GDF-8细胞培养物在对照和谷氨酰胺饥饿的培养条件下的乳酸盐水平。

[0027] 图12显示了在对照和谷氨酰胺饥饿的培养条件下的抗GDF-8滴度。

[0028] 图13显示了培养基1和培养基2中抗GDF-8细胞的铁剂量应答。

[0029] 图14显示了补充了谷氨酸和谷氨酰胺的培养物中的细胞密度。

[0030] 图15显示了补充了谷氨酸和谷氨酰胺的培养物中的细胞存活力。

[0031] 图16显示了补充了谷氨酸和谷氨酰胺的培养物中的抗Lewis Y滴度。

[0032] 图17显示了补充了谷氨酸和谷氨酰胺的培养物中的乳酸盐水平。

[0033] 图18显示了补充了谷氨酸和谷氨酰胺的培养物中的铵盐水平。

- [0034] 图19显示了补充了谷氨酸和谷氨酰胺的培养物的摩尔渗透压浓度。
- [0035] 图20显示了抗Lewis Y细胞的细胞密度。每一曲线为相同条件下生长的两只摇瓶的平均值。
- [0036] 图21显示了抗Lewis Y细胞的细胞存活力。每一曲线为相同条件下生长的两只摇瓶的平均值。
- [0037] 图22显示了抗Lewis Y培养物的平均滴度。每一曲线为相同条件下生长的两只摇瓶的平均值。
- [0038] 图23显示了抗Lewis Y细胞的铵盐水平。每一曲线为相同条件下生长的两只摇瓶的平均值。
- [0039] 图24显示了补料分批培养中所用的叶轮窜动。
- [0040] 图25显示了多种试验条件下抗GDF-8细胞的细胞生长。
- [0041] 图26显示了多种试验条件下抗GDF-8细胞的存活力。
- [0042] 图27显示了多种试验条件下的抗GDF-8滴度。
- [0043] 图28显示了多种试验条件下抗GDF-8培养物的乳酸盐水平。
- [0044] 图29显示了多种试验条件下抗GDF-8培养物的铵盐水平。
- [0045] 图30显示了多种试验条件下抗GDF-8细胞的细胞生长。
- [0046] 图31显示了多种试验条件下的抗GDF-8滴度。
- [0047] 图32显示了多种试验条件下抗GDF-8培养物的乳酸盐水平。
- [0048] 图33显示了多种试验条件下抗GDF-8培养物的铵盐水平。
- [0049] 图34显示了在含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中抗GDF-8细胞的细胞生长。
- [0050] 图35显示了在含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中抗GDF-8细胞的细胞存活力。
- [0051] 图36显示了在含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中抗GDF-8培养物的乳酸盐水平。
- [0052] 图37显示了在含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中抗GDF-8培养物的铵盐水平。
- [0053] 图38显示了在不同水平含谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中抗GDF-8培养物的谷氨酰胺水平。
- [0054] 图39显示了含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中的抗GDF-8滴度。
- [0055] 图40显示了在含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺的改良培养基9中抗GDF-8培养物的摩尔渗透压浓度。
- [0056] 图41显示了在含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中抗GDF-8细胞的细胞生长。
- [0057] 图42显示了在含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中抗GDF-8培养物的乳酸盐水平。
- [0058] 图43显示了在含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中抗GDF-8培养物的铵盐水平。
- [0059] 图44显示了在含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中抗GDF-8培养物的谷

氨酰胺水平。

[0060] 图45显示了在含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中抗GDF-8培养物的谷氨酸水平。

[0061] 图46显示了含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中的抗GDF-8滴度。

[0062] 图47显示了在含不同水平天门冬酰胺和半胱氨酸的培养基中抗GDF-8培养物的摩尔渗透压浓度。

[0063] 图48显示了在含不同水平氨基酸和维生素的培养基中抗GDF-8细胞的细胞生长。

[0064] 图49显示了在含不同水平氨基酸和维生素的培养基中抗GDF-8培养物的乳酸盐水平。

[0065] 图50显示了在含不同水平氨基酸和维生素的培养基中抗GDF-8培养物的铵盐水平。

[0066] 图51显示了在含不同水平氨基酸和维生素的培养基中抗GDF-8培养物的谷氨酰胺水平。

[0067] 图52显示了含不同水平氨基酸和维生素的培养基中的抗GDF-8滴度。

[0068] 图53显示了在含不同水平维生素、微量元素E和铁的培养基中抗GDF-8细胞的细胞生长。

[0069] 图54显示了在含不同水平维生素、微量元素E和铁的培养基中抗GDF-8培养物的乳酸盐水平。

[0070] 图55显示了在含不同水平维生素、微量元素E和铁的培养基中抗GDF-8培养物的铵盐水平。

[0071] 图56显示了含不同水平维生素、微量元素E和铁的培养基中的抗GDF-8滴度。

[0072] 图57显示了在培养基1、3和9中抗GDF-8细胞的细胞生长。

[0073] 图58显示了培养基1、3和9中的抗GDF-8滴度。

[0074] 图59显示了含不同水平谷氨酰胺以及含不同水平谷氨酰胺和天门冬酰胺组合总量时的外推抗GDF-8滴度。

[0075] 图60显示了在多种测试培养基条件下抗Aβ细胞的细胞生长。

[0076] 图61显示了在多种测试培养基条件下抗Aβ细胞的存活力。

[0077] 图62显示了在多种测试培养基条件下抗Aβ培养物的乳酸盐水平。

[0078] 图63显示了在多种测试培养基条件下抗Aβ培养物的铵盐水平。

[0079] 图64显示了多种测试培养基条件下的抗Aβ滴度。

[0080] 图65显示了在多种测试培养基条件下抗Aβ培养物的摩尔渗透压浓度。

[0081] 图66显示了在多种试验条件下表达TNFR-Ig的细胞的细胞生长。

[0082] 图67显示了在多种试验条件下表达TNFR-Ig的细胞的存活力。

[0083] 图68显示了在多种试验条件下表达TNFR-Ig的细胞培养物中的残留葡萄糖。

[0084] 图69显示了在多种试验条件下表达TNFR-Ig的细胞培养物中的谷氨酰胺水平。

[0085] 图70显示了在多种试验条件下表达TNFR-Ig的细胞培养物中的乳酸盐浓度。

[0086] 图71显示了在多种试验条件下表达TNFR-Ig的细胞培养物中的铵盐水平。

[0087] 图72显示了多种试验条件下的TNFR-Ig相对滴度。

[0088] 图73显示了生长于6000L和1L生物反应器内的抗GDF-8细胞的细胞密度。

[0089] 图74显示了生长于6000L和1L生物反应器内的抗GDF-8细胞的滴度。

[0090] 图75显示了生长于6000L和1L生物反应器内的抗GDF-8细胞的乳酸盐水平。

[0091] 图76显示了生长于6000L和1L生物反应器内的抗GDF-8细胞的铵盐水平。

[0092] 定义

[0093] “约”、“大约”：当此处所用的术语“约”和“大约”用于一种或多种具体细胞培养条件时，是指与所述培养条件下指定的参考值相似的一系列值。在某些实施方案中，术语“约”是指处在所述培养条件下指定参考值的百分之25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1或更小范围的系列值。

[0094] “氨基酸”：此处所用的术语“氨基酸”，指用于常规制备多肽的20种天然氨基酸中的任意一种，或所述氨基酸的类似物或衍生物。本发明中于培养基内向细胞培养物提供氨基酸。培养基中所含的氨基酸可为盐或水合物形式。

[0095] “抗体”：此处所用的术语“抗体”，是指免疫球蛋白分子或免疫球蛋白分子的免疫活性部分，如Fab或F(ab')₂片段，其含有一个或多个能与抗原特异性结合(免疫反应)的抗原结合位点。此处所用的术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”，是指仅含有一种能与特定抗原表位发生免疫反应的抗原结合位点的抗体分子克隆群，而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指含有多种能与某一特定抗原相互作用的抗原结合位点的抗体分子群。单克隆抗体的定义既包括了常规技术得到的克隆分子，也包括了通过操作或变异特定残基得到的指定序列分子，如人源化抗体。

[0096] “分批培养”：此处所用的术语“分批培养”是一种细胞培养方法，其中所有最终将用于培养细胞的成分均于培养过程起始时加入，包括培养基(见下文“培养基”定义)和细胞本身。一般在某一点终止分批培养，收集培养基中的细胞和/或成分，并任选纯化之。

[0097] “生物反应器”：此处所用的术语“生物反应器”是指用于哺乳动物细胞培养物生长的任何容器。只要能用于培养哺乳动物细胞，生物反应器可为任意大小。一般而言，生物反应器为至少1升，也可10、100、250、500、1000、2500、5000、8000、10,000、12,000升或更大，或其间任意容积。一般在培养期间调控生物反应器的内部条件，包括但不限于pH和温度。生物反应器可以由适于容纳在本发明培养条件下悬浮于培养基内的哺乳动物细胞培养物的任何材料构成，包括玻璃、塑料或金属。此处所用的术语“生产生物反应器”是指用于生产目的多肽或蛋白质的终末生物反应器。大规模细胞培养物生产生物反应器的容积一般至少为500升，也可1000、2500、5000、8000、10,000、12,000升或更大，或其间任意容积。本领域普通技术人员应当了解并能够选择合适的生物反应器用于实施本发明。

[0098] “细胞密度”：此处所用的术语“细胞密度”是指在指定体积培养基中存在的细胞数目。

[0099] “细胞存活力”：此处所用的术语“细胞存活力”是指培养物中的细胞在一组指定培养条件或试验变量下存活的能力。此处所用的术语也指在某一特定时间内存活的那部分细胞与该时间培养物中活细胞和死细胞总数之间的关系。

[0100] “培养物”、“细胞培养物”和“哺乳动物细胞培养物”：此处所用的这些术语是指在适于细胞群存活和/或生长的条件下，悬浮于培养基(见下文“培养基”定义)内的哺乳动物细胞群。对本领域普通技术人员显而易见的是，此处所用的这些术语也指包含哺乳动物细胞群和细胞群悬浮于其中的培养基的组合。

[0101] “补料分批培养”：此处所用的术语“补料分批培养”是在培养过程起始后的某一时间向培养物内加入额外成分的细胞培养方法。所提供的成分一般包括在培养过程中已消耗的细胞营养添加剂。一般在某一点终止补料分批培养，收集培养基中的细胞和/或成分，并任选纯化之。

[0102] “片段”：此处所用的术语“片段”指多肽并且被定义为给定多肽中特有的或特征性的任意分离部分。此处所用的该术语也指给定多肽中保留至少部分全长多肽活性的任意分离部分。优选保留的活性部分至少为全长多肽活性的10%。更优选保留的活性部分至少为全长多肽活性的20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。更优选保留的活性部分至少为全长多肽活性的95%、96%、97%、98%或99%。最优选保留的活性部分为全长多肽活性的100%。此处所用的该术语也指包括全长多肽中至少一个确定序列元件的指定多肽的任意部分。优选该序列元件跨越全长多肽的至少4-5个，更优选至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多氨基酸。

[0103] “基因”：此处所用的术语“基因”指DNA或RNA的任意核苷酸序列，其中至少某些部分编码分离的在细胞代谢或发育的某些方面发挥作用的终产物，一般为(但不限于)多肽。该术语并非仅指编码多肽或其他分离终产物的编码序列，还包括位于编码序列之前或之后、调节基础表达水平的区域(见下文“遗传控制元件”定义)，以及单个编码区段(“外显子”)之间的插入序列(“内含子”)。

[0104] “遗传控制元件”：此处所用的术语“遗传控制元件”，是指调节与其有效连接的基因表达的任意序列元件。遗传控制元件通过提高或降低表达水平而发挥功能，可位于编码序列之前、之中或之后。通过调节如转录起始、延伸或终止；mRNA剪接、mRNA编辑、mRNA稳定性、mRNA细胞内定位；翻译起始、延伸或终止；或基因表达的任何其他阶段，遗传控制元件可以作用于基因表达的任意阶段。遗传控制元件可以单独作用或彼此联合作用。

[0105] “杂交瘤”：此处所用的术语“杂交瘤”，是指将免疫来源的永生细胞与抗体产生细胞融合而得到的细胞。所产生的杂交瘤为能产生抗体的永生细胞。用于产生杂交瘤的单个细胞可来自任何哺乳动物，包括但不限于大鼠、猪、兔、绵羊、猪、山羊和人。该术语也包括三体瘤细胞系，后者为人细胞和鼠骨髓瘤细胞系融合产生的异杂交骨髓瘤融合体的子代，再与浆细胞融合的产物。此外，该术语还包括任何产生抗体的永生杂交细胞系，例如四体瘤(见如Milstein等人., Nature, 537:3053(1983))。

[0106] “综合活细胞密度”：此处所用的术语“综合活细胞密度”，是指在培养过程中活细胞的平均密度乘以培养持续的时间量。假设产生多肽和/或蛋白质的量与培养过程中存在的活细胞数目成正比，则综合活细胞密度是估计培养过程中产生多肽和/或蛋白质量的有力工具。

[0107] “培养基”、“细胞培养基”：此处所用的这些术语是指含有滋养哺乳动物细胞生长的营养素的溶液。一般而言，这些溶液提供细胞基本生长和/或存活所需的必需和非必需氨基酸、维生素、能源、脂质和微量元素。溶液中也可含有促进最低速率以上生长和/或存活的成分，包括激素和生长因子。所述溶液优选配制为适于细胞存活和增殖的pH和盐浓度。培养基也可“限定培养基”——不含蛋白质、水解产物或未知组合物成分的无血清培养基。限定培养基中不含有动物来源的成分，并且其所有成分均具有已知的化学结构。

[0108] “代谢废物”：此处所用的术语“代谢废物”是指细胞培养物在正常或非正常代谢过

程中产生的、对细胞培养物的某些方面(特别是对所需重组多肽或蛋白质的表达或活性)具有不良作用的化合物。例如,代谢废物可能对细胞培养物的生长或存活力有不良作用,可能减少重组多肽或蛋白质的产量,可能改变表达多肽或蛋白质的折叠、稳定性、糖基化或其他翻译后修饰,可能对细胞和/或重组多肽或蛋白质的表达或活性的任意其他方面具有不良作用。代谢废物的实例包括糖代谢产生的乳酸盐,以及谷氨酰胺代谢产生的铵盐。本发明的目的之一在于减慢哺乳动物细胞培养物中代谢废物的生成,减少或甚至杜绝哺乳动物细胞培养中的代谢废物。

[0109] “摩尔渗透压浓度”和“重量摩尔渗透压浓度”:“重量摩尔渗透压浓度”是对水溶液中溶解的溶质颗粒渗透压的测量。溶质颗粒包括离子和非离子分子。重量摩尔渗透压浓度表示为溶于1kg溶液中渗透活性颗粒的浓度(即渗透压摩尔)(38°C的1mOsm/kg H₂O相当于19mmHg渗透压)。与之相反,“摩尔渗透压浓度”是指溶于1升溶液中溶质颗粒的数目。此处所用的简写“mOsm”指“毫渗透压摩尔/kg溶液”。

[0110] “灌流式培养”:此处所用的术语“灌流式培养”为一种在培养过程起始后,持续或半持续地向培养物中供以额外成分的细胞培养方法。所提供的成分一般包括在培养过程中消耗的细胞营养添加剂。一般在持续或半持续的基础上收集培养基中的细胞和/或成分部分,并任选纯化之。

[0111] “多肽”:此处所用的术语“多肽”是指通过肽键相连的顺序氨基酸链。该术语用以指任意长度的氨基酸链,然而本领域普通技术人员知道该术语不仅指代长链,也可用于指含有通过肽键相连的2个氨基酸的最短链。

[0112] “蛋白质”:此处所用的术语“蛋白质”是指作用如离散单位的一个或多个多肽。如果单个多肽即为离散的功能单位,且不需要与其他多肽的持久物理缔合以形成该独立的功能单位,则此处术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用。如果该离散功能单位由多于一个彼此物理缔合的多肽组成,则此处所用的术语“蛋白质”指物理偶联的并且共同作为离散单位起作用的多个多肽。

[0113] “重组表达多肽”和“重组多肽”:此处所用的这些术语是指从经遗传工程修饰以表达该多肽的哺乳动物宿主细胞中表达的多肽。重组表达多肽可以与哺乳动物宿主细胞内正常表达的多肽相同或相似。重组表达多肽也可为宿主细胞的外源物,即异源于哺乳动物宿主细胞正常表达的多肽。或者重组表达多肽为嵌合多肽,即部分多肽含有与哺乳动物宿主细胞内正常表达的多肽相同或相似的氨基酸序列,而其他部分为宿主细胞外源物。

[0114] “接种”:此处所用的术语“接种”是指将细胞培养物供予生物反应器或另一容器的方法。之前细胞可在另一生物反应器或容器中增殖。或者细胞为冰冻并于供予生物反应器或容器之前解冻。该术语用于指任意数目细胞,包括单个细胞。

[0115] “滴度”:此处所用的术语“滴度”是指由哺乳动物细胞培养物产生的重组表达多肽或蛋白质的总量除以给定量的培养基体积。滴度一般用每毫升培养基毫克多肽或蛋白质的单位表示。

[0116] 某些优选实施方案的详述

[0117] 本发明提供了通过细胞培养物生成蛋白质和/或多肽的改良系统。具体而言,本发明提供了使一种或多种对细胞生长、存活力和/或蛋白质产生或质量有害的代谢产物的产生最小化的系统。在本发明的优选实施方案中,细胞培养物为分批或补料分批培养。其他某

些本发明的优选实施方案将详述于下文。然而,本领域普通技术人员知道多种对这些优选实施方案的修改均处于所附权利要求书的范围内。权利要求书及其等同物定义了本发明的范围,并不限于也不应当限于此处对某些优选实施方案的说明。

[0118] 多肽

[0119] 根据本发明,可以生成任何能在宿主细胞内表达的多肽。该多肽表达自宿主细胞内源性基因,或表达自通过基因工程引入宿主细胞中的基因。该多肽可为天然存在的多肽,也可以具有人工操作或选择的序列。经加工的多肽可为天然存在的其他单个多肽片段组装而成,也可包括一个或多个并非天然存在的片段。

[0120] 能够根据本发明表达的多肽的选择,是基于其目的生物或化学活性。例如,本发明可用于表达任意药物或商业相关的酶、受体、抗体、激素、调节因子、抗原、结合剂等。

[0121] 抗体

[0122] 考虑到目前应用或研究中的用作药物或其他商业物质的抗体数目之巨,本发明的抗体生产具有特别意义。抗体为能特异性结合特定抗原的蛋白质。任何表达于宿主细胞的抗体都可以用于本发明。在优选实施方案中,表达的抗体为单克隆抗体。

[0123] 在另一优选实施方案中,单克隆抗体为嵌合抗体。嵌合抗体含有来源于多于一种生物的氨基酸片段。嵌合抗体分子可包括,例如来自小鼠、大鼠或其他物种抗体的抗原结合结构域和人恒定区。制备嵌合抗体的多种方法已被描述。见如Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81,6851(1985);Takeda等人,Nature 314,452(1985),Cabilly等人,美国专利号4,816,567;Boss等人,美国专利号4,816,397;Tanaguchi等人,欧洲专利出版号EP171496;欧洲专利出版号0173494,英国专利GB 2177096B。

[0124] 在另一优选实施方案中,单克隆抗体为人抗体,如通过应用核糖体展示或噬菌体展示文库得到(见如Winter等人,美国专利号6,291,159和Kawasaki,美国专利号5,658,754),或利用天然抗体基因失活并被人抗体基因功能性替代、而天然免疫系统的其他成分完好的异种移植物种得到(见如Kucherlapati等人,美国专利号6,657,103)。

[0125] 在另一优选实施方案中,单克隆抗体为人源化抗体。人源化抗体为嵌合抗体,其中大部分氨基酸残基来自人抗体,因此将施用于人受试者时的潜在免疫反应降至最低。人源化抗体中互补性决定区域的氨基酸至少部分被非人物种的残基所取代,后者可赋予所需的抗原特异性或亲和力。可以通过本领域已知的若干技术中的任意一种制备此类改变的免疫球蛋白分子(例如Teng等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,80,7308-7312(1983);Kozbor等人,Immunology Today,4,7279(1983);Olsson等人,Meth.Enzymol.,92,3-16(1982)),并优选根据PCT出版号W092/06193或EP0239400的教导制备,均在此处引用作为参考)。人源化抗体可以由如Scotgen Limited,2Holly Road,Twickenham,Middlesex,Great Britain商业化制备。更多参考见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature332:323-329(1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992),均在此处引用作为参考。

[0126] 在另一优选实施方案中,上述单克隆、嵌合或人源化抗体中可能含有自然界任何物种的任何抗体中都不天然存在的氨基酸残基。这些外源性残基可用于,如为单克隆、嵌合或人源化抗体带来新的或改良的特异性、亲和力或效应物功能。在另一优选实施方案中,上述抗体可缀合于药物用于全身性药物治疗,例如毒素、低分子量细胞毒药物、生物应答调节

物和放射性核素(见如Kunz等人,Calicheamicin derivative-carrier conjugates, US20040082764A1)。

[0127] 在一个实施方案中,该抗体特异性结合淀粉样前体蛋白的AB片段或淀粉样斑块的其他成分,且可用于对抗Alzheimer's病特征性大脑中淀粉样斑块的聚集(见如美国临时申请60/636,684)。

[0128] 在另一实施方案中,本发明的抗体针对增殖性疾病如癌症的靶细胞和/或组织中表达的细胞表面抗原。在某一实施方案中,该抗体为IgG1抗Lewis Y抗体。Lewis Y为糖抗原,其结构为**Fuca1**→2Galβ1→4[**Fuca1**→3]GlcNacβ1→3R(Abe等人(1983) J.Biol.Chem.,25811793-11797)。LewisY抗原表达于60%至90%的人上皮肿瘤(包括乳腺、结肠、肺和前列腺上皮肿瘤)的表面,其中至少40%过量表达该抗原,而在正常组织中限量表达。

[0129] 为靶定Ley并有效靶定肿瘤,最好需要对该抗原有专一特异性的抗体。因此,优选本发明的抗Lewis Y抗体不与1型结构(即乳糖系列血型(Lea和Leb))发生交叉反应,且优选不结合其他2型表位(即新乳糖结构)如Lex和H-型2型结构。优选的抗Lewis Y抗体的实例命名为hu3S193(见美国专利号6,310,185;6,518,415;5,874,060,在此处整体引用作为参考)。人源化抗体hu3S193(Attia,M.A.等人.1787-1800)经CDR移植从3S193(Kitamura,K.,12957-12961)产生,3S193为针对腺癌细胞产生的对Ley具有高度特异性的鼠单克隆抗体。Hu3S193不仅保留了3S193对Ley的特异性,而且获得了介导补体依赖性细胞毒作用(以下称为CDC)以及抗体依赖性细胞毒作用(以下称为ADCC)的能力(Attia,M.A.等人1787-1800)。该抗体靶定裸鼠中表达Ley的异种移植物,如利用¹²⁵I、¹¹¹In或¹⁸F,以及需要螯合剂的其他放射性标记如¹¹¹In、^{99m}Tc或⁹⁰Y标记的hu3S193进行生物分布研究所示(Clark等人4804-4811)。

[0130] 在另一实施方案中,抗体为称为Myo29、Myo28及Myo22的人抗GDF-8抗体以及由其衍生的抗体和抗原结合片段之一。这些抗体能高亲和力结合成熟GDF-8,抑制GDF-8的体外和体内活性(如抑制ActRIIB结合和报告基因检测所示),还可抑制与骨骼肌重量和骨密度负调节相关的GDF-8活性。见如Veldman等人,美国专利申请号20040142382。

[0131] 受体

[0132] 可有效作为药物和/或商业物质的另一类多肽包括受体。受体一般为通过识别细胞外信号配体而发挥作用的跨膜糖蛋白。除配体识别结构域外,受体一般还具有蛋白质激酶结构域,后者在结合受体后通过磷酸化细胞内靶分子而起始信号途径,从而导致细胞内发育或代谢改变。在一个实施方案中,修饰目的受体以移除其跨膜和/或细胞内结构域,而可任选以IgG结构域取代之。在优选实施方案中,根据本发明生产的受体为受体酪氨酸激酶(RTK)。RTK家族包括对众多细胞类型中多种功能具有关键作用的受体(见如Yarden和Ullrich,Ann.Rev.Biochem.57:433-478,1988;Ullrich和Schlessinger,Cell 61:243-254,1990,此处引用作为参考)。RTK的非限制性实例包括成纤维细胞生长因子(FGF)受体家族成员、表皮生长因子(EGF)受体家族成员、血小板衍生生长因子(PDGF)受体、携带免疫球蛋白和EGF同源结构域-1(TIE-1)及TIE-2受体的酪氨酸激酶(Sato等人,Nature376(6535):70-74(1995),此处引用作为参考)以及c-Met受体,其中一些似乎能直接或间接促进血管形成(Mustonen和Alitalo,J.Cell Biol.129:895-898,1995)。其他RTK的非限制性实例包括

胎肝激酶1(FLK-1)(有时称为含激酶插入结构域的受体(KDR)(Terman等人,Oncogene6:1677-83,1991)或血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR-2))、fms样酪氨酸激酶-1(Flt-1)(DeVries等人Science 255:989-991,1992;Shibuya等人,Oncogene 5:519-524,1990),有时称为血管内皮细胞生长因子受体1(VEGFR-1)、神经毡蛋白-1、内皮糖蛋白、内皮唾液酸蛋白和Ax1。本领域普通技术人员知道根据本发明优选表达的其他受体。

[0133] 在特别优选的实施方案中,根据本发明表达的肿瘤坏死因子抑配方如肿瘤坏死因子 α 和 β 受体形式(TNFR-1,发表于1991年3月20日的EP417,563;以及TNFR-2,发表于1991年3月20日的EP 417,014)(综述见Naismith和Sprang,J Inflamm.47(1-2):1-7(1995-96),此处引用作为参考)。根据一个实施方案,肿瘤坏死因子抑配方包括可溶性TNF受体及优选TNFR-Ig。在一个实施方案中,本发明优选的TNF抑配方为TNFR I和TNFR II的可溶形式,以及可溶性TNF结合蛋白质。在另一实施方案中,该TNFR-Ig融合物为TNFR:Fc,此处所用的该术语指“依那西普(etanercept)”,其为两分子p75 TNF- α 受体胞外部分的二聚体,每一分子由人IgG亚型1的Fc部分的235个氨基酸组成。

[0134] 生长因子和其他信号分子

[0135] 可有效作为药物和/或商业物质的另一类多肽包括生长因子和其他信号分子。生长因子一般为糖蛋白,其由细胞分泌并结合和活化其他细胞上的受体,起始受体细胞中的代谢或发育改变。在一个实施方案中,目的蛋白质为包括ActRIIB受体胞外结构域和抗体Fc部分的ActRIIB融合多肽(见如Wolfman等人,ActRIIB fusion polypeptides and uses therefor,US2004/0223966A1)。在另一实施方案中,生长因子为修饰的GDF-8前肽(见如Wolfman等人,Modified and stabilized GDF propeptides and uses thereof,US2003/0104406A1)。或者目的蛋白为含滤泡素抑制素结构域的蛋白质(见如Hill等人,GASP1:a follistatin domain containing protein,US2003/0162714A1,Hill等人,GASP1:a follistatin domain containing protein,US 2005/0106154A1,Hill等人,Follistatin domain containing proteins,US2003/0180306A1)。

[0136] 哺乳动物生长因子和其他信号分子的非限制性实例包括:细胞因子;表皮生长因子(EGF);血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子(FGF)如aFGF和bFGF;转化生长因子(TGF)如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素样生长因子I和II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白质如CD-3、CD-4、CD-8和CD-19;红细胞生成素;骨生成诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白质(BMP);干扰素如干扰素 α 、 β 和 γ ;集落刺激因子(CSF)如M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白介素(TL)如IL-1至IL-10;肿瘤坏死因子(TNF) α 和 β ;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;凝血因子如因子VIIIC、因子IX、组织因子和冯维勒布兰德因子;抗凝因子如蛋白C;心钠素;肺表面活性物质;纤溶酶原激活物如尿激酶或人尿或组织型血纤维蛋白溶酶原活化因子(t-PA);蛙皮素;凝血酶、造血生长因子;脑啡肽酶;RANTES(调节激活正常T细胞表达和分泌因子);人巨噬细胞炎症蛋白质(MIP-1- α);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;神经营养因子如骨源神经营养因子(BDNF)、神经营养因子3、4、5或6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6),或神经生长因子如NGF- β 。一名本领域普通技术人员应了解可根据本发明表达的其他生长因子或信号分子。

[0137] G-蛋白偶联受体

[0138] 可有效作为药物和/或商业物质的另一类多肽包括生长因子和/或其他信号分子。G-蛋白偶联受体(GPCR)为具有7个跨膜结构域的蛋白质。一旦配体与GPCR结合,将在细胞内转导信号,从而使细胞的生物或生理性质发生改变。

[0139] GPCR以及G蛋白和效应物(受G蛋白调控的胞内酶和通道),是将细胞内第二信使状态和细胞外输入相联系的调节信号系统的组分。这些基因和基因产物是疾病的潜在诱因。

[0140] 视紫红质基因和V2血管加压素受体基因的特定缺陷会导致多种形式的常染色体显性和常染色体隐性视网膜色素变性、肾性尿崩症。这些受体对于中枢神经系统和外周生理过程都至关重要。GPCR蛋白质超家族目前包括250种以上的旁系同源物(基因复制(或其他过程)产生的变体受体),与之对应的直系同源物为不同物种的相同受体。该超家族可分为5个家族:家族I,以视紫红质和 β_2 肾上腺素受体为代表的受体,目前具有200以上的独特成员;家族II,最近表征的甲状旁腺激素/降钙素/胰泌素受体家族;家族III,哺乳动物代谢型谷氨酸受体家族;家族IV,cAMP受体家族,在化学趋化作用和盘基网柄菌(*D. discoideum*)的发育中具有重要作用;以及家族V,真菌交配信息素受体如STE2。

[0141] GPCR包括生物胺、炎症脂质介质、肽激素和感觉信号介质的受体。当受体结合其细胞外配体时GPCR被活化。配体-受体相互作用引发的GPCR构象改变,会影响G蛋白对GPCR胞内结构域的结合亲和力。这使得GTP以增强的亲和力结合于G蛋白。

[0142] 由GTP活化G蛋白,引发了G蛋白 α 亚基与腺苷酸环化酶或其他第二信使分子产生物间的相互作用。这一相互作用调节腺苷酸环化酶的活性,继而调节了第二信使分子cAMP的产生。cAMP调节其他细胞内蛋白质的磷酸化和活化。备选地,GPCR的活性也可上调或下调其他第二信使分子如cGMP或eicosinoid的细胞水平。GTPase水解GTP失活G蛋白 α 亚基,随后 α 、 β 和 γ 亚基重新组合。然后异三聚体G蛋白从腺苷酸环化酶或其他第二信使分子产生物上脱落下来。也可通过细胞内和细胞外结构域或环的磷酸化调节GPCR的活性。

[0143] 谷氨酸受体构成了一组在神经传导中很重要的GPCR。谷氨酸为中枢神经系统中的主要神经递质,在神经元可塑性、认知、记忆、学习和某些神经系统疾病如癫痫、中风和神经变性中起重要作用(Watson,S.和S.Arkininstall(1994)*The G-Protein Linked Receptor Facts Book*,Academic Press,San Diego CA,130-132页)。谷氨酸的这些作用主要通过两类不同的受体介导,即离子型和代谢型。离子型受体含有内源性阳离子通道并介导谷氨酸的快速激动性作用。代谢型受体为调节性受体,通过抑制钙依赖性钾电导并同时抑制和加强离子型受体的兴奋性传导,提高神经元的膜兴奋性。代谢型受体基于激动剂药理学和信号转导途径可分为5个亚类,并广泛分布于脑组织中。

[0144] 血管活性肠肽(VIP)家族为一组也通过GPCR介导作用的相关多肽。该家族的核心成员为VIP本身、胰泌素和生长激素释放因子(GRF)。VIP具有广泛的生理作用,包括松弛平滑肌、刺激或抑制多种组织中的分泌、调节中枢神经系统中多种免疫细胞活性以及多种兴奋性或抑制性活性。胰泌素刺激胰腺和肠中酶和离子的分泌,在脑中少量存在。GRF为重要的神经内分泌物质,调节腺垂体中生长激素的合成和释放(Watson,S.和S.Arkininstall同上,278-283页)。

[0145] 配体结合GPCR后,构象变化传递到G蛋白,导致 α 亚基将结合的GDP分子更换为GTP分子,并从 β 、 γ 亚基上解离下来。 α 亚基的GTP结合形式一般作用如效应物调节部分,导致第二信使的产生,如环化AMP(如通过腺苷酸环化酶的活化)、甘油二酯或肌醇磷酸。已知人有

多于20种不同类型的 α 亚基,与较少类型的 β 和 γ 亚基相连。哺乳动物G蛋白的实例包括Gi、Go、Gq、Gs和Gt。G蛋白详述于Lodish H.等人Molecular Cell Biology中(Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995),其内容在此处引用作为参考。

[0146] GPCR为药物作用和研发的主要靶位。实际上,目前已知药物的一半以上均为受体所致(Drews, Nature Biotechnology, 1996, 14:1516),而GPCR为治疗干预最重要的靶位,临床用药的30%为GPCR的拮抗剂或激动剂(Milligan, G. 和 Rees, S., (1999) TIPS, 20:118-124)这表明,这些受体作为治疗物质已有确定的且经证实的历史。

[0147] 一般而言,本发明的实施者会选择其目的多肽,并已知其准确的氨基酸序列。本发明的技术已经成功应用于生产多样化多肽,其包括如针对生长和分化因子8的人单克隆抗体(实施例1、3、4、7-14)、人源化抗Lewis Y抗体(实施例5和6)、抗AB(实施例15)以及肿瘤坏死因子受体的二聚Fc-融合蛋白(实施例16),提示本发明可用于表达多种不同的多肽和蛋白质。将根据本发明表达的任何给定蛋白质都具有自身的特异反应性特征,并可能影响培养细胞的细胞密度或存活力,其表达水平可能低于相同培养条件下生长的另一种多肽或蛋白质。本领域的普通技术人员能适当修饰本发明的步骤和组合物,从而优化细胞生长和/或任意给定表达的多肽或蛋白质的产生。

[0148] 遗传控制元件

[0149] 对于本领域普通技术人员显而易见的是,遗传控制元件可用于调控多肽或蛋白质的基因表达。选择此类遗传控制元件使其在相关宿主细胞中具有活性。控制元件可具有组成型活性或为指定条件下可诱导。可诱导型控制元件在表达蛋白质具毒性或对细胞生长和/或存活力具其他不良影响时特别有用。在这种情况下,通过可诱导型控制元件调控多肽或蛋白质的表达,可以改善细胞存活力、细胞密度和/或表达多肽或蛋白质的总产率。可用于实施本发明的大量控制元件为本领域公知且可获取。

[0150] 可用于本发明的代表性组成型哺乳动物启动子包括但不限于,次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPTR)启动子、腺苷脱氨酶启动子、丙酮酸激酶启动子、 β 肌动蛋白启动子以及其他本领域普通技术人员已知的组成型启动子。此外,能驱动真核细胞中编码序列的组成型表达的病毒启动子包括,如猿猴病毒启动子、单纯疱疹病毒启动子、乳头瘤病毒启动子、腺病毒启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子、莫洛尼鼠白血病毒及其他逆转录病毒的长末端重复序列(LTR)、单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子,以及其他本领域普通技术人员已知的病毒启动子。

[0151] 诱导型启动子可在存在诱导剂时驱动有效连接的编码序列的表达,也可根据本发明使用。例如在哺乳动物细胞内,金属硫蛋白启动子在某些金属离子存在时能诱导下游编码序列的转录。其他诱导型启动子为本领域普通技术人员所识别和/或公知。

[0152] 一般而言,基因表达序列也包括分别涉及转录和翻译起始的5'非转录和5'非翻译序列,如TATA盒、帽子序列、CAAT序列等。增强子元件可任选用于增强欲表达多肽或蛋白质的表达水平。可在哺乳动物细胞中作用的增强子元件的实例包括SV40早期基因增强子(如Dijkema等人,EMBOJ.(1985)4:761所述)、以及来自劳斯肉瘤病毒(RSV)(如Gorman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1982b)79:6777所述)和人巨细胞病毒(如Boshart等人,Cell(1985)41:521所述)长末端重复序列的增强子/启动子。

[0153] 将控制元件连接到编码序列的系统为本领域公知(普通分子生物学和重组DNA技

术,如Sambrook,Fritsch和Maniatis,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1989,此处引用作为参考)。适用于插入优选编码序列以在多种生长和诱导条件下的多种哺乳动物细胞中表达的商业载体也为本领域所公知。

[0154] 将编码序列和相关控制元件引入宿主细胞

[0155] 适于将表达目的多肽或蛋白质所需的足量核酸引入哺乳动物宿主细胞内的方法为本领域所公知。见如Gething等人,Nature,293:620-625(1981);Mantei等人,Nature,281:40-46(1979);Levinson等人;EP 117,060;以及EP 117,058,均在此处引用作为参考。

[0156] 对于哺乳动物细胞而言,优选转化方法包括,Graham和van der Erb,Virology,52:456-457(1978)的磷酸钙沉淀法,或Hawley-Nelson,Focus15:73(1193)的lipofectamineTM.(Gibco BRL)法。哺乳动物细胞宿主系统转化的一般方面已由Axel述于1983年8月16日递交的美国专利号4,399,216。转化哺乳动物细胞的多种技术可见Keown等人,Methods in Enzymology(1989)、Keown等人,Methods in Enzymolog,185:527-537(1990),以及Mansour等人,Nature,336:348-352(1988)。在哺乳动物细胞中表达多肽或蛋白质的合适载体的非限制性代表实例包括pCDNA1;pCD,见Okayama等人.(1985)Mol.Cell Biol.5:1136-1142;pMCIneo Poly-A,见Thomas等人.(1987)Cell 51:503-512;以及杆状病毒载体如pAC373或pAC610。

[0157] 在优选的实施方案中,多肽或蛋白质稳定转染入宿主细胞中。然而,本领域普通技术人员应当认识到,本发明可用于瞬时或稳定转染哺乳动物细胞。

[0158] 细胞

[0159] 本发明中可应用任何易于细胞培养及表达多肽的哺乳动物细胞或细胞类型。可用于本发明的哺乳动物细胞的非限制性实例,包括BALB/c小鼠骨髓瘤细胞系(NSO/1,ECACC No:85110503);人成视网膜细胞(PER.C6(CruCell,Leiden,The Netherlands));SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胎肾细胞系(亚克隆的293或293细胞用于在悬浮培养基中生长,Graham等人,J.Gen Virol.,36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞+/-DHFR(CHO,Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HeLa,ATCC CCL 2);狗肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);布法罗大鼠肝细胞(BRL3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68(1982));MRC 5细胞;FS4细胞和人肝癌细胞系(Hep G2)。在特别优选的实施方案中,本发明用于培养和表达来自CHO细胞系的多肽及蛋白质。

[0160] 此外,任意数目的商业和非商业可得的能表达多肽或蛋白质的杂交瘤细胞系可用于本发明。本领域技术人员应当知道,杂交瘤细胞系可能具有不同的营养要求,和/或可能需要不同的培养条件以达到最佳的生长和多肽或蛋白质的表达,并能按需改变条件。

[0161] 如上所述,在许多情况下需要选择或设计细胞以产生高水平的蛋白质或多肽。通常对细胞进行遗传工程操作以产生高水平蛋白质,例如通过引入编码目的蛋白质或多肽的基因,和/或通过引入调控编码目的多肽的基因(内源性或引入的)表达的控制元件。

[0162] 某些多肽可能对细胞生长、细胞存活力或某些其他细胞特征具有不良影响,从而最终在某些方面限制了目的多肽或蛋白质的产生。即使在经过遗传工程改造以表达某一特定多肽的特定类型细胞群中,细胞群内部也存在差异,某些细胞个体生长更好和/或产生更多目的多肽。在本发明某些优选实施方案中,实施者经验性选择在选定的特定细胞培养条件下生长良好的细胞系。在特别优选的实施方案中,基于细胞生长、最终细胞密度、细胞存活力百分比、表达多肽的滴度或由这些或由实施者重视的其他条件的任意组合,选择经改造表达特定多肽的个体细胞进行大规模生产。

[0163] 细胞培养阶段

[0164] 生产目的多肽的一般方法包括分批培养和补料分批培养。分批培养方法一般包括用特定细胞密度的种子培养物接种大规模生产培养物,使细胞在有利于细胞生长和存活力的条件下生长、当细胞达到特定细胞密度时收集培养物,并纯化表达多肽。补料分批培养方法包括额外的步骤,即向分批培养物中补充营养素或其他细胞生长中消耗的成分。常规分批和补料分批培养中长期未决的问题,在于对细胞生长、存活力以及表达多肽产生有害的代谢废物的产生。两类特别有害的代谢废物为乳酸盐和铵盐,分别为葡萄糖和谷氨酰胺代谢所产生。除谷氨酰胺代谢中酶促产生铵盐外,细胞培养物中也会因为随时间的非代谢降解蓄积铵盐。本发明提供了大规模生产多肽的改良方法,能通过减缓甚至逆转细胞培养物中这些废物的蓄积,使铵盐和乳酸盐的不良影响最低化。本领域普通技术人员应当认识到本发明可用于任何细胞培养系统,包括但不限于分批、补料分批和灌流系统。在本发明的某些优选实施方案中,细胞生长于分批或补料分批系统。

[0165] 培养基

[0166] 常规培养基配方,包括可购买培养基如Ham's F10(Sigma)、极限必需培养基([MEM],Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's改良Eagle's培养基([DMEM],Sigma),含有相对高水平的葡萄糖和与其他氨基酸相比而言相对高水平的谷氨酰胺。通常认为需要大量这些成分,因为它们是细胞的主要代谢能量来源。然而,这些营养物质的快速消耗导致了上述乳酸盐和铵盐的蓄积。此外,高初始水平的葡萄糖和谷氨酰胺以及随后乳酸盐和铵盐的蓄积会导致高摩尔渗透压浓度,后者本身往往就对细胞生长、细胞存活力和多肽的产生有害。

[0167] 本发明提供了多种培养基配方,当与此处所述的其他培养步骤一同使用时,能最小化甚至逆转乳酸盐和铵盐的蓄积。对细胞生长和/或存活力以及对多肽或蛋白质的表达有利的本发明培养基配方,包括以下一项或多项:i)每单位体积中累积氨基酸量大于约70mM;ii)累积谷氨酰胺与累积天冬酰胺的摩尔比率小于约2;iii)累积谷氨酰胺与累积总氨基酸的摩尔比率小于约0.2;iv)累积无机离子与累积总氨基酸的比率为约0.4至1;或v)每单位体积谷氨酰胺与天冬酰胺浓度的组合累积量大于约16mM。本领域普通技术人员应当理解上文所用的“累积”,是指细胞培养过程中加入的特定成分或成分的总量,包括在培养起始时加入的成分和其后加入的成分。本领域的普通技术人员应当理解本发明的培养基配方包括限定和非限定培养基。

[0168] 相对于本发明培养基配方,常规培养基配方起始时具有相对低水平的总氨基酸。例如,常规细胞培养基DME-F12(Dulbecco's改良Eagle's培养基与Ham's F培养基12的50:50混合物)中总氨基酸含量为7.29mM,而常规细胞培养基RPMI-1640的总氨基酸含量为

6.44mM(见如H.J.Morton, *In Vitro*, 6:89-108(1970), R.G.Ham, *Proc. Nat. Assoc. Sci. (USA)*, 53:288-293(1965), G.E.Moore等人, *J. Am. Medical Assn.*, 199:519-24(1967), 均在此处引用作为参考)。在某些本发明某些实施方案中,培养基中的氨基酸浓度优选大于约70mM。更优选本发明培养基配方中初始培养基含有氨基酸浓度大于约70mM。已经证实当初始培养基的氨基酸浓度在此范围内时,培养物生长期间的细胞密度和滴度得以提高(见实施例13)。

[0169] 此外,在本发明的某些实施方案中,培养基中的谷氨酰胺与天冬酰胺的摩尔比比其他可购买或不可购买的培养基降低。优选培养基中的谷氨酰胺与天冬酰胺的摩尔比小于约2。

[0170] 此外,在本发明的某些实施方案中,培养基中的谷氨酰胺与总氨基酸的摩尔比比其他可购买或不可购买的培养基降低。优选培养基中的谷氨酰胺与总氨基酸的摩尔比小于约0.2。

[0171] 如本发明中降低初始培养基中的谷氨酰胺与天冬酰胺或与总氨基酸浓度的摩尔比,得到的有趣而出人预料的结果是,除了观察到铵盐蓄积减少外,乳酸盐蓄积也减少了。在某些实施方案中,铵盐和乳酸盐的蓄积水平不仅低于对照培养物的水平,实际上在初始蓄积后也降低了(例如,见实施例3和7)。

[0172] Boraston(美国专利号5,871,999)已公开了总无机离子与总氨基酸摩尔比为1至10的培养基。Boraston显示,使用总无机离子与总氨基酸摩尔比位于此范围内的培养基,该培养基中生长的CHO细胞聚集有所减少。在本发明的另一优选实施方案中,培养基中总无机离子与总氨基酸摩尔比进一步降低至约0.4至1。如实施例13所示,将该比例从1.75降至约0.7,使得培养物生长期间的细胞密度和表达的多肽或蛋白质的产生显著增加。

[0173] 在本发明的另一优选实施方案中,培养基含有谷氨酰胺与天冬酰胺的组合浓度为约16至36mM。如实施例14、表22所示,含谷氨酰胺与天冬酰胺的组合总浓度位于此范围内的培养基,相对于谷氨酰胺与天冬酰胺的组合总浓度在此范围外的培养基,其表达多肽的滴度更高。本领域普通技术人员能够选择该范围内恰当的谷氨酰胺与天冬酰胺组合浓度,从而优化细胞生长和/或存活力,并最大化表达多肽的产生。

[0174] 此外,本领域普通技术人员应当认识到以上所列的任一种条件都可单独使用或彼此多种组合使用。利用具有上述一种、几种或所有特征的培养基配方,本领域普通技术人员能够优化细胞生长和/或存活力,并最大化表达多肽的产生。

[0175] 本发明中公开的任何培养基配方可任选于必要时添加激素和/或其他生长因子、特定离子(如钠、氯、钙、镁和磷)、缓冲液、维生素、核苷或核苷酸、微量元素(通常以极低终浓度存在的无机化合物)、氨基酸、脂质、蛋白质水解物或葡萄糖或其他能量来源。在本发明的某些实施方案中,向培养基中添加化学诱导剂如六亚甲基二乙酰胺(“HMB”)和丁酸钠(“NaB”)是有利的。可于培养起始加入这些任选添加剂,也可在稍后加入以补充消耗的营养或另作他用。本领域普通技术人员知道可加入公开培养基配方中的任何有利或必需的添加剂。

[0176] 提供哺乳动物细胞培养物

[0177] 制备用于通过分批或补料分批培养生产蛋白质或多肽的哺乳动物细胞的多种方法为本领域公知。如上所述,可通过任意数目的公知技术将足以进行表达的核酸(一般为含

有编码目的多肽或蛋白质基因及任何有效连接的遗传控制元件的载体)引入宿主细胞系内。一般而言,筛查细胞以确定哪些宿主细胞实际获得了载体并表达目的多肽或蛋白质。检测哺乳动物细胞表达的某一特定目的多肽或蛋白质的常规方法,包括但不限于免疫组化、免疫沉淀、流式细胞术、免疫荧光显微术、SDS-PAGE、Western印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、高效液相色谱(HPLC)技术、生物活性测定和亲和层析。本领域普通技术人员将会知道检测表达多肽或蛋白质的其他合适技术。如果多个宿主细胞表达目的多肽或蛋白质,可以使用某些或所有上述技术确定哪些细胞表达多肽或蛋白质的水平最高。

[0178] 一旦表达目的多肽或蛋白质的细胞得以鉴定,通过任意的本领域普通技术人员公知的多种方法于培养物中增殖细胞。一般使细胞在有利于细胞存活、生长和存活力的温度和培养基中生长,来增殖表达目的多肽和蛋白质的细胞。初始培养基体积可为任意大小,但通常小于最终生成目的多肽或蛋白质的生产生物反应器的培养基体积,且通常在将细胞接种于生产生物反应器前,使细胞在容积递增的生物反应器传代数次。搅拌或摇动细胞培养物以提高培养基的充氧程度和营养物质在细胞中的散布。备选地或额外地,可使用本领域公知的特殊喷射装置提高和控制培养物的充氧程度。根据本发明,本领域的普通技术人员知道控制或调控某些生物反应器的内部条件是有利的,包括但不限于pH、温度、充氧等。

[0179] 生产生物反应器中的起始细胞密度可由本领域普通技术人员选定。根据本发明,生产生物反应器中的起始细胞密度可低至每单位培养物体积含一个细胞。在本发明优选实施方案中,生产生物反应器中的起始细胞密度可为约每毫升 2×10^2 个活细胞,至约每毫升 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 、 5×10^6 或 10×10^6 个活细胞及更高。

[0180] 可使起始和中间细胞培养物生长至任何所需的密度,再接种下一中间或最终生产生物反应器。优选在接种前大部分细胞都存活,尽管具有完全存活力或近于完全的存活力并非必需。在本发明的某一实施方案中,可通过如低速离心将细胞从上清液中分离出来。也可以在接种下一生物反应器前用培养基洗涤取出的细胞,以除去任何不需要的代谢废物或培养基成分。该培养基可为细胞之前生长的培养基,也可为由本发明实施者选择的不同的培养基或洗涤溶液。

[0181] 可将细胞稀释至合适的密度以接种生产生物反应器。在本发明优选实施方案中,将细胞稀释于生产生物反应器所用的相同培养基中。或者也可根据本发明实施者的需要或愿望,或为适应细胞本身的特定需求(例如在接种生产生物反应器前它们需短期贮存),将细胞稀释至另一培养基或溶液中。

[0182] 起始生长阶段

[0183] 一旦如上所述接种生产生物反应器,在有利于细胞培养物存活、生长和存活力的条件下将细胞培养物维持在起始生长阶段。准确的条件将取决于细胞类型、获取细胞的生物以及表达多肽或蛋白质的性质和特征而改变。

[0184] 根据本发明,生产生物反应器可以为适合多肽或蛋白质大规模生产的任意容积。在优选实施方案中,生产生物反应器的容积为至少500升。在另一优选实施方案中,生产生物反应器的容积为1000、2500、5000、8000、10,000、12,000升或更大,或其间的任意容积。本领域普通技术人员知道也能够选择合适的生物反应器用于实施本发明。该生产生物反应器可由有利于细胞生长和存活力、且干扰产生的多肽或蛋白质的表达或稳定性的任意材料构成。

[0185] 起始生长阶段细胞培养物温度的选择主要是基于细胞培养物可保持存活力的温度范围。例如,在起始生长阶段,CHO细胞在37°C生长良好。一般而言,大部分哺乳动物细胞在约25°C至42°C的范围内生长良好。优选哺乳动物细胞在约35°C至40°C的范围内生长良好。本领域普通技术人员能根据细胞的需求和实施者的生产要求,选择细胞生长的合适温度。

[0186] 在本发明的某一实施方案中,将起始生长阶段的温度维持在单一、恒定的温度。在另一实施方案中,将起始生长阶段的温度维持在一系列温度范围内。例如可在起始生长阶段稳步提高或降低温度。或者也可在起始生长阶段的多个时间点不连续地提高或降低温度。本领域普通技术人员能够确定是否应当使用单一或多个温度,以及该温度是否应当稳步改变还是不连续地改变。

[0187] 根据实施者的需要和细胞本身的需求,细胞在起始生长阶段生长的时间可长可短。在一个实施方案中,使细胞生长足以达到活细胞密度的时间,所述活细胞密度为细胞在不受干扰时生长最终可达到的最大活细胞的给定百分比。例如,可使细胞生长一段时间,该时间内足以达到所需的活细胞密度,其为最大活细胞密度的百分之1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或99。

[0188] 在另一实施方案中使细胞生长指定的时间。例如,根据细胞培养物的起始浓度、细胞生长的温度以及细胞的内在生长速率,可使细胞生长0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多天时间。在某些情况下,可使细胞生长一个月或更长时间。如果细胞在起始生长阶段的温度下、接种生物反应器中的生长足以使接种时生产生物反应器中活细胞密度已经达到所需的最大活细胞密度百分比,则细胞可在生产生物反应器中生长0天。本发明实施者能够根据多肽或蛋白质生产需求和细胞本身需求选择起始生长阶段的长度。

[0189] 在起始培养期间可搅拌或摇动细胞培养物,以提高充氧和细胞中营养物质的分布。根据本发明,本领域普通技术人员应当知道,在起始生长阶段控制或调控生物反应器的某些内部条件(包括但不限于pH、温度、充氧等)是有利的。例如,可以通过供以适量的酸或碱控制pH,而可通过本领域公知的喷射装置控制充氧。

[0190] 改变培养条件

[0191] 根据本发明的教导,在起始生长阶段终末期至少可以改变一种培养条件,以应用第二组培养条件并使培养物中发生代谢转变。抑制性代谢物(最主要为乳酸盐和氨)的蓄积会抑制生长。通过如改变细胞培养物的温度、pH、重量摩尔渗透压浓度或化学诱导物水平而完成的代谢转变,其特征在于降低了特定乳酸盐产生速率与特定葡萄糖消耗速率的比率。在非限制性实施方案中,通过转变培养物的温度转变培养条件。然而,如本领域所公知,改变温度不是完成合适代谢改变的唯一机制。例如,此类代谢转变也可通过改变其他培养条件而完成,包括但不限于pH、重量摩尔渗透压浓度或丁酸钠水平。如上所述,培养物转变的时间由本发明实施者根据多肽或蛋白质生产需要或细胞本身需求所确定。

[0192] 当改变培养物温度时,温度的转变可能相对渐变。例如,温度改变的完成可能需要数小时至数天。或者温度转变可以相对突然。例如,温度转变可能在少于数小时内完成。利用适当的生产和控制设施(如商业大规模多肽或蛋白质生产中的标准设施),温度改变甚至可以在1小时以内完成。

[0193] 随后生长阶段中细胞培养物的温度的选择,主要是基于细胞培养物保持存活力且能在商业满足量水平上表达重组多肽或蛋白质的温度范围。一般而言,大多数哺乳动物细胞在约25°C至42°C的温度范围能保持存活力并且在商业满足量水平上表达重组多肽或蛋白质。优选哺乳动物细胞在约25°C至35°C的温度范围保持存活力且能在商业满足量水平上表达重组多肽或蛋白质。本领域普通技术人员能根据细胞需求和实施者的生产需要,选择生长细胞的合适温度。

[0194] 在本发明的一个实施方案中,维持随后生长阶段的温度为单一、恒定的温度。在另一实施方案中,维持随后生长阶段的温度在一系列温度范围内。例如可在随后生长阶段稳步提高或降低温度。或者也可在随后生长阶段的多个时间点不连续地提高或降低温度。本领域普通技术人员应当理解该实施方案中包括多个不连续的温度转换。例如,温度可能转变一次,细胞在该温度或温度范围内维持一段时间,随后可再次转变温度——至更高或更低温度。每次不连续地转变后,培养物温度可为恒定,也可维持于某一温度范围内。

[0195] 在实施例16中,显示的数据证实应用两次连续温度改变的有效性,然而本领域普通技术人员应当理解,在本发明中可以使用3次或更多次连续的温度改变提高细胞的存活力或密度和/或提高重组多肽或蛋白质的表达。每次连续温度转变后细胞培养物的温度或温度范围可能高于或低于转变前的温度或温度范围。在本发明的优选实施方案中,每一连续的温度或温度范围都低于前一温度或温度范围。

[0196] 后续生产阶段

[0197] 根据本发明,一旦如上述转变了细胞培养物条件,将细胞培养物维持于第二组培养条件的后续生产阶段,所述培养条件有利于细胞培养物的存活和存活力,且适于所需多肽或蛋白质以商业满足水平表达。

[0198] 如上所述,可以通过改变数种培养条件中的一种或多种来转变培养物,包括但不限于温度、pH、重量摩尔渗透压浓度和丁酸钠水平。在一个实施方案中,转变培养物的温度。根据该实施方案,在后续生产阶段,将培养物维持于低于起始生长阶段温度或温度范围的温度或温度范围内。例如,在后续生产阶段中,CHO细胞在25°C至35°C范围内良好表达重组多肽或蛋白质。如上所述,可利用多重不连续的温度转变提高细胞密度或存活力,或提高重组多肽或蛋白质的表达。

[0199] 根据本发明,可维持细胞于后续生产阶段直至达到所需的细胞密度或生产滴度。在一个实施方案中,维持细胞于后续生产阶段直至重组多肽或蛋白质的滴度达到最大。在其他实施方案中,可根据实施者的生产要求或细胞本身的需求,在此时间点前收集培养物。例如,可维持细胞一段时间,以足以达到活细胞密度为最大活细胞密度的百分之1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或99。在某些情况下,使活细胞密度达到最大后再于收集培养物前使活细胞密度下降至某一水平可能是有利的。在极端实例中,在收集培养物前使活细胞密度接近或达到0可能有利。

[0200] 在本发明的另一实施方案中,使细胞于后续生产阶段中生长指定的时间。例如,根据细胞培养物在后续生产阶段的起始浓度、细胞生长的温度以及细胞的内在生长速率,可使细胞生长0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多天时间。在某些情况下,可使细胞生长一个月或更长时间。本发明实施者能够根据多肽或蛋白质生产需求和细胞本身需求选择后续生长阶段的长度。

[0201] 在某些情况下,于后续生产阶段中向细胞培养物中添加细胞消耗或代谢的营养物质或其他培养基成分,可能为有利或必要的。例如,向细胞培养物中添加在细胞培养物监测(见下文“监测培养条件”章节)中发现消耗的营养物质或其他培养基成分是有利的。备选地或额外地,在后续生产阶段前补充细胞培养物也是有利或必要的。在非限制性实例中,向细胞培养物中添加激素和/或其他生长因子、特定离子(如钠、氯、钙、镁和磷)、缓冲液、维生素、核苷或核苷酸、微量元素(通常以极低终浓度存在的无机化合物)、氨基酸、脂质或葡萄糖或其他能量来源,是有利或必要的。

[0202] 可将这些增补成分全部一次加入细胞培养物中,或可以系列添加提供给细胞培养物。在本发明的某一实施方案中,在多个时间点按比例量向细胞培养物中提供增补成分。在另一实施方案中,可于起始时仅提供某些增补成分,并于稍后提供其余成分。在本发明的另一实施方案中,以这些增补成分持续向细胞培养物补料。

[0203] 根据本发明,最好应将向细胞培养物中添加的总量保持为最小。例如,向细胞培养物中添加的含有增补成分的培养基或溶液的总量可为提供增补成分之前细胞培养物体积的百分之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50。

[0204] 在后续生产阶段期间可搅拌或摇动细胞培养物,以提高充氧和细胞中营养物质的分散。根据本发明,本领域普通技术人员应当知道,在后续生长阶段控制或调控生物反应器的某些内部条件(包括但不限于pH、温度、充氧等)是有利的。例如,可以通过供以适量的酸或碱控制pH,而可通过本领域公知的喷射装置控制充氧。

[0205] 监测培养条件

[0206] 在本发明的某些实施方案中,实施者会发现周期性监测生长的细胞培养的具体条件是有利或必要的。监测细胞培养条件使得实施者能确定细胞培养物是否在次佳水平上生产重组多肽或蛋白质,或培养物将进入次佳生产阶段。为监测某些细胞培养条件,有必要取出少量等份的培养物进行分析。本领域普通技术人员应当理解此类取出有可能会向细胞培养物中引入污染,并会适度注意以最小化此类污染的风险。

[0207] 作为非限制性实例,监测温度、pH、细胞密度、细胞存活力、综合活细胞密度、乳酸盐水平、铵盐水平、摩尔渗透压浓度或表达多肽或蛋白质的滴度,是有利或必要的。本领域公知有多种技术可使本领域普通技术人员测量这些条件。例如,可以利用血细胞计数仪、Coulter计数器或细胞密度检查(CEDEX)测量细胞密度。可以通过台盼蓝染色培养物样本确定活细胞密度。由于只有死细胞才摄取台盼蓝,通过计量细胞总数、用摄取染料的细胞数目除以细胞总数,取剩余值即可确定活细胞密度。可以利用HPLC确定乳酸盐、铵盐或表达多肽或蛋白质的水平。或者,也可利用标准分子生物学技术例如SDS-PAGE凝胶的考马斯染色、Western印迹、Bradford测定、劳里测定、双缩脲测定和UV吸收确定表达多肽或蛋白质的水平。监测表达多肽或蛋白质的翻译后修饰(包括磷酸化和糖基化)也是有利或必要的。

[0208] 表达多肽的分离

[0209] 一般而言,一般优选分离和/或纯化本发明中表达的蛋白质或多肽。在优选实施方案中,表达多肽或蛋白质分泌于培养基中,因此通过如离心或过滤去除细胞和其他固体是纯化过程的第一步。该实施方案在用于本发明时特别有用,因为此处描述的方法和组合物使细胞存活力增加。结果在培养过程中死亡的细胞减少,且释放入培养基中能潜在降低表达多肽或蛋白质产量的蛋白水解酶减少。

[0210] 或者可将表达的多肽或蛋白质结合于宿主细胞的表面。在该实施方案中,去除培养基,并裂解表达多肽或蛋白质的宿主细胞作为纯化过程中的第一步。可以通过本领域普通技术人员已知的任意方法裂解哺乳动物宿主细胞,包括利用玻璃珠物理破坏,以及暴露于高pH值条件。

[0211] 可以通过标准方法分离和纯化多肽或蛋白质,包括但不限于色谱法(例如离子交换、亲和力、尺寸排阻和羟基磷灰石层析)、凝胶过滤、离心或差异溶解度、乙醇沉淀或任何其他可用的纯化蛋白质技术(见如Scopes,Protein Purification Principles and Practice第二版,Springer-Verlag,New York,1987;Higgins,S.J.和Hames,B.D.(编辑),Protein Expression:A Practical Approach,Oxford Univ Press,1999;以及Deutscher,M.P.,Simon,M.I.,Abelson,J.N.(编辑),Guide to Protein Purification:Methods in Enzymology(Methods in Enzymology Series,Vol 182),Academic Press,1997,均在此处引用作为参考)。具体对于免疫亲和层析而言,通过将蛋白质结合于含有抗体的亲和柱可以分离蛋白质,所述抗体为针对该蛋白质所产生并固定于固态支持物上。或者可利用标准重组技术将亲和标记如流感外壳序列、多聚组氨酸、谷胱甘肽-S-转移酶连接于蛋白质,以使得可通过合适的亲和柱进行简单纯化。可在任意或所有阶段加入蛋白酶抑制剂如苯甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑蛋白酶肽、胃蛋白酶抑制剂或抑酶肽,以减少或消除纯化过程中多肽或蛋白质的降解。当必须裂解细胞以分离和纯化表达多肽或蛋白质时,尤其需要蛋白酶抑制剂。本领域普通技术人员应当认识到根据待纯化多肽或蛋白质的特性、表达多肽或蛋白质的细胞特性,以及细胞生长的培养基组成,具体纯化技术有所不同。

[0212] 药物配方

[0213] 在本发明的某些优选实施方案中,生产的多肽或蛋白质具有药理学活性并可用于药物制备。上述的发明组合物可施用于受试者或可先配制以通过任何可用的途径递送,所述途径包括但不限于胃肠道外(如静脉内)、皮内、皮下、口服、经鼻、经气管、经眼(opthalmic)、经皮(局部)、经粘膜、经直肠以及经阴道途径。发明性药物组合物一般包括表达自哺乳动物细胞系的纯化的多肽或蛋白质、递送物质(即阳离子聚合物、肽分子转运蛋白、表面活性物质等,如上文所述),与可药用载体的组合。此处所用的词语“可药用载体”包括溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等与药物施用相容的物质。组合物中也可含有增补的活性化合物。

[0214] 配制药物组合物以使之与其预期的施用途径相容。应用于胃肠道外、皮内或皮下的溶液或悬浮液包括以下成分:无菌稀释剂如注射用水、盐溶液、非挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂如苯甲醇或对羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂如维生素C或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲液如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐以及调节张力物质如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱(如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可包装胃肠道外制品于安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂小瓶。

[0215] 适于注射用的药物组合物一般包括无菌水溶液(其中可溶于水)或分散体,以及无菌散剂,用以制备无菌注射溶液或分散系的临时制品。可用于经静脉施用的合适载体包括生理盐水、制菌水、聚氧乙烯醚(CremophorEL™)(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物都必须无菌且为可易于注射的液态。优选的药物制剂在生产 and 贮存条件下稳定,且必须贮存以避免微生物如细菌和真菌的污染作用。一般而言,相关载

体可为溶剂或分散介质,其中含有如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇以及液态聚乙二醇等)及其合适混合物。通过如利用如卵磷脂包衣、维持分散系中所需颗粒的尺寸以及通过利用表面活性剂,能够维持适当的流动性。可利用多种抗细菌和抗真菌剂来防止微生物作用,例如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、乙基汞硫代水杨酸钠等。在许多情况下,优选向组合物中加入等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可以通过向组合物中加入延迟吸收的物质如单硬脂酸铝和明胶,延长注射组合物的吸收。

[0216] 根据需求,向含有上述成分的一种或数种组合的合适溶剂中掺入所需量的纯化多肽或蛋白质,然后过滤灭菌,可制备无菌注射用溶液。一般而言,向含有基础分散介质以及所需上述列举中的其他成分的无菌载体中掺入纯化的哺乳动物细胞系表达的多肽或蛋白质,可制备分散系。对于用于制备无菌注射溶液的无菌散剂而言,优选制备方法为真空干燥以及冷冻干燥,可产生具有活性成分以及来自以前无菌过滤溶液的任意其他所需成分的散剂。

[0217] 口服组合物一般包括惰性稀释剂或可食用载体。为进行口服治疗施用,可将纯化多肽或蛋白质混合于赋形剂,并以片剂、锭剂或胶囊如明胶胶囊的形式使用。也可利用液态载体制备口服组合物,用如漱口液。药物相容性粘合剂和/或佐剂材料可作为组合物的组成部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有任意以下成分,或具有相似性质的化合物:粘合剂如微晶纤维素、西黄蓍胶或明胶;赋形剂如淀粉或乳糖;崩解剂如藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;或增味剂如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或桔子香精。口服递送制剂可以有利地掺入能提高胃肠道内稳定性和/或增强吸收的物质。

[0218] 为吸入施用,优选从含有合适推进剂(如气体如二氧化碳)或雾化器的加压容器或分散器以气溶胶喷雾的形式递送含有表达自哺乳动物细胞系的纯化的多肽或蛋白质和递送剂的本发明组合物。本发明特别涉及利用鼻喷雾、吸入或其他直接递送方式将组合物递送至上和/或下呼吸道。经鼻施用针对流感病毒的DNA疫苗已经显示能够引发CD8T细胞应答,提示至少呼吸道内的某些细胞能摄取经此途径递送的DNA,且本发明的递送剂会增强细胞摄取。根据本发明某些实施方案,含有表达自哺乳动物细胞系的纯化多肽和递送剂的组合物,被配制为大的多孔颗粒用于气溶胶施用。

[0219] 也可通过经粘膜或经皮方法全身施用。为进行经粘膜或经皮施用,制剂中使用适合于待穿透屏障的渗透剂。此类渗透剂一般为本领域公知,包括如用于经粘膜施用的去污剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜施用可通过使用鼻喷雾或栓剂而实现。对于经皮施用而言,将纯化的多肽或蛋白质以及递送剂配制为本领域公知的软膏、油膏、凝胶或霜剂中。

[0220] 组合物也可制备为栓剂(例如使用如可可油或其他甘油酯的常规栓剂基质)或用于直肠递送的留置灌肠剂形式。

[0221] 在一个实施方案中,制备的组合物中含有可保护多肽或蛋白质以避免体内迅速消除的载体,例如控释制剂(包括埋植和微囊递送系统)。可使用生物可降解的和生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚羟基乙酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的方法对于本领域技术人员而言显而易见。这些材料也可购自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc.脂质体悬浮液(包括含有针对病毒抗原单克隆抗体的靶定感染细胞的脂质体)也可用作可药用载体。这些均可根据本领域技术人员已知的方法制备,例如美国

专利号4,522,811中所述。

[0222] 最好可将口服或胃肠道外组合物配制为单剂形式以便于剂量的使用和均一性。此处所用的单剂形式是指适合待治疗受试者的单位剂量的物理分离单位；其中每一单位含有经计算能与所需药物载体一同产生所需治疗效果的预定量的活性多肽或蛋白质。

[0223] 根据本发明表达的多肽或蛋白质可按需以多个间隔、持续不同时期施用，例如每周一次，持续约1至10周、2至8周、约3至7周、约4、5或6周等。技术人员认识到某些因素会影响有效治疗受试者所需的剂量和时间选择，包括但不限于疾病或紊乱的严重性、既往治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄，以及存在的其他疾病。一般而言，用此处所述的多肽或蛋白质治疗受试者可包括单次治疗，或在多种情况下可包括一系列治疗。进一步认识到合适的剂量将取决于多肽或蛋白质的效力，且可任选根据具体受者调整，例如通过施用递增的剂量直至出现预选的期望反应。对于任何具体动物受试者的特定剂量水平可能取决于多种因素，包括所用特定多肽或蛋白质的活性、受试者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、任何药物组合以及被调节的表达水平或活性。

[0224] 本发明包括利用发明组合物治疗非人类动物。因此，可根据已知的兽医药理学和医学原则选择施用的剂量和方法。指南可见于如Adams, R. (编辑), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 第8版, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001。

[0225] 发明药物组合物可与施用说明一起含于容器、包裹或分散器中。

[0226] 应该理解，前述说明仅为代表而非限制。实施本发明的其他方法和材料以及额外的应用对于本领域技术人员而言显而易见，并包括于所附权利要求中。

实施例

[0227] 实施例1：用于抗GDF-8补料分批方法的增强型培养基1

[0228] 常规用于细胞系培养的补料分批方法有一些缺点，包括补料所必需的时间及精力，以及大规模生物反应器所需要的特别设施。本实施例的目的是开发一种需要最小补料的在大规模生物反应器中生产目的蛋白质的分批培养基。

[0229] 材料与amp;方法

[0230] 株系和培养基：设计中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达针对生长分化因子8的单克隆抗体(抗GDF-8细胞)(见Veldman等人, Neutralizing Antibodies Against GDF-8 and Uses Therefor, US20040142382A1)。抗GDF-8细胞用于测试新的分批培养基。比较培养基1和培养基2支持高细胞密度和存活力的能力。表1中列出了这些培养基和培养基3的成分。加入除FeSO₄ • 7H₂O以外的所有成分配制培养基。然后将培养基调节至pH 7.25，记录摩尔渗透压浓度，然后加入FeSO₄ • 7H₂O。

[0231] 培养条件：对于烧瓶实验，使抗GDF-8细胞在振荡的烧瓶中生长并传代三次。对于生物反应器实验，抗GDF-8细胞在培养基中生长12天，第5天后每日补充2%体积的20×培养基4的补料培养基(表3)或3%体积的16×培养基4(表4)。对于头4天而言，于37°C培养细胞。在第5天时将细胞移至31°C。

[0232] 样品分析：每天从培养物中取出样品，分析氨基酸、维生素、铁、磷酸盐、葡萄糖和谷氨酰胺的水平。

[0233] 表1.培养基1、培养基2和培养基3的成分

[0234]

	培养基 1		培养基 2		培养基 3	
氨基酸	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
丙氨酸	96.03	1.08	17.80	0.20	24.87	0.28
精氨酸	1186.99	6.82	347.97	2.00	423.43	2.43
天冬酰胺一水合物	713.59	4.76	75.00	0.50	173.90	1.16
天冬氨酸	318.53	2.39	26.20	0.20	52.72	0.40
半胱氨酸盐酸盐一水合物	70.01	0.40	70.19	0.40	70.01	0.40
胱氨酸二盐酸盐	297.09	0.95	62.25	0.20	62.09	0.20
谷氨酸	158.59	1.08	29.40	0.20	41.08	0.28
谷氨酰胺	1892.40	12.96	1163.95	7.97	1162.40	7.96
甘氨酸	95.88	1.28	30.00	0.40	35.92	0.48
组氨酸盐酸盐一水合物	369.10	1.76	46.00	0.22	75.27	0.36
异亮氨酸	623.63	4.76	104.99	0.80	151.90	1.16
亮氨酸	852.31	6.51	104.99	0.80	172.69	1.32
盐酸赖氨酸	945.96	5.20	145.99	0.80	218.38	1.20
甲硫氨酸	291.82	1.96	29.80	0.20	53.55	0.36
苯丙氨酸	428.62	2.60	65.99	0.40	98.81	0.60

[0235]

脯氨酸	372.25	3.24	68.99	0.60	96.40	0.84
丝氨酸	904.71	8.62	126.00	1.20	273.07	2.60
苏氨酸	513.39	4.31	94.99	0.80	132.81	1.12
色氨酸	159.32	0.78	16.00	0.08	28.99	0.14
二水合二钠酪氨酸	560.81	2.15	103.79	0.40	145.10	0.56
缬氨酸	505.36	4.32	93.99	0.80	131.17	1.12
维生素	mg/L	μM	mg/L	μM	mg/L	μM
生物素	2.00	8.21	0.20	0.82	0.36	1.49
泛酸钙	22.02	46.27	2.24	4.71	4.03	8.47
氯化胆碱	87.67	630.74	8.98	64.60	16.11	115.92
叶酸	25.95	58.84	2.65	6.01	4.76	10.80
肌醇	123.39	685.47	12.60	69.99	22.64	125.79
烟酰胺	19.60	160.70	2.02	16.56	3.61	29.62
盐酸吡哆醛	1.99	9.83	2.00	9.85	1.99	9.83
盐酸吡哆醇	18.06	87.67	0.03	0.15	1.67	8.10
核黄素	2.20	5.85	0.22	0.59	0.40	1.06
盐酸硫胺素(维生素 B1)	21.51	63.84	2.17	6.44	3.92	11.64
维生素 B12	6.93	5.12	0.78	0.58	1.34	0.99
无机盐	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
CaCl ₂	115.78	1.04	116.09	1.05	115.78	1.04
KCl	310.94	4.17	311.77	4.18	310.94	4.17
Na ₂ HPO ₄	70.81	0.50	70.99	0.50	70.81	0.50
NaCl	1104.96	18.92	5539.00	94.85	3704.96	63.44
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	636.33	4.61	62.49	0.45	114.33	0.83
MgSO ₄	48.70	0.41	48.83	0.41	48.70	0.41

[0236]

MgSO ₄ •7H ₂ O	0.03	95.00			8.60	95.00
MgCl ₂	28.53	0.30	28.61	0.30	28.53	0.30
NaHCO ₃	2000.00	23.81	2440.00	29.04	2440.00	29.04
微量元素	μg/L	nM	μg/L	nM	μg/L	nM
亚硒酸钠	28.00	161.94	5.00	28.92	7.00	40.49
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	49.86	123.42	50.00	123.75	49.86	123.42
CuSO ₄	2.69	16.80	0.80	5.00	0.97	6.06
CuSO ₄ •5H ₂ O	11.24	45.00			7.49	30.00
FeSO ₄ •7H ₂ O	2503.85	9006.64	839.96	3021.45	1542.85	5549.81
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2734.77	9528.82	429.96	1498.12	1383.80	4821.59
MnSO ₄ •H ₂ O	0.26	1.51			0.17	1.01
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	210.00	739.27			140.00	492.84
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	1.86	1.50			1.24	1.00
NH ₄ VO ₃	0.98	8.33			0.65	5.56
NiSO ₄ •6H ₂ O	0.20	0.74			0.13	0.49
SnCl ₂ •2H ₂ O	0.18	0.80			0.12	0.53
其它成分	mg/L	μM	mg/L	μM	mg/L	μM
氢化可的松	0.23	0.64	0.04	0.10	0.09	0.24
二盐酸腐胺	6.48	40.22	1.08	6.70	2.48	15.39
亚油酸	0.22	0.80	0.04	0.14	0.06	0.20
硫辛酸	0.56	2.73	0.10	0.49	0.14	0.69
D-葡萄糖 (右旋糖)	16039.43	89107.92	6150.72	34170.64	11042.24	61345.76
PVA	2560.00		2400.00		2520.00	
胰岛素	54.00		10.00		14.00	
丙酮酸钠	54.85	498.63	55.00	499.95	54.85	498.63

[0237] 结果与结论

[0238] 图1显示,在烧瓶实验中,抗GDF-8细胞在培养基1和培养基2中的生长速率相似。

[0239] 图2显示生物反应器中,培养基1的最终细胞密度和存活度相对于培养基3显著增加。最终滴度也显著增加,从平台过程的551mg/L到培养基1的976mg/L(数据未示)。第5天时

将温度由37°C变为31°C。由于未预料的高速细胞生长,在第5天后每日向培养物加入2%体积

的20×培养基4或3%体积的16×培养基4。因此,这并非初始计划的真正分批实验。从第10天开始向补料培养基中补充天冬酰胺和硫胺素。

[0240] 开发浓缩分批培养基时需要考虑几个可能的问题。第一,浓缩的营养物可能对细胞有毒。本实施例开发的培养基中,已确认所有营养物和成分都在毒性限度下(数据未示)。

[0241] 第二,浓缩的分批培养基的摩尔渗透压浓度必定高于非浓缩培养基,会对细胞生长和存活力产生有害影响。可以通过降低起始培养基中的NaCl含量来解决这一问题。此外,浓缩分批培养基含有的葡萄糖水平不足以维持整个培养时期的生长。因此在第5天后,每天向培养物中补充葡萄糖补料。

[0242] 第三,胰岛素和谷氨酰胺容易在12天培养期间降解。因此,除葡萄糖之外还要向培养物补充这些成分。

[0243] 最后,铁在高pH值会从含高浓度磷酸盐的溶液中沉淀出来。在培养基制备过程的最后,即pH值已调节至合适水平后,再加入铁,可以解决这一问题。

[0244] 实施例2:补料分批方法中抗GDF-8细胞的浓缩补料培养基(培养基5)的开发

[0245] 实施例1开发了用培养基1培养抗GDF-8细胞的分批方法。由于此过程中产生了较高细胞密度,认为补充除葡萄糖和谷氨酰胺以外的营养物仍然是有利的。然而,向分批培养基中添加8×补料培养基4会导致培养物的过度稀释。为克服这一问题,开发了一种更为浓缩的补料培养基。

[0246] 材料、方法与结果

[0247] 表2列出了用于表3-7的配方的培养基4A-1、培养基4B、微量元素B和微量元素D的成分。

[0248] 表2.用于表3-7配方的培养基4A-1、培养基4B、微量元素B和微量元素D成分。

[0249]

	培养基 4A-1		培养基 4B		微量元素 B		微量元素 D	
氨基酸	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
丙氨酸	17.80	0.20						
精氨酸	191.00	1.10						
天冬酰胺一水合物	135.00	0.90						
天冬氨酸			66.50	0.50				
谷氨酸			29.40	0.20				
甘氨酸	15.00	0.20						
组氨酸盐酸盐一水合物	73.50	0.35						
异亮氨酸	118.00	0.90						
亮氨酸	170.00	1.30						
盐酸赖氨酸	182.00	1.00						
甲硫氨酸	59.60	0.40						
苯丙氨酸	82.50	0.50						
脯氨酸	69.00	0.60						
丝氨酸	158.00	1.50						
苏氨酸	95.20	0.80						
色氨酸	32.60	0.16						
二水合酪氨酸二钠			104.00	0.40				

[0250]

缬氨酸	93.60	0.80						
维生素	mg/L	μM	mg/L	μM	mg/L	mM	mg/L	mM
生物素	0.41	1.68						
泛酸钙	4.50	9.45						
氯化胆碱	17.90	128.78						
叶酸			5.30	12.02				
肌醇	25.20	140.00						
烟酰胺	4.00	32.79						
盐酸吡哆醇	4.10	19.90						
核黄素	0.45	1.20						
盐酸硫胺素	4.40	13.06						
维生素 B12	1.40	1.03						
微量元素	μg/L	nM	mg/L	μM	μg/L	nM	μg/L	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O					1.24	1.00		
CuSO ₄	0.43	2.69						
CuSO ₄ •5H ₂ O							7.49	30.00
FeSO ₄ •7H ₂ O							834	3000
MnSO ₄ •H ₂ O					0.17	1.01		
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O					140.00	492.84		
NH ₄ VO ₃					0.65	5.56		
NiSO ₄ •6H ₂ O					0.13	0.49		
SnCl ₂ •2H ₂ O					0.12	0.53		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	230.00	801.39					863	3007
其它成分	μg/L	nM	μg/L	nM	μg/L	nM	μg/L	nM
亚油酸			42.00	0.15				
硫辛酸			105.00	0.51				
D-葡萄糖 (右旋糖)			1000000	5555.56				

[0251] 1.20×培养基4

[0252] 第一种开发的浓缩培养基是20×培养基4。表3中提供了20×培养基4的配方。

[0253] 表3.20×补料培养基4的工作表

[0254]

部分	成分	含量	单位
I	培养基 4A-I	31.120	g/L
	Nucellin™	40.000	ml/L
	H/P 贮存液	20.000	ml/L
	亚硝酸盐盐贮存液	2.000	ml/L
	PVA	2.400	g/L
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.610	g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.430	g/L
	天冬氨酸	1.330	g/L
	谷氨酸	0.588	g/L
	亚油酸	0.840	ml/L
	硫辛酸	2.100	ml/L
	酪氨酸二钠盐 (Mw 225)	1.790	g/L
	1000×微量元素 B	6.000	ml/L
	葡萄糖	100.000	g/L
	谷氨酰胺	14.600	g/L
	pH 至 7.0		
	记录摩尔渗透压浓度	1064.000	mOs
II	半胱氨酸(400 mM)	加入 108 ml 微量元素 D、 0.25 g FeSO ₄ ·7H ₂ O	m

[0255]

		至 280 ml 半胱氨酸贮存液	
III	叶酸	720 ml 6 mM 叶酸	

[0256] 注:Nucellin™由Eli Lilly(Indianapolis, IN, USA)制造;H/P贮存液=0.036mg/mL氢化可的松、1.08mg/mL二盐酸腐胺。

[0257] 该培养基配方由3个部分组成:I、II、III。部分I为含有除叶酸以外培养基4B各个成分(考虑到该维生素的溶解性)的浓缩形式的8×培养基4。部分II为铁贮存液、微量元素D和酸性半胱氨酸,以避免加入部分I中可能出现的铁沉淀。部分III是叶酸贮存液。从第5天开始,每日添加2%体积的部分I,而部分II和部分III则在第5天时与部分I一同添加一次。

[0258] 调节补料培养基的最终pH值为7.0,摩尔渗透压浓度约为1064mOsm。2%的补料将导致培养物的葡萄糖升高2g/L,谷氨酰胺升高2mM以及摩尔渗透压浓度升高14mOsm。

[0259] 2.16×培养基4

[0260] 为减少摩尔渗透压浓度的升高,补料培养基从20×培养基4(每日加入2%体积)变为16×培养基4(每日加入3%体积)。16×培养基4的配方见表4。

[0261] 表4.16×培养基4补料培养基工作表

[0262]

部分	成分	含量	单位
I	培养基 4A-1	24.896	g/L
	Nucellin™	32.000	ml/L
	H/P 贮存液	16.000	ml/L
	亚硒酸盐贮存液	1.600	ml/L
	PVA	2.400	g/L
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.088	g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.344	g/L
	天冬氨酸	1.064	g/L

[0263]

	谷氨酸	0.470	g/L
	亚油酸	0.672	ml/L
	硫辛酸	1.680	ml/L
	酪氨酸二钠盐 (Mw 225)	1.432	g/L
	1000×微量元素 B	9.000	ml/L
	谷氨酰胺	6.280	g/L
	pH 至 7.0		
	记录摩尔渗透压浓度	295.000	mOsm
II	加入 108 ml 微量元素 D、 0.25 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 半胱氨酸(400 mM)	至 280 ml 半胱氨酸贮存液	
III	叶酸	720 ml 6 mM 叶酸	

[0264] 注:Nucellin™由Eli Lilly(Indianapolis,IN,USA)制造;H/P贮存液=0.036mg/mL氢化可的松、1.08mg/mL二盐酸腐胺。

[0265] 在此改良的16×培养基4中,也除去葡萄糖以进一步降低摩尔渗透压浓度并赋予葡萄糖补料的机动性。补料培养基的总摩尔渗透压浓度现在为295mOsm。

[0266] 3.16×培养基4

[0267] 对16×培养基4的配方进行改变。向补料培养基中加入铁贮存液使每次补料增加0.45μM。此外,又加回葡萄糖使每次补料增加1.5g/L。改良的16×培养基4的培养基配方见表5。

[0268] 表5.16×培养基4补料培养基工作表

[0269]

部分	成分	含量	单位
I	培养基 4A-1	24.896	g/L
	Nucellin™	32.000	ml/L

[0270]

	H/P 贮存液	16.000	ml/L
	亚硒酸盐贮存液	1.600	ml/L
	PVA	2.400	g/L
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.088	g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.344	g/L
	天冬氨酸	1.064	g/L
	谷氨酸	0.470	g/L
	亚油酸	0.672	ml/L
	硫辛酸	1.680	ml/L
	酪氨酸二钠盐 (Mw 225)	1.432	g/L
	1000×微量元素 B	9.000	ml/L
	葡萄糖	50.000	g/L
	谷氨酰胺	7.300	g/L
	pH 至 7.0		
	FeSO ₄ ·7H ₂ O (1 mM 贮存液)	15.000	ml/L
	记录摩尔渗透压浓度	607.000	mOsm
II	叶酸	720 ml 6 mM 叶酸	
III	半胱氨酸(400 mM)	加入 108 ml 微量元素 D、 0.25 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 至 280 ml 半胱氨酸贮存液	

[0271] 注:Nucellin™由Eli Lilly(Indianapolis,IN,USA)制造;H/P贮存液=0.036mg/mL氢化可的松、1.08mg/mL二盐酸腐胺。

[0272] 4.16×培养基4

[0273] 此处,制备补料培养基(16×培养基4)为混合培养基,代替最近几批中3种独立的补料。测试以确保叶酸可以以所需浓度溶解,且在4°C或室温存贮6天后,无论铁还是叶酸都不会从溶液中沉淀。组合16×培养基4的培养基配方见表6。

[0274] 表6.16×培养基4的补料培养基工作表

[0275]

成分	含量	单位
培养基4A-1	24.896	g/L
Nucellin™	32.000	ml/L
H/P贮存液	16.000	ml/L

亚硒酸盐贮存液	1.600	ml/L
PVA	2.400	g/L
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	2.088	g/L
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.344	g/L
天冬氨酸	1.064	g/L
谷氨酸	0.470	g/L
亚油酸	0.672	ml/L
硫辛酸	1.680	ml/L
酪氨酸二钠盐(Mw 225)	1.432	g/L
葡萄糖	66.700	g/L
谷氨酰胺	7.300	g/L
叶酸	70.560	mg/L
酸性半胱氨酸(400mM)	6.250	ml/L
FeSO ₄ 贮存液(1mM)	23.000	ml/L
1000×微量元素B	9.000	ml/L
1000×微量元素D	3.300	ml/L
预期pH 6.11	调为7.0	
记录摩尔渗透压浓度	724.000	mOsm

[0276] 注:Nucellin™由Eli Lilly(Indianapolis,IN,USA)制造;H/P贮存液=0.036mg/mL氢化可的松,1.08mg/mL二盐酸腐胺。

[0277] 该培养基的最终摩尔渗透压浓度为724mOsm,每日加入2g/L葡萄糖和1.5mM的谷氨酰胺。

[0278] 5.12X培养基4

[0279] 此处,对补料培养基进行几处改进。采用培养基4B粉末代替加入培养基4B中的各单独成分。将培养基4B粉末与葡萄糖混合,并通过滴定调节溶液pH为10.25,在碱性条件下分别溶解之。由于氨基酸和维生素分析结果显示,天冬酰胺和硫胺素在补料分批方法的最后已经耗尽,因此还要加入额外的这两种成分。使用12X培养基4进一步降低了向培养物补料时摩尔渗透压浓度的升高。12X培养基4的培养基配方见表7。

[0280] 表7.12X培养基4的补料培养基工作表

[0281]

成分	含量	单位
培养基 4A-1	18.672	g/L
Nucellin™	24.000	ml/L
H/P 贮存液	12.000	ml/L
亚硒酸盐贮存液	1.200	ml/L
PVA	2.400	g/L
天冬酰胺一水合物	1.620	g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.566	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.258	g/L
谷氨酰胺	5.475	g/L
硫胺素	0.040	g/L
预溶的培养基 4B 和葡萄糖	~175	ml/L
酸性半胱氨酸(400 mM)	4.688	ml/L
记录 pH		
用 5N 盐酸调节 pH 为 7.2		

[0282]

FeSO ₄ 贮存液(1mM)	17.250	ml/L
1000 × 微量元素 B	6.750	ml/L
1000 × 微量元素 D	2.475	ml/L
记录 pH (预计为 7.18)		
记录 Osm	566.000	
预溶的培养基 4B 和葡萄糖* (用于 1L 补料培养基)		
水	150 ml	
将培养基 4B (14.5 g)与葡萄糖 (38.3 g)混合	加入	
用 25%NaOH 调节 pH 值直至溶 解(pH 约为 10.25)		

[0283] 注:Nucellin™由Eli Lilly(Indianapolis, IN, USA)制造;H/P贮存液=0.036mg/mL氢化可的松,1.08mg/mL二盐酸腐胺。

[0284] 最终的摩尔渗透压浓度为566mOsm。每日加入4%体积补料使摩尔渗透压浓度提高约8.6,葡萄糖提高2g/L,谷氨酰胺提高1.5mM。12X培养基4配方即为培养基5。培养基5相对于20X培养基4或16X培养基4更易配制,且在室温或4°C贮存10天以上保持稳定(数据未示)。

[0285] 实施例3:培养抗GDF-8细胞的谷氨酰胺饥饿的补料分批方法

[0286] 在起始培养基中CHO细胞需要谷氨酰胺才能存活。初始谷氨酰胺水平通常较高,且在第5天后每日都补料直至补料分批法结束。常规补料分批方法通常会造成细胞培养物中高水平的乳酸盐和铵盐,已知这会抑制细胞生长、细胞密度和重组蛋白质的表达。缓慢将葡萄糖加入培养物的补料分批方法,能够减少乳酸盐产生,并提高细胞生长、细胞密度和重组蛋白质的表达。然而,操作葡萄糖加入的该领域现有方法并不适用于大规模生产。此处,通过采用含有较低起始水平谷氨酰胺的培养基并从补料中除去谷氨酰胺,显示出能产生较低水平的铵盐和乳酸盐,从而增强细胞存活力。此外,谷氨酰胺饥饿的培养物中重组蛋白质的表达提高,且最终的摩尔渗透压浓度降低。

[0287] 材料与方法

[0288] 株系和培养基:以补料分批方式,于1L生物反应器中的培养基1中培养抗GDF-8细胞。

[0289] 培养条件:在1L生物反应器中使细胞生长12天。根据细胞生长状况,在第4或第5天将温度从37°C调为31°C。测试了三种补料分批方法:正常(对照)方法、无谷氨酰胺补料方法和谷氨酰胺饥饿方法。这些方法的相关细节如表8和表9所列。

[0290] 表8. 在1L生物反应器中无谷氨酰胺补料方法的补料分批方法

[0291]

	对照方法	无谷氨酰胺补料方法
起始培养基 谷氨酰胺 (mM)	13 mM	13 mM
谷氨酰胺补料	第 4 天, 5 mM	不加谷氨酰胺
补料培养基	培养基 5 (含 37.5 mM 谷氨酰胺)	不含谷氨酰胺的培养基 5
补料方案	从第 5 天每天 4%	从第 5 天每天 4%
温度调为 31°C	第 4 天	第 5 天

[0292] 表9. 在1L生物反应器中谷氨酰胺饥饿方法的补料分批方法

[0293]

	对照方法	低谷氨酰胺方法
起始培养基 谷氨酰胺 (mM)	13 mM	4 mM
谷氨酰胺补料	第 4 天, 5 mM	不补加谷氨酰胺
补料培养基	培养基 5 (含 37.5 mM 谷氨酰胺)	不含谷氨酰胺的培养基 5

[0294]

	谷氨酰胺)	
补料方案	从第 5 天起每日 4%	从第 5 天起每日 4%
温度调为 31°C	第 4 天	第 5 天

[0295] 样品分析: 每日从培养物中取出样品, 并分析细胞密度、细胞存活力、乳酸盐、谷氨酰胺和铵盐水平。每日也测定表达的抗GDF-8抗体滴度。

[0296] 结果与结论

[0297] 图3显示了在无谷氨酰胺补料或对照补料分批条件下生长的培养物的细胞密度。这两种情况下, 实验过程中的细胞密度相近。

[0298] 图4显示了在无谷氨酰胺补料或对照补料分批条件下生长的培养物的细胞存活力百分数。从第6天起到实验结束, 无谷氨酰胺补料的培养物的细胞存活度明显增加。

[0299] 图5显示了在无谷氨酰胺补料或对照补料分批条件下生长的培养物的铵盐水平。从第4天起到实验结束, 无谷氨酰胺补料的培养物的铵盐水平明显降低。

[0300] 图6显示了在无谷氨酰胺补料或对照补料分批条件下生长的培养物的乳酸盐水平。整个实验过程中, 无谷氨酰胺补料的培养物中乳酸盐水平较低。

[0301] 图7显示了在无谷氨酰胺补料或对照补料分批条件下生长的培养物中的抗GDF-8抗体滴度。无谷氨酰胺补料的培养物中最终的抗GDF-8抗体滴度较高。

[0302] 图8显示了在谷氨酰胺饥饿或对照补料分批条件下生长的培养物的细胞密度。在这两种情况下,实验过程中的细胞密度相似。

[0303] 图9显示了在谷氨酰胺饥饿或对照补料分批条件下生长的培养物的细胞存活力。在这两种情况下,实验过程中细胞的存活力相似。

[0304] 图10显示了在谷氨酰胺饥饿或对照补料分批条件下生长的培养物的铵盐水平。在实验过程中谷氨酰胺饥饿培养物的铵盐水平明显降低。

[0305] 图11显示了在谷氨酰胺饥饿或对照补料分批条件下生长的培养物的乳酸盐水平。从第4天起到实验结束,谷氨酰胺饥饿培养物的乳酸盐水平明显降低。

[0306] 图12显示了在谷氨酰胺饥饿或对照补料分批条件下生长的培养物的抗GDF-8抗体滴度。谷氨酰胺饥饿的培养物中的最终抗-GDF-8抗体滴度较高。

[0307] 综合这些结果提示,谷氨酰胺水平的降低通过减少铵盐产生量、提高细胞存活力、并增加表达的抗GDF-8抗体滴度,而对细胞培养物有利。此外,谷氨酰胺饥饿培养物中观测到低乳酸盐水平,可能是葡萄糖的消耗速率降低所致。降低的铵盐和乳酸盐水平也对减少总摩尔渗透压浓度有效。已知摩尔渗透压浓度的升高对细胞生长和存活有抑制作用。低起始水平谷氨酰胺加上除去谷氨酰胺的补料,对减少在贮存培养基中非酶解的谷氨酰胺降解导致的铵盐产生,也具有正面效果。在补料中除去谷氨酰胺也简化了抗GDF-8细胞的培养流程。

[0308] 实施例4.培养基1和培养基2中抗GDF-8细胞的铁剂量应答

[0309] 培养基1的营养成分比培养基2浓很多。为避免在细胞培养过程中的缺铁问题,确定培养基1中细胞生长最佳的铁水平。

[0310] 材料与方法

[0311] 将抗GDF-8细胞在含有培养基1或培养基2的平皿上培养一代。通过加入不同量的铁贮存溶液,操控这些培养基中的铁浓度。用CEDEX测定最终细胞密度。

[0312] 结果与结论

[0313] 图13显示了在含有不同铁浓度的培养基1和培养基2中,抗GDF-8细胞的铁剂量应答。在培养基2中,铁浓度在3 μ M至15 μ M间时细胞密度相对恒定。在培养基1中,细胞密度随着铁浓度增加,但在约5 μ M时达到最大。这种差异可能是由于培养基1中高浓度的营养物含量可能降低了细胞对铁的利用度(铁在培养基中被螯合所致)。这些结果提示应保持铁水平大于5 μ M,以避免在培养基1中铁缺乏的问题。

[0314] 实施例5.在生物反应器方法中用谷氨酸替代谷氨酰胺

[0315] 进行三个实验,测试在抗Lewis Y细胞培养过程中,用谷氨酸替代谷氨酰胺的效果。

[0316] 材料与方法

[0317] 于10L生物反应器中进行这些实验,pH 7.1、30%溶解氧、起始温度为37°C,且在第5天变为31°C。喷射和顶部气体为88%的混合气体(93%空气/7%CO₂)和12%氧气。所有实验中起始培养基均为含谷氨酰胺的培养基1。补料培养基和补料方案,包括补充的葡萄糖和谷氨酰胺补料见表10。标记“谷氨酸”的栏以改良的培养基5补料,所述改良的培养基5不含谷氨酰胺,但含有与标准培养基5中等摩尔浓度的谷氨酸。标记谷氨酰胺的栏以标准培养基5补料。

[0318] 表10.补料方案

[0319]

天数	9040-44		9040-56		9040-64	
	谷氨酸 1	谷氨酰胺 1	谷氨酸 2	谷氨酰胺 2	谷氨酸 3	谷氨酰胺 3
0						
1						
2						
3						
4		5 mM gln		5 mM gln	3 g/L gluc3	7.7 mM gln 2.9g/l gluc
5	3.6 g/ gluc	5 mM gln 5.5 g/L gluc	3.5 g/L gluc	5 mM gln, 6 g/L gluc	3 g/L gluc	3 g/L gluc

[0320]

6	12% 16X 培养基 4	12% 16X 培养基 4	17% 培养基 5	17% 16X 培养基 4	29% 培养基 5	29% 培养基 5
7		4 mM gln				
8						
9		2.5 g/L gluc				
10	10% 16X 培养基 4	10% 16X 培养基 4	8% 培养基 5	5% 16X 培养基 4		
11		1 g/L gluc				
12						
13		1 g/L gluc				

[0321] 结果与结论

[0322] 如图14所示,每一实验中的细胞密度相似。由于实验第3天的pH值偏离至约6.7,谷氨酰胺2和谷氨酸2实验中的细胞密度较低。由于在第6天补入29%的培养基,导致谷氨酰胺3和谷氨酸3实验在第6天和第7天之间细胞密度下降。

[0323] 图15显示了在谷氨酸和谷氨酰胺补料培养物中的细胞存活力。在含有谷氨酸补料培养物的生物反应器中细胞的存活力在后半程中维持较高。

[0324] 在实验1中,谷氨酸和谷氨酰胺补料培养物中的抗Lewis Y滴度相似。图16显示了在实验2和3中,谷氨酰胺补料反应器中的抗Lewis Y滴度较低。观察到的这些反应器中较低的抗Lewis Y滴度,可能是由于产生了高水平的乳酸盐,如图17所示。

[0325] 含有谷氨酸的补料培养基的生物反应器中铵盐浓度(图18)和摩尔渗透压浓度(图

19)较低。

[0326] 利用结合ELISA测定检测谷氨酰胺1和谷氨酸1实验中样品的活性。其活性相似：谷氨酰胺1样品为参照的110%，而谷氨酸1样品为参照的122%（数据未示）。

[0327] 在这些实验中用谷氨酸代替谷氨酰胺，对于细胞密度没有明显影响。但是，细胞存活力在以谷氨酰胺补料的生物反应器中较低。以谷氨酸补料的生物反应器相对于以谷氨酰胺补料者，其中铵盐、乳酸盐和摩尔渗透压浓度较低。平均而言，以谷氨酸补料的生物反应器中抗Lewis Y滴度较高，而在两种条件下活性基本相同。

[0328] 实施例6.抗Lewis Y细胞培养过程中葡萄糖和谷氨酰胺的替换

[0329] 本实验的目的在于，测试在培养抗Lewis Y细胞时以下表11列出的补料培养基的葡萄糖和谷氨酰胺进行替换的效果（见Bogheart等人，Antibody-targeted chemotherapy with the calicheamicin conjugate hu3S193-N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide targets Lewisy and eliminates Lewisy-positive human carcinoma cells and xenografts, Clin.Can.Res.10:4538-49(2004)）。测定细胞密度、细胞存活力、抗Lewis Y滴度和铵盐水平。

[0330] 材料与方法

[0331] 于250ml摇瓶中进行本实验，起始体积75ml。所有摇瓶中都以 0.25×10^6 细胞/ml接种培养基2。于37°C含7%CO₂的温箱里温育这些摇瓶14天。在第3天和第4天，向摇瓶中补入5%体积的补料培养基6。表11中列出了培养基6的成分。在第5-13天，向摇瓶中补入5%体积的表12中列出的补料溶液之一。每个条件进行一式两份重复。每日取样品用CEDEX进行细胞计数，并检测铵盐、葡萄糖和乳酸盐。

[0332] 表11.培养基6的组成

[0333]

氨基酸	mg/L	mM	微量元素	μg/L	nM
丙氨酸	142.48	1.60	亚硒酸钠	40.00	231.35
精氨酸	1528.84	8.79	CuSO ₄	3.44	21.51
天冬酰胺一水合物	1080.60	7.20	CuSO ₄ •5H ₂ O	7.49	30.00
天冬氨酸	532.40	4.00	FeSO ₄ •7H ₂ O	2534	9115
胱氨酸二盐酸盐	473.00	1.51	ZnSO ₄ •7H ₂ O	2704	9421
谷氨酸	235.38	1.60	MnSO ₄ •H ₂ O	0.17	1.01

[0334]

谷氨酰胺	4820.00	33.01	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	140	492.84
甘氨酸	120.07	1.60	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.24	1.00
组氨酸盐酸盐一水合物	588.32	2.80	NH_4VO_3	0.65	5.56
异亮氨酸	944.52	7.21	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.13	0.49
亮氨酸	1360.75	10.39	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12	0.53
盐酸赖氨酸	1456.80	8.00	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.20	4.97
甲硫氨酸	477.06	3.20	AgNO_3	0.17	1.00
苯丙氨酸	660.36	4.00	$\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	2.55	9.98
脯氨酸	552.31	4.80	KBr	0.12	1.01
丝氨酸	1264.70	12.04	$\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$	2.28	9.99
苏氨酸	762.02	6.40	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.38	10.00
色氨酸	260.94	1.28	CrCl_3	0.32	2.02
二水合二钠酪氨酸	832.62	3.19	NaF	4.20	100.02
缬氨酸	749.21	6.40	GeO_2	0.53	5.07
			KI	0.17	1.02
维生素	mg/L	mM	RbCl	1.21	10.01
生物素	3.28	0.01	$\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	3.22	9.99
泛酸钙	36.02	0.08			
氯化胆碱	143.28	1.03	其它成分	μg/L	nM
叶酸	42.43	0.10	氢化可的松	288	0.79
肌醇	201.71	1.12	二盐酸腐胺	8000	49.66
烟酰胺	32.02	0.26	亚油酸	336.25	1.20
盐酸吡哆醇	32.82	0.16	硫辛酸	840.63	4.08
核黄素	3.60	0.01			
盐酸硫胺素	35.22	0.10	其它成分	mg/L	mM
维生素 B12	11.21	0.01	D-葡萄糖(右旋糖)	33005.99	183.37
			PVA	2400.00	
无机盐	mg/L	mM	Nucellin™	80.00	
KH_2PO_4	1635.00	12.02			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	171.98	0.70			

[0335] 表12. 第5-13天的补料。不含葡萄糖和谷氨酰胺的改良培养基6。

[0336]

GluGln	改良培养基6+43g/L葡萄糖+4.82g/L谷氨酰胺(对照)
GluGlu	改良培养基6+43g/L葡萄糖+4.82g/L谷氨酸
GluAsp	改良培养基6+43g/L葡萄糖+4.36g/L天冬酰胺

[0337]

GluGlyGln	改良培养基6+43g/L葡萄糖+6.71g/L甘氨酸谷氨酰胺
GalGlu	改良培养基6+43g/L半乳糖+4.82g/L谷氨酰胺
GalGln	改良培养基6+43g/L半乳糖+4.82g/L谷氨酸
GalAsp	改良培养基6+43g/L半乳糖+4.36g/L天冬酰胺

GalGlyGln	改良培养基6+43g/L半乳糖+6.71g/L甘氨酸谷氨酰胺
Glu	培养基6+43g/L葡萄糖

[0338] 结果与结论

[0339] 补料培养基中存在葡萄糖或半乳糖时,用谷氨酸或甘氨酸谷氨酰胺替代谷氨酰胺,细胞密度最高。一般在以葡萄糖/谷氨酰胺、半乳糖/谷氨酰胺、或仅葡萄糖为补料的培养物中细胞密度较低(图20)。最终存活力在仅补料葡萄糖的培养物中最高,其次是以葡萄糖/谷氨酸补料的培养物。在补入与葡萄糖或半乳糖组合的谷氨酰胺或天冬酰胺的培养物中存活力最低(图21)。

[0340] 葡萄糖/甘氨酸谷氨酰胺和葡萄糖/谷氨酸补料培养物中,第14天的滴度最高,约为700 μ g/ml。在半乳糖/甘氨酸谷氨酰胺和半乳糖/天冬酰胺补料的培养物中滴度最低,约为500 μ g/ml。在葡萄糖/谷氨酰胺对照中滴度约为570 μ g/ml(图22)。

[0341] 在以葡萄糖/谷氨酸补料或仅以葡萄糖补料的摇瓶中铵盐水平最低。半乳糖/谷氨酸、葡萄糖/谷氨酰胺、葡萄糖/甘氨酸谷氨酰胺和葡萄糖/天冬酰胺补料的摇瓶中铵盐水平居中。以半乳糖/天冬酰胺、半乳糖/甘氨酸谷氨酰胺、和半乳糖/谷氨酰胺补料的摇瓶中铵盐水平最高(图23)。

[0342] 直至第11天,所有补入半乳糖的摇瓶中葡萄糖水平平均高于1g/L。从第11天到第14天,这些培养物中的葡萄糖从未被完全耗尽,保持在0.6-1g/L之间,在不同培养物之间无明显差异。

[0343] 直至第10天,以葡萄糖补料或与另一底物组合的葡萄糖补料的所有摇瓶中的葡萄糖水平均在增加。从第10天到第14天,这些培养物中的葡萄糖水平相当恒定,且彼此类似。第14天时,在葡萄糖/谷氨酰胺补料培养物中还剩约8.4g/L葡萄糖,而在仅葡萄糖补料的培养物中,葡萄糖约为10.8g/L。

[0344] 所有细胞的条件都相同时,乳酸盐水平在第5天达到最高约2.4g/L,至第14天时所有培养物中均下降至接近零。葡萄糖/谷氨酰胺对照中的乳酸盐水平从第10天至第14天最高,但在此期间低于1g/L(数据未示)。

[0345] 该实验中测试的所有条件都导致细胞密度高于葡萄糖/谷氨酰胺对照条件。除半乳糖/天冬酰胺条件外,所有测试条件都导致最终存活力高于葡萄糖/谷氨酰胺对照条件或半乳糖/谷氨酰胺补料条件。葡萄糖/谷氨酰胺对照中的滴度约为570 μ g/ml,相比而言,葡萄糖/甘氨酸谷氨酰胺补料条件和葡萄糖/谷氨酸补料条件的滴度较高,约为700 μ g/ml。

[0346] 实施例7.对用谷氨酰胺饥饿的分批方法生产抗GDF-8的评估

[0347] 一般的补料分批生产方法需要在培养期间多步补料。这些补料旨在取代培养基中可能被细胞消耗或可能在分批(培养)过程中降解的营养物质。当此方法扩大用于较大反应器时,这些补料可能会使情况复杂化,如需要叶轮窜动(见图24)。此外,这些补料稀释了已分泌到培养物中的抗GDF-8的量,从而影响收集滴度。使用分批方法,可以用全部体积而非部分体积的生物反应器来接种以容纳补料,从而不必使用叶轮窜动,并大幅减少对生产率的任何稀释作用。

[0348] 谷氨酰胺是采用补料分批方法的最重要的原因之一,因为它在37°C不稳定,且被认为需要在分批培养过程中进行补充。然而测试谷氨酰胺饥饿策略的实施例2、5和6的结果显示,相对于与谷氨酰胺补料的对照反应器,生产率明显提高。将本结果与分批方法组合,

产生了本实施例测试的谷氨酰胺饥饿的分批方法。

[0349] 材料与方法

[0350] 根据以下四个生长条件,使抗GDF-8细胞在1L生物反应器中生长12天。设置所有条件下的生物反应器参数都相同。利用空气喷射维持溶解氧不低于23%的空气饱和度,通过加入含有0.58M碳酸氢钠和0.71M碳酸钠的溶液,维持pH值为7.00。在前4天分批培养时所有培养物的温度都维持在37°C。分批培养的第4天,将所有生物反应器的温度降为31°C,且整个分批培养期间维持此温度。分别在第5、7和10天向对照培养物和补料分批培养物加入占总反应器体积8%、12%和8%的相应补料培养基。

[0351] 1)对照。

[0352] -在培养基7上接种(见表13)。

[0353] -第5、7、10天时加入培养基8(见表13)。

[0354] -第4天时加入5mM谷氨酰胺。

[0355] -第4天将温度降至31°C。

[0356] 2)谷氨酰胺饥饿的分批补料

[0357] -在仅含4mM谷氨酰胺的培养基7上接种(见表13)。

[0358] -第5、7、10天时加入不含谷氨酰胺的培养基8(见表13)。

[0359] -第4天不添加谷氨酰胺。

[0360] -第4天将温度降至31°C。

[0361] 3)分批谷氨酰胺饥饿

[0362] -在仅含4mM谷氨酰胺的新分批培养基上接种(见表13)。

[0363] -无补料培养基。

[0364] -不添加谷氨酰胺。

[0365] -第4天将温度降至31°C。

[0366] -第8天时加入5g/L葡萄糖。

[0367] 4)在第8天补充的分批谷氨酰胺饥饿

[0368] -在仅含4mM谷氨酰胺的新分批培养基上接种(见表13)。

[0369] -无补料培养基。

[0370] -不添加谷氨酰胺。

[0371] -第4天将温度降至31°C。

[0372] -第8天时加入4g葡萄糖、375mg天冬酰胺、1mM FeSO₄贮存溶液3mL、5g/L NucellinTM溶液3.33mL、36mg/L氢化可的松2.57mL和1.0g/L腐胺贮存溶液、50mg/L亚硒酸钠贮存溶液0.23mL,以及13.1mg的硫胺素。

[0373] 表13.所用培养基的成分

[0374]

	分子量	培养基7	培养基8	分批培养基
氨基酸		mM	mM	mM
L-丙氨酸	89.0	1.08	2.4	0.2
L-精氨酸	174.0	6.84	13.2	4
L-天冬酰胺一水合物	150.0	4.76	21.4	7.5

L-天冬氨酸	133.0	2.40	6	1.65
L-半胱氨酸盐酸盐一水合物	176.0	0.40	0	0.4
L-胱氨酸二盐酸盐	313	0.95	1.875	1
L-谷氨酸	147.0	1.08	2.4	1.08
L-谷氨酰胺	146.0	13.00	37.5	4
甘氨酸	75.0	1.28	2.4	1.54
L-组氨酸盐酸盐一水合物	210.0	1.76	4.2	1.76
L-异亮氨酸	131.0	4.76	10.8	2.83
L-亮氨酸	131.0	6.52	15.6	4.7
盐酸赖氨酸	182.0	5.20	12	5.2
L-甲硫氨酸	149.0	1.96	4.8	2.6
L-苯丙氨酸	165.0	2.60	6	2.2
L-脯氨酸	115.0	3.24	7.2	4.1
L-丝氨酸	105.0	8.60	18	8.6
L-苏氨酸	119.0	4.32	9.6	3.2
L-色氨酸	204.0	0.78	1.92	1.04
二水合L-酪氨酸二钠	261.0	2.16	4.8	1.75
L-缬氨酸	117.0	4.32	9.6	4

[0375]

维生素		uM	uM	uM
生物素	244.0	8.31	20.4	11
D-泛酸钙	476.0	46.06	112.8	46.06
氯化胆碱	139.0	632.2	1548	840
叶酸	441.0	58.8	144	58.8
I-肌醇	180.0	686	1680	911
烟酰胺	122.0	161.7	396	215
盐酸吡哆醇	206.0	88.15	240	88
盐酸吡哆醛	203.0	10	0	10
核黄素	376.0	5.37	13.2	1.1
盐酸硫胺素	337.0	63.7	274.7	117
维生素B12	1355.0	4.9	12	7.8
无机盐				
NaCl	58.5	18.8mM		
KCl	74.6	4.2mM		4.19mM
CaCl ₂	111	1.05mM		1.05mM
亚硒酸钠	173	27ug/L	60ug/L	60ug/L
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	142	4.68mM	11mM	4.68mM

Na ₂ HPO ₄	138	0.5mM		0.3986mM
MgSO ₄	120	1.15mM	1.05mM	1.15mM
MgCl ₂	95	0.3mM		0.3mM
FeSO ₄ • 7H ₂ O	278	9uM	24.675uM	9uM
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	404	0.125uM		0.124um
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	287	9.2uM	17uM	9.2um
CuSO ₄	160	0.05uM	0.074uM	0.064um

[0376]

NaHCO ₃	84	23.8mM		23.8mM
其它				
葡萄糖	180	16g/L	38.3g/L	15g/L
聚乙烯醇		2.56g/L	2.4g/L	2.56g/L
氢化可的松	363	0.23mg/L	0.43mg/L	0.28mg/L
二盐酸腐胺	161	6.4mg/L	12mg/L	7.7mg/L
丙酮酸钠	110	500uM		500uM
亚油酸	280	0.81uM	1.8uM	0.81uM
硫辛酸	206	2.7uM	6uM	2.7uM
Nucellin™		54mg/L	120mg/L	50mg/L
1000×微量元素B		1.5ml/L	6.75ml/L	1.5ml/L

[0377] 结果与结论

[0378] 对照和分批方法中前4天的细胞生长相似,而谷氨酰胺饥饿的分批补料方法中细胞密度稍低,并且在其后的分批过程中保持稍低。两种分批方法在分批期间都维持了较高的细胞密度,可能是由于不存在任何明显的稀释作用(见图25)。直到第8天,所有培养物的存活力相同。然而有意思的是,未补充的分批方法在第11天时的存活力低于其它三个生物反应器,且至最后一天时显著偏低。这提示还能最优化分批培养基,因为补充的分批方法具有和补料分批的生物反应器相同的存活力(见图26)。

[0379] 谷氨酰胺饥饿的分批方法或谷氨酰胺饥饿的补料分批方法中培养的细胞,生产率都比在对照补料分批方法培养的相同细胞要高。对照补料分批方法的日收集滴度如预期为685μg/mL,而谷氨酰胺饥饿的补料分批方法的日收集滴度为1080μg/mL,比对照高出约58%。这与前面所见到的结果类似。谷氨酰胺饥饿的非充分分批方法的日收集滴度为960μg/mL,比对照高40%,与谷氨酰胺饥饿的补料分批方法相似,而补充的谷氨酰胺饥饿的分批方法具有最高滴度1296μg/mL。比对照高出89%(见图27)。

[0380] 分析四种条件下抑制剂的水平,结果显示所有三种谷氨酰胺饥饿的方法中,乳酸盐和铵盐水平都明显低于对照。事实上,这三个条件在第4天后都不再产生或者开始消耗乳酸盐,而对照还在分批过程中继续产生乳酸(见图28)。如预期的那样,谷氨酰胺饥饿方法中的铵盐水平低得多并在4天后下降,而对照则持续产生铵盐(见图29)。

[0381] 本实施例中,将谷氨酰胺饥饿的策略与分批方法相结合,可使抗GDF-8细胞生产率比对照的补料分批方法提高40%。数据也提示,对分批培养基做一些优化,可以获得几乎2倍

提高的生产率。生产率的提高可以归于两个因素。第一,谷氨酰胺饥饿可直接或通过控制铵盐和乳酸盐于低水平而提高生产率。第二,由于缺乏补料,分批过程中的滴度没有被稀释。生产率的提高以及分批过程本身的易于操作,使其成为生产重组多肽的有利选择。

[0382] 实施例8.抗GDF-8细胞培养过程中,分批培养基中谷氨酰胺和天冬酰胺浓度的效果

[0383] 在实施例2、5和6中,已经证实谷氨酰胺的饥饿对于两种细胞系的补料分批培养有益,包括促进细胞生长、细胞存活力和滴度,以及降低乳酸盐和铵盐的产生。天冬酰胺似乎也在分批培养基中发挥作用。

[0384] 材料与方法

[0385] 在1L生物反应器中含不同浓度谷氨酰胺和天冬酰胺的改良培养基9内培养抗GDF-8细胞。表14列出了培养基9的基本成分。表15列出了这些基本成分的实验变量。除了4号反应器的温度在第一天因温度控制问题为30°C外,前5天在37°C温育培养物。第6天时将培养物变至31°C。第7天时,向培养物中一次补加5%体积的不含谷氨酰胺的培养基5。每日测定培养物的细胞密度、抗GDF-8滴度、乳酸盐和铵盐水平。

[0386] 表14.培养基9的成分

[0387]

氨基酸	mg/L	mM	微量元素	µg/L	nM
丙氨酸	17.80	0.20	亚硒酸钠	69.16	400.00
精氨酸	696.00	4.00	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50.00	123.76
天冬酰胺一水合物	3000.00	20.00	CuSO_4	10.24	64.00
天冬氨酸	219.45	1.65	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	99.88	400.00
半胱氨酸盐酸盐一水合物	70.40	0.40	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4170	15000
二盐酸合半胱氨酸	468.75	1.50	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2640	9200
谷氨酸一钠	33.80	0.20	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	33.80	200.00
谷氨酰胺	584.00	4.00	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	284.07	1000
甘氨酸	115.50	1.54	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	247.20	200.00
组氨酸盐酸盐一水合物	474.60	2.26	NH_4VO_3	2.34	20.00
异亮氨酸	570.73	4.36	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.26	20.00
亮氨酸	1030.70	7.87	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.90	4.00
盐酸赖氨酸	1401.40	7.70	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.97	4.00
甲硫氨酸	387.40	2.60	KBr	0.48	4.00
苯丙氨酸	507.00	3.07	CrCl_3	15.83	100.00
脯氨酸	539.50	4.69	NaF	0.17	4.00
丝氨酸	1052.00	10.02	GeO_2	0.42	4.00
苏氨酸	564.80	4.75	KI	33.20	200.00
色氨酸	274.16	1.34	RbCl	0.48	4.00
二水合酪氨酸二钠	745.75	2.86	H_3BO_3	12.37	200.00
缬氨酸	749.00	6.40	LiCl	0.17	4.00
维生素	mg/L	mM	其它成分	µg/L	nM
生物素	2.68	0.01	氢化可的松	540.00	1.49
泛酸钙	21.92	0.05	二盐酸腐胺	15000	93.11
氯化胆碱	158.46	1.14	亚油酸	290.00	1.04

[0388]

叶酸	25.93	0.06	硫辛酸	716.00	3.48
肌醇	163.98	0.91			
烟酰胺	26.23	0.22	其它成分	mg/L	mM
盐酸吡哆醛	2.03	0.01	D-葡萄糖(右旋糖)	15000.00	83.33
盐酸吡哆醇	36.13	0.18	PVA	2560.00	
核黄素	2.41	0.01	Nucellin™	50.00	
盐酸硫胺素	39.43	0.12	丙酮酸钠	55.00	0.50
维生素 B12	21.17	0.02			
无机盐	mg/L	mM			
CaCl ₂	116.55	1.05			
KCl	312.90	4.19			
Na ₂ HPO ₄	56.60	0.40			
NaCl	1100.00	18.80			
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	645.84	4.68			
MgSO ₄	138.00	1.15			
MgCl ₂	28.50	0.30			
NaHCO ₃	2000.00	23.81			

[0389] 表15. 测试的谷氨酰胺和天冬酰胺条件

[0390]

	1号反应器	2号反应器	3号反应器	4号反应器	5号反应器	6号反应器
细胞系	抗 GDF-8					
培养基	分批培养基(培养基 9)					
谷氨酰胺水平	1 mM	1 mM	1 mM	4 mM	4 mM	4 mM

[0391]

天冬酰胺水平	8 mM	12 mM	20 mM	8 mM	12 mM	20 mM
播种密度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	0.3 至 0.35					
补料培养基	培养基 5-谷氨酰胺, 第 7 天加 5%					
培养天数	12					
温度改变 (37-31°C)	第 6 天	第 6 天	第 6 天	第 5 天	第 5 天	第 4 天

[0392] 结果与结论

[0393] 图30、31、32和33分别显示了在多种实验条件下,整个实验过程中抗GDF-8细胞的细胞生长、抗GDF-8滴度、乳酸盐水平和铵盐水平。

[0394] 在所有实验条件中,所有测试的天冬酰胺水平下,4mM谷氨酰胺都优于1mM谷氨酰胺。谷氨酰胺水平相当时,12mM和20mM天冬酰胺条件优于8mM的天冬酰胺条件。在培养终末期,可见所有测试条件下乳酸盐和 NH_4 水平都降低。

[0395] 实施例9.分批培养基中谷氨酰胺和天冬酰胺的浓度对抗GDF-8细胞培养方法的作用

[0396] 实施例8证实了无论天冬酰胺的水平如何,谷氨酰胺初始浓度为4mM的培养基9优于含谷氨酰胺1mM的培养基。本实施例说明了含13mM谷氨酰胺和不同水平天冬酰胺的培养基的效果。

[0397] 材料与方法

[0398] 如表16中所列,于1L生物反应器含不同浓度的谷氨酰胺和天冬酰胺的改良培养基9中,培养抗GDF-8细胞12天。最初3天在37°C温育培养物。然后第4天将培养物变为31°C。第7天时向培养物中一次补加5%体积的不含谷氨酰胺的培养基5。定期测量培养物的细胞密度、细胞存活力、乳酸盐、铵盐水平和谷氨酰胺水平、抗GDF-8滴度和摩尔渗透压浓度。

[0399] 表16.测试的谷氨酰胺和天冬酰胺条件

[0400]

	1号反应器	2号反应器	3号反应器	4号反应器	5号反应器	6号反应器
细胞系	抗 GDF-8					
培养基	分批培养基 (培养基 9)					
谷氨酰胺水平	4 mM	4 mM	13 mM	13 mM	13 mM	13 mM
天冬酰胺水平	20 mM	20 mM	20 mM	12 mM	12 mM	8 mM
播种密度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	0.3 至 0.35					
补料培养基	培养基 5(不含谷氨酰胺), 第 7 天加 5%					
培养天数	12					
温度改变 (37-31°C)	第 4 天	第 4 天	第 4 天	第 4 天	第 4 天	第 4 天

[0401] 结果与结论

[0402] 图34、35、36、37、38、39和40分别显示了在多种实验条件下,整个实验期间抗GDF-8细胞的细胞生长、抗GDF-8细胞的存活力百分比、乳酸盐水平、铵盐水平、谷氨酰胺水平、抗GDF-8滴度和摩尔渗透压浓度。

[0403] 在所有测试的条件下,只有含13mM谷氨酰胺和20mM天冬酰胺的培养基9,对细胞生长和滴度具有显著的负作用。无论培养物起始谷氨酰胺是4mM还是13mM,所有培养物中的谷氨酰胺都约同时耗尽。含13mM谷氨酰胺和12mM天冬酰胺的培养物中抗GDF-8的滴度最高。所有培养条件下,培养末期的乳酸盐和铵盐水平都降低。含有13mM谷氨酰胺和20mM天冬酰胺的培养物中的铵盐水平最高。

[0404] 实施例10.天冬酰胺和半胱氨酸的水平对在培养基9中培养的抗GDF-8细胞中观察到的乳酸盐和铵盐水平降低的影响

[0405] 实施例2、5和6中,发现在谷氨酰胺饥饿条件下生长的培养物,培养末期乳酸盐和铵盐的水平降低。但在非谷氨酰胺饥饿条件生长于培养基9的培养物,在培养过程末期仍然有乳酸盐和铵盐水平的降低。在其他培养基如培养基1中没有观察到这一效应,似乎谷氨酰胺饥饿对于乳酸和铵盐水平的降低是必需的。培养基9和培养基1的天冬酰胺(培养基9为20mM,而培养基1含补料共计为11mM)和酸性胱氨酸(培养基9为1.5mM,而培养基1为0.95mM)的水平不同。本实施例测试了这两种成分是否与在培养末期观察到的乳酸盐和铵盐水平的降低有关。

[0406] 材料与方法

[0407] 将抗GDF-8细胞在1L生物反应器中培养12天。最初在37°C培养细胞,第4天或第5天在 $8-10 \times 10^6/\text{ml}$ 时变为31°C。表17列出了测试的多种实验条件。每日取出样本,留作蛋白质A HPLC滴度分析。

[0408] 表17.测试的天冬酰胺和半胱氨酸条件

[0409]

培养基	Gln (mM)	Asn (mM)	总 Gln (mM)	总 Asn (mM)	补料	
培养基 1	13	5	29	11	培养基 5, 总 30%	5mM Gln, 第 4 天
培养基 1	4	5	4	11	培养基 5-Gln, 总 30%	
分批培养基 (培养基 9)	4	20	4	21	培养基 5-Gln, 5% 第 7 天	
培养基 1+ 5 mM Asn + 0.5 mM 半胱氨酸	13	10	29	16	培养基 5, 总 30%	5mM Gln, 第 4 天
分批培养基 (培养基 9)	13	20	29	21	培养基 5, 总 30%	5mM Gln, 第 4 天

[0410] 注:培养基5-Gln=不含谷氨酰胺的培养基5.

[0411] 结果与结论

[0412] 无论培养物中的起始谷氨酰胺浓度是4mM或13mM,培养基9中生长的抗GDF-8细胞在培养过程末期的乳酸盐和铵盐的水平都有降低(见图42和图43)。与之相反,仅当培养物中起始谷氨酰胺为4mM时,培养基1才在培养过程末期出现乳酸盐和铵盐水平的降低(见图42和图43)。向培养基1中添加额外的天冬酰胺和半胱氨酸,不会造成培养末期乳酸盐和铵盐水平的降低(见图42和图43)。

[0413] 在培养过程末期出现乳酸盐和铵盐水平降低的培养物(含4mM谷氨酰胺的培养基1,含4mM谷氨酰胺的培养基9和含13mM谷氨酰胺的培养基9),在培养过程末期也具有较低的总摩尔渗透压浓度(见图47)。

[0414] 含4mM谷氨酰胺的培养基9抗GDF-8滴度最高,其次为在第4天加入13mM谷氨酰胺的培养基9(见图46)。考虑到补料的稀释效应,含4mM谷氨酰胺的培养基9与含有13mM谷氨酰胺的培养基9具有相同的抗GDF-8滴度。

[0415] 实施例11.氨基酸和维生素水平对培养基9培养的抗GDF-8细胞中观察到的乳酸盐和铵盐水平下降的影响

[0416] 实施例10测试了培养基1和培养基9间天冬酰胺和半胱氨酸水平的差别是否造成了非谷氨酰胺饥饿的培养基9在培养过程末期乳酸盐和铵盐水平的降低。已经确定这些因素并不会造成所观测的降低。培养基1和培养基9的氨基酸和维生素浓度也有差异。本实施例测试了这两种培养基间氨基酸和维生素浓度的差别是否造成了观察到的降低。

[0417] 材料与方法

[0418] 将抗GDF-8细胞在1L生物反应器中培养12天。最初在37°C培养细胞,第4天在 $8-10 \times 10^6$ 细胞/ml时变为31°C。表18列出了测试的多种实验条件。在多种实验条件下的培养基1中添加氨基酸、维生素、氢化可的松和腐胺、微量元素E(表19列出的成分)和铁,使这些成分的水平与培养基9中相同。每日取出样本,留作蛋白质A HPLC滴度分析。

[0419] 表18.测试的氨基酸和维生素条件

[0420]

培养基	Gln (mM)	Asn (mM)	补料	第 5 天	第 7 天	第 10 天	第 11 天
-----	----------	----------	----	-------	-------	--------	--------

[0421]

培养基 1	13	5	培养基 5 总 30%, 8% 培养基 5 12%培养基 5 8%培养基 5 5 mM Gln, 第 4 天
培养基 1+AA	13	15	培养基 5 总 30% 8% 培养基 5 12%培养基 5 8%培养基 5 5 mM Gln, 第 4 天
培养基 1+Vit,H/P,E,Fe	13	5	培养基 5 总 30%, 8% 培养基 5 12%培养基 5 8%培养基 5 4g/L 葡萄糖 5 mM Gln, 第 4 天
培养基 1+所有 含有 13 mM 谷氨 酰胺的培养基 9	13	15	培养基 5 总 30%, 8% 培养基 5 12%培养基 5 8%培养基 5 4g/L 葡萄糖 5 mM Gln, 第 4 天
	13	20	培养基 5 总 30%, 8% 培养基 5 12%培养基 5 8%培养基 5 5 mM Gln, 第 4 天

[0422] 注:AA=氨基酸,H/P:=0.036mg/mL氢化可的松、1.08mg/mL二盐酸腐胺、E:微量元素E。

[0423] 表19. 微量元素E的成分

[0424]

微量元素	μg/L	nM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	123.60	100.00
AlCl ₃ • 6H ₂ O	0.48	2.00
H ₃ BO ₃	6.18	100.00
CrCl ₃	7.92	50.00
CuSO ₄ • 5H ₂ O	49.94	200.00
GeO ₂	0.21	2.00
KBr	0.24	2.00
KI	16.60	100.00
LiCl	0.08	2.00
MnSO ₄ • H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ SiO ₃ • 9H ₂ O	142.03	500.00
NaF	0.08	2.00

[0425]

NH ₄ VO ₃	1.17	10.00
NiSO ₄ • 6H ₂ O	2.63	10.00
RbCl	0.24	2.00
SnCl ₂ • 2H ₂ O	0.45	2.00
亚硒酸钠	34.58	200.00

[0426] 结果与结论

[0427] 除了含有添加氨基酸的培养基1,所有测试条件都出现了培养过程末期乳酸盐和铵盐水平的降低,说明与培养基1相比,培养基9中升高的氨基酸水平可能不是造成乳酸盐

和铵盐水平下降的原因(见图49和50)。然而,含有添加维生素、氢化可的松和腐胺、微量元素E和铁的培养基1,相对于含有添加了氨基酸的培养基1,培养过程末期乳酸盐和铵盐水平更低(见图49和50)。说明这些成分可能造成了培养基9中观察到的降低。

[0428] 在含有添加维生素、氢化可的松和腐胺、微量元素E和铁的培养基1中生长的培养物,在实验过程中的铵盐水平最低,因为在初始培养基中天冬酰胺和谷氨酰胺的总量较低(见图50)。

[0429] 实施例12.维生素、微量元素E和铁水平对培养基9中培养的抗GDF-8细胞中观察到的乳酸盐和铵盐水平下降的影响

[0430] 实施例11确定了培养基9中相对培养基1升高的维生素、氢化可的松和腐胺、微量元素E和铁可能造成了培养过程末期观察到的乳酸盐和铵盐水平的降低。此处,对这些成分进行独立和组合测试,以确定哪个或哪些成分导致了观察到的降低。

[0431] 材料与方法

[0432] 将抗GDF-8细胞在1L生物反应器中培养12天。细胞最初培养于37°C,并于第4天 $8-10 \times 10^6$ 细胞/ml时变为31°C(除了含有微量E元素的培养基1,其在第4天 6×10^6 细胞/ml时改变)。表20列出了测试的多种实验条件。在所有实验条件的培养基1中添加氢化可的松和腐胺,使得这些成分的水平与培养基9中相同。向多种实验条件的培养基1中添加维生素、微量元素E(表19列出的成分)和铁,使得这些成分的水平与培养基9中相同。每日取出样本,留作蛋白质A HPLC滴度分析。

[0433] 表20.测试的氨基酸和维生素条件

[0434]

培养基	Gln (mM)	Asn (mM)	补料	温度变化	第4天	第5天	第7天	第10天
培养基 1+Fe	13	15	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5
培养基 1+E	13	15	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5
培养基 1+Vit	13	15	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5
培养基 1+Fe+E	13	15	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5
培养基 1+Fe+Vit	13	15	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5
培养基 1+E+Vit	13	15	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5
含 13mM 谷氨酰胺的培养基 9	13	20	培养基 5 总 30%	第4天	5 mM Gln, 第4天	8% 培养基 5	12% 培养基 5	8% 培养基 5

[0435] 注:E:微量元素E。

[0436] 结果与结论

[0437] 在所有测试的条件下,只有含有13mM谷氨酰胺的培养基9和含有微量元素E的培养基1,在培养过程末期乳酸盐和铵盐水平降低(见图54和图55)。应当注意的是,含有微量元素E的培养基1中观察到的水平降低实际上可能是由于温度改变时该培养物的细胞为 6×10^6 细胞/ml。

[0438] 含有13mM谷氨酰胺的培养基9的抗GDF-8滴度比任何配方的培养基1都高。

[0439] 实施例13. 培养基1、3和9在细胞生长和抗GDF-8滴度方面的比较

[0440] 进行本实验测量培养基1、3和9在细胞生长和抗GDF-8滴度方面的差异。

[0441] 材料与方法

[0442] 在如表21所列的不同培养基和补料条件下培养抗GDF-8细胞。表22列出了相关培养基信息。在1L生物反应器中培养细胞12天,第4天时将其从37°C转变至31°C。

[0443] 表21. 测试的培养基和补料条件

[0444]

			补料						
培养基	Asn	Gln	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第10天	第11天
培养基3	14 mM	4 mM	3.3%	3.3%	3.3%	3.3%	10%	3.3%	3.3%
			培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln
培养基3	14 mM	4 mM	3.3%	3.3%	3.3%	3.3%	10%	3.3%	3.3%
			培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	培养基 5-Gln
培养基1	14 mM	4 mM			8%		12%	8%	
					培养基 5-Gln		培养基 5-Gln	培养基 5-Gln	
培养基9	20 mM	4 mM				5%			
						培养基 5-Gln			

[0445] 注:培养基5-Gln=不含谷氨酰胺的培养基5

[0446] 表22. 培养基概述

[0447]

培养基	Asn	Gln	补料	氨基酸(起始)/(总量)	离子/总氨基酸
3培养基	14mM	4mM	34%培养基5 Gln	34mM/64mM	1.75

[0448]

培养基9	20mM	4mM	5%培养基5 Gln	91.4mM/94.3mM	.72
培养基1	14mM	4mM	31.6%培养基5 Gln	78mM/96.4mM	.74

[0449] 注:培养基5-Gln=不含谷氨酰胺的培养基5

[0450] 结果与结论

[0451] 培养基9中培养的抗GDF-8细胞的细胞密度和抗GDF-8滴度最高,而培养基3中培养的抗GDF-8细胞的细胞密度和抗GDF-8滴度最低(见图57和图58)。培养基9比培养基1的结果更好,提示在起始培养基中提供培养基成分优于通过多步补料提供。此外,培养基1和培养基9优于培养基3,提示提供氨基酸浓度高于约70mM产生的效果优于提供氨基酸浓度低于约70mM。最后,在起始培养基中提供氨基酸浓度高于约70mM,能产生最高的细胞密度和滴度

(对比培养基9和培养基1)。

[0452] 实施例14. 用于生物反应器中培养抗GDF-8细胞的培养基9的最佳谷氨酰胺和天冬氨酰总水平的统计分析

[0453] 材料与方法

[0454] 使抗GDF-8细胞生长于1L生物反应器,并于表23中所述的天数时将其从37°C变为31°C.对最终滴度进行T检验,以确定仅谷氨酰胺的最佳水平和谷氨酰胺与天冬氨酰组合的最佳总水平.表23总结了在培养基9中生长的抗GDF-8细胞的一些相关实验条件和最终结果。

[0455] 表23. 培养基9中生长的抗-GDF-8细胞的相关实验条件和最终结果

[0456]

培养基	Gln(mM)	Asn (mM)	变温天数	补料	滴度 (ug/ml)	滴度/1200	总 Gln	总 Asn	总 Gln+Asn
培养基 9	1	8	6	5% 培养基 5-Gln	615.2	0.51	1	9	10
培养基 9	1	8	6	5% 培养基 5-Gln	857.1	0.71	4	9	13
培养基 9	1	12	6	5% 培养基 5-Gln	947	0.79	1	13	14
培养基 9	4	12	4	5% 培养基 5-Gln	1184	0.99	4	13	17
培养基 9	4	20	4	5% 培养基 5-Gln	769.6	0.64	1	21	22

[0457]

培养基 9	4	8	5	5% 培养基 5-Gln	1262.6	1.05	13	9	22
培养基 9	4	20	4	5% 培养基 5-Gln	1198	1.00	4	21	25
培养基 9	4	20	4	5% 培养基 5-Gln	1321.1	1.10	4	21	25
培养基 9	4	20	4	5% 培养基 5-Gln	1162.4	0.97	4	21	25
培养基 9	13	20	4	5% 培养基 5-Gln	1436.6	1.20	4	21	25
培养基 9	15	12	4	5% 培养基 5-Gln	1638.6	1.37	13	13	26
培养基 9	13	12	4	5% 培养基 5-Gln	1606.7	1.34	13	13	26
培养基 9	13	20	4	5% 培养基 5-Gln	1075.91	0.90	13	21	34
培养基 9	13	20	4	5% 培养基 5-Gln	1058.4	0.88	13	21	34
培养基 9	13	20	4	5% 培养基 5-Gln	1075.91	0.90	15	21	36
培养基 9	13	5	4	Asn、Gln、5% 培养基 5-Gln	974.52	0.81	28.5	11	39.5
培养基 9	13	20	4	Asn、Gln、5% 培养基 5-Gln	831.81	0.69	28.5	26	54.5
培养基 9	13	20	4	第4天, 共 30% 培养基 5, 5 mM Gln	975.4	0.81	28.5	26	54.5
培养基 9	13	20	4	第4天, 共 30% 培养基 5, 5 mM Gln	973.5	0.81	28.5	26	54.5

[0458] 注:培养基5-Gln=不含谷氨酰胺的培养基5

[0459] 结果与结论

[0460] 图59显示了仅谷氨酰胺和谷氨酰胺与天冬氨酰总组合的多种水平下的外推抗GDF-8滴度.表24为比较谷氨酰胺水平为2至15mM间以及此范围外的标准化滴度的T检验结

果。表25为比较组合谷氨酰胺和天冬酰胺水平为16至36mM之间以及此范围外的标准化滴度的T检验结果。

[0461] 两次T检验结果均显示,比较的两组间抗GDF-8滴度存在显著差异。在含2-15mM浓度的谷氨酰胺且16-36mM浓度的组合谷氨酰胺和天冬酰胺的培养基9中生长的培养物,相对于在含谷氨酰胺及组合谷氨酰胺和天冬酰胺水平在此范围外培养基中生长的培养物,抗GDF-8滴度较高。在所有实验中天冬酰胺的水平都高于9mM。

[0462] 表24.比较2mM<Gln<15mM和Gln>15mM、Gln<2mM条件下标准化滴度的T检验结果

[0463]

标准化滴度	Gln>15,Gln<2	2<Gln<15
平均值	0.724649917	1.033147493
方差	0.013326655	0.036834109
观测数量	7	12
合并方差	0.028537361	
假设均值差异	0	
df	17	
t统计量	-3.839791986	
单尾P(T<=t)	0.000656219	
单尾t临界	1.739606432	
双尾P(T<=t)	0.001312438	
双尾t临界	2.109818524	

[0464] 表25.比较16mM<Gln+Asn<36mM和Gln+Asn>36mM、Gln+Asn<16mM条件下标准化滴度的T检验结果

[0465]

标准化滴度	Asn+Gln>36,Asn+Gln<16	16<Asn+Gln<36
平均值	0.735066584	1.027071104
方差	0.012061148	0.041504987
观测数量	7	12
合并方差	0.031113044	
假设均值差异	0	
df	17	
t统计量	-3.480816823	
单尾P(T<=t)	0.001430281	
单尾t临界	1.739606432	

[0466]

双尾P(T<=t)	0.002860561	
双尾t临界	2.109818524	

[0467] 实施例15.培养基对细胞培养的影响

[0468] 该实施例研究了在中等规模下,用高密度接种培养的三种细胞培养基变量的表

现。基于小规模生物反应器数据,预期所有测试培养基都比1期培养基(添加了11号补料培养基的培养基10)有所改进。

[0469] 材料与方法

[0470] 如表26所示,在不同的培养基中测试表达人源化抗Aβ肽IgG1单克隆抗体的CHO细胞(“抗Aβ细胞”)(见Basi等人,Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide,W002/46237)。pH值的低端设置点为7.0,除1期中由含0.58M碳酸氢钠和0.71M碳酸钠控制外,均通过0.95M Na₂CO₃和0.05M K₂CO₃控制。根据需要利用空气喷射控制溶解氧为30%;以60rpm搅拌,补料培养基为培养基5(如所示,含或不含谷氨酰胺)。所有培养物都以130L的规模生长,仅03P49B501以500L规模生长。简言之,培养基1富集了各种营养物质而不考虑相对吸收率,而培养基12从不加选择的富集形式中去除了显然为非必需的营养物而达到平衡。表27列出了培养基10、11和12的成分。

[0471] 表26. 初步试验的起始培养基、补料量和接种来源

[0472]

批号	描述	起始培养基	补料量	Gln 补料?	接种来源	接种密度 (活细胞/ml)
1	1 期	培养基 10	38% *	是	摇摆袋	0.2×10^6
2	富集培养基, 高 Gln(1)	培养基 1	16%	是	摇摆袋	0.2×10^6
3	富集培养基, 高 Gln (2)	培养基 1	16%	是	摇摆袋	0.2×10^6

[0473]

4	富集培养基, 低 Gln	培养基 1	15%	否	摇摆袋	0.2×10^6
5	平衡培养基, 低 Gln (1)	培养基 12	10%	否	摇摆袋	0.2×10^6
6	平衡培养基, 低 Gln (2)	培养基 12	9%	否	摇摆袋	0.2×10^6
7	平衡培养基, 低 Gln, 密集 接种	培养基 12	5%	否	高密度生物反应器	2.0×10^6

[0474] *1期过程中添加不如培养基5富集的培养基12。

[0475] 表27. 培养基10、11和12的成分

[0476]

	培养基 10		培养基 11		培养基 12	
氨基酸	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
丙氨酸	24.87	0.28	142.48	1.60	17.80	0.20
精氨酸	423.43	2.43	1528.84	8.79	696.00	4.00
天冬酰胺一水合物	173.90	1.16	1080.60	7.20	1500.00	10.00
天冬氨酸	52.72	0.40	532.40	4.00	219.45	1.65
半胱氨酸盐酸盐一水合物	70.01	0.40			70.40	0.40
半胱氨酸二盐酸盐	62.09	0.20	470.00	1.50	312.50	1.00
谷氨酸	41.08	0.28	235.38	1.60		
谷氨酸一钠					33.80	0.20
谷氨酰胺	1162.40	7.96	6000.00	41.10	584.00	4.00
甘氨酸	35.92	0.48	120.07	1.60	115.50	1.54
组氨酸盐酸盐一水合物	75.27	0.36	588.32	2.80	369.60	1.76
异亮氨酸	151.90	1.16	944.52	7.21	370.73	2.83

[0477]

亮氨酸	172.69	1.32	1360.75	10.39	615.70	4.70
盐酸赖氨酸	218.38	1.20	1456.80	8.00	946.40	5.20
甲硫氨酸	53.55	0.36	477.06	3.20	387.40	2.60
苯丙氨酸	98.81	0.60	660.36	4.00	363.00	2.20
脯氨酸	96.40	0.84	552.31	4.80	471.50	4.10
丝氨酸	273.07	2.60	1264.70	12.04	903.00	8.60
苏氨酸	132.81	1.12	762.02	6.40	380.80	3.20
色氨酸	28.99	0.14	260.94	1.28	212.16	1.04
二水合酪氨酸二钠	145.10	0.56	832.62	3.19	456.75	1.75
缬氨酸	131.17	1.12	749.21	6.40	468.00	4.00
维生素	mg/L	μM	mg/L	μM	mg/L	μM
生物素	0.36	1.49	3.28	13.45	2.68	11.00
泛酸钙	4.03	8.47	36.02	75.67	21.93	46.06
氯化胆碱	16.11	115.92	143.28	1030	116.76	840.00
叶酸	4.76	10.80	42.43	96.22	25.93	58.80
肌醇	22.64	125.79	201.71	1120	163.98	911.00
烟酰胺	3.61	29.62	32.02	262.44	26.23	215.00
盐酸吡哆醛	1.99	9.83			2.03	10.00
盐酸吡哆醇	1.67	8.10	32.82	159.31	18.13	88.00
核黄素	0.40	1.06	3.60	9.58	0.41	1.10
盐酸硫胺素	3.92	11.64	35.22	104.51	39.43	117.00
维生素 B12	1.34	0.99	11.21	8.27	10.57	7.80
无机盐	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
CaCl ₂	115.78	1.04	113.27	1.02	116.55	1.05
KCl	310.94	4.17			312.90	4.19

[0478]

KH_2PO_4			1640.00	12.06		
Na_2HPO_4	70.81	0.50			56.60	0.40
NaCl	3704.96	63.44				
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	114.53	0.83			645.84	4.68
MgSO_4	48.70	0.41			138.00	1.15
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	0.03	170.00	0.69		
MgCl_2	28.53	0.30			28.50	0.30
NaHCO_3	1220.00	14.52			2000.00	23.81
微量元素	$\mu\text{g/L}$	nM	$\mu\text{g/L}$	nM	$\mu\text{g/L}$	nM
亚硒酸钠	7.00	40.49	40.00	231.35	53.65	310.27
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	49.86	123.42			50.00	123.76
CuSO_4	0.97	6.06	3.44	21.51	10.00	62.50
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7.49	30.00	7.49	30.00	49.94	200.00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1542	5549	2534	9115	3366	12000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1383	4821	2704	9421	2640	9198
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17	1.01	0.17	1.01	16.90	100.00
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	140	492.84	140.00	492.84	142.03	500.00
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.24	1.00	1.24	1.00	123.60	100.00
NH_4VO_3	0.65	5.56	0.65	5.56	1.17	10.00
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.13	0.49	0.13	0.49	2.63	10.00
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12	0.53	0.12	0.53	0.45	2.00
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			1.20	4.97	0.48	2.00
AgNO_3			0.17	1.00		
$\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$			2.55	9.98		
KBr			.12	1.01	0.24	2.00
$\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$			2.28	9.99		

[0479]

CoCl₂•6H₂O			2.38	10.00		
CrCl₃			0.32	2.02	7.92	50.00
NaF			4.20	100.02	0.08	2.00
GeO₂			0.53	5.07	0.21	2.00
KI			0.17	1.02	16.60	100
RbCl			1.21	10.01	0.24	2.00
ZrOCl₂•8H₂O			3.22	9.99		
H₃BO₃					6.18	100.00
LiCl					0.08	2.00
其它成分	µg/L	µM	µg/L	µM	µg/L	µM
氯化可的松	86.40	.24	288.00	0.79	360.00	0.99
二盐酸腐胺	2480	15.39	8000	49.66	10000	62.07
亚油酸	56.69	0.20	336.25	1.20	290.00	1.04
硫辛酸	141.71	0.69	840.63	4.08	716.00	3.48
其它成分	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
D-葡萄糖(右旋糖)	11042.24	61.35	43005.99	238.92	15000.00	83.33
PVA	2520.00		2400.00		2560.00	
Nucellin™	14.00		80.00		50.00	
丙酮酸钠	54.85	0.50			55.00	0.50

[0480] 结果与结论

[0481] 培养基的改变引发了实验过程中的稳步改善。就细胞生长、存活力、乳酸盐水平的降低、铵盐水平的降低和滴度而言,谷氨酰胺水平低的培养基优于升高者(见图60-64),而平衡型(分批)的培养基优于富集型培养基(培养基1,见图60-64)。高密度接种物起始的培养物相对于低密度接种物起始的培养物,最终滴度更高(见图64)。

[0482] 和小规模生物反应器中观察到的不同,第一种培养基(含高谷氨酰胺的培养基1)产生的滴度比原始过程低(见图64)。改变温度后乳酸盐的摄取也不变(见图62)。这提示该培养基可能具有规模敏感性。与这些中等规模实验同时进行的小规模(2L)平行实验支持该结论(数据未示)。至少在这些实验中,其后含有较少谷氨酰胺的培养基配方对规模不敏感(见图60-65)。一式两份重复的这些过程(分批2和3,以及分批5和6)显示了良好的试验重复性(见图60-65),提高了该实验收集的数据的可靠性。

[0483] 实施例16.用培养基9生产TNFR-Ig

[0484] 材料与方法

[0485] 将表达二聚体融合蛋白的CHO细胞(“TNFR-Ig细胞”),从灌流式生物反应器中以高密度接种至培养基9,并稀释至 3×10^6 活细胞/ml,用于生产生物反应器步骤;所述融合蛋白由人75千道尔顿(p75)肿瘤坏死因子受体(TNFR)胞外配基结合部分连接至IgG1的Fc部分组成。

[0486] 结果与结论

[0487] 图66、67、68、69、70、71和72分别显示了细胞生长、细胞存活力、残留葡萄糖、谷氨酰胺水平、乳酸盐浓度、铵盐浓度和相对产物滴度。对该过程进行较小修饰的范围内,所有条件都能得到较好的细胞生长、高细胞存活力和高最终总滴度。

[0488] 对于本实验的所有条件,抑制性代谢副产物乳酸盐或被消耗,或浓度稳定,提示乳酸盐产生受抑。与之类似,抑制性代谢产物铵盐起初水平上升,但温度改变后一段时间,铵盐开始被细胞消耗。在本实施例中,使TNFR-Ig细胞培养物置于化学诱导物丁酸钠和HMBA中。

[0489] 实施例17.大规模和小规模培养条件的比较

[0490] 材料与方法

[0491] 为确定培养物的规模是否影响相关的培养物特性,使抗GDF-8细胞在小规模1升生物反应器或大规模6000升生物反应器中生长。细胞在37°C生长并在第4天变为31°C。

[0492] 结果与结论

[0493] 如图73、74、75和76所示(分别显示了细胞密度、滴度、乳酸盐水平和铵盐水平),这些特性在6000升大规模和1升小规模培养之间没有相应差异。第4天改变温度后,乳酸盐和铵盐水平都开始下降。该实施例证实,当培养物在相同的生长条件下时,培养物的规模并不影响细胞密度、细胞存活力、乳酸盐水平和铵盐水平。

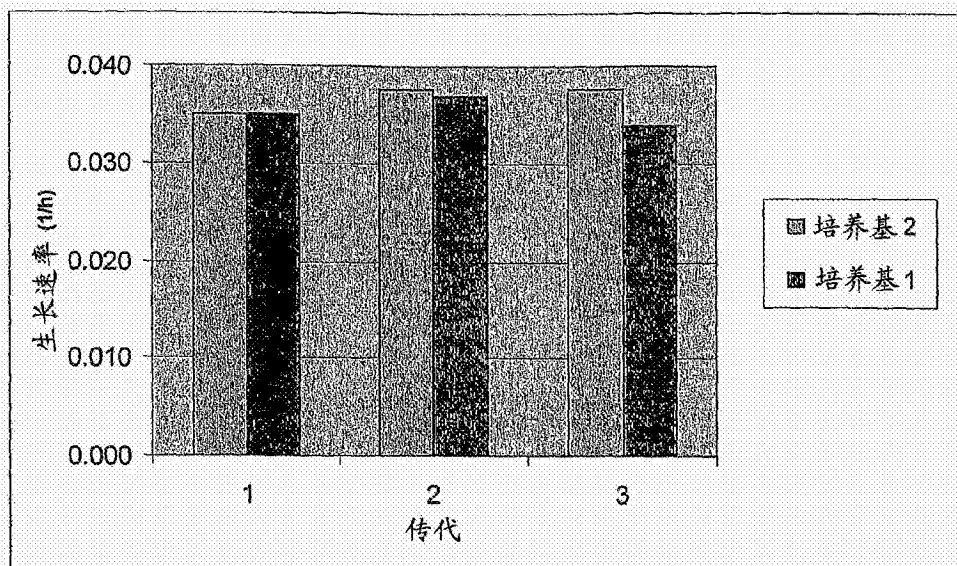


图1

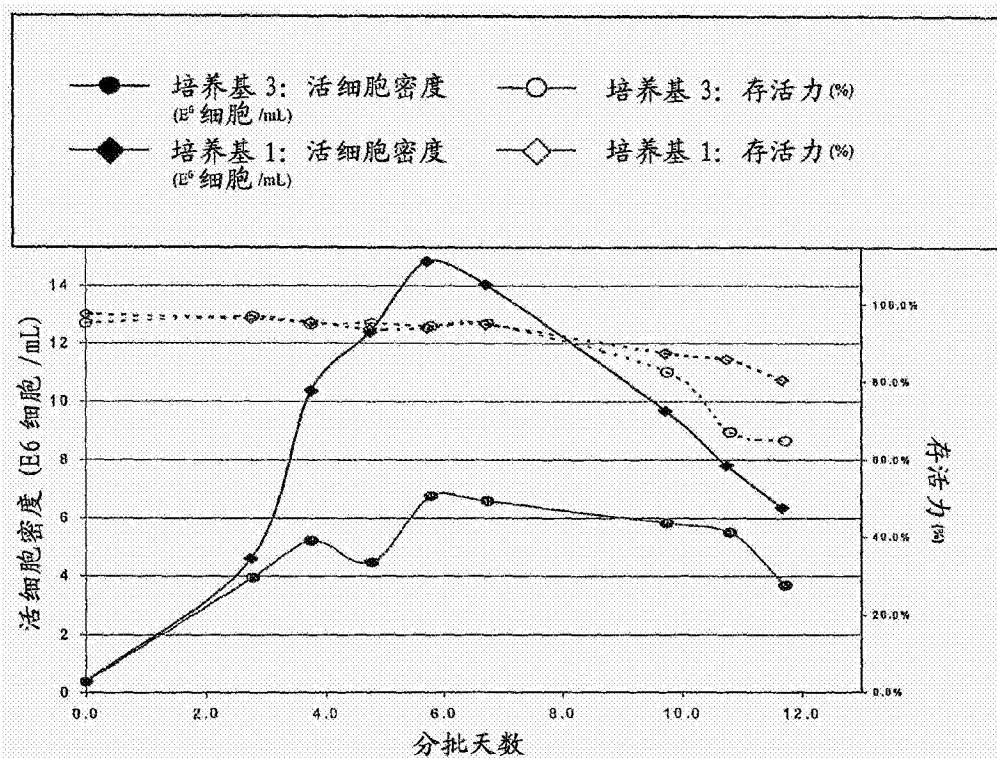


图2

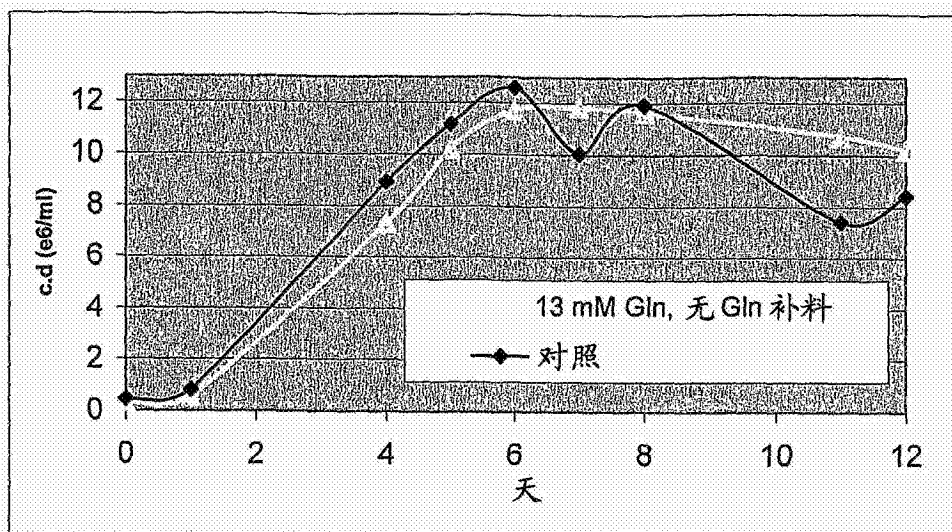


图3

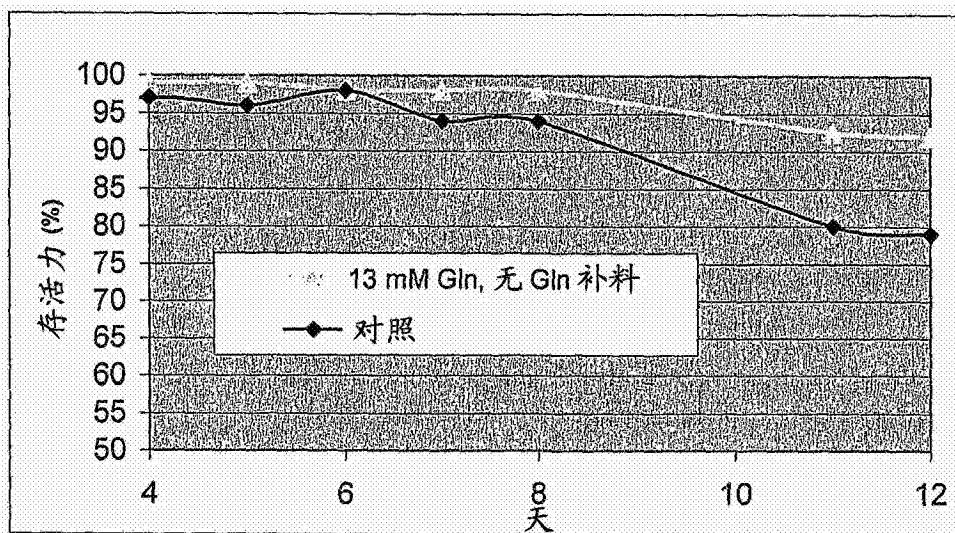


图4

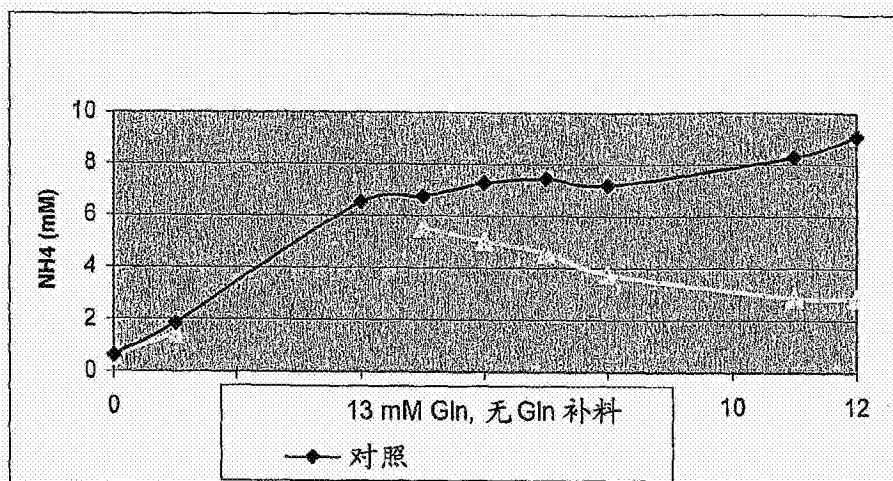


图5

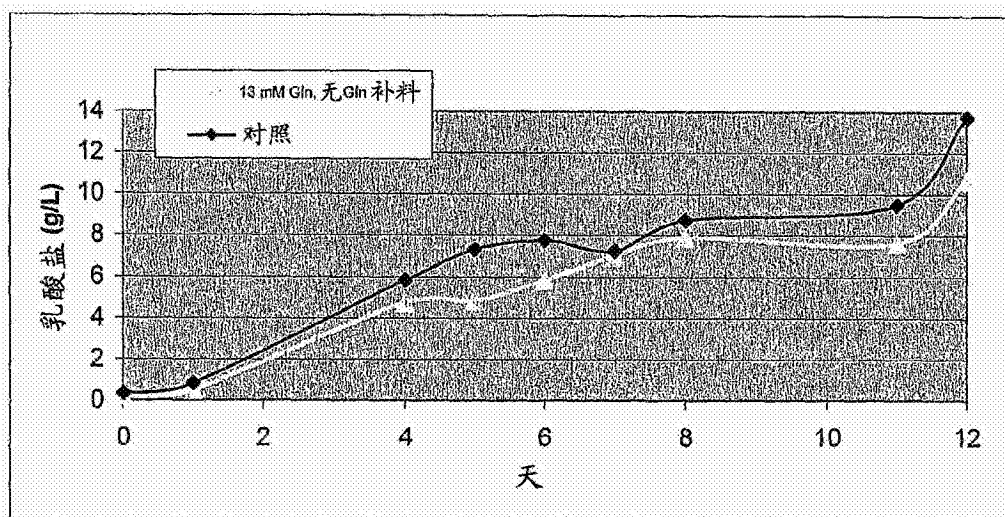


图6

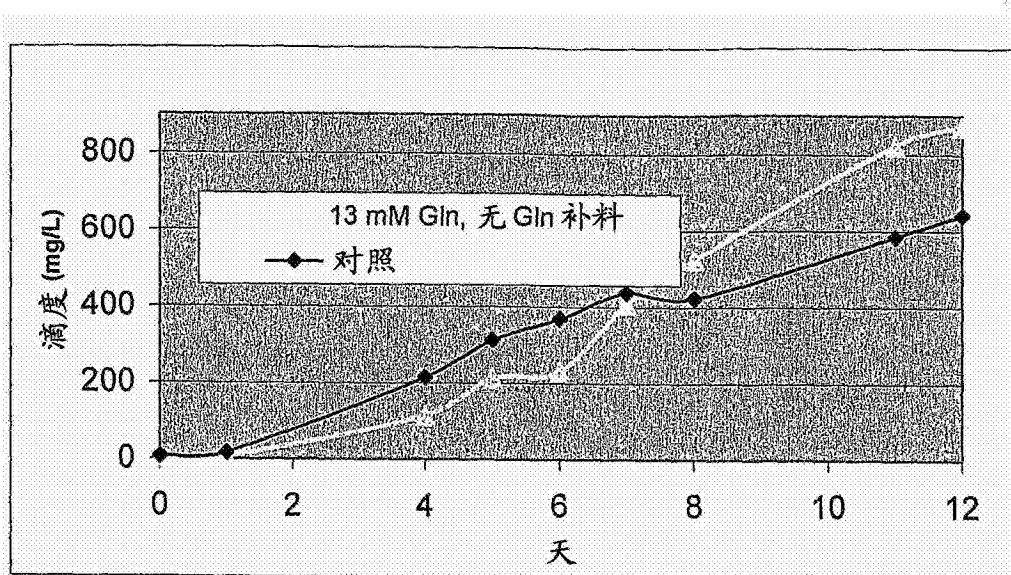


图7

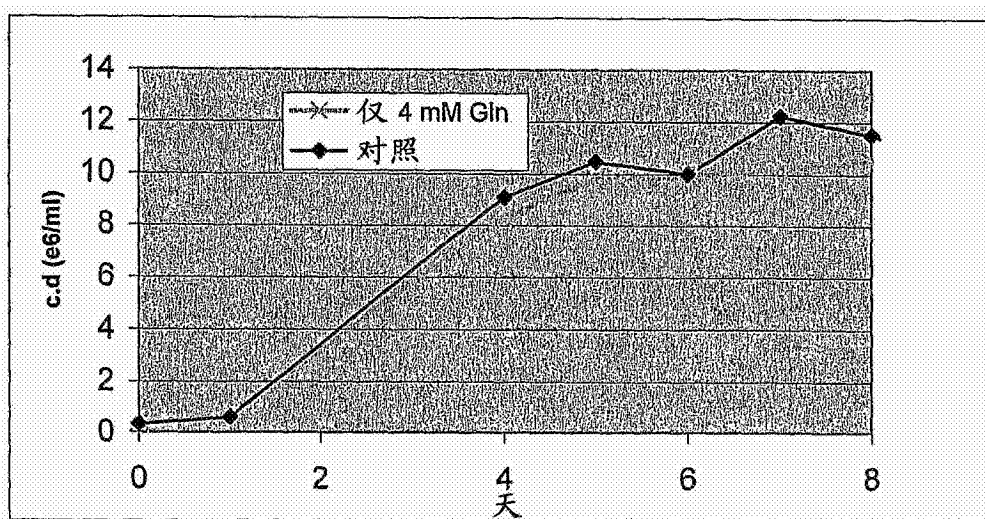


图8

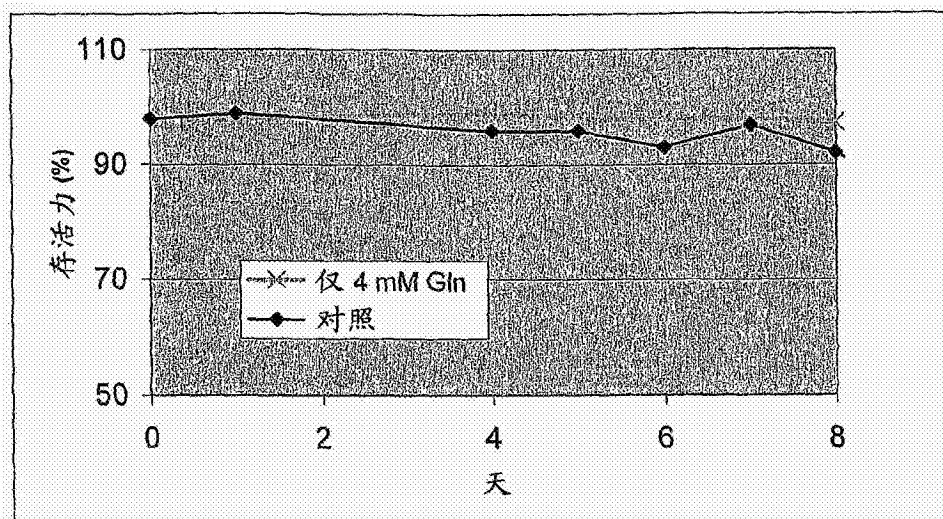


图9

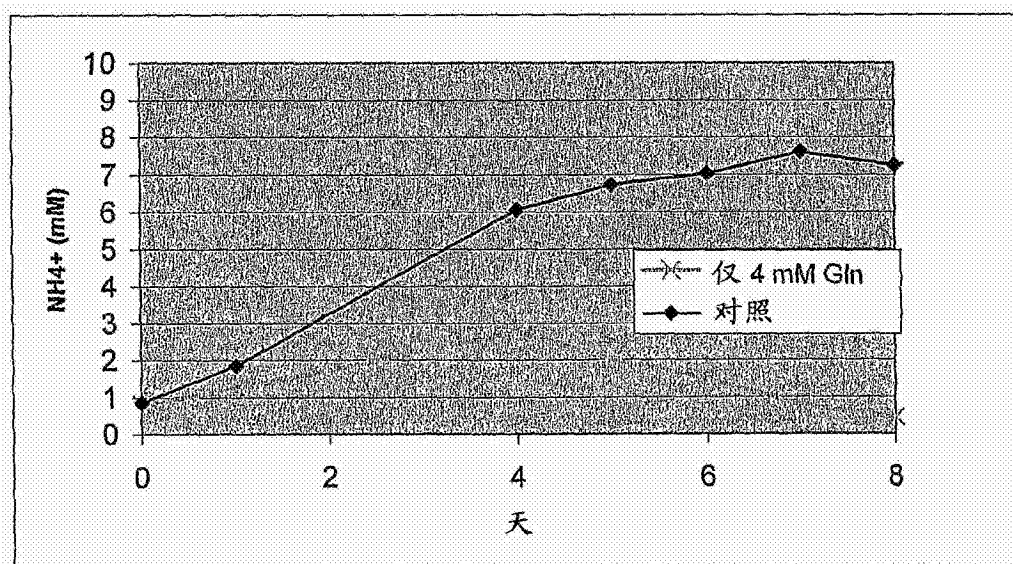


图10

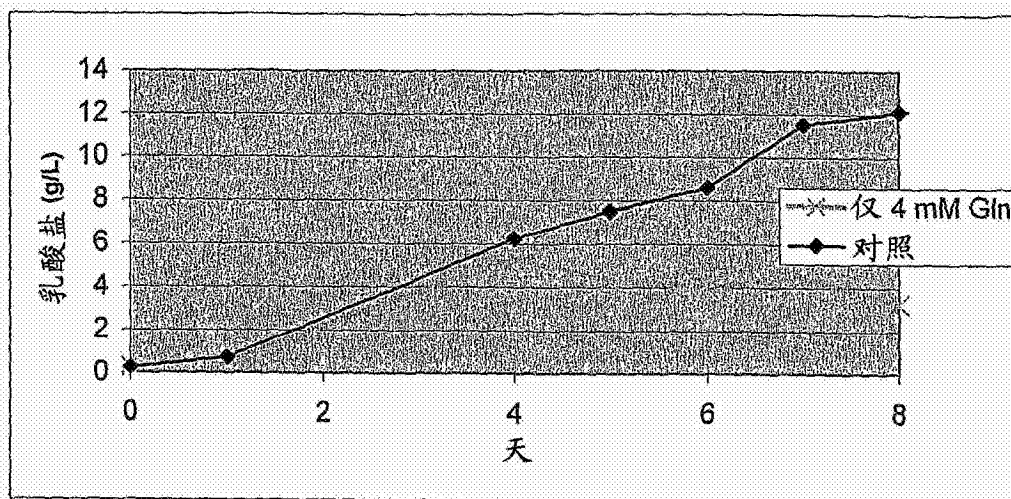


图11

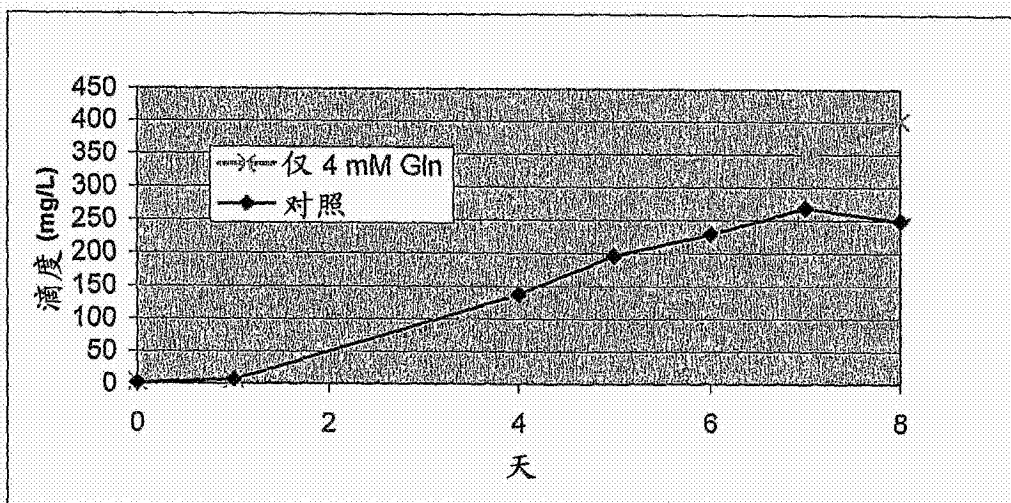


图12

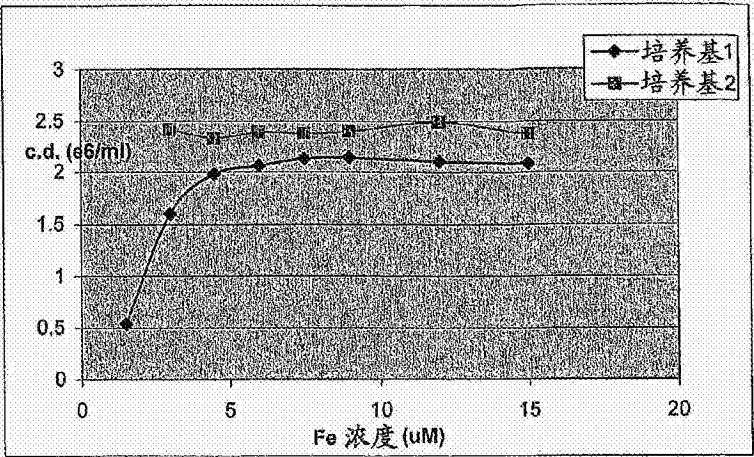


图13

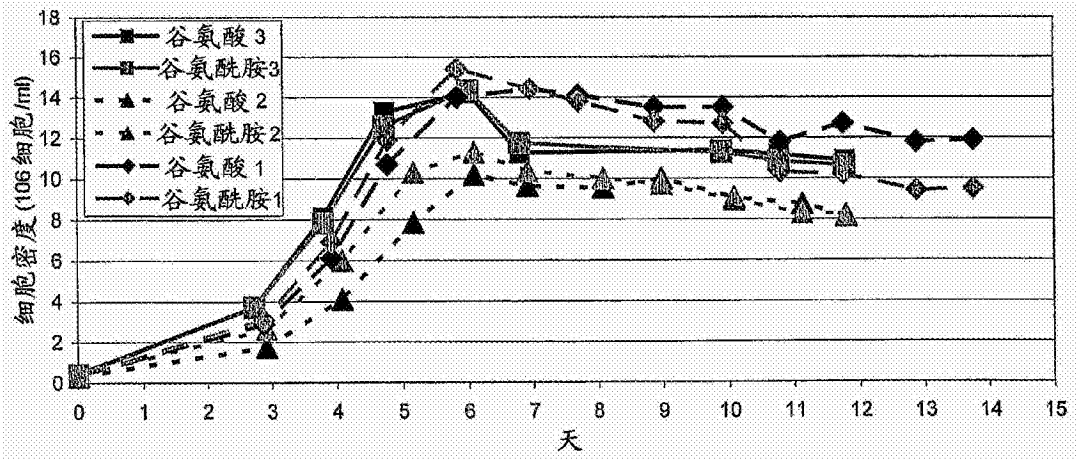


图14

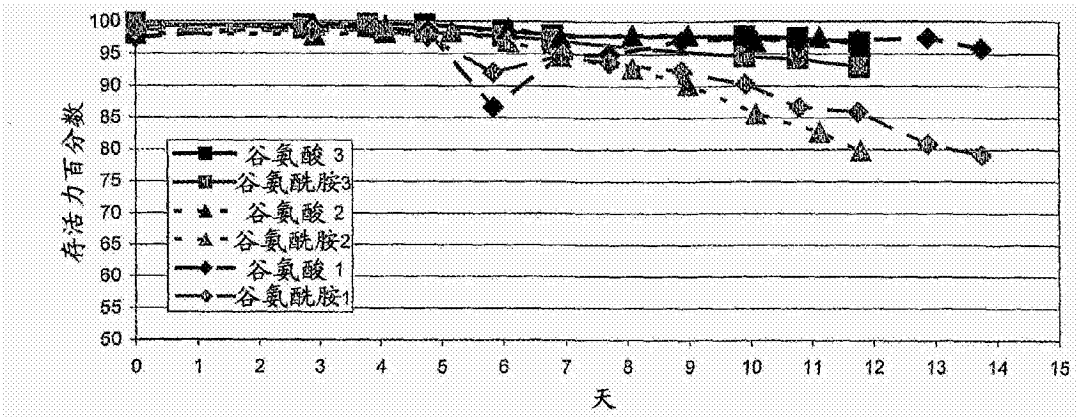


图15

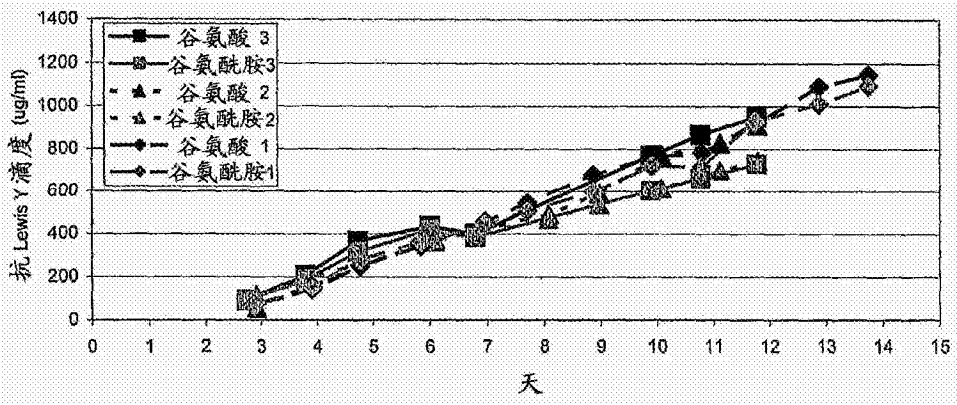


图16

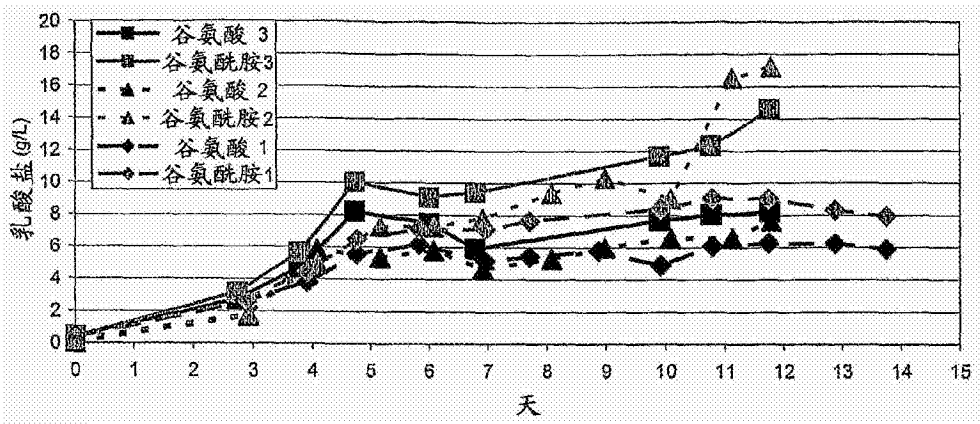


图17

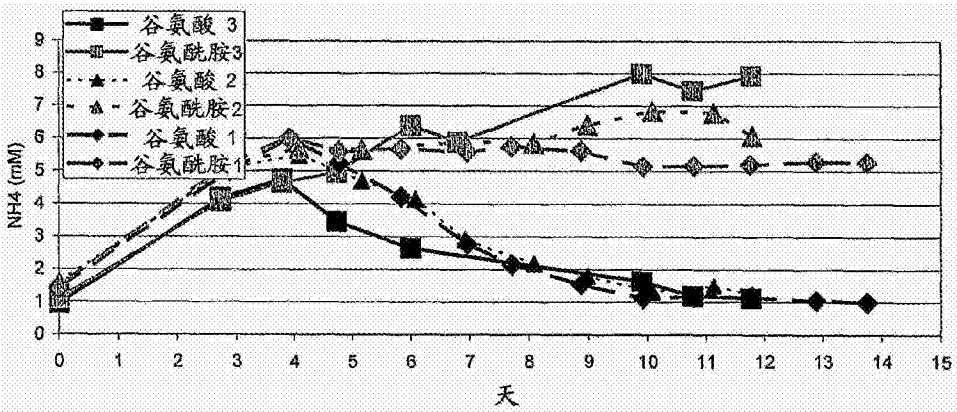


图18

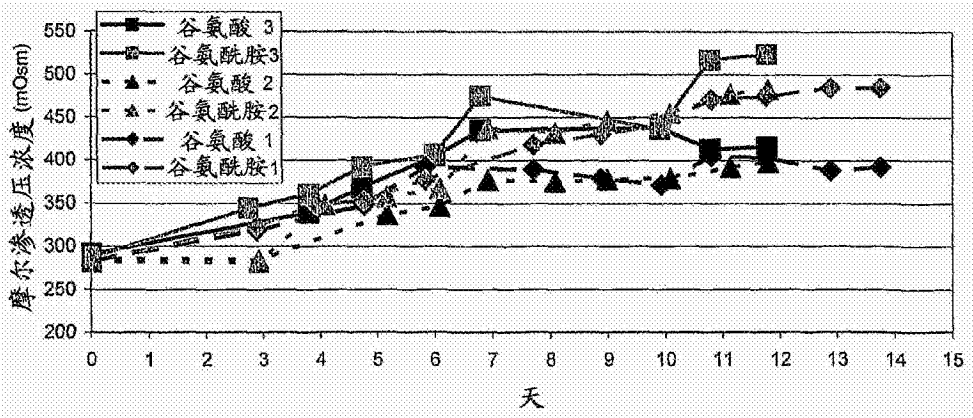


图19

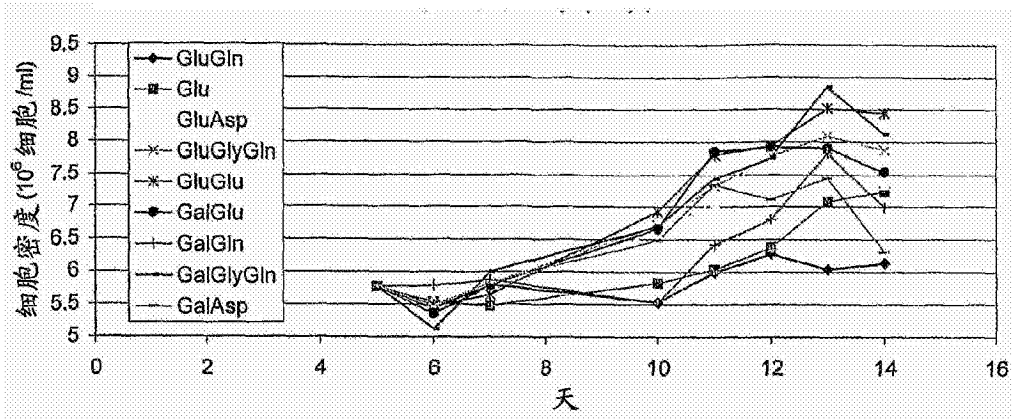


图20

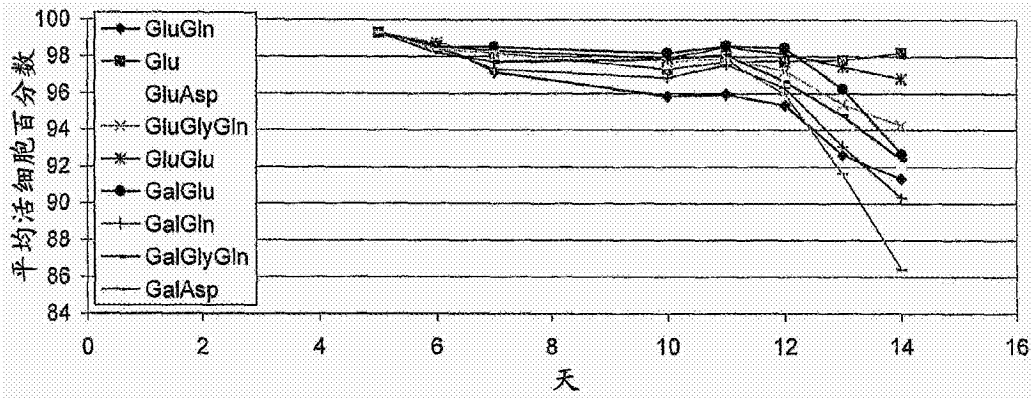


图21

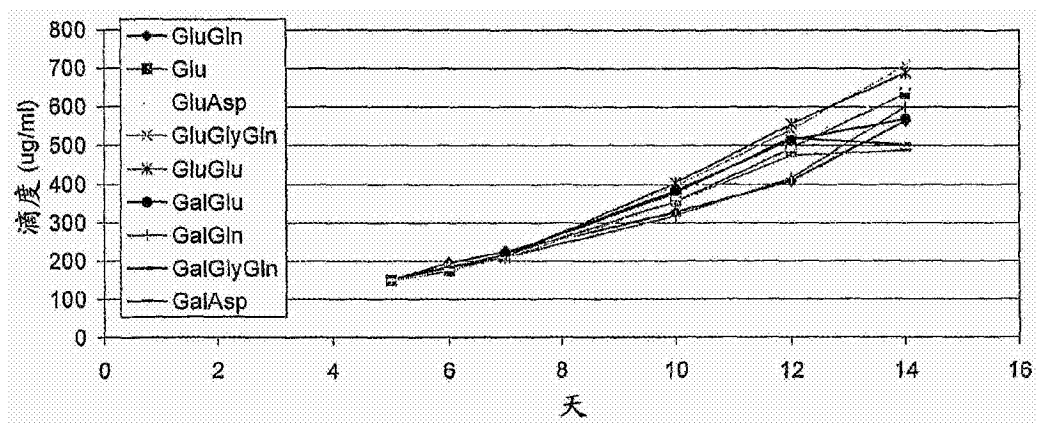


图22

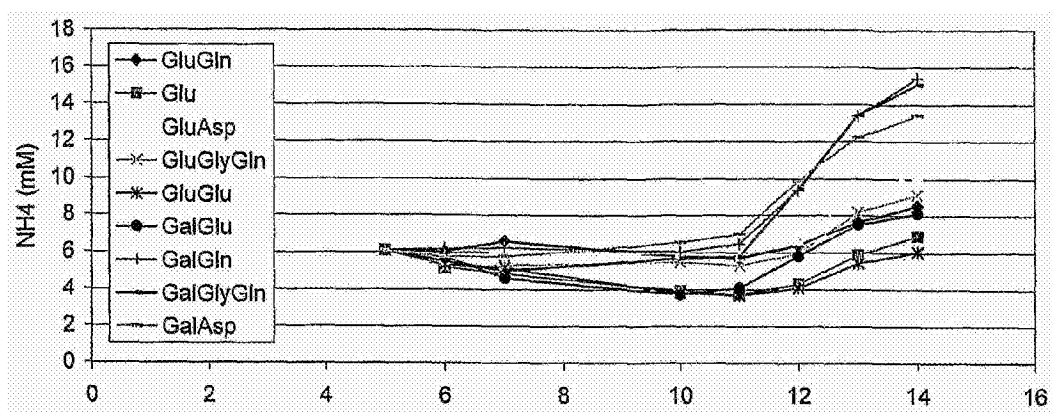


图23

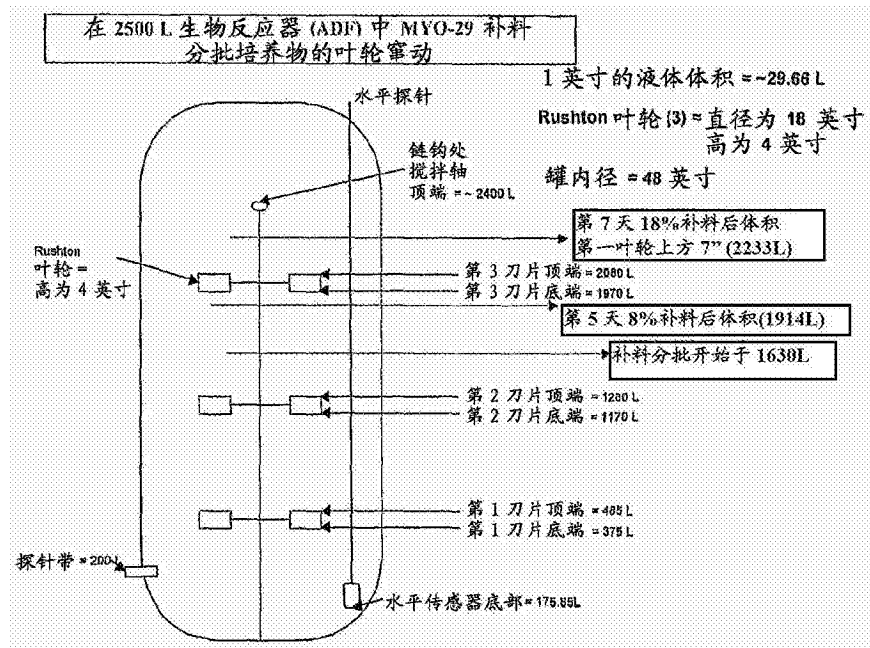


图24

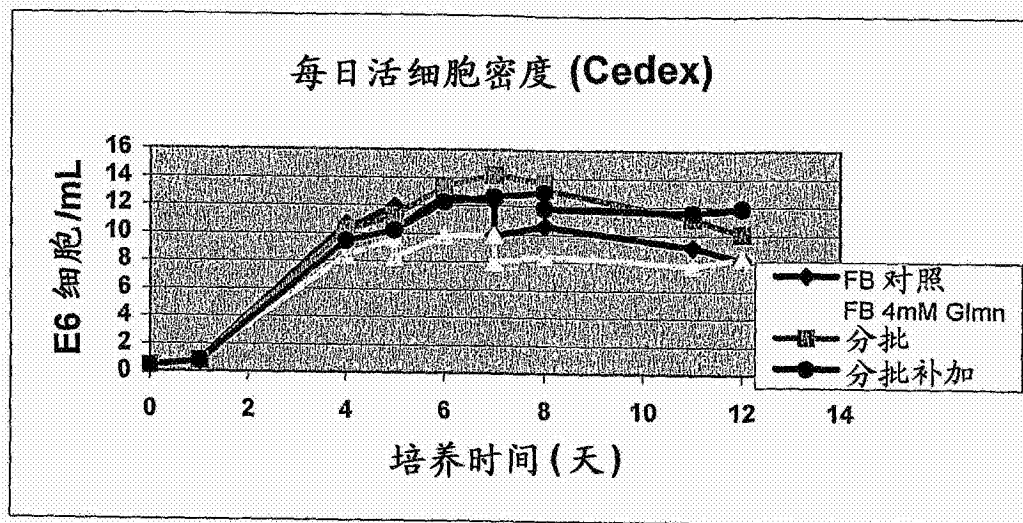


图25

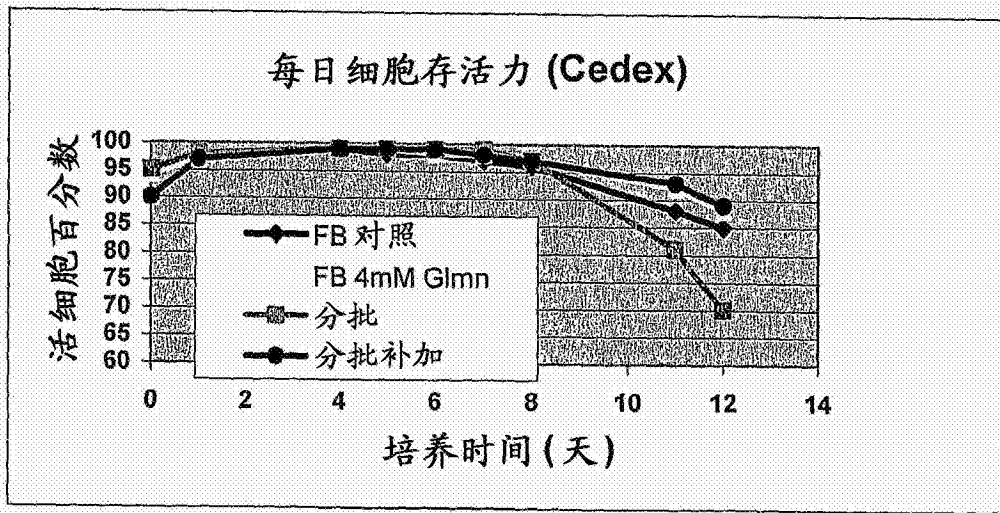


图26

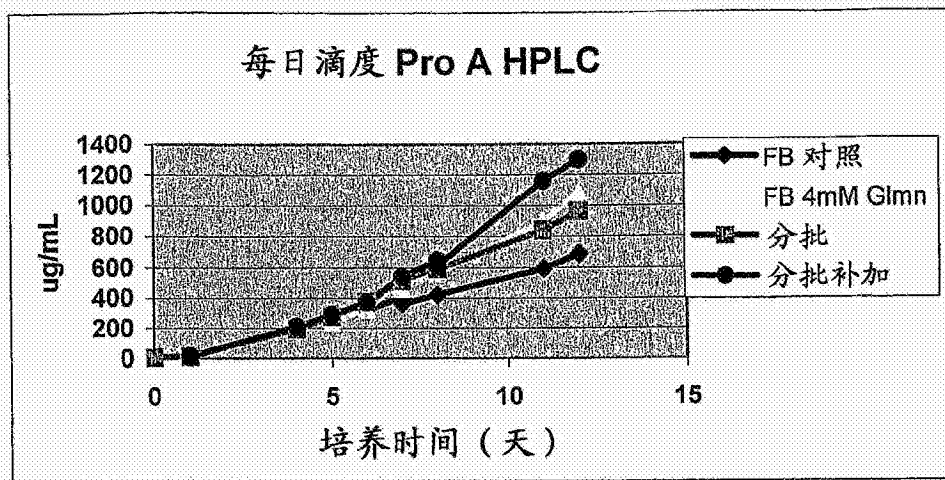


图27

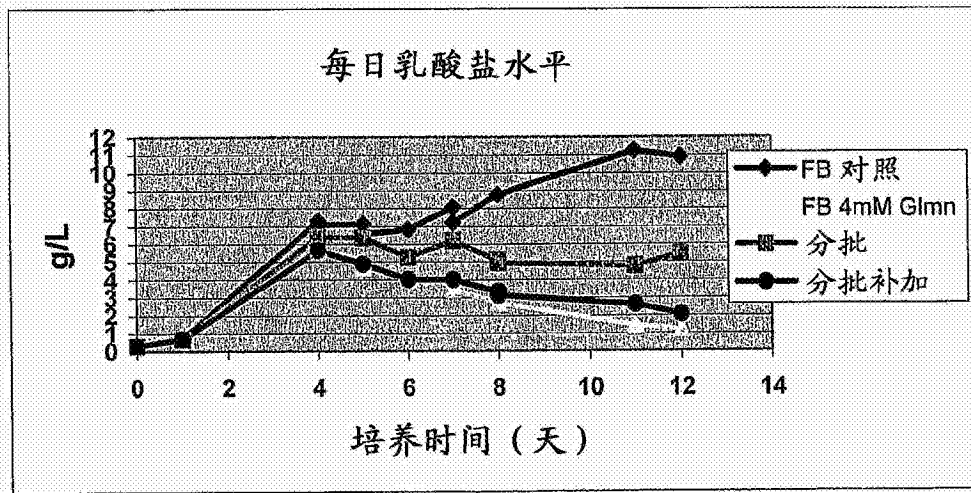


图28

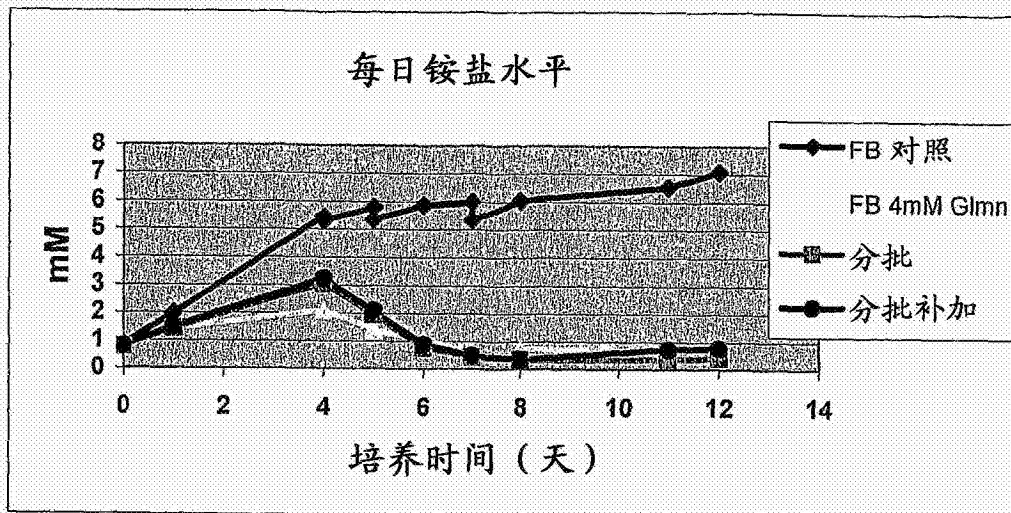


图29

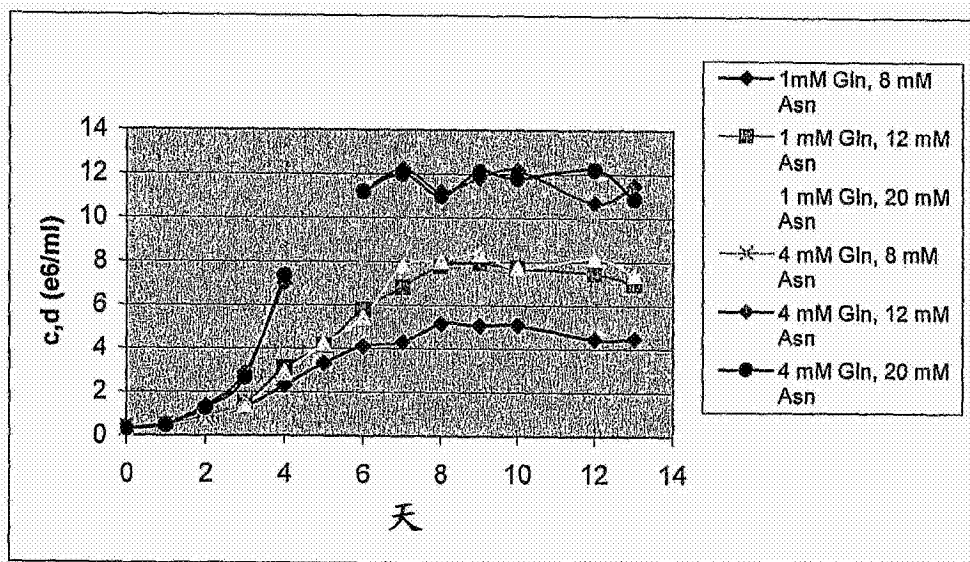


图30

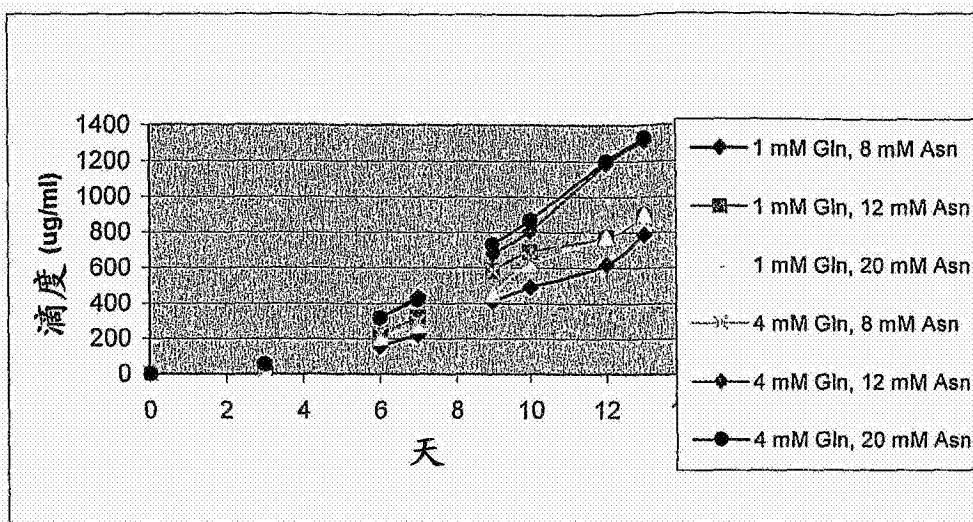


图31

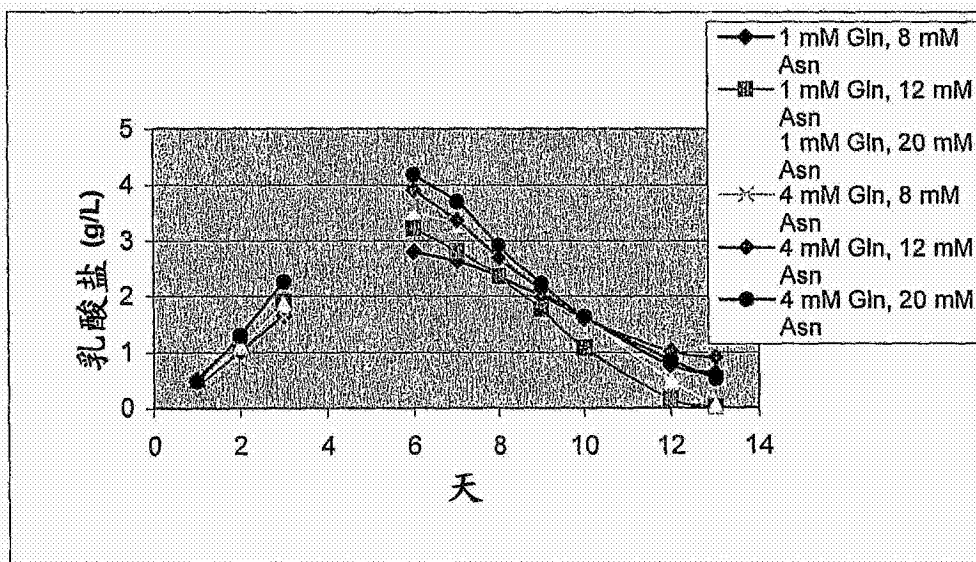


图32

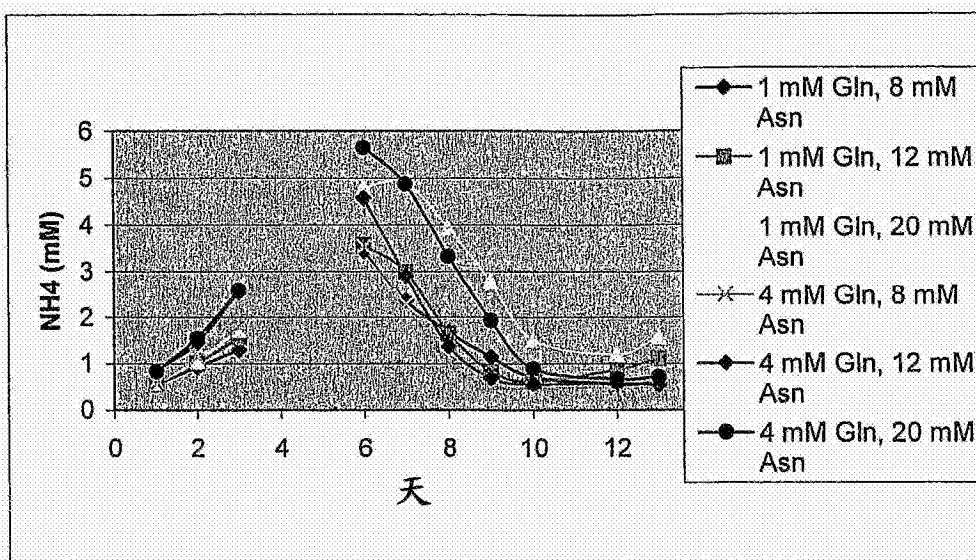


图33

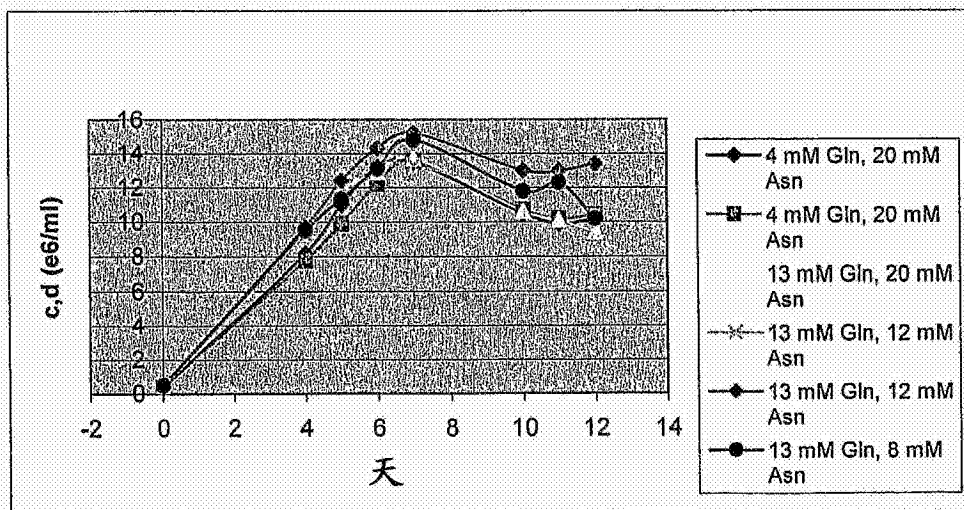


图34

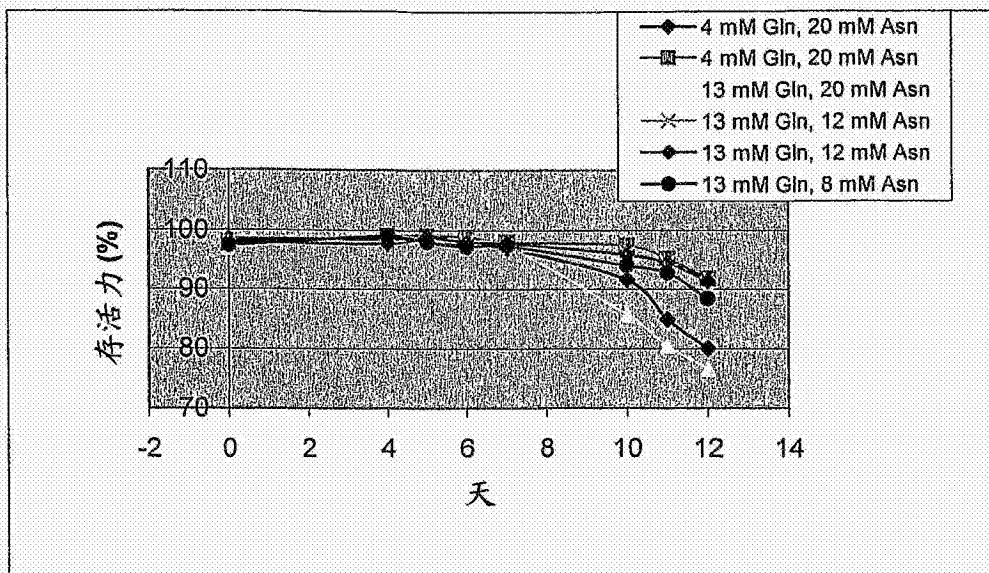


图35

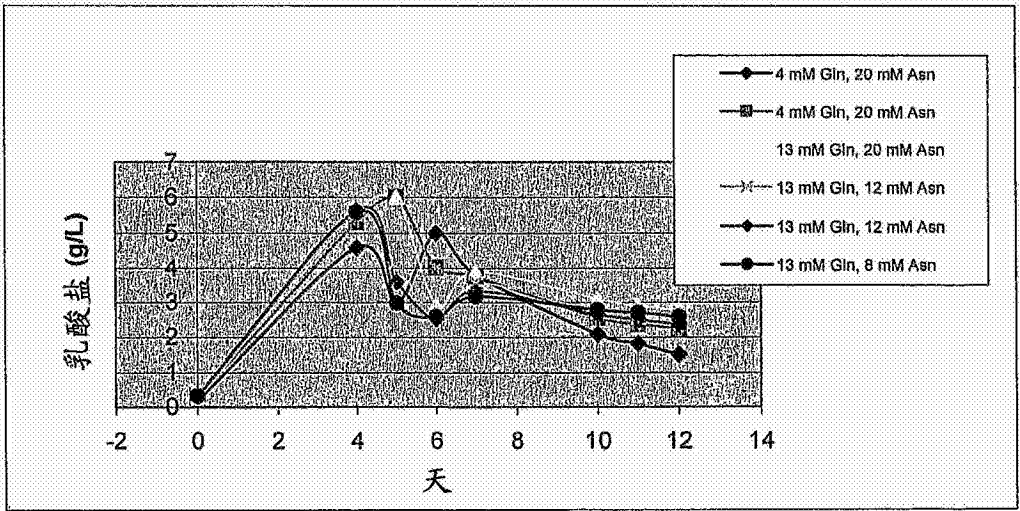


图36

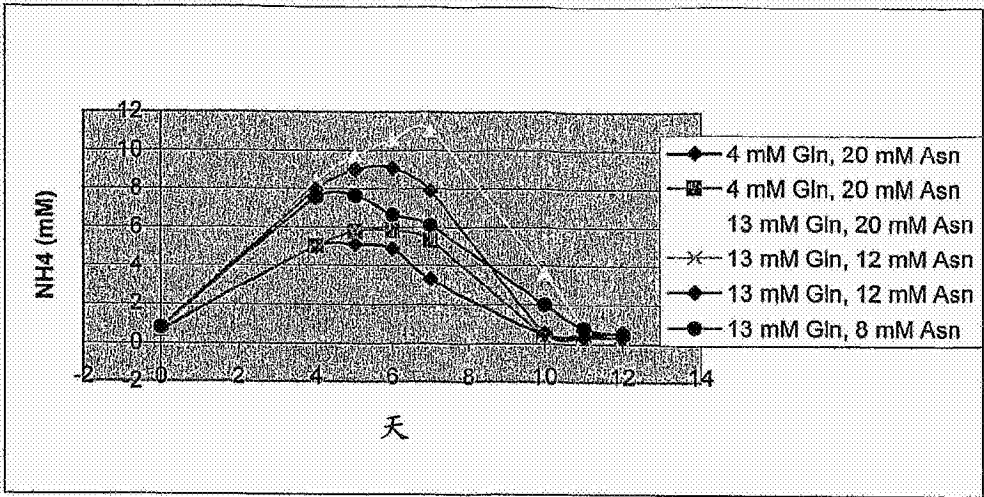


图37

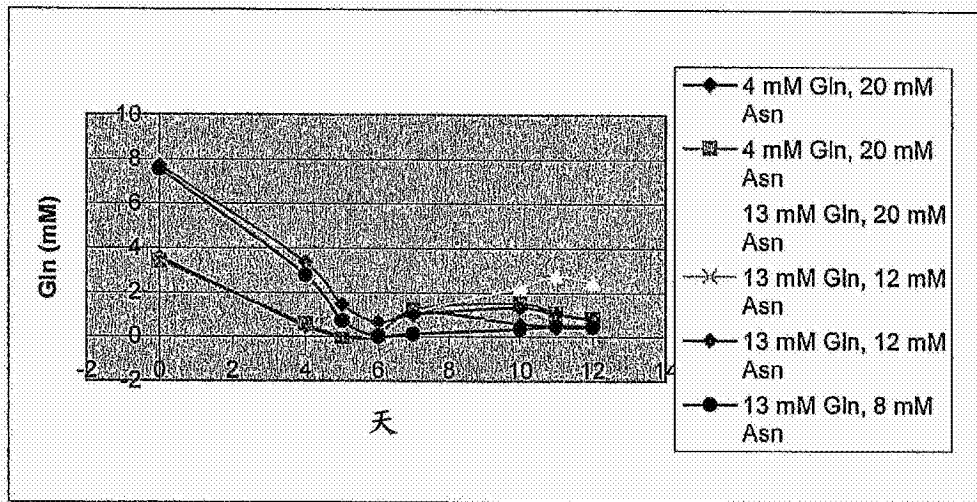


图38

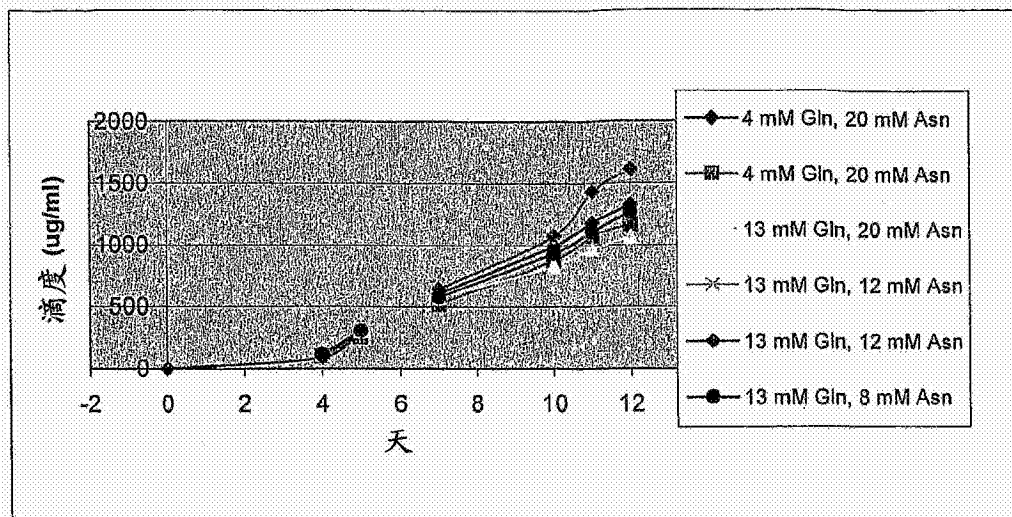


图39

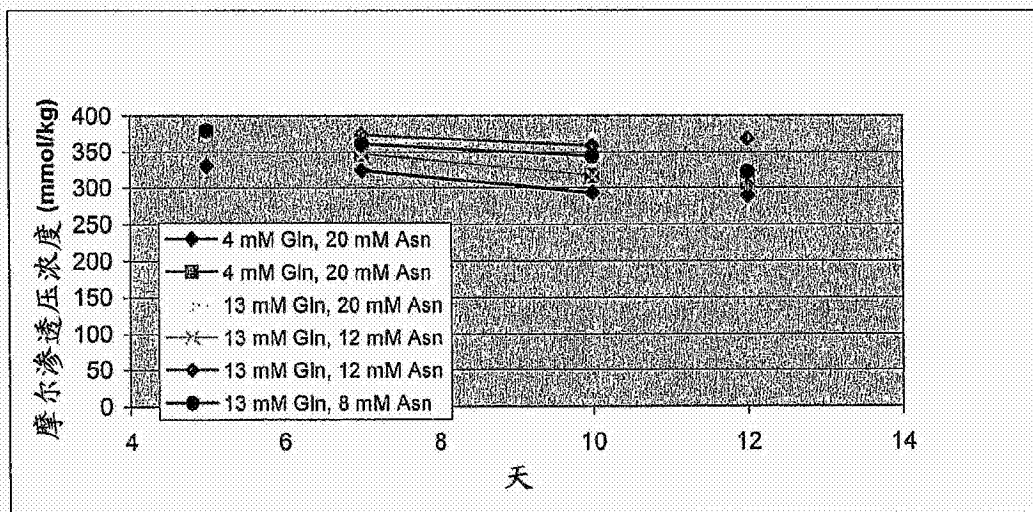


图40

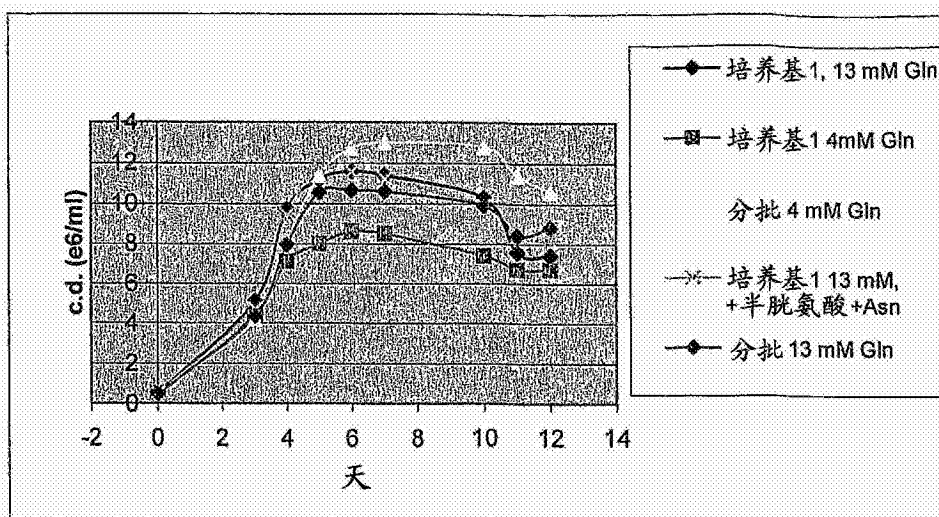


图41

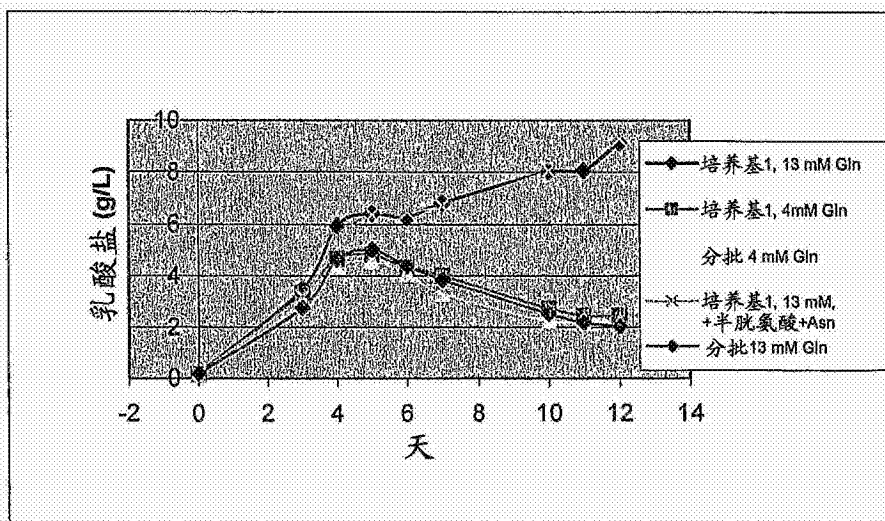


图42

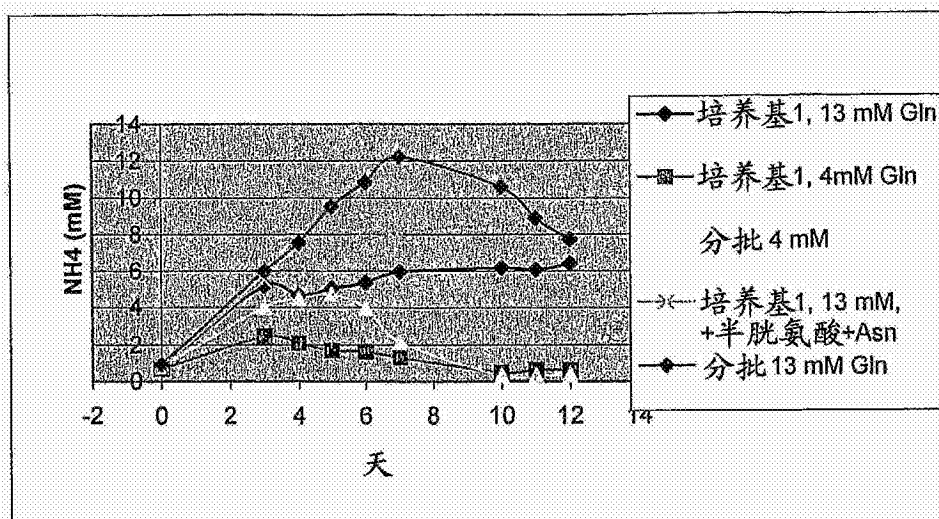


图43

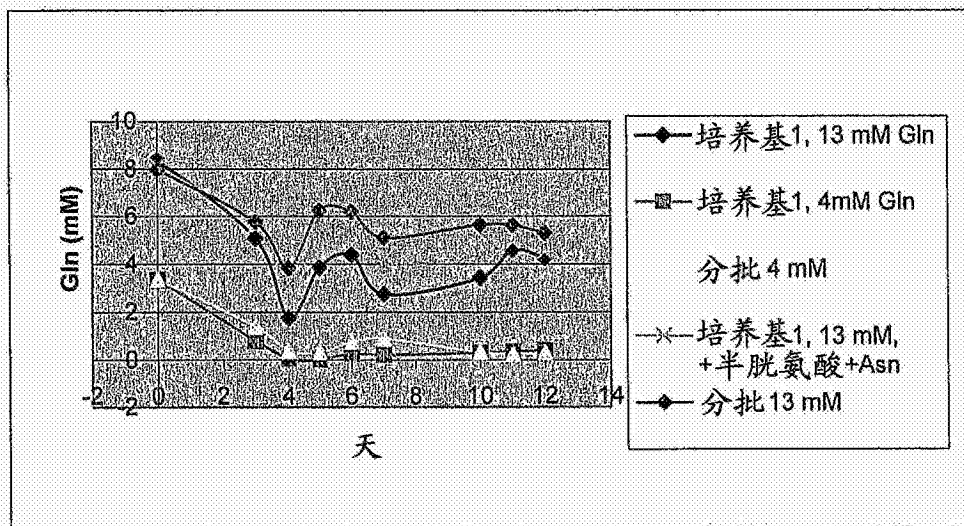


图44

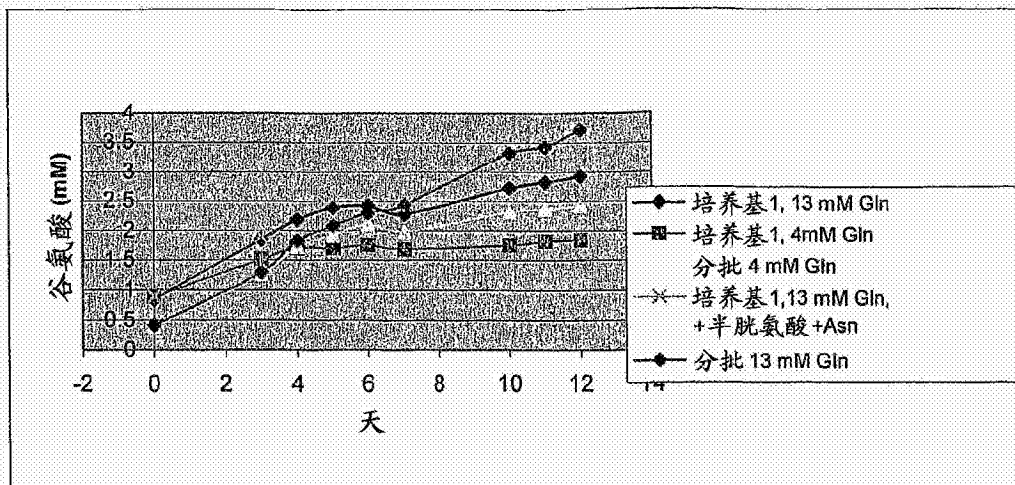


图45

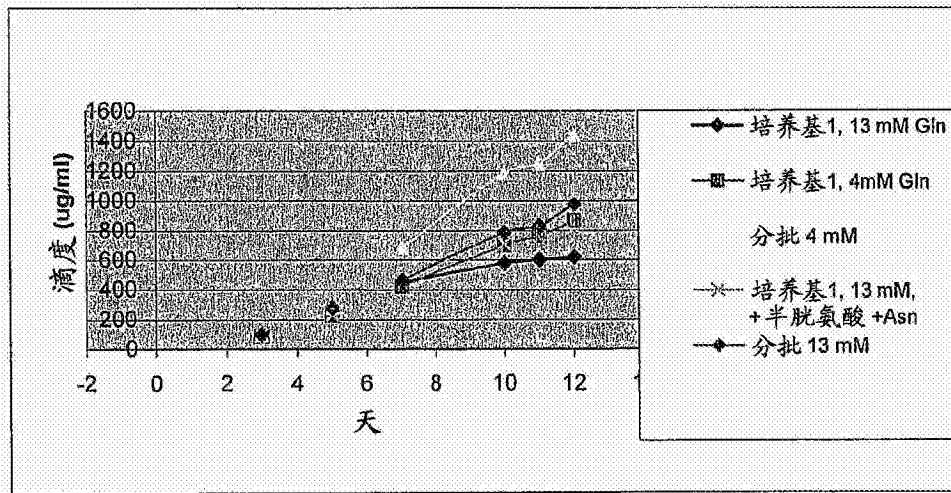


图46

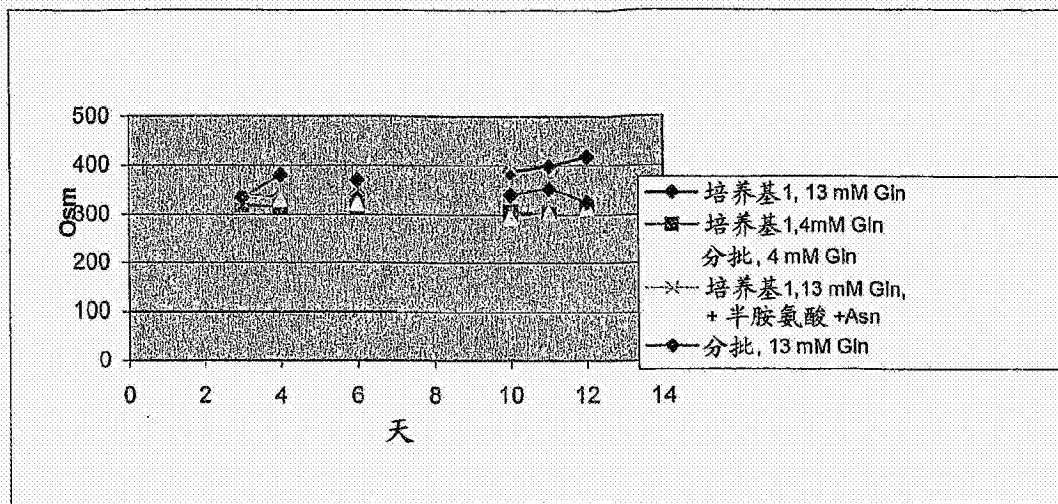


图47

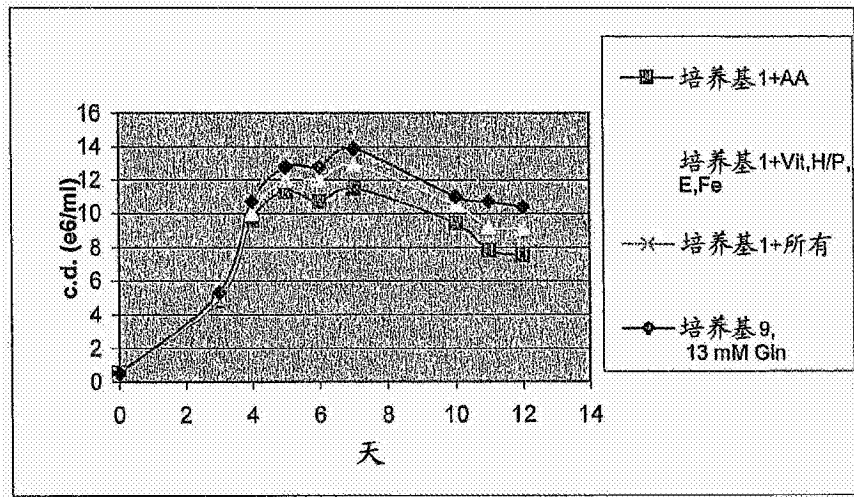


图48

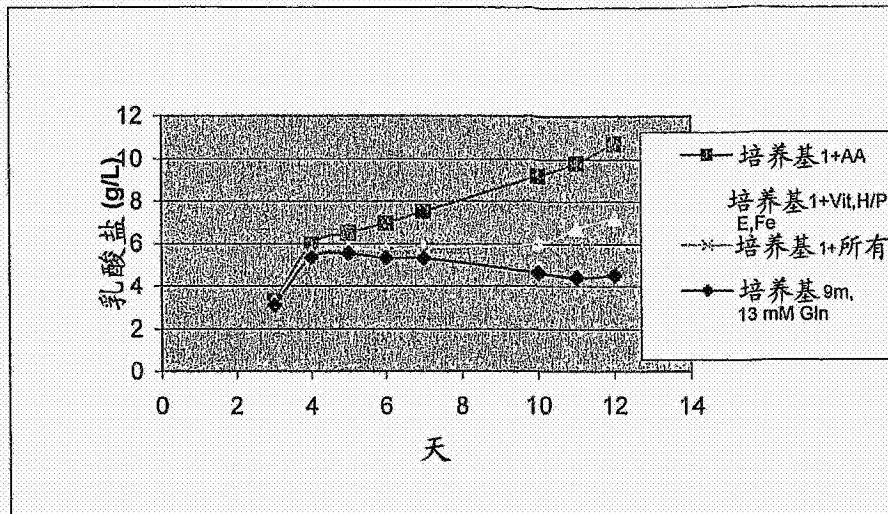


图49

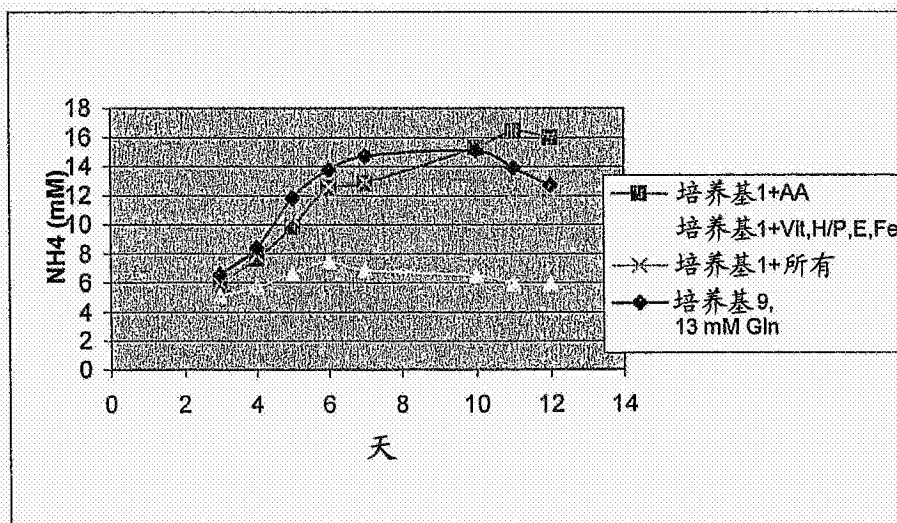


图50

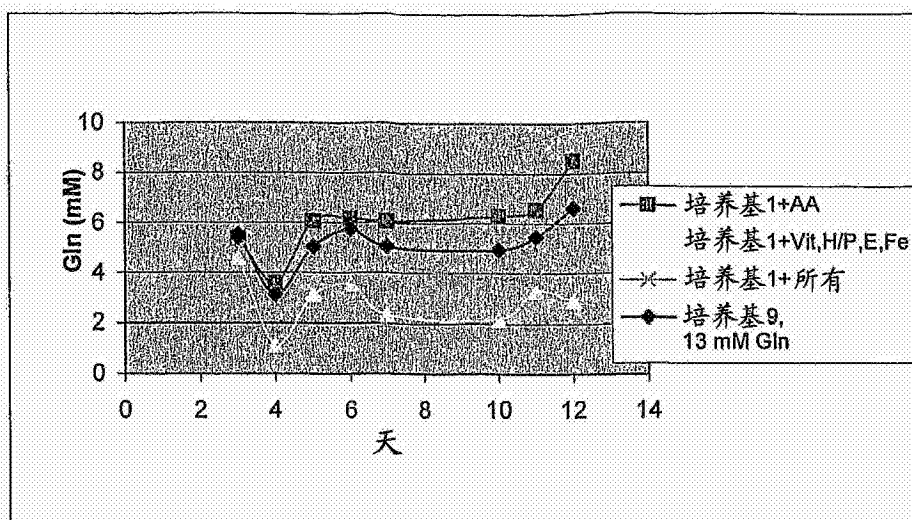


图51

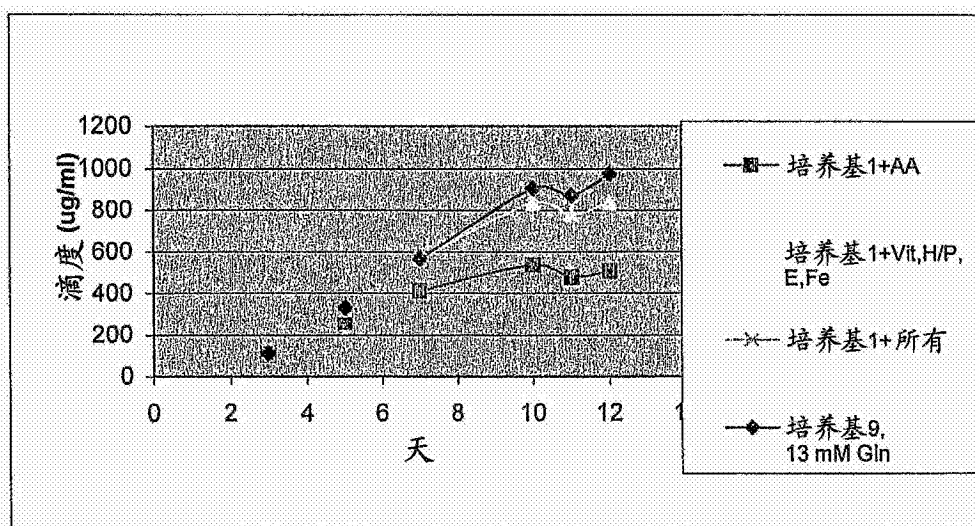


图52

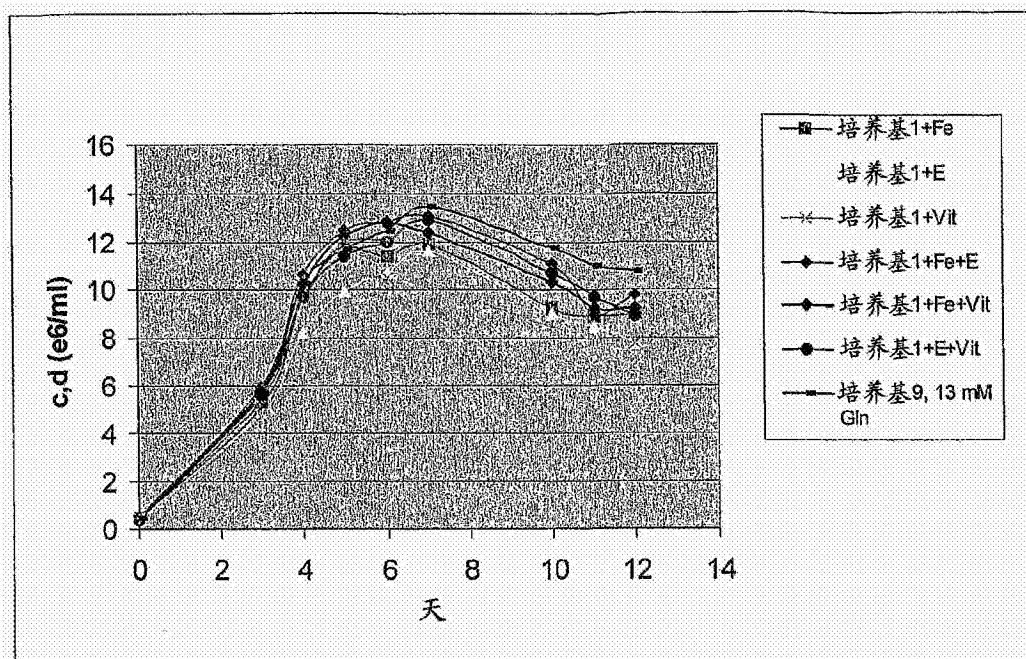


图53

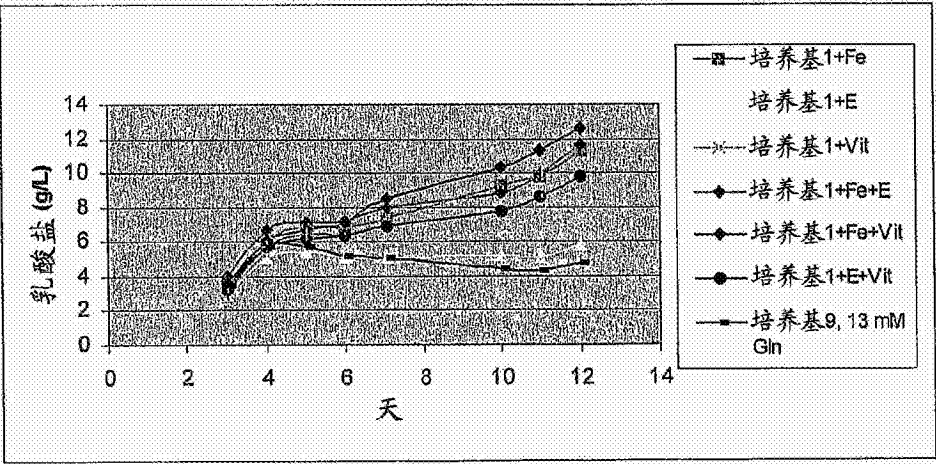


图54

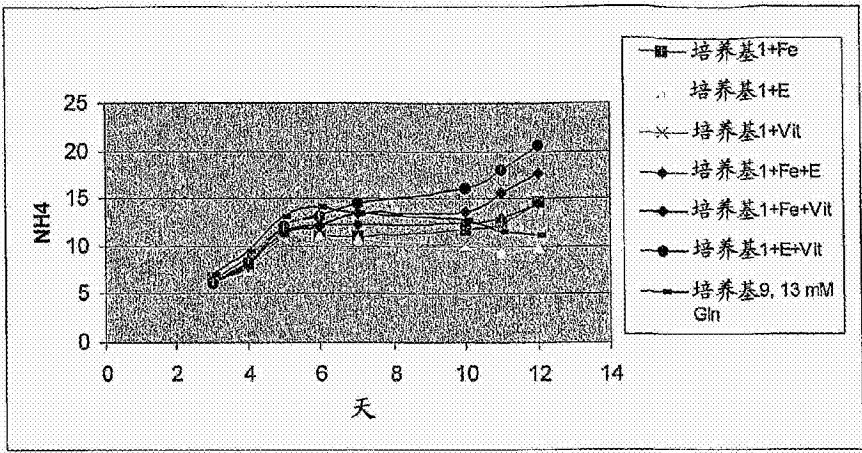


图55

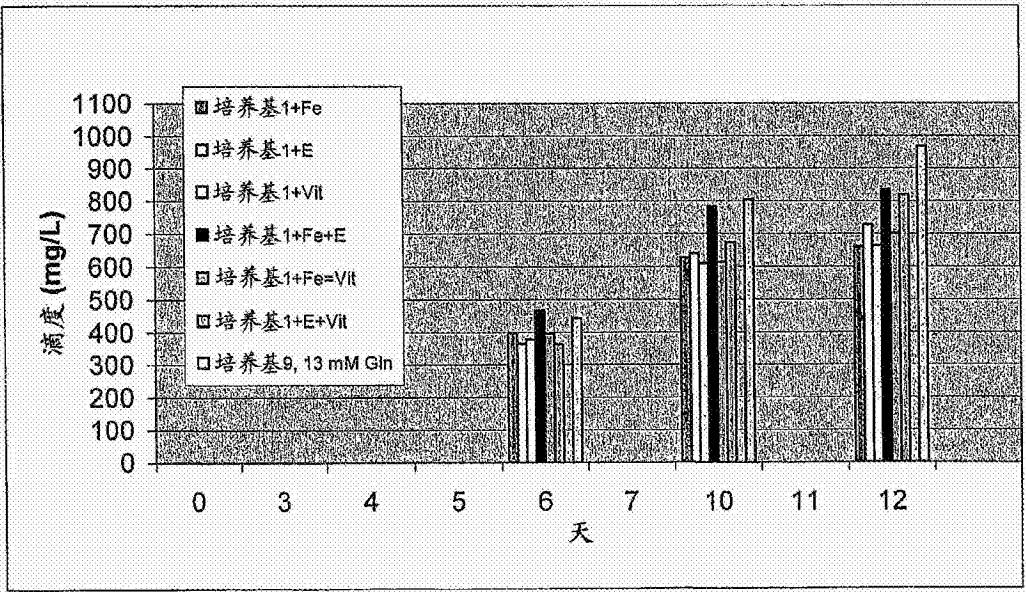


图56

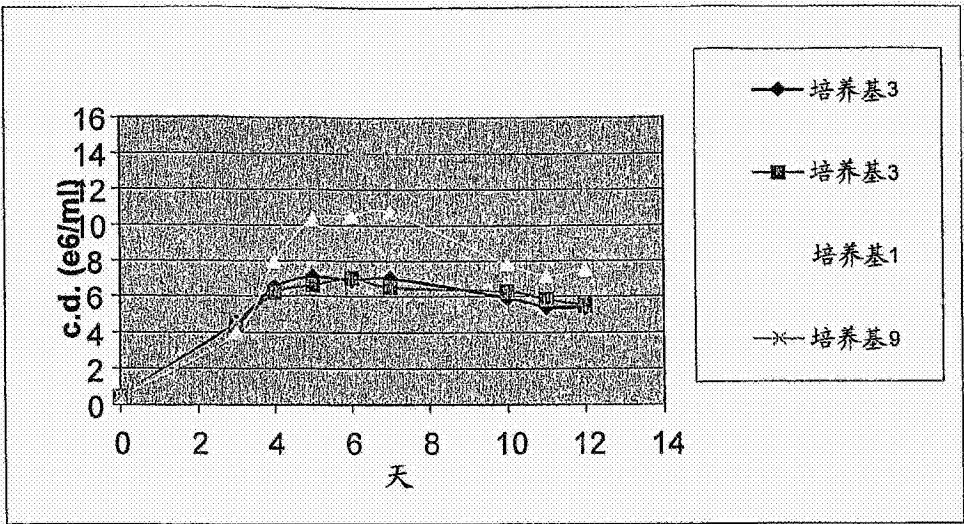


图57

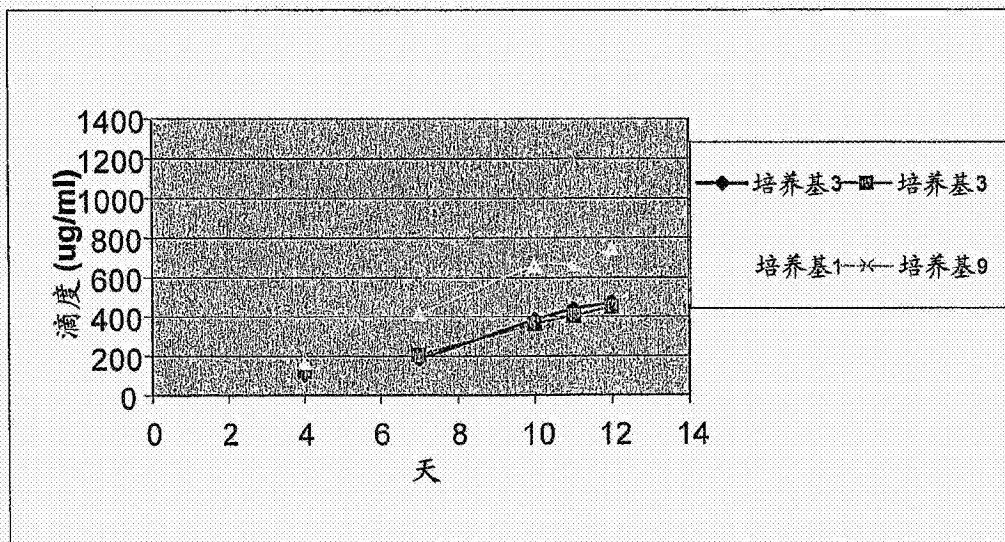


图58

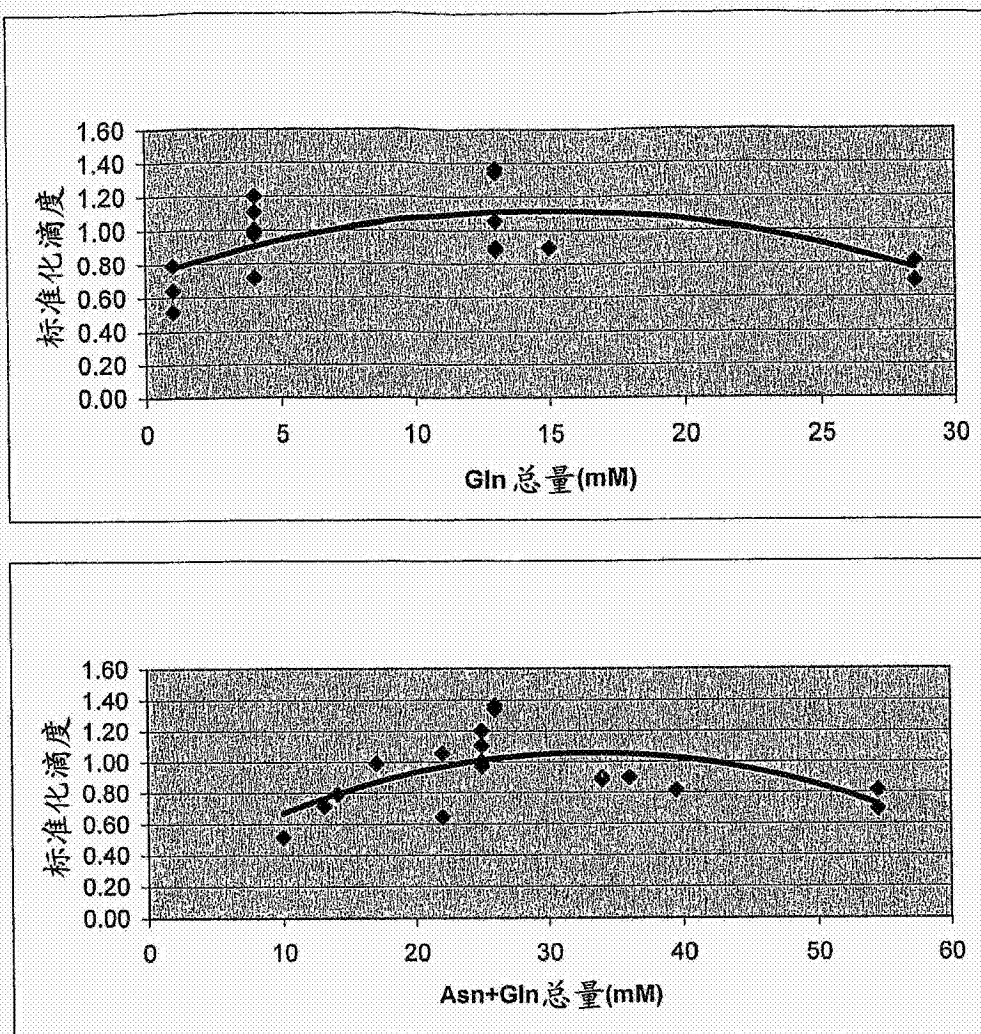


图59

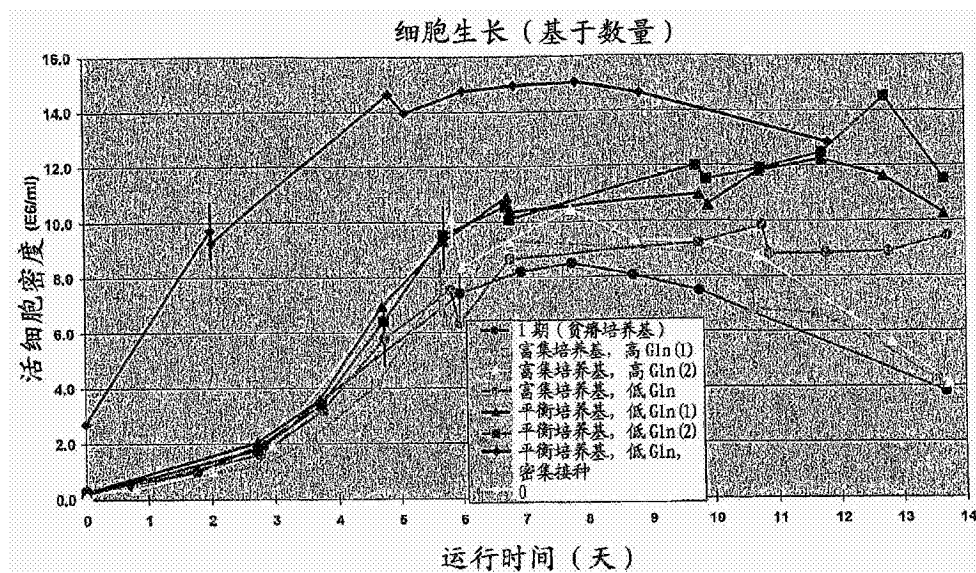


图60

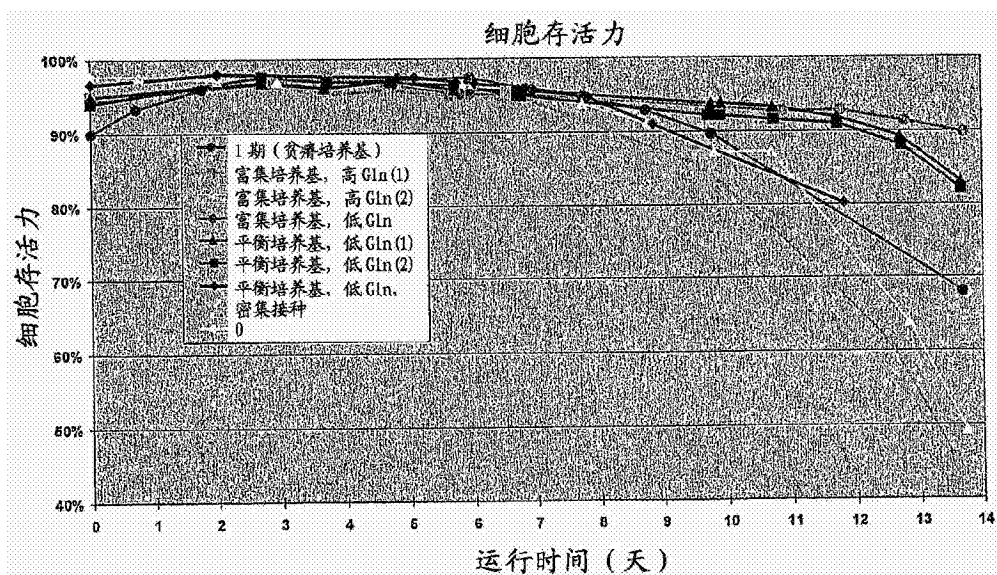


图61

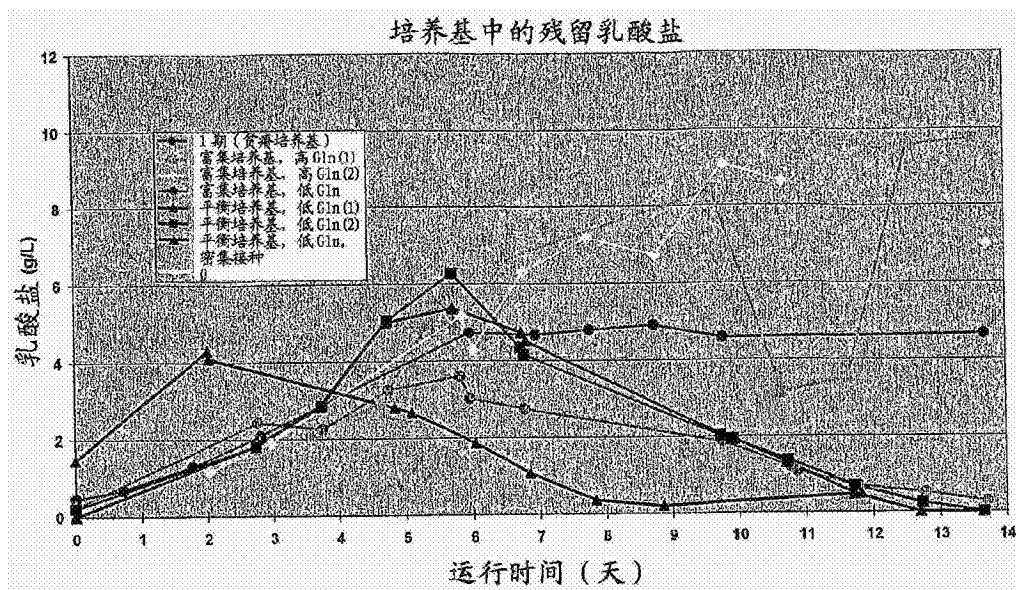


图62

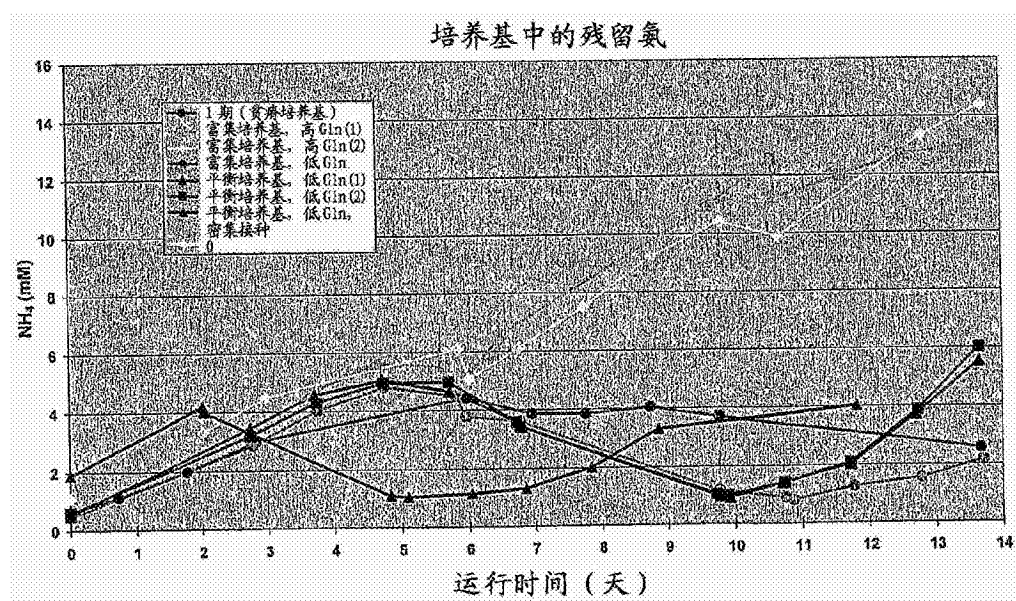


图63

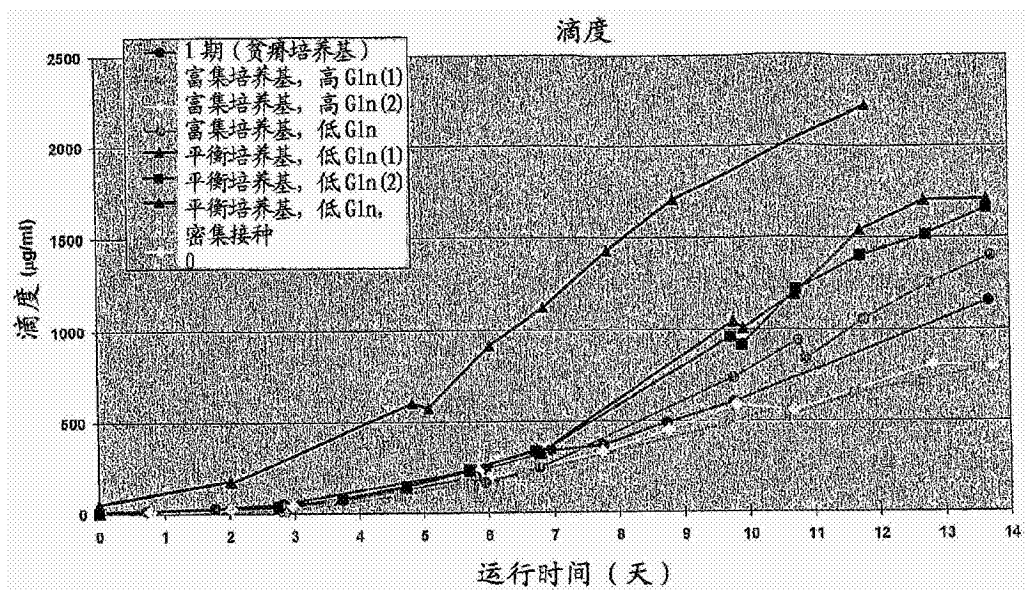


图64

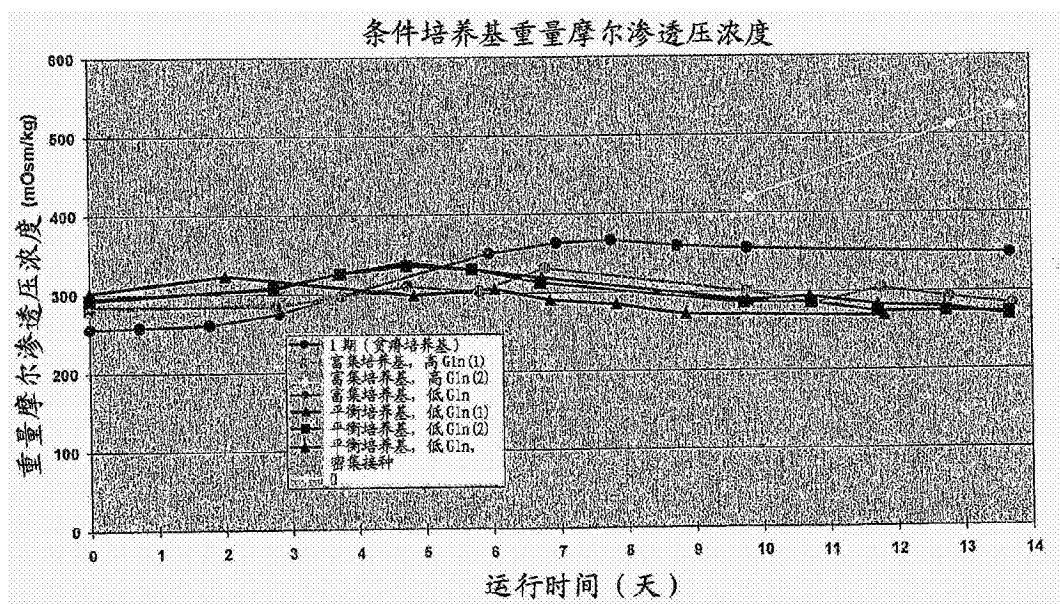


图65

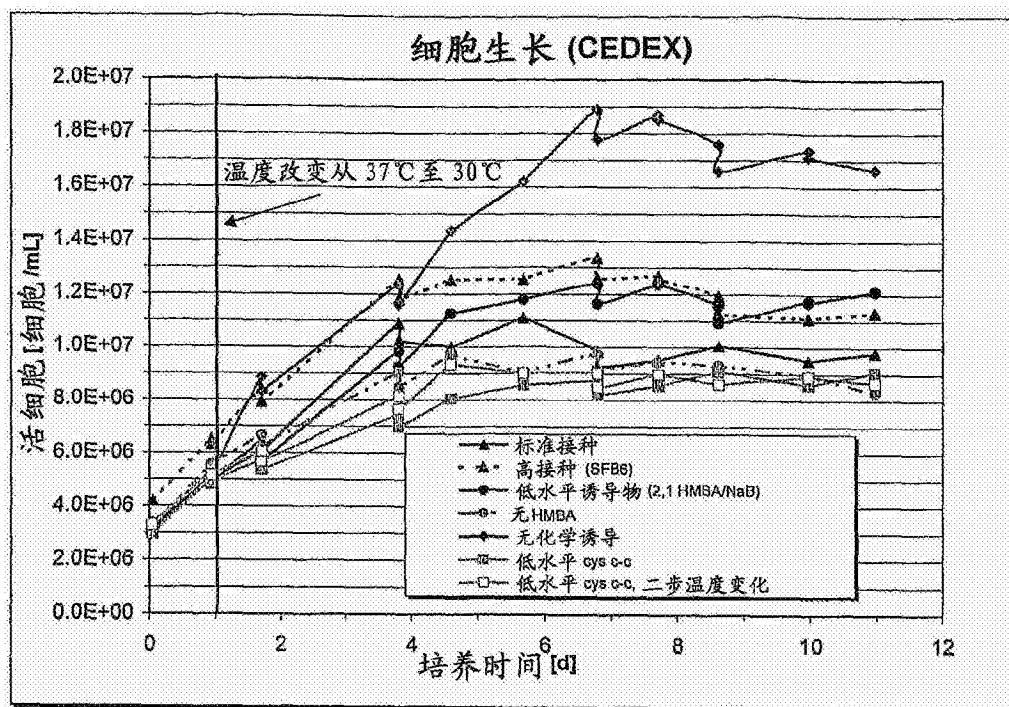


图66

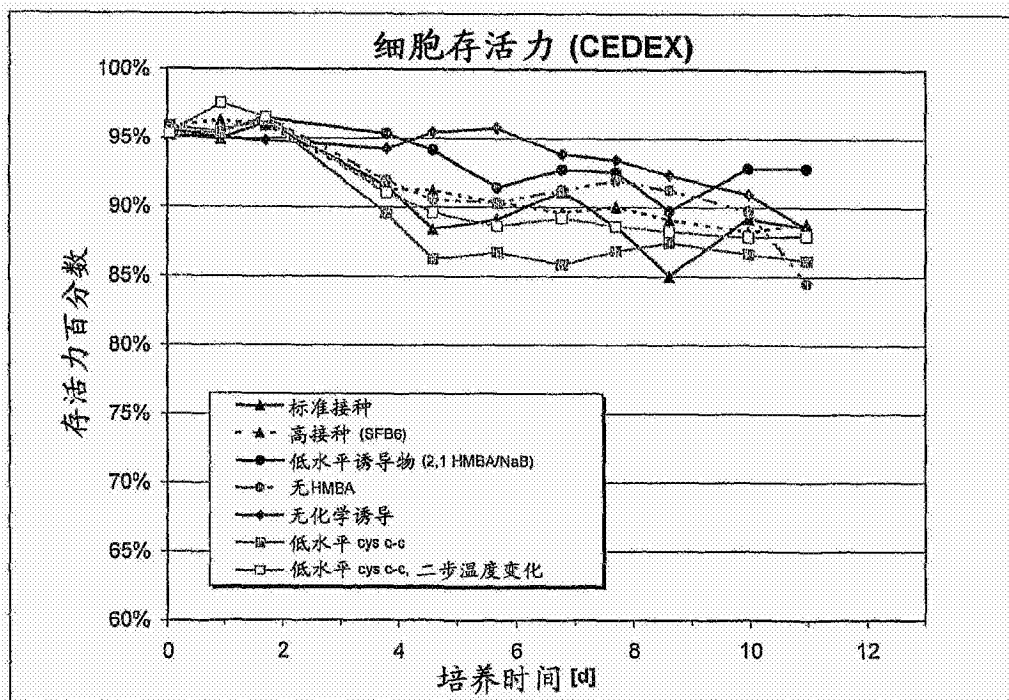


图67

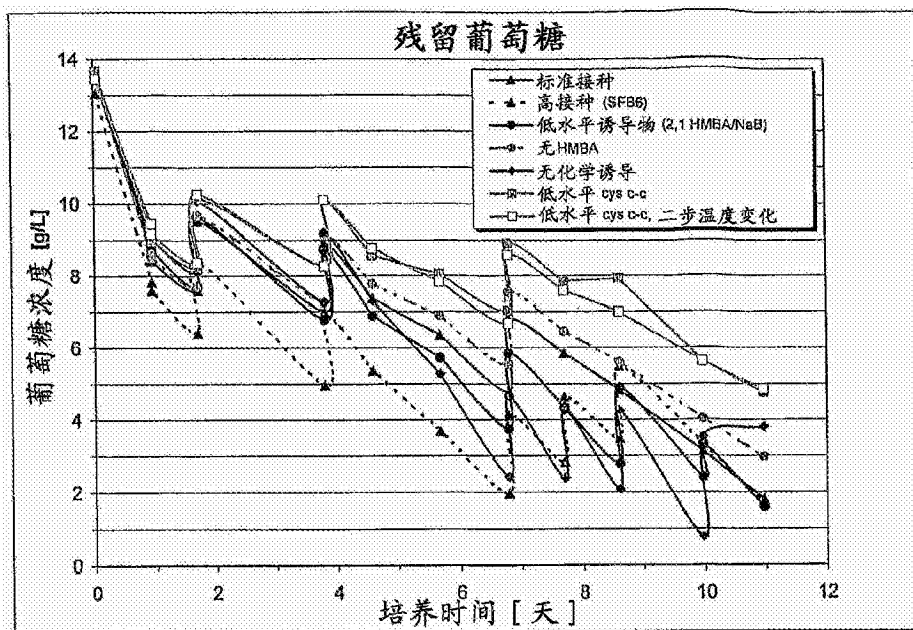


图68

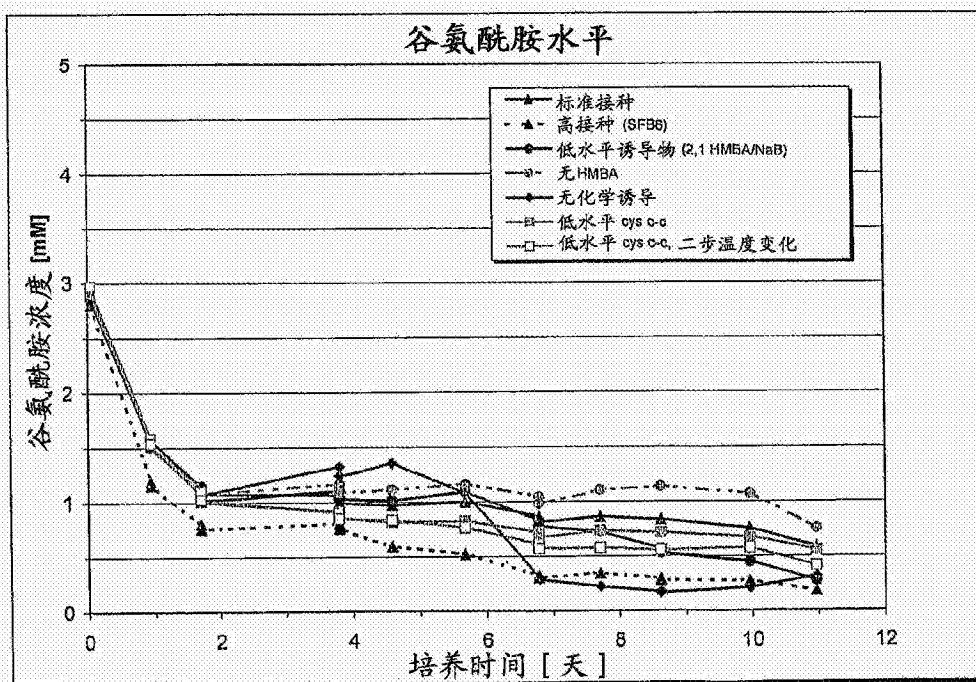


图69

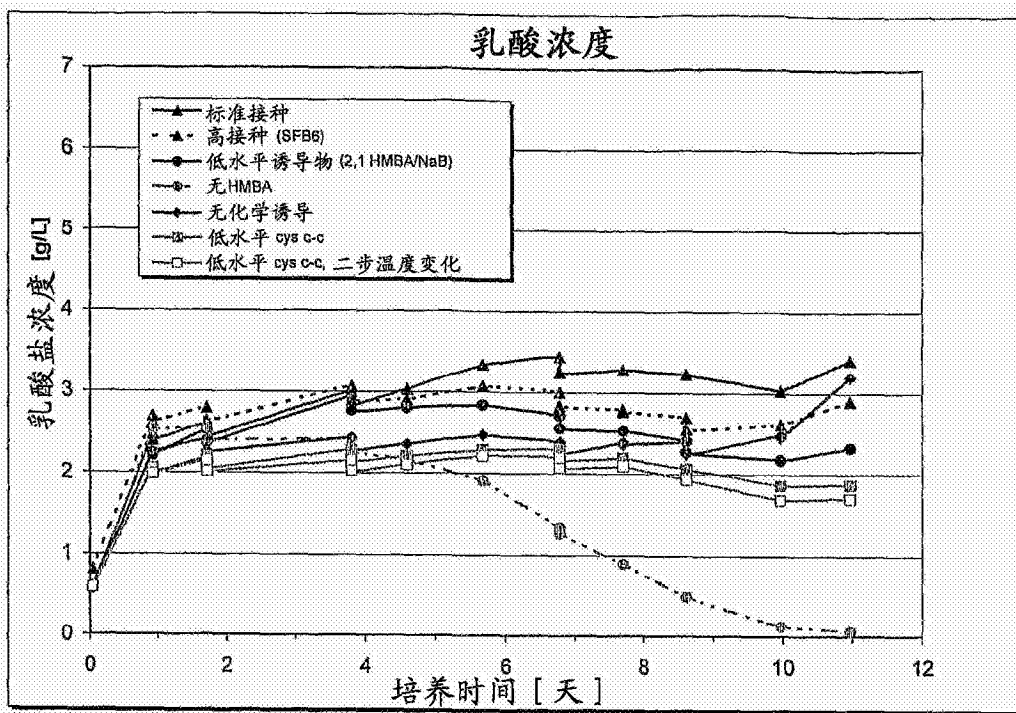


图70

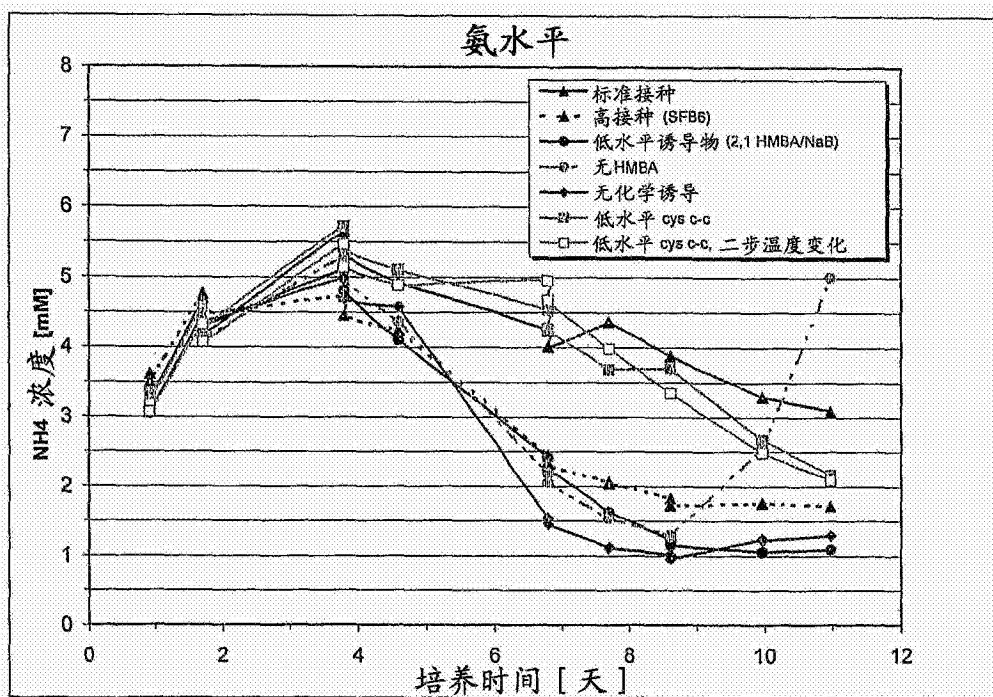


图71

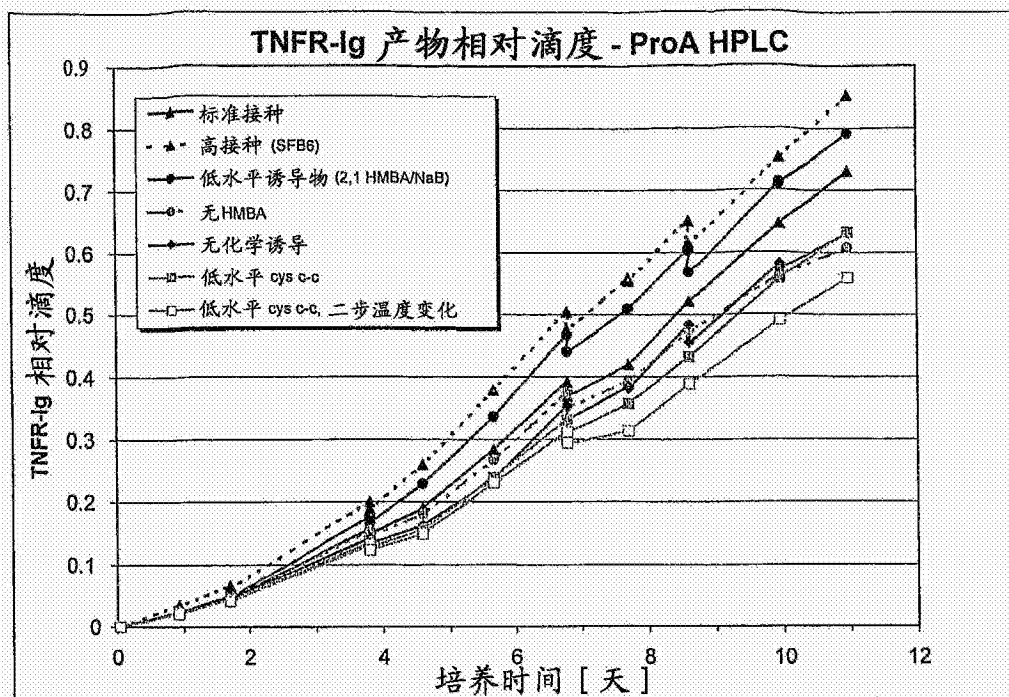


图72

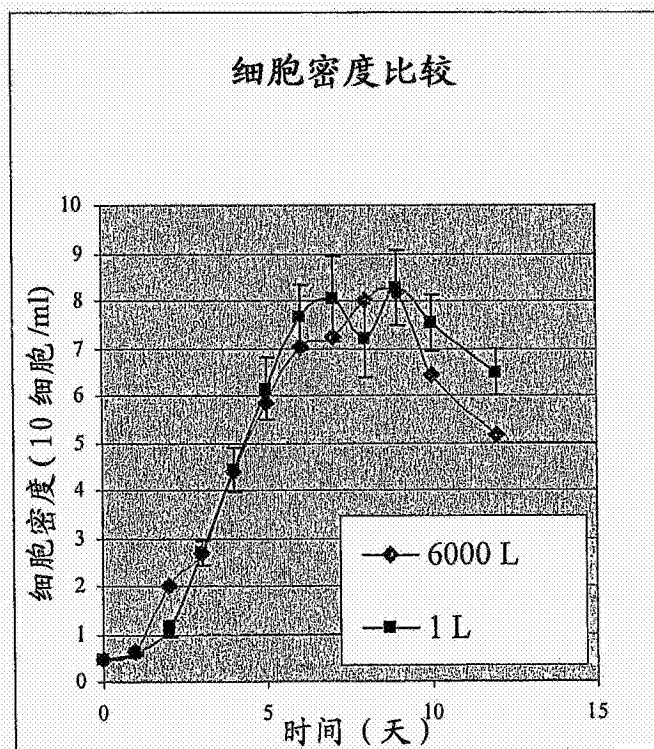


图73

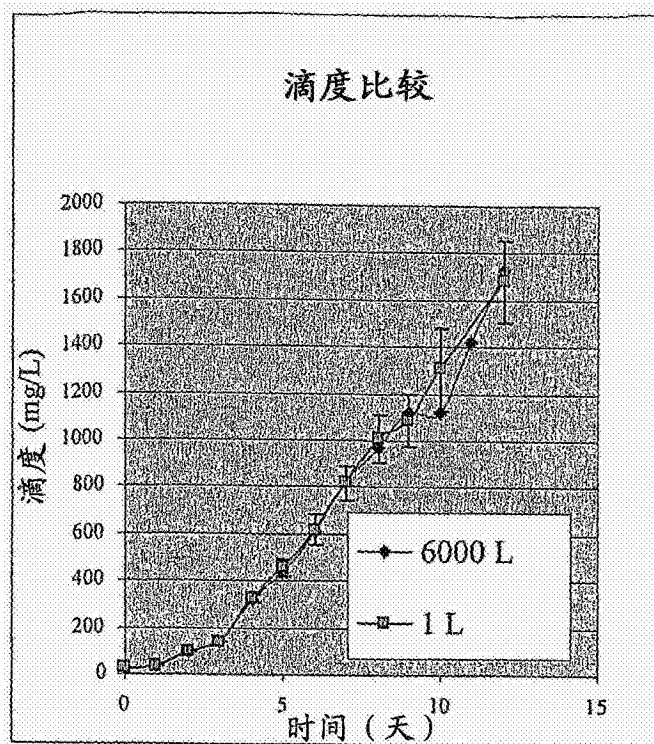


图74

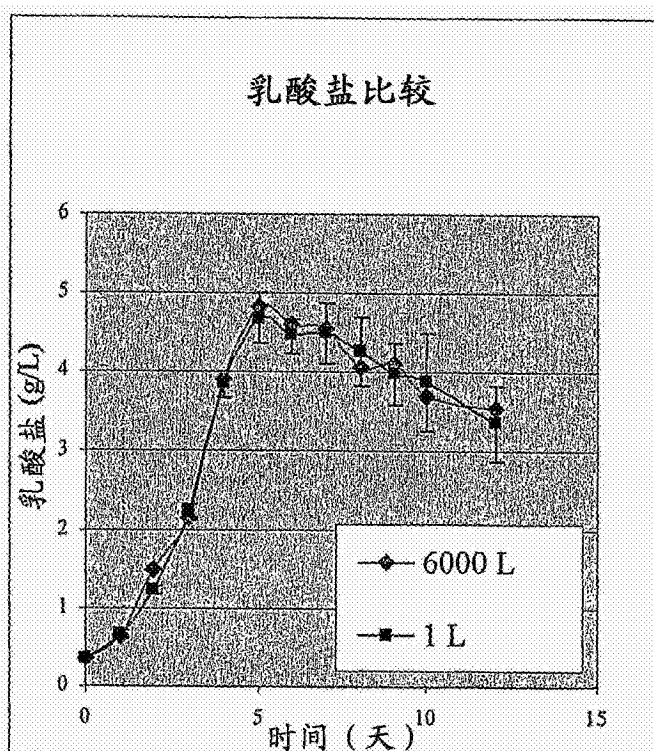


图75

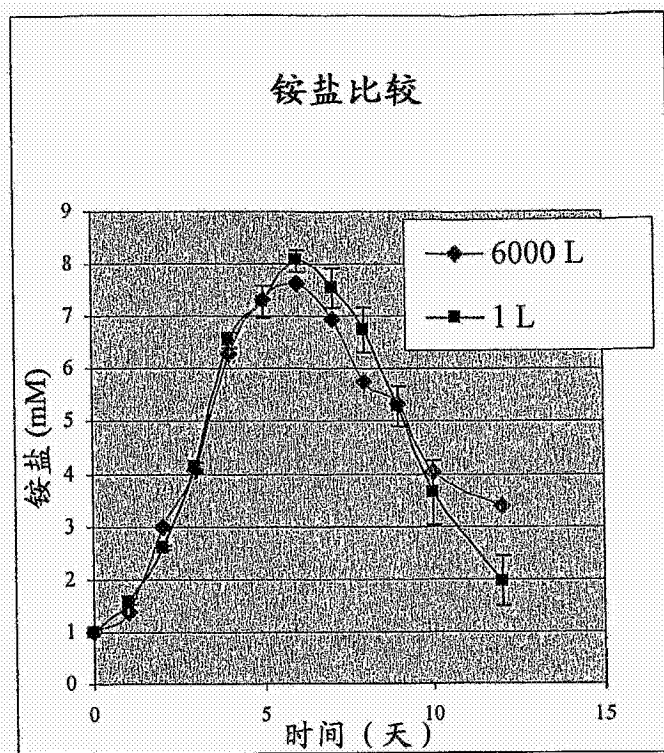


图76