



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103348000 B

(45)授权公告日 2017.09.22

(21)申请号 201280007872.X

(22)申请日 2012.02.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103348000 A

(43)申请公布日 2013.10.09

(30)优先权数据

61/440,237 2011.02.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.08.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/024194 2012.02.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/109279 EN 2012.08.16

(73)专利权人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·菲克 B·布兰绍 S·巴雷特

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 李媛

(51)Int.Cl.

C12N 5/00(2006.01)

审查员 蔺娜

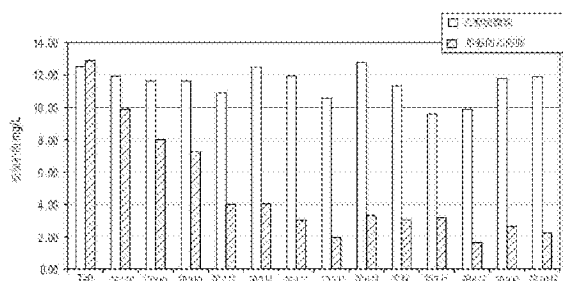
权利要求书3页 说明书28页 附图16页

(54)发明名称

用于稳定敏感化合物的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及用于增加组合物如细胞培养基中的不稳定成分如乙醇胺、生长因子、维生素等的稳定性或保护这些不稳定成分的方法。或者通过使用化学品衍生化不稳定化合物,或者通过螯合不稳定化合物,来增加不稳定化合物的稳定性。可以通过包封于微囊中或者通过使用螯合剂来完成螯合。包封包括将敏感化合物的树枝状聚合物复合物包封于微囊中,由此提供受保护的敏感化合物的控释。这些方法可以改善和扩展包含不稳定化合物的组合物的储存条件,改善包含不稳定化合物的组合物(例如干基质制剂)的运输和处理,在室温而不是在较低的温度保存,因此降低运输成本。在组合物如干式基质中的不稳定化合物的稳定化可以被视为是对于绿色科技的贡献。



1. 一种细胞培养组合物,其包含乙醇胺,所述乙醇胺通过螯合受到保护,且所述螯合是通过包封完成的。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞培养组合物是干式细胞培养粉末。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述包封是包封于可溶性基质中、或于不可溶性基质中。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述可溶性基质或不可溶性基质进一步被保护性涂层涂布。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述保护性涂层由多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸构成。

6. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述可溶性基质是含有醇、酮或醛的分子。

7. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述可溶性基质是己糖,所述己糖选自葡萄糖、甘露糖、果糖、麦芽糖糊精和半乳糖。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述己糖是麦芽糖糊精。

9. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述不可溶性基质选自藻酸盐、多聚-L-赖氨酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、聚乙醇酸、PLGA (乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯 (PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砒、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和角叉菜胶。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物选自细胞培养基、细胞培养补充物、饲料和细胞培养基浓缩物。

11. 一种制备包含一种或多种受保护的不稳定分子的细胞培养组合物的方法,其进一步包含:

a、通过包封螯合所述一种或多种不稳定分子以产生所述一种或多种受保护的不稳定分子;

b、将所述一种或多种受保护的不稳定分子与一种或多种细胞培养组分混合以制得所述细胞培养组合物,

其中与未受保护的不稳定分子相比,所述一种或多种受保护的不稳定分子防止了与一种或多种细胞培养组分发生不良反应,其中至少一种所述受保护的不稳定分子是乙醇胺。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述包封是包封于可溶性基质中、或于不可溶性基质中。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述可溶性基质或不可溶性基质进一步被保护性涂层涂布。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述保护性涂层由多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸构成。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中所述可溶性基质由含有醇、酮或醛的分子构成。

16. 根据权利要求12所述的方法,其中所述可溶性基质由糖构成。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述糖是麦芽糖糊精。

18. 根据权利要求12所述的方法,其中所述不可溶性基质选自藻酸盐、多聚-L-赖氨酸、

壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、聚乙醇酸、PLGA (乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯 (PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和角叉菜胶。

19. 一种微囊包封不稳定化合物以保护其在组合物中免于不良反应的方法, 其包含:

a、任选地, 将不稳定化合物与树枝状聚合物反应以产生树枝状聚合物-不稳定化合物复合物;

b、将步骤a) 的所述树枝状聚合物-不稳定化合物复合物或不稳定化合物包封于螯合剂中, 以产生包封的树枝状聚合物-不稳定化合物复合物, 或包封的不稳定化合物;

c、将步骤c) 的所述包封的树枝状聚合物-不稳定化合物复合物或包封的不稳定化合物与组合物中的一种或多种组分混合;

其中所述不稳定化合物为乙醇胺。

20. 根据权利要求19所述的微囊包封方法, 其中所述组合物是细胞培养基、细胞培养补充物或细胞培养饲料。

21. 根据权利要求20所述的微囊包封方法, 其中所述细胞培养基、细胞培养补充物或细胞培养饲料是干基质。

22. 根据权利要求21所述的微囊包封方法, 其中所述干基质是聚集的基质。

23. 根据权利要求19所述的微囊包封方法, 其中所述包封是在可溶性基质或不可溶性基质中进行。

24. 根据权利要求23所述的微囊包封方法, 其中所述可溶性基质或不可溶性基质进一步被保护性涂层涂布。

25. 根据权利要求24所述的微囊包封方法, 其中所述保护性涂层由多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸构成。

26. 根据权利要求23所述的微囊包封方法, 其中所述可溶性基质由含有醇、酮或醛的分子构成。

27. 根据权利要求23所述的微囊包封方法, 其中所述可溶性基质由糖构成。

28. 根据权利要求27所述的微囊包封方法, 其中所述糖是麦芽糖糊精。

29. 根据权利要求23所述的微囊包封方法, 其中所述不可溶性基质选自藻酸盐、多聚-L-赖氨酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、聚乙醇酸、PLGA (乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯 (PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和角叉菜胶。

30. 根据权利要求19所述的微囊包封方法, 其中所述树枝状聚合物选自聚酰胺-胺 (PAMAM) 树枝状聚合物、聚丙烯亚胺 (PPI) 树枝状聚合物、磷酸化的树枝状聚合物、聚赖氨酸树枝状聚合物、聚乙烯亚胺树枝状聚合物、蝶烯树枝状聚合物、脂肪聚醚树枝状聚合物、芳香聚醚树枝状聚合物和聚丙胺 (POPAM) 树枝状聚合物。

31. 根据权利要求1-10任一项所述的组合物在制备细胞培养基、细胞培养补充物或细

胞培养饲料中的用途。

32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述细胞培养基、细胞培养补充物或细胞培养饲料用于在合适的条件下培养细胞。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述哺乳动物细胞是产生合意的产品的重组细胞。

35. 根据权利要求33或34所述的用途,其中所述细胞是CHO细胞。

用于稳定敏感化合物的组合物和方法

[0001] 本申请要求在35U.S.C. §119(e)下,于2011年2月7日提交的美国临时申请No.61/440,237的权益,其公开的全部内容以引用的形式并入本文。

[0002] 已知一些化学品,或者在湿气的存在下,或者由于与制剂中的其它组分的逐渐的相互作用,即使当它们在干制剂中,也会随着时间而降解。这在制药工业、食品工业、甚至在细胞培养基工业中是屡见不鲜的,并且其导致缩短了产品的贮存期。例如,乙醇胺是细胞培养基中的一种敏感化合物并且其随着时间降解,这导致缩短了细胞培养基的贮存期。乙醇胺,也被称为2-氨基乙醇或单乙醇胺,是一种烷醇胺,其特征既在于既存在氨基基团也存在羧基基团并且具有以下化学结构:



[0004] 在化学工业中,乙醇胺常被用作洗涤剂、药物、和化妆品中的组分。例如,其被用于基于水的和基于溶剂的涂布中以增加溶解性、还原能力、色素分散、和pH稳定性。乙醇胺还被用于水处理工业,并且更特别是用于发电厂的蒸汽循环中,以防止金属组分的腐蚀。其还被使用从自然中的和炼厂气操作中的气流中擦洗或除去酸性组分,例如硫化氢和二氧化碳。乙醇胺通过环氧乙烷与氨的反应制得,其伴随着二乙醇胺和三乙醇胺的额外二级产物。

[0005] 细胞培养基提供在受控制的、人工的和体外环境中维持细胞和使细胞生长所必需的营养。基质制剂被用于培养许多细胞类型,包括细菌细胞和真核细胞例如动物、植物等。乙醇胺是真核细胞培养基的有用的组分,并且由于其是敏感组分因此通常需要之后补充。由于其低稳定性,乙醇胺在某些组合物中是不确定的。例如,在细胞培养基中,在氨基酸的存在下,乙醇胺迅速降解。这种不稳定性在更暖和的环境中增加,例如这种情况出现在制备干粉细胞培养基的过程中,导致乙醇胺的降解并减少了细胞培养基的贮存期。相似地,许多细胞培养组分如维生素、生长因子如胰岛素、和细胞因子等在基质制剂中也是不稳定的,尤其是在单一组分的干式基质制剂中,其可能含有60-100种多变的反应性的不同化学品,包括氨基酸。

[0006] 始终需要稳定和/或保护细胞培养基制剂中存在的不稳定组分,尤其是在单一组分细胞培养基制剂中,在干式基质制剂中等。

[0007] 发明简述

[0008] 本发明提供增加或保护组合物中不稳定化合物或组分,敏感的或易受影响的组分或化合物(可以使用的术语是可替换的)的稳定性的方法,所述组合物包括 但不限于,细胞培养基、细胞培养补充物、药物、营养品、食品补充物、富含维生素的制剂、化妆品、洗涤剂

等。

[0009] 因此,在一个实施方案中,本发明的目的是组合物,如细胞培养组合物,其包含受保护的不稳定分子,其中所述受保护的不稳定分子被阻止与细胞培养组合物中的细胞培养组分发生不良反应。在某些实施方案中,所述细胞培养组合物可以是干式细胞培养粉末,而在其它实施方案中,其可以是液体细胞培养基。在另一个实施方案中,所述受保护的不稳定分子可以选自如乙醇胺、生长因子、维生素、细胞因子等的任何不稳定分子。在一些实施方

案中,所述不稳定分子可以通过不稳定分子的衍生化或通过不稳定分子的螯合(sequestration)而被保护。在该实施方案的一个方面,所述不稳定分子是乙醇胺。在该实施方案的另一个方面,所述受保护的不稳定分子可以是生长因子如胰岛素,或维生素如维生素B12,或硫胺素等。

[0010] “不稳定分子、组分或化合物”或“敏感分子、组分或化合物”是指在组合物中易于降解或与同一组合物中的其它组分发生不需要的相互作用的物质,例如多胺类如乙醇胺、维生素、生长因子等,所述组合物例如培养基、补充物、药物、营养品、食品补充物、富含维生素的制剂、化妆品、洗涤剂等,其中这些组分由于与同一组合物中的其它化学品发生不需要的相互作用而快速降解或在储存期间经过一段时间后降解。

[0011] 在如上实施方案的另一个方面,所述细胞培养组合物包含受保护的不稳定分子,其中所述受保护的不稳定分子证明在细胞培养组合物中具有增加的稳定性,并且其中所述不稳定分子是乙醇胺。在另一个实施方案中,所述细胞培养组合物可以是干式细胞培养粉末或液体细胞培养基。

[0012] 在一个优选的实施方案中,通过衍生化或通过螯合保护乙醇胺。所述衍生化可以通过与糖醇、或氨基糖、或糖醛酸、或磷酸化糖的反应进行。

[0013] 在另一个实施方案中,所述糖醇可以选自阿洛糖醇、阿卓糖醇、果糖醇、半乳糖醇、葡萄糖醇、古洛糖醇(gulitol)、艾杜糖醇、甘露醇、山梨醇、塔罗糖醇、塔格糖醇、阿拉伯糖醇、核糖醇、核酮糖醇、木糖醇、木酮糖醇、来苏糖醇、赤藓酮糖醇、赤藓糖醇、和苏阿糖醇。

[0014] 在另一个实施方案中,所述氨基糖可以选自阿洛糖胺、阿卓糖胺、果糖胺、半乳糖胺、葡萄糖胺、古洛糖胺(gulosamine)、艾杜糖胺、甘露糖胺、山梨糖胺、塔罗糖胺、塔格糖胺、阿拉伯糖胺、核糖胺、核酮糖胺、木糖胺、木酮糖胺、来苏糖胺、赤藓酮糖胺、赤藓糖胺、和苏阿糖胺。

[0015] 在另一个实施方案中,所述糖醛酸可以选自阿洛糖醛酸、阿卓糖醛酸、果糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、古洛糖醛酸(guluronic acid)、艾杜糖醛酸、甘露糖醛酸、山梨糖醛酸、塔罗糖醛酸、塔格糖醛酸、阿拉伯糖醛酸、核糖醛酸、核酮糖醛酸、木糖醛酸、木酮糖醛酸、来苏糖醛酸、赤藓酮糖醛酸、赤藓糖醛酸、和苏阿糖醛酸。

[0016] 在另一个实施方案中,所述磷酸化糖选自3-磷酸甘油醛和磷酸二氢丙酮。

[0017] 在一个方面,所述不稳定分子(例如乙醇胺)的螯合可以通过将不稳定分子包封于可溶性基质中,或者通过将不稳定分子包封于不可溶性基质中完成。在一个优选的实施方案中,将被包封的不稳定分子是乙醇胺。在另一个实施方案中,将被包封的不稳定组分是维生素、生长因子、细胞因子等。

[0018] 在另一个方面,在包封前,所述不稳定分子与树枝状聚合物(dendrimer)复合。在另一个方面,所述不稳定分子不与树枝状聚合物复合而直接包封。

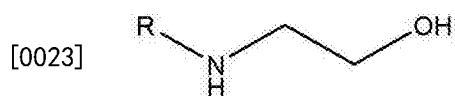
[0019] 在一个方面,所述用于包封的可溶性基质或不可溶性基质可以进一步用保护涂层涂布。在另一个方面,所述保护涂层可以由多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸构成。

[0020] 在一个实施方案中,所述不可溶性基质可以选自藻酸盐、多聚-L-赖氨酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、聚乙醇酸、PLGA(乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯(PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷脂、聚氨基酸、聚二甲基硅

氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和角叉菜胶。在另一个实施方案中,所述微囊包封可以用骨架基质(scaffolding matrices)完成,所述骨架基质包括但不限于,聚乙醇酸、PLGA(乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯(PHA)、聚ε-己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0021] 在另一个实施方案中,所述可溶性基质可以是包含醇、酮或醛的分子。在另一个实施方案中,所述可溶性基质可以是己糖,其选自葡萄糖、甘露糖、果糖、麦芽糖糊精和半乳糖。在一个优选的方面中,所述己糖可以是麦芽糖糊精。

[0022] 在一个方面中,所述乙醇胺衍生物具有下式:



[0024] 其中R是乙酰基或氨基酸。在一个优选的实施方案中,所述乙醇胺衍生物是N-乙酰基乙醇胺(NAE)。

[0025] 在某些实施方案中,本发明所述的组合物可以选自细胞培养基、细胞培养补充物、饲料和细胞培养基浓缩物。

[0026] 在另一个方面,本发明描述了一种制备包含一种或多种受保护的不稳定分子的细胞培养组合物的方法,其进一步包含:a)衍生化和/或螯合所述一种或多种不稳定分子以产生所述一种或多种受保护的不稳定分子;b)将一种或多种受保护的不稳定分子与一种或多种细胞培养组分混合以制得所述细胞培养组合物,其中与未受保护的不稳定化合物相比,所述一种或多种受保护的不稳定分子防止了与一种或多种细胞培养组分发生不良反应,其中至少一种所述受保护的不稳定分子是乙醇胺。

[0027] 在某些实施方案中,所述不稳定分子的衍生化可以使用糖醇、或氨基糖、或糖醛酸、或磷酸化糖。

[0028] 在一个方面中,所述糖醇可以选自所述糖醇可以选自阿洛糖醇、阿卓糖醇、果糖醇、半乳糖醇、葡萄糖醇、古洛糖醇、艾杜糖醇、甘露醇、山梨醇、塔罗糖醇、塔格糖醇、阿拉伯糖醇、核糖醇、核酮糖醇、木糖醇、木酮糖醇、来苏糖醇、赤藓酮糖醇、赤藓糖醇、和苏阿糖醇。在另一个方面中,所述氨基糖可以选自阿洛糖胺、阿卓糖胺、果糖胺、半乳糖胺、葡萄糖胺、古洛糖胺、艾杜糖胺、甘露糖胺、山梨糖胺、塔罗糖胺、塔格糖胺、阿拉伯糖胺、核糖胺、核酮糖胺、木糖胺、木酮糖胺、来苏糖胺、赤藓酮糖胺、赤藓糖胺、和苏阿糖胺。在第三个方面中,所述糖醛酸可以选自阿洛糖醛酸、阿卓糖醛酸、果糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、古洛糖醛酸、艾杜糖醛酸、甘露糖醛酸、山梨糖醛酸、塔罗糖醛酸、塔格糖醛酸、阿拉伯糖醛酸、核糖醛酸、核酮糖醛酸、木糖醛酸、木酮糖醛酸、来苏糖醛酸、赤藓酮糖醛酸、赤藓糖醛酸、和苏阿糖醛酸。在第四个方面中,所述磷酸化糖选自3-磷酸甘油醛和磷酸二氢丙酮。

[0029] 在一个实施方案中,所述不稳定分子的螯合可以通过包封于可溶性基质,或通过将不稳定分子包封于不可溶性基质完成。在一个方面中,所述可溶性基质或不溶性基质可以进一步用保护涂层涂布,而在其它方面中,所述可溶性基质或不可溶性基质可以不用保护涂层进一步涂布。在另一个方面中,所述保护涂层由多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸构成。

[0030] 在另一个方面中,所述可溶性基质由包含醇、酮或醛的分子构成,其可以是糖如麦芽糖糊精。

[0031] 在另一个方面中,所述不可溶性基质可以选自藻酸盐、多聚-L-赖氨酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、聚乙醇酸、PLGA(乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯(PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砒、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和角叉菜胶。

[0032] 在一个实施方案中,本发明提供一种包封或微囊包封(可替换使用)不稳定化合物以保护其在组合物中免于不良反应的方法,其包含:a) 任选地,将不稳定化合物与树枝状聚合物反应以产生树枝状聚合物-不稳定化合物的复合物;b) 将步骤a)的所述树枝状聚合物-不稳定化合物复合物或者不稳定化合物包封于螯合剂中,以产生包封的树枝状聚合物-不稳定化合物复合物或包封的不稳定化合物;和 c) 将步骤c)的所述包封的树枝状聚合物-不稳定化合物复合物或包封的不稳定化合物与组合物中的一种或多种组分混合。所述不稳定化合物选自乙醇胺、生长因子、维生素和细胞因子。

[0033] 在另一个方面中,所述微囊包封或包封组合物的方法可以用于制备细胞培养基、细胞培养补充物、或细胞培养饲料,其中任何一个均可以是干基质形式。在一个优选的实施方案中,所述干基质是聚集的基质。在各个方面中,所述方法可使用包含不稳定分子或化合物的基质其通过将不稳定分子包封于可溶性基质或不可溶性基质中的螯合而得到。在所述方法的一个方面中,所述可溶性基质或不可溶性基质可以进一步用保护涂层涂布,而在其它方面,所述可溶性基质或不可溶性基质可以不用保护涂层进一步涂布。在所述方法的另一个方面中,所述保护涂层由多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸构成。在所述方法的另一个方面中,所述可溶性基质可以由包含醇、酮或醛的分子构成,其可以是糖如麦芽糖糊精。

[0034] 在所述方法的一些实施方案中,所述不可溶性基质可以选自藻酸盐、多聚-L-赖氨酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、聚乙醇酸、PLGA(乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯(PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砒、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和角叉菜胶。

[0035] 在所述方法的另一个实施方案中,用于与不稳定化合物复合的树枝状聚合物可以选自聚酰胺-胺(polyamidoamine)(PAMAM)树枝状聚合物、聚丙烯亚胺(PPI)树枝状聚合物、磷酸化的树枝状聚合物、聚赖氨酸树枝状聚合物、聚乙烯亚胺树枝状聚合物、蝶烯(iptycene)树枝状聚合物、脂肪聚(醚)树枝状聚合物、芳香聚醚树枝状聚合物、和聚丙胺(POPAM)树枝状聚合物。

[0036] 在某些方面中,本发明目的是如上所述的组合物在制备细胞培养基、细胞培养补充物、或细胞培养饲料中的用途。在一个方面中,所述细胞培养补充物或细胞培养饲料用于在适合的条件下培养细胞。所述细胞可以是哺乳动物细胞、重组细胞、产生需要的产品的重组的、哺乳动物细胞。在一个优选的实施方案中,所述细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,并且在进一方面中,所述CHO细胞表达感兴趣的重组蛋白,或者具有商业价值的重组蛋白。

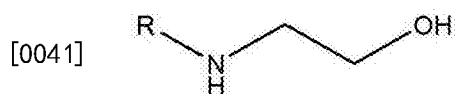
[0037] 在另一个实施方案中,本发明提供或者通过将不稳定成分衍生为稳定形式,或者通过依据包括但不限于包封的方法螯合不稳定组分,用于增加不稳定组分的稳定性的方法。因此,本发明提供用于增加例如干式基质的稳定性的方法,其中不稳定组分如乙醇胺、维生素、生长因子等在室温而不是较低的温度具有延长的时间周期。本发明提供用于增加例如干式基质的稳定性的方法,所述干式基质包含不稳定组分例如乙醇胺、维生素、生长因子等,并且所述干式基质能够在环境温度或室温被运输,而无需干冰或无需冷藏。本发明提供包含稳定当量的降解敏感化合物的组合物,例如包含稳定的多元胺或稳定的维生素等的组合物。所述组合物可以是任何形式,包括半固体浆糊、半干或干式。在干制剂或干式基质中的基质和基质补充物可以是以下任何形式:干粉基质(DPM)、聚集的干式(AGT)或高级粉末基质(APM)。所述细胞培养基可以是干式细胞培养基或液体基质。此外,所述细胞培养基可以是一个单一组分的基质,或者可以具有不只一种组分,例如两种或多种组分的基质。所述干式基质可以是单一组分的基质制剂,或多组分基质制剂,其可以用溶剂重建以产生为细胞培养做好准备的细胞培养基。在一些实施方案中,重建的制剂可以是预自动pH调节和预自动重量克分子渗透浓度(osmolality)调节的。这意味着,在用溶剂的重建过程中不需要向基质中添加另外的酸/碱或重量克分子渗透浓度调节组分,由此使得重建对于最终使用者是一个简单的步骤。

[0038] 本发明的目的还为在任何应用中稳定乙醇胺或其它不稳定组分,所述应用包括但不限于,细胞培养基、制药工业中使用的任何包含不稳定分子例如乙醇胺的化学组合物、化妆品工业、酶工业、食品工业中使用的缓冲剂、在工业的应用例如清洁剂、在处理水的方法中(以控制腐蚀)、油漆工业、在洗涤剂中、从气体中除去酸等。本文公开的方法和组合物可以被用于任何领域以保护易降解化合物,并且本领域技术人员可以将该方法适用于任何其它应用中以稳定本发明中描述的不稳定组分。而化合物的微囊包封在本领域中是已知的,本发明提供包封树枝状聚合物-不稳定组分复合物的新型方法,其中树枝状聚合物包括但不限于聚酰胺-胺树枝状聚合物、聚丙烯亚胺树枝状聚合物、或聚丙胺(POPAM)树枝状聚合物等。在该方法中,树枝状聚合物与敏感化合物如乙醇胺或胰岛素等形成复合物,然后包封树枝状聚合物-化合物复合物。经包封的树枝状聚合物-不稳定化合物复合物被用于制备稳定的组合物例如细胞培养基。因此,本发明提供制备改善的组合物如细胞培养基的方法,所述改善的组合物包含包封的树枝状聚合物-不稳定化合物复合物,所述方法改善细胞培养基的储存、环境温度下基质的运输,并且可以允许不稳定组分从包封的复合物中在长时间内的控释。

[0039] 使用本发明描述的方法,例如衍生化不稳定化合物和/或螯合(如在包封中,和/或不稳定分子-树枝状聚合物的包封中),可以在任何组合物,例如细胞培养基中保护和/或稳定不稳定化合物。因此,使用本发明的方法,与在相似组合物中的可比较的未受保护的或不稳定的分子相比,受保护的化合物可以更加稳定至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%。百分(%)稳定性的测量值可以通过许多方法测量或推导,例如通过受保护的/未受保护的分子(受保护的乙醇胺对比于未受保护的乙醇胺)允许细胞生长的能力(通过细胞培养的活细胞密度测定),或者通过使用LCMS光谱测定法测定组合物中修饰的化合物如修饰的乙醇胺,或者通过测定组合物中乙醇胺的降解%等。

如果与暴露于相似条件的未受保护的分子相比,受保护的分子能够抵挡破坏因子如增加的温度、暴露于辐射(例如UV、日光等)、暴露于湿气、湿润、极端干燥、机械破碎(在运输过程中)等,则也可以被视为稳定性增强。在任何一个或多个如上所述的对比试验中(细胞培养的活细胞密度,或者使用LCMS光谱测定法测定组合中修饰的化合物如修饰分子,或者通过测定降解%),稳定性还可以表示为比暴露于相似条件的未受保护的分子1.5X、2X、3X、4X、5X、6X、7X、10X、15X、20X、25X、3X、35X、40X、4X、50X、55X、60X、65X、70X、75X、高达100X更加稳定。

[0040] 在本发明的一个方面中,通过在化合物的氨基部分形成酰胺键增加敏感化合物的稳定性,例如在氨基基团处乙酰化化合物。例如,通过使用乙酰基衍生物、在乙醇胺的氨基(amine group)处的共价键增加乙醇胺稳定性。在一个实施方案中,所述共价键是酰胺键。所述乙醇胺衍生物可以具有以下结构式:



[0042] 其中R是乙酰基或氨基酸。

[0043] 在一个方面中,可以通过使用螯合剂保护敏感化合物来增加敏感化合物的稳定性。该方法可以提及到(可替换地)包封或嵌入。螯合剂可以是任何“保护”或“隔离”或“包封”或“嵌入”敏感化合物使其远离任何逐渐降解其的元素或化合物的试剂。例如,可以通过将乙醇胺包封于螯合剂中稳定乙醇胺,所述螯合剂保护乙醇胺避免发生副反应。螯合剂可以是可溶性包封基质或不可溶性包封基质。

[0044] 在一个实施方案中,螯合剂可以是可溶性包封基质,例如含酮化合物,或者含醛化合物,包括但不限于,糖(例如葡萄糖),或者其衍生物,或者酮酸。例如,所述螯合剂可以是可溶性的、由糖如麦芽糖糊精构成的结晶基质等等,其可以通过重建而溶解于水基的介质中。

[0045] 在另一个实施方案中,所述包封基质可以是不可溶性基质,例如,藻酸盐等,其可以包封不稳定化合物。所述不可溶性基质或珠子(bead)容易通过用溶剂如水或缓冲剂的重建而将被包封的不稳定材料释放于溶液中,并且可以通过例如过滤从重建介质中分离出来。不可溶性基质包封试剂的实例包括,但不限于,藻酸盐、壳聚糖、PEG基质、乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)、明胶及其衍生物、胶原及其衍生物、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、选择性渗透材料、膜、树脂、胶、阿拉伯半乳聚糖、麦芽糖糊精、其它寡聚或多聚糖基质、脂质、蜡、石蜡、油等。在另一个实施方案中,所述包封基质例如藻酸盐,可以包封不稳定化合物与树枝状化合物的复合物。在不稳定化合物-树枝状聚合物复合物中,树枝状聚合物在易于降解、不稳定的物质周围形成框架。使用可溶性的/不可溶性的基质进一步包封不稳定化合物-树枝状聚合物复合物提供另外的保护层。此外,树枝状聚合物-不稳定化合物复合物可以导致通过用溶剂的重建后不稳定化合物的缓慢释放,这在某些情况下是需要的。

[0046] 胶囊或珠子的制备:藻酸盐是一种交联水凝胶,将其例如用乙醇胺(或任何敏感物质)溶解,然后将得到的溶液滴入钙溶液中以形成胶囊(针头注射法)。形成珠子的另一种方法是通过喷雾法。将珠子收集,洗涤以除去过量的钙,并干燥。当干燥时,藻酸盐形成硬的、有折射能力的珠子,其可以与干粉基质例如DPM、APM或AGT混合,并保护乙醇胺。在一个实施方案中,用于包封乙醇胺的藻酸盐或者通过针头注射法或者通过另外一种喷雾法形成珠

子。喷雾法产生更小的珠子。当含有乙醇胺的树枝状聚合物同样被包封于藻酸盐中,并且用溶剂重建基质时,藻酸盐和树枝状聚合物容易将被包封的材料释放于溶液中。可以从介质中过滤出胶囊。

[0047] 在一个方面中,具有增加的乙醇胺稳定性的组合物是化妆用的或药用的。在一个实施方案中,所述化妆用的或药用的组合物是粉末状的组合物。在另一个实施方案中,所述化妆用的或药用的组合物是溶液。

[0048] 在另一方面中,具有增加的乙醇胺稳定性的组合物是细胞培养基。在一个实施方案中,所述细胞培养基是粉末状的细胞培养基。在另一个实施方案中,所述细胞培养基是溶液。该方面包括增加粉末状的或液体的细胞培养基中的乙醇胺的稳定性的方法,以及通过该方法制得的粉末状的或液体的细胞培养基。

[0049] 一个实施方案的目的是一种增加粉末状的细胞培养基中的乙醇胺的稳定性的方法,所述方法包含将乙醇胺衍生物或已经与螯合剂复合的乙醇胺(“螯合的乙醇胺”)与包含一种或多种氨基酸的粉末状的细胞培养基组合,其中所述包含一种或多种氨基酸的粉末状的细胞培养基和乙醇胺衍生物或螯合的乙醇胺展现了增加的乙醇胺稳定性。在某些实施方案中,所述方法在组合步骤之前进一步包括将乙醇胺与螯合剂复合的步骤以产生螯合的乙醇胺。

[0050] 在另一个方面中,本发明提供一种通过将水性细胞培养基与乙醇胺衍生物或已经与螯合剂复合的乙醇胺(“螯合的乙醇胺”)组合制备水性细胞培养基的方法。在一个实施方案中,所述制备水性细胞培养基的方法包含将乙醇胺衍生物或已经与螯合剂复合的乙醇胺(“螯合的乙醇胺”)与包含一种或多种氨基酸的细胞培养基溶液组合。根据该方法制备的水性细胞培养基可以任选地被干燥以产生包含乙醇胺衍生物或螯合的乙醇胺的粉末状的细胞培养基。在另一个实施方案中,本发明提供一种通过将溶剂例如水与包含一种或多种氨基酸的粉末状的细胞培养基和乙醇胺衍生物或已经与螯合剂复合的乙醇胺(螯合的乙醇胺)组合制备水性细胞培养基的方法。

[0051] 相似地,本发明提供一种根据本文描述的方法制备的粉末状的细胞培养基。在一个实施方案中,所述粉末状的细胞培养基包含乙醇胺衍生物或已经与螯合剂复合的乙醇胺(螯合的乙醇胺)和一种或多种氨基酸。所述粉末状的细胞培养基任选地包含其它组分,例如碳水化合物(例如葡萄糖)。

[0052] 在某些实施方案中,所述细胞培养基是单一组分的基质,其包含一种或多种不稳定化合物例如:乙醇胺、生长因子、细胞因子等。在一个实施方案中,所述细胞培养基不含蛋白质。在另一个实施方案中,所述细胞培养基不含蛋白质并且不含脂质、碳水化合物、或生长因子。在一些实施方案中,所述细胞培养基可以适合于培养细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、藻类细胞、或动物细胞,例如昆虫细胞(例如,果蝇细胞、夜蛾细胞或粉夜蛾细胞)、线虫细胞(例如秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)细胞)或哺乳动物细胞(例如CHO细胞、COS细胞、VERO细胞、BHK细胞、AE-1细胞、SP2/0细胞、L5.1细胞、PerC6、杂交瘤细胞、或其它人类细胞)。

[0053] 在另一个方面中,本发明提供一种培养细胞的方法,其包括在支持细胞培养的条件下,将细胞与含有一种或多种不稳定化合物例如乙醇胺衍生物、螯合的乙醇胺、螯合的生长因子、螯合的细胞因子等的细胞培养基接触。在一些实施方案中,所述细胞可以是母细胞,而在其它实施方案中,所述细胞可以是携带有感兴趣基因的重组细胞、或病变细胞例如

癌细胞等。根据本发明方法可以培养任何细胞,例如细菌细胞、酵母细胞、或真核细胞如藻类细胞、植物细胞或特别是动物细胞。在一个实施方案中,所述动物细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,使用所述基质培养哺乳动物细胞,包括人类细胞和/或组织,包括但不限于CHO(中国仓鼠卵巢)细胞、COS细胞、VERO细胞、BHK细胞、AE-1细胞、SP2/0细胞、L5.1细胞、PerC6、杂交瘤细胞、或任何其它哺乳动物细胞、昆虫细胞,包括但不限于,果蝇细胞、夜蛾细胞或粉夜蛾细胞,线虫细胞,包括但不限于秀丽隐杆线虫细胞等。

[0054] 另一方面提供含有细胞培养基的组合物,所述细胞培养基包含一种或多种不稳定化合物例如乙醇胺衍生物、螯合的乙醇胺、螯合的生长因子、螯合的细胞因子等,和至少一种上述细胞。在一个实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一个优选的实施方案中,所述哺乳动物细胞是CHO细胞。在另一个优选的实施方案中,所述CHO细胞是携带有感兴趣的基因的重组CHO细胞。

[0055] 另一方面的目的是在细胞培养中使用的试剂盒。所述试剂盒可以包含一个或多个容器,所述容器含有包含一种或多种不稳定化合物例如乙醇胺衍生物、螯合的乙醇胺、螯合的生长因子、螯合的细胞因子等,任选地一种或多种氨基酸和一种或多种细胞或细胞类型的细胞培养基。此外,所述试剂盒任选地可以包含至少一种额外的组分,所述组分选自至少一种生长因子、至少一种培养基补充物、至少一种动物组织提取物、至少一种动物器官提取物、至少一种动物腺体提取物、至少一种酶、至少一种蛋白质、至少一种维生素、至少一种细胞因子、至少一种脂质、至少一种微量元素、至少一种细胞外基质组分、至少一种缓冲剂、至少一种抗生素、和至少一种病毒抑制剂。

[0056] 另一方面的目的是使用本文描述的基质产生病毒的方法。特别地,所述方法可以包括(a)在适合于促进用病毒感染细胞的条件下将细胞(例如哺乳动物细胞)与病毒接触;和(b)在适合于促进病毒、病毒颗粒(VLP)或疫苗生产的条件下,在含有一种或多种不稳定化合物例如乙醇胺衍生物、螯合的乙醇胺、螯合的生长因子、螯合的细胞因子等的细胞培养基中培养细胞。在一个实施方案中,所述细胞可以是哺乳动物细胞,例如CHO细胞。

[0057] 在另一个方面中,本发明提供使用本文描述的基质产生多肽的方法。特别地,所述方法包含在适合于细胞表达多肽的条件下,在细胞培养基中培养已经被基因工程改造产生出多肽的细胞,所述细胞培养基含有一种或多种不稳定化合物例如乙醇胺衍生物、螯合的乙醇胺、螯合的生长因子、螯合的细胞因子等。在一个实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞,例如CHO细胞。

[0058] 微囊包封可以扩展敏感化合物如乙醇胺、维生素、生长因子等的储存条件,其可以积极地影响干基质制剂如AGT™等的运输和处理,在室温而不是在较低的温度(例如冷藏或干冰),其可以降低运输成本。由于干式细胞培养基更廉价的处理和储存,干式基质中不稳定化合物的微囊包封因此可以被视为是对于绿色科技的贡献。

附图说明

[0059] 图1A和1B显示在含有一系列乙醇胺衍生物(x轴),包括磷酸乙醇胺(PE)、三乙醇胺(TE)、二乙醇胺(DE)、单甲基乙醇胺(MME)、二甲基乙醇胺(DME)、和N-乙酰基乙醇胺(NAE)的,用于测试细胞培养效力的基质中生长的细胞(DG44-EPO)的活细胞密度(VCD)。NAE和PE是优选的衍生乙醇胺,其在基质中是稳定的。详见实施例2。

[0060] 图2A显示细胞生长滴定分析,其中约16-20X的乙醇胺摩尔当量的N-乙酰基乙醇胺(NAE)(一种衍生的乙醇胺)能够补充与乙醇胺可比的乙醇胺敏感线。图2B显示可以通过LC-质谱分析法,在任何给定样品(例如细胞培养基)中测定N-乙酰基乙醇胺(NAE)。该图表显示通过LC质谱分析法的分析级纯的NAE检测的浓度曲线。

[0061] 图3A显示使用用于微囊包封的CaCl₂制备藻酸盐微珠,在实验室规模,其使用以下两步过程连续形成:i)使用针头和注射法,和ii)喷雾法。对于放大量,可以使用以下装置:包封机、喷射式切割器、振动喷嘴、静电发生器或凝聚混合器。图3B显示在不同微囊包封设定参数下产生的藻酸盐珠子的特性。确定了最佳的CaCl₂和藻酸盐浓度。同质性检验提示AGT™干式中微囊的无分离(non-segregation)。1000X装载的微珠得到可接受的珠子特性。图3B还显示使用维生素B12作为不稳定物质的研究。标准的和减小的珠子显示最佳结果且被用于进一步的实验。

[0062] 图4A:确定最佳珠子尺寸的进一步精制。包封的乙醇胺(在2%的藻酸盐微珠中)的加速贮存期稳定性研究在第7天进行。显示用PLL涂布的或未涂布的胶囊的结果(降解%)。在延长贮存期稳定研究(7天)中,在4℃和30℃的温度下,具有藻酸盐珠子的乙醇胺的微囊包封与具有单独乙醇胺的对照相比显示显著地较少的乙醇胺的降解,并且当珠子被PLL涂布时显示更加少的降解(降解被减少至0)。与标准的和减小的微珠相比,用较小珠子的保护(喷雾干燥)是较不可取的。结果显示微囊包封可以保护乙醇胺。

[0063] 图4B:显示于室温,持续3周以上,长达两个月的微囊包封受保护的乙醇胺的稳定性研究被测试。图4C:完成进一步的试验以确认乙醇胺的微囊包封。加速贮存期研究显示观察直到7天的,在2%藻酸盐微珠中的乙醇胺的稳定性。对照乙醇胺与脯氨酸混合。这些结果提示不稳定化合物如乙醇胺的微囊包封能够改善贮存期并减少运输成本。目前国际上,某些干基质制剂如AGT™在干冰上运输,或在美国通过冷藏运输。改善的储存和处理条件能够减少包装浪费(绿色包装)并且减少运输成本(更轻-绿色科技)。

[0064] 图5显示DG44-EP0细胞生长得到微囊包封的乙醇胺的完全支持。空的微珠不抑制细胞生长。进一步地,微囊包封的乙醇胺不抑制细胞生长,如在表达EP0蛋白的重组CHO-DG44细胞上所看到的。

[0065] 图6:微囊包封树枝状聚合物组分递送系统。该图显示微囊包封树枝状聚合物是怎样工作的。藻酸盐保护树枝状聚合物,并且通过重建释放具有敏感物质的树枝状聚合物。在过滤过程中,藻酸盐被截留在膜过滤器上。在一个实施方案中,由于树枝状聚合物上细胞识别位点的存在,暴露的树枝状聚合物可以将不稳定物质例如乙醇胺或任何其它分子靶向于细胞,由此提高敏感的或低浓度的物质例如生长因子、维生素等对于生长细胞的利用度。

[0066] 图7A:树枝状聚合物(包含测试物质胰岛素)的微囊包封与未包封的树枝状聚合物(具有胰岛素)或单独的胰岛素相比,本质上增加室温稳定性。于4℃树枝状聚合物中的胰岛素的效力与胰岛素单独的效力是可比较的。

[0067] 图7B:胰岛素-树枝状聚合物-RGD共价键合物的微囊包封对于HeLa细胞生长的生长影响。研究显示所有三个条件(微囊包封的树枝状聚合物珠子(具有胰岛素)、未包封的树枝状聚合物(具有胰岛素)、和单独的胰岛素)均显示等价的效力和HeLa细胞的生长特性。注:微囊包封的树枝状聚合物珠子(具有胰岛素)不抑制细胞生长。

[0068] 图8:实时环境储存期间微珠保护的研究。在环境条件下,在AGT™基质中,未包封的

乙醇胺的活性迅速降低,但是当被微囊包封时能够保持效力持续更长的很多月。

[0069] 图9:微囊包封还提高维生素稳定性。

[0070] 图10:微囊包封提高胰岛素稳定性。因此,存在在干式基质中的生物分子保护的可能性。

[0071] 详细描述

[0072] 现在将详细引用各种示例性实施方案。应当理解以下详细的描述是为读者提供某些实施方案、特征、和本发明各方面的细节的充分理解,并且其不能被解读为是本发明范围的限制。

[0073] 1、定义

[0074] 为了可以更容易地理解本发明,首先限定某些术语。在详细描述的全文中陈述了其它定义。

[0075] 在本申请中使用的术语“高级造粒技术”或AGT指一种制备细胞培养基的方法,其涉及将浓缩的基质组分的水溶液喷雾于空气悬浮磨损粉末基质组分上,并迅速蒸发水,得到在形成的聚集的颗粒整体上同质分散的组分,即粒状粉末,其典型的特征是大的颗粒尺寸和较少的粉化。参见Fike等人,Cytotechnology,2006,36:33-39,其全部以引用的形式并入本文。术语“高级粉末基质”或APM指具有粒径不像DPM粉末那样细的有利性质的干粉末基质形式。其具有一些AGT的有利性质。

[0076] 在本申请中使用的术语“易受影响的化合物”或“敏感化合物”或“不稳定化合物”指使用本发明的方法将要受保护的物质、化学品或化合物,所述保护可以通过包封(螯合)或通过含胺部分的化学品形成N乙酰键进行。在细胞培养基中的这样的化合物的实例是:维生素、细胞因子、生长因子、肽、和激素。

[0077] 在本申请中使用的术语“乙醇胺衍生物”指乙醇胺化合物其中通过共价键,如酰胺键稳定乙醇胺的氨基。

[0078] 在本申请中使用的术语“螯合剂”指保护、隔离、包封或螯合敏感化学品或化合物免受增加降解的条件的影响,或免受其它化学品如氨基酸;微量元素如锰、铜等;无机缓冲剂如碳酸氢钠和其它磷酸钠类;以及有机缓冲剂如MOPS、HEPES、PIPES等的影响,所述其它化学品缓慢地与敏感化合物发生反应,由此使得敏感化合物随时间丧失它们合意的性质。术语“保护”或“隔离”或“螯合”或“包封”在本发明中已经是可以被替换使用的,并且表达了保护敏感化学品或化合物免受降解条件或化学品影响的概念。“可溶性螯合剂”本身可以是在用水性介质重建后是可溶的,于是释放“敏感”被包封的材料。或者,“不可溶性螯合剂”在用水性介质重建后可以是不可溶的,于是在释放“敏感”被包封的材料后,可以通过各种手段如过滤、倾析等从重建的终产物中除去。不可溶性螯合剂的实例包括,但不限于,藻酸盐、聚L-乳酸(PLL)、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维衍生物、角叉菜胶等。对于微囊包封可以使用其它骨架 基质,包括聚乙醇酸、PLGA(乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羧基脂肪酸酯(PHA)、聚ε-己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0079] 可溶性螯合剂的实例包括,但不限于,己糖如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖,二糖

如蔗糖,其它可溶性寡糖和可溶性多糖。

[0080] 在一个实施方案中,所述组合物是含有一种或多种氨基酸和乙醇胺的细胞培养基。所述细胞培养基优选粉末状的细胞培养基。在一个实施方案中,所述粉末状的细胞培养基是高级造粒技术(AGT)细胞培养基。基质还指可以应用的浓缩的饲料补充物、浓缩的基质、和在一些情况下是液体基质。

[0081] 本申请中使用的术语“细胞培养”或“培养”指在人工(例如体外)环境中细胞的维持。然而,应理解术语“细胞培养”是上位术语,其可以被用于涵盖不仅是个体原核(例如细菌)细胞或真核(例如动物、植物或真菌)细胞的培养,而且涵盖组织、器官、有机体系或整个有机体的培养,其中术语“组织培养”、“器官培养”、“有机体系培养”或“器官型培养”偶尔可以与术语“细胞培养”替换使用。

[0082] 本申请中使用的术语“培养”指在有利于细胞的生长、分化、或持续存活条件下,以活跃的或静止的状态下,在人工环境中细胞的维持。因此,“培养”可与“细胞培养”或任何上述同义词替换使用。

[0083] 本申请中使用的术语“细胞培养基”、“培养基”、或“基质”(和每种情况中的复数基质)指支持细胞培养和/或生长的营养组合物。细胞培养基可以是完整制剂,即对于培养细胞不需要补充的细胞培养基,可以是不完整制剂,即需要补充的细胞培养基,或者可以是补充不完整制剂的基质,或者在完整制剂的情况中可以是改善培养或培养结果的基质。除非文中另有说明,术语“细胞培养基”、“培养基”、或“基质”(和每种情况中的复数基质)指还未与细胞一起培养的非条件细胞培养基。因此,术语“细胞培养基”、“培养基”、或“基质”(和每种情况中的复数基质)区别于“消耗的”或“条件的”基质,其可以含有许多基质的原始组分以及各种细胞代谢物和分泌的蛋白质。

[0084] 本申请中使用的术语“提取物”指包含一种物质的组分或一种物质的亚组的浓缩制剂的组合物,其典型地通过机械地(例如通过加压处理)或化学地(例如通过蒸馏、沉淀、酶作用或高盐处理)处理该物质而得到。

[0085] 本申请中使用的术语“增加的乙醇胺稳定性”指与含有非衍生化或非螯合形式的乙醇胺的对照组合物相比较少的乙醇胺的降解。例如,如本文中使用的粉末状的细胞培养基,术语“增加的乙醇胺稳定性”指与除了在对照基质中乙醇胺以非衍生化的或非螯合形式的存在(称为“对照基质”)以外,具有相同组分的对照相比较少的乙醇胺的降解。所述对照基质还可以含有一种或多种其它组分,例如被用作分散剂的脯氨酸。为了测定细胞培养基是否增加了稳定性,如本申请中所使用的,在将粉末状的细胞培养基在不同的温度下(例如,4℃和室温)储存7天,注射用水(WFI)重建粉末状的细胞培养基,并且测定在重建细胞培养基中乙醇胺的浓度(mg/L)之后测定乙醇胺的降解。在不同温度下储存的培养基中的乙醇胺浓度的较小的%差别提示较少的乙醇胺的降解,因此为增加的稳定性。例如,如果含有一种或多种氨基酸和乙醇胺衍生物或稳定的乙醇胺的粉末状的细胞培养基展现出乙醇胺的浓度从4℃的100mg/L降低至室温的95mg/L(5%差别),并且对照基质展现出乙醇胺从4℃的50mg/L降低至室温的25mg/L(50%差别),那么含有一种或多种氨基酸和稳定的乙醇胺的粉末状的细胞培养基具有增加的乙醇胺稳定性,因为其相比对照基质展现出较少的乙醇胺的降解(较小的%差别)。你可以在两个温度下测定NAE以观察是否有任何差别。相比于乙醇胺,使用不同的分析标准检测NAE。参见图2A和2B以及实施例。

[0086] 在本申请中使用的“成分”指任何化合物,无论是化学的还是生物学来源的,其可以被用于细胞培养基以维持或促进细胞增殖的增长。术语“组分”、“营养物”和“成分”可以被替换使用,并且均意指这样的化合物。在细胞培养基中可以使用的典型成分包括氨基酸、盐、金属、糖、碳水化合物、脂质、核酸、激素、维生素、脂肪酸、蛋白质等。其它促进或维持间接体内(ex vivo)细胞培养的成分可以由本领域技术人员根据具体需要选择。

[0087] 本申请中使用的术语“粉末”或“粉末状的”指以颗粒形式存在的组合物,其可以与或不与溶剂如水或血清复合或聚集。术语“干粉末”可以与术语“粉末”替换使用,然而,本文中使用的“干粉末”简单地指肉眼可见的粒状材料,并且不指完全不含复合的或聚集的溶剂的材料(除非另有说明)。

[0088] 本申请中使用的术语“螯合剂”指保护乙醇胺或者赋予增加的乙醇胺稳定性的试剂。此外,包封也提供控释。

[0089] 本申请中使用的术语“稳定的乙醇胺”指已经与螯合剂复合的乙醇胺。

[0090] “1X制剂”指任何包含一些或全部在细胞培养基中发现的工作浓度的成分的水溶液。“1X制剂”可以指例如细胞培养基或指对于该基质成分的任何亚组。在1X溶液中的成分的浓度大约与在用于体外维持或培养细胞的细胞培养制剂中发现的成分的浓度相同。用于体外培养细胞的细胞培养基定义为1X制剂。当许多成分存在时,1X制剂中的每个成分的浓度大约等同于细胞培养基中的那些成分的浓度。例如,RPMI-1640培养基含有,在其它成分中,0.2g/L的L-精氨酸、0.05g/L的L-天冬酰胺、和0.02g/L的L-天冬氨酸。这些氨基酸的“1X制剂”含有大约这些成分在溶液中的相同浓度。因此,当提及“1X制剂”,其指溶液中的每一种成分具有与描述的细胞培养基中发现的成分相同的或大约相同的浓度。在细胞培养基的1X制剂中的各成分的浓度对于本领域普通技术人员是已知的。参见Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies,42-50 (Sadettin Ozturk 和 Wei-Shou Hu eds.,Taylor and Francis Group2006),其全部以引用的形式并入本文。然而,在1X制剂中,相比于培养基,重量克分子渗透浓度(osmolality)和/或pH可以不同,特别是当1X制剂中含有更少的成分时。

[0091] “10X制剂”是指一种溶液,其中该溶液中的每一种成分大约是在细胞培养基中相同成分的10倍浓度。例如,RPMI-1640培养基的10X制剂可以含有,在其它成分中,2.0g/L的L-精氨酸、0.5g/L的L-天冬酰胺、和0.2g/L的L-天冬氨酸(与如上的1X制剂相比)。“10X制剂”可以含有一些其它成分,其浓度是1X培养基中发现的成分的大约10倍。很明显,“5X制剂”、“25X制剂”、“50X制剂”、“100X制剂”、“500X制剂”、和“1000X制剂”指溶液,其分别含有与1X细胞培养基相比大约5-、25-、50-、100-、500-倍浓度的成分。仍然,基质制剂的重量克分子渗透浓度和pH以及浓缩的溶液可以不同。根据特别的细胞培养方案,一种制剂可以含有1X浓度的组分或成分,但是根据不同培养方案或不同基质,一种制剂可以含有例如2、2.5、5、6、7、9、12等X浓度的组分或成分。

[0092] 本发明涉及干和液体形式乙醇胺的稳定化。一个方面涉及增加细胞培养基中,并且特别是干式(或粉末状的)细胞培养基中乙醇胺的稳定性的方法。乙醇胺在干式中相比液体形式更不稳定。在干式中,将乙醇胺与碳水化合物(例如葡萄糖)单独(无氨基酸)组合得到少的或无乙醇胺降解。然而,在氨基酸的存在下,显著的乙醇胺降解迅速发生,尤其是在升高的温度中(例如30℃)。

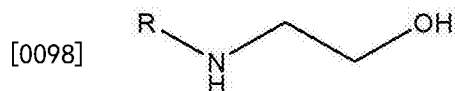
[0093] 本申请人已经发现降低乙醇胺降解的方法。尽管,这些方法首先在细胞培养基的范围内被例证,但是可以理解其可以被应用于任何需要增加任何干或半干式的乙醇胺的稳定性的范围内。如乙醇胺被用于其它领域,例如洗涤剂、药物、和化妆品,以及用于处理水(以控制腐蚀)和从气体除去酸的方法中,本领域技术人员能够同样地将本申请中描述的方法适用于稳定在这些其它应用中的乙醇胺。

[0094] 一个方面的目的是通过使用在乙醇胺的氨基处具有共价键的乙醇胺衍生物增加乙醇胺稳定性的方法。

[0095] 另一种增加乙醇胺稳定性的方法涉及在乙醇胺和螯合剂之间形成复合物。在一个实施方案中,所述螯合剂是含酮或含醛的分子,例如糖(例如葡萄糖),或其衍生物,或者酮酸。在另一个实施方案中,将乙醇胺嵌入或包封于螯合剂中。

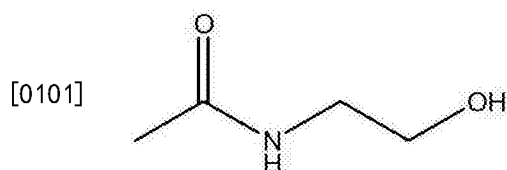
[0096] 1、氨基的共价键

[0097] 如上所述,一种增加乙醇胺稳定性的方式是使用乙醇胺衍生物,其中通过共价键,例如酰胺(或肽)键稳定乙醇胺的氨基。酰胺键是当一个分子的羧基与另一个分子的氨基反应时,在两个分子之间形成的共价键,因此释放一份子水。在一个实施方案中,所述乙醇胺衍生物具有以下结构式:



[0099] 其中R是乙酰基或氨基酸。

[0100] 当R是乙酰基时,所述乙醇胺衍生物是N-乙酰基乙醇胺(NAE)并具有以下结构:



[0102] 与本文列举的乙醇胺相似,含有胺并且有时可能在某些情况下敏感的其它物质可以包括烷醇胺或聚胺例如精胺、亚精胺、腐胺、尸胺、大麻素、多聚赖氨酸、三聚赖氨酸、联丙烯基二甲基氯化铵聚丙烯胺、聚乙烯胺、聚乙胺、聚丁胺、聚异丁胺、聚丙胺、己二胺、乙二胺、N-乙基乙二胺、N,N'-二乙基乙二胺、N-乙基乙醇胺、三乙二胺、N-甲基吗啉、五甲基二亚乙基三胺、二甲基环己胺、四甲基乙二胺、1-甲基-4-二甲氨基乙基哌嗪、3-甲氧基-N-二甲基-丙胺、N-乙基吗啉、二乙基乙醇胺、N-椰纤维烷基吗啉、N,N'-二甲基-N,N'-二甲基异丙基-丙二胺、N,N'-二乙基-3-二乙基氨基丙胺、二甲基-苄胺等,而且本文描述的用于稳定化的乙酰化方法也可以被应用于这些化合物。

[0103] 此外,R还可以是任何氨基酸,包括但不限于丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在一个实施方案中,所述氨基酸具有非极性侧链。在另一个实施方案中,所述氨基酸是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。

[0104] 在另一个实施方案中,所述乙醇胺衍生物是1,3,5-三(2-羟乙基)-均三嗪(Grotan)。Grotan可以通过将乙醇胺与甲醛反应形成。

[0105] 因此,本发明的一个方面涉及一种增加组合物中乙醇胺稳定性的方法,所述方法

包含:

[0106] 将如上所述的乙醇胺与例如乙酰基化合物组合,其中N-乙酰基乙醇胺展现了增加的稳定性。另一方面涉及包含如上所述的乙醇胺衍生物的组合物,其中所述组合物展现了增加的乙醇胺稳定性。在一个实施方案中,所述组合物是含有一种或多种氨基酸的细胞培养基。

[0107] 2、与含酮或醛的分子的相互作用

[0108] 还可能通过与包封剂或螯合剂的相互作用稳定乙醇胺,其中所述螯合剂是糖,含酮或醛的分子,特别是在代谢途径中涉及的物质,例如糖或酮酸。这种类型的螯合可以形成一种保护或包封类型,其中微囊在用溶剂重建后溶解或基本溶解,并且为了最终基质的利用考虑到胶囊中糖、酮或醛的浓度。并非旨在受限于任何理论,似乎是当与乙醇胺组合时含酮或醛的分子或糖分子在乙醇胺周围形成晶体结构,并且该晶体结构有助于保护乙醇胺避免被降解,特别是当乙醇胺是干式时。

[0109] 在一个实施方案中,所述螯合剂是糖。在一个实施方案中,所述糖是己糖,例如阿洛糖、阿卓糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、甘露糖、山梨糖、塔罗糖、或塔格糖,或其衍生物,例如糖醇、氨基糖、糖醛酸、或磷酸化糖。在另一个实施方案中,所述糖是戊糖,例如阿拉伯糖、核糖、核酮糖、木糖、木酮糖、或来苏糖,或其衍生物,例如糖醇、氨基糖、糖醛酸、或磷酸化糖。在另一个实施方案中,所述糖是四糖,例如赤藓酮糖、赤藓糖、或苏阿糖,或其衍生物例如糖醇、氨基糖、糖醛酸、或磷酸化糖。在另一个实施方案中,所述糖是三糖,例如甘油醛或二羟丙酮,或其衍生物,例如糖醇、氨基糖、糖醛酸、或磷酸化糖。

[0110] 可以用于稳定乙醇胺的糖醇包括,但不限于,阿洛糖醇、阿卓糖醇、果糖醇、半乳糖醇、葡萄糖醇、古洛糖醇、艾杜糖醇、甘露醇、山梨醇、塔罗糖醇、塔格糖醇、阿拉伯糖醇、核糖醇、核酮糖醇、木糖醇、木酮糖醇、来苏糖醇、赤藓酮糖醇、赤藓糖醇、和苏阿糖醇。可以用于稳定乙醇胺的氨基糖包括,但不限于,阿洛糖胺、阿卓糖胺、果糖胺、半乳糖胺、葡萄糖胺、古洛糖胺、艾杜糖胺、甘露糖胺、山梨糖胺、塔罗糖胺、塔格糖胺、阿拉伯糖胺、核糖胺、核酮糖胺、木糖胺、木酮糖胺、来苏糖胺、赤藓酮糖胺、赤藓糖胺、和苏阿糖胺。可以用于稳定乙醇胺的糖醛酸包括,但不限于,阿洛糖醛酸、阿卓糖醛酸、果糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、古洛糖醛酸、艾杜糖醛酸、甘露糖醛酸、山梨糖醛酸、塔罗糖醛酸、塔格糖醛酸、阿拉伯糖醛酸、核糖醛酸、核酮糖醛酸、木糖醛酸、木酮糖醛酸、来苏糖醛酸、赤藓酮糖醛酸、赤藓糖醛酸、和苏阿糖醛酸。可以用于稳定乙醇胺的磷酸化糖包括,但不限于,3-磷酸甘油醛和磷酸二氢丙酮。

[0111] 在另一个实施方案中,所述糖是二糖,例如麦芽糖、乳糖、乳酮糖、海藻糖、纤维二糖或蔗糖。在另一个实施方案中,所述螯合剂是酮酸或糖,包括但不限于1) 糖例如己糖如葡萄糖、甘露糖等,2) β 酮酸,例如乙酰乙酸,或者3) γ -酮酸,例如乙酰丙酸,或者4) α -酮酸,例如丙酮酸、草酰乙酸、乙醇酸、或酮戊二酸,或者5) 类糖衍生物如麦芽糖糊精,其它寡糖或多糖,胶体,阿拉伯半乳聚糖等。

[0112] 乙醇胺和含酮或醛的分子之间的复合物可以通过将乙醇胺溶解于水中,然后将其加入到指定重量的含酮或醛的分子中形成。用工具,例如刮刀捏合乙醇胺/酮或醛/糖/糖衍生物/水混合物,直至形成糊状均一体。将该浆糊展平并在覆盖下干燥过夜,任选地然后吸湿器中最终干燥。任选地,在将其与其它组合物例如粉末状的细胞培养基混合前,以合意的

尺寸规格将干燥的混合物菲兹微粉碎(fitzmilled)。当糖如葡萄糖是包封基质的一部分时,调节葡萄糖浓度以使得仅使用一部分葡萄糖制备基质,并且理想地维持将基质重建后的葡萄糖的最终浓度。

[0113] 在一个方面,本发明涉及一种增加组合物中乙醇胺稳定性的方法,所述方法包含:

[0114] 将与螯合剂复合的乙醇胺(“螯合的乙醇胺”)与组合物组合,如本文所述,其中所述含有螯合的乙醇胺的组合物展现了增加的乙醇胺稳定性,并且其中所述螯合剂包含含酮或醛的分子。所述方法在组合步骤前任选进一步包括将乙醇胺与含酮或醛的分子复合以产生螯合的乙醇胺的步骤。在一个实施方案中,含酮或醛的分子是糖,或其衍生物,或酮酸。在一个实施方案中,所述组合物是含有一种或多种氨基酸的细胞培养基。所述细胞培养基优选为粉末状的细胞培养基。在一个实施方案中,所述粉末状的细胞培养基是高级造粒技术细胞培养基。含酮或醛的分子增加乙醇胺稳定性的能力可以使用本领域已知的技术评估,包括本申请中公开的方法。

[0115] 另一方面涉及如本文所述的,包含含酮或醛的分子的组合物,其中所述组合物展现了增加的乙醇胺稳定性。在一个实施方案中,所述含酮或醛的分子是糖,或其衍生物,或酮酸。在一个实施方案中,所述组合物是含有一种或多种氨基酸的细胞培养基。在一个实施方案中,所述细胞培养基进一步含有碳水化合物。在另一个实施方案中,所述细胞培养基不含有蛋白质。所述细胞培养基优选为粉末状的细胞培养基。在一个实施方案中,所述粉末状的细胞培养基是高级造粒技术细胞培养基。

[0116] 1、包封

[0117] 另一个稳定乙醇胺或其它不稳定基质化合物的方法是将它们包封或嵌入于螯合剂中。并非旨在受限于任何理论,似乎是将敏感组分如乙醇胺包封或嵌入另一种分子中减少乙醇胺直接与其它组分的接触,或者减少了促进乙醇胺降解的条件,或降低其稳定性。自动的或可控制的体系对于包封过程也是有用的,例如,使用包封机的共挤压、静电珠发生器、振动喷嘴技术、喷射式切割器技术等。可以影响珠子的功能性特性的参数可以包括微囊浓度、CaCl₂%、藻酸盐%、释放率、溶解度、干燥方案、微珠尺寸、同质性、乙醇胺保护、涂布的过程(PLL等)等等。

[0118] 本申请人已经发现通过微囊包封方法减少乙醇胺的降解的方法。尽管,这些方法首先在乙醇胺稳定化的范围内被例证,但是其可以被应用于稳定任何需要稳定的敏感化学品或化合物。特别地,在此情况下和实施例中指对于细胞培养基中的稳定性的范围。然而,可以理解微囊包封方法可以被用于稳定任何敏感化合物,包括但不限于,维生素、不稳定的氨基酸、细胞因子、生长因子、敏感的和有价值的蛋白质或肽等,并且可以被用于增加被稳定的化合物的递送,并且可以被应用于除了细胞培养基发展的领域。例如,可以在工业应用、药物(药物递送)、营养品、食品补充物、富含维生素的制剂、化妆品工业、酶工业、食品工业中的缓冲剂、洗涤剂等中应用树枝状聚合物的包封。如这些方法和组合物可以被用于其它领域一样,本领域技术人员能够同样地将本申请中描述的方法适用于稳定其它应用中的其它敏感的或易降解的化合物。

[0119] 在一个实施方案中,使用螯合剂如藻酸盐包封或嵌入乙醇胺-树枝状聚合物复合物。树枝状聚合物是高度分支的合成的大分子,其可以使用控制的顺序方法制得以赋予它们指定的结构和分子量特征。参考Astruc等人,Chem. Rev. 2010, 110:1857-1959,其全部以

引用的形式并入本文。树枝状聚合物具有中心核、重复的分支、和表面功能基团。重复的分支以一系列被称为代(generation)的中心层形式而组织起来。树枝状聚合物的表面功能基团数目、分子量和尺寸作为聚合物的代(层数)的函数而指数增加,并且在合成期间可以被控制。可以基于启动聚合过程的核结构合成不同类型的树枝状聚合物。本发明的微囊包封树枝状聚合物被描述于图6中。在一个实施方案中,所述树枝状聚合物被包封于胶囊,例如藻酸盐中。藻酸盐保护树枝状聚合物,并且重建后释放具有敏感物质的树枝状聚合物。在过滤过程中藻酸盐被截留在膜过滤器上。由于树枝状聚合物上存在的细胞识别位点,暴露的树枝状聚合物能够使敏感物质靶向于细胞,由此提高敏感的或低浓度的物质例如生长因子、维生素等对于细胞的利用度。如本领域技术人员所知的,可以使用除了藻酸盐以外的任何包封剂以保护树枝状聚合物,例如藻酸盐、聚L-乳酸(PLL)、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物、角叉菜胶等。可以用于微囊包封的其它骨架基质,包括聚乙醇酸、PLGA(乳酸-乙醇酸共聚物)、胶原、聚羟基脂肪酸酯(PHA)、聚 ϵ -己内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚磷腈、聚氨基酸、聚二甲基硅氧烷、聚氨基甲酸酯、聚四氟乙烯、聚乙烯、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯、聚2-羟乙基甲基丙烯酸酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮等。

[0120] 所述树枝状聚合物的核结构支配分子的数个特征,例如整体形状、密度和表面官能化(Tomalia等人,Chem.Int.Ed.Engl.,1990,29:5305。球形树枝状聚合物通常具有胺作为三价的起始核或者乙二胺(EDA)作为四价的起始核。最近描述的杆状的树枝状聚合物(Yin等人,J.Am.Chem.Soc.,1998,120:2678)使用各种长度的聚乙烯亚胺直链核;核越长,杆就越长。树枝状大分子是以千克数量级商业可得的,并且可以在目前的药品生产质量管理规范(GMP)下被制备用于某些生物技术的应用。

[0121] 通常通过会聚途径或发散途径合成树枝状聚合物。在发散途径中,装配起始于中心核并通过一系列反应向外延伸。每一个额外系列的反应导致更高代的树枝状聚合物。在会聚途径中,装配起始于外周并用分支向内构建最终连接于核上。还可以通过点击化学(见例如美国专利申请公开No.20050222427和PCT/US03/17311,二者的全部以引用的形式并入本文),使用狄尔斯-阿尔德反应、硫醇烯反应、和叠氮化物-炔烃反应合成树枝状聚合物。见Franc等人,Chem.Eur.J.,2009,15(23):5631-39;Killops等人,J.Am.Chem.Soc.,2008,130(15):5062-64;Franc等人,Chem.Comm.,2008,5267-76;和Carlmark等人,Chem.Soc.Rev.,2009,38:352-62,所有这些的全部以引用的形式并入本文。

[0122] 树枝状聚合物已经被用于许多领域,包括超分子化学、电化学、光化学、纳米颗粒合成污染管理、染料着色、单分子膜的制备、环氧树脂的矫正、催化、药物递送、和基因转染。Cheng等人,J.Pharm.Sciences,2008,97:123-43。树枝状聚合物典型地具有空的内部孔穴,或开放构造(对于低代的树枝状聚合物),其可以被用于包封化合物,例如治疗分子。表面功能基团的存在还有助于增加被包封的化合物的溶解性。

[0123] 许多美国专利描述了制备树枝状聚合物的方法和组合物。下面提供一些示例性专利作为在本申请中描述的方法和组合物中可能有用的树枝状聚合物组合物的实例。这些专利仅是阐明实例,并且许多其它相似的树枝状聚合物组合物可以被用于本申请中描述的方法和组合物。

[0124] 美国专利No.4,507,466、美国专利No.4,558,120、美国专利No.4,568,737、和美国专利No.4,587,329(其全部以引用的形式并入本文)描述了制备稠密的星状聚合物的方法,所述星状聚合物具有细胞常规星状聚合物更高的最终密度。这些聚合物具有相比常规星状聚合物更高的/更多的均匀反应性,即第三代稠密星状聚合物。这些专利进一步描述了酰胺-胺(amidoamine)树枝状聚合物的性质和树枝状聚合物的3维分子直径。

[0125] 美国专利No.4,631,337(其全部以引用的形式并入本文)描述了水解稳定聚合物。美国专利No.4,694,064(其全部以引用的形式并入本文)描述了杆状树枝状聚合物。美国专利No.4,713,975(其全部以引用的形式并入本文)描述了稠密星状聚合物及其用于特征化病毒、细菌和蛋白质(包括酶)的表面。美国专利No.4,737,550(其全部以引用的形式并入本文)描述了桥连稠密星状聚合物。美国专利No.4,857,599和美国专利No.4,871,779(其全部以引用的形式并入本文)描述了用作离子交换树脂、螯合树脂的固定于核上的稠密星状聚合物及制备该聚合物的方法。

[0126] 美国专利No.5,338,532(其全部以引用的形式并入本文)旨在与至少一个携带的农业的、药学的或其它材料的单元相联系的树枝状聚合物的放射形轭合物。该专利描述了树枝状聚合物提供高浓度的每单元聚合物的携带材料的递送手段的用途,控释递送、靶向递送和/或多个物种例如药物抗生素、一般毒素和特异毒素、金属离子、放射性核素、信号发生器、抗体、白介素、激素、干扰素、病毒、病毒片段、杀虫剂、和抗菌剂。

[0127] 其它有用的树枝状聚合物类型的组合物描述于美国专利No.5,387,617、美国专利No.5,393,797、和美国专利No.5,393,795(其全部以引用的形式并入本文),其中通过用能够提供疏水性外壳的疏水性基团的覆盖修饰稠密星状聚合物。美国专利No.5,527,524(其全部以引用的形式并入本文)公开了在抗体轭合物中使用端氨基的树枝状聚合物。

[0128] 将树枝状聚合物用作金属离子载体描述于美国专利No.5,560,929(其全部以引用的形式并入本文)。美国专利No.5,773,527(其全部以引用的形式并入本文)公开了具有梳状爆炸性(comb-burst)结构的非交联多分支聚合物以及制备其的方法。美国专利No.5,631,329(其全部以引用的形式并入本文)描述了通过形成受保护以避免分支的第一组分支的聚合物;接枝于核上;脱保护第一组分支聚合物,然后形成受保护以避免分支的第二组分支的聚合物,和接枝于具有第一组分支聚合物的核上等制备高分子量的多分支聚合物的方法。

[0129] 美国专利No.5,902,863(其全部以引用的形式并入本文)描述了包含亲脂性有机硅和亲水性polyaniloamine(无对应中译文)纳米尺寸结构域的树枝状聚合物网络。从具有PAMAM的共聚树枝状聚合物前体(亲水的)或聚丙烯亚胺内部和有机硅外层制备所述网络。

[0130] 美国专利No.5,795,582(其全部以引用的形式并入本文)描述了使用树枝状聚合物作为流感抗原的助剂。美国专利No.5,898,005和美国专利No.5,861,319(其全部以引用的形式并入本文)描述了用于确定分析物浓度的特异性免疫结合试验。美国专利No.5,661,025(其全部以引用的形式并入本文)提供含有树枝状聚合物聚阳离子的自组装多核苷酸递送系统的细节以帮助递送核苷酸至靶位点。

[0131] 美国专利No.6,471,968(其全部以引用的形式并入本文)描述了两种或多种树枝状聚合物的组合(每一个具有特异性功能),一种树枝状聚合物单一复合物,例如含有聚酰

胺-胺(PAMAM)树枝状聚合物和聚丙胺(POPAM)树枝状聚合物的树枝状聚合物复合物。

[0132] 在一个实施方案中,本申请中描述的方法中使用的树枝状聚合物是聚酰胺-胺。聚酰胺-胺或PAMAM是生物学领域最常用的树枝状聚合物之一,并且可以通过多种来源商购得到,包括Dendritech Nanotechnologies Inc.,其销售Starburst™ PAMAM树枝状聚合物。本申请中描述的方法中使用的其它树枝状聚合物包括,但不限于,聚丙烯亚胺(PPI)树枝状聚合物、磷酸化的树枝状聚合物、聚赖氨酸树枝状聚合物、聚丙胺(POPAM)树枝状聚合物、聚乙烯亚胺树枝状聚合物、蝶烯树枝状聚合物、脂肪聚(醚)树枝状聚合物、或芳香聚醚树枝状聚合物。可以使用本领域公知的技术(包括本申请中描述的方法)评估树枝状聚合物增加乙醇胺稳定性的能力。

[0133] 在另一个实施方案中,所述用于包封或嵌入乙醇胺的螯合剂是微囊,例如藻酸盐。微囊已经被用于许多目的,包括药物递送和固定在细胞培养中生长的细胞以增强细胞生长和生存力。参见例如,Serp等人,Biotechnology and Bioengineering,2000,70(1):41-53;Breguet等人,Cytotechnology,2007,53:81-93;Chayosumrit等人,Biomaterials,2010,31:505-14;美国专利No.7,482,152;和美国专利No.7,740,861,其全部以引用的形式并入本文。

[0134] 在一个实施方案中,所述微囊由选自以下的材料构成:藻酸盐、聚L-乳酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物和角叉菜胶。微囊典型地为具有2mm或更小直径的球形颗粒,通常在0.05-1.5mm的直径范围内。可以使用本领域公知的技术(包括本申请中描述的方法)评估微囊增加乙醇胺稳定性的能力。

[0135] 在形成微囊包封的乙醇胺后,可以应用各种溶液来对微囊提供另外的层。例如,所述微囊包封乙醇胺可以用多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸涂布,任选地然后是用选自以下材料的外部涂布:藻酸盐、聚L-乳酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物和角叉菜胶。

[0136] 在一个实施方案中,所述微囊包含藻酸盐。典型地,通过对聚阴离子藻酸盐和二价或三价的多价阳离子(例如氯化钙)之间的交联形成藻酸盐微囊。可以使用其它具有二价或三价阳离子的盐,例如氯化镁、氯化钡、和硫酸铝。在一个实施方案中,所述藻酸盐微囊进一步包含涂层,例如多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸。

[0137] 在一个方面,本发明涉及一种增加组合物中乙醇胺稳定性的方法,该方法包含:

[0138] 将与螯合剂复合的乙醇胺(“螯合的乙醇胺”)与组合物组合,如本文所述,其中所述含有螯合的乙醇胺的组合物展现了增加的乙醇胺稳定性,并且其中所述螯合剂包含树枝状聚合物或微囊。所述方法在组合步骤前任选进一步包括将乙醇胺与树枝状聚合物或微囊复合以产生螯合的乙醇胺的步骤。

[0139] 在一个实施方案中,所述微囊由选自以下的材料构成:藻酸盐、聚L-乳酸、壳聚糖、琼脂糖、明胶、透明质酸、硫酸软骨素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、肝素、硫酸肝素、硫酸乙酰肝素、吉兰糖胶、黄原胶、瓜尔胶、水溶性纤维素衍生物和角叉菜胶。所述微囊任选地用例如多聚-L-赖氨酸或多聚鸟氨酸涂布。在另一个实施方案中,所述树枝状聚合物是聚酰胺-胺树枝状聚合物、聚丙烯亚胺树枝状聚合物、或聚丙胺(POPAM)树枝状聚合物。在一个实施方案中,所

述组合物是包含一种或多种氨基酸的细胞培养基。所述细胞培养基优选为粉末状的细胞培养基。在一个实施方案中,所述粉末状的细胞培养基是高级造粒技术细胞培养基。可以使用本领域公知的技术(包括本申请中描述的方法)评估树枝状聚合物或微囊稳定乙醇胺的能力。

[0140] 本发明涉及一种包含含有敏感组分的微囊的组合物,或含有树枝状聚合物-不稳定组分复合物的微囊,以保护任何不稳定物质,例如乙醇胺。这些微囊或微囊/树枝状聚合物组合物可以被干燥并与任何干式组合物混合以增加贮存期、增加储存、在环境温度下保存不稳定物质等。在优选的实施方案中,所述微囊和/或树枝状聚合物组合物展现了增加的乙醇胺稳定性,并且被干燥并与任何干式基质组合物例如AGT、DPM、APM等混合以增加贮存期、增加储存处理、并且在环境温度下保存干粉基质中的乙醇胺等。在一个实施方案中,所述干基质组合物还包含更高浓度的一种或多种氨基酸,例如在基质饲料或基质补充物中。在一个实施方案中,所述进一步包含树枝状组合物的细胞培养基可以特别地有效地递送某种不稳定物质或细胞靶向物质至细胞。在一个优选的实施方案中,所述不稳定物质或靶向物质影响其靶向的细胞。在一个实施方案中,该作用可以是细胞生长、增加的蛋白质生产、增加的渗透耐受、或任何其它要求细胞靶向物或不稳定物质的合意的特征。

[0141] 稳定的乙醇胺(不稳定物质)的检测:可以通过LS-质谱分析法(LS-MS)(图2B),通过筛选或任何其它手段分离干胶囊或珠子,然后将珠子溶解于溶剂中,完成对于NAE的检测。如果珠子是不可溶的,则其可以被过滤掉,反之,如果珠子是可溶的,则在膜过滤器上没有任何物质,但是在两种情况下均可以通过LS-MS在上清液中检测不稳定物质例如乙醇胺。

[0142] 细胞培养基

[0143] 细胞培养基由许多成分构成,并且这些成分在各个培养基中不同。细胞培养基可以是完整制剂,即对于培养细胞不需要补充的细胞培养基,可以是不完整制剂,即需要补充的细胞培养基,或者可以是用于补充不完整制剂的补充物,或者在完整制剂的情况中可以是改善培养或培养结果的补充物。

[0144] 一般地,在重建后,细胞培养基具有在溶剂中溶解的溶质。所述溶质提供平衡跨细胞膜(或细胞壁)的渗透压的渗透力。此外,所述溶质为细胞提供营养物。一些营养物对于细胞运作为是化学燃料;一些营养物可以是细胞用于合成代谢的原料;一些营养物可以是一种机器,例如促进细胞代谢的酶或载体;一些营养物可以是结合和缓冲细胞应用成分的结合剂或是结合或螯合有毒细胞产品的结合剂。

[0145] 取决于细胞和细胞预期用途,细胞培养基的成分最佳为以与最佳细胞培养性能平衡的浓度存在。将根据一种或多种合意的特征,例如细胞数目、细胞质量、细胞密度、O₂消耗、培养成分例如葡萄糖或核苷酸的消耗、生物分子的生产、生物分子的分泌、废物或副产物例如代谢物的形成、对于指示剂或信号分子的活性等,测定性能。每一个成分或一些成分因此优选地被优化成用于预期目标的工作浓度。

[0146] 典型地,使用基础培养基维持细胞培养,基础培养基可以含有许多成分,包括氨基酸、维生素、有机和无机盐、糖和其它组分,每一个成分以支持细胞体外培养的量存在。

[0147] 本文描述的包含稳定的乙醇胺的基质可以是1X制剂,或者可以被浓缩为例如5X、10X、20X、50X、500X、或1000X基质制剂。如果将个体基质成分制备成单独浓缩的溶液,则将适当(充足)量的每一种浓缩物与稀释剂组合以产生1X基质制剂。典型地,使用的稀释剂是

水,但可以使用其它溶液包括水性缓冲剂、盐水溶液、或其它水性溶液。基质可以是基础基质,其中需要添加另外的组分,或可以是完整基质,其不需要额外添加剂并且一旦重建能够使细胞生长。

[0148] 本文描述的包含稳定的乙醇胺的基质还可以被制成不同的形式,例如干粉基质(DPM)或制成高级造粒制剂(AGT),所述DPM或AGT可以与溶剂例如水、维生素溶液、盐溶液、脂质溶液、或任何含有一种或多种基质组分的溶剂、或甚至是血清和/或生长因子,在流化床设备上复合或聚集,正如美国专利No.6,383,810所描述的(其全部以引用的形式并入本文);或者可以使用高级造粒技术-AGTTM(Invitrogen, Carlsbad, CA)制备包含稳定的乙醇胺的基质。参见Fike等人, Cytotechnology, 2006, 36:33-39(其全部以引用的形式并入本文)。其还可以被制成高级粉末基质(APM, Life Technologies, CA)形式。APM是一种干粉基质形式,其具有AGT(聚集的基质:高级造粒技术)的一些有利的性质,所述性质为不需要添加剂例如碳酸氢钠,并且pH调节是自动的而且也不需要。所述基质还指可以应用的浓缩的饲料补充物、浓缩的基质、和在一些情况下是液体基质。

[0149] 在一个实施方案中,从干粉末重建的含有稳定的乙醇胺的基质产生自动-pH和/或自动-重量克分子渗透浓度的含有稳定的乙醇胺的基质,因为,其平衡了缓冲剂浓度和/或盐浓度,其有助于自动获得适合于使某种细胞类型生长的合意的pH和重量克分子渗透浓度,而无需额外的pH或盐浓度的调节。

[0150] 在另一个实施方案中,或在进一步的实施方案中,从干粉末重建的含有稳定的乙醇胺的基质产生化学定义的细胞培养基。基质蛋白质的存在使得纯化重组蛋白是困难的、耗时的、并且是昂贵的,其还能够导致降低的产品收率和/或纯度。因此,在一个实施方案中,所述细胞培养基是无血清的和无蛋白质的,然而完整的,以使其能够支持特定细胞类型的生长。可选地,从干粉末重建的基质可以是无血清的,但是仍然含有以水解产物的形式、或以纯化的蛋白质的形式或水解片段的衍生自一种或多种非动物来源(无动物来源-AOF)如植物、酵母、海藻、真菌的蛋白质,或衍生自重组来源例如细菌、真菌、植物、酵母、海藻等的蛋白质。在其它例子中,无血清基质可以仍然含有一种或多种各种衍生自动物的组分,包括白蛋白、胎球蛋白、各种激素和其它蛋白质。在另一个实施方案中,所述基质或基质补充物不含蛋白质,并且进一步的,不含有脂质、水解产物、或生长因子。

[0151] 本发明的含有受保护的不稳定分子例如稳定的乙醇胺,或包封的乙醇胺,或包封的树枝状聚合物乙醇胺的基质或补充物,可以被用于细胞的补料分批培养(fed-batch cultivation),由于它们对于细胞生长是无毒的(见实施例)。细胞的补料分批培养典型地被用于生物分子(例如蛋白质)的工业生产,以对于高产品浓度和体积生产力增加细胞浓度并延长培养寿命。补料分批培养涉及向基础基质中的一种或多种营养物或饲料,例如葡萄糖的控制添加。本发明中,使用的营养物或饲料可以包含如上所述的受保护的不稳定分子。营养物可以有助于通过防止养分枯竭或聚集和副产物的聚集来控制细胞培养的生长,因此将重要的参数(例如重量克分子渗透浓度和CO₂浓度)维持在对于最佳的产品表达促进细胞生长或最小化细胞死亡的水平。

[0152] 细胞和病毒

[0153] 如本文所述的含有乙醇胺衍生物或用螯合剂保护的乙醇胺的基质还可以被用于培养各种细胞。在一个实施方案中,所述基质被用于培养真核细胞,包括植物或动物细胞,

例如哺乳动物细胞、鱼细胞、昆虫细胞、海藻细胞、两栖动物细胞或鸟类细胞,或者用于产生病毒、病毒样颗粒。

[0154] 可以与本文描述的基质一起培养的哺乳动物细胞包括初级上皮细胞(例如角质细胞、宫颈上皮细胞、气道上皮细胞、气管上皮细胞、肾上皮细胞和视网膜色素上皮细胞)和建立的细胞株及其菌株(例如293胚胎肾细胞、BHK细胞、HeLa宫颈上皮细胞和PER-C6视网膜细胞、MDBK (NBL-1) 细胞、911细胞、CRFK细胞、MDCK细胞、CHO细胞、BeWo细胞、Chang细胞、底特律562细胞、HeLa229细胞、HeLa S3细胞、Hep-2细胞、KB细胞、LS180细胞、LS174T细胞、NCI-H-548细胞、RPMI2650细胞、SW-13细胞、T24细胞、WI-28VA13、2RA细胞、WISH细胞、BS-C-1细胞、LLC-MK2细胞、克隆M-3细胞、1-10细胞、RAG细胞、TCMK-1细胞、Y-1细胞、LLC-PK1细胞、PK (15) 细胞、GH1细胞、GH3细胞、L2细胞、LLC-RC256细胞、MH1C1细胞、XC细胞、MDOK细胞、VSW细胞、和TH-I、B1细胞、或其衍生物),来自任何器官或组织的成纤维细胞(所述组织和器官包括但不限于心脏、肝、肾、结肠、肠、食管、胃、神经组织(脑、脊髓)、肺、血管组织(动脉、静脉、毛细血管)、淋巴组织(淋巴腺、腺状肿、扁桃体、骨髓、和血液)、脾,和成纤维和成纤维样细胞系(例如,CHO细胞、TRG-2细胞、IMR-33细胞、Don细胞、GHK-21细胞、瓜氨血症细胞、邓普西细胞、底特律551细胞、底特律510细胞、底特律525细胞、底特律529细胞、底特律532细胞、底特律539细胞、底特律548细胞、底特律573细胞、HEL299细胞、IMR-90细胞、MRC-5细胞、WI-38细胞、WI-26细胞、MiC11细胞、CHO细胞、CV-1细胞、COS-1细胞、COS-3细胞、COS-7细胞、Vero细胞、DBS-FrhL-2细胞、BALB/3T3细胞、F9细胞、SV-T2细胞、M-MSV-BALB/3T3细胞、K-BALB细胞、BLO-11细胞、NOR-10细胞、C3H/10T1/2细胞、HSDM1C3细胞、KLN205细胞、McCoy细胞、小鼠L细胞、菌株2071(小鼠L)细胞、L-M菌株(小鼠L)细胞、L-MTK-(小鼠L)细胞、NCTC克隆2472和2555、SCC-PSA1细胞、瑞士/3T3细胞、印度黄鹿细胞、SIRC细胞、CII细胞、和延森细胞、或其衍生物)。

[0155] 真核细胞(包括海藻细胞)还可以在适合于生长和生物燃料产生的条件下被培养于包含稳定的乙醇胺的本发明的基质组合物中以产生生物燃料。

[0156] 由本文所述的培养基支持的细胞还可以衍生自任何动物,优选哺乳动物,并且更优选地小鼠或人。根据本文所述的方法培养的细胞可以是正常细胞、病变细胞、转化细胞、突变细胞、体细胞、生殖细胞、干细胞、前体细胞或胚细胞,其中任何一个可以是确立的细胞系或转化的细胞系或从天然来源获得。细胞可以被用于试验目的或用于产生有用的组分。

[0157] 在一个实施方案中,本文描述的基质被用于培养中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括重组CHO细胞或CHO-衍生的细胞系如CHOS、CHOK1、DG44、RevO等。术语CHO细胞包括涉及描述的重组CHO细胞和所有CHO-衍生的细胞系。CHO细胞已经被归类于衍生自中国仓鼠卵巢的上皮细胞和成纤维细胞。起始于中国仓鼠卵巢的细胞系(CHO-K1)(Kao, F.-T. 和Puck, T.T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA60:1275-1281 (1968))已经被培养很多年,但是始终没有确定其特性。由于细胞系具有例如人样糖基化模式、精确的翻译后修饰和传播人类病毒的低风险性的许多优势,目前的大部分生物药品产生CHO细胞中的蛋白质。

[0158] 细胞的培养

[0159] 可以根据研究者确定的实验条件培养本文描述的由培养基支持的细胞。应理解可以仅使用常规实验,由本领域技术人员确定给定细胞类型的最佳铺展和培养条件。对于常规的单层培养条件,使用本文描述的细胞培养基,细胞可以不用延伸因子而被铺展于培养

容器的表面。可选地,所述培养容器可以用天然的、重组的或合成的延伸因子或肽片段(例如,胶原、纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白等,或其天然或合成的片段)预涂层,其可以从 Life Technologies, Corp. (Carlsbad, CA R&D Systems, Inc. (Rochester, Minnesota), Genzyme (Cambridge, Massachusetts) 和 Sigma (St. Louis, Missouri) 商购可得。细胞还可以被接种于天然或合成的三维支持基质例如预制的胶原凝胶或合成的生物聚合材料中或被接种于其上。对于悬浮培养,典型地,将细胞悬浮于本文描述的培养基中,并将其引入促进悬浮剂中细胞培养的培养容器中,例如旋转烧瓶、灌注装置、或生物反应器。理想地,基质的搅拌和悬浮的细胞将被最小化以避免培养过程中基质组分的变性和细胞的剪切。

[0160] 可以针对使用的特定培养条件优化每一个实验条件的细胞接种密度。对于塑料培养容器中的常规单层培养,初始接种密度优选为 $1-5 \times 10^5$ 细胞/ cm^2 ,而对于悬浮培养,可以使用更高的接种密度(例如 $5-20 \times 10^5$ 细胞/ cm^2)。

[0161] 典型地,在细胞孵化器中,在约 37°C ,培养哺乳动物细胞。孵化器的气氛应是湿润的并且在空气中含有约3-10%的二氧化碳,更优选的在空气中含有约8-10%的二氧化碳,并且最优选在空气中含有约8%的二氧化碳,尽管某些细胞系的培养可能需要空气中高达20%的二氧化碳以获得最佳结果。培养基的pH通常应该在约6.2-7.8的范围内,优选约7.1-7.4的范围内,和最优选约7.1-7.3的范围内。可以在不同条件下(pH、温度和/或二氧化碳)培养细胞以增加蛋白质的生产。

[0162] 当细胞达到约 $1.5-2.0 \times 10^6$ 细胞/ml的密度时,封闭培养的或分批培养的细胞应经历完全的基质交换(即,将消耗的基质更换为新鲜基质)。在灌注培养中(例如,在生物反应器中或发酵罐中)的细胞将在连续不断的循环的基础上接受新鲜的基质。

[0163] 病毒的生产

[0164] 除了在悬浮培养或单层培养中培养细胞,本发明的基质还可以用于从哺乳动物细胞生产病毒的方法中。这样的方法包括(a)将细胞(例如哺乳动物细胞)与病毒在适合于促进病毒感染细胞的条件下接触;和(b)在适合于促进细胞生产病毒的条件,在本文描述的培养基中培养细胞。可以在培养基中培养细胞之前、期间或之后,将细胞与病毒接触。用病毒感染哺乳动物细胞的最佳方法是本领域熟知的,并且对于本领域技术人员是熟悉的。可以期待在本文描述的培养基中培养的病毒感染的哺乳动物细胞,与在本文描述的细胞培养基以外的细胞培养基中培养的细胞相比,生产更高的病毒滴度(例如2-、3-、5-、10-、20-、25-、50-、100-、250-、500-、或1000-倍更高的滴度)。

[0165] 这些方法可以被用于生产各种哺乳动物病毒和病毒载体,包括但不限于腺病毒、腺相关病毒、逆转录酶病毒等,并且最优选被用于生产腺病毒或腺相关病毒。在本文所述的培养基中培养感染的细胞后,可以将使用的含有病毒、病毒载体、病毒颗粒或其组分(蛋白质和/或核酸(DNA和/或RNA))的培养基用于各种目的,包括疫苗生产、用于细胞转染或基因治疗的病毒载体的生产、动物或细胞培养物的感染、病毒蛋白和/或核酸的研究等。可选地,任选地可以根据本领域技术人员熟知的蛋白质和/或核酸分离技术,从使用的培养基中分离病毒、病毒载体、病毒颗粒或其组分。

[0166] 重组蛋白的生产

[0167] 在本发明中描述的组合物和方法可以被用于制备细胞培养基,其反过来可以被用于生产重组产品例如来源于重组细胞的肽和/或蛋白质。细胞包括真核细胞(其可以生长在

悬浮剂中)。优选地,所述重组细胞是哺乳动物细胞,并且特别地,所述哺乳动物细胞在悬浮剂中生长。因此,本文描述的组合物和方法,以及其生产的基质,用于培养已经被基因工程改造过的细胞(例如哺乳动物细胞)以在使用本文描述的组合物和方法制备的培养基中生产多肽。用基因工程改造哺乳动物细胞以表达感兴趣的多肽的最佳方法是本领域熟知的,因此对于本领域技术人员也是熟悉的。可以在本发明的基质中培养前对细胞进行基因工程改造,或者在将细胞置于培养基中后,可以用一种或多种外源核酸分子转染细胞。可以在本发明的培养基中以单层培养的方式培养基因工程细胞,或者更优选的,以悬浮培养的方式培养基因工程细胞。培养细胞后,任选地可以根据本领域普通技术人员熟知的蛋白质分离技术,从细胞和/或使用的培养基纯化感兴趣的多肽。

[0168] 实施例1:氨基酸存在下的乙醇胺的降解

[0169] 观察到在葡萄糖单独存在下乙醇胺是稳定的,但是尤其在升高的温度(例如>30℃),在葡萄糖和氨基酸的组合的存在下,乙醇胺迅速不稳定。测试三种干粉细胞培养基样品。第一种含有乙醇胺和葡萄糖,但是不含氨基酸。第二种含有乙醇胺、葡萄糖、和氨基酸的组合。第三种含有乙醇胺、葡萄糖、氨基酸和、另外的氯化胆碱、硝酸钙、4H₂O和磷酸氢二钠。将样品于0℃和37℃储存7天,然后用注射用水(WFI)重建,通过0.22μ过滤器过滤,并且通过HPLC分析以测定乙醇胺的浓度(mg/L)。如表1所示,含有乙醇胺和葡萄糖(无氨基酸)的干基质展现乙醇胺从0℃至37℃的小幅降低(约3%),而向干基质中加入氨基酸产生约90%的乙醇胺的降低。

[0170] 表1:氨基酸存在下的乙醇胺的迅速降解

[0171]

测试样品	0℃ (mg/L)	37℃ (mg/L)	差异% (0℃至37℃)
乙醇胺和葡萄糖	66.192	64.297	2.86%
乙醇胺、葡萄糖和氨基酸	70.824	9.895	86.03%
乙醇胺、葡萄糖和氨基酸+++	69.870	7.107	89.83%

[0172] 实施例2:乙醇胺衍生物的细胞培养效力

[0173] 我们测试了一系列乙醇胺衍生物的细胞培养效力,包括磷酸乙醇胺(PE)、三乙醇胺(TE)、二乙醇胺(DE)、单甲基乙醇胺(MME)、二甲基乙醇胺(DME)、和N-乙酰基乙醇胺(NAE)。起初,我们测试一摩尔当量乙醇胺的所有化合物,没有发现任何与乙醇胺相当水平的支持细胞生长的衍生物。使用的细胞系是DG44-EP0、表达重组促红细胞生成素的CHO细胞系,其需要乙醇胺以很好的生长。在试验开始前,在每一个条件中3个更替继代接种(subpassage),以3x10⁵/ml接种细胞并培养细胞两周。试验也是以3x10⁵/ml接种,但是随后进行8天培养以从ViCell细胞计数器得到活细胞密度。

[0174] 接下来,我们滴定化合物达到一摩尔当量的64X。磷酸乙醇胺和NAE在约16X摩尔当量得到与乙醇胺相似的生长效力。见图1A和1B。在另一组实验中,在约16X乙醇胺摩尔当量的NAE再次显示能够补充乙醇胺敏感线以及乙醇胺。这些在后的实验在24孔培养盘中进行。将细胞以1x10⁵/ml培养并且在第12天收集样品。由于NAE中的氮原子包含在酰胺结构中,预期NAE应当是稳定的并且可以被用于替换细胞培养基中的乙醇胺。

[0175] 在图2A中,数据显示即使是在较高的浓度下(8-12倍),N-乙酰基乙醇胺(NAE)在细

胞生长试验中能够表现的与乙醇胺相当。此时,一摩尔当量的NAE可能不提供与乙醇胺一样的生长性能。然而,因为无乙醇胺的条件下显示较低的增长、因此NAE可以被用于某些新制剂中。图2B显示通过LC-MS的NAE的检测试验,其中NAE可以在任何制剂,包括基质制剂中被检测。LC-MS色谱图显示使用分析级NAE的N-乙酰基乙醇胺的标准样品以检测NAE的浓度变化。阴性对照是不含乙醇胺的。超过其它的线路应该被忽略,它是CD CHO目录对照(catalogue control),其与本试验无关。

[0176] 图2B:使用分析级NAE检测分析N-乙酰基乙醇胺。NAE的检测为19-20000 $\mu\text{g/ml}$,完全在基质浓度范围内。

[0177] 实施例3:乙醇胺/葡萄糖复合物

[0178] 一种降低干粉细胞培养基中乙醇胺降解的方式是在乙醇胺和糖,例如葡萄糖之间形成复合物。为了形成复合物或结晶浆糊,将乙醇胺以特定的量溶解于WFI,然后加入指定量的葡萄糖。立即使用刮刀捏合乙醇胺-葡萄糖-WFI混合物直至其形成均一浆糊。然后将浆糊混合物展平,并在覆盖下干燥过夜,然后在吸湿器中最后干燥。将干燥的混合物在尺寸规格下菲兹微粉碎,并且将其与粉末状的细胞培养基混合。乙醇胺与葡萄糖复合的一个示例性方案如下:

[0179] 1) 对于2000g之多的高级造粒技术-AGTTM细胞培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA),使用5%w/w的结晶实体(crystalline entity)达到总AGTTM重量:使用100g葡萄糖以形成结晶实体(从AGTTM(Invitrogen,Carlsbad,CA)过程中余下的葡萄糖扣除100g)。

[0180] 2) 计算WFI的量以制得结晶实体,每15g葡萄糖使用8ml WFI。因此,对于100g葡萄糖使用53.33ml WFI。

[0181] 3) 在制备结晶实体前,向WFI中加入2.086g乙醇胺并搅拌溶解,pH至约7.0。

[0182] 4) 制备结晶实体:

[0183] a、将葡萄糖置于具有低侧的平的、非反应盘;

[0184] b、加入全部的WFI-乙醇胺溶液;

[0185] c、迅速使用金属刮刀捏合、舀、或桨叶搅拌液体进入葡萄糖中。继续混合和搅拌数分钟。随着葡萄糖改变物理形态,葡萄糖混合物将从砂质粉末变为均一形式的平滑、油样状态。继续混合并捏合直至混合物是同质的。然后将同质混合物铺展成薄层,并用刮刀切割成较小的片,在通风橱下,避光或暗光下放置过夜。

[0186] d、约12个小时后,收集结晶实体并使用AGTTM(Invitrogen,Carlsbad,CA)尺寸参数(例如在1000rpm菲兹微粉碎,向前的刀,0.050"筛选)粉碎。

[0187] 5) 造粒阶段后,将结晶实体混合入AGTTM(Invitrogen,Carlsbad,CA)块中。

[0188] 一种迅速评估贮存期的方式是通过进行加速贮存期的研究。一种进行加速贮存期研究的方式是在降低的和升高的温度中在缩短的时间周期,例如7天培养测试材料。通过在降低的和升高的温度中7天后测量成分的浓度并计算成分浓度的差异%来确定感兴趣成分的稳定性。

[0189] 使用如上所述的方法学,制备样品以测定在两种不同的可商购的AGTTM(Invitrogen,Carlsbad,CA)细胞培养基,EfficientFeedTM A(Invitrogen,Carlsbad,CA)和EfficientFeedTM C(Invitrogen,Carlsbad,CA)中(二者均含有氨基酸)葡萄糖结晶对于乙醇胺稳定性的作用。见表2和3。制备含有乙醇胺的测试样品并将其加入到AGTTM

(Invitrogen, Carlsbad, CA) 块状细胞培养基中。含乙醇胺的测试样品包括至少1) 与葡萄糖复合的乙醇胺2) 干磨乙醇胺和葡萄糖(不与葡萄糖复合的乙醇胺)和3) 具有脯氨酸的干磨乙醇胺(用作阳性对照)。将测试样品加入到AGT块状基质中后,将样品于4℃、室温和30℃培养7天。培养后,将样品用WFI重建并使用HPLC测定乙醇胺的浓度(mg/L),如上所述。在两种细胞培养基中,乙醇胺与葡萄糖的复合物降低乙醇胺的降解(与对照样品相比较小的差异%)。见下表2和3。在现有结果中,葡萄糖结晶方法目前为止显示9个月的贮存期。

[0190] 表2:使用葡萄糖以稳定乙醇胺(#1基质)

[0191]

测试样品	4°C (mg/L)	室温 (mg/L)	30°C (mg/L)	差异% (4°C 至室温)	差异% (室温至 30°C)
与葡萄糖复合的乙醇胺	74.596	73.402	54.088	1.60%	27.50%
干磨乙醇胺和葡萄糖	82.392	64.864	43.456	21.30%	47.30%
具有脯氨酸的干磨乙醇胺	84.617	68.465	47.815	19.20%	43.50%
Efficient Feed™ A (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和葡萄糖	27.969	26.032	18.609	6.90%	33.50%

[0192] 表3:使用葡萄糖以稳定乙醇胺(#2基质)

[0193]

测试样品	4°C (mg/L)	室温 (mg/L)	30°C (mg/L)	差异% (4°C 至室温)	差异% (室温至 30°C)
与葡萄糖复合的乙醇胺结晶	46.176	39.591	34.285	14.30%	25.80%
乙醇胺和与葡萄糖复合的聚胺结晶	40.519	38.097	31.280	6.00%	22.80%
具有脯氨酸的干磨乙醇胺和葡萄糖	55.873	39.581	25.002	29.20%	55.30%

[0194] 实施例4:在藻酸盐微囊中螯合乙醇胺

[0195] 微囊包封提供物理隔离或螯合或保护乙醇胺免受氨基酸影响的另一个机制(特别是在粉末状的细胞培养基中)。作为举例,可以使用藻酸盐用于微囊包封。

[0196] 为了制备藻酸盐-乙醇胺微囊,将乙醇胺溶解于水(WFI)中的2%藻酸盐溶液中,脱气,并且使用针头或注射器或通过气雾喷雾(形成喷雾)滴加入钙浴(13.32g/L氯化钙)中,其中藻酸盐与钙交联以形成水凝胶。使用“1000X”浓度的珠子,意味着1ml藻酸盐溶液含有1000ml基质中乙醇胺的量(即例如1L Efficient Feed A为0.068g乙醇胺)。乙醇胺被捕入藻酸盐水凝胶中以形成微珠或微囊。然后,通过将其在气流下放置过夜,然后将其置于在架子下面具有CaSO₄的吸湿器中施加真空数小时,来干燥含乙醇胺的珠子或微囊。根据微囊形成的方法(液滴或喷雾),该过程产生分位数的、硬的、较小的球形珠子,其可以被直接与任何干粉基质(包括AGT和APM基质)混合。

[0197] 在某些情况下,加入多聚-L-赖氨酸以增加乙醇胺稳定性。使用Breguet等人,

Cytotechnology, 2007, 53:81-93中的技术,将多聚-L-赖氨酸(PLL)涂层加入至微囊。简言之,将1ml 0.15%的PLL加入到1L-当量的珠子的每一个烧杯中,培养约15分钟(偶尔涡旋)以保证所有珠子均被涂布。15分钟后,用移液管吸走过量的PLL。如前述那样干燥并除湿珠子。

[0198] 在将含乙醇胺的海藻酸微囊加入至例如AGT块状基质中后,将样品在4℃、室温和30℃培养7天。培养后,如上所述,将样品用WFI重建并使用HPLC测定乙醇胺的浓度(mg/L)。表4中的数据显示与含有具有脯氨酸(一种氨基酸,其在乙醇胺的情况中为微量组分已经被用作分散剂)的乙醇胺的对照样品相比,当与藻酸盐微囊复合时,显著地较少的乙醇胺的降解。还参见图3A-B、4A-B和图5。

[0199] 图4:使用藻酸盐微囊用于稳定乙醇胺

[0200]

测试样品	4°C (mg/L)	室温 (mg/L)	30°C (mg/L)	差异% (4°C 至室温)	差异% (室温至 30°C)
与藻酸盐复合的乙醇胺	62.521	57.999	48.666	7.2%	22%
具有脯氨酸的预磨乙醇胺	52.552	42.033	29.033	20%	45%

[0201] 在将微囊(具有或不具有PLL)加入到AGT™(Invitrogen, Carlsbad, CA)块状基质中后,将样品在4℃、室温和30℃培养7天。培养后,如上所述,将样品用WFI重建并使用HPLC测定乙醇胺的浓度(mg/L)。表5的数据显示用PLL涂布的藻酸盐微囊防止乙醇胺降解。见图3A-3B和图4A和4B。

[0202] 图5:使用多聚-L-赖氨酸增加乙醇胺稳定性

测试样品	4°C (mg/L)	30°C (mg/L)	差异% (4°C 至 30°C)
[0203] 乙醇胺/藻酸盐微囊(具有 PLL)	59.570	61.881	-3.7%
乙醇胺/藻酸盐微囊(不具有 PLL)	62.014	54.724	11.8%
具有脯氨酸的预磨乙醇胺	60.496	42.031	30.5%

[0204] 实施例5:树枝状聚合物-敏感测试化合物复合物的微囊包封

[0205] 在一个实施例中,使用螯合剂如藻酸盐来包封或嵌入树枝状聚合物-乙醇胺复合物。树枝状聚合物是高度分支的合成大分子,其可以使用控制的顺序方法制得以赋予它们明确的结构和分子量特征。其被报道不仅用于保护敏感物质,还主要用于改善在指定基质内的嵌入组分的定时释放。此外,当细胞识别或细胞结合部分被合并入树枝状聚合物,树枝状聚合物可以特异性结合于细胞并释放其内含物。这在靶向递送有价值的物质、或者极不稳定的物质、或者高敏感细胞调节分子中频繁使用。进行该研究以观察树枝状聚合物-不稳定分子复合物的微囊包封是否稳定分子避免降解,并且另外,不稳定物质当与干状态的树枝状聚合物相关时是否可以在环境条件如室温被长时间储存。按照Astruc等人, Chem. Rev. 2010, 110:1857-1959所描述的完成形成树枝状聚合物的过程,其全部以引用的形式并入 本文。简言之,可以基于引发聚合过程的核结构合成不同类型的树枝状聚合物。

本发明的微囊包封的树枝状聚合物描述于图6。在一个实施方案中,将树枝状聚合物包封于藻酸盐胶囊中。藻酸盐保护树枝状聚合物,并且重建后释放具有敏感物质的树枝状聚合物。在过滤过程中藻酸盐被截留在膜过滤器上。由于树枝状聚合物上细胞识别位点的存在,暴露的树枝状聚合物可以将敏感物质靶向于细胞,因此提高敏感或低浓度物质例如生长因子如胰岛素、维生素等对于细胞的利用度。结果示于图6、7a、7b、8、9和10。

[0206] 在图8中,在环境条件下,未受保护的乙醇胺效力在AGT™中迅速降低,而当被微囊(微珠)保护后能够维持许多月的效力。微囊包封乙醇胺在环境温度下持续显示无效力的改变长达10个月和更长(见图8)。

[0207] 除了乙醇胺的其它微囊包封不稳定化合物的例子显示如下。使用螯合剂如藻酸盐包封或嵌入树枝状聚合物-胰岛素复合物。不稳定化合物胰岛素与PAMAM树枝状聚合物聚合,并且进一步在具有或不具有PLL的藻酸盐微珠中微囊包封。简言之,对于树枝状聚合物的代,使用PAMAM2.5(羧酸化表面基团)。将胰岛素耦合于树枝状聚合物上,其上还加入RGD序列以靶向细胞表面。该复合物中各组分比例为树枝状聚合物:RGD:胰岛素=1:7:12。

[0208] 树枝状聚合物耦合方案:

[0209] 如所附上的,调节耦合物和藻酸盐的浓度。然后,将耦合物加入到藻酸盐中并混合数分钟以均匀分散。使用1ml的注射器通过26计量针头将其滴入氯化钙浴(13.32g/L)中。将其放置培养30分钟以固化微囊。然后在还含有树枝状聚合物耦合物的1X溶液中洗涤以防止微囊中组分的损失。然后在真空中经过干燥剂干燥过夜。然后将装载的微珠加入到AGT干式基质中或通过将其直接加入到液体基质中使用。

[0210] 胰岛素-树枝状聚合物-RGD稀释方案

[0211] 树枝状聚合物-胰岛素-RGD耦合物的胰岛素浓度估计为约2mg/ml(165/168段)。其需要被稀释一半以得到约1mg/ml(1000μg/ml)。

[0212] 用于试验的库存r-胰岛素设定为1000μg/ml,其为100X的10μg/ml浓度。这等价于1000X的1μg/ml浓度,这正好在96孔试验中的可滴定的胰岛素浓度范围内(英文第160段)。因此,用于微囊包封的胰岛素的有效稀释度(a,英文第168段)为1:1000X。此外,1:1000是我们为微囊包封等价设定的(对于1000ml基质使用1ml藻酸盐珠子)。Eugene耦合物对照也首先被稀释为1:1(如上),然后在1:1000的稀释度下使用。

[0213] 我们需要将树枝状聚合物-胰岛素-RGD耦合物(液体)加入到3%藻酸盐中以得到最终2%的藻酸盐(1+0.5)。该稀释不影响树枝状聚合物-胰岛素-RGD耦合物的量,因为加入的所有树枝状聚合物将进入珠子内并最后进入特定的基质中。实施例:对于100ml最终基质体积使用0.1ml树枝状聚合物-胰岛素-RGD耦合物(即 1:1000)。将该0.1ml树枝状聚合物-胰岛素-RGD加入到0.2ml3%藻酸盐中以等于2%藻酸盐。通过将其滴入钙浴和如英文第167段所述的过程并将其加入到100ml基质中,使用其全部。同样地,将阳性胰岛素对照(b,英文第168段)稀释至1:1000X而不是10μg/ml。

[0214] 如图7A所示,与未包封的具有胰岛素的树枝状聚合物或单独的胰岛素(无树枝状聚合物,无藻酸盐的包封)相比,室温下,树枝状聚合物的微囊包封显示实质上增加的稳定性。在4℃在树枝状聚合物中的胰岛素的效力比得上单独胰岛素的效力。此外使用单独的胰岛素(对照),含树枝状聚合物的微珠(测试),或不含树枝状聚合物的微珠在哺乳动物HeLa细胞系上的细胞生长研究均显示等价的效力和HeLa细胞生长特征,并且树枝状聚合物或藻

酸盐均不影响HeLa细胞的活力或生长,这显示微囊包封过程对于细胞是无毒的(图7B)。加速贮存期研究显示微囊包封(微珠)提高干式基质中胰岛素的稳定性达到于37℃一周(图10)。

[0215] 在另一个实施例中,使用维生素(例如硫胺素、维生素B12等)作为测试的用于微囊包封的不稳定化合物并将其加入到干式基质中(图9)。使用螯合剂如藻酸盐包封或嵌入树枝状聚合物-维生素复合物,如上对于包封的胰岛素所述。如图9所示,加速的贮存期研究显示微囊包封大大提高了维生素的稳定性,达到于37℃两周。

[0216] 微囊包封能够扩展敏感化合物如乙醇胺、维生素、生长因子等的储存条件,其可以积极地影响干基质制剂如AGT™等的运输和处理,在室温而不是较低的温度(如冷藏或干冰)下,其可以降低运输成本。因此,由于干式细胞培养基的更廉价的处理和储存,干式基质中不稳定化合物的微囊包封因此可以被视为是对绿色科技的贡献。

[0217] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员常规理解的相同含义。在冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。相关领域的普通技术人员将容易理解,其它对于本文描述的方法和应用的合适的修饰和修改是显而易见的,并且将不偏离本发明或其任何实施方案的范围。此外,所述材料、方法、和实例仅是例证性的并不旨在限制本发明。本文引用的所有专利、专利申请、和出版参考文献的全部以引用的形式并入本文。

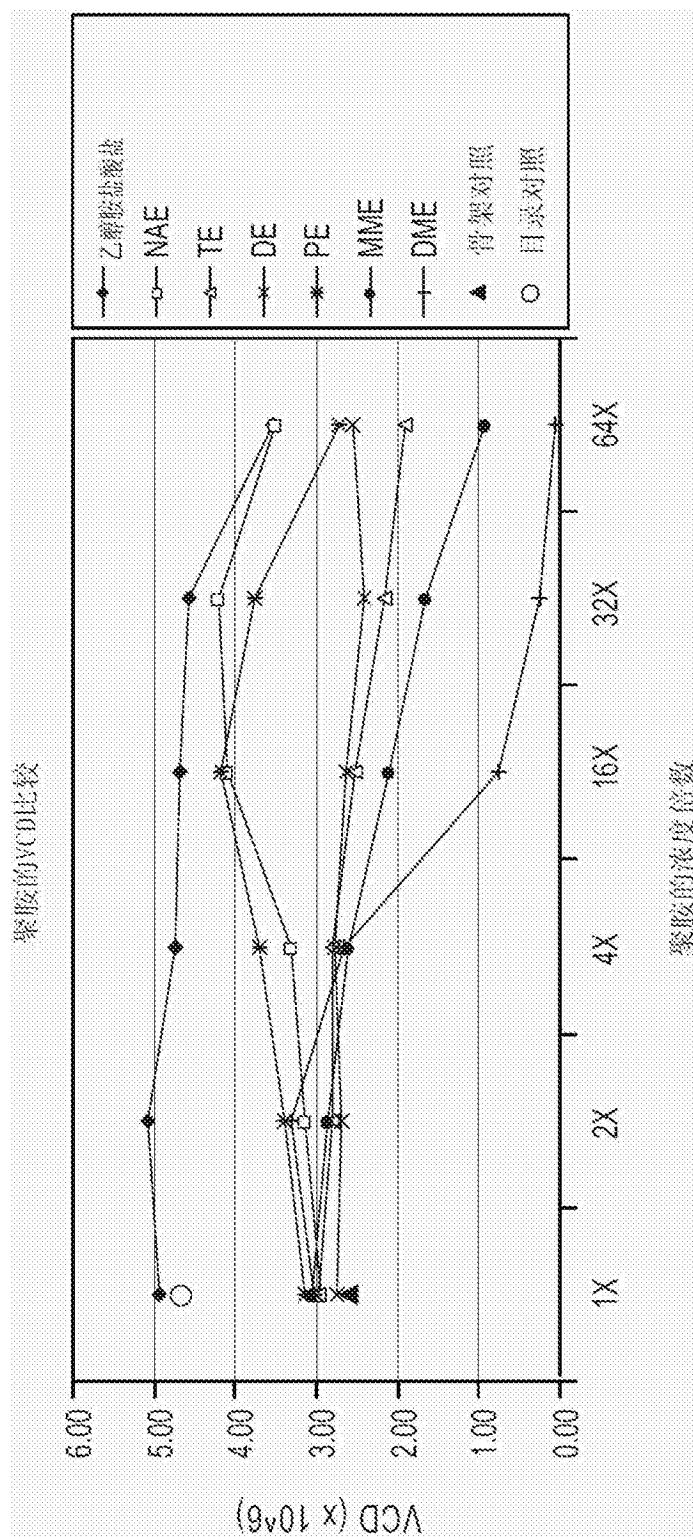


图1A

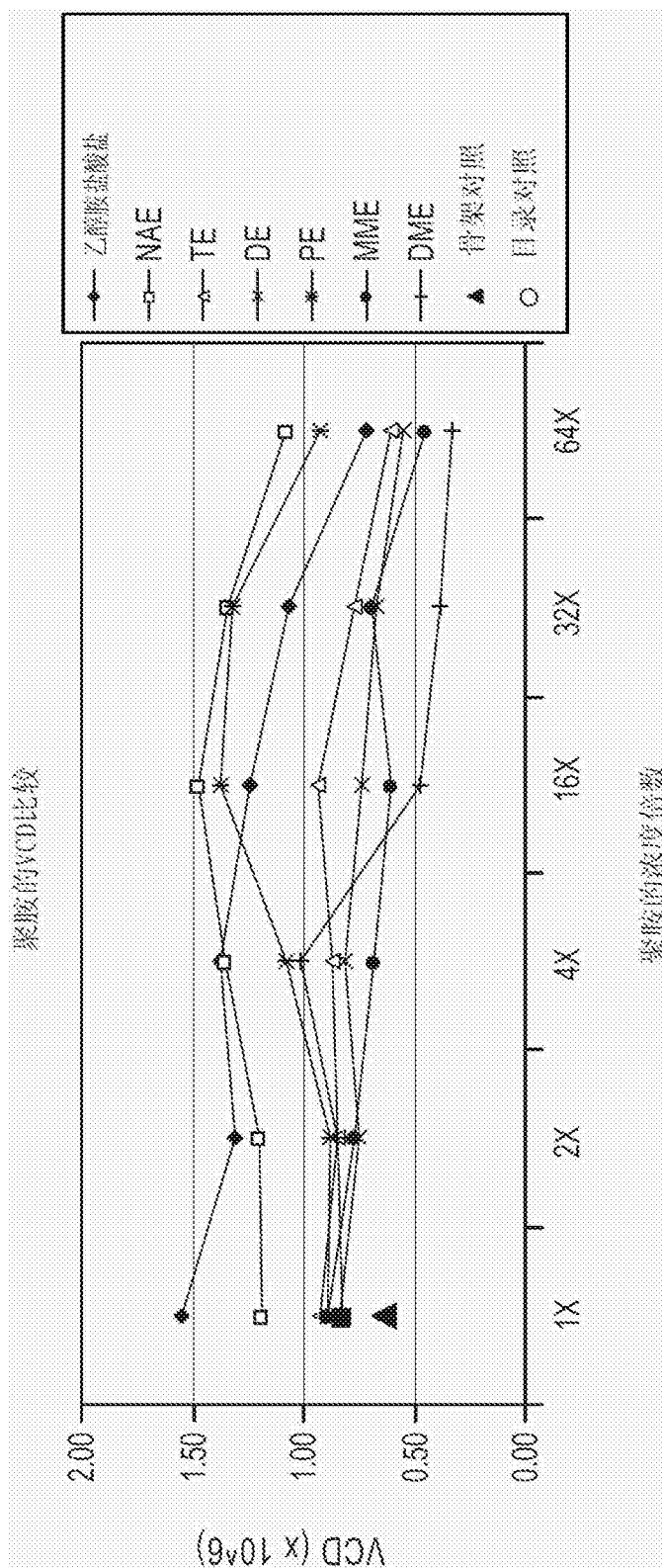


图1B

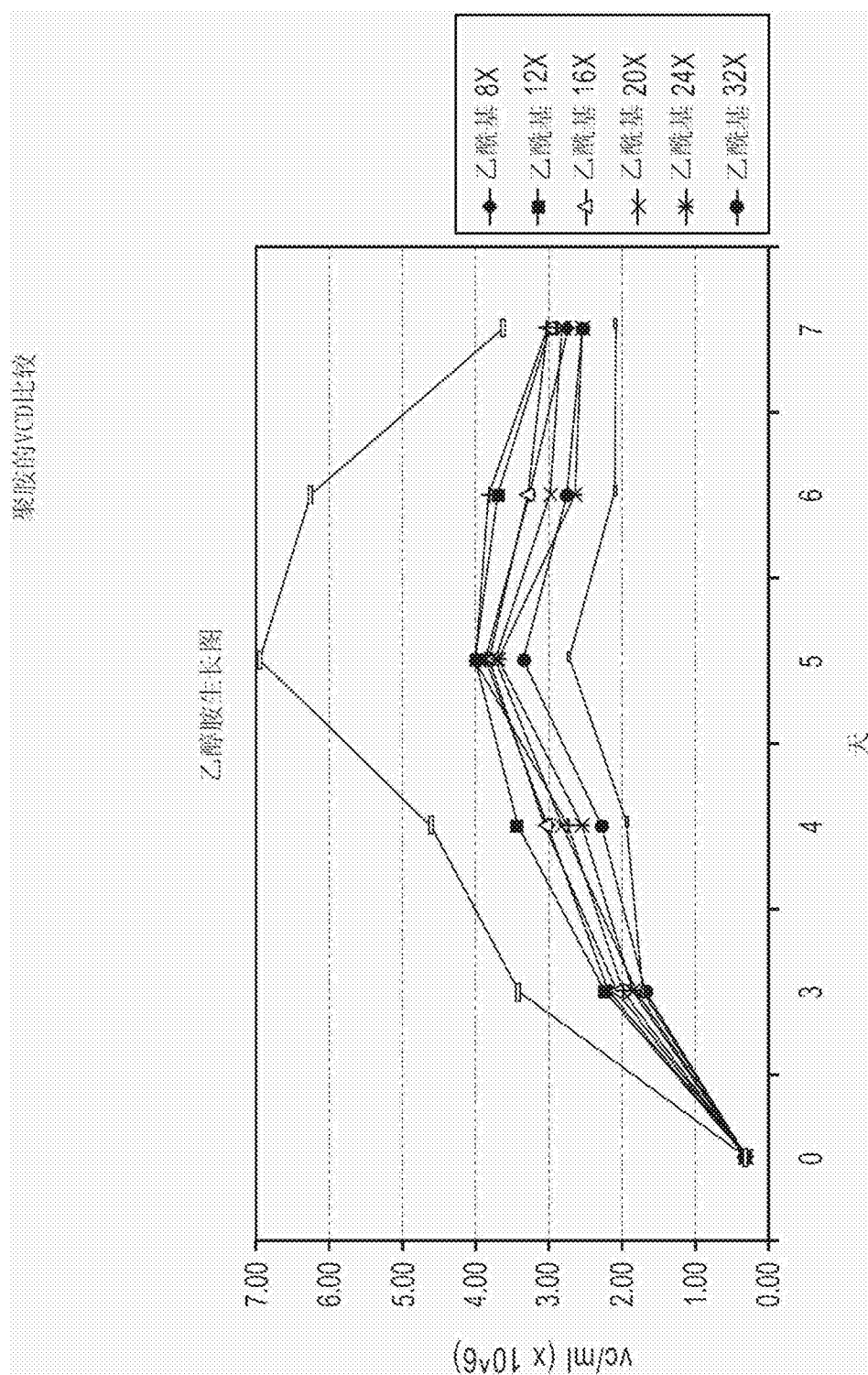


图2A

NAE

浓度 (mg/mL)	峰面积	测试样品
19.49	708.98	DANA_102110_04
0.001949	0	DANA_102110_05
0.00001949	0	DANA_102110_06
0.1949	39.69	DANA_102110_07
1.949	197.25	DANA_102110_08
19.49	686.52	DANA_102110_09
0.001949	0	DANA_102210_01
0.00001949	0	DANA_102210_02
0.01949	7.91	DANA_102210_03
0.1949	45.46	DANA_102210_04
1.949	210.05	DANA_102210_05
19.49	702.28	DANA_102210_06
0.01949	9.74	DANA_102210_07
0.1949	40.06	DANA_102210_08
1.949	208.93	DANA_102210_09
0.1949	40.09	DANA_102210_11
0.01949	8.79	DANA_102210_10

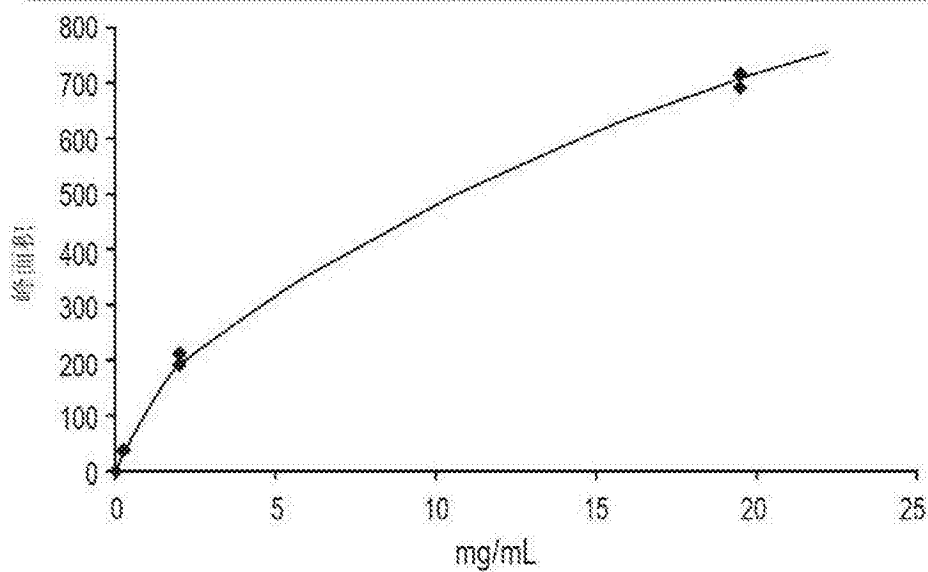


图2B

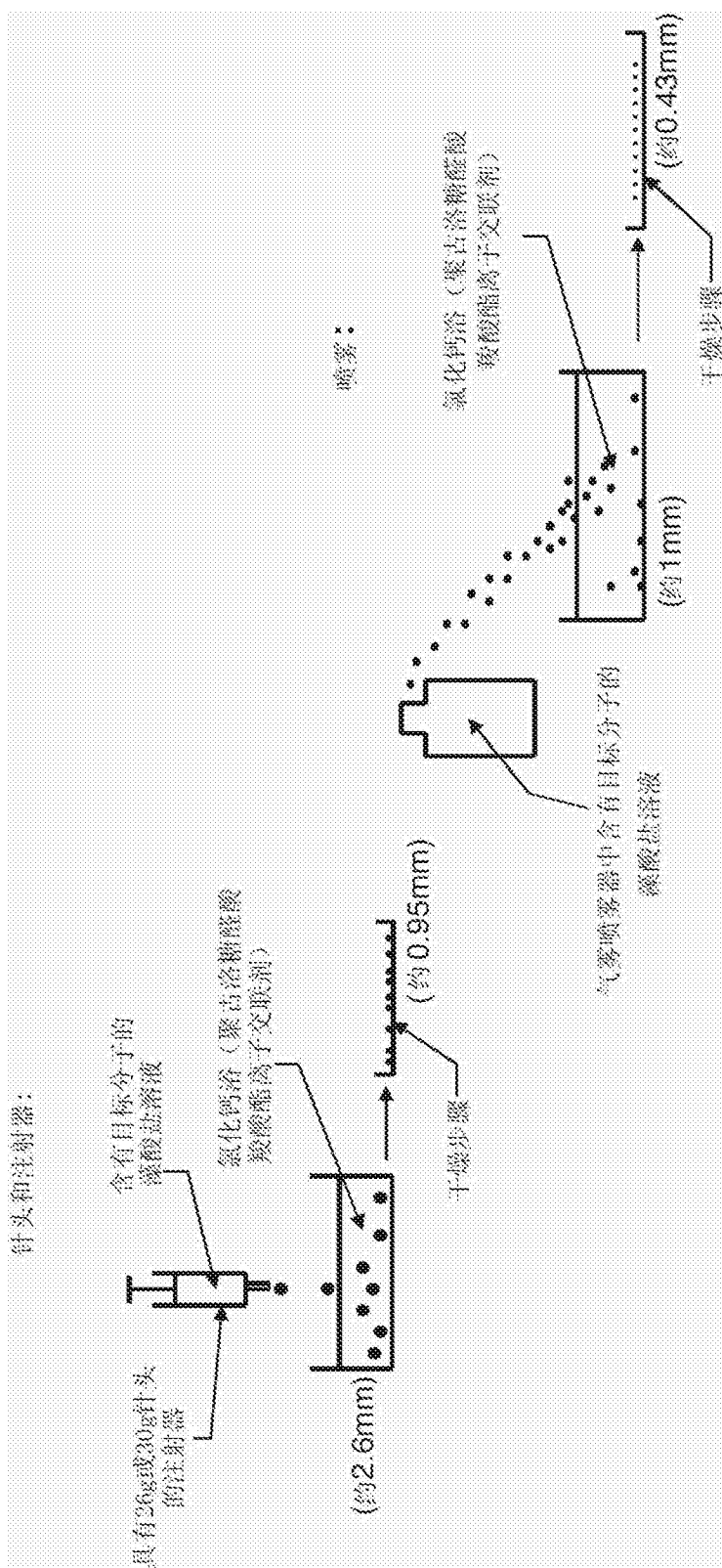


图3A

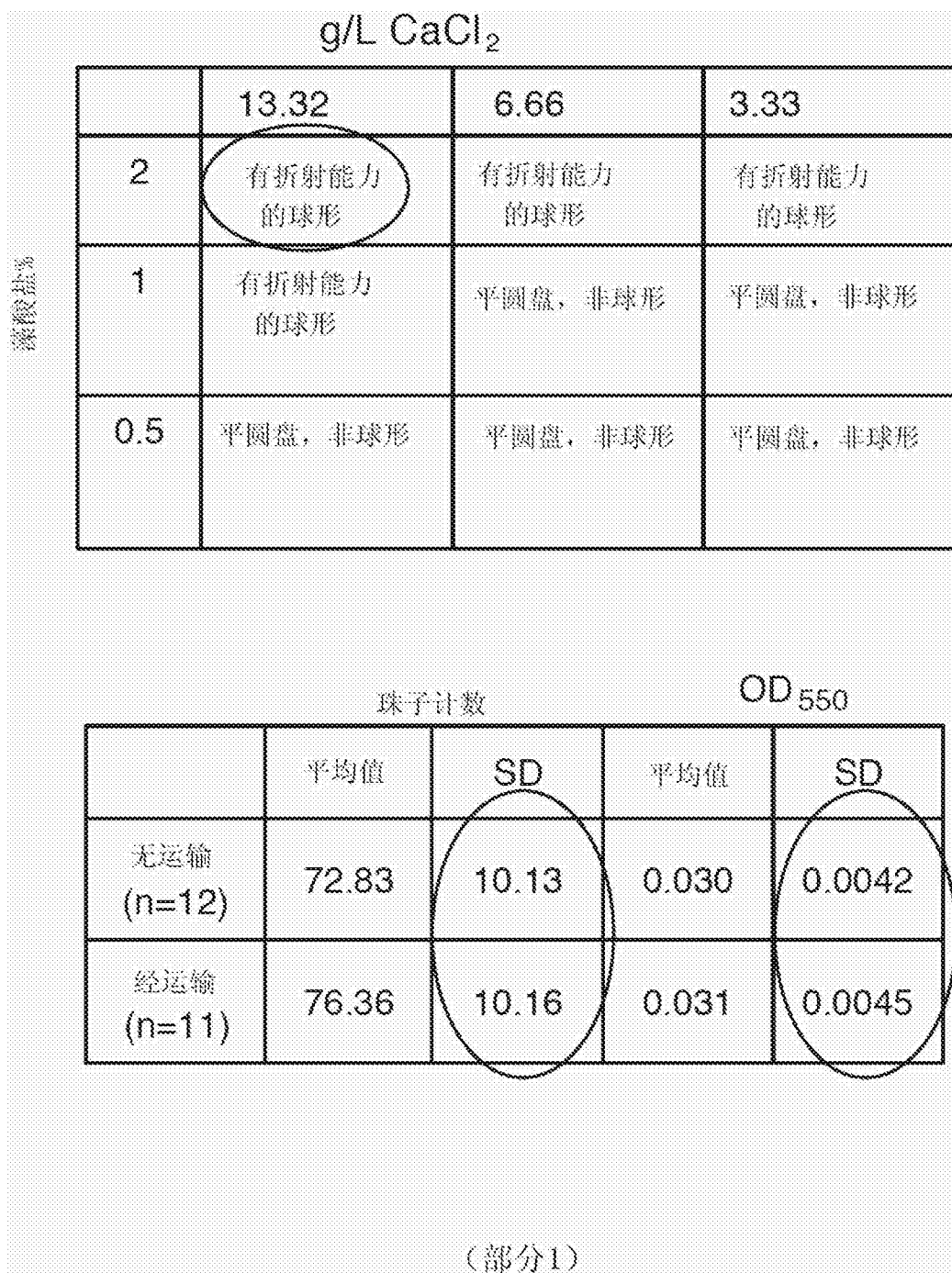


图3B

乙醇胺(g/ml 藻酸盐)		浓度	珠子特征	尺寸 (mm)
	0.0135	1000x	干燥的, 硬的, 很好的分离	0.945
	0.0675	5000x	干燥的, 硬的, 很好的分离	1.33
	0.1350	10,000x	干燥的, 硬的, 很好的分离	1.86
	0.3375	25,000x	几乎干燥的, 硬的, 但是有光泽的	2.17
	0.6750	50,000x	几乎干燥的, 但是粘性的珠子	2.44

从具有PLL的3%藻酸盐完全释放B12的时间

	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟	90 分钟
标准	整个珠子残留B12	核中残留B12	核中残留B12	核中残留B12 (轻微)	B12完全释放
减小	整个珠子残留B12	核中残留B12	核中残留B12 (微量)	B12完全释放	-----
微量	B12完全释放	-----	-----	-----	-----

(部分2)

图3B

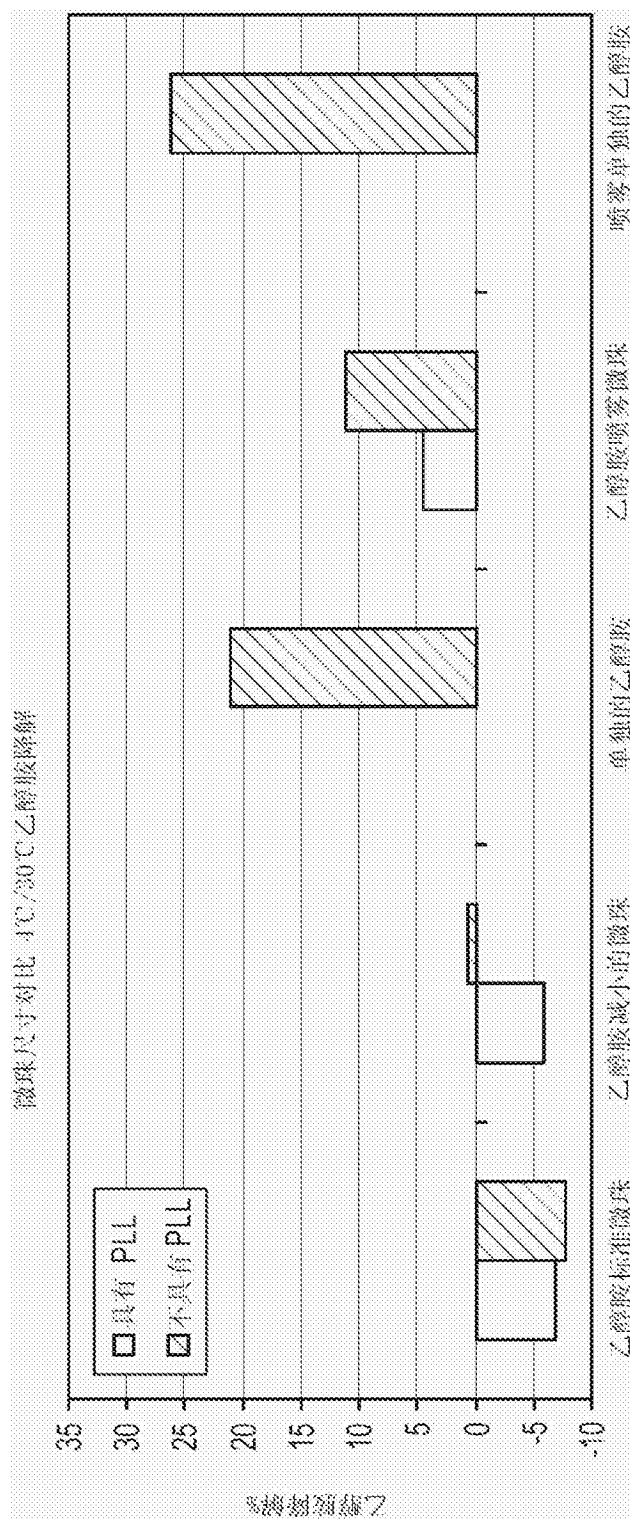


图4A

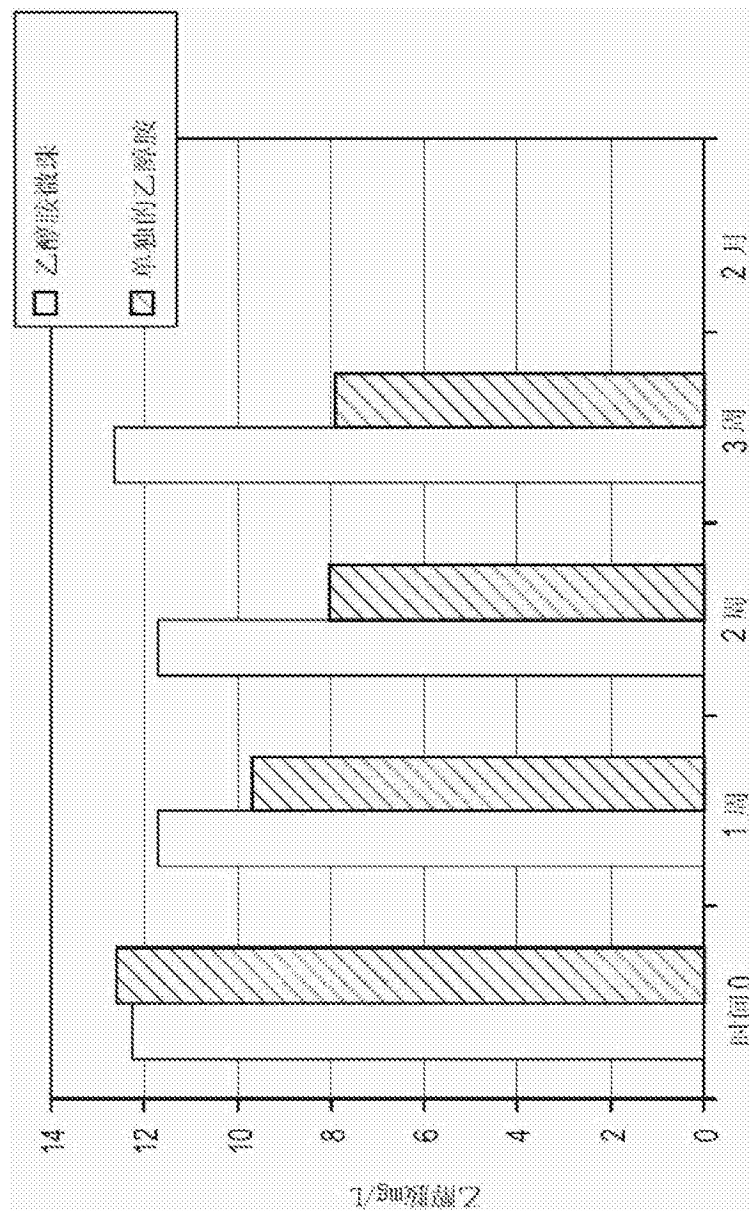


图4B

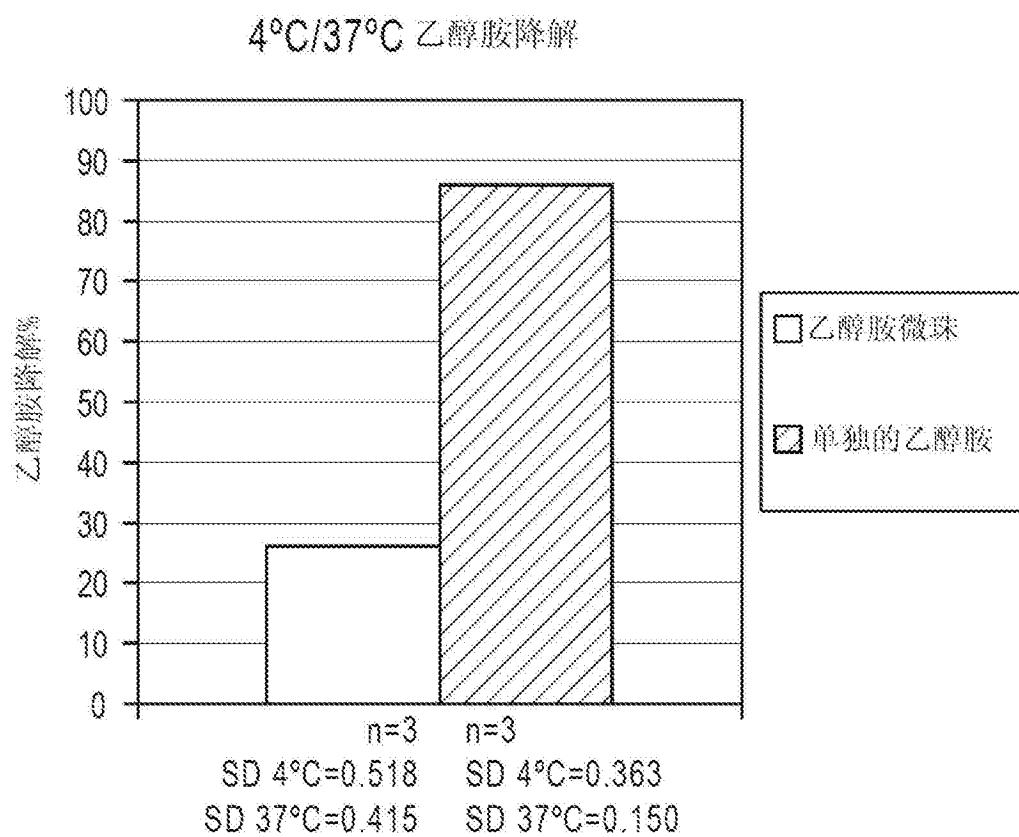


图4C

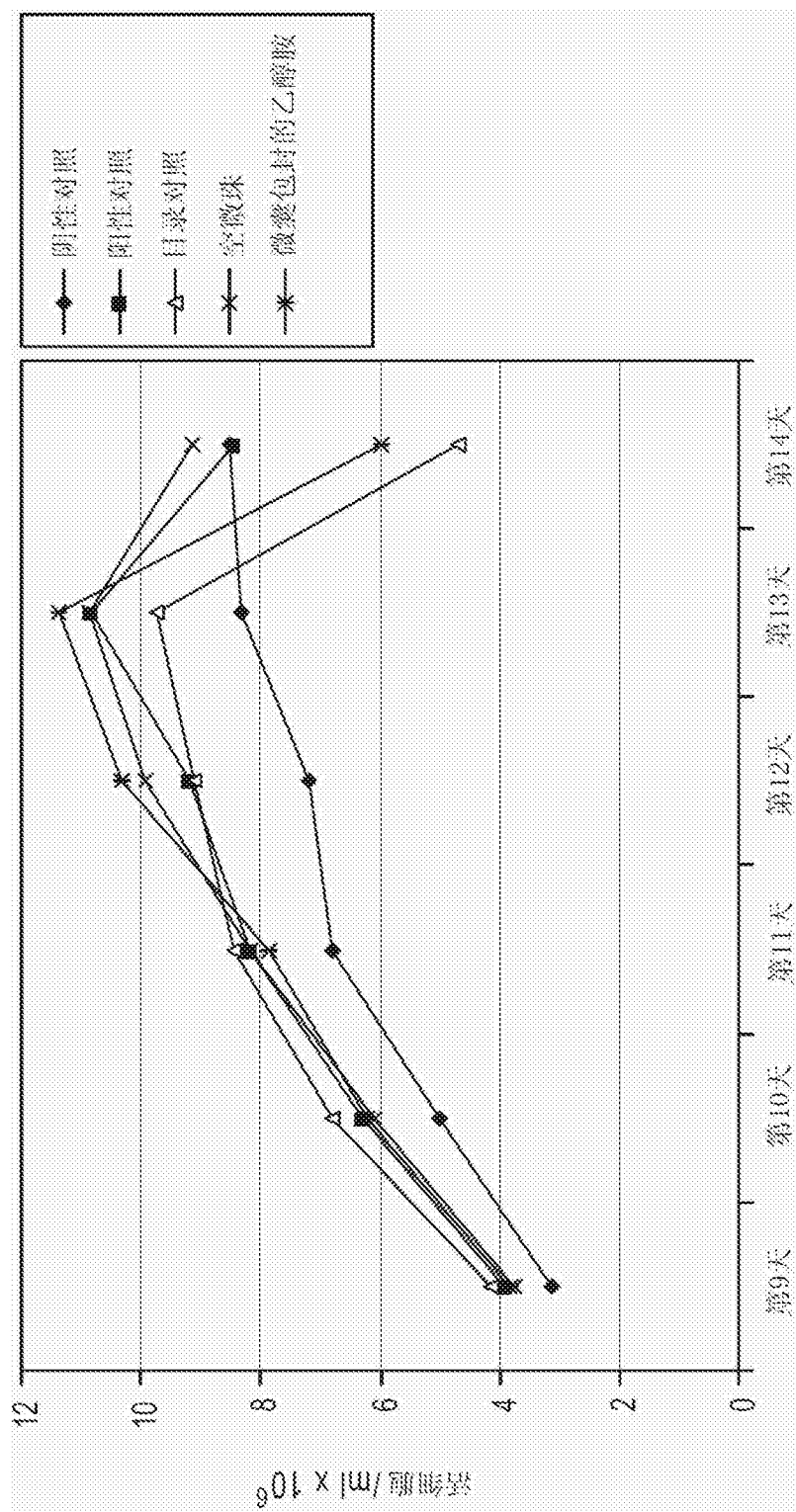


图5

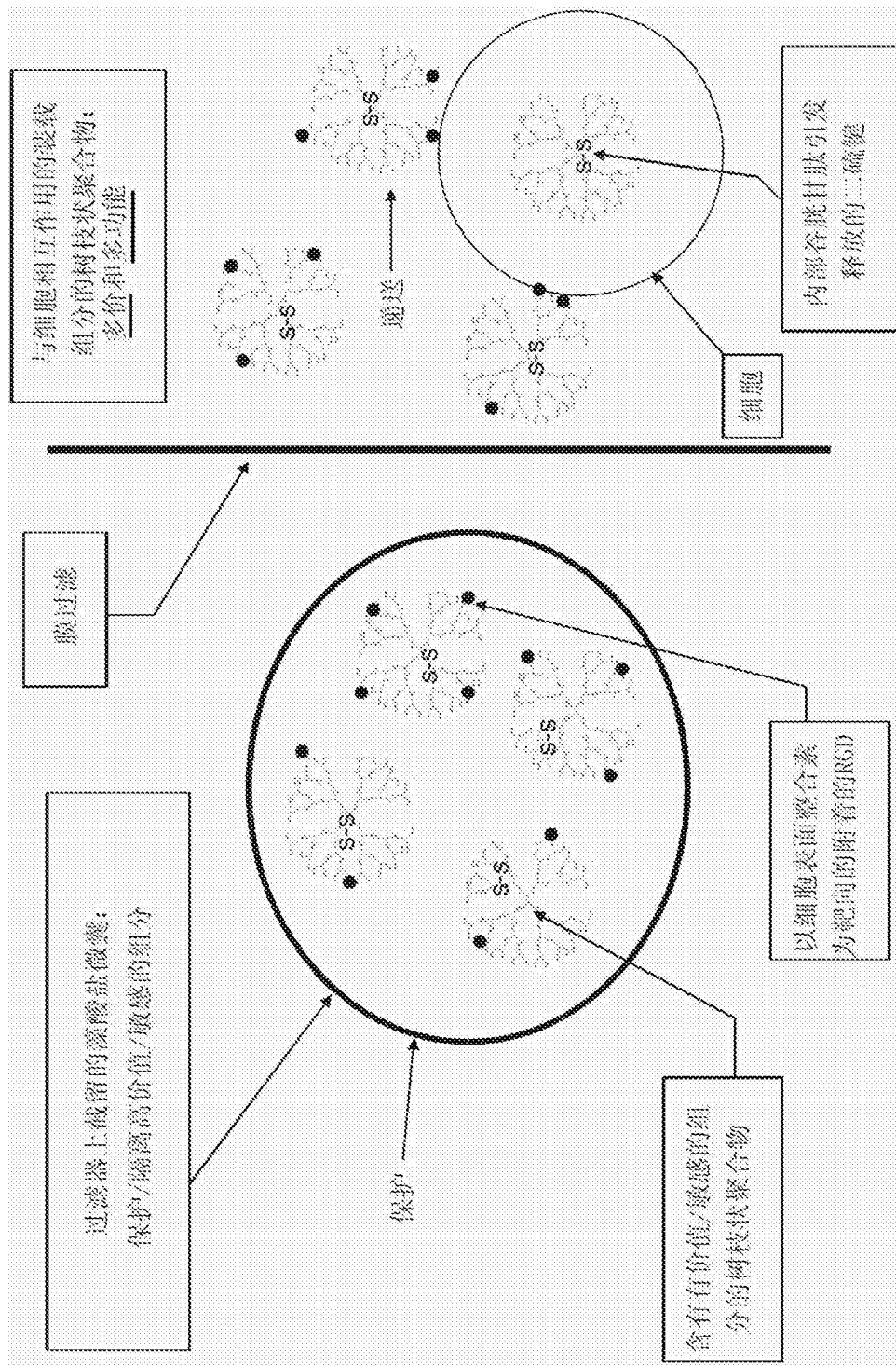


图6

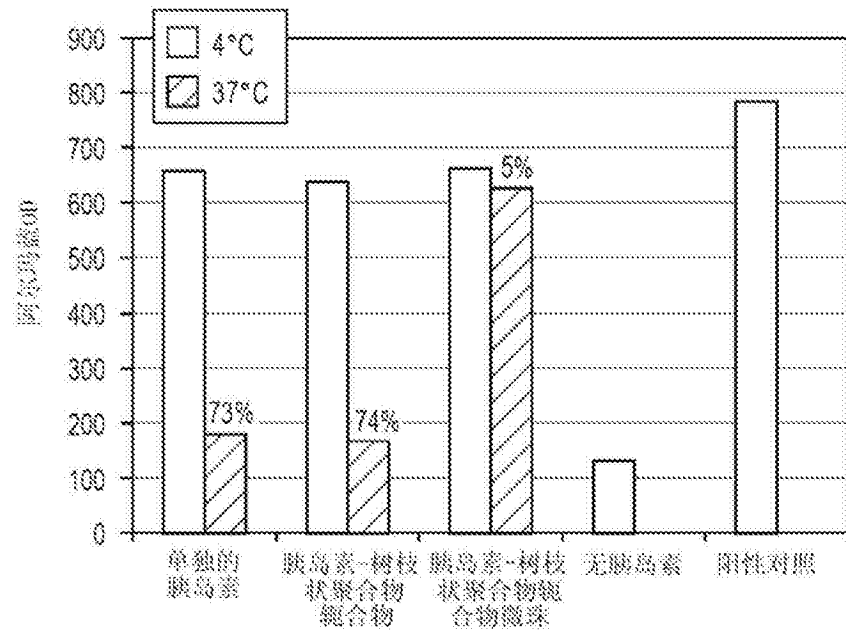


图7A

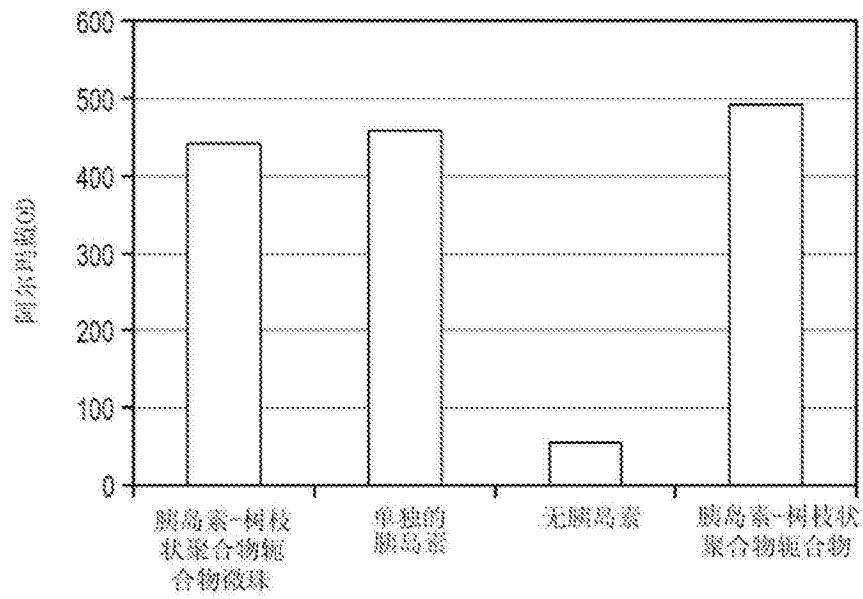


图7B

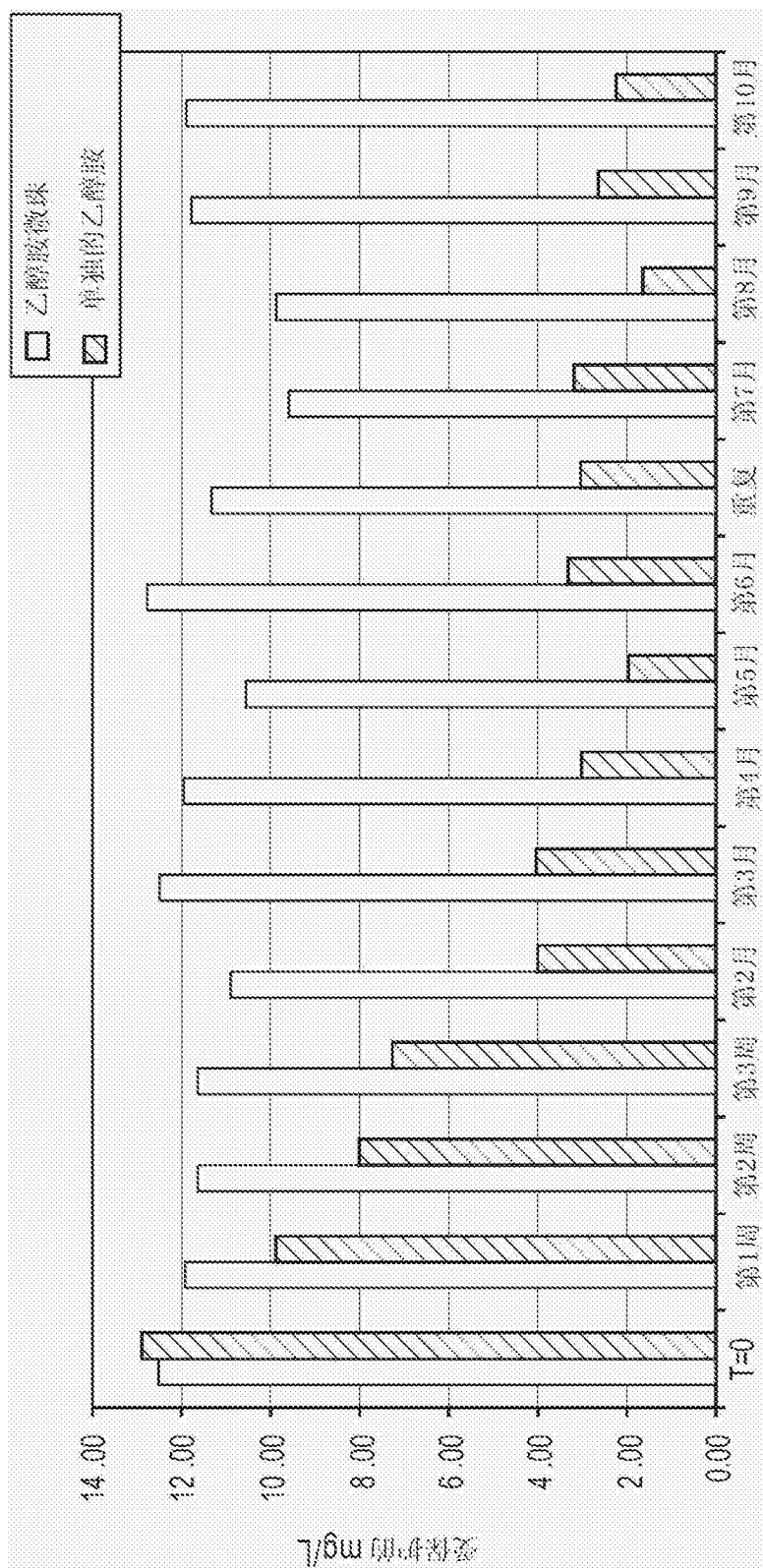


图8

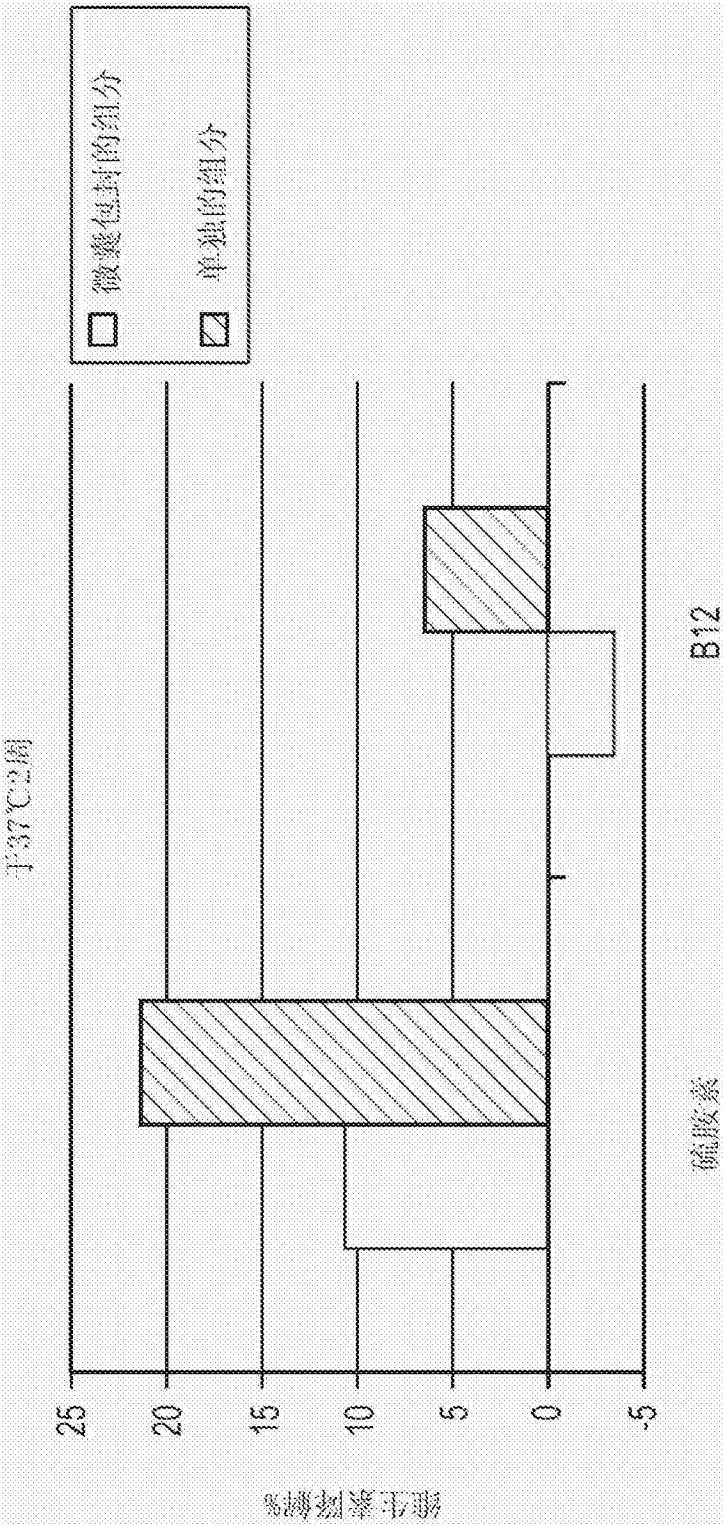


图9

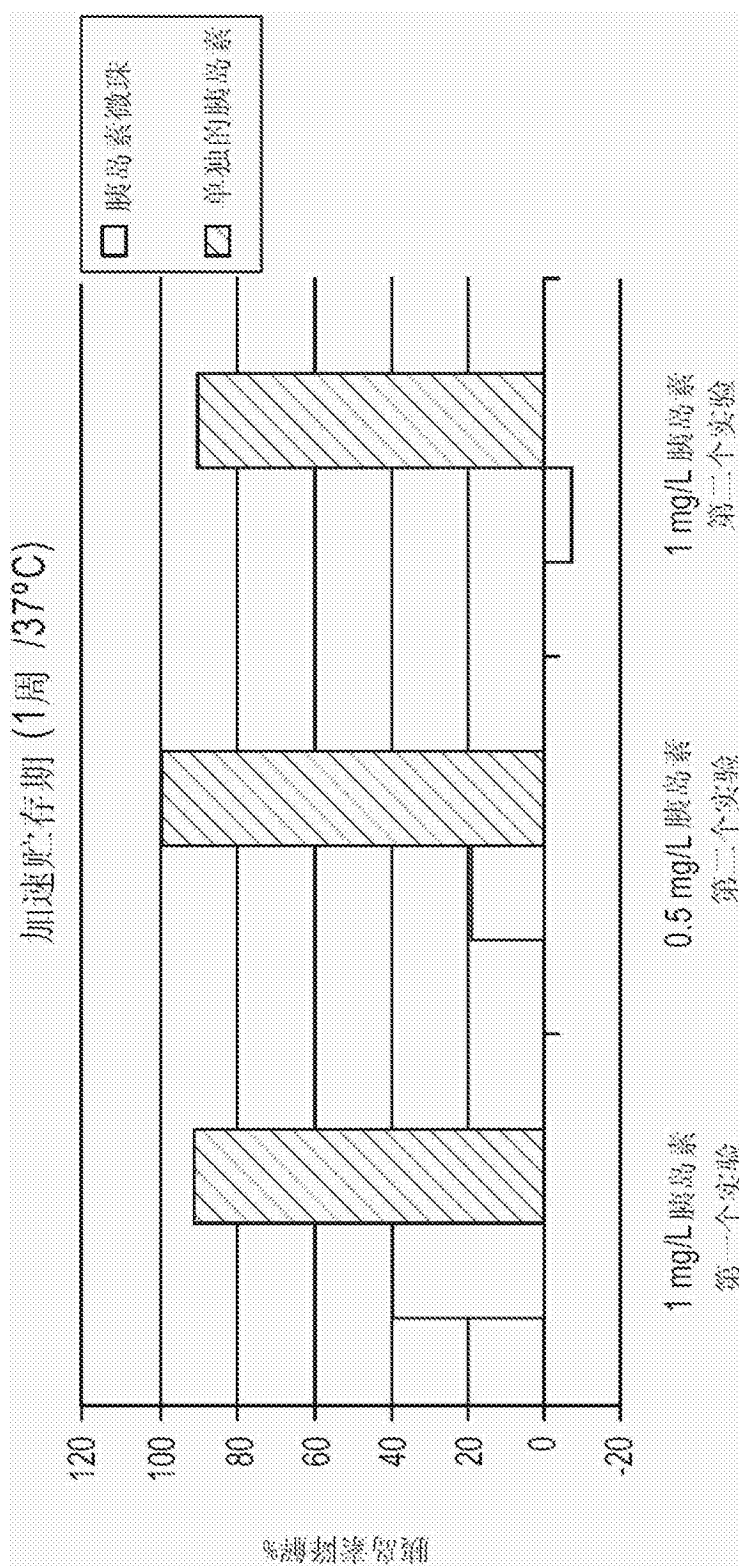


图10