



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102549142 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201080036754. 2

(22) 申请日 2010. 08. 02

(30) 优先权数据

61/230, 313 2009. 07. 31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 02. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/061191 2010. 08. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2011/012725 EN 2011. 02. 03

(73) 专利权人 巴克斯特保健股份有限公司

地址 瑞士奥普菲孔市

专利权人 巴克斯特国际公司

(72) 发明人 L·格里尔伯格 M·赖特

D·弗莱施汉德尔

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国 贾师英

(51) Int. Cl.

C12M 3/00 (2006. 01)

C12N 5/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1596302 A, 2005. 03. 16,

ROBINSON D K ETAL. Continuous hybridoma suspension cultures with and without cell retention kinetics of growth, metabolism and product formation. <JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY>. 1992, 第 22 卷 (第 1-2 期), pages 41-50.

VOISARD D ETAL. Potential of Cell Retention Techniques. <BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING>. 2003, 第 82 卷 (第 7 期), pages 751-765.

ANTOINE G ETAL. ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. <BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY>. 2003, 第 120 卷 (第 5 期), pages 821-824.

审查员 张敏

权利要求书2页 说明书15页

(54) 发明名称

在连续细胞培养中产生所关心多肽或病毒的方法

(57) 摘要

本文描述一种类似恒化器连续细胞培养系统,其合并了灌流开放系统和恒化器开放系统的某些优点从而改进哺乳动物细胞例如基因修饰细胞的培养,特别是在无血清或化学成分明确的培养基中的培养。本文所述的连续培养系统涉及在包含细胞截留装置的连续细胞培养系统中培养哺乳动物细胞,其中所述细胞培养系统的稀释率(D) 小于约 $2d^{-1}$,细胞密度小于约 2×10^7 细胞 /mL。本文还描述一种用于在连续细胞培养中产生所关心多肽和 / 或病毒的方法,所述方法包含在包含细胞截留装置的连续细胞培养系统中培养表达所关心多肽和 / 或病毒的哺乳动物细胞,其中所述

细胞培养系统的稀释率(D) 小于约 $2d^{-1}$,细胞密度小于约 2×10^7 细胞 /mL ;和从细胞培养系统的培养基中回收所关心多肽和 / 或病毒。

1. 一种用于在无血清连续细胞培养中产生所关心多肽和 / 或病毒的方法,所述方法包含:

(a) 在连续细胞培养系统中培养表达所述所关心多肽和 / 或病毒的哺乳动物细胞,其中所述细胞在无血清培养基中培养并且所述细胞培养系统包含产生小于 90% 的细胞截留率的细胞截留装置并且具有小于 0.6d^{-1} 的稀释率 (D)、在 0.15d^{-1} 至 0.25d^{-1} 之间的比生长率以及小于 2×10^7 细胞 /mL 的细胞密度;和

(b) 从自所述细胞培养系统除去的培养基中回收所述所关心多肽和 / 或病毒。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述稀释率大于 0.3d^{-1} 并且小于 0.6d^{-1} 。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞截留装置产生小于 85% 的细胞截留率。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞截留装置产生小于 80% 的细胞截留率。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞截留装置产生小于 75% 的细胞截留率。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞密度小于 1×10^7 细胞 /mL。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞密度小于 8×10^6 细胞 /mL。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞密度小于 5×10^6 细胞 /mL。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞培养系统的稀释率和比生长率的比率 (D/ μ) 在 1.2 与 4 之间。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞在所述细胞培养系统中培养大于 20 天。

11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞在所述细胞培养系统中培养大于 40 天。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞在所述细胞培养系统中培养大于 50 天。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述稀释率和所述细胞密度保持所述细胞在所述细胞培养系统中培养时间的至少 80%。

14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞截留装置包含大孔微载体。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞在化学成分明确的培养基或没有动物源性组分的培养基中培养。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞在至少 250L 培养基中培养。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞是非锚定依赖性细胞。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包含在所述培养步骤之前,悬浮预培养所述细胞。

19. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞经过基因修饰以表达所述所关心多肽和 / 或病毒。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述细胞是 CHO 细胞。

21. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述多肽是去整合素样金属肽酶含血小板反应蛋白 1 基元 13 (ADAMTS13) 蛋白。

22. 一种用于在连续细胞培养中产生去整合素样金属肽酶含血小板反应蛋白 1 基元 13 (ADAMTS13) 蛋白的方法,所述方法包含:

(a) 在连续细胞培养系统中培养经基因修饰以表达 ADAMTS13 蛋白的哺乳动物细胞,其中所述细胞培养系统包含产生小于 90% 的细胞截留率的细胞截留装置并且具有小于 0.6d^{-1} 的稀释率 (D)、在 0.15d^{-1} 至 0.25d^{-1} 之间的比生长率以及小于 2×10^7 细胞 /mL 的细胞密度;和

- (b) 从自所述细胞培养系统除去的培养基中回收所关心的所述 ADAMTS13 蛋白。
23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述细胞截留装置产生小于 75% 的细胞截留率。
24. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述细胞截留装置具有小于 $2d^{-1}$ 的稀释率 (D) 和小于 2×10^7 细胞 /mL 的细胞密度。
25. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法, 其中所述方法产生所关心多肽。

在连续细胞培养中产生所关心多肽或病毒的方法

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 7 月 31 日提交的美国临时申请第 61/230,313 号的权益,并要求其优先权,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中产生所关心多肽或病毒的连续细胞培养策略。本文所述的连续细胞培养策略合并了恒化器和灌流培养技术的优点。

背景技术

[0004] 产生所关心多肽或病毒的能力对于生物技术工业日益重要。过去二十年,生物技术的进步引起了对许多多肽和病毒的关注,这些多肽和病毒具有作为疫苗和医药的潜在治疗用途。大规模生产一般涉及例如在细菌、酵母、昆虫、哺乳动物细胞或其它细胞类型中重组产生所述所关心多肽或病毒。具体来说,在哺乳动物细胞培养物中产生所关心多肽或病毒优于在细菌或其它低级微生物宿主中的产生,原因在于哺乳动物细胞能够对复杂的蛋白质结构进行翻译后加工,例如经由依赖于二硫键的折叠和糖基化作用。

[0005] 哺乳动物细胞在体外一般以两种模式繁殖:作为非锚定依赖性细胞,在培养物的整个本体中自由悬浮生长;或作为锚定依赖性细胞,需要粘附到供其繁殖的固体基质(即,单层类型的细胞生长)。已经开发出微载体系统来容纳两种类型的生长。例如,锚定依赖性细胞可以在包含小固体颗粒的微载体系统中繁殖,所述小固体颗粒利用缓慢搅动悬浮于生长培养基中。该系统允许锚定依赖性细胞粘附到悬浮颗粒的表面,并生长到汇合,而同时微载体保持悬浮于生长培养基中。或者,可以使用大孔微载体从而在生物反应器中含有非锚定依赖性细胞,例如利用细胞到这些微载体的表面的非特定粘附。非锚定依赖性细胞或锚定依赖性细胞的微载体悬浮培养是大规模生产细胞和细胞产物的最广泛使用的方式。

[0006] 大规模悬浮培养可以在封闭系统中操作,例如作为分批式(batch)或流加式(fed-batch)封闭系统,封闭系统比开放系统更方便操作和放大。通常,在封闭系统中,没有细胞、产物和/或废物除去(尽管可能利用通风来加入空气(例如氧气)和除去CO₂)。在分批式生长系统情况下可见的典型生长曲线涉及迟缓期,后面为指数期、稳定期和衰亡期。在这些分批式系统中,随着养分耗尽和代谢物积聚,环境连续发生变化。在流加式系统中,关键养分被连续送入系统中从而延长生长周期,尽管细胞、产物、副产物和废物(包括毒性代谢物)未除去。因此,利用分批式或流加式系统来产生所关心多肽或病毒受到细胞和有害物质诸如毒性代谢物的积聚的限制。

[0007] 大规模悬浮培养也可以在开放系统中操作,例如在灌流系统或恒化器系统中。在灌流系统中,使新鲜培养基灌流穿过培养物,同时利用各种细胞截留装置截留细胞。细胞截留装置的类型包括例如微载体、微孔旋转过滤器、中空纤维、平板膜过滤器、沉降管、超声波细胞截留装置等。通常,灌流培养物设计成增加细胞密度到最大值,而细胞截留装置设计和操作成具有>90%的细胞截留率。这些培养物通常达到>2X10⁷的细胞密度,这必须利用

稀释率大于约 2.0d^{-1} 的细胞培养基进料来供应。然而,由于生物质不受控制的增加,使得系统很难保持稳态,并且难以控制和 / 或达到一致的生产条件。

[0008] 恒化器系统利用培养基连续流入与细胞和产物的流出来操作。在恒化器系统中,没有细胞截留装置,以致生物反应器中细胞的浓度和从生物反应器收获的上清液中细胞的浓度大致相同。通常,培养基以预定的恒定速率送入反应器,从而保持培养物的低稀释率(通常为 0.3d^{-1} 至 0.8d^{-1})。为防止细胞冲坏,稀释率一般选择为小于、有时等于细胞的最大比生长率。含有细胞、细胞产物、副产物、废物等的培养流体同时除去,或大致同时除去。恒化器系统通常提供高的控制程度,因为培养物可以在比生长率等于稀释率下平衡,即,达到稳态。此平衡决定了细胞、代谢物、废物、表达产物(例如,分泌蛋白)等的浓度。由于至少一种限制性基质,恒化器系统中的比生长率通常低于最大生长率。不过,在一些系统中,稳态可以通过控制和调整生物质而保持在最大比生长率,例如在恒化器培养的 turbidostat 系统中。优选地,这些恒化器培养物含有在整个生物反应器中均匀分布的细胞(例如,单细胞悬浮液)。但是,与灌流系统相比,恒化器系统通常产生较低的细胞密度。此外,恒化器系统的固有缺点在于,细胞的进料不能够独立于生物反应器系统中的细胞密度来进行控制。

[0009] 用于在无血清和 / 或化学成分明确的培养基中产生重组蛋白的悬浮细胞培养也受到限制,因为无血清和 / 或化学成分明确的培养基与含有血清的培养基中生长的细胞相比,通常支持较慢的生长率。培养物中生长率降低意味着所关心多肽或病毒的产量降低。

[0010] 因此,仍需要开发能够持续所关心多肽或病毒的产生的细胞培养系统,尤其是能够长时间持续以便满足例如低成本下产量增加的需求的培养。本发明提供针对此需要和其它需要的方法和组合物。

发明内容

[0011] 本文公开了一种用于在哺乳动物细胞、尤其非锚定依赖性细胞中产生所关心多肽和 / 或病毒的连续细胞培养。本文公开的连续细胞培养方法合并了灌流开放系统和恒化器开放系统的优点,并允许细胞密度和细胞生长的增加,特别是在无血清或化学成分明确的培养基中。细胞密度和细胞生长的增加提高所关心蛋白质和 / 或病毒的产率,同时允许更好地控制工艺参数。

[0012] 因此,本发明的一个方面涉及用于在连续细胞培养中产生所关心多肽和 / 或病毒的方法,所述方法包含在连续细胞培养系统中培养表达所述多肽和 / 或病毒的哺乳动物细胞,其中细胞培养系统包含细胞截留装置并且具有小于约 2d^{-1} 的稀释率和小于约 2×10^7 细胞 / mL 的细胞密度;和从自细胞培养系统除去的培养基中回收所关心多肽和 / 或病毒。在一些实施方案中,细胞经过基因修饰以便重组表达所关心多肽和 / 或病毒。

[0013] 在一些实施方案中,细胞截留装置选择为截留细胞的能力低于典型的细胞截留装置。在一些实施方案中,细胞截留装置产生的细胞截留率为小于约 90%、小于约 85%、小于约 80% 或小于约 75%。在一些实施方案中,细胞截留装置包含大孔微载体,例如基于纤维素的颗粒。

[0014] 稀释率和细胞密度优选保持在所选值或范围。在一些实施方案中,稀释率为小于约 1d^{-1} ,例如在约 0.1d^{-1} 与约 1.0d^{-1} 之间。在一些实施方案中,细胞密度为小于约 1×10^7 细胞 / mL。在一些实施方案中,细胞培养系统的稀释率和比生长率的比率 (D/μ) 保持在所选

值或范围。在一些优选实施方案中,细胞培养系统的稀释率和比生长率的比率为大于约 1,例如在约 1.2 与约 5.0 之间或在约 1.8 与约 3 之间。在一些实施方案中,比生长率保持在 0.2d^{-1} 与 0.8d^{-1} 之间。

[0015] 本文所述的连续细胞培养系统的某些实施方案的优点在于该培养可以持续较长时间。例如,在一些实施方案中,稀释率和 / 或细胞密度保持细胞在连续细胞培养系统中培养时间的至少约 80%。在一些实施方案中,细胞在细胞培养系统中培养例如大于 20 天、优选大于 40 天、更优选大于 50 天,从而允许在低成本下增加所关心多肽和 / 或病毒的产量。

[0016] 连续细胞培养系统的某些实施方案的另一优点为较高细胞密度引起的相比于典型恒化器培养的体积生产率的增加。例如,在特定优选实施方案中,体积生产率增加 70%、90% 或更高。连续细胞培养系统的某些实施方案的再一优点为例如由于在培养单元中滞留时间降低而引起的所回收蛋白质的比活性提高,这可能会对蛋白质的稳定性、结构和 / 或功能具有有利影响。

[0017] 本文所述的连续细胞培养系统的某些实施方案的另一优点在于系统可以放大以进行大规模生产。也就是说,通过允许与标准恒化器培养系统相比增加细胞密度和 / 或细胞生长,本文公开的连续细胞培养系统提供所关心多肽和 / 或病毒的商业规模生产。例如,在一些实施方案中,在至少约 250L 培养基,例如至少约 500L 或至少约 1,000L 培养基中培养细胞。在一些优选实施方案中,在无血清培养基和 / 或化学成分明确的培养基中培养细胞。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法进一步包含预培养步骤,例如以便使细胞适应如本文所述的在连续细胞培养系统中所关心多肽和 / 或病毒的产生。因此,在一些优选实施方案中,所述方法进一步包含在培养步骤之前,悬浮预培养细胞,例如直到培养物达到适当体积。

[0019] 在特定实施方案中,所关心多肽为去整合素样金属肽酶含血小板反应蛋白 1 基元 13 (ADAMTS13) 蛋白。在一些实施方案中,哺乳动物细胞为 CHO 细胞,例如经过基因修饰以表达 ADAMTS13 蛋白的 CHO 细胞。在特定实施方案中,提供用于在连续细胞培养中产生所关心多肽和 / 或病毒的方法,所述方法包含 (a) 在连续细胞培养系统中培养表达所关心多肽和 / 或病毒的非锚定依赖性哺乳动物细胞,其中细胞培养系统包含细胞截留率小于 90% 的细胞截留装置,且具有在 0.1d^{-1} 与 1.0d^{-1} 之间的稀释率 (D) 和小于 1×10^7 细胞 / mL 的细胞密度;和 (b) 从自细胞培养系统除去的培养基中回收所关心多肽和 / 或病毒。

[0020] 在另一特定实施方案中,提供用于在连续细胞培养中产生所关心多肽和 / 或病毒的方法,所述方法包含 (a) 在连续细胞培养系统中培养表达所关心多肽和 / 或病毒的非锚定依赖性 CHO 细胞,其中细胞培养系统包含细胞截留率小于 90% 的大孔微载体细胞截留装置,且具有在 0.1d^{-1} 与 1.0d^{-1} 之间的稀释率 (D) 和小于 1×10^7 细胞 / mL 的细胞密度;和 (b) 从自细胞培养系统除去的培养基中回收所关心多肽和 / 或病毒。

[0021] 在再一特定实施方案中,提供用于在连续细胞培养中产生 ADAMTS13 的方法,所述方法包含 (a) 在连续细胞培养系统中培养表达重组 ADAMTS13 蛋白的非锚定依赖性哺乳动物细胞,其中细胞培养系统包含细胞截留率小于 90% 的大孔微载体细胞截留装置,且具有在 0.1d^{-1} 与 1.0d^{-1} 之间的稀释率 (D) 和小于 1×10^7 细胞 / mL 的细胞密度;和 (b) 从自细胞培养系统除去的培养基中回收 ADAMTS13。

[0022] 在又一特定实施方案中,提供用于在连续细胞培养中产生所关心多肽和 / 或病毒的方法,所述方法包含 (a) 在连续细胞培养系统中培养表达所关心多肽和 / 或病毒的非锚定依赖性哺乳动物细胞,其中细胞培养系统包含细胞截留率小于 90% 的细胞截留装置,且具有在 0.1d^{-1} 与 1.0d^{-1} 之间的稀释率 (D) 和小于 1×10^7 细胞 / mL 的细胞密度,以及在 1.2 与 5 之间的稀释率和比生长率的比率 (D/μ); 和 (b) 从自细胞培养系统除去的培养基中回收所关心多肽和 / 或病毒; 且进一步,其中细胞在细胞培养系统中培养大于 50 天,并且稀释率、细胞密度以及稀释率和比生长率的比率各自保持细胞在细胞培养系统中培养时间的至少 80%。

[0023] 本发明的另一方面涉及包含根据本文所述的方法产生的所关心多肽和 / 或病毒的组合物,例如包含据此产生的重组 ADAMTS13 蛋白的组合物。

[0024] 下面更详细地描述本发明的这些和其它方面。

具体实施方式

[0025] 本文所述的连续细胞培养系统合并了哺乳动物细胞的灌流培养和恒化器培养的一些优点。如上文所述,灌流培养系统利用新鲜培养基灌流穿过细胞培养物来操作,同时使用细胞截留装置截留细胞; 恒化器培养系统利用培养基的连续流入与细胞和产物的流出来操作,没有细胞截留装置。

[0026] 本文所用的“灌流”指代生理营养液在稳定速率下的连续流动,穿过或经过细胞群。由于灌流系统一般涉及细胞在培养单元内的截留,所以灌流培养物特有地具有相对高的细胞密度,但培养条件难以保持和控制。另外,因为细胞生长到高密度并接着在高密度下截留在培养单元内,所以生长率通常随时间连续减小,从而达到细胞生长的指数末期或甚至稳定期。相比之下,本文所用的“恒化器”指代生理营养液的连续流入结合细胞和其它产物随取出培养基的连续流出,穿过细胞培养物,例如在恒化器系统中。然而,由于细胞被连续除去,使得恒化器系统通常只支持较低细胞密度。

[0027] 本文所述的连续培养策略一般包含在连续细胞培养系统中在生产阶段期间培养表达所关心多肽和 / 或病毒的哺乳动物细胞,例如非锚定依赖性细胞。“非锚定依赖性细胞”表示与繁殖期间粘附于或固定于固体基质相反,在培养物整个本体中自由悬浮繁殖的细胞。连续细胞培养系统将包含与灌流系统中所使用的类似的细胞截留装置,但其允许连续除去细胞的较大部分,优选使得与灌流培养中相比截留较小百分比的细胞。“细胞截留装置”表示能够在细胞培养期间的特定位置上截留细胞、尤其非锚定依赖性细胞的任何结构。非限制性实例包括可以将非锚定依赖性细胞截留在生物反应器内的微载体、微孔旋转过滤器、中空纤维、平板膜过滤器、沉降管、超声波细胞截留装置等。所关心多肽和 / 或病毒 (例如重组多肽和 / 或重组病毒) 可以从细胞培养系统回收,例如从自细胞培养系统除去的培养基中回收。

[0028] 本文公开的用于产生所关心多肽和 / 或病毒 (例如重组多肽和 / 或重组病毒) 的方法包含提供类似恒化器培养系统并使用细胞截留装置的细胞培养方法。所述系统包含在具有细胞截留装置的连续细胞培养系统中培养表达所关心多肽和 / 或病毒的哺乳动物细胞。细胞截留装置的作用在于防止用新鲜培养基补充用过的培养基期间从培养物除去一部分、优选较大一部分活细胞。成功的细胞截留装置应当尽可能多地满足以下要求: (1) 极小

的细胞损伤或对细胞生长和生产率的影响, (2) 仅对活细胞的选择性截留 (非活细胞由于释放毒性代谢物到培养环境中所以优选地从培养物中除去), (3) 长期培植的不间断操作, (4) 低能耗, (5) 操作与维护简便, (6) 对于大规模生产单元的放大能力, (7) 结构紧凑, 和 (8) 成本有效性。

[0029] 在特别优选的实施方案中, 所用的细胞截留装置准许细胞的部分截留。细胞截留装置和 / 或方法在本领域众所周知。其中许多以常规的沉积、离心和 / 或过滤技术为基础。细胞截留装置的非限制性实例包括微载体、旋转过滤器诸如微孔旋转过滤器、中空纤维、平板膜过滤器、沉降管、超声波细胞截留装置、重力沉降槽、离心机、声学细胞过滤器、基于介电电泳的细胞分离器等 (例如参见美国专利第 5, 019, 512 号 ; 第 5, 626, 734 号, 以引用的方式全部并入本文)。

[0030] 根据本文所述的培养系统的一个实施方案, 可以使用微载体作为细胞截留装置。微载体可以充当低成本可定标 (scalable) 表面, 非锚定依赖性细胞可以固定在上面以便帮助细胞截留。本文所用的“微载体”指代待用于悬浮培养中的足够小的颗粒, 优选地搅拌速率不会引起对细胞的显著剪切损伤。微载体可以为实心、多孔的, 或者具有实心核心和多孔涂层。微载体可以为, 例如但不限于, 基于纤维素或葡聚糖的, 并且它们的表面 (多孔载体情况下的外表面和内表面) 可以带正电。关于微载体的更多细节可见于例如 WO 02/29083 中, 该专利以引用的方式全部并入本文。

[0031] 在一个实施方案中, 微载体为大孔微载体。本文所用的“大孔微载体”指代具有以下性质的颗粒, 例如基于纤维素的颗粒 : (a) 足够小以允许用于悬浮培养中, 优选地搅拌速率不会引起对细胞的显著剪切损伤 ; 和 (b) 具有足够大小的孔和内部空间以允许细胞迁移到内部空间中。在一个实施方案中它们的表面 (外部和内部) 可以带正电。在一个实施方案中, 载体 : (a) 具有约 150 μm 与约 350 μm 之间的总体粒径 ; (b) 具有平均孔开口直径在约 15 μm 与约 40 μm 之间的孔 ; 和 (c) 具有约 0.8 meq/g 与 2.0 meq/g 之间的正电荷密度。在一些实施方案中, 正电荷由 DEAE (N,N-二乙氨基乙基) 基团提供。有用的大孔微载体包括但不限于 CYTOPORE 1TM 和 CYTOPORE 2TM (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ)。特别有用的大孔微载体为 CYTOPORE 2TM 载体, 其平均粒径为 230 μm , 平均孔径为 30 μm , 正电荷密度为 1.8 meq/g。

[0032] 在一些实施方案中, 搅动培养单元。如本领域中所知, 搅动可以包含振荡、搅拌、摇摆、振动等。在优选实施方案中, 利用具有挡板的 Rushton 型叶轮进行搅动。挡板可以在约 140 rpm, 对应于近似 40 W/m³ 的比功率 / 体积输出。在一些实施方案中, 比功率 / 体积输出大于约 40 W/m³, 例如约 50 W/m³、约 60 W/m³、约 70 W/m³、约 80 W/m³ 或更高。根据所使用的特定细胞或培养法适用时, 可以使用其它速度。

[0033] 如本文所述的微载体的浓度一般较低, 例如以便帮助保持稀释率和细胞密度在特定范围内。在一个实施方案中, 培养单元可以包含的微载体的量对应于在 0.05-1.0 g/L 范围内的微载体终浓度。在一个实施方案中, 微载体终浓度为约 0.05-0.1 g/L。在一个实施方案中, 微载体终浓度为约 0.1-0.25 g/L。在另一实施方案中, 微载体终浓度为约 0.25-0.5 g/L。在另一实施方案中, 微载体终浓度为约 0.5-0.75 g/L。在另一实施方案中, 微载体终浓度为约 0.75-1.0 g/L。在另一实施方案中, 载体浓度可以在连续培养期间增加或降低, 例如以便调整细胞密度和稀释率在预定范围内。

[0034] 所公开的连续细胞培养系统具有优选的稀释率 (D) 和优选的细胞密度。具体来说, 稀释率和细胞密度保持在预定值或预定范围内。此外, 所公开的连续细胞培养系统可以在整个工艺时间内具有极小比生长率或预定范围的比生长率。

[0035] 稀释率 (D) 指代每天供应的培养基体积除以培养物的体积。虽然本文所述的连续细胞培养系统涉及细胞截留, 但连续细胞培养系统的稀释率一般小于灌流培养的稀释率, 例如小于约 2 稀释体积 / 天 ($2d^{-1}$)。在一个实施方案中, 稀释率保持在大于约 $0.2d^{-1}$ 至小于约 $2.0d^{-1}$ 之间。在另一实施方案中, 稀释率保持在小于约 $2.0d^{-1}$, 例如小于约 $1.8d^{-1}$, 例如小于约 $1.5d^{-1}$, 例如小于约 $1.2d^{-1}$ 等。在另一实施方案中, 稀释率保持在小于约 $1.0d^{-1}$, 例如小于约 $0.9d^{-1}$, 例如小于约 $0.8d^{-1}$, 例如小于约 $0.7d^{-1}$, 例如小于约 $0.6d^{-1}$ 等。在另一实施方案中, 稀释率保持在大于约 $0.2d^{-1}$, 例如大于约 $0.3d^{-1}$, 例如大于约 $0.4d^{-1}$, 例如大于约 $0.5d^{-1}$ 等。

[0036] 另外, 在本文所述的连续细胞培养系统中, 细胞密度的值保持在小于灌流培养系统中所保持的值, 但高于恒化器系统中所达到的细胞密度。在一个实施方案中, 细胞密度小于约 2×10^7 细胞 / mL, 例如小于约 1.5×10^7 细胞 / mL, 例如小于约 1×10^7 细胞 / mL, 例如小于约 8×10^6 细胞 / mL, 例如小于约 6×10^6 细胞 / mL, 例如小于约 5×10^6 细胞 / mL。在另一实施方案中, 细胞密度可以为大于约 1×10^6 细胞 / mL, 例如大于约 1.5×10^6 细胞 / mL, 例如大于约 2×10^6 细胞 / mL, 例如大于约 3×10^6 细胞 / mL, 例如大于约 4×10^6 细胞 / mL 等。在另一实施方案中, 细胞密度保持在约 1.0×10^6 细胞 / mL 到约 2×10^6 细胞 / mL 之间。在另一实施方案中, 细胞密度保持在约 2×10^6 细胞 / mL 到约 4×10^6 细胞 / mL 之间。在另一实施方案中, 细胞密度保持在约 5×10^6 细胞 / mL 到约 1×10^7 细胞 / mL 之间, 例如约 6×10^6 细胞 / mL 到约 8×10^6 细胞 / mL 之间。在另一实施方案中, 细胞密度保持在约 1×10^7 细胞 / mL 到约 2×10^7 细胞 / mL 之间。

[0037] 所属领域的技术人员将认识到用以保持细胞密度的机制涉及减少利用细胞截留装置截留的细胞部分, 即降低细胞截留率。一般来说, 灌流培养的细胞截留率大于 90% 或 95%, 在许多情况下接近 100%。在所公开的连续细胞培养系统中, 细胞截留率小于 90%。在一个实施方案中, 细胞截留率小于约 85%, 例如小于约 75%。在一个实施方案中, 细胞截留率小于约 70%, 例如小于约 60%, 例如小于约 50%, 例如小于约 40%, 例如小于约 30%。在一个实施方案中, 细胞截留率保持在约 30% 与约 90% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 30% 与约 80% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 30% 与约 70% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 40% 与约 60% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 40% 与约 70% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 50% 与约 90% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 60% 与约 90% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 70% 与约 90% 之间。在另一实施方案中, 细胞截留率保持在约 80% 与约 90% 之间。

[0038] 培养物还可以利用稀释率和比生长率的比率来表征。比生长率 (μ) 指代每天每细胞质量的细胞质量增加 (相对于总细胞质量): $\mu = (\ln(X_t/X_{t-1})) / ((t) - (t-1))$; 其中 X_t 为时间 (t) 的生物物质浓度和 X_{t-1} 为前一时间点的生物物质浓度。一般来说, 如本文所述的连续培养系统的比生长率应当恒定在预定范围内, 优选在某一极低水平以确保生长相关的多肽和 / 或病毒表达的极低值。例如, 本文所述的连续培养系统的比生长率可以为约 $0.1d^{-1}$ 到约 $1.0d^{-1}$ 。在一个实施方案中, 本文所述的连续培养系统所保持的比生长率为大于约 $0.1d^{-1}$,

例如大于约 0.15d^{-1} , 例如大于约 0.2d^{-1} , 例如大于约 0.25d^{-1} , 例如大于约 0.3d^{-1} , 例如大于约 0.35d^{-1} 等。在另一实施方案中, 本文所述的连续培养系统所保持的比生长率为小于约 1.0d^{-1} , 例如小于约 0.8d^{-1} , 例如小于约 0.7d^{-1} , 例如小于约 0.6d^{-1} , 例如小于约 0.5d^{-1} , 例如小于约 0.45d^{-1} 。在另一实施方案中, 比生长率可以保持在约 0.1d^{-1} 到约 0.45d^{-1} 之间。在一个实施方案中, 本文所述的连续培养系统所保持的比生长率在约 0.15d^{-1} 到约 0.3d^{-1} 之间。在一个实施方案中, 本文所述的连续培养系统所保持的比生长率在约 0.2d^{-1} 到约 0.25d^{-1} 之间。

[0039] 如上文所述, 本文公开的连续培养系统保持小于约 2×10^7 细胞/mL 的细胞密度。如本文所述细胞密度可以得到保持的机制涉及保持稀释率与比生长率的特定比率。恒化器培养的稀释率近似等于比生长率, D/μ 比率近似为 1。灌流培养一般具有较高的绝对稀释率和非常低的比生长率, 故 D/μ 比率显著大于 1。但在本文公开的连续培养系统中, 优选保持稀释率稍高于比生长率。因此, 在本文公开的连续培养中, 保持大于 1 的 D/μ 比率。在特别优选的实施方案中, 依据截留装置的效率计算和设定稀释率以便保持比生长率在预定范围内。在一个实施方案中, 稀释率与比生长率的比率为大于约 1.0, 例如大于约 1.2, 例如大于约 1.5, 例如大于约 2, 例如大于约 2.5。在另一实施方案中, 稀释率与比生长率的比率为小于约 5, 例如小于约 4, 例如小于约 3。在一个实施方案中, D/μ 比率在约 1.2 与约 5 之间。在另一实施方案中, 稀释率与比生长率的比率在约 1.8 与约 3 之间。在另一实施方案中, 稀释率与比生长率的比率在约 2.0 与约 2.5 之间。

[0040] 本发明的方法可以在适当的培养单元或生物反应器中进行。生物反应器可以具有任何尺寸, 只要它适用于培养细胞, 例如哺乳动物细胞。由于具有低细胞密度的工艺一般容易放大, 所以本发明的方法对于大规模培养 (即, 培养体积大于 250L) 特别有利并且特别适合从小的实验室规模培养 (例如 10L) 放大到生产规模培养 (例如 250L 和 250L 以上), 其中培养条件进行极小修改。培养单元的内部条件, 包括但不限于 pH、 pO_2 和温度, 通常在培养期期间进行控制。生产培养单元指代在所关心多肽、病毒和 / 或任何其它产物的生产中使用的最终培养单元。大规模生产培养单元的体积一般大于约 250 升, 可以为约 300、约 500、约 800、约 1000、约 2500、约 5000、约 8000、约 10,000、约 12,000L 或更多, 或任何中间体积。适合的培养单元或生产培养单元可以由适合在其中所涵盖的培养条件下容纳悬浮于培养基中的细胞培养物以及有益于哺乳动物细胞生长和成活的任何材料构成 (即, 由所述材料构造)。适用材料的实例包括但不限于玻璃、塑料和 / 或金属。在优选实施方案中, 所述材料不干扰、或不显著干扰或大致不干扰所需产物例如所关心多肽和 / 或病毒的表达和 / 或稳定性。所属领域的技术人员将会认识到并且将能够选择适用于实践本发明连续培养系统的培养单元。

[0041] 在一些实施方案中, 细胞培养工艺在多于一个不同的培养单元中操作, 诸如使用一个或多个种子 (繁殖) 培养单元, 之后使用生产培养单元。这样, 在一些实施方案中, 该工艺涉及转移约 50L 繁殖后的种子培养物 (具有约 1.0×10^6 细胞/mL) 到含有约 150L 培养基的 250L 培养单元中。一般来说, 本文所述的连续培养系统仅施加至生产培养单元。例如, 首先使种子哺乳动物细胞在一个或多个种子培养单元中繁殖, 例如在分批式、流加式、灌流和 / 或恒化器系统中。在细胞转移到生产培养单元后, 可以根据本文所述的连续培养系统培养细胞, 例如利用细胞截留装置在稀释率小于约 2d^{-1} 和细胞密度小于约 2×10^7 细胞/mL 的

细胞培养系统中。

[0042] 或者,可以在一个物理培养单元中将细胞扩增到生产培养单元和生产阶段。例如,可以将细胞扩增到最终生产规模并将工艺切换到生产条件,由此可以使用针对本文所述的连续细胞培养系统的条件。

[0043] 意外发现,可以使用本发明的培养方法保持细胞密度和稀释率在预定范围内,例如以便支持持续时间类似于恒化器或灌流系统的生产阶段。“预定范围”表示目标范围,例如本文中针对根据本发明实施方案操作连续培养系统所述的范围。例如,在一些实施方案中,稀释率的目标范围在 0.2d^{-1} 到 2.0d^{-1} 之间,而细胞密度的目标范围为小于 2×10^7 细胞/mL。在另一实施方案中,稀释率保持为小于 2.0d^{-1} ,例如小于 1.8d^{-1} ,例如小于 1.5d^{-1} 或例如小于 1.2d^{-1} ,而细胞密度为小于 1.5×10^7 细胞/mL,例如小于 1×10^7 细胞/mL 或例如小于 8×10^6 细胞/mL。在一些实施方案中,比生长率为 0.1d^{-1} 到 1.0d^{-1} 且稀释率与比生长率的比率在 1.2 与 5 之间。在一些实施方案中,稀释率的目标范围在 0.5d^{-1} 到 1.0d^{-1} 之间且细胞密度为小于 5×10^6 细胞/mL。在一些实施方案中,比生长率为 0.15d^{-1} 到 0.3d^{-1} 且稀释率与比生长率的比率在 1.8 与 3 之间。在一些实施方案中,比生长率为 0.2d^{-1} 到 0.25d^{-1} 且稀释率与比生长率的比率在 2.0 与 2.5 之间。在特别优选的实施方案中,细胞密度为 5×10^6 细胞/mL 或更小,稀释率为小于 0.6d^{-1} ,且比生长率为 0.18 到 0.27d^{-1} 。在另一特别优选的实施方案中,细胞密度为小于 5×10^6 细胞/mL,稀释率在 0.55d^{-1} 与 0.6d^{-1} 之间,且比生长率为 0.16d^{-1} 到 0.26d^{-1} 。实施方案包括在总连续培养时间和/或生产阶段时间的至少约 50%,例如至少约 60%,例如至少约 70%,例如至少约 80%,例如至少约 90%,例如至少约 95%,例如至少约 98%,保持稀释率和/或细胞密度和/或比生长率和/或稀释率与比生长率的比率在目标范围(例如,上文提及的范围)内。

[0044] 本文所述的连续细胞培养系统可以允许由哺乳动物细胞持续产生所关心多肽和/或病毒。在一些实施方案中,细胞培养大于约 7 天的总连续细胞培养时间。在更优选的实施方案中,细胞培养大于约 9 天、大于约 14 天、大于约 21 天、大于约 28 天、大于约 35 天、大于约 40 天、大于约 45 天或大于约 50 天。

[0045] 术语“细胞培养基 (cell culture medium)”和“培养基”(culture medium 或简称“medium”)指代用于真核细胞生长的营养液,通常提供来自以下一个或多个种类的至少一种组分:(1) 促进培养基渗透压的盐(例如,钠、钾、镁、钙等);(2) 能源,通常呈诸如葡萄糖等碳水化合物的形式;(3) 所有必需氨基酸,和通常二十种氨基酸的基本集(basic set);(4) 维生素和/或所需的其它低浓度有机化合物;和(5) 微量元素,其中微量元素定义为通常需要的非常低浓度、通常在微摩尔浓度范围内的无机化合物。营养液任选地可以补充来自以下任一种类的一种或多种组分:(a) 动物血清;(b) 激素和其它生长因子诸如(例如)胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子;和(c) 植物、酵素和/或组织的水解产物,包括其蛋白质水解产物。

[0046] 在无血清培养基、化学成分明确的培养基或没有动物源性组分的培养基中培植表达所关心多肽和/或病毒的哺乳动物细胞时,本发明连续培养系统特别有用。化学成分明确的培养基是其中的所有组分具有已知的化学结构的培养基。化学成分明确的培养基可以从商业供应商获得,诸如(例如)Sigma、JRH Biosciences、Gibco 和 Gemini。在本发明的其它实施方案中,培养基可以含有来源于本领域中已知的任何来源或方法的氨基酸,包括

但不限于来源于添加一个或多个氨基酸或添加蛋白胨或蛋白质水解产物（包括动物、酵母或植物来源的水解产物）的氨基酸。

[0047] 支持在本发明条件下的细胞生长和保持的任何细胞培养基都可以使用。通常，培养基含有水、渗透压调节剂、缓冲剂、能源、氨基酸、无机或重组铁源、一种或多种合成或重组生长因子、维生素和辅因子。在优选实施方案中，培养基没有动物源性组分。本文所用的“动物源性”组分是完整动物中产生的任何组分（诸如（例如）从血清分离和纯化的蛋白质），或使用完整动物中产生的组分产生的任何组分（诸如（例如）使用从动物分离和纯化的酶来水解植物来源材料所得的氨基酸）。相比之下，具有动物蛋白的序列（即，具有动物基因组来源的序列）但是使用没有在完整动物中产生的或从完整动物分离和纯化的组分的培养基在体外的细胞培养中（诸如（例如）在重组酵母或细菌细胞中或在建立的重组或非重组的连续真核细胞细胞系中）产生的蛋白质，不是“动物源性”组分。例如，在酵母或细菌细胞中产生的胰岛素，或在建立的哺乳动物细胞系诸如 CHO、BHK 或 HEK 细胞中产生的胰岛素，或在 Namalwa 细胞中产生的干扰素，不构成“动物源性”组分。因此，没有动物源性组分的细胞培养基可以含有重组产生的动物蛋白；不过，这种培养基不含有例如动物血清或从动物血清纯化的蛋白质或其它产物。例如，这种培养基可以含有来源于植物的一种或多种组分。

[0048] 在本发明的其它实施方案中，在细胞生长阶段期间使用的培养基含有浓培养基，即所含的养分浓度高于正常需要的或正常提供给生长培养物的浓度的培养基。所属领域的技术人员将认识到哪些细胞培养基、接种培养基等适合培养特定细胞，例如动物细胞（例如 CHO 细胞）。例如，所属领域的技术人员将能够为特定培养物适当地选择葡萄糖和其它养分诸如谷氨酰胺、铁、微量元素等的量，以及其它培养变量，诸如（例如）发泡、渗透压等的量（例如参见 Mather, J. P., 等人 (1999) “Culture media, animal cells, large scale production,” Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2 : 777-785 (尤其第 780 页到第 783 页) ; 美国专利申请公开案第 2006/0121568 号 (尤其第 [0144] 段到第 [0185] 段和第 [0203] 段到第 [0331] 段) ; 两者均已引用的方式全部并入本文)。本发明还涵盖这些已知培养基的变体，包括例如这些培养基的养分富集变体、浓培养基、化学成分明确的培养基、无血清培养基，和另外根据本发明各种实施方案修改的培养基。

[0049] 连续培养系统不限于非锚定依赖性哺乳动物细胞的任何类型。哺乳动物细胞可以是表达所关心重组多肽（和 / 或重组病毒）的基因修饰哺乳动物细胞，或表达所关心多肽（和 / 或病毒）的未修饰哺乳动物细胞。许多哺乳动物细胞系为适合多肽和 / 或病毒重组表达的宿主细胞。哺乳动物宿主细胞系包括例如 COS、PER. C6、TM4、VERO、MDCK、BRL-3A、W138、Hep G2、MMT、MRC 5、FS4、CHO、293T、A431、3T3、CV-1、C3H10T1/2、Colo205、293、HeLa、L 细胞、BHK、HL-60、FRhL-2、U937、HaK、Jurkat 细胞、Rat2、BaF3、32D、FDCP-1、PC12、M1x、鼠骨髓瘤（例如 SP2/0 和 NS0）和 C2C12 细胞，以及转化的灵长类细胞系、杂交瘤、正常二倍体细胞，和来源于初生组织与初生外植体的体外培养的细胞株。可以适应悬浮培养的任何哺乳动物细胞都可以在所公开的细胞培养方法中使用。非限制性实例包括 CHO 细胞，其在血清和适当表面存在下培植时具有锚定依赖性，但很容易适应悬浮培养中的生长（参见例如 Rasmussen 1998, Cytotechnology 28 : 第 31-42 页，尤其第 34-37 页，关于培养无血清 CHO

细胞系)。能够表达所关心多肽和 / 或病毒 (不管是重组产生或非重组产生) 的任何哺乳动物细胞也都可以是在所公开的细胞培养方法中使用。在一个实施方案中, 可以使用本文公开的连续细胞培养方法来使锚定依赖性细胞系改造成非锚定依赖性细胞系。许多细胞系可以从商业来源诸如美国菌种保藏中心 (ATCC) 获得。在一个实施方案中, 使用连续细胞培养系统来培养基因修饰 CHO 细胞。

[0050] 如本文所述, 连续细胞培养系统可以进行所关心多肽和 / 或病毒 (例如重组多肽和 / 或重组病毒) 的回收。多肽和 / 或病毒通常从自系统除去的用过的培养基中回收。本发明优选实施方案的优点包括降低蛋白质和 / 或病毒在生物反应器中的滞留时间, 这对容易降解的产物特别有用。不过, 本文公开的连续细胞培养系统并不限于这类不稳定多肽或病毒, 也可以用于其它所关心多肽或病毒的回收。

[0051] 本发明涉及用于表达一种或多种所关心蛋白质和 / 或病毒的哺乳动物细胞的改进大规模连续培养的方法, 不管所述表达是来自内源基因或自然感染, 或是向所述细胞中引入编码所关心蛋白质或病毒的重组基因之后。所述蛋白质的非限制性实例包括酶、激素、抗体、蛋白质受体、融合蛋白 (例如可溶受体与 IgG 的 Fc 域的融合蛋白)、疫苗、细胞因子、趋化因子、生长因子、血液因子蛋白等。在一个实施方案中, 所关心蛋白质是 ADAMTS13。在另一实施方案中, 所关心蛋白质是因子 VII 或因子 VIII。在另一实施方案中, 所关心蛋白质是 α -1- 蛋白酶抑制剂。

[0052] 本发明还涉及用于表达一种或多种所关心病毒 (包括病毒颗粒和病毒载体) 的哺乳动物细胞的改进大规模连续培养的方法, 不管所述病毒是野生型还是重组病毒。所述野生型或重组病毒、病毒颗粒和 / 或病毒载体的非限制性实例包括腺病毒、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒、流感病毒等。重组病毒、病毒颗粒的产生以及重组病毒载体的使用在本领域众所周知。对于病毒的表达, 本发明的方法特别适合但不限于利用非溶解性 (non-lytic) 病毒诸如 (例如) A 型肝炎和 TBE 病毒的感染和这些病毒在例如 Vero 细胞中的表达, 或者利用慢病毒的感染和这些病毒在例如 HEK293 或其它人或哺乳动物细胞系中的表达。

[0053] 一旦培养基自培养单元中除去, 就可以使它经历一种或多种加工步骤以获得所关心蛋白质和 / 或病毒。下游加工步骤包括但不限于离心和 / 或过滤以除去先前未从培养物取出的细胞; 亲和色谱法、疏水性相互作用色谱法; 离子交换色谱法; 尺寸排除色谱法; 电泳程序 (例如制备型等电点聚焦 (IEF)、差别溶解度 (例如硫酸铵沉淀法)、萃取等。大体上, 参见 Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, 纽约, 1982; 和 Protein Purification, 编著 J. -C. Janson 和 Lars Ryden, VCH Publishers, 纽约, 1989。

[0054] 在某些实施方案中, 让哺乳动物细胞经历预培养步骤, 例如使细胞适应所关心多肽和 / 或病毒的产生的预培养步骤。在一些实施方案中, 所述适应包含悬浮预培养细胞, 例如持续的时间使培养物达到例如约 5L、约 8L、约 10L、约 12L、约 15L 或约 20L 等的所需最终工作体积。此时, 将培养物切换到连续培养基进料并根据本文所述的连续细胞培养系统进行操作。

[0055] 在下面提供的实施例中进一步讨论本文公开的本发明的示例性实施例。但是所述实施例和它们的具体细节并非意在限制本发明。

[0056] 实施例

[0057] 实施例 1: 在化学成分明确的 BACD-A13 培养基 (富集的 DMEM/F12 调配物) 中利

用表达人 ADAMTS13 的重组 CHO 细胞系制备恒化器培养物,所述培养基如表 1.1 中所示进行补充。

[0058]

表 1.1: 细胞培养基 BACD-A13 的组成	
组分	浓度[g/kg]
DMEM/HAMS F12 BaxS9	12.74
L-谷氨酰胺	1.3
Synperonic	1.00
乙醇胺	0.00153
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
NaHCO ₃	1.5

[0059] 使表达人 ADAMTS13 的重组 CHO 细胞适应化学成分明确的培养基,即 BCS 培养基,如表 1.2 中所示。

[0060]

表 1.2: 细胞培养基 BCS 的组成	
组分	浓度[g/kg]
DMEM/HAMS F12 Bax Special	11.75
L-谷氨酰胺	0.9
Synperonic	1.00
乙醇胺	0.00153
腐胺·2HCl	0.0036
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0006
NaHCO ₃	2.0

[0061] 使发展工作细胞库 (Development Working Cell Bank) 融化,在 BCS 培养基中制备细胞接种物。把细胞转移到具有 Rushton 型叶轮的 10L 培养单元中,在 BACD-A13 培养基中的重复分批式培养中培植,利用线内控制参数,如下: pH 7.10, 温度 36℃, 和 DO 20% 空气饱和。

[0062] 2 批次循环后,培养物达到最终工作体积 10L,第 4 天把培养物切换到连续培养基进料,并一直以恒化器模式操作到第 18 天。

[0063] 利用此培养物,对具有 Rushton 型叶轮和细胞截留装置的第二个 10L 培养单元接种以用于类似恒化器灌流,使用同样的细胞培养基,并在重复分批式培养中培植 8 天。添加 CYTOPORE 2™ 微载体 (GE Healthcare) (0.25g/L),进一步以连续类似恒化器灌流模式操作培养单元,与恒化器模式的另一培养单元并行进行。在 140rpm 下利用具有挡板的 Rushton 型叶轮搅动培养单元,所述 140rpm 对应于近似 40W/m³ 的比功率 / 体积输出。

[0064] 两种培养单元并行操作 24 天。以 3 个周间隔和另一 3 天的间隔计算数据 (表 1.3 (恒化器) 和表 1.4 (类似恒化器灌流))。表 1.3 中四个间隔 (第 26-32 天、第 33-39 天、第 40-46 天和第 47-49 天) 的数据直接与表 1.4 中所示的四个间隔 (第 9-15 天、第 16-22 天、第 23-29 天和第 30-32 天) 的数据进行比较。

[0065] 从培养单元取样,利用 ELISA 分析 ADAMTS13 浓度,利用 FRET-73 试验分析

ADAMTS13 活性。利用 Nucleocounter 技术测定细胞计数。对于灌流培养物, 分开测量总细胞计数和上清液中的细胞计数以计算相对细胞截留。测量稀释率, 使用稀释率计算生长率和体积生产率。下面提供方程

[0066] 恒化器培养中的生长率 (μ) 使用方程 $\mu = D + \ln(X_t/X_{t-1}) / (t-t_{-1})$ 计算, 其中 D = 稀释率, X_t = 时间 t 时的总细胞密度, 和 $(t-t_{-1}) = t$ 与 t_{-1} 之间的时间。

[0067] 类似恒化器灌流培养中的生长率 (μ) 使用方程 $\mu = \ln(X_t/X_{t-1}) / (t-t_{-1}) + D \times (\log \text{mean } X_{\text{SN}} / \log \text{mean } X) / (t-t_{-1})$ 计算; 其中 D = 稀释率, X_t = 时间 t 时的总细胞密度, $(t-t_{-1}) = t$ 与 t_{-1} 之间的时间, $\log \text{mean } X$ = 总细胞密度的对数平均值 = $(X_t - X_{t-1}) / (\ln(X_t) - \ln(X_{t-1}))$, 和 $\log \text{mean } X_{\text{SN}}$ = 上清液细胞密度的对数平均值。

[0068] 细胞截留率计算为 $100 \times (1 - X_{\text{SN}}/X) [\%]$ 。

[0069]

表1.3: 恒化器培养的发酵悬浮数据

间隔	ZZ.-Nuc.	D	μ	Adamts Frets	Adamts ELISA	比活 性	P Frets	P ELISA	qp Frets	qp ELISA
天数	[1 E6/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	U/mg	[U/L/d]	[mg/L/d]	[mU/E06/d]	[μ g/E06/d]
0-4	n.a.	分批式	0.420	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5-11	2.76	0.353	0.369	4314.4	4.09	1055	1523	1.44	551	0.52
12-18	2.01	0.309	0.299	9148.8	8.45	1083	2830	2.61	1407	1.30
19-25	1.82	0.311	0.300	8609.6	8.67	993	2677	2.70	1473	1.48
26-32	1.76	0.309	0.304	8868.2	9.96	891	2742	3.08	1560	1.75
33-39	1.84	0.321	0.337	7845.4	10.10	777	2519	3.24	1369	1.76
40-46	1.97	0.330	0.340	8098.7	9.24	877	2674	3.05	1358	1.55
47-49	2.02	0.361	0.343	7353.7	9.30	791	2658	3.36	1314	1.66
平均值 26-49	1.90	0.330	0.331	8041.5	9.65	834	2648	3.18	1400	1.68

[0070]

表 1.4: 类似恒化器培养的发酵悬浮数据

间隔	总CC	上清液 CC	细胞 截留 率	D	μ	Adamts Frets	Adamts ELISA	比活 性	P Frets	P ELISA	ln qp Frets	ln qp ELISA
天数	[1x10 E6/ml]	[1x10 E6/ml]	%	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	U/mg	[U/L/d]	[mg/L/d]	[mU/E06/d]	[mU/E06/d]
0-8	n.a.	n.a.	n.a.	分批 式	0.398	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9-15	2.04	0.82	60	0.37	0.271	5804.4	6.25	929	2176	2.34	1068	1.15
16-22	3.75	1.14	70	0.44	0.192	8863.5	10.18	871	3889	4.46	1037	1.19
23-29	5.86	1.53	74	0.53	0.178	11873.6	11.03	1076	6292	5.84	1073	1.00
30-32	8.05	1.30	84	0.62	0.175	9398.6	10.61	886	5794	6.54	719	0.81
平均 值 9-32	4,93	1,20	72	0.49	0.204	8985.0	9.52	941	4538	4.80	974	1.04

[0071] 分批式培养中细胞的比生长率约为 0.42d^{-1} 。切换到恒化器培养后,观察到比生长率下降到近似 0.30d^{-1} ,这指示了化学成分明确的培养基中限制生长的条件。细胞密度平衡在 $1.8\text{--}2\times 10^6$ 细胞/mL 的范围内。在所述连续培养条件下,达到稳态(在间隔 12–18 中开始),并且可以达到超过 2500U/L/d 。

[0072] 如上所述,对具有细胞截留装置的培养单元接种后,第 18 天,进一步在连续类似恒化器灌流模式中培植细胞。由于细胞截留作用,使得类似恒化器灌流培养物中的细胞密度增加。不过,由于细胞截留率相对较低(平均 72%;范围 60%–84%),所以细胞密度保持在 $< 1\times 10^7$ 细胞/mL 的相对低水平(平均 4.93×10^6 细胞/mL),最大稀释率为 0.62d^{-1} 。

[0073] 低细胞截留率还允许细胞保持 $0.18\text{--}0.27\text{d}^{-1}$ 的连续比生长率,而不会导致过量的细胞密度。这对于以生长相关方式表达重组蛋白的重组细胞来说可视为一个优点。尽管比生产率降低(例如 974mU/E06/d vs. 1400mU/E06/d),但是由于细胞密度高达近似 2.8 倍,使得体积生产率从 2648U/L/d 到 4538U/L/d 增加超过 70%。重组蛋白的比活性也得到提高(941U/mg vs. 834U/mg),可能是因为在培养单元中的滞留时间降低进而提高了稳定性,或者对所表达的重组 ADAMTS13 的结构和功能的任何其它有益作用。

[0074] 实施例 2:在化学成分明确的 BACD-A13 培养基(富集的 DMEM/F12 调配物)中利用表达人 ADAMTS13 的重组 CHO 细胞系制备恒化器培养物,所述培养基如表 1.1 中所示进行补充。

[0075] 使表达人 ADAMTS13 的重组 CHO 细胞适应化学成分明确的培养基,即 BCS 培养基,如表 1.2 中所示。使发展工作细胞库融化,在 BCS 培养基中制备细胞接种物。把细胞转移到具有叶片叶轮的 1.5L 培养单元中,在 BACD-A13 培养基中的重复分批式培养中培植,利用线内控制的 pH 7.1,温度 36°C ,和 DO 20% 空气饱和。

[0076] 2 批次循环后,培养物达到最终工作体积 1.5L,第 5 天把培养物切换到连续培养基进料,并一直以恒化器模式操作到第 7 天。

[0077] 利用此培养物,对包含具有叶片叶轮的细胞截留装置的第二个培养单元接种,使用同样的细胞培养基,并在分批式培养中培植 1 天。添加 CYTOPORE 2™ 微载体(GE Healthcare) (0.25g/L),进一步以连续类似恒化器灌流模式操作培养单元,与恒化器模式的另一培养单元并行进行。

[0078] 两种培养单元并行操作 28 天。以 4 个周间隔计算数据(表 2.1(恒化器)和表 2.2(类似恒化器灌流模式))。

[0079] 从培养单元取样,利用 ELISA 分析 ADAMTS13 浓度,利用 FRETs-73 试验分析 ADAMTS13 活性。利用 Nucleocounter 技术确定细胞计数。对于类似恒化器灌流培养物,分开测量总细胞计数和上清液中的细胞计数以计算相对细胞截留。测量稀释率,使用稀释率计算生长率和体积生产率。

[0080] 恒化器培养中的生长率(μ)使用方程 $\mu = D + \ln(X_t/X_{t-1})/(t-t_{-1})$ 计算,其中 D = 稀释率, X_t = 时间 t 时的总细胞密度,和 $(t-t_{-1}) = t$ 与 t_{-1} 之间的时间。

[0081] 类似恒化器灌流培养中的生长率(μ)使用方程 $\mu = \ln(X_t/X_{t-1})/(t-t_{-1}) + D \times (\log\text{mean } X_{\text{SN}}/\log\text{mean } X)/(t-t_{-1})$ 计算;其中 D = 稀释率, X_t = 时间 t 时的总细胞密度, $(t-t_{-1}) = t$ 与 t_{-1} 之间的时间, $\log\text{mean } X$ = 总细胞密度的对数平均值 = $(X_t - X_{t-1})/(\ln(X_t) - \ln(X_{t-1}))$,和 $\log\text{mean } X_{\text{SN}}$ = 上清液细胞密度的对数平均值。

[0082] 细胞截留率计算为 $100 \times (1 - X_{SN}/X) [\%]$ 。

[0083]

表 2.1: 恒化器培养的发酵悬浮数据										
间隔	总CC	D	μ	Adamts Frets	Adamts ELISA	比活性	P Frets	P ELISA	qp Frets	qp ELISA
天数	[1x10 E6/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	U/mg	[U/L/d]	[mg/L/d]	[mU/E06/d]	[μ g/E06/d]
0-5	n.a.	分批式	0.507	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9-15	1.87	0.345	0.340	2879.8	2.987	964	994.0	1.031	533.0	0.553
16-22	1.21	0.298	0.253	3483.7	3.755	926	1042.9	1.123	867.7	0.933
23-29	1.02	0.270	0.262	3726.6	3.928	946	951.8	1.008	957.9	1.021
30-36	0.83	0.279	0.268	2551.1	2.858	895	691.8	0.780	837.7	0.948
平均值 9-36	1.23	0.298	0.281	3160.3	3.382	933	920.1	0.986	799.1	0.864

[0084]

表2.2: 类似恒化器灌流培养的发酵悬浮数据												
间隔	总 CC	上清液 CC	细胞截 留率	D	μ	Adamts Frets	Adamts ELISA	比活性	P Frets	P ELISA	q Frets	q ELISA
天数	[1x10 E6/ml]	[1x10 E6/ml]	%	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[μ g/ml]	U/mg	[U/L/d]	[mg/L/d]	[mU/E06/d]	[μ g/E06/d]
02-08	1.96	1.22	38	0.449	0.262	2767.4	3.180	870	1241.6	1.427	634.6	0.729
09-15	2.95	1.12	62	0.442	0.256	4726.5	4.788	987	2090.0	2.117	707.7	0.717
16-22	3.90	1.06	73	0.592	0.207	3855.3	4.071	947	2281.5	2.409	585.6	0.618
23-29	3.57	1.00	72	0.604	0.205	2671.2	3.027	882	1613.4	1.829	451.8	0.512
30-36	3.52	1.13	68	0.594	0.222	2559.4	2.761	927	1519.5	1.639	431.3	0.465
37-43	4.20	1.18	72	0.571	0.219	2828.7	2.905	974	1615.2	1.659	384.7	0.395
44-49	4.30	1.21	72	0.566	0.159	2705.0	3.110	870	1530.0	1.759	355.9	0.409
平均值 02-29	3.09	1.10	61	0.522	0.232	3505.1	3.767	922	1806.6	1.945	594.9	0.644
平均值 02-49	3.49	1.13	68	0.545	0.219	3159.1	3.406	922	1698.8	1.834	507.3	0.549

[0085] 分批式培养中表达 ADAMTS-13 的重组 CHO 细胞的比生长率约为 $0.51d^{-1}$ 。切换到恒化器培养后,观察到比生长率下降到小于 $0.30d^{-1}$,这指示了化学成分明确的培养基中限制生长的条件。细胞密度平衡在 $0.8-1.2 \times 10^6$ 细胞 /mL 的范围内,比生长率为 $0.25-0.27d^{-1}$ 。在所述连续培养条件下,达到稳态(在间隔 16-36 中开始)。第 09-36 天的全部 4 个间隔的平均生产率为 920U/L/d。

[0086] 如上所述,对具有细胞截留装置的培养单元接种后,第 7 天,进一步在连续类似恒化器模式中培植细胞。表 2.1 的四个间隔(第 9-15 天、第 16-22 天、第 23-29 天和第 30-36 天)的数据和第 9-36 天的平均值直接与表 2.2 的四个间隔(第 2-8 天、第 9-15 天、第 16-22 天和第 23-29 天)的数据和第 2-29 天的平均值进行比较。

[0087] 然后对类似恒化器灌流培养操作(没有恒化器作为参照)另外 3 个间隔(第 30-36

天、第 37-43 天和第 44-49 天) 以证实类似恒化器灌流培养的长期稳定性。7 周连续培养的平均值在表 2.2 中提供(第 2-49 天的平均值)。

[0088] 由于细胞截留作用,使得灌流培养物中的细胞密度增加。不过,由于细胞截留率相对较低(第 02-29 天的平均值:61%,第 02-49 天的平均值:68%,范围 38%-72%),所以细胞密度保持在 $< 5 \times 10^6$ 细胞/mL 的相对低水平(第 02-49 天的平均值 $= 3.49 \times 10^6$ 细胞/mL)。在第 3 个间隔达到近似 0.60d^{-1} 的最大稀释率,随后保持恒定在 0.55d^{-1} - 0.60d^{-1} 之间,直到实验结束(第 02-49 天的平均值: 0.55d^{-1})。

[0089] 低细胞截留率还允许细胞保持 0.16 - 0.26d^{-1} 的连续比生长率(第 02-49 天的平均值: 0.22d^{-1})而不会导致过量的细胞密度。尽管比生产率降低(例如 595mU/E06/d vs. 799mU/E06/d),但是由于细胞密度高达近似 2.8 倍,使得体积生产率从 920U/L/d 到 1807U/L/d (前 4 个间隔的平均值)增加超过 90%。对于另外 3 个间隔,类似恒化器培养的生产率保持相对稳定在 1500 - 1600U/L/d 的范围内。

[0090] 如实施例 1 中一样,证实这种利用降低的细胞截留率来稳定连续悬浮培养物的方法可以弥补某些培养条件下的严重生长限制的缺点(例如,使用化学成分明确的培养基时)。因此,控制细胞截留作用能够使该培养保持在相对适中的细胞密度和相对低的恒定稀释率。也是由于相对低的细胞截留率,使得该培养保留了连续悬浮培养的较多特点,例如由比生长率所显示。

[0091] 本文中提及的所有专利、专利公开案和其它出版物以引用的方式并入本文,并入程度就如同每个个别的出版物、专利或专利公开案被具体和单独地说明以引用的方式并入一样。

[0092] 在阅读了前文描述之后,所属领域的技术人员可以进行某些修改和改进。应理解,为了简明易读,所有这些修改和改进在本文中省略。尽管如此,所有这些修改和改进仍涵盖在本发明的范围内并且恰当地处于所附权利要求书的范围内。