



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.23

(21) Номер заявки
201391826

(22) Дата подачи заявки
2012.06.29

(51) Int. Cl. **C12N 5/00** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(31) **61/503,737**

(32) **2011.07.01**

(33) **US**

(43) **2014.04.30**

(86) **PCT/US2012/045070**

(87) **WO 2013/006479 2013.01.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Фоллстад Брайан Д., Маккой
Ребекка Е., Моррис Арвни Е. (US)**

(74) Представитель:
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Кондакова
Е.В., Соболев А.Ю. (RU)**

(56) WO-A1-2006026445
CHEN Z.-L. ET AL.: "Temperature shift as a process optimization step for the production of pro-urokinase by a recombinant Chinese hamster ovary cell line in high-density perfusion culture", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 97, no. 4, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 239-243, XP008105293, ISSN: 1389-1723, DOI: 10.1016/S1389-1723(04)70198-X the whole document

JENG-DAR YANG ET AL.: "Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 69, no. 1, 5 July 2000 (2000-07-05), pages 74-82, XP002619089, ISSN: 0006-3592, DOI: [retrieved on 2000-05-15] the whole document

HAYTER P.M. ET AL.: "CHINESE HAMSTER OVARY CELL GROWTH AND INTERFERON PRODUCTION KINETICS IN STIRRED BATCH CULTURE", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 34, 1 January 1991 (1991-01-01), pages 559-564, XP001088303, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/BF00167898 the whole document

CHU L. ET AL.: "Industrial choices for protein production by large-scale cell culture", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 12, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 180-187, XP003014088, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00197-X the whole document

JEE YON KIM ET AL.: "CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 93, no. 3, 9 December 2011 (2011-12-09), pages 917-930, XP035006081, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-011-3758-5 the whole document

WO-A1-2006128908

SAUER PAUL W. ET AL.: "A high-yielding, generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 67, no. 5, 5 March 2000 (2000-03-05), pages 585-597, XP002690472, ISSN: 0006-3592 the whole document

MICHAEL BUTLER: "Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 68, no. 3, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 283-291, XP019331930, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-005-1980-8 the whole document

RODRIGUEZ J. ET AL.: "High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 150, no. 4, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 509-518, XP027516641, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2010.09.959 [retrieved on 2010-11-23] figure 5

MATTHEW L. LIPSCOMB ET AL.: "Production of a secreted glycoprotein from an inducible promoter system in a perfusion bioreactor", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, AMERICAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS, US, vol. 20, no. 5, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1402-1407, XP002623481, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/BP049973J [retrieved on 2008-09-05] the whole document

(57) Изобретение представляет способ культивирования клеток млекопитающих. Способ дает больший контроль над ростом клеток для получения большого значения титра клеточных культур.

Область изобретения

Настоящее изобретение представляет способ культивирования клеток млекопитающих. Способ дает больший контроль над ростом клеток для получения клеточных культур с высоким титром.

Уровень техники

С ростом потребности во все больших количествах терапевтических рекомбинантных белков увеличение роста клеток, жизнеспособности и продуцирование белка может быть достигнуто с помощью применения новых способов улучшения развития клеток, оптимизацией рабочей среды и параметров управления процессом. Сейчас большие усилия прилагаются к оптимизации процесса, в частности к способам и принципам культивирования, питания и поддержания продуцирования культур клеток.

Сейчас способы культивирования клеток, обеспечивающие относительные улучшения в производстве рекомбинантных белков являются очень ценными, если учитывать в крупном масштабе расходы на культивирование клеток и растущую потребность в большем ее количестве и меньшей стоимости биологических продуктов.

Существует потребность в усовершенствовании процессов культивирования клеток, экспрессии рекомбинантных полипептидов, титра и жизнеспособности клетки, которые могут привести к большему уровню производства, уменьшая таким образом расходы, связанные с производством белкового терапевтического средства. Настоящее изобретение удовлетворяет эти потребности, давая простой, легкий и недорогой способ регулирования роста клеток с увеличением производства белка.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение представляет способ ограничения роста клеток при культивировании клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок, который включает помещение клеток млекопитающих в бессывороточную среду для культивирования в биореакторе; индуцирование задержки пролиферации клеток с помощью перфузии бессывороточной средой для культивирования с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее; поддерживание клеток млекопитающих в условиях задержки пролиферации с помощью перфузии бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее.

Настоящее изобретение также представляет способ увеличения продуцирования рекомбинантных белков при культивировании клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок, который включает помещение клеток млекопитающих в бессывороточную среду для культивирования в биореакторе; индуцирование задержки пролиферации клеток с помощью перфузии бессывороточной средой для культивирования с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее; поддерживание клеток млекопитающих в условиях задержки пролиферации с помощью перфузии бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее. В связанных вариантах осуществления продуцирование рекомбинантных белков при культивировании клеток млекопитающих увеличено по сравнению с культивированием, при котором клетки не подвергаются индуцируемой L-аспарагином задержке пролиферации.

Настоящее изобретение также представляет способ ограничения культуры клеток млекопитающих, экспрессирующей рекомбинантный белок, при желаемом объеме уплотненных клеток путем помещения клеток млекопитающих в бессывороточную среду для культивирования в биореакторе; индуцирование задержки пролиферации клеток с помощью перфузии бессывороточной средой для культивирования с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее; поддерживание клеток млекопитающих в условиях задержки пролиферации с помощью перфузии бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в любом из вышеуказанных способов перфузия бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее начинается на третий день культивирования или после третьего дня. В другом варианте осуществления в любом из вышеуказанных способов индуцирование задержки пролиферации клеток происходит до начала фазы продуцирования. В другом варианте осуществления в любом из вышеуказанных способов индуцирование задержки пролиферации клеток происходит во время фазы продуцирования. В другом варианте осуществления в любом из вышеуказанных способов задержка пролиферации индуцируется недостатком L-аспарагина. В другом варианте осуществления в любом из указанных способов имеет место изменение температуры от 36 до 31°C. В другом варианте осуществления в любом из указанных способов имеет место изменение температуры от 36 до 33°C. В связанном варианте осуществления изменение температуры происходит при переходе от фазы роста к фазы продуцирования. В другом варианте осуществления изменение температуры происходит во время фазы продуцирования. В другом варианте осуществления способ предусматривает поддержание объема уплотненных клеток менее или равным 35% во время фазы продуцирования. В связанном варианте осуществления объем уплотненных клеток во время фазы продуцирования менее или равен 35%.

Настоящее изобретение также представляет способ культивирования клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок; помещение культуры клеток в бессывороточную среду в биореакторе; выращивание клеток млекопитающих во время фазы роста подпитывание культуральной среды с помощью болюсной подачи бессывороточной среды и поддерживание клеток млекопитающих во время фазы продуцирования с помощью перфузии бессывороточной средой, при этом объем уплотненных клеток во время фазы продуцирования составляет 35% или менее. В одном варианте осуществления настоя-

шего изобретения перфузия начинается на 5-9 день культивирования клеток. В связанном варианте осуществления перфузия начинается на 5-7 день культивирования клеток. В одном варианте осуществления перфузия начинается, когда клетки достигают фазы продуцирования. В другом варианте осуществления способ включает задержку пролиферации клеток, индуцируемую с помощью недостатка L-аспарагина, с последующей перфузией бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее. В другом варианте осуществления способ включает индуцирование задержки пролиферации клеток, вызванное перфузией бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет 5 мМ или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет 4,0 мМ или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет 3,0 мМ или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет 2,0 мМ или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет 1,0 мМ или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной перфузионной среде составляет 0 мМ. В другом варианте осуществления перфузия происходит со скоростью, которая растет во время фазы продуцирования от 0,25 рабочего объема до 1,0 рабочего объема в день во время культивирования клеток. В связанном варианте осуществления перфузия происходит со скоростью, достигающей 1,0 рабочего объема в день с девятого по одиннадцатый день культивирования клеток. В другом связанном варианте осуществления перфузия происходит со скоростью, достигающей 1,0 рабочего объема в день на десятый день культивирования клеток. В другом варианте осуществления болюсная подача бессывороточной среды начинается на третий или четвертый день культивирования клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ включает изменение температуры от 36 до 31°C. В другом варианте осуществления способ включает изменение температуры от 36 до 33°C. В связанном варианте осуществления изменение температуры происходит при переходе от фазы роста к фазе продуцирования. В связанном варианте осуществления изменение температуры происходит во время фазы продуцирования.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание L-аспарагина в культуральной среде отслеживается до и во время создания недостатка L-аспарагина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения объем уплотненных клеток составляет 35% или менее. В связанном варианте осуществления объем уплотненных клеток составляет 30% или менее.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения плотность жизнеспособных клеток в культуре клеток млекопитающих с объемом уплотненных клеток, равным или меньшим 35%, составляет от 10×10^6 до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В связанном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток в культуре клеток млекопитающих составляет от 20×10^6 до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения перфузия является непрерывной перфузией.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения скорость перфузии является постоянной.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения перфузия происходит со скоростью, меньшей или равной 1,0 рабочего объема в день.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения культура клеток млекопитающих помещается в биореактор путем введения как минимум от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл бессывороточной среды. В связанном варианте осуществления культура клеток млекопитающих помещается путем введения в биореактор как минимум от $0,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл бессывороточной среды.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения перфузия осуществляется изменяющимся тангенциальным потоком.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения емкость биореактора составляет как минимум 500 л. В связанном варианте осуществления емкость биореактора составляет как минимум от 500 до 2000 л. В другом связанном варианте осуществления емкость биореактора составляет как минимум от 1000 до 2000 л.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения клетками млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (ЯКХ).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок выбирается из группы, включающей человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантный слитый белок или цитокин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения любые из вышеуказанных способов содержат стадию сбора рекомбинантного белка, произведенного клеточной культурой.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок, произведенный клеточной культурой, очищается и формируется в фармацевтически приемлемый препарат.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - начало культивирования с подпитыванием: сплошной квадрат (■) и сплошной круг (●); начало периодического культивирования: незаполненный квадрат (□) и незаполненный круг (○);
 фиг. 1А - плотность жизнеспособных клеток, фиг. 1В - жизнеспособность, фиг. 1С - титр;
 фиг. 2 - начало периодического культивирования: незаполненный круг (○), начало культивирования с подпиткой с сильным перемешиванием: незаполненный квадрат (□);
 фиг. 2А - плотность жизнеспособных клеток, фиг. 2В - жизнеспособность, фиг. 2С - титр, фиг. 2D - содержание аспарагина;
 фиг. 3 - 1,0 начальный объем перфузии, без изменения температуры: сплошной круг. 1,0 начальный объем перфузии, без изменения температуры: незаполненный круг (○). 0,75 начальный объем перфузии, без изменения температуры: сплошной квадрат (■). 0,75 начальный объем перфузии, без изменения температуры: незаполненный квадрат (□);
 фиг. 3А - плотность жизнеспособных клеток, фиг. 3В - жизнеспособность, фиг. 3С - титр;
 фиг. 4 - начало периодического культивирования с низким содержанием аспарагина: незаполненный треугольник (Δ). Начало периодического культивирования с регулируемым количеством L-аспарагина: сплошной треугольник (▲). Начало культивирования с подпиткой с низким содержанием L-аспарагина: незаполненный ромб (◇). Начало культивирования с подпиткой с регулируемым количеством L-аспарагина: сплошной квадрат (◆). Обработка с помощью перфорированной трубки: сплошная линия. Обработка с помощью разбрызгивателя: пунктирная линия;
 фиг. 4А - плотность жизнеспособных клеток, фиг. 4В - жизнеспособность, фиг. 4С - титр, учитывающий объем уплотненных клеток;
 фиг. 5 - культуры, выращенные в среде с содержанием 17,3 или 5 мМ L-аспарагина и 4,6 или 10 мМ L-глутамин. 17,3 мМ L-аспарагина и 4,6 мМ L-глутамин, сплошной ромб (◆) или 5 мМ L-аспарагина, 10 мМ L-глутамин, незаполненный ромб (◇);
 фиг. 5А - плотность жизнеспособных клеток, фиг. 5В - титр, фиг. 5С - объем уплотненных клеток, фиг. 5D - титр, учитывающий объем уплотненных клеток, фиг. 5Е - жизнеспособность;
 фиг. 6 - культивирование в 2 л лабораторном масштабе и 500 л полупромышленном масштабе с 5 мМ L-аспарагина, 10 мМ L-глутамин; среда содержит 5 мМ L-аспарагина, 10 мМ L-глутамин в 2 л лабораторном масштабе представлена сплошным ромбом (◆), 500 л полупромышленном масштабе представлена незаполненным ромбом (◇);
 фиг. 6А - плотность жизнеспособных клеток, фиг. 6В – титр, фиг. 6С - объем уплотненных клеток, фиг. 6D - титр, учитывающий объем уплотненных клеток, фиг. 6Е - жизнеспособность.

Подробное описание изобретения

Во время продуцирования рекомбинантных белков желательно иметь контролируруемую систему, в которой клетки выращиваются до желаемой плотности, а затем физиологическое состояние клеток переключается на режим ограничения роста, состояние высокой производительности, в котором клетки используют энергию и субстраты для продуцирования интересующего рекомбинантного белка вместо получения большего числа клеток. Способы достижения этой цели, такие как изменение температуры и низкомолекулярные индукторы, не всегда успешны и могут иметь нежелательное воздействие на качество продукта. Как описано здесь, объем уплотненных клеток может быть ограничен желаемым уровнем во время фазы продуцирования с помощью индуцирования задержки пролиферации клеток в культивируемых клетках путем создания условий с низким содержанием L-аспарагина. Задержка пролиферации клеток может достигаться и поддерживаться с использованием перфузионной среды, содержащей ограниченную концентрацию L-аспарагина и поддерживающей низкое содержание L-аспарагина в клеточной культуре (5 мМ или менее).

Также было установлено, что клетки задержкой пролиферации имеют большую производительность, если задержка пролиферации была вызвана низким содержанием или недостатком L-аспарагина, и клетки с задержкой пролиферации в последующем оставались в клеточной культуре и перфузионная среда имела концентрацию L-аспарагина 5 мМ или менее.

Фаза продуцирования с задержкой пролиферации и большой производительностью может быть достигнута изменением концентрации L-аспарагина. Как описано здесь, снижение концентрации L-аспарагина приводит к задержке пролиферации. В случае подпитываемого культивирования, если плотность клеток достаточно высока (например, $\geq 20 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл), клетки периодически испытывают недостаток L-аспарагина, несмотря на повторяющееся подпитывание из-за потребления L-аспарагина и/или преобразования в L-аспартат. При выращивании клеток внеклеточный L-аспарагин может быть преобразован в L-аспартат или аммиак. Снижение концентрации L-аспарагина приводит к задержке клеточного цикла. Во время подпитки в те периоды, когда L-аспарагин присутствует в культуре, производительность повышается, а в те периоды, когда L-аспарагин исчерпан, производительность понижается. В перфузированной системе L-аспарагин подается непрерывно, что помогает избежать общего истощения, и может поддерживаться более высокое содержание L-аспарагина, позволяя клеткам продолжить размножение без истощения или ограничения L-аспарагина. Контроль концентрации L-

аспарагина при достаточно низких концентрациях (например, при концентрации 5 мМ или менее) может поддерживать высокую производительность клеток при сохранении их жизнеспособности и ограничения роста. В системе с болюсной и перфузионной подачей подаваемая среда может меняться от состава с высоким уровнем (вызывающим рост) L-аспарагина при болюсной подаче до состава с более низким уровнем (ограничивающим рост) L-аспарагина при перфузионной подаче. Клеточные культуры, пролиферация которых была задержана с помощью ограничения L-аспарагина могут, иметь высокую производительность при использовании повторного добавления составов с низким уровнем L-аспарагина.

В коммерческом масштабе для клеточной культуры и производства терапевтических средств способность задерживать пролиферацию клеток и поддерживать клетки в этом состоянии во время фазы продуцирования была бы крайне желательна. Присутствие клеток, производительность которых была повышена в состоянии задержки пролиферации, и способных сохранять эту повышенную производительность, идеально подходит для производственных целей.

Здесь описывается способ задержки пролиферации клеток в культуре клеток млекопитающих, экспрессирующей рекомбинантный белок. Способ включает индуцирование задержки пролиферации клеток в культуре клеток млекопитающих с помощью воздействия на клеточную культуру бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее, с содержанием 0 мМ L-аспарагина. Такое индуцирование может быть вызвано истощением L-аспарагина или созданием среды с низким уровнем содержания L-аспарагина с помощью перфузии культуры с бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее или поддержанием среды с низким содержанием L-аспарагина. Клеточная культура поддерживается в состоянии задержки пролиферации с помощью перфузии бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее и поддержание культуры в окружении с низким содержанием L-аспарагина.

Также представлен способ увеличения продуцирования рекомбинантного белка культурой клеток млекопитающих, экспрессирующей рекомбинантный белок, путем индуцирования низкого уровня аспарагина для задержки пролиферации клеток в культуре клеток млекопитающих. Клетки млекопитающих, которые поддерживаются в среде с низким уровнем содержания аспарагина для задержки пролиферации, проявляют большую производительность (г белок/клетка/день и г белок/масса клетки/день), чем те, пролиферация которых не была ограничена низким содержанием аспарагина.

Такой способ также полезен для ограничения культуры клеток млекопитающих при желаемом объеме уплотненных клеток. Объем уплотненных клеток во время фазы продуцирования может быть ограничен до желаемого уровня с помощью уменьшения уровня L-аспарагина в культуральной среде. Концентрация аспарагина 5 мМ или менее в перфузионной среде является достаточной для контроля роста при культивировании и ограничения желаемого объема уплотненных клеток.

Описанные здесь способы обеспечивают больший контроль над ростом клеток с получением клеточных культур с высоким титром; и могут сами по себе упростить стратегию по сравнению в перфузионными процессами с большой биомассой, а также минимизировать потери продукта при сборе и последующих стадиях обработки.

Способ начинается с размещения культуры клеток млекопитающих в производственном биореакторе. Предпочтительно использование биореакторов меньшего размера, в одном варианте осуществления объем биореакторов составляет от 500 до 2000 л. В предпочтительном варианте осуществления используются биореакторы объемом 1000-2000 л. Плотность посевных клеток, загружаемых в биореактор, может иметь положительное влияние на уровень произведенного рекомбинантного белка. В одном варианте осуществления в биореактор вводится как минимум от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной среде. В предпочтительном варианте осуществления вводится $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

Затем клетки млекопитающих проходят фазу экспоненциального роста. Клеточная культура может поддерживаться без дополнительной подпитки, пока не достигается желаемая плотность клеток. В одном варианте осуществления клеточная культура поддерживается без дополнительной подпитки до трех дней, после чего следует перфузия бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее для введения и поддержания ограничения низкого содержания L-аспарагина. В другом варианте осуществления культура может быть введена с желаемой плотностью клеток для начала фазы продуцирования без короткой фазы роста с задержкой пролиферации клеток, инициируемой мгновенно путем перфузии культуры клеток бессывороточной перфузионной средой, содержащей 5 мМ или менее L-аспарагина для индуцирования и поддержания задержки пролиферации, вызванной низким содержанием L-аспарагина. В любом из описанных здесь вариантов осуществления переход от фазы роста к фазе продуцирования может быть вызван недостатком L-аспарагина (клетки подвергаются воздействию среды с содержанием 0 мМ L-аспарагина); после этого осуществляют перфузию культуральной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или меньше, и концентрация L-аспарагина в клеточной культуре поддерживается на этом уровне.

Независимо от того, насколько низка концентрация L-аспарагина, при которой индуцируется задержка пролиферации, большая производительность наблюдается для клеток, поддерживаемых перфузи-

ей средой с низким содержанием L-аспарагина и поддержанием культуры клеток при уровне L-аспарагина 5 мМ или менее.

Используемый здесь термин "задержка пролиферации", которая также может называться "задержка пролиферации клеток", означает момент, когда число клеток перестает увеличиваться или когда клеточный цикл больше не продолжается. Задержка пролиферации может отслеживаться с помощью определения плотности жизнеспособных клеток клеточной культуры. Некоторые клетки в состоянии задержки пролиферации могут увеличиваться по размеру, но не по количеству, так что объем уплотненных клеток культуры при задержке пролиферации может увеличиваться. Пролиферация может быть восстановлена до некоторой степени, если здоровье клеток значительно не ухудшилось, путем введения в клеточную культуру L-аспарагина.

Задержка пролиферации вызывается L-аспарагином, когда плотность клеток культуры достигает уровня, когда концентрация L-аспарагина в культуре становится ограниченной для дальнейшего роста или когда культура испытывает недостаток L-аспарагина. Недостаток L-аспарагина имеет место, когда концентрация L-аспарагина в культуральной среде составляет 0 мМ. Недостаток в течение 24 ч может привести к задержке пролиферации. Недостаток в течение большего времени, чем 48 ч, может нанести вред здоровью клеток. Для поддержания клеток в состоянии с задержкой пролиферации концентрация L-аспарагина в клеточной культуре должна поддерживаться на уровне 5 мМ или менее. Концентрация L-аспарагина в культуральной среде, необходимая для задержки пролиферации клеток, зависит от способности клеток производить собственный аспарагин. Для культур, производящих собственный аспарагин, для задержки пролиферации может потребоваться более низкое содержание или даже выведение L-аспарагина из среды. Для культур, неспособных производить собственный аспарагин, например клеток с недостатком активного фермента синтетазы, для задержки пролиферации может использоваться содержание от 0 до 5 мМ L-аспарагина.

Используемый здесь термин "объем уплотненных клеток" (ОУК), называемый также "объемный процент уплотненных клеток" (%ОУК), является отношением объема, занимаемого клетками к общему объему клеточной культуры, выраженному в процентах (смотрите Settler, et al, (2006) *Biotechnol Bioeng. Dec 20:95(6): 1228-33*). Объем уплотненных клеток является функцией плотности клеток и диаметра клеток; рост объема уплотненных клеток может быть вызван ростом либо плотности клеток, либо диаметра клеток, либо обоими. Объем уплотненных клеток характеризует содержание твердого вещества в клеточной культуре. Твердые вещества удаляются во время процессов сбора и последующей очистки. Большее количество твердых веществ означает большие затраты для отделения твердого вещества от желаемого продукта при стадиях сбора и последующей очистке. Также необходимый продукт может остаться в твердых веществах и быть утерян во время процесса сбора, что приведет к меньшему сбору продукта. Поскольку сами клетки различны по размеру, а клеточные культуры также содержат мертвые и умирающие клетки и другие продукты распада клеток, объем уплотненных клеток является более точным способом для характеристики содержащихся твердых веществ в клеточной культуре, чем плотность клеток или плотность жизнеспособных клеток. Например, 2000 л с плотностью клеток 50×10^6 клеток/мл может иметь очень различный объем уплотненных клеток в зависимости от размера клеток. Кроме того, некоторые клетки, находясь в состоянии задержки пролиферации, увеличиваются в размере, так что объем уплотненных клеток до и после задержки пролиферации, вероятно, будет различным из-за роста биомассы в результате увеличения размера клеток.

При переходе от фазы роста к фазе продуцирования и во время фазы продуцирования процентный объем уплотненных клеток (%ОУК) составляет 35% или меньше. Желаемый объем уплотненных клеток, поддерживаемый во время фазы продуцирования, равен 35% или меньше. В предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 30% или меньше. В другом предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 20% или меньше. В другом предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 15% или меньше. В другом предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 10% или меньше.

Используемая здесь "плотность клеток" означает число клеток в данном объеме культуральной среды. "Плотность жизнеспособных клеток" означает число живых клеток в данном объеме культуральной среды, как определено стандартными испытаниями на жизнеспособность (такими как способ вытеснения трипанового синего).

Желаемая плотность жизнеспособных клеток при переходе от фазы роста к фазе продуцирования и во время фазы продуцирования дает объем уплотненных клеток 35% или меньше. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 70×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 60×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток состав-

ляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 до 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 20×10^6 до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 20×10^6 до 25×10^6 жизнеспособных клеток/мл, предпочтительно около 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Меньшая плотность уплотненных клеток во время фазы продуцирования помогает устранить проблемы с растворенным кислородом, который может препятствовать более высокой плотности перфузионных культур. Меньшая плотность уплотненных клеток также позволяет использовать для сред меньшего объема меньшие сосуды для хранения сред, а также такие клетки могут быть смешаны с более медленными расходами. Меньшая плотность уплотненных клеток также оказывает меньшее влияние на процессы сбора и последующей обработки по сравнению с культурами с большей биомассой клеток. Все это уменьшает стоимость, связанную с производством терапевтических средств на основе рекомбинантных белков.

Три способа обычно используют в коммерческих процессах производства рекомбинантных белков культурой клеток млекопитающих: периодическое культивирование, подпитываемое культивирование и перфузионное культивирование. Периодическое культивирование - это прерывистый способ, в котором клетки растут в фиксированном объеме культуральной среды в течение короткого промежутка времени, после чего следует полный сбор. Культуры, выращенные с использованием периодического способа, испытывают рост плотности клеток, пока не достигается максимальная плотность клеток, после чего плотность жизнеспособных клеток уменьшается, а компоненты среды потребляются, а уровни промежуточных продуктов метаболизма (таких как лактат и аммиак) накапливаются. Сбор обычно происходит в точке достижения максимальной плотности клеток (обычно $5-10 \times 10^6$ клеток/мл в зависимости от состава среды, клеточной линии и т.д.). Периодическое культивирование является простейшим способом, однако плотность жизнеспособных культур ограничена наличием питательных веществ, а когда клетки имеют максимальную плотность, культуры истощаются, и производство уменьшается. Нет необходимости продлевать фазу продуцирования, потому что накопление продуктов отходов и истощение питательных веществ быстро приводят к прекращению культивирования (обычно от 3 до 7 дней).

Подпитываемое культивирование имеет преимущество над периодическим процессом в том, что обеспечивает болюсную или непрерывную подачу среды для восполнения тех компонентов среды, которые были использованы. Поскольку культуры при подпитываемом культивировании получают дополнительные питательные вещества во время работы, они могут достигать больших плотностей клеток (>10 до 30×10^6 клеток/мл в зависимости от состава среды, клеточной линии и т.д.) и больших титров продуктов по сравнению с периодическим способом. В отличие от периодического процесса двухфазная культура может создаваться и поддерживаться с помощью изменения способов подачи и составов среды для разграничения периода пролиферации клеток для достижения желаемой плотности клеток (фаза роста) от периода отложенного или медленного роста клеток (фаза продуцирования). Подпитываемое культивирование позволяет достигать больших титров по сравнению с периодическим культивированием. Обычно периодическое культивирование используется во время фазы роста, а подпитываемое культивирование используется во время фазы продуцирования, но подпитка может быть использована во время всего процесса. Однако в отличие от периодического процесса объем биореактора является ограничивающим фактором по отношению к объему подачи. Так же, как и в случае с периодическим процессом, промежуточные продукты метаболизма накапливаются, что приведет к уменьшению культуры, что ограничивает длительность фазы продуцирования приблизительно от 1,5 до 3 недель. Подпитываемое культивирование является непрерывным, и сбор обычно происходит, когда промежуточные продукты метаболизма или жизнеспособность культуры достигают заранее определенных уровней.

Перфузионные способы имеют преимущество над периодическим и подпитываемым процессом, благодаря добавлению новой среды и одновременному удалению израсходованной среды. Типичные крупномасштабные способы коммерческого культивирования клеток стремятся достигнуть высоких плотностей клеток, $60 - 90(+)\times 10^6$ клеток/мл, где от третьей части до более половины объема реактора является биомассой. В случае перфузионного культивирования предельные плотности клеток $>1 \times 10^8$ клеток/мл были достигнуты и предвидятся еще более высокие плотности. Типичное перфузионное культивирование начинается с периодического культивирования, которое длится день или два, после чего происходит непрерывная, пошаговая и/или прерывистая новая подача среды в культуру с одновременным удалением израсходованной среды во время фаз роста и продуцирования культуры с сохранением клеток и добавлением дополнительных весовых составляющих, таких как белки (на основе отсечения по молекулярной массе). Различные способы, такие как отстаивание, центрифугирование или фильтрация могут использоваться для удаления израсходованной среды с сохранением плотности клеток. Скорости перфузионного потока составляют от одного рабочего объема в день до множества рабочих объемов в

день. Преимуществом перфузионного процесса является то, что продуцирующая культура может поддерживаться дольше, чем при периодическом или подпитываемом способе. Однако необходима большая подготовка, хранение, использование и удаление среды для поддержания долговременной перфузионной культуры, особенно с большой плотностью клеток, которые также требуют больше питательных веществ, и все это приводит к еще большему росту стоимости по сравнению с периодическим или подпитываемым способом. Кроме того, большие плотности клеток могут вызвать проблемы во время производства, такие как поддержание уровней растворенного кислорода и проблемы с большим выделением газов, включая подачу дополнительного кислорода и удаление дополнительного диоксида углерода, что может привести к большему пенообразованию и необходимости внесения изменений в противоположные операции; точно так же во время сбора и последующих процессов обработки, когда требуется больше затрат для удаления избыточного клеточного материала, что может привести к потере продукта, нивелируя преимущество большего титра из-за избыточной массы клеток.

Также предложен крупномасштабный способ культивирования клеток, соединяющий подпитку во время фазы роста, за которой следует непрерывная перфузия во время фазы продуцирования. Способ нацелен на фазу продуцирования, в которой клеточная культура поддерживается при объеме уплотненных клеток, меньшем или равном 35%. Способ также предусматривает инициирование и поддержание задержки пролиферации клеток, благодаря низкому содержанию аспарагина.

Подпитываемое культивирование является широко применяемым способом культивирования в крупномасштабных способах производства белков из клеток млекопитающих. См., например, Chu and Robinson (2001), *Current Opin. Biotechnol* 12: 180-87. Подпитываемое культивирование клеток млекопитающих является таким, при котором культура подпитывается либо непрерывно, либо периодически концентрированной питательной средой, содержащей питательные вещества. Подача может осуществляться по predetermined графику, например каждый день, один раз в два дня, один раз в три дня и т.д. По сравнению с периодическим культивированием, при котором подпитка не происходит, подпитываемое культивирование может производить большее количество рекомбинантных белков. См., например, патент США № 5672502.

В одном варианте осуществления используется подпитываемое культивирование с болюсной подачей для поддержания клеточной культуры во время фазы роста. Перфузионная подача может использоваться во время фазы продуцирования. В одном варианте осуществления перфузия начинается, когда клетки достигают фазы продуцирования. В другом варианте осуществления перфузия начинается от 5 до 9 дня культивирования. В другом варианте осуществления перфузия начинается от 5 до 7 дня культивирования.

В другом варианте осуществления инициирование задержки пролиферации клеток при подпитываемом культивировании может быть вызвано недостатком L-аспарагина, после чего происходит перфузия бессывороточной перфузионной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее. В одном варианте осуществления содержание L-аспарагина в клеточной культуре отслеживается до и во время недостатка L-аспарагина. В другом варианте осуществления начало задержки пролиферации клеток при подпитываемом культивировании может достигаться перфузией бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 мМ или менее.

Использование болюсной подачи во время фазы роста позволяет клеткам переходить в фазу продуцирования с меньшей зависимостью от изменения температуры, как средства вызывающего и контролирующего фазу продуцирования. Однако изменение температуры от 36 до 31°C может происходить между фазами роста и продуцирования. В предпочтительном варианте осуществления изменение происходит от 36 до 33°C.

В описанный здесь биореактор может быть введено по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной среде, предпочтительно $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

Перфузионное культивирование - это культивирование, при котором клеточная культура получает свежую подачу перфузионной среды при одновременном удалении отработанной среды. Перфузия может быть непрерывной, пошаговой, прерывистой или комбинацией любых из этих вариантов. Скорость перфузии может быть меньше, чем один рабочий объем в день до множества рабочих объемов в день. Предпочтительно клетки сохраняются в культуре, и удаляемая израсходованная среда в основном не содержит клеток или не содержит значительно меньше клеток, чем культура. Рекомбинантные белки, экспрессированные клеточной культурой, могут также оставаться в культуре. Перфузия может совершаться с помощью определенных средств, к которым относят центрифугирование, отстаивание или фильтрацию. См., например, Voisard et al., (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. Предпочтительным способом фильтрации является фильтрация переменным тангенциальным потоком. Переменный тангенциальный поток поддерживается с помощью нагнетания среды через модули полуволоконного фильтрующего модуля. См., например, патент США №. 6544424; Furey (2002) *Gen. Eng. News*. 22 (7), 62-63.

Используемый здесь термин "скорость перфузионного потока" означает объем среды (добавленный и удаленный), прошедший через биореактор и обычно выраженный в виде части или единицы рабочего объема за определенное время. "Рабочий объем" означает объем биореактора, используемый для разме-

щения клеточной культуры. В одном варианте осуществления скорость перфузионного потока составляет один рабочий объем в день или менее. Перфузионная среда может быть составлена для максимального увеличения питательных веществ для минимизации скорости перфузии.

"Культивирование клеток" и "культивирование" означают рост и распространение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования клеток млекопитающих являются известными в области техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed, Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих могут быть культивированы в суспензии или нанесены на твердый субстрат. Могут быть использованы биореакторы с псевдооживленным слоем, половолоконные биореакторы, роллерные флаконы, встряхиваемые колбы или биореакторы с механическим перемешиванием, с микроносителями или без микроносителей. В одном варианте осуществления используются биореакторы от 500 до 2000 л. В предпочтительном варианте осуществления используются биореакторы от 1000 до 2000 л.

В целях настоящего изобретения культуральная среда является средой, пригодной для роста клеток животных, таких как клетки млекопитающих, в клеточной культуре вне организма. Составы культуральной среды хорошо известны в области техники. Обычно культуральная среда содержит буферные смеси, соли, углеводы, аминокислоты, витамины и необходимые примеси. "Бессывороточная" среда означает культуральную среду, не содержащую сыворотки животных, такой как сыворотка крови эмбрионов коров. Различные тканевые культуры, включая среды определенных культур, доступны на рынке, например, любая одна или комбинация следующих сред клеточных культур: среда RPMI-1640, среда RPMI-1641, минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM), минимальная эссенциальная среда Игла, среда F-12K, среда Хэма F12, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков, среда Маккоя 5A, среда Лейбовица L-15 и бессывороточная среда, такая как EX-CELL™ серия 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) среди прочих. Также доступны бессывороточные варианты таких культуральных сред. Культуральная среда может характеризоваться дополнительным или повышенным содержанием компонентов, таких как аминокислоты, соли, буферные смеси, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, антибиотики, липиды, примеси и так далее, в зависимости от требований к культивируемым клеткам и/или желаемым параметрам клеточной культуры.

Клеточные культуры могут снабжаться концентрированной питательной средой, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, потребляемые во время фазы продуцирования клеточной культуры. Концентрированная питательная среда может быть основана на практически любом составе культуральной среды. Такая концентрированная питательная среда может содержать большинство компонентов среды клеточной культуры в количествах 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X или даже 1000X от их обычной величины. Подача концентрированной среды часто используется в процессах культивирования с подпитываемым культивированием.

Способ согласно настоящему изобретению может использоваться для увеличения производства рекомбинантных белков в многофазных процессах культивирования. В процессе с большим числом стадий клетки культивируются в двух или более отдельных фазах. Например, клетки могут культивироваться сначала в одной или более фазах роста в условиях среды, которые максимально увеличивают пролиферацию и жизнеспособность клеток, а затем могут переходить в фазу продуцирования при условиях, которые способствуют максимальному продуцированию белков. В коммерческом процессе продуцирования белка клетками млекопитающих существует множество фаз роста, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, которые происходят в различных сосудах для культивирования до получения конечной продуцирующей культуры. Фазы роста и продуцирования могут следовать друг за другом или быть отделены одним или несколькими переходными фазами. В процессах с несколькими фазами способ согласно настоящему изобретению может использоваться как минимум во время фаз роста и продуцирования на стадии окончательного производства коммерческой клеточной культуры, несмотря на то, что он может также использоваться в предыдущей фазе роста. Фаза продуцирования может проводиться в крупном масштабе. Крупномасштабный процесс может проходить в объеме как минимум 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10000, 15000, 20000 л. В предпочтительном варианте осуществления продуцирование происходит в биореакторах объемом 500, 1000 и/или 2000 л. Фаза роста может происходить при более высокой температуре, чем фаза продуцирования. Например, фаза роста может происходить при первой температуре от 35 до 38°C, а фаза продуцирования может происходить при второй температуре от 29 до 37°C, в некоторых вариантах - от 30 до 36°C или от 30 до 34°C. Кроме того, химические стимуляторы производства белков, например, такие как бутират, кофеин и гексаметилен-биацетамид (ГМБА), могут добавляться одновременно, до и/или после изменения температуры. Если стимуляторы добавляются после изменения температуры, они могут добавляться от одного часа до пяти дней после изменения температуры, в различных вариантах от одного до двух дней после изменения температуры. Клеточные культуры могут поддерживаться в течение дней или даже недель, пока клетки продуцируют желаемый белок (белки).

Образцы клеточной культуры могут отслеживаться и оцениваться с помощью любого из аналитических способов, известных в области техники. Различные параметры, в том числе качество рекомбинант-

ного белка, качество среды и характеристики могут отслеживаться во время культивирования. Образцы могут быть взяты и отслеживаться периодически с желаемой частотой, включая непрерывный мониторинг в режиме реального времени или близком к нему режиме. В одном варианте осуществления содержание L-аспарагина в культуральной среде отслеживается до недостатка и во время недостатка L-аспарагина.

Обычно клеточные культуры, которые предшествуют конечной продуцирующей культуре (N-x до N-1) используются для образования клеток для посева, которые будут использованы для введения в культуру N-1 для производства в биореакторе. Плотность посевных клеток может иметь положительное влияние на уровень производства рекомбинантных белков. Уровень производства растет с ростом плотности клеток. Рост титра связан не только с большей плотностью посевных клеток, но также зависит от клеточного цикла и метаболизма клеток, находящихся в производстве.

Посевные клетки могут производиться любым способом культивирования. Предпочтительным способом является перфузионное культивирование с использованием фильтрации переменным тангенциальным потоком. Биореактор N-1 может работать с фильтрацией переменным тангенциальным потоком с образованием клеток высокой плотности для введения в биореактор для производства. Стадия N-1 может использоваться для роста клеток до плотностей $>90 \times 10^6$ клеток/мл. Биореактор N-1 может использоваться для образования болусных посевных культур или может использоваться как культура подвижного посевного состава, которые могут быть использованы для посева в биореакторах с высокой плотностью посевных клеток. Длительность стадии роста производства может варьировать от 7 до 14 дней и может быть организована для поддержания экспоненциального роста клеток до введения в биореактор для производства. Скорость перфузии, состав среды и время оптимизированы для роста и доставки клеток в биореактор в наилучшем состоянии для оптимизации производства. Плотности посевных клеток $>15 \times 10^6$ клеток/мл могут достигаться для посева в биореакторах. Большие плотности посевных клеток при введении могут уменьшить или даже нивелировать время, необходимое для достижения желаемой плотности производства.

Настоящее изобретение особенно полезно для улучшения роста клеток, жизнеспособности и/или производстве белка с помощью процессов культивирования. Линии клеток (также называемые "клетка-хозяин"), используемые в этом изобретении, являются генетически обработанными для экспрессирования полипептидов, представляющих коммерческий или научный интерес. Линии клеток обычно получают из линий дифференцировки, получаемых из первичной культуры, и могут содержаться в культуре в течение неограниченного времени. Генетическая инженерия линий клеток включает трансфекцию, преобразование и превращение клеток с молекулами рекомбинантных полинуклеотидов и/или в обратном случае чередование (например, гомологической рекомбинацией и активацией генов или слияние рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой) для того, чтобы клетка-хозяин экспрессировала желаемый рекомбинантный полипептид. Способы и направления генетической инженерии клеток и/или линий клеток, экспрессирующих интересующий полипептид, хорошо известны специалистам в области техники; например различные способы проиллюстрированы в *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988 и квартальные редакции); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69.

Линии клеток животных получены из клеток, предшественники которых были получены из многоклеточных животных. Один тип клеточной линии животных - это линия клеток млекопитающих. Широкое разнообразие линий клеток млекопитающих, пригодных для роста в культуре, доступны в American Type Culture Collection (Manassas, Va.) и у коммерческих производителей. Примеры линий клеток, обычно используемых в промышленности, включают VERO, ВНК, HeLa, CV1 (в том числе Cos), MDCK, 293, 3T3, миеломные линии клеток (например, NSO, NS1), PC12, WI38 клетки и клетки яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO широко используются для производства сложных рекомбинантных белков, например цитокинов, факторов свертывания крови и антител (Brasel et al. (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988). *J. Biol Chem* 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991). *J Mol Endocrinol* 6:231-239; Wood et al. (1990), *J. Immunol.* 145:3011-3016). Дигидрофолатредуктаза (ДФР)-дефицитные мутантные линии клеток (Urlaub et al. (1980), *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216-4220), DXB11 и DG-44 являются желаемыми клетками-хозяевами CHO, потому что эффективная селективируемая ДФР и амплифицируемая система экспрессии генов позволяет в этих клетках экспрессировать высокий уровень рекомбинантных белков (Kaufman R.J. (1990), *Meth Enzymol* 185:537-566). Кроме того, этими клетками легко управлять в случае адгезивных или суспензионных культур, и они проявляют относительно высокую генетическую устойчивость. Клетки CHO и экспрессированные ими рекомбинантные белки были охарактеризованы и утверждены к использованию в клиническом коммерческом производстве регулирующими органами.

Способы настоящего изобретения могут использоваться для клеточных культур, которые экспрессируют интересующие рекомбинантные белки. Экспрессированные рекомбинантные белки могут секретироваться в культуральную среду, из которой они могут быть извлечены и/или собраны. Кроме того, белки могут быть очищены или частично очищены от таких культур или компонентов (например, от

культуральной среды) с помощью известных процессов и продуктов, доступных у коммерческих производителей. Очищенные белки затем могут быть "сформулированы", что означает, что буферный раствор сменяется, стерилизуется, помещается в многдозовую упаковку и/или упаковывается для конечного потребителя. Подходящие составы для фармацевтического препарата содержат составы, описанные в книге Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 ed., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Используемые здесь понятия "пептиды", "полипептиды" и "белки" являются взаимозаменяемыми и относятся к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также могут содержать модификации, в том числе гликозилирование белка, присоединение липида, сульфатизацию, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Полипептиды могут представлять научный или коммерческий интерес, в том числе лекарства на белковой основе. Полипептиды среди прочего включают антитела, слитые белки и цитокины. Пептиды, полипептиды и белки производятся рекомбинантными клеточными линиями клеток животных с использованием способов культивирования клеток и могут называться "рекомбинантными пептидами", "рекомбинантными полипептидами" и "рекомбинантными белками". Экспрессированный белок может быть произведен внутри клетки или секретироваться в культуральную среду, из которой он может быть восстановлен и/или собран.

Примерами полипептидов, которые могут быть произведены способами настоящего изобретения, являются белки, содержащие аминокислотные последовательности, идентичные или очень похожие на все или часть одного из следующих белков: фактор некроза опухолей (TNF), лиганд flt3 (WO 94/28391), эритропоэтин, тромбопоэтин, кальцитонин, IL-2, ангиопоэтин-2 (Maisonpierre et al. (1997), Science 277(5322): 55-60), лиганд для рецептора активатора фактора транскрипции каппа Б (RANKL (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора), WO 01/36637), индуцирующий апоптоз лиганд, связанный с фактором некроза опухолей (TNF) (TRAIL, WO 97/01633), лимфопоэтин, полученный из тимической стромы, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, патент Австралии № 588819), фактор роста тучных клеток, фактор роста стволовых клеток (патент США № 6204363), эпидермальный фактор роста, кератиноцитарный фактор роста, фактор роста и развития мегакариоцитов, цитокин, белок человеческий фибриногенподобный-2 (FGL2; NCIBI номер доступа NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62), гормон роста, инсулин, инсулинотропин, инсулиноподобные факторы роста, гормон паразитовидной железы, интерфероны, в том числе α -интерферон, γ -интерферон и общие интерфероны (патенты США № 4695623 и 4897471), нейроростовой фактор, синаптогаминоподобные белки (SLP 1-5), нефротрофин-3, глюкагон, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, β лимфотоксин, фактор, ингибирующий лейкемию и онкостатин-М. Описание белков, которые могут быть произведены согласно способам изобретения, можно найти, например, в книгах Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, все тома (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); и The Cytokine Handbook. Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Кроме того, способы настоящего изобретения могут быть полезны для производства белков, содержащих все или часть аминокислотной последовательности рецептора для любого из вышеуказанных белков, антагониста такого рецептора или любого из вышеуказанных белков и/или белки, аналогичные, по существу, таким рецепторам или антагонистам. Эти рецепторы и антагонисты включают обе формы рецептора фактора некроза опухолей (TNFR, указанные как p55 и p75 в патентах США №№ 5395760 и 5610279), рецепторы интерлейкина-1 (IL-1) (типы I и II; Европейский патент № 0460846, патенты США №№ 4968607 и 5767064), антагонист рецептора IL-1 (патент США № 6337072), антагонисты или ингибиторы IL-1 (патенты США №№ 5981713, 6096728 и 5075222), рецепторы IL-2, рецепторы IL-4 (Европейский патент № 0367566 и патент США № 5856296), рецепторы IL-15, рецепторы IL-17, рецепторы IL-18, рецепторы Fc, гранулоцитарно-моноцитарный стимулирующий фактор рецептора, рецепторы для онкостатина-М и факторы ингибирования лейкемии, рецептор активатора фактора транскрипции каппа В (RANK, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин (патент США № 6015938), рецепторы для TRAIL (в том числе рецепторы TRAIL 1,2,3 и 4) и рецепторы, содержащие домены смерти, такие как Fas или апоптоиндуцирующий рецептор (AIR).

Другие белки, которые могут быть произведены с помощью этого изобретения, содержат все или часть аминокислотной последовательности различных антигенов (называемых CD белки) или их лигандов или белков, аналогичных, по существу, любому из них. Эти антигены описаны в Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996). Аналогичные CD белки описаны в материалах последующих конференций. Примеры таких антигенов включают CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 и их лиганды (лиганд CD27, лиганд CD30 и т.д.). Некоторые из CD антигенов принадлежат к семейству рецепторов TNF, которое также включает 41BB и OX40. Лиганды часто принадлежат к семейству TNF, как, например, лиганды 41BB и OX40.

Ферментативно-активные белки и их лиганды также могут быть получены с помощью настоящего изобретения. Примеры включают белки, содержащие часть или весь белок, или его лиганд, или белок, аналогичный одному из следующих: дезинтегрин и члены семейства домена металлопротеазы, в том

числе TNF-альфа конвертирующий фермент, различные киназы, глюкоцереброзидаза, супероксиддисмутаза, тканевой активатор плазминогена, фактор VIII, фактор IX, апилопопротеин E, апилопопротеин A-I, глобины, антагонист IL-2, альфа-1 антитрипсин, лиганды любого из вышеуказанных ферментов и различные другие ферменты и их лиганды.

Термин "антитело" относится как к гликозилированным, так и к негликозилированным иммуноглобулинам любого изотипа или подкласса или к их антигенсвязывающему участку, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано обратное, включая человеческое, гуманизированное, химерное, мультиспецифичное, моноклональное, поликлональное, или олигомеры, или их антигенсвязывающие фрагменты. Также к ним относятся белки, имеющие антигенсвязывающий фрагмент или участок, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, одноцепочечные молекулы антитела, фрагменты гипервариабельных участков (CDR), scFv, диатела, триатела, тетратела и полипептиды, содержащие как минимум часть иммуноглобулина, достаточную для придания специфического связывания антигена с целевым полипептидом. Термин "антитело" подразумевает, но не ограничивается, антитела, полученные, экспрессированные, созданные или изолированные рекомбинантными средствами, такими как антитела, изолированные из клетки-хозяина, трансфицированные для экспрессирования антитела.

Примеры антител включают, но не ограничиваются теми, которые распознают один или несколько белков, включающих, но не ограничивающихся вышеуказанными белками и/или следующими антигенами: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-2 рецепторами, рецептор IL-4, рецептор IL-6, рецептор IL-13, подэлементы рецепторов IL-18, FGL2, PDGF- β и их аналоги (см. патенты США №№ 5272064 и 5149792), рецепторы VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, EGF (см. патент США № 6235883), рецептор VEGF, фактор роста гепатоцитов, лиганды остеопротегерина, интерферон-гамма, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS, также известны как BAFF, THANK, TALL-1 и zTFP4; см. Do and Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), C5 комплемент, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, PEM антиген, LCG (который является генным продуктом, экспрессируемым при раке легких), HER-2, HER-3, опухолеассоциированный гликопротеин, TAG-72, антиген SK-1, опухолеассоциированные эпитопы, присутствующие в повышенных уровнях в сыворотке пациентов с раком толстой кишки и/или поджелудочной железы, связанные с раком эпитопы или белки, экспрессированные на клетках рака груди, толстой кишки, простаты, поджелудочной железы, легких, плоскоклеточного рака и/или рака почек, и/или клеток меланомы, глиомы, нейробластомы, некротического ядра опухоли, интегрин альфа 4 бета 7, интегрин VLA-4, интегрин B2, TRAIL RANK, RANK лиганд, TNF- α , адгезивная молекула VAP-1, адгезивная молекула эпителиальных клеток (EPCAM), межмолекулярная адгезивная молекула-3 (ICAM-3), адгезин лейкоинтегрин, гликопротеин тромбоцита гр. Пв/IIIa, тяжелая цепочка сердечного миозина, гормон парашитовидной железы, rNAPc2 (который является ингибитором фактора опухоли VPa), MHC I, онкоэмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопропротеин (AFP), фактор некроза опухоли (TNF), CTLA-4 (который является цитотоксичным связанным с Т-лимфоцитом антигеном), рецептор Fc- γ -1, HLA-DR 10 бета, HLA-DR антиген, склеротин, L-селестин, респираторно-синцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус гепатита В (HBV), Streptococcus mutans и Staphylococcus aureus. Специфические примеры известных антител, которые могут быть произведены с помощью способов настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются адалимумабом, бевацизумабом, инфликсимабом, абсиксимабом, алемтузумабом, бапинеизумабом, базиликсимабом, белимумабом, бриакиумабом, канакинумабом, цертолизумаб пеголом, цетуксимабом, конатумумабом, деносумабом, гемтузумаб озогамидином, голимумабом, ибритумаб тиуксетаном, лабетузумабом, матузумабом, матумумабом, мепализумабом, мотавизумабом, муромонаб-CD3, натализумабом, нимотузумабом, офатумумабом, омализумабом, ореговамабом, паливизумабом, панитимумабом, пемтузумабом, пертузумабом, ранибизумабом, ровелизумабом, тоцилизумабом, тоситумабом, трастузумабом, устекинумабом, ведолизумабом, залутумабом и занолимумабом.

Настоящее изобретение может также использоваться для производства рекомбинантных слитых белков, содержащих, например, любой из вышеуказанных белков. Например, рекомбинантные слитые белки содержат один из вышеуказанных белков плюс мультимеризационный домен, такой как лейциновая "молния", двойная спираль, Fc часть иммуноглобулина или аналогичного белка, могут быть произведены с использованием способов настоящего изобретения. Например, см. публикацию международной заявки 94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Håkansson et al. (1999), Structure 7:255-64. Такие рекомбинантные слитые белки включают белки, в которых часть рецептора слита с Fc частью антитела, такого как этанерцепт (с. 75 TNFR:Fc) и белатацепт (CTLA4:Fc).

Поскольку терминология, используемая в этой заявке, является стандартной в области техники, определения некоторых терминов приведены здесь для внесения ясности и определенности в значение терминов формулы изобретения. Единицы, приставки и символы могут обозначаться в системе СИ. Указанные здесь диапазоны чисел содержат числа, определяющие диапазон, а также содержат и поддерживают

каждое целое число в указанном диапазоне. Описанные здесь способы и технологии обычно выполняются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в области техники, и как описано в различных общих и более специальных ссылках, которые приводятся и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. См., например, книгу Сэмбрука с соавт. Sabrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы или части документов, приведенные в этой заявке, указаны здесь посредством ссылки и содержат, но не ограничиваются, патентами, патентными заявками, книгами, учебниками. То, что описано в варианте осуществления изобретения может быть совмещено с другими вариантами осуществления настоящего изобретения.

Настоящее изобретения не должно ограничиваться областью действия специальных описанных здесь вариантов осуществления, которые приведены для иллюстрирования частных случаев изобретения; функциональные эквивалентные способы и компоненты применимы в пределах области действия настоящего изобретения. В действительности различные модификации настоящего изобретения, кроме описанных здесь вариантов, станут понятны специалистам в области техники из предыдущего описания и сопровождающих чертежей. Такие модификации должны попадать в область действия прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1.

Этот эксперимент сравнивает различные начальные условия способов периодической подачи и подпитываемой подачи перед перфузией с помощью фильтрации переменным тангенциальным потоком. Перфузия началась, либо рано во время фазы начального экспоненциального роста (периодическое культивирование) без дополнительных подач в перфузию, либо в конце экспоненциальной фазы и переходит в стационарную фазу или в фазу продуцирования (подпитываемое культивирование), получая болюсные подпитки бессывороточной средой до перфузии.

В день 0 клетки СНО, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессывороточной определенной среды для начала подпитываемого культивирования и 1800 мл для начала периодического культивирования. Культуры находятся при температуре 36°C, растворенный кислород (РК) на уровне 30%, перемешивание при 215 об/мин. Глюкоза поддерживается на уровне выше 0 г/л и ниже 8 г/л.

Перфузия началась на четвертый день (0,25 об./день) для периодического культивирования и на седьмой день (0,75 об./день) для подпитываемого культивирования. Перфузия выполнена с помощью переменного тангенциального потока и системы фильтрации (Refine Technologies, Hanover, NJ, половолоконный фильтр 50 кДа). Перед началом перфузии подпитываемые культуры получают болюсные подпитки концентрированной бессывороточной средой на четвертый день (7,5% начального рабочего объема) и день 6 (10% начального рабочего объема). Скорости перфузии приведены в табл. 1.

Таблица 1

Скорость перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
0 – 4*	0,00
4 – 6	0,25
6 – 7	0,50
7 – 10	0,75
10 -	1,00

Значения основаны на описанных здесь рабочих объемах;

* - день 0-7 для подпитываемого начала.

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем уплотненных клеток определен с помощью VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Germany).

Изменение температуры (от 36,0 до 33,0°C) применялось, когда плотность жизнеспособных клеток превысила 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, что произошло на 7 и 11 день для периодического культивирования и подпитываемого культивирования соответственно.

Для периодического культивирования плотность жизнеспособных клеток продолжила расти после начала перфузии; для подпитываемого культивирования перфузия началась после того, как клеточная

культура достигла устойчивой или стационарной фазы с небольшим ростом. На 15 день плотность жизнеспособных клеток находилась между 27,7 и $30,7 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл, в то время как ПЖК при периодическом культивировании находилась между 22,5 и $27,4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл (фиг. 1А). Жизнеспособность культуры при подпитываемом культивировании находилась между 73,9 и 77,5%, в то время как жизнеспособность культуры при периодическом культивировании находилась между 72,5 и 83,1% (фиг. 1В). Титр культуры при подпитываемом культивировании находился между 15,3 и 16,1 г/л, в то время как титр культуры при периодическом культивировании находился между 10,6 и 12,3 г/л (фиг. 1С). Поскольку значения интегрированной переменной плотности клеток (ИППК) аналогичны всем четырем культурам на 15 день (приблизительно 230×10^6 клеток/мл), то удельная производительность была больше в условиях подпитываемого культивирования. Подпитываемое культивирование продолжено до 24 дня. За 20 дней был получен титр 20 г/л.

Переменный тангенциальный поток перфузии привел к росту производства при подпитываемом культивировании с поддержанием клеток в более производительном состоянии по сравнению с периодическим культивированием.

Пример 2.

В день 0 клетки СНО, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессыороточной среды для подпитываемого культивирования и 1300 мл для периодического культивирования. Культуры находятся при температуре 36°C, РК на уровне 30%, перемешивание при 215 об/мин. Подпитываемая культура вращалась при 430 об/мин. В подпитываемую культуру подавалось 7 г/л глюкозы ежедневно до начала перфузии; у всех культур поддерживался уровень глюкозы во время перфузии 4 г/л. Перфузия (переменный тангенциальный поток) началась на четвертый день (0,25 об./день) для культур при периодическом культивировании и на восьмой день (0,75 об./день) при подпитываемом культивировании. До начала перфузии подпитываемая культура получала болюсные подпитки концентрированной бессыороточной средой на четвертый день (7,5% начального рабочего объема) и шестой день (10% начального рабочего объема). Скорость перфузии приведена в табл. 2. Культуры поддерживались в течение 21 дня.

Таблица 2

Скорость перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
4 – 6	0,25
6 – 8	0,50
8 – 10	0,75
10 -	1,00

Значения основаны на описанных здесь рабочих объемах

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Изменение температуры (от 36,0 до 33,0°C) применялось при периодическом культивировании на шестой день, когда плотность жизнеспособных клеток превысила 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, как в примере 1. Подпитываемая культура поддерживалась при температуре 36,0°C во время культивирования.

Для начала периодического культивирования результаты были аналогичны описанным выше с плотностью жизнеспособных клеток приблизительно от 20 до 25×10^6 жизнеспособных клеток/мл без роста после 10-го дня. Для подпитываемого культивирования плотность достигала почти 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл на 20 день после того, как была израсходована большая часть культуры с содержанием меньше 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, смотрите фиг. 2А. Жизнеспособность оставалась выше 80% до 10 дня, а затем упала приблизительно до 40% на 20 день после начала периодического культивирования и 60% для подпитываемого культивирования; смотрите фиг. 2В. Наибольшее значение титра составило почти 15 г/л для периодического культивирования, смотрите фиг. 2С. Было замечено, что культура при периодическом культивировании имела концентрацию L-аспарагина около 3–4 мМ на третий день и не испытала воздействия среды с ограничением аспарагина. Однако при подпитываемом культивировании с перфузией культура испытывала воздействие среды с недостатком L-аспарагина до 6-го дня до начала перфузии на 7 день. Затем имела место перфузия культуры средой с содержанием L-аспарагина 2,0 г/л (или 13,3 мМ), что привело к тому, что после 8-го дня не было дальнейших ограничений L-аспарагина (фиг. 2D). Концентрация глюкозы в основном поддерживалась между 4 и 10 г/л.

Подпитываемое культивирование с сильным перемешиванием культуры дает максимальный титр (более 20 г/л) за 20 дней, более чем на 5 г/л больше, чем при периодическом культивировании, что было аналогично вышеописанным результатам. Отрицательные эффекты более быстрой скорости перемешивания не наблюдались. Поддержание постоянной температуры не привело к негативному воздействию

на подпитываемое культивирование.

Пример 3.

Этот эксперимент характеризует влияние объема перфузии и изменений температуры на переменный тангенциальный поток при подпитываемом культивировании, как описано выше. Все культуры были культивированы с подпитыванием и перфузия была начата на 7 день. Скорость перфузии была от трех четвертей объема к полному объему или от полного рабочего объема к трем четвертям рабочего объема. Было проведено изменение температуры от 36 до 33°C на 14 день.

В день 0 клетки СНО, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1200 мл бессывороточной среды. Культуры находились при температуре 36°C, РК на уровне 30%. До начала перфузии подавалось 7 г/л глюкозы в день; у всех культур поддерживался уровень глюкозы во время перфузии 1 г/л. Культура поддерживалась 20 дней.

Культуры получили болюсные подпитки концентрированной бессывороточной средой на четвертый день (7,5% начального рабочего объема) и шестой день (10% начального рабочего объема). Перфузия началась на 8 день. Скорости перфузии приведены в табл. 3. Одна культура из каждой группы имела изменение температуры от 36 до 33°C на 15 день, другие культуры оставались при 36°C во время эксперимента.

Таблица 3
Скорость перфузии

Условие	День	Скорость перфузии (объем/день)
Условие 1 (n=2)	8 – 12	0,75
	12 -	1,00
Условие 2 (n=2)	8 – 10	1,00
	10 –	0,75

Значения основаны на описанных здесь рабочих объемах

Изменение температуры и скорость перфузии не повлияли на плотность жизнеспособных клеток (смотрите фиг. 3А). Однако изменение температуры помогает дольше сохранить жизнеспособность клеток в культуре. Существует разрыв между условиями изменения температур начиная с 15 дня. Жизнеспособность культур с измененной температурой падает более медленно, чем культур с температурой 36°C (смотрите фиг. 3В). Что касается титра, три культуры проявляют очень похожие титры на 15 день (17,1-17,9 г/л), и на 20 день (22-24 г/л), но одна культура имела больший титр на 15 день (21,58 г/л) и на 20 день (28,33 г/л) (смотрите фиг. 3С). Ни температура, ни скорость перфузии не повлияли на титр производства, что говорит о том, что культуры могут поддерживаться при различных скоростях перфузии.

Пример 4.

Этот эксперимент исследует влияние концентрации аспарагина в перфузионной среде и условий начала перфузии, либо с ограничением L-аспарагина, либо без ограничения, на плотность жизнеспособных клеток во время фазы продуцирования.

В день 0 клетки СНО, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл для периодического и для подпитываемого способов. Культуры находились при температуре 36°C, РК на уровне 30%, скорость вращения 400 об/мин. Распыление происходило либо с помощью трубки с отверстиями, либо с помощью разбрызгивателей. Уровень глюкозы поддерживался выше 0 и ниже 8 г/л.

Перфузия (переменный тангенциальный поток) началась на третий день (0,29 об/день) для периодического культивирования "с неограниченным содержанием аспарагина" и на седьмой день (0,48 об/день) для подпитываемого культивирования "с ограниченным содержанием аспарагина". Культуральная среда периодического культивирования содержала 10 мМ L-аспарагина. До начала перфузии периодически подпитываемые культуры получали болюсные подпитки концентрированной бессывороточной средой на третий день и шестой день (7% начального рабочего объема) с концентрацией 113,4 мМ L-аспарагина. Концентрация аспарагина в перфузионной среде может быть контрольной (17,3 мМ аспарагина в определенной бессывороточной перфузионной среде) или низкой (5 мМ аспарагина в определенной бессывороточной перфузионной среде). Перфузия проводилась, как описано выше. Скорости перфузии приведены в табл. 4.

Таблица 4

Скорость перфузии

Условие	День	Скорость перфузии (объем/день)
День 3	3 – 4	0,29
Начало периодической перфузии культура с неограниченным содержанием аспарагина	4 – 7	0,48
	7 – 9	0,48
	9 – 11	0,67
	11 – 20	0,96
День 7	7 – 9	0,48
Начало подпитываемой перфузии культура с ограниченным содержанием аспарагина	9 – 11	0,67
	11 – 20	0,96

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Все культуры имели температуру 36,0°C.

Уменьшение роста клеток и рост производительности были достигнуты во время фазы продуцирования с помощью ограничения аспарагина в культуральной среде. На 15 день максимальная плотность жизнеспособных клеток составляла около $17,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл для подпитываемых культур с низким содержанием аспарагина (фиг. 4А). Культуры с контрольным уровнем содержания аспарагина достигли плотности жизнеспособных клеток более 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл (>30 об.% уплотненных клеток). Жизнеспособность культуры в случае подпитываемого культивирования с низким содержанием аспарагина составила 67,1%, в случае периодического культивирования - 55,1%, с контрольным содержанием аспарагина - 69% (фиг. 4В). Титр культуры с регулируемым объемом уплотненных клеток с низким содержанием аспарагина при подпитываемом культивировании был на уровне 17,0 г/л, в то время как титр при периодическом культивировании был около 15,4 г/л (фиг. 4С). Титры культур с контрольным содержанием составили от 10,2 до 12,9 г/л (периодическое культивирование) и от 14,2 до 15,9 г/л (подпитываемое культивирование).

Поддерживание уровней аспарагина 5 мМ или менее во время производства привело к ограничению роста, стимулировало производительность и сохраняло жизнеспособность во время фазы продуцирования.

Пример 5.

Этот эксперимент сравнивает условия среды во время перфузии. В этом эксперименте с биореактором объемом 2 л клетки вводились в химически определенную среду периодического культивирования с рабочим объемом 1,5 л, культивировались в течение 3 дней и затем разбрызгивались в течение 12 дней с помощью химически определенной перфузионной среды, содержащей либо 17,3 мМ L-аспарагина и 4,6 мМ L-глутамина, либо 5 мМ L-аспарагина и 10 мМ L-глутамина. Перфузия проводилась с помощью переменного тангенциального потока перфузии и системы фильтрации (Refine Technologies, Hanover, NJ) с половолоконным фильтром на 30 кДа (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Перфузия началась на третий день со скоростью 0,3 объемов культуры в день. Скорость перфузии возрастала на 4, 9 и 11 день, как указано в табл. 6 ниже. Культуры поддерживались при температуре 36°C, РК 30%, pH 7.0 и скорости вращения 400 об/мин.

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем уплотненных клеток определен с помощью VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Germany).

Таблица 5

Скорость перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
3	0,30
4	0,50
9	0,67
11	0,96

Ограничение аспарагина привело к накоплению меньшего числа клеток и росту производительности. Культуры, обрабатываемые перфузионной средой, содержащей 5 мМ аспарагина, достигли макси-

мальной ПЖК в $8,16 \times 10^7$ - $8,54 \times 10^7$ клеток/мл, в то время как культуры, обрабатываемые перфузионной средой, содержащей 17,3 мМ аспарагина, достигали $11,9 \times 10^7$ - $12,2 \times 10^7$ клеток/мл (фиг. 5А). Несмотря на то, что культуры в 17,3 мМ аспарагина имели больше клеток, культуры в 5 мМ аспарагина производили больше продукта. Культуры, обрабатываемые перфузионной средой, содержащей 17,3 мМ аспарагина, производили 6,89-7,18 г/л (4,33 - 4,67 г/л объем уплотненных клеток) по сравнению с 7,59-8,15 г/л (5,01-5,38 г/л объем уплотненных клеток) для культур, обрабатываемых средой, содержащей 5 мМ аспарагина (фиг. 5В и 5D). Окончательный объем уплотненных клеток (ОУК) культур, обрабатываемых 5 мМ аспарагина, был немного меньше, чем для культур, обрабатываемых 17,3 мМ аспарагина (фиг. 5С), без разницы в жизнеспособности культуры (фиг. 5Е).

Интересно, что в этом примере рост концентрации глутамина больше чем в два раза в условиях с низким содержанием аспарагина (4,6 мМ против 10 мМ глутамина) не связан со способностью среды с низким содержанием аспарагина ограничивать рост культуры.

Пример 6.

Этот пример сравнивает показатели линии клеток, выделенной из антитела клонированных СНО, в процессе с использованием ограничения аспарагина для контроля роста в лабораторных и полупромышленных масштабах. Лабораторная модель использовала биореакторы объемом 2 л, а полупромышленная модель - объемом 500 л. В лабораторной модели клетки вводились в химически определенную среду для периодического культивирования объемом 1,5 л, а в полупромышленной модели объем биореактора составлял около 378 л. Клетки культивировались в течение 3 дней в среде при периодическом культивировании, а затем обрабатывались в течение 12 дней с помощью химически определенной перфузионной среды, содержащей 5 мМ L-аспарагина и 10 мМ L-глутамина. Перфузия проводилась с помощью перфузии переменным тангенциальным потоком и системы фильтрации (Refine Technologies, Hanover, NJ) с половолоконным фильтром на 30 кДа (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Перфузия началась на 3 день при скорости 0,3 объема культуры в день. Скорость перфузии увеличивалась на 4, 9 и 11 дни, как указано ниже в табл. 7. Культуры содержались при температуре 36°C, 30% РК и pH 6.9.

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность в лабораторных масштабах определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA), а в полупромышленных масштабах - с помощью CEDEX (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем уплотненных клеток определен с помощью VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Germany).

Таблица 6

График скорости перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
3	0,30
4	0,50
9	0,67
11	0,96

Приведены данные для четырех культур, культивированных в лабораторных масштабах и двух культур, культивированных в полупромышленных масштабах. Кривые ПЖК подобны в обоих условиях, контроль роста достигнут (фиг. 6А) и общая масса клеток (объем уплотненных клеток) поддерживался ниже 30% в обеих культурах (фиг. 6С). Несмотря на то, что ПЖК достиг устойчивого положения около 10 или 11 дня, объем уплотненных клеток продолжил расти приблизительно до 13 или 14 дня (фиг. 6С). Производительность двух культур также была похожа. Культура, обрабатываемая средой, содержащей 5 мМ аспарагина, вырабатывала 14,2-15,7 г/л (10,7-11,4 г/л объема уплотненных клеток) в лабораторных масштабах с реактором объемом 2 л по сравнению с 15,0-17,3 г/л (10,6-12,8 г/л объема уплотненных клеток) в полупромышленных масштабах с объемом 500 л (фиг. 6В и 6D). Жизнеспособность оказалась немного ниже в полупромышленных масштабах (фиг. 6Е).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ культивирования клеток яичника китайского хомячка (ЯКХ), экспрессирующих рекомбинантный белок, который отличается тем, что включает размещение культуры клеток ЯКХ в бессывороточной культуральной среде в биореакторе путем введения в реактор как минимум от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной культуральной среде;

выращивание клеток ЯКХ во время фазы роста и подпитывание культуральной среды болюсной подачей бессывороточной среды,

начало перфузии приблизительно на 5-9 день клеточной культуры, и

поддержание клеток ЯКХ во время фазы продуцирования с помощью перфузии бессывороточной перфузионной средой, при этом объем уплотненных клеток во время фазы продуцирования составляет 35% или меньше.

2. Способ по п.1, который отличается тем, что перфузию начинают приблизительно на 5-7 день

культивирования.

3. Способ по п.1 или 2, который отличается тем, что перфузию начинают, когда клетки достигают фазы продуцирования.

4. Способ по любому из пп.1-3, который отличается тем, что он дополнительно включает (а) индуцирование задержки пролиферации клеток путем создания недостатка L-аспарагина с последующей перфузией бессывороточной перфузионной средой, имеющей концентрацию L-аспарагина 5 мМ или менее, (б) индуцирование задержки пролиферации клеток путем перфузии бессывороточной перфузионной средой, имеющей концентрацию L-аспарагина 5 мМ или менее, или (с) изменение температуры, при котором фаза роста происходит при температуре от приблизительно 35°C до приблизительно 38°C, а фаза продуцирования происходит при температуре от приблизительно 30°C до приблизительно 34°C.

5. Способ по любому из пп.1 и 4, который отличается тем, что концентрация L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 5 мМ или менее, 4,0 мМ или менее, 3 мМ или менее, 2,0 мМ или менее, 1,0 мМ или менее.

6. Способ по п.4, который отличается тем, что концентрация L-аспарагина в культуральной среде контролируется до начала и во время перфузии бессывороточной перфузионной средой, имеющей концентрацию L-аспарагина 5 мМ или менее.

7. Способ по любому из пп.1-6, который отличается тем, что объем уплотненных клеток равен 30% или менее.

8. Способ по любому из пп.1-6, который отличается тем, что плотность жизнеспособных клеток культуры клеток ЯКХ в объеме уплотненных клеток составляет 35% или менее и составляет от 10×10^6 до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл, предпочтительно плотность жизнеспособных клеток культуры клеток ЯКХ составляет от 20×10^6 до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

9. Способ по любому из пп.1-8, который отличается тем, что перфузия бессывороточной средой является непрерывной перфузией.

10. Способ по любому из пп.1-9, который отличается тем, что перфузию осуществляют при постоянной скорости перфузии.

11. Способ по любому из пп.1-10, который отличается тем, что перфузия осуществляется (а) со скоростью, меньшей или равной 1,0 рабочих объемов в день, или (б) со скоростью, увеличивающейся во время фазы продуцирования от 0,25 до 1,0 рабочего объема в день во время культивирования клеток.

12. Способ по любому из пп.1-11, который отличается тем, что перфузия проводится со скоростью, достигающей 1,0 рабочего объема в день на 9-11 день культивирования клеток, предпочтительно на 10 день культивирования клеток.

13. Способ по любому из пп.1-12, который отличается тем, что болюсная подача бессывороточной среды начинается на 3 или 4 день культивирования клеток.

14. Способ по любому из пп.1-13, который отличается тем, что культура клеток ЯКХ размещается путем введения в реактор по меньшей мере от $0,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной культуральной среде.

15. Способ по любому из пп.1-14, который отличается тем, что он предусматривает изменение температуры от 36 до 31°C или от 36 до 33°C, причем изменение температуры происходит при переходе от фазы роста к фазе продуцирования или во время фазы продуцирования.

16. Способ по любому из пп.1-14, который дополнительно предусматривает изменение температуры, при котором температура снижается от интервала между 35 и 38°C до интервала между 30 и 34°C, причем изменение температуры происходит при переходе между фазой роста и фазой продуцирования.

17. Способ по любому из пп.1-14, который дополнительно предусматривает изменение температуры, при котором фаза роста происходит при температуре от приблизительно 35 до приблизительно 38°C, а фаза продуцирования происходит при температуре от приблизительно 30 до приблизительно 34°C.

18. Способ по любому из пп.1-17, который отличается тем, что перфузия осуществляется переменным тангенциальным потоком.

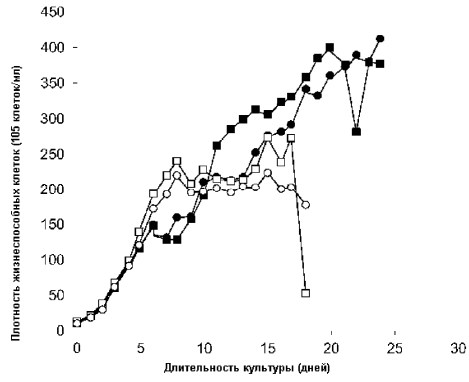
19. Способ по любому из пп.1-18, который отличается тем, что емкость биореактора составляет по меньшей мере 500 л, предпочтительно по меньшей мере от 500 до 2000 л или по меньшей мере от 1000 до 2000 л.

20. Способ по любому из пп.1-19, который отличается тем, что рекомбинантный белок выбран из группы, включающей человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантный слитый белок или цитокин.

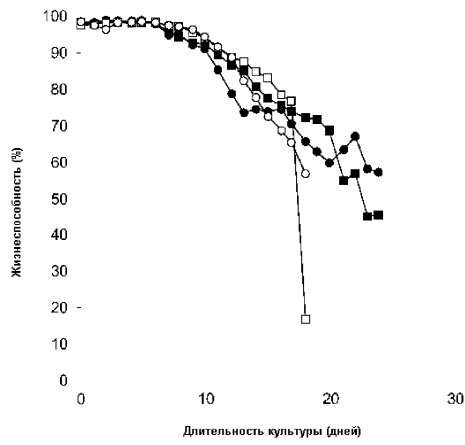
21. Способ по любому из пп.1-20, который дополнительно включает стадию сбора рекомбинантного белка, продуцированного клеточной культурой.

22. Способ по любому из пп.1-21, который отличается тем, что рекомбинантный белок, продуцированный клеточной культурой, очищают и формируют фармакологически приемлемый препарат.

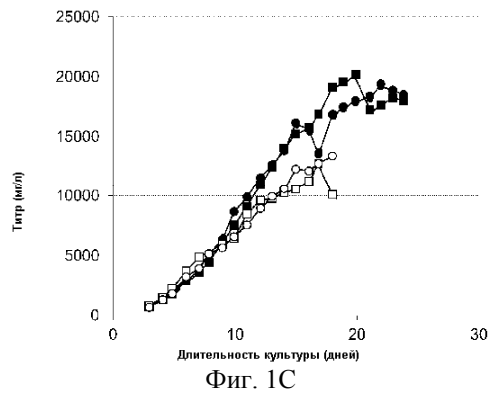
039023



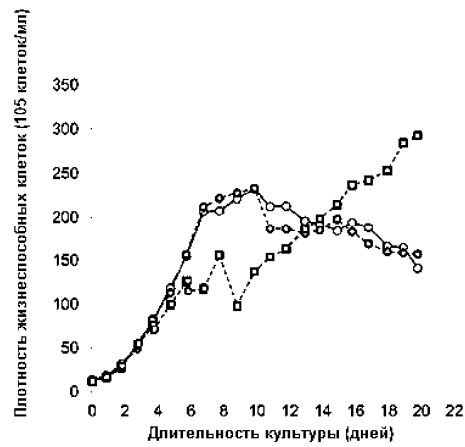
Фиг. 1А



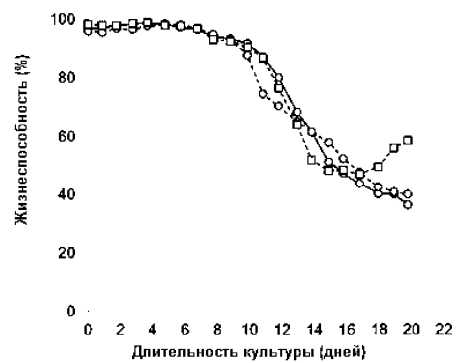
Фиг. 1В



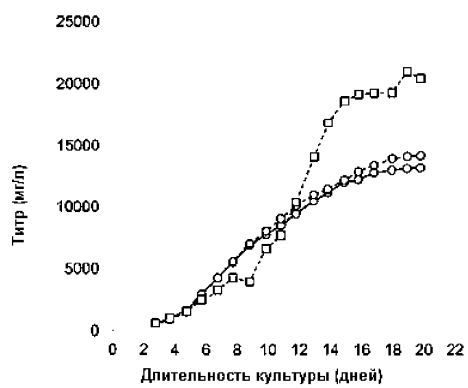
Фиг. 1С



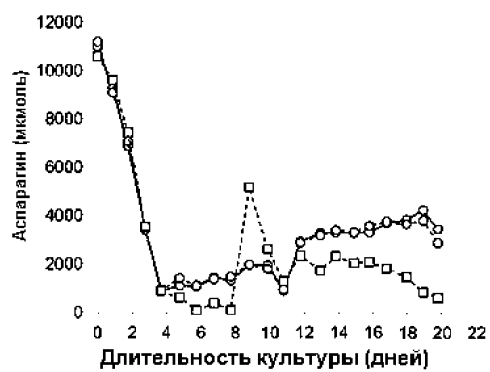
Фиг. 2А



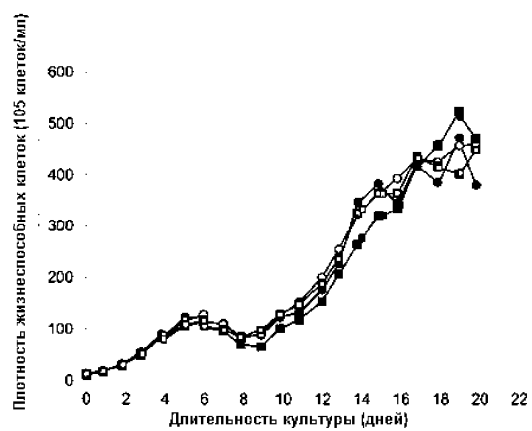
Фиг. 2В



Фиг. 2С

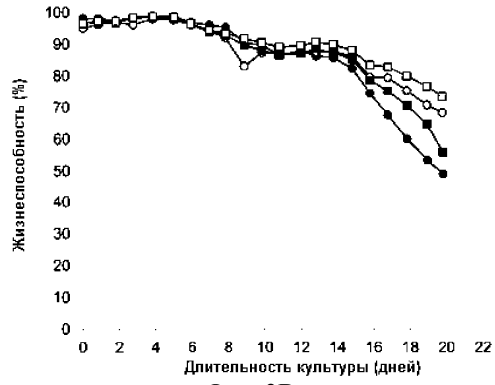


Фиг. 2D

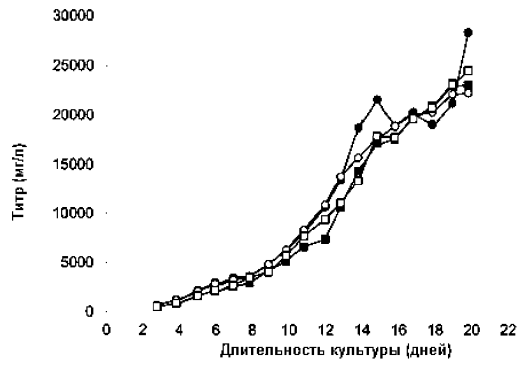


Фиг. 3А

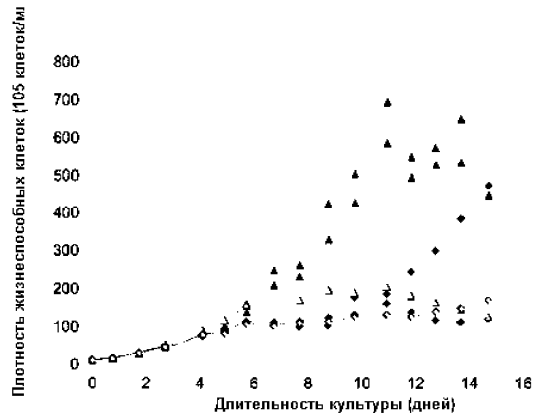
039023



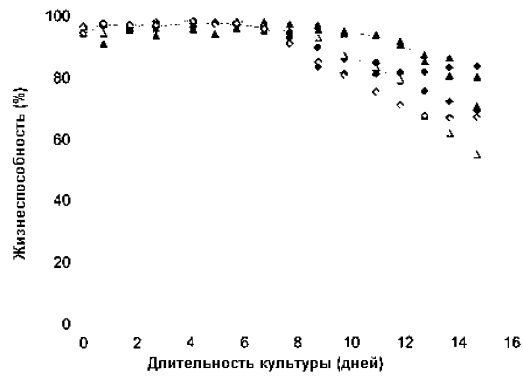
Фиг. 3В



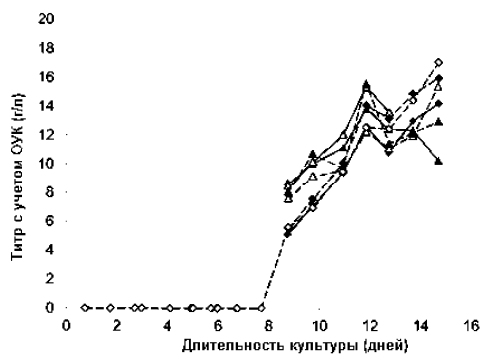
Фиг. 3С



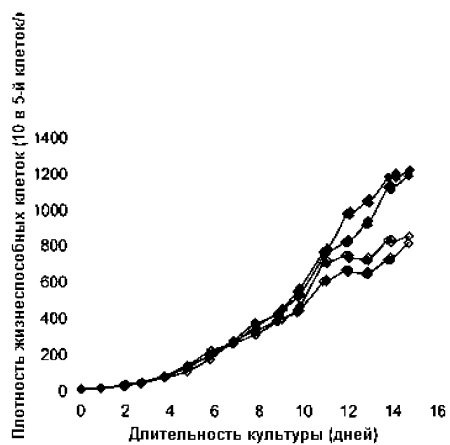
Фиг. 4А



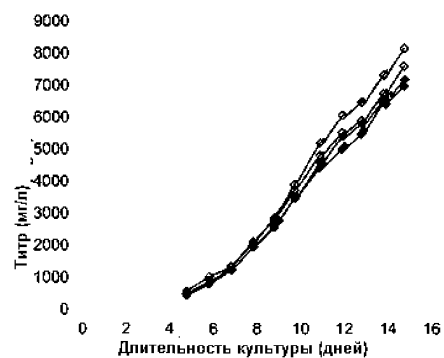
Фиг. 4В



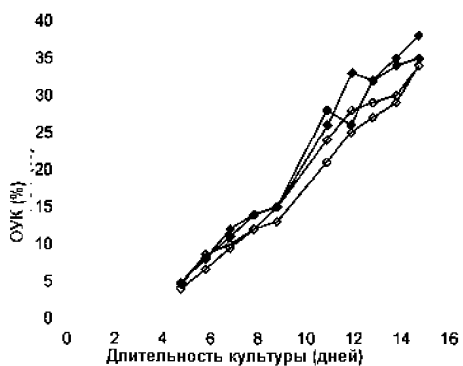
Фиг. 4С



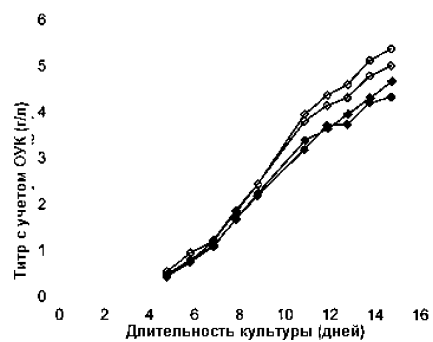
Фиг. 5А



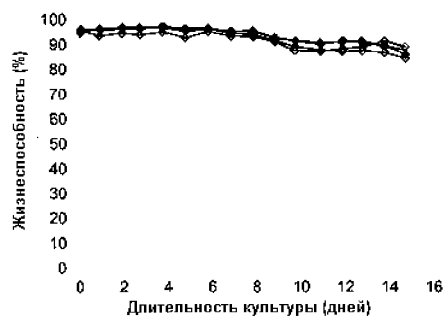
Фиг. 5В



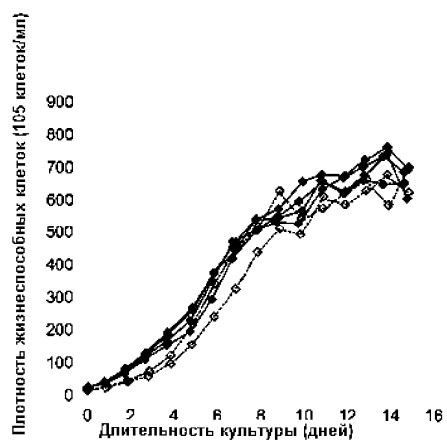
Фиг. 5С



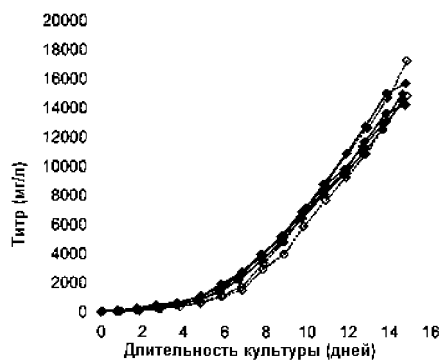
Фиг. 5D



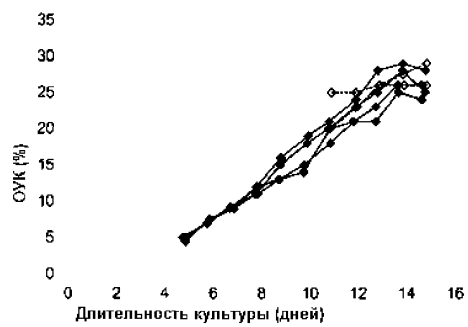
Фиг. 5E



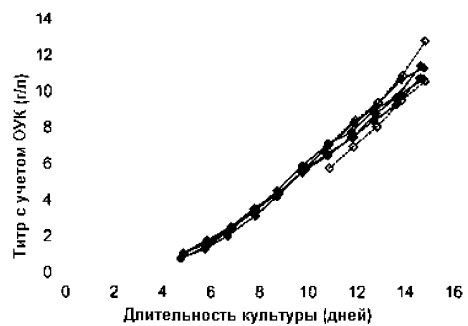
Фиг. 6A



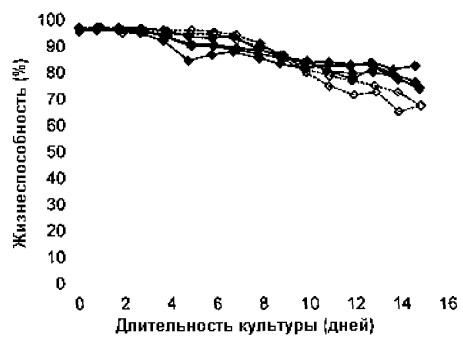
Фиг. 6B



Фиг. 6С



Фиг. 6D



Фиг. 6E

