

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293473** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.02.28

(51) Int. Cl. *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.15

(54) **ПЕРФУЗИОННЫЙ БИОРЕАКТОР И СВЯЗАННЫЕ С НИМ СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/572,918**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.10.16**

**Анджелини Мэттью, Уитмер Эшли,
Дибайэс Энтони (US)**

(33) **US**

(62) **202090740; 2018.10.15**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) Способ управления биореакторной системой, включающий в себя подачу культуры клеток в биореактор, при этом условия в биореакторе позволяют культуре клеток продуцировать представляющий интерес белок (ИБ), измерение технологических параметров (ТП) культуры внутри биореактора с помощью рамановской спектроскопии, при этом технологические параметры выбирают из группы, состоящей из концентрации питательного вещества, концентрации жизнеспособных клеток и атрибутов белка, измерение предварительно заданной массы биореактора с культурой клеток, удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с применением первой выводной трубы при первом номинальном расходе, удаление клеток из культуры клеток с применением второй выводной трубы при втором номинальном расходе и введение одной или обеих из свежей питательной среды и питательных веществ в культуру клеток с применением вводной трубы при третьем номинальном расходе.

202293473

A1

A1

202293473

ПЕРФУЗИОННЫЙ БИОРЕАКТОР И СВЯЗАННЫЕ С НИМ СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ(ЫЕ) ЗАЯВКУ(И)

[001] Эта патентная заявка испрашивает приоритет в соответствии с документом 35 U.S.C. § 119 по предварительной патентной заявке США № 62/572,918, поданной 16 октября 2017 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Данное раскрытие направлено на перфузионный биореактор и связанные с ним способы применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Биореакторы могут использоваться для поддержания культуры клеток с целью производства биологических продуктов, таких как белки. В биореакторе с подпиткой одно или большее количество питательных веществ подают в биореактор во время культивирования, а биологические продукты остаются в биореакторе до окончания партии продукции. Перфузионные биореакторы решают некоторые эксплуатационные проблемы, связанные с реакторами с подпиткой, и начали набирать популярность в конце 1990-х годов. Тем не менее, современные перфузионные биореакторы страдают от ограниченного числа доступных стратегий управления, недостающих данных и больших затрат.

[004] Например, для решения задач управления для перфузионных реакторов предпринимаются попытки откалибровать объемный расход вводного и выводного питающих насосов, одновременно учитывая смещение характеристики насоса и изменчивость технологического процесса. Однако неудачные промышленные серии могут привести к переполнению или опустошению биореактора из-за внутренних различий (например, производственных отклонений) между любыми двумя заданными насосами и невозможности добиться точного управления. Существующим решениям задач управления также не хватает возможности измерять другие параметры, такие как, например, атрибуты качества аммония, глюкозы и белка. Варианты осуществления настоящего раскрытия относятся к одному или большему количеству ограничений и недостатков существующих перфузионных биореакторов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] Варианты осуществления настоящего раскрытия относятся, среди прочего, к способу управления биореактором и биореакторной системой, полезного для управления технологическим процессом культивирования клеток для продуцирования белка. Каждый из раскрытых в данном документе вариантов осуществления изобретения может включать в себя один или большее количество признаков, описанных в связи с любым из других вариантов осуществления изобретения.

[006] Данное раскрытие относится к способу управления биореакторной системой,

включающему в себя подачу культуры клеток в биореактор; измерение одного или большего количества параметров технологического процесса культуры клеток в биореакторе с помощью зонда для рамановской спектроскопии; удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с использованием первой выводной трубы с первым номинальным расходом; удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы со вторым номинальным расходом; введение одной или обеих из свежей питательной среды или питательных веществ в культуру клеток с использованием вводной трубы с третьим номинальным расходом; и изменение одного или большего количества из первого номинального расхода, второго номинального расхода или третьего номинального расхода на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии.

[007] Один вариант осуществления изобретения относится к способу управления биореакторной системой, который включает в себя подачу культуры клеток в биореактор, при этом условия в биореакторе позволяют культуре клеток продуцировать представляющий интерес белок (ИБ), измерение технологических параметров (ТП) культуры внутри биореактора с помощью рамановской спектроскопии, при этом технологические параметры выбирают из группы, состоящей из концентрации питательного вещества, концентрации жизнеспособных клеток и атрибутов белка, измерение массы биореактора с содержимым культуры клеток, удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуру клеток с использованием первой выводной трубы с первым номинальным расходом, удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы со вторым номинальным расходом, введение одной или обеих из свежей питательной среды и питательных веществ в культуру клеток с использованием вводной трубы при третьем номинальном расходе, и при этом вводная и выводная трубы регулируются на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии и измерения массы биореактора для поддержания (i) одного или большего количества технологических параметров в предварительно заданных диапазонах, (ii) массы биореактора с культурой клеток в предварительно заданных диапазонах и (iii) третьего номинального расхода вводной трубы, а также первого и второго номинальных расходов каждой из выводных труб в пределах их соответствующих предварительно заданных диапазонов.

[008] В некоторых вариантах осуществления изобретения измерение одного или большего количества технологических параметров культуры в биореакторе с помощью рамановской спектроскопии происходит через регулярные интервалы, *например*, по меньшей мере один раз в час. В других вариантах осуществления изобретения способ включает в себя возможность поддержания в устойчивом состоянии культуры клеток при средней концентрации жизнеспособных клеток по меньшей мере около 30 миллионов клеток на мл в течение по меньшей мере около 30 дней. В одном варианте осуществления изобретения биореактор имеет объем по меньшей мере 2 л, по меньшей мере 3 л, по меньшей мере 10 л, по меньшей мере 35 л или по меньшей мере 50 л, или более, и способ

включает в себя возможность поддержания массы биореактора с культурой клеток в пределах 0,1 процента от первоначальной массы биореактора с культурой клеток. Например, биореактор имеет объем по меньшей мере около 10 л, и способ включает в себя возможность поддержания массы биореактора и культуры клеток в пределах диапазона массы, определенной на основе начальной массы биореактора и содержимого культуры клеток, *например*, в пределах диапазона около 20 ± 2 г. В некоторых вариантах осуществления изобретения биореактором управляют, когда: технологический параметр отклоняется от заданного значения в соответствующем желаемом диапазоне, выполняют одно или большее количество из удаления бесклеточной питательной среды, удаления клеток и введения одной или обеих из свежей питательной среды и питательных веществ, а затем биореактор регулируется, чтобы уменьшить отклонение. По меньшей мере два объема биореактора истощенной питательной среды удаляются через первую выводную трубу в сутки. До трех объемов биореактора истощенной питательной среды удаляется через первую выводную трубу в сутки. Технологические параметры включают в себя температуру культуры клеток и рН культуры клеток, и температуру поддерживают от около 30 градусов Цельсия до 40 градусов Цельсия, от около 32 градусов Цельсия до около 38 градусов Цельсия или от около 34 градусов Цельсия до около 38 градусов Цельсия, и рН поддерживается от около 6,50 до около 7,50, от около 6,60 до около 7,40, от около 6,70 до около 7,40, от около 6,80 до около 7,30, от около 6,90 до около 7,20, от около 7,00 до около 7,10, при около 6,50, при около 6,55, при около 6,60, при около 6,65, при около 6,70, при около 6,75, при около 6,80, при около 6,85, при около 6,90, при около 6,95, при около 7,00, при около 7,05, при около 7,10, при около 7,15, при около 7,20, при около 7,25, при около 7,30, при около 7,35, при около 7,40, при около 7,45 или при около 7,50. Технологические параметры включают в себя специфическую продуктивность клеток, и способ включает в себя возможность поддержания клеток в культуре клеток при специфической продуктивности клеток по меньшей мере около 15-60 пкг/кл/сут, около 15-25 пкг/кл/сут, по меньшей мере около 17-23 пкг/кл/сут или по меньшей мере около 19-21 пкг/кл/сут в течение по меньшей мере 25-37 дней. Технологические параметры включают в себя концентрацию глюкозы, и способ включает в себя возможность поддержания концентрации глюкозы от около 5 мМ до около 85 мМ или от около 0,5 г/л до около 15,5 г/л, от около 1 г/л до около 15,5 г/л, от около 0,5 г/л до около 8 г/л, от около 2 г/л до около 6 г/л или от около 3 г/л до около 5 г/л. Технологические параметры включают в себя концентрацию лактата, и способ включает в себя возможность поддержания концентрации лактата менее чем около 60 мМ или менее чем около 6 г/л, менее чем около 5 г/л, менее чем около 4 г/л, менее чем около 3 г/л, менее чем около 2 г/л или менее чем около 1 г/л. Технологические параметры включают в себя концентрацию аммония, и способ включает в себя возможность поддержания концентрации аммония менее чем около 15 мМ, менее чем около 12 мМ, менее чем около 10 мМ, менее чем около 9 мМ, менее чем около 8 мМ, менее чем около 7 мМ, менее чем около 6 мМ. Каждым из удаления бесклеточной истощенной питательной среды, удаления

клеток и введения одной или обеих из свежей питательной среды и питательных веществ управляют соответствующим насосом. Биореактор содержит фильтр, выполненный с возможностью удержания клеток и обеспечения возможности сквозного прохода жидкости.

[009] В другом варианте осуществления раскрытие относится к способу управления биореакторной системой, включающему в себя подачу культуры клеток в биореактор; измерение одного или большего количества технологических параметров (ТП) культуры клеток в биореакторе с помощью зонда для рамановской спектроскопии; и регулирование одного или большего количества вводов или выводов биореактора на основе измерений с зонда для рамановской спектроскопии.

[010] Способ в соответствии с данным раскрытием проиллюстрирован как включающий в себя следующие этапы: подача культуры клеток в биореактор (302), при этом условия в биореакторе позволяют культуре клеток продуцировать представляющий интерес белок (ИБ), измерение технологических параметров культуры внутри биореактора с помощью рамановской спектроскопии (304), при этом технологические параметры выбирают из по меньшей мере группы, состоящей из концентрации питательного вещества, концентрации жизнеспособных клеток и атрибутов белка, измерение предварительно заданной массы биореактора с культурой клеток (306), удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с использованием первой выводной трубы с первым номинальным расходом (308), удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы со вторым номинальным расходом (310), введение одной или обеих из свежей питательной среды и питательных веществ в культуру клеток с использованием вводной трубы при третьем номинальном расходе, и при этом вводная и выводная трубы регулируются на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии и измерения массы биореактора для поддержания (i) одного или большего количества технологических параметров в предварительно заданных диапазонах, (ii) массы биореактора с культурой клеток в предварительно заданных диапазонах и (iii) третьего номинального расхода вводной трубы, а также первого и второго номинальных расходов каждой из выводных труб в пределах их соответствующих предварительно заданных диапазонов (312).

[011] В еще одном аспекте данное раскрытие относится к биореакторной системе культивирования, содержащей резервуар, содержащий вводную трубу и по меньшей мере одну выводную трубу; по меньшей мере один насос; фильтр, соединенный с резервуаром; зонд для рамановской спектроскопии, соединенный с резервуаром; и контроллер, соединенный с по меньшей мере одним насосом и зондом для рамановской спектроскопии, причем контроллер выполнен с возможностью управления по меньшей мере одним насосом на основе входного сигнала из зонда для рамановской спектроскопии.

[012] По меньшей мере одна выводная труба содержит первую выводную трубу для соединения со вторым насосом, выполненным с возможностью управления удалением

жидкости из резервуара, и вторую выводную трубу для соединения с третьим насосом, выполненным с возможностью управления удалением клеток из резервуара. Фильтр выполнен с возможностью удержания клеток в резервуаре и для обеспечения возможности прохода жидкости через фильтр. Зонд для рамановской спектроскопии расположен внутри резервуара. Контроллер соединен с первым насосом, вторым насосом и третьим насосом. Биореактор содержит весы, выполненные с возможностью измерения массы резервуара с культурой клеток внутри резервуара; при этом контроллер выполнен с возможностью получения данных о массе от весов. Контроллер выполнен с возможностью сравнения массы резервуара с заданным значением массы и на основе сравнения регулирует одно или большее количество из производительностей первого насоса, второго насоса и третьего насоса. Контроллер выполнен с возможностью приема спектральных данных от зонда для рамановской спектроскопии; определения на основании полученных спектральных данных параметра культуры клеток; сравнения определенного параметра с заданным значением параметра; и регулирования, на основе сравнения, одного или большего количества из производительностей первого насоса, второго насоса или третьего насоса. Регулирование производительности одного или большего количества из первого насоса, второго насоса и третьего насоса уменьшает отклонение между определенным параметром и заданным значением параметра или отклонение между полученной массой и заданным значением массы. Способ включает в себя возможность поддержания при установившемся режиме работы культуры клеток при средней концентрации жизнеспособных клеток, составляющей по меньшей мере 30 миллионов клеток на мл в течение 30 дней. Объем резервуара составляет по меньшей мере 10 л, и способ включает в себя возможность поддержания массы резервуара с культурой клеток в пределах колебаний 20 г. Объем резервуара составляет по меньшей мере 10 л, и способ включает в себя возможность поддержания массы биореактора с культурой клеток в пределах 0,1 процента от первоначальной массы резервуара с культурой клеток. Контроллер выполнен с возможностью определения на основе принятых спектральных данных совокупности параметров культуры биореактора; сравнения каждого из совокупности параметров с соответствующим заданным значением для каждого из совокупности параметров; и регулирования на, основе сравнения, одного или большего количества из производительностей первого насоса, второго насоса и третьего насоса, чтобы уменьшить отклонение между определенными параметрами и соответствующими заданными значениями. Указанная совокупность параметров включает в себя температуру, pH, концентрацию питательных веществ, концентрацию лактата, концентрацию аммония и специфическую продуктивность клеток. Фильтр выполнен с возможностью удержания клеток и обеспечения возможности сквозного прохода жидкости. Биореактор содержит весы, при этом резервуар и фильтр опираются на весы. Биореактор содержит весы, при этом резервуар опирается на весы. Биореактор содержит весы, при этом резервуар находится в физическом контакте с весами.

[013] Биореакторная система культивирования содержит: резервуар, содержащий

вводную трубу и по меньшей мере одну выводную трубу; по меньшей мере один насос; фильтр, соединенный с резервуаром; зонд для рамановской спектроскопии, соединенный с резервуаром; весы, соединенные с резервуаром; и контроллер, соединенный по меньшей мере с одним насосом, весами и зондом для рамановской спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления изобретения фильтр и резервуар находятся в контакте с весами. В другом варианте осуществления изобретения фильтр содержит сетчатый материал. В некоторых вариантах осуществления изобретения фильтр содержит сетку с размерами пор в диапазоне от 0,2 мкм до 30 мкм.

[014] В еще одном варианте осуществления изобретения данное раскрытие относится к биореакторной системе культивирования, содержащей резервуар, содержащий вводную трубу и по меньшей мере одну выводную трубу; по меньшей мере один насос; фильтр, соединенный с резервуаром; весы, находящиеся в контакте с резервуаром; зонд для рамановской спектроскопии, соединенный с резервуаром; и контроллер, соединенный по меньшей мере с одним насосом, весами и зондом для рамановской спектроскопии, причем контроллер выполнен с возможностью управления по меньшей мере одним насосом на основе входного сигнала от зонда для рамановской спектроскопии и входного сигнала от весов.

[015] В другом варианте осуществления изобретения раскрыта биореакторная система культивирования. Биореакторная система культивирования содержит резервуар, содержащий вводную трубу для соединения с первым насосом, выполненным с возможностью управления подачи жидкости в резервуар, первую выводную трубу для соединения со вторым насосом, выполненным с возможностью управления удалением жидкости из резервуара, и третью выводную трубу для подключения к третьему насосу, выполненному с возможностью управления удалением клеток из резервуара, фильтр, соединенный с резервуаром, при этом фильтр выполнен с возможностью удержания клеток в резервуаре и обеспечения возможности жидкости проходить через фильтр, весы, выполненные с возможностью измерения массы резервуара с культурой клеток внутри резервуара, зонд для рамановской спектроскопии, расположенный внутри резервуара. Вариант осуществления изобретения включает в себя контроллер, соединенный с первым насосом, вторым насосом, третьим насосом, весами и зондом для рамановской спектроскопии, при этом контроллер выполнен с возможностью приема данных о массе от весов, сравнения массы резервуара с заданным значением для массы, приема спектральных данных от зонда для рамановской спектроскопии, определения на основе принятых спектральных данных параметра культуры клеток, сравнения определенного параметра с заданным значением параметра и регулирования, на основе сравнений, одного или большего количества из производительностей первого насоса, второго насоса и третьего насоса.

[016] Регулировка производительности одного или большего количества из первого насоса, второго насоса и третьего насоса уменьшает отклонение между определенным параметром и заданным значением параметра или отклонение между принятой массой и

заданным значением массы. Контроллер выполнен с возможностью поддержания в устойчивом состоянии культуры клеток при средней концентрации жизнеспособных клеток, составляющей по меньшей мере 30 миллионов клеток на мл в течение 30 дней. Объем резервуара составляет по меньшей мере 3 л, и контроллер выполнен с возможностью поддержания массы резервуара с культурой клеток в пределах колебаний 20 г. Объем резервуара составляет по меньшей мере 3 л, и контроллер выполнен с возможностью поддержания массы биореактора с культурой клеток в пределах 0,1 процента от первоначальной массы резервуара с культурой клеток. Контроллер выполнен с возможностью определения на основе принятых спектральных данных совокупности параметров культуры биореактора, сравнения каждого из совокупности параметров с соответствующим заданным значением для каждого из совокупности параметров, и регулирования, на основе сравнения, одного или большего количества из производительностей первого насоса, второго насоса и третьего насоса, чтобы уменьшить отклонение между определенными параметрами и соответствующими заданными значениями. Совокупность параметров включает в себя температуру, рН, концентрацию питательных веществ, концентрацию лактата, концентрацию аммония и специфическую продуктивность клеток. Биореакторная система культивирования содержит фильтр, выполненный с возможностью удержания клеток и обеспечения возможности сквозного прохода жидкости. Резервуар и фильтр опираются на весы. Резервуар опирается на весы.

[017] В определенных вариантах осуществления изобретения биореакторная система культивирования в соответствии с данным раскрытием иллюстрируется как содержащая следующие элементы: резервуар (10), содержащий вводную трубу для соединения с первым насосом (30), выполненным с возможностью управления подачей жидкости в резервуар, первую выводную трубу для соединения со вторым насосом (40), выполненным с возможностью управления удалением жидкости из резервуара, и третью выводную трубу для соединения с третьим насосом (50), выполненным с возможностью управления удалением клеток из резервуара; фильтр (100), соединенный с резервуаром, связанный с ним или иным образом находящийся в жидкостной связи с резервуаром, при этом фильтр выполнен с возможностью удержания клеток в резервуаре и обеспечения возможности пропускания жидкости через фильтр; весы (110), выполненные с возможностью измерения массы резервуара с культурой клеток внутри резервуара; зонд (18) для рамановской спектроскопии, расположенный внутри резервуара; и контроллер (200), соединенный с первым насосом (30), вторым насосом (40), третьим насосом (50), весами (110) и зондом (18) для рамановской спектроскопии.

[018] В биореакторной системе культивирования контроллер (200) выполнен с возможностью: приема данных о массе от весов (110); сравнения массы резервуара (10) с заданным значением для массы; приема спектральных данных от зонда (18) для рамановской спектроскопии; определения на основе принятых спектральных данных параметра культуры клеток; сравнения определенного параметра с заданным значением параметра; и регулирования, на основе сравнений, одного или большего количества из

производительностей первого насоса, второго насоса и третьего насоса.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[019] Прилагаемые графические материалы, которые включены и составляют часть этого описания, иллюстрируют различные примеры и вместе с описанием служат для объяснения принципов раскрытых примеров и вариантов осуществления изобретения.

[020] Аспекты раскрытия могут быть реализованы в связи с вариантами осуществления изобретения, проиллюстрированными на приложенных графических материалах. Эти графические материалы показывают различные аспекты настоящего раскрытия, и, где это целесообразно, ссылочные позиции, иллюстрирующие одинаковые структуры, компоненты, материалы и/или элементы на разных фигурах, обозначены одинаково. Понятно, что различные комбинации структур, компонентов и/или элементов, кроме тех, которые конкретно показаны, рассматриваются и находятся в пределах объема настоящего раскрытия.

[021] Кроме того, в данном документе описано и проиллюстрировано много вариантов осуществления изобретения. Настоящее раскрытие не ограничено ни одним отдельным аспектом или его вариантом осуществления, ни какими-либо комбинациями и/или перестановками таких аспектов и/или вариантов осуществления изобретения. Кроме того, каждый из аспектов настоящего раскрытия и/или его вариантов осуществления может использоваться отдельно или в сочетании с одним или большим количеством других аспектов настоящего раскрытия и/или его вариантами осуществления. Для краткости некоторые перестановки и комбинации не обсуждаются и/или не иллюстрируются отдельно в данном документе. В частности, вариант осуществления изобретения или вариант реализации изобретения, описанный в данном документе как «представленный в качестве примера», не должен рассматриваться как предпочтительный или преимущественный, например, по сравнению с другими вариантами осуществления изобретения или вариантами реализации изобретения; скорее, он предназначен для отражения или указания варианта (вариантов) осуществления изобретения, который/которые является/являются «представленным в качестве примера» вариантом (вариантами) осуществления изобретения.

[022] Фиг. 1 представляет собой схематический вид биореакторной системы в соответствии с примером данного раскрытия.

[023] Фиг. 2 представляет собой схематический вид представленного в качестве примера контроллера биореакторной системы в соответствии с фиг. 1, и его соответствующие входы и выходы.

[024] Фиг. 3 представляет собой блок-схему последовательности операций представленного в качестве примера способа согласно данному раскрытию.

[025] Фиг. 4 представляет собой графическое сравнение измеренной концентрации жизнеспособных клеток в перфузионном биореакторе на 37 день партии продукции с измеренной концентрацией жизнеспособных клеток в биореакторе с подпиткой на 6 день партии продукции.

[026] Фиг. 5 представляет собой график, показывающий нормализованную специфическую продуктивность клеток во времени между перфузионным биореактором и биореактором с подпиткой, описанным со ссылкой на фиг. 4.

[027] Фиг. 6 представляет собой график, показывающий концентрацию жизнеспособных клеток во времени для перфузионного биореактора, в котором не управляют концентрацией жизнеспособных клеток или глюкозой.

[028] Фиг. 7 представляет собой график, показывающий концентрацию глюкозы во времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 6.

[029] Фиг. 8 представляет собой график, показывающий жизнеспособность клеток во времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 6.

[030] Фиг. 9 представляет собой график, показывающий концентрацию жизнеспособных клеток во времени для перфузионного биореактора, в котором управляли концентрацией жизнеспособных клеток.

[031] Фиг. 10 представляет собой график, показывающий жизнеспособность клеток при установившемся режиме работы в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 9.

[032] Фиг. 11 представляет собой график, показывающий нормализованное продуцирование белка (титр) с течением времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 9.

[033] Фиг. 12 представляет собой график, показывающий концентрацию глюкозы во времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 9.

[034] Фиг. 13 представляет собой график сравнения концентраций жизнеспособных клеток в перфузионном биореакторе и биореакторе с подпиткой.

[035] Фиг. 14 представляет собой график сравнения нормализованного продуцирования белка (титра), достигнутого в биореакторах, описанных на фиг. 13.

[036] Фиг. 15 представляет собой график, показывающий концентрацию жизнеспособных клеток во времени для перфузионного биореактора, управляющего концентрацией жизнеспособных клеток с использованием зонда для рамановской спектроскопии.

[037] Фиг. 16 представляет собой график, показывающий жизнеспособность клеток во времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 15.

[038] Фиг. 17 представляет собой график, показывающий нормализованное продуцирование белка (титр) с течением времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 15.

[039] Фиг. 18 представляет собой график, показывающий концентрацию глюкозы во времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 15.

[040] Фиг. 19 представляет собой график, показывающий концентрацию жизнеспособных клеток во времени для перфузионных биореакторов, управляющих концентрацией жизнеспособных клеток с использованием зонда для рамановской спектроскопии.

[041] Фиг. 20 представляет собой график, показывающий нормализованное

продуцирование белка (титр) с течением времени в перфузионном биореакторе, описанном на фиг. 19.

[042] Фиг. 21 представляет собой график, показывающий концентрацию жизнеспособных клеток во времени для перфузионного биореактора, управляющего концентрацией жизнеспособных клеток с использованием зонда для рамановской спектроскопии.

[043] Кроме того, в данном документе описано и проиллюстрировано много вариантов осуществления изобретения. Настоящее раскрытие не ограничено ни одним отдельным аспектом или его вариантом осуществления, ни какими-либо комбинациями и/или перестановками таких аспектов и/или вариантов осуществления изобретения. Каждый из аспектов настоящего раскрытия и/или его вариантов осуществления может использоваться отдельно или в сочетании с одним или большим количеством других аспектов настоящего раскрытия и/или его вариантами осуществления. Для краткости многие из этих комбинаций и перестановок не обсуждаются отдельно в данном документе.

[044] В частности, для простоты и ясности иллюстрации некоторые аспекты фигур изображают общую структуру и/или способ построения различных вариантов осуществления изобретения. Описания и подробности известных признаков и методов могут быть опущены, чтобы избежать ненужного затенения других признаков. Элементы на фигурах не обязательно изображены в масштабе; размеры некоторых признаков могут быть преувеличены относительно других элементов для улучшения понимания представленных в качестве примера вариантов осуществления изобретения. Например, специалист в данной области техники понимает, что виды в поперечном разрезе не изображены в масштабе и не должны рассматриваться как представляющие пропорциональные отношения между различными компонентами. Виды в поперечном разрезе предоставлены для того, чтобы помочь проиллюстрировать различные компоненты изображенного узла и показать их взаимное расположение друг с другом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[045] Теперь будет сделана подробная ссылка на примеры настоящего раскрытия, которые проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах. Везде, где возможно, одни и те же ссылочные позиции будут использоваться на всех графических материалах для обозначения одинаковых или похожих частей. В последующем обсуждении относительные термины, такие как «около», «по существу», «приблизительно» и т. д., используются для обозначения возможного отклонения $\pm 10\%$ в указанном числовом значении. Более того, в формуле изобретения значения, пределы и/или диапазоны означают значение, предел и/или диапазон $\pm 10\%$.

[046] Термин «труба» относится к каналу, трубке, соединению, проходу или тому подобному, по которым может проходить жидкость. В одном примере труба может представлять собой биопреновые термопластичные трубки от компании Watson-Marlow.

[047] «Периодическая культура» или «периодический режим» относится к блоку

(например, сосуд для культивирования), который заполнен клетками и имеет начальный рабочий объем среды культуры клеток, который никогда не обменивается. В такой периодической культуре все компоненты для культивирования клеток подаются в сосуд для культивирования в начале технологического процесса культивирования. Культура может работать до тех пор, пока питательные вещества не будут исчерпаны или продукты жизнедеятельности не достигнут токсичных уровней, запускающих апоптоз.

[048] Фраза «культура клеток с подпиткой» или «культура с подпиткой» относится к периодической культуре, при этом клетки животных и культуральную среду первоначально подают в сосуд для культивирования, а дополнительные питательные вещества для культуры подают либо непрерывно, либо в виде отдельных болюсных добавок к культуре во время культивирования с или без периодического сбора клеток и/или продуктов до прекращения культивирования. Культура с подпиткой включает в себя «полунепрерывную культуру с подпиткой», при этом периодически целую культуру (которая может включать клетки и питательную среду) удаляют и заменяют свежей питательной средой. Культура с подпиткой отличается от простой «периодической культуры» добавлением (или удалением) компонентов в сосуд во время культивирования. Культуру с подпиткой можно дополнительно отличить от перфузионного культивирования, поскольку во время технологического процесса с подпиткой питательная среда не заменяется в той же мере, тогда как при перфузионном культивировании все или некоторые клетки сохраняются в культуре, например, с использованием фильтра или устройства для удержания клеток, а культуральная среда непрерывно или периодически подается, в то время как побочные продукты, замедляющие рост, постоянно или периодически удаляются из сосуда для культивирования. В технологическом процессе с подпиткой, который отличается от перфузионного технологического процесса, культивирование продолжается до тех пор, пока не будет определено, что достигнут максимальный или иным образом определенный рабочий объем и/или продуцирование белка, а затем продукты культуры с подпиткой собирают.

[049] Перфузионная культура в качестве способа получения интересующего белка также рассматривается для использования в способах по настоящему изобретению. Способы перфузии культуры клеток для получения интересующего белка или антител известны специалисту в данной области.

[050] Термин "клетка" включает в себя любую клетку, которая подходит для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают в себя клетки прокариот и эукариот. Эукариотические клетки включают, но не ограничиваются ими, дрожжи и все клетки млекопитающих (человека и не человека) и клеточные слияния, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, примата, хомячка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления изобретения клетку выбирают из следующих клеток: СНО (например, СНО К1, DXB-11

CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки глаза, лимфоциты, Vero, CV1, почек (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальный), CV-1, U937, 3T3, L клетка, клетка C127, SP2/0, NS-0, клетка ММТ, опухолевая клетка, и клеточная линия полученная из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка содержит один или большее количество вирусных генов, например, клетка сетчатки глаза, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку CHO K1.

[051] «Клеточная линия» относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии посредством последовательного пассирования или субкультивирования клеток. Термин «клетки» используется взаимозаменяемо с «клеточной популяцией».

[052] С учетом современных стратегий кормления, клетки CHO достигли количеств клеток, таких как более чем 10×10^6 клеток/мл (после около одной недели) и титров, составляющих, например, > 2 г/л человеческого IgG (собранного после около двух недель), числа, которые являются типичными промышленными значениями для культур с подпиткой клеток CHO. См. Kim, BJ, et al., *Biotechnol Bioeng.* 2012 январь; 109 (1):137-45. Даже более 10 г/л продуцирования антител было сообщено из CHO клеток, которые были хорошо установлены в качестве важной промышленной линии клеток млекопитающих. См. Omasa et al., *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11:233-240.

[053] Термины «среда для культивирования клеток» и «культуральная среда» относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как источник энергии углеводов, незаменимые аминокислоты, микроэлементы, витамины и т. д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например, сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые поставляют сырье, которое поддерживает рост клеток. Питательная среда может содержать экстракты дрожжей или сои вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная питательная среда относится к среде для культивирования клеток, в которой известны все химические компоненты. Химически определенная питательная среда полностью свободна от компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. Питательная среда также может быть без белка. «Свежая питательная среда» представляет собой питательную среду, которая еще не была введена в культуру клеток и/или еще не использовалась клетками культуры клеток. Свежая питательная среда может содержать, как правило, высокий уровень питательных веществ и по существу не содержать продуктов жизнедеятельности. «Отработанная питательная среда» может относиться к питательной среде, которая использовалась клетками в культуре клеток, и обычно может содержать

более низкие уровни питательных веществ (поскольку эти питательные вещества могут использоваться клетками в культуре клеток) и более высокие уровни отходов, чем уровни, присутствующие в свежих средах.

[054] В перфузионном биореакторе культуральная среда может непрерывно удаляться из культуры клеток и заменяться свежей питательной средой. Постоянное добавление свежей питательной среды при одновременном удалении продуктов жизнедеятельности может обеспечить клетки в культуре клеток питательными веществами, которые необходимы для достижения высоких концентраций клеток. В отличие от постоянно меняющихся условий в периодических культурах и культурах с подпиткой, метод перфузии предлагает средства для достижения и поддержания культуры в устойчивом состоянии. Как правило, в день обменивается около одного объема культуры, и концентрация клеток, достигаемая при перфузии, обычно в два-десять раз выше, чем достигается на пике периодической культуры или культуры с подпиткой. Замена питательных веществ и/или удаление апоптотических клеток обеспечивает возможность поддержания жизнеспособности клеток в установившемся режиме работы в течение длительного времени. При производстве в установившемся режиме работы атрибуты качества белка (или других представляющих интерес соединений), полученные в начале партии продукции, могут быть по существу идентичными атрибутам качества белка (или других представляющих интерес соединений), полученного в конце партии продукции. Белок может быть оценен на основе различных посттрансляционных модификаций, таких как гликоформы, неоднородность заряда, агрегация и различные показатели чистоты. Значительная степень идентичности качества белка не достижима в реакторах с подпиткой, поскольку условия культивирования клеток в таких реакторах постоянно меняются.

[055] Условия культивирования в биореакторе позволяют культуре клеток продуцировать интересующий белок (ИБ) с целью обеспечения согласованного белкового материала. В некоторых условиях культивирования культуры клеток один или большее количество технологических параметров могут быть выбраны по меньшей мере из группы, состоящей из концентрации питательного вещества, такой как концентрация глюкозы, концентрация глутамата и концентрация глутамина; концентрации аммония; концентрации лактата; общей плотности клеток; плотности жизнеспособных клеток; и атрибутов белка.

[056] Способ для биореактора позволяет установить контроль над потоком различных компонентов, таких как питательная среда (включая, *например*, питательные вещества), белок и клетки, в и из биореактора. Способ для биореактора включает в себя удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с использованием первой выводной трубы с первым номинальным расходом потока. Способ включает в себя удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы со вторым номинальным расходом потока. Способ включает в себя введение одной или обеих из свежей питательной среды или питательных веществ в

культуру клеток с использованием вводной трубы с третьим номинальным расходом потока. Один или большее количество из указанных первого, второго и третьего номинальных расходов потока регулируются на основании измерений зонда для рамановской спектроскопии биореактора. Один или большее количество из указанных первого, второго и третьего номинальных расходов потока регулируются на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии биореактора для поддержания одного или большего количества технологических параметров в пределах предварительно заданных диапазонов. Указанные первый, второй и третий номинальные расходы потока регулируются на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии биореактора, чтобы поддерживать третий номинальный расход потока вводной трубы и первый и второй номинальные расходы потока каждой из выводной труб в пределах соответствующих предварительно заданных диапазонов.

[057] Каждое из удаления бесклеточной истощенной питательной среды, удаления клеток и введения одной или обеих из свежей питательной среды и питательных веществ управляется соответствующим насосом. Биореактор содержит фильтр, выполненный с возможностью удержания клеток и обеспечения возможности сквозного прохода жидкости.

[058] Способы и системы данного раскрытия включают в себя способ управления массой биореактора и его содержимым для реализации последовательного производственного технологического процесса, среди прочих причин. Способ включает в себя измерение массы биореактора, содержащего содержимое культуры клеток. В дополнительном варианте осуществления изобретения способ использует управление массой биореактора, соединенное с управлением расходами потока, как описано в связи с трубами выше. Способ включает в себя измерение массы биореактора с содержимым культуры клеток, при этом один или большее количество из указанных первого, второго и третьего номинальных расходов потока регулируются на основании измеренной массы. Указанные первый, второй и третий номинальные расходы потока регулируются на основе измеренной массы, чтобы поддерживать третий номинальный расход потока вводной трубы и первый и второй номинальные расходы потока каждой из выводной труб в пределах соответствующих предварительно заданных диапазонов. Указанные первый, второй и/или третий номинальные расходы потока регулируются для поддержания массы культуры клеток и биореактора в пределах предварительно заданного диапазона. Измерение технологических параметров (ТП) культуры клеток в биореакторе с помощью зонда для рамановской спектроскопии происходит по меньшей мере один раз в час. Способ включает в себя возможность поддержания культуры клеток при средней концентрации жизнеспособных клеток по меньшей мере около 30 миллионов клеток на мл в течение по меньшей мере около 30 дней в устойчивом режиме работы. Биореактор имеет объем, составляющий по меньшей мере 10 л, и способ включает в себя возможность поддержания массы биореактора с культурой клеток в пределах колебаний 20 г. Биореактор имеет объем, составляющий по меньшей мере 10 л, и способ включает в себя

возможность поддержания массы биореактора с культурой клеток в пределах 0,1 процента от первоначальной массы биореактора с культурой клеток. Когда технологический параметр отклоняется от заданного значения в соответствующем желаемом диапазоне, выполняют одно или большее количество из удаления бесклеточной питательной среды, удаления клеток и введения одной или обеих из свежей питательной среды или питательных веществ, чтобы уменьшить отклонение. Например, по меньшей мере два объема биореактора истощенной питательной среды удаляются через первую выводную трубу в сутки, или до трех объемов биореактора истощенной питательной среды удаляются через первую выводную трубу в сутки.

[059] Один или большее количество технологических параметров также включают в себя температуру культуры клеток и pH культуры клеток, и температура поддерживается между 35 градусами Цельсия и 36 градусами Цельсия, а pH поддерживается между 6,85 и 7,15. В других вариантах осуществления изобретения pH поддерживается от около 6,50 до около 7,50, от около 6,60 до около 7,40, от около 6,70 до около 7,40, от около 6,80 до около 7,30, от около 6,90 до около 7,20, от около 7,00 до около 7,10, при около 6,50, при около 6,55, при около 6,60, при около 6,65, при около 6,70, при около 6,75, при около 6,80, при около 6,85, при около 6,90, при около 6,95, при около 7,00, при около 7,05, при около 7,10, при около 7,15, при около 7,20, при около 7,25, при около 7,30, при около 7,35, при около 7,40, при около 7,45 или при около 7,50.

[060] Один или большее количество технологических параметров включают в себя специфическую продуктивность клеток, и способ включают в себя возможность поддержания клеток в клеточной культуре при специфической продуктивности клеток, составляющей по меньшей мере 15-25 пкг/кл/сут в течение по меньшей мере 25-37 дней.

[061] Один или большее количество технологических параметров включают в себя концентрацию глюкозы, и способ включает в себя возможность поддержания концентрации глюкозы от около 5 mM до около 85 mM или от около 1 г/л до около 15,5 г/л.

[062] Один или большее количество технологических параметров включают в себя концентрацию лактата, и способ включает в себя возможность поддержания концентрации лактата менее чем около 60 mM или менее чем около 6 г/л.

[063] Один или большее количество технологических параметров включают в себя концентрацию аммония, и способ включает в себя возможность поддержания концентрации аммония менее чем около 15 mM.

[064] .

[065] Термин «установившийся режим работы» относится к поддержанию концентрации питательных веществ, технологических параметров или атрибутов качества в культуре клеток на неизменном, постоянном или стабильном уровне. Понятно, что неизменный, постоянный или стабильный уровень относится к уровню в пределах предварительно заданных значений или предварительно заданных диапазонов. Заданные значения и, следовательно, уровни установившегося режима работы могут быть смещены

оператором во временном периоде продуцирования культуры клеток. Заданные значения или уровни установившегося режима работы также могут включать в себя заданные диапазоны значений или пороговые значения.

[066] Термин «предварительно заданный» может относиться к количеству или заданному значению, значение которого фиксируется или вычисляется вручную пользователем или контроллером в соответствии с одним или большим количеством алгоритмов.

[067] На протяжении всего технологического процесса производства конкретного терапевтического белкового продукта, атрибуты продукта или атрибуты качества белка, нуждающиеся в управлении, могут быть идентифицированы на основе их потенциального влияния на качество, особенно клинического воздействия. Соответствующие атрибуты качества белка могут влиять на чистоту, безопасность и/или эффективность. Атрибуты качества относятся к физическим, химическим, биологическим или микробиологическим свойствам или характеристикам производимого лекарственного продукта, которые должны находиться в пределах соответствующего предела, диапазона или распределения для обеспечения желаемого качества продукта (белка). См., *например*, International Council for Harmonization (ICH) Q8 (R2) *Pharmaceutical Development* (ICH, август 2009 г.). Атрибуты качества для белковых продуктов могут включать, но не ограничиваются ими, высокомолекулярные соединения, агрегаты, варианты заряда, внешний вид, цвет, pH, активность, посттрансляционные модификации (содержание и распределение гликана), проводимость, изоэлектрическую точку, неоднородность заряда, скремблирование дисульфидной связи, свободный цистеин, белки клетки-хозяина и могут рассматриваться как атрибуты, которые имеют большое влияние на качество продукта. Определенными технологическими параметрами управляют в рамках соответствующего предела, диапазона или распределения во время продуцирования культуры для обеспечения эксплуатационной надежности и согласованности во время производственного технологического процесса. Технологические параметры могут включать в себя начальную плотность клеток, начальную жизнеспособность клеток, конечную жизнеспособность клеток, общий белок (титр), количество жизнеспособных клеток (КЖК), концентрацию питательных веществ (глюкозы, фосфата, аминокислот и т. д.), аммоний, pH, лактат и другие. Лекарственный продукт, который чувствителен к определенному технологическому параметру во время производственного технологического процесса, может вызвать изменения в атрибуте белка выше или ниже порогового значения для этого конкретного атрибута и, следовательно, требует надлежащего управления. Таким образом, технологические параметры также включают в себя технологические параметры, изменчивость которых может оказывать влияние, превышающее или равное определенному пороговому значению, на любой атрибут качества, перечисленный выше, и поэтому их следует отслеживать или управлять ими, чтобы гарантировать, что технологический процесс продуцирует материал требуемого качества.

Термины «специфическая продуктивность клеток», «специфическая скорость клеток» и тому подобное относятся к специфической скорости экспрессии продукта, например, на клетку или на единицу измерения массы или объема клеток. Специфическая продуктивность клеток измеряется, например, в граммах белка, произведенного на клетку в день.

[068] Биореакторная система 1 может содержать резервуар 10 биореактора, питающий резервуар 28, питающий насос 30, сливной насос 40 и насос 50 для сбора продукта. Биореакторная система 1 также может содержать ATF насос 70 с переменным тангенциальным потоком (от англ. ATF - alternating tangential flow), сливной резервуар 80 и резервуар 90 для сбора продукта. Насосы 30, 40, 50 и 70 могут быть функционально соединены с контроллером 200. В некоторых примерах, однако, ATF насос 70 с переменным тангенциальным потоком может быть соединен с отдельным контроллером 102 и управляться им.

[069] Резервуар 10 биореактора может представлять собой ванну, бочку, сосуд, колбу или другой подходящий контейнер, рассчитанный на многочисленные рабочие масштабы. Например, объем резервуара 10 биореактора может составлять от около 1 л до около 20 000 л, от около 5 л до около 10 000 л, от около 10 л до около 1 000 л, от около 20 л до около 100 л, около 50 л, по меньшей мере около 1 л, по меньшей мере около 10 л, по меньшей мере около 50 л, по меньшей мере около 100 л, по меньшей мере около 200 л, по меньшей мере около 500 л, по меньшей мере около 1 000 л, по меньшей мере около 10 000 л, менее чем около 20 000 л, менее чем около 10 000 л, менее чем около 1 000 л, менее чем около 500 л, менее чем около 200 л или менее чем около 100 л. В других вариантах осуществления изобретения резервуар 10 биореактора имеет объем по меньшей мере 2 л, по меньшей мере 3 л, по меньшей мере 10 л, по меньшей мере 35 л или по меньшей мере 50 л или более. Резервуар 10 биореактора может быть изготовлен из металла (например, стали или нержавеющей стали), металлического сплава, стекла и/или полимера (например, расходуемый биореактор одноразового использования).

[070] Насосы 30, 40 и 50 могут представлять собой любые подходящие насосы, такие как, например, перистальтические насосы, мембранные насосы, поршневые насосы, моторизованные насосы или тому подобное. В одном примере насосы 30, 40 и 50 могут быть по существу идентичны друг другу. В другом примере один или большее количество насосов 30, 40 и 50 могут отличаться от других насосов. В еще одном примере насос 70 может быть аналогичен любому из насосов 30, 40 и 50. Питающий резервуар 28 может содержать любой подходящий источник подпитки питательным веществом для резервуара 10 биореактора, и подпитка питательным веществом может быть направлена в резервуар 10 биореактора посредством питающего насоса 30 через подходящую трубу. Подпитка питательным веществом (питательная среда для роста) может содержать источник углерода (например, глюкозу), воду, соль, источник аминокислот и/или другие питательные вещества.

[071] Крышка 12 может закрывать верхнюю часть резервуара 10 биореактора, а

различные компоненты и инструменты могут проходить через крышку 12 во внутреннюю часть резервуара 10 биореактора. Например, аэратор 14, перемешивающее устройство 16, зонд 18 для рамановской спектроскопии, труба 20 и труба 22 могут проходить через крышку 12. Однако предполагается, что любой или все из аэратора 14, перемешивающего устройства 16, зонда 18 для рамановской спектроскопии, трубы 20 и трубы 22 могут быть функционально соединены с резервуаром 10 биореактора любым другим подходящим способом, таким как, например, через боковую поверхность резервуара 10 биореактора.

[072] Аэратор 14 может быть барботером, выполненным с возможностью подачи кислорода и/или других газов в культуру клеток в резервуаре 10 биореактора. Аэратор 14 может быть соединен с источником кислорода или другого газа и может направлять газ в культуру клеток, так что пузырьки газа в культуре клеток, таким образом, аэрируют культуру клеток. В некоторых примерах микробарботер можно использовать в сочетании с барботером с просверленной трубкой.

[073] Перемешивающее устройство 16 может быть любым подходящим перемешивающим устройством, выполненным с возможностью смешивания культуры клеток внутри резервуара 10 биореактора. Перемешивающее устройство 16 может быть с верхним приводом или нижним приводом с помощью механических и/или магнитных механизмов. В некоторых случаях может быть желательно перемешивающее устройство с нижним приводом, поскольку он может освободить пространство в крышке 12 для измерительных приборов, таких как, например, датчиков температуры, pH, растворенного кислорода, пены, диоксида углерода и других датчиков, а также впускных отверстий для кислоты, щелочи, пены, входных и выходных отверстий для свежей питательной среды. Перемешивающее устройство 16 может представлять собой радиальное перемешивающее устройство, осевое перемешивающее устройство, импеллер Раштона, импеллер с наклонными лопастями, импеллер с морскими лопастями или тому подобное.

[074] Зонд 18 для рамановской спектроскопии может быть, например, волоконно-оптическим зондом для рамановской спектроскопии в, например, корпусе из нержавеющей стали, и иметь прозрачное, например, сапфировое или стеклянное окно. Зонд 18 для рамановской спектроскопии может быть выполнен с возможностью обеспечения рамановского отбора проб культуры 2 клеток. Зонд 18 для рамановской спектроскопии может быть выполнен с возможностью излучать монохроматический свет (например, лазер на 785 нм или другой подходящей длиной волны) на культуру 2 клеток и обнаруживать рассеянный свет от культуры 2 клеток.

[075] Рамановская спектроскопия представляет собой форму вибрационной спектроскопии, которая предоставляет информацию о молекулярных колебаниях, которые можно использовать путем введения зонда для рамановской спектроскопии *in situ* для идентификации и количественного определения образцов. В некоторых вариантах осуществления изобретения отслеживание переменных технологического процесса выполняется с использованием рамановской спектроскопии *in situ*. Рамановский анализ *in situ* представляет собой способ анализа образца в его исходном местоположении без

необходимости извлечения порции образца для анализа в рамановском спектрометре. Рамановский анализ *in situ* выгоден тем, что спектрометры рамановской спектроскопии неинвазивны, что снижает риск загрязнения, и неразрушительны, не влияя на жизнеспособность культуры клеток или качество белка. Рамановский анализ *in situ* может обеспечить оценку в реальном времени одной или большего количества переменных технологического процесса в культурах клеток. Производители зондов для рамановской спектроскопии включают, помимо прочего, tech5usa, Anton Paar, InPhotonics, Kaiser Optical Systems, Inc. и FiberTech Optica.

[076] Резервуар 10 биореактора может быть соединен с фильтровальной системой 100, содержащей в себе фильтр с полыми волокнами. Мембрана с полыми волокнами (например, полисульфон) может содержать одну или большее количество трубчатых мембран, имеющих внутренний диаметр от около 0,3 мм до около 6,0 мм, от около 0,5 мм до около 3,0 мм, от около 0,5 мм до около 2,0 мм, более чем около 0,3 мм, более чем около 0,5 мм, менее чем около 6,0 мм, менее чем около 3,0 мм или менее чем около 2,0 мм. Сетчатый материал в мембране может быть выбран таким образом, чтобы размер пор в сетке был близок к диаметру клеток из культуры 2 клеток, помогая обеспечить высокое удержание клеток, в то же время позволяя клеточному детриту и истощенной питательной среде проходить через фильтр. В одном примере размер пор сетки составляет от около 0,2 мкм до около 30 мкм, хотя также рассматриваются другие подходящие диапазоны и значения. Белок или другие представляющие интерес биологические продукты могут быть перфузированы или сохранены в зависимости от размера пор фильтра (например, 0,2 мкм или 50 кДа).

[077] Жидкость из резервуара 10 биореактора может подаваться в фильтровальную систему 100 через трубу 20 и насос 70. Насос 70 может быть реверсивным, чтобы позволить жидкости течь из фильтровальной системы 100 обратно в резервуар 10 биореактора. Фильтровальная система 100 может работать при переменном тангенциальном потоке. В одном примере переменный тангенциальный поток может означать, что существует один поток в том же направлении, что и (например, тангенциальный к) мембранные поверхности полых волокон, который течет назад и вперед, и что существует другой поток в направлении по существу перпендикулярном указанной поверхности фильтра. Переменный тангенциальный поток может быть достигнут с использованием одного насоса (например, насоса 70) для циркуляции культуры клеток по фильтровальному модулю, содержащему полые волокна, и другого насоса (например, насоса 50) для удаления жидкости, имеющей более низкую плотность клеток до отделения фильтром. Переменный тангенциальный поток может помочь предотвратить загрязнение и проблемы сдвига, типичные для других механизмов удержания клеток.

[078] В качестве альтернативы могут быть использованы другие механизмы фильтрации (включая мембранные механизмы фильтрации), такие как, например, ультрафильтрация, микрофильтрация и фильтрация тангенциальным потоком.

[079] Сливной насос 40 может быть выполнен с возможностью удаления клеток из резервуара 10 биореактора через трубу 22. Труба 22 может быть погружной трубкой, выбранной во избежание клеточной агрегации и закупоривания (что, например, может привести к тому, что труба 22 будет слишком узкой по отношению к вязкости культуры 2). Труба 22 может представлять собой термопластичные эластомерные трубки (например, биопрен). Сливной насос 40 может управляться, например, с помощью процессора 200. Слив клеток через сливной насос 40 может удалить клетки из культуры 2 клеток в резервуаре 10 биореактора. Скорость слива клеток (управляемая с помощью выходного отверстия сливного насоса 40 и контроллера 200) может быть определена на основе скорости роста клеток в культуре 2 клеток. Чтобы поддерживать установившуюся плотность клеток в культуре 2 клеток, может быть желательно иметь скорость слива и скорость роста клеток, приблизительно или по существу равные друг другу. В некоторых примерах, если имеется значительный объем культуры 2 клеток, то удаляемый из клеток слив с ценным продуктом, может быть затем собран и обработан для извлечения продукта.

[080] Резервуар 10 биореактора может быть расположен на весах 110, выполненных с возможностью измерения массы резервуара 10 биореактора и культуры 2 клеток. Весы 110 могут быть присоединены к контроллеру 200 и могут непрерывно посылать значение массы резервуара 10 биореактора и культуры 2 клеток на контроллер 200. В некоторых примерах по меньшей мере часть фильтровальной системы 100, включая, например, корпус фильтра и фильтр с полой мембраной в нем, также может быть расположена на весах 110. Весы 110 могут быть любыми подходящим весами или датчиком нагрузки, выполненным с возможностью измерения массы компонентов, опирающихся на весы.

[081] Ссылаясь на фиг. 1 и 2, контроллер 200 может быть выполнен с возможностью приема данных от зонда 18 для рамановской спектроскопии, весов 110 и других датчиков, а также может быть выполнен с возможностью управления расходом потока жидкости через один или большее количество из питающего насоса 30, сливного насоса 40 и насоса 50 для сбора продукта, на основе указанных данных.

[082] Контроллер 200 может быть выполнен с возможностью приема необработанных спектральных данных от зонда 18 для рамановской спектроскопии для определения технологических параметров, таких как, например, концентрация глюкозы, концентрация глутамина, концентрация глутамата, концентрация аммония, концентрация лактата, общая плотность клеток, титр и плотность жизнеспособных клеток. Контроллер 200 может использовать эти определенные технологические параметры для создания контура обратной связи для регулировки одного или большего количества из потоков жидкости через питающий насос 30, сливной насос 40 и насос 50 для сбора продукта. То есть контроллер 200 может устанавливать заданные значения для одного или большего количества из концентрации глюкозы (например, от около 5 мМ до около 85 мМ или от около 0,5 г/л до около 15,5 г/л, от около 1 г/л до около 15,5 г/л, от около 0,5 г/л до около 8

г/л, от около 2 г/л до около 6 г/л или от около 3 г/л до около 5 г/л), концентрации глутамин (например, менее чем около 8 мМ, менее чем около 7 мМ, менее чем около 6 мМ, менее чем около 5 мМ или менее чем около 4 мМ), концентрации глутамата (например, менее чем около 5 мМ, менее чем около 4 мМ, менее чем около 3 мМ, менее чем около 2 мМ или менее чем около 1 мМ), концентрации аммония (например, менее чем около 15 мМ, менее чем около 12 мМ, менее чем около 10 мМ, менее чем около 9 мМ, менее чем около 8 мМ, менее чем около 7 мМ, менее чем около 6 мМ), концентрации лактата (например, менее чем около 6 г/л, менее чем около 5 г/л, менее чем около 4 г/л, менее чем около 3 г/л, менее чем около 2 г/л или менее чем около 1 г/л), общей плотности клеток (например, более чем около 30 ММ, более чем около 35 ММ, более чем около 40 ММ, более чем около 45 ММ, более чем около 50 ММ, более чем около 55 ММ, более чем около 60 ММ или более чем около 65 ММ) и плотности жизнеспособных клеток (например, по меньшей мере 30 миллионов клеток на мл, по меньшей мере 35 миллионов клеток на мл, по меньшей мере 50 миллионов клеток на мл или по меньшей мере 75 миллионов клеток на мл), а также сравнивать определенные значения (на основе рамановского спектра от зонда 18 для рамановской спектроскопии) с их соответствующими заданными значениями.

[083] Контроллер 200 может использовать контур отрицательной обратной связи для исправления любой разницы между заданным значением (или заданным диапазоном значений) и определенным значением. Например, если определенная концентрация глюкозы будет больше, чем заданное значение концентрации глюкозы, контроллер 200 может, например, уменьшить производительность питающего насоса 30, уменьшить производительность сливного насоса 40 и/или увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта, чтобы помочь снизить концентрацию глюкозы; или контроллер 200 может уменьшить производительность питающего насоса 30 и уменьшить производительность насоса 50 для сбора продукта. Например, если определенная концентрация глутамин будет больше, чем заданная концентрация глутамин, контроллер 200 может, например, уменьшить производительность питающего насоса 30, уменьшить производительность сливного насоса 40 и/или увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта, чтобы помочь снизить концентрацию глутамин; или контроллер 200 может уменьшить производительность питающего насоса 30 и уменьшить производительность насоса 50 для сбора продукта. Например, если определенная концентрация глутамата будет больше, чем заданное значение концентрации глутамата, контроллер 200 может, например, уменьшить производительность питающего насоса 30, уменьшить производительность сливного насоса 40 и/или увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта, чтобы помочь снизить концентрацию глутамата; или контроллер 200 может уменьшить производительность питающего насоса 30 и уменьшить производительность насоса 50 для сбора продукта. Например, если определенная концентрация аммония выше заданной концентрации аммония, контроллер 200 может, например, уменьшить производительность питающего насоса 30, увеличить

производительность питающего насоса 30 и увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта. Например, если определенная концентрация лактата будет меньше, чем заданное значение концентрации лактата, контроллер 200 может, например, увеличить производительность питающего насоса 30, увеличить производительность сливного насоса 40 и/или уменьшить производительность насоса 50 для сбора продукта, чтобы помочь увеличить концентрацию лактата; или контроллер 200 может увеличить производительность питающего насоса 30 и увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта. Например, если определенная общая плотность клеток будет меньше, чем заданное значение общей плотности клеток, контроллер 200 может, например, увеличить производительность питающего насоса 30, уменьшить производительность сливного насоса 40 и/или увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта, чтобы помочь увеличить общую плотность клеток; или контроллер 200 может увеличить производительность питающего насоса 30 и увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта. Например, если определенная плотность жизнеспособных клеток будет меньше, чем заданное значение плотности жизнеспособных клеток, контроллер 200 может, например, увеличить производительность питающего насоса 30, уменьшить производительность сливного насоса 40 и/или увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта, чтобы помочь увеличить плотность жизнеспособных клеток; или контроллер 200 может увеличить производительность питающего насоса 30 и увеличить производительность насоса 50 для сбора продукта.

[085] Тем не менее, общая перфузия через систему поддерживается на заданном уровне (скорость перфузии не будет изменяться в зависимости от концентрации внутри реактора). Контроллер 200 может аналогичным образом контролировать массу биореактора (и массу культуры 2 клеток), используя петлю отрицательной обратной связи.

[086] Следует отметить, что добавление или вычитание различных питательных веществ, вводимых в реактор, может быть связано с соответствующим изменением других вводимых веществ, чтобы гарантировать, что общая масса и/или объем материала, вводимого в реактор, остается неизменным. То есть, поскольку скорость перфузии поддерживается постоянной, увеличение одного питательного вещества, например, раствора глюкозы, глутамина, глутамата или тому подобного, может сопровождаться соответствующим уменьшением массы или объема первичного потока подпитки питательным веществом.

[087] В одном варианте осуществления изобретения система может содержать по меньшей мере две петли обратной связи - одну для управления массой и одну для управления технологическими параметрами (например, КЖК, глюкоза, глутамин, глутамат, аммоний, лактат и т. д.). В одном примере различные входные и выходные насосы не управляются конкурирующими контурами. Например, может быть установлена скорость перфузии (например, 20 л/день), после чего зонд 18 для рамановской спектроскопии измеряет одно или большее количество значений культуры, а контроллер

200 оценивает этапы, которые необходимо предпринять, основываясь на измерениях от зонда 18 для рамановской спектроскопии. Если контроллер 200 определяет, что, например, КЖК слишком высок, контроллер 200 может начать удаление клеток через сливной насос 40, и расход потока насоса 50 для сбора продукта, может одновременно уменьшаться, так что общий объем в рамках системы остается постоянным. Дополнительные этапы, которые должны быть выполнены контроллером 200, когда измерено, что другие технологические параметры являются слишком высокими или слишком низкими (например, глюкоза, глютамин, глютамат, аммиак, лактат и общая плотность клеток), описаны выше.

[088] Второй питающий насос может быть добавлен для добавления глюкозы, лактозы, глютамина, глютамата и т. д. В альтернативном варианте или в дополнение, слив можно регулировать таким образом, чтобы он реагировал на увеличение аммония путем удаления клеток.

[089] Контроллер 200 может быть расположен в "безголовой" компьютерной системе (например, в системе без монитора, клавиатуры и мыши). Таким образом, контроллер 200 может быть расположен на сервере, которым управляют через сетевое соединение или какое-либо другое соединение, такое как, например, последовательное соединение. Контроллер 200 может быть клонирован на одном или большем количестве избыточных серверов в случае сбоя одного или большего количества серверов.

[090] Контроллер 200 может быть выполнен с возможностью применения фильтрации Калмана, например, линейной квадратичной оценки (linear quadratic estimation - LQE) для рамановских спектральных данных от зонда 18 для рамановской спектроскопии. Фильтрация Калмана может включать в себя применение алгоритма к спектральным данным, который использует серию измерений во времени для получения оценок неизвестных переменных, которые имеют тенденцию быть более точными, чем те, которые основаны только на одном измерении. Таким образом, определенные технологические параметры могут быть основаны на отфильтрованных моделях. Предполагается, что контроллер 200 также может использовать другие типы фильтрации для обработки спектральных данных от зонда 18 для рамановской спектроскопии.

[091] Контроллер 200 может содержать или может быть иным образом связан с историей ИТП (информации о технологическом процессе). Указанная история ИТП может быть приложением с базой данных временных рядов, которое может записывать данные из систем управления технологическим процессом. История ИТП может позволить пользователям записывать, анализировать и отслеживать информацию в режиме реального времени. Контроллер 200 может хранить в истории ИТП, например, значения массы от весов 110, спектральные данные от зонда 18 для рамановской спектроскопии, а также расходы насоса для питающего насоса 30, сливного насоса 40 и насоса 50 для сбора продукта.

[092] На фиг. 3 проиллюстрирован способ 300 в соответствии с данным раскрытием. Один или большее количество этапов способа 300 могут выполняться не по

порядку, выполняться одновременно с другими этапами или вообще исключаться. Способ 300 может начинаться на этапе 302, на котором биореакторная система 1 может быть собрана, и культура 2 клеток может быть предоставлена в резервуар 10 биореактора и инокулирована линией клеток. Затем способ 300 может перейти к этапу 304, на котором технологические параметры культуры 2 клеток измеряются в биореакторе с помощью зонда 18 для рамановской спектроскопии и/или с помощью дополнительных или других датчиков. Технологические параметры могут включать в себя любой из вышеупомянутых параметров, определенных из рамановских спектральных данных, полученных с помощью зонда 18 для рамановской спектроскопии. Способ 300 может перейти к этапу 306, на котором масса резервуара 10 биореактора (включая культуру 2 клеток внутри) измеряется с помощью весов 110 и передается в процессор 200.

[093] От этапа 306 способ 300 может перейти к этапу 308, на котором бесклеточная истощенная питательная среда из культуры 2 клеток удаляется с первым номинальным расходом путем активации насоса 70 для извлечения культуры клеток (питательная среда плюс клетки) из резервуара 10 биореактора через трубу 20, а также путем активации насоса 50 для сбора продукта, для удаления раствора из фильтровальной системы 100. От этапа 308 способ 300 может переходить к этапу 310, на котором клетки могут быть удалены из культуры клеток с использованием выводной трубы 22 со вторым номинальным расходом с помощью сливного насоса 40. От этапа 310 способ 300 может перейти к этапу 312, на котором одна или обе из свежей питательной среды и питательных веществ могут быть введены в культуру клеток с третьим номинальным расходом с использованием вводной трубы и питающего насоса 30 таким образом, чтобы поддерживать общий ввод питательной среды и питательных веществ равным объединенной производительности сливного насоса 40 и насоса 50 для сбора продукта. Номинальный расход может быть заданным значением расхода или диапазоном расходов, при которых насос работает и/или обслуживается. Указанные номинальные расходы могут быть определены контроллером 200.

[094] Предполагается, что каждый из этапов с 302 по 312 может происходить в любом порядке, а в некоторых случаях может происходить одновременно в режиме реального времени через совокупность контуров обратной связи, выполняемых контроллером 200.

[095] Управление на этапах 308, 310 и 312 может осуществляться с помощью контроллера 200 на основе данных, полученных от зонда 18 для рамановской спектроскопии на этапе 304, и от весов 110 на этапе 306. Массой резервуара 10 биореактора (плюс содержащейся в нем культуры 2 клеток) можно управлять с помощью петли ПИД (пропорционально-интегрально-дифференциального) управления. Кроме того, контроллер 200 может быть выполнен с возможностью анализа рамановских спектров, полученных с помощью зонда 18 для рамановской спектроскопии, для определения одного или большего количества технологических параметров, включая, например, концентрацию глюкозы, концентрацию глутамина, концентрацию глутамата,

концентрацию аммония, концентрацию лактата, общую плотность клеток и плотность жизнеспособных клеток. Каждой из этих переменных также можно управлять с помощью петли с отрицательной обратной связью.

[096] Примеры настоящего раскрытия могут предоставлять элегантные, гибкие и недорогие решения для существующих решений задач управления и могут иметь относительно небольшое количество пробелов в данных. Стратегии управления по настоящему изобретению могут демонстрировать последовательное управление уровнем биореактора. Например, дисперсия уровня была снижена с +/- 0,5 л/сутки до +/- 0,01 л/сутки с использованием систем управления по настоящему изобретению. Также были достигнуты улучшения дисперсии массы, например, уменьшение отклонения массы от 5-10% с использованием других систем, таких как объемная калибровка, до погрешности 0,1-0,5% с использованием систем управления, раскрытых в данном документе. Улучшение может быть, по меньшей мере частично, связано с изменением системы с объемной калибровки насосов на версию с программным управлением, основанную на массе и других параметрах. Кроме того, системы управления по настоящему раскрытию могут быть полностью интегрированы с аварийными сигналами технологических данных (ТД) (например, электронными сообщениями) и могут быть доступны и отключены удаленно. Кроме того, системы и способы настоящего раскрытия могут обеспечить более повторяемые и надежные результаты, чем предшествующие системы и способы.

[097] **Пример 1 (фиг. 4 и 5)**

[098] Эксперименты, описанные в примере 1, сравнивают перфузионный биореактор с биореактором с периодической подпиткой и показывают более высокие достигнутые концентрации жизнеспособных клеток и специфическую продуктивность клеток в перфузионном биореакторе по сравнению с биореактором с периодической подпиткой.

[099] В одном эксперименте биореактор вместимостью 15 л культивировался с использованием клеточных линий и питательной среды. Заданные значения для биореактора включали температуру (35,5 градусов Цельсия), перемешивание (250 об/мин), pH (управляемая с помощью CO₂ и бикарбоната натрия) (от 6,85 до 7,15) и рабочий объем (11 л). Устройство для удержания клеток ATF4, оснащенное фильтром с полыми волокнами 0,2 мкм, было присоединено к биореактору. Фильтр с полыми волокнами задерживал клетки, но обеспечивал возможность белкам и питательным веществам проходить сквозь него. Два объема реактора (или 22 л питательной среды) пропускали через указанный фильтр каждые 24 часа.

[0100] Как биореактор, так и указанное устройство ATF были расположены на весах. Масса биореактора, культуры клеток и устройства ATF передавалась через соединение Ethernet в исполняемое компьютером программное обеспечение системы управления. Масса сравнивалась с заданным значением (11,0 кг, например, рабочий объем биореактора), и ПИД-контроллер (разработанный в MATLAB, но выполняемый через программное обеспечение системы управления SynTQ) определял, следует ли

задействовать питающий насос. Насос для сбора продукта, устанавливали на постоянный расход, эквивалентный требуемой скорости перфузии (два объема реактора в день). Питающим насосом и перфузионным насосом автоматически управляли с помощью программного обеспечения SynTQ, которое транслирует сигнал OPC на сервер Kerware. Сервер Kerware транслирует этот сигнал через соединение Ethernet на модуль вывода аналогового сигнала MODBUS, который преобразует цифровое значение в физический миллиамперный выходной сигнал в диапазоне от 4 мА до 20 мА.

[0101] Используя эту систему, массой биореактора можно управлять с точностью до 10 г от первоначальной массы 11 кг (0,09%). До внедрения этой системы было невозможно управлять массой биореактора с точностью более 0,5 кг (4,54%) в течение ночи в биореакторе. Внутри той же системы зонд для рамановской спектроскопии Kaiser Optical использовался для захвата рамановского спектра из культуры клеток. Контроллер использовал модели, которые были разработаны в предшествующих партиях для прогнозирования количества клеток, глюкозы, лактата, аммония и других концентраций питательных веществ. Зонд для рамановской спектроскопии захватывает тысячи различных спектров, которые затем анализируются в компьютерной программе, например, SIMCA. Используя многокомпонентный анализ и автономные данные для данного параметра, программа создает модель по всем показаниям зонда. Затем эта модель SIMCA загружается в SynTQ, и к ней обращаются в режиме реального времени каждый раз, когда зонд снимает показания (например, каждые 15-45 минут).

[0102] Управление различными питательными веществами с помощью зонда для рамановской спектроскопии позволяет повысить продуктивность клеточных линий, увеличить жизнеспособность культуры клеток в течение длительного времени и улучшить качество нескольких аспектов белка.

[0103] На фиг. 4 проиллюстрировано, что максимальная концентрация жизнеспособных клеток в перфузионном биореакторе (Эксперимент «Экс.» 1) согласно данному раскрытию на 37-й день партии продукции, приблизительно вдвое превышает максимальную концентрацию жизнеспособных клеток в реакторе с подпиткой с эквивалентным размером на седьмой день партии продукции (Экс. 2). Тот факт, что максимальная концентрация жизнеспособных клеток была достигнута на 37-й день (в отличие от 6-го дня в биореакторе с подпиткой), показывает надежность и долговечность технологического процесса перфузионного биореактора.

[0104] На фиг. 5 показана специфическая продуктивность клеток (cell specific productivity - cSP) в течение 12-25 дней перфузионного технологического процесса для партии продукции (Экс. 1) против cSP в течение 1-12 дней технологического процесса с подпиткой (Экс. 2). Аналогичные продуктивности были достигнуты на 25-37 сутки перфузионной партии продукции.

[0105] Скорость перфузии, равная трем объемам реактора в день, требовалась для увеличения КЖК после 50×10^6 клеток/мл в перфузионной партии продукции, что во многих случаях может быть коммерчески недопустимым.

[0106] Оптимизация питательной среды с использованием стратегии «толчок к низкому уровню» должна снизить необходимую скорость перфузии. Например, клетки могут быть выращены до 20×10^6 клеток/мл и поддерживаться в стабильном состоянии. Скорость перфузии может быть установлена на два объема реактора/день в течение пяти дней. На пятый день скорость перфузии может быть уменьшена до 1,5 объемов реактора/день. Если клетки поддерживаются, скорость перфузии может быть уменьшена до одного объема реактора/день через 5 дней. Как только клетки начинают умирать, можно использовать аминокислотный анализ или другой анализ, чтобы определить, как лучше обогащать питательную среду, например, добавлять питательные вещества или регулировать концентрацию питательных веществ в питательной среде. В одном неограничивающем примере указанная стратегия описана в “The Push to Low Approach for Optimization of High Density Perfusion Cultures of Animal Cells” by Bayer et al. Adv. BioChem. Engin./Biotechnol. 2006, 101:75-98.

[0107] Данные NOVA Flex могут быть получены, когда автономное считывание производится путем анализа пробы. Используя предыдущие данные NOVA, можно построить модель рамановской спектроскопии, и в этот момент в реактор можно ввести зонд, а модель может предоставлять данные КЖК каждые 15-45 минут, каждую секунду, каждую минуту, каждые 2 минуты, каждые 3 минуты, каждые 4 минуты, каждые 5 минут, каждые 10 минут, каждые 15 минут, каждые 20 минут, каждые 25 минут, каждые 30 минут, каждые 35 минут, каждые 40 минут, каждые 45 минут, каждые 50 минут, каждые 55 минут, каждый час, каждые 2 часа, каждые 3 часа, каждые 4 часа, каждые 5 часов или каждые 6 часов, вместо одного раза в день и требующего ручного отбора проб, как с NOVA. На фиг. 5 показан 20 день данного цикла. Первые 20 дней цикла были использованы для сбора данных NOVA, которые были использованы для создания модели рамановской спектроскопии для последующих частей цикла.

[0108] В последующих примерах ниже приведены общие диапазоны для определенных технологических параметров: pH: 6,85-7,40, растворенный кислород: 30-60%, 35-55%, 40-50% или 45%, температура: 34-37,5 °C и перемешивание: 150-300 об/мин, 175-275 об/мин, 200-250 об/мин или 225 об/мин на рабочем столе.

[0109] **Пример 2 (фиг. 6-8)**

[0110] Эксперименты, описанные в примере 2, показывают данные для перфузионного биореактора, не имеющего управления ростом КЖК или глюкозой. Наблюдали пик КЖК на 7-й день, когда клетки быстро росли до большой плотности клеток, а затем быстро снижались на 11-й день, когда они истощали питательные вещества в питательной среде (фиг. 6). Только управление массой было недостаточным для достижения устойчивого состояния КЖК.

[0111] Глюкозой также не управляли во время цикла перфузии. Поскольку культура использовала глюкозу в питательной среде во время цикла перфузии для питания клеток, это впоследствии привело к гибели клеток во время культивирования. По мере роста клеток уровень глюкозы неуклонно снижался, хотя питательная среда

постоянно подпитывалась (фиг. 7). Пик в обнаружении глюкозы, имевший место после 10-го дня, был вызван полной гибелью клеток и, следовательно, отсутствием потребления глюкозы, как можно видеть при отслеживании жизнеспособности клеток, представленном на фиг. 8.

[0112] В этом эксперименте инокулировали настольный биореактор объемом 15 л с заданной концентрацией клеток яичника китайского хомячка (Chinese hamster ovary - СНО), продуцирующих mAb1. Клетки культивировали при определенной концентрации растворенного кислорода, температуры, перемешивания и рН, которые поддерживались постоянными в течение всего цикла. Клеткам также подавали свежую питательную среду и питательные вещества в виде перфузионной подпитки со скоростью, в два раза превышающей объем реактора в сутки. Объем реактора поддерживали постоянным путем добавления в реактор того же количества подпитки, которое удалялось в перфузате с использованием системы Repligen XCell ATF4. Это было достигнуто путем отслеживания массы биореакторной системы и использования автоматизированной системы управления с обратной связью для поддержания массы в пределах 0,05 кг от заданной целевой массы. Ни управление на основе рамановской спектроскопии, ни управление сливом не были предоставлены для управления КЖК или любого другого параметра биореактора во время этого производственного цикла перфузии.

[0113] В аналогичном эксперименте (не показан на фигурах), в котором расход потока также был установлен на два биореактора в день подачи питательной среды, но массой не управляли, вариабильностью насосов не могли адекватно управлять.

[0114] В этом аналогичном эксперименте по перфузии питающий насос и насос для перфузируемой жидкости были настроены на эквивалентные расходы потока (определяемые путем объемной калибровки насосов). Этот метод не мог обеспечить расходы потока, которые были достаточно точными, чтобы соответствовать друг другу, и в течение ночи (например, период времени, когда биореактором активно не управляли), питающий насос добавлял в реактор больше питательной среды, чем мог удалять насос для перфузируемой жидкости. Это привело к переполнению реактора и последующей потере культуры.

[0115] **Пример 3 (фиг. 9-12)**

[0116] Эксперимент, описанный в примере 3, показывает данные для перфузионного биореактора с управлением КЖК. Управление КЖК (фиг. 9) приводило к постоянному устойчивому состоянию жизнеспособности (фиг. 10), продуцированию белка (фиг. 11) и питательных веществ (фиг. 12).

[0117] В этом эксперименте инокулировали настольный биореактор объемом 15 л с заданной концентрацией клеток СНО, продуцирующих mAb2. Клетки культивировали при определенной концентрации растворенного кислорода, температуры, перемешивания и рН, которые поддерживались постоянными в течение всего цикла. Клеткам также подавали свежую питательную среду и питательные вещества в виде перфузионной подпитки со скоростью, в два раза превышающей объем реактора в день. Объем реактора

поддерживали постоянным путем добавления в реактор того же количества подпитки, которое удалялось в перфузате с использованием системы ATF4. Это было достигнуто путем отслеживания массы системы и использования компьютерной системы управления для поддержания массы в пределах плюс или минус 0,05 кг от заданного целевого значения. Управление с использованием рамановской спектроскопии не использовалось для этого цикла, и расход слива насоса был установлен вручную после отбора проб КЖК. Этот процесс требовал нескольких образцов, а расход слива должен был регулироваться несколько раз в день.

[0118] КЖК управляли в течение перфузионного продуцирования культуры с целевым КЖК, составляющим $42,5 \times 10^6$ клеток/мл ($40-45 \times 10^6$ клеток/мл). Соответственно, если КЖК поднималось выше целевого значения, то расход слива был увеличен, а если КЖК опускалось ниже целевого значения, то расход слива был уменьшен.

[0119] **Пример 4 (фиг. 13 и 14)**

[0120] Эксперименты в этом примере сравнивают способ перфузионного культивирования (фиг. 14) со способом культивирования с подпиткой (фиг. 13). Способ перфузионного культивирования позволил достичь около четырехкратного максимального числа клеток по сравнению со способом культивирования клеток с подпиткой для одного и того же белка в аналогичных условиях (фиг. 13). Культивирование с подпиткой выполняли в полупромышленном масштабе, в то время как перфузионный эксперимент проводили в лабораторном масштабе (15 л). Стратегия перемешивания и аэрации была уменьшена до лабораторной шкалы с использованием подхода мощности на единицу объема для перемешивания и согласования стратегии для аэрации объема на объем.

[0121] Способ перфузионного культивирования позволил получить в 3,5 раза больше белка по сравнению с количеством, полученным в реакторе с подпиткой, за такое же количество времени (фиг. 14).

[0122] Способ перфузионного культивирования осуществляли, предоставляя настольный биореактор объемом 15 л, инокулированный с определенной концентрацией клеток СНО, продуцирующих mAb2 (Экс. 5 и 7). Клетки культивировали при определенной концентрации растворенного кислорода, температуры, перемешивания и рН, которые поддерживались постоянными в течение всего цикла. Клеткам также подавали свежую питательную среду и питательные вещества в виде перфузионной подпитки со скоростью, в два раза превышающей объем реактора в день. Питательная среда в этом цикле была дополнена повышенными концентрациями жизненно важных питательных веществ по сравнению с предыдущими экспериментами, так что клетки могли быть доведены до более высокой плотности клеток во время цикла перфузии. Объем реактора поддерживали постоянным с помощью системы управления массой, чтобы поддерживать массу в пределах 0,05 кг от заданного целевого значения. Ни управление на основе рамановской спектроскопии, ни управление сливом не были предоставлены во время этого производственного цикла перфузии.

[0123] Культивирование клеток с подпиткой (Экс. 6 и 8) проводили в аналогичных условиях (растворенный кислород, температура, перемешивание и рН).

[0124] **Пример 5 (фиг. 15-18)**

[0125] Эксперимент, описанный на фиг. 15-18 показывает предпочтительные результаты жизнеспособности, глюкозы и титра, а также КЖК, поддерживаемых в устойчивом состоянии в течение более 30 дней с помощью этой перфузионной системы (см., например, фиг. 15-18).

[0126] Способ перфузионного культивирования с управлением на основе рамановской спектроскопии, сливом и массой выполняли, предоставляя 15-литровый настольный биореактор, инокулированный с определенной концентрацией клеток СНО, продуцирующих mAb2. Клетки культивировали при специфической концентрации растворенного кислорода, температуры, перемешивания и диапазона рН, которые поддерживались постоянными в течение всего цикла. Клеткам также подавали свежую питательную среду и питательные вещества в виде перфузионной подпитки со скоростью, в два раза превышающей объем реактора в день. Питательную среду в этом цикле дополняли повышенными концентрациями жизненно важных питательных веществ (по сравнению с примерами 2 и 3), чтобы клетки можно было подтолкнуть к более высокой плотности клеток. Объем реактора поддерживали постоянным с помощью системы управления массой, добавляя в реактор такое же количество питания, которое удалялось в перфузионной жидкости с использованием системы ATF4, путем отслеживания массы системы и использования компьютерной системы управления с обратной связью для поддержания массы в пределах плюс или минус 0,05 кг от заданного целевого значения.

[0127] Управление с использованием рамановской спектроскопии и автоматическое управление сливом на основе обратной связи по результатам рамановской спектроскопии использовались для управления КЖК в этом цикле (фиг. 15). В первом эксперименте (Экс. 9), стратегия слива на основе рамановской спектроскопии была установлена для поддержания КЖК, составляющего 40×10^6 клеток/мл. Диапазон КЖК составлял $35-45 \times 10^6$ клеток/мл, что было немного шире, чем целевое значение, которое имело место при ручном сливе в предыдущем эксперименте (Пример 3). Однако отбор проб в системе осуществлялся только один раз в день, и в этом цикле перфузии не потребовались какие-либо регулировки (по сравнению с несколькими регулировками по несколько раз в день с ручным сливом, описанным в примере 3).

[0128] Во втором эксперименте (Экс. 10), условия были аналогичны первому эксперименту, за исключением того, что КЖК было установлено на 10×10^6 клеток/мл со скоростью перфузии, составляющей один объем реактора в день.

[0129] **Пример 6 (фиг. 19 и 20)**

[0130] В одном эксперименте три разных биореактора культивировали с использованием клеточных линий и питательной среды. Вместимость биореакторов составляла: 3 л (Экс. 11), 15 л (Экс. 12) и 50 л (Экс. 13) (одноразовый биореактор). Заданные значения для биореактора включали температуру (35,5 градусов Цельсия),

перемешивание (250 об/мин), pH (управляемая с помощью CO₂ и бикарбоната натрия) (от 6,85 до 7,15) и рабочий объем (2 л, 10 л, 35 л соответственно). Все эти параметры были постоянными на протяжении всего цикла. Каждый биореактор был соединен с устройством для удержания клеток ATF (ATF2, ATF4, ATF6 соответственно), оснащенным фильтром 0,2 микрона. Фильтр с полыми волокнами задерживал клетки, но обеспечивал возможность белкам проходить сквозь него после 24 часов.

[0131] Перфузионное культивирование проводили в каждой системе, используя управление на основе рамановской спектроскопии, сливом и массой на всех трех масштабах. Как и в примере 5, питательная среда в этом эксперименте была дополнена дополнительными питательными веществами. Массой в каждой системе управляли для: +/- 0,05 кг в ATF4 и ATF6, а также +/- 1 кг (из-за ограничений оборудования самих весов) от заданного целевого значения.

[0132] Управление с использованием рамановской спектроскопии и автоматическое управление сливом на основе обратной связи по результатам рамановской спектроскопии использовались для установки КЖК в этом цикле (фиг. 19) до 40×10^6 клеток/мл. Изменчивость зонда для рамановской спектроскопии наблюдалась в 50-литровой системе ATF6, что ожидалось, поскольку модель управления на основе рамановской спектроскопии еще не была оптимизирована для крупномасштабных исследований.

[0133] Во всех трех из этих циклов скорость перфузии была установлена в диапазоне от 1,8 до 2 объемов реактора/день, и все параметры увеличения масштаба были установлены с использованием традиционных методов.

[0134] Результаты этого эксперимента заключались в том, что сопоставимая продуктивность белка (фиг. 20) была достигнута во всех трех системах в течение пяти дней.

[0135] Пример 7 (фиг. 21)

[0136] В одном эксперименте биореактор культивировался с использованием клеточных линий и питательной среды. Емкость биореактора была 15 л (Экс. 14). Заданные значения для биореактора включали температуру (35,5 градусов Цельсия), перемешивание (250 об/мин), pH (управляемая с помощью CO₂ и бикарбоната натрия) (от 6,85 до 7,15). Все эти параметры были постоянными на протяжении всего цикла. Биореактор был соединен с устройством для удержания клеток ATF4, оснащенным фильтром 0,2 микрона. Фильтр с полыми волокнами задерживал клетки, но обеспечивал возможность белкам проходить сквозь него после 24 часов.

[0137] Перфузионное культивирование проводили в системе, используя управление на основе рамановской спектроскопии, сливом и массой. Как и в примере 5, питательная среда в этом эксперименте была дополнена дополнительными питательными веществами. Массой в каждой системе управляли для: +/- 0,05 кг в ATF4 от заданного целевого значения.

[0138] Управление с использованием рамановской спектроскопии и

автоматическое управление сливом на основе обратной связи по результатам рамановской спектроскопии использовались для установки КЖК в этом цикле (см. фиг. 21) до 70×10^6 клеток/мл.

[0139] Скорость перфузии в этом цикле была установлена на уровне 2,5 объема реактора/день, чтобы добавить дополнительные клетки в культуру и гарантировать, что не произойдет истощение питательной среды.

[0140] Реактор был способен поддерживать КЖК выше 70×10^6 клеток/мл в течение 7 дней, прежде чем отказ оборудования привел к концу партии продукции. В течение этого времени жизнеспособность поддерживалась выше 90%, что свидетельствует о здоровой культуре. До реализации системы управления по данному раскрытию устойчивое продуцирование при таких высоких плотностях было бы невозможно.

[0141] В частности, ссылка в данном документе на «один вариант осуществления изобретения» или «вариант осуществления изобретения» означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанная в связи с вариантом осуществления изобретения, могут быть включены, использованы и/или внедрены в один, некоторые или все варианты осуществления настоящего раскрытия. Использование или появление фразы «в одном варианте осуществления изобретения» или «в другом варианте осуществления изобретения» в описании не относятся к одному и тому же варианту осуществления изобретения, и при этом отдельные или альтернативные варианты осуществления изобретения не обязательно взаимно исключают один или большее количество других вариантов осуществления изобретения и не ограничиваются одним эксклюзивным вариантом осуществления изобретения. То же самое относится к терминам «реализация» и «пример». Настоящее раскрытие не ограничено ни одним отдельным аспектом или его вариантом осуществления, ни любыми комбинациями и/или перестановками таких аспектов и/или вариантов осуществления изобретения. Кроме того, каждый из аспектов настоящего раскрытия и/или его вариантов осуществления изобретения может использоваться отдельно или в сочетании с одним или большим количеством других аспектов настоящего раскрытия и/или его вариантами осуществления. Для краткости некоторые перестановки и комбинации не обсуждаются и/или не иллюстрируются отдельно в данном документе.

[0142] Кроме того, как указано выше, вариант осуществления или реализации изобретения, описанные в данном документе как «представленный в качестве примера», не должен рассматриваться как предпочтительный или преимущественный, например, по сравнению с другими вариантами осуществления изобретения или вариантами реализации изобретения; скорее, он предназначен для отражения или указания варианта осуществления изобретения или вариантов осуществления изобретения который является «представленным в качестве примера» вариантом (вариантами) осуществления изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ управления биореакторной системой, включающий:

получение культуры клеток в перфузионном биореакторе, при этом условия в перфузионном биореакторе позволяют культуре клеток продуцировать представляющий интерес белок;

измерение одного или нескольких технологических параметров культуры клеток с помощью зонда для рамановской спектроскопии;

удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с использованием первой выводной трубы при первом заданном расходе;

удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы при втором заданном расходе;

введение одной или обеих свежих сред или питательных веществ в культуру клеток с использованием вводной трубы при третьем заданном расходе; и

регулирование по меньшей мере одной из указанных заданных расходов в ответ на соответствующее изменение другого из указанных заданных расходов для поддержания скорости перфузии в перфузионном биореакторе на основе постоянной заданной скорости перфузии, где скорость перфузии определяет расход общего потока через перфузионный биореактор таким образом, чтобы расход общего потока оставался по существу постоянным при регулировании по меньшей мере одного заданного расхода;

при этом вводную и выводную трубы регулируют на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии в перфузионном биореакторе для поддержания одного или нескольких технологических параметров процесса в заданных диапазонах, и третьего заданного расхода вводной трубы, и первого и второго заданных расходов для каждой из выводных труб в пределах соответствующих заданных диапазонов.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что измерение одного или нескольких технологических параметров культуры в биореакторе с помощью рамановской спектроскопии проводят по меньшей мере один раз в час.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ предназначен для поддержания культуры клеток при средней концентрации жизнеспособных клеток по меньшей мере 30 миллионов клеток на мл в течение 30 дней в стационарном состоянии.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что перфузионный биореактор имеет объем по меньшей мере 10 л, и при этом способ дополнительно включает:

поддержание массы в перфузионном биореакторе с культурой клеток в пределах 20 г.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что перфузионный биореактор имеет объем по меньшей мере 10 л, и при этом способ дополнительно включает:

поддержание изменения массы в перфузионном биореакторе с культурой клеток в пределах 0,1 процента от первоначальной массы в биореакторе с культурой клеток.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, когда технологический параметр процесса отклоняется от заданного значения в пределах соответствующего желаемого диапазона, то выполняется одно или несколько из следующих действий: удаление бесклеточной среды, удаление клеток или введение одной или обеих свежих сред или питательных веществ, корректировку технологических параметров, чтобы уменьшить отклонение.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что через первую выводную трубу в сутки удаляют по меньшей мере два и до трех объемов биореактора истощенной питательной среды.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что технологические параметры процесса включают температуру и рН культуры клеток, при этом температуру поддерживают в диапазоне от 35 градусов Цельсия до 36 градусов Цельсия, и рН поддерживают в диапазоне от 6,85 до 7,15.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что технологические параметры процесса включают специфическую продуктивность клеток, и при этом способ дополнительно включает:

поддержание клеток в культуре клеток при специфической клеточной продуктивности, составляющей по меньшей мере 15 пг на клетку в сутки в течение по меньшей мере 25 дней.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что технологические параметры процесса включают концентрацию глюкозы, и при этом способ дополнительно включает:

поддержание концентрации глюкозы в диапазоне от приблизительно 5 мМ до приблизительно 85 мМ, или от приблизительно 1 г/л до приблизительно 15,5 г/л.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что технологические параметры процесса включают концентрацию лактата, и при этом способ дополнительно включает:

поддержание концентрации лактата менее приблизительно 60 мМ или менее приблизительно 6 г/л.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что технологические параметры процесса включают концентрацию аммиака, и при этом способ дополнительно включает:

поддержание концентрации аммиака менее приблизительно 15 мМ.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что каждое удаление бесклеточной истощенной питательной среды, удаление клеток и введение одной или обеих свежей питательной среды и питательных веществ управляются соответствующим насосом.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что перфузионный биореактор включает фильтр, выполненный с возможностью удержания клеток и обеспечения возможности сквозного прохода жидкости.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что вводную и выводную трубы регулируют на основе измерений с помощью зонда для рамановской спектроскопии в перфузионном биореакторе для поддержания скорости перфузии в перфузионном биореакторе на постоянном заданном значении скорости перфузии.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что перед корректировкой по меньшей мере одного из указанных расходов способ включает:

определение контура обратной связи на основе одного или нескольких технологических параметров процесса, измеренных с помощью зонда для рамановской спектроскопии, для увеличения или уменьшения по меньшей мере одного заданного расхода в ответ на противоположное уменьшение или увеличение другого заданного расхода.

17. Способ управления биореакторной системой, включающий:

подачу культуры клеток в перфузионный биореактор;

измерение одного или нескольких технологических параметров культуры клеток с помощью зонда для рамановской спектроскопии;

удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с использованием первой выводной трубы при первом заданном расходе;

удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы при втором заданном расходе;

введение одной или обеих свежих сред или питательных веществ в культуру клеток с использованием вводной трубы при третьем заданном расходе; и

измерение первого изменения одного или нескольких показателей из числа первого заданного расхода, второго заданного расхода или третьего заданного расхода на основании измерений, выполненных с использованием зонда для рамановской спектроскопии;

измерение второго изменения для другого показателя из числа первого указанного расхода, второго указанного расхода или третьего указанного расхода в ответ на первое изменение, для поддержания по существу постоянной скорости перфузии через биореакторную систему, чтобы расход общего входного потока и расход общего

выходного потока оставался по существу постоянным во время первого и второго изменения;

при этом потоки через вводную и выводные трубы регулируют контроллером, получающим результаты измерения от зонда для рамановской спектроскопии, для поддержания (i) одного или нескольких технологических параметров процесса в заданных диапазонах, (ii) первого заданного расхода и второго заданного расхода для каждой из выводных труб в пределах соответствующих заданных диапазонов значений, (iii) третьего заданного расхода вводной трубы в пределах заданного диапазона значений и (iv) скорости перфузии в перфузионном биореакторе на основе постоянной заданной скорости перфузии.

8. Способ по п.17, дополнительно включающий измерение массы перфузионного биореактора с культурой клеток, при этом автоматически регулируют расходы в вводной и выводных трубах на основе измерения массы перфузионного биореактора для поддержания массы перфузионного биореактора с культурой клеток в заданном диапазоне.

19. Способ по п.17, отличающийся тем, что перед выполнением второго изменения способ включает:

определение контура обратной связи на основе одного или нескольких технологических параметров процесса, измеренных с помощью зонда для рамановской спектроскопии, для увеличения или уменьшения другого указанного первого расхода, другого второго указанного расхода, или другого третьего указанного расхода в ответ на первое изменение, включая ответ на противоположное уменьшение или увеличение другого указанного расхода.

20. Способ управления биореакторной системой, включающий:

подачу культуры клеток в перфузионный биореактор;

измерение одного или нескольких технологических параметров культуры клеток с помощью зонда для рамановской спектроскопии;

удаление бесклеточной истощенной питательной среды из культуры клеток с использованием первой выводной трубы при первом заданном расходе;

удаление клеток из культуры клеток с использованием второй выводной трубы при втором заданном расходе;

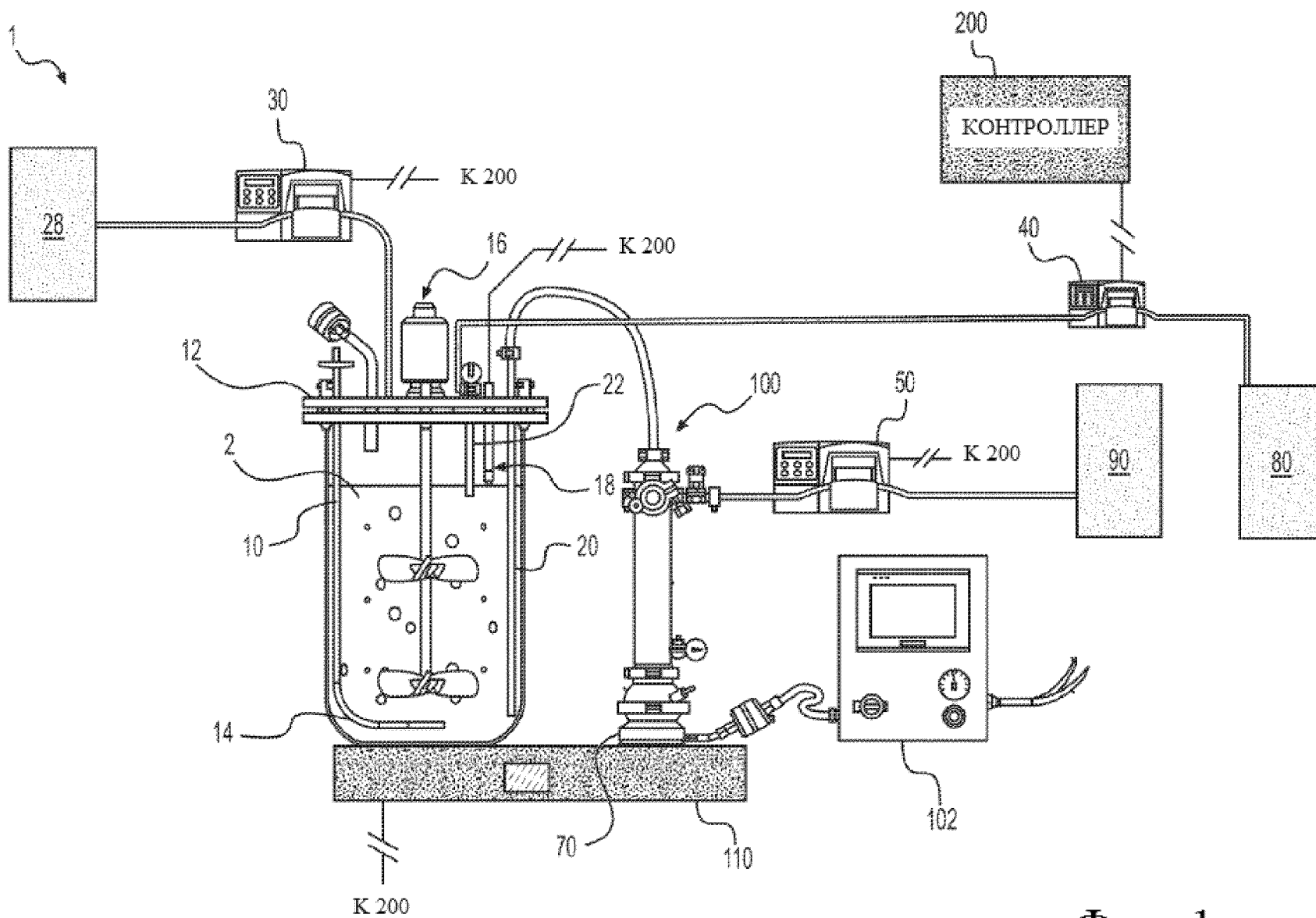
введение одной или обеих свежей среды или питательных веществ в культуру клеток с использованием вводной трубы при третьем заданном расходе;

изменение одной или нескольких из первого заданного расхода, второго заданного расхода или третьего заданного расхода на основе измерений зонда для рамановской

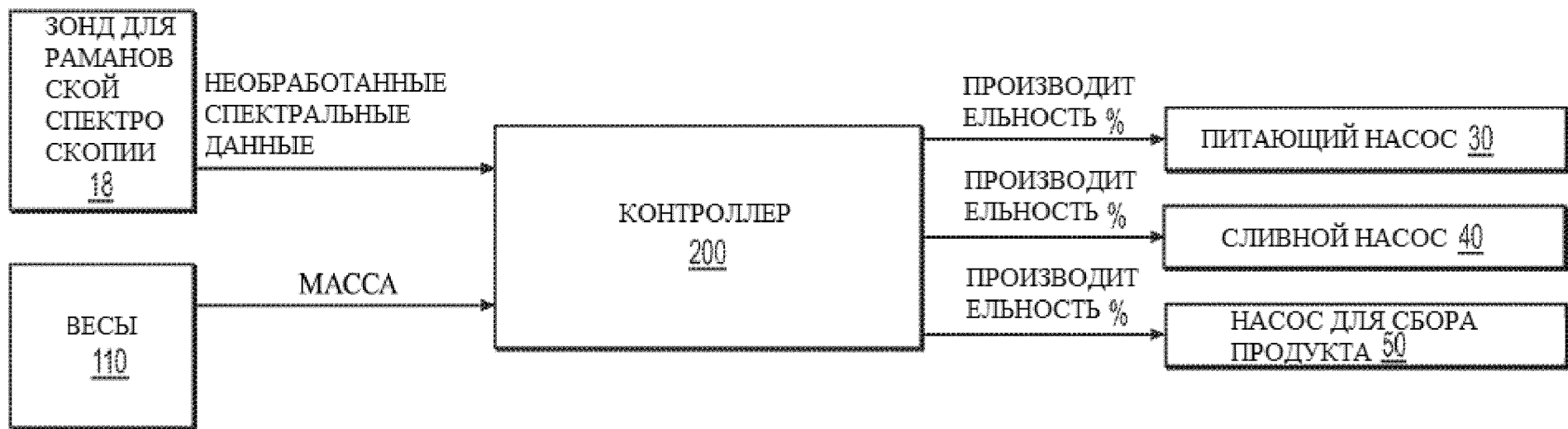
спектроскопии, при этом скорость перфузии через биореакторную систему поддерживают на постоянном уровне; и

регулировку на основе измерений зонда для рамановской спектроскопии вводных и выходных труб для поддержания по меньшей мере одного из технологических параметров процесса в заданном диапазоне, первого и второго заданных расходов в каждом из выводных труб в соответствующих заданных диапазонах, третьего заданного расхода в вводной трубе в пределах заданного диапазона, и поддержания постоянной скорости перфузии через биореакторную систему.

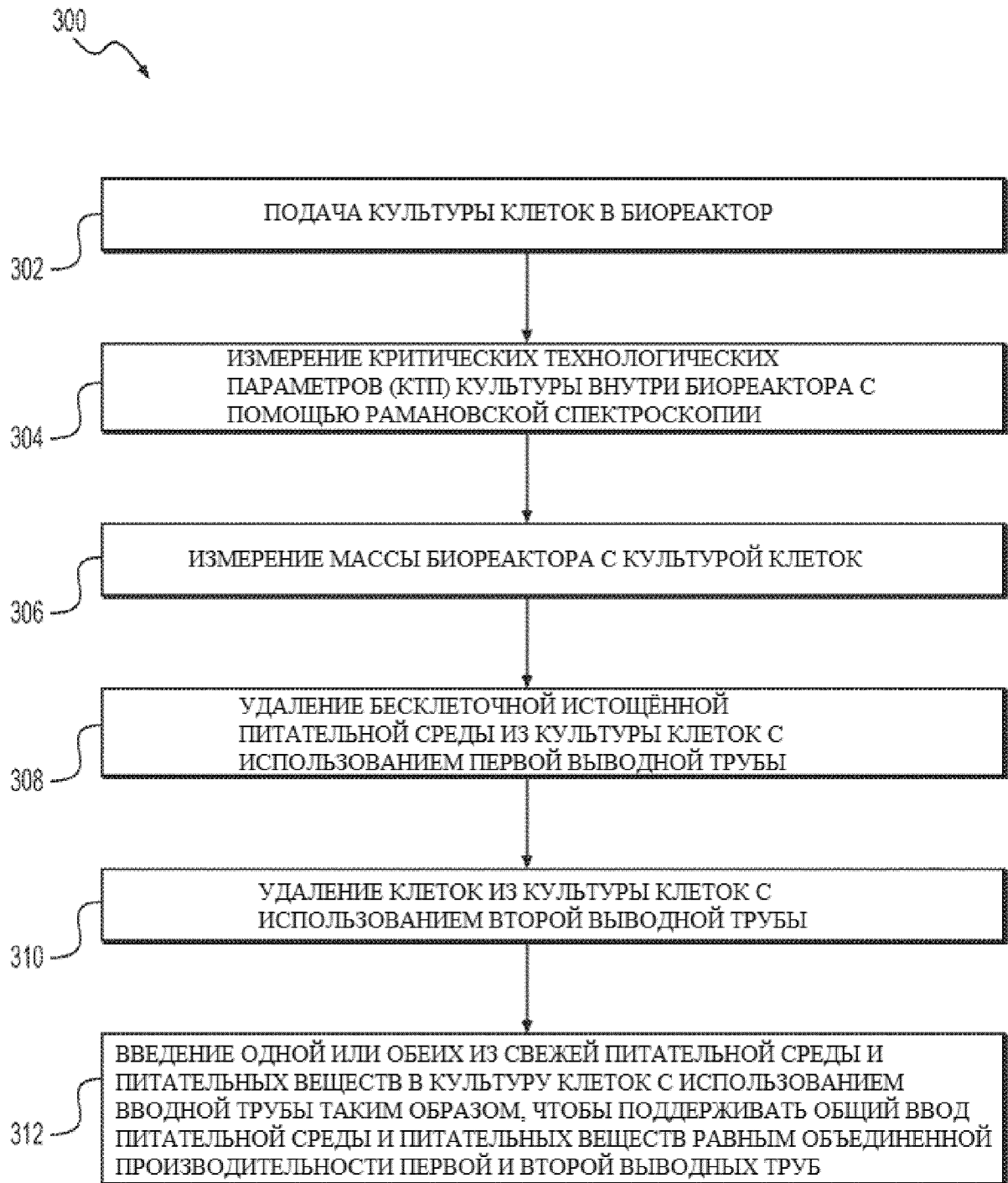
По доверенности



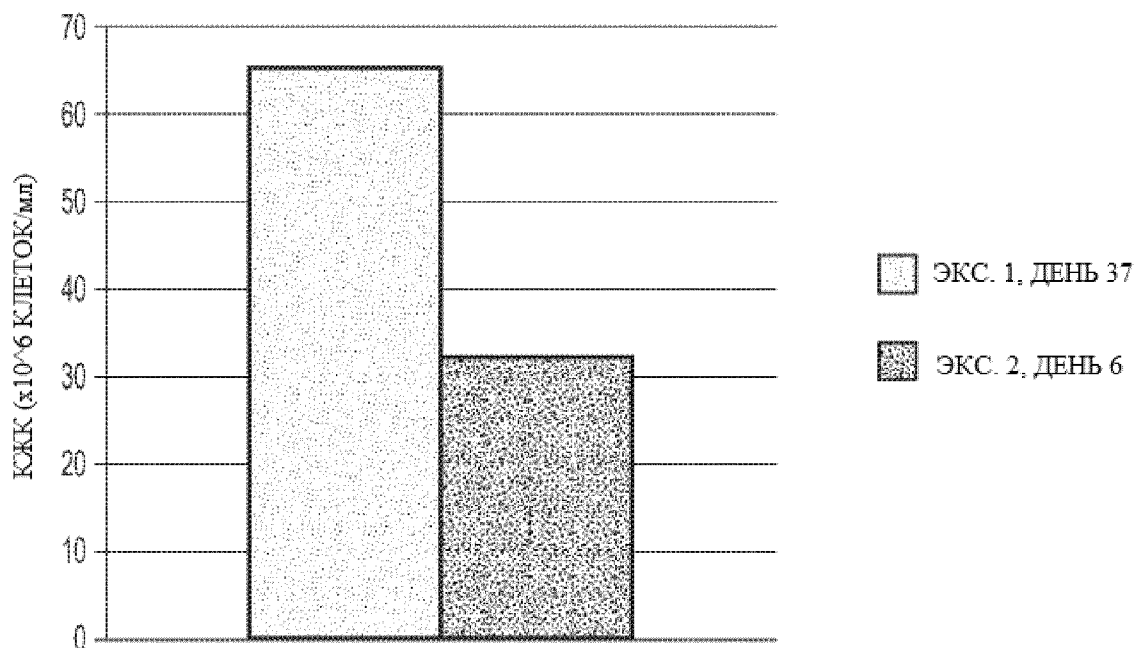
Фиг. 1



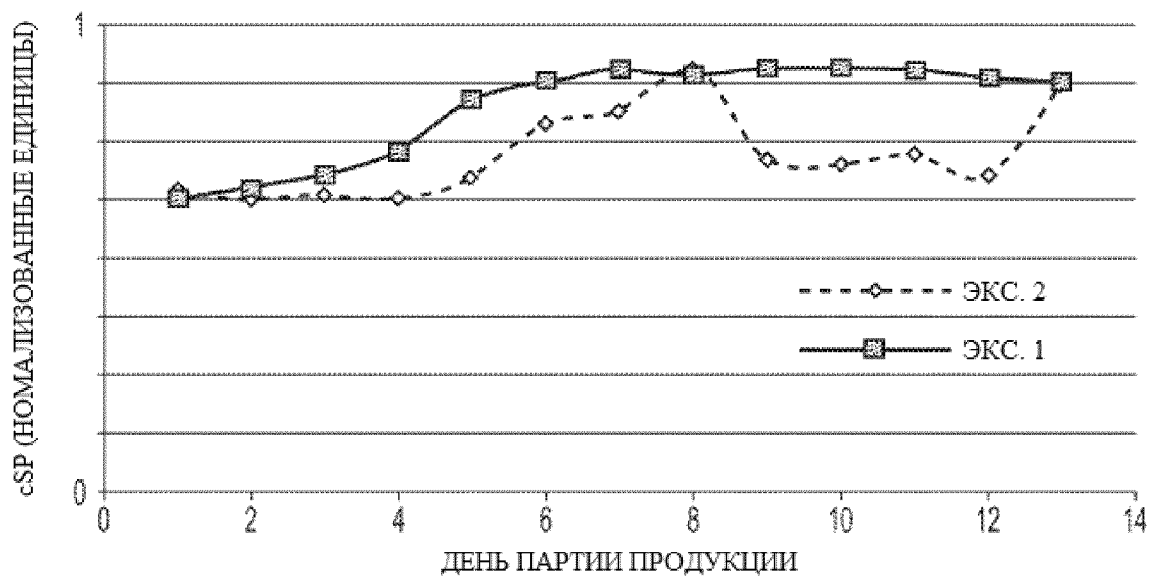
Фиг. 2



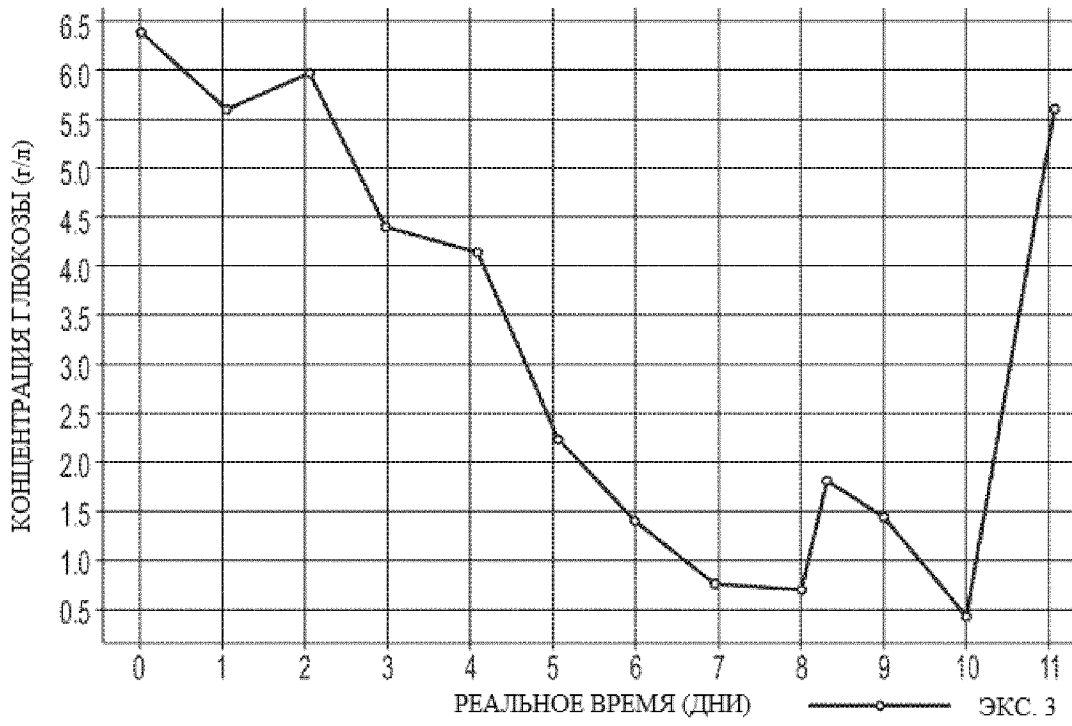
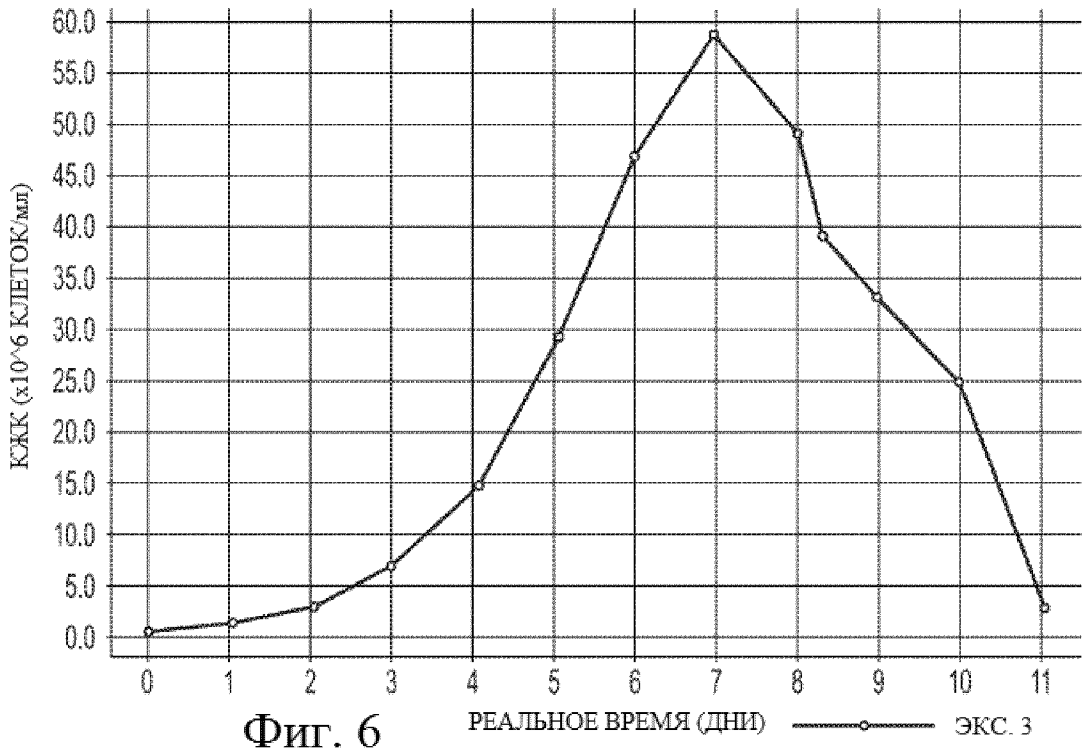
Фиг. 3

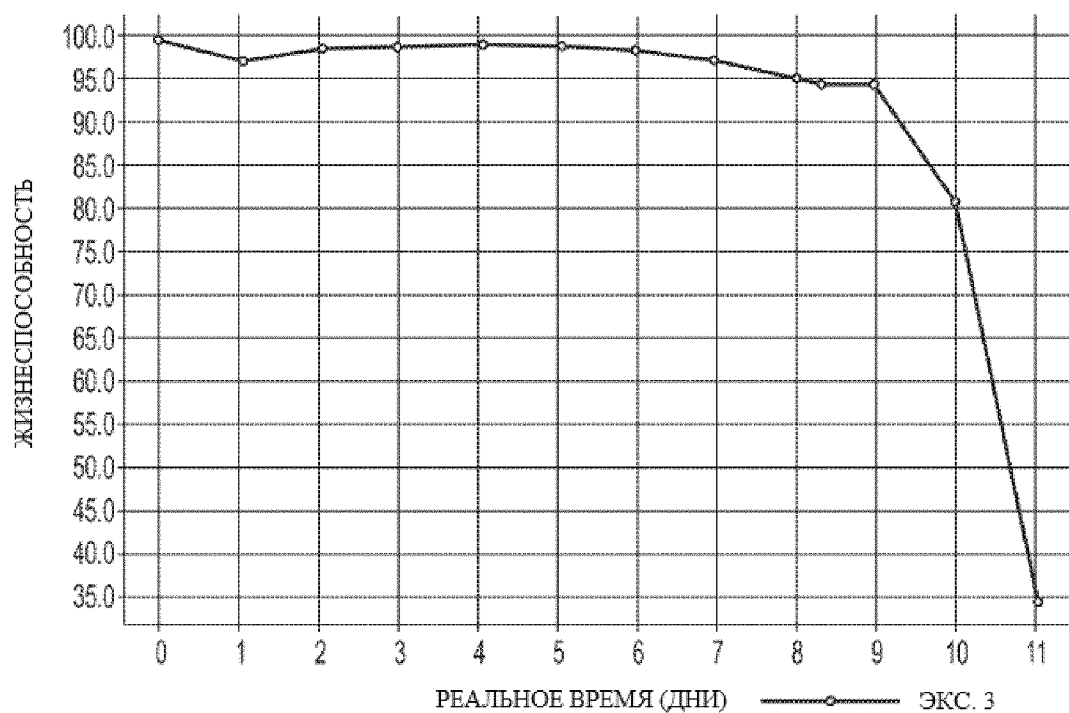


Фиг. 4

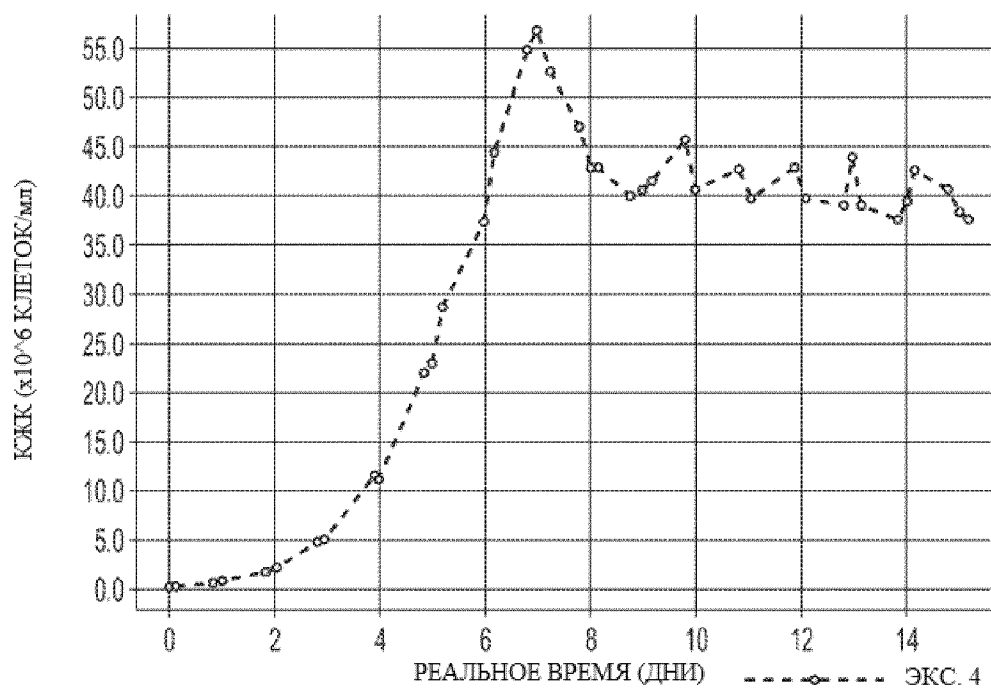


Фиг. 5

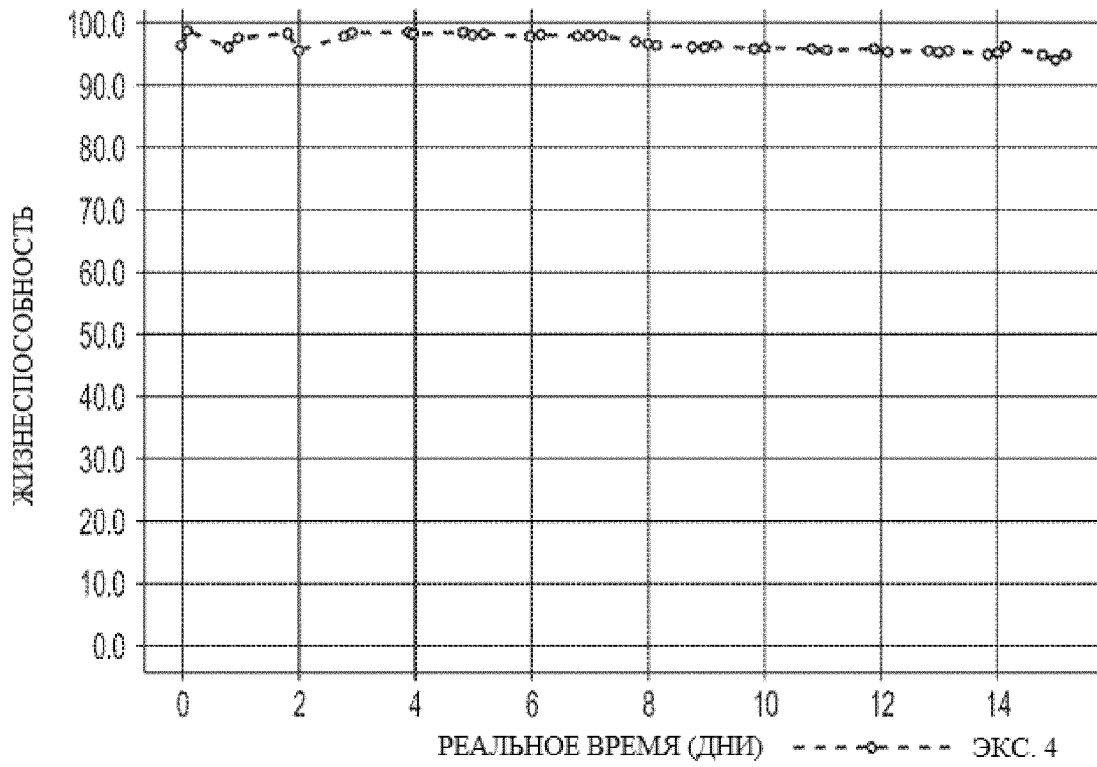




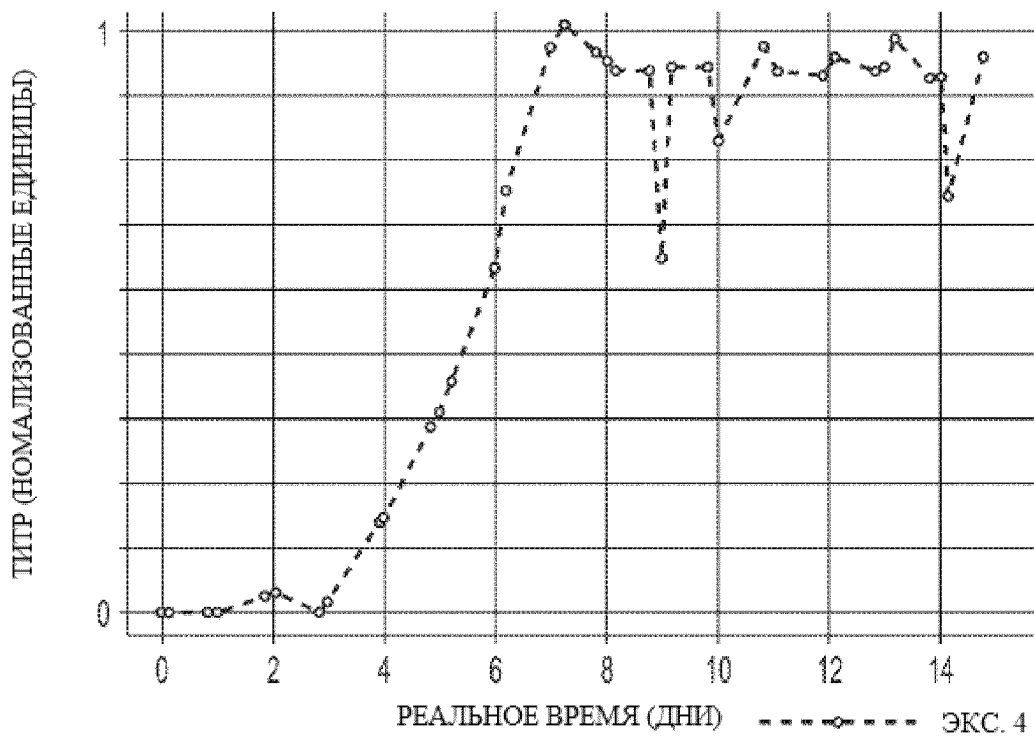
Фиг. 8



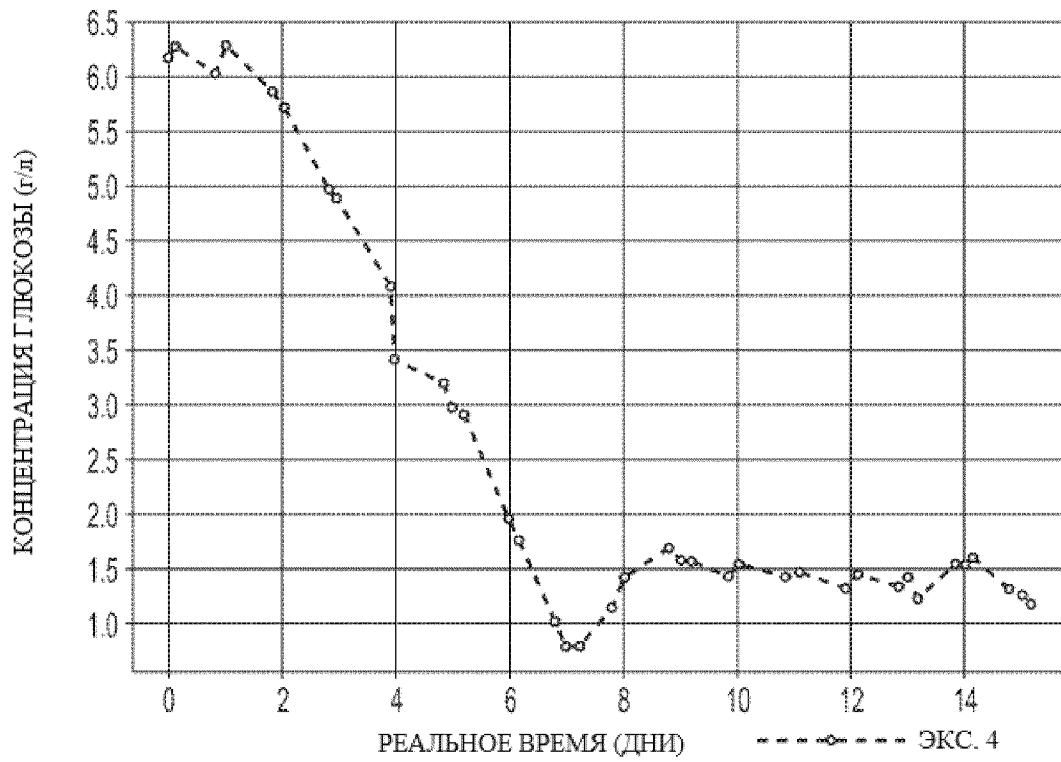
Фиг. 9



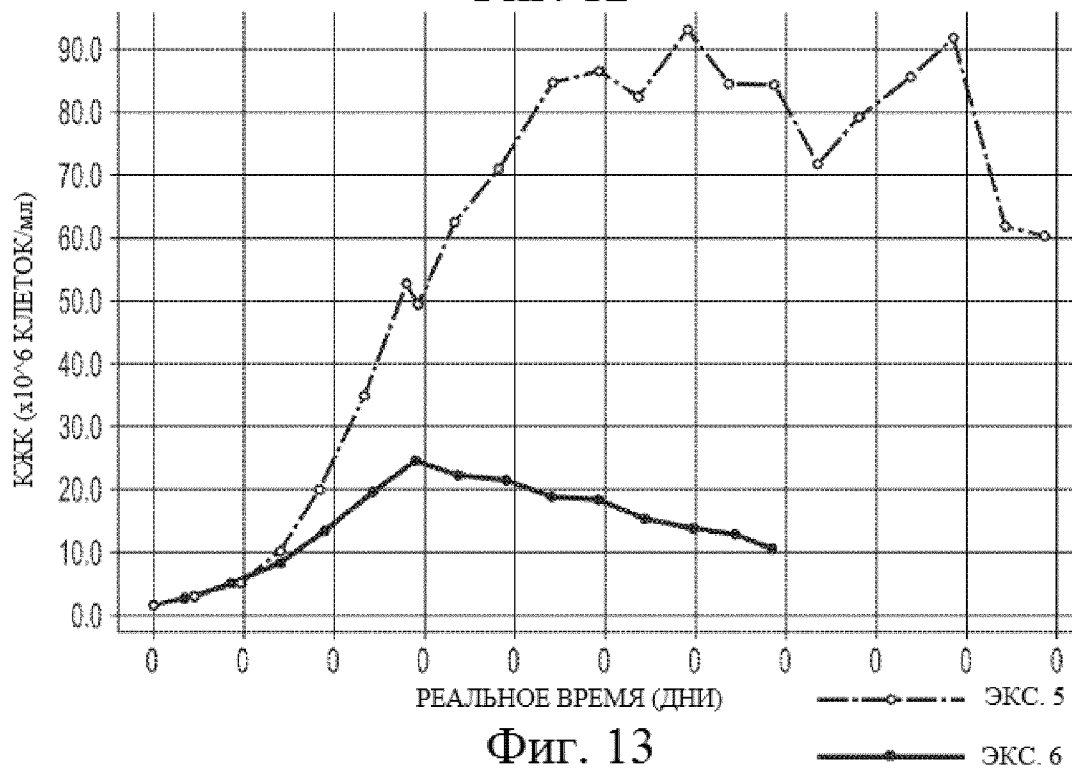
Фиг. 10



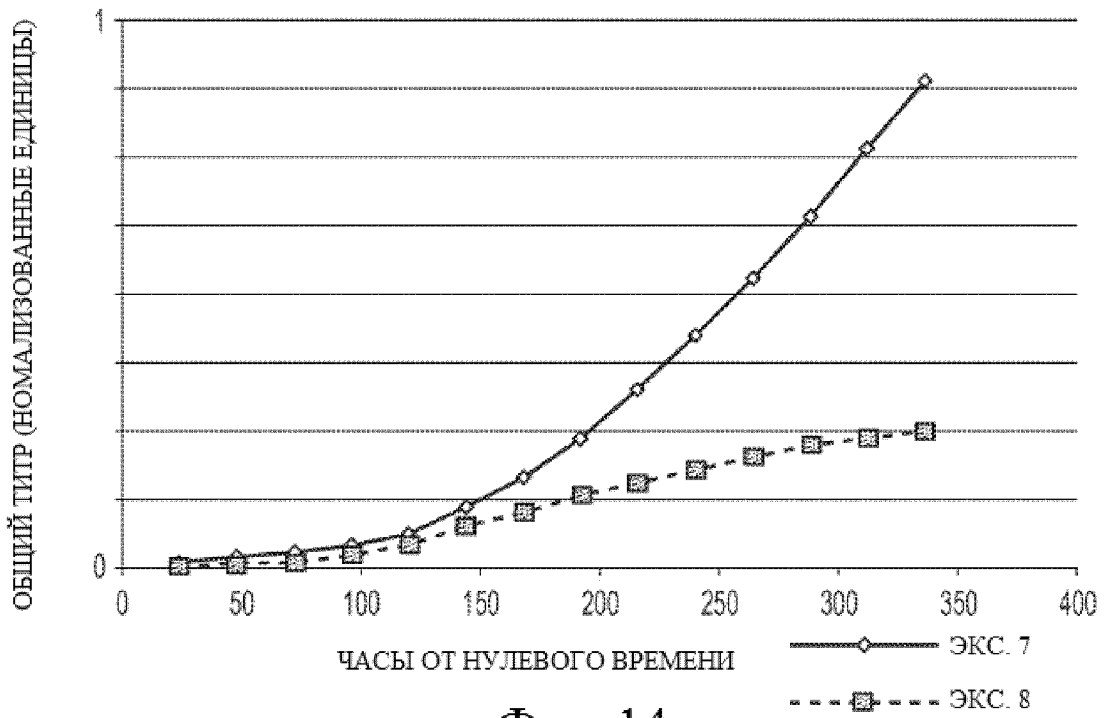
Фиг. 11



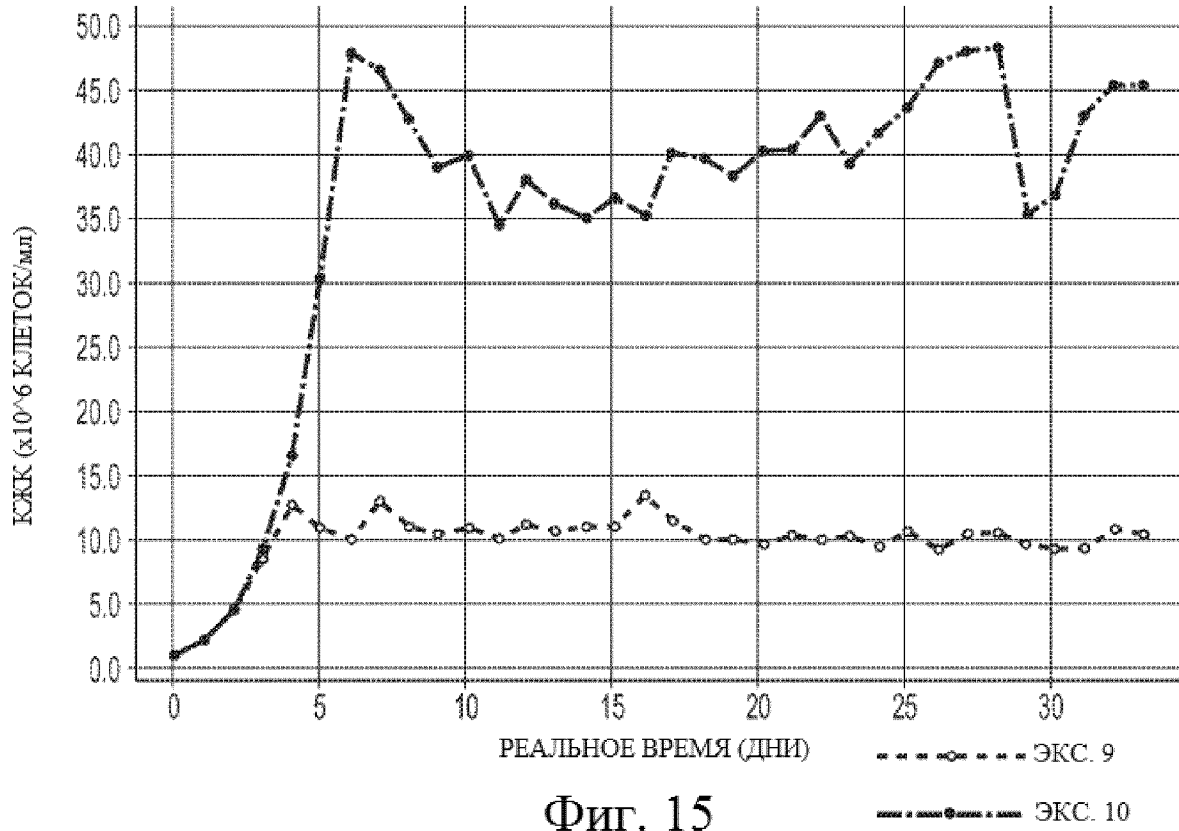
Фиг. 12



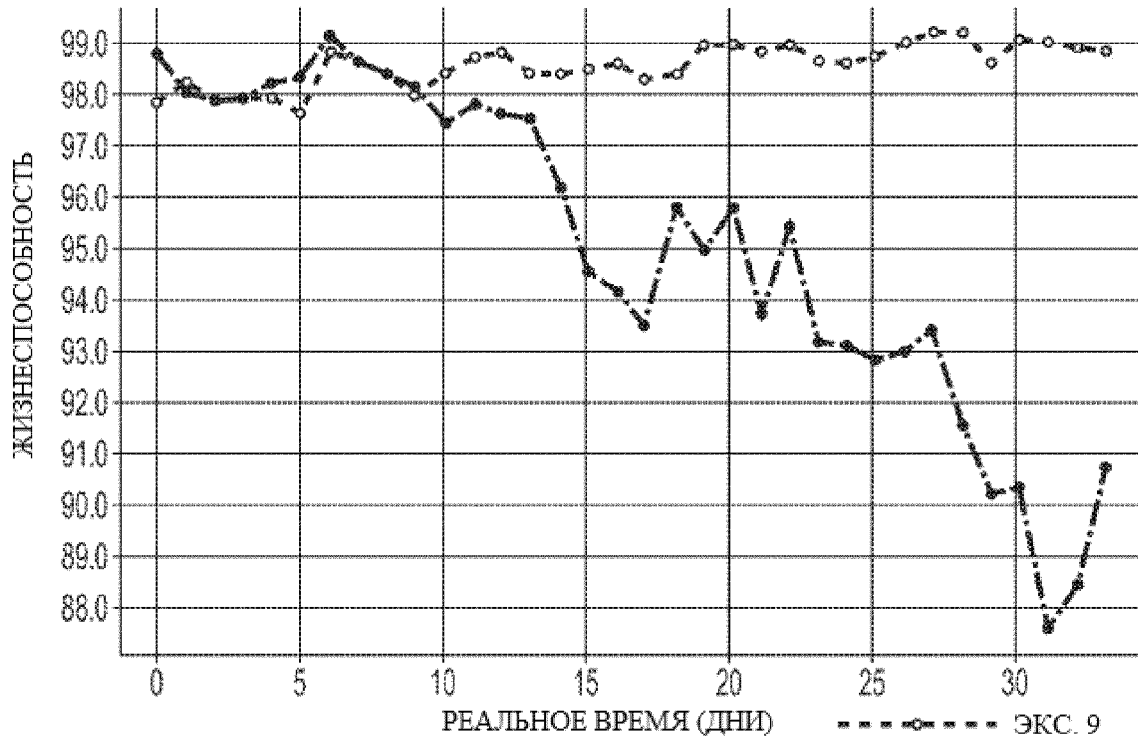
Фиг. 13



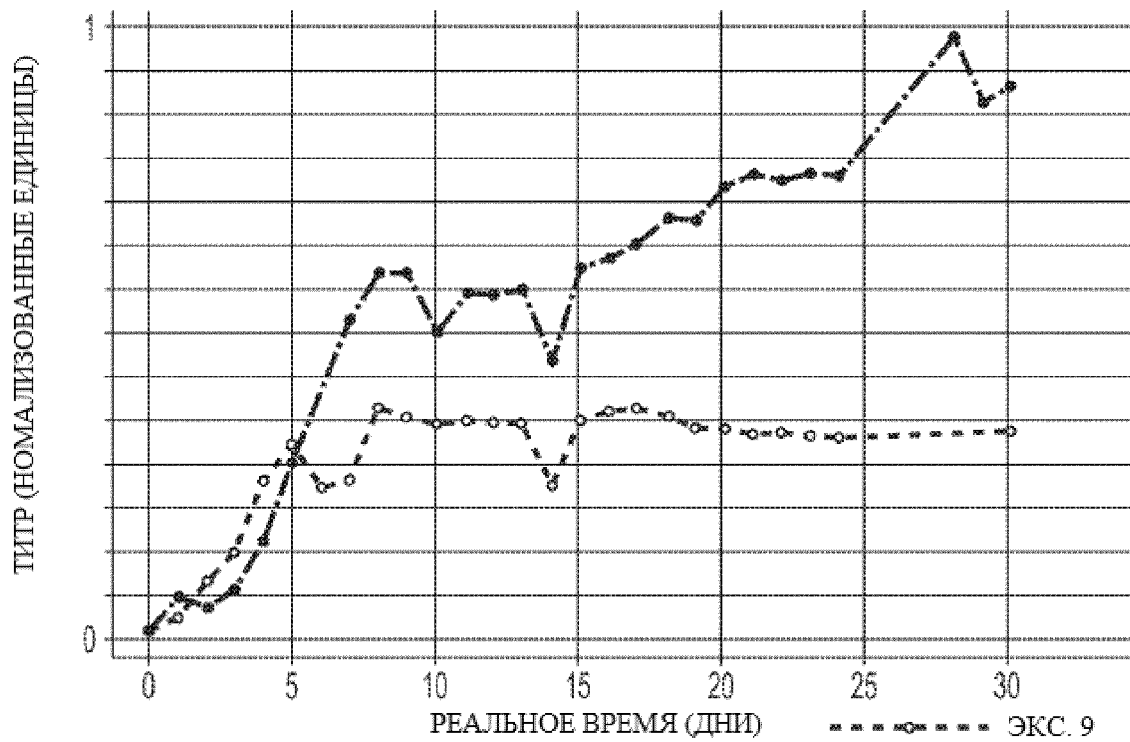
Фиг. 14



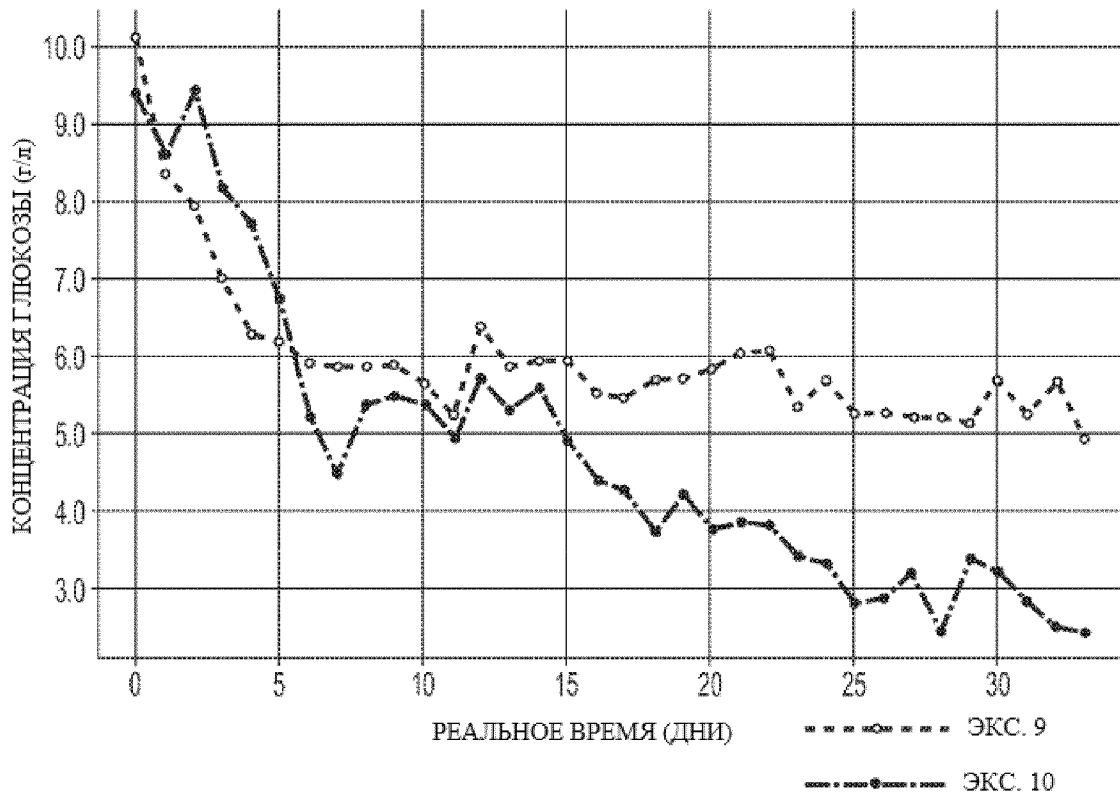
Фиг. 15



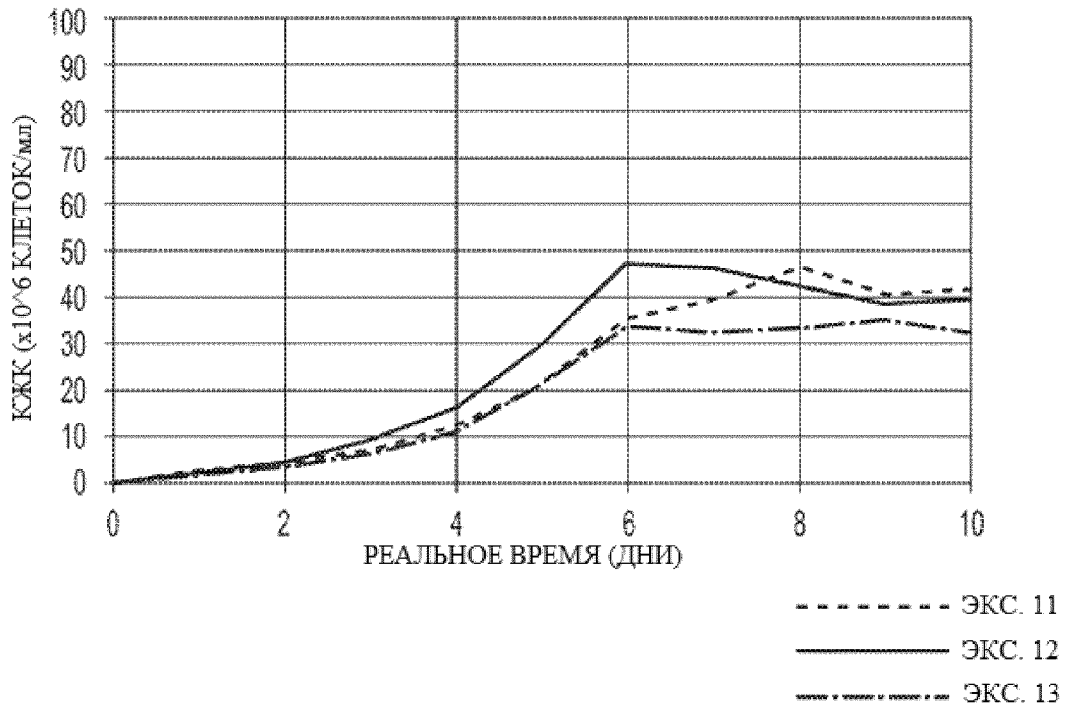
Фиг. 16



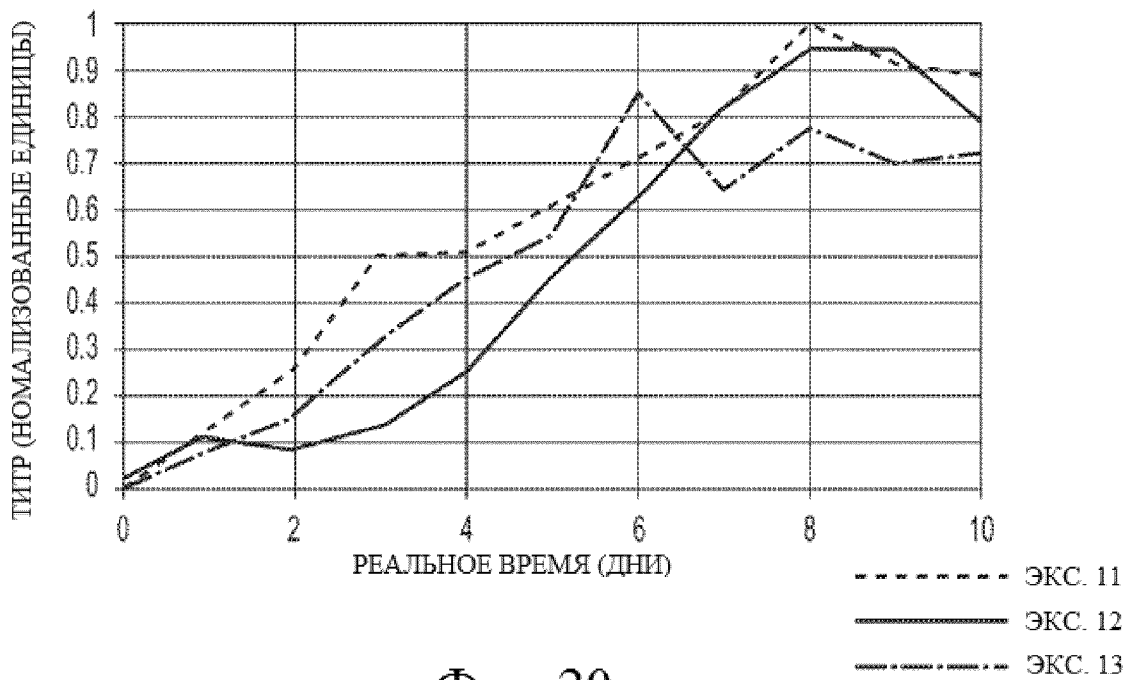
Фиг. 17



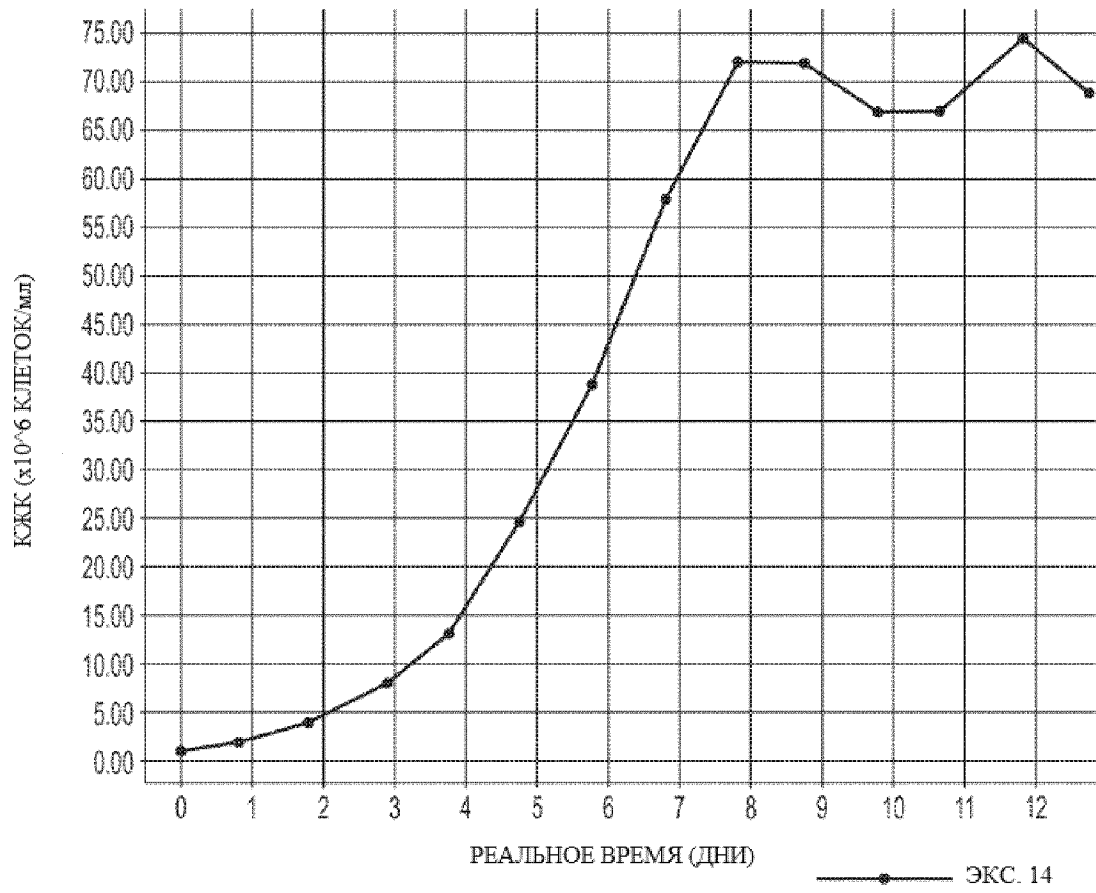
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 00166-12-304	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2018/055891	International filing date (<i>day/month/year</i>) 15 October 2018 (15-10-2018)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 16 October 2017 (16-10-2017)	
Applicant REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
- a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

- as suggested by the applicant
- as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/055891

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12M1/00 C12M1/34
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12M
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/196315 A2 (BIOGEN MA INC [US]) 8 December 2016 (2016-12-08) page 1, paragraph 4 page 2 page 4, paragraph 1 page 5, paragraph 2-4 page 6, paragraph 4 page 7, paragraph 1 page 8, paragraph 4 page 9, paragraph 2 page 11, paragraph 2 page 12, paragraph 2-4 page 13 page 16, line 21 - page 17, line 4 page 20, paragraph 2 page 48, line 30 figures 3,4 ----- -/--	1-50

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 24 January 2019	Date of mailing of the international search report 31/01/2019
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Böhm, Ingo
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2018/055891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/071716 A2 (BIOGEN IDEC INC [US]; WEBB MARCUS [US]) 6 July 2006 (2006-07-06) page 3, lines 27-30 page 4, lines 3-32 page 5, lines 30-18 page 7, lines 26-33 page 9, lines 5-6,15-20,27,32 -----	1-50
Y	WO 2017/132185 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; HILLER GREGORY WALTER [US]; GAGNON MATT) 3 August 2017 (2017-08-03) page 1, paragraph 1 page 3, paragraph 1 page 4, paragraph 7 page 9, paragraph 23-24 page 14, paragraphs 1,24 page 15, paragraph 20-25 figure 1 -----	1-50
Y	WO 2016/196261 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; HILLER GREGORY WALTER [US]; GAGNON MATT) 8 December 2016 (2016-12-08) page 2 - page 3 page 7, paragraph 3 page 8, paragraph 1 page 9, paragraph 2 page 12, paragraph 4 page 15, paragraph 3 page 17, paragraph 2 page 23, paragraph 2 -----	1-50
Y	US 2016/145563 A1 (BERTEAU OLIVIER [US] ET AL) 26 May 2016 (2016-05-26) figures 1-5,9c paragraphs [0002], [0004], [0005] - [0008], [0010], [0047], [0058], [0059], [0063], [0069], [0074], [0075], [0093], [0099], [0103], [0105] -----	1-50
A	WO 2016/004322 A2 (BIOGEN MA INC [US]) 7 January 2016 (2016-01-07) page 5, paragraph 16 page 8, lines 25-31; figure 1 -----	1,16,17, 35,36, 47-50
A	WO 2013/103901 A1 (BEND RES INC [US]) 11 July 2013 (2013-07-11) paragraphs [0069], [0070], [0074] - [0076] figures 1,2,4,5 ----- -/--	1,16,17, 35,36, 47-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/055891

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JESSICA WHELAN ET AL: "In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 28, no. 5, 20 July 2012 (2012-07-20), pages 1355-1362, XP55447080, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.1590 page 1355 - page 1356 -----	1,16,17, 35,36, 47-50
A	KONSTANTINOV KONSTANTIN ET AL: "The "push-to-low" approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells", ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING, BIOTECHNOL, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 101, 31 January 2006 (2006-01-31), pages 75-98, XP009107388, ISSN: 0724-6145, DOI: 10.1007/10_016 cited in the application page 79 - page 80 -----	1,16,17, 35,36, 47-50
A	INN H. YUK ET AL: "Controlling glycation of recombinant antibody in fed-batch cell cultures", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 108, no. 11, 15 June 2011 (2011-06-15), pages 2600-2610, XP55171183, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.23218 page 2600 - page 2603 -----	1,16,17, 35,36, 47-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/055891

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016196315 A2	08-12-2016	EP 3303561 A2	11-04-2018
		US 2018291329 A1	11-10-2018
		WO 2016196315 A2	08-12-2016

WO 2006071716 A2	06-07-2006	AU 2005322159 A1	06-07-2006
		CA 2593374 A1	06-07-2006
		CN 101443444 A	27-05-2009
		EP 1844138 A2	17-10-2007
		JP 2008526203 A	24-07-2008
		US 2009104594 A1	23-04-2009
		WO 2006071716 A2	06-07-2006

WO 2017132185 A1	03-08-2017	CN 108884428 A	23-11-2018
		EP 3408371 A1	05-12-2018
		KR 20180101596 A	12-09-2018
		SG 11201806310T A	30-08-2018
		WO 2017132185 A1	03-08-2017

WO 2016196261 A1	08-12-2016	AU 2016271607 A1	30-11-2017
		CA 2985702 A1	08-12-2016
		CN 107922919 A	17-04-2018
		EP 3303558 A1	11-04-2018
		JP 2018516079 A	21-06-2018
		KR 20180010202 A	30-01-2018
		US 2018171279 A1	21-06-2018
		WO 2016196261 A1	08-12-2016

US 2016145563 A1	26-05-2016	US 2016145563 A1	26-05-2016
		WO 2015003012 A2	08-01-2015

WO 2016004322 A2	07-01-2016	EP 3164481 A2	10-05-2017
		US 2017130186 A1	11-05-2017
		WO 2016004322 A2	07-01-2016

WO 2013103901 A1	11-07-2013	EP 2800966 A1	12-11-2014
		US 2015019140 A1	15-01-2015
		WO 2013103901 A1	11-07-2013
