

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045844**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.29

(21) Номер заявки
202192126

(22) Дата подачи заявки
2015.06.04

(51) Int. Cl. **C12P 21/00** (2006.01)
C12N 5/07 (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01)
C12M 3/06 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ СБОРА КУЛЬТУР КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(31) **62/007,588**

(32) **2014.06.04**

(33) **US**

(43) **2021.11.30**

(62) **201692498; 2015.06.04**

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

(72) Изобретатель:
**Годар Четан, Коул Шон, Сабо
Николь, Лин Джонатан, Лалл
Джонатан, Тхармалингам Тхармала
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2009023562

ZHAO Feng et al. Perfusion Bioreactor System for Human Mesenchymal Stem Cell Tissue Engineering: Dynamic Cell Seeding and Construct Development. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2005, Vol. 91, N.4, pp 482-493
DOI: 10.1002/bit.20532

ALTSHULER Gordon L. et.al. Continuous Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production in Hollow Fiber Reactors-Separators. Biotechnology and Bioengineering, 1986, Vol XXVIII, pp. 646-658
US-A1-20020146816

(57) В настоящем изобретении предложены способы и материалы для культивирования клеток млекопитающих и сбора рекомбинантного белка.

B1

045844

045844

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/007588, поданной 4 июля 2014 года, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Область изобретения

В изобретении предложены способы и материалы для культивирования клеток млекопитающих и сбора рекомбинантных белков.

Уровень техники

Поскольку спрос на большее количество терапевтических рекомбинантных белков продолжает расти, прилагаются большие усилия для оптимизации процессов, в частности, способов и стратегий выращивания, кормления и поддержания промышленных клеточных культур, которые оказывают положительное влияние на жизнеспособность клеток и выход белка. Разработка промышленных процессов для производства рекомбинантных белков является сложной задачей, в которой многие переменные должны быть сбалансированы. Это особенно верно для начальных этапов процесса производства, где каждый элемент технологического процесса клеточных культур может оказать значительное влияние на более поздние стадии производства, в частности, сбор урожая и этапы обработки.

Типичная клеточная культура проходит фазу роста, которая представляет собой период экспоненциального роста, в течение которого плотность клеток увеличивается. После фазы роста наступает фазовый переход, когда экспоненциальный рост клеток замедляется и начинает увеличиваться синтез белка. Это знаменует начало стационарной фазы - фазы производства, в течение которой плотность клеток обычно выравнивается и повышается титр продукта. В пакетных системах сбора, в которых культура клеток поддерживается в течение определенного количества дней с последующим сбором всей культуры сразу, большая часть продукта может быть получена в последние несколько дней, которые предшествуют сбору урожая, когда культура клеток, как правило, достигает своей наибольшей производительности. Хотя это может привести к более высокому титру урожая однократно, это происходит за счет непроизводительного времени перезапуска, которое включает инициацию следующего пробега и время задержки, нужное для достижения пика производительности. В непрерывных системах сбора, в которых продукт, содержащий пермеат, собирается из клеточной культуры в непрерывном режиме в течение всей фазы производства, время культивирования культуры клеток увеличивается, но это происходит за счет снижения титров продукта и более высоких объемов отходов клеточной культуральной жидкости, с которыми приходится иметь дело в течение этапов сбора урожая и очистки.

Совершенствование клеточной культуры и сбора урожая, в конечном счете, является упражнением в оптимизации, коммерческими переменными, такими как, например, скорость обработки для титра продукта и качества продукта. Эти сложные задачи включают, например, поддержание жизнеспособности клеток, достижение работоспособного титра продукта, и уравнивание пропускной способности начальных этапов производства со скоростью сбора урожая и возможностями более поздних этапов производства.

Новые способы процесса, которые обеспечивают равномерные нарастающие улучшения производства рекомбинантных белков и их восстановления, являются ценными, с учетом расходов на крупномасштабные технологические процессы с применением клеточных культур и растущий спрос на большее количество биопрепаратов и более низкие затраты на их производство. Требуются улучшения технологического процесса клеточных культур, которые могут привести к повышению выхода продукта, тем самым снижая затраты, связанные с производством белковых лекарств. Изобретение удовлетворяет эти потребности, предоставляя такие способы и материалы, которые позволяют продлить время культивирования клеточных культур при одновременном повышении выхода белка.

Сущность изобретения

В изобретении предложен способ длительного периодического сбора урожая, включающий: создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок; поддержание клеточной культуры путем перфузии свежей среды для культивирования в биореактор; прохождение культуры клеток через фильтр и сбор пермеата, при этом нулевой пермеат изначально собирается до момента достижения первого заданного параметра, по достижении которого урожайный пермеат собирается в течение предопределенного времени, после этого следует попеременный сбор нулевого пермеата до момента достижения второго заданного параметра, затем следует сбор урожайного пермеата в течение предопределенного времени, при этом чередование сбора нулевого пермеата и урожайного пермеата продолжается до тех пор, пока культивирование культуры клеток не завершится.

В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр подбирается исходя из времени, плотности жизнеспособных клеток, объема клеточной массы или титра.

В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр составляет по меньшей мере от 12 ч до 25 дней после создания клеточной культуры. В другом варианте реализации изобретения, первый заданный параметр составляет по меньшей мере от 24 до 72 ч после создания клеточной культуры. В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр составляет, по меньшей мере, 4 дня после создания клеточной культуры. В другом варианте реализации изобретения, первый заданный пара-

метр составляет, по меньшей мере, 5 дней или больше после создания клеточной культуры. В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр составляет, по меньшей мере, 25 дней после создания клеточной культуры. В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр составляет по меньшей мере от 5 до 25 дней после создания клеточной культуры. В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр составляет по меньшей мере от 10 до 12 дней после создания клеточной культуры.

В одном варианте реализации изобретения, второй заданный параметр составляет по меньшей мере от 12 до 72 ч после сбора урожайного пермеата. В одном варианте реализации изобретения, второй заданный параметр составляет по меньшей мере от 24 до 72 ч после сбора урожайного пермеата. В одном варианте реализации изобретения, второй заданный параметр составляет по меньшей мере от 24 до 48 ч после сбора урожайного пермеата.

В одном варианте реализации изобретения, предопределенное время составляет по меньшей мере от 12 до 72 ч. В одном варианте реализации изобретения, предопределенное время составляет по меньшей мере от 24 до 72 ч. В одном варианте реализации изобретения, предопределенное время составляет по меньшей мере от 24 до 48 ч.

В одном варианте реализации изобретения, нулевой пермеат изначально собирается, по меньшей мере, в течение от 24 ч до 25 дней, в тоже время урожайный пермеат собирается в течение от 12 до 72 ч, после этого следует попеременный сбор нулевого пермеата, по меньшей мере, в течение от 24 ч до 25 дней, затем следует сбор урожайного пермеата в течение от 12 до 72 ч.

В одном варианте реализации изобретения, когда собирается нулевой пермеат, фильтр представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО) которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В родственном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсека составляет 300 кДа или меньше. В родственном варианте реализации, фильтр с полыми волокнами представляет собой ультрафильтр.

В одном варианте реализации изобретения, когда собирается урожайный пермеат, фильтр представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО) которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В родственном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсека составляет, по меньшей мере, 500 кДа. В родственном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами представляет собой микрофильтр.

В одном варианте реализации изобретения, фильтр представляет собой моноблочную фильтрационную систему. В родственном варианте реализации изобретения, моноблочная фильтрационная система содержит, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО) которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО) которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В родственном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсека, по меньшей мере, одного фильтровального компонента с полыми волокнами, которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет 300 кДа или меньше. В родственном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсека, по меньшей мере, одного фильтровального компонента с полыми волокнами, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет, по меньшей мере, 500 кДа. В родственном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой ультрафильтр, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой микрофильтр. В родственном варианте реализации изобретения, моноблочная фильтрационная система находится внутри корпуса. В родственном варианте реализации изобретения, моноблочная фильтрационная система дополнительно содержит прокладку между, по меньшей мере, двумя фильтровальными компонентами с полыми волокнами.

В одном варианте реализации изобретения, когда собирается нулевой пермеат, он извлекается, по меньшей мере, с одного фильтровального компонента с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО) которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе.

В одном варианте реализации изобретения, когда собирается урожайный пермеат, он извлекается, по меньшей мере, с одного фильтровального компонента с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО) которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе.

В одном варианте реализации изобретения, когда собирается пермеат из фильтра, который представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, свежая среда для культивирования клеток смешивается или дополняется таким образом, чтобы достичь концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера. В родственном варианте реализации изобретения, неионный блок-

сополимер представляет собой полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимер. В родственном варианте реализации, неионный блок-сополимер представляет собой полоксамер 188.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает отбор проб во время процессов культивирования клеточной культуры, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса культивирования клеточной культуры. В родственном варианте реализации изобретения, образцы количественно и/или качественно контролируются с применением аналитических методов технологического процесса.

В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии представляет собой непрерывную перфузию. В одном варианте реализации изобретения, скорость перфузии постоянна. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется со скоростью менее или равной 1,0 рабочему объему в день. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется с помощью перистальтического насоса, насоса с двойной мембранной, насоса с низкой скоростью сдвига или переменного тангенциального потока. В родственном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется с помощью переменного тангенциального потока.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает действие температурного сдвига на клеточную культуру, при этом клетки культивируют: а) при первой температуре в течение первого периода времени; б) при второй температуре в течение второго периода времени. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой производства. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит в течение фазы производства. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр, при этом достижение заданного параметра определяется с помощью емкостного зонда биомассы.

В одном варианте реализации изобретения, создание клеточной культуры начинается с инокуляции биореактора как минимум $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. В родственном варианте реализации изобретения, инокулят выращивают посредством процесса перфузии, используя переменный тангенциальный поток.

В одном варианте реализации изобретения, перед помещением в биореактор, среду для культивирования клеток обрабатывают, используя наночистку, краткосрочную температурную обработку (КТО), или ультрафиолет в комбинации с фильтрацией.

В одном варианте реализации изобретения, биореактор представляет собой промышленный биореактор. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем, по меньшей мере, 500 л. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 л до 2000 л. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л.

В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток с известными химическими компонентами. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой перфузионную среду для культивирования клеток.

В одном варианте реализации изобретения, клетки млекопитающего являются клетками яичника китайского хомячка (СНО). В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантно-слитого белка, или цитокина.

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок очищают из урожайного пермеата с помощью одного или нескольких способов, которые включают: флокуляцию, осаждение, центрифугирование, глубинную фильтрацию, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию в смешанном режиме, хроматографию гидрофобного взаимодействия или гидроксипатитную хроматографию. В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает отбор проб во время процесса очистки, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и процесса очистки.

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок представлен в виде фармацевтически приемлемого препарата. В одном варианте реализации изобретения, предлагается рекомбинантный белок, выработанный описанным выше способом.

В изобретение также предложен способ сбора рекомбинантного белка, включающий: создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок; поддержание клеточной культуры путем перфузии клеточной культуры свежей средой для культивирования клеток, которая смешана или дополнена для достижения концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера; прохождение клеточной культуры через фильтр с порами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека (ММО), которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе; сбор пермеата, содержащего рекомбинантный белок.

В одном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсечения составляет по меньшей мере 500 кДа. В одном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами представляет собой микрофильтр.

В изобретение также предложен способ сбора рекомбинантного белка, включающий: создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок; поддержание клеточной культуры путем перфузии клеток культуры свежей средой для культивирования клеток, которая смешана или дополнена для достижения концентрации не менее 1 г/л неионного блок-сополимера; прохождение клеточной культуры через фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения (ММО), которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе; сбор пермеата; при достижении заданного параметра запуск перфузии клеточной культуры свежей средой для культивирования клеток, которая смешана или дополнена для достижения концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера; прохождение клеточной культуры через фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения (ММО), которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе; сбор пермеата, содержащего рекомбинантный белок.

В одном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсечения фильтра с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет 300 кДа или меньше. В одном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой ультрафильтр.

В одном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсечения фильтра с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения (ММО) которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет, по меньшей мере, 500 кДа. В одном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения (ММО) которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой микрофильтр.

В одном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, и фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, являются компонентами моноблочной фильтрационной системы.

В одном варианте реализации изобретения, неионный блок-сополимер представляет собой полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимер. В одном варианте реализации, неионный блок-сополимер представляет собой полоксамер 188.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает отбор проб во время процессов культивирования клеточной культуры, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса культивирования клеточной культуры. В одном варианте реализации, образцы количественно и/или качественно контролируются с применением аналитических методов технологического процесса.

В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии приставляет собой непрерывную перфузию. В одном варианте реализации изобретения, скорость перфузии постоянна. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется со скоростью менее или равной 1,0 рабочему объему в день. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется с помощью перистальтического насоса, насоса с двойной мембранной, насоса с низкой скоростью сдвига или переменного тангенциального потока. В одном варианте реализации, процесс перфузии выполняется с помощью переменного тангенциального потока.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает действие температурного сдвига на клеточную культуру, при этом клетки культивируют: а) при первой температуре в течение первого периода времени; б) при второй температуре в течение второго периода времени. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой производства. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит в течение фазы производства. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр, при этом достижение заданного параметра определяется с помощью емкостного зонда биомассы.

В одном варианте реализации изобретения, создание клеточной культуры начинается с инокуляции биореактора как минимум $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации изобретения, инокулят выращивают посредством процесса перфузии, используя переменный тангенциальный поток.

В одном варианте реализации изобретения, перед помещением в биореактор, среду для культивирования клеток обрабатывают, используя нанофильтрацию, краткосрочную температурную обработку (КТО), или ультрафиолет в комбинации с фильтрацией.

В одном варианте реализации изобретения, биореактор представляет собой промышленный биоре-

актор. В одном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем, по меньшей мере, 500 л. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 л до 2000 л. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л.

В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток с известными химическими компонентами. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой перфузионную среду для культивирования клеток.

В одном варианте реализации изобретения, клетки млекопитающего являются клетками яичника китайского хомячка (СНО).

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из: человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантно-слитого белка, или цитокина.

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок очищают из урожайного пермеата с помощью одного или нескольких способов, которые включают флокуляцию, осаждение, центрифугирование, глубинную фильтрацию, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию в смешанном режиме, хроматографию гидрофобного взаимодействия или гидроксиапатитную хроматографию.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает отбор проб во время процесса очистки, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса производства.

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок представлен в виде фармацевтически приемлемого препарата.

В одном варианте реализации изобретения, предлагается рекомбинантный белок, выработанный описанным выше способом.

В изобретение также предложена моноблочная фильтрационная система, состоящая из двух или более фильтровальных компонентов с полыми волокнами, с разными размерами пор или молекулярными массами отсека, при этом фильтровальные компоненты с полыми волокнами крепятся друг к другу последовательно таким образом, что поддерживается стерильный путь потока между отдельными полыми волокнами, и фильтровальные компоненты с полыми волокнами, с разными размерами пор или молекулярными массами отсека, изолированы друг от друга по отношению к сторонам их полых оболочек, из которых изымается пермеат таким образом, что пермеат может быть удален независимо из каждого соответствующего фильтровального компонента с полыми волокнами.

В одном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет размер пор или молекулярную массу отсека, которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет порово-размерный фильтр, который представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В родственном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет молекулярную массу отсека 300 кДа или меньше, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет молекулярную массу отсека по меньшей мере 500 кДа. В родственном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами представляет собой ультрафильтр, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами представляет собой микрофильтр. В родственном варианте реализации изобретения, моноблочная фильтрационная система находится внутри корпуса. В одном варианте реализации изобретения, одиночный фильтровальный блок дополнительно содержит прокладку между по меньшей мере, двумя фильтровальными компонентами с полыми волокнами.

В способе также предложен способ культивирования клеток, экспрессирующие рекомбинантный белок, включающий: запуск создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок, поддержание клеточной культуры путем перфузии свежей среды для культивирования клеток в биореактор, прохождение клеточной культуры через моноблочную фильтрационную систему и сбор пермеата, при этом моноблочная фильтрационная система прикреплена к биореактору, и клеточная культура вытягивается из биореактор в моноблочную фильтрационную систему с помощью единой насосной системы, при этом клеточная культура проходит через сторону люмена полых волокон моноблочной фильтрационной системы, и возвращается в биореактор, а пермеат изымается из одного или более фильтровальных компонентов с полыми волокнами.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает отбор проб во время процессов культивирования клеточной культуры, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса культивирования клеточной культуры. В родственном варианте процесса, образцы количественно и/или качественно кон-

тролируются с применением аналитических методов технологического процесса.

В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии представляет собой непрерывную перфузию. В одном варианте реализации изобретения, скорость перфузии постоянна. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется со скоростью менее или равной 1,0 рабочему объему в день.

В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется с помощью перистальтического насоса, насоса с двойной мембранной, насоса с низкой скоростью сдвига или переменного тангенциального потока. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется с помощью переменного тангенциального потока.

В одном варианте реализации изобретения, когда собирается пермеат из фильтра, который представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсекающие которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, свежая среда для культивирования клеток смешивается или дополняется для достижения концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера. В родственном варианте реализации изобретения, неионный блок-сополимер представляет собой полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимер. В родственном варианте реализации изобретения, неионный блок-сополимер представляет собой блок-сополимер 188.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает действие температурного сдвига на клеточную культуру, при этом клетки культивируют а) при первой температуре в течение первого периода времени; б) при второй температуре в течение второго периода времени. В одном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой производства. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит в течение фазы производства. В родственном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр, при этом достижение заданного параметра определяется с помощью емкостного зонда биомассы.

В одном варианте реализации изобретения, наращивание клеточной культуры начинается с инокуляции биореактора как минимум $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. В родственном варианте реализации изобретения, инокулят выращивают посредством процесса перфузии, используя переменный тангенциальный поток.

В одном варианте реализации изобретения, перед помещением в биореактор, среду для культивирования клеток обрабатывают, используя нанофильтрацию, краткосрочную температурную обработку (КТО), или ультрафиолет в комбинации с фильтрацией.

В одном варианте реализации изобретения, биореактор представляет собой промышленный биореактор. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем, по меньшей мере, 500 л. В родственном варианте реализации, биореактор имеет объем по меньшей мере от 500 до 2000 л. В родственном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л.

В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток с известными химическими компонентами. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой перфузионную среду для культивирования клеток.

В одном варианте реализации изобретения, клетки млекопитающего являются клетками яичника китайского хомячка (СНО).

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из: человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантно-слитого белка, или цитокина.

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок очищают из урожайного пермеата с помощью одного или нескольких способов, которые включают флокуляцию, осаждение, центрифугирование, глубинную фильтрацию, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию в смешанном режиме, хроматографию гидрофобного взаимодействия или гидроксиапатитную хроматографию.

В одном варианте реализации изобретения, указанный способ дополнительно включает отбор проб во время процесса очистки, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса производства.

В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок представлен в виде фармацевтически приемлемого препарата. В одном варианте реализации изобретения, предлагается рекомбинантный белок, выработанный описанным выше способом.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Схема моноблочной фильтрационной системы, которая имеет одно отверстие, через которое жидкость культуры клеток входит и выходит через единственное отверстие. Фильтры могут быть в любой ориентации, показано микрофильтрационное полое волокно за которым следует ультрафильтрационное полое волокно.

Фиг. 2. Титр при применении способа длительного периодического сбора, $n=2$ (незакрашенный

квадрат) по сравнению со способом ультрафильтрации, $n=4$ (закрашенный круг).

Фиг. 3. Плотность жизнеспособных клеток при применении способа длительного периодического сбора, $n=2$ (незакрашенный квадрат) по сравнению со способом ультрафильтрации, $n=4$ (закрашенный круг).

Фиг. 4. Процент жизнеспособности при применении способа длительного периодического сбора, $n=2$ (незакрашенный квадрат) по сравнению со способом ультрафильтрации, $n=4$ (закрашенный круг).

Фиг. 5. Процент жизнеспособности при применении реакторов оборудованных 750 кДа фильтром (незакрашенные круги), и при применении реакторов оборудованных 30 кДа фильтрами (закрашенные круги). Процент жизнеспособности уменьшается до 80% к шестому дню в реакторах, оборудованных 750 кДа фильтрами. Процент жизнеспособности в реакторах, оборудованных 30 кДа фильтрами, поддерживался на уровне $>80\%$ в течение 14 дней.

Фиг. 6. Концентрации Lutrol® F68, измеренные в супернатанте (закрашенный круг) и пермеате (незакрашенный квадрат) реакторов с 30 кДа или 750 кДа фильтровальными блоками с полыми волокнами. 30 кДа супернатант демонстрирует накопление Lutrol® F68 в период с 9 по 13 день.

Фиг. 7А. Нормированная плотность жизнеспособных клеток для клеточных линий А и Б при каждой концентрации Lutrol® F68 (2 г/л - 5 г/л) по сравнению с концентрацией 1 г/л, приведен коэффициент плотности клеток. Сравнения были выполнены, используя t -критерий Стьюдента, между данными во всех пассажах, по сравнению с концентрацией 1 г/л. Статистическая значимость: $^*\leq 0,0001$; $^{**}\leq 0,001$; $^{***}\leq 0,01$; $^{****}\leq 0,05$.

Фиг. 7Б. Процент жизнеспособности для клеточных линий А и Б при каждой концентрации Lutrol® F68 (2 г/л-5 г/л) по сравнению с концентрацией 1 г/л. Сравнения были выполнены, используя t -критерий Стьюдента, между данными во всех пассажах, по сравнению с концентрацией 1 г/л. Статистическая значимость: $^*\leq 0,0001$; $^{**}\leq 0,001$; $^{***}\leq 0,01$; $^{****}\leq 0,05$.

Фиг. 7В. Клеточный диаметр для клеточных линий А и Б при каждой концентрации Lutrol® F68 по сравнению с клеточным диаметром при концентрации 1 г/л Lutrol® F68. Сравнения были выполнены, используя t -критерий Стьюдента, между данными во всех пассажах, по сравнению с концентрацией 1 г/л. Статистическая значимость: $^*\leq 0,0001$; $^{**}\leq 0,001$; $^{***}\leq 0,01$; $^{****}\leq 0,05$.

Фиг. 8. Процент клеточной жизнеспособности для клеточных линий А и Б при концентрации 1 г/л Lutrol® F68 (незакрашенные квадраты) и 5 г/л Lutrol® F68 (закрашенные круги). Жизнеспособность поддерживалась на уровне $>90\%$ в течение >30 дней, когда концентрация Lutrol® F68 была увеличена до 5 г/л.

Фиг. 9. Эффект концентрации плуороника на жизнеспособность клеток, выращиваемых в 2 л реакторах с 750 кДа ATF фильтром с перфузионной средой, содержащей 1г/л Lutrol® F68 (закрашенный квадрат) или 5г/л Lutrol® F68 (незакрашенный круг).

Фиг. 10. Эффект увеличения концентрации Lutrol® F68 (до 5 г/л) на восстановление жизнеспособности клеток, выращиваемых при 1 г/л Lutrol® F68 в 2 л реакторах с 750 кДа ATF фильтром. Среда А: закрашенный круг. Среда Б: незакрашенный круг. Стрелка указывает, когда была увеличена концентрация Lutrol® F68.

Фиг. 11. ГХ-МС количественное определение глюкозы и маннозы. (А) Общая Ионная Хроматограмма (ОИХ) при разделении с помощью газовой хроматографии (ГХ) гексоз, и (Б) типичный шаблон масс-спектрометрической фрагментации, найденный в гексозных пиках, содержащих как 12С-гексозу, так и 13С-внутренний стандарт гексозы. (В) Анализ линейности для определения количества глюкозы и маннозы.

Фиг. 12. Эффект маннозы на гликозилирование IgG гликанами с множеством маннозы. (А) СНО клетки, культивируемые при возрастающей концентрации маннозы; (Б) СНО клетки, культивируемые при возрастающей концентрации маннозы, при разных концентрациях глюкозы. Линейное увеличение в гликозилировании гликанами с множеством маннозы не зависит от концентрации глюкозы.

Фиг. 13. Схема КАП петли обратной связи. Ключевые элементы КАП способа, которые нужны для обеспечения предопределенных атрибутов качества продукта, это: КПЦЛ (качество профиля целевого продукта), система АМП включая автоматический отбор проб и специфическую аналитику атрибутов, модель контроля для модификации процесса и процесс с известными уровнями контроля для подгонки уровней атрибутов.

Фиг. 14. Был использован один пробег реактора, чтобы рассчитать параметры модели с помощью метода наименьших квадратов. Символы представляют собой измерения, используемые, чтобы найти параметры модели с помощью метода наименьших квадратов. Пунктирные линии представляют собой конечные результаты моделирования. Пунктирные линии представляют собой подборки модели, используя параметры роста, которые были использованы для МПУ. Сплошные красные линии на фиг. А и Б демонстрируют маннозное кормление, использованное для создания этих тренировочных данных. А) % высокоманнозных гликанов; Б) концентрация маннозы реактора; В) плотность клеток (произвольно масштабированный рассчитанный объем); Г) концентрация продукта.

Фиг. 15. Демонстрация контроля % высокоманнозных гликанов с помощью Модели Прогнозирующего Управления. На всех фигурах символы представляют собой измеренные величины, но для Модели Прогнозирующего Управления были использованы только незакрашенные символы. Пунктирная линия - это результаты модели с учетом результатов измерений и предпринятых мер контроля. Сплошные крас-

ные линии на фиг. А и Б показывают маннозное кормление, установленное с помощью МПУ. А) % высокоманнозных гликанов; Б) концентрация маннозы реактора; В) произвольно масштабированный рассчитанный объем (МРО); Г) концентрация продукта.

Фиг. 16. Сравнение данных КАП и не-КАП. Данные по % высокоманнозных гликанов были получены с помощью ЖХГВ анализа.

Подробное описание сущности изобретения

В изобретение предложен способ, обеспечивающий длительный периодический сбора урожая, который предлагает преимущество поддержания постоянной клеточной культуры на пике производства, при одновременном получении высокого титра пермеата. В изобретении предложен способ длительного периодического сбора урожая, включающий создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок; поддержание клеточной культуры путем перфузии свежей среды для культивирования в биореактор; протекание культуры клеток через фильтр и сбор пермеата, при этом нулевой пермеат изначально собирается до момента достижения первого заданного параметра, по достижении которого урожайный пермеат собирается в течение предопределенного времени, после этого следует попеременный сбор нулевого пермеата до момента достижения второго заданного параметра, затем следует сбор урожайного пермеата в течение заданного времени, при этом чередование сбора нулевого пермеата и урожайного пермеата продолжается до тех пор, пока культура клеток не закончится.

Заданные параметры могут быть достигнуты путем достижения определенной желаемой характеристики, атрибута или рубежа производительности культуры клеток, таких как: плотность жизнеспособных клеток, объем клеточной массы, титра, или момента времени. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут тогда, когда плотность жизнеспособных клеток больше или равна 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут тогда, когда плотность жизнеспособных клеток составляет по меньшей мере от 20×10^6 до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут тогда, когда плотность жизнеспособных клеток менее или равна 35%. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут тогда, когда плотность жизнеспособных клеток менее или равна 30%.

Заданный параметр может быть основан на моменте времени. Момент времени может быть измерен в часах, днях, неделях или месяцах после иницирующего события или действия. Иницирующим событием или действием могут быть часы или дни в культуре, часы или дни после такого события, как достижение определенной плотности жизнеспособных клеток, объема клеточной массы, титра, момента инокуляции биореактора, или сбора урожайного пермеата. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут в течение от 12 ч до 25 дней после иницирующего события или действия. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут в течение от 24 ч до 72 ч после иницирующего события или действия. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут в течение 4 дней после иницирующего события или действия. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут 5 дней или больше, после иницирующего события или действия. В одном варианте реализации изобретения, заданный параметр может быть достигнут, по меньшей мере, 25 дней после иницирующего события или действия. В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр может быть достигнут в течение от 5 до 25 дней после инокуляции биореактора. В одном варианте реализации изобретения, первый заданный параметр может быть достигнут в течение от 10 до 12 дней после инокуляции биореактора. В одном варианте реализации изобретения, второй заданный параметр может быть достигнут в течение от 12 до 72 ч после сбора урожайного пермеата. В одном варианте реализации изобретения, второй заданный параметр может быть достигнут в течение от 24 до 72 ч после сбора урожайного пермеата. В одном варианте реализации изобретения, второй заданный параметр может быть достигнут в течение от 24 до 48 ч после сбора урожайного пермеата.

После того, как заданный параметр был достигнут, урожайный пермеат может быть собран в течение предопределенного промежутка времени. В одном варианте реализации изобретения, предопределенное время составляет по меньшей мере от 12 до 72 ч. В одном варианте реализации изобретения, предопределенное время составляет промежуток времени от 24 до 72 ч. В одном варианте реализации изобретения, предопределенное время составляет промежуток времени от 24 до 48 ч.

В одном варианте реализации изобретения, фильтр представляет собой моноблочную фильтрационную систему. В родственном варианте реализации, моноблочная фильтрационная система содержит, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения (ММО) которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В другом варианте реализации, молекулярная масса отсечения, по меньшей мере, одного фильтровального компонента с полыми волокнами, которые позволяют удерживать рекомбинантный

белок в биореакторе, составляет 300 кДа или меньше. В другом варианте реализации, молекулярная масса отсечения, по меньшей мере, одного фильтровального компонента с полыми волокнами, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет, по меньшей мере, 500 кДа. В другом варианте реализации, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой ультрафильтр, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой микрофильтр. В другом варианте реализации изобретения, моноблочная фильтрационная система находится внутри корпуса. В другом варианте реализации, моноблочная фильтрационная система дополнительно содержит прокладку между, по меньшей мере, двумя фильтровальными компонентами с полыми волокнами.

В одном варианте реализации изобретения, когда нулевой пермеат собирают, используя моноблочную фильтрационную систему, он извлекается, по меньшей мере, с одного фильтровального компонента с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В одном варианте реализации изобретения, когда дрожайный пермеат собирают используя моноблочную фильтрационную систему, он извлекается, по меньшей мере, с одного фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В одном варианте реализации изобретения, пермеат собирается из фильтра, который представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, свежую среду для культивирования клеток смешивают или дополняют для достижения концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера. В родственном варианте реализации изобретения, неионный блок-сополимер представляет собой полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимер. В другом родственном варианте реализации изобретения, неионный блок-сополимер представляет собой полоксамер 188.

В изобретение также предложен способ сбора рекомбинантного белка, включающий: создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок; поддержание клеточной культуры путем перфузии клеток культуры свежей средой для культивирования клеток, которая смешана или дополнена для достижения концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера; прохождение клеточной культуры через фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе; сбор пермеата, содержащего рекомбинантный белок. В одном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсечения составляет не менее 500 кДа. В одном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами представляет собой микрофильтр.

В изобретение также предложен способ сбора рекомбинантного белка, включающий: создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок; поддержание клеточной культуры путем перфузии клеток культуры свежей средой для культивирования клеток, которая смешана или дополнена для достижения концентрации не менее 1 г/л неионного блок-сополимера; прохождение клеточной культуры через фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения, которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе; сбор пермеата; при достижении заданного параметра запуск перфузии клеток культуры свежей средой для культивирования клеток, которая смешана или дополнена для достижения концентрации не менее 5 г/л неионного блок-сополимера; прохождение клеточной культуры через фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе; сбор пермеата, содержащего рекомбинантный белок. В одном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсечения фильтра с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет 300 кДа или меньше. В родственном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой ультрафильтр. В одном варианте реализации изобретения, молекулярная масса отсечения фильтра с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, составляет, по меньшей мере, 500 кДа. В родственном варианте реализации, фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, представляет собой микрофильтр. В одном варианте реализации изобретения, фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, и фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, являются компонентами моноблочной фильтрационной системы. В родственном варианте реализации изобретения, неионный блок-сополимер представляет собой полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимер. В другом родственном варианте реализации, неионный блок-сополимер представляет собой полоксамер 188.

В изобретение также предложена моноблочная фильтрационная система, состоящая из двух или бо-

лее фильтровальных компонентов с полыми волокнами, с разными размерами пор или молекулярными массами отсека, при этом фильтровальные компоненты с полыми волокнами крепятся друг к другу последовательно таким образом, что поддерживается стерильный путь потока между отдельными полыми волокнами, и фильтровальные компоненты с полыми волокнами, с разными размерами пор или молекулярными массами отсека, изолированы друг от друга по отношению к сторонам их полых оболочек, из которых изымается пермеат, так, что пермеат может быть удален независимо из каждого соответствующего фильтровального компонента с полыми волокнами. В одном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет размер пор или молекулярную массу отсека, которые позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет порово-размерный фильтр, который представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе. В одном варианте реализации, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет молекулярную массу отсека 300 кДа или меньше, и, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами имеет молекулярную массу отсека, по меньшей мере, 500 кДа. В одном варианте реализации, по меньшей мере, один фильтровальный компонент с полыми волокнами представляет собой ультрафильтр, и по меньшей мере один фильтровальный компонент с полыми волокнами представляет собой микрофильтр. В одном варианте реализации изобретения, моноблочная фильтрационная система находится внутри корпуса. В одном варианте реализации, моноблочная фильтрационная система дополнительно содержит прокладку между, по меньшей мере, двумя фильтровальными компонентами с полыми волокнами.

В родственном варианте реализации изобретения, в изобретении предложен способ культивирования клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок, включающий: создание клеточной культуры инокулированием биореактора клетками млекопитающего, которые экспрессируют рекомбинантный белок, поддержание клеточной культуры путем перфузии свежей среды для культивирования в биореактор, прохождение клеточной культуры через моноблочную фильтрационную систему и сбор пермеата, при этом моноблочная фильтрационная система прикреплена к биореактору, и клеточная культура извлекается из биореактора в моноблочную фильтрационную систему с помощью единой насосной системы, при этом клеточная культура проходит через сторону люмена полых волокон моноблочной фильтрационной системы, и возвращается в биореактор, и пермеат изымается из одного или более фильтровальных компонентов с полыми волокнами.

В родственном варианте реализации изобретения, способы по изобретению дополнительно включают отбор проб во время процессов культивирования клеточной культуры, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса культивирования клеточной культуры. В родственном варианте реализации, образцы количественно и/или качественно контролируются с применением аналитических методов технологического процесса.

В родственном варианте реализации способов по изобретению, процесс перфузии представляет собой непрерывную перфузию. В одном варианте реализации изобретения, скорость перфузии постоянна. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется со скоростью менее или равной 1,0 рабочему объему в день. В одном варианте реализации изобретения, процесс перфузии выполняется с помощью перистальтического насоса, насоса с двойной мембранной, насоса с низкой скоростью сдвига или переменного тангенциального потока. В одном варианте реализации, процесс перфузии выполняется с помощью переменного тангенциального потока.

В родственном варианте реализации изобретения, способы по изобретению дополнительно включают действие температурного сдвига на клеточную культуру, при этом клетки культивируют: а) при первой температуре в течение первого периода времени; б) при второй температуре в течение второго периода времени. В одном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит при переходе между фазой роста и фазой производства. В одном варианте реализации изобретения, температурный сдвиг происходит в течение фазы производства. В одном варианте реализации, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр, при этом достижение заданного параметра определяется с помощью емкостного зонда биомассы. В одном варианте реализации, температурный сдвиг представляет собой ответ на заданный параметр, при этом достижение заданного параметра определяется с помощью емкостного зонда биомассы.

В родственном варианте реализации способов по изобретению, наращивание клеточной культуры начинается с инокуляции биореактора как минимум $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте реализации изобретения, инокулят выращивают посредством процесса перфузии, применяя переменный тангенциальный поток. В одном варианте реализации изобретения, перед помещением в биореактор, среду для культивирования клеток обрабатывают, применяя нанофильтрацию, краткосрочную температурную обработку (КТО), или ультрафиолет в комбинации с фильтрацией.

В родственном варианте реализации способов по изобретению, биореактор представляет собой промышленный биореактор. В одном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем, по меньшей мере, 500 л. В одном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем меньше

мере от 500 до 2000 л. В одном варианте реализации изобретения, биореактор имеет объем по меньшей мере от 1000 до 2000 л.

В родственном варианте реализации способов по изобретению, среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду для культивирования клеток с известными химическими компонентами. В одном варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой перфузионную среду для культивирования клеток. В одном варианте реализации изобретения, клетки млекопитающего являются клетками яичника китайского хомячка (СНО). В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок выбран из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантно-слитого белка, или цитокина.

В родственном варианте реализации способов по изобретению, рекомбинантный белок очищают из урожайного пермеата с помощью одного или нескольких способов, которые включают: флокуляцию, осаждение, центрифугирование, глубинную фильтрацию, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию в смешанном режиме, хроматографию гидрофобного взаимодействия или гидроксиапатитную хроматографию. В одном варианте реализации изобретения, способы по изобретению дополнительно включают отбор проб во время процесса очистки, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и процесса очистки. В одном варианте реализации, образцы количественно и/или качественно контролируются с применением аналитических методов технологического процесса. В одном варианте реализации изобретения, рекомбинантный белок представлен в виде фармацевтически приемлемого препарата.

В изобретение также предложен рекомбинантный белок, выработанный описанным выше способом.

Культивирование клеток

Под терминами "культивирование клеток" или "культивирование" подразумевается рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия для культуры клеток млекопитающих известны в данной области техники. См., например, *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих могут культивироваться в суспензии, или в то время как они прикреплены к твердой подложке.

Как используется здесь, термин "среда для культивирования клеток" (также называемая "культуральная среда", "среда для культивирования клеток", "тканевая культуральная среда") относится к любому питательному раствору, который используется для выращивания клеток, например, клеток животных или млекопитающих, и который обычно предоставляет, по меньшей мере, один или несколько компонентов из следующих: источник энергии (обычно в виде углеводов, таких как глюкоза); одну или более из всех незаменимых аминокислот, и в целом, как правило, двадцать основных аминокислот и цистеин; витамины и/или другие органические соединения, которые, как правило, требуются в низких концентрациях; липиды или свободные жирные кислоты; микроэлементы, например, неорганические соединения или природные элементы, которые типично требуются в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне.

Питательный раствор может по выбору быть дополнен дополнительными компонентами для оптимизации роста клеток, такими как гормоны и другие факторы роста, такие как инсулин, трансферрин, эпидермальный фактор роста, сыворотка и тому подобное; солями, такими как кальциевые, магниевые и фосфатные, и буферами, например, HEPES; нуклеозидами и основаниями, такими как аденозин, тимидин, гипоксантин; и гидролизатами белков и тканей, такими как гидролизованный растительный или животный белок (пептон или пептоновые смеси, которые могут быть получены из животных побочных продуктов, очищенный желатин или растительный материал); антибиотиками, такими как гентамицин; полиаминами, такими как путресцин, спермидин и спермин (см. WIPO публикацию патента № WO 2008/154014), и пируват (см. патент США № 8053238), анти-апоптотические соединения, например, MDL 28170, циперметрин, циклоспорин А, BBMP, кислота по Bongkrekić, S-15176 дифумерат, циклический пифитрин-а, пифитрин-мю, BI-6C9, NSCI, NS3694 или Necrostatin-1 (см. WIPO публикацию патента № WO 2014/022102) в зависимости от потребностей клеток относительно условий культивирования, и/или параметров культивирования клеток.

Неионогенные поверхностно-активные вещества также могут быть добавлены к среде для культивирования клеток. Примеры неионных ПАВ включают, но не ограничиваются: поливинилловым спиртом, полиэтиленгликолем, и неионными блок-сополимерными поверхностно-активными веществами. Кроме того, включены: алкил-поли(этилен оксид), сополимеры поли(этилен оксида) и поли(пропилен оксида) (ЕО-РО блок-сополимеры), поли(винилпирролидон), алкильные полигликозиды (например, моностеарат сахарозы, лаурил дигликозид, или сорбитан монолауреат, октил глюкозид и децил мальтозид), жирные спирты (цетиловый спирт или олеиловый спирт), или кокаמידы (кокаמיד MEA, кокаמיד ДЭА, кокаמיד ТЭА).

Кроме того, включены: блок-сополимеры на основе окиси этилена и окиси пропилена, также называемые полиоксипропилен-блок-сополимеры полиоксиэтилена. Эти молекулы представляют собой неионогенные трехблочные сополимеры, имеющие центральную гидрофобную цепь полиоксипропилена (поли(пропилен оксид)) фланкированную двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилена (поли(этиленоксида)). Особый интерес представляют те, которые имеют 70 единиц полиоксипропилена и

30 единиц каждой из цепей полиоксиэтилена. В предпочтительном варианте реализации изобретения, блок-сополимер является полоксамером 188 (CAS №90003-11-6 со средней молекулярной массой 8,4 кД, BASF Chemical, Вашингтон, Нью-Джерси), который продается под различными торговыми марками, такие как Pluronic® F68 ne, Kolliphor® P-188, Lutrol® F68, и Lutrol® 188.

Эти полиоксипропилен-полиоксиэтилена блок-сополимеры используются для защиты клеток от пухля-индуцированной гибели из-за барботирования и вспенивания в реакторе. Как описано в настоящем документе, уровня полоксамера 188, который обычно используется в среде для культивирования клеток (1 г/л), может не быть достаточно для защиты клеток от высоких сил сдвига в перфузионной системе переменного тангенциального потока (ПТП), в то время когда культура клеток подвергается микро-фильтрации. Как описано выше, добавление полиоксипропилен-блок-сополимер полиоксиэтилена, такого как полоксамер 188, в более высоких концентрациях, например, 5 г/л, положительно влияет на жизнеспособность клеток, что позволяет продлить время культивирования в условиях ПТП перфузии.

К средам для культивирования клеток относятся также те, что типично применяются в и/или известные для применения с любыми(ых) процессам(ах) культивирования клеточных культур, и к этим относятся такие как (но не ограничены лишь этими): культивирование с загрузкой, продленное культивирование с загрузкой, культивирование с подпиткой и/или перфузия клеточной среды или непрерывное культивирование клеток.

"Базовая" (или бегч) среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется для запуска культивирования культуры клеток, и является достаточно полной для поддержания клеточной культуры.

"Ростовая" среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в клеточных культурах в период экспоненциального роста, "фазы роста", и является достаточно полной для поддержания клеточной культуры во время этой фазы. Ростовая среда для культивирования клеток может также содержать вещества для отбора, которые обеспечивают устойчивость и выживание при применении селекционных маркеров, которые встроены в клеточную линию. Такие вещества для отбора включают, но не ограничиваются: генетицином (G418), неомицином, гигромицином Б, пурамицином, зеоцином, метионин сульфоксимином, метотрексатом, глутамин-свободной средой для культивирования клеток, средой для культивирования клеток без глицина, гипоксантина и тимидина, или только тимидина.

"Производственная" среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в культурах клеток в течение переходного периода, когда экспоненциальный рост заканчивается, и в течение последующего перехода и/или фазы производства, когда начинает преобладать производство белка. Такая среда для культивирования клеток является достаточно полной, для поддержания желаемой плотности клеток, жизнеспособности и/или титра продукта во время этой фазы.

"Перфузионная" среда для культивирования клеток или питательная среда относится к среде для культивирования клеток, которая обычно используется в клеточных культурах, и которая поддерживается перфузией или способами непрерывного культивирования, и является достаточно полной для поддержания клеточной культуры во время этого процесса. Составы перфузионной клеточной среды для культивирования могут быть богаче или более концентрированными, чем составы базовой клеточной среды для культивирования для того, чтобы согласовать со способом, который используется для удаления истощенной среды. Перфузионная среда для культивирования клеток может быть использована в течение и фазы роста, и фазы производства.

Компоненты клеточной среды для культивирования могут быть полностью измельчены в порошковую смесь среды; частично измельчены с жидкими добавками, добавленные в среду для культивирования клеток при необходимости; или добавлены полностью в жидкой форме в клеточную культуру.

Клеточные культуры могут быть дополнены концентрированной подпитывающей средой, которая содержит компоненты, такие как: питательные вещества и аминокислоты, которые потребляются в ходе фазы производства клеточной культуры. Концентрированная среда для культивирования клеток может содержать некоторые или все питательные вещества, необходимые для поддержания культуры клеток; в частности, концентрированная среда может содержать питательные вещества, которые определены как или известны как те, что потребляются в ходе производственной фазы клеточной культуры. Концентрированные среды могут быть основаны на любом составе клеточной среды для культивирования. Концентрированная питательная среда может содержать некоторые или все компоненты клеточной среды для культивирования, например, примерно 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 12x, 14x, 16x, 20x, 30x, 50x, 100x, 200x, 400x, 600x, 800x, или даже примерно 1000x их нормального количества.

Клеточные культуры также может быть дополнены независимыми концентрированными кормами определенных питательных веществ, смешать которые может быть трудно, или которые быстро истощаются в клеточных культурах. Такие питательные вещества могут быть аминокислотами, такими как тирозин, цистеин и/или цистин (см., например, WIPO публикацию патента № 2012/145682). В одном варианте реализации изобретения, концентрированный раствор тирозина независимо поступает в клеточную культуру, которая выращивается в среде для культивирования клеток, содержащей тирозин, при этом

концентрация тирозина в клеточной культуре не превышает 8 мМ. В другом варианте реализации изобретения, концентрированный раствор тирозина и цистеина независимо поступает в клеточную культуру, которая выращивается в среде для культивирования клеток без тирозина, цистеина или цистина. Независимое кормление может начинаться до или в начале фазы производства. Независимые корма могут быть добавлены к среде для культивирования клеток с помощью культивирования с подпиткой, в те же или разные дни, что и концентрированная питательная среда. Независимые корма также могут быть добавлены с помощью перфузии в те же или разные дни, что и перфузионная среда. Такие независимые корма могут быть добавлены к среде для культивирования клеток после одного или более дней, и также могут быть добавлены повторно в течение фазы производства, до тех пор, пока возможно избежать истощения тирозина, цистеина и цистина.

Для непрерывного кормления культуры клеток млекопитающего могут быть использованы способы, такие как те, которые не используют управление с обратной связью (см. WIPO публикацию патента № WO 2013/040444).

Среда для культивирования клеток, в некоторых вариантах реализации изобретения, является бесывороточной и/или свободной от продуктов или ингредиентов животного происхождения. Среда для культивирования клеток, в некоторых вариантах реализации изобретения, имеет определенный химический состав, в которой все химические компоненты известны.

Клетки животных или млекопитающих культивируют в среде, подходящей для конкретных клеток, которые культивируют, и которая может быть определена специалистом в данной области техники без излишнего экспериментирования. Имеющиеся в продаже среды могут быть использованы и включают (но не ограничиваются): модификация Искова среды Дульбекко (МИСД), RPMI 1640, Минимальная Необходимая Среда-альфа (МНС-альфа), модификация Дульбекко среды Игла (МДСИ), МДСИ/ F12, альфа-МНС, базальная среда Игла с ССР Эрла, МДСИ с высоким содержанием глюкозы, с глутамином, МДСИ с высоким уровнем глюкозы, без глутамин, МДСИ с низким уровнем глюкозы, без глутамин, МДСИ: F12 1:1, с глутамином, ГМНС (МНС Глазго), ГМНС с глутамином, полная среда для клеток насекомых Грейса, среда Грейса для клеток насекомых, без ФБС, F-10 Хэма, с глутамином, F-12 Хэма, с глутамином, МИСД с NEPER и глутамином, МИСД с NEPER и без глутамин, IP41 среда для клеток насекомых, 15 (Лейбовиц) (2x), без глутамин или фенолового красного, 15 (Лейбовиц), без глутамин, модифицированная среды Маккоя 5А, среда 199, МНС Игла, без глутамин или фенолового красного (2x), МНС Игла-Эрла ССР, с глутамином, ССР МНС Игла-Эрла, без глутамин, МНС Игла-Хэнкса ССР, без глутамин, NCTC-109 с глутамином, среда для культивирования клеток Рихтера с глутамином, RPMI 1640 с NEPER, глутамином и/или пенициллином-стрептомицином, RPMI 1640, с глутамином, RPMI 1640, без глутамин, среда Шнейдера для клеток насекомых или любая другая среда, известная специалисту в данной области техники, которая разработаны для конкретных типов клеток. К вышеперечисленным типичным средам могут быть добавлены дополнительные компоненты или ингредиенты, включая необязательные компоненты, в соответствующих концентрациях или количествах, как это необходимо или желательно, и как это известно, и практикуется теми, кто имеет и использует стандартные навыки в данной области техники.

Обработка сред

Среда для культивирования клеток может быть обработана, применяя способы и устройства для стерилизации или дезинфекции среды перед добавлением в биореактор и/или клеточную культуру. В одном варианте реализации изобретения, среду для культивирования клеток обрабатывают с помощью высокой температуры непродолжительное время (КТО) (см., например, патент США № 7420183). В другом варианте реализации изобретения, среду для культивирования клеток обрабатывают с помощью ультрафиолета в комбинации с фильтрацией (см., например, WIPO публикации патентов WO 2008/157247; WO 2012/115874; WO 2013/063298 и WO 2013/138159). В другом варианте реализации изобретения, среду для культивирования клеток подвергают нанофильтрации (см., например, Liu et al., (2000) *Biotechnol. Prog.* 16:425-434). В другом варианте реализации изобретения, среда для культивирования клеток обрабатывается химическими веществами, которые инактивируют вирусы, такими как: сольвенты, детергенты, псорален, или бета-пропиолактон.

Клетки

Клеточные линии (также называемые "клетки" или "клетки-хозяева"), используемые в изобретении, являются генетически модифицированными, для того чтобы производить полипептиды коммерческого или научного интереса. Клеточные линии, как правило, получают из линии, вытекающей из первичной культуры, которая может поддерживаться в культуре в течение неограниченного времени. Клетки могут содержать встроенные, например, с помощью трансформации, трансфекции, инфекции, или инъекции, экспрессирующие векторы (конструкции), такие как плазмиды и тому подобное, которые содержат кодирующие последовательности, или их части, которые кодируют белки для экспрессии и производства в процессе культивирования. Такие векторы экспрессии содержат необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности. Способы, которые хорошо известны, и практикуются специалистами в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие производимые белки и полипепти-

ды, а также соответствующие транскрипционные и трансляционные управляющие элементы. Эти способы включают *in vitro* методы рекомбинантной ДНК, синтетические методы, и *in vivo* генетическую рекомбинацию. Такие методы описаны в J. Sambrook et al., 2012, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4th edition Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. или любом из предыдущих изданий; F. M. Ausubel et al., 2013, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. или любом из предыдущих изданий; Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, которые включены в настоящий документ для любых целей.

Клетки животных, клетки млекопитающих, культивируемые клетки, клетки-хозяева животных или млекопитающих, клетки-хозяева, рекомбинантные клетки, рекомбинантные клетки-хозяева, и подобное, все являются выражениями обозначающие клетки, которые можно культивировать в соответствии со способом данного изобретения. Такие клетки обычно являются клеточными линиями, которые получены или изъятые из млекопитающих, и способны расти и выживать при размещении или в форме однослойной культуры, или в форме суспензионной культуры в среде, содержащей подходящие питательные вещества и/или другие факторы, такие как те, что описаны в настоящем документе. Обычно выбирают те клетки, что могут экспрессировать и секретировать белки, или, что могут быть молекулярно спроектированы для того чтобы экспрессировать и секретировать большие количества особого белка, в частности, гликопротеин интереса, в среду для культивирования. Следует понимать, что белок выработанный клеткой-хозяином может быть эндогенным или гомологичным белком клетки-хозяина. Альтернативно, белок является гетерологическим, то есть, чужеродным для клетки-хозяина, например, человеческий белок, вырабатываемый и секретируемый клетками-хозяевами яичника китайского хомячка (CHO). Кроме того, белки млекопитающего, т.е. те, которые изначально получены из организма млекопитающего, успешно нарабатываются с помощью способов настоящего изобретения и могут быть секретированы клетками в среду для культивирования.

Композиции настоящего изобретения могут быть использованы для культивирования различных клеток. В одном варианте реализации изобретения, культивируемые клетки являются эукариотическими клетками, такими как клетки растения и/или животного. Клетки могут быть клетками млекопитающих, клетками рыб, клетками насекомых, клетками амфибий или клетками птиц. Широкий выбор клеточных линий млекопитающих, подходящих для выращивания в культуре, доступен в Американской коллекции типов культур (Манассас, штат Вирджиния) и других хранилищах, а также коммерческих поставщиков. Клетки, которые могут быть использованы в процессах изобретения, включают, но не ограничиваются: линией клеток МК2.7, линией клеток PER-C6, линиями клеток яичника китайского хомячка (CHO), такими как CHO-K1 (ATCC CCL-61), DG44 (Chasin et al., 1986, *Som. Cell Molec. Genet.*, 12:555-556; Kollekar et al., 1997, *Biochemistry*, 36:10901-10909; и WO 01/92337 A2), дигидрофолат-редуктазо-негативной линией клеток CHO (CHO/-DHFR, Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216), и линией клеток dp12.CHO (патент США № 5721121); линией клеток почки обезьяны (CV1, ATCC CCL-70); линией клеток почки обезьяны CV1, которые трансформированные SV40 (COS линия клеток, COS-7, ATCC CRL-1651); HEK 293 линией клеток, и Sp2/0 линией клеток, 5L8 линией клеток гибридомы, линией клеток Дауди, EL4 линией клеток, HeLa линией клеток, HL-60 линией клеток, K562 линией клеток, Jurkat линией клеток, THP-1 линией клеток, Sp2/0 линией клеток, линией первичных эпителиальных клеток (например, кератиноцитов, эпителиальных клеток шейки матки, бронхиальных эпителиальных клеток, эпителиальных клеток трахеи, эпителиальных клеток почек и сетчатки, ретинальных эпителиальных клеток) и созданными клеточными линиями и их штаммами (например, линия человеческих эмбриональных почечных клеток (например, 293 линия клеток, или линия клеток 293, которые субклонированы для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59); линией клеток почки детеныша хомячка (ВНК, ATCC CCL-10); линией клеток сертоли мыши (TM4, Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251); линией человеческих клеток карциномы шейки матки (HELA, ATCC CCL-2); линией клеток почек собак (MDCK, ATCC CCL-34); линией клеток легкого человека (W138, ATCC CCL-75); линией человеческих клеток гепатомы печени (HEP-G2, HB 8065); линией мышинных клеток опухоли молочной железы (MMT 060562, ATCC CCL-51); линией печеночных клеток крысы Буффало (BRL 3A, ATCC CRL-1442); линией клеток TRI (Mather, 1982, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68); линией клеток MCR 5; линией клеток FS4; линией клеток сетчатки PER-C6, линией клеток MDBK (NBL-1), линией клеток 911, линией клеток CRFK, линией клеток MDCK, линией клеток BeWo, линией клеток Chang, линией клеток Detroit 562, линией клеток HeLa 229, линией клеток HeLa S3, линией клеток Hep-2, линией клеток KB, линией клеток LS 180, линией клеток LS 174T, линией клеток NCI-H-548, линией клеток RPMI 2650, линией клеток SW-13, линией клеток T24, WI-28 VA13, линией клеток 2RA, линией клеток WISH, линией клеток BS-C-1, линией клеток LLC-MK₂, линией клеток Clone M-3, линией клеток I-10, линией клеток RAG, линией клеток TCMK-1, линией клеток Y-1, линией клеток LLC-PK1, линией клеток PK(15), линией клеток GH₁, линией клеток GH₃, линией клеток L2, линией клеток LLC-RC 256, линией клеток MH₁C₁, линией клеток XC, линией клеток MDOK, линией клеток VSW, и TH-I, линией клеток B1, или их производные), линией клеток фибробластов из любой ткани или органа (включая но не ограничиваясь сердцем, печенью, почками, толстой кишкой, кишечником, пищеводом, желудком, нервной тканью (головного мозга, спинного мозга), легкими, сосудистой тканью (артерии, вены, капилляры), лимфоидной тканью

(лимфатические железы, аденоиды, миндалины, костный мозг и кровь), селезенкой, и фибробластными и фибробласт-схожими линиями клеток (например, линией клеток TRG-2, линией клеток IMR-33, линией клеток Don, линией клеток GHK-21, линия клеток с цытрулинимией, линией клеток Dempsey, линией клеток Detroit 551, линией клеток Detroit 510, линией клеток Detroit 525, линией клеток Detroit 529, линией клеток Detroit 532, линией клеток Detroit 539, линией клеток Detroit 548, линией клеток Detroit 573, линией клеток HEL 299, линией клеток IMR-90, линией клеток MRC-5, линией клеток WI-38, линией клеток WI-26, линией клеток MiCl₁, линией клеток CV-1, линией клеток COS-1, линией клеток COS-3, линией клеток COS-7, линиями клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); линией клеток DBS-FrhL-2, линией клеток BALB/3T3, линией клеток F9, линией клеток SV-T2, линией клеток M-MSV-BALB/3T3, линией клеток K-BALB, линией клеток BLO-11, линией клеток NOR-10, линией клеток C₃H/10T1/2, линией клеток HSDM₁C₃, линией клеток KLN205, линией клеток McCoу, линией клеток Mouse L, штаммом 2071 (Mouse L), L-M штаммом (Mouse L), линией клеток L-MTK (Mouse L), NCTC клонами 2472 и 2555, линией клеток SCC-PSA1, линией клеток Swiss/3T3, линией клеток индийского мунтжака, линией клеток SIRC, линией клеток C₁₂, и линией клеток Jensen, или их производные или любыми другими типами клеток, известные специалисту в данной области.

Клетки могут быть пригодны для дружных, однослойных и/или суспензионных культур, трансфекции и экспрессии белков, например, антител. Клетки можно использовать, например, с такими способами культивирования как культивирование с загрузкой, культивирование с подпиткой перфузионное или непрерывное культивирование.

Типы культивирования клеток

Для целей понимания, но, не ограничиваясь этим, это будет понятно специалисту в данной области, что клеточное культивирование и пробег культивирования, выполняемые для производства белка, могут включать: культивирование с загрузкой, культивирование с подпиткой перфузионное или непрерывное культивирование, или их комбинации. В бетч культивировании, клетки изначально культивируются в среде, и эта среда не удаляется, не заменяется или дополняется, т.е. клетки не "кормят" свежей средой, во время или до окончания пробега культивирования. Всю клеточную культуру собирают в конце пробега культивирования.

Для культивирований с подпиткой время пробега культивирования увеличивается путем периодического или непрерывного добавления к среде для культивирования, свежей среды, в течение пробега, т.е. клетки "кормят" свежей средой ("кормовая среда") в течение пробега культивирования. Культивирование с подпиткой может включать различные режимы кормления и время, как описано выше, например, ежедневно, через день, каждые два дня и т. д., более чем один раз в день, или реже, чем раз в день, и так далее. Далее, культуры с подпиткой можно непрерывно кормить кормовой средой. Желаемый продукт собирают в конце пробега культивирования.

Перфузионное культивирование, которое иногда называют непрерывным культивированием, представляет собой культивирование, при котором клеточная культура получает добавление свежей среды ("перфузионная среда"), а истощенная среда удаляется из биореактора. Перфузия может быть непрерывной, поэтапной, прерывистой, или сочетанием любых или всех этих. Скорость перфузии может быть меньше, чем рабочий объем для многих рабочих объемов в сутки. Термин "скорость потока перфузии" - это количество среды, которая проходит через (добавляется и удаляется) биореактор, обычно выражена как какая-то часть или множество рабочих объемов в данный момент времени. "Рабочий объем" относится к части объема биореактора, используемого для клеточной культуры. В одном варианте реализации изобретения, скорость потока перфузии равна одному рабочему объему или меньше, в день. Перфузионная кормовая среда может быть составлена таким образом, чтобы увеличить перфузионную концентрацию питательных веществ, для уменьшения скорости перфузии.

Предпочтительно, чтобы клетки удерживались в культуре и истощенная среда, которая удаляется, практически не содержала клеток, или имела значительно меньше клеток, чем культура клеток. Рекомбинантный белок, который экспрессируется клеточной культурой, может быть удержан или удален из клеточной культуры, в зависимости от используемой системы удержания. Иногда это предпочтительно для клеток-хозяев и экспрессируемых рекомбинантных белков оставаться в ретантате в биореакторе, а для пермеата быть в основном свободным или иметь значительно меньше любого из них ("нуль пермеат"). В других случаях, может быть предпочтительным удерживать клетки, но позволять экспрессируемым белкам проходить в пермеат ("урожайный пермеат").

Перфузия может быть достигнута с помощью ряда средств, в том числе центрифугирования, седиментации или фильтрации, смотреть, например, Voisard et al., (2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. В одном варианте реализации изобретения, используется способ фильтрации. Фильтры включают мембранные фильтры, керамические фильтры и металлические фильтры, и могут быть любой формы, в том числе спирально-витые или трубчатые, или в виде листа. Один или более фильтров могут быть: подключены к биореактору через соединение по жидкой среде, быть вместе или по отдельности, последовательно или параллельно.

Фильтры с полыми волокнами используются в перфузионном культивировании клеток млекопитающего для удержания клеток и/или рекомбинантного белка. Когда культуру клеток, включая клеточ-

ную культуру, клетки (целые и разрушенные), растворимые экспрессированные рекомбинантные белки, белки клетки-хозяина, отходы и тому подобное, вводят в фильтр, в зависимости от размера пор или молекулярной массы отсечения (ММО), материал полого волокна может удерживать компоненты культуры клеток на стороне просвета (внутри) и разрешать определенным компонентам проходить через фильтр (пермеат), основываясь на размере пор или молекулярной массе отсечения материала полого волокна. Материал, который удерживается (ретантат), возвращается в биореактор. Свежая перфузионная среда для культивирования клеток добавляется в биореактор, и пермеат извлекают из фильтра через определенные промежутки времени или непрерывно, для поддержания желаемого или постоянного объема биореактора. Пермеат может быть удален, сохранен в резервуарах, баллонах, или перегружен, или перенесен прямо к другому блоку операций, такому как фильтрация, центрифугирование и/или другим последующим способам очистки или тому подобным. Полые волокна для микрофильтрации, как правило, имеют размер пор в диапазоне от 0,1 мкм до 5-10 мкм или молекулярную массу отсечения равную 500 кДа или более, и могут применяться, чтобы позволить белку проходить через них в пермеат. Ультрафильтрационные полые волокна обычно имеют диапазон размера пор от 0,01 мкм до 0,1 мкм или молекулярную массу отсечения равную 300 кДа или менее, и могут быть использованы для удержания желаемого белка в ретантате, и его возвращения в биореактор. Это может быть использовано, например, чтобы сконцентрировать рекомбинантный белковый продукт для сбора. Такие фильтры имеются в продаже, например, такие как: UFP-750-E-4MA, Xamplер UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Питсбург, Пенсильвания) и Midikros TC Modules T02-E030-10, T02-050-10, T02-E750-05, T02-M10U-06 (Spectrum Laboratories, Inc, Домингес, Калифорния).

В изобретение предложено, что при сборе нулевого пермеата, фильтр представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения, которые не позволяют рекомбинантному белковому продукту пройти в пермеат, а вместо этого удерживают его в биореакторе. В изобретение также предложено, что когда урожайный пермеат собирается, фильтр представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсечения, которые позволяют рекомбинантному белку проходить через полое волокно.

Клеточная культура вытягивается из биореактора в фильтр с помощью насосной системы, которая пропускает клеточную культуру через люменную сторону полого волокна. Примеры клеточных насосных систем включают: перистальтический насос, насос с двойной мембранной, насос с низкой скоростью сдвига (Levitronix® pumps, Zurich, Switzerland) и системы переменного тангенциального потока (ATF™, Refine Technology, Пайн Брук, Нью-Джерси, см., например, патент США № 6544424; Furey (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63.). Пермеат может быть извлечен из фильтров с помощью перистальтических насосов.

Моноблочная фильтрационная система

В изобретение предлагается моноблочная фильтрационная система, состоящая из двух или более фильтровальных компонентов с полыми волокнами с различными размерами пор или молекулярными массами отсечения, объединенные последовательно в моноблочную фильтрационную систему, при необходимости, содержащаяся в корпусе, которая может управляться одним насосным устройством. Это позволяет сбор в режиме удержания продукта (удаления нуль пермеата) или режиме сбора продукта (удаления урожайного пермеата) через одну систему фильтров (фиг. 1). Моноблочная фильтрационная система предлагает преимущества удаления белков клеток-хозяев и прочих отходов из клеточной культуры во время циклов сбора урожая, увеличивая продолжительность культивирования клеточной культуры. Моноблочная фильтрационная система имеет потенциально меньшее засорение фильтра для большей эффективности сбора урожая. Моноблочная фильтрационная система может заготавливать пермеат в многочисленные, маленькие партии, для более легкой и эффективной загрузки колонок очистки следующего этапа производства. Моноблочная фильтрационная система может быть использована как часть непрерывного процесса производства.

Конфигурация моноблочной фильтрационной системы включает в себя два или более фильтровальных компонента с полыми волокнами, имеющих различные размеры пор или молекулярную массу отсечения, сконфигурированы последовательно, таким образом, что все фильтры находятся в соединении по жидкой среде друг с другом, и биореактор может управляться одним насосным устройством. Такие фильтровальные компоненты с полыми волокнами являются доступными для приобретения в, например, GE Healthcare and Spectrum Laboratories, Inc.. В то время как культура клеток проходит через все фильтры, пермеат может быть выборочно удален из одного или более фильтров одновременно. Пермеат (нулевой или урожайный) удаляется путем вывода пермеата из соответствующего компонента с полыми волокнами, на основе размера их пор или молекулярной массы отсечения. Нулевой пермеат и урожайный пермеат удаляются отдельно и независимо с применением отдельных перистальтических насосов. Расчет времени и сбора пермеата можно контролировать через их отдельные перистальтические насосы.

Отдельные фильтровальные компоненты с полыми волокнами могут быть выстроены в любую конфигурацию, которая подходит для применения. В одном варианте реализации изобретения, фильтровальный компонент(ы) с полыми волокнами, имеющие такой размер пор или молекулярную массу отсе-

чения, что рекомбинантный белковый продукт клеточной культуры удерживается в ретантате в биореакторе для культивирования клеток, и расположен таким образом, что он первый принимает поток клеточной культуры из биореактора.

Конфигурация моноблочной фильтрационной системы позволяет урожайному пермеату и нуль пермеату быть выведенными из биореактора отдельно таким образом, что относительное объемное соотношение и сроки удаления можно регулировать по желанию. Пермеат собирают с моноблочной фильтрационной системы с той же скоростью, что и скорость перфузии.

В дополнение к применению коммерчески-доступных фильтровальных компонентов с полыми волокнами, материал с полыми волокнами может быть использован для конструирования двух разделенных зон в пределах одного фильтра, которые изолированы друг от друга герметизирующей зоной. Кроме того, отдельные полые волокна, имеющие различный размер поры или молекулярную массу отсека, могут быть соединены с помощью соединительной зоны в середине зоны герметизации, чтобы изолировать обе стороны пермеата. Каждый порово-размерный домен, по длине полого волокна, будет иметь соответствующую поверхность оболочки, которая изолирована от других порово-размерных доменов поверхности оболочки таким образом, что пермеат можно извлечь из каждого порово-размерного домена поверхности оболочки независимо от остальных.

Фильтры могут быть прикреплены друг к другу любым способом, который позволяет соединение по жидкой среде между фильтровальными компонентами с полыми волокнами. Компоненты фильтра могут быть склеены или сплавлены вместе. Фильтры могут быть соединены с помощью зажима, например, трех-зажимного хомута, или другого механического устройства, которое скрепляет вместе фильтрующие элементы и позволяет жидкостное сообщение между фильтрами. Корпус фильтра может быть снабжен внутренними и внешними резьбовыми областями, которые используются для присоединения фильтровальных элементов, либо непосредственно, либо через резьбовую муфту. Фильтры также могут быть соединены любым типом запирающего механизма.

Размещение двух фильтров напрямую конец к концу может создать плотное соединение или небольшое несоответствие между полыми волокнами, что может помешать потоку клеток и вызвать повреждение клеток в результате структурной деформации. В результате, там может быть снижение жизнеспособности в связи с выравниванием фильтров. Прокладка или муфта, которая обеспечивает определенное расстояние между соседними фильтровальными элементами, которая позволяет потоку клеток легче перемещаться с люмена одного фильтра в люмен следующего полого волокна, может быть использована между фильтровальными элементами. Прокладка разделяет отдельные элементы фильтра один от другого, делает возможным стерильный путь потока между отдельными полыми волокнами при сохранении изоляции соответствующих сторон полых волокон, из которых извлекается пермеат.

Такие прокладки могут быть изготовлены из любого материала, который может создать безопасное и стерильное соединение между фильтрами, и делает возможным жидкостное соединение между фильтрами. Такие прокладки могут быть само-уплотняющимися по отношению к фильтрам. Прокладки могут быть приклеены или приварены к фильтрам, которые нужно объединить. Прокладка может крепиться к фильтрам с помощью механического устройства, которое прикрепляет прокладку к фильтрам, таким как зажим. Прокладка может быть снабжена внутренними или внешними областями с резьбой, используемые для крепления прокладки к фильтрам напрямую или через резьбовую муфту. Прокладка также может быть присоединена с помощью любого типа запирающего механизма.

Моноблочная фильтрационная система может быть дополнительно закрыта внешним корпусом для простоты применения, особенно когда более двух фильтров сконфигурированы последовательно. Внешний корпус может быть изготовлен из пластика или другого подходящего материала, который будет поддерживать стерильность материала внутри блока фильтра. Корпус может быть вторичным корпусом, чтобы соответствовать более коммерчески-доступным фильтрам с полыми волокнами, или корпус может быть изготовлен в качестве основного корпуса для соединенных фильтров с полыми волокнами. Корпус должен иметь достаточно отверстий, делающие возможным введение и сбор кормовой среды и ретантата, и также, по меньшей мере, одно отверстие для пермеата, для каждого фильтра с полыми волокнами, имеющие различные размер пор или молекулярную массу отсека.

Моноблочная фильтрационная система может применяться в сочетании с единой системой откачки клеток, которая перекачивает культуру клеток через люменную сторону полых волокон при постоянной скорости потока, как описано выше.

Процесс культивирования клеток

Культивирование клеток может быть осуществлено в условиях, приспособивающие малый масштаб производства к большому масштабу производства рекомбинантных белков с применением сосудов для культивирования и/или аппаратов для культивирования, которые обычно используются для культивирования клеток животных или млекопитающих. Для культивирования в больших масштабах, может быть применено такое оборудование, как: системы вращающихся флаконов, аппараты для культивирования по типу наполненной колонки, баковые биореакторы по типу ферментера, биореакторы с воздушным подъемом, биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с иммобилизованными клетками, биореакторы с полыми волокна, биореакторы с механическим перемешиванием, многокамерные биореакто-

ры, центробежные биореакторы, или любой другой подходящий аппарат, известный специалисту в данной области техники. Также может быть применено одноразовое оборудование для биопроцессинга, такое как биореакторы. Микроносители могут также применяться с биореакторными системами. Системы могут эксплуатироваться в бетч, фед-бетч или перфузионном/непрерывном режимах. Кроме того, резервуары для культивирования могут быть оснащены дополнительными приборами, такими как: сепараторы клеток с применением фильтров, силы тяготения, центробежной силы, и тому подобное.

Термин "фаза роста" клеточной культуры относится к периоду экспоненциального роста клеток (например, логарифмической фазы), во время которой, клетки, как правило, быстро делятся. Клетки поддерживаются в фазе роста в течение примерно одного дня, или примерно двух дней, или примерно трех дней, или примерно четырех дней, или дольше, чем четыре дня. Продолжительность времени, в течение которого клетки поддерживаются в фазе роста, будет варьировать в зависимости от, например, типа клеток, скорости роста клеток и/или условий культивирования.

Термин "фазовый переход" относится к периоду между фазой роста и фазой производства. В целом, фазовый переход представляет собой время, в течение которого условия культивирования могут быть контролируемы для того, чтобы поддержать переход от фазы роста к фазе производства. Можно контролировать различные параметры клеточной культуры, или управлять ими, для того, чтобы контролировать переход, и которые включают (но не ограничиваются лишь этими) один или больше параметров, таких как: температура, осмолярность, концентрация витаминов, аминокислот, сахаров, аммония, молочной кислоты, и солей, или тому подобного.

Понятие "фаза производства" относится к периоду времени, когда рост клеток достигает плато. Логарифмический рост клеток обычно уменьшается до или во время этой фазы, и процесс производства белка начинает преобладать. Технологические процессы культивирования с подпиткой и перфузионного культивирования клеточных культур предусматривают добавление клеточной среды для культивирования, или предоставляют свежую среду в течение этой фазы для того, чтобы достичь и/или поддержать желаемой(ую) плотности(ь) клеток, жизнеспособности и/или титра рекомбинантного белкового продукта. Фаза производства может проводиться в больших масштабах. Крупномасштабные процессы культивирования клеток могут поддерживаться в объемах не менее примерно 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000 л или больше. В предпочтительном варианте реализации изобретения, стадия производства ведется в 500 л, 1000 л и/или 2000 л биореакторах.

Производство рекомбинантных белков может быть выполнено в несколько этапов. В процессе с множеством фаз, клетки культивируют в двух или более различных фазах. Как правило, клетки сначала культивируют в течение одной или нескольких фаз роста, в условиях окружающей среды, увеличивающих клеточную пролиферацию и жизнеспособность, затем следует переход к фазе производства, в условиях окружающей среды, увеличивающих продукцию белка. В коммерческих способах производства рекомбинантных белков с помощью клеток млекопитающих, обычно множество, например, по меньшей мере, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более фаз роста, которые происходят в различных сосудах для культивирования (от N-x до N-1) предшествующих окончательной производственной культуре. Фазам роста и производства могут предшествовать одна или несколько переходных фаз, или они могут быть разделены одной или несколькими переходными фазами. Фаза производства может проводиться в больших масштабах. Способ по настоящему изобретению может быть применен для того, чтобы продлить фазу производства клеточной культуры.

При подготовке к коммерческому производству рекомбинантных белков, клеточные культуры, предшествующие окончательной производственной культуре, как правило, проходят через два процесса, подготовку посевной культуры и подготовку инокулята. Фаза подготовки посевной культуры (N-X) проводится в небольших масштабах, при этом клетки быстро растут в числе. В фазе подготовки инокулята (N-1), клетки дополнительно размножают, чтобы создать инокулят для промышленного биореактора. Посевная культура и N-1 инокулят могут быть приготовлены любым способом культивирования, типично бетч культивированием клеток. N-1 плотность клеток равная $>15 \times 10^6$ клеток/мл является типичной для промышленных биореакторов с посевной культурой. Более высокая плотность клеток N-1 и/или приспособленная среда для культивирования клеток может уменьшить или даже полностью сократить время требуемое для достижения желаемой плотности клеток в промышленном биореакторе. В одном варианте реализации изобретения, более высокая плотность клеток N-1 достигается с помощью процесса перфузии, с применением фильтрации переменного тангенциального потока. Культура клеток N-1, выращенная посредством процесса перфузии применяя фильтрацию переменного тангенциального потока, может предоставить клетки в любой желаемой плотности: может легко быть достигнута высокая плотность клеток, такая как плотность $>90 \times 10^6$ клеток/мл или больше. N-1 культура клеток может применяться для создания одноболюсной инокуляционной культуры или может применяться как стоковая культура, которую поддерживают, чтобы инокулировать многочисленные промышленные биореакторы. Плотность инокуляции может иметь положительное влияние на уровень вырабатываемого рекомбинантного белка. Уровни рекомбинантного белкового продукта, как правило, увеличиваются с увеличением плотности инокуляции. Повышение титра связано не только с увеличением плотности инокуляции, но также, веро-

ятно, на него влияет метаболическое состояние клеток и стадии клеточного цикла клеток, которые находятся в промышленном биореакторе. В течении N-1 процесса, клеточной культуре может быть разрешено вступать в фазу производства до инокуляции промышленного биореактора. Такая инокуляция позволяет начать фазу производства сразу в промышленном биореакторе.

Термин "плотность клеток" относится к количеству клеток в заданном объеме питательной среды. "Плотность жизнеспособных клеток" относится к количеству живых клеток в заданном объеме питательной среды, что определяется стандартными анализами жизнеспособности (например, метод исключения красителем трипановым синим). Термин "объем клеточной массы" (ОКМ), также известный как "процент гематокрита" (% ОКМ), является отношением объема, занимаемого клетками, к общему объему культуры клеток, выраженное в процентах (см. Stettler, et al., (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dec 20:95(6):1228-33). Объем клеточной массы является функцией плотности клеток и диаметра клеток; увеличение объема клеточной массы может быть следствием увеличения плотности клеток, или диаметра клеток, или того и другого. Объем клеточной массы представляет собой меру сухого вещества в клеточной культуре. Поскольку клетки-хозяева различаются по размеру, и клеточные культуры также содержат мертвые и умирающие клетки, и другие продукты клеточного распада, объем клеточной массы можно описать с большей степенью точности как сухое вещество внутри культуры клеток. Например, 2000 л культуры, имеющие плотность клеток 50×10^6 клеток/мл, будут иметь совершенно разные объемы клеточной массы в зависимости от размера клеток. Кроме того, некоторые клетки будут увеличиваться в размерах, например, как при состоянии задержки роста, поэтому объем клеточной массы до задержки роста и после задержки роста, скорее всего, будет отличаться, за счет увеличения биомассы, как следствие увеличения размера клеток. Более низкий объем клеточной массы во время фазы производства помогает смягчить проблемы барботирования растворенного кислорода, которые могут препятствовать более высокой плотности перфузионной клеточной культуры. Более низкий объем клеточной массы также допускает меньший объем среды, что позволяет использовать емкости для хранения среды с меньшим размером, и может быть скомбинирован с более медленной скоростью потока. Меньший объем клеточной массы также оказывает меньшее влияние на урожай, и более поздние стадии производства, по сравнению с культурами с более высокой клеточной биомассой. Все это снижает затраты, связанные с производством рекомбинантных терапевтических белков.

В одном варианте реализации изобретения, способ дополнительно включает, что объем клеточной массы во время фазы производства равен или составляет менее чем 35%. В родственном варианте реализации изобретения, объем клеточной массы равен или менее чем 30%.

В одном варианте реализации изобретения, плотность жизнеспособных клеток культуры клеток млекопитающего, при объеме клеточной массы равной или менее чем 35%, составляет от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В родственном варианте реализации, плотность жизнеспособных клеток культуры клеток млекопитающего составляет от 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Управление культивированием клеток

Условия культивирования культуры клеток, подходящие для способов настоящего изобретения, представляют собой те, которые обычно применяются и являются известными для загрузочного, полунепрерывного или перфузионного (непрерывного) культивирования клеток или любого сочетания этих методов, уделяя также внимание pH, растворенному кислороду (O_2) и диоксиду углерода (CO_2), перемешиванию и влажности, и температуре. Во время производства рекомбинантного белка желательно иметь управляемую систему, в которой клетки выращивают в течение требуемого времени или к требуемой плотности, а затем физиологическое состояние клеток переключают на рост-ограниченное или задержанное, высоко-продуктивное состояние, в котором клетки используют энергию и субстраты для производства рекомбинантного белка взамен увеличения плотности клеток. Для культивирования клеток в коммерческих масштабах и производства биопрепаратов, возможность ограничить или задержать клеточный рост, и быть способным поддерживать клетки в рост-ограниченном или задержанном состоянии в течение фазы производства является очень желательным. К таким методам относятся, например, температурные изменения, применение химических индукторов синтеза белков, ограничение питательных веществ или голодание, и ингибиторы клеточного цикла, поодиночке, либо в сочетании.

Одним таким механизмом ограничения или задержки роста является изменение температуры в течение культивирования клеточной культуры. Например, фаза роста может иметь место при более высокой температуре, а переход на более низкую температуру, может инициировать и/или поддерживать фазу производства. Например, фаза роста может происходить при первом заданном значении температуры примерно от $35^\circ C$ до $38^\circ C$, а фаза производства может происходить при втором заданном значении температуры от $29^\circ C$ до $37^\circ C$, опционально от $30^\circ C$ до $36^\circ C$, или от примерно $30^\circ C$ до $34^\circ C$.

Переключение заданного значения температуры может осуществляться вручную или может быть сделано автоматически благодаря использованию систем управления биореактором. Заданное значение температуры можно изменить в предопределенное время или в ответ на один или несколько параметров культивирования культуры клеток, таких как: плотность клеток, титр или концентрация одного или не-

скольких компонентов среды. Один из таких способов использует онлайн инструмент мониторинга биомассы, который интегрирован в систему управления биореактором, чтобы вызвать изменение заданного значения температуры при достижении желаемой плотности клеток. Например, емкостный зонд биомассы может быть использован для онлайн оценки плотности клеток, а данные из онлайн измерений могут быть использованы, чтобы вызвать изменение температуры в биореакторе. Такие зонды на основе емкости включают в себя емкостный датчик Fogale (DN12-200) (г. Ниме, Франция).

Кроме того, химические индукторы синтеза белков, такие как кофеин, бутират, и/или гексаметилен бисацетамид (НМВА), могут быть добавлены одновременно, до, или после изменения температуры. Если индукторы добавляются после изменения температуры, они могут быть добавлены в течение от одного часа до пяти дней после изменения температуры, и по выбору от одного до двух дней после изменения температуры. Клеточные культуры могут поддерживаться в течение нескольких дней или даже недель, пока клетки вырабатывают нужный белок(и).

Другой способ поддержания клеток в нужном физиологическом состоянии заключается в вызове задержки роста путем воздействия на клеточную культуру низким уровнем L-аспарагина, и/или аспарагиновым голодом (см., например, патент WIPO № WO 2013/006479). Задержка роста клеток может достигаться и поддерживаться с помощью среды для культивирования, содержащей ограничивающую концентрацию L-аспарагин, и поддержанием низкой концентрации L-аспарагин в культуре клеток. Поддержание концентрации L-аспарагин на уровне 5 мМ или менее могут быть использованы, чтобы вызвать и сохранить клетки в состоянии задержки роста, посредством чего достигается увеличение производительности.

Ингибиторы клеточного цикла, соединения известные или предполагаемые как такие, что регулируют прохождение клеточного цикла и связанные с ним процессы транскрипции, репарации ДНК, дифференцирования, старения и апоптоза, связанные с этим, также полезны, чтобы вызывать задержку роста клеток. Ингибиторы клеточного цикла, взаимодействующие с аппаратом клеточного цикла, такие как циклин-зависимые киназы (ЦЗК) полезны как те молекулы, которые взаимодействуют с белками из других путей, например, АКТ, mTOR, и других путей, которые влияют прямо или косвенно на клеточный цикл.

Сбор и очистка

Экспрессированные рекомбинантные белки могут быть секретированы в среду для культивирования, из которой их можно восстановить и/или собрать. Рекомбинантные белки могут затем подвергаться одному или нескольким этапам обработки, включающие: сбор урожая, очистку, инактивацию/фильтрацию эндотоксинов и/или вирусов, ультрафильтрацию/диафильтрацию в подходящую фармацевтическую композицию, и/или хранение.

Экспрессированные рекомбинантные белки могут быть захвачены в урожайном пермеате. Белки могут быть очищены, или частично очищены, от урожайного перемета, применяя процессы и коммерчески доступную продукцию, известные в данной области техники и/или доступные у коммерческих поставщиков. К таким методам, среди других доступных, относятся: флокуляция; центрифугирование; осаждение; способы фильтрации, такие как глубинная фильтрация; методы хроматографии, в том числе, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, анионообменная хроматография в смешанном режиме, хроматография гидрофобного взаимодействия или гидроксилапатитная хроматография.

Очищенные белки затем могут быть "приготовлены", имеется ввиду замена буфера, стерилизация, упаковка насыпью и/или упаковка для конечного пользователя. Подходящие составы для фармацевтических композиций, включают те, что описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Аналитические методы процесса

Аналитические методы процесса представляют собой методы, которые доступны для мониторинга и оценки проб, отобранных в течение процессов культивирования клеточной культуры, для количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса производства. Эта информация реального времени или предполагаемая информация может быть использована для мониторинга и/или контроля продукта и параметров производства, таких как титр, плотность клеток; атрибуты качества продукта, такие как пост-трансляционные модификации; изменчивость продукта или процесса, такая как примеси и тому подобное, принятие своевременных решений и модификация процессов по мере необходимости. Например, возможно контролировать и/или управлять такими атрибутами качества продукта, как распределение видов гликанов, уровней окисления или дезамидирования.

Каждый шаг начальных этапов процесса культивирования клеточной культуры или более поздние стадии процесса очистки могут быть проконтролированы, чтобы предоставить информацию о количестве определенного атрибута качества продукта (АКП) и, чтобы проконтролировать этот АКП с наперед заданной целью и пределами измерения.

Образцы могут быть взяты с перерывами, с нужной частотой, или непрерывно. Образцы могут быть проанализированы в реальном времени или почти в реальном времени или сохранены для последующего анализа. Эта информация может использоваться, чтобы вносить изменения в течение всех этапов процесса.

Определение атрибутов качества продукта может быть выполнено с помощью масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии с УФ и/или масс-спектрометрии обнаружения и капиллярного электрофоре-

за, и тому подобного.

Эти процессы являются адаптируемые под непрерывный контроль с ручной или автоматической настройкой процессов, таких как кормление, температура, продолжительность процесса, что определяется уровнем определенного атрибута качества продукции.

Может быть выполнен масс-спектрометрический анализ белков для того, чтобы выявить наличие пост-трансляционных модификаций, таких как аминокислотные изменения и гликозилирование, применяя колонку с полигидроэтиласпартамидом, которая эксплуатируется в эксклюзионном режиме и в сочетании с ESI-МС (Brady et al., (2008) J Am Soc Mass Spectro, 19: 502-509).

Мониторинг в реальном времени элюата из ионообменной хроматографии, путем мониторинга нормированного соотношения LS/UV для каждой фракции, применяя лазерный детектор светорассеяния и УФ-поглощения, см. публикацию патента США № US 2013-0303732.

Способ множества атрибутов позволяет использовать одну жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию (ЖХ/МС) для поиска и характеристики тандемных данных МС, используя различные базы данных и поисковые платформы, такие как: Sequest (Исследовательский институт Скриппса, Ла-Хойя, Калифорния), X!Tandem (The Global Proteome Machine Organization) или Mascot (Matrix Science, Бостон, Массачусетс). Образцы могут быть денатурированы при высоком pH, или же могут быть сохранены дисульфидные изоформы и защищены сукцинимидные варианты, при низких значениях pH. Образец затем уменьшается и алкилируется с последующим разрушением трипсином. Затем пробу вводят в МС (такой как Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Fischer Scientific, Уолтем, Массачусетс) и анализ осуществляется с помощью программного обеспечения Pinpoint (Thermo Fischer Scientific). Атрибуты, которые могут быть выявлены, проанализированы и проконтролированы, включают: изомеризацию, дезаминирование, дисульфидное уменьшения, загрязнения белками клетки-хозяина, мутации, неправильное встраивание, гидроксизин, тиоэфир, негликозилированные тяжелые цепи, С-концевое амидирование, остаточный белок А, характеристика гликанов и обеспечение молекулярной идентичности. Точность массы для каждого отслеживаемого атрибута может быть установлена на уровне менее 5 промилле предсказанной массы. Идентификация пептида/атрибута подтверждается с помощью МС2 фрагментации и ортогональных методов описания (ВЭЖХ-МС, например, для гликозилирования). Экспериментальное изотопное распределение должно иметь бал скалярного произведения лучше, чем 0,95 по сравнению с теоретическим изотопным распределением. Окно времени удержания устанавливается для каждого атрибута, и все обнаруживаемые состояния заряда для каждого атрибута учитываются при количественной оценке. Критерий определяется таким образом, что позволяет обнаружить изменения в атрибуте. Например, дезаминирование может контролироваться с помощью определения значения дезаминирование (дезаминированный белок, деленный на сумму дезаминированного белка и немодифицированного родительского белка, умноженное на 100). Гликозилирование может контролироваться путем сравнения каждого специфического гликана с суммой всех обнаруживаемых гликанов.

В некоторых вариантах реализации, аналитические методы технологического процесса могут также включать "Контроль Атрибутов Продукта" (КАП). КАП сочетает в себе несколько АМП элементов с моделью биопроцесса, чтобы ввести в действие управления с использованием обратной связи в режиме реального времени одного или более КАК (Критические Атрибуты Качества). Этот новый КАП-процесс представляет собой пример реализации QbD производства биопрепаратов. Процесс КАП процесс опирается на применение управляемого средства воздействия, которое может влиять на КАК. Управляемое средство воздействия включено в модель, основанную на контуре управления, для поддержания КАК на желаемом уровне, как указано в КПЦП (Качество Профиля Целевого Продукта). В частности, управляемое средство воздействия представляет собой корректировку параметров процесса, которые влияют на обеспечения качества таким образом, что КАК могут быть смоделированы математически. Например, уровни ингибитора или активатора могут быть динамически скорректированы, чтобы регулировать активность ферментов гликозилирования, для регулирования профиля гликозилирования продукта, при условии, что их влияние может быть смоделировано математически. Также температура или pH могут быть отрегулированы во время пробега, при условии, что их влияние на КАК также может быть надежно смоделировано.

Белки

Как применяется здесь, "пептид", "полипептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле, состоящей из двух или более остатков аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также содержат модификации, включающие, но не ограничены лишь ими: гликозилирование, прикрепление липидов, сульфатацию, гамма-карбоксихлирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование.

Белки могут иметь научный или коммерческий интерес, включая белковые препараты. Белки включают, среди прочего, антитела, слитые белки и цитокины. Пептиды, полипептиды и белки могут быть получены путем синтеза прокариотическими и эукариотическими клеточными линиями, с помощью способов культивирования культуры клеток, и могут упоминаться как "рекомбинантный пептид", "рекомбинантный полипептид", "рекомбинантный белок", "рекомбинантный белковый продукт" и "продукт". Экспрессированный белок(ки) может быть произведен внутриклеточно, или секретированы в культуру

ральную среду, из которой он может быть восстановлен и/или собран.

Не ограничивающие примеры белков млекопитающих, которые могут быть с успехом произведены с помощью способов данного изобретения включают в себя белки, содержащие аминокислотные последовательности, идентичные, или по существу аналогичные полностью или частично одному из следующих белков: фактору некроза опухоли (ФНО), лиганду flt3 (WO 94/28391), эритропоэтину, тромбопоэтину, кальцитонину, ИЛ-2, ангиопоэтину-2 (Maisonpierre et al. (1997), Science 277(5322):55-60), лиганду для рецептора активатора фактора NF-каппа В (RANKL, WO 01/36637), апоптоз-индуцирующему лиганду родственному фактору некроза опухоли (ФНО) (TRAIL, WO 97/01633), тимусному липопротейну полученному из стромы, гранулоцитарному колониестимулирующему фактору, гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору, (GM-CSF, австралийский патент № 588819), фактору роста тучных клеток, фактору роста стволовых клеток (патент США № 6,204,363), эпидермальному фактору роста, фактору роста кератиноцитов, фактору роста и развития мегакариоцитов, RANTES, человеческому фибриноген-подобному 2 белку (FGL2; шифр доступа NCBI NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62) гормону роста, инсулину, инсулиноподобному фактору роста, паратиреоидному гормону, интерферонам включая α -интерфероны, γ -интерферон, и консенсусные интерфероны (патенты США № 4695623 и 4897471), фактору роста нервов, нейротрофическому фактору полученному из мозга, белкам подобным синаптогаминам (SLP 1-5), нейротрофину-3, глюкагону, интерлейкинам, колониестимулирующим фактором, лимфотоксину- β , фактору ингибирующему лейкемию, и онкостатину-М. Описания белков, которые могут быть произведены согласно способам по данному изобретению могут быть найдены, например, в Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, Volumes 1-3 (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Brown, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1998) все издания; и The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Кроме того, способы по данному изобретению будут полезны для синтеза: белков, содержащие все или часть аминокислотной последовательности рецептора для любого из вышеупомянутых белков, антагониста такого рецептора или какого-либо из вышеупомянутых белков, и/или белков, похожих на такие рецепторы или антагонисты. Эти рецепторы и антагонисты включают: обе формы рецептора фактора некроза опухоли (TNFR, называются p55 и p75, патент США № 5395760 и патент США № 5610279), рецепторы интерлейкина-1 (ИЛ-1) (типы I и II; ЕПО патент № 0460846, патент США 4968607, и патент США № 5767064), антагонисты рецептора ИЛ-1 (патент США № 6337072), ингибиторы или антагонисты рецептора ИЛ-1 (патенты США № 5981713, 6096728, и 5075222) ИЛ-2 рецепторы, ИЛ-4 рецепторы (ЕПО патент № 0 367 566 и патент США № 5856296), ИЛ-15 рецепторы, ИЛ-17 рецепторы, ИЛ-18 рецепторы, Fc-рецепторы, рецептор гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, рецепторы для онкостатина-М и фактора ингибирующего лейкемию, активатор рецептора NF-каппа В (RANK, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин (патент США № 6015938), рецепторы для TRAIL (включая рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4), и рецепторы содержащие домены смерти, такие как Fas или Apoptosis-Inducing Receptor (AIR).

Другие белки, которые могут быть получены применяя изобретение, включают белки, содержащие всю или часть аминокислотных последовательностей антигенов дифференцирования (далее CD белков) или их лигандов, или белков, существенно похожих на любой из этих. Такие антигены описаны в Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996). Похожие CD белки описаны в последующих секциях. Примеры таких антигенов включают CD22, CD27, CD30, CD39, CD40, и лиганды к ним (CD27 лиганд, CD30 лиганд и т. д.). Несколько CD антигенов являются членами семейства рецепторов ФИО, которое также включает 41BB и OX40. Лиганды часто являются членами семьи ФИО, как 41BB лиганд и OX40-лиганд.

Также могут быть получены ферментативно-активные белки или их лиганды применяя данное изобретение. Примеры включают белки, состоящие полностью или частично из одного или следующих белков или их лигандов, или белка, существенно похожего на одного из них: дизинтегрин и члены семейства белков с металлопротеиназным доменом включая: ФНО-альфа превращающий фермент, различные киназы, глюкоцереброзидазу, супероксиддисмутазу, тканевый активатор плазминогена, фактор VIII, фактор IX, аполипопротеин Е, аполипопротеин А-I, глобины, антагонист ИЛ-2, альфа-1 антитрипсин, лиганды для любого из вышеперечисленных ферментов, и множество других ферментов и их лигандов.

Термин "антитело" включает упоминание как гликозилированных, так и негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса, или его антиген-связывающего домена, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное, в том числе с человеческими, гуманизированными, химерными, мульти-специфическими, моноклональными, поликлональными антителами, и олигомерами или их антиген-связывающими фрагментами. Кроме того, включены белки, имеющие антиген связывающий фрагмент или область, такие как: Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, дитела, Fd, dAb, макситела, одноцепочечные молекулы антитела, фрагменты области определяющей комплементарность (CDR), scFv, дитела, тритела, тетратела и полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, которой достаточно для обеспечения специфического антигенного связывания с

целевым полипептидом. Термин "антитело" включает, но не ограничивается теми, которые готовятся, экспрессируются, создаются или выделяются рекомбинантными средствами, например такие антитела, что выделены из клетки-хозяина, которая трансфицирована для экспрессии антитела.

Примеры антител включают, но не ограничиваются, теми, которые распознают любой один белок или комбинацию белков, включая, но не ограничиваясь, вышеупомянутыми белками и/или следующими антигенами: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7,1), CD86 (B7,2), CD147, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-2 рецептор, ИЛ-4 рецептор, ИЛ-6 рецептор, ИЛ-13 рецептор, субъединицы рецептора ИЛ-18, FGL2, PDGF- β и их аналоги (см. патенты США № 5272064 и 5149792), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, EGF рецептор (см. патент США № 6235883), VEGF рецептор, фактор роста гепатоцитов, лиганд остеопротегерина, интерферон гамма, стимулятор В лимфоцитов (BlyS, также известный как BAFF, THANK, TALL-1, и ZTNF4; см. Do and Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1):19-25), C5 комплемент, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, РЕМ антиген, LCG (который является продуктом гена, который экспрессируется в связи с раком легких), HER-2, HER-3, опухоль-ассоциированный гликопротеин TAG-72, SK-1 антиген, опухоль-ассоциированные эпитопы, которые присутствуют в повышенной концентрации в сыворотке крови пациентов с раком толстой кишки и/или поджелудочной железы, рак-ассоциированные эпитопы или белки, которые экспрессируются на раковых клетках груди, толстой кишки, раковых плоских клетках, раковых клетках простаты, поджелудочной железы, легких и/или почек, и/или клетках меланомы, глиомы, нейроblastомы, клетках некротического ядра опухоли, интегрин альфа 4 бета 7, интегрин VLA-4, B2 интегрин, TRAIL рецепторы 1, 2, 3, и 4, RANK, RANK лиганд, ФНО- α , молекула адгезии VAP-1, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), молекула-3 межклеточной адгезии (ICAM-3), лейкоинтегрин-адгезин, тромбоцитарный гликопротеин gp IIb/IIIa, тяжелая цепь сердечного миозина, паратиреоидный гормон, rNAPc2 (который представляет собой ингибитор фактора VIIa-тканевого фактора), МНС I, карцино-эмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопrotein (AFP), фактора некроза опухоли (ФНО), CTLA-4 (который является антигеном связанным с цитотоксическими Т-лимфоцитами), Fc- γ -1 рецептор, HLA-DR 10 бета, HLA-DR антиген, склеростин, L-селектин, респираторно-синцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), *Streptococcus mutans*, и *Staphylococcus aureus*. Специфические примеры известных антител, которые могут быть произведены применяя способы по изобретению включают, но не ограничиваются: адалимумаб, бевасизумаб, инфликсимаб, абциксимаб, алектумумаб, бапинецумаб, базиликсимаб, белимумаб, бриакинумаб, канакинумаб, сертолизумаб, пегол, цетуксимаб, койнейтенумаб, деносумаб, экьюлайзумаб, гемтузумаб, озогамин, голимумаб, ибригьюумаб, труксетан, лейбгьюзумаб, мапатумаб, мапатумаб, меполизумаб, мотавизумаб, муромонаб-CD3, натализумаб, нимотьюзумаб, офутумаб, омализумаб, ореговомаб, паливизумаб панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, ровелизумаб, тоцилизумаб, тозитумумаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб, залутумумаб и занолумумаб.

Изобретение также может быть применено для получения рекомбинантных слитых белков, включая, например, любой из вышеперечисленных белков. Например, рекомбинантный слитый белок, содержащий один из вышеперечисленных белков плюс мультимеризационный домен, такой как лейциновый zipper, двойная спираль, и Fc фрагмент иммуноглобулина, или аналогичный белок, могут быть получены с применением способов изобретения. См. например WO94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Hakansson et al. (1999), Structure 7:255-64. Особую группу среди таких рекомбинантных слитых белков представляют собой белки, в которых фрагмент рецептора слитый с Fc фрагментом антитела, таким как этанерцепт (p75 TNFR:Fc), и белатацепт (CTLA4:Fc). Химерные белки и полипептиды, а также фрагменты или части, или мутанты, варианты, аналоги или какой-либо из вышеупомянутых белков и полипептидов, также включены в число пригодных белков, полипептидов и пептидов, которые могут быть произведены с помощью способов настоящего изобретения.

В то время как терминология, используемая в этой заявке, является стандартной в данной области техники, в настоящем документе представлены определения некоторых терминов для того, чтобы обеспечить ясность и определенность смысла формулы. Единицы, приставки и символы могут быть выражены в их общепринятой форме СИ. Числовые диапазоны, указанные здесь, включают числа, определяющие диапазон, а также включают и поддерживают каждое целое число в пределах определенного диапазона. Способы и методы, описанные в настоящем документе, как правило, выполняются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более специфических источниках, ссылки на которые цитируются и обсуждаются в настоящей спецификации, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1995), и Greenfield, Antibodies: A Laboratory Manual 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2013), или любой из предыдущих выпусков. Все документы или части документов, цитируемых в настоящей заявке, включая, но не

ограничиваясь патентами, заявками на патенты, статьи, книги и трактаты, включены в настоящий документ посредством ссылки. То, что описано в варианте реализации изобретения может быть объединено с другими вариантами реализации изобретения.

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами реализации изобретения, описанными в данном документе, которые предназначены в качестве иллюстрации отдельных аспектов изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты находятся в пределах объема настоящего изобретения. Действительно, различные модификации изобретения, помимо тех, которые показаны и описаны в данном документе, станут очевидными для специалиста в данной области техники исходя из вышеизложенного описания и сопроводительных чертежей. Такие модификации предназначены для того, чтобы охватываться прилагаемой формулой изобретения.

Примеры

Пример 1.

Процесс длительного периодического культивирования клеточной культуры.

Этот эксперимент описывает процесс культивирования клеток с продленной периодической сборкой урожая (X-PH) по сравнению с процессом ультрафильтрации культуры (УФ). Для длительного периодического процесса, была выполнена перфузия через моноблочную фильтрационную систему, состоящая из ультрафильтра, имеющего такие размер пор или ММО, что рекомбинантный белковый продукт клеточной культуры удерживался в ретантате в клеточной культуре биореактора, соединенного с микрофильтром, имеющим такой размер пор или молекулярную массу отсечения, что рекомбинантный белок интереса переносился с пермеатом и собирался как продукт урожая. Перфузию проводили путем выкачиванием пермеата без рекомбинантного белка, или нуль пермеата, из ультрафильтрационного компонента, до момента достижения заданного параметра, в этом случае дни культивирования, и в это время перфузия проводилась путем извлечения пермеата содержащего рекомбинантный белок, или урожайного пермеата, из микрофильтровального компонента в течение заданного времени. После того как заданное время истекало, процесс повторялся. Этот цикл удержания и сбора белкового продукта повторялся до тех пор, пока культура не истощалась.

Для процесса ультрафильтрации культуры, клетки культивировали в перфузионной системе, заменяя ультрафильтр с такими размер пор или молекулярной массой отсечения, что рекомбинантный белковый продукт удерживался в ретантате в культуре клеток биореактора, и собирался пермеат без рекомбинантного белка. Удержанный рекомбинантный белковый продукт был восстановлен в качестве урожая из биореактора, когда культура истощалась.

Процесс длительного периодического сбора клеточной культуры (X-PH).

В нулевой день, СНО клетки, экспрессирующие рекомбинантное антитело были инокулированы в два 2 л биореактора (Applikon, Фостер-Сити, Калифорния) при 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессывороточной бетч-среды с известным химическим составом. Культуры поддерживали на уровне 36°C, концентрация РО (растворимый кислород) равнялась 48,0 мм рт. ст., скорость перемешивания составляла 350 об/мин.

Культивирования клеток начинали в бетч режиме, перфузия была начата на 2-е сутки с помощью ATF-2™ фильтрационной системы с переменным тангенциальным потоком (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси) применяя 30 см 30 кДа фильтр с полыми волокнами (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Питсбург, Пенсильвания) соединенный последовательно с 30 см 750 кДа фильтром с полыми волокнами (Xampler UFP-750-E-4MA, GE Healthcare). Фильтры были соединены приблизительно 1 дюймовой санитарной трубой с фланцем, применяя санитарные хомуты. Среда представляла собой бессывороточную перфузионную среду с известным химическим составом, и содержала 1,5 г/л плюроники (Kolliphor P188 SAFC Biosciences, ST. Луис, Миссури).

Скорость перфузии постепенно увеличивали от 0,5 до 1,0 рабочего объема реактора за сутки в течение пробега клеточной культуры, и она была равномерной благодаря фильтрующему элементу. Нулевой и урожайный пермеаты были собраны с помощью независимых перфузионных насосов, с той же скоростью, что и скорость перфузии. Для оценки культуры из биореактора брались ежедневные пробы. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определяли, применяя Vi-Cell (Beckman Coulter, Брея, Калифорния). Титр определяли путем ВЭЖХ анализа.

Для анализа гликанов, пробы содержащие белок, были собраны и очищены Белком А. Очищенные образцы были обработаны PNGase-F и инкубированы при 37°C в течение 2 часов, чтобы высвободить N-связанные гликаны. Ферментативно-освобожденные гликаны были помечены 2-аминобензойной кислотой (2-AA) при 80°C в течение 75 мин. Избыток 2-AA метки был удален с помощью GlycoClean S катриджа. Образцы выпаривали в течение ночи, и полученный в результате сухой осадок разводили водой для последующего ЖХГВ (жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия) анализа. Гликаны вводили и связывали с колонкой в условиях с высоким содержанием органических веществ и элюировали при возрастающем градиенте водного буфера формиата аммония. Было использовано обнаружение флуоресценции для контроля элюирования гликанов, и были рассчитаны относительные проценты крупных и мелких типов гликанов.

До одиннадцатого дня, нуль пермеата, или пермеат не содержащий продукта, непрерывно собирался, выкачиванием пермеата из 750 кДа ультрафильтра с помощью перистальтического насоса (Уотсон Марлоу 120У/ДВ Фалмут, Корнуолл, Великобритания) и выбрасывался. Из-за размера фильтра, белковый продукт культуры клеток удерживался в ретантате в биореакторе в клеточной культуре.

Урожайный пермеат, или пермеат содержащий продукт, собирали в течение пяти отдельных предопределенных моментов времени, в течение пробега клеточной культуры, в соответствии с графиком, приведенным в табл. 1. Урожайный пермеат собирался, выкачиванием пермеата из 30 кДа микрофильтра с помощью перистальтического насоса (Уотсон Марлоу 120У/ДВ Фалмут, Корнуолл, Великобритания). Белковый продукт культуры клеток переносился в пермеат и был собран как часть урожайного пермеата. Урожайный пермеат оценивали по титру и качеству продукта, как описано выше. Урожайный пермеат хранился в баллонах для пермеата (RCBV-300, Рим Био Инк. Сизтл, Вашингтон).

Таблица 1

График сбора урожайного пермеата

Сбор урожая	День	Время сбора (часы)
1	11-12	22
2	14-15	23
3	17-18	25
4	20-21	26
5	23-24	25

Сразу после завершения сбора каждого урожайного пермеата, нуль пермеат снова непрерывно собирался из 750 кДа ультрафильтра и выбрасывался. Культивирование культуры было прекращено после сбора урожайного пермеата на 24-й день.

Процесс ультрафильтрации культуры (УФ)

В нулевой день, СНО клетки, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были инокулированы в четыре 2 л биореактора (Applikon, Фостер-Сити, Калифорния) при 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессывороточной бетч-среды с известным составом. Культуры поддерживали на уровне 36°C , РО (растворимый кислород) равнялось 48,0 мм рт. ст., скорость перемешивания составляла 350 об/мин.

Культивирование клеток начинали в бетч режиме, перфузия была начата на 2-е сутки с помощью ATF-2™ фильтрационной системы с переменным тангенциальным потоком (Refine Technologies,

Ганновер, Нью-Джерси), оснащенной 60 кДа фильтром с полыми волокнами (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Среда представляла собой бессывороточную перфузионную среду с известным составом, и содержала 1 г/л плуороника (Kolliphor P 188 SAFB Biosciences, ST. Луис, Миссури).

Скорость перфузии постепенно увеличивалась от 0,5 до 1,0 рабочего объема реактора за сутки в течение пробега клеточной культуры. Пробы отбирали ежедневно для оценивание культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определяли, применяя Vi-Cell (Beckman Coulter, Брея, Калифорния). Титр определяли путем ВЭЖХ анализа.

Пермеат собирали с той же скоростью, что и скорость перфузии. Из-за размера фильтра, белковый продукт культуры клеток удерживался в ретантате в биореакторе в клеточной культуре, до тех пор, пока не прекращалось культивирование культуры на 15 день.

Профиль титра из X-РН процесса согласовывался с титром из УФ процесса культуры до 11 дня (фиг. 2). Профайлы титров разделяют, когда первый 750 кДа цикл сбора урожая вводят в X-РН процесс. Аналогичное соответствие наблюдалось в плотности жизнеспособных клеток (фиг. 3) и % жизнеспособности (фиг. 4).

Был использован промышленный биореакторный период равный пятьдесят одному дню для сравнения процесса X-РН с УФ процессом с выделенным трехдневным периодом перезапуска промышленного биореактора между пробегами. С этим критерием, два 24 дневных пробега X-РН процесса и три пробега УФ процесса были проведены в сравнительный период равный 51 дню.

X-РН процесс смог обеспечить на 98% больше восстановленного продукта в сравнении с УФ процессом, за период производства равный 51 дню (табл. 2). Это в основном включало 26% прироста в комплексной плотности жизнеспособных клеток (КПЖК) и 46% прироста в удельной производительности. X-РН процесс использовал на 27% больше среды в двух пробегах относительно трех пробегов УФ процесса, но это преобразовывалось в 36% сокращение требования в среде (затраты среды) на грамм продукта, произведенного с помощью X-РН процесса, по сравнению с УФ процессом.

Таблица 2

Продукт, восстановленный в течение производственного периода сроком в 51 день в 2 л биореакторе с 1,5 л рабочим объемом

Процесс	Пробег в периодом в 51 день	КПЖК ($\times 10^6$ клеток-день/мл)	Специфическая продуктивность (пт/клетка-день)	Изготовлено всего продукта (г)	Восстановленный продукт		Восстановлено всего продукта (г)
					РХ-МФ урожайных баллонов (г)	Урожай Био-реактора (г)	
УФ	Один запуск	689,9	~27,9	28,9	-	23,1	23,1
	Три запуска	2069,7		86,6		69,3	69,3
Х-РН	Один запуск	1302,8	~41,3	80,7	65,1	3,7	68,8
	Два запуска	2605,6		161,3	130,2	7,3	137,5

Качество продукта Х-РН процесса оценивалось с помощью ЖХГВ гликанового картирования и сравнивалось со стандартом, произведенным используя УФ процесс длительностью 15 дней (табл. 3). Атрибуты карты гликанов Х-РН процесса согласовываются со стандартом с применением УФ процесса.

Таблица 3

ЖХГВ анализ гликанов

Процесс		Высокоманозные гликаны (%)	Общее фукозилирование (%)	Общее гликозилирование (%)	Неизвестно (%)
Х-РН	Сбор урожая 1 пробег №1	8,0	86,3	17,2	5,2
	Сбор урожая 1 пробег №2	9,5	84,3	18,4	5,7
	Сбор урожая 2 пробег №1	7,5	87,3	15,8	4,6
	Сбор урожая 2 пробег №2	7,9	86,5	16,1	4,9
	Сбор урожая 3 пробег №1	7,7	86,5	15,9	4,9
	Сбор урожая 3 пробег №2	8,3	85,8	15,0	4,9
	Сбор урожая 4 пробег №1	7,3	87,4	15,5	4,5
	Сбор урожая 4 пробег №2	7,8	86,6	14,9	4,9
	Сбор урожая 5 пробег №1	9,4	84,1	16,8	5,4
	Сбор урожая 5 пробег №2	8,9	84,5	14,8	5,5
	Среднее \pm Стандартное Отклонение	8,2 \pm 0,8	85,9 \pm 1,2	16,0 \pm 1,1	5,1 \pm 0,4
УФ	Стандарт	7,2	86,0	16,4	5,7

Пример 2.

Этот эксперимент сравнивает воздействие низких и высоких концентраций полиоксипропилен-полиоксиэтилен блок-сополимера, Lutrol® F68, и фильтр 30 кДа с фильтром 750 кДа в перфузионной системе культивирования.

В нулевой день, клетки линии СНО, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были инокулированы в четыре 2 л биореактора (Applikon, Фостер-Сити, Калифорния) при 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессывороточной перфузионной бетч-среды с известным химическим составом, содержащей 1 г/л Lutrol® F68 (BASF, МТ Олив, Нью-Джерси). Культуры поддерживали при температуре 36°C, при концентрации растворенного кислорода равной 48%, pH 6,9, скорость перемешивания составляла 350 об/мин.

Пробеги культивирования клеток были начаты в бетч режиме; перфузия начиналась на 2 день, когда плотность клеток достигала $4-5 \times 10^6$ клеток/мл. Перфузия осуществлялась с использованием перфузионной и фильтрационной системы ATF-2™ с переменным тангенциальным потоком (Refine Technolo-

gies, Ганновер, Нью-Джерси). Культура клеток постоянно циркулировала через люменную сторону внешнего вертикально-ориентированного фильтра, поступая в верхний конец. Пермеат непрерывно откачивали, применяя перистальтический насос. Два реактора были оборудованы 30 кДа фильтрами с полыми волокнами (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Два реактора были оборудованы 750 кДа фильтрами с полыми волокнами (Xampler UFP-750-E-4MA, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания).

Скорость перфузии постепенно увеличивали с 0,5 до 3,0 мл/минута в течение пробега культивирования клеток. Пробы пермеата собирали с той же скоростью, что и скорость перфузии. Пробы отбирали ежедневно из биореактора и трубопровода перемеата. Плотность клеток, жизнеспособность и диаметр клеток измерялись с помощью CEDEX (Roche, Натли, Нью-Джерси) после разведения фосфатно-солевым буфером для того, чтобы получить плотность клеток $<10^7$ клеток/мл. pH и парциальное давление CO_2 ($p\text{CO}_2$) и O_2 ($p\text{O}_2$) были измерены, используя газовый анализатор крови; концентрации глюкозы, лактата, глутамина, аммиака и концентрации ионов K^+ и Na^+ поддерживали с помощью прибора NovaFLEX (Nova Biomedical, Уолтем, Массачусетс).

В реакторах оборудованных 750 кДа фильтром, клеточная жизнеспособность снижалась до 80% к шестому дню. Снижение не было столь выраженным в реакторах, оборудованных фильтрами 30 кДа, в которых жизнеспособность поддерживалась на уровне более 80% в течение 14 дней. (фиг. 5)

Наблюдалось накопление до 7 г/л Lutrol® F68 в супернатанте реакторов, оборудованных 30 кДа фильтрами с полыми волокнами. В этих условиях концентрация Lutrol® F68 была ниже обнаруживаемого уровня в пробах пермеата. В реакторах, оборудованных 750 кДа фильтром, уровень Lutrol® F68 в супернатанте биореактора и пермеате оставался относительно постоянным и подобным уровням в перфузионной среде, в диапазоне 1-1,5 г/л, что свидетельствует об отсутствии накопления (фиг. 6). Средняя молярная масса Lutrol® F68 составляет 8400 Да и теоретически он должен протекать через фильтр 30 кДа. Мицеллярные образования Lutrol® F68 могут возникать при концентрациях намного ниже, чем 1 г/л (0,04 мМ при температуре 20-25°C, по данным производителя). Вполне вероятно, что концентрация Lutrol® F68 была повышена за счет образования мицелл в реакторе и фильтре.

Исследования токсичности Lutrol® F68.

Чтобы проверить эффект токсичности высоких концентраций Lutrol® F68 на клетки, две линии клеток СНО (клеточная линия А и клеточная линия В), экспрессирующие различные моноклональные антитела, поддерживались более 10 пассажей (по 3 дня/пассаж), при начальной плотности посева 8×10^5 клеток/мл в 250 мл флаконах для встряхивания с клеточной культуральной средой, содержащей 1, 2, 3, 4 или 5 г/л Lutrol® F68.

Общее увеличение плотности клеток наблюдалось ($3,4-6,5 \times 10^6$ клеток/мл) после 3 дней. Плотность жизнеспособных клеток была нормирована к условию 1 г/л, чтобы стало возможным сравнение между различными концентрациями Lutrol® F68.

Клетки, выращиваемые в среде, содержащей 3, 4 и 5 г/л Lutrol® F68, были стабильно выше при пассажах, в которых было измерено 10% увеличение клеточной плотности по сравнению с условием 1 г/л ($p < 0,01$) (фиг. 7А). Жизнеспособность также была большей для культур с более высокой концентрацией Lutrol® f68 (среднее $>95\%$) (фиг. 7Б). Также было обнаружено, что диаметр клеток был незначительно увеличен в любых условиях по сравнению с условием 1 г/л (15,42 мкМ) ($p < 0,05$) (фиг. 7В). Вариабельность плотности жизнеспособных клеток, % жизнеспособности и диаметра при условиях высокой концентрации Lutrol® F68 были результатом изменчивости характеристик в течение длительного проведения пассажей.

Эффект цитотоксичности высоких концентраций Lutrol® F68 на клетки проверяли в 2 л фед-бетч культуре, применяя две линии клеток СНО, экспрессирующие моноклональные антитела. И снова, не было влияния высокой концентрации Lutrol® F68 на плотность жизнеспособных клеток, жизнеспособность, диаметр клеток или титр (фиг. 8).

Дополнение ATF перфузионных культур 5 г/л Lutrol® F68.

Были проведены эксперименты, сравнивающие концентрации Lutrol® F68 1г/л и 5г/л. В нулевой день, клетки СНО линии, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были инокулированы в шесть 2 л биореактора (Applikon, Фостер-Сити, Калифорния) при 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл. Два реактора получили бессывороточную перфузионную среду с известным составом, содержащую 1 г/л Lutrol® F68, и два реактора получили бессывороточную перфузионную среду с известным составом, содержащую 5 г/л Lutrol® F68. Культуры поддерживали при температуре 36°C, при концентрации растворенного кислорода равной 48%, pH 6,9, скорость перемешивания составляла 350 об/мин.

Культивирования клеток были начаты в бетч режиме; перфузия начиналась на 2 день. Перфузия была выполнена, применяя ATF-2™ фильтрационную систему с переменным тангенциальным потоком (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси), оснащенную 750 кДа фильтром с полыми волокнами (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Скорость перфузии составляла 3 рабочих объема/день.

Пробы отбирали ежедневно из биореактора и трубопровода перематеа, и тестировали, как описано выше.

Увеличение концентрации Lutrol® F68 к 5 г/л приводила к продленной выживаемости >95% в течение 14 дней, и >90% к 25 дню (фиг. 9).

Восстановление культуры с низкой концентрацией Lutrol® F68 высокой концентрацией Lutrol® F68.

В нулевой день, клетки СНО линии, экспрессирующие рекомбинантное антитело, были инокулированы в четыре 2 л биореактора (Applikon, Фостер-Сити, Калифорния) при 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл. Культивирования клеток были начаты в бетч режиме; перфузия началась на 2 день. Перфузия была выполнена, применяя ATF-2™ фильтрационную систему с переменным тангенциальным потоком (Refine Technologies, Ганновер, Нью-Джерси), оснащенную 750 кДа фильтром с полыми волокнами (Xampler UFP-30-E-4MA, GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания). Реакторы были поделены на две группы по два в каждой, каждая группа получала среду для культивирования клеток с разным составом (Среда А и Среда Б).

Оба состава сред содержали 1 г/л Lutrol® F68. Культуры поддерживали при температуре 36°C, при концентрации растворенного кислорода равной 48%, рН 6,9, скорость перемешивания составляла 350 об/мин. Культуры поддерживали в таких условиях до тех пор, пока процент жизнеспособности клеток не падал до 80%. Тогда, среду для обеих групп дополняли добавочными 4 г/л Lutrol® F68 (до общей концентрации 5 г/л). Культуры поддерживали в этих условиях до 30 дня. Восстановление клеточной жизнеспособности добавлением более высокой концентрации Lutrol® F68 показано на фиг. 10. После добавления, процент жизнеспособности увеличивался до 15%. Был очевидным защитный эффект более высокой концентрации плуроника в культуре со сниженной жизнеспособностью клеток, несмотря на различные составы сред для культивирования.

Пример 3.

Этот эксперимент демонстрирует успешное опытно-промышленное применение множественных элементов концепции Качества через Дизайна (QbD) в КАП процессе, обеспечивающий заданное качество профиля целевого продукта (КПЦП). Контролируемым КАК в этом эксперименте являлось N-связанное гликозилирование высокоманнозными гликанами Fc-области моноклонального антитела ("гликозилирование высокоманнозными гликанами").

Уровень гликозилирования высокоманнозными гликанами контролировался добавлением или удалением маннозы (управляемое средство воздействия) к/из клеточной среде(ы) для культивирования клеток. Однако, также могут быть использованы метаболические прекурсоры, метаболические ингибиторы, малые молекул, ферментные кофакторы и индуцибельные промоторы. Недавние исследования показали, что различные углеводы могут влиять на уровень высокоманнозного гликозилирования на продуке-анителе. Конкретно, было показано, что кормление маннозой увеличивает уровень высокоманнозного гликозилирования без снижения продуктивности культуры. На основе эмпирических исследований было разработано понимание влияния концентрации маннозы в среде для культивирования клеток на уровне высокоманнозного гликозилирования IgG, и было изучено ее отношения к процессу культивирования культуры клеток. Были внедрены знания, полученные из небольших исследований и тренировочных промышленных запусков в опытном масштабе, для разработки алгоритма КАП, основанного на принципе Модели Прогнозирующего Управления (МПУ). МПУ представляет собой контролирующую схему, в которой математическая модель процесса применяется для прогнозирования будущей траектории. Преходящий характер типичного СНО биореакторного процесса, вероятность взаимодействия между несколькими КАК, и их управляемыми средствами воздействия, и задержки, связанные со сложной аналитикой обеспечивают сильную мотивацию для МПУ. Были использованы АМП методы, в том числе масс-спектрометрический анализ в режиме реального времени, в сочетании со стандартным мониторингом биореактора для того, чтобы своевременно предоставлять информацию для модели, используемой для МПУ. Данные из нескольких анализов были включены в систему МПУ, которая определяла количество маннозы, требуемое для добавления в биореактор для поддержания КАК высокоманнозного гликозилирования в пределах целевого диапазона.

Соотношение глюкозы к маннозе при плащечном анализе клеточной культуры.

Клеточная линия представляла собой клеточную линию СНО, экспрессирующую моноклональное антитело. Клетки высевали в концентрации $7,5 \times 10^5$ клеток/мл, в среду с известным химическим составом (CD), содержащую 12 г/л глюкозы при рабочем объеме 2 мл, в плашки с глубокими лунками. Клетки инкубировали в орбитальном шейкере при 36.0°C и 5% CO₂, при 220 об/мин (орбитальный диаметр 50 мм). На третий-четвертый день, концентрацию глюкозы измеряли с помощью Polychem Glucose Reagent Plate Assay (MedTest DX, Кантон, Мичиган), и культуру центрифугировали, чтобы заменить 26% использованной среды свежей CD средой. Аналогично, на 5-й день, 100% использованной среды было заменено на свежую CD-среду, которая не содержала глюкозу. Общая концентрация гексозы была затем скорректирована до 10 г/л, используя различные соотношения глюкозы к маннозе путем добавления из концентрированных гексозных стоковых растворов. Клеткам позволяли расти в течение 24 ч. Супернатанты были удалены, IgG был очищен и % высокоманнозного гликозилирования был измерен с помощью ана-

лиза с применением ЖХГВ.

ГХ-МС анализ гексоз.

Концентрации глюкозы и маннозы были вычислены в среде для культивирования клеток с помощью ГХ-МС. Чтобы осадить клетки, 1 мл культуры клеток центрифугировали, и супернатант фильтровали (0,2 мкм). Отфильтрованный супернатант разбавляли 1 к 10 дистиллированной водой, и 10 мкл этого разведения добавляли в 1,5 мл центрифужную пробирку. Добавляли 5-ти мкл аликвоту раствора гексозы внутреннего стандарта, содержащий 10 мМ D-[UL-13C6]маннозы 99,9% (Omicron Biochemicals) и 10 мМ D-[U-13C6] глюкозы 99,9% (Cambridge Isotope Labs). Образец высушивали (SpeedVac) в течение 30 мин. Производные гексоз получали путем добавления 20 мкл безводного пиридина и 30 мкл N-метил-N-(триметилсилил)трифлюоацетамида (MSTFA) с 1% триметилхлорсилана (TMS), с инкубированием при 40°C в течение 30 минут. Сразу после дериватизации, образцы были проанализированы с помощью системы Agilent GC 6890N MSD 5973. В Agilent DB-35 GC колонку был внесен 1 мкл образца (30м × 0,32 мм × 0,25 мкм) с 1 к 50 разделением. Гелий удерживали при постоянном потоке равном 1 мл/минута. Температура печи удерживалась при 190°C в течение 2 мин, и ее увеличивали до 202°C со скоростью 4°C/мин.

Температура дополнительно была увеличена до 280°C со скоростью 60°C/мин. Общее время работы составило 6,3 мин. Каждая гексозы дала два пика, представляющие как открытые, так и закрытые изомерные формы. Маннозу элюировали в течение 2,7 мин и 3,34 мин; глюкозу элюировали в течение 3,5 мин и 4,18 мин (фиг. 11(A)). Площадь пика с 3,34 мин была использована для количественного определения маннозы, а пик с 4,18 мин - для количественного определения глюкозы. Гексозы были количественно оценены с помощью типичного TMS углеводного фрагмента m/z=20416 и стандартного изотопного разбавления, где площадь пика m/z=204 сахара 12C сравнивали с площадью пика m/z=206 сахара 13C (фиг. 11(B)).

IdeS (FabRICATOR®) МС-ПАТ анализ с ограниченным протеолизом.

Отфильтрованные пробы среды для культивирования клеток анализировали без дополнительной очистки. Примерно 60 мкг каждой пробы фрагментировали 60 единицами IdeS фермента (fabRICATOR, Genovis, Лунд, Швеция) при 37°C в течение 30 минут. Фрагментированные пробы затем измельчали в 4 М гуанидин гидрохлориде с 50 мМ дитиотрейтола (DTT) при 55°C в течение 10 минут. Затем, фрагментированные и измельченные пробы анализировали с помощью RP-HPLC/MS.

RP-ВЭЖХ/МС анализ выполняли применяя Waters Acquity высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) (Милфорд, Массачусетс), соединенную с Agilent MST времяпролетным (TOF) масс-спектрометром (Санта-Клара, Калифорния). Приготовленные пробы были разделены на Waters ВЕН фениловой колонке с обращенной фазой (1,7 мкм, 2,1×150 мм; Милфорд, Массачусетс) и поддерживались при 80°C. Пики наблюдались с помощью УФ при 220 нм и TOF-МС. Данные масс были извлечены из общего ионного тока (ОИТ) пиков, после деконволюции и количественной оценки с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter.

Анализ карты гликанов с применением жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (ЖХГВ).

100 мкг очищенных антител фрагментировали с помощью PNGase F (New England Biolabs) с последующим добавлением 50 мкл раствора флуоресцентного мечения, содержащего 12 мг/мл 2-аминобензойной кислоты (2AA) с 0,04 М цианогидрида натрия. Эту смесь инкубировали при 80°C в течение 75 мин. Меченые гликаны были проанализированы с помощью Acquity UPLC, оснащенной детектором флуоресценции (Милфорд, Массачусетс). Примерно 3 мкл меченых гликанов было выведено в Acquity UPLC ВЕН Glycan Column (№ 186004741, Милфорд, Массачусетс), с последующим применением детектора флуоресценции, с использованием излучения в 360 нм и обнаружения при 425 нм. 2AA меченые типы гликанов были определены методом МС/МС.

Генерация данных для подгонки параметров модели, и последующая демонстрация МПУ для управления % высокоманозного гликозилирования проводились в биореакторах. Манноза (Sigma, M6020) была добавлена в первый день культивирования, в количестве, достаточном чтобы достичь концентрации культуры 1 г/л применяя 25% стоковый раствор. Перфузия была начата на второй день. Перфузионная среда поставлялась в увеличивающихся объемах от 0,5 до 1,0 объема биореактора в сутки. Биореактор контролировали с помощью автоматике Delta V (Emerson). Отбор проб из биореактора проводили каждые четыре часа, используя автоматический клапан MAST SP200 (Bend Research) для измерения титра, гексоз и гликанов продукта. После автоматизированного отбора проб, образцы центрифугировали вручную и фильтровали через 0,2 мкм фильтр, чтобы удалить клетки и клеточный мусор. Ежедневные пробы для измерения роста, жизнеспособности, осмолярности и количества лактата собирали вручную или с помощью MAST SP200. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и % жизнеспособности культуры измеряли, применяя Nova CDV (Nova Biomedical). Концентрацию лактата определяли с применением анализатора Nova Bioprofile Basic (Nova Biomedical).

Модель прогнозирующего управления.

Программирование для Модели Прогнозирующего Управления (МПУ) и подбор параметров модели были выполнены в MATLAB (версия R2014a, Mathworks), а код доступен в дополнительных материалах.

лах. Параметры модели определяли, применяя метод наименьших квадратов к уравнению модели, используя данные, полученные из одного тренировочного запуска реактора. Для контроля высокоманнозного гликозилирования, применяя маннозное кормление (через МПУ), ежедневные изменения уровня рассчитывали следующим образом:

1. Расчет смещения текущей модели. История эксплуатации реактора, в сочетании с ежедневными измеренными значениям (если были доступны), были использованы в качестве входных данных для создания численного решения модели дифференциальных уравнений. Затем могла быть рассчитана разница между моделью и самыми последними измерениями. Это различие было использовано в качестве оценки будущего смещения.

H_k - значение модели в момент времени $k=f(t_k)$.

H'_k =измеренное значение в момент времени k .

H_{k+1} =скорректированные предсказанные значения в момент времени $k+1=F(t_{k+1})+(H_k-H'_k)$.

2. Определение оптимальных будущих скоростей с помощью МПУ. Стандартный МПУ способ 17 убывающего горизонта был использован каждый день, как только было начато управление. Оптимальный набор из пяти изменений скорости определялся путем минимизации суммы квадратов ошибки между профилем качества продукции, предсказанного моделью, и целевого заданного значения. Не смотря на то, что были рассчитаны пять изменений скорости, было использовано только первое из них. К тому времени, как должно было быть реализовано следующее изменение скорости, новые данные уже были доступны, которые затем были использованы для пересчета оптимального набора будущих скоростей.

Скорость маннозного кормления была найдена путем ее обработки в качестве независимой переменной в минимизации целевой функции (которая в данном случае является суммой квадратов разности между желаемым уровнем высокоманнозных гликанов на молекуле, и которая найдена с помощью интегрирования регулирующих дифференциальных уравнений). Приведенные выше уравнения достаточно хорошо вели себя, таким образом, решения, полученного с помощью вычисляющих программ MATLAB, было достаточно для контроля до +/- 1% типов высокоманнозных гликанов на антителе. Способ управления высокоманнозным гликозилированием является односторонним - добавление маннозы в реактор увеличивает % высокоманнозных гликанов на антителе. Снижение % выработки высокоманнозных гликанов достигается за счет снижения концентрации маннозы (путем разбавления с помощью перфузии после снижения скорости подачи маннозы).

ГХ-МС определения количества гексоз.

Определение количества маннозы в реальном времени было необходимым вводным параметром для МПУ. Была использована ГХ-МС, чтобы различить гексозы (маннозу и глюкозу) в среде для культивирования клеток. Гексозы были определены методом изотопного разбавления, как описано выше. Фиг. 11(A) показывает базовое разделение маннозы с помощью ГХ, в пробах из клеточной культуры во время обычного пробега. Фиг. 11(B) показывает шаблон фрагментации гексоз (идентичный между маннозой и глюкозой), в котором m/z 204 пик был рассчитан, применяя m/z 206 пик из 13С меченого внутреннего стандарта. Предел обнаружения и маннозы, и глюкозы составлял 0,02 г/л, и была продемонстрирована линейность для количественной оценки при концентрации гексоз до 6 г/л (фиг. 11(B)).

Соотношения глюкозы к маннозе при пласечном анализе клеточной культуры.

Клетки культивировали при общей постоянной концентрации гексоз равной 10 г/л, но при увеличивающейся концентрации маннозы, чтобы обеспечить соотношения глюкозы:маннозы равные 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 и 0:10. Клетки культивировали в течение 24 ч с различными соотношениями гексоз. Супернатанты были удалены, IgG был очищен и % высокоманнозного гликозилирования был измерен с помощью ЖХГВ анализа. Фиг. 12(A) иллюстрирует линейную зависимость между концентрацией маннозы в среде для культивирования клеток, и общим уровнем высокоманнозного гликозилирования, при этом высокоманнозное гликозилирование было наименьшим и составляло 10% в среде, содержащей только глюкозу, и при этом высокоманнозное гликозилирование было наибольшим и составляло 37% в среде, содержащей только маннозу.

Для того чтобы установить, было ли увеличение высокоманнозного гликозилирования благодаря, или увеличению концентрации маннозы, или уменьшению концентрации глюкозы, клетки культивировали также как и для первого пласечного эксперимента, с исключением лишь для 5 дня, в который среда была заменена на свежую среду, содержащую 1, 3, 5, 7 или 10 г/л маннозы. Пять различных концентраций глюкозы (1, 3, 5, 7 или 9 г/л) были добавлены к каждой культуре, содержащей маннозу. Это было сделано в общей сложности для 25 различных культур с наименьшим общим количеством гексоз, равным 2 г/л (1 г/л глюкозы и 1 г/л маннозы, фиг. 12(B)), и наибольшим - 19 г/л (9 г/л глюкозы и 10 г/л маннозы, фиг. 12(B)). Клеткам позволяли расти в течение 24 ч. Супернатанты были удалены, IgG был очищен, и % высокоманнозного гликозилирования был измерен с помощью ЖХГВ анализа. Фиг. 12(B) показывает, что линейное увеличение высокоманнозного гликозилирования не зависит от концентрации глюкозы, и только зависит от концентрации маннозы в среде. Эта связь была использована для разработки контура управления МПУ.

Разработка контура управления: Модель прогнозирующего управления.

Для разработки контура управления, биореактор был соединен с MAST SP200 прибором автомати-

ческого отбора проб, насосом подачи маннозного раствора, помимо текущего контроля биореактора, и офф-лайн аналитики (фиг. 13). Был выполнен 15-ти дневный перфузионный пробег биореактора для того, чтобы сгенерировать тренировочные данные для разработки контура обратного управления МПУ, для одностороннего контроля высокоманнозного гликозилирования, используя маннозное кормление. Данные по % высокоманнозного гликозилирования (фиг. 14(А)), концентрации маннозы в реакторе (фиг. 14(Б)), клеточному росту (фиг. 14(В)) и накоплению титра (фиг. 14(Г)) были собраны с четырех часовыми интервалами, за исключением данных по гликанам, которые не собирались в течение периода с 9 по 11 день. Была разработана МПУ модель из набора данных, за исключением ростовых параметров, которые через ошибку, были рассчитаны по данным похожего запуска. Прогнозы модели с использованием обоих наборов ростовых параметров показаны на фиг. 14 и фактически идентичны.

Разработка контура управления: уравнения модели.

Были построены обыкновенные дифференциальные уравнения для описания скорости изменения количества клеток, продукта, концентрации маннозы, типов высокоманнозных гликанов.

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu N(N_m - N)}{N_m}$$

Здесь N - это плотность клеток, μ - это максимальная скорость роста, N_m - это максимальная плотность клеток. Плотность клеток может быть представлена в клетки/объем или объем/объем клеток. В данной работе, рассчитанный и произвольно масштабированный объем был вычислен из подсчета клеток и их диаметра, измеренных на Nova CDV. Предполагалось, что для титра, удельная производительность является постоянной, и переменная удержания продукта (которая зависит от используемого перфузионного фильтра) рассчитывается так:

$$\frac{dP}{dt} = q_p N - S D P$$

Концентрация продукта это P , и q_p это удельная производительность. S - коэффициент просеивания, который является частью продукта, которая проходит через перфузионный фильтр, а D - скорость перфузии в объемах реактора/день. Скорость изменения концентрации маннозы

$$\frac{dM}{dt} = D(M_f - M) - q_m N$$

Концентрация маннозы в реакторе - M , M_f это эффективная концентрации маннозы в перфузионной среде, а q_m удельная скорость потребления маннозы. Предполагается, что скорость потребления маннозы следует кинетике Михаэлиса-Ментен:

$$q_m = \frac{V_m M}{K_m + M}$$

Максимальная скорость реакции это V_m , и K_m это константа Михаэлиса-Ментен. Данные из плашек культуры клеток дают предположить, что относительная скорость производства типов высокоманнозных гликанов была пропорциональна концентрации маннозы (фиг. 12(Б)):

$$\frac{dH}{dP} = F_H M$$

Здесь H это концентрация типов высокоманнозных гликанов, и F_H это коэффициент пропорциональности высокоманнозных гликанов. Изучение раннее полученных данных (не показано) дало возможность предположить, что F_H меняется с плотностью клеток, так что было использовано следующие чисто эмпирическое уравнение для F_H :

$$F_H = K_1 * (K_2 + N)$$

K_1 и K_2 это эмпирические константы. Наконец, скорость изменения высокоманнозного гликозилирования находится по правилу цепочки:

$$\frac{dH}{dt} = \frac{dH}{dP} \frac{dP}{dt} = q_p K_1 (K_2 + N) M N$$

Все параметры модели были определены с помощью метода наименьших квадратов, используя тренировочные данные, показанные на фиг. 14. Параметры были найдены путем подгонки профиля роста клеток, показанного на фиг. 14(В). Значение q_p было найдено подгонкой кривой титра, показанной на фиг. 14(Г). Снижение титра после 12 дня обусловлено переходом от ультрафильтрирующей мембраны (для которой коэффициент просева, S , равняется нулю) к микрофильтрирующей мембране (с коэффициентом просеивания в диапазоне 0,76 до 0,78). Остальные параметры были найдены подгонкой этих уравнений к данным на фиг. 14(А) и фиг. 14(Б) одновременно.

Значения параметров, используемых в модели, и их 95% доверительные пределы приведены в табл. 4. Численные значения параметров модели и доверительные интервалы получены из тренировочных данных и применены для МПУ. Графики полученной модели, соответствующие тренировочным данным,

представлены на фиг. 14(пунктирные линии А-Г), в то время как совпадающие с ростовыми параметрами, использованные для МПУ, показаны пунктирными линиями. Подгонка параметров для постоянной Михаэлиса-Ментен маннозы, K_M , намного больше, чем использованные концентрации, поэтому кинетика потребления маннозы была фактически первого порядка. Тренировочные данные и последующая демонстрация МПУ были выполнены в одинаковых условиях, за исключением концентрации маннозы, которая служила как управляемое средство воздействия для высокоманнозного гликозилирования.

Таблица 4

Численные значения параметров модели и доверительные интервалы, полученные из тренировочных данных, и которые применены для МПУ

Параметр	Значение	95% доверительный интервал	Единица измерения
μ	0,7415 (0,7048) ¹	[0,67, 0,83]	1/день
N_M	13,8 (14,2) ¹	[12,5, 15,1]	МКО/л
q_p	0,1705	[0,167, 0,179]	г/МКО/день
V_M	102,5	N/A ²	г/л/день
K_M	1,47 x 10 ³	N/A ²	г/л
V_M/K_M^2	0,695	[0,062, 0,077]	1/день
K_1	0,00332	[0,0029, 0,0038]	л ² /г/МКО
K_2	4,2	[2,57, 5,84]	МКО/л

Приметка: МКО это Масштабированный Клеточный Объем, и рассчитывается из плотности клеток и среднего диаметра

Демонстрация МПУ для контроля уровня высокоманнозного гликозилирования.

После вывода значений параметров, петля обратной связи была использована в пробеге биореактора, чтобы активно отрегулировать % высокоманнозного гликозилирования к 6% \pm 1% для антител А. Перфузионное и маннозное кормление были начаты на 2 день производственной культуры. Начальная подача маннозы была установлена на скорости, достаточной для поддержания ее концентрации на примерно стабильном уровне в реакторе. Эта начальная скорость подачи маннозы оценивалась на основе предыдущего опыта с процессом и не являлась частью контура управления. Контур управления был запущен на 5-й день производства. Пробы отбирали ежедневно и анализировали, чтобы определить входные данные для МПУ модели. Задержка между отборами проб из реактора и скоростью изменения варьировала в пределах от 5 до 14 ч, со средним 8,5 ч. После того, как все необходимые данные были доступны, они были введены вручную в MATLAB для расчета будущих скоростей подачи маннозы. Полученная траектория % высокоманнозного гликозилирования, другие смоделированные величины, и результирующие кормовые концентрации на основе МПУ (рассчитываются из скорости кормления), приведены в фиг. 15. После того как управление было запущено, измеренный и смоделированный % высокоманнозного гликозилирования быстро увеличился и сохранился в пределах 1% для 6% целевого значения (фиг. 15(A)). Измеренные и смоделированные профили концентрации маннозы, поднимались и падали как ожидалось, в ответ на кормление маннозой (фиг. 15(B)). Рост клеток в значительной степени следовал предположенной логистической кривой, за исключением довольно значительного отклонения на 6 и 12 день (фиг. 15(B)). Измеренный титр соответствовал модели, хотя разрывы в последние несколько дней культивирования являются доказательством того, что модель была занижена по отношению к оценке производства белка (фиг. 15(G)). Корректировка состояния модели МПУ в соответствии с измерениями позволили достичь хорошего контроля высокоманнозного гликозилирования, несмотря на обнаруженные отклонения. Фиг. 16 иллюстрирует сравнение между процессом КАП и историческим пробным пробегом промышленного оборудования. Исторические запуски проводились с использованием обычного процесса, который аналогичен по конструкции и производительности КАП процессу, но без активного контура управления. Взамен, обычный процесс зависит от статических параметров процесса для выполнения пробега в пределах определенной погрешности для каждой партии, чтобы произвести нужный продукт, который должен будет проходить контроль качества для утверждения. С КАП процессом, качество продукта оценивается почти в реальном времени, и за счет активного контроля в процессе производства, не требует последующего аналитического исследования до реализации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ длительного периодического сбора рекомбинантного белка из клеточной культуры, включающий стадии, на которых
 - создают клеточную культуру путем инокулирования биореактора клетками млекопитающего, экспрессирующими рекомбинантный белок;
 - поддерживают клеточную культуру путем перфузии свежей культуральной среды в биореактор,

пропускания культуры клеток через фильтр и сбора пермеата,

причем нулевой пермеат изначально собирают до момента достижения первого заданного параметра, по достижении которого полученный пермеат собирают в течение predetermined времени,

после сбора полученного пермеата попеременно собирают нулевой пермеат до момента достижения второго заданного параметра, после чего собирают полученный пермеат в течение predetermined времени,

при этом чередование сбора нулевого пермеата и полученного пермеата продолжают до тех пор, пока культура клеток не исчерпает себя, где заданный параметр подбирают исходя из времени, плотности жизнеспособных клеток, объема клеточной массы или титра, и predetermined время составляет по меньшей мере от 12 до 72 ч.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что первый заданный параметр составляет по меньшей мере от 12 ч до 25 суток после создания клеточной культуры.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что второй заданный параметр составляет по меньшей мере от 12 ч до 72 ч после сбора полученного пермеата.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что при сборе нулевого пермеата фильтр представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека, позволяющие удерживать рекомбинантный белок в биореакторе.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что при сборе полученного пермеата фильтр представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что фильтр представляет собой моноблочную фильтрационную систему.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что, когда пермеат собирают из фильтра, который представляет собой фильтр с полыми волокнами, имеющими размер пор или молекулярную массу отсека, которые не позволяют удерживать рекомбинантный белок в биореакторе, свежая среда для культивирования клеток смешивается или дополняется таким образом, чтобы достичь по меньшей мере 5 г/л неионного блок-сополимера.

8. Способ по п.1 дополнительно включающий отбор проб во время процессов культивирования клеток, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и/или процесса культивирования клеток.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что процесс перфузии представляет собой непрерывную перфузию.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что процесс перфузии выполняют со скоростью меньшей или равной 1,0 рабочему объему в сутки.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что процесс перфузии выполняют с помощью перистальтического насоса, насоса с двойной мембраной, насоса с низкой скоростью сдвига или переменного тангенциального потока.

12. Способ по п.1, дополнительно включающий действие температурного сдвига на клеточную культуру, причем клетки культивируют:

а) при первой температуре в течение первого периода времени;

б) при второй температуре в течение второго периода времени.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что сдвиг температуры представляет собой ответ на заданный параметр, причем достижение заданного параметра определяется с помощью емкостного зонда биомассы.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что создание клеточной культуры начинается с инокуляции биореактора как минимум $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что клетки млекопитающего представляют собой клетки яичника китайского хомячка (СНО).

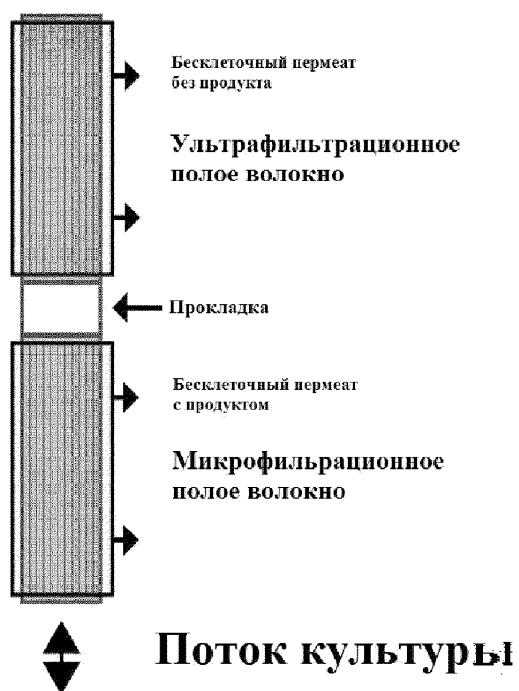
16. Способ по п.1, отличающийся тем, что рекомбинантный белок выбирают из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, рекомбинантно-слитого белка или цитокина.

17. Способ по п.1, отличающийся тем, что рекомбинантный белок очищают от полученного пермеата с помощью одного или нескольких способов, включающих флокуляцию, осаждение, центрифугирование, глубинную фильтрацию, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, анионообменную хроматографию в смешанном режиме, хроматографию гидрофобного взаимодействия или гидроксипатитную хроматографию.

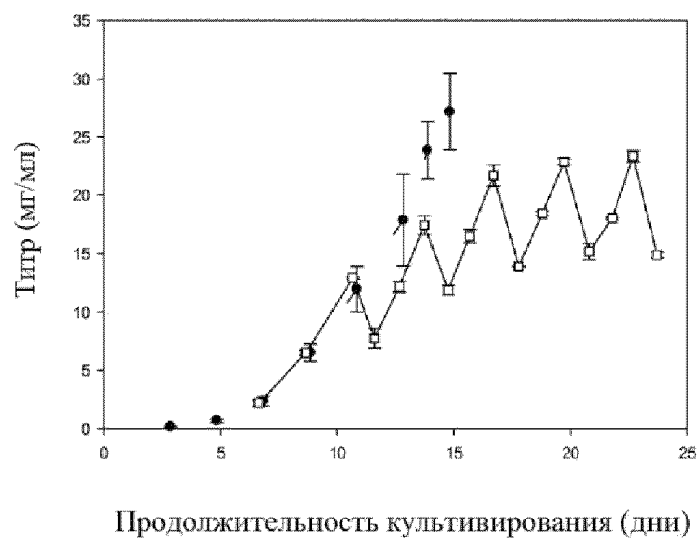
18. Способ по п.17, дополнительно включающий отбор проб во время процесса очистки, оценивание проб с целью количественного и/или качественного контроля характеристик рекомбинантного белка и процесса очистки.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что пробы количественно и/или качественно контролируются с применением аналитических методов.

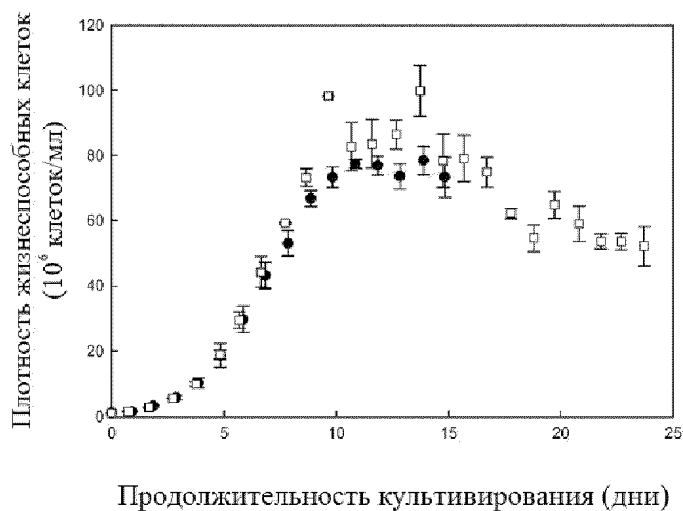
20. Способ по п.17, отличающийся тем, что рекомбинантный белок представлен в виде фармацевтически приемлемого препарата.



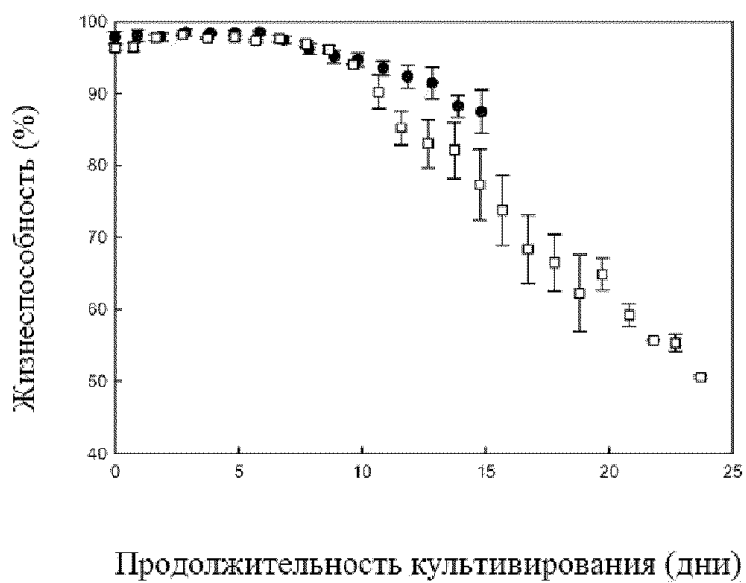
Фиг. 1



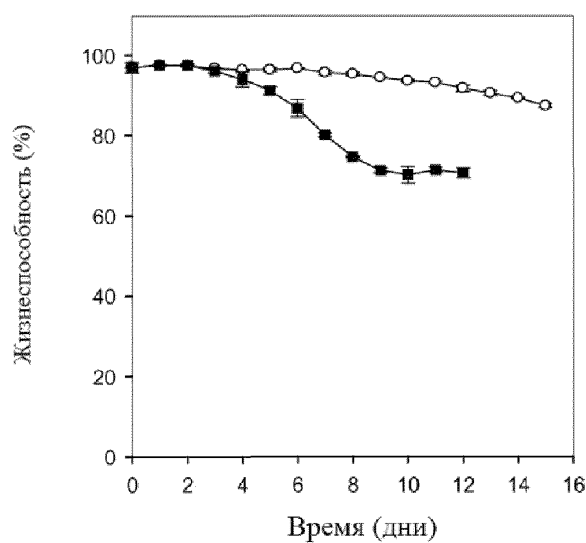
Фиг. 2



Фиг. 3

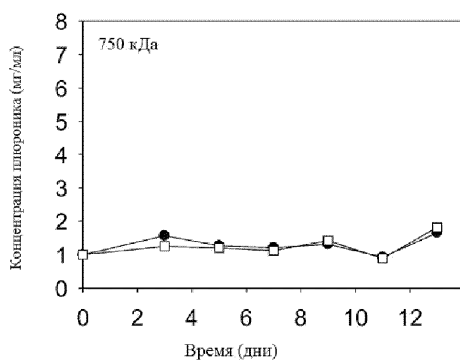
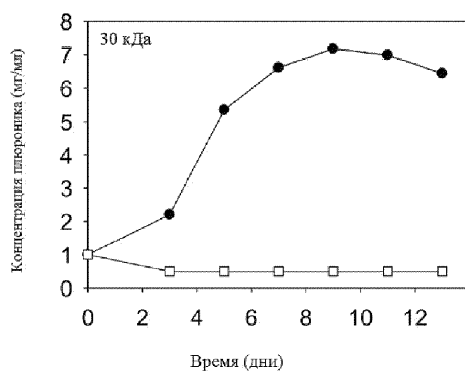


Фиг. 4

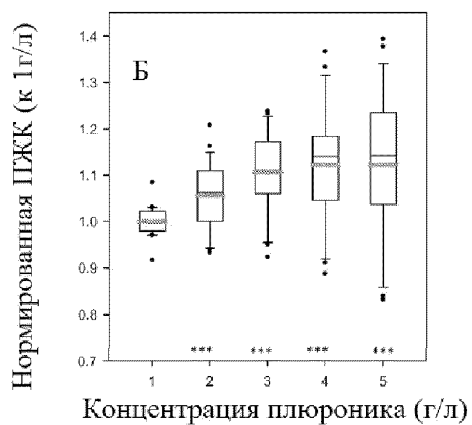
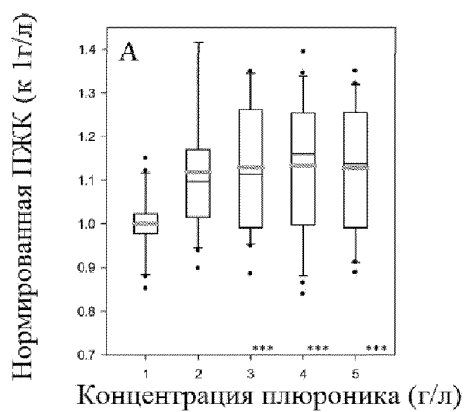


Фиг. 5

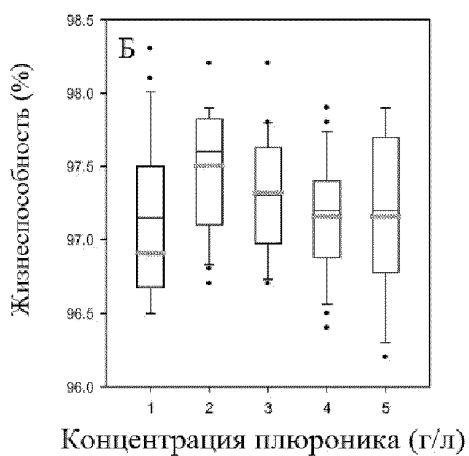
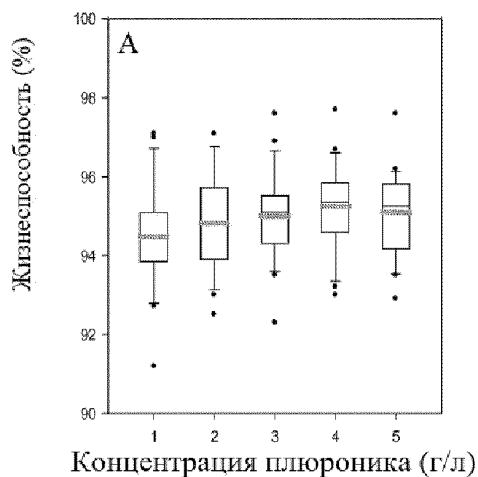
045844



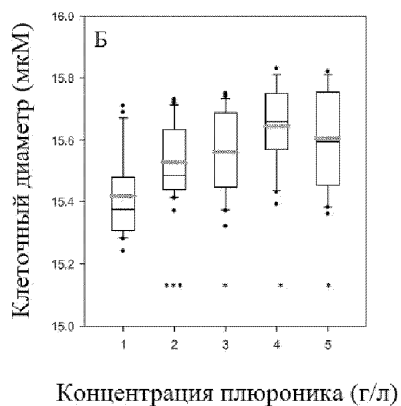
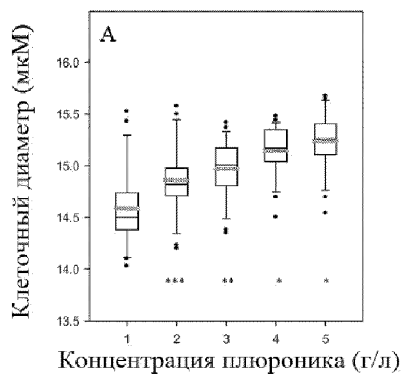
Фиг. 6



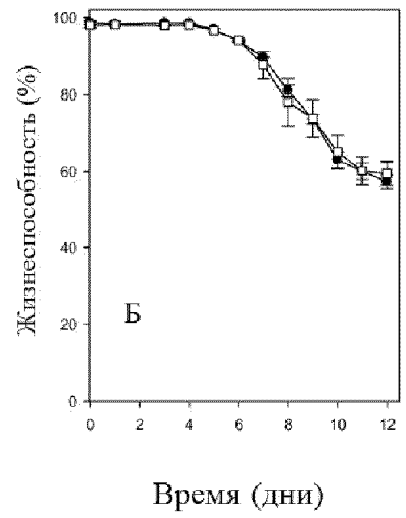
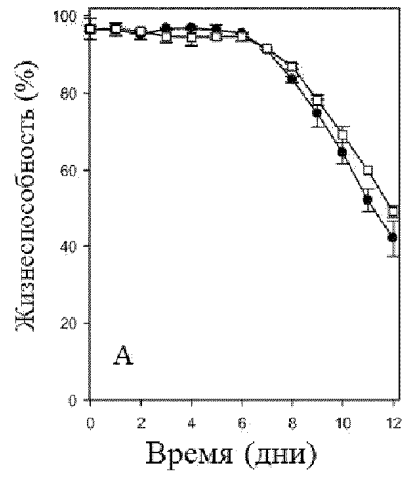
Фиг. 7А



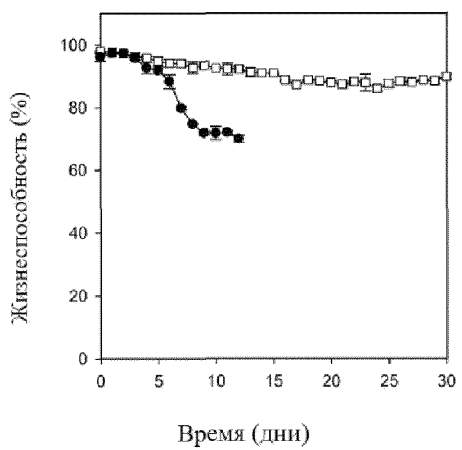
Фиг. 7Б



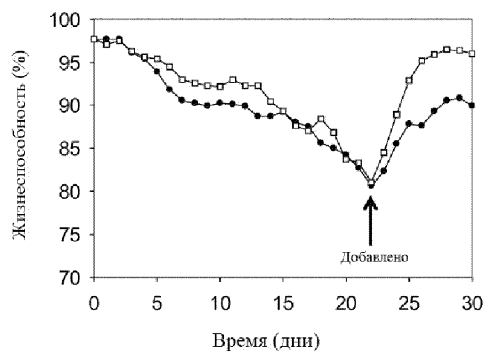
Фиг. 7В



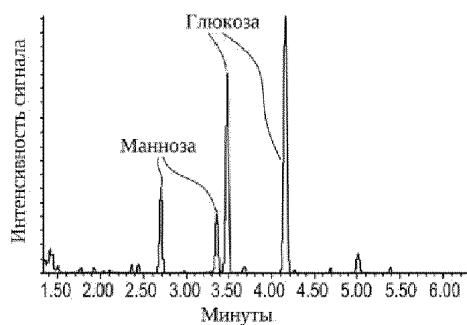
Фиг. 8



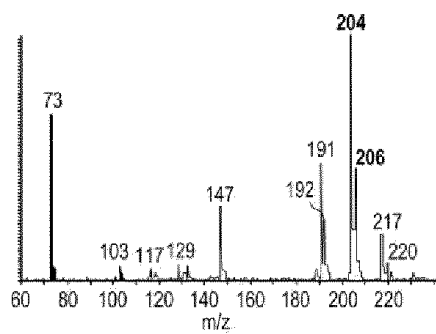
Фиг. 9



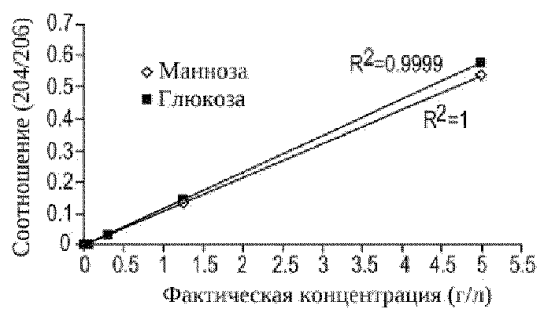
Фиг. 10



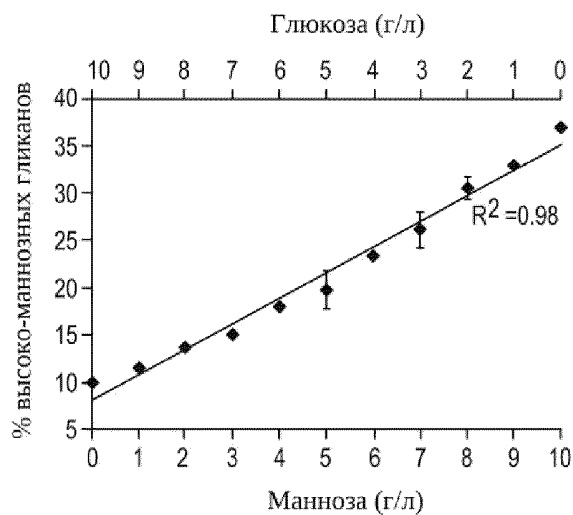
Фиг. 11А



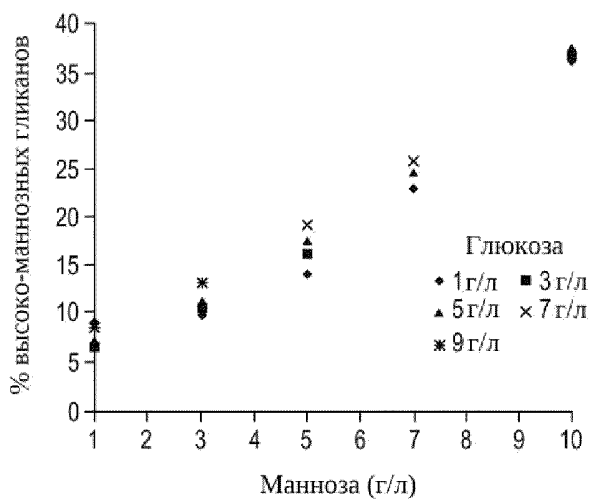
Фиг. 11Б



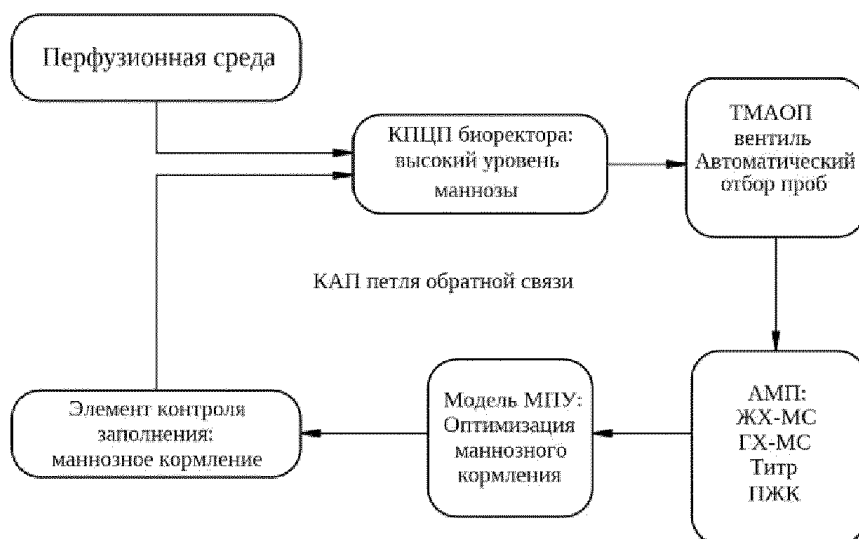
Фиг. 11В



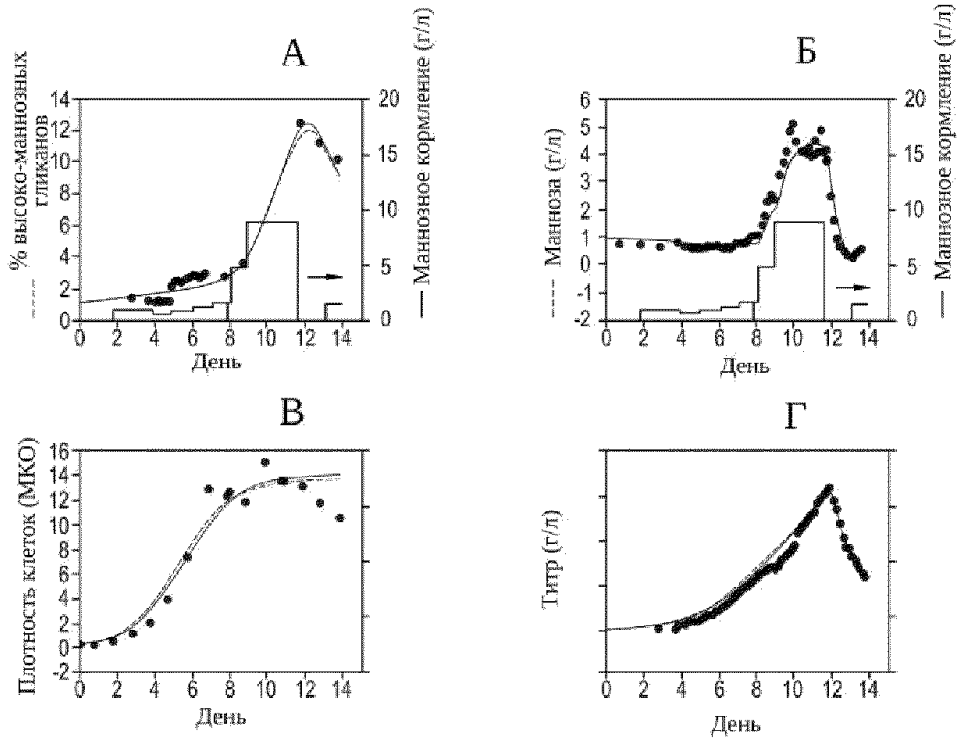
Фиг. 12А



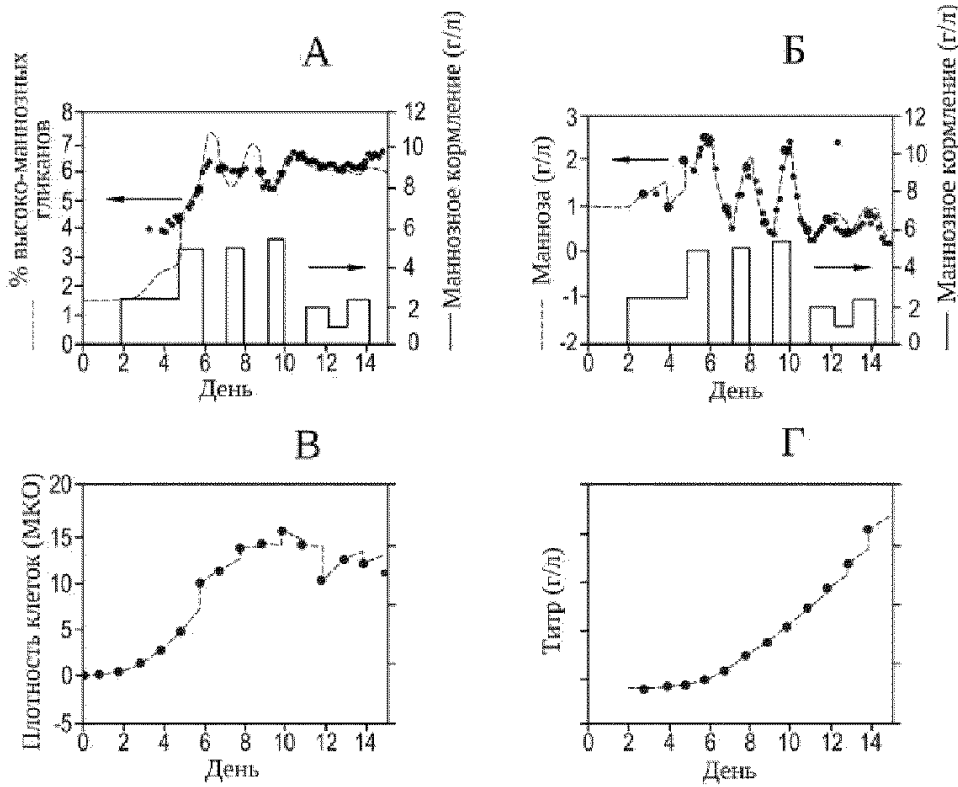
Фиг. 12Б



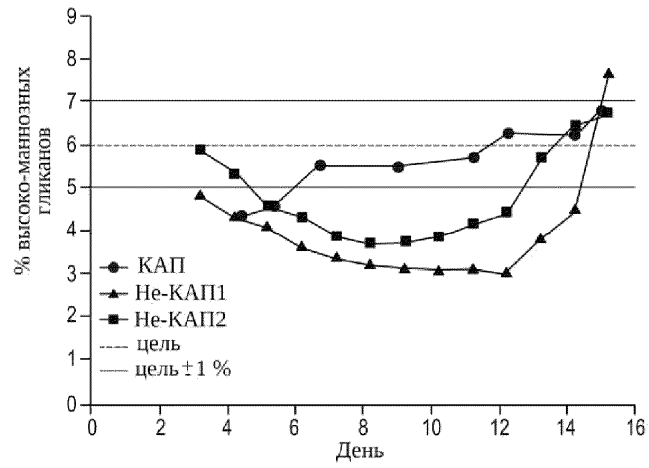
Фиг. 13



Фиг. 14А-Г



Фиг. 15А-Г



Фиг. 16

