

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046418**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.13

(51) Int. Cl. **C12N 5/00** (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)

(21) Номер заявки
201491144

(22) Дата подачи заявки
2012.12.14

(54) СПОСОБ ФЛОКУЛЯЦИИ

(31) 61/576,303

(32) 2011.12.15

(33) US

(43) 2014.09.30

(86) PCT/US2012/069916

(87) WO 2013/090820 2013.06.20

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

(72) Изобретатель:
**Макнерни Томас М., Петти Криста,
Томас Энн С., Чжао Сяоян (US)**

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

(56) WO-A2-0112778

EP-A1-1403274

BERRILL ALEX ET AL. "Ultra scale-down to define and improve the relationship between Flocculation and disc-stack centrifugation", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 24, no. 2, March 2008 (2008-03), pages 426-431, XP9167631, page 426, column 2, paragraph 3

US-A-5552316

RISKE ET AL. "The use of chitosan as a flocculant in mammalian cell culture dramatically improves clarification throughput without adversely impacting monoclonal antibody recovery", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 128, no. 4, 6 March 2007 (2007-03-06), pages 813-823, XP005916242, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2006.12.023 figures 1-6

YUKSELEN M.A. ET AL. "Formation and breakage of flocs using dual polymers", WATER SCIENCE & TECHNOLOGY, ELMSFORD, NY; US, vol. 53, no. 7, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 217-223, XP009167641, ISSN: 0273-1223, DOI: 10.2166/WST.2006.226 page 218, column 1, paragraph 3

WO-A1-2010082894

(57) Изобретение относится к способу сбора рекомбинантных белков из жидкой культуры клеток млекопитающих. Способ использует катионные полимеры, неионные полимеры и неионные поверхностно-активные вещества.

B1

046418

046418 B1

Данная заявка испрашивает приоритет по временной заявке США № 61/576303, поданной 15 декабря 2011 г., которая включена в данный документ в качестве ссылки.

Область техники

Изобретение относится к способу сбора рекомбинантных белков из культуральной жидкости клеток млекопитающего. Способ использует катионные полимеры, неионные полимеры и неионные поверхностно-активные вещества.

Уровень техники

Производство терапевтических белков для клинических целей представляет собой дорогостоящее крупномасштабное предприятие. Потребность в больших количествах терапевтических рекомбинантных белков вызвала развитие технологий обработки клеточных культур, что привело к резкому увеличению титров продуктов. Клеточные культуры с высокими титрами типично получают путем поддержания высокой плотности жизнеспособных клеток в течение более длительного времени культивирования. Также наблюдается соответствующее увеличение количества сухих веществ биомассы (жизнеспособные и нежизнеспособные клетки) и субмикронных частиц клеточных обломков. Более высокая нагрузка сухих веществ и субмикронных частиц клеточных обломков может создавать проблемы в процессе сбора культур клеток млекопитающих, делая процесс сбора менее эффективным по показателям удаления обломков, без существенной потери производительности.

Катионные полимерные флокулянты используются во многих областях применения от очистки питьевой воды, очистки сточных вод, использования в нефтяной, горнодобывающей и бумажной промышленности, косметике и медицине, и также использовались для инкапсулирования клеток млекопитающих и ферментов и для флокуляции клеточных культур микроорганизмов. Однако, при использовании в процессах сбора клеток млекопитающих в промышленных масштабах, продолжительные времена осаждения при флокуляции могут создавать проблемы, приводя к большим затратам времени на процесс сбора и меньшей эффективности по сравнению со стандартной практикой сбора.

Продолжает существовать потребность в усовершенствовании способов сбора культур клеток млекопитающих, особенно способов промышленного масштаба. Любые усовершенствования, позволяющие уменьшить время извлечения и/или увеличить выход, могут приводить к сокращению затрат, связанных с производством белковых терапевтических средств. Изобретение удовлетворяет эту потребность, предлагая быстрый и эффективный способ сбора клеточных культур.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среду клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление катионного полимера и неионного полимера к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для осаждения хлопьев, и извлечение осветленного супернатанта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среду клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление полидиаллилдиметиламмония хлорида и ПЭГ 3000 к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для осаждения хлопьев, и извлечение осветленного супернатанта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среду клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление полидиаллилдиметиламмония хлорида, ПЭГ 3000 и Тритона X-100 к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для осаждения хлопьев, и извлечение осветленного супернатанта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среду клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление катионного полимера и неионного полимера к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для первичного осаждения хлопьев, извлечение первичного осветленного супернатанта, промывание первичного осадка хлопьев, создание условий для вторичного осаждения промытых хлопьев, и извлечение вторичного осветленного супернатанта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий

культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среду кле-

точной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление катионного полимера и неионного полимера к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для первичного осаждения хлопьев, извлечение первичного осветленного супернатанта, промывание первичного осадка хлопьев, если выход продукта в первичном осветленном супернатанте составляет менее 80%, создание условий для вторичного осаждения промытых хлопьев, и извлечение вторичного осветленного супернатанта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий

культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среде клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление полидиаллилдиметиламмония хлорида и ПЭГ 3000 к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для первичного осаждения хлопьев, извлечение первичного осветленного супернатанта, промывание первичного осадка хлопьев, создание условий для вторичного осаждения промытых хлопьев, и извлечение вторичного осветленного супернатанта.

Настоящее изобретение также предусматривает способ сбора культуры клеток млекопитающих, включающий

культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среде клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление полидиаллилдиметиламмония хлорида, ПЭГ 3000 и Тритона X-100 к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для первичного осаждения хлопьев, извлечение первичного осветленного супернатанта, промывание первичного осадка хлопьев, создание условий для вторичного осаждения промытых хлопьев, и извлечение вторичного осветленного супернатанта.

В одном варианте исполнения, катионный полимер представляет собой полидиаллилдиметиламмония хлорид.

В другом варианте исполнения, неионный полимер выбирают из полиэтиленгликоля и декстрана.

В другом варианте исполнения, неионный полимер выбирают из ПЭГ 3000 и ПЭГ 6000.

В другом варианте исполнения, способ сбора культуры клеток млекопитающих, предусмотренный выше, дополнительно включает прибавление неионного поверхностно-активного вещества к среде клеточной культуры. В родственном варианте исполнения, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой Тритон X-100.

В другом варианте исполнения, катионный полимер и неионный полимер прибавляют одновременно.

В другом варианте исполнения, катионный полимер, неионный полимер и неионное поверхностно-активное вещество прибавляют одновременно.

В другом варианте исполнения, катионный полимер прибавляют первым и перемешивают в течение по меньшей мере 30 секунд, с последующим прибавлением неионного полимера.

В другом варианте исполнения, катионный полимер прибавляют первым и перемешивают в течение по меньшей мере 30 с, с последующим прибавлением неионного полимера и неионного поверхностно-активного вещества.

В другом варианте исполнения, катионный полимер представляет собой полимер диаллилдиметиламмония хлорида, полидиаллилдиметиламмония хлорид, полиэтиленмин, полиакриламид или хитозан.

В другом варианте исполнения, неионное поверхностно-активное вещество представляет собой сапонин или Тритон X100.

В другом варианте исполнения, полидиаллилдиметиламмония хлорид прибавляют в концентрации от равной или составляющей примерно 20 до равной или составляющей примерно 90 пг/общую плотность клеток.

В другом варианте исполнения, полидиаллилдиметиламмония хлорид прибавляют в концентрации, равной или составляющей примерно 25 пг/общую плотность клеток, где клетки млекопитающих происходят от диплоидной клеточной линии.

В другом варианте исполнения, полидиаллилдиметиламмония хлорид прибавляют в количестве от 43 пг/общую плотность клеток до 57 пг/общую плотность клеток, где клетки млекопитающих происходят от тетраплоидной клеточной линии.

В другом варианте исполнения, концентрация ПЭГ 3000 имеет значение от равного или составляющего примерно 3% до равного или составляющего примерно 4,5%.

В другом варианте исполнения, концентрация ПЭГ 6000 имеет значение от равного или составляющего примерно 2,5% до равного или составляющего примерно 3,5%.

В другом варианте исполнения, концентрация Тритона X100 составляет 0,05% (мас./об.).

В другом варианте исполнения, культуральная жидкость клеток млекопитающего имеет температуру в интервале значений от 36 до 20°C.

В другом варианте исполнения, культуральная жидкость клеток млекопитающего имеет температуру, равную или имеющую значение выше 20°C.

В другом варианте исполнения, хлопья первичного осадка промывают 9% раствором сахарозы.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 изображает структуру PDADMAC (полидиаллилдиметиламмония хлорида).

Фиг. 2А показывает разницу во временах осаждения, полученных для PDADMAC разного молекулярного веса. Концентрация PDADMAC для каждого молекулярного веса составляла 57 мг/общую плотность клеток. Закрашенные ромбики/пунктирная линия относятся к PDADMAC с молекулярным весом 100000-200000. Закрашенные квадраты и пунктирная линия относятся к PDADMAC с молекулярным весом 200000-300000. Закрашенные треугольники и сплошная линия относятся к PDADMAC с молекулярным весом 400000-500000.

Фиг. 2В показывает прозрачность супернатанта, достигнутую при флокуляции клеточной культуральной жидкостью с помощью PDADMAC разного молекулярного веса. Слева направо - столбики соответствуют PDADMAC с молекулярным весом <100000; 100000-200000; 200000-350000; и 400000-500000.

Фиг. 3А демонстрирует влияние концентрации высокомолекулярного PDADMAC на флокуляцию клеток размером 15-20 мкм. Закрашенные ромбики и пунктирная линия соответствуют PDADMAC при 11 мг/общую плотность клеток. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют PDADMAC при 18 мг/общую плотность клеток. Закрашенные треугольники со сплошной линией соответствуют PDADMAC при 25 мг/общую плотность клеток. Закрашенные кружки с пунктирной линией соответствуют PDADMAC при 39 мг/общую плотность клеток.

Фиг. 3В показывает влияние концентрации высокомолекулярного PDADMAC на флокуляцию клеток размером 21-24 мкм. Закрашенные ромбики и штрих-пунктирная линия соответствуют PDADMAC при 29 мг/общую плотность клеток. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют PDADMAC при 43 мг/общую плотность клеток. Закрашенные треугольники с пунктирной линией соответствуют PDADMAC при 57 мг/общую плотность клеток. Закрашенные кружки со сплошной линией соответствуют PDADMAC при 71 мг/общую плотность клеток. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют PDADMAC при 86 мг/общую плотность клеток.

Фиг. 4А показывает влияние на флокуляцию высокомолекулярного PDADMAC для клеточных культур, продуцирующих высокие уровни лактата. Закрашенные ромбики со сплошной линией соответствуют отсутствию добавленного лактата. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют лактату, введенному в дозе 3 г/л. Закрашенные треугольники с пунктирной линией соответствуют лактату, введенному в дозе 6 г/л. Закрашенные кружки с пунктирной линией соответствуют лактату, введенному в дозе 9 г/л.

Фиг. 4В показывает влияние на флокуляцию высокомолекулярного PDADMAC для клеточных культур, имеющих высокую плотность клеток, измеренную по упакованному объему клеток (PCV). Закрашенные ромбики с пунктирной линией соответствуют 44% PCV. Закрашенные треугольники с пунктирной линией соответствуют 33% PCV. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют 22% PCV. Закрашенные кружки со сплошной линией соответствуют 11% PCV.

Фиг. 5 показывает влияние различных разбавителей на флокуляцию высокомолекулярным PDADMAC для процесса культивации клеток с высокими уровнями лактата. Закрашенные треугольники со штрих-пунктирной линией соответствуют сахарозе. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют клеточной культуральной среде без разбавителей. Закрашенные ромбики с пунктирной линией соответствуют бетанину. Закрашенные кружки с пунктирной линией соответствуют ПЭГ 1000. Закрашенные треугольники со сплошной линией соответствуют ПЭГ 6000. Закрашенные треугольники с пунктирной линией соответствуют декстрану 70 и бетанину.

Фиг. 6 показывает влияние флокуляции с использованием PDADMAC/ПЭГ для клеточных культур с PCV, равным 43,2%. Закрашенные ромбики с пунктирной линией соответствуют одному PDADMAC. Закрашенные квадраты с пунктирной линией соответствуют сахарозе. Закрашенные треугольники со сплошной линией соответствуют PDADMAC/ПЭГ.

Фиг. 7 показывает влияние порядка прибавления PDADMAC и ПЭГ. Болюсное добавление PDADMAC и ПЭГ (1-стадийный способ) представлено закрашенными треугольниками и пунктирной линией. Прибавление PDADMAC, а затем прибавление ПЭГ (2-стадийный способ) представлено закрашенными квадратами и пунктирной линией. Использование одного PDADMAC представлено закрашенными ромбиками со сплошной линией.

Фиг. 8 показывает влияние прибавления Тритон X-100. Прибавление PDADMAC/ПЭГ представлено закрашенными квадратами со сплошной линией. Прибавление PDADMAC/ПЭГ/Тритон X-100 представлено закрашенными треугольниками с пунктирной линией.

Подробное описание изобретения

Изобретение предлагает простой способ сбора методом флокуляции, предназначенный для увеличения эффективности операции извлечения в процессах культивации клеток с высокой клеточной мас-

сой. Предусматривается способ сбора культуры клеток млекопитающих, который использует катионные полимеры в комбинации с неионными полимерами для флокуляции клеточной культуральной жидкости. Также предусматривается использование катионных полимеров в комбинации с как неионными полимерами, так и неионными поверхностно-активными веществами.

Изобретение основано на открытии того, что использование неионного полимера или неионного полимера и неионного поверхностно-активного вещества в комбинации с катионным полимером для флокуляции культуральной жидкости клеток млекопитающего уменьшает время осаждения хлопьев с 24 ч или больше до менее чем 1 ч, в некоторых случаях - до 15 мин, независимо от плотности клеток в процессе культивации (упакованный объем клеток до 44%) или уровней лактата (10 г/л). Использование неионных полимеров также приводило к удалению агрегатов высокого порядка и белков клеток-хозяев, которые выделяются при очистке вместе с желательным рекомбинантным продуктом. Данный простой способ сбора увеличивает эффективность операции извлечения для процессов культивации клеток, особенно, коммерческих процессов с высокой клеточной массой клеточных культур.

Флокуляция представляет собой процесс, при котором частицы в суспензии образуют более крупные по размеру агрегаты или кластеры. При флокуляции частицы выделяются из суспензии в форме флокул в результате прибавления флокулирующего агента или флокулянта. Флокулянты могут быть анионными или катионными полимерами. Существуют природные флокулянты, такие как альгинаты или хитозан; минеральные флокулянты, такие как коллоидные глины и активированный кремнезем; и синтетические флокулянты, такие как полиакриламиды и полидиаллилдиметиламмония хлорид. Синтетические флокулянты могут быть изготовлены с определенными молекулярными весами (в зависимости от длины цепи) и молекулярными распределениями.

Катионные полимеры взаимодействуют с отрицательно заряженными частицами, такими как органические вещества. В клеточной культуральной жидкости, катионные полимеры взаимодействуют с отрицательно заряженными частицами, такими как жизнеспособные и нежизнеспособные клетки, клеточные метаболиты и клеточные обломки, такие как нуклеиновые кислоты, белки и липосомы. Флокуляция отрицательно заряженных соединений, присутствующих в клеточной культуральной жидкости, с катионными полимерами происходит в результате ионного взаимодействия или путем образования мостиковых связей с отрицательно заряженными частицами; в результате "очагового" связывания катионного полимера, приводящего к флокуляции; или вследствие нейтрализации заряда крупных отрицательно заряженных частиц, приводящей к выпадению нейтрализованных частиц из раствора. Хлопья, создаваемые катионным полимером, соединяющим отрицательно заряженные частицы, образуют более крупные флокулы и имеют повышенную чувствительность к сдвиговым нагрузкам, что приводит к разрушению флокул с образованием более высоких уровней содержания медленнее оседающих более мелких частиц. При "очаговом" связывании или нейтрализации заряда, катионные полимеры с высокими плотностями заряда взаимодействуют с анионными участками частиц в суспензии, и при этом или нейтрализуют заряд частицы, или образуют более крупные частицы, выпадающие в осадок из раствора. Флокулы, образующиеся таким образом, имеют меньший объем флокулированных частиц и труднее поддаются разрушению под действием сдвиговой нагрузки. Например, прибавление полидиаллилдиметиламмония хлорида (PDADMAC) к клеточной культуральной жидкости флокулирует отрицательно заряженные клетки и клеточные обломки в более крупные частицы по механизму образования электростатических "очаговых" связей (Ramsden et al. (1998), *Biotechnology Techniques*, 12(8):599-603. PDADMAC также флокулирует отрицательно заряженные субмикронные частицы с образованием сырьевого потока со значительно более высокой производительностью сбора фильтровального тракта по сравнению с типичным сбором путем центрифугирования сырьевого потока. Флокуляция в результате ионных взаимодействий может быть нарушена путем увеличения концентрации соли или изменения pH.

Прибавление катионного полимера, такого как полидиаллилдиметиламмония хлорид, к культуральной среде для клеток млекопитающих, которая содержит или содержала клетки, экспрессирующие рекомбинантные белки, флокулирует отрицательно заряженные частицы, включая клетки (жизнеспособные и нежизнеспособные), клеточные метаболиты и клеточные обломки. Такие крупные флокулированные частицы могут быть удалены центрифугированием или гравитационным осаждением. Скорость осаждения или время, необходимое для осаждения флокулированных клеток и клеточных обломков, зависит от плотности клеток, клеточных обломков и клеточных метаболитов. При низких плотностях клеток, типичных для периодического процесса культивации клеток, флокулированный материал типично выпадает в осадок (без дальнейшего осаждения) в некоторый момент времени в интервале от 4 часов до 24 часов, типично, примерно 20-24 часов. Скорости осаждения значительно снижаются для процессов культивации клеток, продуцирующих высокие плотности клеток биомассы (упакованный объем клеток >10%), субмикронных клеточных обломков и/или высокие уровни лактата (>2-3 г/л). Процессы культивации клеток, которые продуцируют высокие плотности клеток или имеют повышенные уровни лактата, требуют значительного разбавления клеточного бульона для того, чтобы флокулы оседали за 24 ч. Несмотря на простоту использования катионных полимеров, таких как PDADMAC, в качестве альтернативы традиционным способам сбора, более продолжительные времена осаждения могут быть менее желательными в промышленном масштабе.

Изобретение предусматривает, что размеры флокулированных частиц и скорость роста размера частиц в материале, флокулированном катионным полимером, значительно возрастают в присутствии неионных полимеров и неионных поверхностно-активных веществ. Времена гравитационного осаждения флокул, составляющие менее 2 ч, регулярно наблюдались при использовании PDADMAC в комбинации с неионными полимерами, такими как полиэтиленгликоли, и неионными поверхностно-активными веществами, такими как Тритон X100, несмотря на высокую плотность биомассы/клеток, которая значительно увеличивала время осаждения при флокуляции под действием одного только PDADMAC. Сдвиговые усилия, которые могли бы разрушать флокулы и/или уменьшать скорости флокуляции, были допустимыми при прибавлении неионных полимеров и неионных поверхностно-активных веществ. Регулярно достигались величины выхода собираемого продукта 80-90% или больше при существенно меньшем содержании ДНК хозяина. Прибавление неионного полимера также снижало содержание белков клеток-хозяев и некоторых высокомолекулярных материалов.

В используемом тут значении, "катионные полимеры" представляют собой положительно заряженные полимеры, которые связываются с отрицательно заряженными суспендированными частицами. Катионные полимеры включают, без ограничений, полимеры диаллилдиметиламмония хлорида (DADMAC). В предпочтительном варианте исполнения, полимеризация DADMAC приводит к образованию N-замещенной пирролидиновой структуры, PDADMAC (фиг. 1). Катионные полимеры также включают полиэтиленимин (PEI), полиакриламид (PAA) и хитозан.

Концентрации от равной или составляющей примерно 20 пг до равной или составляющей примерно 90 пг PDADMAC на общую плотность клеток приводили к низкой мутности супернатанта и хорошему осаждению флокул. "Общая плотность клеток" представляет собой сумму жизнеспособных клеток плюс нежизнеспособных клеток, измеренных по исключению трипанового синего с использованием счетчика и анализатора клеток Cedex. В одном варианте исполнения, для мелких клеточных линий, таких как диплоидная клеточная линия, PDADMAC прибавляют в количестве, равном или составляющем примерно 25 пг/общую плотность клеток. В другом варианте исполнения, PDADMAC прибавляют в количестве от равного или составляющего примерно 43 до равного или составляющего примерно 57 пг/общую плотность клеток для более крупных клеточных линий, таких как тетраплоидная клеточная линия.

PDADMAC с молекулярными весами 200000-500000, влияет на параметры флокуляции путем увеличения скорости седиментации и прозрачности супернатанта, по сравнению с более низкомолекулярными формами. В одном варианте исполнения, молекулярный вес PDADMAC находится в интервале значений от 400000 до 500000. В другом варианте исполнения, используется PDADMAC, имеющий молекулярный вес в интервале значений 400000-500000 при конечной концентрации, равной 22 пг/общую плотность клеток. В другом варианте исполнения, PDADMAC, имеющий молекулярный вес в интервале значений 400000-500000, используется при конечной концентрации, равной 25 пг/общую плотность клеток. В другом варианте исполнения, PDADMAC, имеющий молекулярный вес в интервале значений 400000-500000, используется при конечной концентрации, равной 45 пг/общую плотность клеток.

В используемом тут значении, "скорость осаждения", "скорость гравитационного осаждения" и "скорость осаждения упакованных флокул" используются взаимозаменяемо. Скорости осаждения могут быть определены способами, известными специалистам и описанными в данном документе. Например, гравитационное осаждение проводится при 1×g. Скорости осаждения определяют путем деления объема флокул на общий объем, измеренный в стеклянном градуированном цилиндре на 0,5 или 1 л. Общий объем представляет собой объем клеточного бульона, включающего все флокулирующие/осаждающие агенты.

"Время осаждения" представляет собой время, необходимое для осаждения флокул. Время осаждения считается достигнутым тогда, когда величина скорости осаждения флокул имеет значение, меньшее или равное 1% в час. Времена осаждения, составляющие всего 15 мин для флокуляции с помощью PDADMAC в комбинации с дозированием неионного полимера или неионных полимеров в комбинации с неионными поверхностно-активными веществами, описаны в данном документе. Малое время осаждения наблюдается несмотря на высокую плотность биомассы/клеток, которая значительно увеличивает время осаждения флокул с помощью одного PDADMAC. Сдвиговые усилия, которые разрушают флокулы и/или снижают скорости флокуляции, становятся допустимыми при прибавлении неионных полимеров или неионных поверхностно-активных веществ.

Прозрачность супернатанта является независимой от скорости осаждения, но зависит от уровня дозирования катионного полимера. Другие факторы, такие как температура, плотность жидкой клеточной культуры и вязкость, оказывают незначительное влияние на скорость осаждения или прозрачность супернатанта. Доза PDADMAC, в частности, является функцией объема клеток, общей плотности клеток (жизнеспособных и нежизнеспособных клеток), и концентрации субмикронных частиц клеточных обломков.

В используемом тут значении, "неионный полимер" относится к гидрофильным полимерам, которые усиливают взаимодействия между молекулами, ускоряя осаждение. Неионные полимеры включают, без ограничений, полиэтиленгликоли (ПЭГ) мальтодекстран, крахмалы, метилцеллюлозы и декстраны.

Повышенные скорости осаждения были достигнуты в тех случаях, когда ПЭГ или декстраны при-

бавляли в культуральную среду клеток млекопитающих одновременно с прибавлением катионного полимерного флокулянта, или после него. Выход продукта зависел от концентрации неионного полимера, молекулярного веса ПЭГ, порядка прибавления неионного полимера и PDADMAC (одновременно или сначала PDADMAC, а затем неионный полимер) и длительности клеточной культуры или уровня содержания обломков в клеточной культуральной жидкости.

ПЭГ 3000 пригоден для использования в интервале значений от равного или составляющего примерно 3 до равного или составляющего примерно 4,5% (мас./об.). ПЭГ 6000 пригоден для использования в интервале значений от равного или составляющего 2,5% до равного или составляющего примерно 3,5% (мас./об.). В одном варианте исполнения, ПЭГ 3000 используется в конечной концентрации, равной 3% (мас./об.). В другом варианте исполнения, ПЭГ 3000 используется в конечной концентрации, равной 15% (мас./об.). В другом варианте исполнения, ПЭГ 3000 используется в конечной концентрации, равной 25% (мас./об.).

В используемом тут значении, "неионное поверхностно-активное вещество" относится к органическим соединениям, которые являются амфифильными, что означает, что они содержат как гидрофобные группы, так и гидрофильные группы, и включают, без ограничений, сапоин и Тритон X100. В одном варианте исполнения, Тритон X-100 используется при конечной концентрации, равной 0,05% (мас./об.).

Неионный полимер может быть прибавлен сам или в комбинации с неионным поверхностно-активным веществом. Любой из них может быть прибавлен одновременно с катионным полимером или после прибавления катионного полимера. Неионный полимер и поверхностно-активное вещество оба могут быть прибавлены быстро, при времени прибавления, составляющем 1 мин или меньше.

После осаждения хлопьев (первичное осаждение), осветленный супернатант может быть собран. Для увеличения выхода рекомбинантного продукта, флокулы могут быть промыты или ресуспендированы для удаления любых остатков рекомбинантного продукта. Пригодные разбавители для промывки включают сахарозу, ПЭГ, клеточную культуральную среду и буферный солевой раствор. В одном варианте исполнения, разбавитель для промывки представляет собой 9% сахарозу. Флокулы и разбавитель для промывки перемешивают в течение периода времени от <1 до 60 мин и оставляют для осаждения в течение от примерно 1 до 24 ч. После осаждения флокул (вторичное осаждение), осветленный вторичный супернатант собирают. Супернатанты от первичного и вторичного осадений могут быть объединены или очищены раздельно.

Осветленный супернатант может быть собран путем удаления супернатанта откачиванием с помощью насоса или декантированием с последующей фильтрацией через объемный фильтр, содержащий диатомовую землю, а затем 0,2 мкм отсекающий мембранный фильтр или просто 0,2 мкм отсекающий фильтр.

Очистку от катионного полимера можно контролировать способами, известными специалистам, такими как анализы для контроля токсичности клеток млекопитающих; анализы для определения ингибирования транскрипции ДНК или РНК ДНК-полимеразой или обратной транскрипции, и с помощью анализов, определяющих трансляцию белка мРНК; и способами, описанными в данном документе. Например, удаление PDADMAC из промежуточных продуктов процесса очистки рекомбинантного белка можно контролировать по ингибированию амплификации ДНК с использованием количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР).

Клеточная культуральная жидкость может быть использована непосредственно из биореактора или она может быть охлаждена перед флокуляцией. В предпочтительном варианте исполнения, интервал температур для клеточной культуральной жидкости ограничен значениями от равного или составляющего примерно 36°C до равного или составляющего примерно 20°C. В другом варианте исполнения, клеточную культуральную жидкость охлаждают до температуры, равной или составляющей примерно 20°C.

Настоящее изобретение предусматривает способ сбора рекомбинантных белков их клеточных культур млекопитающих. Типичные способы, используемые в промышленных процессах продуцирования рекомбинантных белков в культурах клеток млекопитающих, включают периодическую культуру, подпитываемую и перфузионную культуру. Периодическая культура представляет собой прерывистый способ, в котором клетки выращиваются в постоянном объеме питательной среды в течение короткого периода времени с последующим полным сбором продукта. Сбор продукта типично проводится в момент, когда достигается максимальная плотность клеток (типично, $5-10 \times 10^6$ клеток/мл). Подпитываемая культура предусматривает болюсную или непрерывную подачу среды для восполнения тех компонентов среды, которые были израсходованы. Поскольку подпитываемые культуры получают дополнительные питательные вещества на протяжении рабочего цикла, они обладают потенциалом достижения более высоких значений плотности клеток ($>10-30 \times 10^6$ клеток/мл) и более высоких титров продуктов, по сравнению с периодическим способом. При перфузионных способах, типичные стратегии крупномасштабных промышленных клеточных культур направлены на достижение высокой плотности клеток, $60-90(+)\times 10^6$ клеток/мл, когда биомасса занимает от почти пятидесяти до более чем половины объема реактора. Для перфузионных культур были достигнуты предельно высокие плотности клеток, составляющие $>1 \times 10^8$ клеток/мл, и прогнозируется возможность получения еще более высоких плотностей.

В используемом тут значении, "пептид", "полипептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к молекуле, содержащей два или больше аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также включают модификации, включая, без ограничений, гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксихилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксильное и АДФ-рибозилирование.

Полипептиды могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на белковой основе. Полипептиды включают, в числе прочего, антитела, слитые белки и цитокины. Пептиды, полипептиды и белки продуцируются рекомбинантными животными клеточными линиями с использованием способов клеточных культур и могут быть названы "рекомбинантными пептидами", "рекомбинантными полипептидами" и "рекомбинантными белками". Экспрессируемый белок (белки) может продуцироваться внутриклеточно или секретироваться в культуральную среду, из которой он может быть выделен и/или собран.

Примеры полипептидов, которые могут быть собраны с использованием способов по изобретению, включают белки, содержащие аминокислотные последовательности, идентичные или в существенной степени подобные всему или части одного из следующих белков: фактор некроза опухоли (ФНО), лиганд *flt3* (WO 94/28391), эритропоэтин, тромбopoэтин, кальцитонин, IL-2, ангиопоэтин-2 (Maisonpierre et al. (1997), *Science* 277(5322): 55-60), лиганд активатора рецептора NF-каппа В (RANKL, WO 01/36637), фактор некроза опухоли (ФНО)-родственный апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL, WO 97/01633), тимусный стромальный лимфopoэтин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, патент Австралии № 588819), фактор роста мастоцитов, фактор роста стволовых клеток (патент США № 6204363), эпидермальный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, мегакариотический фактор роста и развития, RANTES, человеческий фибриноген-подобный белок 2 (FGL2; № доступа NCBI NM 00682; Rüegg and Pytela (1995), *Gene* 160:257-62) гормон роста, инсулин, инсулиноподобные факторы роста, паратгормон, интерфероны, включая α -интерфероны, γ -интерферон и консенсус-интерфероны (патенты США №№ 4695623 и 4897471), фактор роста нервов, мозговой нейротрофический фактор, синаптоагмин-подобные белки (SLP 1-5), нейротрофин-3, глюкагон, интерлейкины, колониестимулирующие факторы, лимфотоксин- β , фактор, ингибирующий лейкозы, и онкостатин-М. Описания белков, которые могут продуцироваться в соответствии со способами по изобретению, приведены, например, в *Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research*, все тома (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); и *The Cytokine Handbook. Vols. 1 и 2* (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003).

Дополнительно, способы по изобретению будут полезны для сбора белков, содержащих всю или часть аминокислотной последовательности рецептора любого из вышеупомянутых белков, антагониста такого рецептора или любого из вышеупомянутых белков и/или белков, в существенной степени подобных таким рецепторам или антагонистам. Такие рецепторы и антагонисты включают: обе формы рецептора фактора некроза опухоли (TNFR, обозначаемые как p55 и p75, патент США № 5395760 и патент США № 5610279), рецепторы интерлейкина-1 (IL-1) (типы I и II; патент EP № 0460846, патент США № 4968607, и патент США № 5767064), антагонисты рецептора IL-1 (патент США № 6337072), антагонисты или ингибиторы IL-1 (патенты США №№ 5981713, 6096728 и 5075222) рецепторы IL-2, рецепторы IL-4 (патент EP № 0367566 и патент США № 5856296), рецепторы IL-15, рецепторы IL-17, рецепторы IL-18, рецепторы Fc, рецептор гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, рецепторы онкостатина-М и фактора, ингибирующего лейкозы, активатор рецептора NF-каппа В (RANK, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин (патент США № 6015938), рецепторы TRAIL (включая рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4) и рецепторы, содержащие домены смерти, такие как Fas или апоптоз-индуцирующий рецептор (AIR).

Другие белки, которые могут быть собраны с использованием изобретения, включают белки, содержащие все или часть аминокислотных последовательностей дифференцировочных антигенов (называемых CD-белками) или их лигандов или белков, в существенной степени подобных любым из них. Такие антигены раскрыты в: *Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996)*. Подобные CD-белки раскрыты в материалах последующих семинаров. Примеры таких антигенов включают CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 и их лиганды (лиганд CD27, лиганд CD30 и т.д.). Несколько антигенов CD являются членами семейства рецепторов ФНО, которое также включает 41BB и OX40. Лиганды часто являются членами семейства ФНО, как в случае лиганда 41BB и лиганда OX40.

Ферментативно активные белки или их лиганды также могут быть собраны с использованием изобретения. Примеры включают белки, содержащие весь или часть одного из следующих белков или их лигандов или белков, в существенной степени подобных одному из них: члены семейства дезинтегринового и металлопротеиназного домена, включая ФНО-альфа-конвертирующий фермент, различные киназы, глюкоцереброзидаза, супероксиддисмутаза, активатор тканевого плазминогена, фактор VIII, фактор IX, аполипопротеин E, аполипопротеин А-I, глобины, антагонист IL-2, антитрипсин альфа-1, лиганды

любого из вышеупомянутых ферментов и многочисленные другие ферменты и их лиганды.

Термин "антитело" включает ссылки на как гликозилированные, так и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса или их антигенсвязывающий участок, которые конкурируют с интактным антителом за специфическое связывание, если не указано иное, включая человеческие, гуманизированные, химерные, мультиспецифические, моноклональные, поликлональные, и их олигомеры или антигенсвязывающие фрагменты. Он также включает белки, имеющие антигенсвязывающий фрагмент или участок, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, одноцепочечные молекулы антител, фрагменты участков, определяющих комплементарность (CDR), scFv, диатела, триатела, тетра-тела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть иммуноглобулина, которая является достаточной для придания антигену способности специфически связывать полипептид-мишень. Термин "антитело" включает, без ограничений, материалы, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные с использованием рекомбинантных средств, таких как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной с целью экспрессии антитела.

Примеры антител включают, без ограничений, материалы, распознающие любой один из или комбинацию белков, включая, без ограничений, вышеупомянутые белки и/или следующие антигены: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, рецептор IL-2, рецептор IL-4, рецептор IL-6, рецептор IL-13, субъединицы рецептора IL-18, FGL2, PDGF- β и их аналоги (см. патенты США №№ 5272064 и 5149792), VEGF, TGF, TGF- β 2, TGF- β 1, рецептор EGF (см. патент США № 6235883) рецептор VEGF, фактор роста гепатоцитов, лиганд остеопротегерина, интерферон-гамма, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS, также известен как BAFF, THANK, TALL-1 и zTNF4; см. Do and Chen-Kiang (2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1): 19-25), комплемент C5, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, антиген PEM, LCG (который представляет собой генный продукт, экспрессируемый в связи с раком легкого), HER-2, HER-3, опухоль-ассоциированный гликопротеин TAG-72, антиген SK-1, опухоль-ассоциированные эпитопы, которые присутствуют с повышенными уровнями в сыворотке пациентов с раком ободочной кишки и/или поджелудочной железы, рак-ассоциированные эпитопы или белки, экспрессируемые клетками раков молочной железы, ободочной кишки, сквамозными клетками, клетками простаты, поджелудочной железы, легкого и/или почки и/или клетками меланомы, глиомы, или нейроblastомы, некротической сердцевинной опухоли, интегрин альфа 4 бета 7, интегрин VLA-4, интегрин B2, рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4, RANK, лиганд RANK, ФНО- α , молекула адгезии VAP-1, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), молекула межклеточной адгезии-3 (ICAM-3), адгезин лейкоинтегрин, тромбоцитарный гликопротеин gp IIb/IIIa, тяжелая цепь сердечного миозина, паратгормон, rNAPc2 (представляющий собой ингибитор фактора Vlla-тканевого фактора), MHC I, карциноэмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопропротеин (AFP), фактор некроза опухоли (ФНО), CTLA-4 (представляющий собой цитотоксичный Т-лимфоцит-ассоциированный антиген), рецептор Fc- γ -I, HLA-DR 10 бета, антиген HLA-DR, склеростин, L-селектин, респираторно-синцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (HBV), Streptococcus mutans и Staplycoccus aureus. Конкретные примеры известных антител, которые могут продуцироваться с использованием способов по изобретению, включают, без ограничений, адалимумаб, бевацизумаб, инфликсимаб, абциксимаб, алемтузумаб, бапинеизумаб, базиликсимаб, белимумаб, бриакинумаб, канакинумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, конатумумаб, деносумаб, экулизумаб, гемтузумаб озогомицин, голимумаб, ибритумаб тиуксетан, лабетузумаб, мапатумумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, муромонаб-CD3, натализумаб, нимотузумаб, офатумумаб, омализумаб, ореговомаб, паливизумаб, панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, ровелизумаб, тоцилизумаб, тозитумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб, залутумумаб и занолимумаб.

Изобретение также может быть использовано для сбора рекомбинантных слитых белков, содержащих, например, любые из вышеупомянутых белков. Например, рекомбинантные слитые белки, содержащие один из вышеупомянутых белков плюс домен мультимеризации, такой как лейциновая молния, двойная спираль, Fc-участок иммуноглобулина, или в существенной степени подобные белки, могут продуцироваться с использованием способов по изобретению. См., например, WO 94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262:1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371:80-83; Håkansson et al. (1999), Structure 7:255-64. К таким рекомбинантным слитым белкам конкретно относятся белки, в которых участок рецептора является слитым с Fc-участком антитела, такие как этанерцепт (p75 TNFR:Fc) и белатацепт (CTLA4:Fc).

В целях данного изобретения, среда клеточной культуры представляет собой среду, пригодную для роста животных клеток, таких как клетки млекопитающих, в *in vitro* клеточной культуре. Рецептуры клеточных культуральных сред хорошо известны специалистам. Типично, клеточные культуральные среды состоят из буферов, солей, углеводов, аминокислот, витаминов и существенных микроэлементов. Среда клеточной культуры может содержать или не содержать сыворотку, пептон и/или белки. Различные питательные среды для тканевых культур, включая бессывороточные и питательные среды определенного состава, являются коммерчески доступными, например, могут быть использованы любая из или комби-

нация следующих клеточных культуральных сред: среда RPM1-1640, среда RPM1-1641, модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM), минимальная эссенциальная среда Игла, среда F-12K, среда Хэма F12, модифицированная по Искову среда Дульбекко, среда Маккоя 5A, среда Лейбовица L-15 и бессывороточные среды, такие как серия EX-CELL™ 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), в числе прочих. Клеточная культуральная среда может быть дополнена дополнительными или повышенными концентрациями компонентов, таких как аминокислоты, соли, сахара, витамины, гормоны, факторы роста, буферы, антибиотики, липиды, микроэлементы и т.п., в зависимости от потребностей культивируемых клеток и/или желательных параметров клеточной культуры.

Клеточная культуральная среда может быть бессывороточной, безбелковой и/или беспептонной. "Бессывороточная" относится к средам клеточных культур, которые не содержат сывороток животных, таких как сыворотка плода коровы. "Безбелковая" относится к клеточной культуральной среде, не содержащей экзогенного добавленного белка, такого как трансферрин, белковые факторы роста IGF-1 или инсулин. Безбелковая среда может содержать или не содержать пептоны. "Беспептонная" относится к клеточной культуральной среде, которая не содержит экзогенных белковых гидролизатов, таких как гидролизаты животного и/или растительного белка. Клеточная культуральная жидкость или подобная терминология относится к клеточной культуральной среде, которая содержит, в числе прочего, жизнеспособные и нежизнеспособные клетки млекопитающих, клеточные метаболиты и клеточные обломки, такие как нуклеиновые кислоты, белки и липосомы.

Под клеточной культурой или "культурой" подразумевается рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Пригодные условия культивации для клеток млекопитающих известны специалистам. См., например, *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992). Клетки млекопитающих могут культивироваться в суспензии или присоединенными к твердой подложке. Биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с полыми волокнами, роллер-флаконы, качалочные колбы или биореакторы с перемешиваемым резервуаром, с микроносителями или без них, и работающие в периодическом, подпитываемом, непрерывном, полунепрерывном или перфузионном режиме, являются доступными для культур клеток млекопитающих.

Клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), могут культивироваться в культурах малого масштаба, таких как, например, в клеточных культурах от 100 мл до крупномасштабных, таких как системы с размером культур в тысячи и десятки тысяч миллилитров, для клинического и промышленного производства белковых терапевтических средств.

Клеточные линии (также называемые "клетки-хозяева") генетически модифицируют для экспрессии полипептида, представляющего коммерческий или научный интерес. Клеточные линии типично получают как ряд поколений, происходящих от первичной культуры, которые могут поддерживаться в культуре в течение неограниченного времени. Генетическая модификация клеточных линий предусматривает трансфекцию, трансформацию или трансдукцию клеток рекомбинантными полинуклеотидными молекулами и/или другие изменения (например, путем гомологической рекомбинации и генной активации или слияния рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой), чтобы вызвать экспрессию клеткой-хозяином желательного рекомбинантного полипептида. Способы и векторы для генетической модификации клеток и/или клеточных линий с целью экспрессии полипептида, представляющего интерес, хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники; например, различные методики описаны в *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988 и ежеквартальные обновления); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69.

Широкий спектр клеточных линий млекопитающих, пригодных для выращивания в культуре, доступен от Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, Manassas, Va.) и коммерческих поставщиков. Примеры клеточных линий млекопитающих, широко используемых в промышленности, включают VERO, BHK, HeLa, CV1 (включая Cos), MDCK, 293, 3T3, миеломные клеточные линии (например, NSO, NS1), PC12, клетки WI38 и клетки яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO широко используются для продуцирования сложных рекомбинантных белков, например, цитокинов, факторов свертывания крови и антител (Brasel et al. (1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman et al. (1988), *J. Biol Chem* 263:6352-6362; McKinnon et al. (1991), *J Mol Endocrinol* 6:231-239; Wood et al. (1990), *J. Immunol.* 145:3011-3016). Дигидрофолатредуктаза (DHFR)-дефицитные мутантные клеточные линии (Urlaub et al. (1980), *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4216-4220), DXB11 и DG-44, являются желательными линиями клеток-хозяев CHO вследствие эффективной DHFR-селектируемой и амплифицируемой системы генной экспрессии, позволяющей достичь высокого уровня экспрессии рекомбинантного белка в этих клетках (Kaufman R.J. (1990), *Meth Enzymol* 185:537-566). Кроме того, такие клетки удобны для проведения манипуляций в виде прикрепленных или суспензионных культур и демонстрируют относительно хорошую генетическую стабильность. Клетки CHO и белки, рекомбинантно экспрессируемые в них, были детально охарактеризованы и разрешены для применения в клиническом коммерческом производстве государственными регулирующими органами.

Хотя терминология, используемая в данной заявке, является стандартной для данной области техники, определения определенных терминов приведены в данном документе для обеспечения четкости и

определенности значений в формуле изобретения. Единицы измерения, префиксы и символы могут быть приведены в форме, принятой в системе единиц СИ. Интервалы численных значений, указанные в данном документе, включают численные значения, ограничивающие данный интервал, и включают и охватывают каждое целочисленное значение в указанном интервале. Если не указано иное, термины в единственном числе должны истолковываться как означающие "по меньшей мере один из". Заголовки разделов, используемые в данном документе, приводятся только с организационными целями и не должны рассматриваться как ограничивающие описываемый предмет изобретения. Способы и методы, описанные в данном документе, осуществляются в общем в соответствии с обычными способами, хорошо известными специалистам, и описаны в различных общих и более узкоспецифических ссылках, приведенных и обсуждаемых в данном описании, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы или части документов, упоминаемых в данной заявке, включая, без ограничений, патенты, патентные заявки, статьи, книги и общие руководства, настоящим прямо включены сюда в качестве ссылок.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться в объеме конкретными вариантами исполнения, описанными в данном документе, которые предназначены для использования в качестве отдельных иллюстраций индивидуальных аспектов изобретения, и функционально эквивалентные способы и компоненты не выходят за пределы объема изобретения. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к представленным и описанным в данном документе, будут очевидными для квалифицированных специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих чертежей. Предполагается, что такие модификации входят в объем приложенной формулы изобретения.

Примеры

Пример 1.

Данный эксперимент сравнивает препараты диаллилдиметиламмония хлорида (PDADMAC) с разным молекулярным весом для флокулирования культуральной жидкости клеток млекопитающих и проведения сравнения их времен осаждения.

Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантные моноклональные антитела, выращивали в биореакторах объемом 2000 л в подпитываемой культуре в течение 15 дней. Клеточную культуральную жидкость охлаждали до 10°C перед тестированием. Серию вращающихся колб наполняли 1 л клеточной культуральной жидкости в каждую колбу. PDADMAC поставлялся в виде 20% (мас./об.) жидкости (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), и рабочий маточный раствор, используемый во всех этих экспериментах, готовили путем разбавления очищенной водой до 10% (мас./об.). PDADMAC с молекулярными весами 100000-200000; 200000-350000; и 400000-500000 прибавляли в каждую колбу до конечной концентрации от 29 до 86 пг PDADMAC на общую плотность клеток. Растворы PDADMAC прибавляли непрерывно в течение примерно 1 минуты и инкубировали в течение 15 мин с перемешиванием при 70-80 об./мин. при 10°C. Хлопьям позволяли осесть при температуре окружающей среды. Этот материал использовали для определения времени осаждения.

Вторую подпитываемую культуру выращивали в реакторе для одноразового использования на 1000 л в течение 15 дней. Клеточная культуральная жидкость поддерживалась при температуре ок. 36°C. Серию вращающихся колб наполняли клеточной культуральной жидкостью по 1 л в каждую колбу. PDADMAC с молекулярными весами <100000, 100000-200000; 200000-350000; и 400000-500000 прибавляли в каждую колбу до конечной концентрации от 25 до 76 пг PDADMAC на общую плотность клеток. Растворы PDADMAC прибавляли непрерывно в течение примерно 1 мин и инкубировали в течение 15 мин, с перемешиванием при 70-80 об./мин при температуре ок. 36°C. Хлопьям позволяли осесть при температуре окружающей среды. Этот материал использовали для определения мутности.

Общую плотность клеток определяли путем суммирования общего числа жизнеспособных клеток с общим числом нежизнеспособных клеток, измеренным по исключению трипанового синего с использованием счетчика и анализатора клеток Cedex (Roche Innovatis AG, Indianapolis, IN). Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с интервалами 15 мин в течение 90 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали как Объем осажженных флокул/Общий объем.

Супернатант удаляли из осажженной флокулированной клеточной массы путем декантирования с последующим фильтром 0,2 мкм. Мутность измеряли с помощью турбидиметра 2100P (Hach, Loveland, CO).

Фиг. 2A и 2B показывают, что флокуляция с помощью PDADMAC, имеющего средний молекулярный вес более 200000, но менее 500000, обеспечивает оптимальное время осаждения и прозрачность по сравнению с PDADMAC со средним молекулярным весом менее 200000.

Пример 2.

Этот эксперимент сравнивает количество PDADMAC, необходимого для флокулирования культуральной жидкости клеток млекопитающего, экспрессирующего рекомбинантное антитело из мелкокле-

точной линии, такой как диплоидные клетки, и крупноклеточной линии, такой как тетраплоидная клеточная линия.

Диплоидную и тетраплоидную клеточные линии выращивали, как описано выше. Серию вращающихся колб наполняют 1 л клеточной культуральной жидкости в каждую колбу от каждой из диплоидной и тетраплоидной культур. В данном эксперименте и всех последующих экспериментах, если не указано иное, использовался PDADMAC, имеющий средний молекулярный вес от 400000 до 500000. PDADMAC прибавляли в каждую колбу до конечной концентрации, указанной в табл. 1. Общую плотность клеток определяли, как описано выше.

Таблица 1
Конечные концентрации PDADMAC для диплоидной и тетраплоидной культур

Тип клеток	Конечная концентрация PDADMAC
Клетки размером 15-20 мкм, такие как диплоидные клетки	11 пг на общую плотность клеток
	18 пг на общую плотность клеток
	25 пг на общую плотность клеток
	30 пг на общую плотность клеток
Клетки размером 21-24 мкм, такие как тетраплоидные клетки	29 пг на общую плотность клеток
	43 пг на общую плотность клеток
	57 пг на общую плотность клеток
	71 пг на общую плотность клеток
	86 пг на общую плотность клеток

Растворы PDADMAC прибавляли непрерывно и перемешивали, как описано выше. Хлопьям позволяли осаждаться при температуре окружающей среды.

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с интервалами 15 мин в течение 90-120 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Фиг. 3А показывают, что флокуляция с помощью PDADMAC в концентрации 25 пг на общее количество клеток обеспечивала наименьшее время осаждения.

Фиг. 3В показывают, что флокуляция с помощью PDADMAC в концентрации 57 пг на общее количество клеток обеспечивала наименьшее время осаждения.

Пример 3.

Данный эксперимент исследовал влияние флокуляции с помощью PDADMAC для клеточных культур, продуцирующих высокие уровни лактата и/или имеющих высокую плотность клеток.

Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантное моноклональное антитело, выращивали в биореактор для одноразового использования на 1000 л в течение 14 дней. Клеточная культуральная жидкость находилась при температуре окружающей среды. Четыре вращающиеся колбы наполняли по 1 л клеточной культуральной жидкости в каждую колбу. Перед прибавлением PDADMAC, в каждую колбу вводили одной порцией 3 г/л, 6 г/л или 9 г/л DL-лактата Na, в концентрации 60% (мас./мас.) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), или не вводили лактат для контроля. Затем прибавляли PDADMAC в каждую колбу до конечной концентрации 25 пг/общую плотность клеток (маточный раствор PDADMAC, как описано выше). Общую плотность клеток определяли, как описано выше.

PDADMAC прибавляли непрерывно при температуре окружающей среды и перемешивали, как описано выше. Флокулам затем позволяли осаждаться при температуре окружающей среды.

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с различными интервалами времени в течение 1500 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Вторую порцию клеточной культуры CHO выращивали в биореакторе для одноразового использования на 1000 л, в перфузионной культуре в течение 20 дней. Клеточный бульон охлаждали до температуры окружающей среды. Перед прибавлением PDADMAC, клеточный бульон разбавляли до 25%, 50% и 75% средой клеточной культуры. Клеточный бульон с упакованным объемом клеток 44% не разбавляли перед прибавлением PDADMAC. Конечная концентрация PDADMAC составляла 25-26 пг/общую плотность клеток. Скорость прибавления PDADMAC составляла ок. 1 мин, с перемешиванием и осаждением при температуре окружающей среды, как описано выше.

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с различными интервалами времени в течение 1400 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Фиг. 4А и 4В показывают, что скорости осаждения значительно снижаются для процессов культивации клеток, имеющих высокие уровни лактата (>2-3 г/л) и/или продуцирующих высокие плотности клеток биомассы (упакованный объем клеток >10%).

Пример 4.

Данный эксперимент сравнивает времена осаждения для разных разбавителей, используемых в

комбинации с PDADMAC.

Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантное моноклональное антитело, выращивали в биореакторе на 1000 л для одноразового использования в перфузионной культуре в течение 18 дней. Клеточный бульон Дня 16 доставлялся для проведения испытаний при температуре 36°C и охлаждался до температуры окружающей среды в течение 2,5 ч перед флокуляцией. Прибавление и осаждение проводили при температуре окружающей среды. Перед прибавлением PDADMAC, клеточный бульон разбавляли до 67% различными разбавителями. Уровень содержания лактата составлял 5 г/л, скорость прибавления PDADMAC - ок. 1 мин с периодом инкубации 15 мин при 75-85 об./мин. Маточный раствор PDADMAC готовили с концентрацией 10% (мас./об.) из исходного маточного раствора 20% (мас./об.) с помощью очищенной воды. Конечная концентрация PDADMAC составляла 25 пг/общую плотность клеток. Хлопьям позволяли осажаться при температуре окружающей среды.

Готовили серию разбавителей; концентрации приведены в табл. 2.

Таблица 2
Конечные концентрации различных разбавителей

Соединение	Конечная концентрация
Сахароза (EMD, Philadelphia, PA)	90 г/л
Бетаин (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)	32 г/л
ПЭГ 1000 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)	146 г/л
ПЭГ 6000 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)	260 г/л
Декстран 70/Бетаин (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)	Декстран 100 г/л Бетаин 30 г/л
Среда клеточной культуры	Контроль

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с различными интервалами времени в течение 1600 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Как показано на фиг. 5, комбинация PDADMAC и ПЭГ 6000 обеспечивала наименьшее время осаждения. Комбинации PDADMAC с ПЭГ 6000, ПЭГ 1000 или декстраном 70/бетаином давали улучшение скорости осаждения по сравнению с одним лишь PDADMAC. Прибавление неионных полимеров значительно увеличивало скорость осаждения флокул. Комбинация PDADMAC с ПЭГ или декстраном также уменьшала время осаждения по сравнению с одним лишь PDADMAC, независимо от уровней лактата в культуре.

Пример 5.

Данный эксперимент исследует влияние комбинации PDADMAC и ПЭГ 3000 на времена осаждения для клеточных культур с высокой плотностью клеток.

Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантное моноклональное антитело, выращивали в биореакторе на 80 л в перфузионной культуре в течение 20 дней. Клеточную культуральную жидкость охлаждали до температуры окружающей среды перед проведением испытаний. Перед прибавлением PDADMAC, клеточный бульон разбавляли до 10% с помощью 36% (мас./об.) сахарозы или 25% (мас./об.) ПЭГ 3000 (оба - в очищенной воде). Конечная концентрация сахарозы в клеточном бульоне составляла 3,6% (мас./об.), и конечная концентрация ПЭГ 3000 составляла 2,5% (мас./об.). Скорость прибавления PDADMAC - ок. 1 мин с периодом инкубации 15 мин при 75-85 об./мин. Маточный раствор PDADMAC готовили с концентрацией 10% (мас./об.) из исходного маточного раствора 20% (мас./об.) с помощью очищенной воды. Конечная концентрация PDADMAC составляла 22 пг/общую плотность клеток для ПЭГ 3000 и 25 пг/общую плотность клеток для сахарозы и контроля или неразбавленного клеточного бульона. Величина PCV (объем упакованных клеток) контроля или неразбавленного клеточного бульона составляла 48%. Величина PCV разбавленного клеточного бульона = (PCV контроля × коэффициент разбавления) = 43,2%.

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с различными интервалами времени в течение 240 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Как показано на фиг. 6, комбинация PDADMAC и ПЭГ 3000 приводила к более быстрому осаждению, чем для одного PDADMAC. Как видно из примера 3, скорость осаждения для одного лишь PDADMAC значительно снижается с увеличением плотности клеток. Комбинация ПЭГ 3000 с PDADMAC уменьшает время осаждения хлопьев по сравнению с показателями для одного PDADMAC, независимо от плотности в процессе культивации клеток (в данном случае - упакованный объем клеток 43%).

Пример 6.

Данный эксперимент исследует влияние времени прибавления ПЭГ с PDADMAC на времена осаждения.

Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантное моноклональное антитело, выращивали в биореакторе на 80 л с использованием 19-дневного перфузионного процесса культивации клеток. Клеточную культуральную жидкость охлаждали до 21°C. Три вращающиеся колбы наполняли 1 л клеточной культуральной жидкости в каждую колбу. В одну колбу прибавляли PDADMAC в концентрации 45 мг/общую плотность клеток (молекулярный вес 400000-500000). В другую колбу прибавляли PDADMAC 45 мг/общую плотность клеток и ПЭГ 3000, 15% (мас./об.) путем болюсного добавления (1-стадийный способ). В третью колбу прибавляли PDADMAC в концентрации 45 мг/общую плотность клеток, и ПЭГ 3000 при конечной концентрации, равной 15% (мас./об.), прибавляли после прибавления PDADMAC (2-стадийный способ). Скорость прибавления PDADMAC составляла ок. 1 мин. Скорость прибавления PDADMAC/ПЭГ составляла ок. 5 мин. Все прибавления осуществлялись при температуре окружающей среды. Все колбы инкубировали в течение 15 мин при 75-85 об./мин. Хлопьям позволяли осажаться при температуре окружающей среды.

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с различными интервалами времени в течение 240 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Как показано на фиг. 7, комбинация PDADMAC и ПЭГ 3000 при одновременном или последовательном прибавлении уменьшала время осаждения хлопьев по сравнению с результатами для одного PDADMAC.

Затем была приготовлена крупномасштабная культура. Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантное моноклональное антитело, выращивали в биореакторе на 80 л в перфузионной культуре в течение 19 дней. Клеточную культуральную жидкость охлаждали до 21°C. Прибавляли одновременно PDADMAC в концентрации 45 мг/общую плотность клеток и ПЭГ 3000 при конечной концентрации, равной 15% (мас./об.), при температуре окружающей среды, скорость прибавления составляла 21 мин, с последующим 5-минутным инкубированием при 100 об./мин. Хлопьям позволяли осажаться при температуре окружающей среды.

После осаждения флокул (первичное осаждение), осветленный супернатант собирали, откачивая жидкость из биореактора с последующей фильтрацией через объемный фильтр, содержащий диатомовую землю, а затем через 0,2 мкм отсекающий мембранный фильтр.

Флокулы промывали равным объемом 9% раствора сахарозы для удаления остаточного рекомбинантного белка и оставляли для осаждения на 16 ч. После осаждения флокул (вторичное осаждение) осветленный вторичный супернатант собирали, как описано выше.

Супернатанты осветленных собранных клеточных культур от вышеописанных флокуляций (маломасштабной и крупномасштабной) очищали с использованием хроматографии на белке А с последующим определением качества продукта. Элюат белка А не нейтрализовали перед определением качества продукта. Измеряемыми показателями качества продукта элюата белка А были молекулярные варианты, измеренные методом эксклюзионной хроматографии (SEC), белки клеток-хозяев, определенные методом ELISA.

Очищенный на белке А материал затем пропускали через колонку для катионообменной хроматографии (СЕХ) при pH 7,5.

Таблица 3

Собранный продукт	SEC			СН (рр м)	СЕХ при pH 7.5			
	высокомолекулярные	Мономер	низкомолекулярные		начальный участок	основной пик	хвостовое плечо пика	конечный участок
Контроль	11,6%	87,2%	1,2%	9,60	8,7%	82,9%	6,8%	1,6%
Маломасштабный 2-стадийный способ	9,2%	89,6%	1,2%	3,95	8,2%	83,5%	6,8%	1,6%

Маломасштабный 1-стадийный способ	9,0%	89,8%	1,2%	3,60 2	8,2%	83,5%	6,8%	1,5%
Крупномасштабное первичное осаждение	9,6%	89,2%	1,2%	5,05 6	8,1%	83,5%	7,0%	1,4%
Крупномасштабное вторичное осаждение с промывкой сахарозой	11,7%	86,9%	1,5%	11,2 68	8,4%	83,8%	6,4%	1,5%

Качество продукта остается близким для контроля и собранного первичного флокулята для процессов обоих масштабов. Первичный собранный продукт PDADMAC/ПЭГ имеет тенденцию к удалению агрегатов более высокого порядка, что отражается в низких уровнях HMW в пуле белка А. Наблюдалось снижение уровня белка клеток-хозяев для собранного продукта PDADMAC/ПЭГ. Ресуспендирование в сахарозе приводило к несколько более высоким уровням CHOP и HMW по сравнению с собранным первичным продуктом PDADMAC/ПЭГ и, как считается, связано с ресолюбилизацией этих примесей.

Пример 7.

Данный эксперимент исследует влияние на время осаждения путем прибавления поверхностно-активного вещества вместе с PDADMAC и ПЭГ.

Клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантное моноклональное антитело, выращивали в биореакторе на 80 л в перфузионной клеточной культуре в течение 15 дней. Клеточный бульон Дня 14 охлаждали до 30°C для проведения испытаний. Две вращающиеся колбы наполняли 1 л клеточной культуральной жидкости в каждую колбу. В одну колбу прибавляли одновременно PDADMAC и ПЭГ 3000, причем PDADMAC прибавляли в концентрации 25 пг/общую плотность клеток (молекулярный вес 400000-500000), а ПЭГ 3000 - до конечной концентрации, равной 3% (мас./об.). В другую колбу прибавляли Тритон X-100 при конечной концентрации, равной 0,05% (об./об.) в дополнение к PDADMAC и ПЭГ в указанных выше концентрациях. (Маточный раствор Тритона X-100 с концентрацией 10% (об./об.) готовили из исходного маточного раствора 20% (об./об.), Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.). Три компонента прибавляли одновременно. Скорость прибавления составляла ок. 1 мин, с инкубированием в течение 15 мин при 75-85 об./мин. Все колбы вращали, как описано в предыдущих примерах. Хлопьям позволяли осаждаться при температуре окружающей среды.

Флокулированные растворы затем переносили в стеклянные градуированные цилиндры на 1 л для определения скорости осаждения упакованных флокул. Показания считывали с различными интервалами времени в течение 240 мин и относительный объем флокуляции рассчитывали, как описано выше.

Как показано на фиг. 8, прибавление Тритона X-100 вместе с PDADMAC и ПЭГ 3000 уменьшало время осаждения хлопьев по сравнению с результатами для одних лишь PDADMAC и ПЭГ 3000.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

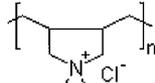
1. Способ сбора культуры клеток млекопитающих, который включает культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среде клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток и/или упакованного объема клеток, прибавление (i) катионного полимера, который представляет собой полимер диаллилдиметиламмония хлорида, полидиаллилдиметиламмония хлорид, полиэтиленимин, полиакриламид или хитозан, и (ii) неионного полимера, который представляет собой полиэтиленгликоль или декстран, к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции, перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции, создание условий для первичного осаждения хлопьев и извлечение первичного осветленного супернатанта.
2. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по п.1, в котором катионный полимер представляет собой полидиаллилдиметиламмония хлорид.
3. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по п.1 или 2, в котором неионный полимер выбирают из ПЭГ 3000 и ПЭГ 6000.
4. Способ по п.3, в котором концентрация ПЭГ 3000 имеет значение от равной или составляющей примерно 3% до равной или составляющей примерно 4,5%.
5. Способ по п.3, в котором концентрация ПЭГ 6000 имеет значение от равной или составляющей примерно 2,5% до равной или составляющей примерно 3,5%.
6. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по любому из пп.1-5, который дополнительно включает прибавление неионного поверхностно-активного вещества к среде клеточной культуры.
7. Способ по п.6, в котором неионное поверхностно-активное вещество представляет собой сапоин или Тритон X100.
8. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по п.6, в котором неионное поверхностно-активное вещество представляет собой Тритон X-100.
9. Способ по п.8, в котором концентрация Тритона X100 составляет 0,05% (мас./об.).
10. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по любому из пп.1-9, который дополнительно включает промывание первичного осадка хлопьев, создание условий для вторичного осаждения промытых хлопьев и извлечение вторичного осветленного супернатанта.
11. Способ по п.10, в котором хлопья первичного осадка промывают 9%-ным раствором сахарозы.
12. Способ по любому из пп.1-11, в котором катионный полимер и неионный полимер прибавляют одновременно.
13. Способ по любому из пп.1-11, в котором катионный полимер прибавляют первым и перемешивают в течение, по меньшей мере, 30 с, с последующим прибавлением неионного полимера.
14. Способ по любому из пп.1-11, в котором катионный полимер, неионный полимер и неионное поверхностно-активное вещество прибавляют одновременно.
15. Способ по любому из пп.1-11, в котором катионный полимер прибавляют первым и перемешивают в течение, по меньшей мере, 30 с, с последующим прибавлением неионного полимера и неионного поверхностно-активного вещества.
16. Способ по любому из пп.1-15, в котором полидиаллилдиметиламмония хлорид прибавляют в концентрации от равной или составляющей примерно 20 до равной или составляющей примерно 90 пг/общую плотность клеток.
17. Способ по любому из пп.1-15, в котором полидиаллилдиметиламмония хлорид прибавляют в концентрации, равной или составляющей примерно 25 пг/общую плотность клеток, где клетки млекопитающих происходят от диплоидной клеточной линии.
18. Способ по любому из пп.1-15, в котором полидиаллилдиметиламмония хлорид прибавляют в количестве от 43 пг/общую плотность клеток до 57 пг/общую плотность клеток, где клетки млекопитающих происходят от тетраплоидной клеточной линии.
19. Способ по любому из пп.1-18, в котором культуральная среда клеток млекопитающих имеет температуру в интервале значений между 36 и 20°C.
20. Способ по любому из пп.1-18, в котором культуральная среда клеток млекопитающих имеет температуру, равную или выше 20°C.
21. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по любому из пп.1-20, в котором желательный упакованный объем клеток составляет >10%.
22. Способ сбора культуры клеток млекопитающих по любому из пп.1-21, в котором культура клеток млекопитающих представляет собой клетки яичника китайского хомячка (CHO).
23. Способ сбора культуры клеток млекопитающих, который включает

культивирование клеток млекопитающих, экспрессирующих рекомбинантный белок в среде клеточной культуры, на протяжении предварительно заданного периода времени или до достижения желательной плотности клеток или упакованного объема клеток,

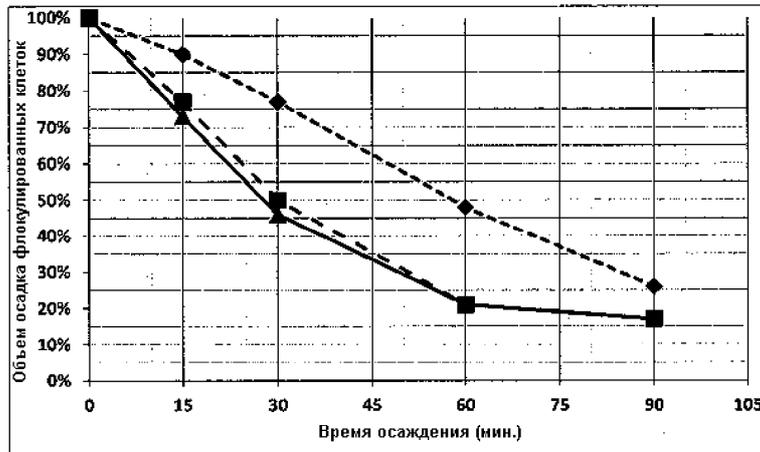
прибавление катионного полимера, выбранного из группы, состоящей из полимера диаллилдиметиламмония хлорида и полимера полидиаллилдиметиламмония хлорида, и неионного полимера, который выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, бетаина и декстрана/бетаина, к среде клеточной культуры для инициирования флокуляции,

перемешивание среды клеточной культуры во время флокуляции,

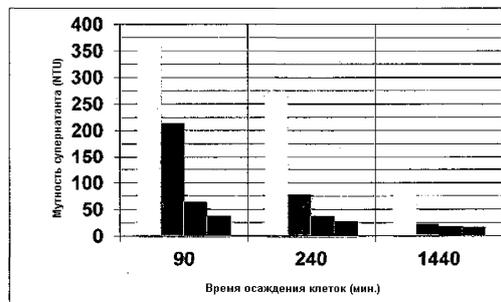
создание условий для первичного осаждения хлопьев в течение периода менее чем 1 ч и извлечение первичного осветленного супернатанта.



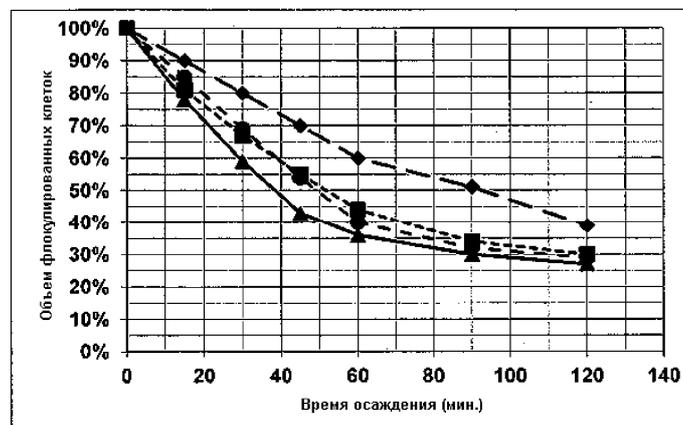
Фиг. 1



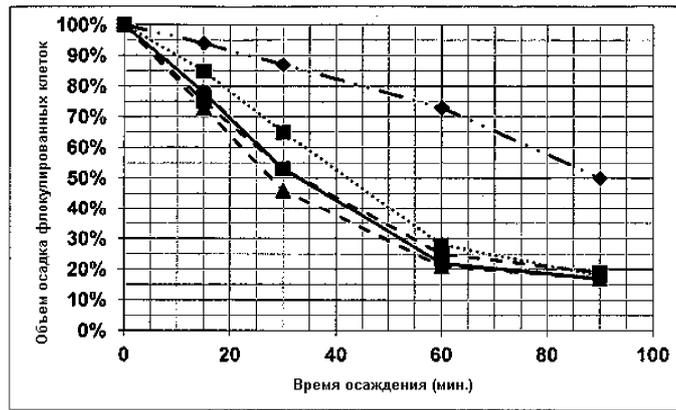
Фиг. 2А



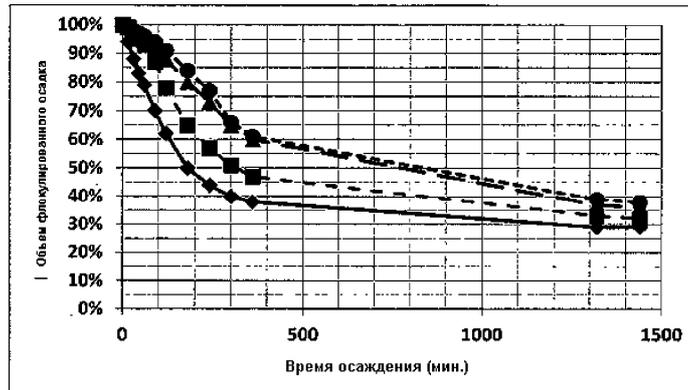
Фиг. 2В



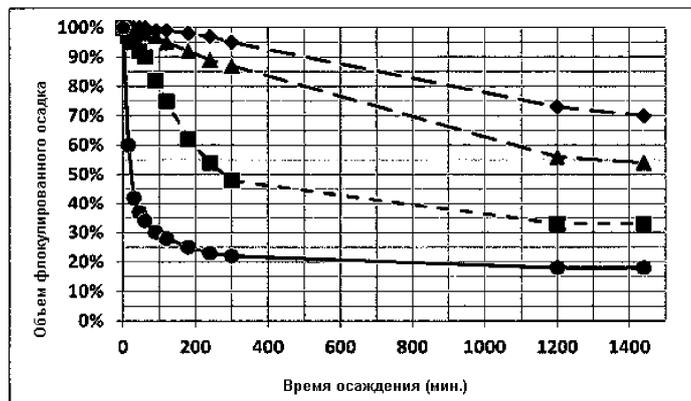
Фиг. 3А



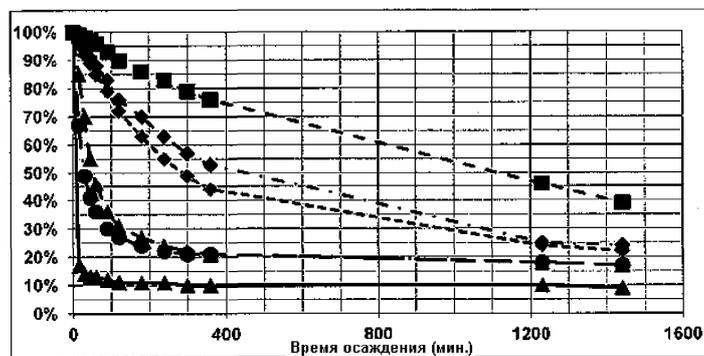
Фиг. 3В



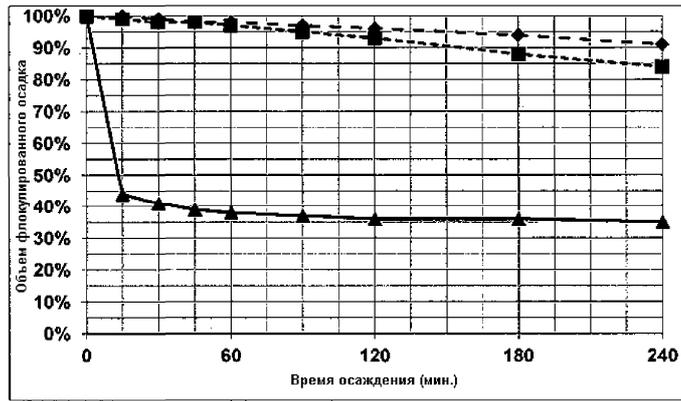
Фиг. 4А



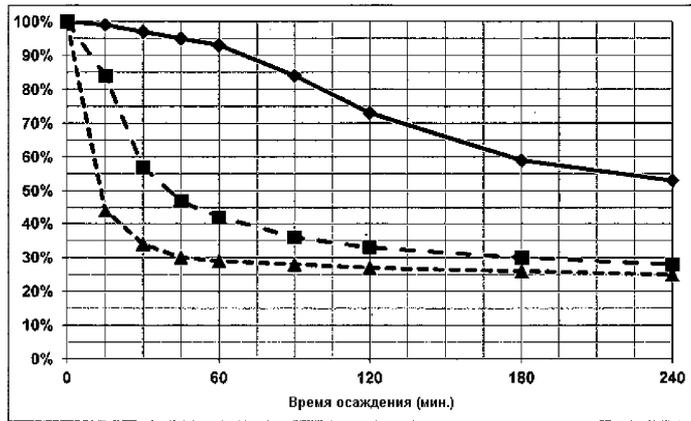
Фиг. 4В



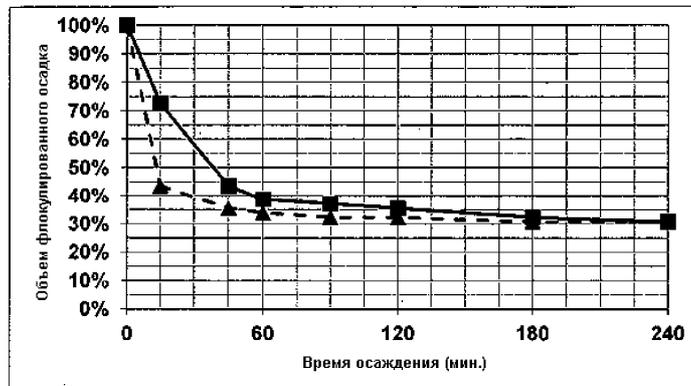
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

