

Brevetto europeo No. 2501822

Domanda di brevetto europeo No. 10782133.2

Data di deposito: 17 novembre 2010

Classificazione Internazionale: C12N1/02, C12P21/02, C12P21/00, C12N5/00, C07K1/36, C07K16/00

5 Priorità: Statunitense No. 20090261886P del 17 novembre 2009

Titolo: "METODI PER UN'AUMENTATA PRODUZIONE DI PROTEINE"

Richiedente: E. R. Squibb & Sons, L.L.C.

Route 206 and Province Line Road

Princeton, NJ 08540

10 U.S.A.

Inventori: ARUNAKUMARI, Alahari

DAI, Xiao-Ping

GARCIA, Javier

MARTEL, Richard

15 *****

Descrizione

SFONDO DELL'INVENZIONE

20 La coltura di cellule animali, in particolare la coltura di cellule di mammifero, viene comunemente utilizzata per l'espressione di proteine prodotte in modo ricombinante per scopi terapeutici, profilattici e diagnostici. Sebbene i metodi di coltura di cellule di mammifero siano preferiti rispetto ai sistemi di espressione microbici (per esempio i sistemi di espressione batterici o di lievito), poiché sono maggiormente adatti ad esprimere proteine a peso molecolare elevato e proteine aventi strutture steriche complesse, i livelli di espressione proteica da sistemi basati su colture cellulari di mammifero sono in generale considerevolmente inferiori rispetto a quelli da sistemi di espressione microbici. Anche se numerosi approcci hanno cercato di incrementare l'espressione proteica da coltura di cellule di mammifero, questi metodi

sono stati insufficienti nell'ottimizzare le condizioni per la crescita cellulare, nel mantenere elevata la vitalità cellulare e nel produrre grandi volumi di proteina di qualità elevata, limitando quindi la loro applicazione pratica nell'industria biofarmaceutica.

Come tale, vi è la necessità nell'arte di sviluppare metodi migliorati di coltura di cellule animali su larga scala per produrre e per purificare proteine (per esempio anticorpi e frammenti anticorpali, peptidi, enzimi, fattori di crescita, ormoni, interleuchine, interferoni e vaccini) per raggiungere una produzione proteica a rese elevate affidabile ed efficiente in termini di costo.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce metodi per aumentare la produzione di una proteina in una coltura cellulare facendo crescere in perfusione le cellule che producono la proteina ad una densità cellulare elevata (per esempio almeno superiore a circa 50×10^6 cellule/ml, più preferibilmente superiore a circa da 60 a 80×10^6 cellule/ml, ed il più preferibilmente attorno a circa 100×10^6 cellule/ml), indicata qui anche come "densità super elevata", cambiando quindi la coltura cellulare verso fed-batch, in modo tale che le cellule entrino in una fase di produzione proteica elevata. La presente invenzione si basa, almeno in parte, sulla scoperta inaspettata che è possibile coltivare cellule in coltura ad una densità molto superiore rispetto a quanto si era precedentemente pensato possibile. Questo, a sua volta, fornisce significativamente più proteina rispetto a quanta ne viene tipicamente prodotta utilizzando tecniche note di coltura cellulare. Specificamente, si pensa che la densità cellulare massima ottenuta utilizzando tecniche di coltura cellulare note sia in generale limitata dalla presenza di particolari livelli di prodotti di scarto (per esempio lattato, ammonio, ecc.), poiché è noto che tali prodotti di scarto possono essere tossici per la crescita cellulare quando si accumulano a concentrazioni critiche (si veda per esempio Schumpp, B. et al., J. Cell Sci., 7(part 4):639-647 (dicembre 1990)). Pertanto, tecniche note di coltura cellulare spesso limitano la densità massima a cui le cellule vengono inizialmente fatte crescere, così che le cellule non vengano influenzate sfavorevolmente da particolari concentrazioni di prodotti di scarto.

Per esempio, il metodo di coltura cellulare descritto in WO 2009/023562 si basa su livelli di lattato per segnalare la densità cellulare massima che può teoricamente essere ottenuta prima di iniziare una coltura cellulare per perfusione.

5 Come insegnato in WO 2009/023562, le cellule vengono fatte crescere ad una densità cellulare di circa da 1 milione a 9 milioni di cellule/ml, che porta ad una concentrazione di lattato di circa da 1g/l a circa 6g/l. Secondo WO 2009/023562, ciò segnala l'istante ottimale per cominciare la perfusione. Dopo la perfusione, le cellule vengono quindi fatte crescere ad approssimativamente da 5 a 40 milioni di cellule/ml e mantenute in una coltura cellulare a fed-batch per fornire titoli anticorpali tra 8-10g/l (tra i giorni 14-17).

10 Al contrario di tali metodi noti di coltura cellulare, nessun particolare livello di prodotti di scarto limita la densità di crescita cellulare secondo i metodi della presente invenzione. Invece, è stato scoperto che quando le cellule vengono inizialmente fatte crescere solo in una coltura cellulare per perfusione, le cellule sono in grado di crescere ad una densità cellulare molto superiore (per esempio almeno superiore a 40×10^6 cellule/ml) rispetto a quanto precedentemente riportato per tecniche note di coltura cellulare, indipendentemente dalla presenza di prodotti di scarto. In una forma di realizzazione particolare, le cellule vengono fatte crescere ad una densità di almeno superiore a circa da 50×10^6 cellule/ml a 60×10^6 cellule/ml, preferibilmente superiore a circa da 70×10^6 cellule/ml a 90×10^6 cellule/ml, più preferibilmente superiore a circa da 100×10^6 a 130×10^6 , ed il più preferibilmente superiore a circa da 140×10^6 a 200×10^6 cellule/ml o maggiore. Questa densità "super" elevata di cellule, a sua volta, permette la produzione di quantità significativamente più elevate di
15 proteina (per esempio 13,8g/l nel giorno 6) in un periodo di tempo più breve rispetto a quanto era stato precedentemente riportato.

20 La presente invenzione fornisce inoltre ancora un altro vantaggio inaspettato rispetto alle tecniche note di coltura cellulare, in quanto ottimizza la produzione di grandi quantità di proteina di qualità elevata. Per esempio, in una forma di realizzazione, la proteina raccolta secondo i metodi della presente invenzione viene ottenuta solo dalla coltura cellulare a fed-batch. Questo aumenta la freschezza, la stabilità e la qualità della proteina, in contrasto con la proteina ottenuta da colture sia per perfusione che a fed-batch sottoposte a periodi più lunghi di coltura, che è così più sensibile alla degradazione ed in generale di qualità più scarsa. Nondimeno, la presente invenzione contempla anche la raccolta di proteina da colture sia per perfusione che a fed-batch (per esempio quando le cellule vengono poste in coltura in un bioreattore singolo).



In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione impiega cellule ricombinanti che esprimono una proteina d'interesse. Per esempio, le cellule vengono trasfettate con almeno un acido nucleico che codifica una proteina d'interesse.

I metodi della presente invenzione possono essere utilizzati per aumentare la produzione di qualsiasi proteina d'interesse, compresi, senza limitazione, enzimi, recettori, proteine di fusione, citochine, fattori regolatori, ormoni, proteine diagnostiche, proteine terapeutiche ed agenti leganti un antigene. In una forma di realizzazione particolare, la proteina è un anticorpo (o un suo frammento legante l'antigene). In modo simile, un'ampia varietà di cellule può essere posta in coltura secondo i metodi della presente invenzione. In una forma di realizzazione particolare, le cellule sono cellule animali. In una forma di realizzazione preferita, le cellule sono cellule di mammifero, quali cellule CHO, NS0, BHK e Per C6.

Le condizioni della coltura cellulare (per esempio pH, temperatura, terreno, recipiente particolare per far crescere le colture, ecc.) possono essere determinate e regolate da una persona esperta nell'arte in relazione a diversi fattori, quali la particolare linea cellulare e la proteina da produrre. In una forma di realizzazione, la coltura cellulare per perfusione e la coltura cellulare con modalità a fed-batch vengono realizzate in bioreattori. Questo può includere un bioreattore singolo o bioreattori multipli (per esempio in modo tale che la coltura cellulare per perfusione e la coltura cellulare in modalità a fed-batch vengano realizzate in bioreattori separati). Per esempio, la coltura cellulare per perfusione può essere realizzata in un bioreattore e quindi le cellule possono essere trasferite in bioreattori multipli a fed-batch.

Inoltre, le condizioni di coltura cellulare possono essere ottimizzate per massimizzare la produzione proteica. Per esempio, possono essere ottimizzati i parametri delle colture cellulari, quali pH, DO, temperatura, strategie di alimentazione, composizione dell'alimentazione, ecc.

Vengono qui descritti anche metodi per chiarificare una proteina da una coltura cellulare. Questo viene ottenuto regolando il pH della coltura cellulare sotto il pH neutro (cioè sotto un pH di 7) e facendo sedimentare la coltura cellulare, in modo tale che la coltura cellulare si separi per formare uno strato di surnatante ed uno strato di letto cellulare, in cui la proteina è presente in (e può essere isolata da) lo strato del surnatante. Anche se i metodi possono essere applicati alle colture cellulari dell'invenzione, essi possono essere applicati per chiarificare una proteina da qualsiasi coltura cellulare, comprese le colture cellulari a densità elevata.

Il metodo può implicare la regolazione del pH della coltura cellulare ad un pH basso (cioè sotto al pH neutro di 7, quali pH di 4-7). In particolare, il pH può essere regolato ad un pH tra circa 4,5 e 6,5. Il metodo può anche implicare la sedimentazione della coltura cellulare per almeno circa 30 minuti, in modo tale da aumentare la chiarificazione della coltura cellulare prima di raccogliere la proteina. Tuttavia, la coltura cellulare può essere lasciata sedimentare per periodi di tempo più lunghi a discrezione del tecnico esperto. In particolare, la coltura cellulare può essere lasciata sedimentare per tra circa 30 e 120 minuti.

Altre tecniche di purificazione note possono facoltativamente essere impiegate in combinazione con il metodo di chiarificazione descritto sopra. Per esempio, la coltura cellulare può essere centrifugata prima della sedimentazione della coltura cellulare. In alternativa, la coltura cellulare può essere centrifugata dopo la sedimentazione della coltura cellulare, o la coltura cellulare può essere centrifugata prima e dopo la sedimentazione della coltura cellulare.

Un altro eventuale passaggio che può essere considerato per potenziare il metodo di chiarificazione è il lavaggio dello strato del letto cellulare che si forma in conseguenza del procedimento di sedimentazione con un tampone a basso pH. In una forma di realizzazione particolare, il pH del tampone è uguale al pH della coltura cellulare, cioè, quando la coltura cellulare viene regolata ad un pH basso (cioè sotto al pH neutro di 7).

Inoltre, possono essere utilizzate tecniche di filtrazione per chiarificare ulteriormente la coltura cellulare. Per esempio, la coltura cellulare può essere filtrata prima che la coltura cellulare si sia sedimentata, la coltura cellulare può essere filtrata dopo che la coltura cellulare si è sedimentata o la coltura cellulare può essere filtrata prima e dopo che la coltura cellulare si sia sedimentata. La filtrazione può essere realizzata utilizzando numerose tecniche note nell'arte, comprese, ma non limitate a, filtrazione di profondità e filtrazione di rifinitura.

Altre caratteristiche e vantaggi dell'invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La figura 1 descrive un possibile piano d'azione per mettere in pratica i metodi della presente invenzione, cioè in cui il procedimento di coltura cellulare a fed-batch a super densità viene realizzato in un bioreattore singolo.



La figura 2 descrive un altro possibile piano d'azione per mettere in pratica i metodi della presente invenzione, cioè in cui le cellule vengono perfuse in un bioreattore a perfusione fino a che non venga ottenuta una particolare densità di cellule e quindi trasferite a reattori multipli a fed-batch. Il procedimento di coltura cellulare a fed-batch viene realizzato in un bioreattore singolo.

5 La figura 3 è un grafico che mostra la crescita cellulare ed il profilo di produzione proteica per l'esperimento #1.

La figura 4 è un grafico che mostra la crescita cellulare ed il profilo di produzione proteica per l'esperimento #2.

La figura 5 è un grafico che descrive il profilo dei bioreattori a perfusione (cioè densità di cellule vitali e percentuale di vitalità) dell'esperimento 3.

10 La figura 6 è un grafico di sovrapposizione che descrive i profili di densità cellulare e produttività dai due bioreattori utilizzati nell'esperimento 3.

La figura 7 è un grafico che mostra i profili di crescita cellulare, vitalità cellulare e produzione proteica nel bioreattore da produzione per l'esperimento 4.

La figura 8 è un grafico che riassume i risultati della produttività di tutti e quattro gli esperimenti in funzione dell'integrale cellulare.

15 La figura 9 è un grafico che descrive l'effetto di parametri sperimentali variabili (cioè pH, adiuvante di filtrazione, ecc.) sul procedimento di chiarificazione.

La figura 10 è uno schema che descrive i passaggi chiave nel procedimento di chiarificazione, così come eventuali tecniche per aumentare il procedimento di chiarificazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

20 La presente invenzione fornisce metodi migliorati per aumentare la produzione proteica in una coltura cellulare facendo crescere le cellule che producono la proteina in una coltura cellulare per perfusione ad una densità cellulare elevata (cioè almeno superiore a 40×10^6 cellule/ml) e quindi cambiando verso una coltura cellulare a fed-batch, in modo tale che le cellule entrino in una fase di produzione proteica. L'invenzione fornisce anche metodi per chiarificare le colture cellulari per facilitare la raccolta della proteina dalle colture.

Affinché la presente invenzione possa essere compresa più facilmente, vengono prima definiti alcuni termini. Ulteriori definizioni vengono fornite in ogni parte della descrizione dettagliata.

I. Definizioni

5 I termini “coltura cellulare” e “coltura” includono qualsiasi combinazione di cellule e terreno. I metodi della presente invenzione contemplano, senza limitazione, due tipi generali di coltura cellulare, cioè la coltura cellulare per perfusione e la coltura cellulare a fed-batch. I principi dietro questi tipi di coltura cellulare vengono descritti qui sotto.

10 Come qui utilizzati, i termini “perfondere”, “perfusione” e “coltura per perfusione” vengono utilizzati in modo intercambiabile per riferirsi ad un metodo per coltivare le cellule, in cui viene fornito ulteriore terreno fresco alla coltura ed il terreno consumato viene rimosso dalla coltura. La perfusione viene fatta cominciare dopo che la coltura è stata seminata e può avvenire in modo continuo o in modo discontinuo, come desiderato, per un periodo di tempo. Il terreno fresco aggiunto durante la perfusione fornisce tipicamente integratori nutrizionali per le cellule che sono state private durante il procedimento di coltura. La perfusione permette anche la rimozione dei prodotti cellulari di scarto e dei sottoprodotti tossici dalla coltura cellulare. La perfusione viene realizzata durante la fase di crescita delle cellule, ma può anche essere continuata dopo che le cellule sono state trasferite ad una coltura cellulare a fed-batch (discusso sotto).

15 Come utilizzato qui, il termine “velocità di perfusione specifica” (SPR) si riferisce alla velocità alla quale il terreno fresco viene fornito alla coltura cellulare ed il terreno consumato viene rimosso in base alla densità cellulare. L’SPR può essere calcolata utilizzando l’equazione seguente:

$$\text{velocità di perfusione specifica (SPR)} = (\text{volume del reattore/giorno})/(\text{densità cellulare totale} (\times 10^6)).$$

20 L’SPR può essere determinata e/o regolata da una persona esperta nell’arte sulla base di fattori, comprese, ma senza limitazione, la natura delle cellule ospiti particolari, la velocità di crescita cellulare e la densità cellulare. Per esempio, la tipica SPR può variare da circa 0,01 a circa $1,0 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹. In una forma di realizzazione, l’SPR è 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01. In una forma di realizzazione, l’SPR varia da 0,25 a $0,03 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹. In un’altra forma di realizzazione, l’SPR varia da 0,07 a $0,01 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹.
25 In una forma di realizzazione particolare, l’SPR viene mantenuta a circa $0,05 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹.



L'SPR può rimanere costante per un periodo di tempo o può essere alterata (cioè aumentata o ridotta) nel corso del periodo di perfusione. Per esempio, l'SPR può essere uniformemente aumentata nel tempo, aumentata in una modalità a tappe nel tempo, uniformemente diminuita nel tempo, diminuita in una modalità a tappe nel tempo o qualsiasi loro combinazione. La perfusione può essere applicata in modo continuo o in modo discontinuo. Una persona esperta nell'arte
5 può determinare l'SPR, così come la tempistica appropriata dell'inizio e della cessazione del/i periodo/i di perfusione, e di qualsiasi alterazione alla perfusione, in base al monitoraggio di alcuni parametri della coltura cellulare.

Come utilizzato qui, il termine "coltura a fed-batch" si riferisce ad un metodo per coltivare le cellule, in cui la coltura cellulare viene arricchita con terreno fresco, cioè le cellule vengono "alimentate" con nuovo terreno mentre il terreno consumato non viene rimosso. Tipicamente, un procedimento di coltura a "fed-batch" viene realizzato in un
10 bioreattore, ed altri componenti (per esempio integratori nutrizionali) vengono aggiunti alla coltura qualche tempo dopo l'inizio del procedimento di coltura. L'aggiunta controllata di sostanze nutrienti influenza direttamente la velocità di crescita della coltura e permette di evitare l'accumulo di metaboliti in eccedenza (si vedano per esempio Wlaschin, K.F. et al., "Fedbatch culture and dynamic nutrient feeding", *Cell Culture Engineering*, 101:43-74 (2006) e Lee, J. et al., "Control of fed-batch fermentations", *Biotechnol. Adv.*, 17:29-48 (1999)). Una coltura a fed-batch viene tipicamente
15 terminata ad un certo punto e le cellule e/o i componenti nel terreno vengono raccolti e facoltativamente purificati.

Come utilizzato qui, il termine "percentuale di alimentazione" è la percentuale del volume di alimentazione nel volume totale della coltura cellulare.

Come utilizzato qui, il termine "alimentazione in bolo" si riferisce all'aggiunta del nutrimento in una volta.

Come qui utilizzati, i termini "inoculazione", "inoculo" e "semina" si riferiscono all'aggiunta di cellule al terreno
20 di partenza per cominciare la coltura.

Come utilizzato qui, il termine "densità cellulare" si riferisce al numero di cellule in un dato volume di terreno. Una densità cellulare elevata è desiderabile, in quanto può condurre ad una produttività proteica superiore. Pertanto, la densità cellulare viene solitamente monitorata nelle colture cellulari. La densità cellulare può essere monitorata mediante qualsiasi tecnica nota nell'arte, comprese, ma senza limitazione, l'estrazione di campioni da una coltura e l'analisi delle
25 cellule al microscopio, utilizzando un dispositivo per la conta cellulare disponibile in commercio o utilizzando una sonda

adatta disponibile in commercio introdotta nel bioreattore stesso (o in un'ansa attraverso cui il terreno e le cellule in sospensione vengono fatti passare e quindi ritornare al bioreattore).

Come qui utilizzati, i termini “densità cellulare super elevata” e “densità cellulare elevata” vengono utilizzati in modo intercambiabile e si riferiscono ad una densità cellulare superiore almeno a 40×10^6 cellule/ml. Tecniche note di coltura cellulare possono implicare la crescita cellulare ad un “primo livello critico” (cioè “un punto durante la fase di crescita del ciclo cellulare in cui la vitalità cellulare può essere influenzata dalla concentrazione aumentata di produzioni di scarto (per esempio inibitori della crescita cellulare e metaboliti tossici, per esempio lattato, ammonio, ecc.)” prima di approfondire la coltura cellulare ed ottenendo approssimativamente da 5 a 40 milioni di cellule/ml. Al contrario, le cellule cresciute secondo i metodi della presente invenzione non vengono limitate dai prodotti di scarto e sono così in grado di raggiungere una densità cellulare super elevata (cioè almeno superiore a circa 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130×10^6 cellule/ml). Specificamente, come parte della presente invenzione, è stato scoperto che quando le cellule sono fatte crescere inizialmente in una coltura cellulare per perfusione, le cellule crescono ad una densità cellulare molto superiore (cioè ad una densità cellulare super elevata), indipendentemente dalla presenza di prodotti di scarto, quali lattato o ammonio.

Nella presente invenzione, le cellule cresciute nella coltura cellulare per perfusione vengono “cambiate” (per esempio spostate o trasferite) ad una coltura in modalità a fed-batch, una volta che le cellule raggiungono una densità cellulare elevata. In una forma di realizzazione, lo scambio avviene ad una densità cellulare elevata superiore almeno a circa 50×10^6 cellule/ml. In un'altra forma di realizzazione, lo scambio avviene ad una densità cellulare elevata di almeno tra circa 50×10^6 cellule/ml e 200×10^6 cellule/ml. In forme di realizzazione particolari, lo scambio avviene a densità cellulari elevate di circa 51×10^6 cellule/ml, 52×10^6 cellule/ml, 53×10^6 cellule/ml, 54×10^6 cellule/ml, 55×10^6 cellule/ml, 56×10^6 cellule/ml, 57×10^6 cellule/ml, 58×10^6 cellule/ml, 59×10^6 cellule/ml, 60×10^6 cellule/ml, 61×10^6 cellule/ml, 62×10^6 cellule/ml, 63×10^6 cellule/ml, 64×10^6 cellule/ml, 65×10^6 cellule/ml, 66×10^6 cellule/ml, 67×10^6 cellule/ml, 68×10^6 cellule/ml, 69×10^6 cellule/ml, 70×10^6 cellule/ml, 71×10^6 cellule/ml, 72×10^6 cellule/ml, 73×10^6 cellule/ml, 74×10^6 cellule/ml, 75×10^6 cellule/ml, 76×10^6 cellule/ml, 77×10^6 cellule/ml, 78×10^6 cellule/ml, 79×10^6 cellule/ml, 80×10^6 cellule/ml, 81×10^6 cellule/ml, 82×10^6 cellule/ml, 83×10^6 cellule/ml, 84×10^6 cellule/ml, 85×10^6 cellule/ml, 86×10^6



5 cellule/ml, 87x10⁶ cellule/ml, 88x10⁶ cellule/ml, 89x10⁶ cellule/ml, 90x10⁶ cellule/ml, 91x10⁶ cellule/ml, 92x10⁶ cellule/ml, 93x10⁶ cellule/ml, 94x10⁶ cellule/ml, 95x10⁶ cellule/ml, 96x10⁶ cellule/ml, 97x10⁶ cellule/ml, 98x10⁶ cellule/ml, 99x10⁶ cellule/ml, 100x10⁶ cellule/ml, 101x10⁶ cellule/ml, 102x10⁶ cellule/ml, 103x10⁶ cellule/ml, 104x10⁶ cellule/ml, 105x10⁶ cellule/ml, 106x10⁶ cellule/ml, 107x10⁶ cellule/ml, 108x10⁶ cellule/ml, 109x10⁶ cellule/ml, 110x10⁶ cellule/ml, 111x10⁶ cellule/ml, 112x10⁶ cellule/ml, 113x10⁶ cellule/ml, 114x10⁶ cellule/ml, 115x10⁶ cellule/ml, 116x10⁶ cellule/ml, 117x10⁶ cellule/ml, 118x10⁶ cellule/ml, 119x10⁶ cellule/ml, 120x10⁶ cellule/ml, 121x10⁶ cellule/ml, 122x10⁶ cellule/ml, 123x10⁶ cellule/ml, 124x10⁶ cellule/ml, 125x10⁶ cellule/ml, 126x10⁶ cellule/ml, 127x10⁶ cellule/ml, 128x10⁶ cellule/ml, 129x10⁶ cellule/ml, 130x10⁶ cellule/ml, 131x10⁶ cellule/ml, 132x10⁶ cellule/ml, 133x10⁶ cellule/ml, 134x10⁶ cellule/ml, 135x10⁶ cellule/ml, 136x10⁶ cellule/ml, 137x10⁶ cellule/ml, 138x10⁶ cellule/ml, 139x10⁶ cellule/ml, 140x10⁶ cellule/ml, 141x10⁶ cellule/ml, 142x10⁶ cellule/ml, 143x10⁶ cellule/ml, 144x10⁶ cellule/ml, 145x10⁶ cellule/ml, 146x10⁶ cellule/ml, 147x10⁶ cellule/ml, 148x10⁶ cellule/ml, 149x10⁶ cellule/ml, 150x10⁶ cellule/ml, 151x10⁶ cellule/ml, 152x10⁶ cellule/ml, 153x10⁶ cellule/ml, 154x10⁶ cellule/ml, 155x10⁶ cellule/ml, 156x10⁶ cellule/ml, 157x10⁶ cellule/ml, 158x10⁶ cellule/ml, 159x10⁶ cellule/ml, 160x10⁶ cellule/ml, 161x10⁶ cellule/ml, 162x10⁶ cellule/ml, 163x10⁶ cellule/ml, 164x10⁶ cellule/ml, 165x10⁶ cellule/ml, 166x10⁶ cellule/ml, 167x10⁶ cellule/ml, 168x10⁶ cellule/ml, 169x10⁶ cellule/ml, 170x10⁶ cellule/ml, 171x10⁶ cellule/ml, 172x10⁶ cellule/ml, 173x10⁶ cellule/ml, 174x10⁶ cellule/ml, 175x10⁶ cellule/ml, 176x10⁶ cellule/ml, 177x10⁶ cellule/ml, 178x10⁶ cellule/ml, 179x10⁶ cellule/ml, 180x10⁶ cellule/ml, 181x10⁶ cellule/ml, 182x10⁶ cellule/ml, 183x10⁶ cellule/ml, 184x10⁶ cellule/ml, 185x10⁶ cellule/ml, 186x10⁶ cellule/ml, 187x10⁶ cellule/ml, 188x10⁶ cellule/ml, 189x10⁶ cellule/ml, 190x10⁶ cellule/ml, 191x10⁶ cellule/ml, 192x10⁶ cellule/ml, 193x10⁶ cellule/ml, 194x10⁶ cellule/ml, 195x10⁶ cellule/ml, 196x10⁶ cellule/ml, 197x10⁶ cellule/ml, 198x10⁶ cellule/ml, 199x10⁶ cellule/ml o 200x10⁶ cellule/ml o superiori. In una forma di realizzazione preferita, lo scambio dalla coltura per perfusione alla coltura a fed-batch avviene ad una densità cellulare almeno di circa 50x10⁶ cellule/ml. In una forma di realizzazione più preferita, lo scambio avviene ad una densità cellulare almeno di circa 100x10⁶ cellule/ml.

25 Come utilizzati qui, i termini “procedimento di fed-batch a super densità”, “procedimento SDF” e “procedimento di coltura cellulare a fed-batch a super densità” vengono utilizzati in modo intercambiabile e si riferiscono al procedimento di crescita cellulare in una coltura cellulare per perfusione e quindi di trasferimento delle cellule ad una modalità di coltura

a fed-batch, una volta che le cellule raggiungono una densità cellulare elevata (per esempio almeno superiore a 50×10^6 cellule/ml).

La transizione dalla coltura cellulare per perfusione alla coltura cellulare a fed-batch avviene una volta ottenuta una densità cellulare elevata (come discusso sopra). Una densità cellulare elevata può essere ottenuta in qualsiasi momento dopo l'inoculo della coltura cellulare, in relazione alla velocità di crescita della linea cellulare ed alla densità di semina. In una forma di realizzazione, la densità elevata può essere raggiunta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24 o 25 giorni dopo l'inoculo. In una forma di realizzazione preferita, la densità elevata viene raggiunta tra circa da 4 a 17 giorni dopo l'inoculo.

Come utilizzato qui, il termine "densità di cellule vitali" si riferisce al numero di cellule vive presente in un dato volume di terreno in una data serie di condizioni sperimentali.

Come utilizzato qui, il termine "vitalità cellulare" si riferisce alla capacità delle cellule in coltura di sopravvivere in una data serie di condizioni o di variazioni sperimentali. Il termine, come utilizzato qui, si riferisce anche a quella porzione di cellule che sono vive in un particolare momento in relazione al numero totale di cellule (per esempio viventi e morte) nella coltura in quel momento.

Come utilizzato qui, "la fase di crescita" di una coltura cellulare si riferisce alla fase durante la quale la densità di cellule vitali in qualsiasi istante è superiore rispetto a qualsiasi istante precedente.

Come utilizzato qui, la "fase di produzione" di una coltura cellulare si riferisce alla fase durante la quale le cellule producono quantità significative della proteina, che si accumula per la lavorazione futura.

Come utilizzato qui, il termine "integrale cellulare" si riferisce al numero complessivo di cellule vitali nel corso di un profilo di crescita cellulare.

Come utilizzato qui, il termine "titolo" si riferisce alla quantità totale di proteina prodotta da una coltura cellulare, divisa per una data quantità di volume del terreno. In sostanza, il termine "titolo" si riferisce ad una concentrazione e viene tipicamente espresso in unità di milligrammi di polipeptide per litro di terreno. I metodi della presente invenzione hanno l'effetto di aumentare sostanzialmente titolo di prodotto polipeptidico, in confronto al titolo di prodotto polipeptidico preparato da altri metodi di coltura cellulare noti nell'arte.

Come qui utilizzati, i termini “terreni”, “terreni di coltura cellulare” e “terreni di coltura”, comprese loro variazioni grammaticali, vengono utilizzati in modo intercambiabile e si riferiscono alla soluzione di nutrienti in cui le cellule (preferibilmente cellule animali o di mammifero) vengono fatte crescere in coltura. I terreni di coltura delle cellule sono l’ambiente fisiochimico, nutrizionale e ormonale per le cellule e comprendono tipicamente almeno uno o più componenti tra i seguenti: una fonte di energia (per esempio sotto forma di un carboidrato quale il glucosio); amminoacidi essenziali, compresi i venti amminoacidi di base più la cisteina; vitamine e/o altri composti organici tipicamente richiesti a basse concentrazioni; lipidi o acidi grassi liberi (per esempio l’acido linoleico); ed oligoelementi (per esempio composti inorganici o elementi presenti in natura che sono tipicamente richiesti a concentrazioni molto basse, solitamente nell’intervallo micromolare). I terreni possono essere solidi, gelatinosi, liquidi, gassosi o una miscela di fasi e materiali.

Le cellule utilizzate nei metodi della presente invenzione possono essere fatte crescere ed essere mantenute in numerosi terreni di coltura cellulare che sono noti nell’arte o sono disponibili in commercio. Una persona di ordinaria abilità nell’arte può scegliere di utilizzare uno o più terreni noti di coltura cellulare che vengono scelti per massimizzare crescita cellulare, vitalità cellulare e/o produzione proteica in una particolare cellula ospite in coltura. Terreni di coltura cellulare esemplificativi includono qualsiasi terreno adatto per la coltura di cellule che possono esprimere una proteina d’interesse, compresi, ma senza limitazione, un terreno privo di componenti animali, quale il terreno EX-CELL® TiterHigh (SAFC) e terreni definiti chimicamente, quali i terreni CD CHO (Invitrogen, Carlsbad, California) e CD OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, California)

Inoltre, i terreni di coltura cellulare possono essere facoltativamente arricchiti per includere uno o più componenti aggiuntivi, in concentrazioni o quantità appropriate, come necessario o come desiderato, e come sarebbe noto e praticato da parte di coloro che sono di abilità ordinaria nell’arte. Supplementi esemplificativi includono, ma non sono limitati a, agenti di selezione genetica chimici, ormoni ed altri fattori di crescita, (per esempio insulina, transferrina, fattore di crescita epidermico, siero, somatotropina, estratto di ipofisi, aprotinina); sali (per esempio calcio, magnesio e fosfato), e tamponi (per esempio HEPES (acido 4-[2-idrossietil]-1-piperazinetasolfonico)); nucleosidi e basi (per esempio adenosina, timidina, ipoxantina); lisati proteici e idrolisati; antibiotici (per esempio gentamicina); agenti protettivi cellulari (per esempio un poliolo Pluronic (Pluronic® F68)) e proteine della matrice extracellulare (per esempio

fibronectina). I supplementi che supportano la crescita ed il mantenimento di particolari colture cellulari sono in grado di essere facilmente determinati da parte di coloro che sono di abilità ordinaria nell'arte, come viene descritto per esempio da Barnes et al. (Cell, 22:649 (1980)); in Mammalian Cell Culture, a cura di Mather, J.P., Plenum Press, New York (1984); e nel brevetto US 5,721,121.

5 Come utilizzato qui, il termine "bioreattore" si riferisce a qualsiasi apparecchio, contenitore chiuso o recipiente (per esempio una camera di fermentazione) che viene utilizzato per far crescere colture cellulari. I bioreattori permettono di controllare vari parametri durante il procedimento di coltura cellulare compresi, ma non limitati a, flusso del circuito di circolazione, pH, temperatura, pressione positiva e/o velocità di perfusione del terreno. I bioreattori includono bioreattori disponibili in commercio, fermentatori classici e sistemi di perfusione di colture cellulari, così come bioreattori
10 monouso.

Il bioreattore può essere di qualsiasi dimensione che è utile per la coltura delle cellule ad una scala desiderabile secondo un metodo dell'invenzione. Per esempio, un bioreattore impiegato nei metodi della presente invenzione può essere almeno di 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115,
15 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 550, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8.000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 120000, 13000, 14000, 15000 litri o superiore, o di qualsiasi volume intermedio.

I metodi della presente invenzione possono impiegare uno o più bioreattori. Per esempio, in una forma di
20 realizzazione, la coltura cellulare per perfusione e la coltura cellulare a fed-batch possono essere realizzate nello stesso bioreattore. In un'altra forma di realizzazione, la coltura cellulare per perfusione può essere realizzata in bioreattori separati. In un'altra forma di realizzazione, le cellule dalla coltura cellulare per perfusione possono essere trasferite a bioreattori multipli a fed-batch.

Un bioreattore adatto può essere costituito da (cioè costruito con) qualsiasi materiale che sia adatto a mantenere
25 le colture cellulari nelle condizioni di coltura della presente invenzione e favorisca la crescita e la vitalità cellulare. Per

esempio, un bioreattore impiegato nei metodi della presente invenzione può essere fatto di vetro, plastica o metallo. Tuttavia, i materiali costituenti il bioreattore non dovrebbero interferire con l'espressione o la stabilità del prodotto polipeptidico. Bioreattori adatti sono noti nell'arte e disponibili in commercio.

5 Un bioreattore a perfusione utilizzato nei metodi della presente invenzione può essere un bioreattore a perfusione monouso o qualsiasi altro bioreattore a perfusione tradizionale. Il bioreattore può essere facoltativamente provvisto di qualsiasi dispositivo di ritenzione cellulare interno o esterno, compresi, ma senza limitazione, filtri per centrifugazione, filtri di membrana a flusso tangenziale, membrane dinamiche, separatori ultrasonici, sedimentatori per gravità, centrifuga continua o dispositivo di ritenzione cellulare acustico, dispositivi per microfiltrazione, dispositivi per ultrafiltrazione, ecc. In una forma di realizzazione particolare, il bioreattore è un bioreattore monouso provvisto di membrana per
10 microfiltrazione avente una dimensione dei pori da 1,2 a 10 μm .

Come utilizzato qui, il termine "antischiuma" si riferisce ad un agente che può essere aggiunto ad una coltura cellulare per impedire l'aumento di schiuma in eccesso. Esempi di agenti antischiuma includono, ma non sono limitati a, simeticone 3% prodotto da Invitrogen e HyClone. Gli agenti antischiuma sono disponibili in commercio e possono essere utilizzati a discrezione di una persona esperta nell'arte.

15 Le colture cellulari comprese dai metodi della presente invenzione possono essere fatte crescere a qualsiasi temperatura appropriata per il tipo cellulare e le condizioni di coltura. In una forma di realizzazione, è desiderabile utilizzare una temperatura tra circa 30°C e 38°C, per potenziare la produzione proteica. In un'altra forma di realizzazione, la temperatura è almeno di circa 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C o 41°C. Può anche essere desiderabile utilizzare temperature differenti in momenti differenti durante la
20 coltura.

A. Coltura cellulare

Come utilizzato qui, il termine "cellula", si riferisce a cellule animali, cellule di mammifero, cellule poste in coltura, cellule ospiti, cellule ricombinanti e cellule ospiti ricombinanti. Tali cellule sono generalmente linee cellulari ottenute o derivate da tessuti di mammifero che sono in grado di crescere e sopravvivere quando poste in terreni contenenti
25 sostanze nutrienti e/o fattori di crescita appropriati. Le cellule utilizzate nei metodi della presente invenzione sono

generalmente cellule animali o di mammifero che possono esprimere e secernere, o che possono essere ingegnerizzate a livello molecolare per esprimere e secernere, grandi quantità di una particolare proteina nel terreno di coltura. In una forma di realizzazione, la proteina prodotta dalla cellula può essere endogena od omologa rispetto alla cellula. In alternativa, la proteina è eterologa, cioè estranea, rispetto alla cellula.

5 Qualsiasi cellula che sia in grado di esprimere la proteina d'interesse può essere posta in coltura secondo i metodi della presente invenzione. Sono disponibili numerose linee cellulari da fonti commerciali, compreso, ma senza limitazione, l'American Type Culture Collection (ATCC). In una forma di realizzazione dell'invenzione, la coltura cellulare impiega cellule di ibridoma. La costruzione di cellule di ibridoma che producono anticorpi è ben nota nell'arte. In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, la coltura cellulare impiega cellule CHO.

10 Cellule rappresentative che possono essere utilizzate nei metodi della presente invenzione includono, ma non sono limitate a, cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), NSO, Per C6, HEK, COS, VERO076, BRL-3A, HepG2, MRC 5, 293T, A431, 3T3, CV-1, C3H10T1/2, Colo205, 293, cellule L, HL-60, FRhL-2, U937, HaK, cellule di Jurkat, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, Mix, cellule di mielomi murini (per esempio SP2/0 e NSO) e C2C12, DG44 (Chasin et al., Som. Cell Molec. Genet., 12:555-556 (1986); e Kolkekar et al., Biochemistry, 36:10901-10909 (1997)), linea cellulare
15 CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO indicata con ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Regno Unito), clone 13 di CHO (GEIMG, Genova, Italia), clone B di CHO (GEIMG, Genova, Italia), CHO-K1/SF indicata con ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Regno Unito), RR-CHOK1 indicata con ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, Regno Unito), cellule CHO negative per la diidrofolato reductasi (CHO-DHFR, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), e cellule dp12.CHO (Brevetto US 5,721,121); cellule CV1 di rene di scimmia trasformate
20 mediante SV40 (cellule COS, COS-7, ATCC® CRL-1651); cellule renali embrionali umane (per esempio cellule 293 o cellule 293 subclonate per crescita in coltura in sospensione, Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); cellule renali di criceto neonato (BHK, ATCC® CCL-10); cellule renali di scimmia (CV1, ATCC® CCL-70); cellule renali di cercopiteco grigio-verde africano (VERO-76, ATCC® CRL-1587; VERO, ATCC® CCL-81); cellule del Sertoli di topo (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); cellule di carcinoma del collo dell'utero umano (HeLa, ATCC® CCL-2);
25 cellule renali di cane (MDCK, ATCC® CCL-34); cellule polmonari umane (W138, ATCC® CCL-75); cellule di epatoma

umano (HEP-G2, HB 8065); cellule di tumore mammario di topo (MMT 060562, ATCC® CCL-51); cellule epatiche di ratto Buffalo (BRL 3A, ATCC® CRL-1442); cellule TRI (Mather, *Annals NY Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); cellule MCR 5; cellule FS4, così come linee cellulari di primate trasformate, ibridomi, cellule normali diploidi e ceppi cellulari derivati da coltura in vitro di tessuto primario ed espianti primari.

5 Le cellule adatte alla coltura nei metodi della presente invenzione possono contenere vettori di espressione (costrutti) introdotti (per esempio mediante trasformazione, trasfezione, infezione o iniezione), quali plasmidi e simili, che recano sequenze codificanti (o loro porzioni) che codificano una proteina desiderata. Tali vettori di espressione contengono gli elementi necessari per la trascrizione e la traduzione della sequenza codificante inserita ed in generale
10 includono, ma non sono limitati a, uno o più dei seguenti: una sequenza segnale, uno o più geni marcatori, un elemento potenziatore, un promotore ed una sequenza di terminazione della trascrizione.

 I metodi e le tecniche per costruire vettori di espressione contenenti sequenze codificanti le proteine prodotte, così come gli appropriati elementi di controllo trascrizionale e traduzionale, sono ben noti nell'arte. Tali metodi includono tecniche del DNA ricombinante in vitro, tecniche sintetiche e ricombinazione genetica in vivo (si veda per esempio
15 Sambrook J. et al., *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York (1989) ed in Ausubel, F.M. et al., *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York, New York (1989)).

 I costrutti di espressione possono essere introdotti nelle cellule mediante un'ampia varietà di metodi di trasferimento genico di routine nota nell'arte. Per esempio, tali metodi possono includere, ma non sono limitati a, metodi di trasfezione genica convenzionali, quali coprecipitazione con fosfato di calcio, trasfezione liposomiale, microiniezione, elettroporazione ed infezione o trasduzione virale (si vedano per esempio il brevetto US 4,399,216, Keown et al., *Methods
20 in Enzymology* (1989), Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) e Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988)).

 Numerosi vettori di espressione noti possono essere adatti per cellule ospiti eucariotiche coltivate secondo i metodi dell'invenzione, compresi, ma non limitati a, vettori per le cellule ospiti di mammifero (per esempio BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vettori pVPack,
25 vettori pCMV, vettori pSG5 (Stratagene), vettori retrovirali (per esempio vettori pFB (Stratagene)), pcDNA-3



(Invitrogen), vettori adenovirali; vettori di virus adenoassociati, vettori di baculovirus, vettori di lievito (per esempio vettori pESC (Stratagene)) o forme modificate di qualsiasi dei precedenti. I vettori possono anche contenere sequenze potenziatrici a monte o a valle delle sequenze della regione del promotore per ottimizzare l'espressione genica.

5 Gli elementi di controllo (per esempio le sequenze regolatrici) sono quelle regioni non tradotte del vettore, per esempio potenziatori, promotori, regioni non tradotte al 5' ed al 3', che interagiscono con proteine cellulari dell'ospite per condurre la trascrizione e la traduzione. Tali elementi variano nelle loro forza e specificità. In relazione al sistema di vettori e cellula ospite particolari, possono essere utilizzati numerosi elementi di trascrizione e di traduzione adatti, compresi promotori costitutivi ed inducibili. In sistemi di cellule di mammifero, i promotori da geni di mammifero o da virus di mammifero sono preferiti. I costrutti per uso nei sistemi di espressione di proteine vengono progettati per
10 contenere almeno un promotore, una sequenza potenziatrice (facoltativa, per sistemi di espressione di mammifero) ed altre sequenze come necessario o richiesto per trascrizione e regolazione dell'espressione genica opportune (per esempio sequenze di inizio e di terminazione della trascrizione, siti di origine di replicazione, sequenze di poliadenilazione). La scelta di un vettore appropriato per trascrizione, espressione ed isolamento opportuni di proteine prodotte nei sistemi di espressione eucariotici (per esempio di mammifero) è nota e ben all'interno dell'abilità ordinaria nell'arte.

15 Sequenze di controllo eucariotiche comunemente utilizzate per uso in vettori di espressione di mammifero includono promotori e sequenze di controllo compatibili con le cellule di mammifero quali, per esempio, il promotore del citomegalovirus (CMV) (vettore CDM8) ed il virus del sarcoma aviario (ASV). Altri promotori comunemente utilizzati includono i promotori precoce e tardivo da virus Simian 40 (SV40) (Fiers et al., Nature, 273:113 (1973)), o altri promotori virali come quelli derivati da poliovirus, adenovirus 2 e virus del papilloma bovino. Può essere anche utilizzato un
20 promotore inducibile, quale hMTII (Karin et al., Nature, 299:797-802 (1982)).

B. Produzione proteica

Come qui utilizzati, i termini "polipeptide", "prodotto polipeptidico", "proteina" e "prodotto proteico" vengono utilizzati in modo intercambiabile e, com'è noto nell'arte, si riferiscono ad una molecola consistente di due o più amminoacidi, per esempio, almeno una catena di amminoacidi legati attraverso legami peptidici sequenziali. In una forma
25 di realizzazione, una "proteina d'interesse" o un "polipeptide d'interesse" sono proteine codificate da molecole esogene

di acido nucleico che sono state utilizzate per trasformare una cellula ospite, in cui il DNA esogeno determina la sequenza amminoacidica. In un'altra forma di realizzazione, una "proteina d'interesse" è una proteina codificata da una molecola di acido nucleico che è endogena rispetto alla cellula ospite.

5 Numerosi polipeptidi possono essere prodotti mediante i metodi della presente invenzione. Polipeptidi
 esemplificativi includono prodotti genici, proteine presenti in natura, omologhi, ortologhi, paraloghi, frammenti ed altri
 equivalenti, varianti ed analoghi dei precedenti. I polipeptidi possono includere anche una o più modifiche quali, per
 esempio, una porzione lipidica, un fosfato, un residuo zuccherino, ecc. Polipeptidi particolari che possono essere
 desiderabili per l'espressione in un metodo dell'invenzione includono, ma non sono limitati a, citochine, recettori di
 citochine, fattori di crescita (per esempio fattore di crescita epidermico (EGF), recettore del fattore di crescita epidermico
 10 umano 2 (HER-2), fattore di crescita dei fibroblasti alfa (FGF- α), fattore di crescita dei fibroblasti beta (FGF- β), fattore
 di crescita trasformante alfa (TGF- α), fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), fattore di crescita derivato dalle
 piastrine (PDGF), fattore di crescita simile all'insulina 1 (IGF-1), fattore di crescita simile all'insulina 2 (IGF-2), fattore
 di crescita nervoso (NGF), fattore di crescita nervoso beta (NGF- β)); recettori dei fattori di crescita, comprese proteine
 chimeriche o di fusione, ormoni della crescita (per esempio ormone della crescita umano, ormone della crescita bovino);
 15 insulina (per esempio catena insulinica A e catena insulinica B), proinsulina; eritropoietina (EPO); fattori stimolanti le
 colonie (per esempio fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), fattore stimolante le colonie di granulociti e dei
 macrofagi (GM-CSF), fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF)); interleuchine (per esempio da IL-1 a IL-12);
 fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) ed il suo recettore (VEGF-R); interferoni (per esempio IFN- α , β o γ) e
 loro recettori; fattore di necrosi tumorale (per esempio TNF- α e TNF- β) e loro recettori, TNFR-1 e TNFR-2;
 20 trombopoietina (TPO); trombina; peptide natriuretico cerebrale (BNP); fattori della coagulazione (per esempio fattore
 VIII, fattore IX, fattore di von Willebrand e simili); fattori anticoagulativi; attivatore tissutale del plasminogeno (TPA),
 per esempio, urochinasi o dell'urina umana o di tipo tissutale TPA; ormone follicolo stimolante (FSH); ormone
 luteinizzante (LH); calcitonina; proteine CD (per esempio CD3, CD4, CD8, CD28, CD19, ecc.); proteine CTLA (per
 esempio CTLA4); proteine recettoriali dei linfociti T e dei linfociti B; proteine morfogenetiche ossee (BMP, per esempio
 25 BMP-1, BMP-2, BMP-3, ecc.); fattori neurotrofici, per esempio, fattore neurotrofico derivato dalle ossa (BDNF);

neurotrofine, per esempio 3-6; renina; fattore reumatoide; RANTES (regolata sull'attivazione, espressa e secreta da linfociti T normali); albumina; relaxina; catena A della relaxina; catena B della relaxina; prorelaxina; proteina inibitoria macrofagica (per esempio MIP-1, MIP-2); proteine o antigeni virali; proteine di membrana superficiali; proteine canale ionico; enzimi; proteine regolatrici; anticorpi; proteine immunomodulatrici, (per esempio HLA, MHC, la famiglia B7);
5 recettori di migrazione selettiva; proteine di trasporto; superossido dismutasi (SOD); proteina recettoriale accoppiata alle proteine G (GPCR); proteine neuromodulatrici; proteine e peptidi associati alla malattia di Alzheimer, (per esempio A- β), ormone paratiroideo; ormone tireotropo; lipoproteine; glucagone; fattore natriuretico atriale; surfattante polmonare; bombesina; fattore di crescita emopoietica; encefalinas; un'albumina sierica (per esempio l'albumina sierica umana); sostanza inibente mulleriana; peptide associato alla gonadotropina; DNAsi; inibina; attivina; recettori per ormoni o fattori
10 di crescita; integrina; proteina A o D; proteine CD quali CD-3, CD-4, CD-8 e CD-19; PD-1 e PD-L1 (B7-H1 e ligando); e B7-H4, fattori osteoinduttivi; immunotossine; fattore accelerante la degradazione; ed altri come noto nell'arte, proteine di fusione e polipeptidi, proteine e polipeptidi chimerici e frammenti o porzioni o mutanti, varianti o analoghi di qualsiasi dei suddetti proteine e polipeptidi.

In ulteriori forme di realizzazione, i metodi della presente invenzione possono essere utilizzati per produrre
15 immunoglobuline (per esempio anticorpi), molecole contenenti domini di tipo immunoglobulinico (per esempio molecole contenenti domini di anchirina o fibronectina) e proteine di fusione all'Fc. Il termine "proteina di fusione all'Fc", come qui utilizzato, è inteso a comprendere proteine terapeutiche comprendenti una porzione derivata da un'immunoglobulina (cioè una porzione Fc) ed una porzione derivata da una seconda proteina non immunoglobulinica.

In una forma di realizzazione particolare dell'invenzione, il polipeptide prodotto mediante i metodi della presente
20 invenzione è un anticorpo. Il termine "anticorpo" viene utilizzato nel senso più ampio per comprendere qualsiasi tipo di anticorpo noto, compresi, ma senza limitazione, anticorpi monoclonali (compresi anticorpi monoclonali a lunghezza intera), anticorpi policlonali, anticorpi monospecifici, anticorpi multispecifici (per esempio anticorpi bispecifici), immunoadesine, chimere anticorpo-immunoadesina, anticorpi umanizzati, umani, chimerici, a catena singola, sintetici, ricombinanti, ibridi, mutati, innestati o generati in vitro. L'anticorpo può essere un anticorpo a lunghezza intera o un

frammento anticorpale. L'anticorpo può essere scelto tra qualsiasi degli isotipi anticorpali noti, per esempio IgA, IgG, IgD, IgE, IgM. L'anticorpo può essere un monomero, un dimero o un multimerico (per esempio un trimero o un pentamero).

I termini "anticorpo" o "immunoglobulina", come utilizzati qui in modo intercambiabile, comprendono anticorpi interi e qualsiasi loro frammento legante l'antigene (cioè "porzione legante l'antigene") o catene singole. Un "anticorpo" comprende almeno due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) interconnesse mediante legami disolfuro. Ciascuna catena pesante è costituita da una regione variabile della catena pesante (abbreviata qui come V_H) e da una regione costante della catena pesante. La regione costante della catena pesante è costituita da tre domini, CH1, CH2 e CH3. Ciascuna catena leggera è costituita da una regione variabile della catena leggera (abbreviata qui come V_L) ed una regione costante della catena leggera. La regione costante della catena leggera è costituita da un dominio, CL. Le regioni V_H e V_L possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, chiamate regioni determinanti la complementarietà (CDR), intervallate con regioni che sono più conservate, chiamate regioni cornice (FR). Ciascuna V_H e V_L è costituita da tre CDR e quattro FR, disposte dal dominio amminotermine al dominio carbossiterminale nell'ordine seguente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Le regioni variabili delle catene pesanti e leggere contengono un dominio di legame che interagisce con un antigene. Le regioni costanti degli anticorpi possono mediare il legame dell'immunoglobulina per tessuti o fattori dell'ospite, compresi varie cellule del sistema immunitario (per esempio cellule effettrici) ed il primo componente (C1q) del sistema del complemento classico.

Il termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo (o semplicemente "porzione anticorpale"), come utilizzato qui, si riferisce ad uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi specificamente ad un antigene. È stato mostrato che la funzione di legame di un anticorpo con l'antigene può essere realizzata da frammenti di un anticorpo a lunghezza intera. Esempi di frammenti di legame compresi nel termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo includono (i) un frammento Fab, un frammento monovalente consistente dei domini V_L , V_H , CL e CH1; (ii) un frammento $F(ab')_2$, un frammento bivalente comprendente due frammenti Fab legati da un ponte disolfuro nella regione cerniera; (iii) un frammento Fd consistente dei domini V_H e CH1; (iv) un frammento Fv consistente dei domini V_L e V_H di un singolo braccio di un anticorpo, (v) un dAb comprendente i domini V_H e V_L ; (vi) un frammento dAb (Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989)), che consiste di un dominio V_H ; (vii) un dAb che consiste di un dominio V_H o

VL; e (viii) una regione determinante la complementarità (CDR) isolata o (ix) una combinazione di due o più CDR isolate che possono facoltativamente essere unite da un gruppo di collegamento sintetico. Inoltre, sebbene i due domini del frammento F_v, V_L e V_H, siano codificati da geni distinti, essi possono essere uniti, utilizzando metodi ricombinanti, da un gruppo di collegamento sintetico che permette loro di essere prodotti come catena proteica singola in cui le regioni V_L e V_H si appaiano per formare molecole monovalenti (note come F_v a catena singola (scFv); si vedano per esempio Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988); e Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)). Anche tali anticorpi a catena singola si intendono essere compresi nel termine “porzione legante l’antigene” di un anticorpo. Questi frammenti anticorpali vengono ottenuti utilizzando tecniche convenzionali note a coloro con esperienza nell’arte, ed i frammenti vengono esaminati per l’utilità nello stesso modo degli anticorpi intatti. Le porzioni leganti l’antigene possono essere prodotte mediante tecniche del DNA ricombinante, o mediante scissione enzimatica o chimica di immunoglobuline intatte.

Il termine “anticorpo monoclonale” come utilizzato qui si riferisce ad un anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenea, cioè i singoli anticorpi comprendenti la popolazione sono identici, tranne che per possibili mutazioni presenti in natura che possono essere presenti in piccole quantità. Gli anticorpi monoclonali sono altamente specifici, essendo diretti contro un singolo sito antigenico. Inoltre, in contrasto con preparazioni anticorpali convenzionali (policlonali) che tipicamente includono anticorpi differenti diretti contro determinanti differenti (epitopi), ciascun anticorpo monoclonale è diretto contro un singolo determinante sull’antigene. Per esempio, gli anticorpi monoclonali possono essere prodotti utilizzando la tecnologia convenzionale dell’ibridoma descritta per la prima volta da Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o possono essere prodotti utilizzando metodi del DNA ricombinante (si veda per esempio il brevetto US 4,816,567). Gli anticorpi monoclonali possono anche essere isolati da librerie fagiche di anticorpi, per esempio utilizzando le tecniche descritte in Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); e brevetti US 5,223,409; 5,403,484; 5,571,698; 5,427,908; 5,580,717; 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; e 6,593,081.

Un “anticorpo bispecifico” o “bifunzionale” è un anticorpo ibrido artificiale avente due differenti coppie di catene pesanti/leggere e due siti di legame differenti. Gli anticorpi bispecifici possono essere prodotti mediante una varietà



di metodi, compresi fusione di ibridomi o legame di frammenti Fab'. Si vedano per esempio Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553 (1992).

Un "anticorpo isolato", come utilizzato qui, è inteso a riferirsi ad un anticorpo che è sostanzialmente privo di altri anticorpi aventi differenti specificità antigeniche. Inoltre, un anticorpo isolato è tipicamente sostanzialmente privo di altri materiale cellulare e/o sostanze chimiche. In una forma di realizzazione dell'invenzione, anticorpi monoclonali multipli "isolati" aventi differenti specificità di legame sono combinati in una composizione ben definita.

Come utilizzato qui, "isotipo" si riferisce alla classe anticorpale (per esempio IgM o IgG1) che viene codificata da geni della regione costante della catena pesante. In una forma di realizzazione, un anticorpo o una sua porzione legante l'antigene sono di un isotipo scelto tra un isotipo anticorpale IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.

Gli anticorpi monoclonali qui descritti includono anticorpi "chimerici" ed "umanizzati" in cui una porzione delle catene pesante e/o leggera è identica od omologa alle sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da una specie particolare o appartenenti ad una classe o ad una sottoclasse particolari dell'anticorpo, mentre il resto della/e catena/e è identico od omologo a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti ad un'altra classe o sottoclasse anticorpali, così come frammenti di tali anticorpi, a condizione che esibiscano l'attività biologica desiderata (brevetto US 4,816,567; e Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Le forme "umanizzate" degli anticorpi non umani (per esempio murini) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da un'immunoglobulina non umana. Per la maggior parte, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui i residui della regione ipervariabile del ricevente sono sostituiti con residui della regione ipervariabile da una specie non umana (anticorpo donatore) quali un topo, un ratto, un coniglio o un primate diverso dall'uomo aventi la specificità, l'affinità e la capacità desiderate. In alcuni esempi, residui della regione cornice Fv (FR) dell'immunoglobulina umana sono sostituiti con i residui non umani corrispondenti. Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo ricevente o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche vengono realizzate per perfezionare ulteriormente la prestazione dell'anticorpo. In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente tutto almeno uno, e tipicamente due, domini variabili, in cui tutte o sostanzialmente tutte le



anse ipervariabili corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le regioni FR sono quelle di una sequenza immunoglobulinica umana. L'anticorpo umanizzato comprenderà facoltativamente anche almeno una porzione di una regione costante immunoglobulinica (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Per ulteriori dettagli, si vedano Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988);
5 e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Gli anticorpi chimerici o umanizzati possono essere preparati sulla base della sequenza di un anticorpo monoclonale murino preparato come descritto sopra. Il DNA codificante le immunoglobuline delle catene pesante e leggera può essere ottenuto dall'ibridoma di topo d'interesse e modificato geneticamente per contenere sequenze immunoglobuliniche non murine (per esempio umane) utilizzando tecniche di
10 biologia molecolare standard. Per esempio, per creare un anticorpo chimerico, le regioni variabili murine possono essere legate a regioni costanti umane utilizzando metodi noti nell'arte (si veda per esempio il brevetto US 4,816,567 a Cabilly et al.). Per creare un anticorpo umanizzato, le regioni CDR murine possono essere inserite in una regione cornice umana utilizzando metodi noti nell'arte (si vedano per esempio il brevetto US 5,225,539 a Winter ed i brevetti US 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 e 6,180,370 a Queen et al.).

Gli anticorpi monoclonali qui descritti includono anche anticorpi "umani", che possono essere isolati da varie
15 fonti, compreso, per esempio, dal sangue di un paziente umano o preparati per via ricombinante utilizzando animali transgenici. Esempi di tali animali transgenici includono KM-MOUSE® (Medarex, Inc., Princeton, New Jersey), che ha un transgene della catena pesante umana ed un transcromosoma della catena leggera umana (si veda WO 02/43478), XENOMOUSE® (Abgenix, Inc., Fremont California; descritto per esempio nei brevetti US 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 e 6,162,963 a Kucherlapati et al.), e HUMAB-MOUSE® (Medarex, Inc.; descritto per esempio in
20 Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research*, 20:6287-6295 (1992); Chen, J. et al., *International Immunology*, 5:647-656 (1993); Tuaille et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3720-3724 (1993); Choi et al., *Nature Genetics*, 4:117-123 (1993); Chen, J. et al., *EMBO J.*, 12: 821-830 (1993); Tuaille et al., *J. Immunol.*, 152:2912-2920 (1994); Taylor, L. et al., *International Immunology*, 6: 579-591 (1994); e Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996); i brevetti US 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; e 5,770,429;
25 5,545,807; e le pubblicazioni PCT No. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 e WO

99/45962, WO 01/14424 a Korman et al.). Gli anticorpi monoclonali umani dell'invenzione possono anche essere preparati utilizzando topi con SCID in cui sono state ricostituite cellule immunitarie umane, in modo tale che si possa generare una risposta anticorpale umana in seguito ad immunizzazione. Tali topi vengono descritti, per esempio, nei brevetti US 5,476,996 e 5,698,767 a Wilson et al.

5 Un altro esempio del tipo di proteina che può essere prodotto utilizzando i metodi della presente invenzione è una proteina di fusione. Una proteina di fusione è una proteina, o un dominio di una proteina (per esempio un dominio extracellulare solubile) fuso ad una proteina o ad un peptide eterologhi. Proteine di fusione rappresentative includono, ma non sono limitate a, proteine espresse come fusione con una porzione di una molecola immunoglobulinica, proteine espresse come proteine di fusione con una porzione a cerniera e nuove proteine polifunzionali, quali una proteina di fusione di una citochina ed un fattore di crescita. WO 93/08207 e WO 96/40918 descrivono la preparazione di varie forme oligomeriche solubili di una molecola chiamata CD40L, comprendenti una proteina immunoglobulinica di fusione ed una proteina di fusione a cerniera, rispettivamente. Le tecniche descritte in WO 93/08207 e WO 96/40918 sono applicabili ad altre proteine. Generalmente parlando, qualsiasi molecola può essere espressa come proteina di fusione compresi, ma senza limitazione, il dominio extracellulare di una molecola recettoriale cellulare, un enzima, un ormone, una citochina, una porzione di una molecola immunoglobulinica, un dominio a cerniera, ed un epitopo.

10

15

C. Chiarificazione e purificazione di colture cellulari

La presente descrizione descrive metodi migliorati per chiarificare una coltura cellulare, per esempio, in modo tale da facilitare la raccolta della proteina espressa. Specificamente, la presente descrizione descrive un metodo per chiarificare una proteina da una coltura cellulare regolando il pH della coltura cellulare sotto al pH neutro (cioè sotto ad un pH di 7) e facendo sedimentare la coltura cellulare, in modo tale che la coltura cellulare si separi per formare uno strato di surnatante ed uno strato di letto cellulare, in cui la proteina è presente nello e può essere isolata dallo strato del surnatante. I metodi descritti nella presente descrizione possono comprendere passaggi per potenziare il procedimento di chiarificazione. Per esempio, dopo che la proteina viene isolata dallo strato del surnatante, i metodi possono anche comprendere il lavaggio del letto cellulare con tampone allo stesso pH, ulteriore sedimentazione ed ulteriore filtrazione in modo tale che si possa ottenere una maggiore resa proteica dalla coltura cellulare. I metodi di chiarificazione qui

20

25



descritti possono essere utilizzati in combinazione con il suddetto metodo di coltura cellulare o qualsiasi altro metodo di coltura cellulare.

Come utilizzato qui, il termine “strato del surnatante della coltura cellulare” si riferisce alla frazione liquida della coltura cellulare, compresa la fase liquida del letto cellulare.

5 Come utilizzato qui, il termine “strato del letto cellulare” si riferisce allo strato della biomassa della coltura cellulare.

Come utilizzato qui, il termine “sedimentazione” si riferisce al procedimento del permettere alla coltura cellulare di stare a riposo indisturbata per un periodo di tempo, in modo tale da facilitare la separazione del surnatante dal letto cellulare. La coltura cellulare può essere lasciata sedimentare per qualsiasi periodo di tempo, compresi, ma senza
10 limitazione, circa 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, e 145 minuti. In una forma di realizzazione,
15 la coltura cellulare può essere lasciata sedimentare per circa tra 30-120 minuti. In un'altra forma di realizzazione, la coltura cellulare può essere lasciata sedimentare per circa tra 30-60, 60-90 o 90-120 minuti.

Le colture cellulari possono essere chiarificate utilizzando i metodi qui descritti, da soli o in combinazione con altre tecniche note di chiarificazione e di purificazione. Tali procedimenti noti hanno incluso, ma non sono limitati a,
20 filtrazione, centrifugazione, precipitazione (per esempio precipitazione con etanolo o precipitazione con solfato d'ammonio), separazione di fase, purificazione per affinità, permeazione su gel, cromatografia a scambio ionico, cromatografia ad interazione idrofobica (HIC; utilizzando resine quali fenilettere, butilettere o etere propilico), HPLC o frazionamento su colonne per immunoaffinità o a scambio ionico, SDS-PAGE inversa o qualsiasi combinazione di queste tecniche. Un inibitore delle proteasi quale il fenilmetilsolfonilfluoruro (PMSF) può anche essere utile per inibire la degradazione proteolitica durante la chiarificazione.

Un esperto nell'arte comprenderà che i metodi di chiarificazione adatti per la proteina d'interesse possono richiedere una modifica per tenere conto delle variazioni nella natura della proteina dopo l'espressione in una coltura di cellule ricombinanti. Inoltre, il grado desiderato di chiarificazione dipende dalla proteina particolare e dall'uso desiderato della proteina. Le proteine isolate infine utilizzando i metodi qui descritti possono essere adatte per usi terapeutici e diagnostici.

Come utilizzato qui, il termine "filtrazione di profondità" si riferisce ad un tipo di filtrazione realizzata utilizzando un filtro di profondità. Un filtro di profondità solitamente ha strati multipli di terreni di filtrazione, ciascuno di dimensione e densità variabili, che diventano progressivamente più fini e più densi nello strato inferiore. Un filtro di profondità blocca il particolato all'interno della sua struttura, non solo sulla superficie.

Come utilizzato qui, il termine "filtrazione di rifinitura" si riferisce ad un più fine grado di filtrazione di profondità e di filtrazione su membrana.

La presente invenzione viene ulteriormente illustrata dagli esempi seguenti che non dovrebbero essere intesi come ulteriormente limitanti.

ESEMPI

Esempio I: procedimento di coltura cellulare a fed-batch a super densità

A. Metodi sperimentali

Cellule ricombinanti CHO (cioè cellule CHOK1SV che producono un anticorpo) sono state espanse in fiasche da coltura cellulare prima di inoculare il bioreattore a perfusione Wave. Il bioreattore a perfusione è stato messo in funzione con lo stesso terreno basale che viene utilizzato nel procedimento di espansione cellulare. La velocità di perfusione è stata regolata per mantenere una coltura sana con vitalità cellulari elevate. In alcuni esperimenti, le cellule sono state concentrate ad una densità cellulare superiore, come appropriato, regolando le portate del terreno in entrata ed in uscita. Dopo che la densità di cellule vitali ha raggiunto più di 50×10^6 cellule/ml, è cominciato il procedimento di produzione a fed-batch. La coltura è stata alimentata mediante una combinazione di modalità di alimentazione in bolo e continua, in modo tale da controllare l'osmolalità ed il livello di glucosio. La coltura cellulare è stata quindi raccolta quando la vitalità cellulare è diminuita ad approssimativamente il 60-10%.



B. Esperimento 1

Le cellule sono state inoculate in un BIOSTAT Cultibag (Sartorius) ad approssimativamente $0,84 \times 10^6$ cellule/ml. La velocità di perfusione specifica (SPR) variava da 0,25 a $0,03 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹. Le cellule sono state concentrate di circa 2,6 volte quando la densità di cellule vitali ha raggiunto $12,6 \times 10^6$ cellule/ml. Dopo la
5 concentrazione, le cellule sono state fatte crescere fino a $108,8 \times 10^6$ cellule/ml. Una volta che le cellule hanno raggiunto $108,8 \times 10^6$ cellule/ml, la perfusione è stata fermata ed il procedimento di fed-batch è cominciato immediatamente. Durante il procedimento di fed-batch, una o due alimentazioni in bolo dal 3 al 10% (cioè la percentuale di alimentazione sul volume a seguito dell'alimentazione) sono state realizzate ogni giorno per mantenere la vitalità cellulare. Il glucosio è stato anche arricchito mediante alimentazione in bolo per mantenere un livello sufficiente. La densità cellulare ha
10 raggiunto $124,66 \times 10^6$ cellule/ml con il 98% di vitalità il secondo giorno dopo l'inizio del procedimento di fed-batch. La percentuale di alimentazione totale è stata circa del 40%. Come mostrato nel profilo di crescita e di produzione descritto nella figura 3, è stata ottenuta una produttività finale di 8,8g/l dal procedimento di fed-batch dopo 6 giorni al 39% di vitalità.

C. Esperimento 2

15 Le cellule sono state inoculate nel bioreattore WAVE® (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut) ad approssimativamente $0,81 \times 10^6$ cellule/ml. La velocità di perfusione specifica (SPR) variava da 0,07 a $0,01 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹ e variava in momenti differenti. Le cellule sono state concentrate di circa 1,5 volte per una notte tra i giorni 15 e 16. Il giorno 16, la densità cellulare ha raggiunto fino a $136,5 \times 10^6$ cellule/ml. In questo punto temporale, il procedimento di perfusione è stato fermato ed è cominciato il procedimento di fed-batch. Una o due alimentazioni in bolo dall'1 al 6%
20 sono state realizzate nei primi due giorni per mantenere la vitalità cellulare. L'alimentazione continua di glucosio e/o di altre sostanze nutrienti è stata cominciata il primo giorno del procedimento di fed-batch per mantenere il livello di glucosio, così come per promuovere una favorevole tendenza di osmolalità crescente, mentre si forniscono sufficienti sostanze nutrienti.

25 Le cellule sono cresciute a $142,0 \times 10^6$ cellule/ml circa 7 ore dopo l'inizio del procedimento di fed-batch ed la percentuale di alimentazione totale è stata circa del 28%. Come mostrato nel profilo di crescita e di produzione descritto

nella figura 4, è stata ottenuta una produttività finale di 13,8g/l dopo 6 giorni al 61% vitalità dalla fase di produzione a fed-batch.

5 Durante questo esperimento, si è notato che dei componenti di alimentazione sono fuoriusciti dalla soluzione nella colonna di erogazione della pompa durante il procedimento di alimentazione continua, probabilmente a causa della bassa portata. Pertanto, sono state eseguite alcune modifiche nelle alimentazioni in uno studio successivo (si veda l'esperimento #5 sotto) per impedire la precipitazione di componenti dell'alimentazione nella colonna di erogazione della pompa.

D. Esperimento 3

10 Le cellule sono state inoculate nel bioreattore WAVE® (GE Healthcare, Fairfield, Connecticut) ad approssimativamente $1,20 \times 10^6$ cellule/ml. La velocità di perfusione specifica (SPR) variava da 0,07 a 0,03 (per esempio $0,05 \times 10^{-6}$ ml cellula⁻¹ giorno⁻¹ e variava in momenti differenti. Come mostrato nella figura 5, le cellule sono state parzialmente trasferite il giorno 13 ed il giorno 18 a due bioreattori separati con serbatoi da agitazione da 5 litri ad una densità cellulare di approssimativamente 50×10^6 cellule/ml. È stato anche aggiunto un agente antischiuma per far fronte alla schiuma nei bioreattori. Come mostrato nel profilo di crescita e di produzione descritto nella figura 5, è stata ottenuta
15 una produttività finale di 6,3g/l a circa il 40% vitalità dalle cellule in fed-batch trasferite il giorno 13 (cioè 2391AB) (si veda la figura 6). È stata ottenuta una produttività finale di 7,1g/l a circa il 38% di vitalità dalle cellule in fed-batch trasferite il giorno 18 (cioè 2391BB) (si veda la figura 6).

E. Esperimento 4

20 Un'ulteriore esecuzione di perfusione è stata realizzata per ripetere il procedimento di coltura cellulare degli esempi precedenti in un singolo bioreattore a perfusione (cioè in modo tale che sia la perfusione che il fed-batch avvenissero nello stesso bioreattore). Attraverso l'ottimizzazione del procedimento di perfusione (per esempio della velocità di perfusione specifica (SPR)), la densità cellulare ha raggiunto oltre 100×10^6 cellule/ml il giorno 8. L'SPR è stata mantenuta ad un intervallo di circa da 0,15 a 0,05 per mantenere le cellule in una condizione stabile e di salute. Questo ha condotto ad un incremento di più del 100% della velocità di crescita cellulare, rispetto alle esecuzioni di
25 perfusione iniziali (esperimenti #1 e 2). La densità cellulare è aumentata di circa il 70% al giorno.



Una volta che la densità cellulare ha raggiunto oltre 100×10^6 cellule/ml, il procedimento di fed-batch è cominciato immediatamente ed è stata fermata la perfusione di terreno. Sono state realizzate alimentazioni in bolo da due a tre volte dal 2 al 6% ogni giorno per tre giorni. Il secondo giorno dopo l'inizio del procedimento di fed-batch, la densità cellulare ha raggiunto $119,5 \times 10^6$ cellule/ml ed è stato ottenuto il 98% di vitalità. È stata eseguita un'alimentazione continua di glucosio e/o di altre sostanze nutrienti durante tutto il procedimento di fed-batch per mantenere il livello di glucosio e controllare la velocità di incremento di osmolalità. La percentuale di volume di alimentazione totale è stata circa del 60%.

L'ottimizzazione di concentrazioni e rapporti per i componenti dell'alimentazione ha condotto ad una soluzione limpida nella colonna di erogazione della pompa durante il procedimento di alimentazione continua. Non è stata osservata nessuna precipitazione visibile. Tuttavia, il volume di alimentazione è aumentato significativamente in confronto all'esperimento #2, il che ha portato ad una concentrazione diluita del prodotto. Come mostrato nella figura 7, la produttività volumetrica finale è stata di 8,9g/l.

F. Riassunto degli esperimenti 1-4

La figura 8 riassume la produttività e l'integrale cellulare degli esperimenti #1-3 (cioè in cui il procedimento di fed-batch è cominciato con oltre 100×10^6 cellule/ml) e dell'esperimento #4 (cioè in cui il procedimento di fed-batch è cominciato con circa 50×10^6 cellule/ml). La produttività è rappresentata in termini di titolo finale reale osservato, così come di titolo normalizzato (per esempio normalizzato dal volume di partenza e densità finale di cellule per perfusione per 100 milioni di cellule/ml). Per esempio, il titolo normalizzato può essere calcolato come segue:

titolo normalizzato = titolo osservato / (volume della coltura di partenza \times densità finale di cellule per perfusione in 10^6 cellule/ml) \times 100

G. Ottimizzazione delle condizioni di coltura cellulare

Vari parametri sperimentali possono essere regolati per ottimizzare le condizioni di coltura cellulare. Per esempio, il terreno basale può essere ottimizzato concentrando le sostanze nutrienti, in modo tale da ridurre potenzialmente il volume di perfusione. In alternativa o in aggiunta, il componente di tamponamento del pH nel terreno basale può essere ottimizzato per gestire condizioni di pH basso tipiche dei bioreattori a serbatoi da agitazione tradizionali.

Inoltre, la composizione dell'alimentazione e/o la strategia di alimentazione possono essere ottimizzate per promuovere produttività ed efficienza, mentre si mantiene una buona solubilità.

Esempio 2: chiarificazione del procedimento di coltura cellulare a fed-batch a super densità

5 A causa delle densità cellulari super elevate prodotte nei suddetti metodi di coltura, la coltura risultante ha una percentuale elevata di volume solido di letto cellulare (per esempio il 20% del volume di letto cellulare per le colture quando la densità cellulare è oltre 100×10^6 cellule/ml mediante sedimentazione naturale o centrifugazione) e surnatante molto torbido. Pertanto, raccogliere la proteina può essere laborioso. Conseguentemente, diversi metodi sperimentali differenti sono stati testati per migliorare l'efficienza del procedimento di raccolta, cioè sedimentazione cellulare, adjuvante di filtrazione, aggiunta di CaCl_2 , diminuzione del pH a 5,5 prima della sedimentazione cellulare, così come
10 varie combinazioni di queste tecniche.

Specificamente, varie condizioni sono state testate utilizzando l'esecuzione 1201-09-29311AB dall'esperimento #3 (descritto sopra). Come mostrato nella figura 9, il pH è stato diminuito a 4,5 o 5,5, con o senza l'aggiunta di un adjuvante di filtrazione, prima della sedimentazione della coltura cellulare per 90 minuti. Tutte le condizioni testate hanno significativamente ridotto la torbidità (raffigurata come delle barre nella figura 9) dopo la sedimentazione cellulare.
15 Rispetto al titolo dei bioreattori di controllo, il pH 4,5 in combinazione con un adjuvante di filtrazione hanno condotto a della perdita di prodotto mediante analisi HPLC con proteina A (raffigurata come simboli a diamante nella figura 9).

Inoltre, diminuendo il pH o aggiungendo sali di calcio e/o adjuvante di filtrazione prima della sedimentazione, il volume del letto cellulare è aumentato a circa il 40-50% ed è stato prodotto un surnatante cellulare molto più limpido. Questo procedimento di chiarificazione potenziato è stato anche testato per altre proteine e sono stati ottenuti risultati
20 simili. In breve, la strategia di sedimentazione a pH basso ha significativamente aumentato la capacità di filtrazione ed ha aumentato anche la qualità del filtrato.

Passaggi addizionali, quale il lavaggio del letto con un tampone compatibile con il prodotto o PBS diluito alla stessa condizione di pH che si è utilizzata per lasciar sedimentare le cellule, ulteriore sedimentazione ed ulteriore filtrazione, possono essere facoltativamente realizzati per potenziare il procedimento di chiarificazione, come mostrato
25 nella figura 10. Tuttavia, si deve notare che la figura 10 non è intesa ad essere limitante, e gli ulteriori passaggi facoltativi

(per esempio filtrazione, centrifugazione, lavaggio, ecc.) possono avvenire in un ordine differente rispetto a come viene descritto nella figura 10. Per esempio, la centrifugazione può essere facoltativamente realizzata prima di o dopo il procedimento di sedimentazione.

RIVENDICAZIONI

1. Un metodo per aumentare la produzione di una proteina in una coltura cellulare, comprendente:
 - a) coltivare cellule che producono la proteina in una coltura cellulare per perfusione ad una densità cellulare di almeno superiore a circa 50×10^6 cellule/ml; e
 - 5 b) trasferire le cellule ad una coltura cellulare a fed-batch, in modo tale che le cellule entrino in fase di produzione;
in cui le cellule sono cellule animali.
2. Metodo della rivendicazione 1, in cui le cellule vengono fatte crescere nella coltura cellulare per perfusione ad una densità cellulare di circa tra 50×10^6 cellule/ml e 150×10^6 cellule/ml.
- 10 3. Metodo delle rivendicazioni 1 o 2, in cui le cellule vengono fatte crescere nella coltura cellulare per perfusione ad una densità cellulare di almeno superiore a circa 100×10^6 cellule/ml.
4. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la proteina è un anticorpo.
5. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la proteina viene scelta nel gruppo consistente di enzimi, recettori, proteine di fusione, citochine, fattori regolatori, ormoni, agenti leganti un antigene, proteine terapeutiche
- 15 e proteine diagnostiche.
6. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la coltura cellulare per perfusione e la coltura cellulare a fed-batch vengono fatte crescere in un bioreattore singolo.
7. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui la coltura cellulare per perfusione e la coltura cellulare a fed-batch vengono fatte crescere in bioreattori separati.
- 20 8. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 e 7, in cui la coltura cellulare a fed-batch viene fatta crescere in bioreattori multipli.
9. Metodo delle rivendicazioni 7 o 8, comprendente inoltre la raccolta della proteina dalla coltura cellulare a fed-batch e non dalla coltura cellulare per perfusione.




Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

10. Metodo della rivendicazione 6, comprendente inoltre la raccolta della proteina sia dalla coltura per perfusione che dalla coltura cellulare a fed-batch.

5

Il sottoscritto dichiara che la presente
traduzione è conforme al testo originale.

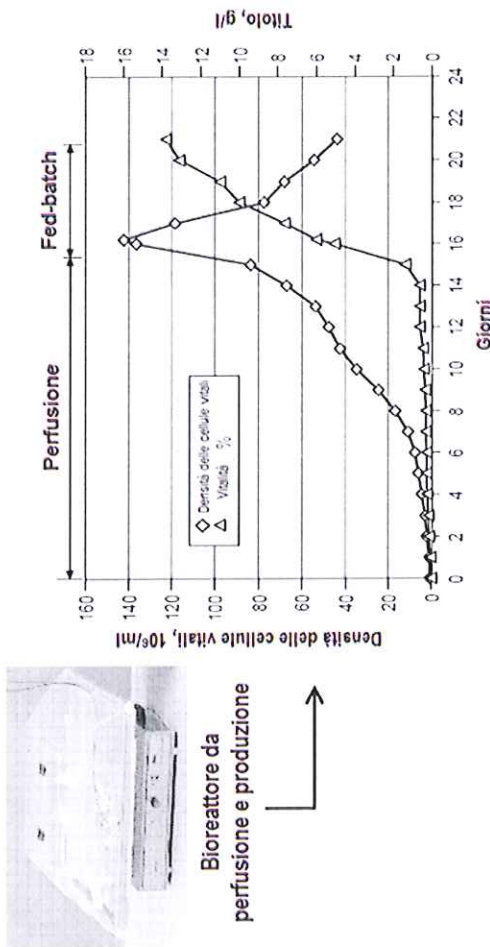
10



Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

FIG. 1

Crescita e produzione in bioreattore singolo



Bioreattore da perfusione e produzione



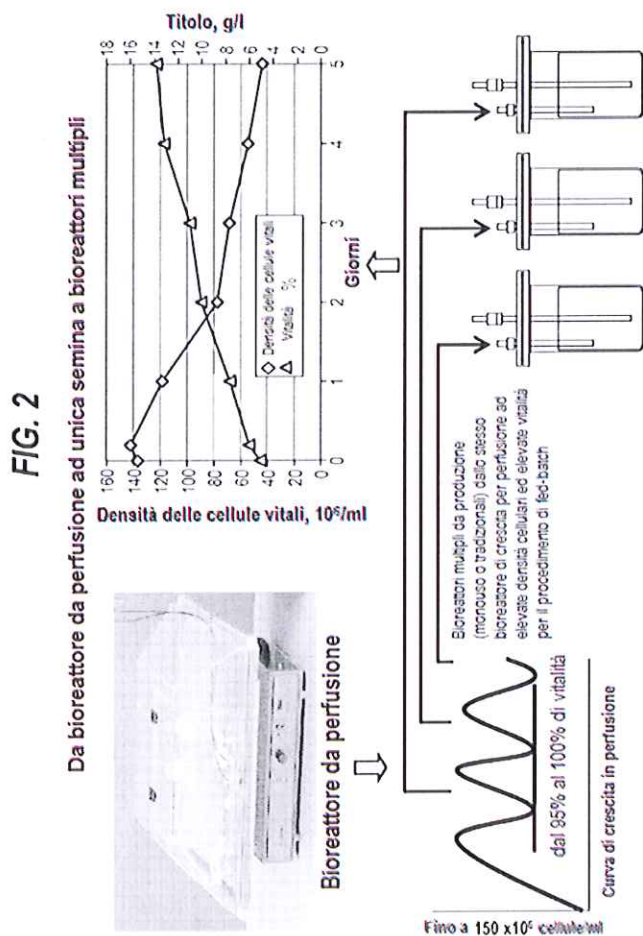


FIG. 3

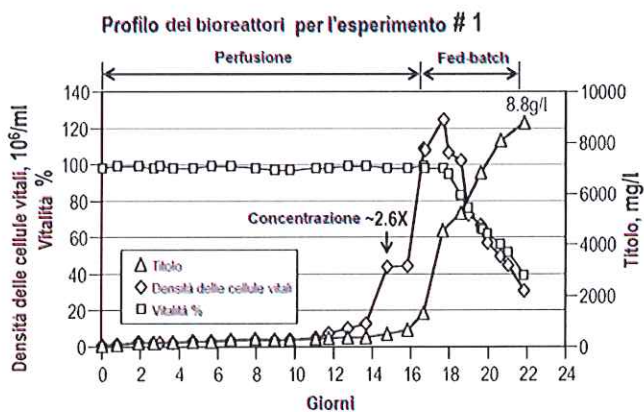


FIG. 4

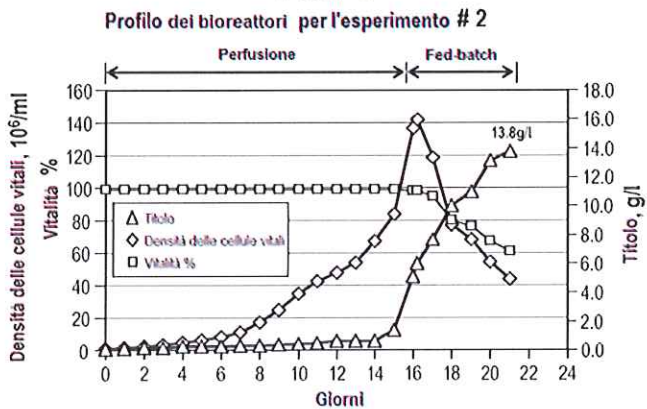


FIG. 5

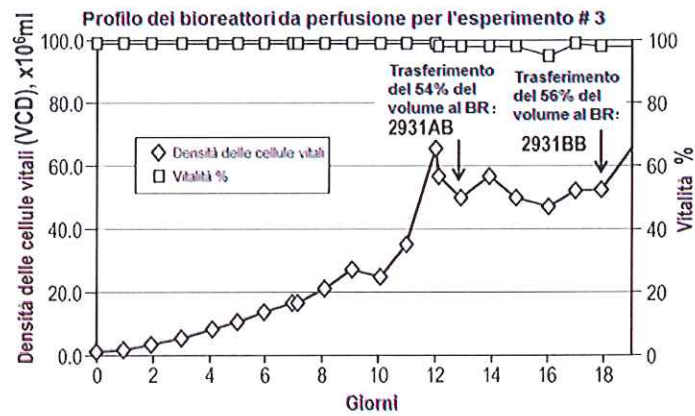


FIG. 6

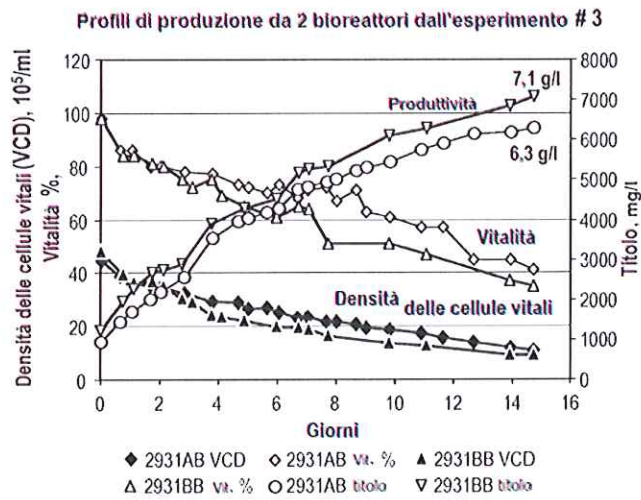


TAVOLA V

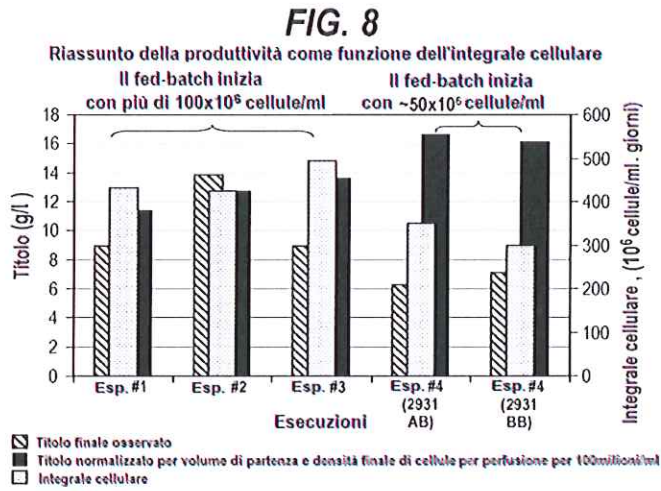
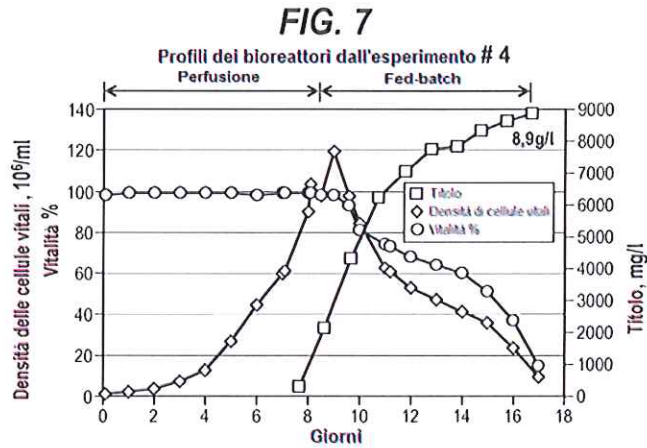


FIG. 9

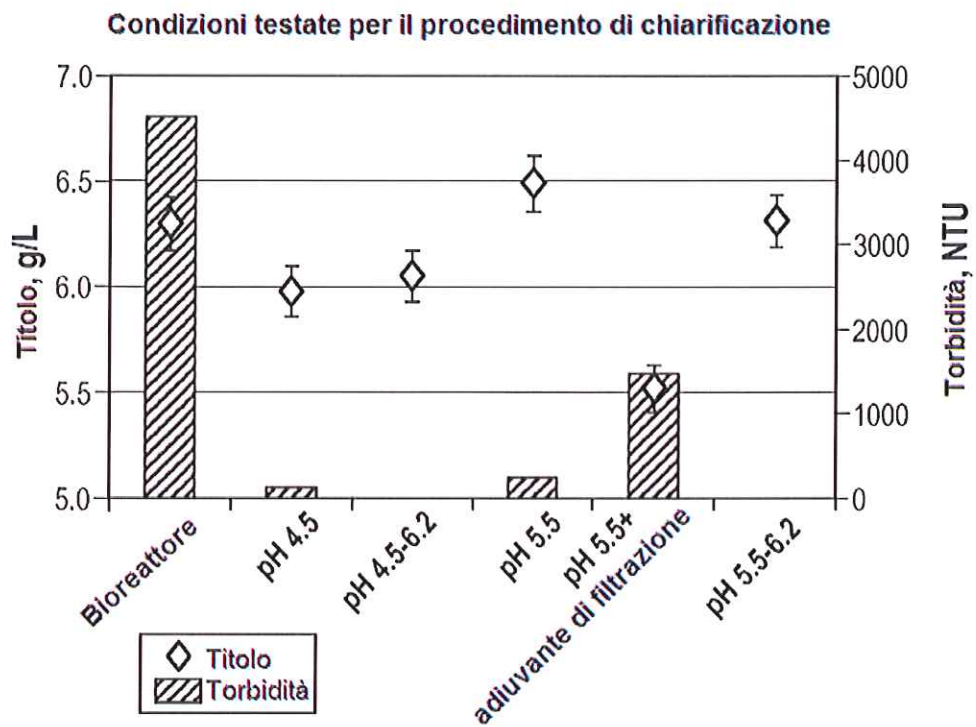


FIG. 10

Procedimento di chiarificazione di colture cellulari ad elevata densità

