

Brevetto europeo No. 3818078

Domanda di brevetto europeo No. 19745845.8

Data di deposito: 02 luglio 2019

Classificazione IPC: C07K16/00, C12N5/00

5 Classificazione CPC: C07K16/00 (EP,IL,KR,US); C12N5/0018 (EP,IL,KR,US); C12N15/85 (KR);
C12P21/00 (US); C07K2317/14 (EP,IL,KR,US); C12N2500/34 (US)

Priorità: Statunitense No. 201862693606P del 03 luglio 2018

Titolo: METODI DI PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI

Richiedente: Bristol-Myers Squibb Company

10 Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543
U.S.A.

Inventori: XU, Jianlin

15 YONGKY, Andrew
TIAN, Jun
BORYS, Michael C.
LI, Zhengjian

Descrizione

20 Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda genericamente metodi per incrementare la densità delle cellule vitali durante lo stadio di coltura N-1 con una strategia non perfusiva di inoculazione di bioreattori di produzione dello stadio N ad un'alta densità del seme per la produzione di colture di cellule.

Sfondo

Le proteine e i polipeptidi hanno acquisito sempre più importanza come agenti terapeutici. Nella maggior parte dei casi, la produzione di proteine e polipeptidi con utilità terapeutica avviene in coltura cellulare, usando cellule che sono state ingegnerizzate e/o selezionate per produrre livelli insolitamente alti del polipeptide d'interesse. Il controllo e l'ottimizzazione delle condizioni di coltura cellulare sono di cruciale importanza per il successo della produzione di proteine e polipeptidi su scala commerciale.

La produzione di molte proteine e polipeptidi in coltura cellulare avviene in un processo di tipo ad alimentazione discontinua in cui, dopo aver coltivato le cellule per un periodo di tempo, la coltura viene terminata, e la proteina o il polipeptide prodotto viene isolato. Lu et al. (Biotechnol. Bioeng., 110:191-205 (2013)) descrivono un processo ad alimentazione discontinua dinamico automatizzato e un'ottimizzazione dei terreni per lo sviluppo di processi di coltura cellulare ad alta produttività.

La quantità e la qualità finali della proteina o del polipeptide prodotto possono essere notevolmente influenzate dalla coltura del seme dello stadio N-1 e dalla densità del seme durante la produzione dello stadio N. Yongky et al. (ACS National Meeting & Exposition 288: BIOT 487 (2018)) descrivono una strategia di coltivazione del seme di tipo discontinuo dello stadio N-1 ad alta densità per la produzione di colture di cellule CHO. Nonostante gli sforzi profusi per migliorare la produzione di proteine e polipeptidi nei processi di coltura ad alimentazione discontinua, rimane la necessità di miglioramenti aggiuntivi.

La coltura cellulare in perfusione è in grado di raggiungere densità delle cellule vitali che sono molto più alte di quelle ottenibili con i convenzionali sistemi di coltura cellulare ad alimentazione discontinua. La coltura cellulare in perfusione fornisce un approvvigionamento continuo di terreno fresco nel sistema di coltura e rimuove al contempo i prodotti di scarto, fornendo così un ambiente ricco per la crescita delle cellule. Xu et al. (Biotechnol. Prog., 33:867-878 (2017)) confrontano le produttività in bioreattore per differenti modalità operative, tra cui i processi ad alimentazione discontinua e quelli in perfusione. Pohlscheidt et al. (Biotechnol. Prog., 29:222-229 (2013)) descrivono una strategia di tipo in perfusione su larga scala per bioreattori di training del seme dello stadio N-1. Rispetto alla coltura di produzione ad alimentazione discontinua convenzionale con una bassa densità del seme, la coltura di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità del seme, che viene inoculata con un seme ottenuto tramite coltura in perfusione dello stadio

N-1, è in grado di raggiungere un titolo finale più alto in meno tempo. Tuttavia, la coltura cellulare in perfusione diventa costosa se usata in sistemi di coltura su larga scala (ad esempio in bioreattori di volume superiore a 200 L) a causa delle grandi quantità di terreno di coltura cellulare che vengono consumate. Inoltre, specie per la produzione su larga scala, la coltura cellulare in perfusione può presentare complicazioni legate al sistema di ritenzione delle cellule che serve a impedire la rimozione delle cellule dal sistema di coltura cellulare.

Esiste in particolare la necessità di sviluppare sistemi migliorati per produrre proteine e polipeptidi in coltura cellulare su larga scala ad un'alta densità delle cellule seme con sistemi di tipo non perfusivo.

BREVE RIEPILOGO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è diretta ad un metodo per la produzione su larga scala di un polipeptide ricombinante d'interesse, che prevede di coltivare cellule ospiti che esprimono il polipeptide ricombinante d'interesse in un sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno arricchito per ottenere una densità di cellule vitali dello stadio N-1 di almeno 5×10^6 cellule vitali per mL; e inoculare un sistema di coltura di produzione dello stadio N, ad un'alta densità del seme di almeno $1,5 \times 10^6$ cellule per mL, con le cellule ospiti del sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio rispetto al terreno non arricchito e/o una quantità aumentata di nutrienti selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine rispetto al terreno non arricchito. In alcune forme esecutive, il sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo è una coltura di tipo discontinuo, e la cellula ospite viene coltivata in un terreno arricchito. In altre forme esecutive, il sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo è una coltura di tipo ad alimentazione discontinua, e la cellula ospite viene coltivata in un terreno di semina con l'aggiunta di un terreno di alimentazione. In alcune forme esecutive, la densità di cellule vitali dello stadio N-1 è almeno 10×10^6 , almeno 15×10^6 , almeno 20×10^6 , almeno 25×10^6 o almeno 30×10^6 cellule vitali per mL. In alcune forme esecutive, la vitalità cellulare è almeno 80% l'ultimo giorno dello stadio N-1, almeno 85% l'ultimo giorno dello stadio N-1, o almeno 90% l'ultimo giorno dello stadio N-1.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, il terreno è arricchito con un terreno di alimentazione di almeno 5% rispetto al terreno non arricchito, di almeno 10% rispetto al terreno non arricchito, di almeno 15% rispetto al terreno non

arricchito, o di almeno 20% rispetto al terreno non arricchito. In alcune forme esecutive, il terreno arricchito o il terreno di alimentazione comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio. In alcune forme esecutive, la fonte di carbonio è glucosio. In alcune forme esecutive, il terreno arricchito o il terreno di alimentazione comprende una quantità aumentata di nutrienti. In alcune forme esecutive, i nutrienti sono selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine. In alcune forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio e di nutrienti. In alcune forme esecutive, la fonte di carbonio è glucosio, e i nutrienti sono selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, la cellula ospite è una cellula di mammifero. In alcune forme esecutive, la cellula di mammifero è selezionata dal gruppo costituito da cellule CHO, cellule VERO, cellule BHK, cellule HEK, cellule HeLa, cellule COS, cellule MDCK e cellule di ibridoma. In alcune forme esecutive, la cellula ospite è una cellula CHO.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, il polipeptide d'interesse è un polipeptide terapeutico. In alcune forme esecutive, il polipeptide d'interesse è un anticorpo o un frammento legante l'antigene. In alcune forme esecutive, l'anticorpo o il frammento legante l'antigene lega un antigene selezionato dal gruppo costituito da PD-1, PD-L1, LAG-3, TIGIT, GITR, CXCR4, CD73, HER2, VEGF, CD20, CD40, CD11a, fattore tissutale (TF), PSCA, IL-8, EGFR, HER3 e HER4.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, il bioreattore è almeno 50 L, almeno 500 L, almeno 1.000 L, almeno 5.000 L o almeno 10.000 L.

In alcune forme esecutive, il sistema di coltura di produzione dello stadio N è un bioreattore di tipo ad alimentazione discontinua.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, il titolo del polipeptide d'interesse è almeno 100 mg/L, almeno 1 g/L, almeno 3 g/L, almeno 5 g/L o almeno 10 g/L.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno basale, o in un terreno basale arricchito, per ottenere una densità di cellule vitali dello stadio di produzione N che è almeno $1,5 \times 10^6$, almeno 5×10^6 o almeno 10×10^6 cellule vitali per mL.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, il terreno basale arricchito è arricchito con un terreno di alimentazione di almeno 5%, almeno 10%, almeno 15%, almeno 20% rispetto al terreno non arricchito. In alcune forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio. In alcune forme esecutive, la fonte di carbonio è glucosio. In alcune forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di nutrienti. In alcune forme esecutive, i nutrienti sono selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine. In alcune forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio e di nutrienti. In alcune forme esecutive, la fonte di carbonio è glucosio, e i nutrienti sono selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine.

In alcune forme esecutive dell'invenzione, il metodo comprende inoltre il passaggio di isolare il polipeptide d'interesse dal sistema di coltura di produzione dello stadio N. In alcune forme esecutive, il polipeptide d'interesse è un polipeptide terapeutico. In alcune forme esecutive, il polipeptide d'interesse è un anticorpo o un frammento legante l'antigene.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figure 1A e 1B. La Figura 1A mostra la densità di cellule vitali ("VCD") di una coltura di cellule dello stadio N-1 cresciuta nei seguenti sistemi di coltura cellulare per la Linea di cellule CHO A: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 1B mostra la vitalità cellulare (%) di colture di cellule dello stadio N-1 cresciute nei seguenti sistemi di coltura cellulare per la Linea di cellule A: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

Figure 2A-2C. La Figura 2A mostra la densità di cellule vitali di una coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-1 con la Linea di cellule A usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 2B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto in una coltura di produzione usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo con arricchimento in glucosio, e

discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 2C mostra la focalizzazione isoelettrica capillare ("iCIEF"), la cromatografia ad esclusione dimensionale ("SEC") e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto in una coltura di produzione per il Polipeptide-1 con la Linea di cellule CHO A usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

Figure 3A e 3B. La Figura 3A mostra la VCD di una coltura di cellule dello stadio N-1 cresciuta nei seguenti sistemi di coltura cellulare per la Linea di cellule CHO B: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 3B mostra la vitalità cellulare (%) di colture di cellule dello stadio N-1 cresciute nei seguenti sistemi di coltura cellulare per la Linea di cellule CHO B: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

Figure 4A-4C. La Figura 4A mostra la densità di cellule vitali di una coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-2 con la Linea di cellule CHO B usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 4B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto in una coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-2 con la Linea di cellule CHO B usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 4C mostra la iCIEF, la SEC e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto nella coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-2 con la Linea di cellule CHO B usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

Figure 5A e 5B. La Figura 5A mostra la VCD di una coltura di cellule dello stadio N-1 cresciuta nei seguenti sistemi di coltura cellulare per la Linea di cellule CHO C: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 5B

mostra la vitalità cellulare (%) di colture di cellule dello stadio N-1 cresciute nei seguenti sistemi di coltura cellulare: in perfusione, ad alimentazione discontinua, discontinuo, discontinuo con arricchimento in glucosio, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

5 Figure 6A-6C. La Figura 6A mostra la densità di cellule vitali di una coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: ad alimentazione discontinua, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 6B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto nella coltura di produzione per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: ad alimentazione discontinua, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 6C mostra la
10 iCIEF, la SEC e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto nella coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: ad alimentazione discontinua, e discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

15 Figure 7A-7C. La Figura 7A mostra la densità di cellule vitali di una coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione e ad alimentazione discontinua. La Figura 7B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto nella coltura di produzione per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione e ad alimentazione discontinua. La Figura 7C mostra la iCIEF, la SEC e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto
20 nella coltura di produzione dello stadio N per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: in perfusione e ad alimentazione discontinua.

Figure 8A-8C. La Figura 8A mostra la densità di cellule vitali di colture di produzione dello stadio N in scala 1000 L (n=3) e di colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-1 con la Linea di cellule CHO A usando una coltura del seme ottenuta dal seguente sistema di coltura cellulare dello stadio N-1: discontinuo con arricchimento in glucosio e
25 nutrienti. La Figura 8B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto nelle colture di produzione in scala 1000

L (n=3) e nelle colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-1 con la Linea di cellule CHO A usando la coltura del seme ottenuta dal seguente sistema di coltura cellulare dello stadio N-1: discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 8C mostra la iCIEF, la SEC e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto nelle colture di produzione dello stadio N in scala 1000 L (n=3) e nelle colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-1 con la Linea di cellule CHO A usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

Figure 9A-9C. La Figura 9A mostra la densità di cellule vitali di colture di produzione dello stadio N in scala 500 L (n=1) e di colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-2 con la Linea di cellule CHO B usando una coltura del seme ottenuta dal seguente sistema di coltura cellulare dello stadio N-1: discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 9B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto nelle colture di produzione in scala 500 L (n=1) e nelle colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-2 con la Linea di cellule CHO B usando la coltura del seme ottenuta dal seguente sistema di coltura cellulare dello stadio N-1: discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti. La Figura 9C mostra la iCIEF, la SEC e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto nelle colture di produzione dello stadio N in scala 500 L (n=1) e nelle colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-2 con la Linea di cellule CHO B usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: discontinuo con arricchimento in glucosio e nutrienti.

Figure 10A-10C. La Figura 10A mostra la densità di cellule vitali di colture di produzione dello stadio N in scala 500 L (n=1) e di colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando una coltura del seme ottenuta dal seguente sistema di coltura cellulare dello stadio N-1: ad alimentazione discontinua. La Figura 10B mostra il titolo del polipeptide d'interesse cresciuto nelle colture di produzione in scala 500 L (n=1) e nelle colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C usando la coltura del seme ottenuta dal seguente sistema di coltura cellulare dello stadio N-1: ad alimentazione discontinua. La Figura 10C mostra la iCIEF, la SEC e l'analisi degli N-glicani per il polipeptide d'interesse cresciuto nelle colture di produzione dello stadio N in scala 500 L (n=1) e nelle colture satellite da 5 L (n=2) per il Polipeptide-3 con la Linea di cellule CHO C

usando una coltura del seme ottenuta dai seguenti sistemi di coltura cellulare dello stadio N-1: ad alimentazione discontinua.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

5 La presente invenzione è diretta ad un metodo per la produzione su larga scala di un polipeptide ricombinante d'interesse, che prevede di coltivare cellule ospiti che esprimono il polipeptide ricombinante d'interesse in un sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno arricchito per ottenere una densità di cellule vitali dello stadio N-1 di almeno 5×10^6 cellule vitali per mL; e inoculare un sistema di coltura di produzione dello stadio N, ad un'alta densità del seme di almeno $1,5 \times 10^6$ cellule per mL, con le cellule ospiti del sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui il terreno arricchito comprende una quantità
10 aumentata di una fonte di carbonio rispetto al terreno non arricchito e/o una quantità aumentata di nutrienti selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine rispetto al terreno non arricchito.

Definizioni

Gli articoli indeterminativi "un" e "uno" identificano "uno o più" di qualsiasi componente recitato o elencato.

15 Nel presente contesto, il termine "circa" [identifica] un valore o una composizione entro un intervallo accettabile di errore per il particolare valore o la particolare composizione come determinato da una persona di competenza ordinaria nel ramo, detto intervallo dipendendo in parte dal modo in cui il valore viene misurato o determinato, ovvero dai limiti del sistema di misurazione. Ad esempio, secondo la pratica del ramo, "circa" può significare entro 1 o più di 1 deviazione standard. In alternativa, "circa" può intendere un intervallo fino a 20%. Inoltre, specie con riferimento ai sistemi o processi biologici, i termini possono intendere fino ad un ordine di grandezza o fino
20 a 5 volte un valore. Quando vengono forniti particolari valori o composizioni nella domanda di brevetto e nelle rivendicazioni, se non dichiarato altrimenti, resterà inteso che il significato di "circa" sarà entro un intervallo di errore accettabile per quel particolare valore o quella particolare composizione.

25 Nel presente contesto, l'espressione "e/o" va interpretata come la specifica divulgazione di ciascuno di due elementi o componenti specificati in presenza o in assenza dell'altro. Ne consegue che l'espressione "e/o", come qui usata in una frase come "A e/o B", intende comprendere "A e B", "A o B", "A" (da solo) e "B" (da solo).

Analogamente, l'espressione "e/o", come usata in una frase come "A, B e/o C", intende abbracciare ciascuno dei seguenti aspetti: A, B e C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A e C; A e B; B e C; A (da solo); B (da solo); e C (da solo). Resterà inteso che l'uso di una particella alternativa (ad esempio "o") significa una, entrambe o qualsiasi combinazione delle alternative.

5 Nel presente contesto, il termine "amminoacido", nella sua accezione più ampia, identifica qualsiasi composto e/o sostanza che può essere incorporata in una catena polipeptidica. In alcune forme esecutive, un amminoacido ha la struttura generale $H_2N-C(H)(R)-COOH$. In alcune forme esecutive, un amminoacido è un amminoacido esistente in natura. In alcune forme esecutive, un amminoacido è un amminoacido sintetico; in alcune forme esecutive, un amminoacido è un D-amminoacido; in alcune forme esecutive, un amminoacido è un L-amminoacido. Gli amminoacidi, 10 inclusi gli amminoacidi carbossi-terminali e/o ammino-terminali nei peptidi, possono essere modificati tramite metilazione, amidazione, acetilazione, aggiunta di gruppi protettivi, e/o sostituzione con altri gruppi chimici in grado di cambiare l'emivita del peptide nel circolo senza influenzare negativamente la sua attività. Gli amminoacidi potranno partecipare ad un legame disolfuro. Gli amminoacidi potranno comprendere una o più modifiche post-traduzionali, come l'associazione con una o più entità chimiche (ad esempio gruppi metile, gruppi acetato, gruppi acetile, gruppi fosfato, 15 porzioni formiliche, gruppi isoprenoide, gruppi solfato, porzioni polietilenglicoliche, porzioni lipidiche, porzioni carboidratiche, porzioni biotiniche, ecc.). In alcune forme esecutive, gli amminoacidi della presente invenzione potranno essere forniti in o usati per supplementare un terreno di coltura cellulare. In alcune forme esecutive, gli amminoacidi forniti in o usati per supplementare un terreno di coltura cellulare potranno essere forniti come sali o in forma di idrato.

20 Nel presente contesto, il termine "anticorpo" identifica una molecola immunoglobulinica che riconosce e lega specificatamente un bersaglio, come una proteina, un polipeptide, un peptide, un carboidrato, un polinucleotide, un lipide o combinazioni dei precedenti, attraverso almeno un sito di riconoscimento dell'antigene che risiede all'interno della regione variabile della molecola immunoglobulinica. Nel presente contesto, il termine abbraccia anticorpi policlonali intatti, anticorpi monoclonali intatti, frammenti di anticorpo (come frammenti Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv), 25 anticorpi Fv a catena singola (scFv), anticorpi multispecifici, come anticorpi bispecifici generati da almeno due

anticorpi intatti, anticorpi monospecifici, anticorpi monovalenti, anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, anticorpi umani, proteine di fusione comprendenti una porzione di determinazione dell'antigene di un anticorpo, e qualsiasi altra molecola immunoglobulinica modificata che comprende un sito di riconoscimento dell'antigene, a condizione che gli anticorpi mostrino l'attività biologica desiderata. Un anticorpo può appartenere ad una qualsiasi delle cinque classi principali di immunoglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o delle loro sottoclassi (isotipi) (ad esempio IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), in base all'identità dei domini costanti delle loro catene pesanti rispettivamente identificate come alfa, delta, epsilon, gamma e mu. Le differenti classi di immunoglobuline hanno strutture subunitarie e configurazioni tridimensionali differenti e ben note. Gli anticorpi possono essere nudi o possono essere coniugati ad altre molecole tra cui, ma senza limitazioni, tossine e radioisotopi.

5

10 Nel presente contesto, il termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo, o "frammento legante l'antigene", identifica uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi specificatamente ad un antigene. È stato mostrato che la funzione di legame all'antigene di un anticorpo può essere espletata da frammenti di un anticorpo a tutta lunghezza. Esempi di frammenti leganti abbracciati dal termine "frammento legante l'antigene" [sono], ad esempio, (i) un frammento Fab (frammento ottenuto tramite taglio con papaina) o un frammento monovalente simile che è costituito dai domini VL, VH, LC e CH1; (ii) un frammento F(ab')₂ (frammento ottenuto tramite taglio con pepsina) o un frammento bivalente simile che comprende due frammenti Fab collegati per mezzo di un ponte disolfuro nella regione cerniera; (iii) un frammento Fd costituito dai domini VH e CH1; (iv) un frammento Fv costituito dai domini VL e VH di un singolo braccio di un anticorpo, (v) un frammento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), che è costituito da un dominio VH; (vi) una regione determinante la complementarità (CDR) isolata, e (vii) una

15

20

25 combinazione di due o più CDR isolate che possono essere opzionalmente unite per mezzo di un raccordo sintetico. Inoltre, benché i due domini VL e VH del frammento Fv vengano codificati da geni separati, essi possono essere uniti, usando metodi ricombinanti, attraverso un raccordo sintetico che permette di produrli come una singola catena proteica in cui le regioni VL e VH si appaiano per formare molecole monovalenti (note come Fv a catena singola (scFv); vedere ad esempio Bird et al. (1988) Science 242:423-426; e Huston et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Il termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo intende abbracciare anche tali anticorpi a catena singola. Questi

frammenti di anticorpo vengono ottenuti usando tecniche convenzionali che sono note agli esperti nel ramo, e lo screening dell'utilità dei frammenti viene condotto allo stesso modo degli anticorpi intatti. Le porzioni leganti l'antigene possono essere prodotte attraverso tecniche di DNA ricombinante o tramite taglio enzimatico o chimico di immunoglobuline intatte.

5 Nel presente contesto, il termine "coltura discontinua" identifica un metodo di coltivazione delle cellule in cui tutti i componenti che verranno in definitiva usati per coltivare le cellule, inclusi il terreno (vedere la definizione di "terreno" sottostante) e le stesse cellule, vengono forniti all'inizio del processo di coltivazione. Una coltura discontinua viene tipicamente interrotta ad un certo punto, e le cellule e/o i componenti nel terreno vengono raccolti e opzionalmente purificati. Il termine "coltura ad alimentazione discontinua" intende l'aggiunta incrementale o continua
10 di un secondo terreno di coltura liquido ad una coltura di cellule iniziale senza la rimozione sostanziale o significativa del primo terreno di coltura liquido dalla coltura di cellule. In alcuni casi, il secondo terreno di coltura liquido è uguale al primo terreno di coltura liquido. In altri casi, il secondo terreno di coltura liquido è una forma concentrata del primo terreno di coltura liquido e/o viene aggiunto come una polvere secca.

15 Nel presente contesto, il termine "bioreattore" identifica qualsiasi recipiente usato per la crescita di una coltura di cellule di mammifero. Il bioreattore può avere qualsiasi capacità, a condizione che sia utile per coltivare cellule di mammifero. Tipicamente, il bioreattore avrà una capacità di almeno 1 litro, e potrà avere una capacità di 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000, 15.000, 20.000 litri o più, o qualsiasi volume intermedio. Durante il periodo di coltivazione, è tipico controllare le condizioni interne del bioreattore tra cui, ma senza limitazioni, pH e temperatura. Il bioreattore può essere realizzato in qualsiasi materiale adatto per contenere colture di cellule di
20 mammifero sospese in un terreno alle condizioni di coltura della presente invenzione, tra cui vetro, plastica o metallo. Nel presente contesto, il termine "bioreattore di produzione" identifica il bioreattore finale che viene usato nella produzione del polipeptide o della proteina d'interesse. Il volume del bioreattore di produzione per colture di cellule su larga scala è tipicamente almeno 500 litri, e potrà essere 1000, 2500, 5000, 8000, 10.000, 12.000, 15.000, 20.000 litri o più, o qualsiasi volume intermedio. Una persona di competenza ordinaria nel ramo sarà a conoscenza e sarà in grado di
25 scegliere i bioreattori adatti per l'uso nella pratica della presente invenzione.

Nel presente contesto, il termine "densità di cellule vitali" identifica quel numero di cellule vitali (viventi) che sono presenti in un dato volume di terreno. Il termine "densità cellulare bersaglio" indica una specifica concentrazione di cellule per volume di terreno di coltura che serve a produrre una proteina ricombinante in coltura. La densità cellulare bersaglio può variare a seconda della specifica cellula di mammifero che viene coltivata.

5 Nel presente contesto, il termine "vitalità cellulare" identifica la capacità delle cellule in coltura di sopravvivere quando esposte ad un dato insieme di condizioni di coltura o variazioni sperimentali. Nel presente contesto, il termine identifica anche quella percentuale di cellule che sono vive in un particolare momento rispetto al numero totale di cellule, vive e morte, che sono presenti nella coltura in quel momento.

10 Nel presente contesto, i termini "coltura", "coltura di cellule" e "coltura di cellule di mammifero" identificano una popolazione di cellule di mammifero che è sospesa in un terreno in condizioni adatte per la sopravvivenza e/o la crescita della popolazione di cellule. Come risulterà chiaro alle persone di competenza ordinaria nel ramo, nel presente contesto, questi termini potranno identificare la combinazione comprendente la popolazione di cellule di mammifero e il terreno in cui la popolazione è sospesa.

15 Il termine "coltivazione", o "coltivazione cellulare", intende l'operazione di mantenere e far crescere una cellula di mammifero in un terreno di coltura liquido in un insieme controllato di condizioni fisiche.

20 Nel presente contesto, i termini "terreno", "terreno di coltura cellulare" e "terreno di coltura" identificano una soluzione contenente nutrienti che nutrono le cellule di mammifero in crescita. Tipicamente, queste soluzioni forniscono amminoacidi essenziali e non essenziali, vitamine, fonti di energia, lipidi e oligoelementi che sono necessari alla cellula per crescere e/o sopravvivere ad un livello minimo. La soluzione potrà anche contenere componenti che incrementano la crescita e/o la sopravvivenza sopra il livello minimo, inclusi ormoni e fattori di crescita. La soluzione è preferibilmente formulata ad un pH e una concentrazione salina ottimali per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule. Il terreno potrà anche essere un "terreno chimicamente definito", ovvero un terreno privo di siero che non contiene proteine, idrolisati o componenti di composizione sconosciuta. I terreni definiti sono privi di componenti di origine animale, e tutti i suoi componenti hanno una struttura chimica nota. Il termine "terreno arricchito", "terreni

arricchiti" o "terreno chimicamente definito arricchito" è un terreno di coltura che comprende quantità aggiuntive o aumentate di fonti di carbonio e/o nutrienti rispetto ai terreni di coltura standard.

5 Nel presente contesto, il termine "stadio N-1" identifica l'ultimo stadio di espansione del seme subito prima dell'inoculazione per lo stadio di produzione. Lo stadio N-1 è il passaggio finale di crescita delle cellule che precede la semina del bioreattore di produzione per la produzione del polipeptide. Nel presente contesto, i termini "stadio N-2" e "stadio N-3" identificano il periodo di tempo che intercorre durante la crescita e l'espansione delle cellule e che, tipicamente, precede l'inoculazione dello stadio di produzione N. Lo stadio N-3 è lo stadio di crescita delle cellule che serve ad aumentare la densità delle cellule vitali da usare nello stadio N-2. Lo stadio N-2 è lo stadio di crescita delle cellule che serve ad aumentare la densità delle cellule vitali da usare nello stadio N-1.

10 Nel presente contesto, il termine "perfusione", o "processo di perfusione", identifica un metodo di coltivazione delle cellule che prevede di aggiungere e rimuovere simultaneamente volumi equivalenti di terreno (contenente supplementi nutrizionali) al/dal bioreattore mentre le cellule risiedono nel reattore. Tipicamente, ciò prevede di rimuovere, su base continua o semicontinua, un volume di cellule e terreno che corrisponde al volume del terreno usato come supplemento, con questo volume rimosso che viene opzionalmente purificato. Tipicamente, un processo di coltura cellulare che prevede un processo di perfusione è identificato come "coltura in perfusione". In alcune forme esecutive, un terreno fresco potrà essere identico o simile al terreno di base usato nel processo di coltura cellulare. In alcune forme esecutive, un terreno fresco potrà essere differente dal terreno di base ma contenere i supplementi nutrizionali desiderati. In alcune forme esecutive, un terreno fresco è un terreno chimicamente definito.

20 Nel presente contesto, il termine "polinucleotide", o "nucleotide", intende abbracciare sia un acido nucleico al singolare che più acidi nucleici al plurale, e identifica una molecola di acido nucleico isolata o un costrutto di acido nucleico isolato, ad esempio un RNA messaggero (mRNA), un DNA complementare (cDNA) o un DNA plasmidico (pDNA). In certi aspetti, un polinucleotide comprende un legame fosfodiesterico convenzionale o un legame non convenzionale (ad esempio un legame ammidico come incontrato negli acidi nucleici peptidici (PNA)).

25 Nel presente contesto, il termine "polipeptide" identifica una molecola costituita da monomeri (amminoacidi) che sono collegati linearmente per mezzo di legami ammidici (anche noti come legami peptidici). Il termine

"polipeptide" identifica una o più catene qualunque di due o più amminoacidi, e non fa riferimento ad una lunghezza specifica del prodotto. Nel presente contesto, il termine "proteina" intende abbracciare una molecola costituita da uno o più polipeptidi che, in alcuni casi, possono essere associati per mezzo di legami diversi dai legami ammidici. Per contro, una proteina può anche essere una singola catena polipeptidica. In quest'ultimo caso, la singola catena polipeptidica può, in alcuni casi, comprendere due o più subunità polipeptidiche fuse insieme per formare una proteina. I termini "polipeptide" e "proteina" identificano anche i prodotti di modifiche post-espressione tra cui, ma senza limitazioni, glicosilazione, acetilazione, fosforilazione, ammidazione, funzionalizzazione con gruppi protettivi/bloccanti noti, taglio proteolitico, o modifiche attraverso amminoacidi non esistenti in natura. Un polipeptide o una proteina può derivare da una fonte biologica naturale o può essere prodotta attraverso una tecnologia ricombinante senza essere necessariamente tradotta da una sequenza di acido nucleico designata. Essa può essere generata in qualsiasi maniera, incluso tramite sintesi chimica.

Nel presente contesto, il termine "polipeptide d'interesse" viene usato nella sua accezione più ampia per comprendere qualsiasi proteina (naturale o ricombinante), presente in una miscela, che si desidera purificare. Tali polipeptidi d'interesse comprendono, senza limitazioni, enzimi, ormoni, fattori di crescita, citochine, immunoglobuline (ad esempio anticorpi) e/o qualsiasi proteina di fusione.

Il termine "stadio di produzione", riferito ad una coltura cellulare, identifica l'ultimo stadio della coltura cellulare. Durante lo stadio di produzione, prima verranno fatte crescere le cellule, e poi verrà prodotto il polipeptide. Lo stadio di produzione è comunemente identificato come stadio "N" o ultimo stadio della produzione di una coltura di cellule.

I termini "purificare", "separare", "isolare" o "recuperare", qui usati in modo intercambiabile, identificano l'atto di purificare o isolare una proteina ricombinante almeno parzialmente (ad esempio ad una purezza di almeno o circa 5% in peso, ad esempio di almeno o circa 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% in peso, o di almeno o circa 95% in peso) da uno o più altri componenti presenti nel terreno di coltura cellulare (ad esempio cellule di mammifero o proteine del terreno di coltura) o da uno o più altri componenti presenti in un lisato di cellule di mammifero (ad esempio DNA, RNA o altre proteine). Tipicamente, il grado di purezza della

proteina d'interesse viene aumentato rimuovendo (completamente o parzialmente) almeno un'impurezza dalla composizione.

5 Nel presente contesto, i termini "polipeptide espresso in maniera ricombinante" e "polipeptide ricombinante" identificano un polipeptide espresso da una cellula ospite di mammifero che è stata geneticamente ingegnerizzata per esprimere quel polipeptide. Il polipeptide espresso in maniera ricombinante può essere identico o simile a polipeptidi che vengono normalmente espressi nella cellula ospite di mammifero. Il polipeptide espresso in maniera ricombinante può anche essere estraneo alla cellula ospite, ovvero eterologo ai peptidi normalmente espressi nella cellula ospite di mammifero. In alternativa, il polipeptide espresso in maniera ricombinante può essere chimerico, nel senso che certe porzioni del polipeptide contengono sequenze di amminoacidi che sono identiche o simili a quelle presenti in polipeptidi normalmente espressi nella cellula ospite di mammifero, mentre altre porzioni sono estranee alla cellula ospite.

10 Nel presente contesto, il termine "semina" identifica il processo di fornire una coltura cellulare in un bioreattore o altro recipiente. Le cellule potranno essere già state propagate in un altro bioreattore o recipiente. In alternativa, le cellule potranno essere state congelate e scongelate immediatamente prima di fornirle nel bioreattore o recipiente. Il termine identifica un qualsiasi numero di celle, inclusa una singola cella.

15 Il termine "matraccio agitabile" intende un recipiente (ad esempio un recipiente sterile) che può contenere un volume di terreno di coltura liquido e che ha almeno una superficie permeabile ai gas. Ad esempio, un matraccio agitabile può essere un matraccio di coltura cellulare, come un matraccio a T, un matraccio di Erlenmeyer, o qualsiasi sua versione modificata che è riconosciuta nel ramo.

20 Nel presente contesto, il termine "titolo" identifica la quantità totale di polipeptide o proteina espressa in maniera ricombinante che viene prodotta da una coltura di cellule di mammifero, diviso per una data quantità di volume di terreno. Il titolo viene tipicamente espresso in unità di milligrammi di polipeptide o proteina per millilitro di terreno.

Le seguenti sottosezioni descrivono in ulteriore dettaglio vari aspetti della divulgazione.

Metodi

Questa divulgazione fornisce nuovi metodi per aumentare la densità delle cellule vitali di una coltura cellulare in bioreattore su larga scala dello stadio N-1, che prevedono di coltivare una cellula ospite che esprime un polipeptide ricombinante d'interesse in un sistema di coltura di tipo non perfusivo, e in cui la densità delle cellule vitali viene aumentata ad almeno 5×10^6 cellule/mL.

5 La divulgazione fornisce inoltre nuovi metodi per la produzione su larga scala di un polipeptide ricombinante d'interesse, che prevedono di: (1) coltivare una cellula ospite che esprime un polipeptide ricombinante d'interesse in uno stadio N-1 in un sistema di coltura di tipo non perfusivo, in cui la densità delle cellule vitali viene aumentata ad almeno 5×10^6 cellule/mL; e (2) coltivare in uno stadio di produzione dello stadio N, in un terreno arricchito con un'alta densità del seme, fino ad almeno $1,5 \times 10^6$ cellule/mL, le cellule inoculate dalla coltura cellulare dello stadio N-1 in un sistema
10 di coltura di tipo non perfusivo.

La presente invenzione riguarda un metodo per la produzione su larga scala di un polipeptide ricombinante d'interesse, che prevede di coltivare cellule ospiti che esprimono il polipeptide ricombinante d'interesse in un sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno arricchito per
15 ottenere una densità di cellule vitali dello stadio N-1 di almeno 5×10^6 cellule vitali per mL; e inoculare un sistema di coltura di produzione dello stadio N, ad un'alta densità del seme di almeno $1,5 \times 10^6$ cellule per mL, con le cellule ospiti del sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio rispetto al terreno non arricchito e/o una quantità aumentata di nutrienti selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine rispetto al terreno non arricchito

Cellule ospiti

20 Come cellula per l'uso secondo la presente invenzione, sarà possibile adoperare qualsiasi cellula di mammifero o tipo di cellula che può essere sottoposta a coltura cellulare e che è in grado di esprimere polipeptidi. Esempi non limitativi di cellule di mammifero che potranno essere usate secondo la presente invenzione comprendono la linea di mieloma in topo BALB/c (NSO/1, N° ECACC: 85110503); i retinoblasti umani (PER.C6 (CruCell, Leiden, Paesi Bassi)); la linea di rene di scimmia CV1 trasformata con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la linea di rene embrionale
25 umano (cellule 293 o 293 subclonate per la crescita in coltura in sospensione, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59

(1977)); le cellule di rene di criceto neonato (BHK, ATCC CCL 10); le cellule di ovaio di criceto cinese \pm DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); le cellule del sertoli di topo (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); le cellule di rene di scimmia (CV1 ATCC CCL 70); le cellule di rene della scimmia verde africana (VERO-76, ATCC CRL-1 587); le cellule di carcinoma cervicale umano (HeLa, ATCC CCL 2); le cellule di rene canino (MDCK, ATCC CCL 34); le cellule di fegato di ratto bufalino (BRL 3A, ATCC CRL 1442); le cellule di polmone umano (W138, ATCC CCL 75); le cellule di fegato umano (Hep G2, HB 8065); il tumore mammario di topo (MMT 060562, ATCC CCL 51); le cellule TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); le cellule MRC 5; le cellule FS4; e una linea di epatoma umano (Hep G2). In una forma esecutiva, la presente invenzione viene usata per coltivare ed esprimere polipeptidi e proteine da linee di cellule CHO.

10 Inoltre, per l'uso secondo la presente invenzione, sarà possibile adoperare qualsiasi numero di linee di cellule di ibridoma disponibili in commercio e non disponibili in commercio che esprimono polipeptidi o proteine. Un esperto nel ramo apprezzerà che le linee di cellule di ibridoma potrebbero avere fabbisogni nutrizionali differenti e/o potrebbero richiedere condizioni di coltura differenti per la crescita ottimale e per l'espressione ottimale del polipeptide o della proteina, e sarà in grado di modificare le condizioni secondo necessità.

15 Come notato sopra, in molti casi, le cellule verranno selezionate o ingegnerizzate per produrre alti livelli di proteine o polipeptidi. Spesso, le cellule vengono geneticamente ingegnerizzate per produrre alti livelli di una proteina, ad esempio attraverso l'introduzione di un gene che codifica per la proteina o il polipeptide d'interesse, e/o attraverso l'introduzione di elementi di controllo che regolano l'espressione del gene (endogeno o introdotto) che codifica per il polipeptide d'interesse.

20 Certi polipeptidi potranno avere effetti dannosi sulla crescita delle cellule, sulla vitalità delle cellule o su qualche altra caratteristica delle cellule che, in definitiva, limita in qualche modo la produzione del polipeptide o della proteina d'interesse. Anche nel contesto di una popolazione di cellule di un particolare tipo che sono state ingegnerizzate per esprimere uno specifico polipeptide, esiste una variabilità, all'interno della popolazione di cellule, tale per cui certe cellule individuali cresceranno meglio e/o produrranno una maggiore quantità del polipeptide d'interesse. In certe forme esecutive della presente invenzione, la linea di cellule viene selezionata empiricamente dal

professionista sulla base del fatto che la crescita della linea di cellule è robusta alle particolari condizioni scelte per la coltivazione delle cellule. In altre forme esecutive, le singole cellule ingegnerizzate per esprimere un particolare polipeptide vengono scelte per la produzione su larga scala in base a crescita cellulare, densità cellulare finale, percentuale di cellule vitali, titolo del polipeptide espresso, qualsiasi combinazione di questi parametri, o qualsiasi altra
5 condizione ritenuta importante dal professionista.

Produzione di colture di cellule ad alimentazione discontinua

Le tipiche procedure per produrre un polipeptide d'interesse comprendono le colture discontinue per gli stadi di espansione del seme e di produzione di colture ad alimentazione discontinua. I processi di coltura del seme di tipo discontinuo prevedono tradizionalmente di inoculare una coltura di produzione su larga scala con una coltura del seme
10 avente una particolare densità cellulare, far crescere le cellule in condizioni favorevoli alla crescita e alla vitalità delle cellule e, una volta che le cellule raggiungono una densità cellulare specificata, trasferire la coltura del seme allo stadio successivo. Le procedure di coltura ad alimentazione discontinua comprendono uno o più passaggi aggiuntivi in cui la coltura discontinua viene supplementata con nutrienti e altri componenti che vengono consumati durante la crescita delle cellule. Una persona di competenza ordinaria nel ramo riconoscerà che la presente invenzione può essere
15 impiegata in qualsiasi sistema in cui le cellule vengono coltivate tra cui, ma senza limitazioni, sistemi discontinui, sistemi ad alimentazione discontinua e sistemi in perfusione. In certe forme esecutive preferite della presente invenzione, le cellule vengono fatte crescere in sistemi discontinui o ad alimentazione discontinua.

Terreno arricchito

La presente invenzione fa uso di formulazioni di terreno chimicamente definito e arricchito che, quando usate
20 secondo altri passaggi di coltivazione qui descritti, aumentano la densità delle cellule vitali nelle cellule ospiti della coltura dello stadio N-1 e/o forniscono più nutrienti nella coltura di produzione con un'alta densità del seme, rispetto alle cellule ospiti coltivate in un terreno non arricchito. Le formulazioni di terreno arricchito della presente invenzione che hanno dimostrato di avere effetti benefici sulla crescita delle cellule o sulla produzione del polipeptide d'interesse comprendono i) una quantità aumentata di una fonte di carbonio, e/o ii) più nutrienti rispetto ad un terreno di coltura
25 standard. Inoltre, la fonte di carbonio può essere: caseina, lattato, destrosio, fruttosio, fruttano, glucosio, saccarosio,

lattosio, maltosio, acetato, glicerolo, sorbitolo, mannitolo, saccarosio, xilosio, melassa, fucosio, glucosammina, destrano, un grasso, un olio, glicerolo, acetato di sodio, arabinosio, proteina della soia, proteina solubile, raffinosisio, amilosio, amido, triptone, estratto di lievito e loro combinazioni, e i nutrienti possono essere amminoacidi. Il terreno arricchito è arricchito con un terreno di alimentazione di 5%, di almeno 10%, di almeno 15% o di almeno 20% rispetto al terreno non arricchito in termini di fonte di carbonio e/o nutrienti. Una persona di competenza ordinaria nel ramo comprenderà che le formulazioni di terreno della presente invenzione abbracciano sia terreni definiti che terreni non definiti.

Un risultato inaspettato associato all'uso di un terreno arricchito, mostrato negli Esempi 1-3, è che le cellule ospiti coltivate in un metodo discontinuo con il terreno arricchito durante lo stadio di coltura N-1 mostrano una densità di cellule vitali aumentata rispetto alle cellule ospiti coltivate in un metodo discontinuo con il terreno non arricchito. Inoltre, le cellule ospiti coltivate in un metodo discontinuo con il terreno arricchito mostravano una densità di cellule vitali e/o una vitalità cellulare pari a quelle delle cellule ospiti coltivate in un metodo ad alimentazione discontinua senza il terreno arricchito. Pertanto, le cellule ospiti coltivate in un metodo discontinuo con il terreno arricchito sono in grado di ottenere risultati simili a quelli delle cellule ospiti coltivate in un sistema in perfusione o ad alimentazione discontinua con il terreno non arricchito.

Un altro risultato inaspettato legato all'uso di un terreno arricchito, mostrato negli Esempi 1-3, è che le colture di produzione seminate con le cellule fatte crescere in una coltura discontinua con il terreno arricchito avevano titoli del polipeptide d'interesse che erano simili a quelli delle colture di produzione seminate con le cellule ottenute usando metodi in perfusione o ad alimentazione discontinua senza il terreno arricchito. Le condizioni elencate sopra potranno essere usate singolarmente o in varie loro combinazioni.

Ciascuna di queste formulazioni di terreno qui divulgate potrà essere opzionalmente supplementata, se necessario, con ormoni e/o altri fattori di crescita, con ioni particolari (come sodio, cloruro, calcio, magnesio e fosfato), con tamponi, vitamine, nucleosidi o nucleotidi, oligoelementi (composti inorganici solitamente presenti a concentrazioni finali molto basse), amminoacidi, lipidi, idrolisati proteici, o con glucosio o altra fonte di energia. In certe forme esecutive della presente invenzione, potrà essere conveniente supplementare i terreni con induttori chimici,

come esametilene-bis(acetammide) ("HMBA") e butirrato di sodio ("NaB"). Questi supplementi opzionali potranno essere aggiunti all'inizio della coltura, o potranno essere aggiunti in un secondo momento per reintegrare i nutrienti esauriti o per altra ragione. Una persona di competenza ordinaria nel ramo sarà a conoscenza di tutti i supplementi desiderabili o necessari che potranno essere inclusi nelle formulazioni di terreno divulgate.

5 Fornitura di una coltura di cellule di mammifero

Una volta identificata una cellula che esprime il polipeptide o la proteina d'interesse, la cellula viene propagata in coltura attraverso uno qualsiasi della varietà di metodi ben noti alla persona di competenza ordinaria nel ramo. La cellula che esprime il polipeptide o la proteina d'interesse viene tipicamente propagata facendola crescere ad una temperatura e in un terreno che favoriscono la sopravvivenza, la crescita e la vitalità della cellula. Il volume di coltura iniziale può essere un volume qualsiasi, ma è spesso più piccolo del volume di coltura del bioreattore di produzione usato nella produzione finale del polipeptide o della proteina d'interesse, ed è frequente che le cellule vengano fatte passare più volte in bioreattori di volume crescente prima di seminare il bioreattore di produzione. Una volta che le cellule hanno raggiunto una specifica densità delle cellule vitali, le cellule vengono fatte crescere in un bioreattore per aumentare ulteriormente il numero di cellule vitali. Questi bioreattori sono identificati come N-1, N-2, N-3, ecc. "N" identifica il bioreattore dove avviene la coltura di produzione principale, mentre "N-1" intende il bioreattore che precede la coltura di produzione principale, e così via.

La coltura di cellule può essere agitata o scossa per aumentare l'ossigenazione del terreno e la dispersione dei nutrienti nelle cellule. In alternativa o in aggiunta, per aumentare e controllare l'ossigenazione della coltura, è possibile usare appositi dispositivi di aerazione che sono ben noti nel ramo. Secondo la presente invenzione, una persona di competenza ordinaria nel ramo comprenderà che può essere conveniente controllare o regolare certe condizioni interne del bioreattore tra cui, ma senza limitazioni, pH, temperatura, ossigenazione, ecc.

La densità cellulare di partenza nel bioreattore N-3 può essere scelta da una persona di competenza ordinaria nel ramo. La densità cellulare di partenza nel bioreattore di produzione può essere bassa, nell'ordine di 2×10^4 cellule vitali per mL. In certe forme esecutive, le densità cellulari di partenza nel bioreattore N-3 possono variare ed essere 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 cellule vitali per mL e più. La coltivazione delle cellule ospiti dello stadio N-3 con

il terreno arricchito può portare a densità delle cellule vitali da almeno 5×10^6 cellule vitali per mL a 10×10^6 , 15×10^6 , 20×10^6 , 25×10^6 o 30×10^6 cellule vitali per mL e più.

5 La densità cellulare di partenza nel bioreattore N-2 può essere scelta da una persona di competenza ordinaria nel ramo. La densità cellulare di partenza nel bioreattore di produzione può essere bassa, nell'ordine di 2×10^4 cellule vitali per mL. In certe forme esecutive, le densità cellulari di partenza nel bioreattore N-2 possono variare da circa 2×10^4 cellule vitali per mL a circa 2×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 cellule vitali per mL e più. La coltivazione delle cellule ospiti dello stadio N-2 con il terreno arricchito può portare a densità delle cellule vitali da almeno 5×10^6 cellule vitali per mL a 10×10^6 , 15×10^6 , 20×10^6 , 25×10^6 o 30×10^6 cellule vitali per mL e più.

10 La densità cellulare di partenza nel bioreattore N-1 può essere scelta da una persona di competenza ordinaria nel ramo. La densità cellulare di partenza nel bioreattore di produzione può essere bassa, nell'ordine di una singola cellula per volume di coltura. In certe forme esecutive, le densità cellulari di partenza nel bioreattore di produzione possono variare da circa 2×10^4 cellule vitali per mL a circa 2×10^5 , 2×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 cellule vitali per mL e più. La coltivazione delle cellule ospiti dello stadio N-1 con il terreno arricchito può portare a densità delle cellule vitali da almeno 5×10^6 cellule vitali per mL a circa 10×10^6 , 15×10^6 , 20×10^6 , 25×10^6 o 30×10^6 cellule vitali per mL e più.
15 Secondo l'invenzione, le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno arricchito per ottenere una densità di cellule vitali dello stadio N-1 di almeno 5×10^6 cellule vitali per mL.

20 La densità cellulare di partenza nel bioreattore di produzione N può essere scelta da una persona di competenza ordinaria nel ramo. La densità cellulare di partenza nel bioreattore di produzione N può essere bassa, nell'ordine di 1×10^6 cellule per mL. Le densità cellulari di partenza nel bioreattore di produzione possono variare da circa 1×10^6 cellule vitali per mL a circa 2×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 cellule vitali per mL e più. Secondo la presente invenzione, la densità cellulare di partenza nel bioreattore di produzione è almeno $1,5 \times 10^6$ cellule vitali per mL. La coltivazione delle cellule ospiti con il terreno arricchito può portare a densità delle cellule vitali da almeno 1×10^6 cellule vitali per mL a circa 2×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 , 15×10^6 , 20×10^6 , 25×10^6 o 30×10^6 cellule vitali per mL e più.

25 Generalmente, le colture di cellule dello stadio N-1 potranno essere fatte crescere fino alla densità desiderata prima di seminare il bioreattore di produzione successivo. È preferito che la maggior parte delle cellule rimanga viva

prima della semina, benché non sia richiesto che la vitalità sia totale o pressoché totale. In una forma esecutiva della presente invenzione, le cellule potranno essere rimosse dal sovrantante, ad esempio tramite centrifugazione a bassa velocità. Prima di seminare il bioreattore successivo, potrà anche essere desiderabile lavare le cellule rimosse con un terreno allo scopo di rimuovere tutti i prodotti metabolici di scarto o i componenti del terreno indesiderati. Il terreno potrà essere il terreno in cui le cellule sono state fatte precedentemente crescere, o potrà essere un terreno differente o una soluzione di lavaggio selezionata dal professionista che mette in atto la presente invenzione.

Le cellule dello stadio N-1 potranno essere poi diluite ad una densità appropriata per la semina del bioreattore di produzione. In una certa forma esecutiva della presente invenzione, le cellule vengono diluite nello stesso terreno che verrà usato nel bioreattore di produzione. In alternativa, le cellule possono essere diluite in un altro terreno o in una soluzione, a seconda delle esigenze e dei desideri del professionista che mette in atto la presente invenzione, o per soddisfare particolari requisiti delle cellule stesse, ad esempio se si pensa di conservarle per un breve periodo di tempo prima di seminare il bioreattore di produzione.

Secondo la presente invenzione, il bioreattore di produzione può avere qualsiasi volume che è appropriato per la produzione su larga scala dei polipeptidi o delle proteine. In una certa forma esecutiva, il volume del bioreattore di produzione è almeno 500 litri. In altre forme esecutive, il volume del bioreattore di produzione è 1.000, 2.500, 5.000, 8000, 10.000, 15.000 o 20.000 litri o più, o qualsiasi volume intermedio. Una persona di competenza ordinaria nel ramo sarà a conoscenza e sarà in grado di scegliere un bioreattore adatto per l'uso nella pratica della presente invenzione. Il bioreattore di produzione potrà essere realizzato in qualsiasi materiale che favorisce la crescita e la vitalità delle cellule senza interferire con l'espressione o la stabilità del polipeptide o della proteina prodotta.

In certe forme esecutive della presente invenzione, lo stadio di produzione comprende un terreno che è arricchito rispetto ad un terreno non arricchito. Ad esempio, il terreno è arricchito con un terreno di alimentazione di almeno 5%, almeno 10%, almeno 15% o almeno 20% rispetto al terreno non arricchito. In certe forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio (ad esempio glucosio). In certe forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di nutrienti (ad esempio amminoacidi). In certe forme esecutive, il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio e di nutrienti.

La temperatura della coltura di cellule dello stadio N-1 o dello stadio di produzione sarà selezionata principalmente in base all'intervallo di temperature a cui la coltura di cellule rimane vitale. In generale, la maggior parte delle cellule di mammifero cresce bene in un intervallo da circa 25°C a 42°C. Preferibilmente, le cellule di mammifero crescono bene nell'intervallo da circa 35°C a 40°C. Le persone di competenza ordinaria nel ramo saranno in grado di selezionare la o le temperature appropriate a cui far crescere le cellule, a seconda dei fabbisogni delle cellule e dei requisiti di produzione del professionista. Opzionalmente, la temperatura viene mantenuta ad una singola temperatura costante. Opzionalmente, la temperatura viene mantenuta in un intervallo di temperature. Ad esempio, la temperatura potrà essere costantemente aumentata o diminuita. In alternativa, la temperatura potrà essere aumentata o diminuita di quantità discrete in vari momenti. Una persona di competenza ordinaria nel ramo sarà in grado di determinare se sarà necessario usare una singola temperatura o molteplici temperature, e se la temperatura dovrà essere regolata in maniera costante o con quantità discrete.

Le cellule dello stadio N-1 o dello stadio di produzione potranno essere fatte crescere per più o meno tempo, a seconda delle esigenze del professionista e dei requisiti delle cellule stesse. In una forma esecutiva, le cellule vengono fatte crescere per un periodo di tempo sufficiente a raggiungere una densità di cellule vitali che è una data percentuale della densità di cellule vitali massima che le cellule potrebbero infine raggiungere se venissero lasciate crescere indisturbate. Le cellule possono essere lasciate crescere per un periodo di tempo definito. Ad esempio, a seconda della concentrazione di partenza della coltura cellulare, della temperatura a cui le cellule vengono fatte crescere e del tasso di crescita intrinseco delle cellule, le cellule potranno essere fatte crescere per 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o più giorni. Il professionista che mette in atto la presente invenzione potrà scegliere la durata della crescita a seconda dei requisiti di produzione del polipeptide e dei fabbisogni delle cellule stesse.

Monitoraggio delle condizioni di coltura

In certe forme esecutive, vengono monitorate particolari condizioni della coltura cellulare in crescita. Il monitoraggio delle condizioni della coltura cellulare permette di determinare se la coltura cellulare sta producendo il polipeptide o la proteina ricombinante a livelli subottimali, o se la coltura è in procinto di entrare in uno stadio di produzione subottimale.

Come esempi non limitativi, potrà essere conveniente o necessario monitorare temperatura, pH, densità cellulare, vitalità cellulare, densità delle cellule vitali integrata, livelli di lattato, livelli di ammonio, osmolarità, o titolo del polipeptide o della proteina espressa. Nel ramo sono ben note numerose tecniche che permetteranno di misurare queste condizioni ad una persona di competenza ordinaria nel ramo. Ad esempio, la densità cellulare potrà essere misurata usando un emocitometro, usando un contatore Coulter (Vi-Cell) o eseguendo un esame della densità cellulare (CEDEX). La densità delle cellule vitali potrà essere determinata colorando un campione della coltura con Trypan Blue. Poiché solo le cellule morte captano il Trypan Blue, la densità delle cellule vitali può essere determinata contando il numero totale di cellule, dividendo il numero di cellule che captano il colorante per il numero totale di cellule, e prendendo il reciproco. Per determinare il livello di lattato, il livello di ammonio o il livello del polipeptide o della proteina espressa, è possibile usare l'HPLC. In alternativa, il livello del polipeptide o della proteina espressa può essere determinato con tecniche di biologia molecolare standard, come la colorazione con Coomassie di gel SDS-PAGE, il Western blot, i saggi Bradford, i saggi Lowry, i saggi del biuretto e l'assorbanza nell'UV. Potrà anche essere conveniente o necessario monitorare le modifiche post-traduzionali del polipeptide o della proteina espressa, incluse la fosforilazione e la glicosilazione.

15 Isolamento del polipeptide espresso

In generale, sarà tipicamente desiderabile isolare e/o purificare le proteine o i polipeptidi espressi secondo la presente invenzione. In una forma esecutiva, poiché il polipeptide o la proteina espressa viene secreta nel terreno, le cellule e altri solidi potranno essere rimossi, ad esempio per centrifugazione o filtrazione, come prima passaggio del processo di purificazione. Questa forma esecutiva è particolarmente utile quando usata secondo la presente invenzione, perché i metodi e le composizioni qui descritte danno luogo ad un aumento della vitalità cellulare. Di conseguenza, durante il processo di coltura, muoiono meno cellule e la quantità di enzimi proteolitici che vengono rilasciati nel terreno è minore, cosa che può potenzialmente abbassare la resa del polipeptide o della proteina espressa.

20 Polipeptidi ricombinanti

I metodi della presente invenzione possono essere usati per la produzione su larga scala di qualsiasi polipeptide ricombinante d'interesse, inclusi anticorpi terapeutici. Esempi non limitativi di polipeptidi ricombinanti che possono

essere prodotti con i metodi qui forniti comprendono anticorpi (tra cui immunoglobuline intatte o frammenti di anticorpo), enzimi (ad esempio una galattosidasi), proteine (ad esempio eritropoietina umana, fattore di necrosi tumorale (TNF), o un interferone alfa o beta), recettori cellulari (ad esempio EGFR), o proteine immunogeniche o antigeniche o loro frammenti proteici (ad esempio proteine per l'uso in un vaccino). Gli anticorpi che ricadono nell'ambito della presente invenzione comprendono, ma senza limitazioni: anticorpi anti-HER2, tra cui Trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992)); anticorpi anti-HER3; anticorpi anti-HER4 (brevetto US 5.725.856); anticorpi anti-CD20, come l'anti-CD20 chimerico "C2B8" descritto nel brevetto US 5.736.137 (RITUXAN®), una variante chimerica o umanizzata dell'anticorpo 2H7 descritta nel brevetto US 5.721.108B1, o Tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John et al., Chest, 103:932 (1993), e pubblicazione internazionale WO 95/23865); anticorpi anti-VEGF, tra cui anticorpi anti-VEGF umanizzati e/o maturati in affinità, come l'anticorpo anti-VEGF umanizzato huA4.6.1 AVASTIN® (Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992), pubblicazione internazionale WO 96/30046, e pubblicazione internazionale WO 98/45331, pubblicata il 15 ott. 1998); anticorpi anti-PSCA (WO 01/40309); anticorpi anti-CD40, tra cui S2C6 e sue varianti umanizzate (WO 00/75348); anti-CD11a (brevetto US 5.622.700, WO 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991), e Hourmant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)); anti-IgE (Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993), e pubblicazione internazionale WO 95/19181); anti-CD18 (brevetto US 5.622.700, rilasciato il 22 apr. 1997, o WO 97/26912, pubblicata il 31 lug. 1997); anti-IgE (tra cui E25, E26 e E27; brevetto US 5.714.338, rilasciato il 3 feb. 1998, brevetto US 5.091.313, rilasciato il 25 feb. 1992, WO 93/04173, pubblicata il 4 mar. 1993, domanda di brevetto internazionale PCT/US98/13410, depositata il 30 giu. 1998, o brevetto US 5.714.338); un anticorpo anti-recettore per Apo-2 (WO 98/51793, pubblicata il 19 nov. 1998); anticorpi anti-TNF- α , tra cui cA2 (REMICADE®), CDP571 e MAK-195 (vedere il brevetto US 5.672.347, rilasciato il 30 sett. 1997, Lorenz et al., J. Immunol. 156(4): 1646-1653 (1996), e Dhainaut et al., Crit. Care Med. 23(9):1461-1469 (1995)); anti-fattore tissutale (TF) (brevetto europeo EP 0 420 937 B1, concesso il 9 nov. 1994); anti-integrina $\alpha 4\beta 7$ umana (WO 98/06248, pubblicata il 19 feb. 1998); anti-EGFR (l'anticorpo 225 chimerizzato o umanizzato descritto in WO 96/40210, pubblicata il 19 dic. 1996); anticorpi anti-CD3, come OKT3 (brevetto US 4.515.893, rilasciato il 7 maggio 1985); anticorpi anti-CD25 o anti-tac, come CHI-621 (SIMULECT®) e

(ZENAPAX®) (vedere il brevetto US 5.693.762, rilasciato il 2 dic. 1997); anticorpi anti-CD4, come l'anticorpo cM-7412 (Choy et al., *Arthritis Rheum.* 39(1):52-56 (1996)); anticorpi anti-CD52, come CAMPATH-1H (Riechmann et al., *Nature* 332:323-337 (1988)); anticorpi anti-recettore per Fc, come l'anticorpo M22 diretto contro FcγRI descritto in Graziano et al., *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995); anticorpi anti-antigene carcinoembrionario (CEA), come hMN-14 (Sharkey et al., *Cancer Res.* 55(23 Suppl.):5935s-5945s (1995)); anticorpi diretti contro le cellule epiteliali mammarie, tra cui huBrE-3, hu-Mc-3 e CHL6 (Ceriani et al., *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); e Richman et al., *Cancer Res.* 55(23 Suppl.):5916s-5920s (1995)); anticorpi che si legano alle cellule di carcinoma del colon, come C242 (Litton et al., *Eur. J. Immunol.* 26(1):1-9 (1996)); anticorpi anti-CD38, ad esempio AT 13/5 (Ellis et al., *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticorpi anti-CD33, come Hu M195 (Jurcic et al., *Cancer Res.* 55(23 Suppl.):5908s-5910s (1995)) e CMA-676 o CDP771; anticorpi anti-CD22, come LL2 o LymphoCide (Juweid et al., *Cancer Res.* 55(23 Suppl.):5899s-5907s (1995)); anticorpi anti-EpCAM, come 17-1A (PANOREX®); anticorpi anti-GpIIb/IIIa, come abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticorpi anti-RSV, come MEDI-493 (SYNAGIS®); anticorpi anti-CMV, come PROTOVIR®; anticorpi anti-HIV, come PRO542; anticorpi anti-epatite, come l'anticorpo anti-epatite B OSTAVIR®; l'anticorpo anti-CA125 OvaRex; l'anticorpo anti-epitopo idiotipico di GD3 BEC2; l'anticorpo anti-αvβ3 VITAXIN®; un anticorpo anti-carcinoma a cellule renali umano, come ch-G250; ING-1; un anticorpo anti-17-1A umano (3622W94); un anticorpo anti-tumore del colon-retto umano (A33); l'anticorpo anti-melanoma umano R24 diretto contro il ganglioside GD3; un anti-carcinoma a cellule squamose umano (SF-25); anticorpi anti-antigene leucocitario umano (HLA), come Smart ID10; anticorpi anti-PD-1; anticorpi anti-PD-L1; anticorpi anti-LAG-3; anticorpi anti-GITR; anticorpi anti-TIGIT; anticorpi anti-CXCR4; anticorpi anti-CD73; e l'anticorpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

20 ESEMPI

Linee di cellule e terreni

In questi esperimenti, sono state usate tre linee di cellule CHO differenti che producono tre anticorpi monoclonali o polipeptidi differenti. Il terreno di semina, quello basale e quello di alimentazione usati erano chimicamente definiti.

25 Colture del seme N-1

Per le colture N-1 discontinue e ad alimentazione discontinua, le cellule sono state fatte crescere in matracci agitabili da 250 mL con un volume iniziale di 80-100 mL, o in matracci agitabili da 2 L con un volume iniziale di 1000 mL. È stata usata una velocità di agitazione di 150 rpm su un agitatore orbitale con una distanza di gittata di 25 mm. L'incubatore era impostato su una temperatura costante di 36,5°C e su un livello di CO₂ controllato a 5%. Per le colture N-1 discontinue, i terreni di semina erano o non arricchiti, o arricchiti in glucosio, o arricchiti in glucosio e nutrienti. Alle colture N-1 discontinue non sono state aggiunte alimentazioni. Per le colture N-1 ad alimentazione discontinua, il terreno di semina è stato alimentato quotidianamente dal Giorno 3 in poi.

Le colture N-1 in perfusione prevedevano di far crescere le cellule in sacche porta-cellule da 10 L con un volume iniziale di 5 L. La velocità di oscillazione era controllata a 28 rpm, e l'angolo di oscillazione era impostato a 7°. Il controllo del livello di CO₂ è stato impostato su 4% tra il Giorno 0 e il Giorno 1, ed è stato poi disattivato. La sacca porta-cellule era collegata ad un ATF-2 ausiliario (Repligen) per perfondere la coltura. Il terreno di coltura fresco (concentrato 1×) viene continuamente aggiunto mentre il terreno di coltura vecchio viene continuamente rimosso alla stessa velocità secondo il programma: 0,5 VVD per i giorni D2-4, incremento a 1,0 VVD per i giorni D4-5, e incremento finale a 2,0 VVD per i giorni D5-6.

15 Culture di produzione

I bioreattori di produzione ad alimentazione discontinua usati erano bioreattori Sartorius da 5 L con un volume di lavoro iniziale di 3,3 L.

Analisi

La densità delle cellule vitali (VCD) e la vitalità cellulare sono state misurate fuori linea usando un contatore di cellule automatizzato Vi-Cell (Beckman Coulter). I campioni di coltura sono stati analizzati sempre fuori linea usando un Cedex Bio HT (Roche) per monitorare il glucosio, la glutammina, il glutammato, il lattato e l'ammonio. Per le colture in bioreattore, il pH, la pCO₂ e la pO₂ sono stati misurati sempre fuori linea usando un BioProfile pHOX (Nova Biomedical). Per misurare il titolo della proteina, riportato come valore normalizzato, è stato usato un metodo UPLC con Proteina A.

La cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) per i materiali di alto peso molecolare (HMW) è stata condotta usando una colonna Tosoh TSK G3000SW_{xl}, 7,8 × 30 cm, 5 µm, con un gradiente isocratico monitorato a 280 nm su un sistema HPLC Waters Alliance (Milford, MA) dotato di autocampionatore a temperatura controllata e rilevatore di tipo PDA Waters 2996.

5 Le varianti di carica sono state saggiate via focalizzazione isoelettrica capillare con acquisizione di immagini (iCIEF) che è stata condotta su uno strumento Protein Simple iCE3 con autocampionatore Alcott 720NV (San Jose, CA). I campioni sono stati miscelati con i marcatori di pI e gli anfoliti appropriati, e con urea, e sono stato iniettati in una cartuccia capillare rivestita di fluorocarburo. È stata applicata un'alta tensione, con le varianti cariche che migravano ai rispettivi pI. Una telecamera UV catturava l'immagine a 280 nm. È stato identificato il picco principale, e i
10 picchi che migravano nell'intervallo acido e nell'intervallo basico sono stati sommati, quantificati e riportati come percentuale in area relativa.

L'analisi degli N-glicani è stata condotta usando un kit disponibile in commercio da Prozyme, GlykoPrep® Rapid N-Glycan Preparation with 2-AB (Hayward, CA). Gli oligosaccaridi liberi sono stati profilati usando una colonna Acquity UPLC Glycan BEH Amide, 130 Å, 1,7 µm, 2,1×10 mm (Milford, MA), su un sistema Waters Acquity H-Class
15 (Milford, MA) dotato di autocampionatore a temperatura controllata e rilevatore di fluorescenza.

Esempio 1

Linea di cellule A: Colture del seme N-1

Per la Linea di cellule A, le colture N-1 sono state fatte crescere in modalità discontinua, in modalità discontinua con arricchimento in glucosio, in modalità discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti, in modalità
20 ad alimentazione discontinua, o in modalità in perfusione. La coltura N-1 discontinua raggiungeva una VCD di picco di solo 15×10⁶ cellule per mL, e non riusciva a mantenere un'alta vitalità cellulare verso la fine del periodo di coltura (Figura 1A). Al contrario, la coltura N-1 discontinua con arricchimento in glucosio raggiungeva una VCD di 17×10⁶ cellule per mL, e manteneva una vitalità cellulare >99% (Figura 1A). In maniera simile, sia la coltura N-1 ad alimentazione discontinua che la coltura N-1 discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti crescevano a

>20×10⁶ cellule per mL il Giorno 6 e mantenevano una vitalità >99% (Figure 1A e 1B). Le cellule nella coltura N-1 in perfusione crescevano fino a 44×10⁶ cellule per mL il Giorno 6, e la vitalità era >99% (Figure 1A e 1B).

Linea di cellule A per la produzione del Polipeptide-1: Colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità

5 Per la Linea di cellule A, sono state iniziate colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità usando semi cresciuti in una coltura discontinua con arricchimento in glucosio, in una coltura discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti, in una coltura ad alimentazione discontinua, o in una coltura in perfusione.

10 La coltura di produzione dello stadio N è stata inoculata ad un'alta densità del seme di 5×10⁶ cellule per mL per 14 giorni. L'alimentazione giornaliera è stata iniziata il Giorno 2 con un volume di alimentazione pari a 3,5% del volume della coltura. L'ossigeno disciolto (DO) è stato mantenuto a 40%, e il pH è stato controllato tra 6,8 e 7,6. La temperatura è stata inizialmente mantenuta a 36,5°C, ed è stata cambiata a 34°C il Giorno 4.

15 La Figura 2A dimostra che tutte le colture di produzione mantenevano una vitalità cellulare >90% durante l'intero periodo di coltura. La coltura del seme in perfusione aveva una densità di cellule vitali massima di 22×10⁶ cellule per mL rispetto a 17×10⁶ cellule per mL per la coltura del seme ad alimentazione discontinua e per le colture del seme discontinue con arricchimento in glucosio o con arricchimento in glucosio e nutrienti (Figura 2A). Il titolo del Polipeptide-1 per la coltura del seme in perfusione era circa 9,3 g/L, mentre la coltura del seme ad alimentazione discontinua aveva un titolo di circa 9 g/L (Figura 2B). Il titolo del polipeptide d'interesse per la coltura del seme discontinua con arricchimento in glucosio e per la coltura del seme discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti era rispettivamente circa 8,5 g/L e 9 g/L. La Figura 2C mostra che gli attributi qualitativi per tutte le condizioni di produzione dello stadio N, come iCIEF, SEC ed N-glicani, erano simili a prescindere dai differenti semi dello stadio N-1.

Esempio 2

Linea di cellule B: Colture del seme N-1

25 Per la Linea di cellule B, le colture N-1 sono state fatte crescere in modalità discontinua, in modalità discontinua con arricchimento in glucosio, in modalità discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti, in modalità

ad alimentazione discontinua, o in modalità in perfusione. La coltura N-1 discontinua raggiungeva una VCD di picco di solo $24,5 \times 10^6$ cellule per mL, e non riusciva a mantenere un'alta vitalità (Figure 3A e 3B). Al contrario, le colture N-1 discontinue con arricchimento in glucosio o con arricchimento sia in glucosio che in nutrienti raggiungevano $\geq 25,5 \times 10^6$ cellule vitali per mL, e mantenevano una vitalità cellulare $\geq 99\%$ (Figure 3A e 3B). In maniera simile, le colture N-1 ad alimentazione discontinua crescevano fino a $\geq 30 \times 10^6$ cellule vitali per mL il Giorno 5, e le vitalità si mantenevano a $\geq 99\%$ (Figure 3A e 3B). Le cellule nella coltura N-1 in perfusione crescevano fino a 41×10^6 cellule per mL il Giorno 5, e la vitalità era $\geq 99\%$ (Figure 3A e 3B).

Linea di cellule B per la produzione del Polipeptide-2: Colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità

Per la Linea di cellule B, sono state iniziate colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità usando semi cresciuti in una coltura discontinua, in una coltura discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti, in una coltura ad alimentazione discontinua, o in una coltura in perfusione.

La coltura di produzione è stata inoculata ad un'alta densità del seme di 3×10^6 cellule per mL per 14 giorni. L'alimentazione giornaliera è stata iniziata il Giorno 2 con un volume di alimentazione pari a 3,1% del volume della coltura. L'ossigeno disciolto (DO) è stato mantenuto a 40%, e il pH è stato controllato tra 6,7 e 7,6. La temperatura è stata mantenuta a $36,5^\circ\text{C}$.

La Figura 4A dimostra che tutte le colture di produzione mantenevano una vitalità cellulare $>90\%$ durante l'intero periodo di coltura. La coltura del seme in perfusione aveva una densità di cellule vitali massima di circa 26×10^6 cellule per mL rispetto a solo circa 24×10^6 cellule per mL per la coltura del seme ad alimentazione discontinua e per le colture del seme discontinue con arricchimento in glucosio o con arricchimento in glucosio e nutrienti (Figura 4A). Il titolo del polipeptide d'interesse per la coltura del seme in perfusione e per quella discontinua (con arricchimento in glucosio e nutrienti) era circa 3,2 g/L, mentre la coltura del seme discontinua e quella ad alimentazione discontinua avevano un titolo di circa 3 g/L (Figura 4B). La Figura 4C mostra che gli attributi qualitativi per tutte le condizioni di produzione dello stadio N, come iCIEF, SEC ed N-glicani, erano simili a prescindere dai differenti semi dello stadio N-1.

Esempio 3

Linea di cellule C: Colture del seme N-1

Per la Linea di cellule C, le colture N-1 sono state fatte crescere in modalità discontinua, in modalità discontinua con arricchimento in glucosio, in modalità discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti, in modalità ad alimentazione discontinua, o in modalità in perfusione. La coltura N-1 discontinua raggiungeva una VCD di picco di solo 26×10^6 cellule per mL, e non riusciva a mantenere un'alta vitalità (Figure 5A e 5B). Al contrario, le colture N-1 discontinue con arricchimento in glucosio o con arricchimento sia in glucosio che in nutrienti raggiungevano $\geq 30 \times 10^6$ cellule vitali per mL, e mantenevano una vitalità cellulare $\geq 99\%$ (Figure 5A e 5B). In maniera simile, le colture N-1 ad alimentazione discontinua crescevano fino a $\geq 33 \times 10^6$ cellule vitali per mL il Giorno 5, e le vitalità si mantenevano a $\geq 99\%$ (Figure 5A e 5B). Le cellule nella coltura N-1 in perfusione crescevano fino a 62×10^6 cellule per mL il Giorno 5, e la vitalità era $\geq 99\%$ (Figure 5A e 5B).

Linea di cellule C per la produzione del Polipeptide-3 (Esperimento 1): Colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità usando semi ottenuti tramite coltura ad alimentazione discontinua o discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti

Per la Linea di cellule C, sono state iniziate colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità usando semi cresciuti in una coltura ad alimentazione discontinua o in una coltura discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti.

La coltura di produzione è stata iniziata ad un'alta densità del seme di 6×10^6 cellule per mL per 14 giorni. L'alimentazione giornaliera è stata iniziata il Giorno 2 con un volume di alimentazione che era 5% del volume della coltura per i giorni D2-10, e poi 3,3% del volume della coltura iniziale per i giorni D11-13. L'alimentazione veniva condotta due volte al giorno alla metà della quantità indicata. L'ossigeno disciolto (DO) è stato mantenuto a 40%, e il pH è stato controllato tra 6,8 e 7,3. La temperatura è stata inizialmente mantenuta a $36,5^\circ\text{C}$, ed è stata cambiata a 33°C il Giorno 6.

La Figura 6A dimostra che tutte le colture di produzione mantenevano una vitalità cellulare $>80\%$ durante l'intero periodo di coltura. La coltura del seme ad alimentazione discontinua e quella discontinua (con arricchimento in

glucosio e nutrienti) avevano una densità di cellule vitali massima di circa 27×10^6 cellule per mL (Figura 6A). Il titolo del polipeptide d'interesse per la coltura del seme ad alimentazione discontinua e quella discontinua (con arricchimento in glucosio e nutrienti) era circa 4,3 g/L (Figura 6B). La Figura 6C mostra che gli attributi qualitativi per tutte le condizioni di produzione dello stadio N, come iCIEF, SEC ed N-glicani, erano simili a prescindere dai differenti semi dello stadio N-1.

Linea di cellule C per la produzione del Polipeptide-3 (Esperimento 2): Colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità usando semi ottenuti tramite coltura ad alimentazione discontinua o in perfusione

Per la Linea di cellule C, sono state iniziate colture di produzione ad alimentazione discontinua ad alta densità usando semi cresciuti in una coltura ad alimentazione discontinua o in una coltura in perfusione.

La coltura di produzione è stata iniziata ad un'alta densità del seme di 6×10^6 cellule per mL per 14 giorni. L'alimentazione giornaliera è stata iniziata il Giorno 1 con un volume di alimentazione pari a 3,7% del volume della coltura. L'ossigeno disciolto (DO) è stato mantenuto a 40%, e il pH è stato controllato tra 6,8 e 7,3. La temperatura è stata inizialmente mantenuta a $36,5^\circ\text{C}$, ed è stata cambiata a 33°C il Giorno 6.

La Figura 7A dimostra che tutte le colture di produzione mantenevano una vitalità cellulare $>80\%$ durante l'intero periodo di coltura. La coltura del seme in perfusione aveva una densità di cellule vitali massima di circa 33×10^6 cellule per mL, mentre la coltura del seme ad alimentazione discontinua aveva una densità di cellule vitali massima di circa 30×10^6 cellule per mL (Figura 7A). Il titolo del polipeptide d'interesse per la coltura del seme in perfusione e quella ad alimentazione discontinua era circa 7 g/L (Figura 7B). La Figura 7C mostra che gli attributi qualitativi per tutte le condizioni di produzione dello stadio N, come iCIEF, SEC ed N-glicani, erano simili a prescindere dai differenti semi dello stadio N-1.

Esempio 4

I processi di produzione su larga scala per le tre molecole sono stati condotti presso un impianto GMP di Bristol-Myers Squibb in scala 1000 L (per la Linea di cellule A) o presso un impianto di incremento di scala in scala 500 L (per le Linee di cellule B e C). Le colture del seme N-1 per le Linee di cellule A e B adoperavano la coltura discontinua con arricchimento in glucosio e nutrienti, mentre il seme N-1 per la Linea di cellule C è stato coltivato in

5 modalità ad alimentazione discontinua. Tutti e tre i processi si dimostravano robusti e scalabili a 1.000 L o 500 L. La densità cellulare, il titolo e il profilo qualitativo del prodotto sono coerenti con quelli delle colture satellite eseguite in bioreattori in scala di laboratorio (Figure 8-10). Per la Linea di cellule A, le colture di produzione sono state raccolte il Giorno 10 a causa del titolo eccezionalmente alto che superava la capacità di purificazione a valle. La durata ridotta della coltura per la Linea di cellule A permetteva di inoculare una nuova coltura di produzione ogni settimana (con due recipienti di produzione), aumentando così significativamente la resa produttiva.

Rivendicazioni

1. Metodo per la produzione su larga scala di un polipeptide ricombinante d'interesse, che prevede di coltivare cellule ospiti che esprimono il polipeptide ricombinante d'interesse in un sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno arricchito per ottenere una densità di cellule vitali dello stadio N-1 di almeno 5×10^6 cellule vitali per mL; e inoculare un sistema di coltura di produzione N, ad un'alta densità del seme di almeno $1,5 \times 10^6$ cellule per mL, con le cellule ospiti del sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo, in cui il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio rispetto al terreno non arricchito e/o una quantità aumentata di nutrienti selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine rispetto al terreno non arricchito.
2. Metodo della rivendicazione 1, in cui il sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo è una coltura discontinua e la cellula ospite viene coltivata in un terreno arricchito, o in cui il sistema di coltura dello stadio N-1 di tipo non perfusivo è una coltura ad alimentazione discontinua e la cellula ospite viene coltivata in un terreno di semina con aggiunta di un terreno di alimentazione.
3. Metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui la densità di cellule vitali dello stadio N-1 è almeno 10×10^6 , almeno 15×10^6 , almeno 20×10^6 , almeno 25×10^6 o almeno 30×10^6 cellule vitali per mL.
4. Metodo della rivendicazione 3, in cui la vitalità cellulare l'ultimo giorno dello stadio N-1 è almeno 80%, almeno 85% o almeno 90%.
5. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui il terreno è arricchito con un terreno di alimentazione di almeno 5% rispetto al terreno non arricchito, di almeno 10% rispetto al terreno non arricchito, di almeno 15% rispetto al terreno non arricchito, o di almeno 20% rispetto al terreno non arricchito.
6. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui il terreno arricchito o il terreno di alimentazione comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio.
7. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui la fonte di carbonio è glucosio.
8. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui il terreno arricchito o il terreno di alimentazione comprende una quantità aumentata di nutrienti selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine.

9. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui il terreno arricchito comprende una quantità aumentata di una fonte di carbonio e di nutrienti selezionati da amminoacidi, lipidi, vitamine, minerali e poliammine.
10. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, in cui la cellula ospite è una cellula di mammifero.
11. Metodo della rivendicazione 10, in cui la cellula ospite è una cellula CHO.
- 5 12. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-11, in cui il sistema di coltura di produzione N è un bioreattore ad alimentazione discontinua.
13. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui il titolo del polipeptide d'interesse è almeno 100 mg/L, almeno 1 g/L, almeno 3 g/L, almeno 5 g/L o almeno 10 g/L.
14. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-13, in cui le cellule ospiti vengono coltivate in un terreno basale o in un terreno basale arricchito per ottenere una densità di cellule vitali dello stadio di produzione N di almeno $1,5 \times 10^6$, almeno 5×10^6 o almeno 10×10^6 cellule vitali per mL.
- 10 15. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-14, che comprende inoltre il passaggio di isolare il polipeptide d'interesse dal sistema di coltura di produzione N.

15

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



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

20

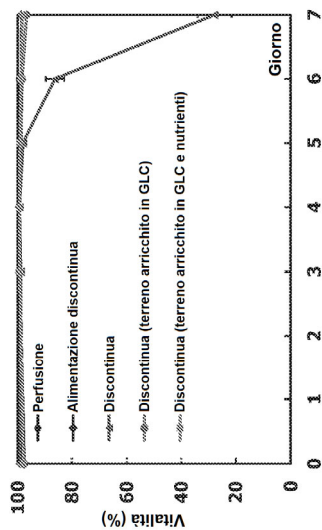


FIGURA 1B

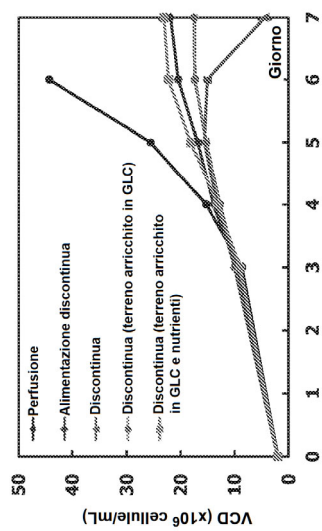


FIGURA 1A

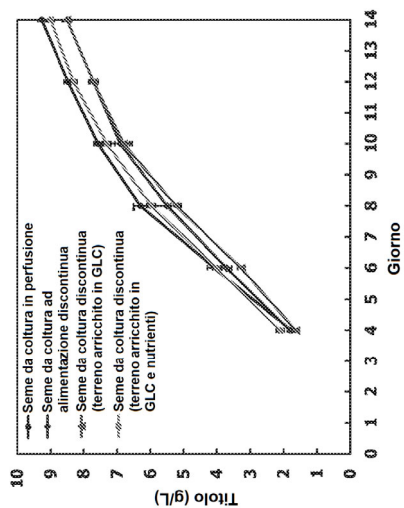


FIGURA 2B

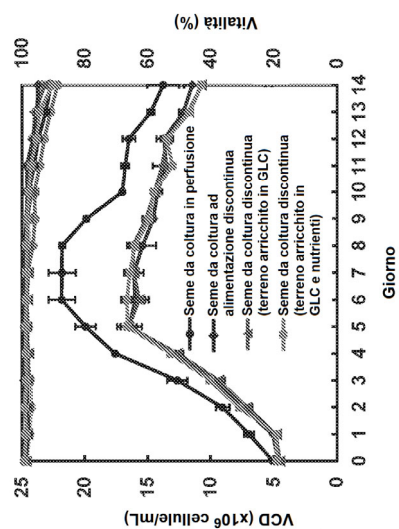


FIGURA 2A

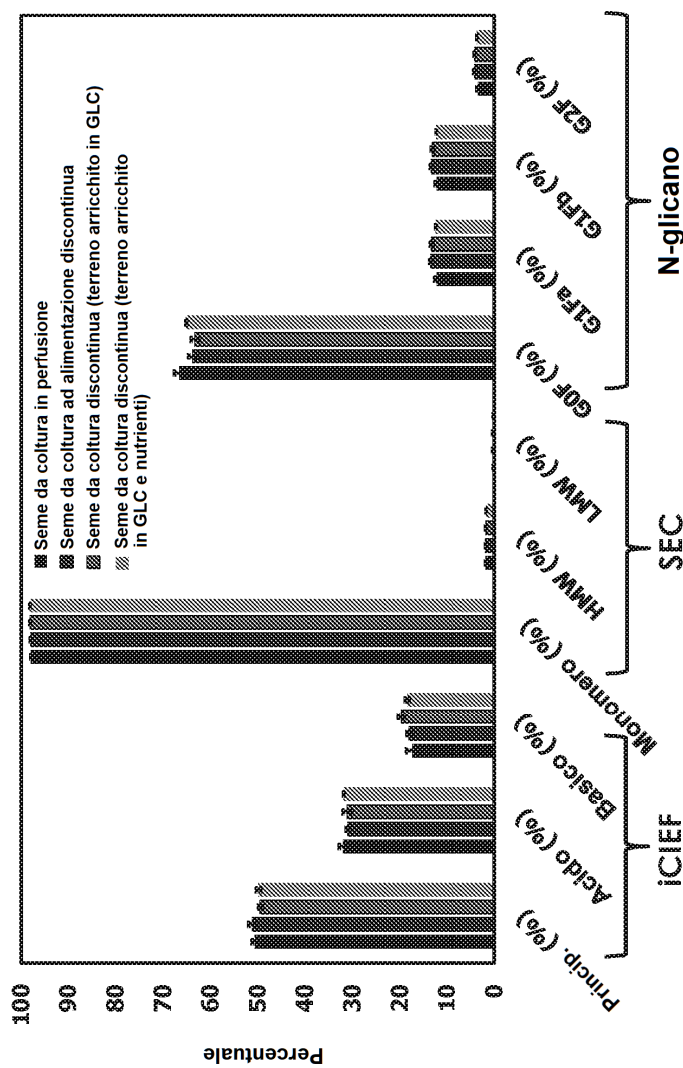


FIGURA 2C

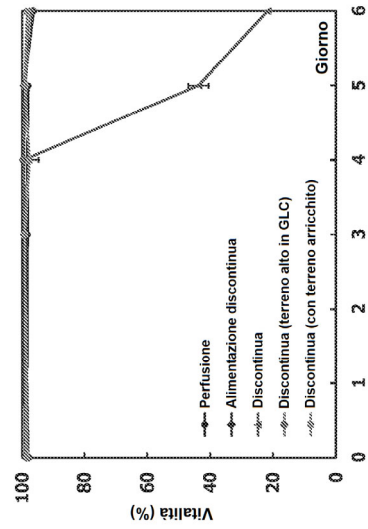


FIGURA 3B

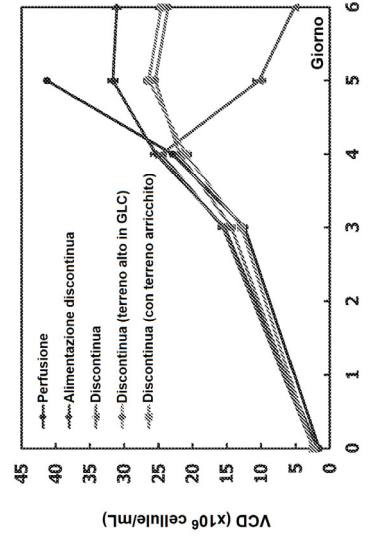


FIGURA 3A

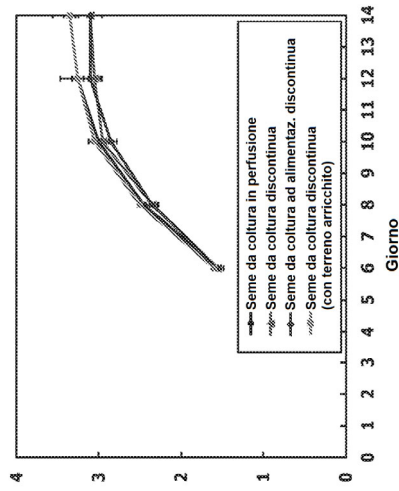


FIGURA 4B

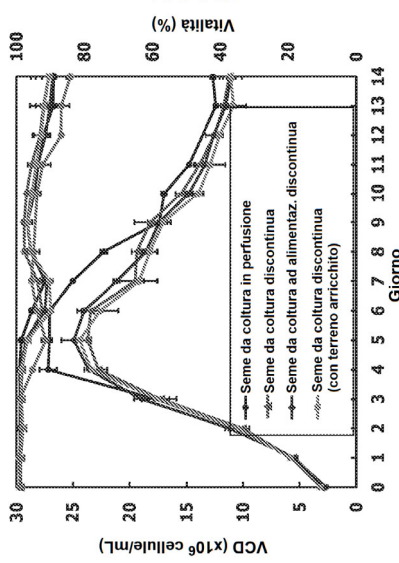


FIGURA 4A

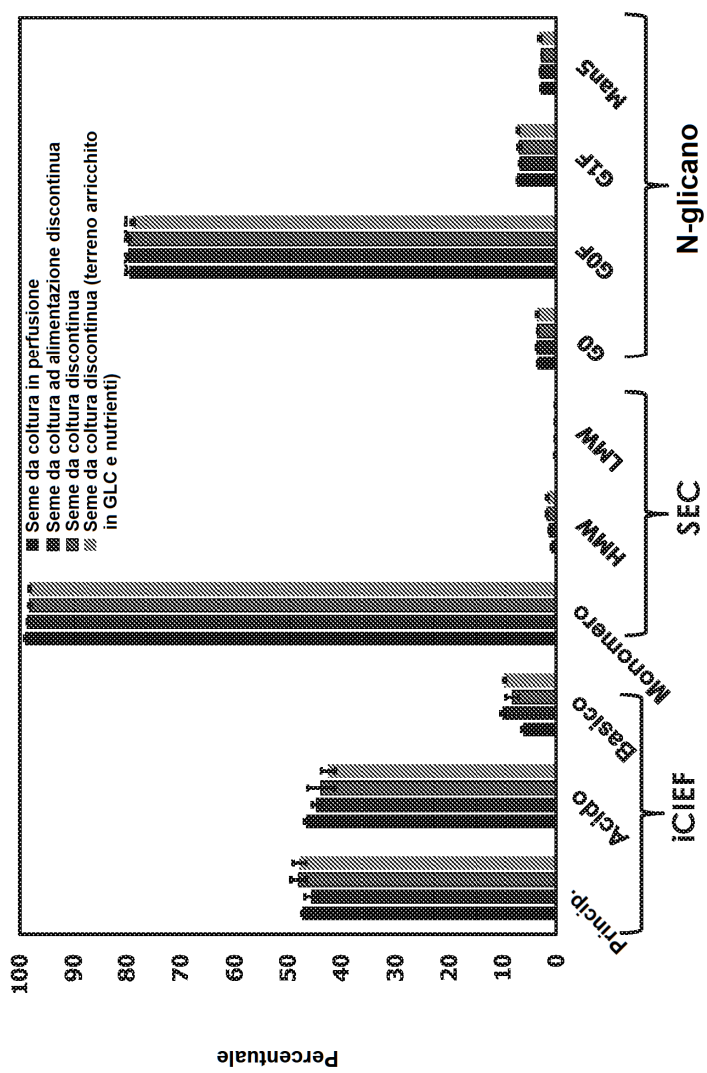


FIGURA 4C

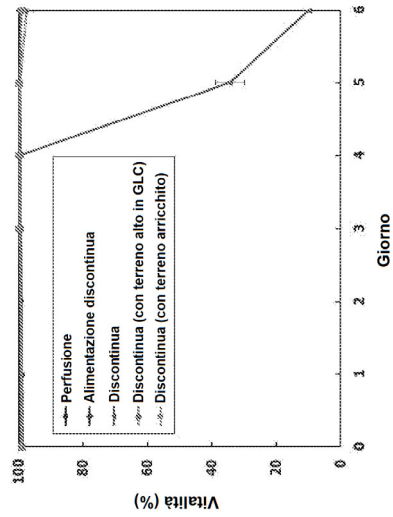


FIGURA 5B

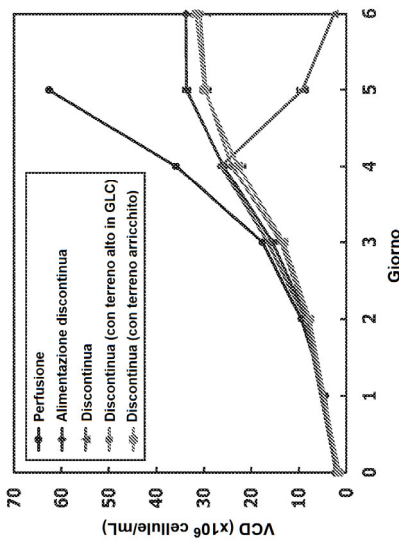


FIGURA 5A

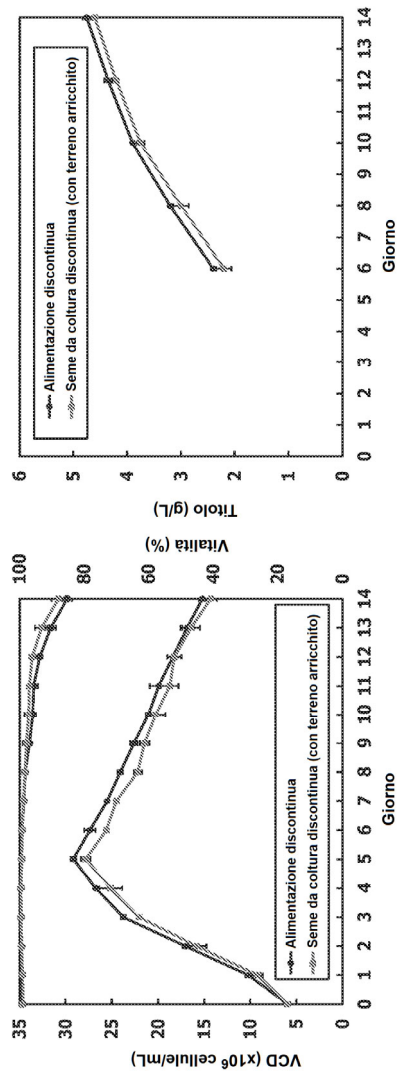


FIGURA 6B

FIGURA 6A

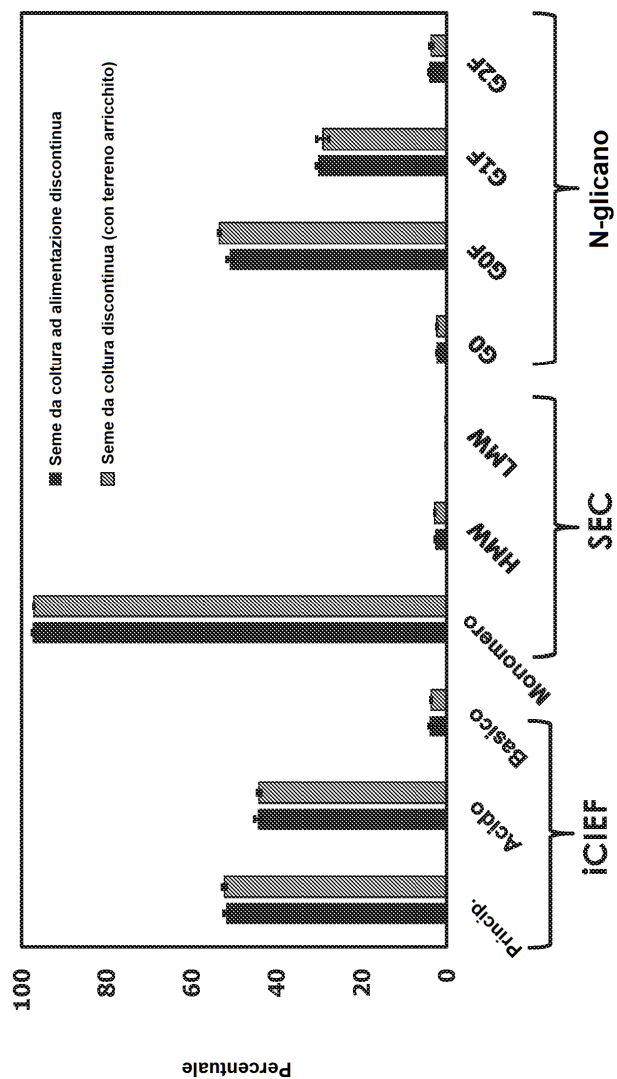


FIGURA 6C

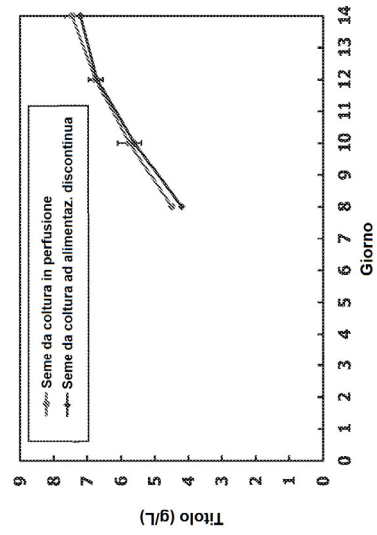


FIGURA 7B

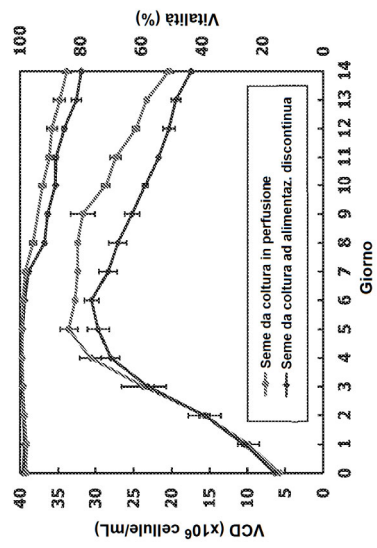


FIGURA 7A

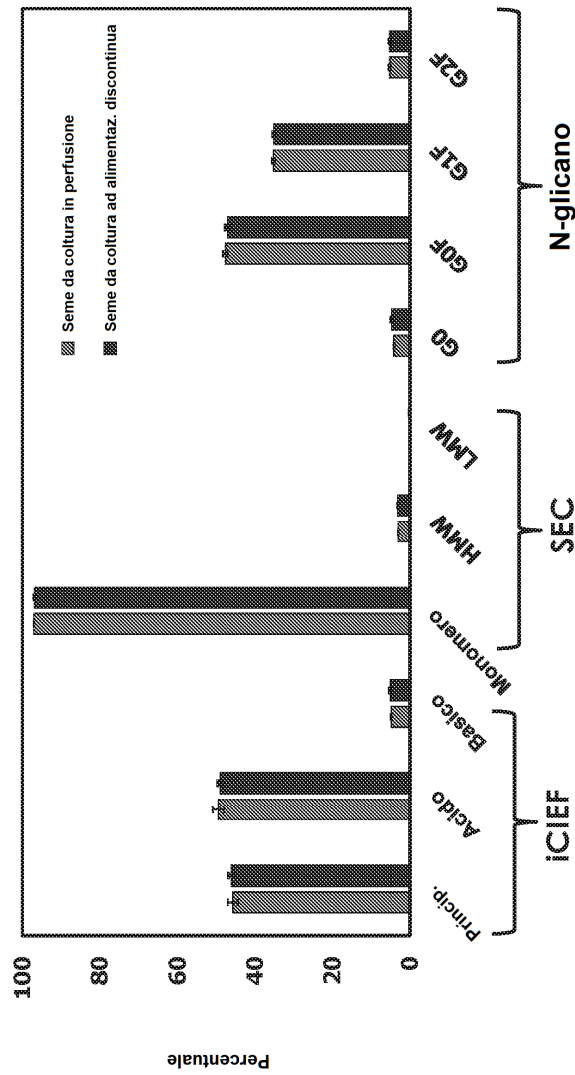


FIGURA 7C

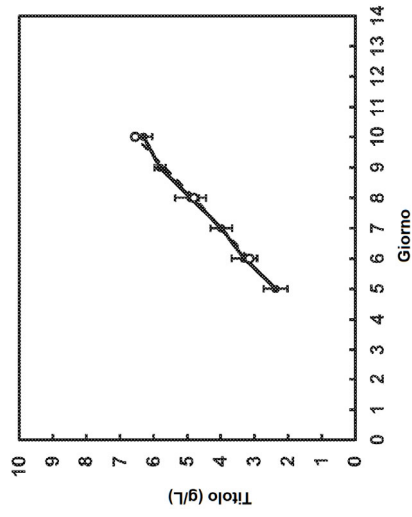


FIGURA 8B

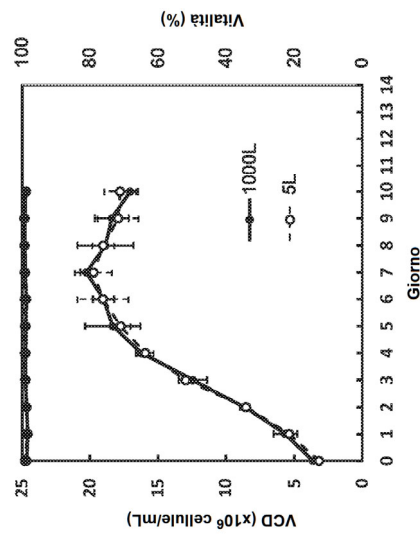


FIGURA 8A

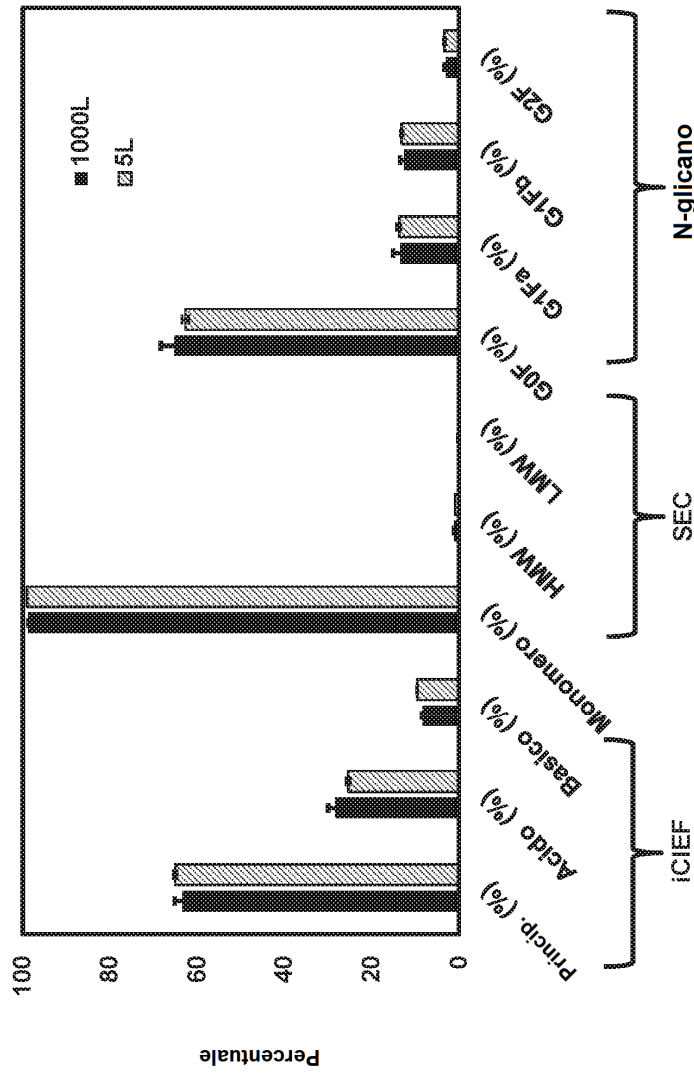


FIGURA 8C

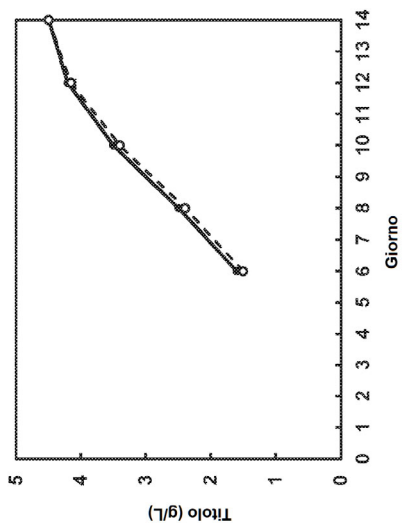


FIGURA 9B

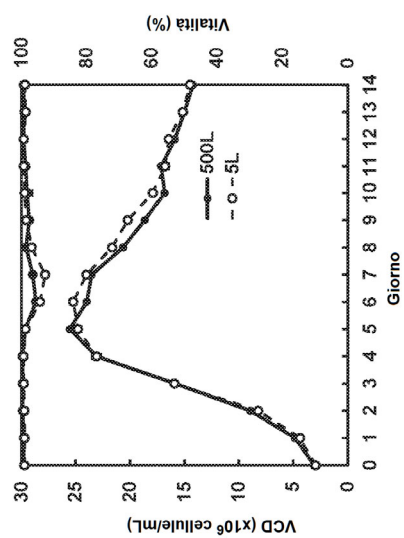


FIGURA 9A

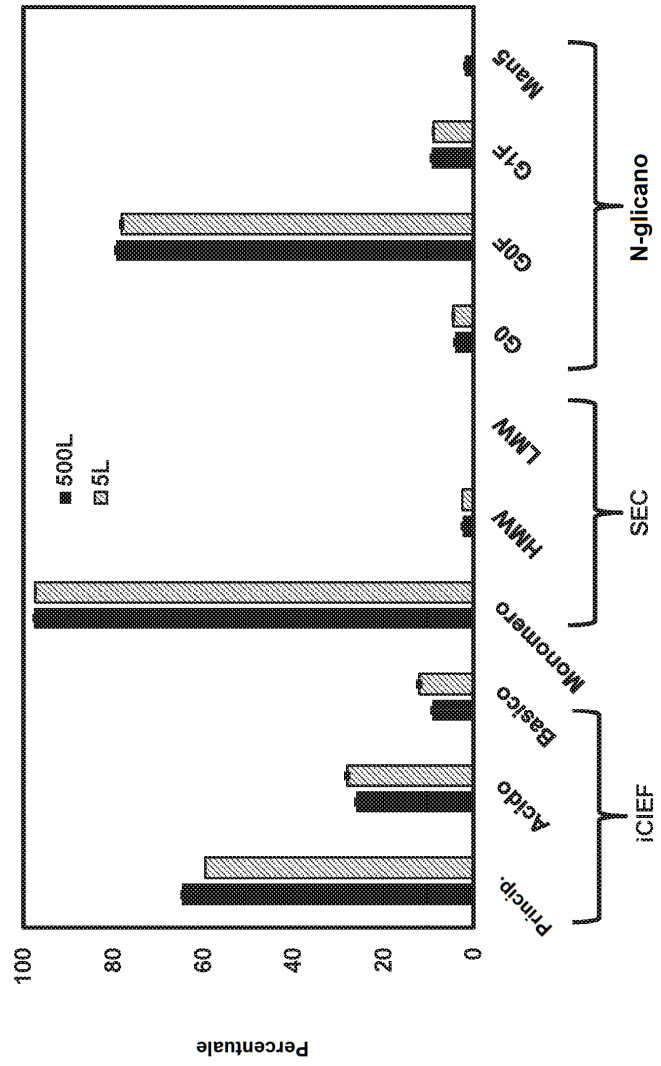


FIGURA 9C

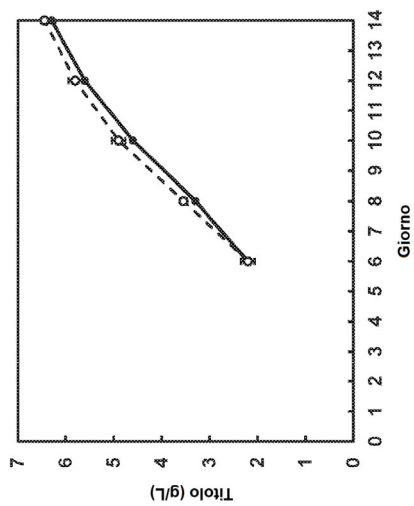


FIGURA 10B

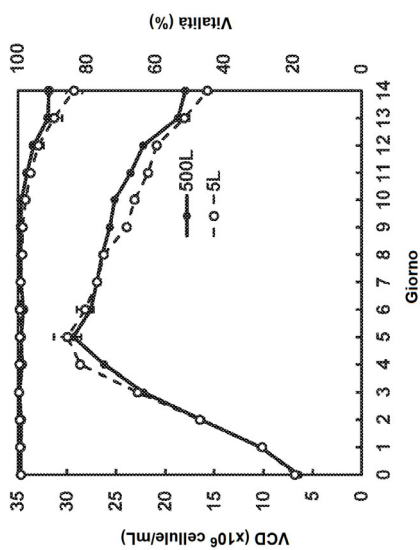


FIGURA 10A

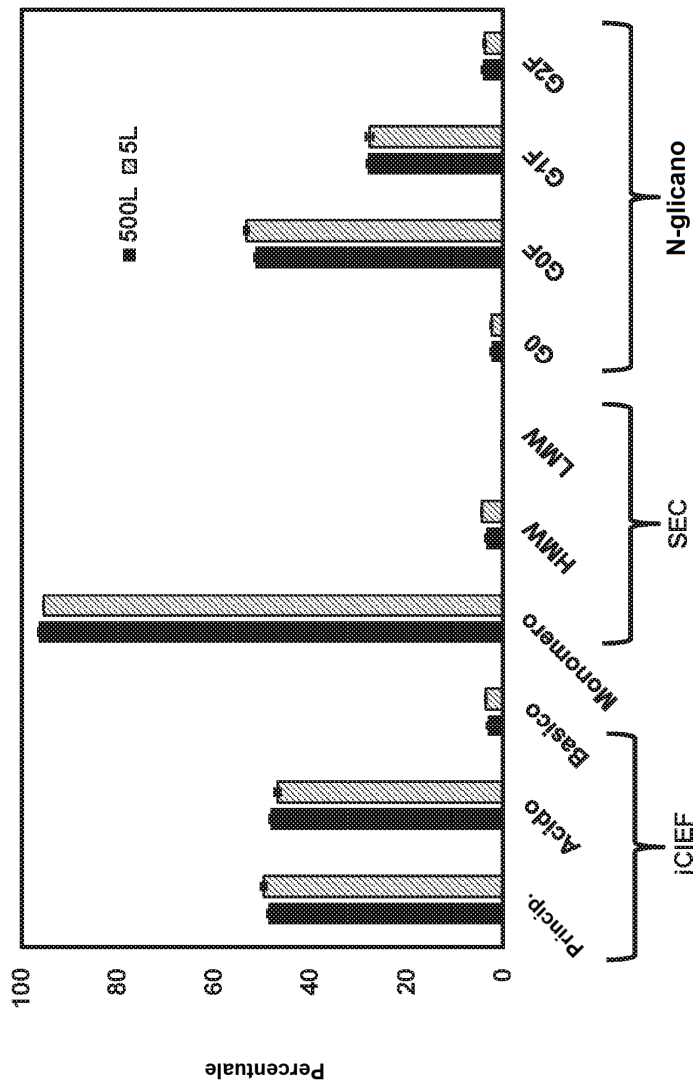


FIGURA 10C