



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I707949 B

(45) 公告日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 21 日

(21) 申請案號：104118240

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 05 日

(51) Int. Cl. : C12M3/00 (2006.01)

C12M3/02 (2006.01)

(30) 優先權：2014/06/09 美國

62/009,553

(71) 申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72) 發明人：布朗恩豪斯 麥可 BRUNINGHAUS, MICHAEL (US)；柯恩斯坦汀諾威 柯恩斯坦汀 KONSTANTINOV, KONSTANTIN (US)；瑞特 班傑明 WRIGHT, BENJAMIN (US)；周 偉昌 ZHOU, WEICHANG (US)

(74) 代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

(56) 參考文獻：

US 2009042253A1

WO 02/50251A2

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：9 共 92 頁

(54) 名稱

種子罐培養法 (seed train processes) 及其用途

(57) 摘要

本發明提供的是種子罐培養方法和產生重組蛋白質的方法，後者包括使用這些種子罐培養方法。

Provided herein are seed train processes and methods of producing a recombinant protein that include the use of these seed train processes.

指定代表圖：

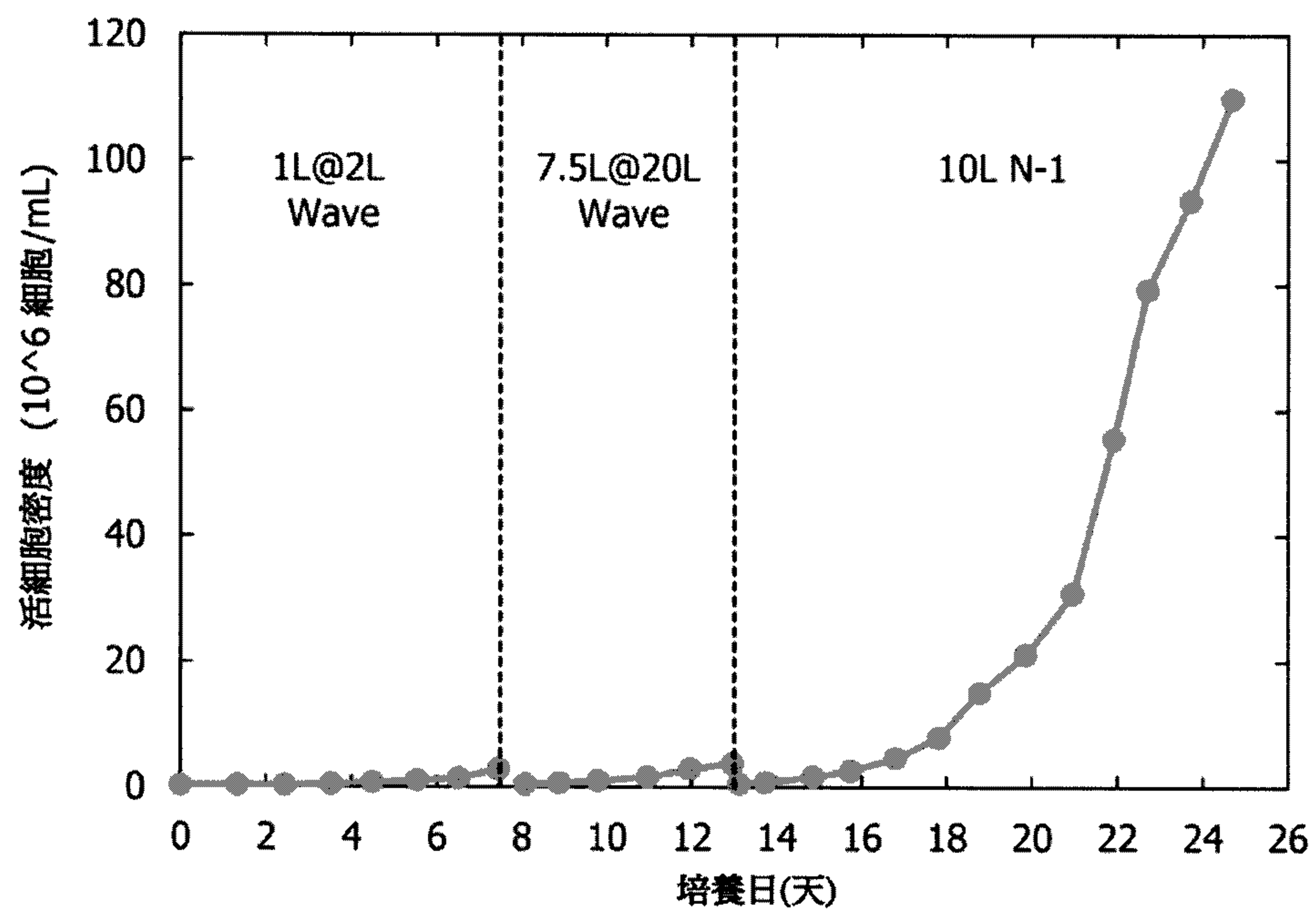


圖 3

發明摘要

I707949

※ 申請案號： 104118240

C12M 3/00 (2006.01)

※ 申請日： 104年6月5日

C12M 3/02 (2006.01)

**【發明名稱】** (中文/英文)

種子罐培養法(seed train processes)及其用途

SEED TRAIN PROCESSES AND USES THEREOF

**【中文】**

本發明提供的是種子罐培養方法和產生重組蛋白質的方法，後者包括使用這些種子罐培養方法。

**【英文】**

Provided herein are seed train processes and methods of producing a recombinant protein that include the use of these seed train processes.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 3 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】 (中文/英文)

種子罐培養法(seed train processes)及其用途

SEED TRAIN PROCESSES AND USES THEREOF

## 【技術領域】

【0001】 本發明涉及重組蛋白質的生物技術和生物製造的方法。

## 【先前技術】

【0002】 常常使用含有編碼重組蛋白質的核酸的哺乳動物細胞以生產治療上或商業上重要的蛋白質。在多種多樣的產品管道的當前環境中，生物技術公司越來越多地被驅動以開發可高度靈活而且划算地生產治療劑的創新的技術方案。

【0003】 含有編碼重組蛋白質的核酸的哺乳動物細胞經常在大的生產生物反應器中培養以生產感興趣的治療蛋白質。使用種子罐培養方法以產生足夠數目的所述哺乳動物細胞以接種所述大生產生物反應器。常規的種子罐培養方法以冷藏的細胞庫小瓶的解凍開始，然後是在逐漸更大的培養容器中的多個培養步驟(例如，5個以上)。常規的種子罐培養方法有幾個缺點，包括對於每個步驟過程中多個人工作業的要求，這使得整個工藝對於污染和操作者錯誤是易受損的。此外，常規的種子罐培養方法是耗費時間的，這是由於培養步驟的數目且由於在N-1步實現的低細胞密度(生產生物反應器的接種之前的(penultimate to)細胞培養物)，其僅可導致大規模生產生物反應器中小於 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL的起始細胞密度，這需要5-10日生長期以達到所述穩態生產細胞密度。

## 【發明內容】

**【0004】** 本發明基於，至少部分基於開發種子罐培養方法，其導致幾個優勢，包括，例如，較低的複雜度，減少的培養步驟數目，減少的從起始細胞培養物(例如，解凍的細胞庫)到接種生產生物反應器的時間量，減少的人工操縱量，減少的污染風險，生產生物反應器中較高的起始細胞活細胞密度，和生產生物反應器中較短的生長期(例如，達到所述穩態生產細胞密度所需的短時期)。所提供的種子罐培養方法包括(a)將多個重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第一培養基中處理以提供第一細胞培養物；(b)分批培養所述第一細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL；(c)將一體積的(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應器內所包含的第二培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL的第二細胞培養物；(d)灌注培養所述第二細胞培養物至細胞密度範圍為約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL；並(e)將一體積的(d)的第二細胞培養物在生產生物反應器內所包含的第三培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為 $0.20 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL的生產細胞培養物。本文還提供生產重組蛋白質(例如，重組治療蛋白質)的方法，其包括使用本文所述的種子罐培養方法之一。

**【0005】** 本文提供的是種子罐培養方法，其包括：(a)將多個重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第一培養基中處理以提供第一細胞培養物；(b)分批培養所述第一細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL；(c)將一體積的步驟(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應器內所包含的第二培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL的第二細胞培養物；(d)灌注培養所述第二細胞培養物至細胞密度範圍為約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL；並(e)將一體積的步驟(d)的第二細胞培養物在生產生物反應器內所包含的

三培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL的生產細胞培養物。在這些方法的一些具體實例中，(a)中處理所述多個重組哺乳動物細胞包括：將凍結的細胞庫解凍；和將一體積的解凍的細胞庫在所述第一培養基中處理。在本文所述的任何方法的一些具體實例中，所述凍結的細胞庫包含約 $10 \times 10^7$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL的細胞密度範圍。在本文所述的任何方法的一些具體實例中，所述解凍的細胞庫含有至少60% (例如，至少90%)的活細胞百分數。

**【0006】** 在本文所述的任何方法之一一些具體實例中，(a)中處理所述多個重組哺乳動物細胞包括將一體積的含有所述多個重組哺乳動物細胞的第三細胞培養物在所述第一培養基中處理。本文所述的任何方法的一些具體實例進一步包括：(1)將多個所述重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第四培養基中處理以提供所述第三細胞培養物；(2)分批培養(1)的第三細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，其中將一體積的(2)中的第三細胞培養物在(a)中的第一細胞培養基中處理。在本文所述的任何方法之一一些具體實例中，(a)中的容器和(1)中的容器之一或兩者是可丟棄的單次使用的生物反應器(例如，可丟棄的單次使用的生物反應器，包括塑膠無菌袋)。。

**【0007】** 在本文所述的任何方法之一一些具體實例中，(1)中處理所述多個重組哺乳動物細胞包括：將凍結的細胞庫解凍；並將一體積的解凍的細胞庫在所述第四培養基中處理。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述凍結的細胞庫包含約 $10 \times 10^7$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL的細胞密度範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述解凍的細胞庫含有至少60% (例如，至少90%)的活細胞百分數。

**【0008】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(a)中所述第一細

胞培養物具有約1.0 L至約50 L (例如, 約5.0 L至約10 L)的體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中, (c)中所述第二細胞培養物具有約5 L至約600 L (例如, 約10L至約300 L)的體積範圍。在本文所述的任何方法的一些具體實例中, (e)中所述生產細胞培養物具有約50 L至約20,000 L (例如, 約100 L至約10,000 L)的體積範圍。在本文所述的任何方法的一些具體實例中, (1)中所述第四培養基具有約500 mL至約20 L (例如, 約500 mL至約10 L)的體積範圍。

**【0009】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中, (a)中所述容器具有約1.5 L至約100 L (例如, 約1.5 L至約50 L)的內部體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中, (c)中所述灌注生物反應器具有約7.5 L至約1,000 L (例如, 約50 L至約1000 L)的內部體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中, (e)中所述生產生物反應器具有約150 L至約25,000 L (例如, 約150 L至約10,000 L)的內部體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中, (1)中所述容器具有約1 L至約40 L (例如, 約1 L至約20 L)的內部體積範圍。

**【0010】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中, (c)中所述灌注培養使用配備有交替切向流過濾裝置的灌注生物反應器進行。在本文所述任何方法的一些具體實例中, (e)中所述初始細胞密度範圍是約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL。在本文所述任何方法的一些具體實例中, (e)中所述初始細胞密度為穩態生產細胞密度的至少10% (例如, 至少20%)。

**【0011】** 還提供的是產生重組蛋白質的方法, 其包括: (a)將多個重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第一培養基中處理以提供第一細胞培養物; (b)分批培養所述第一細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL; (c)將一體積的(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應



器內所包含的第二培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL的第二細胞培養物；(d)灌注培養所述第二細胞培養物至細胞密度範圍為約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $60 \times 10^6$ 細胞/mL；(e)將一體積的(d)的第二細胞培養物在生產生物反應器內所包含的第三培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL的生產細胞培養物；(f)在允許所述重組哺乳動物細胞分泌重組蛋白質的條件下灌注培養生產細胞培養物；並(g)從所述生產細胞培養物收穫所述重組蛋白質。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(a)中處理所述多個重組哺乳動物細胞包括：將凍結的細胞庫解凍；並將一體積的解凍的細胞庫在所述第一培養基中處理。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述凍結的細胞庫具有約 $10 \times 10^7$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL的細胞密度範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述解凍的細胞庫含有至少60% (例如，至少90%)的活細胞百分數。

**【0012】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(a)中處理所述多個重組哺乳動物細胞包括將一體積的包含所述多個重組哺乳動物細胞的第三細胞培養物在所述第一培養基中處理。本文所述任何方法的一些具體實例進一步包括：(1)將多個所述重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第四培養基中處理以提供所述第三細胞培養物；並(2)分批培養(1)的第三細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，其中將一體積的(2)中的第三細胞培養物在(a)中的第一細胞培養基中處理。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(a)中的容器和(1)中的容器之一或兩者是可丟棄的單次使用的生物反應器(例如，可丟棄的單次使用的生物反應器包括塑膠無菌袋)。

**【0013】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(1)中處理所述多

個重組哺乳動物細胞包括：將凍結的細胞庫解凍；並將一體積的解凍的細胞庫在所述第四培養基中處理。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述凍結的細胞庫包含約 $1.0 \times 10^7$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL (例如，約 $10 \times 10^7$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL)的細胞密度範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述解凍的細胞庫含有至少60% (例如，至少90%)的活細胞百分數。

**【0014】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(a)中所述第一細胞培養物具有約1.0 L至約50 L (例如，介於約5.0 L與約10.0 L之間)的體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(c)中所述第二細胞培養物具有約5 L至約600 L (例如，約10 L至約300 L)的體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(e)中所述生產細胞培養物具有約50 L至約20,000 L (例如，約100 L至約10,000 L)的體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(1)中所述第四培養基具有約500 mL至約20 L (例如，約500 mL至約10 L)的體積範圍。

**【0015】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(a)中所述容器具有的內部體積範圍約1.5 L至約100 L (例如，約1.5 L至約50 L)。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(c)中所述灌注生物反應器具有約7.5 L至約1,000 L (例如，約50 L至約1000 L)的內部體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(e)中所述生產生物反應器具有約150 L至約25,000 L (例如，150 L至約10,000 L)的內部體積範圍。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(1)中所述容器具有約1 L至約40 L (例如，約1 L至約20 L)的內部體積範圍。

**【0016】** 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(c)中所述灌注培養使用配備有交替切向流過濾裝置的灌注生物反應器進行。在本文所述任

何方法的一些具體實例中，(e)中所述初始細胞密度範圍是約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL。在本文所述任何方法的一些具體實例中，(e)中所述初始細胞密度為穩態生產細胞密度的至少10% (例如，至少20%)。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述穩態生產細胞密度為 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^6$ 細胞/mL (例如，約 $15 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^6$ 細胞/mL)。在本申請所述的任何方法的一些具體實例中，(f)中所述灌注培養得到生產細胞培養物，其在約1日至約10日(例如，介於約2日與約5日之間)的時間中達到所述穩態生產細胞密度。

【0017】 在本文所述任何方法的一些具體實例中，(g)中所述收穫包括從所述生產生物反應器去除(例如，連續去除)培養基。本文所述任何方法的一些具體實例進一步包括從去除的培養基分離重組蛋白質。在本文所述任何方法的一些具體實例中，所述分離使用整合的連續工藝進行。本文所述任何方法的一些具體實例進一步包括將分離的重組蛋白質配製入藥劑中。

【0018】 如本文中所使用的，名詞前的單詞“a”代表特定名詞的一個或多個。例如，短語“重組哺乳動物細胞”代表“一個或多個重組哺乳動物細胞”。

【0019】 術語“哺乳動物細胞”意指來自或源自任何哺乳動物(例如，人、倉鼠、小鼠、綠猴、大鼠、豬、牛或兔)的任何細胞。例如，哺乳動物細胞可為永生化的細胞。在一些具體實例中，哺乳動物細胞是分化的細胞。在一些具體實例中，哺乳動物細胞是未分化的細胞。哺乳動物細胞的非限制性實例在本文中描述。哺乳動物細胞的其他實例是本領域已知的。

【0020】 術語“種子罐培養方法(seed train process)”是本領域已知的且意指一種多步方法，藉由所述方法將第一細胞培養物中的起始數目的細

胞(例如，重組哺乳動物細胞)擴增為N-1細胞培養物，其含有足夠數目的細胞從而以大於 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL的初始細胞密度接種通常的生產生物反應器。

**【0021】** 術語“基本上不含”意指一種組成物(例如，液體培養基)，其至少或大約90%不含(例如，至少或大約95%、96%、97%、98%或至少或大約99%不含，或約100%不含)特定的物質(例如，哺乳動物細胞)。

**【0022】** 術語“0.5x體積”意指約50%的體積。術語“0.6x體積”意指約60%的體積。同樣地，0.7x、0.8x、0.9x和1.0x分別意指約70%、80%、90%或100%的體積。

**【0023】** 術語“培養”或“細胞培養”意指在受控的物理條件組下哺乳動物細胞(例如，重組哺乳動物細胞)的維持或增殖。

**【0024】** 術語“哺乳動物細胞的培養物”或“細胞培養物”意指含有多個哺乳動物細胞的液體培養基，所述哺乳動物細胞在受控的物理條件組下維持或增殖。

**【0025】** 術語“液體培養基”或“培養基”意指含有足夠營養物以允許細胞(例如，哺乳動物細胞)在體外生長或增殖的流體。例如液體培養基可含有如下的一種或多種：胺基酸(例如，20種胺基酸)、嘌呤(例如，次黃嘌呤)、嘧啶(例如，胸苷)、膽鹼、肌醇、硫胺素、葉酸、生物素、鈣、煙醯胺、維生素B6 (pyridoxine)、核黃素、胸苷、氰鈷胺素、丙酮酸鹽、硫辛酸、鎂、葡萄糖、鈉、鉀、鐵、銅、鋅和碳酸氫鈉。在一些具體實例中，液體培養基可含有來自哺乳動物的血清。在一些具體實例中，液體培養基不含有來自哺乳動物的血清或另外的提取物(限定的(defined)液體培養基)。在一些具體實例中，液體培養基可含有痕量金屬、哺乳動物生長激素和/或哺乳動物生長因子。液體培養基的另外的實例是基本培養基(例如，僅含有無機鹽、



碳源和水的培養基)。液體培養基的非限制性實例在本文中描述。液體培養基的另外的實例是本領域已知的且是商業上可得到的。液體培養基可含有任何密度的哺乳動物細胞。例如，如本文中所使用的，從生產生物反應器去除的一定體積的液體培養基可基本上不含哺乳動物細胞。

【0026】 術語“不含源自動物的組分的液體培養基”意指一種液體培養基，其不含有任何源自哺乳動物的組分(例如，蛋白質或血清)。

【0027】 術語“不含血清的液體培養基”意指一種液體培養基，其不含有哺乳動物血清。

【0028】 術語“含血清的液體培養基”意指一種液體培養基，其含有哺乳動物血清。

【0029】 術語“化學上限定的液體培養基”是本領域的術語且意指一種液體培養基，其中所有化學組分都是已知的。例如，化學上限定的液體培養基不含有胎牛血清、牛血清白蛋白或人血清白蛋白，因為這些製備物通常含有白蛋白和脂質的複雜混合物。

【0030】 術語“不含蛋白質的液體培養基”意指一種液體培養基，其不含有任何蛋白質(例如，任何可檢測到的蛋白質)。

【0031】 術語“攪動”意指攪拌或以其他方式移動容器(例如，生物反應器)中液體培養基的部分。進行攪動從而，例如，增加容器(例如，生物反應器)中的液體培養基中溶解的O<sub>2</sub>濃度。攪動可使用任何本領域已知的方法進行，例如，工具(instrument)或攪拌槳(propeller)。例如，攪動可藉由將容器置於傾斜和/或旋轉的平臺上來進行。可用於進行容器(例如，生物反應器)中液體培養基的部分的攪動的例示性裝置和方法是本領域已知的。

【0032】 術語“整合的方法”意指一種方法，其使用合作發揮功能以實現特定結果(例如，生成從液體培養基分離的重組蛋白質)的結構元件來進

行。

**【0033】** 術語“連續方法”意指一種方法，其藉由系統的至少一部分連續地給料流體。

**【0034】** 術語“免疫球蛋白”意指含有免疫球蛋白蛋白質的至少15個胺基酸(例如，至少20、30、40、50、60、70、80、90或100個胺基酸)的胺基酸序列的多肽(例如，可變域序列、框架序列或恒定域序列)。免疫球蛋白可包括例如輕鏈免疫球蛋白的至少15個胺基酸，例如，重鏈免疫球蛋白的至少15個胺基酸。免疫球蛋白可為分離的抗體(例如，IgG、IgE、IgD、IgA或IgM)。免疫球蛋白可為IgG的亞類(例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。免疫球蛋白可為抗體片段，例如，Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段或scFv片段。免疫球蛋白還可為雙-特異性抗體或三-特異性抗體，或二聚體、三聚體或多聚體抗體，或雙功能抗體(diabody)，Affibody®，或Nanobody® (納米抗體)。免疫球蛋白還可為含有至少一個免疫球蛋白域的工程改造的蛋白質(例如，融合蛋白)。免疫球蛋白的非限制性實例在本文中描述且免疫球蛋白的另外的實例是本領域已知的。

**【0035】** 術語“蛋白質片段”或“多肽片段”意指多肽序列的一部分，其長度上為至少或大約4個胺基酸，至少或大約5個胺基酸，至少或大約6個胺基酸，至少或大約7個胺基酸，至少或大約8個胺基酸，至少或大約9個胺基酸，至少或大約10個胺基酸，至少或大約11個胺基酸，至少或大約12個胺基酸，至少或大約13個胺基酸，至少或大約14個胺基酸，至少或大約15個胺基酸，至少或大約16個胺基酸，至少或大約17個胺基酸，至少或大約18個胺基酸，至少或大約19個胺基酸，或至少或大約20個胺基酸，或者長度上多於20個胺基酸。重組蛋白質片段能夠使用本文中所述的任何方法產生。

**【0036】** 術語“工程改造的蛋白質”意指一種多肽，其不由生物體(例

如，哺乳動物)內存在的內源核酸天然編碼。工程改造的蛋白質的實例包括酶(例如，具有一個或多個胺基酸取代、缺失、插入或添加，其導致工程改造的酶的催化活性和/或穩定性增加)、融合蛋白、抗體(例如，二價抗體、三價抗體或雙功能抗體)和含有至少一個重組支架(scaffolding)序列的抗原-結合蛋白。

**【0037】** 術語“多-柱層析系統”或“MCCS”意指總共兩個或多個相互連接的或轉換的層析柱和/或層析膜的系統。多-柱層析系統的非限制性實例是週期逆流色譜系統(periodic counter current chromatography system) (PCC)，其含有總共兩個或多個相互連接的或轉換的層析柱和/或層析膜。多-柱層析系統的另外的實例在本文中描述且為本領域已知的。

**【0038】** 術語“捕獲”意指一個步驟，進行該步驟以將重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)與液體培養基或稀釋的液體培養基中存在的一種或多種其他組分(例如，培養基蛋白質或哺乳動物細胞中存在的或從其中分泌的一種或多種其他組分(例如，DNA、RNA或其他蛋白質))部分地純化或分離(例如，按重量計至少或大約5%，例如，至少或大約10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少或大約95%純)、濃縮和穩定化。通常，使用結合重組蛋白質的樹脂(例如，藉由使用親和層析)進行捕獲。用於從液體培養基或稀釋的液體培養基捕獲重組蛋白質的非限制性方法在本文中描述且其他是本領域已知的。重組蛋白質可使用至少一個層析柱和/或層析膜(例如，本文中描述的任何層析柱和/或層析膜)從液體培養基捕獲。

**【0039】** 術語“純化”意指一個步驟，進行所述步驟以將重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)與含有重組蛋白質的流體中存在的一種或多種其他雜質(例如，塊狀(bulk)雜質)或組分(例如，液體培養基蛋白質或哺乳動物細

胞中存在的或從其中分泌的一種或多種其他組分(例如，DNA、RNA、其他蛋白質、內毒素、病毒等))分離。例如，純化可在初始捕獲步驟過程中或其後進行。純化可使用結合重組蛋白質或污染物(例如，藉由使用親和層析、疏水相互作用層析、陰離子或陽離子交換層析或分子篩層析)的樹脂、膜或任何其他固體支持物進行。重組蛋白質可使用至少一個層析柱和/或層析膜(例如，本文中描述的任何層析柱或層析膜)從含有所述重組蛋白質的流體純化。

**【0040】** 術語“精製(polishing)”是本領域的術語且意指一個步驟，進行該步驟以從含有重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)的流體去除殘餘的痕量或少量污染物或雜質，其接近最終合意的純度。例如，精製可藉由將含有重組蛋白質的流體經過層析柱或膜吸收劑來進行，所述層析柱或膜吸收劑選擇性地結合靶重組蛋白質或含有重組蛋白質的流體中存在的少量污染物或雜質。在這樣的實例中，層析柱或膜吸收劑的洗脫液/濾液含有所述重組蛋白質。

**【0041】** 術語“洗脫液/濾液”是本領域的術語且意指一種從層析柱或層析膜發出的流體，其包含可檢測量的重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)。

**【0042】** 術語“過濾”意指從液體(例如，液體培養基或本文中所述的任何系統或方法中存在的流體)去除至少部分的(例如，至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)不合意的生物污染物(例如，哺乳動物細胞、細菌、酵母細胞、病毒或分枝桿菌(*mycobacteria*)和/或特定的物質(例如，沉澱的蛋白質)。

**【0043】** 術語“分泌的蛋白質”或“分泌的重組蛋白質”意指一種蛋白質(例如，重組蛋白質)，當其在哺乳動物細胞內轉譯時其初始含有至少一個分泌信號序列，並且(至少部分)藉由所述哺乳動物細胞中分泌信號序列的酶



切割至少部分分泌入胞外空間(例如，液體培養基)。有技術的實施者會懂得“分泌的”蛋白質不需要從細胞完全解離才被認為是分泌的蛋白質。

【0044】 術語“灌注培養”是本領域的術語且意指在容器(例如，生物反應器)中培養細胞培養物，其中在容器中培養細胞培養物包括週期地或連續地去除容器中存在的液體培養基(例如，基本上不含細胞的液體培養基)，並且同時或稍後將基本上相同體積的替代液體培養基添加至容器。在一些實例中，去除的液體培養基的體積和在培養期過程中隨增加的時間(例如，約24-小時時間，約1分鐘-約24-小時的時間，或大於24小時的時間)添加的替代培養基的體積(例如，基於日的培養基再進料速率(refeed rate))存在增量變化(incremental change) (例如，增加或減少)。每日去除和替代的培養基的級分可取決於所培養的特定細胞、初始接種密度和特定時間的細胞密度而變化。“RV”或“反應器體積”意指在培養過程開始時存在的培養基的體積(例如，接種後存在的培養基的總體積)。

【0045】 術語“容器”是本領域已知的且意指一種裝置，其具有適於在受控的允許維持或增殖所述細胞的物理條件組下在液體培養基中培養多個細胞(例如，重組哺乳動物細胞)的內部體積。容器的非限制性實例為生物反應器(例如，本申請描述或本領域已知的任何例示性生物反應器)。

【0046】 術語“灌注生物反應器”是本領域已知的且意指一種生物反應器，其具有用於在液體培養基中培養多個細胞(例如，重組哺乳動物細胞)的內部體積，並具有用於週期地或連續地去除生物反應器中的液體培養基的工具(means) (例如，出口、入口、泵或其他這樣的裝置)且具有用於將基本上相同體積的替代液體培養基添加至生物反應器的工具(例如，出口、入口、泵或其他這樣的裝置)。替代液體培養基的添加可以與從生物反應器去除液體培養基在基本上相同的時間或其稍後來進行。用於從生物反應器去

除液體培養基的工具和用於添加替代液體培養基的工具可為單一裝置或系統。

**【0047】** 術語“生產生物反應器”是本領域的術語且意指一種大規模生物反應器(例如，具有超過500 L、1,000 L、5,000 L、10,000 L、20,000 L、50,000L或100,000 L的內部體積)。例如，生產生物反應器可為灌注生物反應器。

**【0048】** 術語“穩態生產細胞密度”是本領域的術語且意指在灌注培養過程中隨時間維持的培養基中的活細胞(例如，活的重組哺乳動物細胞)的目標濃度。

**【0049】** 術語“分批培養(物)”是本領域的術語且意指含有在液體培養基中的多個細胞(例如，哺乳動物細胞)的容器(例如，生物反應器)，其中所述容器(例如，生物反應器)中存在的細胞的培養不包括將大量或顯著量的新鮮液體培養基添加至細胞培養物且不包括在培養過程中將大量或顯著量的液體培養基從細胞培養物去除。

**【0050】** 術語“補料-分批培養(物)”是本領域的術語且意指包括在液體培養基中的多個細胞(例如，哺乳動物細胞)的容器(例如，生產生物反應器)，其中所述容器(例如，生產生物反應器)中存在的細胞的培養包括將新鮮液體培養基週期地或連續地添加至所述容器而在培養過程中不從所述容器大量地或顯著地去除液體培養基。所述新鮮液體培養基可與培養開始時容器中存在的液體培養基相同。在補料-分批培養的一些實例中，所述新鮮液體培養基是培養開始時容器中存在的液體培養基的濃縮形式。在補料-分批培養的一些實例中，將新鮮培養基作為乾粉添加。

**【0051】** 術語“單元操作”是本領域的術語且意指一個功能步驟，其可在從液體培養基分離重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白質)的過程中進行。

例如，單元操作可為過濾(例如，從含有重組蛋白質的流體去除污染的細菌、酵母、病毒或分枝桿菌和/或特定的物質)、捕獲、表位標籤去除(epitope tag removal)、純化、容納或保存、精製、病毒滅活、調節含有所述重組蛋白質的流體的離子濃度和/或pH以及去除不想要的鹽。

**【0052】** “比生產速率(Specific productivity rate)”或“SPR”是本領域的術語且如本文中所用的指每日每個哺乳動物細胞產生的重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)的質量(mass)或酶活性。重組抗體的SPR通常測量為質量/細胞/日。重組酶的SPR通常測量為單位/細胞/日或(單位/質量)/細胞/日。

**【0053】** “體積生產速率(Volume productivity rate)”或“VPR”是本領域的術語且如本文中所用的指每日每體積的培養物(例如，每L的生物反應器、容器或管體積)產生的重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)的質量或酶活性。重組抗體的VPR通常測量為質量/L/日。重組酶的VPR通常測量為單位/L/日或質量/L/日。

**【0054】** “滑座(Skid)”是本領域的術語且如本文中所用的指三維固體結構，其可充當本文中描述的系統的平臺或支援物。如果滑座包含一個或多個允許運動的結構(例如，輪、輓等)，其可賦予所述系統或其部分運動性(mobility)。滑座的非限制性實例在本文中描述。滑座的其他實例是本領域已知的。

**【0055】** 除非以其他方式定義，本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域的普通技術人員所理解的相同的含義。本文描述用於本發明的方法和材料，也可使用本領域已知的其他、合適的方法和材料。所述材料、方法和實例僅僅是說明性的，且不意欲為限制性的。本文提及的所有出版物、專利申請案、專利、序列、資料庫錄入項和其他參考資料以參考方式以它們的整體併入。在衝突的情況下，以包括定義的本說明書為

准。

【0056】 本發明的其他特徵和優勢會從如下詳述的說明書和附圖以及從請求項中顯而易見。

### 【圖式簡單說明】

【0057】 圖1為顯示常規種子罐培養方法的示意圖(頂部)，其以接種500-L生產灌注生物反應器結束；和本文提供的例示性種子罐培養方法的示意圖(底部)，其以接種500-L生產灌注生物反應器結束。

【0058】 圖2為顯示常規種子罐培養方法的示意圖(頂部)，其以接種10,000-L生產分批或補料-分批生物反應器結束；和本文提供的例示性種子罐培養方法的示意圖(底部)，其以接種10,000-L生產分批或補料-分批生物反應器結束。

【0059】 圖3為顯示本文所述的例示性種子罐培養方法的所有步驟中的活細胞密度的圖：在2-L可丟棄的單次使用的生物反應器中分批培養1-L第三細胞培養物，在20-L可丟棄的單次使用的生物反應器中分批培養7.5-L第一細胞培養物，和在15-L灌注生物反應器中灌注培養10-L第二細胞培養物。

【0060】 圖4為本文所述的例示性種子罐培養方法中活細胞密度作為N-1灌注細胞培養物的電容(capacitance)的函數之圖。

【0061】 圖5為用一體積的具有 $25 \times 10^6$ 細胞/mL (藍線)、 $50 \times 10^6$ 細胞/mL (綠線)或 $100 \times 10^6$ 細胞/mL (紅線)的活細胞密度的N-1細胞培養物接種以在旋轉管(代表生產生物反應器)中得到 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL的起始活細胞密度的旋轉管的活細胞密度(實線)和細胞活力百分比(虛線)隨時間的圖。實線和虛線代表數據( $n = 3$ )的均值。陰影面積代表 $\pm 2$ 標準差。

【0062】 圖6為用一體積的具有 $25 \times 10^6$ 細胞/mL (藍線)、 $50 \times 10^6$ 細胞

/mL (綠線)或 $100 \times 10^6$ 細胞/mL (紅線)的活細胞密度的N-1細胞培養物接種以在旋轉管(代表生產生物反應器)中得到 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL的起始活細胞密度的旋轉管的活細胞密度(實線)和細胞活力百分比(虛線)隨時間的圖。實線和虛線代表數據( $n = 3$ )的均值。陰影面積代表 $\pm 2$ 標準差。

【0063】 圖7為用一定體積的具有 $25 \times 10^6$ 細胞/mL (藍線)、 $50 \times 10^6$ 細胞/mL (綠線)或 $100 \times 10^6$ 細胞/mL (紅線)的活細胞密度的N-1細胞培養物接種以在旋轉管(代表生產生物反應器)中得到 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL的起始活細胞密度的旋轉管的活細胞密度(實線)和細胞活力百分比(虛線)隨時間的圖。實線和虛線代表數據( $n = 3$ )的均值。陰影面積代表 $\pm 2$ 標準差。

【0064】 圖8為與以來自 $50 \times 10^6$ 活細胞/mL的N-1灌注生物反應器的 $5.0 \times 10^6$ 活細胞/mL接種的10-L生產生物反應器( $n = 2$ ) (綠線)相比，以來自 $2.5 \times 10^6$ 活細胞/mL的N-1灌注生物反應器的 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL接種的10-L生產生物反應器( $n = 2$ ) (紅線)的活細胞密度隨時間的圖。虛線代表用於生產生物反應器的穩態操作的目標活細胞密度。實線代表數據( $n = 2$ )的均值。陰影面積代表 $\pm 2$ 標準差。

【0065】 圖9為顯示與以來自 $50 \times 10^6$ 細胞/mL的N-1生物反應器的 $5.0 \times 10^6$ 活細胞/mL接種的10-L生產生物反應器(綠點)相比，以來自 $2.5 \times 10^6$ 活細胞/mL的N-1灌注生物反應器的 $0.5 \times 10^6$ 活細胞/mL接種的10-L生產生物反應器(紅點)的累積產品活性(單位/L)作為積分的(integral)活細胞濃度的函數的圖。所述點代表資料( $n = 2$ )的均值，而誤差棒代表 $\pm 2$ 標準差。

### 【實施方式】

#### 詳細說明

【0066】 本文提供的是種子罐培養方法，其包括如下步驟：(a)將多個重組哺乳動物細胞在容器內所包括的第一培養基中處理以提供第一細胞

培養物；(b)分批培養所述第一細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL；(c)將一體積的步驟(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應器內所包括的第二培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL的第二細胞培養物；(d)灌注培養所述第二細胞培養物至細胞密度範圍為約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL；並(e)將一體積的步驟(d)的第二細胞培養物在生產生物反應器內所包括的第三培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL的生產細胞培養物。

**【0067】** 本文描述的種子罐培養方法提供多種益處。在第一個方面，本種子罐培養方法與常規的種子罐培養方法相比在提供生產細胞培養物(例如，減少小規模擴增階段的數目)之前需要較少的培養步驟(去除1至2個不同的培養步驟)，這又提供了較少的細胞培養的人工操縱和減少的污染所述生產細胞培養物的風險。本文描述的種子罐培養方法可在12日中達到具有高的活細胞密度，例如，多至 $100 \times 10^6$ 活細胞/mL的N-1細胞培養物(用於接種所述生產細胞培養物的第二細胞培養物)而不折損所述生產細胞培養物中的培養物生長特性。使用本文描述的種子罐培養方法在N-1培養物(第二細胞培養物)中達到的高的活細胞密度允許生產生物反應器中生產細胞培養物中的更高的初始細胞密度。例如，本種子罐培養方法可用於達到約 $0.50 \times 10^6$ 活細胞/mL- $10 \times 10^6$ 活細胞/mL的初始細胞密度，這又導致生產細胞培養物達到所述穩態生產細胞密度的時間量減少(例如，減少4-6日)。生產細胞培養物達到所述穩態生產細胞密度的此時間量減少可提供50-日生產培養運作時間(run)的總體生產力(productivity)增加10%。本文提供的種子罐培養方法還可得到具有比由其他種子罐培養方法得到的生產細胞培養物更高的體積生產速率和比生產速率的生產細胞培養物。



## 種子罐培養方法

【0068】 本文提供的是種子罐培養方法，其相對於其他種子罐培養方法提供幾種優勢。這些種子罐培養方法的非限制性方面在本文中描述，並可以任何組合使用。

### 提供第一細胞培養物

【0069】 本文描述的種子罐培養方法包括(a)將多個重組哺乳動物細胞(例如，本文所述的或本領域已知的任何重組哺乳動物細胞)在容器內所包括的第一培養基中處理以提供第一細胞培養物的步驟。在一些實例中，在第一培養基中處理的多個重組哺乳動物細胞可為約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞(例如，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $112.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $135 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $157.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $180 \times 10^7$ -約 $450 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ -約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ -約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $112.5 \times 10^7$ -約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $135 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $157.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $180 \times 10^7$ 個細胞-約 $405 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $112.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $135 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $157.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$ 個細胞，約 $180 \times 10^7$ 個細胞-約 $360 \times 10^7$

個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞/mL，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $112.5 \times 10^7$ 個細胞至約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $135 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $157.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $180 \times 10^7$ 個細胞-約 $315 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $112.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $135 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $157.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $180 \times 10^7$ 個細胞-約 $270 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $112.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $135 \times 10^7$ 個細胞-約 $225 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $180 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $180 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ -約 $180 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $180 \times 10^7$ 個細胞，約 $67.5 \times 10^7$ -約 $180 \times 10^7$ 個細胞，約 $90 \times 10^7$ -約 $180 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $135 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ -約 $135 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $135 \times 10^7$ 個細胞，約 $45 \times 10^7$ 個細胞-約 $135 \times 10^7$ 個細胞，約 $4.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $90 \times 10^7$ 個細胞，約 $9.0 \times 10^7$ 個細胞-約 $90 \times 10^7$ 個細胞，約 $22.5 \times 10^7$ 個細胞-約 $90 \times 10^7$ 個細胞，或約 $45 \times 10^7$ -約 $90 \times 10^7$ 個細胞)並可取決於容器內所含的第一培養基的體積而變化。例如，在第一液體培養基中處理的多個細胞可足以在第一細胞培養物中得到約 $0.10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.80 \times 10^6$ 細胞/mL的初始細胞密





$\times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.30 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.60 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.30 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.55 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.30 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.30 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.45 \times 10^6$ 細胞/mL，或約 $0.30 \times 10^6$ -約 $0.40 \times 10^6$ 細胞/mL)。

【0070】 如本領域中可知的，步驟(a)中的容器可具有多種不同的體積。例如，包括第一培養基的步驟(a)中的容器可具有約0.50 L至約200 L的內部體積(例如，約0.50 L-約180 L，約0.50 L-約160 L，約0.50 L-約140 L，約0.50 L-約120 L，約0.50 L-約100 L，約0.50 L-約90 L，約0.50 L-約80 L，約0.50 L-約70 L，約0.50 L-約60 L，約0.50 L-約50 L，約0.50 L-約40 L，約0.50 L-約30 L，約0.50 L-約20 L，約0.50 L-約10 L，約0.50 L-約5.0 L，約1.0 L-約200 L，約1.0 L-約180 L，約1.0 L-約160 L，約1.0 L-約140 L，約1.0 L-約120 L，約1.0 L-約100 L，約1.0 L-約90 L，約1.0 L-約80 L，約1.0 L-約70 L，約1.0 L-約60 L，約1.0 L-約50 L，約1.0 L-約40 L，約1.0 L-約30 L，約1.0 L-約20 L，約1.0 L-約10 L，約1.0 L-約5.0 L，約1.5 L-約200 L，約1.5 L-約180 L，約1.5 L-約160 L，約1.5 L-約140 L，約1.5 L-約120 L，約1.5 L-約100 L，約1.5 L-約90 L，約1.5 L-約80 L，約1.5 L-約70 L，約1.5 L-約60 L，約1.5 L-約50 L，約1.5 L-約40 L，約1.5 L-約30 L，約1.5 L-約20 L，約1.5 L-約10 L，約1.5 L-約5.0 L，約2.0 L-約200 L，約2.0 L-約180 L，約2.0 L-約160 L，約2.0 L-約140 L，約2.0 L-約120 L，約2.0 L-約100 L，約2.0 L-約90 L，約2.0 L-約80 L，約2.0 L-約70 L，約2.0 L-約60 L，約2.0 L-約50 L，約2.0 L-約40 L，約2.0 L-約30 L，約2.0 L-約20 L，約2.0 L-約10 L，約2.0 L-約5.0 L，約2.5 L-約200 L，約2.5 L-約180 L，約2.5 L-約160 L，約2.5 L-約140 L，約2.5 L-約120 L，約2.5 L-約100 L，約2.5 L-約90 L，約2.5 L-約80 L，約2.5 L-約70 L，約2.5 L-約60 L，約2.5 L-約50 L，約2.5 L-約40 L，約2.5 L-約30 L，約2.5 L-約20 L，約2.5 L-約10 L，約2.5 L-約5.0 L，約5.0 L-約200 L，

約5.0 L-約180 L，約5.0 L-約160 L，約5.0 L-約140 L，約5.0 L-約120 L，約5.0 L-約100 L，約5.0 L-約90 L，約5.0 L-約80 L，約5.0 L-約70 L，約5.0 L-約60 L，約5.0 L-約50 L，約5.0 L-約40 L，約5.0 L-約30 L，約5.0 L-約20 L，或約5.0 L-約10 L)。

【0071】 如本領域中可知的，所述含有第一細胞培養物的容器可為本領域中用於培養哺乳動物細胞的目的之任何裝置(例如，燒瓶(例如，旋轉瓶/搖瓶(spin flask))、搖管或生物反應器)。所述容器可包括用於攪動的內部手段/工具(例如，攪拌槳)或所述容器可外部攪動(例如，藉由使用旋轉和/或傾斜平臺)。所述容器可由不銹鋼或塑膠(例如，塑膠無菌袋)製成。在一些具體實例中，所述容器可為可丟棄的單次使用的生物反應器(例如，Millipore™ Mobius® Cellready 3L可丟棄的生物反應器、Pierre Guerin ATM1 Nucleo™ 20 L可丟棄的生物反應器、Sartorius Cultibag STR™ 50 L可丟棄的生物反應器、Sartorius Cultibag RMT™ 20 L、Sartorius Cultibag Orbital™ 50 L、GE Wave生物反應器 2/10 System 5 L、GE Wave生物反應器 20/50 System 25 L、GE Wave生物反應器 200 System 200 L或GE Wave生物反應器 500/1000 System 500 L)。所述容器的內表面可具有至少一個塗層(例如，明膠、膠原、多聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層黏連蛋白的至少一個塗層)，和如本領域中已知的用於將O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>噴射入第一液體培養基的一個或多個埠(port)。所述容器可配備有一個或多個感測器探針。當所述容器由非剛性塑膠材料(例如，塑膠無菌袋)組成時，所述容器可連接至圍繞並支援該容器的外部支援物。

【0072】 所述第一細胞培養物可具有多種不同的體積，例如，第一細胞培養物可具有約0.30 L-約100 L的體積(例如，約0.30 L-約90 L，約0.30 L-約80 L，約0.30 L-約70 L，約0.30 L-約60 L，約0.30 L-約50 L，約0.30 L-約

40 L, 約0.30 L-約30 L, 約0.30 L-約20 L, 約0.30 L-約10 L, 約0.30 L-約5.0 L, 約0.50 L-約100 L, 約0.50 L-約90 L, 約0.50 L-約80 L, 約0.50 L-約70 L, 約0.50 L-約60 L, 約0.50 L-約50 L, 約0.50 L-約40 L, 約0.50 L-約30 L, 約0.50 L-約20 L, 約0.50 L-約10 L, 約0.50 L-約5.0 L, 約1.0 L-約100 L, 約1.0 L-約90 L, 約1.0 L-約80 L, 約1.0 L-約70 L, 約1.0 L-約60 L, 約1.0 L-約50 L, 約1.0 L-約40 L, 約1.0 L-約30 L, 約1.0 L-約20 L, 約1.0 L-約10 L, 約1.0 L-約5.0 L, 約1.5 L-約100 L, 約1.5 L-約90 L, 約1.5 L-約80 L, 約1.5 L-約70 L, 約1.5 L-約60 L, 約1.5 L-約50 L, 約1.5 L-約40 L, 約1.5 L-約30 L, 約1.5 L-約20 L, 約1.5 L-約10 L, 約1.5 L-約5.0 L, 約2.0 L-約100 L, 約2.0 L-約90 L, 約2.0 L-約80 L, 約2.0 L-約70 L, 約2.0 L-約60 L, 約2.0 L-約50 L, 約2.0 L-約40 L, 約2.0 L-約30 L, 約2.0 L-約20 L, 約2.0 L-約10 L, 約2.0 L-約5.0 L, 約2.5 L-約100 L, 約2.5 L-約90 L, 約2.5 L-約80 L, 約2.5 L-約70 L, 約2.5 L-約60 L, 約2.5 L-約50 L, 約2.5 L-約40 L, 約2.5 L-約30 L, 約2.5 L-約20 L, 約2.5 L-約10 L, 約2.5 L-約5.0 L, 約5.0 L-約100 L, 約5.0 L-約90 L, 約5.0 L-約80 L, 約5.0 L-約70 L, 約5.0 L-約60 L, 約5.0 L-約50 L, 約5.0 L-約40 L, 約5.0 L-約30 L, 約5.0 L-約20 L, 或約5.0 L-約10 L)。

**【0073】** 如本領域中可知的,存在可在容器內所含的第一培養基處理多個細胞的多種方式。例如,處理所述多個重組哺乳動物細胞可包括將凍結的細胞庫解凍(例如,本文所述或本領域已知的任何例示性凍結的細胞庫)並將一定體積的解凍的細胞庫在所述第一培養基中處理(例如,無菌移液)的步驟。凍結的細胞庫可具有例如,約 $1.0 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^7$ 細胞/mL的細胞密度範圍(例如,約 $2.0 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^7$ 細胞/mL,約 $5.0 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^7$ 細胞/mL,約 $10 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^7$ 細胞/mL,約 $15 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^7$ 細胞/mL,約 $20 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^7$ 細胞



$\times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL，約 $15 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL，約 $20 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL，約 $25 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL，或約 $30 \times 10^7$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^7$ 細胞/mL)。用於產生所述凍結的細胞庫的方法是本領域中已知的(參見，例如，2013年3月15日申請的美國臨時專利申請系列號61/793,021；2014年3月14日申請的美國專利申請系列號14/212,607；和2014年3月14日申請的國際申請號PCT/US2014/027757)。如本領域中熟知的，可例如藉由將凍結的細胞庫暴露於加熱元件(除暴露於室溫外)，例如，水浴或塊狀加熱器(例如，設定在 $30^\circ\text{C}$ 或 $37^\circ\text{C}$ )來進行凍結的細胞庫的解凍。在一些實例中，所述解凍可進行1秒-1分鐘，1秒-55秒，1秒-50秒，1秒-45秒，1秒-40秒，1秒-35秒，1秒-30秒，1秒-25秒，或1秒-20秒的時間)。凍結的細胞庫還可藉由將所述凍結的細胞庫暴露於室溫(例如，約 $25^\circ\text{C}$ )來解凍。解凍的細胞庫可含有例如至少60%的活細胞百分數(例如，至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%)。例如，解凍的細胞庫可含有60%-約98%的活細胞百分數(例如，約60%-約95%，約60%-約90%，約60%-約85%，約60%-約80%，約60%-約75%，約60%-約70%，約65%-約98%，約65%-約95%，約65%-約90%，約65%-約85%，約65%-約80%，約65%-約75%，約70%-約98%，約70%-約95%，約70%-約90%，約70%-約85%，約70%-約80%，約80%-約98%，約80%-約95%，約80%-約90%，約85%-約98%，約85%-約95%，約90%-約98%，或約90%-約95%)。

**【0074】** 在一些實例中，在第一培養基中處理多個重組哺乳動物細胞以生成所述第一細胞培養物可包括將一體積的包含所述多個重組哺乳動物細胞的第三細胞培養物在所述第一培養基中處理的步驟。例如，在第一培

養基中處理的所述第三培養物的體積可為，例如，0.10 mL-約10 L (例如，約0.10 mL-約8.0 L，約0.10 mL-約6.0 L，約0.10 mL-約4.0 L，約0.10 mL-約2.0 L，約0.10 mL-約1.0 L，約0.10 mL-約800 mL，約0.10 mL-約600 mL，約0.10 mL-約400 mL，約0.10 mL-約200 mL，約0.10 mL-約100 mL，約0.10 mL-約50 mL，約0.10 mL-約25 mL，約0.10 mL-約10 mL，約0.50 mL-約10 L，約0.50 mL-約8.0 L，約0.50 mL-約6.0 L，約0.50 mL-約4.0 L，約0.50 mL-約2.0 L，約0.50 mL-約1.0 L，約0.50 mL-約800 mL，約0.50 mL-約600 mL，約0.50 mL-約400 mL，約0.50 mL-約200 mL，約0.50 mL-約100 mL，約0.50 mL-約50 mL，約0.50 mL-約25 mL，約1.0 mL-約10 L，約1.0 mL-約8.0 L，約1.0 mL-約6.0 L，約1.0 mL-約4.0 L，約1.0 mL-約2.0 L，約1.0 mL-約1.0 L，約1.0 mL-約800 mL，約1.0 mL-約600 mL，約1.0 mL-約400 mL，約1.0 mL-約200 mL，約0.10 mL-約100 mL，約1.0 mL-約50 mL，約1.0 mL-約25 mL，約2.0 mL-約10 L，約2.0 mL-約8.0 L，約2.0 mL-約6.0 L，約2.0 mL-約4.0 L，約2.0 mL-約2.0 L，約2.0 mL-約1.0 L，約2.0 mL-約800 mL，約2.0 mL-約600 mL，約2.0 mL-約400 mL，約2.0 mL-約200 mL，約2.0 mL-約100 mL，約2.0 mL-約50 mL，約2.0 mL-約25 mL，約5.0 mL-約10 L，約5.0 mL-約8.0 L，約5.0 mL-約6.0 L，約5.0 mL-約4.0 L，約5.0 mL-約2.0 L，約5.0 mL-約1.0 L，約5.0 mL-約800 mL，約5.0 mL-約600 mL，約5.0 mL-約400 mL，約5.0 mL-約200 mL，約5.0 mL-約100 mL，約5.0 mL-約50 mL，約5.0 mL-約25.0 mL，約10.0 mL-約10 L，約10.0 mL-約8.0 L，約10.0 mL-約6.0 L，約10.0 mL-約4.0 L，約10.0 mL-約2.0 L，約10.0 mL-約1.0 L，約10.0 mL-約800 mL，約10.0 mL-約600 mL，約10.0 mL-約400 mL，約10.0 mL-約200 mL，約10.0 mL-約100 mL，約10.0 mL-約50 mL，或約10.0 mL-約25.0 mL)。在第一培養基中處理的所述第三培養物的細胞密度可為本

文所述的任何例示性細胞密度或細胞密度範圍。如本領域的技術人員可知的，足以生成具有約 $0.10 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.80 \times 10^6$ 細胞/mL (或對於上述第一細胞培養物列出的初始細胞密度的任何其他例示性範圍)的初始細胞密度的第一細胞培養物的第三培養物的體積可由第三細胞培養物的細胞密度和容器中存在的第一液體培養基的體積(在將第三細胞培養物在第一培養基中處理之前)確定。

**【0075】** 使用第三細胞培養物的一些具體實例可包括如下步驟：(1) 將多個所述重組哺乳動物細胞在容器內所包括的第四培養基中處理以提供所述第三細胞培養物，和(2)分批培養(1)的第三細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15.0 \times 10^6$ 細胞/mL (例如，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.5 \times 10^6$ 細胞



/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15 \times 10^6$ 細胞/mL，或約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL)，其中將一定體積的(2)中的第三細胞培養物在第一培養基中處理以生成第一細胞培養物。在第四培養基中處理的多個細胞可為，例如，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $20 \times 10^7$ 細胞(例如，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $15 \times 10^7$ 細胞，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $10 \times 10^7$ 細胞，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $5.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $2.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $1.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.10 \times 10^7$ 細胞-約 $0.50 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞-約 $20 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞-約 $15 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞-約 $10 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞-約 $5.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞-約 $2.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞至約 $1.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.20 \times 10^7$ 細胞-約 $0.50 \times 10^7$ 細胞，約 $0.40 \times 10^7$ 細胞-約 $20 \times 10^7$ 細胞，約 $0.40 \times 10^7$ 細胞-約 $15 \times 10^7$ 細胞，約 $0.40 \times 10^7$ 細胞至約 $10 \times 10^7$ 細胞，約 $0.40 \times 10^7$ 細胞-約 $5.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.40 \times 10^7$ 細胞-約 $2.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.40 \times 10^7$ 細胞-約 $1.0 \times 10^7$ 細胞，約 $0.60 \times 10^7$ 細胞-約 $20 \times 10^7$ 細胞，約 $0.60 \times 10^7$ 細胞-約 $15 \times 10^7$ 細胞，約 $0.60 \times 10^7$ 細胞-約 $10 \times 10^7$ 細胞，約 $0.60 \times 10^7$ 細胞-約 $5 \times 10^7$ 細胞，約 $0.60 \times 10^7$ 細胞-約 $2 \times 10^7$ 細胞，約 $0.60 \times 10^7$ 細胞-約 $1 \times 10^7$ 細胞，約 $0.80 \times 10^7$ 細胞-約 $1.0 \times 10^7$ 細胞，約 $1.0 \times 10^7$ 細胞-約 $20 \times 10^7$ 細胞，約 $1.0 \times 10^7$ 細胞-約 $15 \times 10^7$ 細胞，約 $1.0 \times 10^7$ 細胞-約 $10 \times 10^7$ 細胞，約 $1.0 \times 10^7$ 細胞-約 $5.0 \times 10^7$ 細胞，約 $1.0 \times 10^7$ 細胞-約 $2.0 \times 10^7$ 細胞，約 $5.0 \times 10^7$ 細胞-約 $20 \times 10^7$ 細胞，約 $5.0 \times 10^7$ 細胞-約 $15 \times 10^7$ 細胞，或約 $5.0 \times 10^7$ 細胞-約 $10 \times 10^7$ 細胞)並可取決於所述容器中含有的第四培養基的體積而變化。例如，在第三液體培養基中處理的多個細胞可足以在第三細胞培養物中得到約 $0.10 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.80 \times 10^6$ 細胞/mL的初始細胞密度(例如，上述對於第一細胞培養物列出的初始細胞密度的任何例

示性初始細胞密度或初始細胞密度範圍)。

**【0076】** 在一些具體實例中，在第四培養基中處理多個重組哺乳動物細胞以生成第三細胞培養物的步驟可包括將凍結的細胞庫解凍和將一定體積的解凍的細胞庫在所述第四培養基中處理的步驟。在所述具體實例中，所述凍結的細胞庫可具有對於本文所述凍結的細胞庫的任何細胞密度或細胞密度範圍。所述凍結的細胞庫可使用本文所述或本領域已知的任何方法來解凍。所得的解凍的細胞庫可具有對於本文所述的解凍的細胞庫的任何活細胞百分比或任何活細胞百分比範圍。

**【0077】** 含有第三細胞培養物的容器的內部體積可為，例如，約0.20 L-約30 L (例如，約0.20 L-約20 L，約0.20 L-約10 L，約0.20 L-約5.0 L，約0.20 L-約2.5 L，約0.50 L-約30 L，約0.50 L-約20 L，約0.50 L-約10 L，約0.50 L-約5.0 L，約0.50 L-約2.5 L，約1.0 L-約30 L，約1.0 L-約20 L，約1.0 L-約10 L，約1.0 L-約5.0 L，約1.0 L-約2.5 L，約2.0 L-約30 L，約2.0 L-約20 L，約2.0 L-約10 L，約2.0 L-約5.0 L，約5.0 L-約30 L，約5.0 L-約20 L，約5.0 L-約10 L，約10 L-約30 L，或約10 L-約20 L)。第四培養基可具有例如，約0.10 L至約20 L的體積(例如，約0.10 L-約20 L，約0.10 L-約15 L，約0.10 L-約10 L，約0.10 L-約5.0 L，約0.20 L-約20 L，約0.20 L-約15 L，約0.20 L-約10 L，約0.20 L-約5.0 L，約0.50 L-約20 L，約0.50 L-約15 L，約0.50 L-約10 L，約0.50 L-約5.0 L，約1.0 L-約20 L，約1.0 L-約15 L，約1.0 L-約10 L，約1.0 L-約5.0 L，約1.5 L-約20 L，約1.5 L-約15 L，約1.5 L-約10 L，約1.5 L-約5.0 L，約2.0 L-約25 L，約2.0 L-約20 L，約2.0 L-約15 L，約2.0 L-約10 L，約2.0 L-約5.0 L，約5.0 L-約20 L，約5.0 L-約15 L，約5.0 L-約10 L，約10 L-約20 L，或約10 L-約15 L)。

**【0078】** 如本領域中可知的，含有所述第三細胞培養物的容器可為本

領域用於培養哺乳動物細胞的目的的任何裝置(例如，燒瓶(例如，旋轉瓶/搖瓶)、搖管或生物反應器)。所述容器可包括用於攪動的內部手段/工具(例如，攪拌槳)或所述容器可外部攪動(例如，藉由使用旋轉和/或傾斜平臺)。所述容器可由不銹鋼或塑膠(例如，塑膠無菌袋)製成。在一些具體實例中，所述容器可為可丟棄的單次使用的生物反應器(例如，任何本文所述的可丟棄的單次使用的生物反應器)。灌注生物反應器的內表面可具有至少一個塗層(例如，明膠、膠原、多聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層黏連蛋白的至少一個塗層)，和如本領域中已知的用於將O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>噴射入第三液體培養基的一個或多個埠(port)。所述容器可配備有一個或多個感測器探針。當所述容器由非剛性塑膠材料(例如，塑膠無菌袋)組成時，所述容器可由外部結構圍繞和支援。

**【0079】** 本文中所述的每個處理步驟可使用無菌移液器(例如，組織培養罩(tissue culture hood)中的無菌移液)進行。

#### *所述第一細胞培養物的分批培養*

**【0080】** 在步驟(a)中提供所述第一細胞培養物之後，本文所述的種子罐培養方法包括(b)分批培養所述第一細胞培養物至細胞密度範圍為約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約20.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL (例如，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約17.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約15.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約12.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約10.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約7.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約5.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約1.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約2.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約20.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約17.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約15.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約12.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約10.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>細胞/mL-約7.5 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，約2.0 x 10<sup>6</sup>

細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $20.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $17.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $20.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $17.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL， $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $20.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $17.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $20.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $17.5 \times 10^6$ 細胞/mL，或約 $12.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $15.0 \times 10^6$ 細胞/mL)的步驟。用於確定細胞密度的多種不同的方法是本領域中已知的(例如，使用光顯微鏡和血細胞計數器或使用自動細胞計數器，如，例如，Countess®自動細胞計數器(Life Technologies)、Cellometer®(Nexcelom Bioscience)、Luna™自動細胞計數器(Logos Biosystems)或Vi-Cell®細胞活力分析儀)。

**【0081】** 所述第一細胞培養物的分批培養不包括將大量或顯著量的液體培養基添加至所述第一細胞培養物，且不包括在培養過程中將大量或顯著量的所述第一細胞培養基去除。所述分批培養可使用本文所述的任何示例性溫度和/或CO<sub>2</sub>氣體暴露來進行。所述分批培養可使用本領域已知的任何O<sub>2</sub>和/或N<sub>2</sub>氣體暴露來進行。所述分批培養還可包括本文所述的任何類型的攪動。如本領域的技術人員可知的，分批培養所述第一細胞培養物以達到約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $20.0 \times 10^6$ 細胞/mL (或本文所述的任何其他細胞密度或細胞密度範圍)的目標細胞密度的時間長度會取決於所述重組哺乳動物細胞的生長速率和第一細胞培養物的初始細胞密度。例如，可將所述

第一細胞培養物培養約1日-約9日(例如，約1日-約8日，約1日-約7日，約1日-約6日，約1日-約5日，約1日-約4日，約1日-約3日，約2日-約9日，約2日-約8日，約2日-約7日，約2日-約6日，約2日-約5日，約2日-約4日，約3日-約9日，約3日-約8日，約3日-約7日，約3日-約6日，約3日-約5日，約4日-約9日，約4日-約8日，約4日-約7日，約4日-約6日，約5日-約9日，約5日-約8日，約5日-約7日，約6日-約9日，約6日-約8日，或約7日-約9日)的時間。可用於本方法的分批培養的其他例示性參數在本文中描述。

### **提供第二細胞培養物**

**【0082】** 本文所述的種子罐培養方法進一步包括(c)將一定體積的步驟(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應器內所包括的第二培養基中處理以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.10 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.8 \times 10^6$ 細胞/mL(例如，對於上述第一細胞培養物所述的任何初始細胞密度或初始細胞密度範圍)的第二細胞培養物的步驟。如本領域的技術人員可知的，在第二培養基中處理以達到對於所述第二細胞培養物約 $0.10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.80 \times 10^6$ 細胞/mL的初始細胞密度範圍的第一細胞培養物的適當體積可由所述第一細胞培養物的細胞密度和第二培養基的體積確定。在第二培養基中處理的第一細胞培養物的體積可為，例如，0.30 L-約100 L(例如，約0.30 L-約90 L，約0.30 L-約80 L，約0.30 L-約70 L，約0.30 L-約60 L，約0.30 L-約50 L，約0.30 L-約40 L，約0.30 L-約30 L，約0.30 L-約20 L，約0.30 L-約10 L，約1.0 L-約100 L，約1.0 L-約90 L，約1.0 L-約80 L，約1.0 L-約70 L，約1.0 L-約60 L，約1.0 L-約50 L，約1.0 L-約40 L，約1.0 L-約30 L，約1.0 L-約20 L，約1.0 L-約10 L，約2.5 L-約100 L，約2.5 L-約90 L，約2.5 L-約80 L，約2.5 L-約70 L，約2.5 L-約60 L，約2.5 L-約50 L，約2.5 L-約40 L，約2.5 L-約30 L，約2.5 L-約20 L，約2.5 L-約10 L，約5.0 L-約100 L，約5.0 L-約90 L，約5.0 L-約80

L, 約5.0 L-約70 L, 約5.0 L-約60 L, 約5.0 L-約50 L, 約5.0 L-約40 L, 約5.0 L-約30 L, 約5.0 L-約20 L, 約5.0 L-約10 L, 約15 L-約100 L, 約15 L-約90 L, 約15 L-約80 L, 約15 L-約70 L, 約15 L-約70 L, 約15 L-約60 L, 約15 L-約50 L, 約15 L-約40 L, 約15 L-約30 L, 約15 L-約20 L, 約20 L-約100 L, 約20 L-約90 L, 約20 L-約80 L, 約20 L-約70 L, 約20 L-約60 L, 約20 L-約50 L, 約20 L-約40 L, 約30 L-約100 L, 約30 L-約90 L, 約30 L-約80 L, 約30 L-約70 L, 約30 L-約60 L, 約30 L-約50 L, 約40 L-約100 L, 約40 L-約90 L, 約40 L-約80 L, 約40 L-約70 L, 約40 L-約60 L, 約50 L-約100 L, 約50 L-約90 L, 約50 L-約80 L, 約50 L-約70 L, 約60 L-約100 L, 約60 L-約90 L, 約60 L-約80 L, 約70 L-約100 L, 約70 L-約90 L, 或約80 L-約100 L)。

【0083】 第二細胞培養物的體積可為, 例如, 2.0 L- 800 L (例如, 約2.0 L-約750 L, 約2.0 L-約700 L, 約2.0 L-約650 L, 約2.0 L-約600 L, 約2.0 L-約550 L, 約2.0 L-約550 L, 約2.0 L-約500 L, 約2.0 L-約450 L, 約2.0 L-約400 L, 約2.0 L-約350 L, 約2.0 L-約300 L, 約2.0 L-約250 L, 約2.0 L-約200 L, 約2.0 L-約150 L, 約2.0 L-約100 L, 約2.0 L-約50 L, 約2.0 L-約25 L, 約5.0 L-約800 L, 約5.0 L-約750 L, 約5.0 L-約700 L, 約5.0 L-約650 L, 約5.0 L-約600 L, 約5.0 L-約550 L, 約5.0 L-約500 L, 約5.0 L-約450 L, 約5.0 L-約400 L, 約5.0 L-約350 L, 約5.0 L-約300 L, 約5.0 L-約250 L, 約5.0 L-約200 L, 約5.0 L-約150 L, 約5.0 L-約100 L, 約5.0 L-約50 L, 約5.0 L-約25 L, 約10 L-約800 L, 約10 L-約750 L, 約10 L-約700 L, 約10 L-約650 L, 約10 L-約600 L, 約10 L-約550 L, 約10 L-約500 L, 約10 L-約450 L, 約10 L-約400 L, 約10 L-約350 L, 約10 L-約300 L, 約10 L-約300 L, 約10 L-約250 L, 約10 L-約200 L, 約10 L-約150 L, 約10 L-約100 L, 約10 L-約50 L, 約10 L-約25 L, 約15 L-約800 L, 約15 L-約750 L, 約15 L-約700 L, 約15 L-

約600 L，約15 L-約550 L，約15 L-約500 L，約15 L-約450 L，約15 L-約400  
 L，約15 L-約350 L，約15 L-約300 L，約15 L-約250 L，約15 L-約200 L，約  
 15 L-約150 L，約15 L-約100 L，約15 L-約50 L，約15 L-約25 L，約20 L-約  
 800 L，約20 L-約750 L，約20 L-約700 L，約20 L-約650 L，約20 L-約600 L，  
 約20 L-約550 L，約20 L-約500 L，約20 L-約450 L，約20 L-約400 L，約20 L-  
 約350 L，約20 L-約300 L，約20 L-約250 L，約20 L-約200 L，約20 L-約150  
 L，約20 L-約100 L，約20 L-約50 L，約25 L-約800 L，約25 L-約750 L，約  
 25 L-約700 L，約25 L-約650 L，約25 L-約600 L，約25 L-約550 L，約25 L-  
 約500 L，約25 L-約450 L，約25 L-約400 L，約25 L-約350 L，約25 L-約300  
 L，約25 L-約250 L，約25 L-約200 L，約25 L-約150 L，約25 L-約100 L，約  
 25 L-約50 L，約50 L-約800 L，約50 L-約750 L，約50 L-約700 L，約50 L-  
 約650 L，約50 L-約600 L，約50 L-約550 L，約50 L-約500 L，約50 L-約450  
 L，約50 L-約400 L，約50 L-約350 L，約50 L-約300 L，約50 L-約250 L，約  
 50 L-約200 L，約50 L-約150 L，約50 L-約100 L，約75 L-約800 L，約75 L-  
 約750 L，約75 L-約700 L，約75 L-約650 L，約75 L-約600 L，約75 L-約550  
 L，約75 L-約500 L，約75 L-約450 L，約75 L-約400 L，約75 L-約350 L，約  
 75 L-約300 L，約75 L-約250 L，約75 L-約200 L，約75 L-約150 L，約75 L-  
 約100 L，約100 L-約800 L，約100 L-約750 L，約100 L-約700 L，約100 L-  
 約650 L，約100 L-約600 L，約100 L-約550 L，約100 L-約500 L，約100 L-  
 約450 L，約100 L-約400 L，約100 L-約350 L，約100 L-約300 L，約100 L-  
 約250 L，約100 L-約200 L，約100 L-約150 L，約150 L-約800 L，約150 L-  
 約750 L，約150 L-約700 L，約150 L-約650 L，約150 L-約600 L，約150 L-  
 約550 L，約150 L-約500 L，約150 L-約450 L，約150 L-約400 L，約150 L-  
 約350 L，約150 L-約300 L，約150 L-約250 L，約150 L-約200 L，約200 L-

約800 L，約200 L-約750 L，約200 L-約700 L，約200 L-約650 L，約200 L-約600 L，約200 L-約550 L，約200 L-約500 L，約200 L-約450 L，約200 L-約400 L，約200 L-約350 L，約200 L-約300 L，約200 L-約250 L，約250 L-約800 L，約250 L-約750 L，約250 L-約700 L，約250 L-約650 L，約250 L-約600 L，約250 L-約550 L，約250 L-約500 L，約250 L-約450 L，約250 L-約400 L，約250 L-約350 L，約250 L-約300 L，約300 L-約800 L，約300 L-約750 L，約300 L-約700 L，約300 L-約650 L，約300 L-約600 L，約300 L-約550 L，約300 L-約500 L，約300 L-約450 L，約300 L-約400 L，約300 L-約350 L，約350 L-約800 L，約350 L-約750 L，約350 L-約700 L，約350 L-約650 L，約350 L-約600 L，約350 L-約550 L，約350 L-約500 L，約350 L-約450 L，約350 L-約400 L，約400 L-約800 L，約400 L-約750 L，約400 L-約700 L，約400 L-約650 L，約400 L-約600 L，約400 L-約550 L，約400 L-約500 L，約400 L-約450 L，約450 L-約800 L，約450 L-約750 L，約450 L-約700 L，約450 L-約650 L，約450 L-約600 L，約450 L-約550 L，約450 L-約500 L，約500 L-約800 L，約500 L-約750 L，約500 L-約700 L，約500 L-約650 L，約500 L-約600 L，約500 L-約650 L，約550 L-約800 L，約550 L-約750 L，約550 L-約700 L，約550 L-約650 L，約550 L-約600 L，約600 L-約800 L，約600 L-約750 L，約600 L-約700 L，約600 L-約650 L，約650 L-約800 L，約650 L-約750 L，約650 L-約700 L，約700 L-約800 L，約700 L-約750 L，或約750 L-約800 L)。

**【0084】** 灌注生物反應器可為本文所述或本領域已知的任何例示性灌注生物反應器。例如，灌注生物反應器可由不銹鋼或塑膠製成(例如，塑膠無菌袋)。灌注生物反應器的內表面可具有至少一個塗層(例如，明膠、膠原、多聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層黏連蛋白的至少一個塗層)，和如本領域



中已知的用於將O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>噴射入液體培養基的一個或多個埠(port)，和用於攪動液體培養基的攪拌機構。所述灌注生物反應器還可配備有能夠將一體積的第二液體培養基從生物反應器去除的機械裝置，和任選的在將第二液體培養基轉移出生物反應器的過程中將細胞從第二液體培養基去除的機械裝置內的篩檢程式(例如，交替的切向流(ATF)、切向流過濾(TFF)系統，或美國臨時專利申請案號61/878,502中所述的過濾系統)。所述生物反應器還可配備有一個或多個泵，和容納(hold)去除的第二培養基和待灌注入所述灌注生物反應器的新培養基的一個或多個儲庫(reservoir)。

【0085】 灌注生物反應器可具有其為例如約5.0 L-約2,000 L的內部體積(例如，約5.0 L-約1,900 L，約5.0 L-約1,800 L，約5.0 L-約1,700 L，約5.0 L-約1,600 L，約5.0 L-約1,500 L，約5.0 L-約1,400 L，約5.0 L-約1,300 L，約5.0 L-約1,200 L，約5.0 L-約1,100 L，約5.0 L-約1,000 L，約5.0 L-約900 L，約5.0 L-約800 L，約5.0 L-約700 L，約5.0 L-約600 L，約5.0 L-約500 L，約5.0 L-約400 L，約5.0 L-約300 L，約5.0 L-約200 L，約5.0 L-約100 L，約5.0 L-約50 L，約100 L-約2,000 L，約100 L-約1,900 L，約100 L-約1,800 L，約100 L-約1,700 L，約100 L-約1,600 L，約100 L-約1,500 L，約100 L-約1,400 L，約100 L-約1,300 L，約100 L-約1,200 L，約100 L-約1,100 L，約100 L-約1,000 L，約100 L-約900 L，約100 L-約800 L，約100 L-約700 L，約100 L-約600 L，約100 L-約500 L，約100 L-約400 L，約100 L-約300 L，約100 L-約200 L，約150 L-約2,000 L，約150 L-約1,900 L，約150 L-約1,800 L，約150 L-約1,700 L，約150 L-約1,600 L，約150 L-約1,500 L，約150 L-約1,400 L，約150 L-約1,300 L，約150 L-約1,300 L，約150 L-約1,200 L，約150 L-約1,100 L，約150 L-約1,000 L，約150 L-約900 L，約150 L-約800 L，約150 L-約700 L，約150 L-約600 L，約150 L-約500 L，約150 L-約400 L，約150 L-約300 L，

約150 L-約200 L，約200 L-約2,000 L，約200 L-約1,900 L，約200 L-約1,800  
 L，約200 L-約1,700 L，約200 L-約1,600 L，約200 L-約1,500 L，約200 L-  
 約1,400 L，約200 L-約1,300 L，約200 L-約1,200 L，約200 L-約1,100 L，約  
 200 L-約1,000 L，約200 L-約900 L，約200 L-約800 L，約200 L-約700 L，  
 約200 L-約600 L，約200 L-約500 L，約200 L-約400 L，約200 L-約300 L，  
 約300 L-約2,000 L，約300 L-約1,900 L，約300 L-約1,800 L，約300 L-約1,700  
 L，約300 L-約1,600 L，約300 L-約1,500 L，約300 L-約1,400 L，約300 L-  
 約1,300 L，約300 L-約1,200 L，約300 L-約1,100 L，約300 L-約1,000 L，約  
 300 L-約900 L，約300 L-約800 L，約300 L-約700 L，約300 L-約600 L，約  
 300 L-約500 L，約300 L-約400 L，約400 L-約2,000 L，約400 L-約1,900 L，  
 約400 L-約1,800 L，約400 L-約1,800 L，約400 L-約1,700 L，約400 L-約1,600  
 L，約400 L-約1,500 L，約400 L-約1,400 L，約400 L-約1,300 L，約400 L-  
 約1,200 L，約400 L-約1,100 L，約400 L-約1,000 L，約400 L-約900 L，約400  
 L-約800 L，約400 L-約700 L，約400 L-約600 L，約400 L-約500 L，約500 L-  
 約2,000 L，約500 L-約1,900 L，約500 L-約1,800 L，約500 L-約1,700 L，約  
 500 L-約1,600 L，約500 L-約1,500 L，約500 L-約1,400 L，約500 L-約1,300  
 L，約500 L-約1,200 L，約500 L-約1,100 L，約500 L-約1,000 L，約500 L-  
 約900 L，約500 L-約800 L，約500 L-約700 L，約500 L-約600 L，約600 L-  
 約2,000 L，約600 L-約1,900 L，約600 L-約1,800 L，約600 L-約1,700 L，約  
 600 L-約1,600 L，約600 L-約1,500 L，約600 L-約1,400 L，約600 L-約1,300  
 L，約600 L-約1,200 L，約600 L-約1,100 L，約600 L-約1,000 L，約600 L-  
 約900 L，約600 L-約800 L，約600 L-約700 L，約700 L-約2,000 L，約700 L-  
 約1,900 L，約700 L-約1,800 L，約700 L-約1,700 L，約700 L-約1,600 L，約  
 700 L-約1,500 L，約700 L-約1,400 L，約700 L-約1,300 L，約700 L-約1,200

L，約700 L-約1,100 L，約700 L-約1,000 L，約700 L-約900 L，約700 L-約800 L，800 L-約2,000 L，約800 L-約1,900 L，約800 L-約1,800 L，約800 L-約1,700 L，約800 L-約1,600 L，約800 L-約1,500 L，約800 L-約1,400 L，約800 L-約1,300 L，約800 L-約1,200 L，約800 L-約1,100 L，約800 L-約1,000 L，約800 L-約900 L，約1,000 L至約2,000 L，約1,000 L至約1,750 L，約1,000 L至約1,500 L，約1,000 L至約1,250 L，約1,250 L至約2,000 L，約1,250 L至約1,750 L，約1,250 L至約1,500 L，約1,500 L至約2,000 L，約1,500 L至約1,750 L，或約1,750 L至約2,000 L)。

### 第二細胞培養物的灌注培養

【0086】 本文所述的種子罐培養方法進一步包括(d)灌注培養所述第二細胞培養物至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL的細胞密度(例如，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $130 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $80 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $70 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $60 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $40 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $30 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $20 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $130 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $80 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $70 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $60 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $50 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $40 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $30 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $20 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL)。





胞/mL，約 $80 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $130 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $90 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $130 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $100 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $110 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $130 \times 10^6$ 細胞/mL，或約 $130 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL)的步驟。

**【0087】** 灌注培養是本領域已知的且在此步驟包括從灌注生物反應器去除(例如，連續地或週期地去除)一定體積的液體培養基(例如，所述灌注生物反應器中的一定體積的第二液體培養基，其基本上不含細胞)，和在大約相同的時間或基本上相同的時間將一定體積的替代培養基添加至所述灌注生物反應器。去除和添加可同時或連續或兩者組合進行。此外，去除和添加可(例如，以去除和替代灌注生物反應器體積或培養開始時液體培養基的初始體積(例如，第二液體培養基體積的體積)的0.1%至800% (例如，1%-700%，1%-600%，1%-500%，1%-400%，1%-350%，1%-300%，1%-250%，1%-100%，100%-200%，5%-150%，10%-50%，15%-40%，8%-80%，和4%-30%)的體積的速率在任何給出的時間(例如，在24-小時時間，在約1小時至約24小時的增加了的時間，在多於24小時的增加了的時間))連續進行，或者週期地進行(例如，每三天一次(once every third day)、每隔一天一次(once every other day)、一天一次、一天兩次、一天三次、一天四次或一天五次)，或其任何組合。當週期性進行時，去除或替代的體積(例如，約24-小時時間內，約1

小時至約24小時的增加了的時間內，或多於24小時的增加了的時間內)可為灌注生物反應器體積或培養開始時生物反應器中的液體培養基的體積(例如，第二液體培養基體積)的0.1%至800% (例如，1%-700%，1%-600%，1%-500%，1%-400%，1%-300%，1%-200%，1%-100%，100%-200%，5%-150%，10%-50%，15%-40%，8%-80%，和4%-30%)。在一些情況中，去除的液體培養基的體積和添加的替代液體培養基(例如，新鮮液體培養基)的體積可在培養期的整個或部分中在每個24-小時時間(或，可替換地，在約1小時至約24小時的增加了的時間或多於24小時的增加了的時間)保持大約相同。如本領域中已知的，去除液體培養基的體積的速率(體積/時間單位)和添加替代液體培養基(例如，新鮮的第二液體培養基)的速率(體積/時間單位)可變化。去除所述體積的液體培養基的速率(體積/時間單位)和添加所述體積的替代液體培養基(例如，新鮮的液體培養基)的速率(體積/時間單位)可為大約相同或可為不同的。

**【0088】** 可替換地，去除的和添加的體積可在培養期過程中在每24-小時時間(或可替換地，1小時至約24小時的增加了的時間或多於24小時的增加了的時間)變化(例如，逐漸增加)。例如，去除的液體培養基的體積和添加的替代液體培養基(例如，添加的新鮮的液體培養基)的體積可在培養期中在每24-小時時間(或可替換地，約1小時至約24小時以上的增加了的時間或多於24小時的增加了的時間)內增加(例如，逐漸或通過交錯增量(staggered increments))在培養期中體積從培養起始時存在的生物反應器體積或液體培養基的體積(例如，第二培養基體積)的0.5%至約20%增加至培養起始時存在的生物反應器體積或液體培養基的體積(例如，第二培養基體積)的約25%至約300%。

**【0089】** 有技術的實施者可知去除的液體培養基和添加的替代液體

培養基(例如，添加的新鮮液體培養基)可為相同類型的培養基(例如，無血清的或無血清的、無蛋白的化學限定的培養基)。在另外的情況中，去除的液體培養基和添加的替代液體培養基(例如，添加的新鮮液體培養基)可為不同的。

**【0090】** 所述體積的液體培養基可例如，使用機械系統和/或藉由將所述體積滲流(seep)或重力流動藉由具有可排除所述體積中存在的哺乳動物細胞的截留分子量的無菌膜來去除。

**【0091】** 可將所述體積的替代液體培養基(例如，新鮮的第二液體培養基)以自動的方式(例如，藉由灌注泵)添加至生物反應器。在一些情況中，去除所述體積的液體培養基(例如，基本上不含哺乳動物細胞的一定體積的第二液體培養基)和添加所述體積的替代液體培養基(例如，新鮮液體培養基)不發生在用哺乳動物細胞接種所述灌注生物反應器的至少1小時內(例如，2小時內、3小時內、4小時內、5小時內、6小時內、7小時內、8小時內、9小時內、10小時內、12小時內、14小時內、16小時內、18小時內、24小時內、36小時內、48小時內、72小時內、96小時內，或96小時之後)。

**【0092】** 如本領域的技術人員可知的，灌注培養所述第二細胞培養物以實現約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $140 \times 10^6$ 細胞/mL (或本文所述的任何其他細胞密度或細胞密度範圍)的目標細胞密度的時間長度會取決於重組哺乳動物細胞的生長速率和第二細胞培養物的初始細胞密度。例如，可將第二培養物灌注培養約1日-約9日(例如，上述對於分批培養列出的任何例示性時間範圍)的時間。可用於本方法的灌注培養的其他例示性參數在本文中描述。

### **提供生產細胞培養物**

**【0093】** 本申請所述的種子罐培養方法進一步包括(e)將一體積的步驟(d)的所述第二細胞培養物在生產生物反應器內所包括的第三培養基中處



理，以提供具有約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL (例如，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL， $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL， $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.50 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $0.75 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times$

$10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $3.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $4.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $6.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $7.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL，約 $8.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL，或約 $9.0 \times 10^6$ 細胞/mL-約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL)的初始細胞密度範圍的生產細胞培養物的步驟。在一些具體實例中，生產細胞培養物的初始細

胞密度為穩態生產細胞密度的至少約8% (例如，至少約10%、至少約12%、至少約14%、至少約16%、至少約18%、至少約20%、至少約22%、至少約24%、至少約26%、至少約28%、至少約30%、至少約32%、至少約34%、至少約36%、至少約38%、至少約40%或至少約50%)。例如，生產細胞培養物的初始細胞密度可為穩態生產細胞密度的約4.0%-約30% (例如，約4.0%-約28%，約4.0%-約26%，約4.0%-約24%，約4.0%-約22%，約4.0%-約20%，約4.0%-約18%，約4.0%-約16%，約4.0%-約14%，約4.0%-約12%，約4.0%-約10%，約4.0%-約8.0%，約4.0%-約6.0%，約5.0%-約30%，約5.0%-約28%，約5.0%-約26%，約5.0%-約24%，約5.0%-約22%，約5.0%-約20%，約5.0%-約18%，約5.0%-約16%，約5.0%-約14%，約5.0%-約12%，約5.0%-約10%，約5.0%-約8.0%，約10%-約30%，約10%-約28%，約10%-約26%，約10%-約24%，約10%-約22%，約10%-約20%，約10%-約18%，約10%-約16%，約10%-約14%，約10%-約12%，約15%-約30%，約15%-約28%，約15%-約26%，約15%-約24%，約15%-約22%，約15%-約20%，約15%-約18%，約20%-約30%，約20%-約28%，約20%-約26%，約20%-約24%，約20%-約22%，約25%-約30%，或約25%-約28%)。如本領域的技術人員可知的，在第三培養基中處理以達到對於生產細胞培養物約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $10 \times 10^6$ 細胞/mL的初始細胞密度範圍的第二細胞培養物的適當體積可由所述第二細胞培養物的細胞密度和生產生物反應器中第三培養基的體積來確定。例如，在第三細胞培養基中處理的第二細胞培養物的體積可為，例如，2.0 L-800 L (例如，本申請所述的第二細胞培養物的體積的任何例示性範圍)。

**【0094】** 第三細胞培養物具有，例如，約50 L至約20,000 L (例如，約50 L-約17,500 L，約50 L-約15,000 L，約50 L-約12,500 L，約50 L-約10,000 L，約50 L-約7,500 L，約50 L-約5,000 L，約50 L-約2,500 L，約50 L-約1,000

L, 約50 L-約750 L, 約50 L-約500 L, 約50 L-約200 L, 約50 L-約100 L, 約100 L-約20,000 L, 約100 L-約17,500 L, 約100 L-約15,000 L, 約100 L-約12,500 L, 約100 L-約10,000 L, 約100 L-約7,500 L, 約100 L-約5,000 L, 約100 L-約2,500 L, 約100 L-約1,000 L, 約100 L-約750 L, 約100 L-約500 L, 約100 L-約250 L, 約200 L-約20,000 L, 約200 L-約17,500 L, 約200 L-約15,000 L, 約200 L-約12,500 L, 約200 L-約10,000 L, 約200 L-約7,500 L, 約200 L-約5,000 L, 約200 L-約2,500 L, 約200 L-約1,000 L, 約200 L-約750 L, 約200 L-約500 L, 約200 L-約250 L, 約500 L-約20,000 L, 約500 L-約17,500 L, 約500 L-約15,000 L, 約500 L-約12,500 L, 約500 L-約10,000 L, 約500 L-約7,500 L, 約500 L-約5,000 L, 約500 L-約2,500 L, 約500 L-約1,000 L, 約500 L-約750 L, 約750 L-約20,000 L, 約750 L-約17,500 L, 約750 L-約15,000 L, 約750 L-約12,500 L, 約750 L-約10,000 L, 約750 L-約7,500 L, 約750 L-約5,000 L, 約750 L-約2,500 L, 約750 L-約1,000 L, 約1,000 L-約20,000 L, 約1,000 L-約17,500 L, 約1,000 L-約15,000 L, 約1,000 L-約12,500 L, 約1,000 L-約10,000 L, 約1,000 L-約7,500 L, 約1,000 L-約5,000 L, 約1,000 L-約2,500 L, 約2,500 L-約20,000 L, 約2,500 L-約17,500 L, 約2,500 L-約15,000 L, 約2,500 L-約12,500 L, 約2,500 L-約10,000 L, 約2,500 L-約7,500 L, 約2,500 L-約5,000 L, 約5,000 L-約20,000 L, 約5,000 L-約17,500 L, 約5,000 L-約15,000 L, 約5,000 L-約12,500 L, 約5,000 L-約10,000 L, 約5,000 L-約7,500 L, 約7,500 L-約20,000 L, 約7,500 L-約17,500 L, 約7,500 L-約15,000 L, 約7,500 L-約12,500 L, 約7,500 L-約10,000 L, 約10,000 L-約20,000 L, 約10,000 L-約17,500 L, 約10,000 L-約15,000 L, 約10,000 L-約12,500 L, 約12,500 L-約20,000 L, 約12,500 L-約17,500 L, 約12,500 L-約15,000 L, 約15,000 L-約20,000 L, 約15,000 L-約17,500 L, 或約17,500 L-約20,000 L)的

體積。

【0095】 用於這些方法的生產生物反應器可具有，例如，100 L-約25,000 L (例如，約100 L-約22,500 L，約100 L-約20,000 L，約100 L-約17,500 L，約100 L-約15,000 L，約100 L-約12,500 L，約100 L-約10,000 L，約100 L-約7,500 L，約100 L-約5,000 L，約100 L-約2,500 L，約100 L-約1,000 L，約100 L-約500 L，約100 L-約250 L，約200 L-約25,000 L，約200 L-約22,500 L，約200 L-約20,000 L，約200 L-約17,500 L，約200 L-約15,000 L，約200 L-約12,500 L，約200 L-約10,000 L，約200 L-約7,500 L，約200 L-約5,000 L，約200 L-約2,500 L，約200 L-約1,000 L，約200 L-約750 L，約200 L-約500 L，約200 L-約250 L，約約500 L-約25,000 L，約500 L-約22,500 L，約500 L-約20,000 L，約500 L-約17,500 L，約500 L-約15,000 L，約500 L-約12,500 L，約500 L-約10,000 L，約500 L-約7,500 L，約500 L-約5,000 L，約500 L-約2,500 L，約500 L-約1,000 L，約500 L-約750 L，約1,000 L-約25,000 L，約1,000 L-約22,500 L，約1,000 L-約20,000 L，約1,000 L-約17,500 L，約1,000 L-約15,000 L，約1,000 L-約12,500 L，約1,000 L-約10,000 L，約1,000 L-約7,500 L，約1,000 L-約5,000 L，約1,000 L-約2,500 L，約5,000 L-約25,000 L，約5,000 L-約22,500 L，約5,000 L-約20,000 L，約5,000 L-約17,500 L，約5,000 L-約15,000 L，約5,000 L-約12,500 L，約5,000 L-約10,000 L，約5,000 L-約7,500 L，約7,500 L-約25,000 L，約7,500 L-約22,500 L，約7,500 L-約20,000 L，約7,500 L-約17,500 L，約7,500 L-約15,000 L，約7,500 L-約12,500 L，約7,500 L-約10,000 L，約10,000 L-約25,000 L，約10,000 L-約22,500 L，約10,000 L-約20,000 L，約10,000 L-約17,500 L，約10,000 L-約15,000 L，約10,000 L-約12,500 L，約12,500 L-約25,000 L，約12,500 L-約22,500 L，約12,500 L-約20,000 L，約12,500 L-約17,500 L，約12,500 L-約15,000 L，約15,000 L-

約25,000 L，約15,000 L-約22,500 L，約15,000 L-約20,000 L，約15,000 L-約17,500 L，約17,500 L-約25,000 L，約17,500 L-約22,500 L，約17,500 L-約20,000 L，約20,000 L-約25,000 L，約20,000 L-約22,500 L，或約22,500 L-約25,000 L)的内部體積。

**【0096】** 生產生物反應器可為本領域中已知的任何合適的生物反應器(例如，大規模灌注生物反應器、分批生物反應器或補料-分批生物反應器)。例如，合適的生產生物反應器可從Xcellerex、Thermo Fisher和GE Healthcare得到。例如，大規模生產生物反應器(例如，灌注、分批或補料-分批生物反應器)由Holloway American (Springfield, MO)製造並在Cotter Brothers Corporation (Danvers, MA)組裝於生物反應器滑座(skid)上。

### 哺乳動物細胞

**【0097】** 重組哺乳動物細胞可為人、小鼠、倉鼠或猴細胞。例如，重組哺乳動物細胞可為細胞系，例如，中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如，CHO DG44細胞、CHO-K1s細胞、C02.31選殖細胞、A14.13選殖細胞、C02.57選殖細胞和F05.43選殖細胞)、Sp2.0、骨髓瘤細胞(例如，NS/0)、B-細胞、融合瘤細胞、T-細胞、人胚腎(HEK)細胞(例如，HEK 293E和HEK 293F)、非洲綠猴腎上皮細胞(Vero)細胞或Madin-Darby Canine (Cocker Spaniel)腎上皮細胞(MDCK)細胞。

**【0098】** 可使用多種分子生物學和分子遺傳學中已知的方法將編碼重組蛋白質的核酸引入哺乳動物細胞以產生重組哺乳動物細胞。非限制性實例包括轉染(例如，脂轉染)、轉導(例如，慢病毒、腺病毒或逆轉錄病毒感染)和電穿孔。在一些情況中，將編碼重組蛋白質的核酸穩定地整合入重組哺乳動物細胞的染色體(暫態轉染)，而在其他重組哺乳動物細胞中，所述核酸是被整合的。可替換地或此外，編碼重組蛋白質的核酸可存在於質體

中和/或哺乳動物人工染色體(例如，人的人工染色體)中。可替換地或此外，可使用病毒載體(例如，慢病毒、逆轉錄病毒或腺病毒載體)將所述核酸引入哺乳動物細胞。可將所述核酸可操作地連接於啟動子序列(例如，強啟動子，如 $\beta$ -肌動蛋白啟動子和CMV啟動子或誘導型啟動子)。如果需要，包括核酸的載體可還包括可選擇標記(例如，賦予哺乳動物細胞潮黴素、嘌呤黴素或新黴素抗性的基因)。

### 液體培養基

**【0099】** 液體培養基(培養基)是本領域中已知的。可對液體培養基補充哺乳動物血清(例如，胎牛血清和牛血清)和/或生長激素或生長因子(例如，胰島素、轉鐵蛋白和表皮生長因子)。本文所述的任何液體培養基可選自下組：不含動物來源組分的液體培養基、無血清液體培養基、含血清液體培養基、化學限定的液體培養基和無蛋白液體培養基。化學限定的液體培養基、不含動物來源組分的液體培養基、無血清液體培養基和含血清液體培養基的非限制性實例是商業上可得到的。

**【0100】** 液體培養基通常包括能量源(例如，碳水化合物，如葡萄糖)、必需胺基酸(例如，二十個胺基酸的基本組加半胱胺酸)、維生素和/或以低濃度需要的其他有機化合物、游離脂肪酸和/或痕量元素。如果需要，所述液體培養基(例如，第一和/或第二液體培養基)可補充，例如，哺乳動物激素或生長因子(例如，胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽和緩衝液(例如，鈣、鎂和磷酸鹽)、核苷和鹼基(例如，腺苷、胸苷和次黃嘌呤)、蛋白質和組織水解物，和/或這些添加劑的任何組合。

**【0101】** 多種不同的可用於在本文所述的任何方法的任何步驟中培養細胞(例如，哺乳動物細胞)的液體培養基是本領域中已知的。也可用於本方法的培養基組分包括但不限於化學限定的(CD)水解物，例如，CD胰、CD

多肽(兩個以上胺基酸)和CD生長因子。液體組織培養基和培養基組分的另外的實例是本領域中已知的。

**【0102】** 可將從重組哺乳動物細胞培養物獲得的液體培養基過濾或澄清以獲得基本上不含細胞和/或病毒的液體培養基。用於過濾或澄清液體培養基以去除細胞的方法是本領域中已知的(例如，使用 Alternating Tangential Flow (ATF<sup>TM</sup>)系統、切向流過濾(TFF)系統，或美國臨時專利申請案號61/878,502中所述的任何系統的過濾、0.2- $\mu\text{m}$ 過濾)。還可使用離心和去除作為基本上不含細胞的液體培養基的上清液，或藉由允許細胞沉降至含有液體培養基的容納器(例如，容器)的重力底部並去除遠離沉降的重組哺乳動物細胞的液體培養基(基本上不含細胞的液體培養基)而將重組細胞從液體培養基去除。在一些具體實例中，所述第一培養基、第二培養基、第三培養基和第四培養基中的一個或多個(例如，兩個、三個或全部)是相同的。

**【0103】** 用於本申請所述的任何方法中的任何步驟中的液體培養基可為本文所述或本領域已知的任何形式的液體培養基。在用於分離本文所述的重組蛋白質的任何例示性方法中，可藉由添加第二流體(例如，緩衝液)在將其補料入第一MCCS (例如，第一PCCS)之前來稀釋從生產細胞培養物獲得的液體培養基。

**【0104】** 含有重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)的基本上不含細胞的液體培養基可在分離所述重組蛋白質之前(例如，在將液體培養基補料入第一MCCS (例如，第一PCCS)之前)可被儲存(例如，在低於約15°C(例如，低於約10°C，低於約4°C，低於約0°C，低於約-20°C，低於約-50°C，低於約-70°C或低於約-80°C)的溫度)至少1日(例如，至少約2日，至少約5日，至少約10日，至少約15日，至少約20日，或至少約30日))。可替換地，在一些實例中，將含有基本上不含細胞的重組蛋白質的液體培養基補料入用於分離



重組蛋白質的系統(例如，補料入直接來自生產生物反應器的第一MCCS (例如，第一PCCS) (例如，補料入在過濾或澄清步驟後直接來自生產生物反應器的第一MCCS (例如，第一PCCS)。

### 重組蛋白質

【0105】 重組蛋白質可為重組的治療蛋白。可藉由本文提供的方法生產的重組的治療蛋白的非限制性實例包括免疫球蛋白(包括輕鏈和重鏈免疫球蛋白、抗體或抗體片段(例如，本文所述的任何抗體片段)、酶(例如，半乳糖苷酶(例如， $\alpha$ -半乳糖苷酶)、Myozyme®或Cerezyme®)、蛋白質(例如，人紅細胞生成素、腫瘤壞死因子(TNF)或干擾素 $\alpha$ 或 $\beta$ )或免疫原性或抗原性蛋白質或蛋白片段(例如，用於疫苗的蛋白質)。重組的治療蛋白可為含有至少一個多功能重組蛋白質支架的工程改造的抗原結合多肽(參見，例如，Gebauer等, *Current Opin. Chem. Biol.* 13:245-255, 2009；和美國專利申請公開案號2012/0164066中所述的重組的抗原結合蛋白(其在此以參考方式整體併入本文))。作為抗體的重組的治療蛋白的非限制性實例包括：帕尼單抗(panitumumab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、阿巴伏單抗(abagovomab)、阿昔單抗(abciximab)、actoxumab、阿達木單抗(adalimumab)、阿德木單抗(adecatumumab)、阿非莫單抗(afelimomab)、afutuzumab、阿珠單抗(alacizumab)、阿珠單抗、阿侖單抗(alemtuzumab)、alirocumab、阿妥莫單抗(altumomab)、amatuximab、amatuximab、anatumomab、anrukinzumab、阿泊珠單抗(apolizumab)、阿西莫單抗(arcitumomab)、atinumab、托珠單抗(tocilizumab)、basilizimab、貝妥莫單抗(bectumomab)、貝利木單抗(belimumab)、貝伐單抗(bevacizumab)、貝西索單抗(besilesomab)、bezlotoxumab、比西單抗(bicirumab)、卡那單抗(canakinumab)、塞妥珠單抗(certolizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、cixutumumab、達利珠單抗

(daclizumab)、地諾單抗(denosumab)、densumab、依庫珠單抗(eculizumab)、依決單抗(edrecolomab)、依法利珠單抗(efalizumab)、依芬古單抗(efungumab)、依帕珠單抗(epratuzumab)、厄妥索單抗(ertumaxomab)、伊瑞西珠單抗(etaracizumab)、figitumumab、戈利木單抗(golimumab)、替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)、伊戈伏單抗(igovomab)、imgatuzumab、英夫利昔單抗(infliximab)、伊諾莫單抗(inolimomab)、英妥珠單抗(inotuzumab)、拉貝珠單抗(labetuzumab)、lebrikizumab、moxetumomab、那他珠單抗(natalizumab)、obinutuzumab、奧戈伏單抗(oregovomab)、帕利珠單抗(palivizumab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、托珠單抗(tocilizumab)、托西莫單抗(tositumomab)、tralokinumab、tucotuzumab、曲妥珠單抗(trastuzumab)、維妥珠單抗(veltuzumab)、紮魯木單抗(zalutumumab)和zatuximab。可藉由本方法產生的重組治療抗體的另外的實例是本領域中已知的。可藉由本申請所述的方法產生的重組治療蛋白的另外的非限制性實例包括：阿葡糖苷酶 $\alpha$  (alglucosidase alfa)、拉羅尼酶(laronidase)、阿巴西普(abatacept)、加硫酶(galsulfase)、促黃體素 $\alpha$  (lutropin alfa)、抗血友病因子(antihemophilic factor)、阿加糖酶 $\beta$  (agalsidase beta)、干擾素 $\beta$ -1a、達貝泊汀 $\alpha$  (darbepoetin alfa)、替奈普酶(tenecteplase)、依那西普(etanercept)、凝血因子IX (coagulation factor IX)、卵泡刺激激素(follicle stimulating hormone)、干擾素 $\beta$ -1a、伊米昔酶(imiglucerase)、阿法鏈道酶(dornase alfa)、依泊汀 $\alpha$  (epoetin alfa)、胰島素或胰島素類似物、美卡舍明(mecasermin)、因子VIII、因子VIIa、抗凝血酶III、蛋白C、人白蛋白、促紅細胞生成素、粒細胞集落刺激因子、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子、白細胞介素-11、拉羅尼酶、Idursuphase、Galsulphase、 $\alpha$ 1-蛋白酶抑制劑、乳糖酶、腺苷脫氨酶、組織纖維溶酶原啟動物、促甲狀腺素 $\alpha$

(例如，Thyrogen®)和阿替普酶(alteplase)。可藉由本方法產生的重組蛋白質的另外的實例包括酸性 $\alpha$ -葡糖苷酶、阿葡糖苷酶 $\alpha$  (例如，Myozyme®和Lumizyme®)、 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶(例如，Aldurazyme®)、艾杜糖醛酸硫酸酯酶(iduronate sulfatase)、硫酸乙醯肝素N-硫酸酯酶(heparan N-sulfatase)、半乳糖-6-硫化酶(galactose-6-sulfatase)、酸性 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶、N-乙醯葡糖胺-1-磷酸轉移酶、 $\alpha$ -N-乙醯胺基半乳糖苷酶、酸性脂肪酶、溶酶體酸性神經醯胺酶、酸性鞘磷脂酶、 $\beta$ -葡糖苷酶(例如，Cerezyme®和Ceredase®)、半乳糖神經醯胺酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶-A (例如，Fabrazyme®)、酸性 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、神經胺酸酶、己糖胺酶A (hexosaminidase A) 和己糖胺酶B。

**【0106】** 分泌的、可溶的重組蛋白質可藉由從細胞(例如，哺乳動物細胞)去除液體培養基或以其他方式將液體培養基與細胞(例如，哺乳動物細胞)物理分離而從液體培養基回收。用於從細胞(例如，哺乳動物細胞)去除液體培養基的多種不同方法是本領域中已知的，包括，例如，離心、過濾、移液和/或抽吸(aspiration)。然後可使用多種生物化學技術，包括多種類型的層析術(例如，親和層析、分子篩層析、陽離子交換層析、疏水相互作用層析或陰離子交換層析)和/或過濾(例如，分子量截留過濾)將分泌的重組治療蛋白質回收並與液體培養基分離。

### 培養參數

**【0107】** 本文所述的任何分批或灌注培養步驟可在約31°C至約40°C的溫度進行。有技術的實施者可知所述溫度可在培養步驟過程中在特定的時間點變化，例如，以小時或日為基礎。例如，所述溫度可在用所述細胞(例如，重組哺乳動物細胞)初始接種容器(例如，生物反應器)之後約一日、二日、三日、四日、五日、六日、七日、八日、九日、十日、十一日、十二

日、十四日、十五日、十六日、十七日、十八日、十九日或約二十日或以上變化或轉變(例如，增加或降低)。例如，所述溫度可向上轉變(例如，多至或大約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或多至或大約20°C的變化)。例如，所述溫度可向下轉變(例如，多至或大約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或者多至或約20°C的變化)。

**【0108】** 本文所述的任何灌注或分批培養步驟可進一步包括將容器、灌注生物反應器或生產生物反應器中的液體培養基暴露於含有至多或大約15% CO<sub>2</sub> (例如，至多或大約14% CO<sub>2</sub>、12% CO<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、8% CO<sub>2</sub>、6% CO<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、4% CO<sub>2</sub>、3% CO<sub>2</sub>、2% CO<sub>2</sub>，或至多或大約1% CO<sub>2</sub>)的氣氛。所述容器、灌注生物反應器或生產生物反應器可在受控的加濕的氣氛中溫育細胞培養物(例如，以大於20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的濕度或100%的濕度)。所述灌注和生產生物反應器還可裝備有能夠將一定體積的液體培養基從生物反應器去除的機械裝置和任選的所述機械裝置內在將液體培養基轉移出生物反應器的過程中將細胞從液體培養基去除的篩檢程式(例如，ATF系統)。

**【0109】** 本文所述的任何容器、灌注生物反應器或生產生物反應器的內表面可具有至少一個塗層(例如，明膠、膠原、多聚-L-鳥胺酸、聚苯乙烯和層黏連蛋白的至少一個塗層)，和如本領域中已知的用於將O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>和N<sub>2</sub>噴射入液體培養基的一個或多個埠(port)，用於攪動液體培養基的攪拌機構，和一個或多個感測器(例如，溶解的O<sub>2</sub>和溶解的CO<sub>2</sub>感測器)。



## 製備重組蛋白質的方法

【0110】 還提供產生重組蛋白質的方法，其包括上述的任何例示性種子罐培養方法和另外的步驟(f)在允許所述重組哺乳動物細胞分泌重組蛋白質的條件下灌注培養生產細胞培養物；並從所述生產細胞培養物收穫所述重組蛋白質。

【0111】 產生重組蛋白質的其他方法包括本文提供的任何例示性種子罐培養方法和另外的步驟(f)在允許所述重組細胞分泌重組蛋白質的條件下分批或補料分批培養生產細胞培養物；並從所述生產細胞培養物收穫所述重組蛋白質。

【0112】 生產細胞培養物的灌注培養可使用本文所述或本領域已知的任何例示性灌注培養方法進行。例如，生成生產細胞培養物(在將所述第二細胞培養物在第三培養基中處理之後)至生產細胞培養物達到所述穩態生產細胞密度的時間之間的期間為約1.5日-約5.0日(例如，約1.5日-約4.0日，約1.5日-約3.5日，約1.5日-約3.0日，約1.5日-約2.5日,約1.5日- 2.0日，約2.0日-約5.0日，約2.0日-約4.5日，約2.0日-約4.0日，約2.0日-約3.5日，約2.0日-約3.0日，約2.0日-約2.5日，約2.5日-約5日，約2.5日-約4.5日，約2.5日-約4.0日，約2.5日-約3.5日，約2.5日-約3.0日，約3.0日-約5.0日，約3.0日-約4.5日，約3.0日-約4.0日，約3.0日-約3.5日，約3.5日-約5.0日，約3.5日-約4.5日，約3.5日-約4.0日，約4.0日-約5.0日，約4.0日-約4.5日，或約4.5日-約5.0日)。生產細胞培養物的灌注培養可持續例如5.0日-200日(例如，5.0日-190日，5.0日-180日，5.0日-170日，5.0日-160日，5.0日-150日，5.0日-140日，5.0日-130日，5.0日-120日，5.0日-110日，5.0日-110日，5.0日-100日，5.0日-90日，5.0日-80日，5.0日-70日，5.0日-60日，5.0日-50日，5.0日-40日，5.0日-30日，5.0日-20日，5.0日-10日，10日-200日，10日-190日，10日-180日，10日-170

日，10日-160日，10日-150日，10日-140日，10日-130日，10日-120日，10日-110日，10日-100日，10日-90日，10日-80日，10日-70日，10日-60日，10日-50日，10日-40日，10日-30日，10日-20日，20日-200日，20日-190日，20日-180日，20日-170日，20日-160日，20日-150日，20日-140日，20日-130日，20日-120日，20日-110日，20日-100日，20日-90日，20日-80日，20日-70日，20日-60日，20日-50日，20日-40日，30日-200日，30日-190日，30日-180日，30日-170日，30日-160日，30日-150日，30日-140日，30日-130日，30日-120日，30日-110日，30日-100日，30日-90日，30日-80日，30日-70日，30日-60日，30日-50日，30日-40日，40日-200日，40日-190日，40日-180日，40日-170日，40日-160日，40日-150日，40日-140日，40日-130日，40日-120日，40日-110日，40日-100日，40日-90日，40日-80日，40日-70日，40日-60日，40日-50日，50日-200日，50日-190日，50日-180日，50日-170日，50日-160日，50日-150日，50日-140日，50日-130日，50日-120日，50日-110日，50日-100日，50日-90日，50日-80日，50日-70日，50日-60日，75日-200日，75日-175日，75日-150日，50日-125日，50日-100日，50日-75日，75日-200日，75日-175日，75日-200日，75日-175日，75日-150日，75日-125日，75日-100日，100日-200日，100日-175日，100日-150日，100日-125日，125日-200日，125日-175日，125日-150日，150日-200日，150日-175日，或175日-200日)的時間。

**【0113】** 可藉由連續的或週期的去除(例如，以與灌注培養過程中相同或變化的頻率)將培養基從生產生物反應器去除。可人工(例如，藉由移液)或藉由泵系統(例如，交替切向流(ATF)過濾系統或切向流體過濾)去除培養基。

### 分離重組蛋白質



【0114】 本文所述的產生重組蛋白質的方法可進一步包括從去除自生產生物反應器(在灌注培養過程中)的培養基分離重組蛋白質的步驟。從去除自生產生物反應器的培養基分離重組蛋白質的步驟可包括選自下組的一個或多個(例如，兩個、三個、四個、五個、六個或七個)單元操作的進行：捕獲、純化、精製、病毒滅活、調節包括重組蛋白質的流體的pH和/或離子濃度，和過濾。例如，分離重組蛋白質的一個或多個單元操作可藉由將含有重組蛋白質的流體經過一個或多個(例如，兩個、三個、四個或五個)多柱層析系統(MCCS)來進行。從培養基分離重組蛋白質的步驟可使用集成的和連續的工藝/方法(例如，美國臨時專利申請案號61/775,060、美國臨時專利申請案號61/856,390、美國專利申請系列案號14/195,481、國際專利申請案號PCT/US2014/019909和美國臨時專利申請案號61/928,906中所述的例示性方法，每篇所述申請案的整體內容以參考方式併入本文)來進行。例示性方法可包括提供包括基本上不含細胞的重組蛋白質(例如，重組的治療蛋白)的液體培養基(例如，從生產生物反應器去除並藉由ATF系統過濾的液體培養基)。一些方法包括將液體培養基(例如，從生產生物反應器去除並藉由ATF系統過濾的液體培養基)連續進料入包括至少一個層析柱的多柱層析系統(MCCS)，其中這些方法是整合的並從液體培養基連續運行至來自MCCS的洗脫物，其為分離的重組蛋白質。一些方法包括將液體培養基(例如，從生產生物反應器去除並藉由ATF系統過濾的液體培養基)連續進料入第一MCCS (MCCS1)，使用MCCS1從液體培養基捕獲重組蛋白質，產生來自MCCS1的洗脫物，其包括重組蛋白質，和將所述洗脫物連續進料入第二MCCS (MCCS2)，和隨後(從MCCS2)洗脫重組蛋白質從而產生分離的重組蛋白質，其中所述方法是整合的並從液體培養基連續運行至分離的重組蛋白質。一些具體實例進一步包括將分離的重組蛋白質配製成藥劑的步驟。

【0115】 可用於任何這些方法的MCCS的非限制性方面(MCCS、MCCS1和/或MCCS2)在美國臨時專利申請案號61/775,060、美國臨時專利申請案號61/856,390、美國專利申請系列案號14/195,481、國際專利申請案號PCT/US2014/019909和美國臨時專利申請案號61/928,906 (各以參考方式併入本文)中描述。這些例示性方法的多個另外的方面在下文描述並可無限制的在本文提供的方法中以任何組合使用。所提供的方法的例示性方面描述如下，然而本領域技術人員可知：可將另外的步驟添加至本文所述的方法而且可使用其他材料以進行本文所述的方法的任何步驟。

【0116】 本文所述的例示性方法可包括使用MCCS或兩個或更多(例如，兩個、三個、四個、五個或六個)多柱層析系統(MCCS) (例如，MCCS1和MCCS2)。MCCS可包括兩個或更多層析柱，兩個或更多層析膜，或至少一個層析柱與至少一個層析膜的組合。在非限制性實例中，MCCS (例如，本文的任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2)可包括四個層析柱，三個層析柱和層析膜，三個層析柱，兩個層析柱，兩個層析膜，和兩個層析柱和一個層析膜。本領域技術人員可預見層析柱和/或層析膜的組合的另外實例可無限制地用於MCCS (例如，本文所述任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2)。MCCS中存在的個體層析柱和/或層析膜可為相同的(例如，具有相同的形狀、體積、樹脂、捕獲機制和單元操作)，或可為不同的(例如，具有一種或多種不同的形狀、體積、樹脂、捕獲機制和/或單元操作)。MCCS (例如，本文所述任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2)中存在的個體層析柱和/或層析膜可進行相同的單元操作(例如，捕獲、純化或精製的單元操作)或不同的單元操作(例如，不同的單元操作，其例如選自下組：捕獲、純化、精製、滅活病毒、調節包括重組蛋白質的流體的離子濃度和/或pH和過濾)。例如，在文請所述方法的實例中，MCCS或MCCS1中的至少一個層



析柱和/或層析膜進行捕獲重組蛋白質的單元操作。

**【0117】** 用於本文所述的任何方法的MCCS (例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2)中的一個或多個層析柱可具有基本上相同的樹脂體積或可具有不同的樹脂體積。在使用本文所述的任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2的過程中，可採用一種或多種(例如，三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三或二十四種)不同類型的緩衝液。如本領域中已知的，用於本文所述的方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2中一種或多種類型的緩衝液會依賴於MCCS、MCCS1和/或MCCS2的層析柱和/或層析膜中存在的樹脂、重組蛋白質的生物物理性質和藉由MCCS、MCCS1和/或MCCS2的特定的層析柱和/或層析膜進行的單元操作(例如，本文所述的任何例示性單元操作)。在使用本文所述任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2的過程中採用的緩衝液的體積和類型還可由本領域技術人員確定(例如，下面更詳細地討論)。例如，可選擇在使用本文所述任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2的過程中採用的緩衝液的體積和類型，從而優化分離的重組蛋白質的一個或多個下述方面：重組蛋白質的總體收率、重組蛋白質的活性、重組蛋白質的純度水準和從包括重組蛋白質的流體(例如，液體培養基)去除生物污染物(例如，不含活性病毒、分枝桿菌、酵母、細菌或哺乳動物細胞)。

**【0118】** 所述MCCS、MCCS1和/或MCCS2可為週期性逆流層析系統(PCCS)。PCCS可，例如，包括兩個或多個層析柱(例如，三個柱或四個柱)，其經切換以允許從所述兩個或多個層析柱連續洗脫重組蛋白質。PCCS可包括兩個或多個層析柱，兩個或多個層析膜，或至少一個層析柱和至少一個層析膜。柱操作(迴圈)通常由載入、洗滌、洗脫和再生步驟組成。在PCCS中，將多個柱用於以迴圈方式分離地和連續地運行相同步驟。由於柱串聯(in

series)操作，來自一個柱的流過物(flow through)和洗滌物(wash)被另一個柱捕獲。PCCS的此獨特的特徵允許將樹脂載入接近於其靜態結合容量(static binding capacity)而非動態結合容量(dynamic binding capacity)，如分批模式層析過程中通常的。作為連續迴圈和洗脫的結果，將進入PCCS的流體連續處理，並連續產生包括重組蛋白質的洗脫液。

**【0119】** 採用柱切換策略以在PCCS迴圈中從一個步驟前進至另一個步驟。可用於PCCS的柱切換的實例在美國臨時專利申請案號61/775,060、美國臨時專利申請案號61/856,390、美國專利申請系列案號14/195,481、國際專利申請案號PCT/US2014/019909和美國臨時專利申請案號61/928,906中描述。在PCCS中，PCCS中存在的每個層析柱和/或層析膜上重組蛋白質的停留時間(RT)可被減少而無需增加柱/膜大小，因為來自第一柱/膜的突破物(breakthrough)可在PCCS中的另一個柱/膜上被捕獲。可設計連續的方法系統以藉由使用等式 $V = D * RT$ 變化所述柱/膜體積(V)和RT而以任何灌注速率(D)處理液體培養基。

**【0120】** 可藉由用於本文所述任何方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2進行的一個或多個單元操作包括，例如，捕獲所述重組蛋白質、使包括所述重組蛋白質的流體中存在的病毒滅活、純化所述重組蛋白質、精製所述重組蛋白質、保留包括所述重組蛋白質的流體(例如，使用本文所述的任何例示性破碎罐(break tank))、從包括所述重組蛋白質的流體過濾或去除顆粒材料和/或細胞，和調節包括所述重組蛋白質的流體的離子濃度和/或pH。在一些具體實例中，MCCS或MCCS1包括至少一個層析柱和/或層析膜，其進行捕獲所述重組蛋白質的單元操作。所述捕獲的單元操作可使用(例如，利用捕獲機制的)至少一個層析柱和/或層析樹脂進行。捕獲機制的非限制性實例包括結合蛋白A的捕獲機制、結合抗體或抗體片段的捕獲機制、結

合受質的捕獲機制、結合適體(aptamer)的捕獲機制、結合標籤的捕獲機制(例如，基於聚-His標籤的捕獲機制)和結合輔因子的捕獲機制。捕獲還可使用樹脂進行，所述樹脂可用於進行陽離子交換或陰離子交換層析、分子篩層析或疏水相互作用層析。可用於捕獲重組蛋白質的非限制性樹脂在本文中描述。可用於捕獲重組蛋白質的樹脂的另外的實例是本領域中已知的。

**【0121】** 將包括重組蛋白質的流體中存在的病毒滅活的單元操作可使用MCCS、MCCS1和/或MCCS2來進行(例如，其包括，例如，層析柱、層析膜或保溫罐(holding tank)，其能夠將包括重組蛋白質的流體在約3.0-5.0(例如，約3.5至約4.5、約3.5至約4.25、約3.5至約4.0、約3.5至約3.8，或約3.75)的pH溫育至少30分鐘的時間(例如，約30分鐘至1.5小時的時間，約30分鐘至1.25小時的時間，約0.75小時至1.25小時的時間，或約1小時的時間))。

**【0122】** 純化重組蛋白質的單元操作可使用一個或多個MCCS(例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2)來進行，所述一個或多個MCCS包括，例如，包括(例如，利用捕獲系統的)樹脂的層析柱或層析膜。捕獲機制的非限制性實例包括結合蛋白A的捕獲機制、結合抗體或抗體片段的捕獲機制、結合受質的捕獲機制、結合適體的捕獲機制、結合標籤的捕獲機制(例如，基於聚-His標籤的捕獲機制)和結合輔因子的捕獲機制。純化還可使用樹脂進行，所述樹脂可用於進行陽離子交換或陰離子交換層析、分子篩層析或疏水相互作用層析。可用於純化重組蛋白質的非限制性樹脂在本文中描述。可用於純化重組蛋白質的樹脂的另外的實例是本領域中已知的。

**【0123】** 精製重組蛋白質的單元操作可使用一個或多個MCCS(例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2)來進行，所述一個或多個MCCS包括，例如，包括(例如，可用於進行陽離子交換、陰離子交換、分子篩層析或疏水相互作用層析的)樹脂的層析柱或層析膜。可用於精製重組蛋白質的非限制

性樹脂在本文中描述。可用於精製重組蛋白質的樹脂的另外的實例是本領域中已知的。

**【0124】** 過濾包括所述重組蛋白質的流體的單元操作可使用MCCS (例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2)來進行，所述MCCS包括，例如，包括分子篩樹脂的濾器，或層析柱或層析膜。如本領域中已知的，多種亞微米濾器(例如，具有小於1  $\mu\text{m}$ ，小於0.5  $\mu\text{m}$ ，小於0.3  $\mu\text{m}$ ，約0.2  $\mu\text{m}$ ，小於0.2  $\mu\text{m}$ ，小於100 nm，小於80 nm，小於60 nm，小於40 nm，小於20 nm，或小於10 nm的孔徑的濾器)是本領域中可用的，其能夠去除任何沉澱的材料和/或細胞(例如，沉澱的、未折疊的蛋白質；沉澱的、不想要的宿主細胞蛋白；沉澱的脂質；細菌；酵母細胞；真菌細胞；分枝桿菌；和/或哺乳動物細胞)。已知具有約0.2  $\mu\text{m}$ 或小於0.2  $\mu\text{m}$ 的孔徑以從包括重組蛋白質的流體有效地去除細菌的濾器。如本領域中已知的，包括分子篩樹脂的層析柱或層析膜還可用於MCCS (例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2)以進行過濾包括重組蛋白質的流體的單元操作。

**【0125】** 調節包括所述重組蛋白質的流體的離子濃度和/或pH的單元操作可使用MCCS (例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2)來進行，所述MCCS包括和利用緩衝液調節庫(例如，線上(in-line)緩衝液調節庫)，其將新的緩衝溶液添加入包括重組蛋白質的流體(例如，在MCCS、MCCS1和/或MCCS2內的柱之間，或在倒數第二MCCS (例如，MCCS1)中的最後一個柱之後且在將包括重組蛋白質的流體加料入下一個MCCS (例如，MCCS2)的第一個柱之前。

**【0126】** 在本文所述的例示性方法中，MCCS、MCCS1和/或MCCS2可進行兩個或多個單元操作。例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2可各進行至少如下的單元操作：捕獲重組蛋白質和滅活包括重組蛋白質的流體中存

在的病毒；捕獲重組蛋白質，滅活包括重組蛋白質的流體中存在的病毒，和調節包括重組蛋白質的液體的離子濃度和/或pH；純化重組蛋白質和精製重組蛋白質；純化重組蛋白質，精製重組蛋白質，和過濾包括所述重組蛋白質的流體或從包括所述重組蛋白質的流體去除沉澱物和/或特定的物質；和純化重組蛋白質，精製重組蛋白質，過濾包括所述重組蛋白質的流體或從包括所述重組蛋白質的流體去除沉澱物和/或顆粒物質，和調節包括重組蛋白質的液體的離子濃度和/或pH。

**【0127】** 在本文所述的例示性方法中，從液體培養基捕獲重組蛋白質使用MCCS或MCCS1進行。如本領域中可知的，為了實現重組蛋白質的捕獲，MCCS或MCCS1中的至少一個層析柱或至少一個層析膜必須包括利用捕獲機制(例如，本文所述的任何例示性捕獲機制)的樹脂，或包括能夠進行陽離子交換、陰離子交換、分子篩或疏水相互作用層析的樹脂。例如，如果重組蛋白質是抗體或抗體片段，捕獲系統可為結合蛋白A的捕獲機制或結合抗原的捕獲機制(其中藉由重組抗體或抗體片段特異性識別捕獲抗原)。如果重組蛋白質是酶，捕獲機制可使用特異性結合所述酶以捕獲重組酶的抗體或抗體片段，捕獲重組酶的所述酶的受質，捕獲重組酶的所述酶的輔因子，或者，如果重組酶包括標籤，可施用特異性結合重組酶中存在的標籤的蛋白質、金屬螯合物或抗體(或抗體片段)。可用於捕獲重組蛋白質的非限制性樹脂在本文中所描述，且可用於捕獲重組蛋白質的另外的樹脂是本領域中已知的。利用結合蛋白A的捕獲機制的樹脂的一個非限制性實例是MabSelect SuRe樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)、JSR LifeSciences Amsphere ProA JWT203 (Sunnyvale, CA)和Kaneka KanCap A (Osaka, Japan)。

**【0128】** 在本文所述的一些例示性方法中，MCCS或MCCS1可包括

在低pH (例如，4.6以下、4.4以下、4.2以下、4.0以下、3.8以下、3.6以下、3.4以下、3.2以下，或3.0以下的pH)將包括所述重組蛋白質的流體保留例如，約1分鐘至1.5小時(例如，約1小時)並滅活包括所述重組蛋白質的流體中存在的病毒的儲庫。如本領域技術人員可知的，多種其他手段可用於進行滅活病毒的單元操作。例如，UV照射包括所述重組蛋白質的流體也可用於進行滅活病毒的單元操作。

**【0129】** MCCS或MCCS1可包括PCCS，其包括四個層析柱，其中四個層析柱中至少三個進行從液體培養基捕獲重組蛋白質的單元操作(例如，使用包括至少一個層析柱的任何的MCCS，所述層析柱包括能夠進行捕獲(例如，本文所述的任一者)的單元操作的樹脂)。在這些實例中，四柱的PCC可進行滅活包括重組蛋白質的流體中的病毒的單元操作(例如，可用於實現包括所述重組蛋白質的流體的病毒滅活的本文所述的任何例示性柱)。

**【0130】** 本文所述的例示性方法中的MCCS、MCCS1和/或MCCS2可用於進行純化和精製重組蛋白質的單元操作。例如，MCCS2可用於進行純化和精製重組蛋白質的操作且來自MCCS2的洗脫物是分離的重組蛋白質。MCCS、MCCS1和/或MCCS2可包括至少一個(例如，兩個、三個或四個)可用於進行純化重組蛋白質的單元操作的層析柱或層析膜，和至少一個(例如，兩個、三個或四個)可用於進行精製重組蛋白質的單元操作的層析柱或層析膜。

**【0131】** 可用於進行純化重組蛋白質的單元操作的至少一個層析柱或層析膜可包括利用捕獲機制的樹脂(例如，本文所述或本領域已知的任何捕獲機制)，或可用於進行陰離子交換、陽離子交換、分子篩或疏水相互作用層析的樹脂。可用於進行精製重組蛋白質的單元操作的至少一個層析柱或層析膜可包括可用於進行陰離子交換、陽離子交換、分子篩或疏水相互

作用層析的樹脂(例如，本文所述或本領域已知的用於進行陰離子交換、陽離子交換、分子篩或疏水相互作用層析的任何例示性樹脂)。用於進行精製的單元操作的一個或多個層析柱和/或層析膜可包括選擇性結合或保持包括所述重組蛋白質的流體中存在的雜質的樹脂。

**【0132】** 在本文所述的例示性方法的一些實例中，MCCS2包括PCCS，所述PCCS包括三個層析柱和一個層析膜，例如，其中PCCS中的三個層析柱進行純化重組蛋白質的單元操作(例如，使用可用於進行純化蛋白質的單元操作的至少一個層析柱)和PCCS中的層析膜進行精製重組蛋白質的單元操作。在這些實例中，可用於進行精製重組蛋白質的單元操作的PCCS中的層析膜可為本申請所述的可用於進行精製重組蛋白質的單元操作的任何例示性層析膜。本文所述的任何柱切換方法可用於確定此實例中PCCS中的前三個層析柱和層析膜何時可被切換。

#### 例示性重組蛋白質分離系統

**【0133】** 用於進行本文所述的方法且包括MCCS或MCCS1和MCCS2的生物製造系統的實例在美國臨時專利申請系列案號、美國臨時專利申請案號61/775,060、美國臨時專利申請案號61/856,390、美國專利申請系列案號14/195,481、國際專利申請案號PCT/US2014/019909和美國臨時專利申請案號61/928,906 (以參考方式併入)中描述。整個系統可包括，例如，總共四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十個層析柱。例如，MCCS、MCCS1和/或MCCS2可包括(或可各自包括)二、三、四、五、六、七、八、九、十個層析柱。

**【0134】** 例如，有用的系統可包括MCCS1，其包括入口；和MCCS2，其包括出口；或MCCS，其包括入口和出口。在一些具體實例中，MCCS1和MCCS2是相互流體連通的。這些系統還可被構造使得流體可經入口進

入，藉由MCCS1和MCCS2，並從出口流出製造系統。

**【0135】** 在這些例示性系統中，MCCS或MCCS1可包括入口，藉由所述入口流體(例如，來自生產生物反應器基本上不含細胞的液體培養基)可分別進入MCCS或MCCS1。入口可為本領域已知用於所述目的的任何結構。它可包括，例如，螺紋(threading)、肋條(ribbing)或密封物(seal)，其允許被插入流體管道，使得在將流體管道插入入口後流體會通過入口進入MCCS或MCCS1而無流體顯著滲漏出入口。可用於本系統的非限制性入口是已知的，且可由本領域技術人員所理解。

**【0136】** MCCS或MCCS1可包括至少兩個層析柱、至少兩個層析膜，或至少一個層析柱和至少一個層析膜，和入口。MCCS或MCCS1可為本文所述的任何例示性MCCS，或具有一個或多個本文所述的MCCS的任何例示性特徵(以任何組合)。MCCS或MCCS1中存在的層析柱和/或層析膜可具有一個或多個本申請所述或本領域已知的任何例示性形狀、大小、體積(柱床體積)和/或單元操作。

**【0137】** MCCS或MCCS1中存在的層析柱和/或層析膜可包括一種或多種本文所述或本領域已知的任何例示性樹脂。例如，MCCS或MCCS1中存在的一個或多個層析柱和/或層析膜中所包括的樹脂可為利用捕獲機制(例如，結合蛋白A的捕獲機制、結合蛋白G的捕獲機制、結合抗體或抗體片段的捕獲機制、結合受質的捕獲機制、結合輔因子的捕獲機制、結合適體的捕獲機制和/或結合標籤的捕獲機制)的樹脂。MCCS或MCCS1的一個或多個層析柱和/或層析膜中所包括的樹脂可為陽離子交換樹脂、陰離子交換樹脂、分子篩樹脂或疏水相互作用樹脂，或它們的任何組合。可用於純化重組蛋白質的樹脂的另外的實例是本領域已知的，並可包括於MCCS或MCCS1中存在的一個或多個層析柱和/或層析膜中。MCCS或MCCS1中存在



的層析柱和/或層析膜可包括相同和/或不同的樹脂(例如,本文所述或本領域已知的用於重組蛋白質純化的任何樹脂)。

**【0138】** MCCS或MCCS1中存在的兩個或多個層析柱和/或層析樹脂可進行一個或多個單元操作(例如,捕獲重組蛋白質,純化重組蛋白質,精製重組蛋白質,滅活病毒,調節包括所述重組蛋白質的流體的離子濃度和/或pH,或過濾包括重組蛋白質的流體)。在非限制性實例中,MCCS或MCCS1可進行從流體(例如,液體培養基)捕獲重組蛋白質和滅活包括重組蛋白質的流體中存在的病毒的單元操作。MCCS或MCCS1可進行本文所述或本領域已知的兩個或多個單元操作的任何組合。

**【0139】** MCCS或MCCS1中存在的一個或多個層析柱和/或層析膜可通過切換機構(例如,柱切換機構)相互連接或相互移動。MCCS或MCCS1還可包括一個或多個(例如,兩個、三個、四個或五個)泵(例如,自動的,例如,自動的蠕動泵)。柱切換事件可藉由檢測重組蛋白質的水準,液體(例如,緩衝液)的特定體積,或逝去的特定時間觸發,所述重組蛋白質的水準藉由對應於經過MCCS或MCCS1的流體(例如,進入MCCS或MCCS1中的一個或多個層析柱和/或層析膜的輸入物和/或來自MCCS或MCCS1中的一個或多個層析柱和/或層析膜的洗脫物)中重組蛋白質的一定水準的UV吸光度來檢測。柱切換(column switching)通常意指一種機構,藉由該機構允許MCCS或MCCS1中至少兩個不同的層析柱和/或層析膜(例如,MCCS或MCCS1中存在的兩個或多個不同的層析柱和/或層析膜)在方法的至少部分的過程中以基本上相同的時間經過不同的步驟(例如,平衡、載入、洗脫或洗滌)。

**【0140】** MCCS或MCCS1可為週期性逆流層析系統(Periodic Counter-Current Chromatography system; PCCS)。例如,作為MCCS或MCCS1

的PCCS (即，分別為PCCS或PCCS1)可包括四個層析柱，其中前三個柱進行從流體(例如，液體培養基)捕獲重組蛋白質的單元操作，而PCCS的第四個柱進行滅活包括重組蛋白質的流體中的病毒的單元操作。作為MCCS或MCCS1的PCCS可利用柱切換機構。PCC系統可利用改變的ÄKTA系統(GE Healthcare, Piscataway, NJ)，其能夠運行多至，例如，四、五、六、七或八個柱，或更多。

**【0141】** 本文所述的例示性系統中的第二MCCS (MCCS2)可包括至少兩個層析柱、至少兩個層析膜，或者至少一個層析柱和至少一個層析膜，和出口。MCCS2可為本文所述的任何例示性MCCS，或可具有本文所述的MCCS的任何例示性特徵中的一個或多個(以任何組合)。MCCS2中存在的層析柱和/或層析膜可具有如下的一個或多個：本文所述的任何形狀、大小、體積(柱床體積)和/或單元操作。層析柱和/或層析膜可包括本文所述或本領域已知的任何例示性樹脂。例如，MCCS2中存在的一個或多個層析柱和/或層析膜中所包括的樹脂可為利用捕獲機制(例如，結合蛋白A的捕獲機制、結合蛋白G的捕獲機制、結合抗體或抗體片段的捕獲機制、結合受質的捕獲機制、結合輔因子的捕獲機制、結合標籤的捕獲機制和/或結合適體的捕獲機制)的樹脂。有用的樹脂包括，例如，陽離子交換樹脂、陰離子交換樹脂、分子篩樹脂和疏水相互作用樹脂。樹脂的另外的實例是本領域中已知的。MCCS2中存在的層析柱和/或層析膜可包括相同和/或不同的樹脂(例如，本文所述或本領域已知用於重組蛋白質純化的任何樹脂)。

**【0142】** MCCS2中存在的層析柱和/或層析膜可進行一個或多個單元操作(例如，本文所述的任何單元操作或本文所述單元操作的任何組合)。在非限制性實例中，MCCS2可進行從流體純化重組蛋白質和精製包括重組蛋白質的流體中存在的重組蛋白質的單元操作。在其他非限制性實例中，

MCCS2可進行純化流體中存在的重組蛋白質，精製流體中存在的重組蛋白質，和過濾包括重組蛋白質的流體的單元操作。在另一個實例中，MCCS2可進行純化流體中存在的重組蛋白質，精製流體中存在的重組蛋白質，過濾包括重組蛋白質的流體和調節包括重組蛋白質的流體的離子濃度和/或pH的單元操作。MCCS2可進行本文所述或本領域已知的兩個或多個單元操作的任何組合。

**【0143】** MCCS2中存在的層析柱和/或層析膜可通過切換機構(例如，柱切換機構)相互連接或相互移動。MCCS2還可包括一個或多個(例如，兩個、三個、四個或五個)泵(例如，自動的，例如，自動的蠕動泵)。柱切換事件可藉由檢測重組蛋白質的水準，液體(例如，緩衝液)的特定體積，或逝去的特定時間觸發，所述重組蛋白質的水準藉由對應於經過MCCS2的流體(例如，進入MCCS2中的一個或多個層析柱和/或層析膜的輸入物和/或來自MCCS2中的一個或多個層析柱和/或層析膜的洗脫物)中重組蛋白質的一定水準的UV吸光度來檢測。

**【0144】** MCCS2可為週期性逆流層析系統(PCCS2)。例如，PCCS2可包括三個層析柱，其進行從流體純化重組蛋白質的單元操作，和層析膜，其進行精製流體中存在的重組蛋白質的單元操作。例如，進行從流體純化重組蛋白質的單元操作的三個柱可包括，例如，陽離子交換樹脂，且進行精製的單元操作的層析膜可包括陽離子交換樹脂。PCCS2可利用柱切換機構。PCCS2可利用改變的ÄKTA系統(GE Healthcare, Piscataway, NJ)，其能夠運行多至，例如，四、五、六、七或八個柱，或更多。

**【0145】** MCCS2可包括出口，藉由該出口分離的重組蛋白質可離開系統。出口可包括，例如，執行緒、羅紋或密封，其允許被插入流體管道或經設計以保持或存儲分離的重組蛋白質的小瓶。出口可包括可用於密封

所述出口上降低生物負荷小瓶(reduced bioburden vial)或其他這樣的存儲容器的表面，從而允許分離的重組蛋白質直接流入降低生物負荷小瓶或存儲容器。可用於本系統的非限制性出口是已知的，且可由本領域技術人員所理解。

### 配製分離的重組蛋白質

【0146】 可施用本領域已知的方法將分離的重組蛋白質進一步配製成藥劑。藥劑經配製而與它們意欲的施用路徑(例如，靜脈內、動脈內、肌肉內、皮內、皮下或腹膜內)相容。藥劑可包括無菌稀釋劑(例如，無菌的水或鹽水)，固定油(fixed oil)，聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶劑，抗菌劑或抗真菌劑，如苯甲醇或甲基對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞等，抗氧化劑，如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉，螯合劑，如乙二胺四乙酸，緩衝劑如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽，和等滲劑，如糖(例如，右旋糖)、多元醇(例如，甘露醇或山梨醇)或鹽(例如，氯化鈉)，或其任何組合。脂質體懸浮液也可用作藥學可接受的載體(參見，例如，美國專利號4,522,811)。藥劑的製備可配製並封閉於安瓿、一次性注射器或多劑量小瓶中。當需要時(如在，例如，注射製劑中)，可藉由例如，使用塗覆物(coating)如卵磷脂，或表面活性劑來維持適當的流動性。分離的重組蛋白質的吸收可藉由包括可延遲吸收的作用劑(例如，單硬脂酸鋁和明膠)來延長。可替換地，控制釋放可藉由植入物(implants)和微囊化的遞送系統來實現，其可包括生物可降解的、生物相容的聚合物(例如，乙烯乙酸乙烯酯(ethylene vinyl acetate)、聚酞(polyanhydrides)、聚乙醇酸、膠原(collagen)、聚原酸酯(polyorthoesters)和聚乳酸；Alza Corporation和Nova Pharmaceutical, Inc.)。

【0147】 包括任何分離的重組蛋白質中的一種或多種的藥劑可經配製用於胃腸外(例如，靜脈內、動脈內、肌肉內、皮內、皮下或腹膜內)以劑

量單位形式(即，含有預定量的活性蛋白的物理上分散的單位以便於施用和劑量的均勻性)投藥。

【0148】 藥劑的毒性和治療功效可藉由細胞培養物或實驗動物(例如，猴)中的標準藥學方法確定。能夠，例如，確定LD50 (對於群體的50%致死的劑量)和ED50 (在群體的50%中治療上有效的劑量)：治療指數為LD50:ED50的比值。呈現高治療指數的藥劑是較佳的。當藥劑呈現不合意的副作用時，應進行護理以使潛在的損害最小化(即，降低不想要的副作用)。毒性和治療功效可藉由其他標準藥學方法確定。

【0149】 從細胞培養測定法和動物研究獲得的資料可用於配製供用於受試者(例如，人)的任何給定的分離的重組蛋白質的適當劑量。本文所述的任何藥劑的有效性和給藥(dosing)可藉由保健專業人士或獸醫專業人士使用本領域已知的方法確定。一些因素可影響有效治療受試者所需的劑量和時機(例如，疾病或病症的嚴重程度，先前的治療，受試者的年齡和/或總體健康，和其他疾病的存在)。

【0150】 在如下實施例中進一步描述本發明，所述實施例並不限制在所附請求項中描述的本發明的範圍。

## 實施例

### 實施例1. 兩步驟之例示性種子罐培養方法

【0151】 進行實驗以開發改進的種子罐培養方法。本文提供的例示性種子罐培養方法示於圖1和2。與常規的種子罐培養方法相比，本申請提供的例示性種子罐培養方法消除了兩個中間的攪拌培養(spinner culture)步驟。圖1和2中所示的例示性種子罐培養方法代替了攪拌培養(例如，用圖1和2中的Wave生物反應器(2-L和20-L)替代了圖1和2中的125-mL至10-L攪拌

培養)。圖1和2中用Wave生物反應器替代多個攪拌培養減少層流罩中所需操縱的數目，並因此藉由運行在封閉的系統中操作而改進操作的成功率。在N-1灌注培養步驟使用灌注培養(例如，圖1和2中具有ATF過濾裝置的50-L灌注生物反應器)也允許達到 $\geq 50 \times 10^6$ 活細胞/mL的培養細胞密度。N-1灌注培養步驟中達到的高活細胞密度允許500-L生產生物反應器中 $5 \times 10^6$ 活細胞/mL的接種密度，這顯著高於藉由常規種子罐培養方法(圖1)達到的生產生物反應器中的初始細胞密度。由本種子罐培養方法提供的更高的生產生物反應器接種密度有助於將生產生物反應器生長期減少約5日，對於操作50日的生產生物反應器節省了製造工廠時間(manufacturing plant time)。用於測試圖1和2中所示的例示性種子罐培養方法的生產力的材料和方法在下面描述。

## 材料與方法

### 細胞系和介質

【0152】 所有實驗使用補充4 mM穀氨醯胺(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的商業上可得到的、化學限定的細胞培養基(Life Technologies, Grand Island, NY)和產生重組人酶的CHO細胞系進行。

### 2-L和20-L Wave生物反應器中的分批種子罐培養

【0153】 將高密度(HD)細胞庫小瓶( $10 \times 10^7$ 活細胞/mL, 4.5 mL/小瓶)以1-L工作體積融解於2-L Wave細胞袋(cell bag) (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。當2-L Wave細胞袋中的活細胞密度達到 $3.0 \times 10^6$ 活細胞/mL時，將培養物以7.5-L工作體積擴充至20-L Wave細胞袋。將Wave生物反應器系統(Model 20/50 EHTD) (GE Healthcare)用作2-L和20-L Wave細胞袋兩者的搖動平臺。將培養維持在37°C的溫度、16 RPM搖動速度和7°搖動角度。將20% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>的氣體混合物以0.25 slpm的流速添加至頂部空間。

### 種子罐N-1灌注培養

【0154】 將配備有ATF4灌注裝置(Refine Technology, Pine Brook, NJ)的15-L玻璃灌注生物反應器(Broadley-James Corporation, Irvine, CA)用於模擬種子罐培養N-1階段(如圖1中所示的50-L生物反應器)。藉由20  $\mu\text{m}$ 燒結噴霧器(sintered sparger)添加氧氣以控制40%的溶氧並藉由1-mm鑽孔噴霧器添加氮氣以控制120 mmHg以下的溶解的 $\text{CO}_2$ 水準。藉由添加0.5 M碳酸鈉將生物反應器培養pH維持6.85以上。添加10%消泡溶液(FoamAway, Life Technologies, Grand Island, NY)以根據需要控制泡沫水準。

【0155】 以 $0.5 \times 10^6$ 活細胞/mL接種10-L工作體積的15-L生物反應器並以分批模式操作培養直至第2日灌注開始時。使用線上電容感測器(Aber Instruments, Aberystwyth, UK)和可程式設計邏輯控制器(DeltaV)將灌注速率初始控制在0.2 nL/細胞/日的細胞-比灌注速率(CSPR)。在活細胞密度達到 $20 \times 10^6$ 細胞/mL之後，將灌注速率以4倍生物反應器體積每日(RV/日)封頂(capped)。

#### *用於接種密度評估的50-mL離心管分批再補料模型*

【0156】 當其細胞密度達到 $25 \times 10^6$ 活細胞/mL、 $50 \times 10^6$ 活細胞/mL和 $100 \times 10^6$ 活細胞/mL時從種子罐N-1生物反應器移出培養物的等分試樣，並隨後在10 mL的工作體積中以三種不同的接種密度一式三份接種入50-mL離心管(TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland)： $0.5 \times 10^6$ 活細胞/mL、 $2.5 \times 10^6$ 活細胞/mL或 $5.0 \times 10^6$ 活細胞/mL。再補料一日進行一次，因為連續灌注不可能在此規模進行。藉由從溫育器移出離心管，以1100 RPM離心細胞5分鐘，移出上清液然後添加新鮮培養基以重懸細胞在第1日開始進行再補料。再補料策略經設計以在不同的接種密度條件下提供相同的CSPR。將所有旋轉管以 $37^\circ\text{C}$ 的溫度、160 RPM的搖動速率、相對於檯面(benchttop) 45度的搖動角度、80%相對濕度和5%的 $\text{CO}_2$ 濃度維持在Multitron

II震盪溫育器(HT Infors, Bottmingen, Switzerland)中。

### 生產生物反應器

【0157】 為了模擬圖1中顯示的500-L生產生物反應器，使用具有20  $\mu\text{m}$ 燒結噴霧器以控制40%的溶氧的ATF4灌注裝置(Refine Technology, Pine Brook, NJ)，以灌注模式操作工作體積為10 L的15-L生物反應器(Broadley-James Corporation, Irvine, CA)並通過1-mm鑽孔噴霧器添加氮氣以控制120 mmHg以下的溶解的 $\text{CO}_2$ 水準。藉由添加0.5 M碳酸鈉將pH保持在6.85以上。藉由蠕動泵添加10%消泡溶液(FoamAway, Life Technologies, Grand Island, NY)以控制泡沫水準。

【0158】 從種子容器以低密度( $0.5 \times 10^6$ 活細胞/mL)接種一組生產生物反應器，其以分批模式操作。灌注在第1日以0.5 RV/日開始並每日增加0.5 RV/日直至達到2 RV/日灌注速率。當密度達到 $50 \times 10^6$ 活細胞/mL時，從N-1 15-L灌注種子容器以高密度( $5.0 \times 10^6$ 活細胞/mL)接種另一組生產反應器。由於高接種密度，在接種後立即以2 RV/日開始灌注。對於所有生產生物反應器，使用線上電容感測器和抽動泵(bleed pump)將活細胞密度控制在 $40 \times 10^6$ 活細胞/mL。所有生產生物反應器操作50日。

### 分析方法

【0159】 使用ViCell XR細胞活力分析儀(Beckman Coulter, Brea, CA)確定活細胞密度。使用RAPIDLab Blood氣體分析儀(Siemans, Tarrytown, NY)測量離線pH和 $\text{pCO}_2$ 。藉由專有的光度酶活性測定法測量蛋白質生產力。

### 結果和討論

【0160】 圖3顯示這些實施例中所述的例示性種子罐培養方法的活細胞密度生長概貌，包括分批Wave培養和N-1灌注培養。分批2-L和20-L Wave培養物的持續時間分別為8日和5日。將N-1灌注生物反應器操作12日並達到



110 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL的最終活細胞密度和> 98%的細胞活力。活細胞密度在第9日達到50 x 10<sup>6</sup>細胞/mL，其為以5 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL (來自50-L N-1生物反應器)接種500-L生物反應器所需的細胞密度。

【0161】 對於N-1生物反應器，灌注在第2日起始並使用線上電容探針控制以隨著細胞密度增加而自動增加補料速率從而維持0.2 nL/細胞/日的CSPR。此灌注速率控制策略的成功取決於電容探針準確估計活細胞密度的能力。此策略僅使用至第7日，因為灌注速率以4 RV/日封頂，但探針能夠準確估計整個運作時間中至第12日達到110 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL時的密度(圖4)。

【0162】 使用小規模離心管模型以評估N-1細胞密度對於生產生物反應器中細胞生長的影響。當細胞密度分別為25 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL、50 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL或100 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL時，從N-1 生物反應器去除培養物的樣品。將這些分成三個等分試樣，用新鮮培養基稀釋至0.5 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL、2.5 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL或5 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL，然後一式三份接種入離心管(模擬(modeling)灌注生產生物反應器)。當培養物分成它們各自的接種密度時，由於達到的稀釋度直到第1日才進行每日再補料。基於離心管的接種密度調節再補料速率以允許每個接種密度條件在相應的細胞密度經歷相同的CSPR。

【0163】 細胞計數和活力概貌示於圖5-7並經繪製以使在每個接種密度可在N-1密度條件之間進行比較。因為離心管模型中的最大灌注速率為1 RV/日，因此培養物僅生長至20 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL以使CSPR匹配於灌注生物反應器模型。對於測試的所有三種接種密度，在不同的N-1密度條件之間沒有可觀察到的生長差異。

【0164】 為了研究N-1密度和接種密度對於生產生物反應器細胞生長和生產力的作用，將生物反應器以來自50 x 10<sup>6</sup>個活細胞/mL的N-1生物反應器的5.0 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL接種，並與以來自2.5 x 10<sup>6</sup>活細胞/mL的N-1生物

反應器的 $0.5 \times 10^6$ 個活細胞/mL接種的生物反應器相比較。兩種條件的細胞生長是可比較的，如圖8中所示。對於兩種接種條件在50日運行中細胞活力保持90%以上。圖9顯示累積的生產力對積分的(integrated)活細胞密度(作圖)並指示不同條件之間類似的比生產速率。最值得注意的是， $40 \times 10^6$ 活細胞/mL的穩態細胞密度(圖8)和純化所需的效價對於高接種密度條件早達到4-5日。

**【0165】** 本文所述的例示性種子罐培養方法具有經濟的和操作的兩種優勢。例如，對於50-日運作時間，以 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL接種500-L灌注生產物反應器使生長期持續時間減少4-5日，使生產力增加10%。此外，N-1灌注生物反應器能夠達到 $100 \times 10^6$ 活細胞/mL，並可理論上以 $10 \times 10^6$ 活細胞/mL接種500-L生物反應器，進一步減少生長期持續時間(例如，總共減少5-6日)。

**【0166】** 本文所述的例示性種子罐培養方法還可用於接種以分批或補料分批模式操作的生產物反應器。對於使用500-L生物反應器的21-日補料分批細胞培養方法， $5.0 \times 10^6$ 活細胞/mL的接種密度可使生產物反應器持續時間減少25%。總之，這可允許每年額外的5-6批，使製造生產力增加25%-30%。

**【0167】** 在大多數情況中，分批和補料-分批(fed-batch)方法通常使用比用於灌注方法的那些大得多的生產物反應器，這需要大規模不銹鋼生物反應器中的幾個種子罐培養階段。圖2顯示用於接種10,000-L生物反應器的常規種子罐培養方法的實施例，與使用具有ATF灌注裝置的50-L N-1生物反應器的種子罐培養方法相比。使用本文所述的例示性種子罐培養方法，50-100  $\times 10^6$ 活細胞/mL的50-L N-1生物反應器能夠以 $0.25 \times 10^6$ 活細胞/mL至 $0.50 \times 10^6$ 活細胞/mL接種10,000-L生物反應器，從而消除兩個中間的種子罐

細胞培養階段。

**【0168】** 此實施例中所述的資料證明涉及HD細胞儲庫 (cell banking)、可丟棄的單次使用的生物反應器技術和N-1生物反應器階段的灌注培養的例示性種子罐培養方法。本文提供的種子罐培養方法藉由減少小規模培養階段的數目降低了常規種子罐培養方法的複雜性。此實施例中所述的資料顯示在N-1階段使用灌注培養可在12日實現多至 $100 \times 10^6$ 活細胞/mL的活細胞密度而無損進一步擴增步驟後的培養生長特性。基於這些資料，本文所述的例示性種子罐培養方法可用於以 $5 \times 10^6$ 活細胞/mL的細胞密度接種500-L生產生物反應器以將至穩態細胞密度的時間減少4-5日並在50日運行的總生產力方面提供10%的增加。對於需要較大的(如10,000-L)生產生物反應器的分批或補料分批方法，本文提供的種子罐培養方法可藉由在N-1階段使用單個50-L灌注生物反應器而從擴增過程消除1-2個階段。

**【符號說明】**

無

**【生物材料寄存】**

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

**【序列表】**(請換頁單獨記載) 無

## 申請專利範圍

1. 一種產生重組蛋白質之方法，其包括：
  - (a) 將多個重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第一培養基中處理以提供第一細胞培養物；
  - (b) 分批培養該第一細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL；
  - (c) 將一體積的步驟(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應器內所包含的第二培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL的第二細胞培養物；
  - (d) 灌注培養該第二細胞培養物至細胞密度範圍為約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $120 \times 10^6$ 細胞/mL；
  - (e) 將一體積的步驟(d)的第二細胞培養物在生產生物反應器內所包含的第三培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL的生產細胞培養物；
  - (f) 在允許該重組哺乳動物細胞分泌重組蛋白質的條件下灌注培養生產細胞培養物；並
  - (g) 從該生產細胞培養物收穫所述重組蛋白質。
2. 如請求項1的方法，其中(a)中處理該多個重組哺乳動物細胞包括：  
將凍結的細胞庫解凍；並  
將一體積的解凍的細胞庫在該第一培養基中處理。
3. 如請求項1的方法，其中(a)中處理該多個重組哺乳動物細胞包括將一體積的包含該多個重組哺乳動物細胞的第三細胞培養物在該第一培養基中處理。

4. 如請求項3的方法，其進一步包括：
  - (1) 將多個該重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第四培養基中處理以提供該第三細胞培養物；
  - (2) 分批培養(1)的第三細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，其中將一體積的(2)中的第三細胞培養物在(a)中的第一細胞培養基中處理。
5. 如請求項4的方法，其中(1)中處理該多個重組哺乳動物細胞包括：  
將凍結的細胞庫解凍；並  
將一體積的解凍細胞庫在該第四培養基中處理。
6. 如請求項1的方法，其中：
  - (a)中該第一細胞培養物具有約1.0 L至約50 L的體積範圍；
  - (c)中該第二細胞培養物具有約5 L至約600 L的體積範圍；及/或
  - (e)中該生產細胞培養物具有約50 L至約20,000 L的體積範圍。
7. 如請求項1的方法，其中：
  - (a)中該容器具有約1.5 L至約100 L的內部體積範圍；
  - (c)中該灌注生物反應器具有約7.5 L至約1,000 L的內部體積範圍；及/或
  - (e)中該生產生物反應器具有約150 L至約25,000 L的內部體積範圍。
8. 如請求項1的方法，其中：
  - (e)中該初始細胞密度範圍是約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL；及/或
  - (e)中該初始細胞密度為穩態生產細胞密度的至少10%。
9. 如請求項8的方法，其中該穩態生產細胞密度是約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^6$ 細胞/mL。

10. 如請求項8或9的方法，其中步驟(f)中灌注培養得到生產細胞培養物，其在約1日至約10日的時間達到該穩態生產細胞密度。
11. 一種產生及分離重組蛋白質的方法，其包括：
  - (a) 將多個重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第一培養基中處理以提供第一細胞培養物；
  - (b) 分批培養該第一細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL；
  - (c) 將一體積的(b)的第一細胞培養物在灌注生物反應器內所包含的第二培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL的第二細胞培養物；
  - (d) 灌注培養該第二細胞培養物至細胞密度範圍為約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $60 \times 10^6$ 細胞/mL；
  - (e) 將一體積的(d)的第二細胞培養物在生產生物反應器內所包含的第三培養基中處理，以提供具有初始細胞密度範圍為約 $0.25 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL的生產細胞培養物；
  - (f) 在允許該重組哺乳動物細胞分泌重組蛋白質的條件下灌注培養生產細胞培養物；
  - (g) 從該生產細胞培養物收穫該重組蛋白質；並
  - (h) 從該生產細胞培養物之第三培養基中分離該重組蛋白質。
12. 如請求項11的方法，其中(a)中處理該多個重組哺乳動物細胞包括：
  - 將凍結的細胞庫解凍；並
  - 將一體積的解凍細胞庫在該第一培養基中處理。
13. 如請求項11的方法，其中(a)中處理該多個重組哺乳動物細胞包括將一體積的包含該多個重組哺乳動物細胞的第三細胞培養物在該第一培養基

中處理。

14. 如請求項13的方法，其進一步包括：

(1) 將多個該重組哺乳動物細胞在容器內所包含的第四培養基中處理以提供該第三細胞培養物；

(2) 分批培養(1)的第三細胞培養物至細胞密度範圍為約 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $5.0 \times 10^6$ 細胞/mL，

其中將一體積的(2)中的第三細胞培養物在(a)中的第一細胞培養基中處理。

15. 如請求項14的方法，其中(1)中處理該多個重組哺乳動物細胞包括：

將凍結的細胞庫解凍；並

將一體積的解凍細胞庫在該第四培養基中處理。

16. 如請求項11的方法，其中(a)中該第一細胞培養物具有約1.0 L至約50 L的體積範圍。

17. 如請求項11的方法，其中：

(a)中該容器具有約1.5 L至約100 L的內部體積範圍；

(c)中該灌注生物反應器具有約7.5 L至約1,000 L的內部體積範圍；及/或

(e)中該生產生物反應器具有約150 L至約25,000 L的內部體積範圍。

18. 如請求項11的方法，其中：

(e)中該初始細胞密度範圍是約 $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $8 \times 10^6$ 細胞/mL；及/或

(e)中該初始細胞密度為穩態生產細胞密度的至少10%。

19. 如請求項18的方法，其中該穩態生產細胞密度是約 $5 \times 10^6$ 細胞/mL至約 $50 \times 10^6$ 細胞/mL。

20. 如請求項18或19的方法，其中(f)中灌注培養得到生產細胞培養物，其在

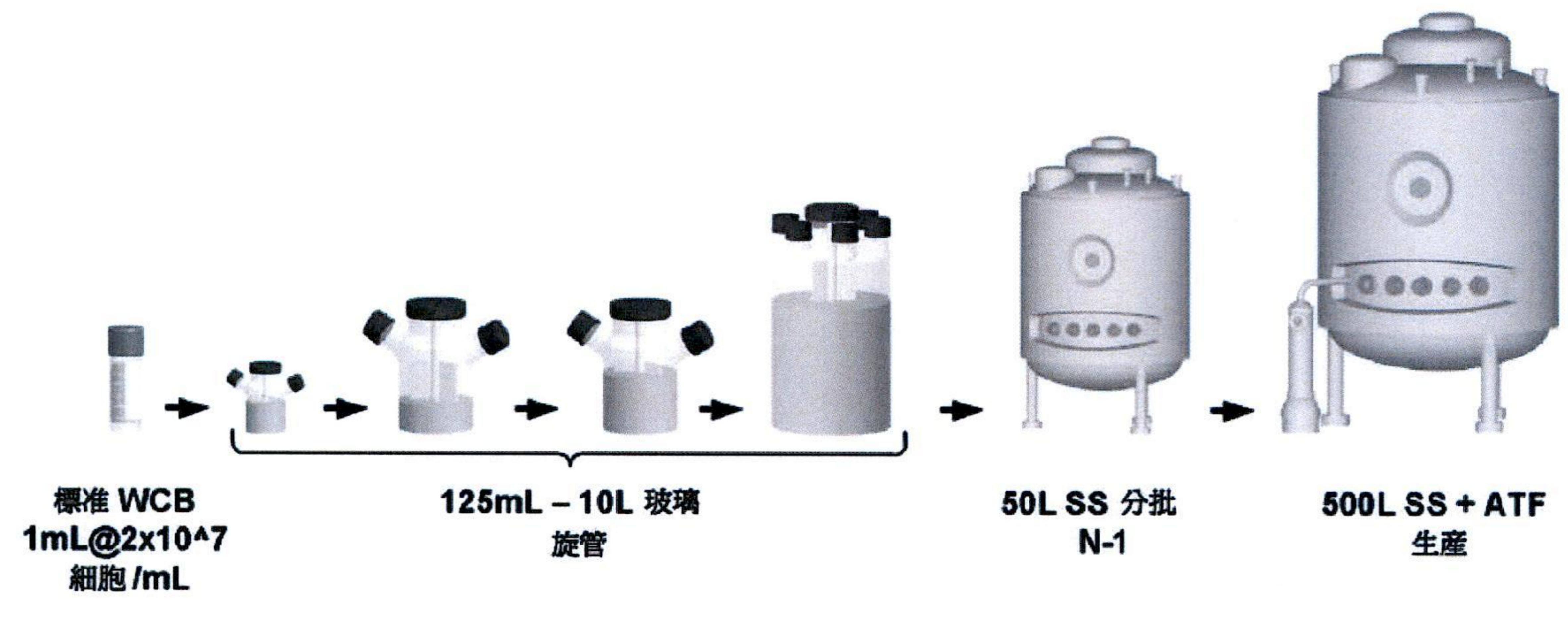
約1日至約10日的時間達到該穩態生產細胞密度。

21. 如請求項11的方法，其中分離使用整合及連續的方法進行。
22. 如請求項11的方法，其進一步包括將步驟(h)分離的重組蛋白質配製入藥劑中。



# 圖式

常規的種子罐培養方法：



本文提供的例示性種子罐培養方法：

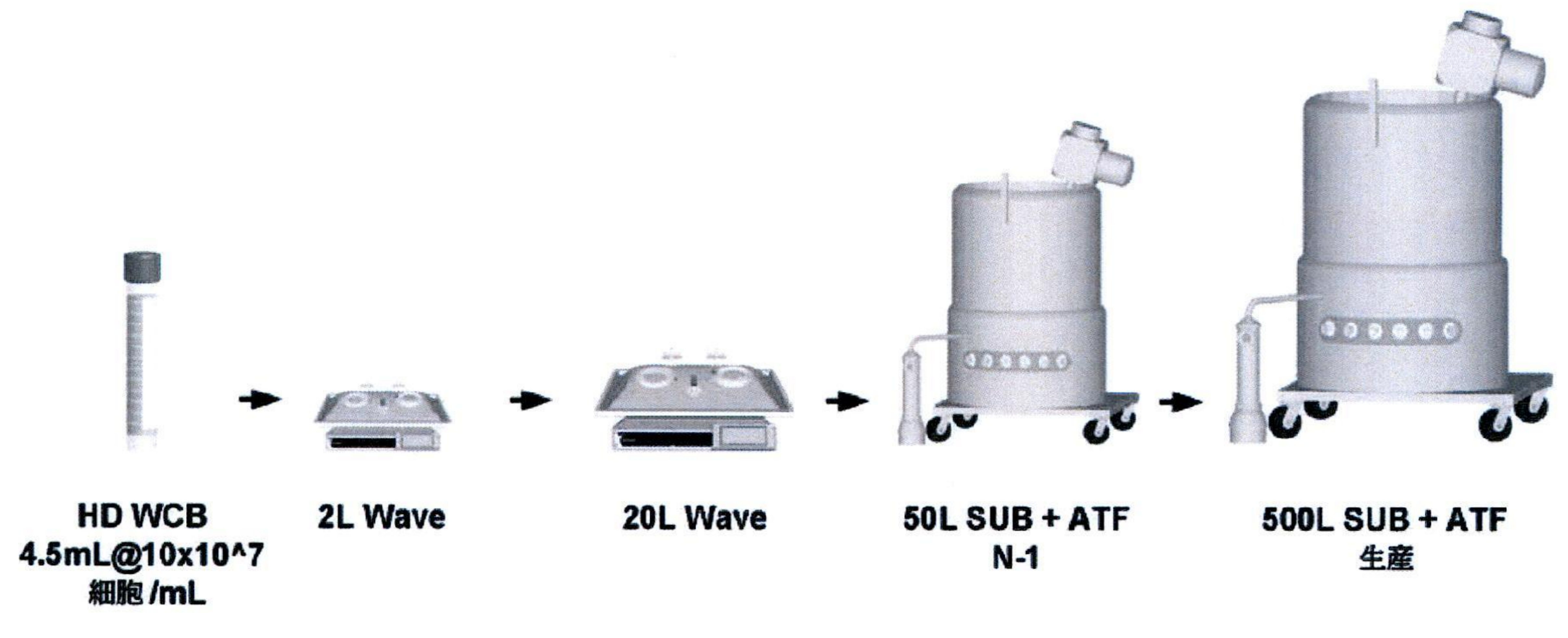
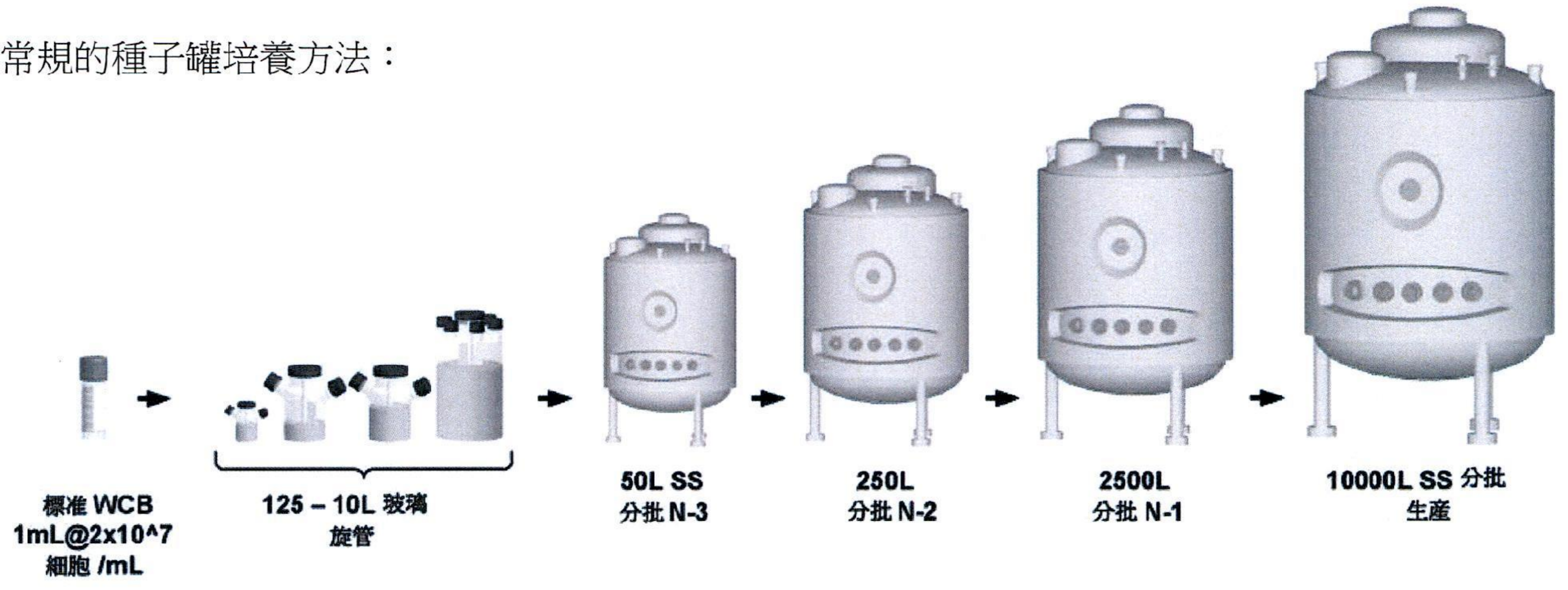


圖 1

常規的種子罐培養方法：



本文提供的例示性種子罐培養方法：

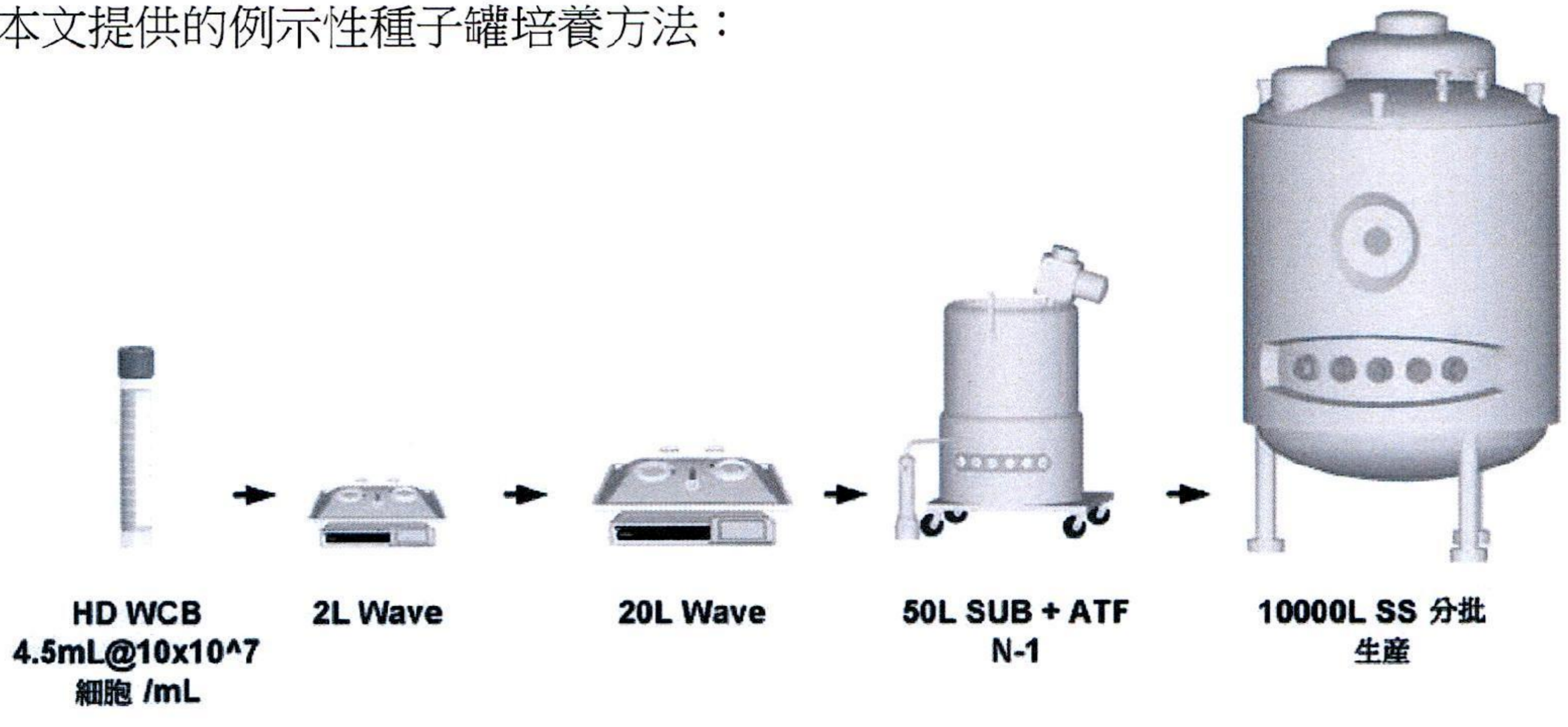


圖 2

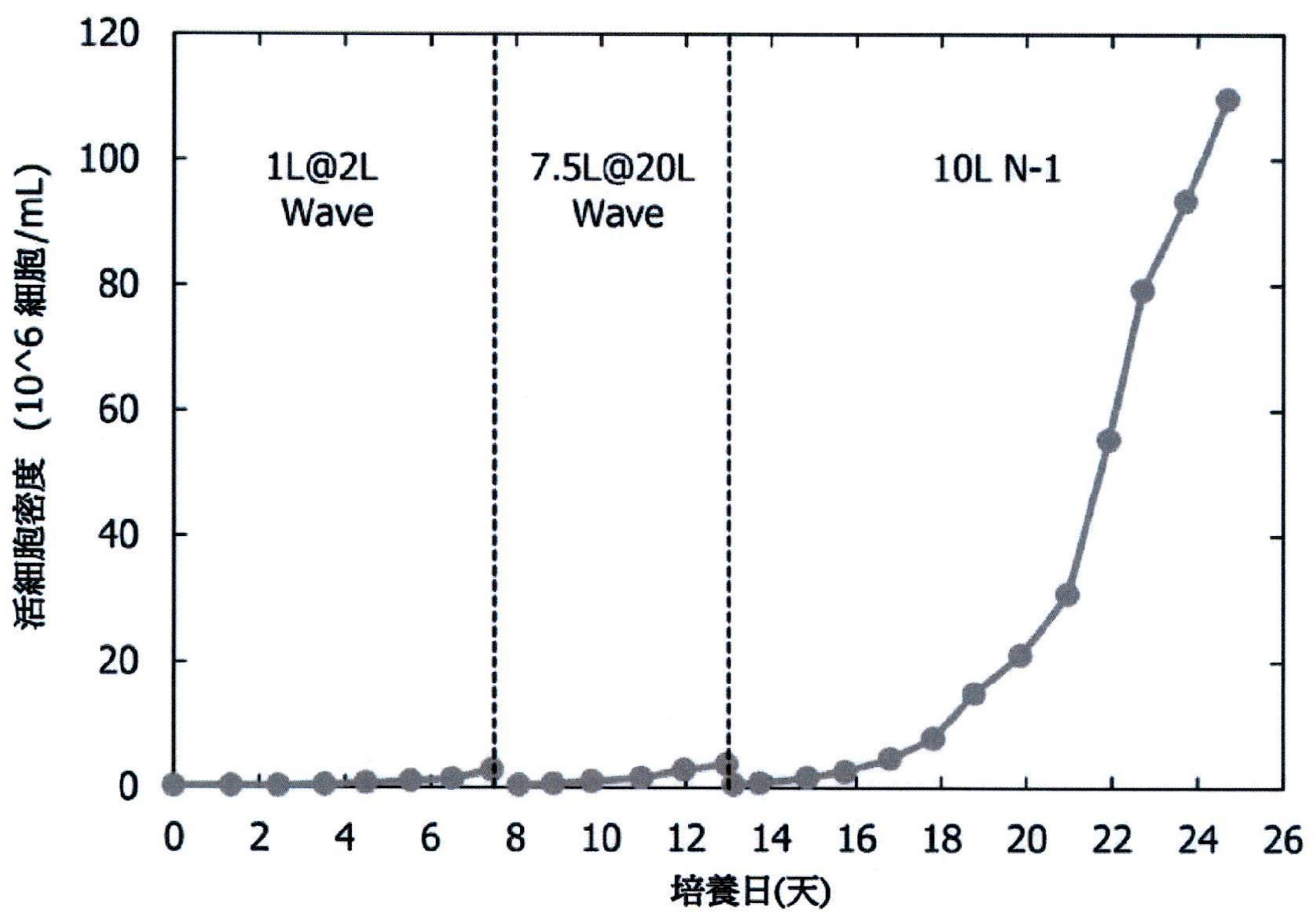


圖 3

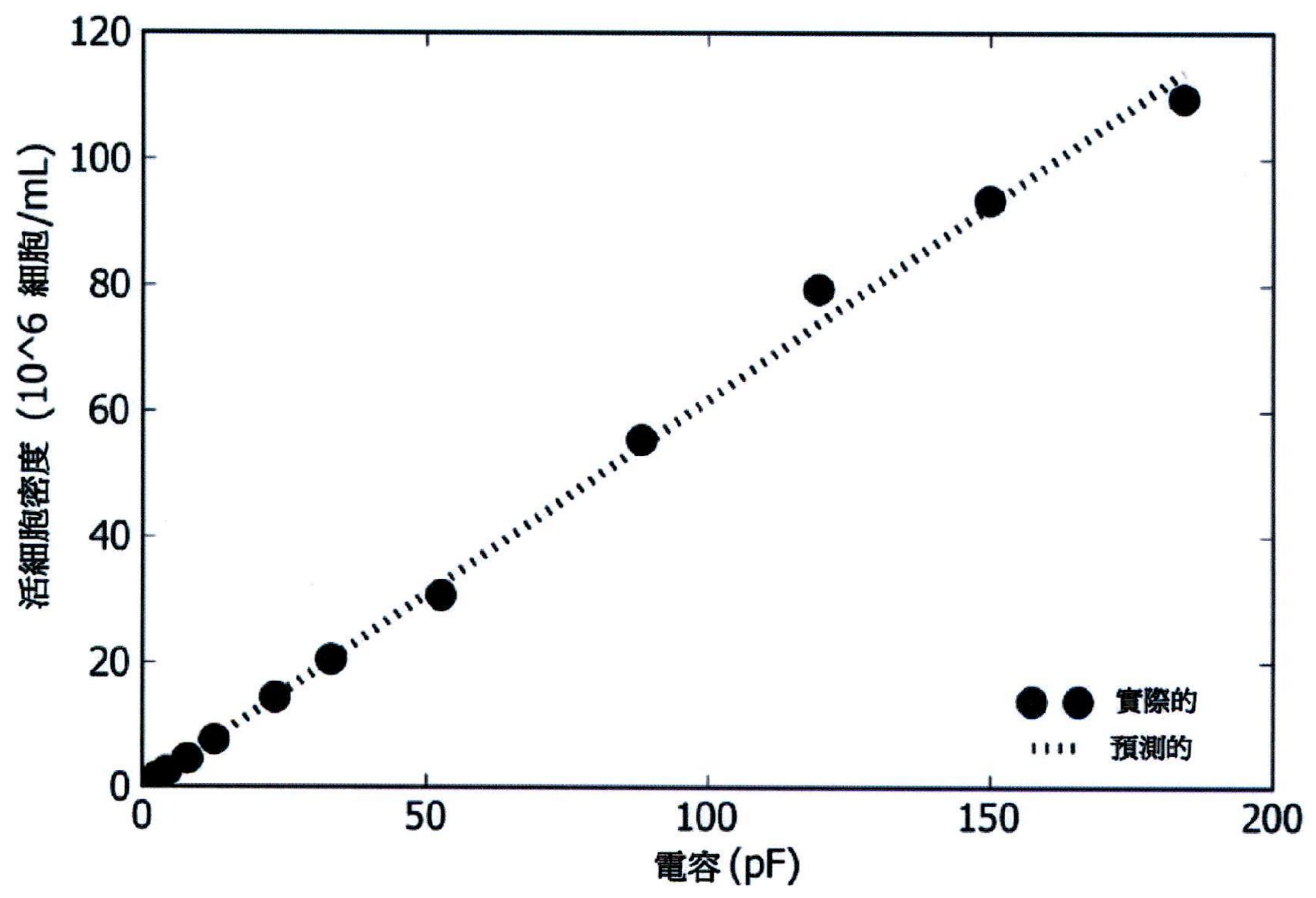


圖 4

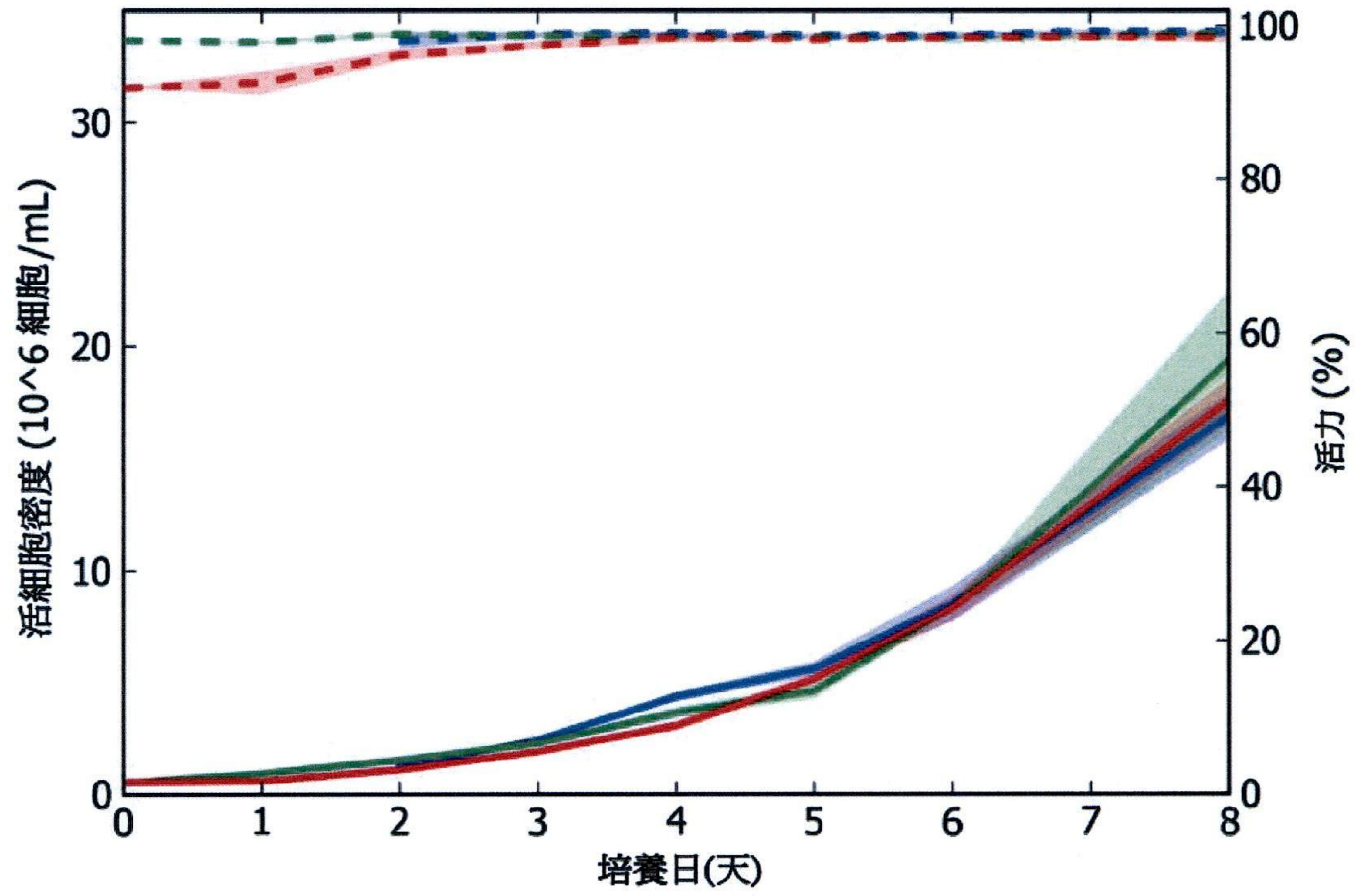


圖 5

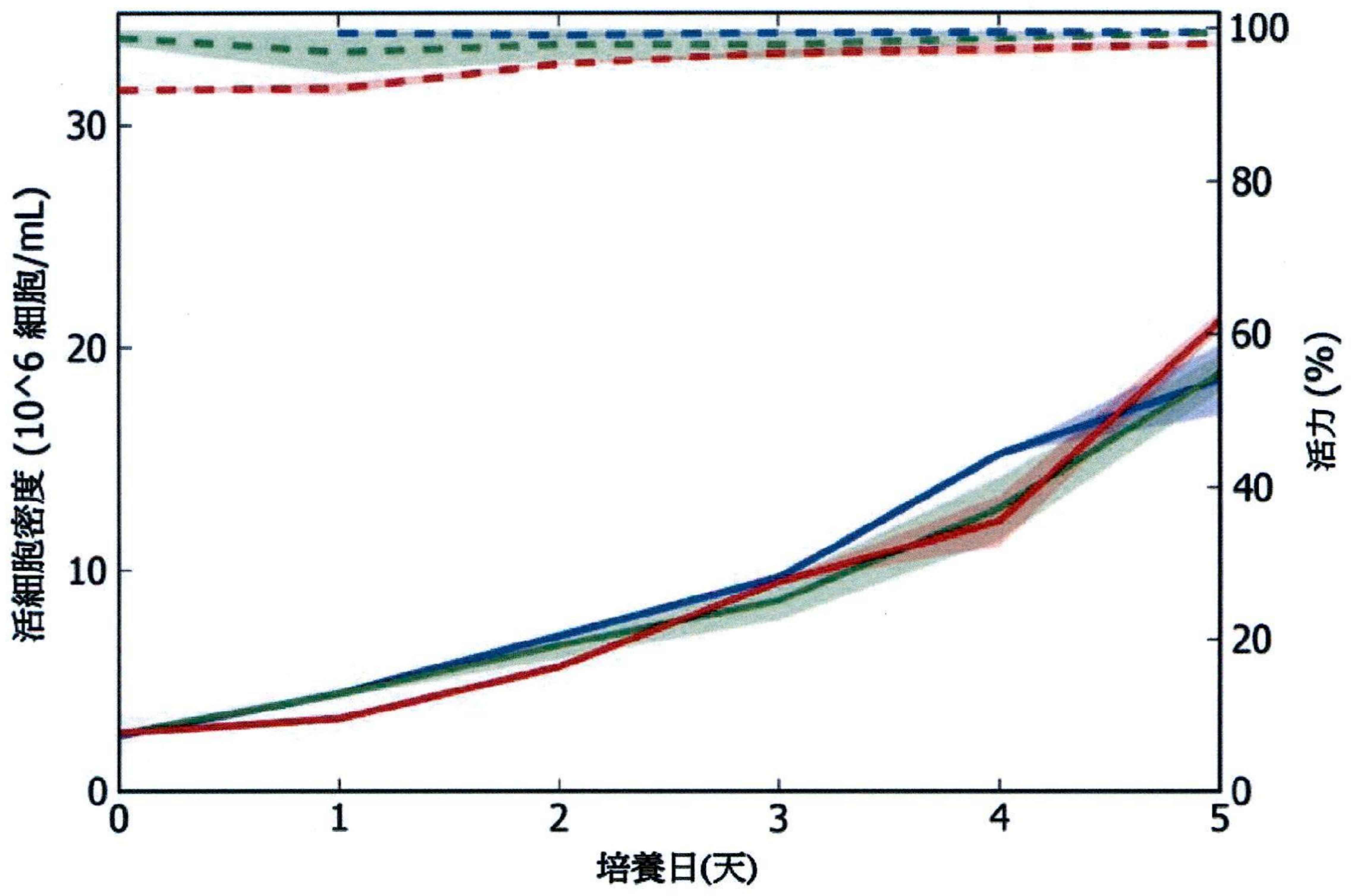


圖 6

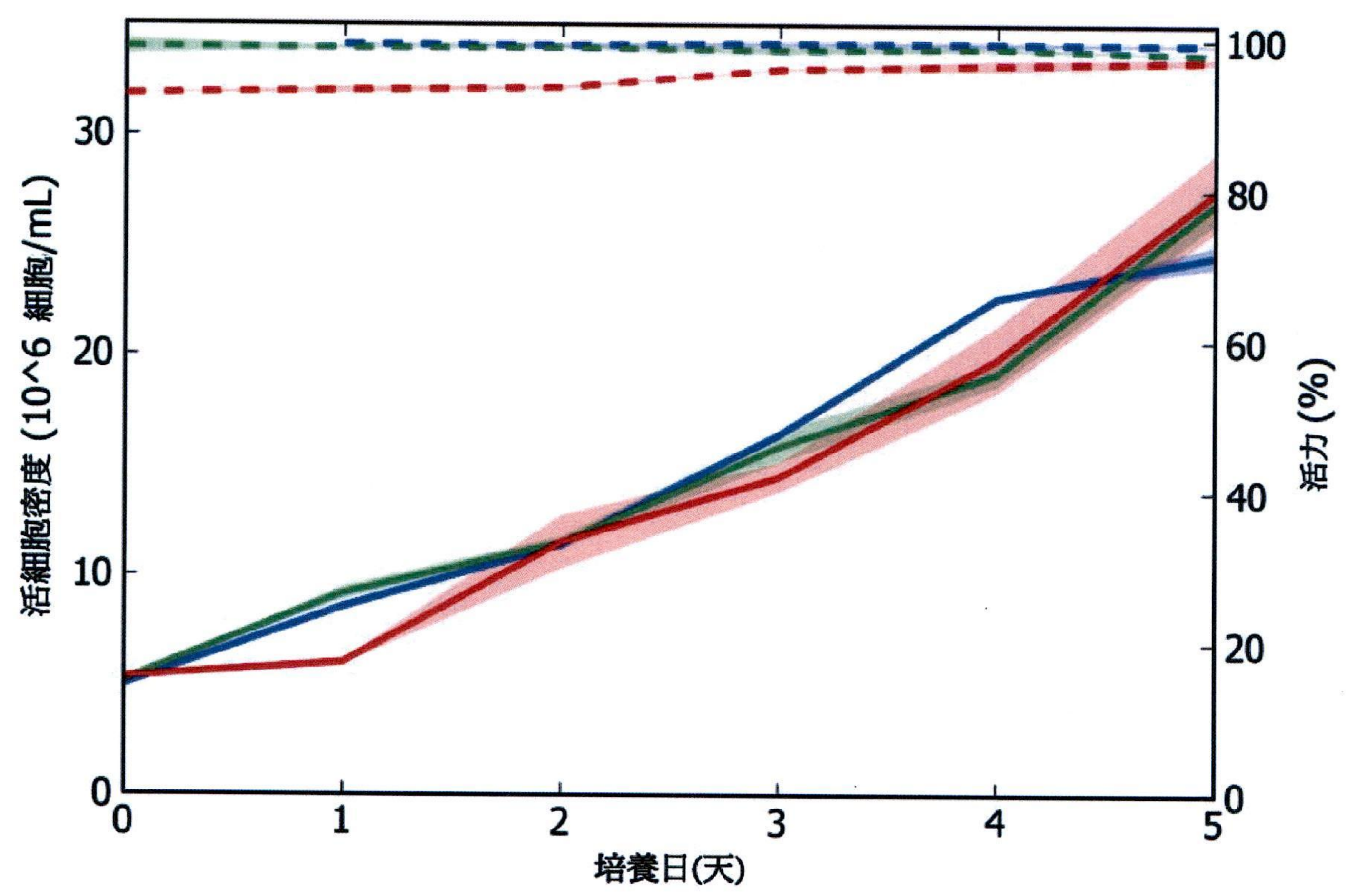


圖 7

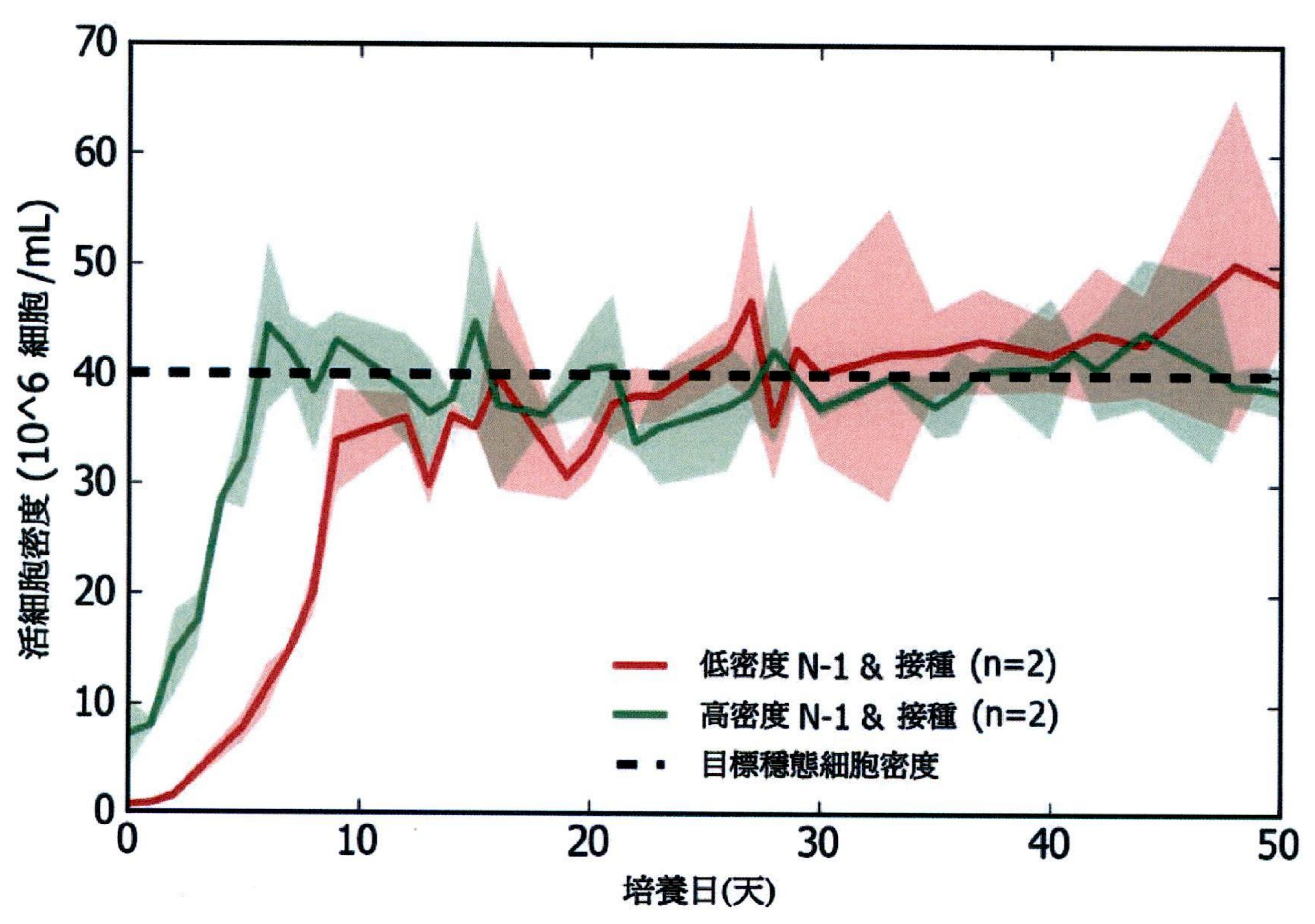


圖 8

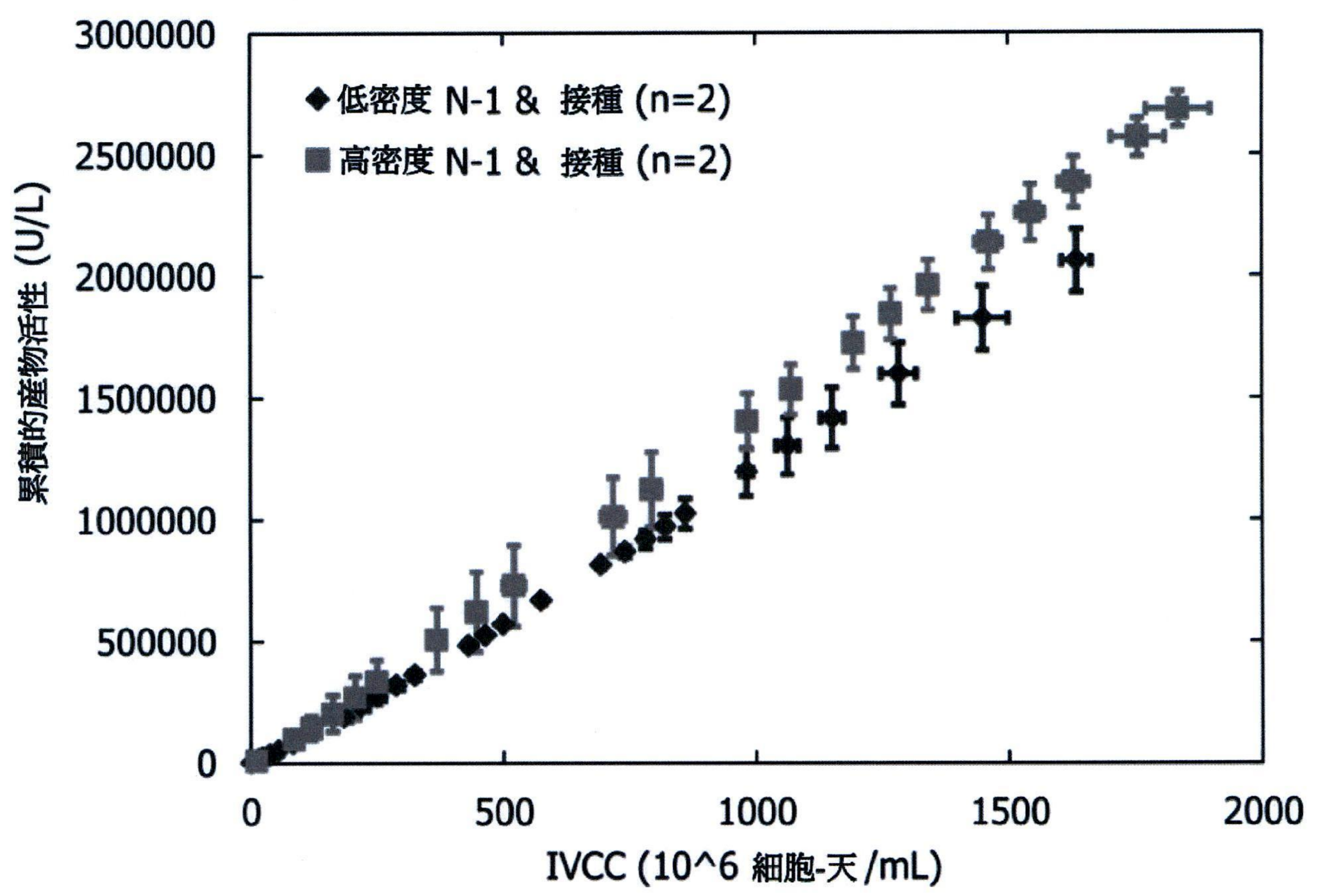


圖 9