



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2016152238, 05.06.2015

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
06.06.2014 US 62/009,058

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2018 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 09.01.2017(86) Заявка РСТ:
US 2015/034494 (05.06.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/188106 (10.12.2015)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Автор(ы):

ВИЛЛИДЖЕР-ОБЕРБЕК Агата (US),**ЯН Цзяньго (US),****ЯН Ян (US),****ЛОРНЗО Габриэль (US)****(54) СПОСОБЫ ПЕРФУЗИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ****(57) Формула изобретения**

1. Способ культивирования клетки млекопитающего, при этом способ предусматривает:

обеспечение многолуночного планшета, содержащего по меньшей мере одну лунку, содержащую клетку млекопитающего, помещенную в первую жидкую культуральную среду, причем первая жидкая культуральная среда занимает от приблизительно 5% до приблизительно 70% объема лунки;

инкубирование многолуночного планшета в течение некоторого периода времени при от приблизительно 31 до 40°C и с перемешиванием вращением со скоростью от приблизительно 320 оборотов в минуту (об./мин.) до приблизительно 500 об./мин; и непрерывно или периодически, в течение этого периода времени, удаление первого объема первой жидкой культуральной среды и добавление к первой жидкой культуральной среде второго объема второй жидкой культуральной среды, причем первый и второй объемы являются приблизительно равными.

2. Способ по п. 1, где клетка млекопитающего содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок, и при этом способ дополнительно предусматривает извлечение рекомбинантного белка из клетки млекопитающего или из первой или второй культуральной среды.

3. Способ по п. 2, дополнительно предусматривающий:

выявление рекомбинантного белка в клетке млекопитающего или в первой или

второй жидкой культуральной среде; и

сравнение количества рекомбинантного белка, находящегося в клетке млекопитающего или в первой или второй жидкой культуральной среде, с эталонным уровнем рекомбинантного белка.

4. Способ по п. 3, где эталонный уровень рекомбинантного белка представляет собой уровень рекомбинантного белка, получаемый при применении другого способа культивирования.

5. Способ по п. 1 или 3, где первый объем первой жидкой культуральной среды по существу не содержит клеток млекопитающих.

6. Способ по п. 1 или 3, где первый объем удаляемой первой жидкой культуральной среды и второй объем добавляемой второй жидкой культуральной среды увеличивают с течением времени.

7. Способ по п. 1 или 3, где:

многолуночный планшет инкубируют в течение периода времени более 7 дней, а в 1-3 день инкубации, в каждый 24-часовой период, первый объем удаляемой первой жидкой культуральной среды и второй объем добавляемой второй жидкой культуральной среды составляют от приблизительно 30% до приблизительно 50% объема первой жидкой культуральной среды;

в 4-6 день инкубации, в каждый 24-часовой период, первый объем удаляемой первой жидкой культуральной среды и второй объем добавляемой второй жидкой культуральной среды составляют от приблизительно 40% до приблизительно 70% объема первой жидкой культуральной среды; и

в 7 день и при дальнейшей инкубации, в каждый 24-часовой период, первый объем удаляемой первой жидкой культуральной среды и второй объем добавляемой второй жидкой культуральной среды составляют от приблизительно 90% до приблизительно 150% объема первой жидкой культуральной среды.

8. Способ по п. 1 или 3, где многолуночный планшет представляет собой планшет с глубокими лунками.

9. Способ по п. 1 или 3, где:

диаметр дна лунки составляет от приблизительно 6,0 до приблизительно 35 мм; высота лунки составляет от приблизительно 12 до приблизительно 50 мм; или лунка имеет объем от приблизительно 1 до приблизительно 18 мл.

10. Способ по п. 1 или 3, где клетку млекопитающего суспендируют в от приблизительно 150 мкл до приблизительно 15 мл первой культуральной среды.

11. Способ по п. 1 или 3, где спустя приблизительно первые 24-48 часов периода времени, в каждый 24-часовой период, первый объем удаляемой первой жидкой культуральной среды и второй объем добавляемой второй жидкой культуральной среды составляют от приблизительно 30% до приблизительно 150% объема первой жидкой культуральной среды.

12. Способ по п. 1 или 3, где многолуночный планшет плотно закрывают одноразовой газопроницаемой мембраной или газопроницаемым слоем из силикона.

13. Способ по п. 1 или 3, где лунка имеет плоское дно или круглое дно.

14. Способ по п. 1 или 3, где в результате способа плотность жизнеспособных клеток составляет от 15×10^6 до 60×10^6 клеток/мл в лунке.

15. Способ культивирования клетки млекопитающего, при этом способ предусматривает:

культивирование в процессе градиентной перфузии клетки млекопитающего, суспензированной в жидкой культуральной среде, помещенной в лунку многолуночного планшета, в условиях, обеспечивающих в среде силу сдвига текучей среды и концентрацию растворенного кислорода (O_2), которые, по сути, являются такими же,

как и таковые, достигаемые в среде, занимающей от приблизительно 15% до приблизительно 25% объема лунки с квадратным дном, имеющей диаметр от приблизительно 6,0 до приблизительно 35 мм и высоту от приблизительно 40 до приблизительно 50 мм, при инкубировании лунки с квадратным дном при температуре от приблизительно 31 до приблизительно 40°C и перемешивании вращением с частотой от приблизительно 320 оборотов в минуту (об./мин.) до приблизительно 360 об./мин.

16. Способ по п. 15, где клетка млекопитающего содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный белок, и при этом способ дополнительно предусматривает извлечение рекомбинантного белка из клетки млекопитающего или жидкой культуральной среды.

17. Система в виде многолуночного планшета для культур клеток, содержащая: сплошную опорную подставку, содержащую первую поверхность, содержащую множество отверстий;

множество сосудов для культивирования, расположенных в опорной подставке, и при этом они выполнены с возможностью размещения культур клеток, имеющих объем от приблизительно 200 мкл до приблизительно 18 мл, где каждое отверстие соединено с каждым сосудом для культивирования и определяет границы входа в него, и где каждый сосуд для культивирования дополнительно содержит по меньшей мере один канал, выполненный с возможностью регулирования потока текучей среды в сосуд для культивирования и/или из него.

18. Система в виде многолуночного планшета для культур клеток по п. 17, где сосуд для культивирования содержит по меньшей мере первый и второй каналы, где первый канал выполнен с возможностью регулирования одностороннего потока текучей среды в сосуд для культивирования, а второй канал выполнен с возможностью регулирования одностороннего потока текучей среды из сосуда для культивирования.

19. Система в виде многолуночного планшета для культур клеток по п. 17, где канал содержит фильтр, выполненный с возможностью избирательного предотвращения вливания клеток в сосуд для культивирования и выливания клеток из него.

20. Система в виде многолуночного планшета для культур клеток по п. 17, дополнительно содержащая по меньшей мере одну трубку, помещенную в сплошную опорную подставку и находящуюся в жидкостном соединении с каналом, при этом трубка выполнена с возможностью вливания текучей среды в сосуд для культивирования и/или выливания текучей среды из него.