



(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 I557228 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：101115255

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 04 月 27 日

(51)Int. Cl. : *C12N5/10 (2006.01)* *C12N5/02 (2006.01)*
C07K16/24 (2006.01) *C01G45/06 (2006.01)*
C07H3/02 (2006.01)

(30)優先權：2011/04/27 美國 61/479,727

(71)申請人：艾伯維有限公司(美國) ABBVIE INC. (US)

美國

(72)發明人：班吉 葛洛雷利 BENGEE, GORNELIA (RO)；瑞菲斯 麗莎 RIVES, LISA (US)；
 豪司樂 派翠克 HOSSLER, PATRICK (US)；麥德莫特 西恩 MCDERMOTT,
 SEAN (US)；沃爾夫 貝瑞 WOLF, BARRY (US)；雍 路易斯 YUNG, LEWIS
 (US)；任 曉貝 ZENG, XIAOBEI (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Gramer MJ et al., "Modulation of antibody galactosylation through feeding of uridine, manganese chloride, and galactose", Biotechnol Bioeng. 2011 Jul;108(7):1591-602. Epub 2011 Feb 18.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：35 項 圖式數：27 共 101 頁

(54)名稱

控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法

METHODS FOR CONTROLLING THE GALACTOSYLATION PROFILE OF RECOMBINANTLY-EXPRESSED PROTEINS

(57)摘要

本發明係關於調節重組表達蛋白質之糖基化輪廓之方法。詳言之，本發明係關於藉由向生產培養基(例如基於水解產物之培養基或化學成分確定之培養基)中補充錳及/或 D-半乳糖來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法。

The present invention relates to methods for modulating the glycosylation profile of recombinantly-expressed proteins. In particular, the present invention relates to methods of controlling the galactosylation profile of recombinantly-expressed proteins by supplementing production medium, e.g., a hydrolysate-based or a chemically defined medium, with manganese and/or D-galactose.

指定代表圖：

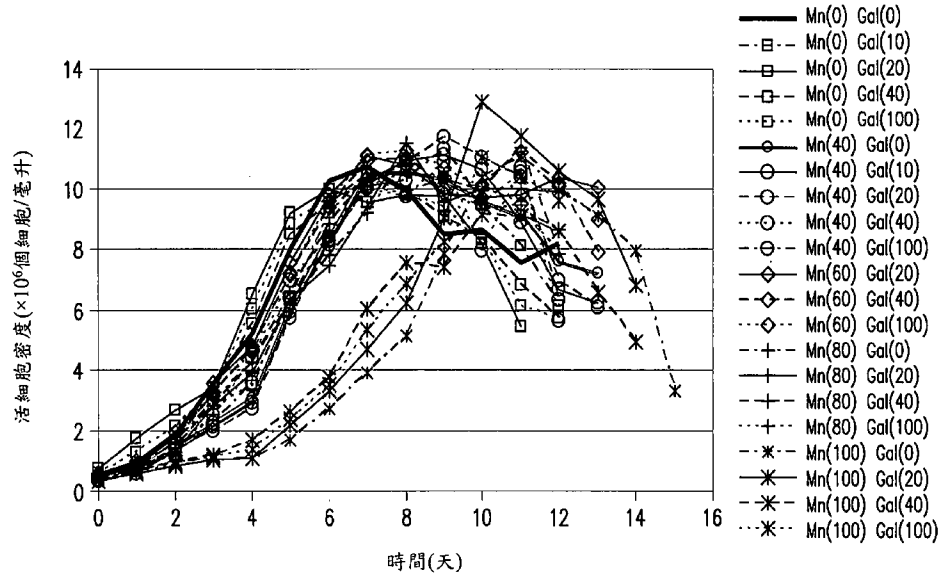


圖 1A

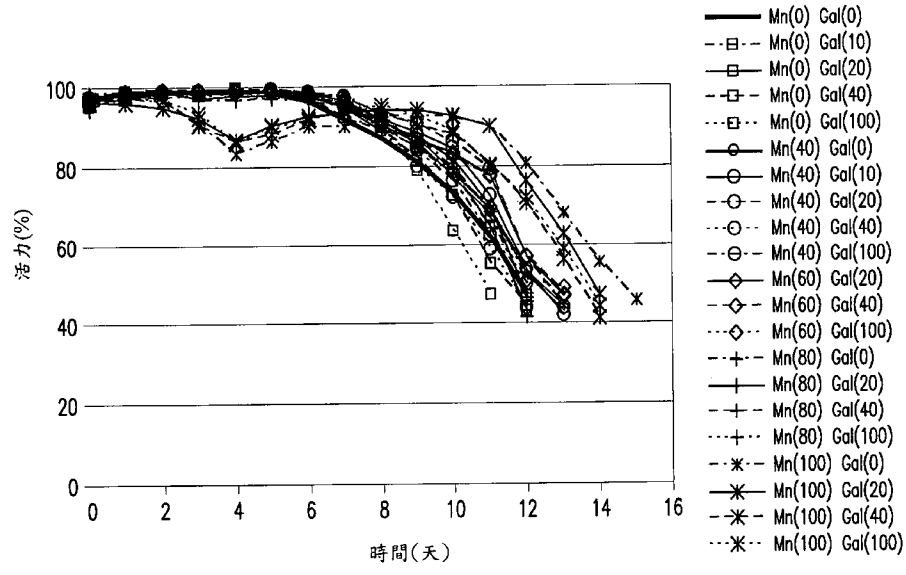


圖 1B

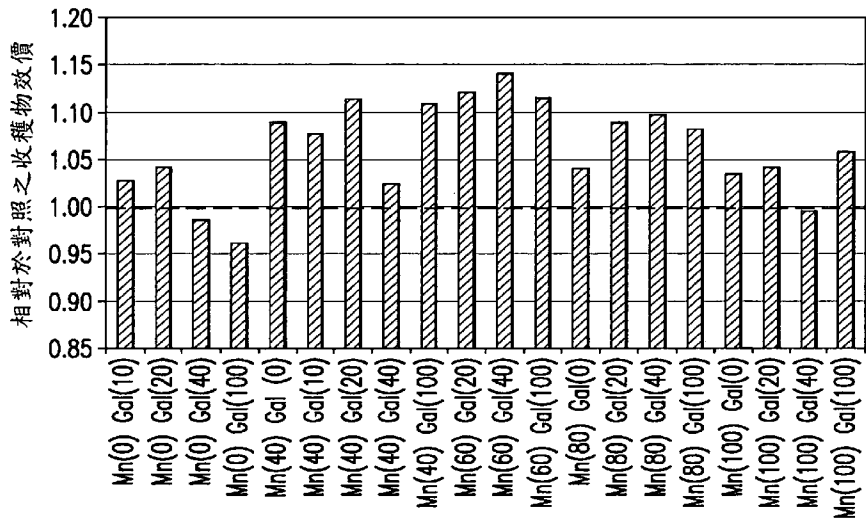


圖 1C

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101115255

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

※申請日：101.4.27

※IPC 分類：C07K 16/24 (2006.01)

C01G 45/06 (2006.01)

C07H 3/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法

METHODS FOR CONTROLLING THE GALACTOSYLATION
PROFILE OF RECOMBINANTLY-EXPRESSED PROTEINS

二、中文發明摘要：

本發明係關於調節重組表達蛋白質之糖基化輪廓之方法。詳言之，本發明係關於藉由向生產培養基(例如基於水解產物之培養基或化學成分確定之培養基)中補充錳及/或D-半乳糖來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to methods for modulating the glycosylation profile of recombinantly-expressed proteins. In particular, the present invention relates to methods of controlling the galactosylation profile of recombinantly-expressed proteins by supplementing production medium, e.g., a hydrolysate-based or a chemically defined medium, with manganese and/or D-galactose.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於調節重組表達蛋白質之糖基化輪廓之方法。詳言之，本發明係關於藉由向生產培養基中補充錳及/或半乳糖來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法。

本申請案主張2011年4月27日申請之美國臨時申請案第61/479,727號之權利，該案亦以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

將特定類型生產培養基(例如基於水解產物之培養基或化學成分確定之培養基(「CD」或「CDM」)用於產生重組蛋白質之CHO細胞培養物可增強細胞生長及目標蛋白質生產。然而，在不同CD或基於水解產物之培養基中產生之重組蛋白質之產物品質輪廓可呈現較大差異。在某些情況下，此可變性可引起非半乳糖基岩藻糖基化二觸角寡糖NGA2F+NGA2F-GlcNAc之分率增加及含有半乳糖之岩藻糖基化二觸角寡糖NA1F+NA2F之分率減少。此量值之重組蛋白質之糖基化輪廓之位移較顯著，因為該等位移可致使目標蛋白質之所得生產批量不符合認可之加工規格。

【發明內容】

本發明係關於調節重組表達蛋白質之糖基化輪廓之方法。詳言之，本發明係關於藉由向生產培養基中補充錳及/或半乳糖來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方

法。在某些實施例中，生產培養基為基於水解產物之培養基或CD培養基。

在某些實施例中，本發明係關於控制重組表達抗體之半乳糖化輪廓之方法。在某些實施例中，重組表達抗體為抗-TNF α 抗體。在某些實施例中，重組表達抗-TNF α 抗體為阿達木單抗(adalimumab)。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充錳及/或半乳糖來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法。在某些實施例中，錳補充劑可呈任何生物學上可接受之錳鹽形式，例如(但不限於)氯化錳(II)。在某些實施例中，半乳糖補充劑可呈任何生物學上可接受之含半乳糖化合物形式，例如(但不限於)D-(+)-半乳糖。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充足量錳及/或含錳補充劑以在生產培養基中達成以下錳濃度來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：至少約0.1 μ M、至少約0.2 μ M、至少約0.5 μ M、至少約1.0 μ M、至少約10 μ M、至少約20 μ M、至少約25 μ M、至少約40 μ M、至少約50 μ M、至少約60 μ M、至少約75 μ M、至少約80 μ M或至少約100 μ M，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。在某些實施例中，本發明係關於藉由

向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充充足半乳糖及/或含半乳糖補充劑以在生產培養基中達成以下半乳糖濃度來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：至少約1 mM、至少約4 mM、至少約5 mM、至少約10 mM、至少約15 mM、至少約20 mM、至少約30 mM、至少約40 mM、至少約60 mM或至少約100 mM，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充充足錳及/或含錳補充劑及充足半乳糖及/或含半乳糖補充劑以在生產培養基中達成至少約以下錳(Mn)及半乳糖(Gal)濃度(以Mn(μ M)/Gal(mM)表示)來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：0/1、0/4、0/5、0/10、0/15、0/20、0/30、0/40、0/60、0/100、0.1/0、0.2/0、0.5/0、1.0/0、10/0、20/0、25/0、40/0、50/0、75/0、80/0、100/0、0.2/1、0.2/4、0.2/30、0.5/1、0.5/4、0.5/30、10/10、10/20、10/40、20/10、20/20、20/40、25/15、40/10、40/20、40/40、40/100、50/30、60/20、60/40、60/100、80/20、80/40、80/100、100/20、100/40、100/100，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或

約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充充足錳及/或含錳補充劑及充足半乳糖及/或含半乳糖補充劑以在生產培養基中達成至少約以下錳(Mn)及半乳糖(Gal)濃度(以Mn(μ M)/Gal(mM)表示)來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：0.2/1、0.2/4、0.2/30、0.5/1、0.5/4、0.5/30、10/10、10/20、10/40、20/10、20/20、20/40、25/15、40/10、40/20、40/40、40/100、50/30、60/20、60/40、60/100、80/20、80/40、80/100、100/20、100/40、100/100，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。

【實施方式】

本發明係關於調節重組表達蛋白質之糖基化輪廓之方法。詳言之，本發明係關於藉由向生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充錳及/或半乳糖來控制(例如調節)重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法。舉例而言但並非作為限制，本發明證實，向化學成分確定之培養基中補充特定範圍之錳及/或半乳糖濃度可用於微調CHO及NSO細胞株中產生之單株抗體之半乳糖化輪廓。類似地，向基於水解產物之培養基中單獨補充半乳糖時，可隨濃度變化之方式有效調節CHO細胞株中產生之單株抗體

阿達木單抗之半乳糖化輪廓。鑒於該等研究結果，本文中揭示之方法可用於藉由控制細胞培養基中之錳及/或半乳糖含量來調節重組蛋白質之半乳糖含量。本文中所描述之研究亦顯示，經由實施本發明之方法得到之半乳糖化輪廓變化不僅與規模(1.5 L相對於200 mL)及製程(於控制生物反應器環境中分批補料相對於搖瓶中分批進行)無關，而且觀測到在大部分研究條件下對培養物生長及生產力無顯著影響。

在氯化錳存在下，藉由 β -半乳糖轉移酶向NGA2F中添加末端半乳糖，以產生NA1F(在添加單一末端半乳糖情況下)或NA2F(在添加兩個末端半乳糖分子情況下)。此半乳糖轉移酶介導之反應使用UDP-半乳糖作為糖受質且使用 Mn^{2+} 作為半乳糖轉移酶輔因子。因此，不受理論約束，咸信呈N-連接之寡糖NGA2F分率增加及NA1F+NA2F N-連接之寡糖分率減少形式之蛋白質均質性變化可由受質(UDP-半乳糖)量不足、半乳糖轉移酶輔因子(Mn^{2+})量不足或兩者引起。

在某些實施例中，本發明係關於控制重組表達抗體之半乳糖化輪廓之方法。在某些實施例中，重組表達抗體為抗-TNF α 抗體。在某些實施例中，重組表達抗-TNF α 抗體為阿達木單抗。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充錳及/或半乳糖來控制重組表達蛋白質之半

乳糖化輪廓之方法。在某些實施例中，錳補充劑可呈任何生物學上可接受之錳鹽形式，例如(但不限於)氯化錳(II)。在某些實施例中，半乳糖補充劑可呈任何生物學上可接受之含半乳糖化合物形式，例如(但不限於)D-(+)-半乳糖。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充足量錳及/或含錳補充劑以在生產培養基中達成至少約以下錳濃度來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：至少約0.1 μM 、至少約0.2 μM 、至少約0.5 μM 、至少約1.0 μM 、至少約10 μM 、至少約20 μM 、至少約25 μM 、至少約40 μM 、至少約50 μM 、至少約60 μM 、至少約75 μM 、至少約80 μM 或至少約100 μM ，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充充足半乳糖及/或含半乳糖補充劑以在生產培養基中達成至少約以下半乳糖濃度來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：至少約1 mM、至少約4 mM、至少約5 mM、至少約10 mM、至少約15 mM、至少約20 mM、至少約30 mM、至少約40 mM、至少約60 mM或至少約100 mM，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之

生產培養基)。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充充足錳及/或含錳補充劑及充足半乳糖及/或含半乳糖補充劑以在生產培養基中達成至少約以下錳(Mn)及半乳糖(Gal)濃度(以Mn(μ M)/Gal(mM)表示)來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：0/1、0/4、0/5、0/10、0/15、0/20、0/30、0/40、0/60、0/100、0.1/0、0.2/0、0.5/0、1.0/0、10/0、20/0、25/0、40/0、50/0、75/0、80/0、100/0、0.2/1、0.2/4、0.2/30、0.5/1、0.5/4、0.5/30、10/10、10/20、10/40、20/10、20/20、20/40、25/15、40/10、40/20、40/40、40/100、50/30、60/20、60/40、60/100、80/20、80/40、80/100、100/20、100/40、100/100，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。

在某些實施例中，本發明係關於藉由向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充充足錳及/或含錳補充劑及充足半乳糖及/或含半乳糖補充劑以在生產培養基中達成至少約以下錳(Mn)及半乳糖(Gal)濃度(以Mn(μ M)/Gal(mM)表示)來控制重組表達蛋白質之半乳糖化輪廓之方法：0.2/1、0.2/4、0.2/30、0.5/1、0.5/4、0.5/30、10/10、10/20、10/40、20/10、20/20、20/40、25/15、40/10、40/20、40/40、

40/100、50/30、60/20、60/40、60/100、80/20、80/40、80/100、100/20、100/40、100/100，其中使用該生產培養基稀釋不含補充劑之無補充劑細胞培養物生長培養基，稀釋比率為約1:4或約1:5(無補充劑生長培養基：經補充之生產培養基)。

在某些實施例中，向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充錳但不補充半乳糖。對於實例1中之搖瓶研究(但不作為限制)，向生產 IVGN CDM GIA-1 中添加錳但不添加半乳糖使 NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%至9%且使 NA1F+NA2F總量增加8%至9%(圖3、4及5)。由於在約100 μ M下觀測到生長抑制，因此未在實驗設計中探索錳濃度之進一步增加。

在某些實施例中，向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充半乳糖但不補充錳。對於實例1中之搖瓶研究(但不作為限制)，向生產 IVGN CDM GIA-1 中僅添加半乳糖使 NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低3%至7%且使 NA1F+NA2F總量增加3%至7%(圖3、4及5)。該等研究結果表明，約100 μ M錳濃度及約100 mM半乳糖濃度表示此實例1之最大相關範圍。

在某些實施例中，向用於生產重組表達蛋白質之生產培養基(例如基於水解產物之培養基或CD培養基)中補充錳與半乳糖。舉例而言但不作為限制，實例1中概述之結果表

明，與不向生產培養基中添加錳或半乳糖之對照條件相比，向生產IVGN CDM GIA-1中添加錳與半乳糖之組合引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量顯著降低11%至26%且NA1F+NA2F總量相應顯著增加13%至23%(圖3、4及5)。組合添加氯化錳及半乳糖對生產IVGN CDM GIA-1中阿達木單抗之半乳糖化之調節作用為協同的。詳言之，與單獨添加錳或半乳糖相比，組合添加氯化錳及半乳糖可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低較大百分比且使NA1F+NA2F總量增加較大百分比，且其個別作用相累加。舉例而言但不作為限制，單獨添加40 μ M氯化錳使NGA2F總量降低6%，且單獨添加40 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%。然而，組合添加該等相同濃度(亦即40 μ M錳+40 mM半乳糖)之氯化錳及半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低18%，比其個別對NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低之貢獻之總和高6%。吾人將此作用定義為協同作用且在整個本發明中保持此定義。在組合添加100 μ M氯化錳及100 mM半乳糖情況下觀測到約26%之最大百分比的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低。在組合添加60 μ M氯化錳及100 mM半乳糖時記錄約23%之最大百分比的NA1F+NA2F總量增加。

對於實例1中描述之分批補料生物反應器研究，研究兩種氯化錳與半乳糖之組合，且結果表明，NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及NA1F+NA2F總量相應增加與規模(1.5 L相對於200 mL)及製程(受控生物反應器環境中分批補料相

對於搖瓶中分批進行)無關。舉例而言但不作為限制，與對照培養物相比，向生產基本 CDM GIA-1 與補料 CDM JCL-5 中組合添加 40 μ M 氯化錳及 20 mM 半乳糖使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低 26% 且使 NA2F+NA2F 總量增加 27%(圖 6)。除補充 40 μ M 濃度錳以外，亦使半乳糖濃度進一步增加至 40 mM，引起 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量再降低 3% 且 NA1F+NA2F 總量相應增加 3%。

在某些實施例中，本發明係關於向用於生產重組表達蛋白質之 CD 培養基中補充半乳糖及/或錳。由實例 2 中概述之結果證明該補充對不同 CD 培養基均有效。特定言之，實例 2 之結果表明，向生產 CDM HyClone CDM4CHO 中單獨添加 0 至 40 μ M 範圍內之氯化錳可以濃度依賴性方式使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低最多 5%(圖 8)。亦達成相當的最大 NA1F+NA2F 總量增加(4%)。單獨添加至多 40 mM 最大濃度之半乳糖可引起 6% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 6% 之 NA1F+NA2F 總量增加。亦在補充有氯化錳與半乳糖之生產 CDM HyClone CDM4CHO 培養物中觀測到半乳糖化調節。在補充有氯化錳與半乳糖之培養物中觀測到累加作用。組合添加氯化錳及半乳糖可使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及使 NA1F+NA2F 總量增加與單獨添加錳或半乳糖情況下相當的百分比，且其個別作用相累加(圖 9)。舉例而言但不作為限制，單獨添加 40 μ M 氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低 5% 且單獨添加 40 mM 半乳糖使 NGA2F 總量降低 6%。組合添加該等相同

濃度(亦即 40 μ M 錳+40 mM 半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低 12%。吾人將此作用定義為累加作用且在整個本發明中保持此定義。在補充有 40 μ M 氯化錳及 40 mM 半乳糖之培養物中觀測到 12% 之最大百分比的 NGA2F 總量降低及相應 11% 之 NA1F+NA2F 總量增加。

在某些實施例中，本發明係關於向用於生產重組表達蛋白質之基於水解產物之培養基中補充半乳糖及/或錳。舉例而言，如實例 3 中概述，向基於水解產物之生產培養基中單獨添加 0 至 40 μ M 範圍內之氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低約 1%，但該變化在寡糖分析法可變性範圍內(圖 11)。單獨添加至多 40 mM 最大濃度之半乳糖可引起 4% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 4% 之最大 NA1F+NA2F 總量增加。該等藉由單獨添加半乳糖達成之寡糖輪廓變化與向基於水解產物之培養基中添加半乳糖與氯化錳之組合時記錄之變化相當。舉例而言，向基於水解產物之培養基中組合添加 0 至 40 μ M 範圍內之氯化錳及 0 至 40 mM 範圍內之半乳糖引起約 5% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 3% 之 NA1F+NA2F 總量增加(圖 12)。在補充有 40 mM 半乳糖及 20 μ M 或 40 μ M 氯化錳之培養物中觀測到 5% 之最大百分比的 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 4% 之 NA1F+NA2F 總量增加。

本發明之組合物及方法亦適用於不同細胞株。舉例而言但不作為限制，實例 4 中描述之研究說明，向 CD 培養基

GIA-1中補充半乳糖及/或錳可有效調節使用不同於實例1-3中所用之CHO細胞株產生之阿達木單抗之半乳糖化。舉例而言但不作為限制，當使用該替代性細胞株時，向生產CDM GIA-1中單獨添加0至20 μM 範圍內之氯化錳可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低(以濃度依賴性方式)及使NA1F+NA2F總量增加約相同百分比。在添加20 μM 氯化錳情況下觀測到22%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應23%之最大NA1F+NA2F總量增加(圖14)。類似地，在單獨添加0至20 mM範圍內之半乳糖情況下觀測到NGA2F+NGA2F-GlcNac總量之濃度依賴性降低及相應NA1F+NA2F總量增加。在添加20 mM半乳糖情況下觀測到9%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應10%之最大NA1F+NA2F總量增加。類似地，關於在藉由向GIA-1培養基中組合添加氯化錳及半乳糖而經補充之培養物中產生之阿達木單抗的寡糖輪廓，觀測到累加作用(圖15)。舉例而言但不作為限制，單獨添加10 μM 氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低18%且單獨添加10 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%。組合添加該等相同濃度之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低24%。在補充有40 μM 氯化錳及20 mM半乳糖之培養物中觀測到35%之最大百分比NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應37%之NA1F+NA2F總量增加。

由實例5之結果進一步證明本發明之組合物及方法亦適用於不同細胞株，實例5使用不同於實例1-4任一產生阿達

本單抗之細胞株的第三種產生阿達木單抗之細胞株。舉例而言但不作為限制，當使用該第三種細胞株時，向生產CDM GIA-1中單獨添加0至1 μM 範圍內之氯化錳可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低(以濃度依賴性方式)及使NA1F+NA2F總量增加約相同百分比。在添加1 μM 氯化錳情況下觀測到26%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及相應28%之NA1F+NA2F寡糖增加(圖17)。向生產CDM GIA-1中單獨添加30 mM濃度半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低4%且使NA1F+NA2F總量增加3%。此外，當向生產基本培養基及補料培養基中同時補充氯化錳及半乳糖時，結果顯示針對NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及NA1F+NA2F寡糖增加之協同效益，此與實例1中顯示之結果一致(圖18)。舉例而言但不作為限制，在0.2 μM 氯化錳加30 mM半乳糖情況下，觀測到之25%的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低比在單獨添加0.2 μM 氯化錳(15%)及單獨添加30 mM半乳糖(4%)情況下所觀測之降低之總和高6%。類似地，所得NA1F+NA2F總量增加24%高於在單獨添加0.2 μM 氯化錳(16%)及單獨添加30 mM半乳糖(3%)情況下觀測之增加的總和。組合補充0.5 μM 氯化錳+30 mM半乳糖亦顯示，對在該第三種細胞株中產生之阿達木單抗之半乳糖化輪廓之協同作用。與對照條件相比，在向化學成分確定之GIA-1培養基中組合添加0.5 μM 氯化錳及30 mM半乳糖情況下觀測到34%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及相應34%之最大NA1F+NA2F寡糖增加。

由實例6之結果進一步證明本發明之組合物及方法亦適用於不同類型之細胞株，實例6使用不同於實例1-5之產生阿達木單抗之細胞株的第四種產生阿達木單抗之細胞株，其為NSO細胞株。舉例而言但不作為限制，當使用該NSO細胞株時，向生產CDM PFBM-3/PFFM-4中單獨添加0至0.5 μM 範圍內之氯化錳可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低(以濃度依賴性方式)及使NA1F+NA2F總量增加約相同百分比。在添加0.5 μM 氯化錳情況下觀測到18%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應20%之NA1F+NA2F總量增加(圖20)。然而，由於細胞毒性作用，未進一步探索大於0.5 μM 之錳劑量。類似地，在向生產CDM PFBM-3/PFFM-4中單獨添加0至10 mM範圍內之半乳糖情況下觀測到NGA2F+NGA2F-GlcNac總量之濃度依賴性降低及相應NA1F+NA2F總量增加。在添加10 mM半乳糖情況下觀測到14%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應15%之NA1F+NA2F總量增加。此外，在補充有氯化錳及半乳糖之生產CDM PFBM-3/PFFM-4中對NSO細胞株中產生之阿達木單抗之半乳糖化之調節的作用為協同的(圖21)。舉例而言但不作為限制，單獨添加0.2 μM 氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低12%，且單獨添加4 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低2%。然而，組合添加該等相同濃度(亦即0.2 μM 錳+4 mM半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低19%，比其個別貢獻之總和高5%。在組合添加0.5 μM 氯化錳及4 mM

半乳糖情況下觀測到約26%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應28%之NA1F+NA2F總量增加。

本發明之組合物及方法亦適用於生產多樣性抗體，如由實例7之結果證明，實例7使用產生不同於阿達木單抗之抗體的CHO細胞株。舉例而言但不作為限制，當生產該不同於阿達木單抗之抗體時，向生產CDM GIA-1中單獨添加0至40 μ M範圍內之氯化錳可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低最多26%(圖23)。亦達成相當的最大NA1F+NA2F總量增加(27%)。單獨添加至多40 mM最大濃度之半乳糖可以濃度依賴性方式引起12%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應13%之最大NA1F+NA2F總量增加。此外，與單獨添加任一組分相比，向生產CDM GIA-1中組合添加半乳糖及氯化錳可引起更大百分比的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應更大百分比的NA1F+NA2F總量增加(圖24)。舉例而言但不作為限制，單獨添加40 μ M氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低20%，且單獨添加40 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低12%。然而，組合添加該等相同濃度(亦即40 μ M錳+40 mM半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低27%。在補充有20 μ M氯化錳及20 mM半乳糖之培養物中觀測到32%之最大百分比的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應30%之NA1F+NA2F總量增加。

由實例8之結果進一步證明本發明之組合物及方法亦適用於生產多樣性抗體，實例8使用產生不同於阿達木單抗

與實例7之抗體之抗體的CHO細胞株。舉例而言但不作為限制，當生產該第三種抗體時，向生產CDM GIA-1中單獨添加0至75 μM 範圍內之氯化錳可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低最多18%(圖26)。亦達成相當的最大NA1F+NA2F總量增加(16%)。單獨添加至多60 mM最大濃度之半乳糖可引起12%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應11%之最大NA1F+NA2F總量增加。此外，當向基本培養基及補料培養基中同時補充氯化錳及半乳糖時，結果表明針對NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及NA1F+NA2F總量增加至少具有累加作用且有時具有協同作用(圖27)。在補充有25 μM 氯化錳及15 mM半乳糖之情況下觀測到協同作用。所觀測到之22%的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低比在單獨添加25 μM 氯化錳(10%)及單獨添加15 mM半乳糖(7%)情況下所觀測之降低之總和高5%。在補充有50 μM 氯化錳及30 mM半乳糖之情況下觀測到累加作用。所觀測之28%的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低與在單獨添加50 μM 氯化錳(18%)及單獨添加30 mM半乳糖(12%)情況下觀測之降低之總和相當。與對照條件相比，在向化學成分確定之GIA-1培養基中組合添加50 μM 氯化錳及30 mM半乳糖情況下觀測到28%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及相應25%之最大NA1F+NA2F總量增加。

儘管特別關於生產抗體，但以下描述概述可適用於生產其他重組表達蛋白質之一般技術。舉例而言，為表達重組抗體，將編碼部分或全長輕鏈及重鏈之核酸插入一或多個

表達載體中，使得基因可操作地連接至轉錄及轉譯控制序列(參見例如美國專利第6,914,128號，其整個教示以引用的方式併入本文中)。在此情形下，術語「可操作地連接」意謂抗體基因接合至載體中使得該載體內之轉錄及轉譯控制序列發揮其調節抗體基因轉錄及轉譯的預期功能。表達載體及表達控制序列經選擇以與所用表達宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入獨立載體中，或更通常將兩種基因插入同一表達載體中。藉由標準方法(例如接合抗體基因片段與載體上之互補限制性位點，或若不存在限制性位點，則鈍端接合(blunt end ligation))將抗體基因插入表達載體中。在插入抗體或抗體相關之輕鏈或重鏈序列之前，表達載體可能已攜帶抗體恆定區序列。舉例而言，一種使特定VH及VL序列轉化為全長抗體基因之方法為將其分別插入已編碼重鏈恆定區及輕鏈恆定區之表達載體中，使得VH區段可操作地連接至載體內之CH區段且VL區段可操作地連接至載體內之CL區段。或者或另外，重組表達載體可編碼促進自宿主細胞分泌抗體鏈之信號肽。可將抗體鏈基因選殖至載體中使得信號肽同框連接至抗體鏈基因之胺基末端。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即來自非免疫球蛋白之信號肽)。

除抗體鏈基因外，本發明之重組表達載體可攜帶一或多個控制抗體鏈基因在宿主細胞中之表達之調節序列。術語「調節序列」意欲包括啟動子、強化子及其他控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯之表達控制元件(例如聚腺苷酸化信

號)。該等調節序列描述於例如 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中，其整個教示以引用的方式併入本文中。熟習此項技術者將瞭解，表達載體之設計(包括調節序列之選擇)可視諸如待轉形宿主細胞之選擇、所需蛋白質之表達量等之因素而定。哺乳動物宿主細胞表達之適合調節序列包括引導蛋白質在哺乳動物細胞中高量表達之病毒元件，諸如來源於巨細胞病毒(CMV)之啟動子及/或強化子(諸如CMV啟動子/強化子)、猿病毒40(Simian Virus 40, SV40)(諸如SV40啟動子/強化子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多瘤病毒。關於病毒調節元件及其序列之進一步描述，參見例如 Stinski之美國專利第5,168,062號、Bell等人之美國專利第4,510,245號及 Schaffner等人之美國專利第4,968,615號，其整個教示均以引用的方式併入本文中。

除抗體鏈基因及調節序列外，本發明之重組表達載體可攜帶一或多個額外序列，諸如調節宿主細胞中載體之複製之序列(例如複製起點)及/或可選標記基因。可選標記基因促進已引入有載體之宿主細胞之選擇(參見例如 Axel等人之美國專利第4,399,216號、第4,634,665號及第5,179,017號，其整個教示均以引用的方式併入本文中)。舉例而言，可選標記基因通常賦予已引入有載體之宿主細胞對藥物(諸如G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤(methotrexate))之抗性。適合之可選標記基因包括二氫葉

酸還原酶(DHFR)基因(用於在dhfr-宿主細胞中進行甲胺喋呤選擇/擴增)及neo基因(用於G418選擇)。

本發明之抗體或抗體部分可藉由在宿主細胞中重組表達免疫球蛋白輕鏈及重鏈基因來製備。為重組表達抗體，用一或多個攜帶編碼抗體之免疫球蛋白輕鏈及重鏈之DNA片段的重組表達載體轉染宿主細胞，使得該等輕鏈及重鏈在宿主細胞中表達且分泌至培養宿主細胞之培養基中，可自該培養基回收抗體。使用標準重組DNA方法獲得抗體重鏈及輕鏈基因，將該等基因併入重組表達載體中且將載體引入宿主細胞中，諸如 Sambrook, Fritsch及 Maniatis(編)，Molecular Cloning; A Laboratory Manual，第二版，Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)；Ausubel 等人(編)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)及美國專利第4,816,397號及第6,914,128號中所描述之宿主細胞，其整個教示均以引用的方式併入本文中。

為表達輕鏈及重鏈，藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表達載體轉染至宿主細胞中。各種形式之術語「轉染」均意欲涵蓋將外源DNA引入原核或真核宿主細胞之多種常用技術，例如電致孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-聚葡萄糖轉染及其類似技術。雖然理論上在原核或真核宿主細胞中表達本發明之抗體皆為可能的，但宜在真核細胞(諸如哺乳動物宿主細胞)中表達抗體，因為該等真核細胞且尤其哺乳動物細胞比原核細胞更可能組裝及分泌適當摺疊且具免疫活

性之抗體。據報導，抗體基因之原核表達不能有效地以高產率生產活性抗體(Boss及Wood (1985) Immunology Today 6:12-13，其整個教示以引用的方式併入本文中)。

適用於在本文之載體中選殖或表達DNA之宿主細胞為如上所述之原核生物、酵母或高級真核生物細胞。適用於此目的之原核生物包括：真細菌(eubacteria)，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)生物體或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)，例如大腸桿菌(*E. coli*)；腸桿菌屬(*Enterobacter*)；伊文氏桿菌屬(*Erwinia*)；克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)；變形桿菌屬(*Proteus*)；沙門氏菌屬(*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)；沙雷氏菌屬(*Serratia*)，例如黏質沙雷菌(*Serratia marcescans*)；及志賀桿菌屬(*Shigella*)；以及芽孢桿菌屬(*Bacilli*)，諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)(例如於1989年4月12日公開之DD 266,710中所揭示之地衣芽孢桿菌41P)；假單胞菌屬(*Pseudomonas*)，諸如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。一種適合之大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌294(ATCC 31,446)，但諸如大腸桿菌B、大腸桿菌X1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌W3110(ATCC 27,325)之其他菌株亦為適合的。此等實例為例示性的而非限制性的。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物亦為適用於編碼多肽之載體的選殖或表達宿主。在低級真核宿

主微生物中最常使用釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通麵包酵母(baker's yeast)。然而，通常可獲得許多其他屬、種及株且其適用於本文中，諸如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；刻魯維拉菌(*Kluyveromyces*)宿主，諸如乳酸刻魯維拉菌(*K. lactis*)、脆壁刻魯維拉菌(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞刻魯維拉菌(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、魏氏刻魯維拉菌(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、瓦爾特刻魯維拉菌(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅刻魯維拉菌(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐熱刻魯維拉菌(*K. thermotolerans*)及馬克斯刻魯維拉菌(*K. marxianus*)；耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；念珠菌屬(*Candida*)；里氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)及麴菌屬(*Aspergillus*)宿主，諸如構巢麴菌(*A. nidulans*)及黑麴菌(*A. niger*)。

適用於表達糖基化抗體之宿主細胞係來源於多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別多種桿狀病毒株及變異體以及來自諸如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅

(*Droso-phila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的相應許可昆蟲宿主細胞。用於轉染之多種病毒株係公開可得，例如苜蓿丫紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且根據本發明，該等病毒可用作本文中之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛花(*petunia*)、番茄及菸草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

適用於表達本發明之重組抗體的哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括 Urlaub 及 Chasin, (1980) PNAS USA 77:4216-4220中描述之 dhfr-CHO細胞，與例如 Kaufman及 Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621中所述之 DHFR可選標記一起使用，該等文獻之整個教示均以引用的方式併入本文中)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。當將編碼抗體基因之重組表達載體引入哺乳動物宿主細胞中時，該等抗體係藉由將宿主細胞培養一段足以允許抗體在宿主細胞中表達或抗體分泌至宿主細胞生長之培養基中的時間來產生。適用之哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉形之猴腎CV1細胞株(COS-7，ATCC CRL 1651)；人類胎腎細胞株(293細胞或經次選殖以在懸浮培養物中生長之293細胞，Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；倉鼠仔腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞(Chinese hamster ovary cell)/-DHFR(CHO，Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠足細胞(TM4，Mather, Biol. Reprod. 23:243-251

(1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝腫瘤細胞株(Hep G2)，該等文獻之整個教示均以引用的方式併入本文中。

宿主細胞用上述用於產生抗體之表達或選殖載體轉形且培養於適當時經修飾以誘導啟動子、選擇轉形體或擴增編碼所需序列之基因的習知營養培養基中。

可在多種培養基中培養用於產生抗體之宿主細胞。諸如Ham's F10™(Sigma)、Minimal Essential Medium™(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及Dulbecco's Modified Eagle's Medium™((DMEM)，Sigma)之市售培養基適用於培養宿主細胞。此外，以下文獻中描述之任何培養基均可用作宿主細胞之培養基：Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem. 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號；WO 90/03430、WO 87/00195；或美國專利第Re. 30,985號，其整個教示均以引用的方式併入本文中。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為先前選

擇進行表達之宿主細胞所用的條件且為一般熟習此項技術者顯而易知。

宿主細胞亦可用於產生完整抗體之部分，諸如Fab片段或scFv分子。應理解，關於以上程序之變體在本發明之範疇內。舉例而言，在某些實施例中，可能需要用編碼本發明抗體之輕鏈或重鏈(但不同時編碼兩者)之DNA轉染宿主細胞。亦可使用重組DNA技術移除編碼未必為抗原結合所必需之輕鏈及重鏈中之任一者或兩者之一些或全部DNA。本發明抗體亦涵蓋由該等截短之DNA分子表達之分子。此外，可藉由以標準化學交聯方法使本發明抗體與第二抗體交聯來產生雙功能抗體，其中一條重鏈及一條輕鏈為本發明之抗體，而另一條重鏈及輕鏈對原始抗原以外的抗原具特異性。

在適於重組表達本發明抗體或其抗原結合部分之系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈與抗體輕鏈之重組表達載體引入dhfr-CHO細胞中。在重組表達載體中，抗體重鏈及輕鏈基因各自可操作地連接至CMV強化子/AdMLP啟動子調控元件，以驅動基因之高量轉錄。重組表達載體亦攜有DHFR基因，該基因允許使用甲胺喋呤選擇/擴增來選擇已經過載體轉染之CHO細胞。培養經選擇之轉形體宿主細胞，以允許表達抗體重鏈及輕鏈，且自培養基中回收完整抗體。使用標準分子生物學技術製備重組表達載體、轉染宿主細胞、選擇轉形體、培養宿主細胞及自培養基中回收抗體。

當使用重組技術時，抗體可於細胞內、周質間隙中產生或直接分泌至培養基中。在一個態樣中，若抗體在細胞內產生，則作為第一步，可例如藉由離心或超濾來移除宿主細胞或溶解細胞之微粒碎片(例如由均質化產生者)。在抗體分泌至培養基中之情況下，可首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如 Amicon™ 或 Millipore Pellicon™ 超濾單元)濃縮來自該等表達系統之上清液。

在本發明方法之前，自細胞碎片純化抗體之程序最初視抗體表達位點而定。一些抗體可自細胞直接分泌至周圍生長培養基中；其他抗體則在細胞內產生。對於在細胞內產生之抗體，純化製程之第一步通常包含：溶解細胞，此可由多種方法(包括機械剪切、滲透壓衝擊或酶處理)進行。該破裂將細胞之整個內含物釋放至勻質物中，且另外產生由於尺寸小而難以移除之亞細胞片段。通常藉由差速離心或藉由過濾來移除該等亞細胞片段。在分泌抗體情況下，通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如 Amicon™ 或 Millipore Pellicon™ 超濾單元)濃縮來自該等表達系統之上清液。在抗體分泌至培養基中之情況下，重組宿主細胞亦可例如藉由切向流過濾(tangential flow filtration)而與細胞培養基分離。可使用本發明之抗體純化方法自培養基中進一步回收抗體。

6. 實例

6.1. 實例 1

6.1.1. 材料及方法

在此實例所概述之研究中，吾人研究實例3中所用但適於GIA-1培養基之產生阿達木單抗之CHO細胞株中由向化學成分確定之Life Technologies Gibco GIA-1培養基(專利配方)中添加氯化錳及/或半乳糖所引起之對產物品質屬性之作用。在搖瓶中以分批製程或在3 L生物反應器中以分批補料製程進行研究。

使用專利Life Technologies Gibco化學成分確定之培養基GIA-1製備產生阿達木單抗之CHO細胞株之生長及生產培養基。根據表1中描述之實驗設計向基本生產培養基及補料培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M1787-100 mL ; 1.0 M $\pm$ 0.1 M)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。所有培養基均經Corning 0.5 L或1 L過濾器系統0.22 μ m聚(乙醚砜)(PES)過濾且在4°C下儲存直至使用。

藉由在250 mL及500 mL Corning通風無擋板搖瓶之組合中使實例3中所用產生阿達木單抗之CHO細胞適於化學成分確定之GIA-1培養基歷時7個(每個2至3天)繼代且隨後冷凍，自該CHO細胞產生用於兩種研究之細胞株。

在解凍後，對於分批搖瓶研究，在250 mL及500 mL Corning通風無擋板搖瓶之組合中擴增細胞歷時3至5個(每個2至3天)繼代。在一式兩份500 mL Corning通風無擋板搖瓶(200 mL工作體積)中在約 0.5×10^6 個細胞/毫升之初始活細胞密度(VCD)下起始生產培養物。培養物於乾燥培育箱中在35°C及5% CO₂下以110轉/分鐘(RPM)維持於迴轉式震盪器上。藉由在培養基葡萄糖濃度低於3 g/L時補充葡萄糖

溶液(1.25% (v/v), 40%溶液)來進行擴展分批模式之搖瓶研究。

對於分批補料生物反應器研究，在乾燥培育箱中於35°C及5% CO₂下，在維持於110 RPM之迴轉式震盪器上之Corning通風無擋板搖瓶中及維持在20-25 RPM、7.5°角度及0.25 SLPM氣流下之20 L細胞袋(3 L至10 L工作體積)中擴增細胞歷時8個(每個2至3天)繼代。在一式兩份3 L生物反應器(1.5 L工作體積)中在35°C、30%溶解氧、200 RPM、pH值經3天自7.1勻變至6.9且此後設定pH值為6.9情況下起始生產培養物。使用固定分流比的細胞與培養基(1:5)起始生產階段培養物。在分批補料模式中，如下添加來自Life Technologies Gibco之化學成分確定之補料JCL-5(專利配方)：3% (v/v)(第3天)、5%(第4天)、7%(第5天)、10%(第6天)及10%(第7天)。在培養基葡萄糖濃度低於3 g/L時補充額外葡萄糖(1.25% (v/v), 40%溶液)。

對於本發明通篇描述之所有使用CHO細胞株進行之研究，每天收集樣品且使用Cedex細胞計數裝置量測細胞密度及活力。當培養物活力開始下降時，藉由在12,000 RPM下離心5分鐘來收集保留樣品(retention sample)以供經由Poros A方法進行效價分析。當培養物活力接近或低於50%時，藉由收集125 mL等分試樣且在3,000 RPM下離心30分鐘來收集培養物。所有上清液在-80°C下儲存直至進行分析。

對於所有研究，使用以下程序對收集之樣品進行蛋白質

A純化且準備進行寡糖分析法。作為確立身分且對寡糖進行定量之製程中的第一步，藉由N-聚糖酶進行之酶消化來自蛋白質釋放寡糖。一旦釋放聚糖，則用螢光標籤2-胺基苯甲醯胺(2-AB)藉由還原胺化作用標記各聚糖之游離還原端。在乙腈(50 mM甲酸銨，pH 4.4)中藉由正相HPLC(NP-HPLC)分離所得經標記之聚糖且藉由螢光偵測器進行偵測。定量係基於所偵測糖之相對面積百分比。在整個本發明中，報導且論述非半乳糖基岩藻糖基化二觸角寡糖之相對面積百分比(表示為NGA2F+NGA2F-GlcNac總量)及含半乳糖岩藻糖基化二觸角寡糖NA1F+NA2F總量。

6.1.2. 實驗設計

如表1中詳細描述，對於分批搖瓶研究，在生產培養基中補充以下濃度之氯化錳：0、40、60、80及100 μM 。在生產培養基中補充以下含量之半乳糖：0、10、20、40及100 mM。使用分成3組實驗之綜合設計研究氯化錳及半乳糖之個別添加及組合添加。各實驗均具有對照培養物以用於直接比較培養物生長、生產力及產物品質。用於對照培養物之生產培養基中未補充氯化錳或半乳糖。對照培養物之培養物生長、生產力及產物品質資料為3次實驗之平均值。

對於分批補料生物反應器研究，按以下組合向生產培養基與補料培養基中補充氯化錳及半乳糖：40 μM 氯化錳及20 mM半乳糖；40 μM 氯化錳及40 mM半乳糖(表2)。用於對照培養物之基本培養基及補料培養基中未補充氯化錳或

半乳糖。

表1 分批搖瓶研究(實例1)之實驗設計

錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
0	10	Mn(0) Gal(10)
0	20	Mn(0) Gal(20)
0	40	Mn(0) Gal(40)
0	100	Mn(0) Gal(100)
40	0	Mn(40) Gal (0)
80	0	Mn(80) Gal(0)
100	0	Mn(100) Gal(0)
40	10	Mn(40) Gal(10)
40	20	Mn(40) Gal(20)
40	40	Mn(40) Gal(40)
40	100	Mn(40) Gal(100)
60	20	Mn(60) Gal(20)
60	40	Mn(60) Gal(40)
60	100	Mn(60) Gal(100)
80	20	Mn(80) Gal(20)
80	40	Mn(80) Gal(40)
80	100	Mn(80) Gal(100)
100	20	Mn(100) Gal(20)
100	40	Mn(100) Gal(40)
100	100	Mn(100) Gal(100)

表1 分批補料3 L生物反應器研究(實例1)之實驗設計

錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
40	20	Mn(40) Gal(20)
40	40	Mn(40) Gal(40)

6.1.3. 培養物生長及生產力

對於搖瓶實驗，補充有0至100 mM濃度範圍內之半乳糖及/或至多80 μM 濃度之氯化錳之生產培養基中培養物之細胞生長及活力輪廓與未添加錳及/或半乳糖之對照培養物相當(圖1A、1B)。在補充有100 μM 濃度氯化錳及0至100 mM濃度範圍之半乳糖之培養基中生長之培養物在最初4個

生產日經歷生長滯後及活力降低，此可能係歸因於此濃度下錳之毒性作用。然而，在第4個生產日後克服毒性作用。大部分實驗條件之收穫物效價比對照培養物之平均收穫物效價高3%至14%(圖1C)。所有3種對照培養物之生長輪廓及生產力類似。對於生物反應器分批補料實驗，所有條件下之培養物生長、活力輪廓及收穫物效價類似(圖2A、2B、2C)。

6.1.4. 寡糖分析

在此實例中，使用實例3中所用但適於GIA-1培養基之產生阿達木單抗之CHO細胞株探索向化學成分確定之培養基GIA-1中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

6.1.4.1. 分批搖瓶研究

對於搖瓶研究，向生產CDM GIA-1中單獨添加0至100 μM 範圍內之氯化錳可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低(以濃度依賴性方式)及使NA1F+NA2F總量增加約相同百分比。在添加100 μM 氯化錳情況下觀測到9%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac變化及8%之NA1F+NA2F寡糖變化(圖3)。由於細胞毒性作用，未進一步探索大於100 μM 之錳劑量。類似地，在向生產CDM GIA-1中單獨添加0至100 mM範圍內之半乳糖情況下觀測到NGA2F+NGA2F-GlcNac總量之濃度依賴性降低及相應NA1F+NA2F總量增加。在添加100 mM半乳糖情況下觀測到7%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNa及NA1F+NA2F寡糖變化。

組合添加氯化錳及半乳糖對CDM GIA-1中阿達木單抗之

半乳糖化之調節為協同的。與單獨添加錳或半乳糖相比，組合添加氯化錳及半乳糖可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低較大百分比且使NA1F+NA2F總量增加較大百分比，且其個別作用相累加(圖4及5)。舉例而言，單獨添加40 μ M氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%且單獨添加40 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%。然而，組合添加該等相同濃度(亦即40 μ M錳+40 mM半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量減少18%，比其個別對NGA2F+NGA2F-GlcNac總量之降低之貢獻之總和高6%。吾人將此作用定義為協同作用且在整個本發明中保持此定義。與對照條件相比，在組合添加100 μ M氯化錳及100 mM半乳糖情況下觀測到26%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低。

6.1.4.2. 分批補料生物反應器研究

對於分批補料3 L生物反應器研究，研究兩種氯化錳及半乳糖組合且吾人證實NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及相應NA1F+NA2F寡糖增加與規模(1.5 L相對於200 mL)及製程(受控生物反應器環境中分批補料相對於搖瓶中分批進行)無關。與對照培養物相比，向生產基本CDM GIA-1與補料CDM JCL-5中組合添加40 μ M氯化錳及20 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低26%且使NA2F+NA2F總量增加27%(圖6)。除補充40 μ M濃度錳以外，亦使半乳糖濃度進一步增加至40 mM，引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量再降低3%且NA1F+NA2F總量相應增加3%。

6.2. 實例 2

6.2.1. 材料及方法

在此實例中概述之研究中，吾人使用實例1中所用且亦適於HyClone培養基之產生阿達木單抗之CHO細胞株研究向化學成分確定之培養基 Thermo Scientific HyClone CDM4CHO中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

使用不含L-麩醯胺酸之Thermo Scientific HyClone化學成分確定之培養基CDM4CHO(目錄號SH30558.02)製備產生阿達木單抗之CHO細胞株之生長及生產培養基。根據表3中描述之實驗設計向生產培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M1787-100 mL; 1.0 M $\pm$ 0.1 M)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。所有培養基均經Corning 0.5 L或1 L(0.22 μ m PES)過濾器系統過濾且在4°C下儲存直至使用。

在解凍後，在250 mL、500 mL及1000 mL Corning通風無擋板搖瓶之組合中使細胞適於HyClone CDM4CHO培養基且在其中擴增歷時5個(每個2至3天)繼代。在一式兩份500 mL Corning通風無擋板搖瓶(200 mL工作體積)中在約 0.5×10^6 個細胞/毫升之初始VCD下起始生產培養物。培養物於乾燥培育箱中在35°C及5% CO₂下維持於110 RPM之迴轉式震盪器上。在培養基葡萄糖濃度低於3 g/L時補充葡萄糖溶液(1.25% (v/v)，40%溶液)。

6.2.2. 實驗設計

如表3中詳細描述，在生產培養基中補充以下濃度之氣

化錳：0、10、20及40 μM 。在生產培養基中補充以下含量之半乳糖：0、10、20及100 mM。用於對照培養物之生產培養基中未補充氯化錳或半乳糖。

表3 實例2之實驗設計

錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
0	10	Mn(0) Gal(10)
0	20	Mn(0) Gal(20)
0	40	Mn(0) Gal(40)
10	0	Mn(10) Gal (0)
20	0	Mn(20) Gal(0)
40	0	Mn(40) Gal(0)
10	10	Mn(10) Gal(10)
20	20	Mn(20) Gal(20)
40	40	Mn(40) Gal(40)

6.2.3. 培養物生長及生產力

補充有0至40 mM濃度範圍內之半乳糖及/或至多10 μM 濃度之氯化錳之生產HyClone CDM4CHO中培養物之細胞生長及活力輪廓與未添加錳及/或半乳糖之對照培養物相當(圖7A、7B)。增加HyClone CDM4CHO生產培養基中之氯化錳濃度至20 μM 或40 μM 可減緩培養物生長。由於觀測到生長抑制作用，因此未進一步探索大於40 μM 之錳劑量。所有條件下之收穫物效價均與對照(資料未圖示)相當。

6.2.4. 寡糖分析

在此實例中，使用實例1中所用且亦適於HyClone培養基之產生阿達木單抗之CHO細胞株探索向市售HyClone CDM4CHO中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向生產CDM HyClone CDM4CHO中單獨添加0至40 μM 範圍內之氯化錳可以濃度依賴性方式使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低最多5%(圖8)。亦達成相當的最大NA1F+NA2F總量增加(4%)。單獨添加至多40 mM最大濃度之半乳糖可引起6%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應6%之NA1F+NA2F總量增加。

在補充有氯化錳與半乳糖之培養物中觀測到累加作用。組合添加氯化錳及半乳糖可使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及使NA1F+NA2F總量增加與單獨添加錳或半乳糖情況下相當的百分比，且其個別作用相累加(圖9)。舉例而言，單獨添加40 μM 氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低5%且單獨添加40 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%。組合添加該等相同濃度(亦即40 μM 錳+40 mM半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低12%。吾人將此作用定義為累加作用且在整個本發明中保持此定義。

在補充有40 μM 氯化錳及40 mM半乳糖之培養物中觀測到12%之最大百分比NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應11%之NA1F+NA2F總量增加。

6.3. 實例3

6.3.1. 材料及方法

在此實例中概述之研究中，吾人研究產生阿達木單抗之CHO細胞株中向基於水解產物之培養基(專利配方)中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

根據專利配方使用酵母及大豆水解產物製備產生阿達木

單抗之CHO細胞株之生長及生產培養基。根據表4中描述之實驗設計，向生產培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M1787-100 mL; 1.0 M $\pm$ 0.1 M)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。所有培養基均經Corning 0.5 L或1 L過濾器系統(0.22 μ m PES)過濾且在4°C下儲存直至使用。

在解凍後，在250 mL、500 mL及1000 mL Corning通風無擋板搖瓶之組合中擴增細胞歷時9個(每個2至3天)繼代。在一式兩份500 mL Corning通風無擋板搖瓶(200 mL工作體積)中在約 0.5×10^6 個細胞/毫升之初始VCD下起始生產培養物。培養物於乾燥培育箱中在35°C及5% CO₂下維持於110 RPM之迴轉式震盪器上。在培養基葡萄糖濃度低於3 g/L時補充葡萄糖溶液(1.25% (v/v)，40%溶液)。

6.3.2. 實驗設計

如表4中詳細描述，在生產培養基中補充以下濃度之氯化錳：0、10、20及40 μ M。在生產培養基中補充以下含量之半乳糖：0、10、20及40 mM。用於對照培養物之生產培養基中未補充氯化錳或半乳糖。

表4 實例3之實驗設計

錳(μ M)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
0	10	Mn(0) Gal(10)
0	20	Mn(0) Gal(20)
0	40	Mn(0) Gal(40)
10	0	Mn(10) Gal (0)
20	0	Mn(20) Gal(0)
40	0	Mn(40) Gal(0)
10	10	Mn(10) Gal(10)
20	20	Mn(20) Gal(20)
40	40	Mn(40) Gal(40)

6.3.3. 培養物生長及生產力

與未添加錳或半乳糖之對照培養物相比，補充有0至40 mM濃度範圍內之半乳糖及/或0至40 μ M濃度之氯化錳之基於水解產物之培養基中大部分培養物之細胞生長較慢(圖10A)。然而，所有培養物均達到類似峰值活細胞密度。雖然一些補充有20 μ M或40 μ M氯化錳之培養物顯示活力降低直至第3個生產培養日，但隨培養物進展而恢復(圖10B)。在另一實驗中，在第二對照條件(B)下研究補充有10 μ M氯化錳之培養物。該兩種培養物與所有其他培養物相比生長至稍高的最大VCD，然而，結果在歷史變化範圍內。所有條件下之收穫物效價均與對照(資料未圖示)相當。

6.3.4. 寡糖分析

在此實例中，在搖瓶中使用產生阿達木單抗之CHO細胞株探索向基於水解產物之培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向基於水解產物之生產培養基中單獨添加0至40 μ M範圍內之氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低約1%，該變化在寡糖分析法可變性範圍內(圖11)。單獨添加至多40 mM最大濃度之半乳糖可引起4%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應4%之最大NA1F+NA2F總量增加。

該等藉由單獨添加半乳糖達成之寡糖輪廓變化與向基於水解產物之培養基中添加半乳糖與氯化錳之組合時記錄之變化相當。向基於水解產物之培養基中組合添加0至40 μ M

範圍內之氯化錳及0至40 mM範圍內之半乳糖引起約5%之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應3%之 NA1F+NA2F總量增加(圖12)。在補充有40 mM半乳糖及20 μ M或40 μ M氯化錳之培養物中觀測到5%之最大百分比的 NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應4%之 NA1F+NA2F總量增加。

6.4. 實例4

6.4.1. 材料及方法

在此實例所概述之研究中，吾人使用不同於實例1、2及3之產生阿達木單抗之CHO細胞株(稱為CHO細胞株#2)研究向化學成分確定之Life Technologies Gibco GIA-1培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

使用專利Life Technologies Gibco化學成分確定之培養基GIA-1製備產生阿達木單抗之CHO細胞株#2之生長及生產培養基。根據表5中描述之實驗設計僅向生產培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M1787-100 mL; 1.0 M $\pm$ 0.1 M)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。所有培養基均經Corning 0.5 L或1 L過濾器系統(0.22 μ m PES)過濾且在4°C下儲存直至使用。

在解凍後，在250 mL、500 mL及1000 mL Corning通風無擋板搖瓶之組合中擴增細胞歷時5至8個(每個2至3天)繼代。在一式兩份500 mL Corning通風無擋板搖瓶(200 mL工作體積)中在約 0.5×10^6 個細胞/毫升之初始VCD下起始生產培養物。培養物於乾燥培育箱中在35°C及5% CO₂下維持於

180 RPM之迴轉式震盪器上。在培養基葡萄糖濃度低於3 g/L時補充葡萄糖溶液(1.25% (v/v)，40%溶液)。

6.4.2. 實驗設計

如表5中詳細描述，在生產培養基中補充以下濃度之氯化錳：0、10、20及40 μM 。在生產培養基中補充以下含量之半乳糖：0、10及20 mM。用於對照培養物之生產培養基中未補充氯化錳或半乳糖。此研究分2區塊進行。

表5 實例4之實驗設計

	錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
區塊I	0	0	Mn(0) Gal(0)
	20	0	Mn(20) Gal(0)
	10	10	Mn(10) Gal(10)
	20	20	Mn(20) Gal(20)
	40	20	Mn(40) Gal(20)
區塊II	0	0	Mn(0) Gal(0)
	0	10	Mn(0) Gal(10)
	0	20	Mn(0) Gal (20)
	10	0	Mn(10) Gal(0)

6.4.3. 培養物生長及生產力

補充有0至20 mM濃度範圍內之半乳糖及/或0至40 μM 濃度範圍內之氯化錳之生產CDM GIA-1中培養物之培養物生長、活力輪廓及收穫物效價與未添加錳或半乳糖之對照培養物相當(圖13A、13B；收穫物效價資料未圖示)。

6.4.4. 寡糖分析

在此實例中，使用產生阿達木單抗之CHO細胞株#2探索向化學成分確定之GIA-1培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向生產CDM GIA-1中單獨添加0至20 μM 範圍內之氯化錳

使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低(以濃度依賴性方式)及使NA1F+NA2F總量增加約相同百分比。在添加20 μ M氯化錳情況下觀測到22%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及最大相應23%之NA1F+NA2F總量增加(圖14)。類似地，在單獨添加0至20 mM範圍內之半乳糖情況下觀測到NGA2F+NGA2F-GlcNac總量之濃度依賴性降低及NA1F+NA2F總量之相應增加。在添加20 mM半乳糖情況下觀測到9%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應10%之最大NA1F+NA2F總量增加。

關於藉由向GIA-1培養基中組合添加氯化錳及半乳糖而經補充之培養物中產生之阿達木單抗之寡糖輪廓，觀測到累加作用(圖15)。舉例而言，單獨添加10 μ M氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低18%，且單獨添加10 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低6%。組合添加該等相同濃度之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低24%。在補充有40 μ M氯化錳及20 mM半乳糖之培養物中觀測到35%之最大百分比的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應37%之NA1F+NA2F總量增加。

6.5. 實例5

6.5.1. 材料及方法

在此實例所概述之研究中，吾人使用不同於實例1、2、3及4之產生阿達木單抗之CHO細胞株(稱為CHO細胞株#3)研究向化學成分確定之Life Technologies Gibco GIA-1培養

基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

使用專利Life Technologies Gibco化學成分確定之培養基GIA-1製備產生阿達木單抗之CHO細胞株#3之生長及生產培養基。根據表6中描述之實驗設計，向基本生產培養基及補料培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M3634-100 g)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。

在解凍後，在乾燥培育箱中於36°C及5% CO₂下，在維持於140 RPM之迴轉式震盪器上之Corning通風無擋板搖瓶及維持於25 RPM、7°角度及0.25 SLPM氣流下之10 L細胞袋(2 L工作體積)中擴增細胞。在3 L生物反應器(1.4 L初始工作體積)中於36°C、30%溶解氧、200 RPM及pH 6.9±0.2下起始生產培養物。使用固定分流比的細胞與培養基(1:6.7)起始生產階段培養物。當培養物VCD值高於5×10⁶個細胞/毫升時進行溫度移動。如下添加來自Life Technologies Gibco之化學成分確定之補料JCL-5：4% (v/v)(第2天)、6%(第4天)、8%(第6天)、10%(第8天)及10%(第10天)。視需要向反應器培養物中再添加400 g/L葡萄糖以確保葡萄糖量不耗乏。在約50%活力下或在第17個生產日(以先出現的情況為準)收集生物反應器。

6.5.2. 實驗設計

如表6中詳細描述，向生產培養基及補料培養基中補充以下濃度之氯化錳：0、0.1、0.2、0.5及1.0 μM。向生產培養基與補料培養基中補充0 mM及30 mM濃度之半乳糖。

此外，對生產基本培養基及補料培養基使用 0.2 μM 或 0.5 μM 氯化錳加 30 mM 半乳糖之組合氯化錳及半乳糖補充策略。用於對照培養物之基本培養基及補料培養基中未補充氯化錳或半乳糖。

表 6 實例 5 之實驗設計

錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
0.1	0	Mn(0.1) Gal(0)
0.2	0	Mn(0.2) Gal(0)
0.5	0	Mn(0.5) Gal(0)
1.0	0	Mn(1.0) Gal(0)
0	30	Mn(0) Gal(30)
0.2	30	Mn(0.2) Gal(30)
0.5	30	Mn(0.5) Gal(30)

6.5.3. 培養物生長及生產力

除單獨補充 30 mM 半乳糖或組合補充 30 mM 半乳糖與 0.2 μM 氯化錳之培養物(其生長較慢且峰值 VCD 較低)以外，大部分補充有氯化錳及/或半乳糖之培養物之生長輪廓均與對照培養物相當(圖 16A)。然而，補充有 0.5 μM 氯化錳及 30 mM 半乳糖之培養物之生長輪廓與對照培養物相當表明，研究濃度下之氯化錳及半乳糖均對培養物生長無害。活力輪廓及收穫物效價與對照條件相當(圖 16B、16C)。

6.5.4. 寡糖分析

在此實例中，使用產生阿達木單抗之 CHO 細胞株 #3 探索向化學成分確定之培養基 GIA-1 中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向生產 CDM GIA-1 中單獨添加 0 至 1 μM 範圍內之氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低(以濃度依賴性方式)及

使NA1F+NA2F總量增加約相同百分比。在添加1 μ M氯化錳情況下觀測到26%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及相應28%之NA1F+NA2F寡糖增加(圖17)。向生產CDM GIA-1中單獨添加30 mM濃度半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低4%且使NA1F+NA2F總量增加3%。

當向生產基本培養基及補料培養基中同時補充氯化錳及半乳糖時，結果顯示對NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及NA1F+NA2F寡糖增加之協同效益，此與實例1中顯示之結果一致(圖18)。舉例而言，在0.2 μ M氯化錳加30 mM半乳糖情況下觀測到的25%之NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低比在單獨添加0.2 μ M氯化錳(15%)及單獨添加30 mM半乳糖(4%)情況下觀測到的NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低之總和高6%。類似地，引起之24%之NA1F+NA2F總量增加亦大於在單獨添加0.2 μ M氯化錳(16%)及單獨添加30 mM半乳糖(3%)情況下觀測到的增加之總和。組合補充0.5 μ M氯化錳+30 mM半乳糖亦顯示對CHO細胞株#3中產生之阿達木單抗之半乳糖化輪廓之協同作用。與對照條件相比，在向化學成分確定之GIA-1培養基中組合添加0.5 μ M氯化錳及30 mM半乳糖情況下觀測到34%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac降低及相應34%之最大NA1F+NA2F寡糖增加。

6.6. 實例6

6.6.1. 材料及方法

在此實例所概述之研究中，吾人在搖瓶中以分批補料方法使用產生阿達木單抗之NSO細胞株研究向化學成分確定

之Life Technologies Gibco PFBM-3基本培養基及PFFM-4補料培養基(專利配方)中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

使用專利Life Technologies Gibco化學成分確定之培養基(PFBM-3基本培養基加PFFM-4補料培養基)製備產生阿達木單抗之NSO細胞株之生長及生產培養基。根據表7中描述之實驗設計，向生產培養基及補料培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M1787-100 mL；1.0 M $\pm$ 0.1 M)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。

在解凍後，在250 mL、500 mL、1 L、2 L及3 L Corning通風無擋板搖瓶之組合中擴增細胞歷時3至5個(每個2天)繼代。在單個1 L Corning通風無擋板搖瓶(240 mL初始工作體積)中在約 2.5×10^5 個細胞/毫升之初始VCD下起始生產培養物。培養物於乾燥培育箱中在37°C及5% CO₂下維持於100 RPM之迴轉式震盪器上。搖瓶研究係以分批補料模式進行且如下向培養物中補充PFFM-4：24 mL(第2天)、28.8 mL(第4天)、28.8 mL(第6天)及28.8 mL(第8天)。

每2天收集樣品且使用Cedex細胞計數裝置量測細胞密度及活力。自第8天開始每天藉由在2,000 g下離心10分鐘且接著經0.2 μ m PVDF針筒過濾器過濾來收集保留樣品以經由Poros A方法進行效價分析。在第10個生產日收集培養物。收集整個培養物，在冰上冷卻至約0°C後維持1.5小時，藉由添加1 M檸檬酸使細胞及碎片在pH 5.0下絮凝且保持15分鐘，且在5°C下在4000x g下離心15分鐘。使上清

液穿過0.20 μm Millipore Stericup PES過濾器且在過濾後立即用2 M Tris將酸化之澄清的無細胞收穫物中和至pH 7.1 ± 0.2 。將無細胞收穫物轉移至PETG瓶且在 -80°C 下儲存直至分析。

6.6.2. 實驗設計

如表7中詳細描述，在生產培養基與補料培養基中補充以下濃度之氯化錳：0、0.2及0.5 μM 。在生產培養基與補料培養基中補充以下含量之半乳糖：0、1、4、5及10 mM。對於0、1及4 mM半乳糖條件及所有濃度之氯化錳，以全因子雙量DOE設計添加氯化錳及半乳糖。使用分成2組實驗之綜合設計研究氯化錳及半乳糖之個別添加及組合添加。各實驗均具有對照培養物以用於直接比較培養物生長、生產力及產物品質。用於對照培養物之生產培養基中未補充氯化錳或半乳糖。

表7 實例6之實驗設計

	錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
區塊I	0	0	Mn(0) Gal(0)
	0	5	Mn(0) Gal(5)
	0	10	Mn(0) Gal(10)
區塊II	0	0	Mn(0) Gal(0)
	0.2	0	Mn(0.2) Gal(0)
	0.5	0	Mn(0.5) Gal(0)
	0	1	Mn(0) Gal(1)
	0.2	1	Mn(0.2) Gal(1)
	0.5	1	Mn(0.5) Gal(1)
	0	4	Mn(0) Gal(4)
	0.2	4	Mn(0.2) Gal(4)
	0.5	4	Mn(0.5) Gal(4)

6.6.3. 培養物生長及生產力

補充有0至5 mM濃度範圍內之半乳糖及/或至多0.5 μM 濃

度之氯化錳之生產培養基中之培養物生長及活力輪廓與未添加錳或半乳糖之對照條件相當(圖 19A、19B)。添加 10 mM 濃度之半乳糖對培養物生長及生產力具有不利影響。區塊 I 實驗中之培養物與區塊 II 實驗中之培養物相比最大 VCD 較低且整體活力較低。區塊 II 實驗中之所有培養物均展示類似 VCD 及活力輪廓。除補充有 10 mM 半乳糖之培養物之效價(其比對照條件之收穫物效價低 60%)以外，大部分實驗條件之收穫物效價均與對照條件之收穫物效價相當(圖 19C)。

6.6.4. 寡糖分析

在此實例中，在搖瓶中以分批補料方法使用產生阿達木單抗之 NSO 細胞株探索向化學成分確定之 PFBM-3/PFFM-4 培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向 CDM PFBM-3/PFFM-4 中單獨添加 0 至 0.5 μ M 範圍內之氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低(以濃度依賴性方式)及使 NA1F+NA2F 總量增加約相同百分比。在添加 0.5 μ M 氯化錳情況下觀測到 18% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 20% 之 NA1F+NA2F 總量增加(圖 20)。由於細胞毒性作用，未進一步探索大於 0.5 μ M 之錳劑量。類似地，在向 CDM PFBM-3/PFFM-4 中單獨添加 0 至 10 mM 範圍內之半乳糖情況下觀測到 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量之濃度依賴性降低及 NA1F+NA2F 總量之相應增加。在添加 10 mM 半乳糖情況下觀測到 14% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 15% 之 NA1F+NA2F 總量增加。

對補充有氯化錳及半乳糖之CDM PFBM-3/PFFM-4中之NSO細胞株中產生之阿達木單抗之半乳糖化之調節為協同的(圖21)。舉例而言,單獨添加0.2 μ M氯化錳使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低12%,且單獨添加4 mM半乳糖使NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低2%。然而,組合添加該等相同濃度(亦即0.2 μ M錳+4 mM半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低19%,比其個別貢獻之總和高5%。在組合添加0.5 μ M氯化錳及4 mM半乳糖情況下觀測到約26%之最大NGA2F+NGA2F-GlcNac總量降低及相應28%之NA1F+NA2F總量增加。

6.7. 實例7

6.7.1. 材料及方法

在此實例中概述之研究中,吾人在產生單株抗體(通常稱為mAb #1)之CHO細胞株中研究向化學成分確定之Life Technologies Gibco GIA-1培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

使用專利Life Technologies Gibco化學成分確定之培養基GIA-1製備產生mAb #1之CHO細胞株之生長及生產培養基。根據表8中描述之實驗設計,僅向生產培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M1787-100 mL; 1.0 M $\pm$ 0.1 M)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。所有培養基均經Corning 0.5 L或1 L過濾器系統(0.22 μ m PES)過濾且在4°C下儲存直至使用。

在解凍後,在250 mL、500 mL及1000 mL Corning通風

無擋板搖瓶之組合中擴增細胞歷時6個(每個3天)繼代。在一式兩份500 mL Corning通風無擋板搖瓶(200 mL工作體積)中在約 0.5×10^6 個細胞/毫升之初始VCD下起始生產培養物。培養物於乾燥培育箱中在35°C及5% CO₂下維持於125 RPM之迴轉式震盪器上。在培養基葡萄糖濃度低於3 g/L時補充葡萄糖溶液(1.25% (v/v), 40%溶液)。

6.7.2. 實驗設計

如表8中詳細描述，在生產培養基中補充以下含量之氯化錳：0、10、20及40 μ M。在生產培養基中補充以下含量之半乳糖：0、10、20及100 mM。用於對照培養物之生產培養基中未補充氯化錳或半乳糖。

表8 實例7之實驗設計

錳(μ M)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
0	10	Mn(0) Gal(10)
0	20	Mn(0) Gal(20)
0	40	Mn(0) Gal(40)
10	0	Mn(10) Gal (0)
20	0	Mn(20) Gal(0)
40	0	Mn(40) Gal(0)
10	10	Mn(10) Gal(10)
20	20	Mn(20) Gal(20)
40	40	Mn(40) Gal(40)

6.7.3. 培養物生長及生產力

單獨補充0至20 μ M濃度範圍之氯化錳之培養物之生長情況與對照培養物相當(圖22A)。雖然單獨補充半乳糖或組合補充20 μ M錳與20 mM半乳糖之培養物之生長與對照相比最大VCD較低，但在第6個生產日達到峰值VCD之前具有相同生長速率。該等培養物提早一天(在第9個生產日)結

束(圖 22B)。補充有 40 μ M 氯化錳及所有研究量之半乳糖之培養物以及補充有 10 μ M 氯化錳及 10 mM 半乳糖之培養物與對照相比經歷較慢生長且峰值 VCD 降低。收穫物效價比對照條件低 3%-24%(資料未圖示)。

6.7.4. 寡糖分析

在此實例中，使用產生單株抗體 mAb #1 之 CHO 細胞株探索向化學成分確定之 Life Technologies Gibco GIA-1 培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向生產 CDM GIA-1 中單獨添加 0 至 40 μ M 範圍內之氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量最大降低 26%(圖 23)。亦達成相當的最大 NA1F+NA2F 總量增加 (27%)。單獨添加至多 40 mM 最大濃度之半乳糖可以濃度依賴性方式引起 12% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 13% 之最大 NA1F+NA2F 總量增加。

與單獨添加任一組分相比，向生產 CDM GIA-1 中組合添加半乳糖及氯化錳引起更大百分比的 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應更大百分比的 NA1F+NA2F 總量增加(圖 24)。舉例而言，單獨添加 40 μ M 氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低 20%，且單獨添加 40 mM 半乳糖使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低 12%。然而，組合添加該等相同濃度(亦即 40 μ M 錳+40 mM 半乳糖)之氯化錳及半乳糖引起 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低 27%。在補充有 20 μ M 氯化錳及 20 mM 半乳糖之培養物中觀測到 32% 之最大百分比的 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 30% 之

NA1F+NA2F總量增加。

6.8. 實例8

6.8.1. 材料及方法

在此實例中概述之研究中，吾人研究在3 L生物反應器中以分批補料方法在產生單株抗體(通常稱為mAb #2)之CHO細胞株中，向化學成分確定之Life Technologies Gibco GIA-1培養基中添加氯化錳及/或半乳糖引起之對產物品質屬性之作用。

使用專利Life Technologies Gibco化學成分確定之培養基GIA-1製備產生mAb #2之CHO細胞株之生長及生產培養基。根據表9中描述之實驗設計，向基本生產培養基及補料培養基中補充氯化錳(II)(Sigma M3634)及D(+)半乳糖(Sigma G5388-1 kg)。

在解凍後，在乾燥培育箱中於36°C及5% CO₂下，在維持於140 RPM之迴轉式震盪器上之Corning通風無擋板搖瓶中及維持在25 RPM、7°角度、0.25 SLPM氣流下之10 L細胞袋(2 L工作體積)中擴增細胞。在3 L生物反應器(1.5 L初始工作體積)中於36°C、25%溶解氧、200 RPM及pH 7.0下起始生產培養物。如下添加來自Life Technologies Gibco之化學成分確定之補料JCL-5：3% (v/v)(第3天)、5%(第5天)、7%(第7天)、10%(第9天)及10%(第11天)。視需要向生物反應器培養物中再添加400 g/L葡萄糖以確保葡萄糖量不耗乏。在約70%或70%以下之活力下或在第15個生產日(以先出現之情況為準)收穫生物反應器。

6.8.2. 實驗設計

如表9中詳細描述，在生產培養基與補料培養基中補充以下濃度之氯化錳：0、25、50及75 μM 。在生產培養基與補料培養基中補充0、15、30及60 mM濃度之半乳糖。此外，對生產基本培養基及補料培養基使用25 μM 氯化錳+15 mM半乳糖及50 μM 氯化錳+30 mM半乳糖之組合氯化錳及半乳糖補充策略。用於對照培養物之基本培養基及補料培養基中未補充氯化錳或半乳糖。

表9 實例8之實驗設計

錳(μM)	半乳糖(mM)	ID
0	0	Mn(0) Gal(0)
25	0	Mn(25) Gal(0)
50	0	Mn(50) Gal(0)
75	0	Mn(75) Gal(0)
0	15	Mn(0) Gal(15)
0	30	Mn(0) Gal(30)
0	60	Mn(0) Gal(60)
25	15	Mn(25) Gal(15)
50	30	Mn(50) Gal(30)

6.8.3. 培養物生長及生產力

除單獨補充25 μM 氯化錳之培養物(其在第7個生產日後生長減緩)以外，大部分補充有0至60 mM濃度範圍內之半乳糖及/或0至75 μM 範圍內之氯化錳之培養物之生長輪廓均與對照培養物相當(圖25A)。然而，將補充至生產CDM GIA-1之氯化錳量增加至50 μM 或75 μM 產生生長輪廓與對照培養物相當之培養物。活力輪廓及收穫物效價與對照條件相當(圖25B、25C)。

6.8.4. 寡糖分析

在此實例中，使用產生單株抗體 mAb #2 之 CHO 細胞株探索向化學成分確定之培養基 GIA-1 中添加氯化錳及/或半乳糖引起之半乳糖化調節。

向生產 CDM GIA-1 中單獨添加 0 至 75 μ M 範圍內之氯化錳使 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量最大降低 18% (圖 26)。達成相當的最大 NA1F+NA2F 總量增加 (16%)。單獨添加至多 60 mM 最大濃度之半乳糖引起 12% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低及相應 11% 之最大 NA1F+NA2F 總量增加。

當向基本培養基及補料培養基中同時補充氯化錳及半乳糖時，結果表明其至少對 NGA2F+NGA2F-GlcNac 降低及 NA1F+NA2F 寡糖增加具有累加作用且有時具有協同作用 (圖 27)。在補充有 25 μ M 氯化錳及 15 mM 半乳糖之條件下觀測到協同作用。觀測到的 22% 之 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低比在單獨添加 25 μ M 氯化錳 (10%) 及單獨添加 15 mM 半乳糖 (7%) 情況下觀測到的降低之總和高 5%。在補充有 50 μ M 氯化錳及 30 mM 半乳糖之條件下觀測到累加作用。觀測到的 28% 之 NGA2F+NGA2F-GlcNac 總量降低與在單獨添加 50 μ M 氯化錳 (18%) 及單獨添加 30 mM 半乳糖 (12%) 情況下觀測到的降低之總和相當。與對照條件相比，在向化學成分確定之 GIA-1 培養基中組合添加 50 μ M 氯化錳及 30 mM 半乳糖情況下觀測到 28% 之最大 NGA2F+NGA2F-GlcNac 降低及相應 25% 之最大 NA1F+NA2F 總量增加。

本說明書中引用之所有專利、專利申請案、公開案、產品說明及方案均以全文引用的方式併入本文中。在術語衝

突之情況下，以本發明為準。

顯然本文中描述之本發明已經適當設計而達成上述效益及優點，但本發明之範疇不受本文中所描述之特定實施例限制。應瞭解，可在不偏離本發明精神之情況下容易地對本發明進行修改、改變及變化。

【圖式簡單說明】

圖1描繪分批搖瓶(batch shake flask)中CDM GIA-1中之產生阿達木單抗之CHO細胞株之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力；(C)校正之效價。

圖2描繪分批補料3 L生物反應器中CDM GIA-1中之產生阿達木單抗之CHO細胞株之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力；(C)校正之效價。

圖3描繪分批搖瓶中CDM GIA-1中CHO細胞株中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖4描繪與對照相比，分批搖瓶中CDM GIA-1中之阿達木單抗之半乳糖化變化百分比。

圖5概述與CHO細胞株中之對照相比，向CDM GIA-1中添加錳及/或半乳糖對阿達木單抗之半乳糖化之作用。

圖6描繪分批補料3 L生物反應器中CDM GIA-1中CHO細胞株中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖7描繪分批搖瓶中CDM HyClone CDM4CHO中CHO細胞株之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力。

圖 8 描繪分批搖瓶中 CDM HyClone CDM4CHO 中 CHO 細胞株中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖 9 概述與 CHO 細胞株中之對照相比，向 CDM HyClone CDM4CHO 中添加錳及/或半乳糖對阿達木單抗之半乳糖化之作用。

圖 10 描繪分批搖瓶中水解產物培養基中 CHO 細胞株之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力。

圖 11 描繪分批搖瓶中水解產物培養基中 CHO 細胞株中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖 12 概述與 CHO 細胞株中之對照相比，向水解產物培養基中添加錳及/或半乳糖對阿達木單抗之半乳糖化之作用。

圖 13 描繪分批搖瓶中 CDM GIA-1 中之產生阿達木單抗之 CHO 細胞株#2 之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力。

圖 14 描繪分批搖瓶中 CDM GIA-1 中 CHO 細胞株#2 中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖 15 概述與 CHO 細胞株#2 中之對照相比，向 CDM GIA-1 中添加錳及/或半乳糖對阿達木單抗之半乳糖化之作用。

圖 16 描繪分批補料 3 L 生物反應器中 CDM GIA-1 中之產生阿達木單抗之 CHO 細胞株#3 之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力；(C)校正之效價。

圖 17描繪分批補料3 L生物反應器中CDM GIA-1中CHO細胞株#3中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖 18概述與CHO細胞株#3中之對照相比，向CDM GIA-1中添加錳及/或半乳糖對阿達木單抗之半乳糖化之作用。

圖 19描繪CDM PFBM-3/PFFM-4分批補料搖瓶中產生阿達木單抗之NSO細胞株之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力；(C)校正之效價。

圖 20描繪CDM PFBM-3/PFFM-4分批補料搖瓶中NSO細胞株中之阿達木單抗之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖 21概述與NSO細胞株中之對照相比，向CDM PFBM-3/PFFM-4中添加錳及/或半乳糖對阿達木單抗之半乳糖化之作用。

圖 22描繪分批搖瓶中CDM GIA-1中之生產mAb #1之CHO細胞株之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力。

圖 23描繪分批搖瓶中CDM GIA-1中之mAb #1之半乳糖化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；(B)NA1F+NA2F。

圖 24概述與對照組相比，向CDM GIA-1中添加錳及/或半乳糖時對mAb #1之半乳糖化之作用。

圖 25描繪生產mAb #2之CHO細胞株在分批補料3 L生物反應器中之CDM GIA-1中之培養效能：(A)培養物生長；(B)活力；(C)校正之效價。

圖 26描繪mAb #2在分批補料3 L生物反應器中之CDM

GIA-1 中之糖基化輪廓：(A)NGA2F+NGA2F-GlcNac；
(B)NA1F+NA2F。

圖 27 概述與對照組相比，向 CDM GIA-1 中添加錳及 / 或
半乳糖對 mAb #2 之半乳糖化之作用。

七、申請專利範圍：

1. 一種增加抗-TNF α 抗體之半乳糖基化程度之方法，該方法包括於細胞培養基中之宿主細胞重組表現該抗體，其中該培養基經補充錳或錳補充劑，其量足以達到培養基中至少 40 μ M之錳濃度。
2. 如請求項1之方法，其中該抗-TNF α 抗體為阿達木單抗(adalimumab)。
3. 如請求項1或2之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑，以達到培養基中至少 75 μ M之錳濃度。
4. 如請求項1或2之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑，以達到培養基中 40-100 μ M之錳濃度。
5. 如請求項1或2之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑，以達到培養基中 60-100 μ M之錳濃度。
6. 如請求項1或2之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑，以達到培養基中選自由以下組成之群之錳濃度：40 μ M、50 μ M、60 μ M、75 μ M、80 μ M及 100 μ M。
7. 如請求項1或2之方法，其中該培養基進一步經補充半乳糖或半乳糖補充劑。
8. 如請求項7之方法，其中該培養基經補充足夠量之半乳糖或半乳糖補充劑，以達到培養基中 1-100 mM之半乳糖濃度。
9. 一種增加抗-TNF α 抗體之糖基化程度之方法，該方法包括於細胞培養基中重組表現該抗體，其中該培養基經補

充錳或錳補充劑及半乳糖或半乳糖補充劑，其量足以達到選自由以下組成之群之培養基中的錳(Mn)濃度及半乳糖(Gal)濃度：0.2/1, 0.2/4, 0.2/30, 0.5/1, 0.5/4, 0.5/30, 10/10, 10/20, 10/40, 20/10, 20/20, 20/40, 25/15, 40/10, 40/20, 40/40, 50/30, 60/20, 60/40, 60/100, 80/20, 80/40, 80/100, 100/20, 100/40及100/100 Mn (μM)/Gal (mM)。

10. 如請求項9之方法，其中該抗-TNF α 抗體為阿達木單抗。
11. 如請求項9或10之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑，以達到培養基中0.2-100 μM 之錳濃度。
12. 如請求項9或10之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑，以達成培養基中選自由以下組成之群之錳濃度：0.1、0.2、0.5、1.0、10、20、25、40、50、60、75、80及100 μM 。
13. 如請求項9或10之方法，其中該培養基經補充足夠量之半乳糖或半乳糖補充劑，以達到培養基中1-100 mM之半乳糖濃度。
14. 如請求項9或10之方法，其中該培養基經補充足夠量之半乳糖或半乳糖補充劑，以達到培養基中選自由以下組成之群之半乳糖濃度：1、4、5、10、15、20、30、40、60及100 mM。
15. 如請求項9或10之方法，其中該培養基經補充足夠量之錳或錳補充劑及半乳糖或半乳糖補充劑，使培養基中達到以下之錳及半乳糖濃度：0.2-100 μM 之錳及1-100 mM之半乳糖。

16. 如請求項9或10之方法，其中該錳補充劑為生物學上可接受之錳鹽。
17. 如請求項16之方法，其中該生物學上可接受之錳鹽為氯化錳(II)。
18. 如請求項9或10之方法，其中該半乳糖補充劑包含生物學上可接受之含半乳糖化合物。
19. 如請求項18之方法，其中該生物學上可接受之含半乳糖化合物為D-(+)-半乳糖。
20. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該細胞培養基為生產培養基。
21. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該宿主細胞為CHO細胞。
22. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該宿主細胞為NS0骨髓瘤細胞。
23. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該細胞經培養至少4天。
24. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該細胞經培養至少12天。
25. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該細胞培養基為基於水解產物之培養基。
26. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該細胞培養基為化學成分確定之培養基。
27. 如請求項1、2、9及10中任一項之方法，其中該方法為生物反應器中之分批補料方法。

28. 如請求項1或9之方法，其進一步包含自該細胞培養基回收該抗體。
29. 如請求項28之方法，其中該回收包含純化該抗體。
30. 一種製備抗-TNF α 抗體之方法，該方法包含於細胞培養基中之宿主細胞表現該抗體，該培養基包含至少40 μ M之錳濃度。
31. 如請求項30之方法，其中該抗-TNF α 抗體為阿達木單抗。
32. 如請求項30之方法，其中該培養基中的錳濃度為40-100 μ M。
33. 如請求項30之方法，其中該培養基中的錳濃度係選自由以下組成之群：40、50、60、75、80及100 μ M。
34. 如請求項30至33中任一項之方法，其中該培養基進一步包含半乳糖或半乳糖補充劑。
35. 如請求項34之方法，其中該培養基中的半乳糖濃度為1-100 mM。

八、圖式：

105年4月27日修正替換頁
第1-27圖

第101115255號專利申請案
中文圖式替換本(105年4月27日)

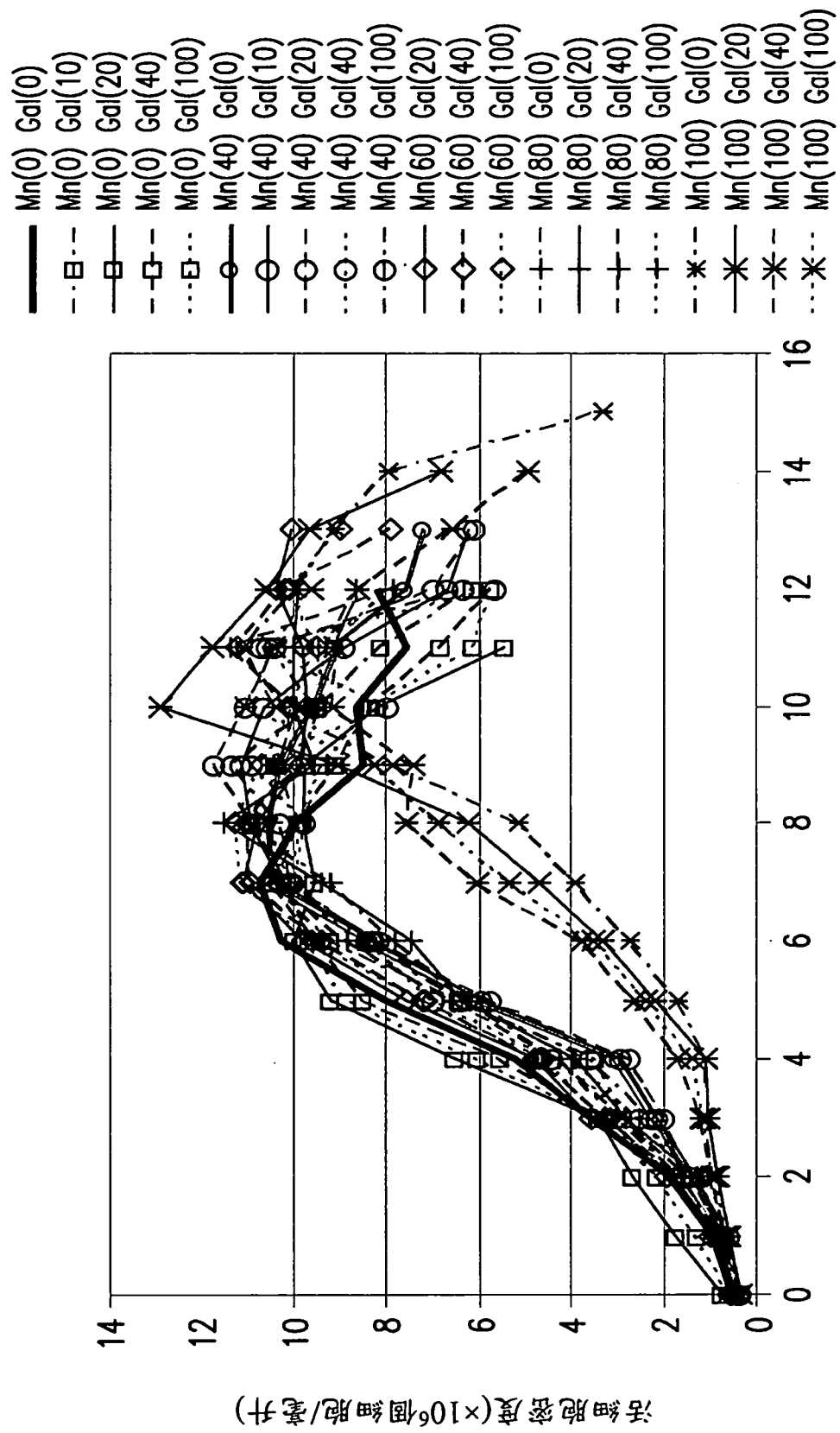


圖1A

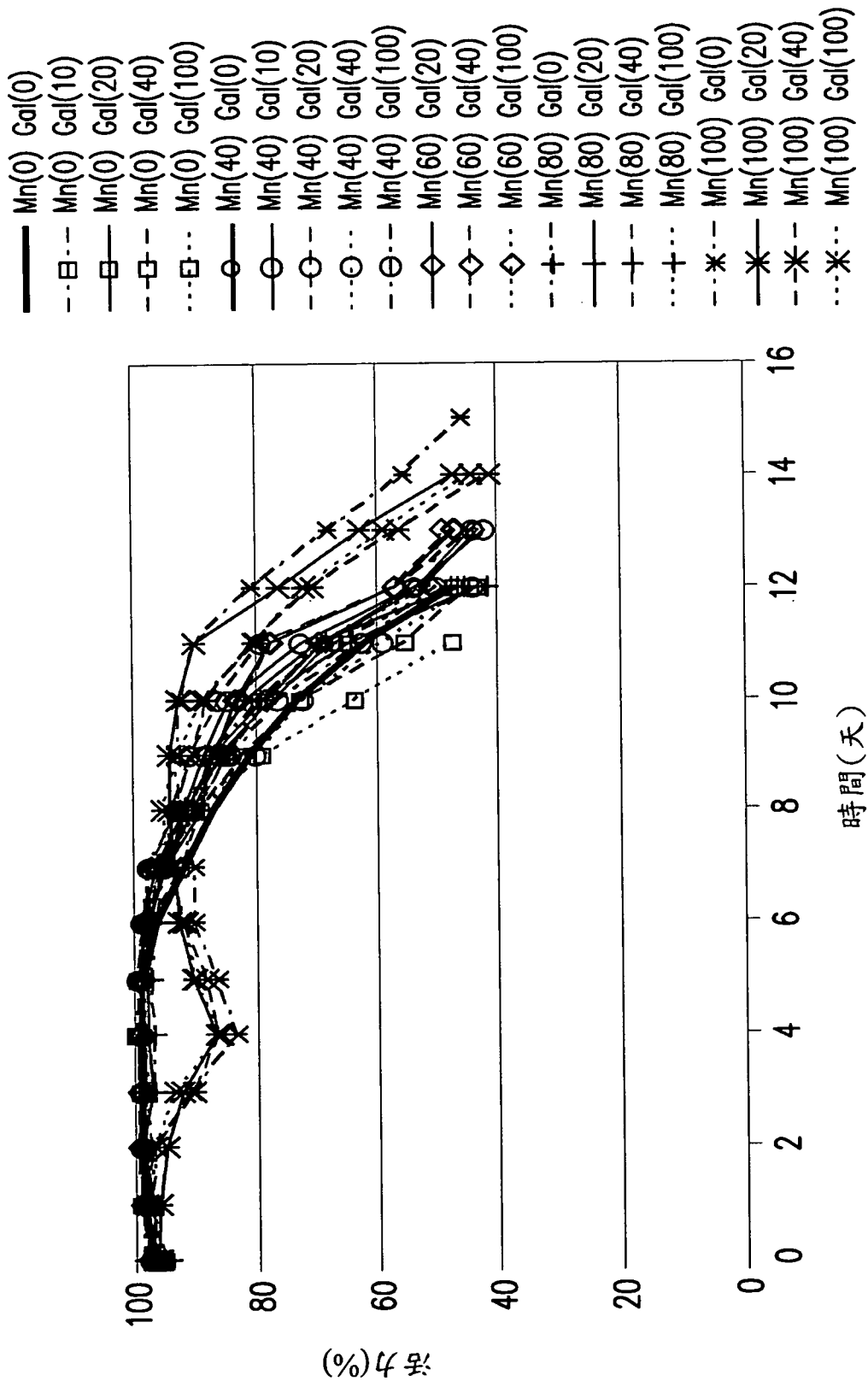


圖1B

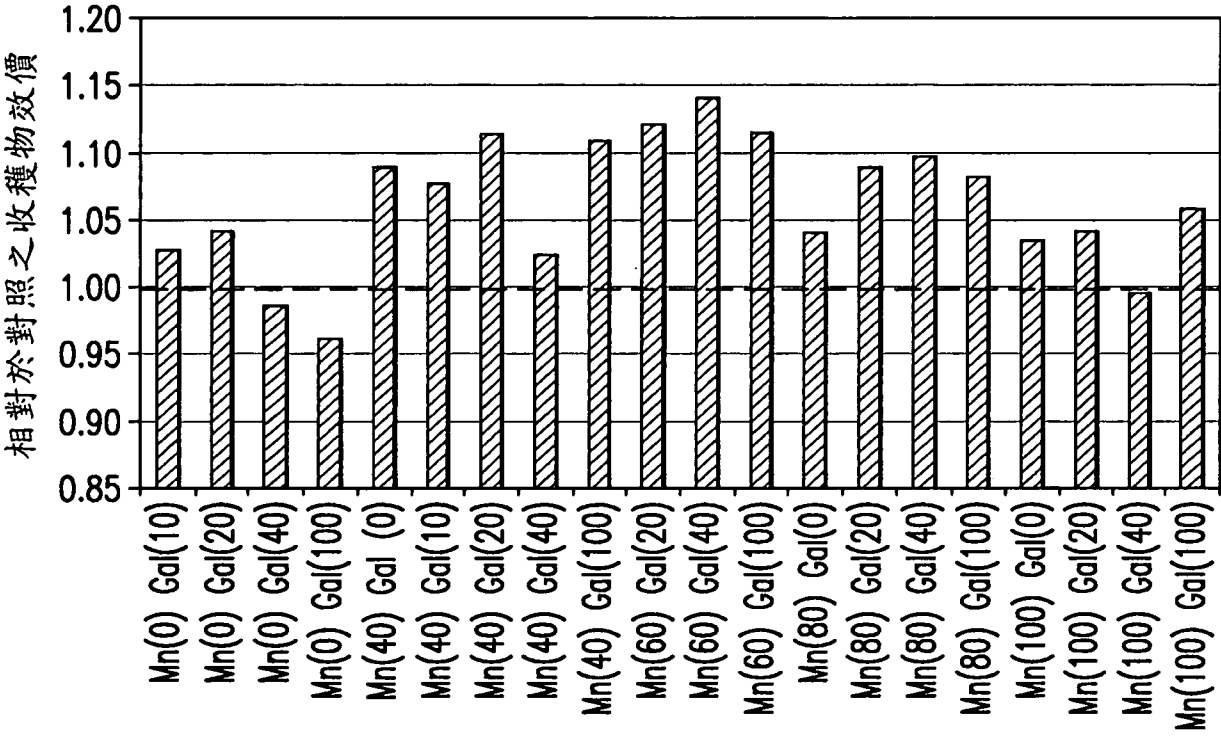


圖 1C

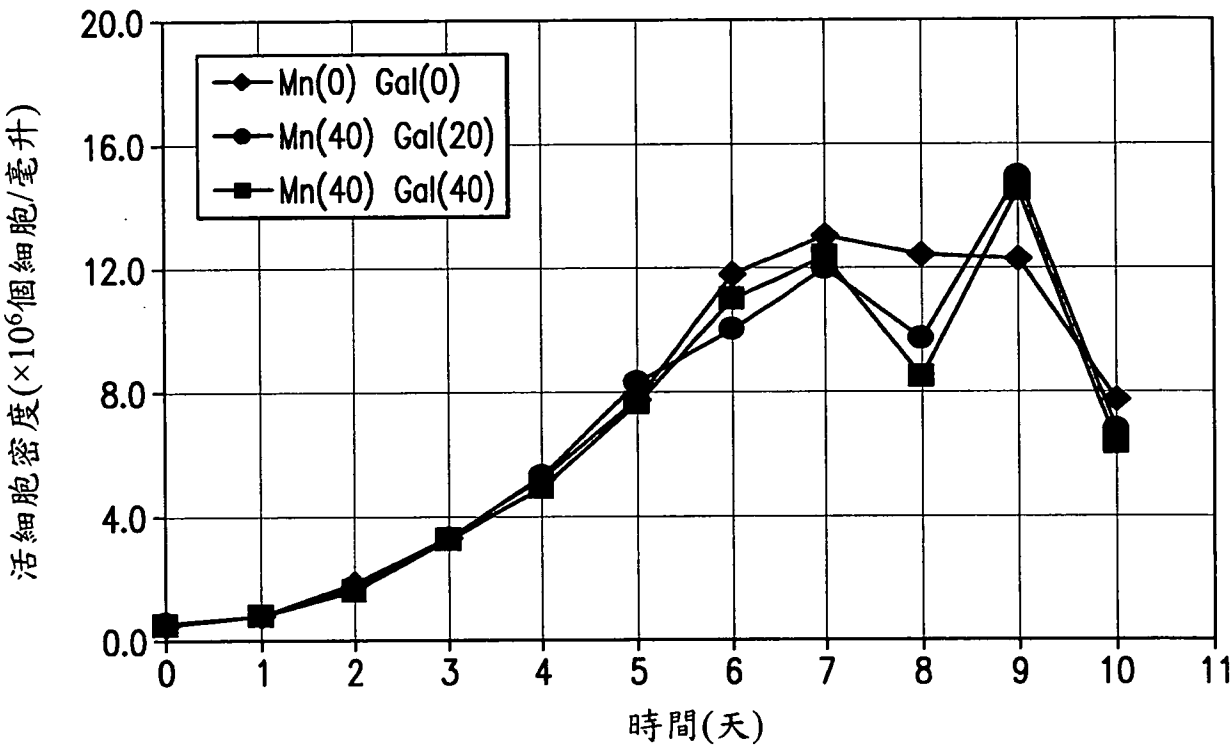


圖2A

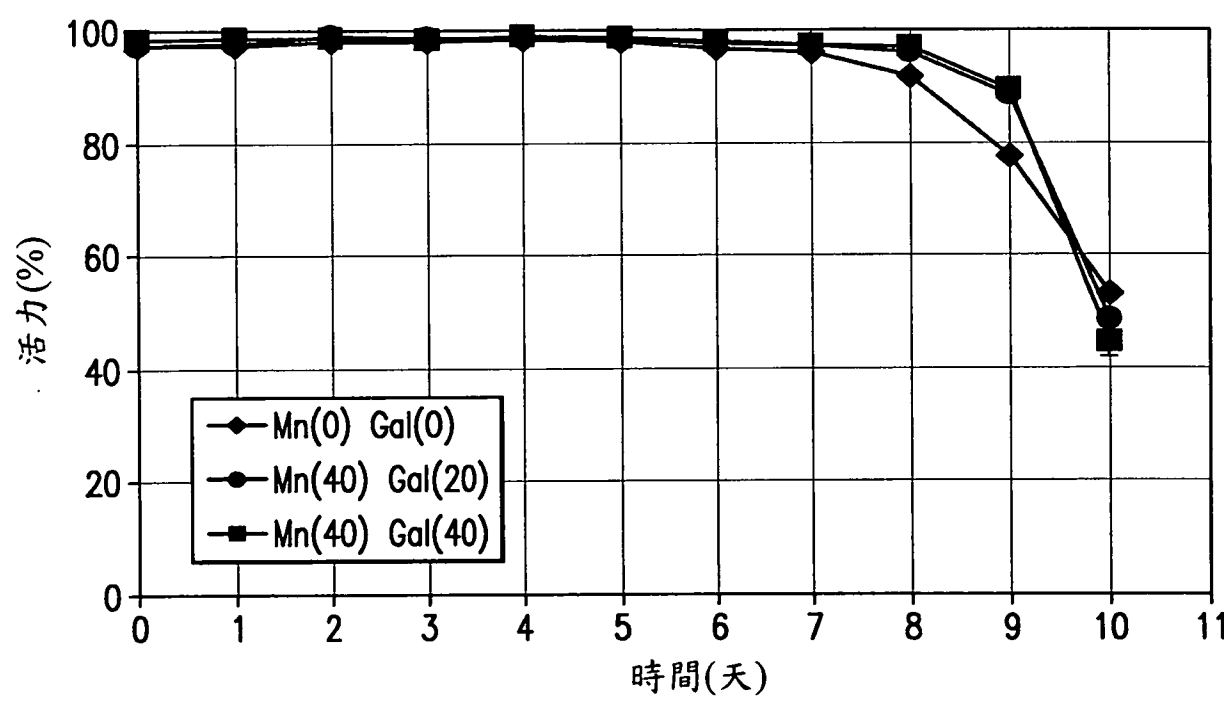


圖2B

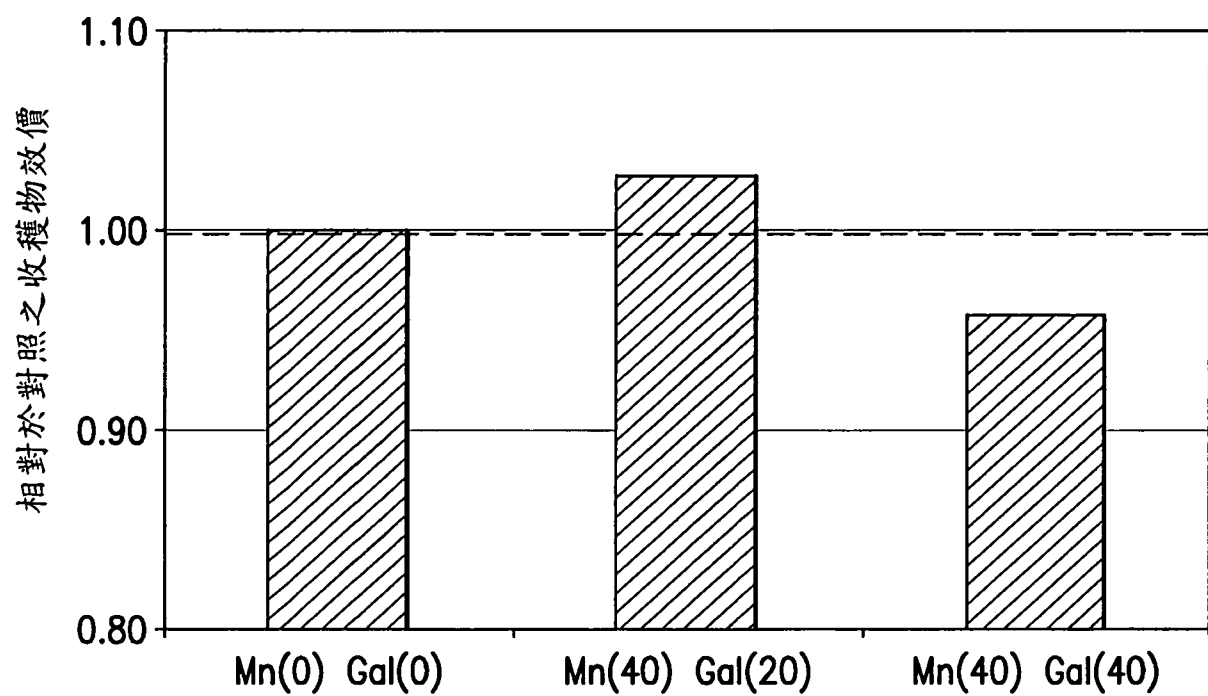


圖2C

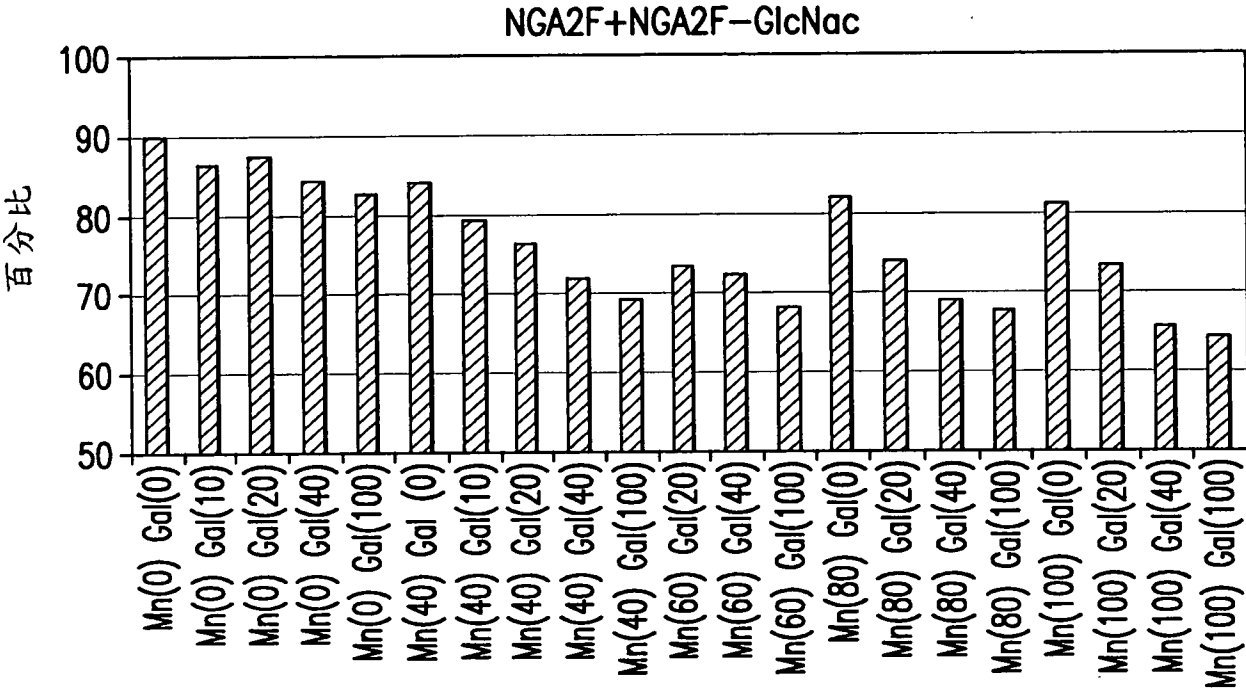


圖 3A

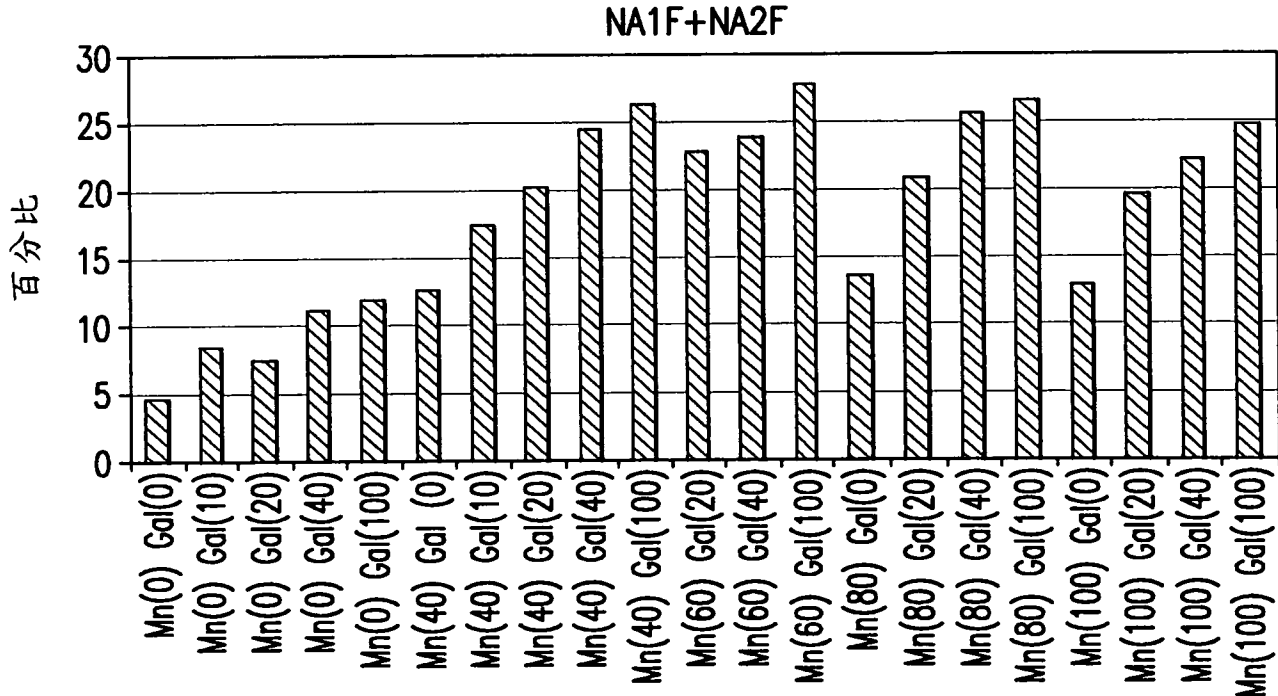
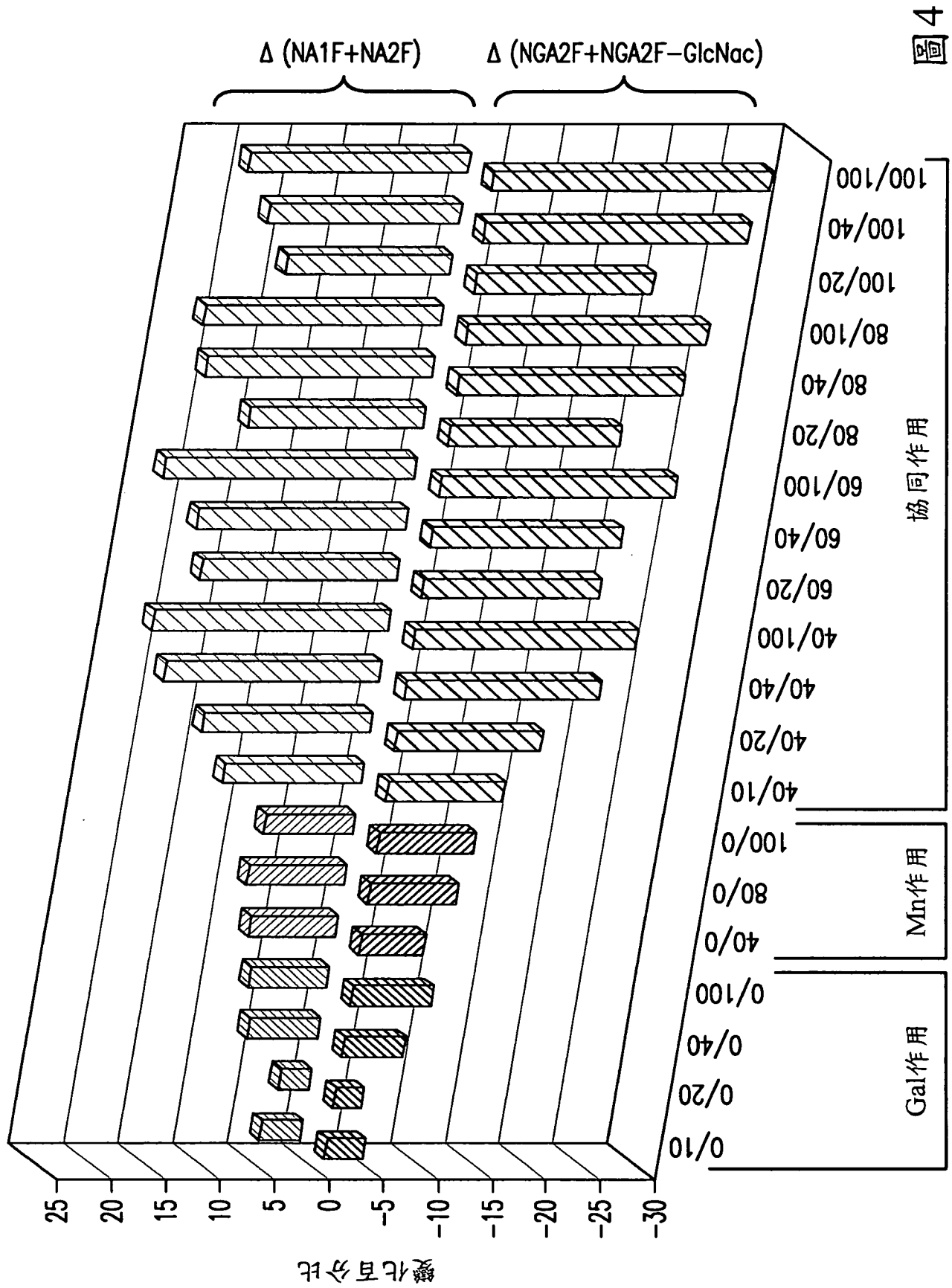


圖 3B



錳 (μ M)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNac) %			Δ (NA1F+NA2F) (%)		
				僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	90.0	4.7						
0	10	86.5	8.4	-3.5			3.8		
0	20	87.4	7.4	-2.6			2.8		
0	40	84.4	11.2	-5.5			6.5		
0	100	82.6	11.8	-7.3			7.2		
40	0	84.1	12.7		-5.8			8.0	
80	0	82.0	13.6		-8.0			9.0	
100	0	81.2	12.8		-8.8			8.2	
40	10	79.2	17.4			-10.7			12.7
40	20	76.4	20.2			-13.5			15.5
40	40	71.9	24.5			-18.0			19.9
40	100	69.3	26.3			-20.7			21.7
60	20	73.5	22.8			-16.5			18.1
60	40	72.3	23.9			-17.6			19.3
60	100	68.2	27.8			-21.8			23.1
80	20	74.0	20.8			-15.9			16.1
80	40	69.1	25.5			-20.8			20.9
80	100	67.7	26.5			-22.2			21.9
100	20	73.4	19.6			-16.5			15.0
100	40	65.6	22.1			-24.4			17.5
100	100	64.4	24.8			-25.6			20.1

圖5

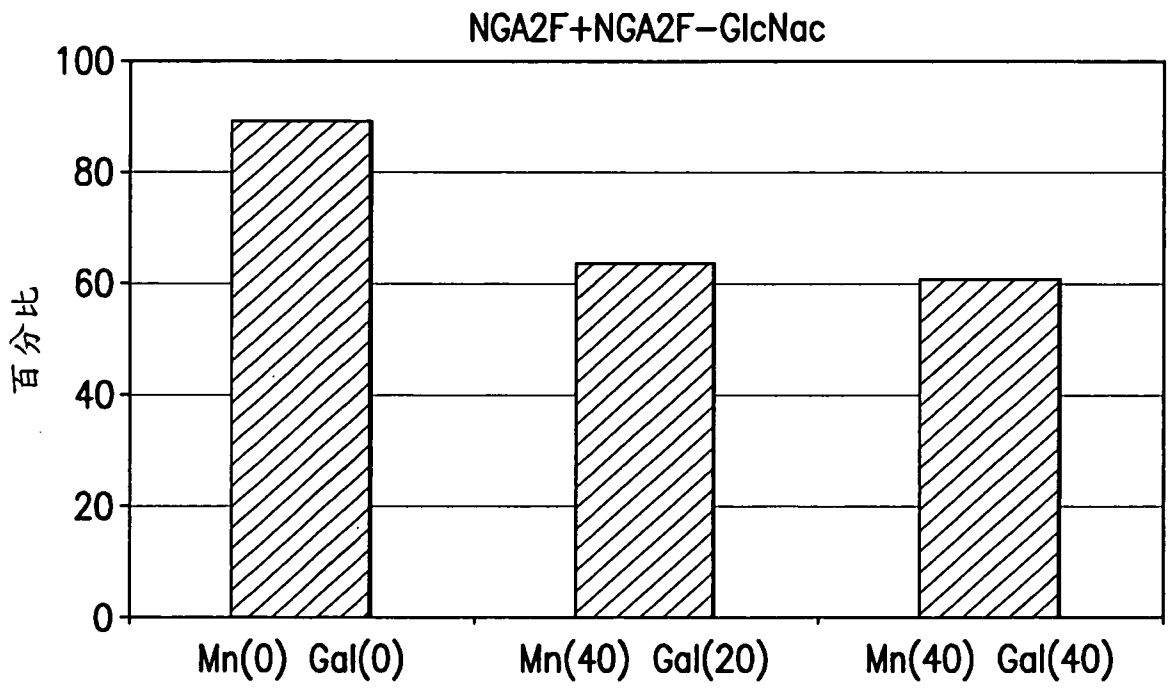


圖 6A

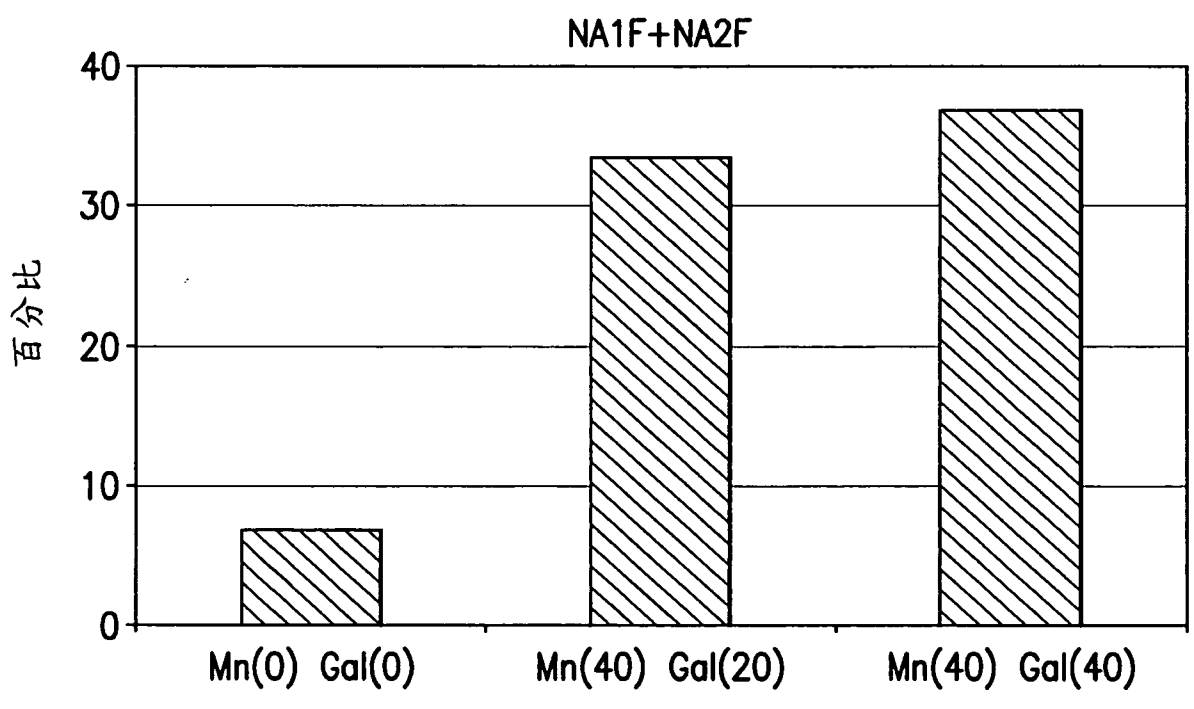


圖 6B

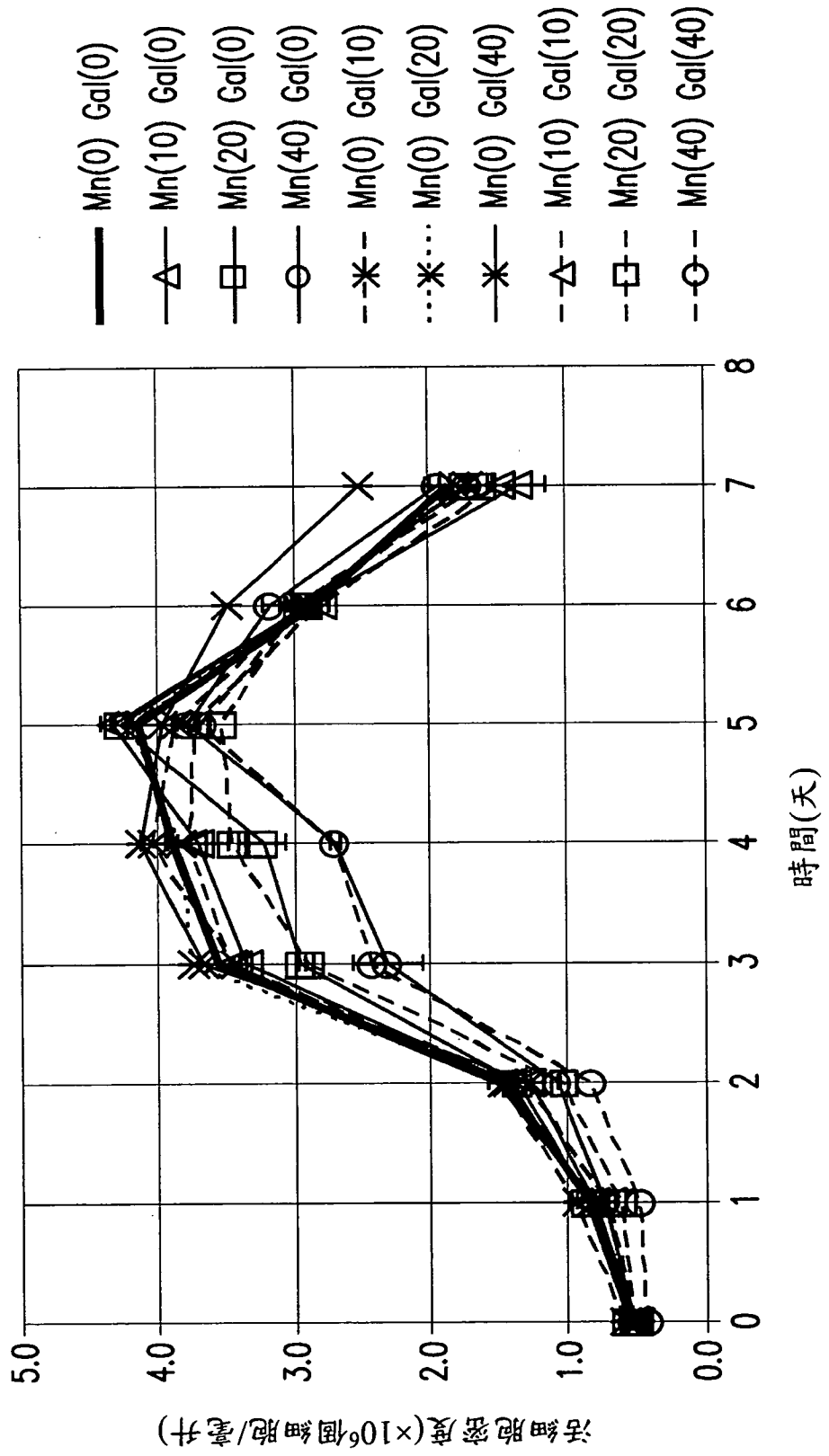


圖7A

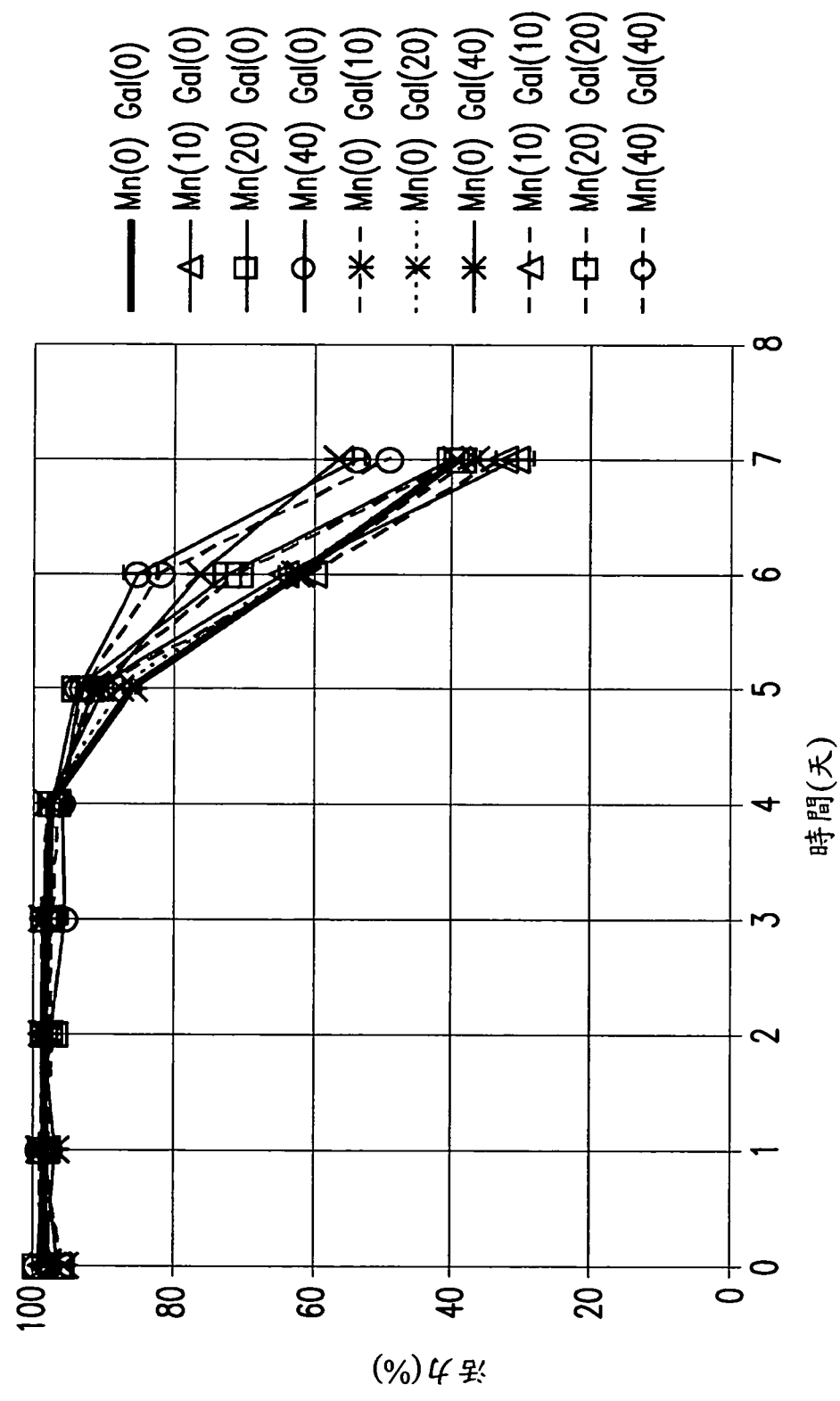


圖 7B

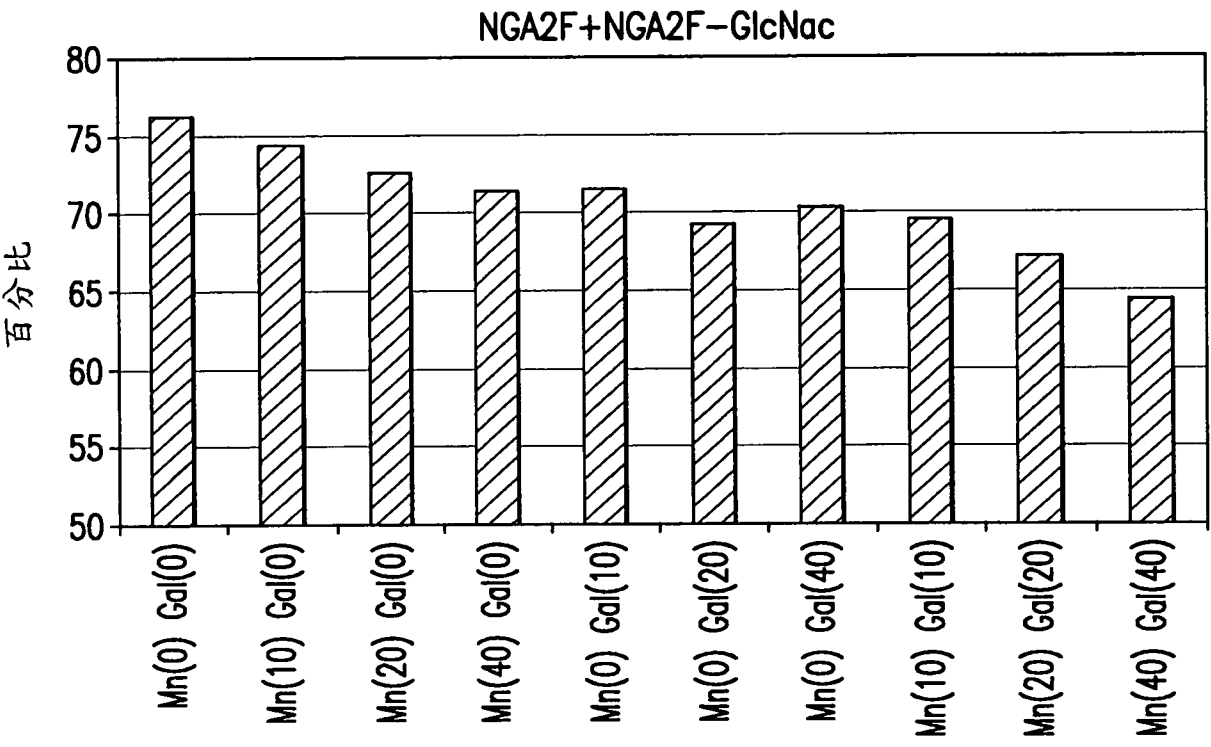


圖 8A

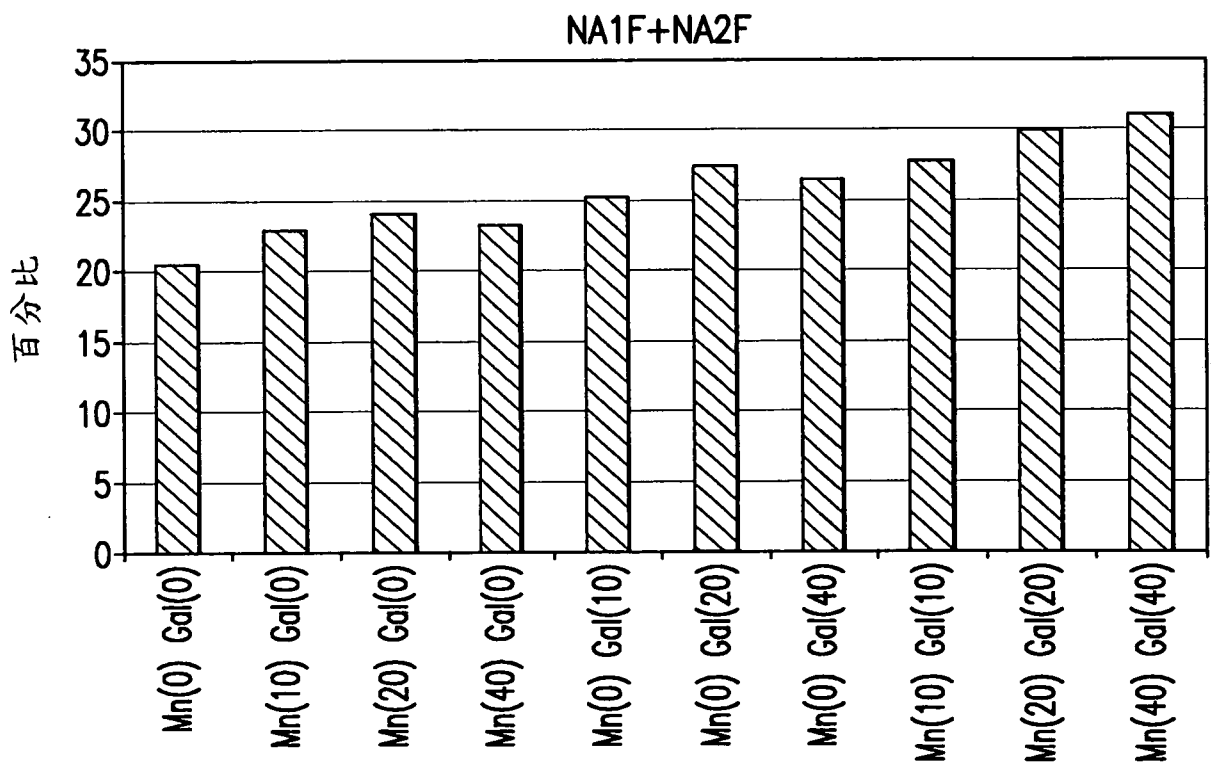


圖 8B

錳 (μM)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNac) %			Δ (NA1F+NA2F) (%)		
				僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	76.2	20.5						
10	0	74.4	22.9		-1.9			2.4	
20	0	72.6	24.0		-3.6			3.5	
40	0	71.4	23.3		-4.9			2.8	
0	10	71.5	25.2	-4.7			4.7		
0	20	69.3	27.5	-7.0			7.0		
0	40	70.4	26.4	-5.9			5.9		
10	10	69.5	27.8			-6.8			7.3
20	20	67.2	29.9			-9.1			9.4
40	40	64.4	31.1			-11.9			10.6

圖9

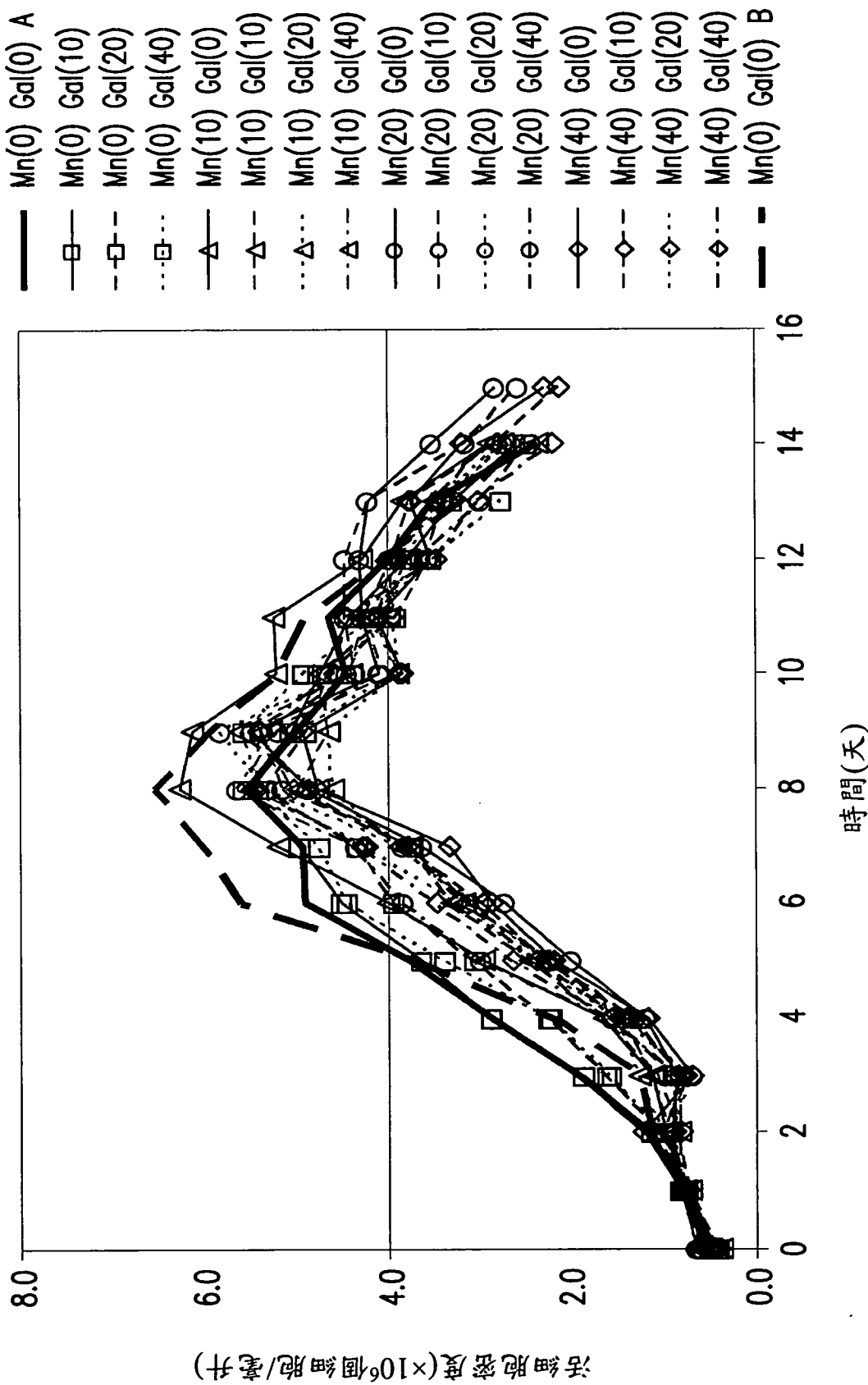
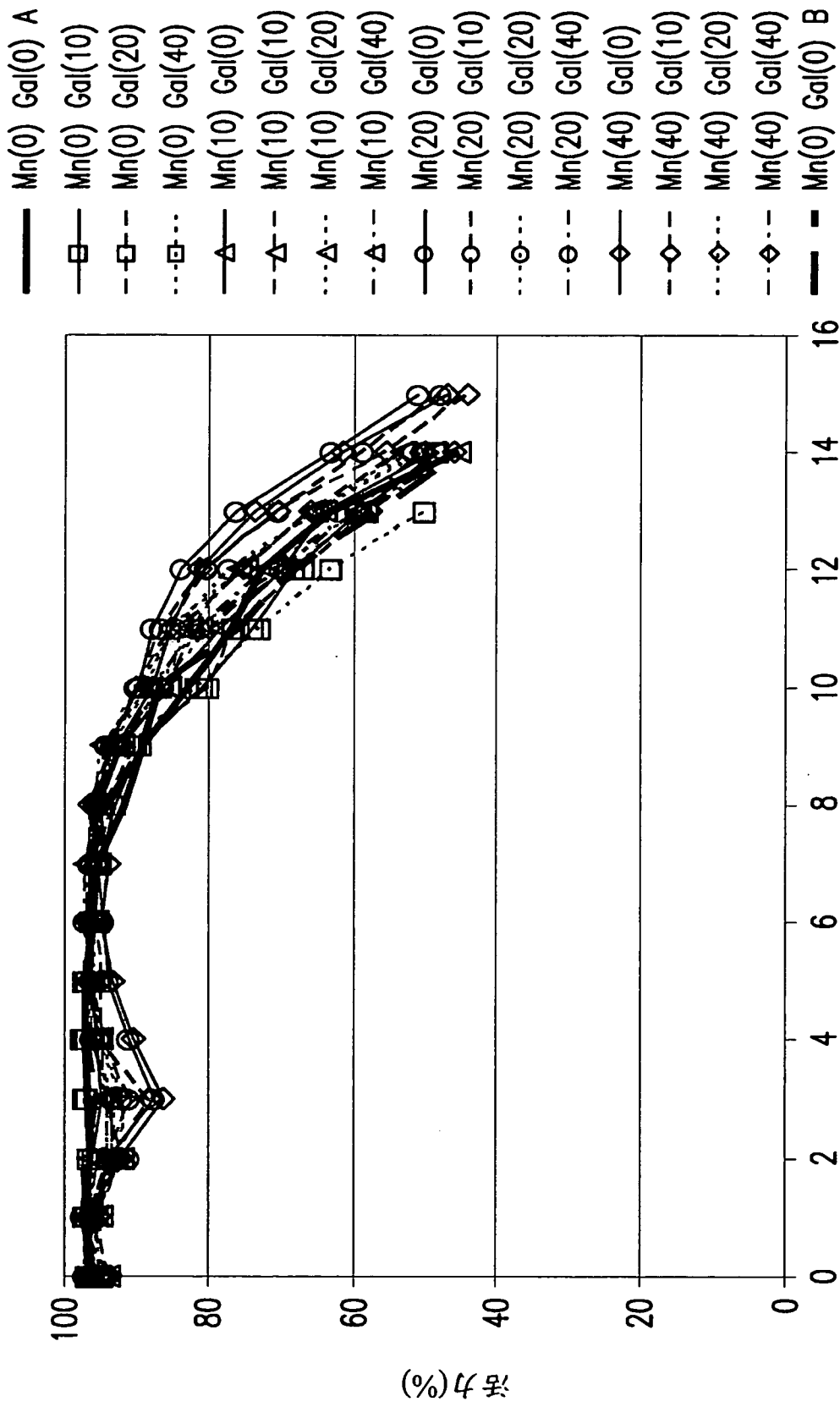


圖10A



時間(天)

圖 10B

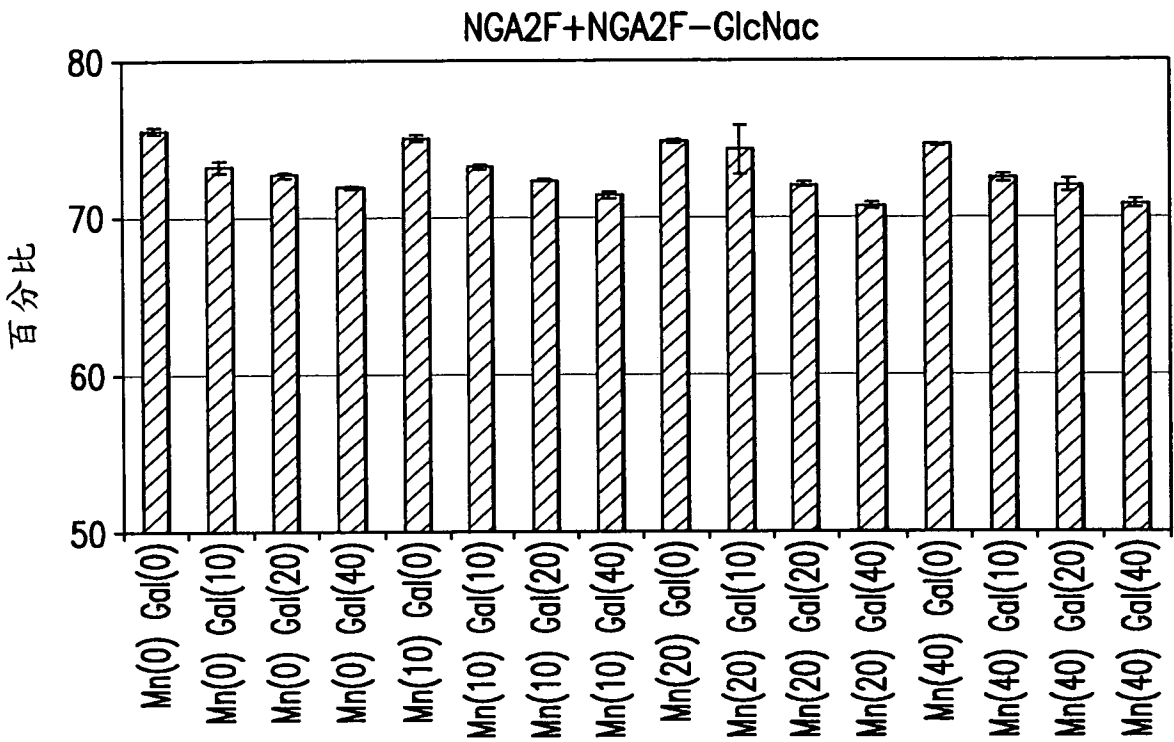


圖 11A

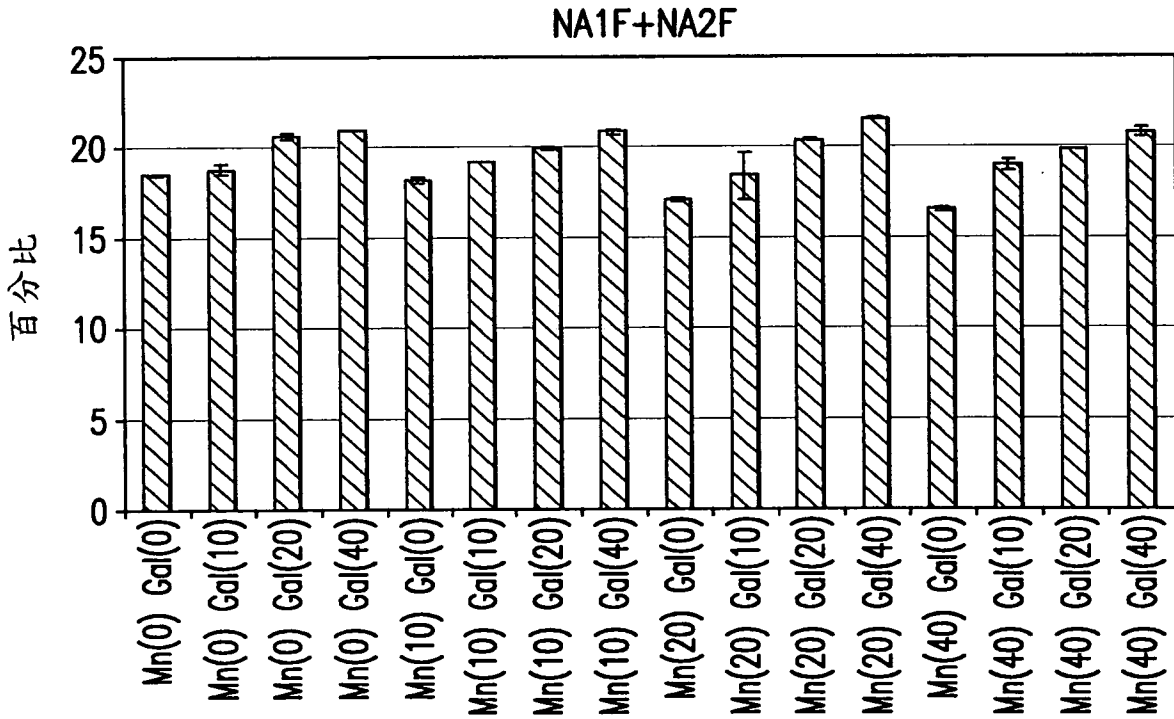


圖 11B

錳 (μM)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNac) %		僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	75.5	17.5								
0	10	73.2	20.3	-2.3					2.8		
0	20	72.7	20.6	-2.9					3.2		
0	40	71.9	21.4	-3.6					3.9		
10	0	75.0	18.2		-0.5					0.7	
10	10	73.2	19.2			-2.3					1.7
10	20	72.3	20.0			-3.2					2.5
10	40	71.4	20.8			-4.2					3.4
20	0	74.9	17.1		-0.7					-0.4	
20	10	74.3	18.4			-1.3					0.9
20	20	72.1	20.4			-3.5					2.9
20	40	70.7	21.6			-4.8					4.1
40	0	74.6	16.6		-0.9					-0.9	
40	10	72.5	19.0			-3.1					1.5
40	20	72.0	19.8			-3.6					2.4
40	40	70.8	20.8			-4.7					3.3

圖12

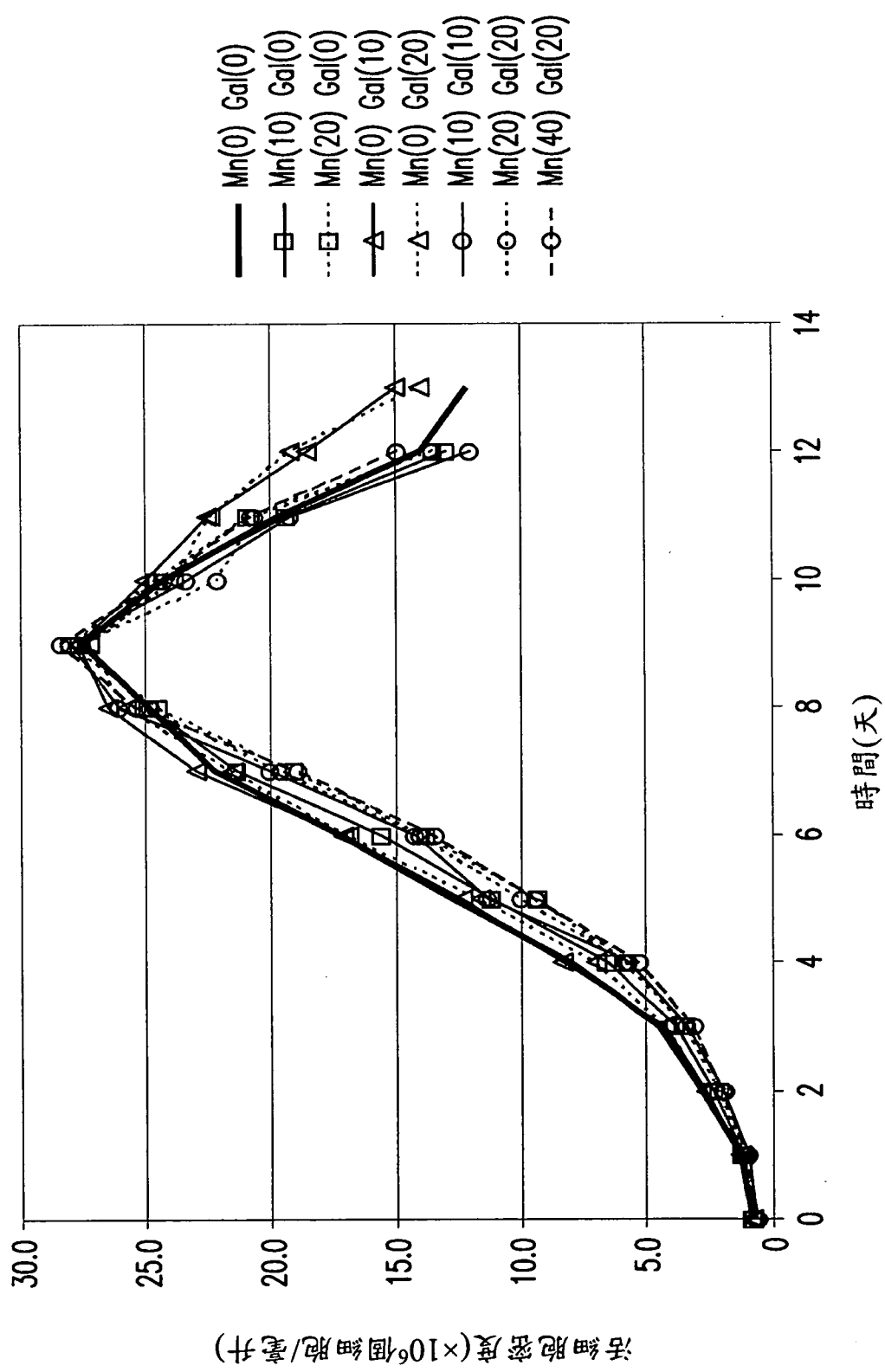


圖13A

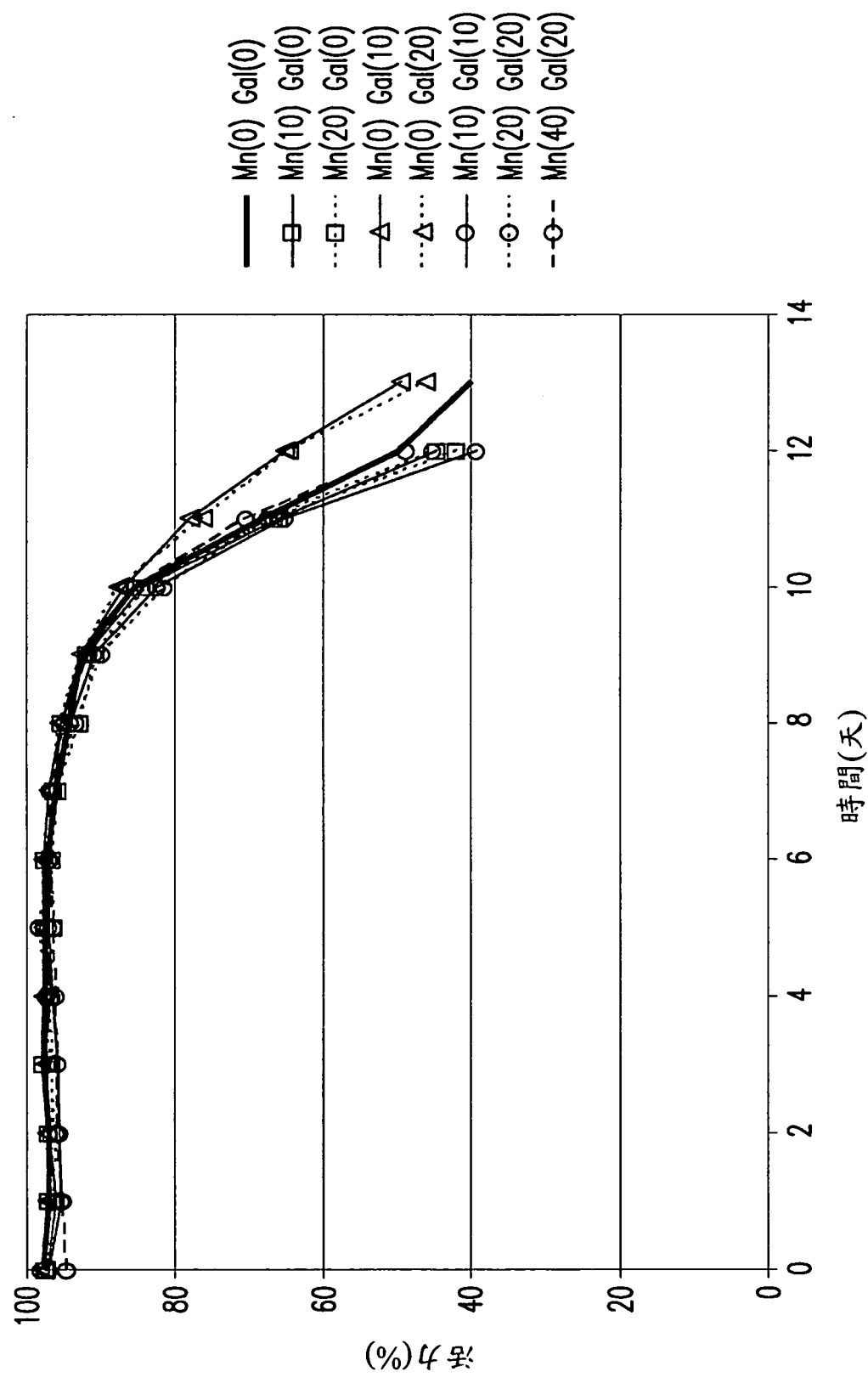


圖13B

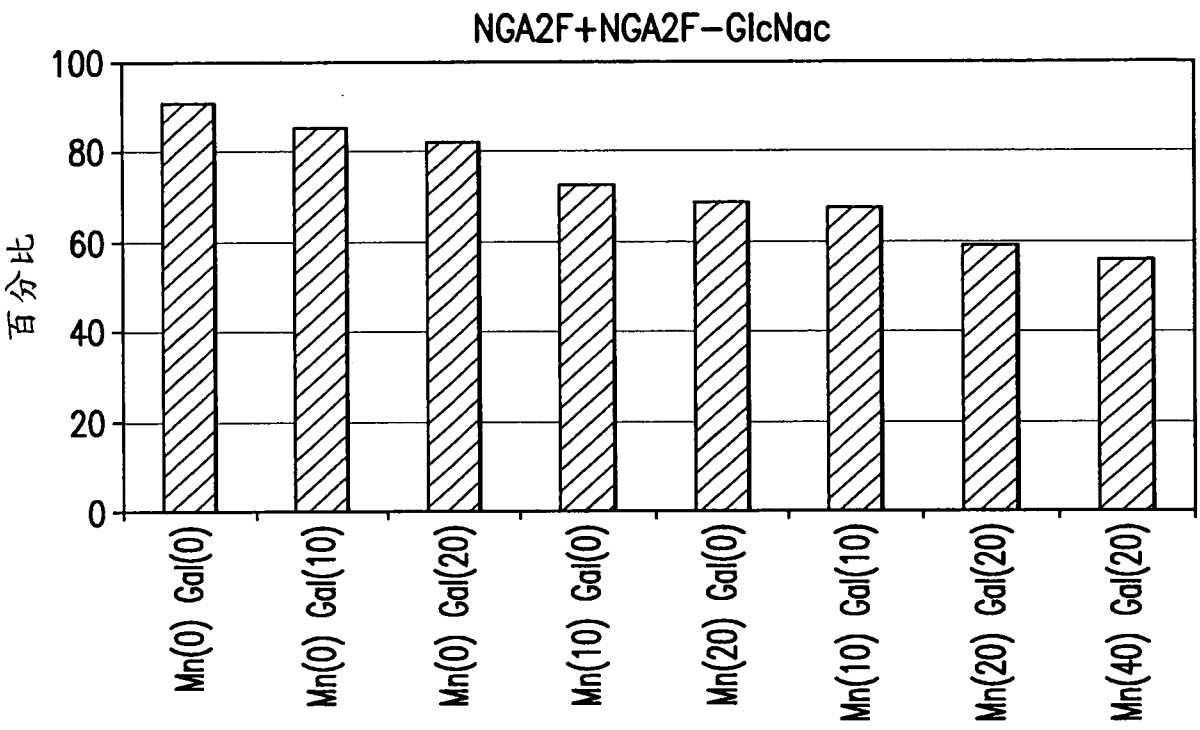


圖 14A

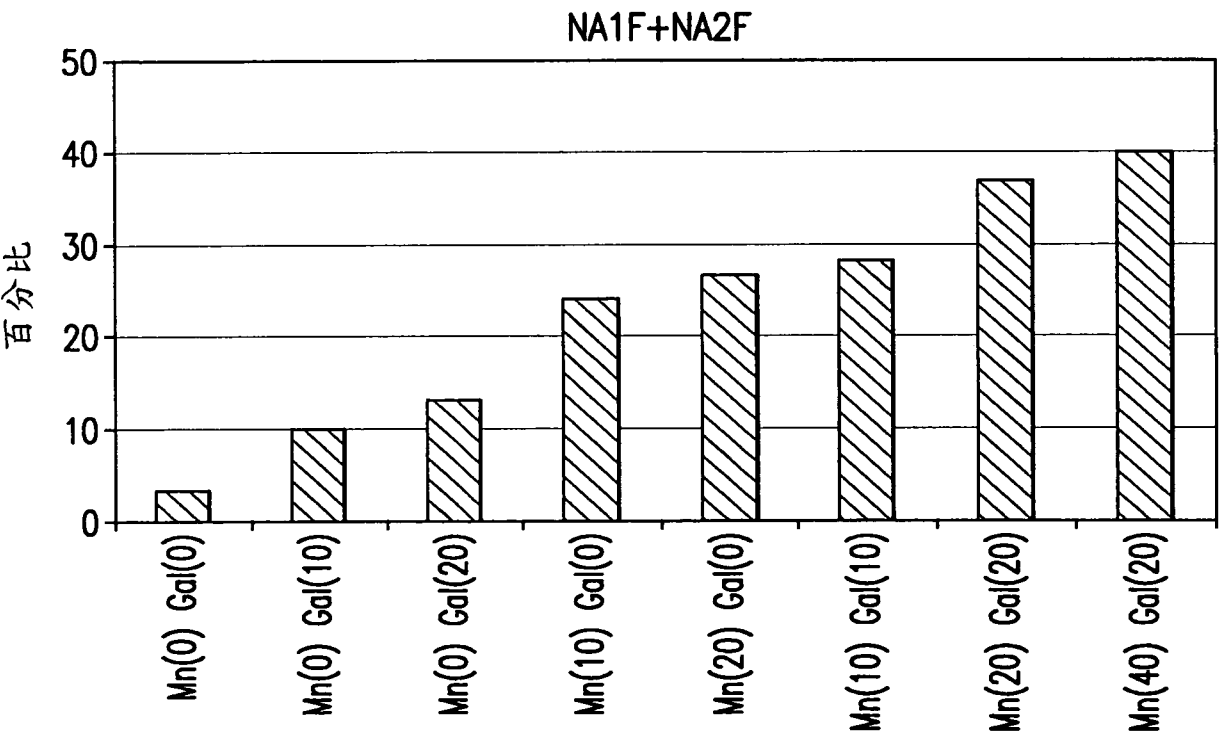


圖 14B

錳 (μM)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNac) %			Δ (NA1F+NA2F) (%)		
				僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	91.0	3.3						
0	10	85.3	10.1	-5.7			6.8		
0	20	82.1	13.3	-8.9			10.0		
10	0	72.8	24.0		-18.3			20.7	
20	0	68.6	26.5		-22.4			23.2	
10	10	67.4	28.2			-23.6			24.9
20	20	59.0	36.9			-32.0			33.6
40	20	55.8	40.1			-35.3			36.7

圖15

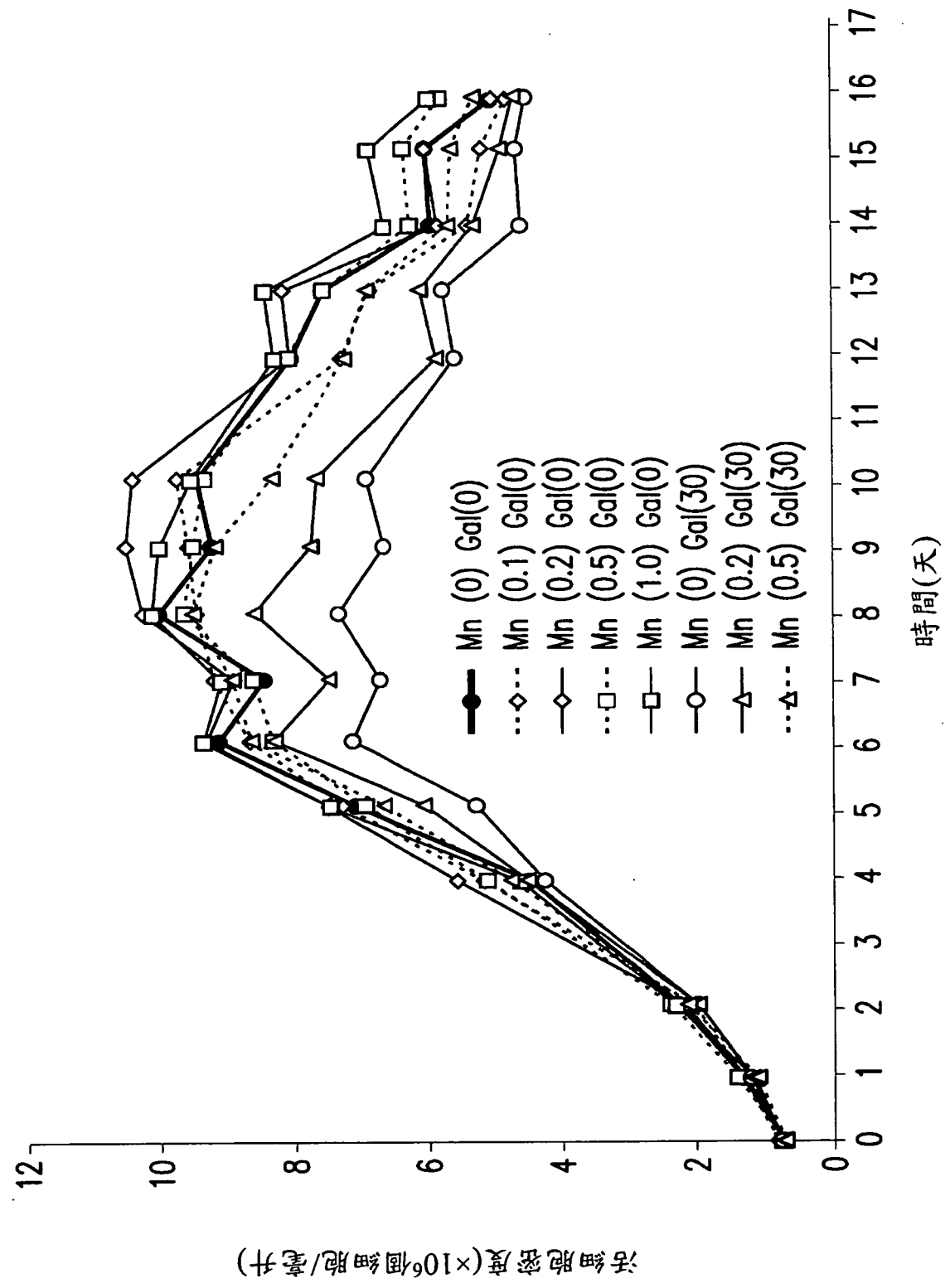


圖16A

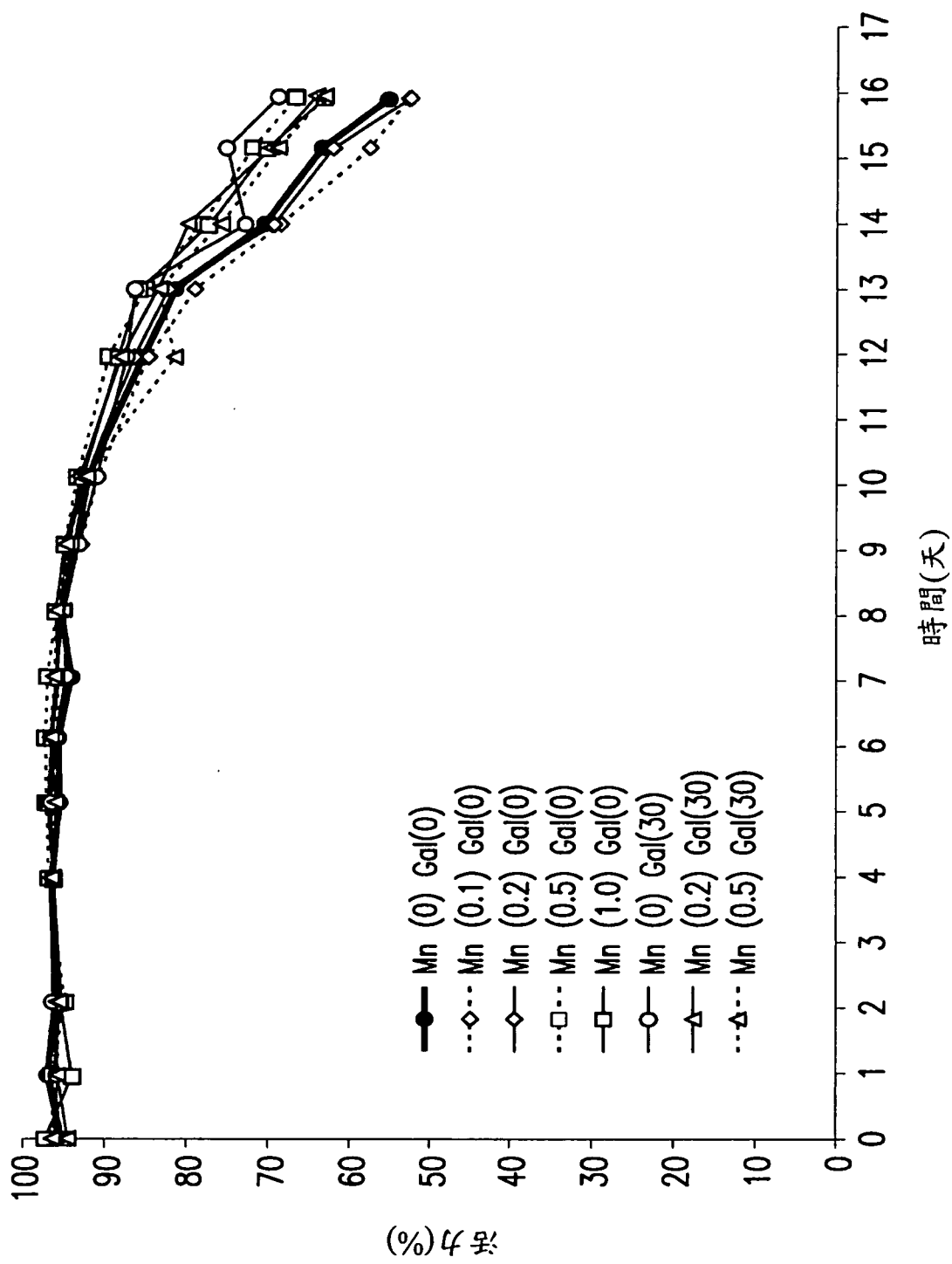


圖 16B

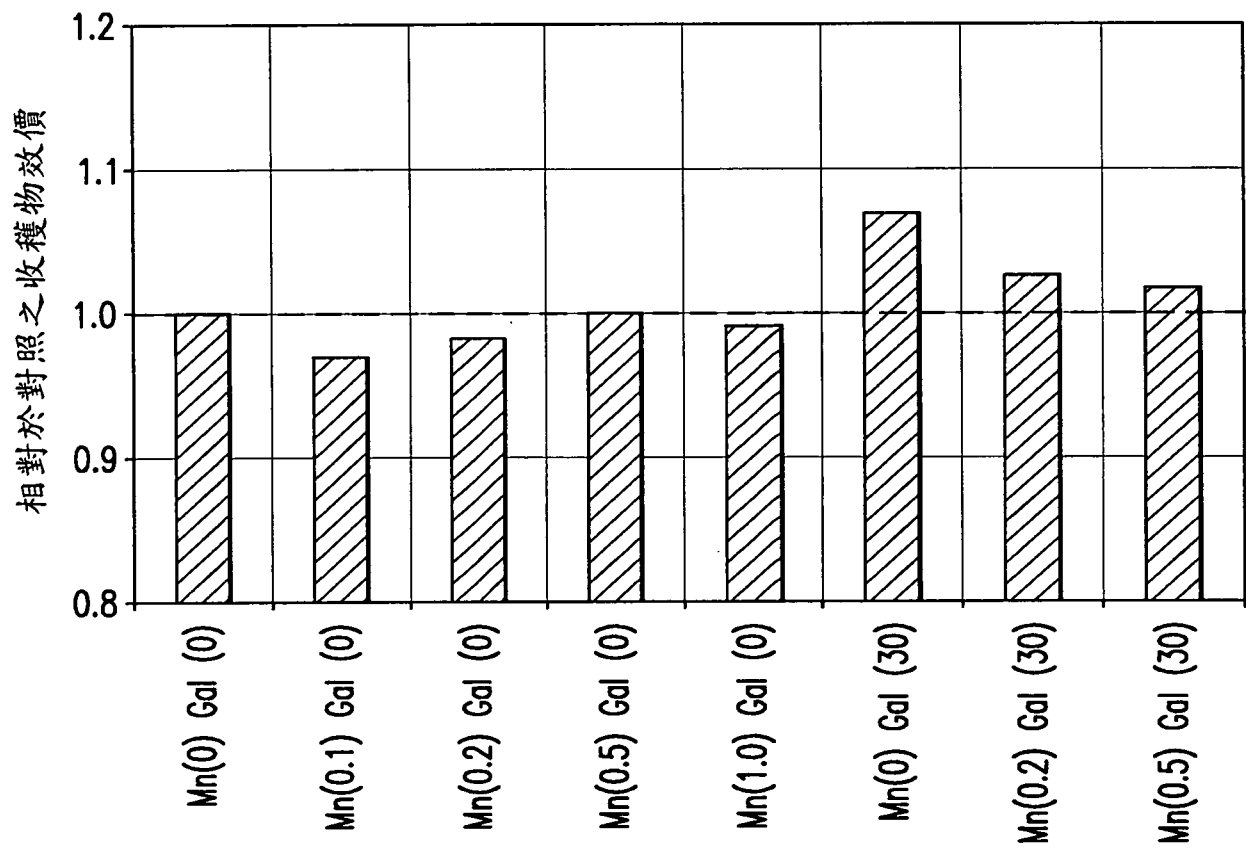


圖 16C

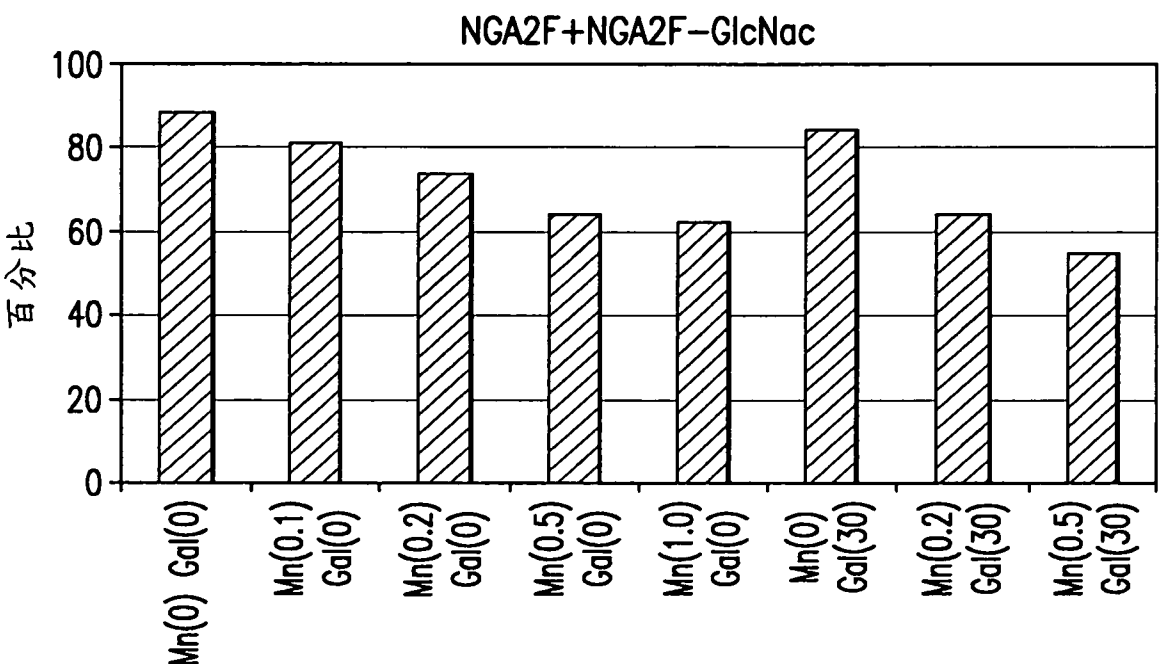


圖 17A

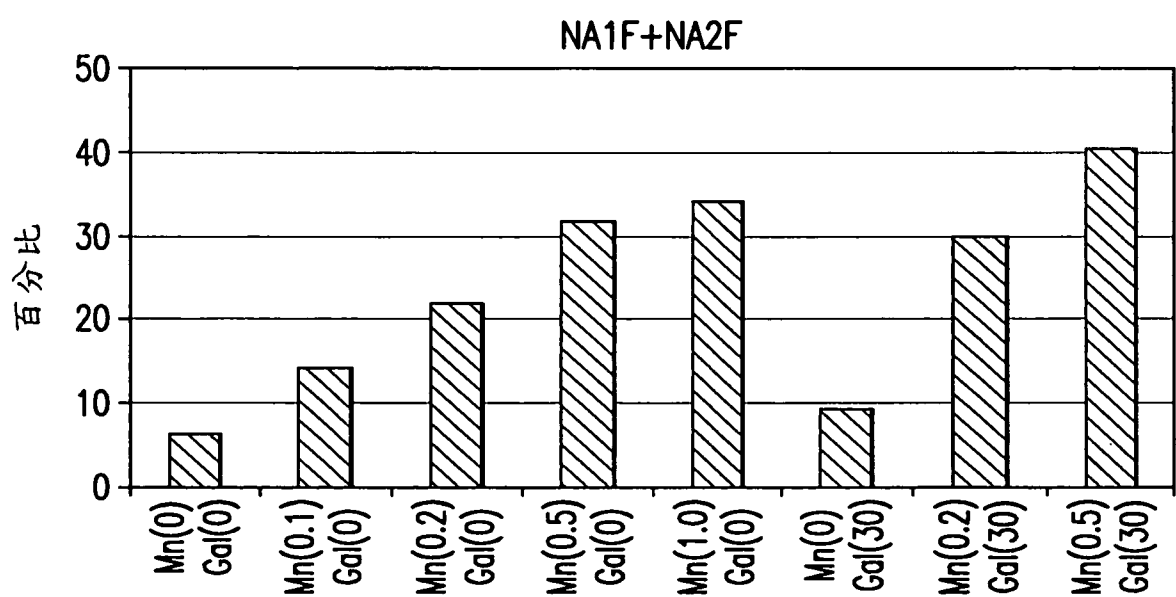


圖 17B

錳 (μM)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNAc	% NA1F+NA2F	Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNAc) 變化%			Δ (NA1F+NA2F) 變化%		
				僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	89	6						
0.1	0	82	13		-7.3			7.8	
0.2	0	75	21		-14.8			15.6	
0.5	0	65	30		-24.5			25.3	
1.0	0	63	33		-26.2			27.7	
0	30	84	8	-4.2			3.1		
0.2	30	65	28			-24.6			23.6
0.5	30	56	38			-33.6			34.1

圖18

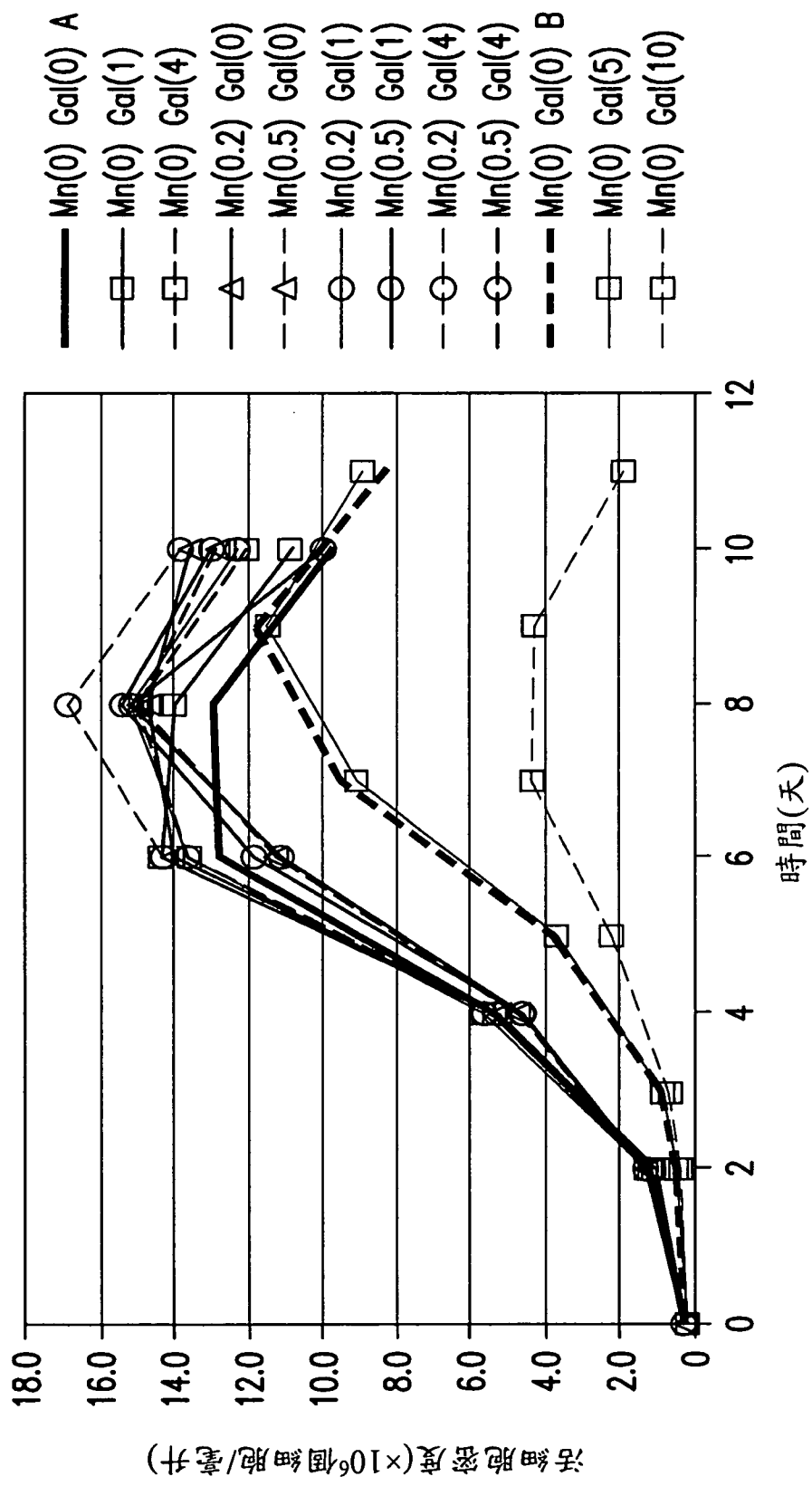


圖19A

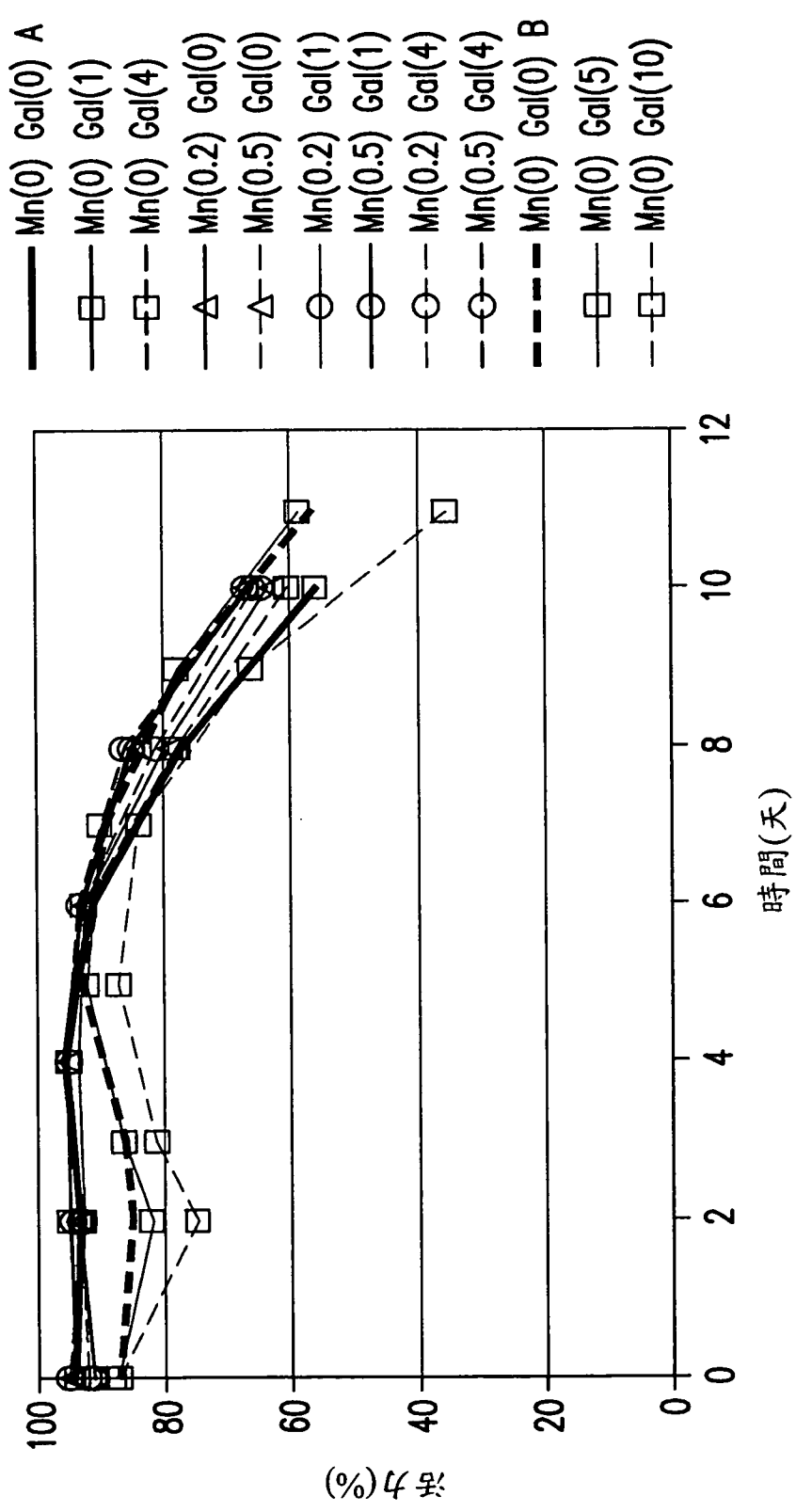


圖 19B

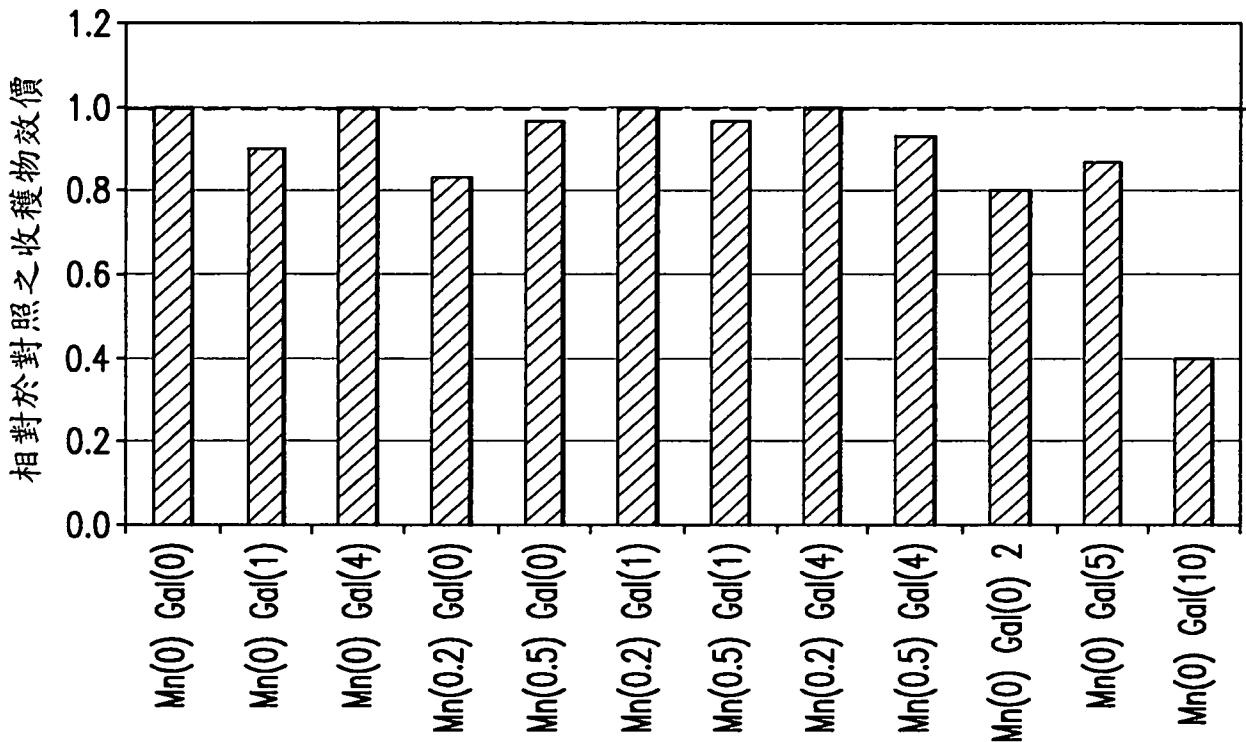


圖 19C

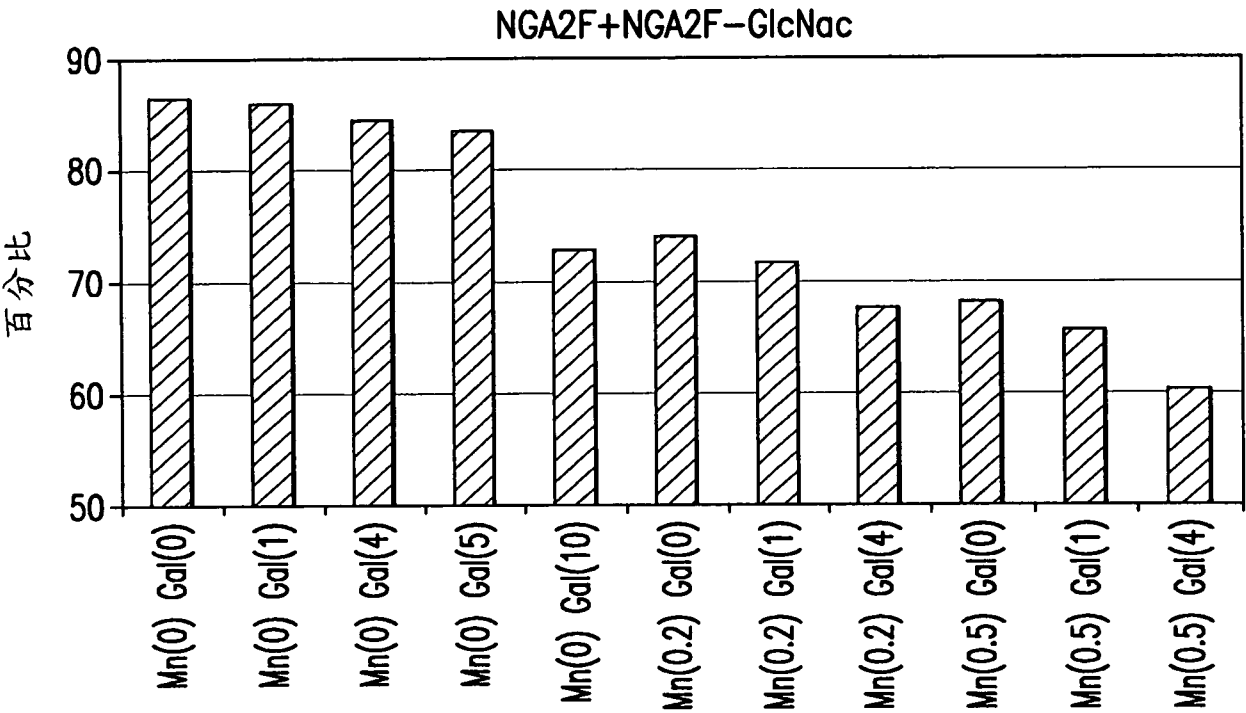


圖 20A

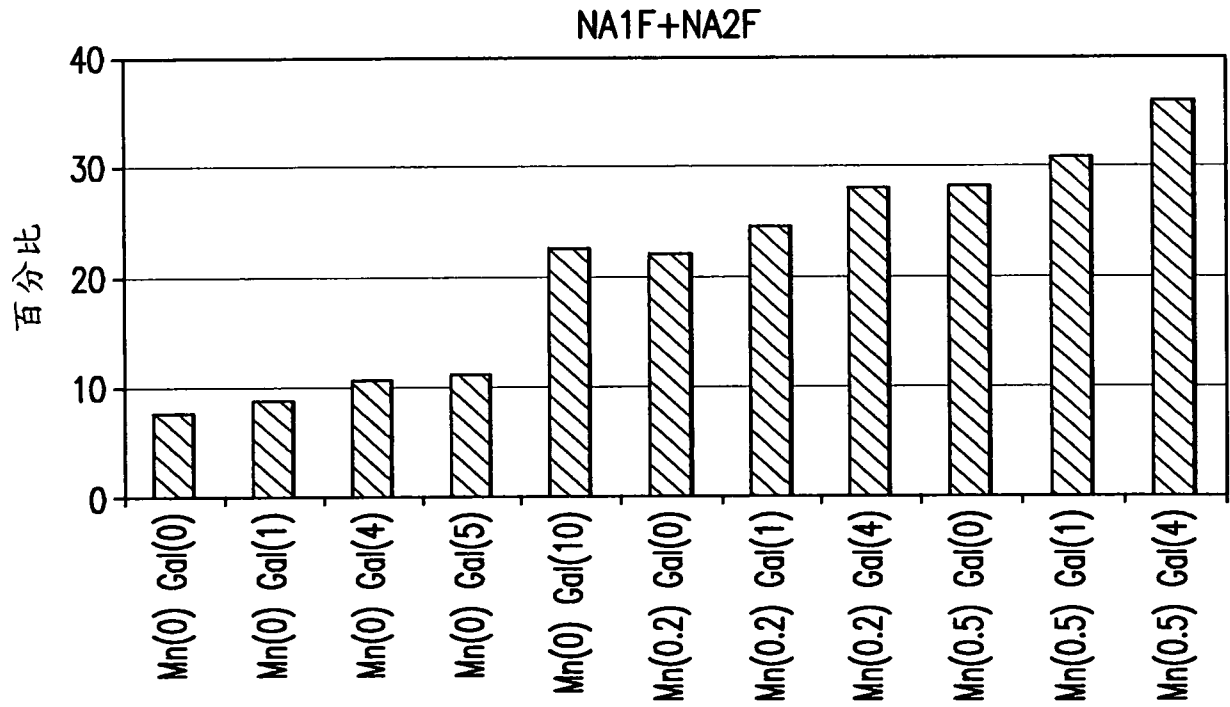


圖 20B

錳 (μ M)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖			僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖		
0	0	86.3	8.0										
0	0	86.8	7.2										
0	1	86.1	8.8	-0.3				0.8					
0	4	84.5	10.6	-1.8				2.6					
0	5	83.6	11.0	-3.2				3.8					
0	10	72.9	22.6	-13.9				15.4					
0.2	0	74.0	22.1		-12.3				14.1				
0.5	0	68.2	28.3		-18.1				20.3				
0.2	1	71.7	24.6			-14.6					16.6		
0.5	1	65.6	30.9			-20.7					22.9		
0.2	4	67.7	28.0			-18.7					20.0		
0.5	4	60.3	36.0			-26.0					28.0		

圖21

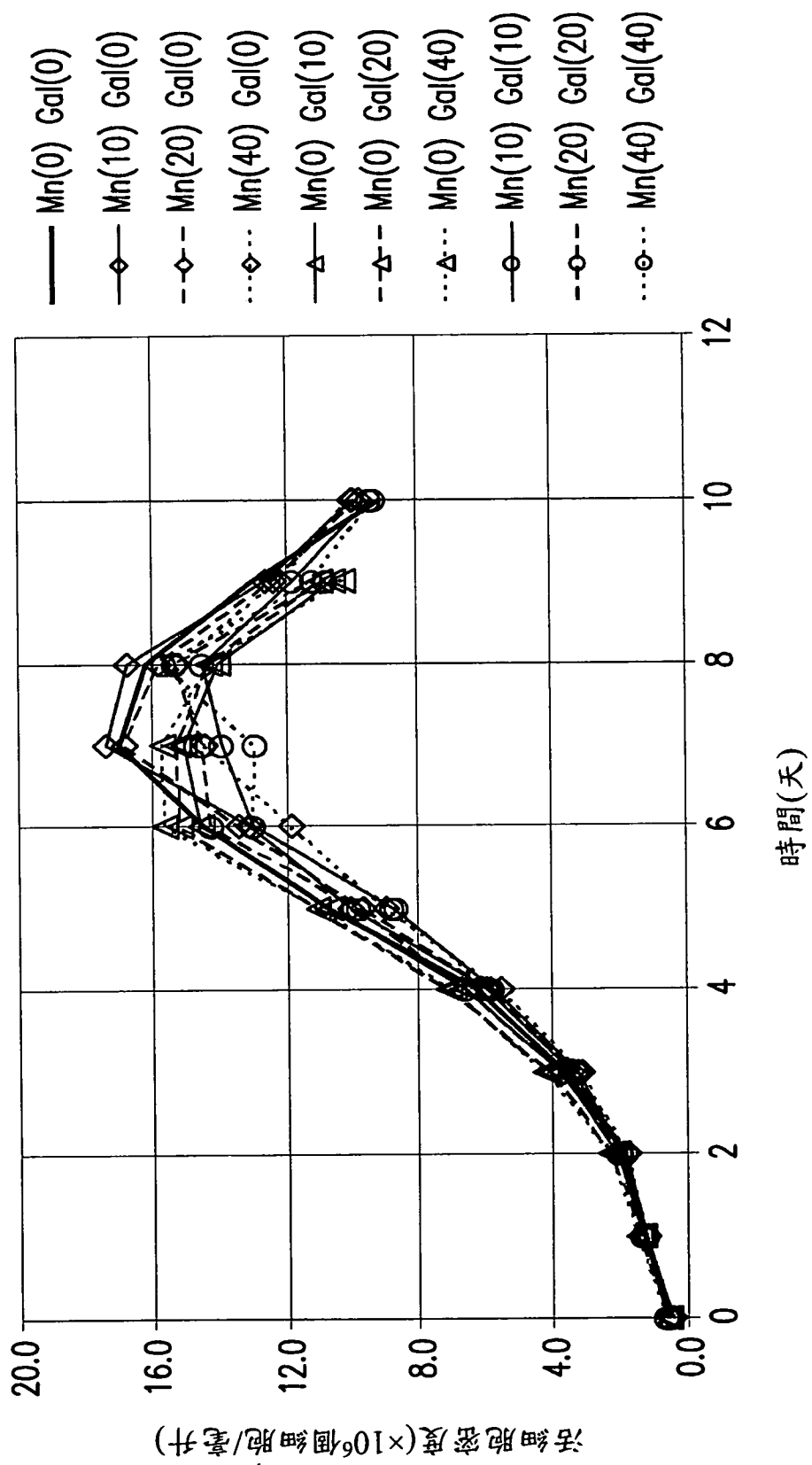


圖 22A

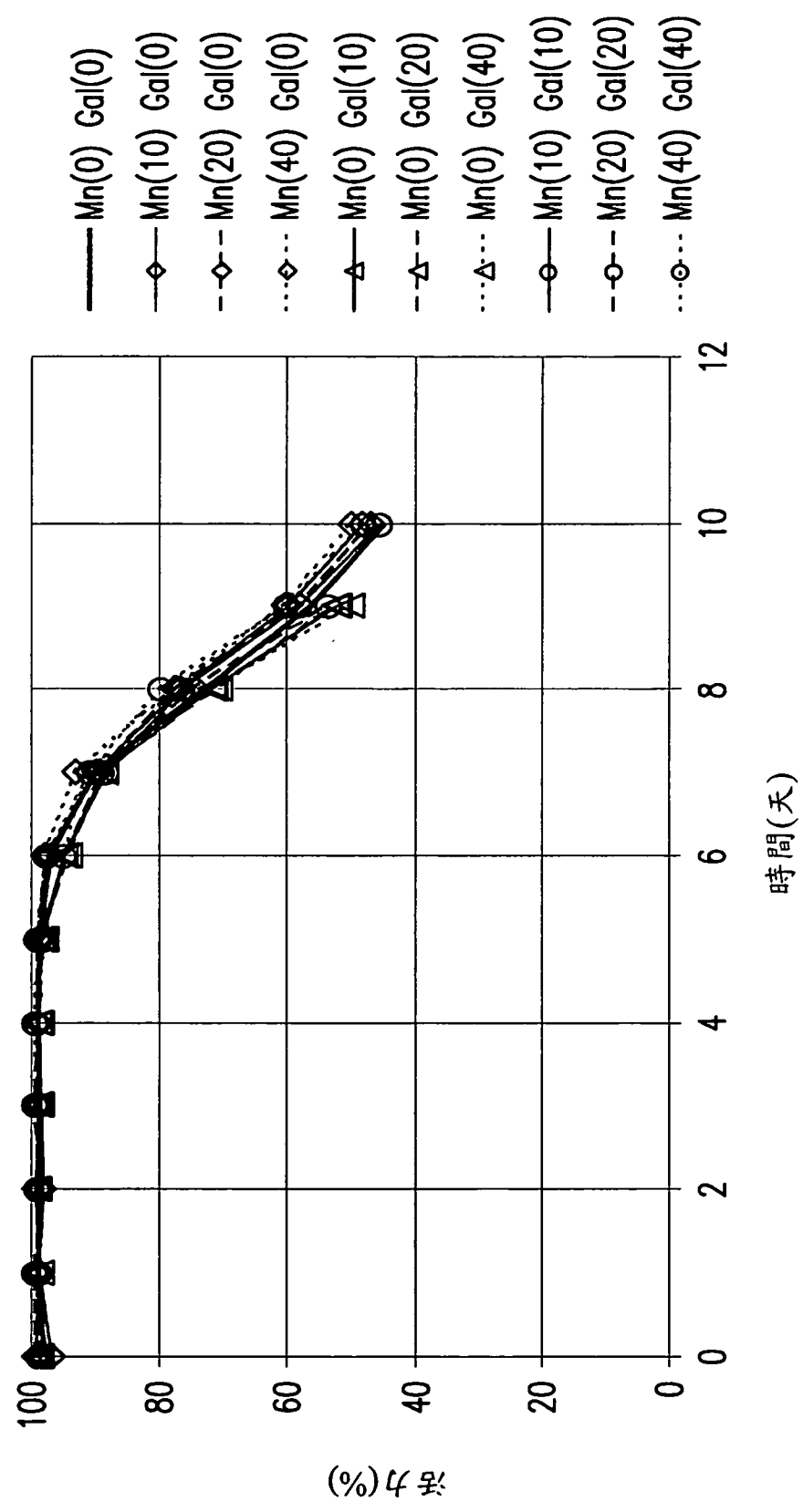


圖 22B

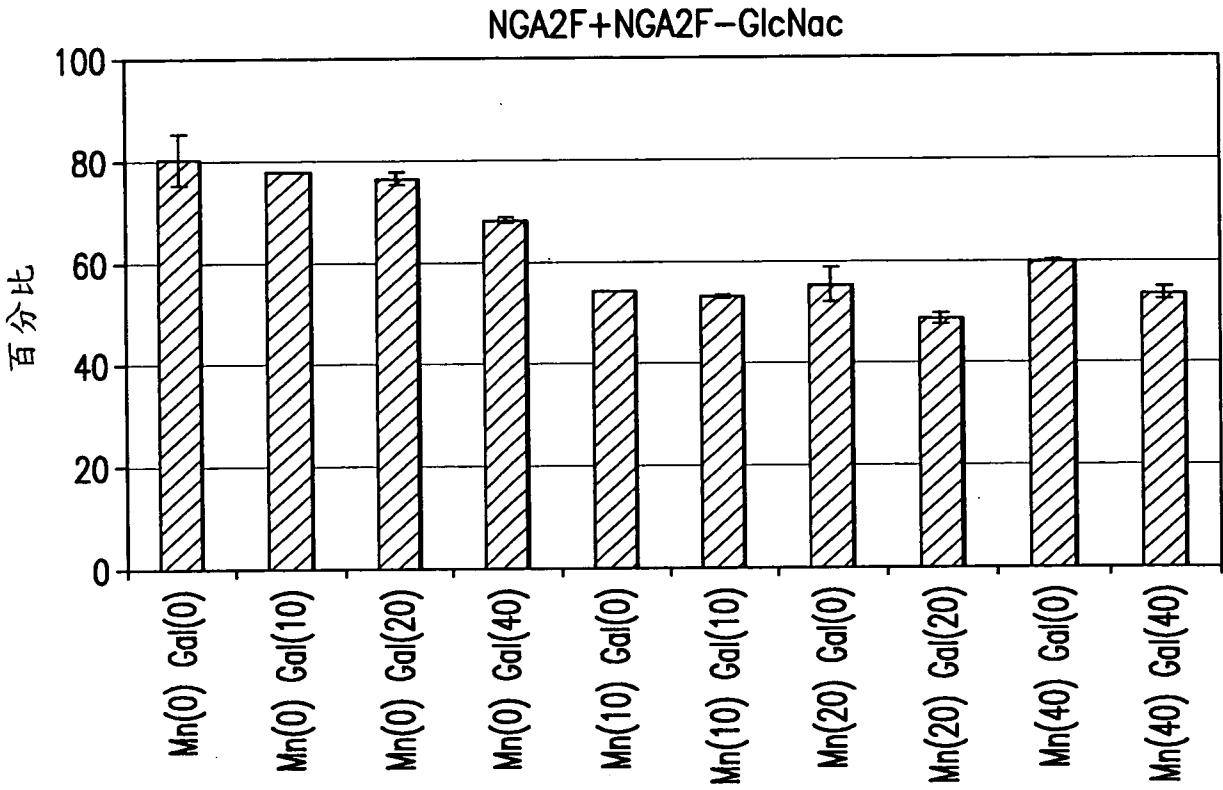


圖 23A

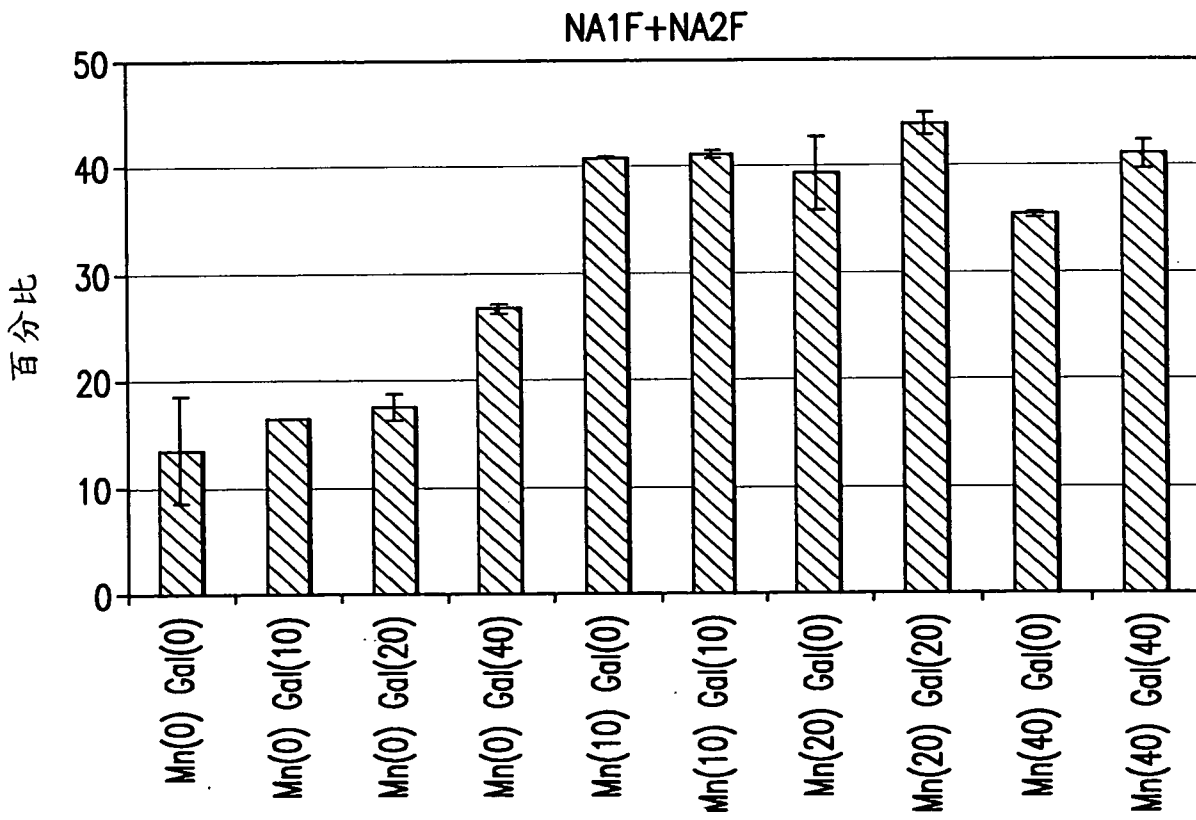


圖 23B

錳 (μ M)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNac) %		僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	80.2	13.6								
10	0	54.2	40.8		-26.0					27.3	
20	0	55.3	39.3		-24.9					25.7	
40	0	60.0	35.4		-20.2					21.8	
0	10	77.7	16.4	-2.5				2.9			
0	20	76.4	17.6	-3.8				4.1			
0	40	68.3	26.7	-11.9				13.1			
10	10	53.1	41.1			-27.1					27.6
20	20	48.7	43.9			-31.5					30.3
40	40	53.5	41.1			-26.7					27.6

圖24

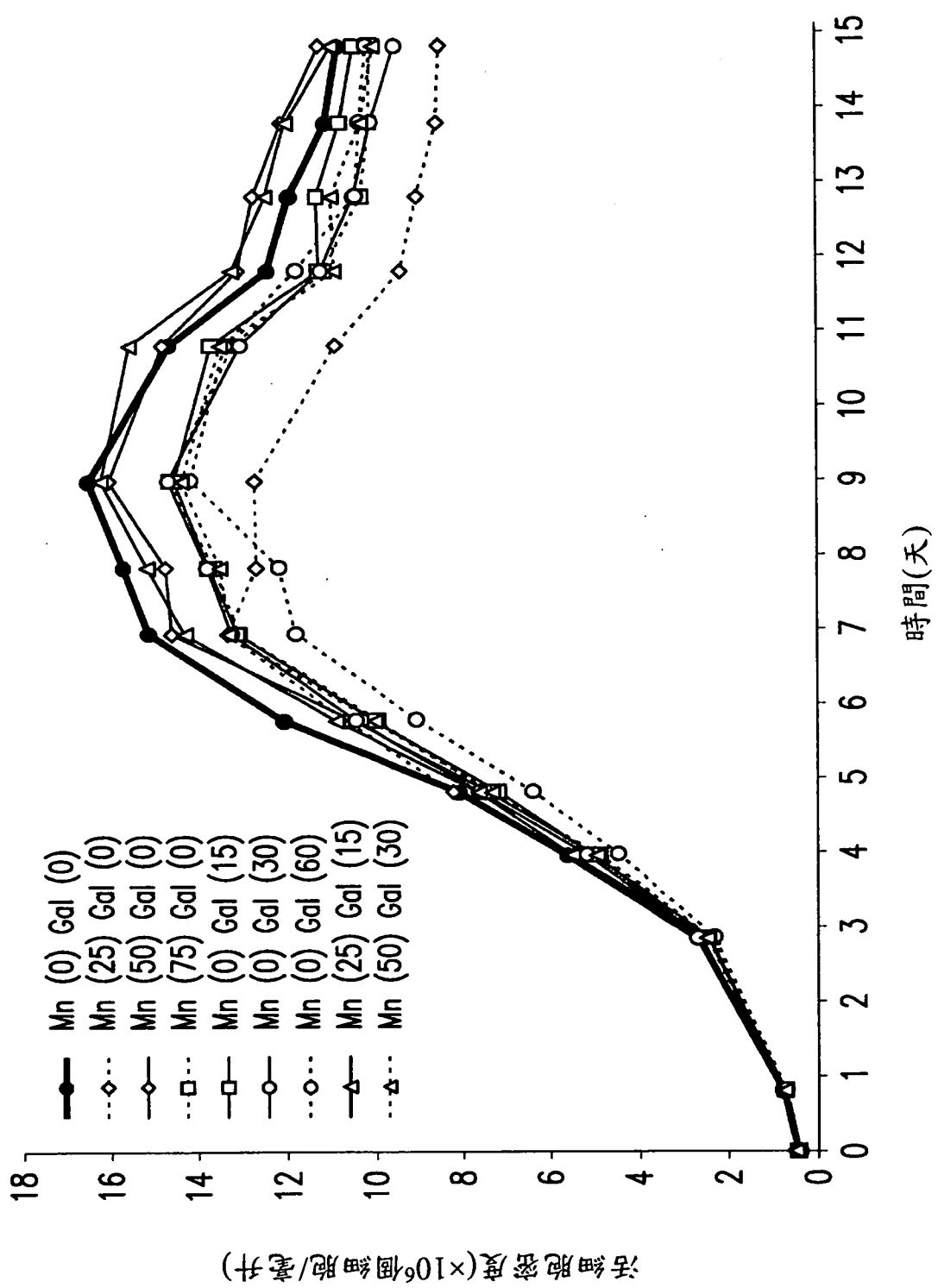


圖25A

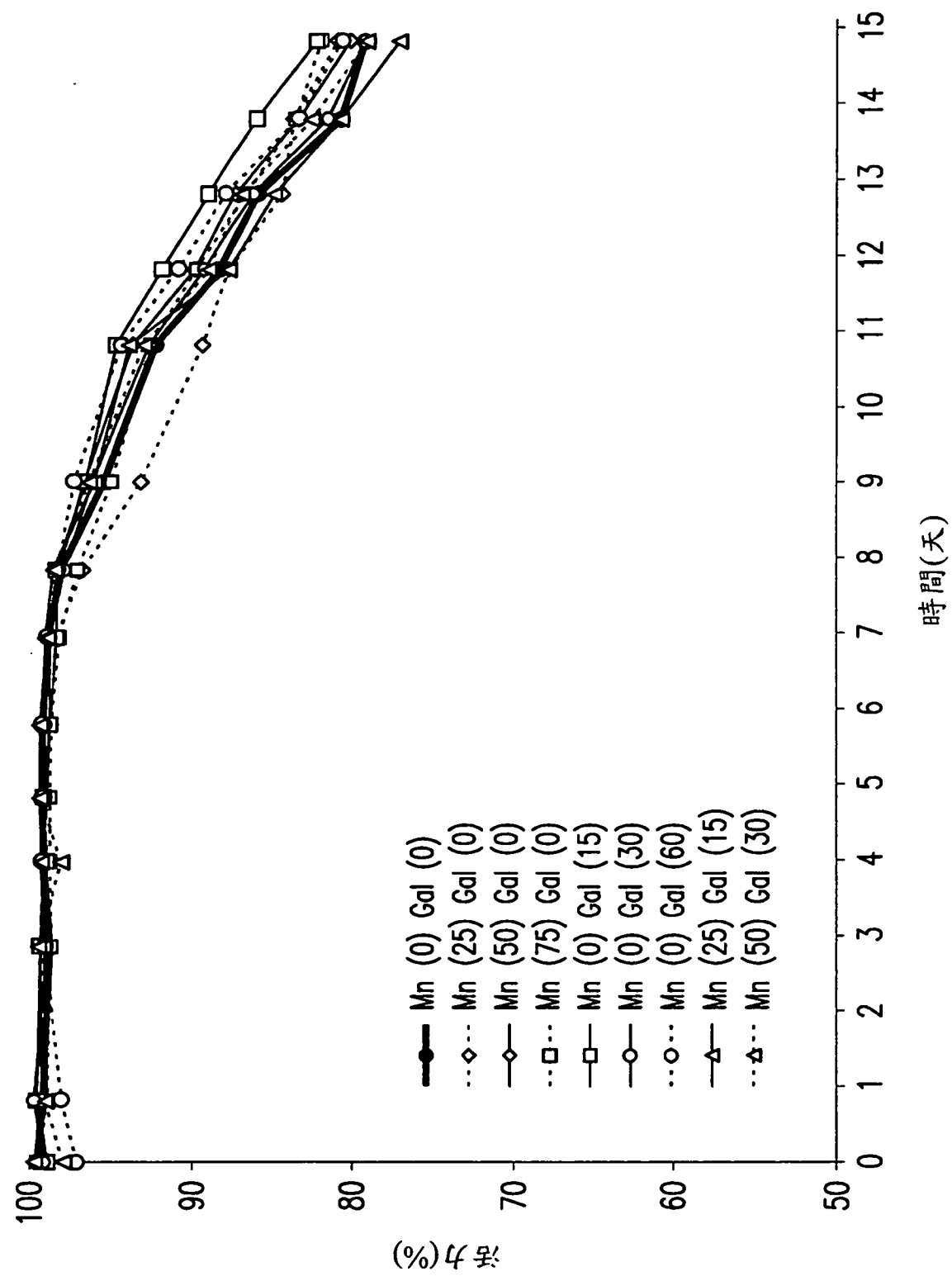


圖25B

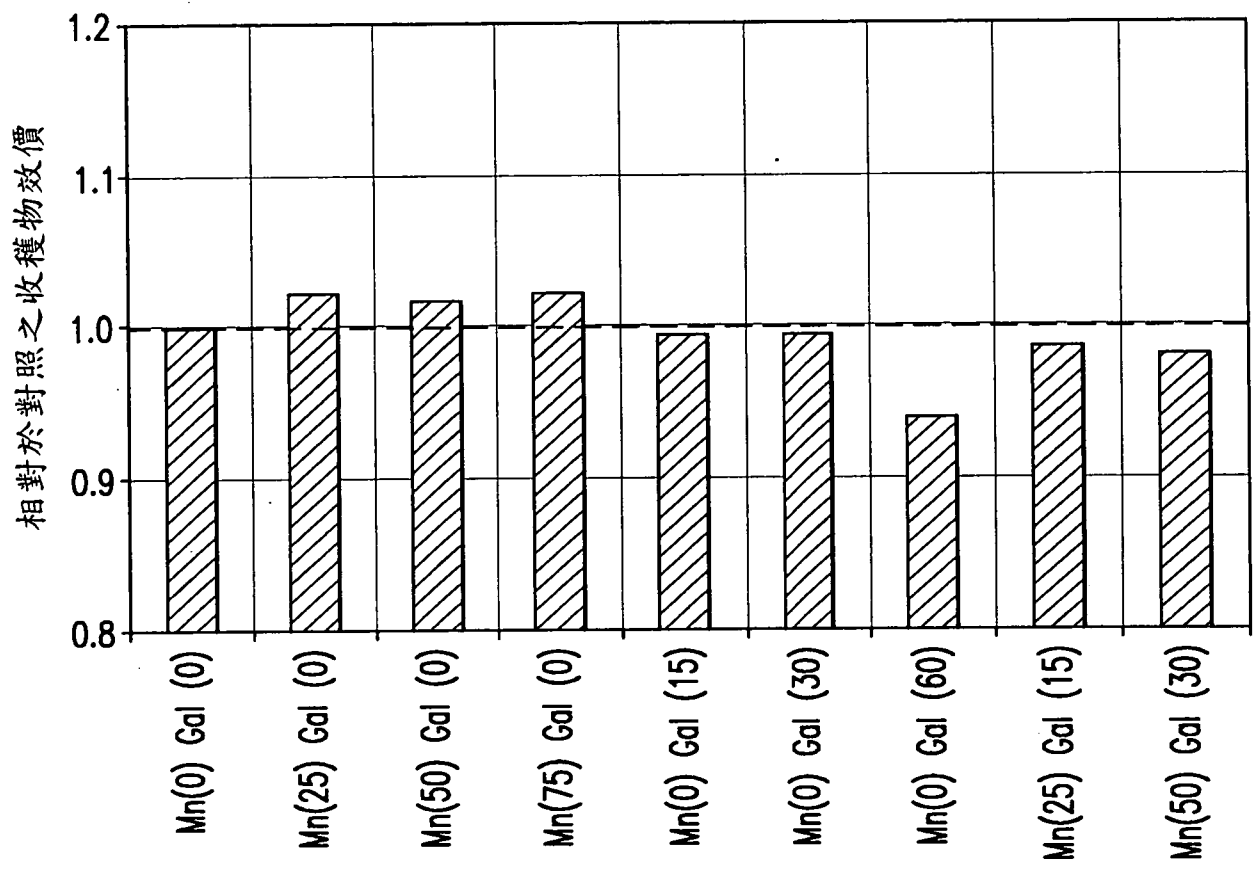


圖 25C

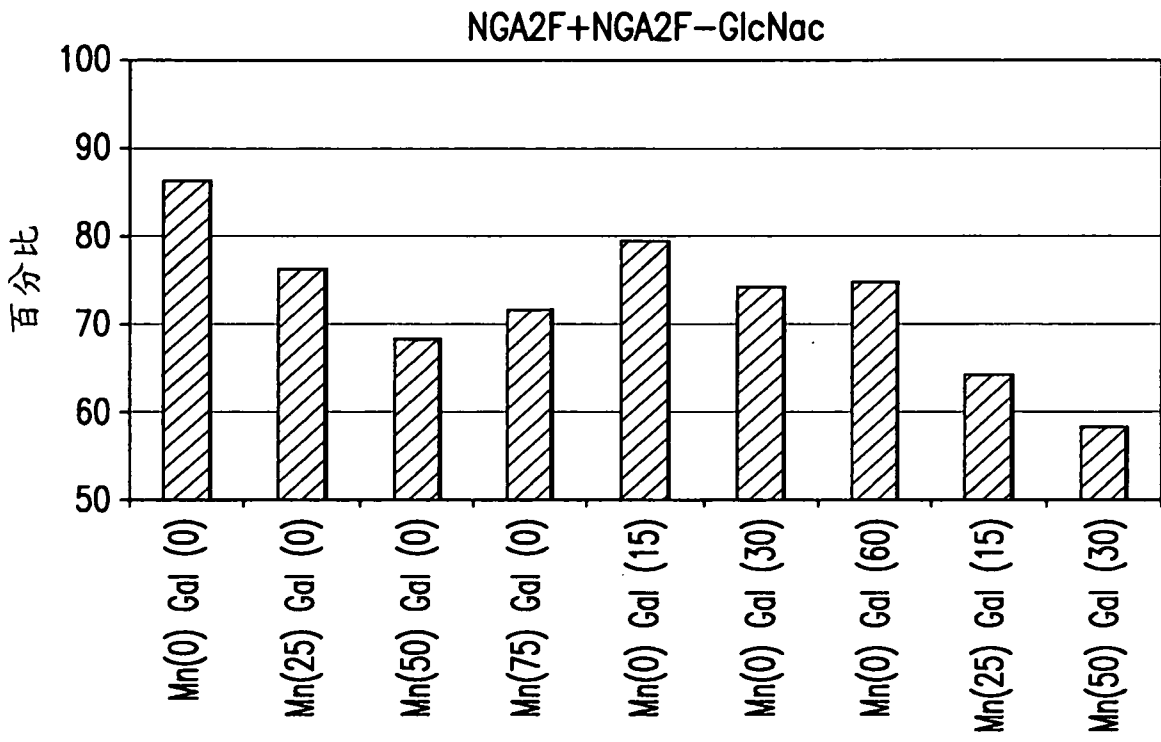


圖 26A

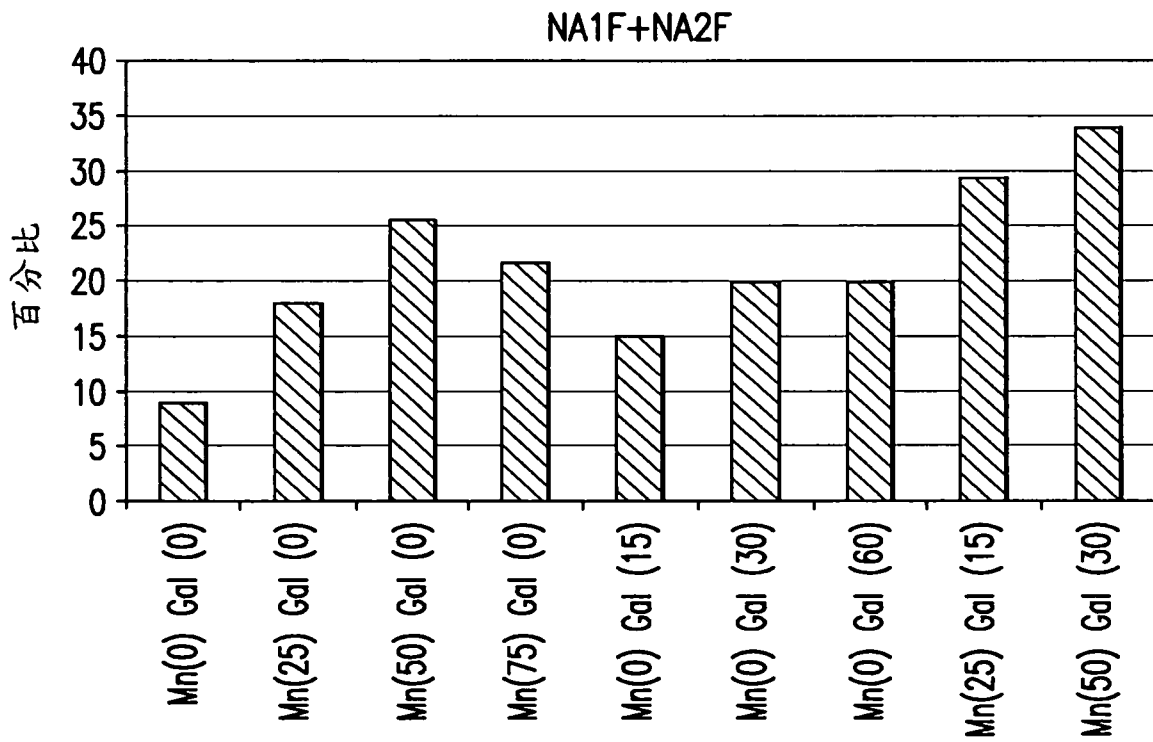


圖 26B

				Δ (NGA2F+NGA2F-GlcNac) 變化%			Δ (NA1F+NA2F) 變化%		
錳 (μ M)	半乳糖 (mM)	% NGA2F+NGA2F -GlcNac	% NA1F+NA2F	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖	僅 半乳糖	僅錳	錳及 半乳糖
0	0	86.3	8.9						
25	0	76.3	18.0		-10.0			9.1	
50	0	68.2	25.5		-18.1			16.6	
75	0	71.6	21.6		-14.7			12.7	
0	15	79.4	15.0	-6.9			6.1		
0	30	74.2	19.8	-12.1			10.9		
0	60	74.9	19.8	-11.4			10.9		
25	15	64.3	29.4			-22.0			20.5
50	30	58.4	33.9			-27.9			25.0

圖27