



(21)申請案號：113117120

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 27 日

(51)Int. Cl.：

C12P13/20 (2006.01)

C12P21/02 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

C12N1/04 (2006.01)

C12N1/38 (2006.01)

(30)優先權：2020/08/31 美國

63/072,740

2020/08/31 美國

63/072,745

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：本農 塞拉諾 桑德拉 BENNUN-SERRANO, SANDRA (AR)；勞倫斯 肖恩
LAWRENCE, SHAWN M. (US)；約翰遜 艾米 JOHNSON, AMY S. (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：23 共 105 頁

(54)名稱

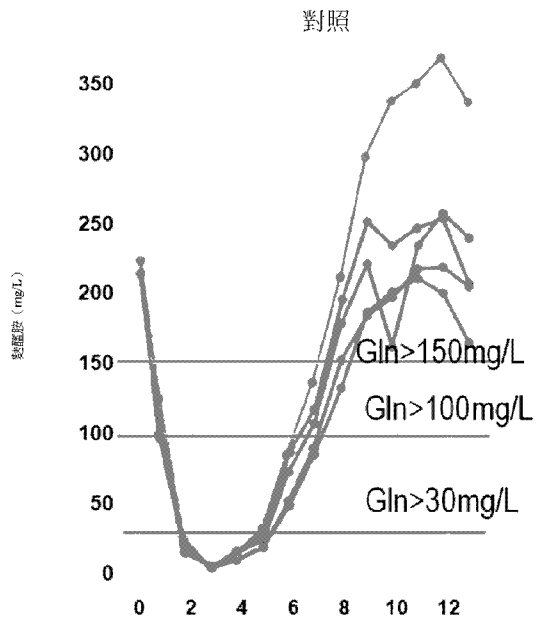
用以改良細胞培養效能及減少天冬醯胺序列變異之天冬醯胺饋料策略

(57)摘要

本發明提供一種用於培養真核細胞以改良細胞培養效能之方法。該方法大體上包括使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中該成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 43.2 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 21.6 mM 之量的天冬醯胺；及於該早期饋料分批細胞培養之至少一部分及該後期饋料分批細胞培養之至少一部分，使該等細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持；其中與該早期饋料分批細胞培養及/或該後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充的類似方法相比，該細胞培養之效能藉由該天冬醯胺補充得以改良。

A method for culturing eukaryotic cells for improved cell culture performance is provided. The method generally comprises propagating or maintaining eukaryotic cells in a defined cell culture medium; wherein the defined cell culture medium is supplemented with asparagine in an amount from about 2.6 mM to about 43.2 mM during early fed-batch cell culture and from about 2.6 mM to about 21.6 mM during late fed-batch cell culture; and maintaining said cells in said asparagine supplemented cell culture medium for at least a portion of the early fed-batch cell culture and at least a portion of the late fed-batch cell culture; wherein the performance of the cell culture is improved by the asparagine supplementation, as compared to a similar method with a lower amount of asparagine supplementation in the early and/or late fed-batch cell culture.

指定代表圖：



【圖23B】

【發明摘要】

【中文發明名稱】用以改良細胞培養效能及減少天冬醯胺序列變異之天冬醯胺
饋料策略

【英文發明名稱】 ASPARAGINE FEED STRATEGIES TO IMPROVE CELL
CULTURE PERFORMANCE AND MITIGATE ASPARAGINE SEQUENCE
VARIANTS

【中文】

本發明提供一種用於培養真核細胞以改良細胞培養效能之方法。該方法大體上包括使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中該成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約2.6 mM至約43.2 mM之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約2.6 mM至約21.6 mM之量的天冬醯胺；及於該早期饋料分批細胞培養之至少一部分及該後期饋料分批細胞培養之至少一部分，使該等細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持；其中與該早期饋料分批細胞培養及/或該後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充的類似方法相比，該細胞培養之效能藉由該天冬醯胺補充得以改良。

【英文】

A method for culturing eukaryotic cells for improved cell culture performance is provided. The method generally comprises propagating or maintaining eukaryotic cells in a defined cell culture medium; wherein the defined cell culture medium is supplemented with asparagine in an amount from about 2.6 mM to about 43.2 mM

during early fed-batch cell culture and from about 2.6 mM to about 21.6 mM during late fed-batch cell culture; and maintaining said cells in said asparagine supplemented cell culture medium for at least a portion of the early fed-batch cell culture and at least a portion of the late fed-batch cell culture; wherein the performance of the cell culture is improved by the asparagine supplementation, as compared to a similar method with a lower amount of asparagine supplementation in the early and/or late fed-batch cell culture.

【指定代表圖】 圖23B

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用以改良細胞培養效能及減少天冬醯胺序列變異之天冬醯胺
饋料策略

【英文發明名稱】 ASPARAGINE FEED STRATEGIES TO IMPROVE CELL
CULTURE PERFORMANCE AND MITIGATE ASPARAGINE SEQUENCE
VARIANTS

【技術領域】

【0001】 相關申請案之交叉參考

【0002】 本申請案主張在申請日2020年8月31日申請之美國臨時申請案第
63/072,740號及2020年8月31日申請之美國臨時申請案第63/072,745號的權益，該
等美國臨時申請案之內容出於所有目的以全文引用的方式併入本文中。

【0003】 本發明係關於用於培養細胞以改良細胞培養效能之方法。本發明
具體係關於用於培養細胞以改良細胞培養效能及使用天冬醯胺補充物減少天冬
醯胺序列變異以及用於生產蛋白質生物藥劑之方法。

【先前技術】

【0004】 生物藥劑，尤其蛋白質及多肽通常經研發作為新穎生物藥劑產
品。產生高含量之特定所關注蛋白質的工程改造細胞已對於此等生物藥劑產品
之成功商業生產變得極其重要。細胞培養條件之控制及最佳化有諸多差異，且
對產生於細胞培養物中之治療蛋白質的含量及品質具有較大影響。

【0005】 習用的是在分批或饋料分批製程中經由細胞培養來製造蛋白質。在小瓶解凍之後，接種體生長之早期階段包含在種細胞培養中培養細胞。典型地，細胞諸如在種細胞系生物反應器中以指數生長速率生長，以便逐漸增加細胞群體之大小及/或體積。在細胞量經由若干生物反應器階段按比例擴增之後，隨後將細胞轉移至饋料分批生產生物反應器中，同時細胞仍處於指數生長（對數期）（Gambhir, A.等人, 2003, 《生物科學及生物工程改造期刊(*J Bioscience Bioeng*)》 95(4):317-327）。

【0006】 在轉移至饋料分批培養物中之後，將細胞培養一段時間，而監測及控制培養基之組成以允許產生蛋白質或所關注多肽。在達至特定產率或細胞生存力、廢物累積或營養耗乏決定應終止培養後，分離所產生蛋白質或多肽。在過去十年間已在意欲改良重組蛋白質產率方面取得諸多顯著進展，當前達至多公克/公升之效價。蛋白質製造製程以及細胞株工程改造及細胞培養基以及饋料研發之進展已促成蛋白質產率增加。舉例而言，最佳化細胞培養基及饋料之方案包含營養補充以及設計用以支援連續細胞生長及最佳產物分泌之化學成分確定的無血清培養基。

【0007】 然而，在本領域中仍需要用於培養細胞之培養基及方法，其中該培養基允許健康且穩固的細胞生長及維持，以及重組蛋白之高效價生產。

【發明內容】

【0008】 在一個態樣中，提供一種用於培養真核細胞以改良細胞培養效能之方法。該方法大體上包括使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約3.6 mM

至約43.2 mM之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約3.6 mM至約21.6 mM之量的天冬醯胺；及使該等細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持早期饋料分批細胞培養之至少一部分及後期饋料分批細胞培養之至少一部分；其中與早期及/或後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充或無天冬醯胺補充的類似方法相比，至少一個細胞培養效能參數藉由天冬醯胺補充得以改良。

【0009】 在某些實施例中，天冬醯胺補充物可在細胞培養之至少一部分時程內以大劑量饋料補充物（例如在早期階段之一個大劑量饋料補充物及在後期階段之一個大劑量饋料補充物）、多個大劑量饋料補充物（例如在早期階段之2、3、4或5個大劑量饋料補充物及在後期階段之2、3、4或5個大劑量饋料補充物）形式，或在細胞培養之至少一部分時程內連續地提供至細胞培養物（早期階段及後期階段兩者）中。

【0010】 在某些實施例中，至少一個細胞培養效能參數係選自由以下組成之群組：細胞生存力增加、細胞生長速率增加、細胞密度增加、所關注重組蛋白質之效價增加、所關注重組蛋白質之產率增加、細胞培養之至少一部分中之必需胺基酸的耗乏減少、細胞培養之至少一部分中之至少一種細胞培養副產物的形成減少及至少一項蛋白質品質指標改良。在某些實施例中，至少一種細胞培養副產物係選自由銨離子及丙胺酸組成之群組。在某些實施例中，至少一項蛋白質品質指標為蛋白質序列變異減少。

【0011】 在某些實施例中，真核細胞可為哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞或酵母細胞。在特定實施例中，真核細胞可為CHO細胞。在其他實施例中，重組蛋白質可選自Fc融合蛋白質、受體Fc融合蛋白質（TRAP）、抗體、抗體片段或ScFv-Fc融合蛋白質。

【0012】 在其他態樣中，提供一種用於防止由細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注重組多肽中之天冬醯胺序列變異的方法。在某些實施例中，該方法可包括：使哺乳動物細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約3.6 mM至約43.2 mM之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約3.6 mM至約21.6 mM之量的天冬醯胺；及在足以表現所關注重組多肽之條件下，於早期饋料分批細胞培養及後期饋料分批細胞培養之至少一部分，使該等細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持。在某些實施例中，在至少早期饋料分批細胞培養期間，使胞外天冬醯胺含量在細胞培養基中維持高於約0.1 mM之耗乏極限，使得由哺乳動物細胞表現的所關注重組多肽在所有個別序列變異基因座處包括小於0.30%之天冬醯胺序列變異。

【0013】 在其他態樣中，提供一種用於偵測由細胞培養物中之真核細胞表現的所關注重組多肽中之天冬醯胺序列變異的方法。在某些實施例中，該方法可包括：使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；由真核細胞表現所關注重組蛋白質；量測成分確定之細胞培養基中之一種或多種天冬醯胺相關胺基酸的胞內及/或胞外濃度；及使一種或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與所表現的所關注重組蛋白質中存在之天冬醯胺序列變異的量相關聯。一種或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與天冬醯胺序列變異之量負相關。

【0014】 在其他態樣中，提供一種用於監測及控制細胞培養基條件之方法。該方法大體上包括：使用使用凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼（Raman）光譜法中之一者或多者原位量測細胞培養物中之一個或多個細胞培養參數，量測細胞培養中之一個或多個細胞培養參數；將所量測之一個或多個細胞培養參數與細胞培養參數之預定設定點值進行比較以

確定一個或多個細胞培養參數是否在預定臨限範圍內；及若確定細胞培養參數在預定臨限範圍之外，則調整細胞培養參數中之一者或多者。在某些實施例中，可監測銨離子濃度，且若確定銨離子濃度在特定細胞培養物之預定臨限範圍之外，則可調整天冬醯胺補充物饋料以使得細胞培養物產生較少銨，同時仍接受充足的天冬醯胺。

【0015】 雖然揭示多個實施例，但根據揭示及描述本揭露之說明性實施例的以下詳細描述，本揭露之其他實施例仍將對於本領域中熟習此項技術者而言變得顯而易見。如將認識到，本發明能夠在各個態樣中進行修改，所有修改均不脫離本揭露之精神及範疇。因此，詳細描述應被視為本質上說明性且非限定性的。

【圖式簡單說明】

【0016】

【0017】 圖1A說明在使用標準饋料策略之饋料分批細胞培養期間的胞外必需胺基酸消耗，而圖1B說明在使用標準饋料策略之饋料分批細胞培養期間的天冬醯胺之消耗。

【0018】 圖2A及圖2B說明根據本揭露之實施例的在使用各種饋料策略之饋料分批細胞培養期間的胞外胺基酸（圖2A）及天冬醯胺（圖2B）消耗。

【0019】 圖3A說明根據本揭露之實施例的具有較低、中等及較高量補充物之一系列早期饋料分批天冬醯胺補充物。圖3B說明具有遞增量之天冬醯胺補充物之細胞培養物生長的增加，而圖3C說明根據本揭露之實施例的具有遞增天冬醯胺補充物之細胞培養物效價的增加。

【0020】圖 4A 說明根據本揭露之實施例的在後期饋料中之較低及較高天冬醯胺補充物。圖 4C 說明總細胞培養物產率未受負面影響，而圖 4B 說明根據本揭露之實施例的副產物形成之增加。

【0021】圖 5A 至圖 5D 說明根據本揭露之實施例的經改良之天冬醯胺補充物饋料策略。圖 5A 說明饋料分批細胞培養物中之胞外必需胺基酸濃度，且圖 5B 說明根據本揭露之實施例的饋料分批細胞培養物中之胞外天冬醯胺濃度。圖 5C 說明細胞培養物生長之增加，而圖 5D 說明根據本揭示案之實施例的細胞培養物效價之增加。

【0022】圖 5E 至圖 5G 說明根據本揭露之實施例的在另一例示性細胞株中之天冬醯胺補充之後的細胞效價（圖 5E）、活細胞計數（圖 5F）及細胞生存力（圖 5G）。

【0023】圖 6A 說明在早期饋料分批細胞培養物中之天冬醯胺補充之後的天冬醯胺消耗，而圖 6B 說明根據本揭露之實施例的在後期饋料分批細胞培養物中之天冬醯胺補充之後的天冬醯胺消耗。

【0024】圖 7 說明根據本揭露之實施例的在針對例示性高消耗細胞株之一系列天冬醯胺饋料策略內的天冬醯胺消耗速率。

【0025】圖 8 說明利用天冬胺酸及麩胺酸之天冬醯胺合成路徑。

【0026】圖 9A 至圖 9D 說明根據本揭露之實施例的天冬醯胺含量在例示性高消耗細胞株之後期饋料分批細胞培養物中的影響，其中圖 9A 至圖 9B 揭示胞外天冬醯胺（圖 9A）及胞外麩胺酸（圖 9B）濃度，且圖 9C 至圖 9D 揭示胞內天冬醯胺（圖 9C）及胞內麩胺酸（圖 9D）濃度。

【0027】圖 10A 至圖 10D 說明根據本揭露之實施例的天冬醯胺含量在另一例示性高消耗細胞株之後期饋料分批細胞培養物中的影響，其中圖 10A 至圖 10B 揭示胞外天冬醯胺（圖 10A）及胞外麩胺酸（圖 10B）濃度，且圖 10C 至

圖 10D 揭示胞內天冬醯胺（**圖 10C**）及胞內麩胺酸（**圖 10D**）濃度。

【0028】 **圖 11A 至圖 11D** 說明根據本揭露之實施例的天冬醯胺含量在例示性低消耗細胞株之後期饋料分批細胞培養物中的影響，其中**圖 11A 至圖 11B** 揭示胞外天冬醯胺（**圖 11A**）及胞外麩胺酸（**圖 11B**）濃度，且**圖 11C 至圖 11D** 揭示胞內天冬醯胺（**圖 11C**）及胞內麩胺酸（**圖 11D**）濃度。

【0029】 **圖 12A 至圖 12F** 說明根據本揭露之實施例的較高（3×早期，1.5×後期）及極高（6×早期，3×後期）天冬醯胺含量在饋料分批細胞培養物中之影響，其中**圖 12A** 揭示天冬醯胺濃度，**圖 12B** 揭示天冬胺酸濃度，**圖 12C** 揭示效價，**圖 12D** 揭示麩胺酸濃度，**圖 12E** 揭示麩醯胺濃度，且**圖 12F** 揭示鉍濃度。

【0030】 **圖 13A 至圖 13D** 說明根據本揭露之實施例的大劑量及連續天冬醯胺饋料之影響，其中**圖 13A** 揭示活細胞計數，**圖 13B** 揭示效價，**圖 13C** 揭示鉍形成，且**圖 13D** 揭示丙胺酸形成。**圖 13E 至圖 13G** 揭示根據本揭露之實施例，與具有相同總天冬醯胺補充物量之大劑量天冬醯胺補充物饋料相比，連續天冬醯胺補充物饋料延遲胞外天冬醯胺（**圖 13E**）、天冬胺酸（**圖 13F**）及麩胺酸（**圖 13G**）耗乏。

【0031】 **圖 14A 至圖 14D** 說明根據本揭露之實施例的大劑量及連續天冬醯胺饋料之影響。**圖 14A** 揭示天冬醯胺之消耗，而**圖 14B 至圖 14C** 揭示天冬醯胺相關代謝物之消耗（**圖 14B** 之天冬胺酸及**圖 14C** 之麩胺酸）。**圖 14D** 揭示細胞培養副產物鉍之形成。

【0032】 **圖 15A 至圖 15G** 說明根據本揭露之一實施例的例示性細胞株中之混合饋料方法（連續天冬醯胺補充物饋料與大劑量天冬醯胺補充物饋料組合），其中**圖 15A** 說明胞外天冬醯胺，**圖 15B** 說明胞外天冬胺酸，**圖 15C** 說明胞外麩胺酸，**圖 15D** 說明活細胞計數，**圖 15E** 說明效價，**圖 15F** 說明鉍形成，且**圖 15G** 說明丙胺酸形成。

【0033】圖 16A 至圖 16E 說明根據本揭露之一實施例的另一例示性細胞株中之混合饋料方法（連續天冬醯胺補充物饋料與大劑量天冬醯胺補充物饋料組合），其中圖 16A 說明胞外天冬醯胺，圖 16B 說明活細胞計數，圖 16C 說明效價，圖 16D 說明銨形成，且圖 16E 說明丙胺酸形成。

【0034】圖 17A 說明根據本揭露之實施例的在天冬醯胺饋料策略之後的饋料分批細胞培養中之天冬醯胺消耗，其中圖 17B 揭示天冬醯胺序列變異之形成的減少。

【0035】圖 18A 說明根據本揭露之實施例的在天冬醯胺饋料策略之後的饋料分批細胞培養中之天冬醯胺消耗。圖 18B 說明胞內麩胺酸含量，及圖 18C 揭示根據本揭露之實施例的天冬醯胺序列變異之形成的減少。

【0036】圖 19A 至圖 19G 說明根據本揭露之實施例的例示性細胞株之天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸及天冬醯胺序列變異之間的關聯性。圖 19B 至圖 19D 說明胞外天冬醯胺（圖 19B）、天冬胺酸（圖 19C）及麩胺酸（圖 19D），而圖 19E 至圖 19G 說明例示性胞內天冬醯胺（圖 19E）、天冬胺酸（圖 19F）及麩胺酸（圖 19G）。

【0037】圖 20A 至圖 20D 說明根據本揭露之實施例的另一例示性細胞株（高消耗細胞株）之天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸及天冬醯胺序列變異之間的關聯性。圖 20B 至圖 20D 說明胞外天冬醯胺（圖 20B）、胞內天冬胺酸（圖 20C）及胞內麩胺酸（圖 20D）。

【0038】圖 21A 至圖 21F 說明根據本揭露之實施例的例示性細胞株之天冬醯胺序列變異趨勢。圖 21A 及圖 21C 說明較高天冬醯胺早期饋料策略（圖 21A，如藉由質譜所測定之序列變異量；圖 21C，胞內麩胺酸之濃度）。圖 21B 及圖 21D 說明較低天冬醯胺早期饋料策略（圖 21B，如藉由質譜所測定之序列變異量；圖 21D，胞內麩胺酸之濃度）。圖 21E 揭示一個例示性細胞株之胞內麩胺酸含量，

及圖 21F 揭示另一例示性細胞株之胞內麩胺酸特徵曲線。

【0039】圖 22A 至圖 22H 說明例示性細胞株之天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸及天冬醯胺序列變異之間的關聯性。圖 22A 至圖 22D 說明較高及較低天冬醯胺饋料策略之例示性細胞株的胞外天冬醯胺（圖 22A）、胞外天冬胺酸（圖 22B）、胞外麩胺酸（圖 22C）及胞外麩醯胺（圖 22D）。圖 22E 至圖 22H 說明較高及較低天冬醯胺饋料策略之另一例示性細胞株的胞外天冬醯胺（圖 22E）、胞外天冬胺酸（圖 22F）、胞外麩胺酸（圖 22G）及胞外麩醯胺（圖 22H）。

【0040】圖 23A 至圖 23C 進一步說明胞外麩醯胺可充當後期饋料分批細胞培養中之天冬醯胺序列變異的替代物。圖 23A 揭示例示性細胞株中經由較高天冬醯胺饋料策略的麩醯胺產生。類似地，圖 23B 揭示例示性細胞株中經由較高天冬醯胺饋料策略的麩醯胺產生。且最後，圖 23C 揭示當未在第 6 天及第 8 天補充天冬醯胺時，偵測到天冬醯胺序列變異，且胞外麩醯胺下降至低於耗乏極限（亦即經由天冬醯胺饋料策略產生不充足的麩醯胺）。

【實施方式】

【0041】根據本揭露之態樣，已出乎意料地發現，相對於無此類最佳化天冬醯胺饋料策略之細胞培養操作，用最佳化天冬醯胺饋料策略執行細胞培養操作可改良細胞培養效能，包含細胞培養物中之細胞生長及細胞產生蛋白質之改良。

【0042】藉助於非限制性實例，細胞培養效能之改良可經由對細胞生長速率、細胞密度、細胞生存力、蛋白質產生、細胞生長副產物之產生（例如銨離子濃度、丙胺酸濃度等）及其各種組合的評估來確定。如本文中所揭示，該改良可相對於無最佳化天冬醯胺饋料策略之細胞培養操作來評估。

【0043】天冬醯胺為通常由培養中之細胞以較高水平消耗的非必需胺基酸，其在細胞培養物代謝中發揮主要作用。在本揭露之某些態樣中，研究天冬醯胺在饋料分批細胞培養之細胞培養效能中的作用，以及胞內及胞外天冬醯胺及相關代謝物之代謝研究。

【0044】如圖 1A 及圖 1B 中所說明，發現在饋料分批細胞培養結束時高度消耗且主要耗乏胞外必需胺基酸（圖 1A），而胞外天冬醯胺、非必需胺基酸（圖 1B）在標準大劑量天冬醯胺饋料策略之後的饋料分批細胞培養則有跨越時間線的耗乏。

【0045】本揭露之實施例係針對利用天冬醯胺補充物以最小化、延遲及防止胺基酸耗乏，同時改良細胞培養效能之細胞培養方法。舉例而言，參考圖 2A 至圖 2B，發現胞外必需胺基酸耗乏可藉由必需胺基酸補充物予以防止（圖 2A），但在饋料分批細胞培養之產生階段的生長階段（早期）及穩定/衰減階段（後期）期間之較高量的天冬醯胺補充物並不防止例示性高產細胞株之胞外天冬醯胺耗乏，此表明，天冬醯胺消耗速率超出化學計量需求（圖 2B）。如此，根據本揭露之實施例，評估天冬醯胺補充物在饋料分批細胞培養之早期生長階段及後期穩定/衰減階段期間及之後的影響以選擇平衡天冬醯胺饋料策略，如本文中所描述。

【0046】本文中所使用之章節標題僅用於組織目的，且不應解釋為限制所描述主題。除非另外指示，否則本文中所描述之方法及技術一般係根據此項技術中已知的習知方法且如本說明書通篇所引用及論述之各種一般及更特定參考文獻中所描述來執行。參見例如 Sambrook 等人,《分子選殖：實驗室手冊（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）》第 3 版，冷泉港實驗室出版社（Cold Spring Harbor Laboratory Press），紐約州冷泉港（Cold Spring Harbor, N.Y.）(2001) 及 Ausubel 等人，《分子生物學現行規範（Current Protocols in Molecular Biology）》第 10 頁，共 68 頁(發明說明書)

Biology)》，格林出版協會 (Greene Publishing Associates) (1992), Harlow 及 Lane 《抗體：實驗室手冊 (Antibodies: A Laboratory Manual)》，冷泉港實驗室出版社，紐約州冷泉港(1990)，及 Julio E. Celis, 《細胞生物學：實驗室手冊 (Cell Biology: A Laboratory Handbook)》，第 2 版，學術出版社，紐約州紐約市(1998)，及 Dieffenbach 及 Dveksler, 《PCR 引物：實驗室手冊 (PCR Primer: A Laboratory Manual)》，冷泉港實驗室出版社，紐約州冷泉港(1995)。貫穿本揭露所提及之所有公開案以全文引用的方式併入本文中。

【0047】 定義

【0048】 除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域中一般熟習此項技術者通常所理解相同的含義。儘管類似或等效於本文中所描述之方法及材料的任何方法及材料可用於本發明之實踐中，但現描述特定方法及材料。

【0049】 術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」始終互換使用，且係指包括藉由肽鍵彼此接合之兩個或更多個胺基酸殘基的分子。肽、多肽及蛋白質亦可包含修飾，諸如醣基化、脂質附著、硫酸化、麩胺酸殘基之 γ -羧化、烷基化、氫基化及 ADP 核糖基化。肽、多肽及蛋白質可具有科學或商業利益，包含蛋白質類藥物。肽、多肽及蛋白質尤其包含抗體及嵌合或融合蛋白質。藉由使用細胞培養方法之重組動物細胞株來產生肽、多肽及蛋白質。

【0050】 如本文中所使用，術語「異源多核苷酸序列」係指編碼所關注蛋白質之核酸聚合物，該等所關注蛋白質諸如以生物藥劑藥物物質形式產生之嵌合蛋白質（如捕獲分子）、抗體或抗體部分（例如 VH、VL CDR3）。異源多核苷酸序列可藉由基因工程改造技術（例如，諸如編碼嵌合蛋白質之序列，或密碼子最佳化序列、無內含子序列等）來製造且引入至細胞中，其中異源多核苷酸序列可以游離基因體形式駐存或整合至細胞之基因體中。異源多核苷酸序列

可為引入至產生細胞基因體內之異位位點中之天然存在的序列。異源多肽序列可為來自另一生物體之天然存在的序列，諸如編碼人類異種同源物之序列。

【0051】「抗體」係指由四個多肽鏈、藉由二硫鍵互連之兩個重（H）鏈及兩個輕（L）鏈組成的免疫球蛋白分子。各重鏈具有重鏈可變區（HCVR 或 VH）及重鏈恆定區。重鏈恆定區含有三個域 CH1、CH2 及 CH3。各輕鏈具有輕鏈可變區及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區由一個域（CL）組成。VH 區及 VL 區可進一步細分為被稱為互補決定區（CDR）之高變區，穿插有被稱為構架區（FR）之較保守區。各 VH 及 VL 包括自胺基端至羧基端按以下次序排列之三個 CDR 及四個 FR：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。術語「抗體」包含對屬於任何同型或子類之醣基化及非醣基化免疫球蛋白兩者的參考。術語「抗體」包含藉由重組手段製備、表現、形成或分離之抗體分子，諸如自經傳染以表現抗體之宿主細胞分離的抗體。術語抗體亦包含雙特異性抗體，該雙特異性抗體包含可結合至超過一個不同抗原決定基之異源四聚體免疫球蛋白。雙特異性抗體一般描述於美國專利申請公開案第 2010/0331527 號中，該美國專利申請公開案以引用之方式併入本申請案中。

【0052】術語抗體之「抗原結合部分」（或「抗體片段」）係指抗體之一個或多個保留特異性結合至抗原之能力的片段。涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內之結合片段的實例包含（i）Fab 片段，由 VL、VH、CL 及 CH1 域組成之單價片段；（ii）F(ab')₂ 片段，包括在鉸鏈區處藉由二硫橋鍵連接之兩個 Fab 片段的二價片段；（iii）Fd 片段，其由 VH 及 CH1 域組成；（iv）Fv 片段，其由抗體之單臂的 VL 及 VH 域組成；（v）dAb 片段（Ward 等人(1989)《自然 Nature》241:544-546），其由 VH 域組成；（vi）分離 CDR；及（vii）scFv，其由 Fv 片段的藉由合成連接子連接以形成單一蛋白質鏈之兩個域 VL 及 VH 組成，其中 VL 及 VH 區配對以形成單價分子。諸如雙功能抗體之其他形式的單鏈抗體亦涵蓋於

第 12 頁，共 68 頁(發明說明書)

術語「抗體」下（參見例如 Holliger 等人(1993)《美國科學院院刊 (PNAS USA)》90: 6444-6448；Poljak 等人(1994)《結構學 (Structure)》2: 1121-1123）。

【0053】又另外，抗體或其抗原結合部分可為藉由抗體或抗體部分與一種或多種其他蛋白質或肽共價或非共價締合而形成之較大免疫黏附分子的部分。此類免疫黏附分子之實例包含使用抗生蛋白鏈菌素核心區以形成四聚 scFv 分子（Kipriyanov 等人(1995)《人類抗體及雜交瘤 (Human Antibodies and Hybridomas)》6:93-101）及使用半胱胺酸殘基、標誌肽及 C 端聚組胺酸標籤以形成二價且生物素化之 scFv 分子（Kipriyanov 等人(1994)《分子免疫學 (Mol. Immunol.)》31:1047-1058）。可使用習知技術，諸如經由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化整個抗體而由整個抗體製備抗體部分，諸如 Fab 及 F(ab')₂ 片段。此外，抗體、抗體部分及免疫黏附分子可使用本領域中通常已知的標準重組 DNA 技術（參見 Sambrook 等人, 1989）而獲得。

【0054】術語「人類抗體」意欲包含具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本發明之人類抗體可包含不由例如 CDR 且尤其 CDR3 中之人類生殖系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基（例如藉由活體內內隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變）。然而，如本文中所使用，術語「人類抗體」並不意欲包含其中衍生自另一哺乳動物物種（諸如小鼠）之生殖系的 CDR 序列已移植至人類構架序列上之抗體。

【0055】如本文中所使用，術語「重組人類抗體」意欲包含藉由重組手段製備、表現、形成或分離之所有人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現的抗體、自重組組合性人類抗體庫分離之抗體、自對於人類免疫球蛋白基因為轉殖基因之動物（例如小鼠）分離的抗體（參見例如 Taylor 等人(1992)《核酸研究 (Nucl. Acids Res.)》20:6287-6295）或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列之任何其他手段製備、表現、形成或分離

的抗體。此類重組人類抗體具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，在某些實施例中，此類重組人類抗體經歷活體內突變誘發（或當使用人類 Ig 序列之動物轉殖基因時，經歷活體內體細胞突變誘發），且因此重組抗體之 VH 區及 VL 區的胺基酸序列為雖然衍生自人類生殖系 VH 及 VL 序列且與其相關，但可不活體內天然存在於人類抗體生殖系抗體庫內之序列。

【0056】「Fc 融合蛋白質」包括不另外共同發現於自然界中之兩種或更多種蛋白質的部分或全部，所述蛋白質中之一者為免疫球蛋白分子之 Fc 部分。包括融合至抗體衍生多肽之各種部分（包含 Fc 域）的某些異源多肽之融合蛋白質的製備已由例如 Ashkenazi 等人,《美國科學院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》88: 10535, 1991；Byrn 等人,《自然》344: 677, 1990；及 Hollenbaugh 等人,在《現行免疫學協定(Current Protocols in Immunology)》增刊 4, 第 10.19.1 至 10.19.11 頁, 1992 中之「免疫球蛋白融合蛋白質之構建(Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins)」予以描述。「受體 Fc 融合蛋白質」包括偶合至 Fc 部分之受體的一個或多個胞外域，該一個或多個胞外域在一些實施例中包括鉸鏈區，隨後為免疫球蛋白之 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，Fc 融合蛋白質含有結合至一個或多個配位體之兩個或更多個不同的受體鏈。舉例而言，Fc-融合蛋白質為捕獲劑，諸如 IL-1 捕獲劑（例如利納西普(rilonacept)，其含有融合至 IL-1R1 胞外區之 IL-1RAcP 配體結合區，該 IL-1R1 胞外區融合至 hIgG1 之 Fc；參見美國專利第 6,927,004 號）或 VEGF 捕獲劑（例如阿柏西普(aflibercept)，其含有融合至 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 域 3 的 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 域 2，該 VEGF 受體 Flk1 融合至 hIgG1 之 Fc；參見美國專利第 7,087,411 號及第 7,279,159 號）。

【0057】 天冬醯胺補充物

【0058】 在本揭露之某些態樣中，發現具有天冬醯胺之補充饋料分批細胞培養影響細胞培養效能。然而，亦發現，無論天冬醯胺補充物之量如何，均不

可避免天冬醯胺在饋料分批細胞培養期間之耗乏。就此而言，在不受限制之情況下，在本揭露之某些態樣中，出乎意料地發現，在饋料分批細胞培養期間之天冬醯胺耗乏可能對細胞培養效能具有負面影響，而處於過高含量下之天冬醯胺饋料亦可能負面地影響細胞培養效能，例如以諸如銨之副產物形成的形式。

【0059】 在某些實施例中，提供一種用於培養真核細胞以改良細胞培養效能之方法。方法大體上包括使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 28.6 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 21.6 mM 之量的天冬醯胺；及使該等細胞於早期饋料分批細胞培養之至少一部分及後期饋料分批細胞培養之至少一部分在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持；其中與早期及/或後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充的類似方法相比，細胞培養之效能藉由天冬醯胺補充得以改良。

【0060】 如本文中將進一步詳細描述，天冬醯胺補充物可在細胞培養之至少一部分時程內以大劑量饋料補充物(例如在早期階段之一個大劑量饋料補充物及在後期階段之一個大劑量饋料補充物)、多個大劑量饋料補充物(例如在早期階段之 2、3、4 或 5 個大劑量饋料補充物及在後期階段之 2、3、4 或 5 個大劑量饋料補充物)形式，或在細胞培養之至少一部分時程內連續地提供至細胞培養物(早期階段及後期階段兩者)中。

【0061】 在某些實施例中，天冬醯胺補充物可作為散裝饋料之部分或作為散裝饋料的單獨補充物饋料提供。更特定言之，補充物可以大劑量或連續饋料作為散裝饋料之部分或作為散裝饋料的單獨補充物饋料提供至細胞培養物（早期階段及後期階段兩者）中。

【0062】 在某些實施例中，與早期及/或後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充物的類似方法相比，細胞培養物密度及/或效價增加。在某些

態樣中，在天冬醯胺補充之後的後期饋料分批細胞培養之至少一部分期間，細胞培養物可維持至少約 10 至 50 M 個細胞/毫升，例如約 10 至 35 M 個細胞/毫升之活細胞計數。

【0063】在某些實施例中，真核細胞為高天冬醯胺消耗細胞株，以使得細胞消耗至少約 1.8 毫莫耳/天至約 9.3 毫莫耳/天之天冬醯胺。在其他實施例中，真核細胞為低天冬醯胺消耗細胞株，以使得細胞消耗至少約 0.32 毫莫耳/天至約 1.8 毫莫耳/天之天冬醯胺。

【0064】在某些實施例中，方法進一步包括在饋料分批細胞培養期間由真核細胞表現所關注重組蛋白質。相較於與未補充天冬醯胺之培養物中培養之細胞相比的效價，所關注重組蛋白質之效價可高至少 3%、5%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或至少 20%。與其中細胞在未補充天冬醯胺之培養物中進行培養之類似方法相比，所關注重組蛋白質之產率可增加至少 0.1 g/L、至少 0.5 g/L、至少 1 g/L、至少 1.2 g/L、至少 1.4 g/L、至少 1.6 g/L、至少 1.8 g/L、至少 2 g/L、至少 2.2 g/L、至少 2.4 g/L 或至少 2.5 g/L。在某些實施例中，真核細胞為高產細胞株，以使得以至少 4 g/L、至少 5 g/L、至少 6 g/L、至少 7 g/L、至少 8 g/L、至少 9 g/L 或至少 10 g/L、至少 11 g/L、至少 12 g/L、至少 13 g/L、至少 14 g/L 之產率產生所關注重組蛋白質。

【0065】在某些實施例中，成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 28.6 mM、約 3.0 mM 至約 25.0 mM、約 5.0 mM 至約 23.0 mM、約 6.0 mM 至約 22.0 mM、約 7.2 mM 至約 21.6 mM、約 10.6 mM 等之量，且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 21.6 mM、約 2.6 mM 至約 20.0 mM、約 2.6 mM 至約 18.0 mM、約 2.6 mM 至約 16.0 mM、約 2.6 mM 至約 14.4 mM、約 5.3 mM 等之量的天冬醯胺。在其他實施例中，成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批期間呈約 7.2 mM 至約 21.6 mM 之量且在後期饋料分

批期間呈約 2.6 mM 至約 14.4 mM 之量的天冬醯胺。在其他實施例中，成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批期間呈約 10.6 mM 之量且在後期饋料期間呈約 5.3 mM 之量的天冬醯胺。

【0066】 在某些實施例中，可使細胞在補充天冬醯胺之細胞培養條件下維持至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天，或持續饋料分批細胞培養之持續時間。天冬醯胺補充物可每日或連續提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次持續早期饋料分批細胞培養之至少一部分。同樣，天冬醯胺補充物可每日或連續提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次持續後期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0067】 在某些實施例中，細胞可在補充天冬醯胺之細胞培養條件下維持於體積為至少 500 公升、至少 750 公升、至少 1,000 公升、至少 1,500 公升、至少 2,000 公升、至少 2,500 公升、至少 5,000 公升、至少 7,500 公升、至少 10,000 公升、至少 12,500 公升、至少 15,000 公升、至少 20,000 公升、至少 25,000 公升、在 500 公升與 25,000 公升之間等的細胞培養中。

【0068】 在某些實施例中，天冬醯胺補充物可在早期及/或後期饋料分批細胞培養中連續地提供。在某些態樣中，與早期及/或後期饋料分批細胞培養中以大劑量饋料形式提供天冬醯胺補充之類似方法相比，細胞培養中之連續天冬醯胺補充物使得天冬醯胺、天冬胺酸及麩胺酸的胞外胺基酸耗乏延遲至少 1 天、至少 2 天、至少 3 天或至少 4 天或更長時間。

【0069】 更特定言之，在某些實施例中，如本文中所描述，天冬醯胺補充物可連續提供至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天或持續早期饋料分批細胞培養之持續時間。類似地，在某些實施例中，天冬醯胺補充物可連續提供至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天或持續後期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0070】 在不受限制之情況下，在某些實施例中，天冬醯胺補充物可在饋料分批細胞培養之第 2 天或第 2 天之後開始連續提供，且其後持續早期饋料分批細胞培養之至少一部分，或在饋料分批細胞培養之第 5 天或第 5 天之後開始連續提供，且其後持續後期饋料分批細胞培養之至少一部分。此類後期饋料分批連續天冬醯胺補充物可在後期饋料分批細胞培養之第 10 天或第 10 天之後停止。

【0071】 用以減少天冬醯胺序列變異之天冬醯胺補充物

【0072】 在其他態樣中，發現在饋料分批細胞培養期間之天冬醯胺（Asn）耗乏可導致由細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異（SV）出現。藉助於先前技術，如以引用之方式併入本文中的美國專利第 9,096,879 號中所揭示，眾所周知，在哺乳動物細胞中之所關注多肽的重組表現期間之特定胺基酸的耗乏可觸發胺基酸錯誤併入(misincorporation)。舉例而言，在哺乳動物細胞中之所關注多肽的重組表現期間之特定胺基酸的耗乏可導致彼胺基酸在哺乳動物細胞中之所關注多肽的轉譯期間經第二胺基酸取代。觀測到 Asn→Ser 天冬醯胺序列變異（亦即在所關注多肽之轉譯期間絲胺酸替代天冬醯胺之錯誤併入），但可藉由用天冬醯胺補充細胞培養物而最小化。

【0073】 就此而言，發現用天冬醯胺補充饋料分批細胞培養可最小化天冬醯胺 SV 之形成。根據本揭露之實施例，出乎意料地發現，可藉由在至少早期饋料分批細胞培養期間使細胞培養基中之胞外天冬醯胺含量維持高於約 1.0 mM、約 0.5 mM、約 0.25 mM、約 0.2 mM、約 0.1 mM 等之耗乏極限來最小化天冬醯胺 SV。在某些實施例中，可在早期饋料分批細胞培養之至少前 6 天、早期饋料分批細胞培養之至少前 5 天、早期饋料分批細胞培養之至少前 4 天、早期饋料分批細胞培養之至少前 3 天、早期饋料分批細胞培養之至少前 2 天等使細胞培養基中之胞外天冬醯胺含量維持高於此耗乏極限。藉助於實例，維持高於此耗乏極限之持續時間可包含在早期饋料分批細胞培養期間每日、連續地等提供天冬醯

胺補充物至少一次、至少兩次、至少三次。

【0074】根據本揭露之某些實施例，用天冬醯胺補充飼料分批細胞培養可減少（亦即防止）天冬醯胺 SV 之存在達至小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.50% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.45% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.40% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.35% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.30% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.25% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.20% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.15% 的量、小於所關注多肽中之天冬醯胺 SV 之約 0.10% 的量、未偵測到天冬醯胺 SV 之量等。

【0075】在某些實施例中，用天冬醯胺補充飼料分批細胞培養可使天冬醯胺 SV 形成在例如細胞培養之第 4 天、細胞培養之第 5 天、細胞培養之第 6 天、細胞培養之第 7 天、細胞培養之第 8 天、細胞培養之第 9 天、細胞培養之第 10 天、細胞培養之第 11 天、細胞培養之第 12 天、細胞培養之第 13 天、細胞培養之第 14 天之後、在後期飼料分批細胞培養期間等減少至此類含量。

【0076】在某些實施例中，細胞培養物可補充如本文中一般描述之天冬醯胺，該天冬醯胺例如在早期飼料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 28.6 mM，例如約 7.2 mM 至約 21.6 mM、約 10.6 mM 等之量且在後期飼料分批細胞培養期間呈約 2.6 mM 至約 21.6 mM，例如約 2.6 mM 至約 14.4 mM、約 5.3 mM 等之量。在某些實施例中，天冬醯胺補充物可作為散裝飼料之部分或作為單獨天冬醯胺補充物飼料提供。

【0077】在某些態樣中，出乎意料地發現，若在早期飼料分批細胞培養期間提供充足天冬醯胺補充以防止經由至少第 4 天之飼料分批細胞培養（例如在某些實施例中，第二大劑量飼料）的天冬醯胺耗乏，則可減少天冬醯胺 SV 形成。在某些實施例中，早期飼料分批細胞培養物中之補充接著其後及後期飼料分批

細胞培養期間之充足天冬醯胺補充以防止天冬胺酸（Asp）及麩胺酸（Glu）耗乏（或產生充足的麩醯胺（Gln），亦即>100 mg/L），同時平衡過量銨之形成提供天冬醯胺 SV 之最佳化減少。

【0078】 在某些實施例中，出乎意料地發現，在早期饋料分批細胞培養期間提供充足天冬醯胺補充以使含量維持高於耗乏極限（例如經由至少第 4 天之饋料分批細胞培養），且其後在後期饋料分批細胞培養期間提供充足天冬醯胺補充以最小化不期待之副產物形成（例如銨）。藉助於非限制性實例，在早期及後期饋料分批細胞培養期間之天冬醯胺補充可符合以下判據中之任一者以提供較低風險之天冬醯胺 SV。

非限制例示性早期饋料分批條件

胺基酸	0.1 mM 耗乏極限	最小饋料指南（mg/L） D4/第二饋料
L-天冬醯胺.H2O	15 mg/L	100 mg/L

非限制例示性後期饋料分批條件

胺基酸	0.1 mM 耗乏極限	最小饋料指南（mg/L） D8-饋料分批結束
L-麩胺酸	15 mg/L	100 mg/L
L-天冬胺酸	13 mg/L	100 mg/L
L-天冬醯胺.H2O	15 mg/L	15 mg/L
L-麩醯胺	15 mg/L	100 mg/L

【0079】 天冬醯胺相關胺基酸

【0080】 在本揭露之其他態樣中，已發現目標天冬醯胺耗乏可經由細胞代謝路徑影響與天冬醯胺相關之非必需胺基酸。藉助於先前技術，天冬醯胺（Asn）、天冬胺酸（Asp）、麩胺酸（Glu）及麩醯胺（Gln）可經由細胞代謝路

徑彼此相互轉化。若需要天冬醯胺，則細胞可增加其天冬胺酸及麩胺酸之利用率以合成補充天冬醯胺。天冬胺酸、麩胺酸及麩醯胺之較高胞內/胞外濃度可指示細胞具有足以支援細胞需求之胞內天冬醯胺。然而，天冬胺酸、麩胺酸及麩醯胺之濃度的減小表示天冬醯胺限制。

【0081】 作為天冬醯胺序列變異 (SV) 之替代標誌物的天冬醯胺相關胺基酸

【0082】 在其他態樣中，已發現包含天冬胺酸 (Asp)、麩胺酸 (Glu) 及麩醯胺 (Gln) 之天冬醯胺相關胺基酸可用作在所關注多肽產生期間形成之天冬醯胺序列變異的替代標誌物。根據本揭露之某些實施例，已發現天冬醯胺相關胺基酸之胞內及胞外濃度可充當天冬醯胺序列變異之形成的定性指標。

【0083】 在不意欲受理論限制之情況下，天冬醯胺相關胺基酸之較高含量的胞內及/或胞外濃度一般將表示細胞具有足以支援細胞需求之胞內天冬醯胺。此充足的胞內天冬醯胺將使得所產生之所關注多肽中的天冬醯胺序列變異最小化。相反，天冬醯胺相關胺基酸之較低含量的胞內及/或胞外濃度一般將表示細胞具有不足以支援細胞需求之胞內天冬醯胺。此不充足的胞內天冬醯胺將導致所產生之所關注多肽中之天冬醯胺序列變異增加。如此，基於一般反相關，天冬醯胺相關胺基酸可用作天冬醯胺序列變異之替代標誌物。此等代替物之關聯強度視所確定天冬醯胺補充對相關胺基酸之胞外及胞內胺基酸概況的影響而定，該影響又可部分由細胞株及天冬醯胺濃度決定。

【0084】 在某些實施例中，胞內及胞外天冬醯胺及天冬醯胺相關胺基酸濃度可用作天冬醯胺序列變異之替代標誌物。在不意欲受限制之情況下，已出乎意料地發現，天冬醯胺 SV 可尤其藉由在早期饋料分批細胞培養中補充充足的天冬醯胺來最小化，且天冬醯胺 SV 之形成可使用胞內及胞外天冬醯胺及天冬醯胺相關胺基酸濃度來監測。藉助於實例，天冬醯胺 SV 之形成可藉由監測天冬醯胺

或天冬醯胺相關胺基酸之胞內或胞外濃度來原位監測。在某些實施例中，可在早期饋料分批細胞培養物中監測胞外天冬醯胺（Asn）作為天冬醯胺 SV 之替代物，而可在後期饋料分批細胞培養物中監測胞外天冬醯胺（Asn）、天冬胺酸（Asp）、麩胺酸（Glu）及麩醯胺（Gln）。在替代實施例中，可在後期饋料分批細胞培養物中監測胞內 Asn、Asp、Glu 及 Gln。

【0085】 在某些實施例中，提供用於偵測、量測或篩選所關注多肽中之天冬醯胺序列變異的方法。該等方法大體上包括使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；由真核細胞表現所關注重組蛋白質；量測成分確定之細胞培養基中天冬醯胺或一種或多種天冬醯胺相關胺基酸的胞內及/或胞外濃度；及使天冬醯胺或一種或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與存在於所表現之所關注重組蛋白質中的天冬醯胺序列變異之存在相關聯。在一些實施例中，天冬醯胺或一種或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與天冬醯胺序列變異之存在反相關。

【0086】 在某些實施例中，成分確定之細胞培養基可補充天冬醯胺，如本文中所描述。在某些實施例中，天冬醯胺相關胺基酸可選自天冬胺酸（Asp）、麩胺酸（Glu）、麩醯胺（Gln）及其組合。在一些實施例中，天冬醯胺相關胺基酸為麩胺酸。在一些實施例中，可胞內量測天冬醯胺相關胺基酸。

【0087】 在一些實施例中，一種或多種天冬醯胺相關胺基酸可在後期饋料分批細胞培養期間，例如在饋料分批細胞培養之第 5 天之後、第 6 天之後、第 7 天之後、第 8 天之後、第 9 天之後、第 10 天之後等進行量測。

【0088】 在某些態樣中，使用天冬醯胺相關胺基酸作為替代標誌物來偵測、量測或篩選天冬醯胺序列變異之方法可提供用於鑑定特定所關注多肽之最佳細胞培養參數的高產量篩選及最佳化技術。舉例而言，該方法可用於確定使特定所關注多肽之天冬醯胺序列變異最小化的最佳天冬醯胺饋料水平。

【0089】天冬醯胺補充之最佳化、原位監測及控制

【0090】 在某些實施例中，提供用於監測及控制細胞培養參數之方法，其包含天冬醯胺補充。此類方法可監測及控制各種細胞培養過程參數以為目標細胞株及/或所關注多肽提供最佳天冬醯胺補充。可監測及控制之例示性細胞培養過程參數包含但不限於天冬醯胺濃度、天冬醯胺相關胺基酸濃度、活細胞計數、死細胞計數、蛋白質效價、銨離子、丙胺酸、重量莫耳滲透濃度及其組合。

【0091】 在某些態樣中，本發明之監測及控制方法可用以最佳化及防止細胞培養基中之天冬醯胺耗乏，同時同步控制諸如銨離子及丙胺酸之細胞培養副產物的形成。此監測及控制可藉此提供對例如活細胞計數及蛋白質效價之細胞培養效能參數的改良控制。

【0092】 在某些實施例中，提供一種用於監測及控制細胞培養基條件之方法。該方法大體上可包括使用凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼光譜法原位量測細胞培養物中之一個或多個細胞培養參數；將所量測之一個或多個細胞培養參數與細胞培養參數之預定設定點值進行比較以確定一個或多個細胞培養參數是否在預定臨限範圍內；及若確定細胞培養參數在預定臨限範圍之外，則調整細胞培養參數中之一者或多者。在某些實施例中，可監測銨離子濃度，且若確定銨離子濃度在特定細胞培養物之預定臨限範圍之外，則可調整天冬醯胺補充物饋料以使得細胞培養物產生較少銨，同時仍接受充足的天冬醯胺。此方法可用以提供最佳及最大量之天冬醯胺補充，同時最小化諸如銨離子及丙胺酸之細胞副產物的產生。

【0093】 在某些實施例中，本揭露之監測及控制方法可使用原位凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼光譜法，或其他合適的用於即時估計細胞培養參數之原位細胞培養參數量測方法及化學計量學建模技術，以及用於對細胞培養過程參數進行精確及連續回饋以及模型預測控制的

訊號處理技術。生物反應器內容物之原位凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼光譜法允許在不必要實體上移除樣本以供測試之情況下對一個或多個過程變數進行分析。此類技術可提供對包含天冬醯胺補充之細胞培養過程參數的即時回饋控制。

【0094】 在一個實施例中，可設定銨離子及/或丙胺酸之預定最大設定點值。同樣，可設定天冬醯胺補充連續流動速率之預定設定點值。在饋料分批細胞培養期間之所要時間點（例如早期饋料分批時間框，第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天；後期饋料分批時間框，第 5 天、第 6 天、第 7 天、第 8 天、第 9 天、第 10 天等）處，可開始連續饋料天冬醯胺補充。天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸、銨離子及/或丙胺酸之濃度中的一者或多者可在細胞培養操作期間，藉由凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼光譜法來監測。在某些實施例中，為確保原始光譜資料持續更新，可約每 10 分鐘至 2 小時採集來自凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼光譜之資料。在另一實施例中，可約每 15 分鐘至 1 小時採集資料。在又一實施例中，可約每 20 分鐘至 30 分鐘採集資料。

【0095】 對一個或多個細胞培養過程參數之監測可藉由允許原位分析之任何可商購分析器來分析。原位分析器應能夠獲得細胞培養內之原始資料（例如分析器應裝備有可插入至生物反應器中之探針）。合適的分析器包含但不限於 RamanRXN2 及 RamanRXN4 分析器（密歇根州安阿伯市的凱撒光學系統公司（Kaiser Optical Systems, Inc.））或 BioProfile Flex 自動化細胞培養分析器。

【0096】 可將藉由原位分析器獲得之原始光譜資料與待監測或控制之特定製程參數的脫機量測值（例如天冬醯胺濃度脫機量測值）進行比較以便使過程參數內之資料關聯。線下量測值資料可經由任何適當分析方法來收集。另外，任何類型之多變數軟體包（例如 SIMCA 13（瑞典默奧（Umea, Sweden）的 MKS

Data Analytic Solutions)) 可用以使資料與待監測或控制之特定過程變數的脫機量測值相關聯。然而，在一些實施例中，可能有必要用濾波器預處理原始資料以移除任何變化的基線。舉例而言，可用任何類型之點平滑技術或標準化技術預處理原始資料。可能需要標準化，例如以校正任何功率變化及曝光時間。在一個實施例中，可用諸如具有 21 cm^{-1} 點平滑之 1 階導數的點平滑及諸如標準正態變量 (SNV) 標準化之標準化來處理原始資料。

【0097】 亦可對所獲得光譜資料執行化學計量學建模。在某些實施例中，可對光譜資料使用一種或多種多變數方法，包含但不限於部分最小平方 (PLS)、主成分分析 (PCA)、正交部分最小平方 (OPLS)、多變量回歸、正準相關、因素分析、集群分析、圖形程序及其類似者。在一個實施例中，所獲得光譜資料用以形成 PLS 回歸模型。PLS 回歸模型可藉由將所預測變數及所觀測變數投射至新空間而形成。在此態樣中，PLS 回歸模型可使用自拉曼分析獲得之量測值及脫機量測值來形成。PLS 回歸模型提供所預測過程值，例如所預測營養濃度值。

【0098】 在化學計量學建模之後，可將訊號處理技術應用於所預測過程值（例如所預測天冬鹼胺濃度值）。在一個實施例中，訊號處理技術包含雜訊降低技術。在某些實施例中，可將一種或多種雜訊降低技術應用於所預測過程參數。可利用本領域中熟習此項技術者已知的任何雜訊降低技術。舉例而言，雜訊降低技術可包含資料平滑及/或訊號抑制。經由一系列平滑演算法及濾波器達成平滑，而訊號抑制使用訊號特性以鑑定不應包含於所分析光譜資料中之資料。在一個實施例中，所預測過程值為藉由雜訊降低濾波器減少之雜訊。雜訊降低濾波器提供最終過濾過程值（例如最終過濾營養物濃度值）。在此態樣中，雜訊降低技術將原始量測值與基於模型之估計值組合，該基於模型之估計值係針對應根據模型得到的量測值。在一個實施例中，雜訊降低技術將當前所預測過程

值與其不確定度組合。不確定度可藉由所預測過程值及當前過程條件之再現性來確定。一旦觀測到下一所預測過程值，則使用加權平均值更新所預測過程值（例如所預測營養物濃度值）之估計值，其中為具有較高確定度之估計值給予更大權重。使用疊代法，可基於前一量測值及當前過程條件來更新最終過程值。在此態樣中，演算法應為遞回的，且能夠即時運算，以便利用當前所預測過程值、前一值及實驗測定常數。雜訊降低技術藉由減小自動化回饋控制器作用所基於之雜訊來改良自拉曼分析及 PLS 預測接收到之量測值的穩固性。

【0099】 在獲得最終過濾過程值（例如最終過濾營養物濃度值）時，可將最終值發送至自動化回饋控制器。自動化回饋控制器可用以將過程參數（例如對鉍濃度之監測及對天冬醯胺濃度之控制）控制及維持於預定義設定點處或低於預定義設定點。在一個實施例中，若偵測到鉍濃度高於最大設定點值，則可促使自動化回饋控制器在臨限範圍內減小天冬醯胺饋料之量。自動化回饋控制器可包含能夠將誤差值計算為所要設定點（例如預定義設定點）與所量測過程參數之間的差且自動應用精確且回應性校正之任何類型的控制器。自動化回饋控制器亦應具有能夠自平台介面即時變化之控制件。舉例而言，自動化回饋控制器應具有允許調整預定義設定點之使用者介面。自動化回饋控制器應能夠對預定義設定點之變化作出回應。

【0100】 在一個實施例中，自動化回饋控制器可為比例-積分-微分（PID）控制器。在此態樣中，PID 控制器可操作以計算預定義設定點與所量測過程變數（例如所量測天冬醯胺濃度）之間的差，且自動應用精確校正。舉例而言，當細胞培養之營養物濃度待控制時，PID 控制器可操作以計算過濾營養值與預定義設定點之間的差，且提供營養物量之校正。在此態樣中，PID 控制器可以操作方式連接至生物反應器上之營養泵，以使得校正的營養物量可泵送至生物反應器中。

【0101】 經由即時分析及回饋控制之使用，本揭露之方法能夠為目標細胞

株及/或所關注多肽提供最佳天冬醯胺補充。亦即，本發明之方法能夠向細胞培養物提供最佳天冬醯胺補充，同時最小化細胞培養副產物(包含有害細胞培養副產物)之產生。

【0102】細胞培養基

【0103】術語「細胞培養基」及「培養基」係指用於使細胞(例如真核細胞)生長之營養液，該營養液典型地提供用以促進細胞生長之必要營養物，諸如碳水化合物能量來源、必需(例如苯丙胺酸、纈胺酸、蘇胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、白胺酸、異白胺酸、離胺酸及組胺酸)及非必需(例如丙胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺、甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸及酪胺酸)胺基酸、微量元素、能源來源、脂質、維生素等。細胞培養基可含有供應支援細胞生長之原材料的萃取物，例如血清或蛋白腴(水解產物)。培養基可含有酵母衍生或大豆萃取物，而非動物衍生性萃取物。化學成分確定之培養基係指其中所有化學組分已知(亦即具有已知化學結構)的細胞培養基。一般而言，化學成分確定之培養基不含動物衍生組分，諸如血清衍生或動物衍生蛋白腴以及酵母及大豆萃取物。在一個實施例中，培養基為化學成分確定之培養基。

【0104】培養基亦可含有促進生長及/或存活高於最小速率之組分，包含激素及生長因子。培養基較佳地經調配至最佳用於細胞存活及增殖之 pH 及鹽濃度。

【0105】在某些態樣中，細胞培養基可為無血清的。「無血清」適用於不含有動物血清(諸如胎牛血清)之細胞培養基。無血清培養基可含有 ≤ 16 g/L 之水解產物，諸如大豆水解產物。本揭露亦提供化學成分確定之培養基，其不僅無血清，而且無水解產物。「無水解產物」適用於不含有外源蛋白質水解產物之細胞培養基，該等外源蛋白質水解產物諸如動物或植物蛋白質水解產物，例如蛋白腴、胰腴及其類似者。

【0106】「基礎培養基」為細胞於其中繁殖且含有包含胺基酸之基礎混合物的所有必要營養的初始培養基（例如存在於種細胞系中及/或細胞培養物產生之第 0 天）。基礎培養基之各種配方（亦即調配物）可以可商購批料形式製造或購買。同樣，「基礎饋料培養基」含有通常在生產培養期間消耗且用於饋料策略（針對所謂「饋料分批」培養）中之補充營養物的混合物。各種各樣之基礎饋料培養基為可商購的。「饋料」包含以規則時間間隔向培養基中進行一次或多次計劃添加，諸如根據如連續培養裝置（chemostat）（參見 C. Altamirano 等人,《生物技術進展 (Biotechnol Prog.)》2001 年 11 月至 12 月; 17(6):1032-41）中之方案（包含連續饋料培養系統），或根據饋料分批製程（Y. M. Huang 等人,《生物技術進展》2010 年 9 月至 10 月; 26(5): 1400-10）。舉例而言，培養物可每天、每隔一天、每三天饋料一次，或可在所監測之特定培養基組分的濃度降低至所要範圍之外時進行饋料。

【0107】在不意欲受限制之情況下，本揭露可使用多種基礎培養基中之任一者或多者或其組合來實踐。基礎培養基一般為本領域中已知的，且尤其包含伊格爾氏 (Eagle's) MEME（最小必需培養基）（Eagle,《科學 (Science)》, 1955, 112(3168):501-504）、哈姆氏 (Ham's) F12（Ham,《美國科學院院刊》, 1965, 53:288-293）、F-12 K 培養基、杜爾貝科氏 (Dulbecco's) 培養基、杜爾貝科氏改良伊格爾培養基（《美國科學院院刊》, 1952 年 8 月; 38(8): 747-752）、DMEM/哈姆氏 F12 1:1、特羅韋爾氏 (Trowell's) T8、A2 培養基（Holmes 及 Wolf,《生物化學與生物物理細胞因子 (Biophys.Biochem. Cytol.)》, 1961, 10:389-401）、Waymouth 培養基 (Davidson 及 Waymouth,《生物化學雜誌 (Biochem. J.)》, 1945, 39(2):188-199）、Williams E 培養基 (William's 等人,《實驗細胞研究 (Exp. Cell Res.)》, 1971, 69:105 及以下）、RPMI 1640 (Moore 等人,《美國醫學協會雜誌 (J. Amer. Med. Assoc.)》, 1967, 199:519-524）、MCDB 104/110 培養基 (Bettger

第 28 頁，共 68 頁(發明說明書)

等人,《美國科學院院刊》,1981,78(9):5588-5592)、Ventrex HL-1 培養基、白蛋白-球蛋白培養基(Orr 等人,《應用微生物學(*Appl. Microbiol.*)》,1973,25(1):49-54)、RPMI-1640 培養基、RPMI-1641 培養基、伊氏(Iscove's)改良杜爾貝科氏培養基、麥考伊氏(McCoy's)5 A 培養基、萊博維茨氏(Leibovitz's) L-15 培養基及無血清培養基,諸如 EX-CELL™ 300 系列(《JRH 生物科學(JRH Biosciences)》,Lenexa, Kans.)、魚精蛋白-鋅-胰島素培養基(Weiss 等人,1974,美國專利第 4,072,565 號)、生物素-葉酸培養基(Cartaya, 1978, US Re30, 985)、運鐵蛋白-脂肪酸培養基(Baker, 1982, 美國專利第 4,560,655 號)、運鐵蛋白-EGF 培養基(Hasegawa, 1982, 美國專利第 4,615,977 號; Chessebeuf, 1984, 美國專利第 4,786,599 號)及其他培養基排列(參見 Inlow, 美國專利第 6,048,728 號; Drapeau, 美國專利第 7,294,484 號; Mather, 美國專利第 5,122,469 號; Furukawa, 美國專利第 5,976,833 號; Chen, 美國專利第 6,180,401 號; Chen, 美國專利第 5,856,179 號; Etcheverry, 美國專利第 5,705,364 號; Etcheverry, 美國專利第 7,666,416 號; Ryll, 美國專利第 6,528,286 號; Singh, 美國專利第 6,924,124 號; Luan, 美國專利第 7,429,491 號; 及其類似者)。

【0108】 細胞培養基亦可週期性饋料(如在所謂「饋料分批」培養中),視待培養細胞之需求或所要細胞培養參數而定,該細胞培養基具有或不具有諸如多元胺之額外成分或增加濃度的組分,如胺基酸、鹽、糖、維生素、激素、生長因子、緩衝液、抗生素、脂質、微量元素及其類似者。

【0109】 在某些態樣中,在不提供額外胺基酸補充的情況下,細胞培養基可在重組蛋白質產生之時程內耗乏胺基酸,或在為耗乏胺基酸提供胺基酸補充(如下文所描述)的情況下,細胞培養基可為「非耗乏」的。

【0110】 在一個實施例中,培養基另外含有 $100\ \mu\text{M}\pm 15\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸,或 $300\ \mu\text{M}\pm 45\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸,或 $600\ \mu\text{M}\pm 90\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸,或甚至 $900\ \mu\text{M}\pm 135\ \mu\text{M}$ 鳥胺

酸。在另一實施例中，培養基含有至少約 $29\ \mu\text{M} \pm 1\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或至少約 $59\ \mu\text{M} \pm 12\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸、 $80\ \mu\text{M} \pm 13\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或至少約 $296\ \mu\text{M} \pm 44\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或至少約 $593\ \mu\text{M} \pm 89\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或至少約 $889\ \mu\text{M} \pm 133\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸。

【0111】可視情況將腐胺添加至補充培養基中。腐胺已按較低濃度（例如 0.01 至 120 mg/L）作為組分包含於一些細胞培養基調配物中；參見例如 WO 2005/028626，其描述 0.02 至 0.08 mg/L 腐胺；美國專利第 5,426,699 號（0.08 mg/L）；美國專利第 RE30,985 號（0.16 mg/L）；美國專利第 5,811,299 號（0.27 mg/L）；美國專利第 5,122,469 號（0.5635 mg/L）；美國專利第 5,063,157 號（1 mg/L）；WO 2008/154014（約 100 至 1000 μM ）；美國專利申請案第 2007/0212770 號（0.5 至 30 mg/L 多元胺；2 mg/L 腐胺；2 mg/L 腐胺+2 mg/L 鳥胺酸；2 mg/L 腐胺+10 mg/L 鳥胺酸）。

【0112】在一些實施例中，細胞培養基進一步補充鳥胺酸與腐胺之組合，其中腐胺可呈至少約 150 至 720 μM 之濃度。在一些實施例中，培養基進一步補充呈約 170 至 230 μM 之濃度的腐胺。在一個實施例中，除 $\geq 90\ \mu\text{M} \pm 15\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸以外，培養基亦含有 $200\ \mu\text{M} \pm 30\ \mu\text{M}$ 腐胺。在一個實施例中，除 $\leq 89\ \mu\text{M} \pm 13\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸以外，培養基亦含有 $\leq 186\ \mu\text{M} \pm 28\ \mu\text{M}$ 腐胺。在另一實施例中，除 $\geq 89\ \mu\text{M} \pm 13\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸以外，培養基亦含有 $\geq 186\ \mu\text{M} \pm 28\ \mu\text{M}$ 腐胺。（參見 2014 年 9 月 18 日公開之國際公開案第 WO2014/144198A1 號，其以全文引用的方式併入本文中。）

【0113】在又其他實施例中，鳥胺酸以範圍介於 $0.09 \pm 0.014\ \text{mM}$ 至 $0.9 \pm 0.14\ \text{mM}$ 之濃度存在於培養基中，諸如 $0.09 \pm 0.014\ \text{mM}$ 、 $0.3 \pm 0.05\ \text{mM}$ 、 $0.6 \pm 0.09\ \text{mM}$ 或 $0.9 \pm 0.14\ \text{mM}$ 鳥胺酸。在一些實施例中，培養基亦含有至少 $0.20 \pm 0.03\ \text{mM}$ 腐胺。在一些實施例中，額外腐胺呈範圍介於 $0.20 \pm 0.03\ \text{mM}$ 至 $0.714 \pm 0.11\ \text{mM}$ 之濃度，諸如 $0.20 \pm 0.03\ \text{mM}$ 、 0.35 ± 0.06 或 $0.714 \pm 0.11\ \text{mM}$ 腐胺。

【0114】 又其他實施例，培養基可補充呈至少約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 mM 之濃度（以毫莫耳/公升表述）的牛膽素。

【0115】 各種其他補充物可添加至培養基，且在本領域中熟習此項技術者之技能內以確定另外適當的條件。在某些實施例中，補充物可為如本文中所描述之天冬醯胺補充物。在一些實施例中，培養基補充選自由以下組成之群組的胺基酸之混合物：天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、酪胺酸及色胺酸，以便為非耗乏的或在需要補充營養物（亦即散裝饋料）時。

【0116】 在一個實施例中，培養基進一步補充約 170 μM 至 175 μM 核苷。在一個實施例中，培養基含有呈至少 40 μM 、至少 45 μM 、至少 50 μM 、至少 55 μM 、至少 60 μM 、至少 65 μM 、至少 70 μM 、至少 75 μM 、至少 80 μM 、至少 85 μM 、至少 90 μM 、至少 95 μM 、至少 100 μM 或至少 105 μM 之累計濃度的嘌呤衍生物。在一個實施例中，培養基含有約 100 μM 至 110 μM 之嘌呤衍生物。嘌呤衍生物包含次黃嘌呤以及核苷腺苷及鳥苷。在一個實施例中，培養基含有呈至少 30 μM 、至少 35 μM 、至少 40 μM 、至少 45 μM 、至少 50 μM 、至少 55 μM 、至少 60 μM 或至少 65 μM 之累計濃度的嘧啶衍生物。在一個實施例中，培養基含有約 65 μM 至 75 μM 之嘧啶衍生物。嘧啶衍生物包含核苷胸苷、尿苷及胞嘧啶核苷。在一個特定實施例中，培養基含有腺苷、鳥苷、胞嘧啶核苷、尿苷、胸苷及次黃嘌呤。

【0117】 除包含上述添加劑中之任一者以外，在一個實施例中，培養基進一步補充微莫耳量之脂肪酸（或脂肪酸衍生物）及生育酚。在一個實施例中，脂肪酸包含以下中之任一者或多者：亞麻油酸、次亞麻油酸、硫辛酸、油酸、

棕櫚酸、硬脂酸、二十烷酸、二十碳四烯酸、十二酸、二十二烷酸、癸酸、十二酸、己酸、二十四烷酸、肉豆蔻酸及辛酸。在一個實施例中，培養基含有生育酚、亞麻油酸及硫辛酸。

【0118】 在一個實施例中，培養基亦可進一步補充維生素之混合物，該混合物以至少約 700 μM 或至少約 2 mM 之累計濃度包含其他營養物及必要營養物。在一個實施例中，維生素之混合物含有以下中之一者或多者：D-生物素、氯化膽鹼、葉酸、肌醇、菸鹼醯胺、吡哆醇鹽酸鹽、D-泛酸 (hemiCa)、核黃素、硫胺鹽酸鹽、維生素 B12 及其類似者。在一個實施例中，維生素之混合物包含 D-生物素、氯化膽鹼、葉酸、肌醇、菸鹼醯胺、吡哆醇鹽酸鹽、D-泛酸 (hemiCa)、核黃素、硫胺鹽酸鹽及維生素 B12 中之所有。

【0119】 在一特定實施例中，細胞培養基可為化學成分確定的，且可包括：如本文中所論述之胺基酸混合物， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；KCl； MgSO_4 ；NaCl； Na_2HPO_4 或其他磷酸鹽；丙酮酸鹽；D-生物素；氯化膽鹼；葉酸；肌醇；菸鹼醯胺；吡哆醇鹽酸鹽；D-泛酸；核黃素；硫胺鹽酸鹽；維生素 B12； p -胺基苯甲酸；乙醇胺鹽酸鹽；泊洛沙姆 (poloxamer) 188；DL-a-生育酚磷酸鹽；亞麻油酸； Na_2SeO_3 ；硫辛酸；一種或多種緩衝液及葡萄糖；及視情況選用之腺苷；鳥苷；胞嘧啶核苷；尿苷；胸苷；及次黃嘌呤二鈉。

【0120】 在一個實施例中，本揭露之培養基的起始容積滲透濃度為 200 至 500、250 至 400、275 至 350 或約 300 mOsm。在本揭露之培養基中之細胞的生長期間，且特定言之，在根據饋料分批協定之任何饋料之後，培養物之容積滲透濃度可增加達至約 350、400、450、500 或至多約 550 mOsm。

【0121】 在其中培養基之容積滲透濃度小於約 300 之一些實施例中，可藉由添加超過指定量之一種或多種鹽而將容積滲透濃度調整至約 300。在一個實施例中，藉由添加選自以下之一種或多種滲透劑而將容積滲透濃度增加至所要水

平：氯化鈉、氯化鉀、鎂鹽、鈣鹽、胺基酸鹽、脂肪酸鹽、碳酸氫鈉、碳酸鈉、碳酸鉀、作為鹽之螯合劑、糖（例如半乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、海藻糖等）及其組合。在一個實施例中，將滲透劑添加至超過且高於其在已存在於成分確定之培養基中之組分中的濃度（例如將糖添加至超過且高於針對糖組分所指定之濃度）。

【0122】細胞培養物

【0123】本揭露之一個態樣提供一種細胞培養物，其包括在用如本文中所描述之天冬醯胺補充物培養時表現所關注重組蛋白質之細胞株。常規上用以產生重組蛋白之細胞株的實例尤其包含初生細胞、BSC 細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞、LLC-MK 細胞、CV-1 細胞、COS 細胞、VERO 細胞、MDBK 細胞、MDCK 細胞、CRFK 細胞、RAF 細胞、RK 細胞、TCMK-1 細胞、LLCPK 細胞、PK15 細胞、LLC-RK 細胞、MDOK 細胞、BHK 細胞、BHK-21 細胞、CHO 細胞、CHO-K1 細胞、NS-1 細胞、MRC-5 細胞、WI-38 細胞、3T3 細胞、293 細胞、Per.C6 細胞及雞胚胎細胞。在一個實施例中，細胞株為 CHO 細胞株，或經最佳化用於大規模蛋白質生產之若干特定 CHO 細胞變異體中的一者或多者，例如 CHO-K1。

【0124】本揭露之另一態樣係關於一種使用如本文所描述之天冬醯胺補充物培養細胞的方法，其中與早期及/或後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充的類似方法相比，此類天冬醯胺補充物之使用促進真核細胞的生長，同時藉由此類細胞改良一種或多種所關注重組蛋白質之效價及尤其藉由在早期饋料分批細胞培養及/或後期饋料分批細胞培養中使用來維持細胞生存力。

【0125】在一些態樣中，相對於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充生長之細胞，重組蛋白質效價得以改良。在一些實施例中，相較於由在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之細胞的蛋白質效價（產率），在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之

天冬醯胺補充生長之細胞培養物所產生的蛋白質效價大至少約 4%、至少約 5%、至少約 6%、至少約 7%、至少約 8%、至少約 9%、至少約 10%、至少約 11%、至少約 12%、至少約 13%、至少約 14%、至少約 15%、至少約 16%、至少約 17%、至少約 18%、至少約 19%、至少約 20%、至少約 21%、大至少約 22%、大至少約 23%、大至少約 24%、大至少約 25%、大至少約 26%、大至少約 27%、大至少約 28%或大至少約 29%。在一些實施例中，具有本揭露之天冬醯胺補充物之細胞培養物所產生的蛋白質效價大於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之類似或相同細胞的蛋白質效價。

【0126】 在一些態樣中，相對於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充生長之細胞，細胞生長（例如倍增速率）、活細胞密度、細胞生存力及其組合得以改良。

【0127】 在一些實施例中，相較於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之細胞的倍增速率，用本揭露之天冬醯胺補充物培養之活細胞的倍增速率大至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%、至少 11%、至少 12%、至少 13%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 17%、至少 18%、至少 19%、至少 20%、至少 21%、至少 22%、至少 23%、至少 24%、至少 25%、至少 26%、至少 27%、至少 28%、至少 29%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%或至少 3 倍。在一些實施例中，相較於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之活細胞的倍增速率，用本揭露之天冬醯胺補充物培養之活細胞的倍增速率大約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%或 30%。

【0128】 在一些實施例中，與在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低

量之天冬醯胺補充培養的細胞相比，當用本揭露之天冬醯胺補充物培養時，主動循環哺乳動物細胞之倍增時間小於 30 小時、小於 29 小時、小於 28 小時、小於 27 小時、小於 26 小時、小於 25 小時、小於 24 小時、小於 23 小時、小於 22 小時、小於 21 小時、小於 20 小時、小於 19 小時或小於 18 小時。在一些實施例中，與在早期及/或後期饋料分批細胞培養物中以較低量之天冬醯胺補充培養的細胞相比，當用本揭露之天冬醯胺補充物培養時，主動生長哺乳動物細胞之倍增時間小於 28 小時。在一些實施例中，與在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養的細胞相比，當用本揭露之天冬醯胺補充物培養時，哺乳動物細胞之倍增時間為約 27 ± 1 小時、約 26 ± 1 小時、約 25 ± 1 小時、約 24 ± 1 小時、約 23 ± 1 小時、約 22 ± 1 小時或約 21 ± 1 小時。在一些實施例中，與在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養的細胞相比，當用本揭露之天冬醯胺補充物培養時，主動循環哺乳動物細胞之倍增時間為約 24 ± 1 小時。在一些實施例中，相較於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之主動循環細胞的倍增時間，當用本揭露之天冬醯胺補充物培養時，主動分裂細胞之倍增時間短至少 15%、至少 16%、至少 17%、至少 18%、至少 19%、至少 20%或至少 25%。

【0129】 關於細胞生存力，相較於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之細胞的生存力，用本揭露之天冬醯胺補充物培養之細胞展現大至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%、至少 100% 或至少 3 倍之生存力。

【0130】 在生產培養容器或生物反應器中，在種細胞培養或生長階段之後，將基礎培養基及細胞供應至培養容器。在某些實施例中，在生產培養之後

第 35 頁，共 68 頁(發明說明書)

採集細胞上清液或細胞裂解物。在其他實施例中，使用本領域中習知技術自培養基或細胞裂解物回收多肽或所關注蛋白質，或無論如何，情況可視所關注蛋白質之位置而定

【0131】「細胞株」係指經由細胞之連續傳代或繼代培養而衍生自特定譜系的一種或多種細胞。術語「細胞」可與「細胞群體」互換使用。

【0132】術語「細胞」包含適合於表現重組核酸序列之任何細胞。細胞包含真核生物之細胞，諸如非人類動物細胞、哺乳動物細胞、人類細胞、禽類細胞、昆蟲細胞、酵母細胞或細胞融合物，諸如融合瘤或雜交瘤。在某些實施例中，細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在其他實施例中，細胞係選自以下細胞：CHO（例如 CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO）、COS（例如 COS-7）、視網膜細胞、Vero、CV1、腎臟細胞（例如 HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK21）、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球（例如 Jurkat（T 淋巴球）或 Daudi（B 淋巴球））、A431（表皮）、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞之細胞株。在一些實施例中，細胞包括一個或多個病毒基因，例如表現病毒基因之視網膜細胞（例如 PER.C6®細胞）。在一些實施例中，細胞為 CHO 細胞。在其他實施例中，細胞為 CHO K1 細胞。

【0133】在重組蛋白質產生階段中，「饋料分批細胞培養」或「饋料分批培養」係指以下分批培養：其中最初將動物細胞及培養基供應至培養容器，且在培養期間向培養物中連續或以離散增量緩慢饋入額外培養營養物，其中在培養結束之前進行或不進行週期性細胞及/或產物採集。饋料分批培養包含「半連續饋料分批培養」，其中將全培養物（其可包含細胞及培養基）週期性地移除且由新鮮培養基替換。饋料分批培養區別於單純「分批培養」，而用於細胞培養之所有組分（包含動物細胞及所有培養營養物）係在分批培養中之培養過程

開始時供應至培養容器中。就在該過程期間並不自培養容器移除上清液而言，饋料分批培養可進一步區別於灌注培養，而在灌注培養中，藉由例如過濾而將細胞保留於培養物中，且將培養基連續或間歇地引入培養容器及自培養容器移除。然而，涵蓋在饋料分批細胞培養期間出於測試目的而移除樣本。饋料分批過程繼續，直至確定達至最大工作體積及/或蛋白質產生為止。

【0134】當在本文中使用时，片語「連續細胞培養」係關於一種用以使細胞通常在特定生長階段中連續生長之技術。舉例而言，若需要恆定供應細胞，或需要產生特定多肽或所關注蛋白質，則細胞培養可能需要維持於特定生長階段中。因此，必須持續監測且相應地調整條件，以便使細胞維持於特定階段中。

【0135】本揭露之一個態樣係關於一種饋料分批生產細胞培養物，其中產生且採集蛋白質。在產生階段之前，典型地存在生長階段（亦稱為種細胞系或種細胞培養），其中在培養過程開始時將用於細胞培養之所有組分供應至培養容器，隨後使細胞群體擴增直至準備用於生產規模為止。如此，視起始細胞株而定，以適合於初始細胞生長階段之接種密度將細胞接種於培養容器。在一些態樣中，本揭露之天冬醯胺補充物可與饋料分批生產細胞培養物一起使用，如本文中進一步描述。

【0136】培養容器包含但不限於孔板、T 瓶、搖瓶、攪拌容器、旋轉器瓶、中空纖維、氣升式生物反應器及其類似者。合適的細胞培養容器為生物反應器。生物反應器係指經製造或工程改造以操縱或控制環境條件之任何培養容器。此類培養容器為本領域中習知的。

【0137】已研發生物反應器處理及系統以最佳化氣體交換，以供應充足氧氣以維持細胞生長及生產力，且移除 CO_2 。維持氣體交換之效率為保證細胞培養及蛋白質產生按比例增長成功的重要準則。此類系統為本領域中熟習此項技術者所熟知。

【0138】 在一個實施例中，在細胞培養期間根據饋料分批製程以時間間隔補充培養基。饋料分批培養一般為本領域中已知的，且用以最佳化蛋白質產生（參見 Y. M. Huang 等人,《*生物技術進展*》2010 年 9 月至 10 月; 26(5): 1400-10）。饋料分批製程典型地在產生階段使用。

【0139】 可執行補充饋料以按時間間隔以每天或每 2 至 3 天之頻率包含額外營養物（諸如維生素、胺基酸及如上文中所描述之其他營養物），持續生產培養之持續時間。在生產培養之整個持續時間中，可執行補充饋料（添加含有營養物之補充培養基）至少 2 次或至少 8 次持續 2 週或更長時間的培養。在另一實施例中，補充饋料可每日執行，持續培養之持續時間。亦設想替代培養饋料排程。

【0140】 亦可執行額外胺基酸補充以提供非耗乏培養基，其中耗乏胺基酸係根據本領域中已知且在本文中所描述的方法來測定。當採用此方案時，視胺基酸耗乏之確定值而定，以時間間隔，較佳地以每天或每 2 至 3 天之頻率補充或添加額外胺基酸，持續生產培養時間。在一個實施例中，在第 1 天或約第 1 天、在第 2 天或約第 2 天、在第 3 天或約第 3 天、在第 4 天或約第 4 天、在第 5 天或約第 5 天、在第 6 天或約第 6 天、在第 7 天或約第 7 天、在第 8 天或約第 8 天、在第 9 天或約第 9 天、在第 10 天或約第 10 天、在第 11 天或約第 11 天、在第 12 天或約第 12 天、在第 13 天或約第 13 天及在第 14 天或約第 14 天，將用以維持非耗乏細胞培養基之額外胺基酸的混合物添加至培養物中，持續 2 週或更長時間的培養。亦設想替代培養物饋料排程。

【0141】 可在小規模培養中，諸如在具有約 25 mL 之培養基的 125 ml 容器、具有約 50 至 100 mL 之培養基的 250 mL 容器、具有約 150 至 240 mL 之培養基的 250 mL 容器、具有約 100 至 200 mL 之培養基的 500 mL 容器中培養真核細胞，諸如 CHO 細胞。可替代地，培養可為大規模的，諸如具有約 300 至 1000 mL

之培養基的 1000 mL 容器、具有約 500 mL 至 3000 mL 之培養基的 3000 mL 容器、具有約 2000 mL 至 8000 mL 之培養基的 8000 mL 容器及具有約 4000 mL 至 15000 mL 之培養基的 15000 mL 容器。用於製造之培養物可含有 10,000 L 之培養基或更多。諸如用於蛋白質治療劑之臨床製造的大規模細胞培養典型地維持數天或甚至數週，同時細胞產生所要蛋白質。在此時間期間，培養物可補充濃縮饋料培養基，該濃縮饋料培養基含有在培養之時程期間消耗的組分，諸如營養物及胺基酸。濃縮饋料培養基可基於任何細胞培養基調配物。此濃縮饋料培養基可以例如約 5×、6×、7×、8×、9×、10×、12×、14×、16×、20×、30×、50×、100×、200×、400×、600×、800×或甚至約 1000×之其正常適用量含有細胞培養基之大部分組分。濃縮饋料培養基通常用於饋料分批培養製程中。

【0142】 在一些實施例中，在細胞生長或蛋白質產生之時程期間，細胞培養可進一步補充「使用點添加物」，亦稱為添加物、使用點成分或使用點化學物質。使用點添加物包含以下中之任一者或多者：生長因子或其他蛋白質、緩衝液、能量來源、鹽、胺基酸、金屬及螯合劑。其他蛋白質包含運鐵蛋白及白蛋白。包含細胞介素及趨化介素之生長因子一般為本領域中已知的，且已知刺激細胞生長，或在一些情況下刺激細胞分化。生長因子通常為蛋白質（例如胰島素）、小型肽或類固醇激素，諸如雌激素、DHEA、睪固酮及其類似者。在一些情況下，生長因子可為促進細胞增殖或蛋白質產生之非天然化學物質，諸如四氫葉酸（THF）、甲胺喋呤及其類似者。蛋白質及肽生長因子之非限制性實例包含血管生成素、骨形態生成蛋白質（BMP）、腦衍生神經營養因子（BDNF）、表皮生長因子（EGF）、紅血球生成素（EPO）、纖維母細胞生長因子（FGF）、膠細胞株衍生神經營養因子（GDNF）、顆粒球群落刺激因子（G-CSF）、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子（GM-CSF）、生長分化因子-9（GDF9）、肝細胞生長因子（HGF）、肝癌衍生生長因子（HDGF）、胰島素、類胰島素生長因子（IGF）、

遷移刺激因子、肌肉抑制素 (GDF-8)、神經生長因子 (NGF) 及其他神經營養素、血小板衍生生長因子 (PDGF)、血小板生成素 (TPO)、轉化生長因子 α (TGF- α)、轉化生長因子 β (TGF- β)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、血管內皮生長因子 (VEGF)、wnt 傳訊路徑促效劑、胎盤生長因子 (PIGF)、胎牛血清生長激素 (FBS)、介白素-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7 及其類似者。在一個實施例中，細胞培養基補充使用點添加物生長因子胰島素。在一個實施例中，在添加之後，培養基中之胰島素的濃度 (亦即細胞培養基中之胰島素的量) 為約 0.1 μ M 至 10 μ M。

【0143】緩衝液一般為本領域中已知的。本發明並不限於任一或任何特定緩衝液，且任何本領域中一般習知此項技術者可選擇供與產生特定蛋白質之特定細胞株一起使用的一種或多種適當緩衝液系統。在一個實施例中，使用點添加物緩衝液為 NaHCO_3 。在另一實施例中，緩衝液為 HEPES。在其他實施例中，使用點添加物緩衝液包括 NaHCO_3 及 HEPES 兩者。

【0144】適用作細胞培養中之使用點添加物的能源來源亦為此項技術中熟知的。非限制性地，在一個實施例中，使用點添加物能量來源為葡萄糖。鑒於待產生之特定細胞株及蛋白質的特定及特殊要求，在一個實施例中，可在培養基中將葡萄糖添加至約 1 至 20 mM 之濃度。在一些情況下，可以 20 g/L 或更高之較高含量添加葡萄糖。

【0145】螯合劑同樣為細胞培養及蛋白質產生之技術中習知的。四鈉 EDTA 脫水物及檸檬酸鹽為在此項技術中使用之兩種常用螯合劑，但其他螯合劑可用於本發明之實施。在一個實施例中，使用點添加物螯合劑為四鈉 EDTA 二水合物。在一個實施例中，使用點添加物螯合劑為檸檬酸鹽，諸如 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 。

【0146】在一個實施例中，細胞培養基可另外補充一種或多種使用點添加物胺基酸作為能量來源，諸如麩醯胺。在一個實施例中，細胞培養基以約 1 mM

至 13 mM 之最終濃度補充使用點添加物麩醯胺。

【0147】 其他使用點添加物包含各種金屬鹽中之一者或多者，諸如鐵、鎳、鋅及銅之鹽類。在一個實施例中，細胞培養基補充硫酸銅、硫酸鋅、氯化鐵及硫酸鎳中之任一者或多者。

【0148】 蛋白質產生

【0149】 在某些態樣中，本揭露提供用於改良細胞培養效能之方法，其包含藉由培養真核細胞來改良重組蛋白質產生中之重組蛋白質效價。在一些實施例中，真核細胞包括編碼重組蛋白質之穩定整合核酸。在其他實施例中，本揭露之方法提供經改良之細胞生長（例如倍增速率）、活細胞密度、細胞生存力及其組合，

【0150】 在一些實施例中，本揭露之方法包含提供本揭露之天冬醯胺補充物；在天冬醯胺補充物中培養真核細胞；由真核細胞表現所關注重組蛋白質；及與早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充或非天冬醯胺補充培養之類似或相同真核細胞相比，由天冬醯胺補充物中培養之真核細胞產生較高效價的重組蛋白質。

【0151】 在一些實施例中，用本揭露之天冬醯胺補充物培養之細胞的蛋白質產率或效價（其可以每公升培養基之蛋白質產物的公克數來表述）為至少 100 mg/L、至少 1 g/L、至少 1.2 g/L、至少 1.4 g/L、至少 1.6 g/L、至少 1.8 g/L、至少 2 g/L、至少 2.5 g/L、至少 3 g/L、至少 3.5 g/L、至少 4 g/L、至少 4.5 g/L、至少 5 g/L、至少 5.5 g/L、至少 6 g/L、至少 6.5 g/L、至少 7 g/L、至少 7.5 g/L、至少 8 g/L、至少 8.5 g/L、至少 9 g/L、至少 9.5 g/L、至少 10 g/L、至少 15 g/L 或至少 20 g/L。

【0152】 在一些實施例中，相較於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充或非天冬醯胺補充培養之類似或相同細胞的蛋白質效價

(產率)，用本揭露之天冬醯胺補充物培養之細胞產生的蛋白質效價大至少約 2%、至少約 3%、至少約 4%、至少約 5%、至少約 6%、至少約 7%、至少約 8%、至少約 9%、至少約 10%、至少約 11%、至少約 12%、至少約 13%、至少約 14%、至少約 15%、至少約 16%、至少約 17%、至少約 18%、至少約 19%、至少約 20%、至少約 21%、至少約 22%、大至少約 23%、大至少約 24%、大至少約 25%、大至少約 26%、大至少約 27%、大至少約 28%或大至少約 29%。

【0153】 在一些實施例中，相較於在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充或非天冬醯胺補充培養的類似或相同細胞之蛋白質效價，用本揭露之天冬醯胺補充物培養的哺乳動物細胞之蛋白質效價(產率)大至少 100 mg/L、至少 0.5 g/L、至少 1 g/L、至少 1.2 g/L、至少 1.4 g/L、至少 1.6 g/L、至少 1.8 g/L、至少 2 g/L、至少 2.5 g/L。

【0154】 本揭露之方法適用於經由細胞培養製程來改良蛋白質產生。用於本發明中之細胞株可經基因工程改造以表現具有商業或科學利益之重組蛋白質。基因工程改造細胞株涉及使用重組聚核苷酸分子轉染、轉化或轉導細胞或以其他方式進行改變(例如藉由同源重組及基因活化或重組細胞與非重組細胞融合)以促使宿主細胞表現所要重組多肽。用於基因工程改造細胞及/或細胞株表現所關注多肽之方法及載體為本領域中習知技術者所熟知的；舉例而言，各種技術描述於《分子生物學現代方法 (Current Protocols in Molecular Biology)》.Ausubel 等人編 (Wiley & Sons, 紐約, 1988, 且每季更新)；Sambrook 等人,《分子選殖：實驗室手冊》(冷泉港實驗室出版社，1989 年)；Kaufman, R. J.,《大規模哺乳動物細胞培養 (Large Scale Mammalian Cell Culture)》, 1990 年,第 15 至 69 頁中。適合於在培養物中生長之廣泛多種細胞株可獲自美國典型培養物保藏中心 (American Type Culture Collection) (弗吉尼亞州馬納薩斯 (Manassas, Va.)) 及商業供應商。

【0155】 在一些實施例中，蛋白質產物（所關注蛋白質）為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體、IgG4 抗體或其組合。在一個實施例中，抗體為 IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG2 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG1/IgG4 抗體。

【0156】 在一些實施例中，抗體係選自由以下組成之群組：抗計劃性細胞死亡 1 抗體（例如，如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0203579A1 號中之抗 PD1 抗體）、抗計劃性細胞死亡配位體-1（例如，如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0203580A1 號中之抗 PD-L1 抗體）、抗 DII4 抗體、抗血管生成素-2 抗體（例如，如描述於美國專利第 9,402,898 號中之抗 ANG2 抗體）、抗類血管生成素 3 抗體（例如，如描述於美國專利第 9,018,356 號中之抗 AngPt13 抗體）、抗血小板衍生生長因子受體抗體（例如，如描述於美國專利第 9,265,827 號中之抗 PDGFR 抗體）、抗 Erb3 抗體、抗泌乳素受體抗體（例如，如描述於美國專利第 9,302,015 號中之抗 PRLR 抗體）、抗補體 5 抗體（例如，如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0313194A1 號中之抗 C5 抗體）、抗 TNF 抗體、抗表皮生長因子受體抗體（例如，如描述於美國專利第 9,132,192 號中之抗 EGFR 抗體，或如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0259423A1 號中之抗 EGFRvIII 抗體）、抗前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶 Kexin-9 抗體（例如，如描述於美國專利第 8,062,640 號或美國專利申請公開案第 US2014/0044730A1 號中之抗 PCSK9 抗體）、抗生長及分化因子-8 抗體（例如，如描述於美國專利第 8,871,209 號或第 9,260,515 號中之抗 GDF8 抗體，亦稱為抗肌肉抑制素抗體）、抗升糖素受體

(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0337045A1 號或第 US2016/0075778A1 號中之抗 GCGR 抗體)、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、介白素 4 受體抗體(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2014/0271681A1 號或美國專利第 8,735,095 號或第 8,945,559 號中之抗 IL4R 抗體)、抗介白素 6 受體抗體(例如,如描述於美國專利第 7,582,298 號、第 8,043,617 號或第 9,173,880 號中之抗 IL6R 抗體)、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗介白素 33 (例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2014/0271658A1 號或第 US2014/0271642A1 號中之抗 IL33 抗體)、抗分化集群 3(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號以及美國申請案第 62/222,605 號中之抗 CD3 抗體)、抗分化集群 20(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號以及美國專利第 7,879,984 號中之抗 CD20 抗體)、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗分化集群 48 (例如,如描述於美國專利第 9,228,014 號中之抗 CD48 抗體)、抗 Fcγd1 抗體(例如,如美國專利第 9,079,948 號中所描述)、抗流感病毒抗體、抗呼吸道合胞病毒抗體(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2014/0271653A1 號中之抗 RSV 抗體)、抗中東呼吸道症候群病毒(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0337029A1 號中之抗 MERS-CoV 抗體)、抗伊波拉病毒抗體(例如,如美國專利申請公開案第 US2016/0215040 號中所描述)、抗茲卡病毒(Zika virus)抗體、抗重度急性呼吸道症候群(SARS)抗體(例如抗 SARS-CoV 抗體、抗 COVID-19 抗體(例如抗 SARS-CoV-2 抗體)、抗淋巴球活化基因 3 抗體(例如抗 LAG3 抗體或抗 CD223 抗體)、抗神經生長因子抗體(例如,如描述於美國專利申請公開案第 US2016/0017029 號以及美國專利第 8,309,088 號及第 9,353,176 號中之抗 NGF 抗體)及抗活化素 A 抗體。在一些實施例中,雙特異性抗體係選自由以下組成之

第 44 頁,共 68 頁(發明說明書)

群組：抗 CD3×抗 CD20 雙特異性抗體（如美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號中所描述）、抗 CD3×抗黏蛋白 16 雙特異性抗體（例如抗 CD3×抗 Muc16 雙特異性抗體）及抗 CD3×抗前列腺特異性膜抗原雙特異性抗體（例如抗 CD3×抗 PSMA 雙特異性抗體）。在一個實施例中，所關注蛋白質包括前述任一者之組合。

【0157】 在一些實施例中，所關注蛋白質係選自由以下組成之群組：抗流感病毒抗體、抗呼吸道合胞病毒抗體（例如，如描述於美國專利申請公開案第 US2014/0271653A1 號中之抗 RSV 抗體）、抗中東呼吸道症候群病毒（例如，如描述於美國專利申請公開案第 US2015/0337029A1 號中之抗 MERS-CoV 抗體）、抗伊波拉病毒抗體（例如，如美國專利申請公開案第 US2016/0215040 號中所描述）、抗茲卡病毒抗體、抗重度急性呼吸道症候群（SARS）抗體（例如抗 SARS-CoV 抗體、抗 COVID-19 抗體（例如抗 SARS-CoV-2 抗體）。在一個實施例中，所關注蛋白質包括前述任一者之組合。

【0158】 在一些實施例中，所關注蛋白質係選自由以下組成之群組：阿利庫單抗（alirocumab）、賽瑞單抗（sarilumab）、法神單抗（fasinumab）、內斯瓦庫單抗（nesvacumab）、度匹魯單抗（dupilumab）、特里沃單抗（trevogrumab）、恩維納單抗（evinacumab）及瑞努庫單抗（rinucumab）。在一個實施例中，所關注蛋白質包括前述任一者之組合。

【0159】 在一些實施例中，所關注蛋白質為含有 Fc 部分及另一域之重組蛋白質（例如 Fc 融合蛋白質）。在一些實施例中，Fc 融合蛋白質為受體 Fc 融合蛋白質，其含有偶合至 Fc 部分之受體的一個或多個胞外域。在一些實施例中，Fc 部分包括鉸鏈區，隨後為 IgG 之 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，受體 Fc 融合蛋白質含有結合至單一配位體或多個配體之兩個或更多個不同受體鏈。舉例而言，Fc 融合蛋白質為 TRAP 蛋白質，諸如 IL-1 捕獲劑（例如利納西普，其

含有融合至 II-1R1 胞外區之 IL-1RAcP 配位體結合區，該 II-1R1 胞外區融合至 hIgG1 之 Fc；參見美國專利第 6,927,004 號，其以全文引用的方式併入本文中）或 VEGF 捕獲劑（例如阿柏西普或塞維-阿柏西普（ziv-aflibercept），其含有融合至 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 域 3 的 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 域 2，該 VEGF 受體 Flk1 融合至 hIgG1 之 Fc；參見美國專利第 7,087,411 號及第 7,279,159 號）。在其他實施例中，Fc 融合蛋白質為 ScFv-Fc 融合蛋白質，其含有一個或多個抗原結合域中之一者或多者，諸如偶合至 Fc 部分之抗體的可變重鏈片段及可變輕鏈片段。

【0160】同樣，本揭露不限於用於重組蛋白質產生之任何特定類型的細胞。適合於重組蛋白質產生之細胞類型的實例包含哺乳動物細胞、昆蟲細胞、禽類細胞、細菌細胞及酵母細胞。細胞可為幹細胞或經用於重組基因表現之載體轉化的重組細胞，或經用於產生病毒產物之病毒轉染的細胞。細胞可含有編碼所關注蛋白質之重組異源聚核苷酸構築體。構築體可為游離基因體，或其可為實體上整合至細胞之基因體中的元件。細胞亦可在不具有異源多肽構築體上所編碼之彼蛋白質的情況下產生所關注蛋白質。換言之，細胞可天然地編碼所關注蛋白質，諸如產生抗體之 B 細胞。細胞亦可為諸如雞胚胎細胞之初生細胞，或初生細胞株。

【0161】適合細胞之實例包含 CHO、COS、視網膜細胞、Vero、CV1、腎臟細胞、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞之細胞株。在各種實施例中，細胞株為 CHO 細胞衍生物，諸如 CHO-K1、CHO DUX B-11、CHO DG-44、Veggie-CHO、GS-CHO、S-CHO 或 CHO Iec 突變株。

【0162】產生階段可在任何培養規模下進行，自搖瓶或波袋，至 250 mL 生物反應器，至一公升生物反應器，及至大規模量產生物反應器。同樣，種細

胞系擴增階段可在任何培養規模下進行，自及搖瓶或波袋，至 250 mL 生物反應器，至一公升或更大的生物反應器。大規模製程可以約 100 公升至 20,000 公升或更大的體積進行。若干手段中之一者或多者可用以控制蛋白質產生，諸如溫度變化或化學誘導。生長階段可在比產生階段更高的溫度下出現。舉例而言，生長階段可在約 35°C 至 38°C 之第一溫度下出現，且產生階段可在約 29°C 至 37°C，視情況約 30°C 至 36°C 或約 30°C 至 34°C 之第二溫度下出現。另外，蛋白質產生之化學誘導劑可與溫度變化同時、在溫度變化之前或之後添加，該等化學誘導劑諸如咖啡鹼、丁酸鹽、他莫昔芬（tamoxifen）、雌激素、四環素、多西環素（doxycycline）及伸己基雙乙醯胺（HMBA）。若在溫度變化之後添加誘導劑，則可在溫度變化之後的一小時至五天，諸如在溫度變化之後的一天至兩天添加該等化學誘導劑。產生細胞培養可以連續的饋料培養系統形式進行操作，如在連續培養裝置（參見 C. Altamirano 等人, 2001 見上文）中，或根據饋料分批製程（Huang, 2010 見上文）。

【0163】本揭露之實施例

【0164】 在一個實施例中，本揭露係關於用於培養真核細胞以改良細胞培養效能之方法，該方法包括：使真核細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 43.2 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 21.6 mM 之量的天冬醯胺；及於持續早期饋料分批細胞培養及後期饋料分批細胞培養之至少一部分，使該等細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持；其中與早期及/或後期饋料分批細胞培養中具有較低量之天冬醯胺補充或無天冬醯胺補充的類似方法相比，至少一個細胞培養效能參數藉由天冬醯胺補充得以改良。

【0165】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物在早期及/或後期饋料分批細胞培養中係作為散裝

饋料之部分或作為單獨天冬醯胺補充物饋料提供。

【0166】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物在早期及/或後期饋料分批細胞培養中係連續地或以大劑量形式提供。

【0167】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 7.2 mM 至約 21.6 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 10.8 mM 之量的天冬醯胺。

【0168】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，該等方法進一步包括在饋料分批細胞培養期間由真核細胞表現所關注重組蛋白質。

【0169】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，至少一個細胞培養效能參數係選自由以下組成之群組：細胞生存力增加、細胞生長速率增加、細胞密度增加、所關注重組蛋白質之效價增加、所關注重組蛋白質之產率增加、細胞培養之至少一部分中之必需胺基酸的耗乏減少、細胞培養之至少一部分中之至少一種細胞培養副產物的形成減少及至少一項蛋白質品質指標改良。

【0170】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，至少一種細胞培養副產物係選自由銨離子及丙胺酸組成之群組。

【0171】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，至少一項蛋白質品質指標為蛋白質序列變異減少。

【0172】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，相較於與早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之細胞相比的效價，所關注重組蛋白質之效價高至少 3%、5%、8%、

9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或至少 20%。

【0173】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，與其中在早期及/或後期饋料分批細胞培養中以較低量之天冬醯胺補充培養之細胞的類似方法相比，所關注重組蛋白質之產率增加至少 0.1 g/L、至少 0.5 g/L、至少 1 g/L、至少 1.2 g/L、至少 1.4 g/L、至少 1.6 g/L、至少 1.8 g/L、至少 2 g/L、至少 2.2 g/L、至少 2.4 g/L 或至少 2.5 g/L。

【0174】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，在後期饋料分批細胞培養之至少一部分期間，細胞培養使活細胞計數維持於至少約 10 至 50 M 個細胞/毫升。

【0175】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，使細胞在補充天冬醯胺之細胞培養條件下維持至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天，或持續早期及/或後期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0176】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係每日或連續提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次持續早期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0177】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係每日或連續提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次持續後期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0178】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物連續地提供至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天或持續早期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0179】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物連續地提供至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天或持續後期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0180】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係在饋料分批細胞培養之第 5 天或其之後開始連續地提供，且其後持續後期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0181】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，連續的天冬醯胺補充物係在細胞培養之饋料分批的第 10 天時或第 10 天之後停止。

【0182】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物在早期及/或後期饋料分批細胞培養中係連續地提供。

【0183】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係作為連續散裝饋料之部分提供。

【0184】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係作為分別的連續天冬醯胺補充物饋料之部分提供。

【0185】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，與早期及/或後期饋料分批細胞培養中以大劑量饋料形式提供天冬醯胺補充之類似方法相比，天冬醯胺、天冬胺酸及麩胺酸之細胞培養中的胺基酸耗乏延遲至少 1 天、至少 2 天、至少 3 天或至少 4 天或更長時間。

【0186】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，真核細胞為哺乳動物細胞。

【0187】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，真核細胞為 CHO 細胞。

【0188】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，真核細胞為高天冬醯胺消耗細胞株，以使得細胞消耗至少約 1.8

毫莫耳/天至約 9.3 毫莫耳/天之天冬醯胺。

【0189】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，真核細胞為低天冬醯胺消耗細胞株，以使得細胞消耗至少約 0.32 毫莫耳/天至約 1.8 毫莫耳/天之天冬醯胺。

【0190】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，真核細胞為高產細胞株，以使得以至少 4 g/L、至少 5 g/L、至少 6 g/L、至少 7 g/L、至少 8 g/L、至少 9 g/L 或至少 10 g/L、至少 11 g/L、至少 12 g/L、至少 13 g/L、至少 14 g/L 之產率產生所關注重組蛋白質。

【0191】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，所關注重組蛋白質為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。

【0192】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，所關注重組蛋白質包括 Fc 域。

【0193】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，所關注重組蛋白質係選自由以下組成之群組：Fc 融合蛋白質、受體-Fc 融合蛋白質（TRAP）、抗體、抗體片段及 ScFv-Fc 融合蛋白。

【0194】 在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，所關注重組蛋白質係選自由以下組成之群組：抗 PD1 抗體、抗 PDL-1 抗體、抗 Dll4 抗體、抗 ANG2 抗體、抗 AngPt13 抗體、抗 PDGFR 抗體、抗 Erb3 抗體、抗 PRLR 抗體、抗 TNF 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 PCSK9 抗體、抗 GDF8 抗體、抗 GCGR 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、抗 IL4R 抗體、抗 IL6R 抗體、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗

體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗 RSV 抗體、抗 NGF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗 CD48 抗體、抗 CD3/抗 CD20 雙特異性抗體、抗 CD3/抗 MUC16 雙特異性抗體及抗 CD3/抗 PSMA 雙特異性抗體。

【0195】在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，所關注重組蛋白質係選自由以下組成之群組：抗流感病毒抗體、抗呼吸道融合病毒（RSV）抗體、抗中東呼吸道症候群（MERS）病毒、抗伊波拉病毒抗體、抗茲卡病毒抗體、抗重度急性呼吸道症候群（SARS）抗體及抗 COVID-19 抗體。

【0196】在用於培養真核細胞以改良本揭露之細胞培養效能之方法的某些實施例中，所關注重組蛋白質係選自至少一種阿利庫單抗、賽瑞單抗、法神單抗、內斯瓦庫單抗、度匹魯單抗、特里沃單抗、恩維納單抗、瑞努庫單抗、卡瑞單抗（casirivimab）或依德單抗（imdevimab）。

【0197】在其他實施例中，本揭露係關於用於防止由細胞培養中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異的方法，該方法包括：使哺乳動物細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；其中成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 43.2 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 21.6 mM 之量的天冬醯胺；及在足以表現所關注多肽之條件下，於早期饋料分批細胞培養及後期饋料分批細胞培養之至少一部分，使該等細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持；其中在至少早期饋料分批細胞培養期間，在細胞培養基中使胞外天冬醯胺含量維持高於約 0.1 mM 之耗乏極限，使得由哺乳動物細胞表現之所關注多肽在所有個別 SV 基因座處包括小於 0.30% 之天冬醯胺序列變異。

【0198】在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，在細胞培養的第 12 天

之後，由哺乳動物細胞表現之所關注多肽在所有個別 SV 基因座處包括小於 0.30% 之天冬醯胺序列變異。

【0199】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物在早期及/或後期饋料分批細胞培養中係作為散裝饋料之部分或作為單獨天冬醯胺補充物饋料提供。

【0200】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物在早期及/或後期饋料分批細胞培養中係連續地或以大劑量形式提供。

【0201】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 7.2 mM 至約 21.6 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 10.8 mM 之量的天冬醯胺。

【0202】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，使細胞在補充天冬醯胺之細胞培養條件下維持至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天，或持續早期及/或後期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0203】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係每日或連續提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次持續早期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0204】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係每日或連續提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次、至少五次持續後期

饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0205】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物連續地提供至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天，或持續早期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0206】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物連續地提供至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天，或持續後期饋料分批細胞培養之持續時間。

【0207】 在本揭露之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係在饋料分批細胞培養之第 5 天或其之後開始連續地提供，且其後持續後期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【0208】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，連續天冬醯胺補充物係在細胞培養之饋料分批的第 10 天或第 10 天之後停止。

【0209】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物在早期及/或後期饋料分批細胞培養中係連續地提供。

【0210】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係作為連續散裝饋料之部分提供。

【0211】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺補充物係作為分別的連續天冬醯胺補充物饋料之部分提供。

【0212】 在用於防止由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺序列變異為在所關注多肽之轉譯期間絲胺酸替代天冬醯胺之錯誤併入。

【0213】 在其他實施例中，本揭露係關於用於偵測由細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異的方法，該方法包括：使哺乳動物細胞在成分確定之細胞培養基中繁殖或維持；由真核細胞表現所關注重組蛋白質；量測細胞培養物或成分確定之細胞培養基中之天冬醯胺或一種或多種天冬醯胺相關胺基酸的胞內及/或胞外濃度；及使天冬醯胺或一種或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與所表現之所關注多肽中的天冬醯胺序列變異之存在相關聯。

【0214】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，天冬醯胺或一種或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與天冬醯胺序列變異之存在反相關。

【0215】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，成分確定之細胞培養基補充在早期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 43.2 mM 之量且在後期饋料分批細胞培養期間呈約 3.6 mM 至約 21.6 mM 之量的天冬醯胺；及於早期饋料分批細胞培養及後期饋料分批細胞培養之至少一部分，使細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持。

【0216】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，一種或多種天冬醯胺相關胺基酸係選自天冬胺酸 (Asp)、麩胺酸 (Glu)、麩醯胺 (Gln) 及其組合。

【0217】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，一種或多種天冬醯胺

相關胺基酸為麩胺酸（Glu）

【0218】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，一種或多種天冬醯胺相關胺基酸可在後期饋料分批細胞培養期間進行量測。

【0219】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，一種或多種天冬醯胺相關胺基酸可在細胞培養之第 5 天之後、第 6 天之後、第 7 天之後、第 8 天之後、第 9 天之後或第 10 天之後進行量測。

【0220】 在用於偵測由本揭露之細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之方法的某些實施例中，一種或多種天冬醯胺相關胺基酸係在胞內量測。

【0221】 在本揭露之方法的某些實施例中，一種或多種天冬醯胺相關胺基酸係在胞外量測。

【0222】 在其他實施例中，本揭露係關於用於監測及控制一個或多個細胞培養參數之方法，該方法包括：使用凝固點下降、電化學、數位成像、測光術、生物處理分析儀或拉曼光譜法中之一者或多者原位量測細胞培養中之一個或多個細胞培養參數；將所量測之一個或多個細胞培養參數與細胞培養參數之預定設定點值進行比較以確定一個或多個細胞培養參數是否在預定臨限範圍內；及若確定細胞培養參數在預定臨限範圍之外，則調整細胞培養參數中之一者或多者。

【0223】 在用於監測及控制本揭露之一個或多個細胞培養參數之方法的某些實施例中，一個或多個細胞培養參數係選自由以下組成之群組：細胞生長速率、細胞密度、細胞生存力、天冬醯胺濃度、天冬醯胺相關胺基酸濃度、鉍離子濃度及丙胺酸濃度。

【0224】 在用於監測及控制本揭露之一個或多個細胞培養參數之方法的某些實施例中，一個或多個細胞培養參數係選自天冬醯胺濃度及銨離子濃度。

【0225】 在用於監測及控制本揭露之一個或多個細胞培養參數之方法的某些實施例中，若確定銨離子濃度在預定臨限範圍之外，則調整天冬醯胺饋料輸入。

【0226】 本揭露之範疇不限於本文中所描述之特定實施例，該等特定實施例意欲作為本發明之個別態樣或實施例的說明。在功能上等效的方法及組分在本發明之範疇內。根據前述描述及隨附圖式，除本文中所描述的修改以外，本發明之各種修改對本領域中熟習此項技術者顯而易見。此類修改屬於本發明之範疇內。

【0227】 貫穿本揭露所提及之所有公開案以全文引用的方式併入本文中。

實例

【0228】 以下實例僅出於說明性目的而提供，且不意欲限制本發明之範疇。

【0229】 饋料分批方法

【0230】 如本文中所描述，經由自動化 AMBR250 24 路並行生物反應器系統來執行饋料分批饋料研發。AMBR250 高產量工作站提供對 24 個一次性生物反應器之一體式並行控制。更特定言之，AMBR250（24 路）為由 24 個生物反應器組成之完全一體式高產量系統，該等生物反應器各自在藉由並行細胞培養製程之全自動化控制下具有最大 250 ml 工作體積。提供對各生物反應器容器之個別持續控制及監測，包含溫度、葉輪速度、pH 及溶解氧（DO）、廢氣分析。系統提供全自動化培養基填充、接種、取樣及饋料。系統使用具有葉輪、噴霧器或頂空充氣、pH 及 DO 探針以及至多四個饋料管線之生物反應器。

【0231】 在執行本揭露之饋料策略研發時，AMBR250 生物反應器

第 57 頁，共 68 頁(發明說明書)

(Sartorius Stedim) 以至多 250 mL 之工作體積進行操作。使用專屬化學成分確定之基礎及饋料培養基。饋料培養基及饋料策略在細胞株間有所不同。每日饋入葡萄糖，且基於目標來控制含量。生物反應器接種有細胞培養。在研究期間，藉由控制來維持氧氣，且經由噴霧器以變化流動速率添加純氧。類似地，藉由針對較高 pH 帶使用 CO₂ 噴霧進行控制來維持 pH，其中無受控低帶 pH。接種細胞密度、溶解氧、溫度、pH 及死帶保持恆定。空氣及氧氣之攪動及流動速率視規模而變化。

【0232】 除非另外指示，否則在所有實例中利用較高天冬醯胺消耗 CHO 細胞株 1，從而表現例示性多肽 A。

【0233】 胞外胺基酸量測

【0234】 如本文中所描述，可量測胺基酸之胞外含量。在某些實施例中，根據以下程序來量測此類含量。使用 Waters AccQ•Tag 方法及 Waters AccQ•Tag 反應劑套組（馬薩諸塞州米爾福德的沃特世（Waters, Milford, MA））來衍生及製備所耗費細胞培養基樣本。在衍生之前，將樣本稀釋 10×，且外加 100 mg/L 肌胺酸內部標準（馬薩諸塞州伯靈頓（Burlington, MA）的 Millipore Sigma）。衍生胺基酸之分離及連續量測使用裝備有 AccQ•Tag Ultra C18 管柱（1.7 μ M, 2.1×10 mm）之 UPLC 來執行，在 260 nm 波長下收集資料。移動相及梯度遵循 Waters AccQ•Tag 方法。

【0235】 胞內胺基酸量測

【0236】 如本文中所描述，可量測胺基酸之胞內含量。在某些實施例中，根據以下程序來量測此類含量。自生物反應器收集細胞，且在室溫下進行離心，將上清液與細胞沈澱分離。將細胞沈澱用 1×PBS 洗滌，離心。移除 PBS，且用液氮低溫淬滅細胞沈澱。將研究樣本外加穩定標記的內部標準，萃取且使用有機溶劑進行蛋白質沈澱。在離心之後，將上清液之等分試樣稀釋且注射至裝備

有 C18 反相 UHPLC 管柱之 Agilent 1290/AB Sciex QTrap 5500 LC-MS/MS 系統上。質譜儀在正模式下使用電噴霧電離 (ESI) 進行操作。針對擬 MRM 模式中之對應內部標準之母離子的峰面積來量測個別分析物母離子之峰面積。使用由緊接在各輪次之前製備之強化校準標準物產生的加權最小平方回歸分析來執行定量。收集 LC-MS/MS 原始資料，且使用 AB SCIEX 軟體 Analyst 1.6.2 進行處理。使用針對 Office 365 v.16 之 Microsoft Excel 執行資料縮減。

【0237】天冬醯胺序列變異分析

【0238】如本文中所描述，可量測所關注多肽之天冬醯胺序列變異。雖然可使用此類序列變異之任何合適的量測方法，但天冬醯胺序列變異之定量可如下測定。對約 50 種可能肽中之三種肽的基於快速及敏感 LC-MS 之檢定可用作篩選工具，以鑑別取代情況且獲得取代程度之定量估計。所關注多肽可使用適當純化方法以小規模純化。所關注多肽隨後可減少且變性，隨後進行酶促消化。以此方式，可產生所關注多肽之胰蛋白酶圖 (tryptic map)，且分析蛋白質序列以確定是否與所預期序列存在任何差異。隨後可進行基於 HPLC 梯度之分離，且可藉由 Q-TOF MS 系統來分析個別肽。可藉由質譜測定來詳細分析特定肽。可分析肽序列之變化。藉助於實例，對於天冬醯胺至絲胺酸取代，觀測到 27 Da 變化。

【0239】實例 1-天冬醯胺對細胞培養之影響及饋料策略研發

【0240】使用例示性 CHO 細胞株及變化的天冬醯胺補充來評估饋料分批細胞培養效能及饋料策略。饋料分批細胞培養效能及饋料策略研發可使用 AMBR250 生物反應器系統及胺基酸量測值來執行，如本文中所描述。

【0241】參考圖 3A 至圖 3C，在某些態樣中，發現早期饋料分批細胞培養物中之遞增天冬醯胺使得細胞生長增加，且在與其他細胞營養物需求保持平衡時並不負面影響培養物生產力。圖 3A 說明具有較低、中等及較高量補充物（範

第 59 頁，共 68 頁(發明說明書)

圍介於例如每饋料約 1.8 mM 至約 5.4 mM 精胺酸) 之一系列早期饋料分批天冬醯胺補充物，但此類天冬醯胺補充物並不防止後期饋料分批天冬醯胺耗乏。**圖 3B** 說明在遞增量之天冬醯胺補充物下的細胞培養物生長增加，而**圖 3C** 說明在遞增天冬醯胺補充物下之細胞培養物效價增加，直到達至由一些必需胺基酸之耗乏產生的平穩期。

【0242】 參考**圖 4A 至圖 4C**，亦發現儘管副產物(諸如銨)形成增加，但後期饋料分批細胞培養物中之遞增天冬醯胺並不顯著影響細胞培養物生產力。更具體而言，**圖 4A** 說明後期饋料中之較低及較高天冬醯胺補充物(範圍介於每饋料約 1.8 mM 至約 7.2 mM)，但此類天冬醯胺補充物並不防止後期饋料分批天冬醯胺耗乏。雖然總細胞培養物生產力不受負面影響(**圖 4C**)，但後期饋料分批細胞培養物中之較高量的天冬醯胺補充物可導致過量副產物形成(**圖 4B**)，此表明可視需要將更多天冬醯胺饋入至細胞培養物中，但仍難以防止耗乏。

【0243】 根據本揭露之實施例，研發出經改良之天冬醯胺補充饋料策略(亦即在早期饋料分批饋料中具有 3×天冬醯胺且在後期饋料分批饋料中具有 1.5×天冬醯胺之「新饋料平台」)，其防止早期饋料分批細胞培養物中之必需胺基酸及天冬醯胺耗乏，且提供整體細胞培養效能之增加。如**圖 5A 至圖 5D** 中所揭示，早期饋料分批天冬醯胺補充防止早期饋料分批天冬醯胺耗乏，且增加細胞培養物生長。此外，如所展示，天冬醯胺相關之細胞培養物生長增加與必需胺基酸耗乏之消除改良細胞培養物生產力，其中高產饋料分批時間延長且產生較高效價。然而，後期饋料分批細胞培養物中之較高天冬醯胺補充仍不可避免後期饋料分批中之天冬醯胺耗乏。參考**圖 5E 至圖 5G**，在另一例示性細胞株中之較高天冬醯胺補充物下，細胞效價、活細胞計數及細胞生存力均得以改良。

【0244】 參考**圖 6A**，在早期饋料分批細胞培養物中補充變化量之天冬醯胺仍會在類似時間處產生耗乏。然而，遞增天冬醯胺補充物量會增加天冬醯胺

消耗速率（參見圖 7），此表明細胞並未有效利用天冬醯胺。參考圖 6B，在後期饋料分批細胞培養物中補充增加之天冬醯胺量並不防止後期饋料分批天冬醯胺耗乏，可導致過量副產物形成，此同樣表明細胞並未有效利用天冬醯胺。

【0245】就此而言，圖 7 說明在針對例示性高消耗細胞株之天冬醯胺饋料策略之範圍內的天冬醯胺消耗速率。如所揭露，與先前已知平台饋料策略相比，本揭露之新平台饋料策略產生在細胞培養之持續時間內消耗更少天冬醯胺的饋料分批細胞培養。此外，如所揭露，與較低天冬醯胺饋料策略相比，較高天冬醯胺饋料策略產生更高天冬醯胺消耗速率。此數據表明，本揭露之新平台饋料策略提供天冬醯胺之最高效利用。

【0246】總之，天冬醯胺經鑑定在高消耗細胞株中耗乏。早期饋料分批細胞培養物之補充影響細胞培養效能。後期饋料分批細胞培養物之補充增加副產物（例如銨）產生。出乎意料地發現，防止必需胺基酸耗乏之平衡天冬醯胺饋料策略解決了早期饋料分批中之天冬醯胺耗乏，且最小化銨影響，從而產生增加的細胞培養物生產力。

【0247】 **實例 2-饋料分批細胞培養物中之天冬醯胺對天冬醯胺相關胺基酸之影響**

【0248】天冬醯胺與經由代謝路徑之天冬醯胺相關的非必需胺基酸之間的相互關係可使用 AMBR250 生物反應器系統及胺基酸量測值來研究，如本文中所描述。

【0249】參考圖 8，若需要天冬醯胺，則細胞可增加其天冬胺酸及麩胺酸之利用率以合成補充天冬醯胺。天冬胺酸、麩胺酸及麩醯胺之較高胞內/胞外濃度可指示細胞具有足以支援細胞需求之胞內天冬醯胺。然而，天冬胺酸、麩胺酸及麩醯胺之濃度的減小可表示天冬醯胺限制。

【0250】參考圖 9A 至圖 9D，說明天冬醯胺含量在例示性高消耗細胞株 1

第 61 頁，共 68 頁(發明說明書)

之後期饋料分批細胞培養物中的影響。如所揭露，較低天冬醯胺影響相關非必需胺基酸之胞內概況（胞內麩胺酸隨較低天冬醯胺而減少）。

【0251】 參考圖 10A 至圖 10D，說明天冬醯胺含量在另一例示性高消耗細胞株 2 之後期饋料分批細胞培養物中的影響。如所揭露，較低天冬醯胺影響相關非必需胺基酸之胞內概況（胞內麩胺酸隨較低天冬醯胺而減少），然而，比針對例示性高消耗細胞株 1 所觀測之程度更低。

【0252】 參考圖 11A 至圖 11D，說明天冬醯胺含量在例示性低消耗細胞株之後期饋料分批細胞培養物中的影響。如所揭露，對於此例示性細胞株，較低天冬醯胺不影響相關非必需胺基酸之胞外或胞內概況（麩胺酸之胞內概況不隨較低天冬醯胺而減少）。如所揭露，在饋料分批循環結束時，存在較高含量之胞內天冬醯胺及麩胺酸。

【0253】 最後，如圖 12A 至圖 12F 中所揭露，較高（3×早期，1.5×後期）及極高（6×早期，3×後期）之影響顯示胞外天冬醯胺之增加可增加天冬醯胺相關胺基酸，但亦可影響效價及鉍含量。如所揭露，較高含量之補充天冬醯胺（圖 12A）可導致天冬醯胺相關胺基酸增加（圖 12B、圖 12D 及圖 12E），但非所要細胞培養副產物（亦即圖 12F，鉍）之所得增加可導致細胞培養效能（亦即圖 12C，效價）降低。

【0254】 圖 9A 至圖 9D、圖 10A 至圖 10D、圖 11A 至圖 11D 及圖 12A 至圖 12F 一同說明針對不同天冬醯胺饋料含量之天冬醯胺相關胺基酸概況及細胞培養效能因細胞株而不同，此表明天冬醯胺饋料需求可以細胞株之特定需求為目標。

【0255】 總之，天冬醯胺相關胺基酸之胞內濃度表明對特定細胞株之特定天冬醯胺要求。更具體而言，天冬醯胺補充對相關胺基酸之胞外及胞內胺基酸概況的影響可以細胞株之特定需求為目標。

【0256】 實例 3-解決天冬醯胺耗乏

【0257】 經最佳化以解決天冬醯胺耗乏同時維持細胞培養效能之改良天冬醯胺饋料策略及平台可使用 AMBR250 生物反應器系統及胺基酸量測值來研發，如本文中所描述。

【0258】 下表 1 說明所研究之例示性天冬醯胺饋料策略。

饋料方法	散裝饋料	Asn 饋料
標準饋料分批（大劑量）	大劑量	大劑量
連續獨立 Asn 饋料	大劑量	連續
連續散裝+Asn 饋料	連續	連續
混合饋料	大劑量	大劑量（1X）+連續（1X）

表 1

【0259】 如表 1 中所揭示，將標準饋料分批大劑量天冬醯胺饋料與若干天冬醯胺饋料策略（亦即連續天冬醯胺補充物饋料（與大劑量細胞培養物散裝饋料分開）、連續組合散裝加天冬醯胺饋料，及利用大劑量天冬醯胺饋料及連續天冬醯胺補充物饋料（與大劑量細胞培養物散裝饋料分開）兩者之混合饋料策略）進行比較，以使得向細胞培養物中提供總天冬醯胺補充物量之兩倍。

【0260】 參考圖 13A 至圖 13D，發現對於相同的總天冬醯胺補充物量，大劑量及連續天冬醯胺饋料具有相當的細胞培養效能（說明於圖 13A 中之活細胞計數，說明於圖 13B 中之培養物生產力）。此外，細胞培養副產物形成（圖 13C 說明銨形成，圖 13D 說明丙胺酸形成）在大劑量及連續天冬醯胺饋料中相對恆定。然而，參考圖 13E 至圖 13G，與具有相同的總天冬醯胺補充物量之大劑量天冬醯胺補充物饋料相比，連續天冬醯胺補充物饋料延遲胞外天冬醯胺（圖 13E）、天冬胺酸（圖 13F）及麩胺酸（圖 13G）耗乏。根據本揭露之態樣，出乎意料地發現，當連續饋料時，相同的總天冬醯胺補充物量會降低天冬醯胺、天冬胺酸及麩胺酸之消耗速率。就此而言，具有相當細胞培養效能之改良胺基

酸耗乏概況表明細胞培養之更高效的天冬醯胺消耗。

【0261】 參考圖 14A 至圖 14D，發現與經由連續散裝饋料及標準推注補充之連續天冬醯胺補充相比，經由連續獨立的天冬醯胺饋料（與大劑量散裝饋料分開）之天冬醯胺補充針對相同的總天冬醯胺補充物量並不防止胞外天冬醯胺耗乏（圖 14A），但的確減少細胞培養副產物形成（圖 14D），且調節天冬醯胺相關代謝物之消耗速率（圖 14B 及圖 14C）。全部所說明的饋料策略具有相當的細胞培養效能。

【0262】 發現與大劑量天冬醯胺補充相比，混合饋料方法（連續天冬醯胺補充物饋料與大劑量天冬醯胺補充物饋料組合）延遲胺基酸耗乏，但增加多種例示性細胞株中之副產物形成。

【0263】 參考圖 15A 至圖 15G，在第一例示性細胞株中，發現混合饋料方法延遲天冬醯胺及相關代謝物耗乏（圖 15A 說明胞外天冬醯胺，圖 15B 說明胞外天冬胺酸，且圖 15C 說明胞外麩胺酸），且產生相當的細胞培養效能（說明於圖 15D 中之活細胞計數、說明於圖 15E 中之培養物高產），但亦發現混合饋料方法增加副產物形成（圖 15F 說明銨形成，圖 15G 說明丙胺酸形成）。

【0264】 參考圖 16A 至圖 16E，在第二例示性細胞株中，發現混合饋料方法延遲天冬醯胺（圖 16A 說明胞外天冬醯胺），但導致細胞培養物生產力減小（說明於圖 16B 中之活細胞計數、說明於圖 16C 中之培養物高產）。亦發現混合饋料方法增加副產物形成（圖 16D 說明銨形成，圖 16E 說明丙胺酸形成）。

【0265】 總之，藉由鑑別新天冬醯胺補充物饋料策略來解決在後期饋料分批中胞外天冬醯胺耗乏之影響。出乎意料地發現，連續天冬醯胺補充為用於饋入天冬醯胺之更高效平台。連續天冬醯胺補充，尤其作為獨立性單獨天冬醯胺饋料降低天冬醯胺及相關代謝物之消耗速率。

【0266】 實例 4-減少及控制饋料分批細胞培養物中之天冬醯胺序列變異

以及天冬醯胺相關胺基酸作為天冬醯胺序列變異之替代標誌物的用途

【0267】 天冬醯胺補充物減少天冬醯胺序列變異之用途及天冬醯胺相關胺基酸作為所關注多肽中之天冬醯胺序列變異之替代標誌物的用途可使用 AMBR250 生物反應器系統及胺基酸量測值來研究，如本文中所描述。

【0268】 返回參考圖 10A 至圖 10D，其說明天冬醯胺含量在例示性高消耗細胞株 2 之後期饋料分批細胞培養物中的影響，在饋料分批細胞培養之最後一天藉由質譜分析天冬醯胺序列變異。發現補充較低天冬醯胺之細胞培養物存在有 0.30% 的天冬醯胺序列變異，且發現補充較高天冬醯胺之細胞培養物存在有 0.24% 的天冬醯胺序列變異。此等 SV 值相對低，且與在細胞培養物中觀測到之較高含量的胞內麩胺酸一致，如圖 10D 中所說明。

【0269】 類似地，參考圖 11A 至圖 11D，其說明天冬醯胺含量在例示性低消耗細胞株之後期饋料分批細胞培養物中的影響，在饋料分批細胞培養之最後一天藉由質譜分析天冬醯胺序列變異。發現補充較低天冬醯胺之細胞培養物存在有 0.11% 的天冬醯胺序列變異，且發現補充較高天冬醯胺之細胞培養物存在有 0.04% 的天冬醯胺序列變異。同樣，此等 SV 值相對較低，且與在細胞培養物中觀測到之較高含量的胞內麩胺酸一致，如圖 11D 中所說明。

【0270】 參考圖 17A 至圖 17B，已發現早期饋料分批中之胞外天冬醯胺耗乏可為 Asn→Ser 天冬醯胺序列變異形成之指標。如圖 17A 中所揭露，使胞外天冬醯胺含量維持高於 0.1 mM (15 mg/L) 之耗乏極限直至早期細胞培養之至少第 4 天(例如經由饋料 2)的較高天冬醯胺饋料策略(在 10.8 mM 下之 3×早期，1.5×後期)能夠將天冬醯胺序列變異之形成減少至低於約 0.20% SV 之水平(圖 17B)。

【0271】 參考圖 18A，已發現後期饋料中之較低天冬醯胺含量增加 Asn→Ser 天冬醯胺序列變異，尤其在峰值活細胞濃度之後。在圖 18A 中所描繪之實驗中，早期饋料中之天冬醯胺含量相同。圖 18B 說明較高天冬醯胺後期饋

料策略與較低天冬醯胺後期饋料策略相比之的胞內麩胺酸（Glu）含量。此外，出乎意料地發現，將 Gln 添加至細胞培養基中進一步減少天冬醯胺序列變異之形成（圖 18C）。

【0272】如所揭示，胞內麩胺酸濃度與天冬醯胺序列變異之存在呈反相關。在天冬醯胺序列變異之出現率較低的細胞培養物中發現較高胞內麩胺酸含量，且在天冬醯胺序列變異之出現率較高的細胞培養物中發現較低胞內麩胺酸含量。以此方式，胞內麩胺酸可用作所關注多肽中之天冬醯胺序列變異量的替代標誌物。

【0273】圖 19A 至圖 19G 說明例示性細胞株 1 之天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸及天冬醯胺序列變異之間的相關性。圖 19B 至圖 19D 說明胞外天冬醯胺（圖 19B）、天冬胺酸（圖 19C）及麩胺酸（圖 19D），而圖 19E 至圖 19G 說明例示性胞內天冬醯胺（圖 19E）、天冬胺酸（圖 19F）及麩胺酸（圖 19G）。圖 19G 說明後期饋料分批胞內麩胺酸（Glu）可充當使用圖 19A 之較高及較低天冬醯胺饋料策略產生的多肽之天冬醯胺序列變異的替代標誌物。如所揭露，較高天冬醯胺補充物饋料產生較高後期饋料分批胞內麩胺酸及較低天冬醯胺序列變異。較低天冬醯胺補充物饋料產生較低後期胞內麩胺酸及較高天冬醯胺序列變異。替代胞內麩胺酸量測值與質譜天冬醯胺序列變異分析一致。然而，對於此特定細胞株，關於胞外或胞內天冬醯胺或天冬胺酸或胞外麩胺酸無明顯趨勢。

【0274】圖 20A 至圖 20D 說明另一例示性細胞株（高消耗細胞株）之天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸及天冬醯胺序列變異之間的類似相關性。圖 20B 至圖 20D 說明胞外天冬醯胺（圖 20B）、胞內天冬胺酸（圖 20C）及胞內麩胺酸（圖 20D）。圖 20C 及圖 20D 說明後期饋料分批胞內天冬胺酸及胞內麩胺酸皆可充當使用圖 20A 之較高及較低天冬醯胺饋料策略產生的多肽之天冬醯胺序列變異的替代標誌物。如所揭露，較高天冬醯胺補充物饋料產生較高後期饋料分批

胞內天冬胺酸及較高後期饋料分批胞內麩胺酸以及較低天冬醯胺序列變異。較低天冬醯胺補充物饋料產生較低後期饋料分批胞內天冬胺酸及較低後期饋料分批胞內麩胺酸以及較高天冬醯胺序列變異。替代胞內天冬胺酸及胞內麩胺酸量測值與質譜天冬醯胺序列變異分析一致。

【0275】圖 21A 至圖 21F 說明例示性細胞株 1 之天冬醯胺序列變異趨勢與胞內麩胺酸趨勢一致，此顯示胞內天冬醯胺相關胺基酸可用作天冬醯胺序列變異之替代物。圖 21A 及圖 21C 說明較高天冬醯胺早期饋料策略（圖 21A，如藉由質譜所測定之序列變異量；圖 21C，胞內麩胺酸之濃度）。圖 21B 及圖 21D 說明較低天冬醯胺早期饋料策略（圖 21B，如藉由質譜所測定之序列變異量；圖 21D，胞內麩胺酸之濃度）。圖 21E 揭示與天冬醯胺序列變異之較高出現率及較低出現率關聯的例示性細胞株 4 之胞內麩胺酸含量，其中圖 21F 揭示另一例示性細胞株 5 之類似胞內麩胺酸概況。

【0276】圖 22A 至圖 22H 說明例示性細胞株之天冬醯胺、天冬醯胺相關胺基酸及天冬醯胺序列變異之間的關聯性。圖 22A 至圖 22D 說明較高及較低天冬醯胺饋料策略之例示性細胞株 1 的胞外天冬醯胺（圖 22A）、胞外天冬胺酸（圖 22B）、胞外麩胺酸（圖 22C）及胞外麩醯胺（圖 22D）。如所揭露，針對胞外天冬醯胺、天冬胺酸或麩胺酸及天冬醯胺序列變異形成未觀測到明顯趨勢。然而，在後期饋料分批胞外麩醯胺與天冬醯胺序列變異形成之間存在關聯（尤其假設天冬醯胺之補充高於早期饋料分批細胞培養物中之耗乏極限）。針對例示性細胞株 4 之類似趨勢揭示於圖 22E 至圖 22H 中，其說明較高及較低天冬醯胺饋料策略之胞外天冬醯胺（圖 22E）、胞外天冬胺酸（圖 22F）、胞外麩胺酸（圖 22G）及胞外麩醯胺（圖 22H）。

【0277】圖 23A 至圖 23C 進一步說明胞外麩醯胺可充當後期饋料分批細胞培養物中之天冬醯胺序列變異的替代物。圖 23A 揭示可經由例示性細胞株 1 中

之較高天冬醯胺饋料策略產生充足麩醯胺（例如高於麩醯胺耗乏極限）。類似地，**圖 23B** 揭示可經由例示性細胞株 1 中之較高天冬醯胺饋料策略產生充足麩醯胺，此與其中藉由質譜未偵測到天冬醯胺序列變異之實施例相關聯。且最後，**圖 23C** 揭示當未在第 6 天及第 8 天補充天冬醯胺時，偵測到天冬醯胺序列變異，且胞外麩醯胺下降至低於耗乏極限（亦即經由天冬醯胺饋料策略產生不充足的麩醯胺）。然而，當經由較高天冬醯胺饋料策略產生充足麩醯胺時，胞外麩醯胺與天冬醯胺序列變異形成相關聯。

【0278】 本說明書中所引用之所有公開案及專利申請案以引用的方式併入本文中，就如同各個別公開案或專利申請案特定地且個別地經指示以引用之方式併入一般。

【0279】 雖然已參考例示性實施例描述本發明，但本領域中熟習此項技術者將理解，在不脫離本發明之範疇的情況下，可作出各種變化，且等效物可取代其元件。另外，可在不脫離其基本範疇之情況下作出諸多修改以使特定情形或材料適應於教示內容。因此，不希望本發明限於作為經審慎考慮用於實現本發明之最佳模式而揭示的特定實施例，但本發明將包含屬於所附申請專利範圍之範疇內的所有實施例。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種偵測由細胞培養物中之哺乳動物細胞表現的所關注重組蛋白之天冬醯胺序列變異的方法，該方法包括：

- (a) 使哺乳動物細胞在細胞培養基中繁殖或維持；
- (b) 於該哺乳動物細胞表現所關注重組蛋白；
- (c) 測量細胞培養物或細胞培養基中天冬醯胺濃度或一或多種天冬醯胺相關胺基酸；以及
- (d) 使天冬醯胺或一或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與所表現之所關注重組蛋白中的天冬醯胺序列變異之存在相關聯。

【請求項2】 如請求項1之方法，其中天冬醯胺或一或多種天冬醯胺相關胺基酸之所量測濃度與天冬醯胺序列變異之存在反相關。

【請求項3】 如請求項1之方法，其中該細胞培養基在早期饋料分批細胞培養期間補充3.6 mM至43.2 mM之量的天冬醯胺且在後期饋料分批細胞培養期間補充3.6 mM至21.6 mM之量的天冬醯胺，其中早期饋料分批細胞培養期間補充之天冬醯胺量大於後期饋料分批細胞培養期間補充之天冬醯胺量，以及細胞在該補充天冬醯胺之細胞培養基中維持於早期饋料分批細胞培養及後期饋料分批細胞培養之至少一部分。

【請求項4】 如請求項3之方法，其中該補充於早期饋料分批細胞培養期間之第1天或更晚開始。

【請求項5】 如請求項3之方法，其中該補充係以約2天之間隔執行。

【請求項6】 如請求項1之方法，其中該一或多種天冬醯胺相關胺基酸係選自天冬胺酸、麩胺酸、麩醯胺、及其組合。

【請求項7】 如請求項6之方法，其中該一或多天冬醯胺相關胺基酸係麩胺酸。

【請求項8】 如請求項1之方法，其中天冬醯胺或該一或多種天冬醯胺相關胺基酸係於後期饋料分批細胞培養期間測量。

【請求項9】 如請求項1之方法，其中天冬醯胺或該一或多種天冬醯胺相關胺基酸係於細胞培養後5天、後6天、後7天、後8天、後9天、或後10天測量。

【請求項10】 如請求項1之方法，其中天冬醯胺或該一或多種天冬醯胺相關胺基酸係於胞內測量。

【請求項11】 如請求項1之方法，其中天冬醯胺或該一或多種天冬醯胺相關胺基酸係於胞外測量。

【請求項12】 如請求項1之方法，其中所述細胞係CHO細胞、BHK細胞、HEK293細胞、或其變異體。

【請求項13】 如請求項1之方法，其中所述重組蛋白係抗體、單株抗體、單特異性抗體、雙特異性抗體、抗體片段、抗體-藥物接合物、融合蛋白、抗體衍生蛋白、治療蛋白、或其變異體。

【請求項14】 如請求項11之方法，其中所述測量包含收集細胞培養基、衍生所述胺基酸、及使用液態層析法分離和量化所述衍生胺基酸。

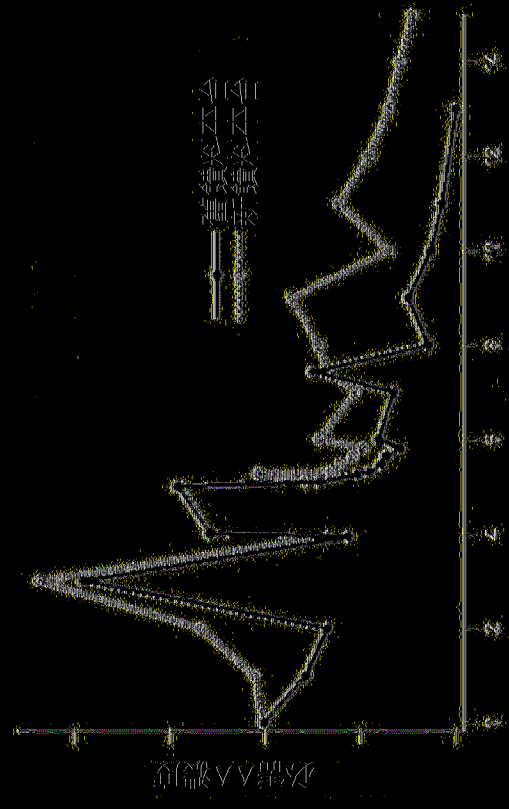
【請求項15】 如請求項11之方法，其中所述衍生包含將所述胺基酸接觸6-胺喹啉基-N-羥琥珀醯亞胺基胺基碳酸鹽(6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)。

【請求項16】 如請求項14之方法，其中所述液態層析法包含使用C18管柱的高效液態層析法。

【請求項17】 如請求項14之方法，其中所述量化包含螢光偵測或紫外光偵測。

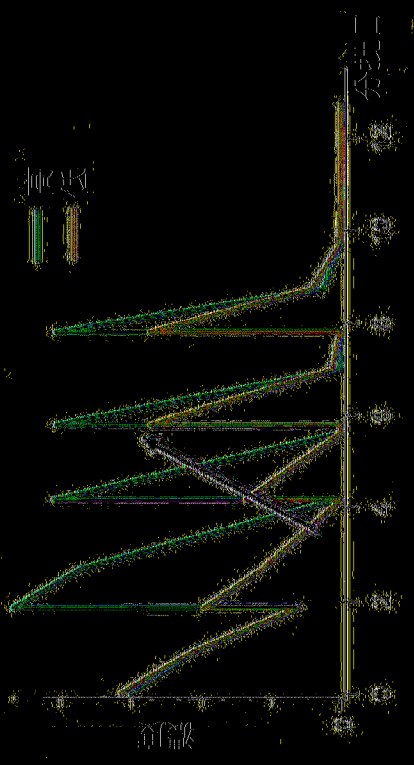
【請求項18】 如請求項1之方法，其中所述天冬醯胺序列變異係使用液態層析法-質譜分析鑑別。

必需波基線濃度

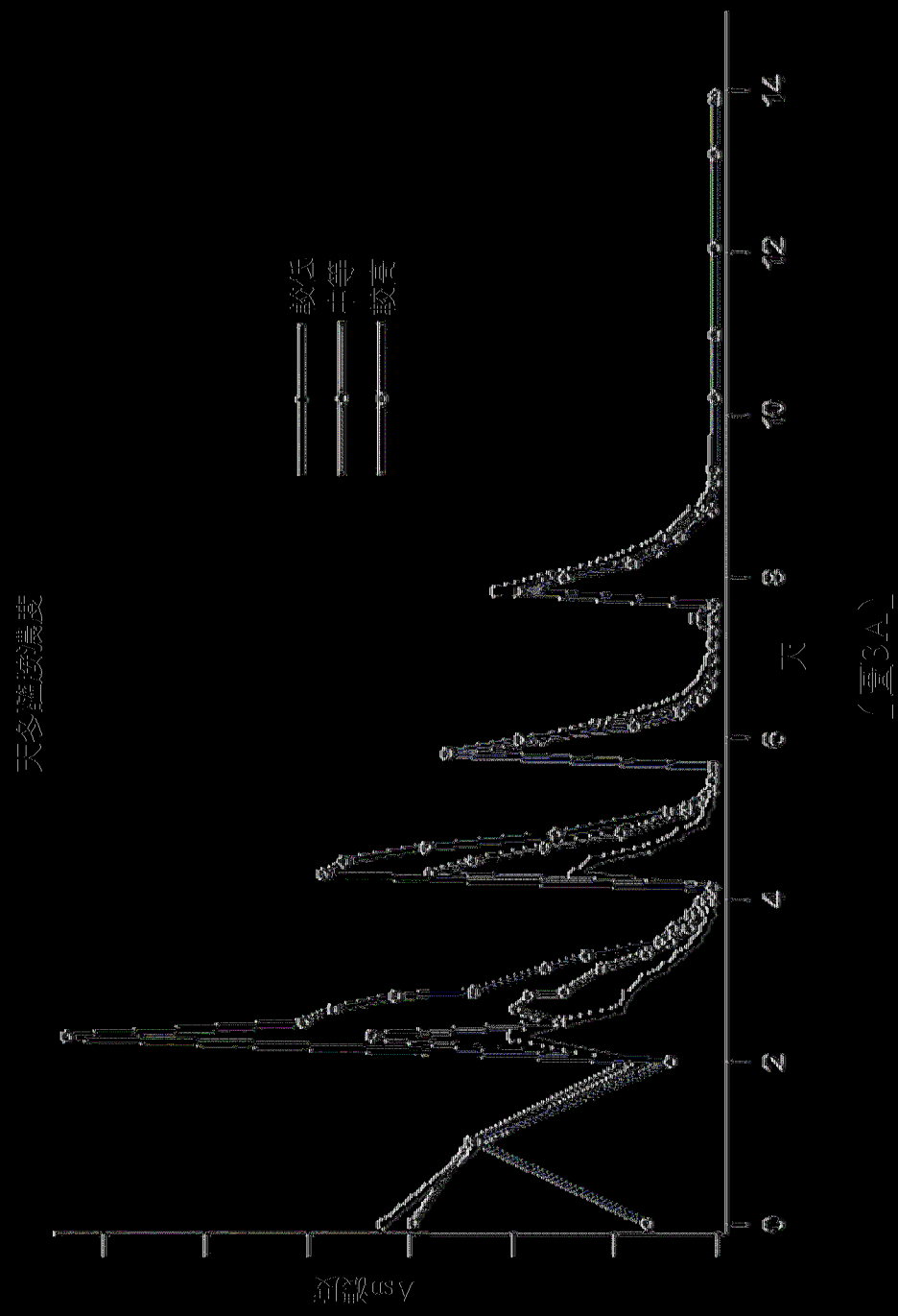


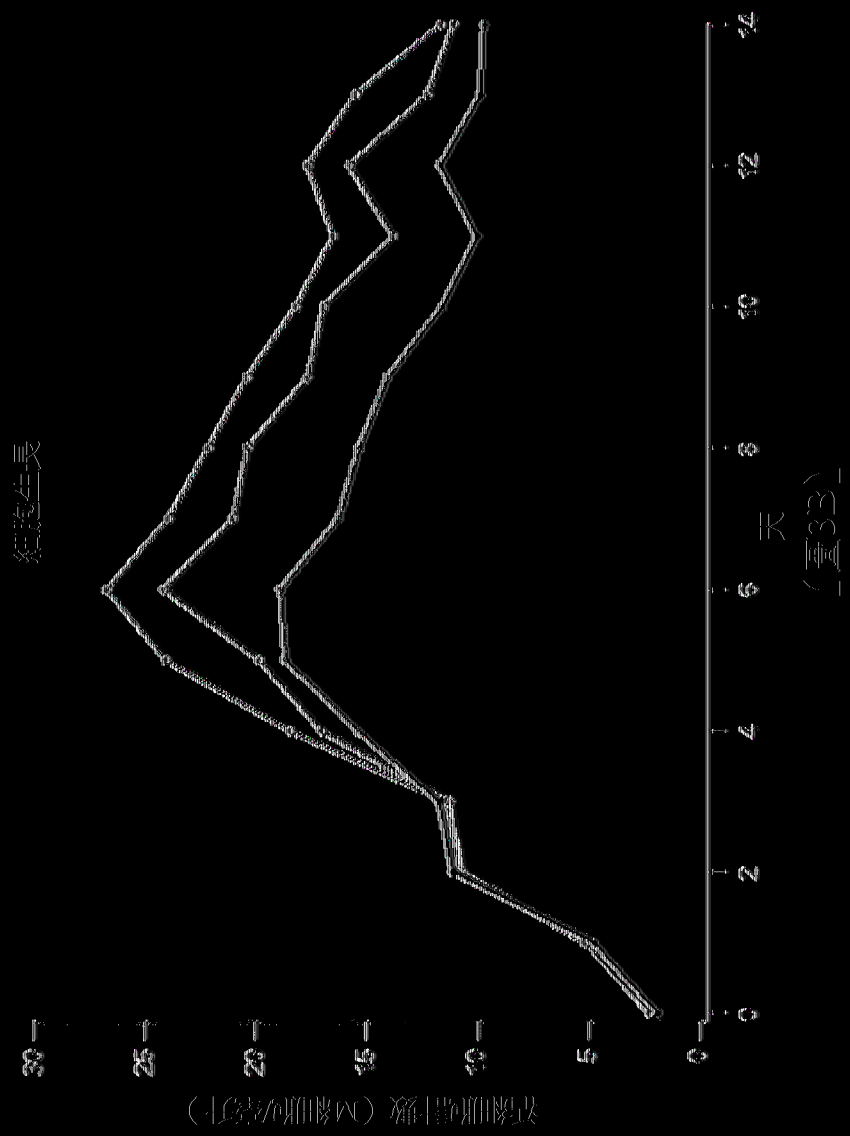
(圖2A)

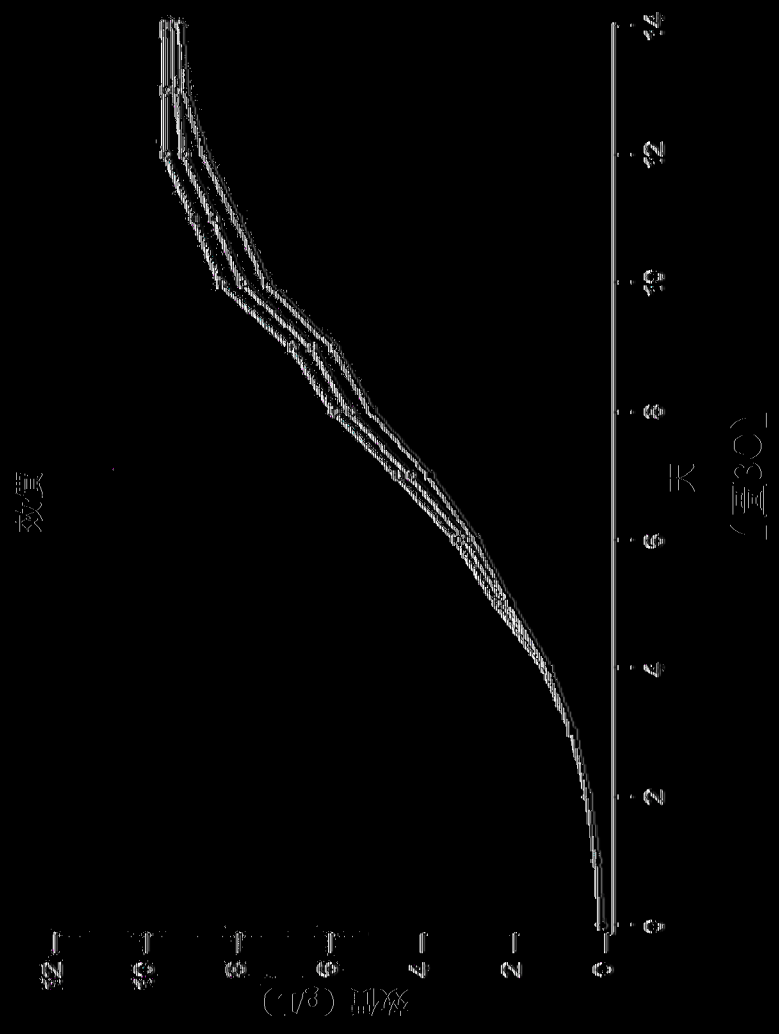
左鑽孔分選期夏之天冬溫度濃沉

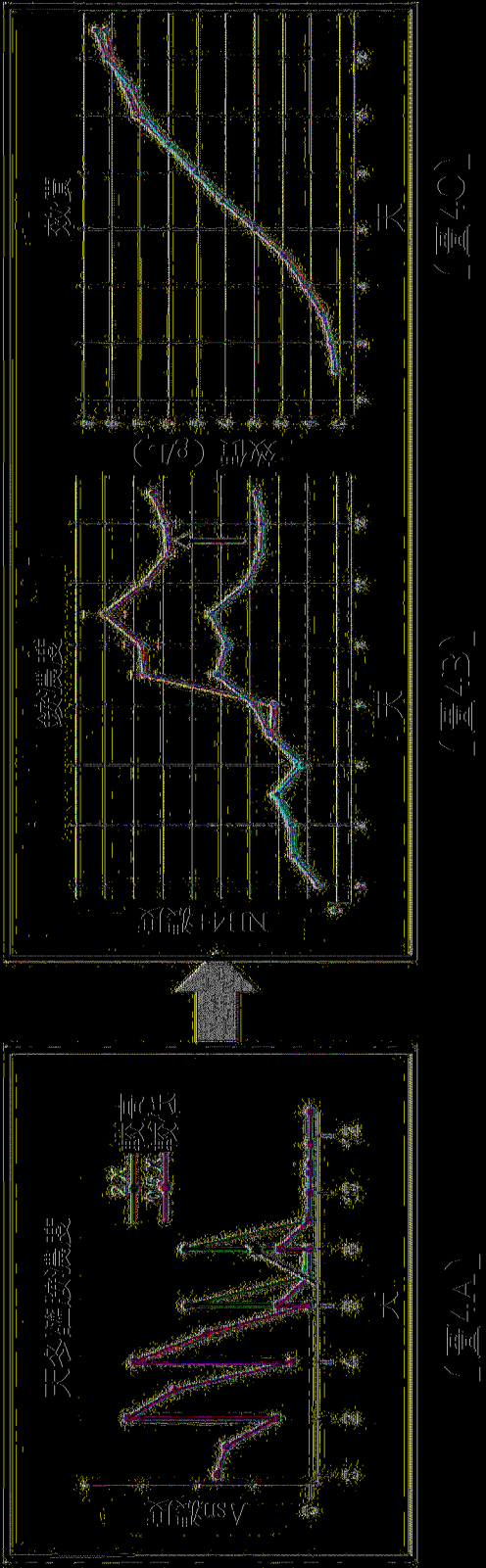


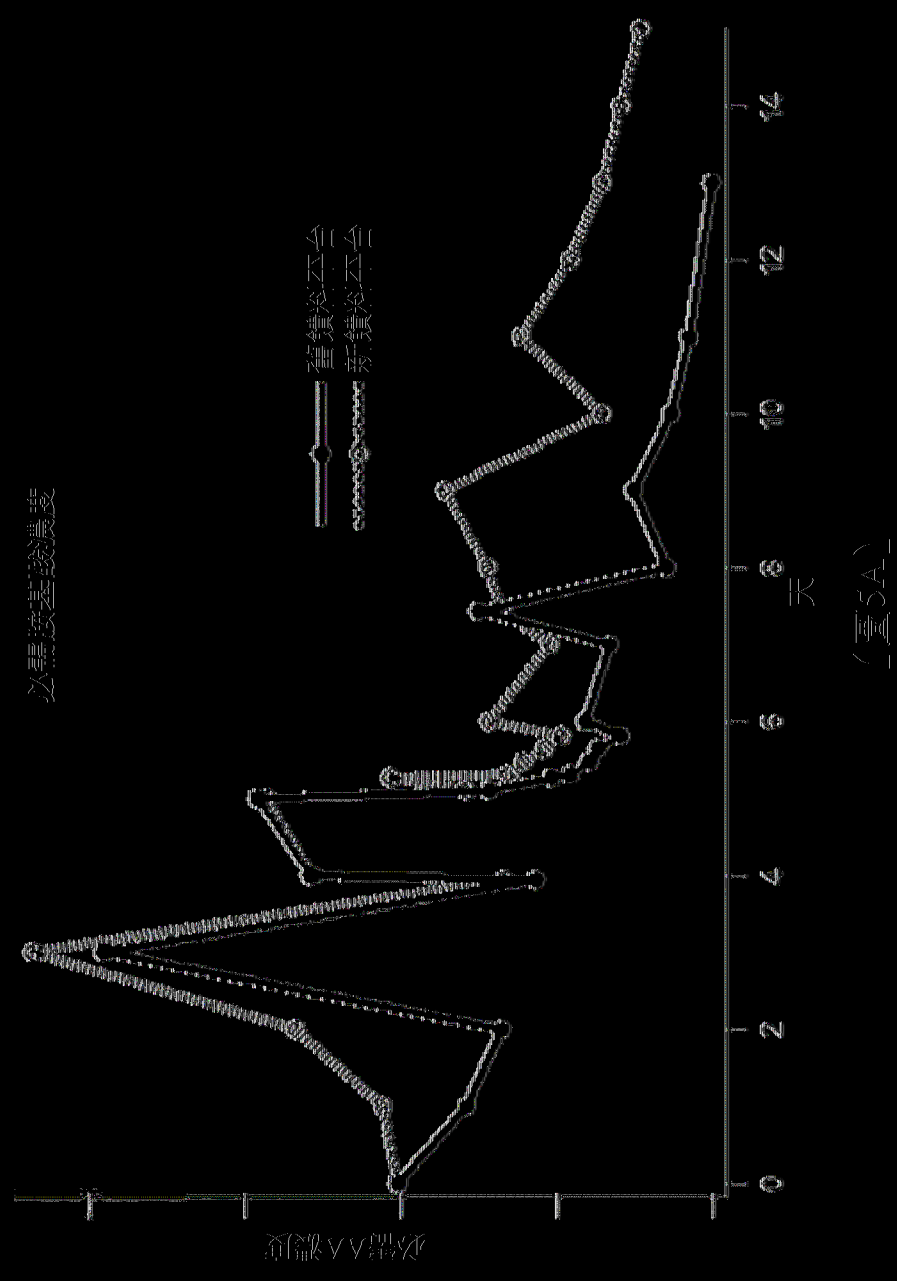
(圖2B)

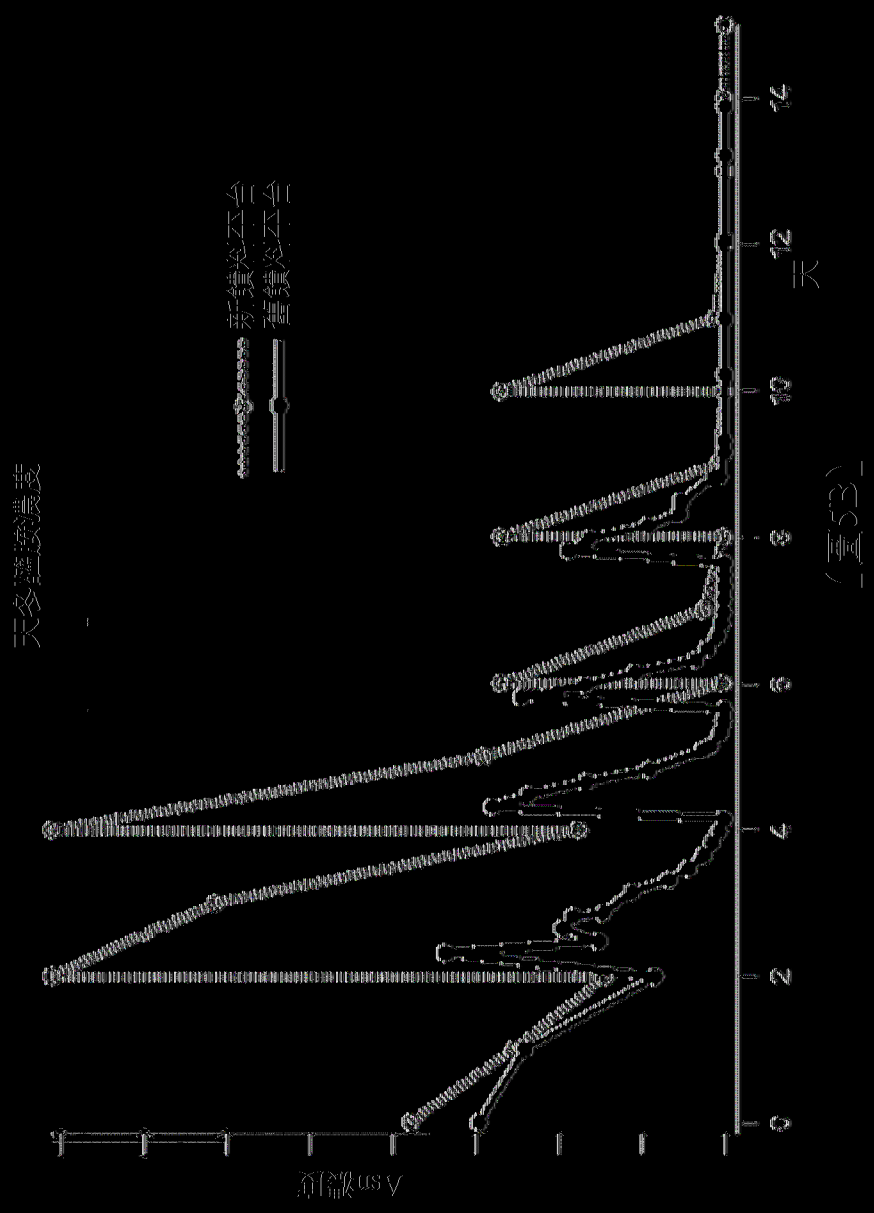


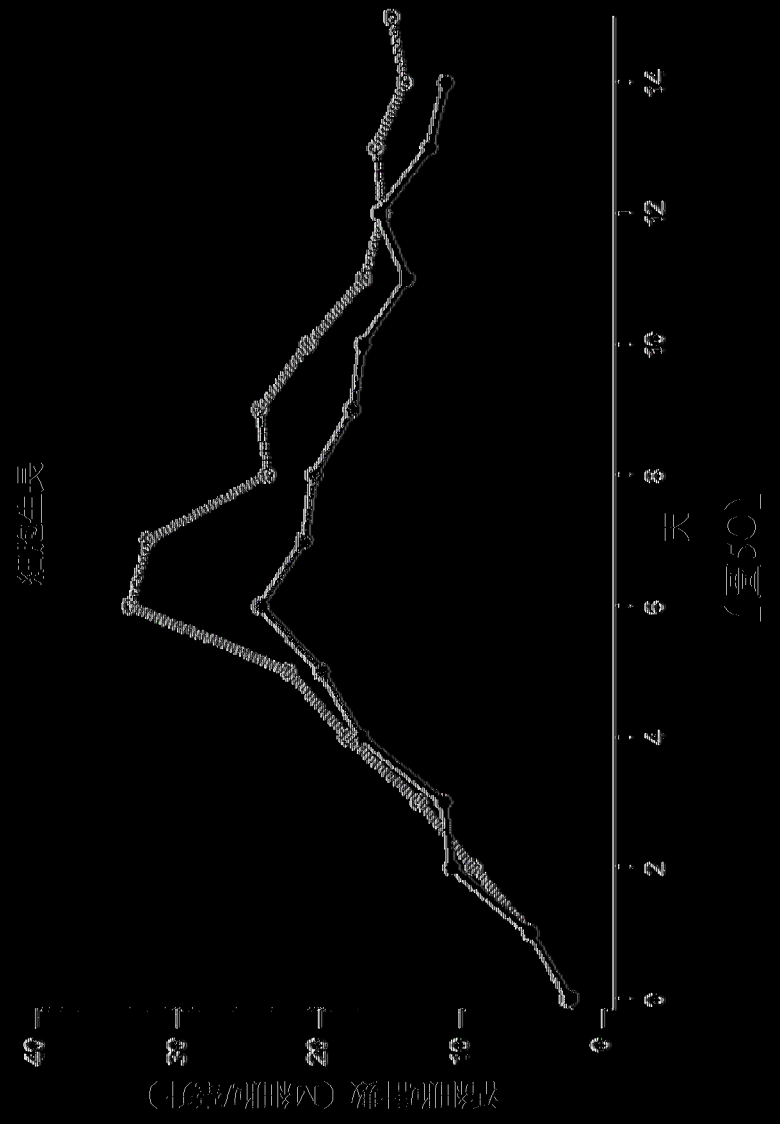


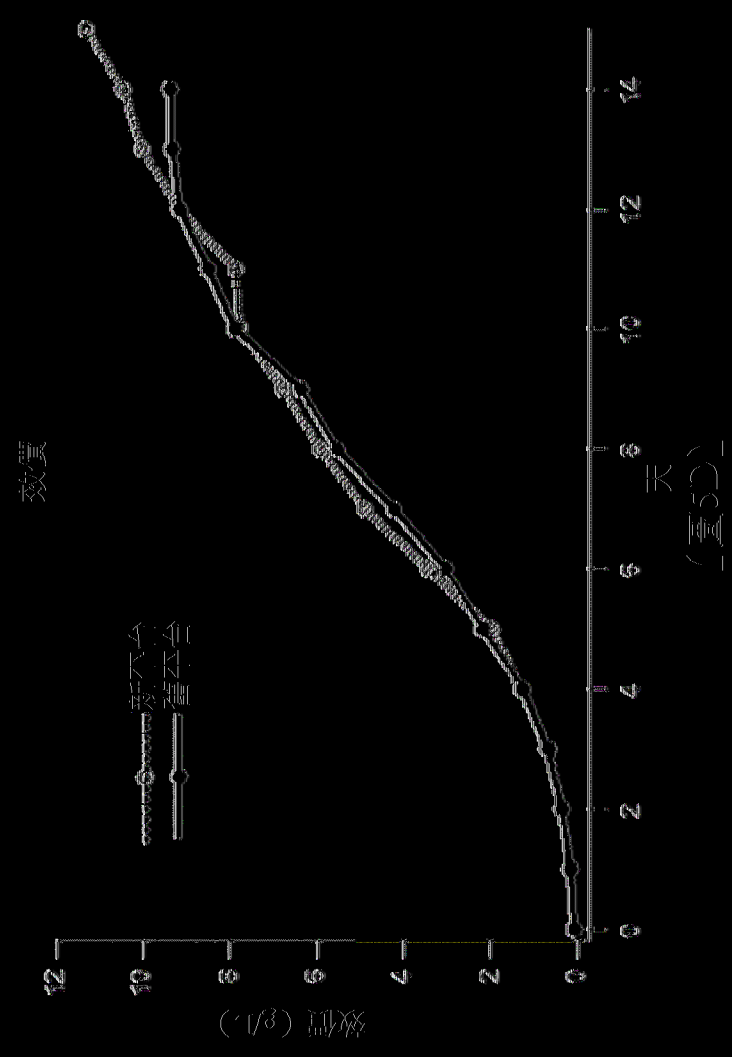


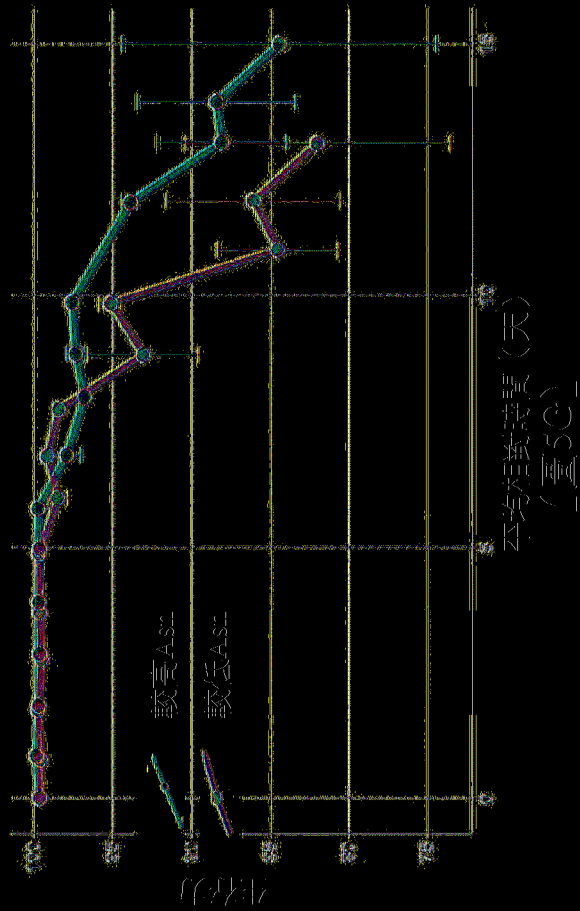
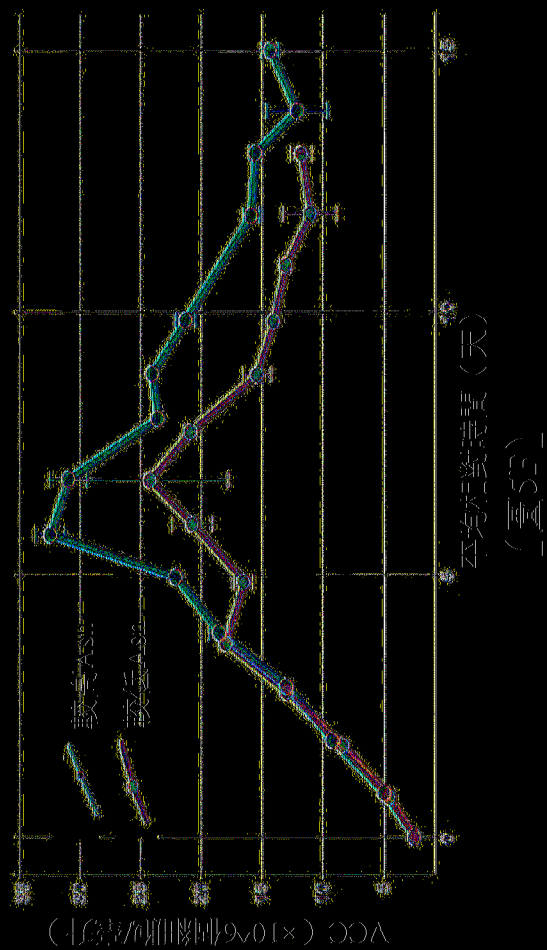


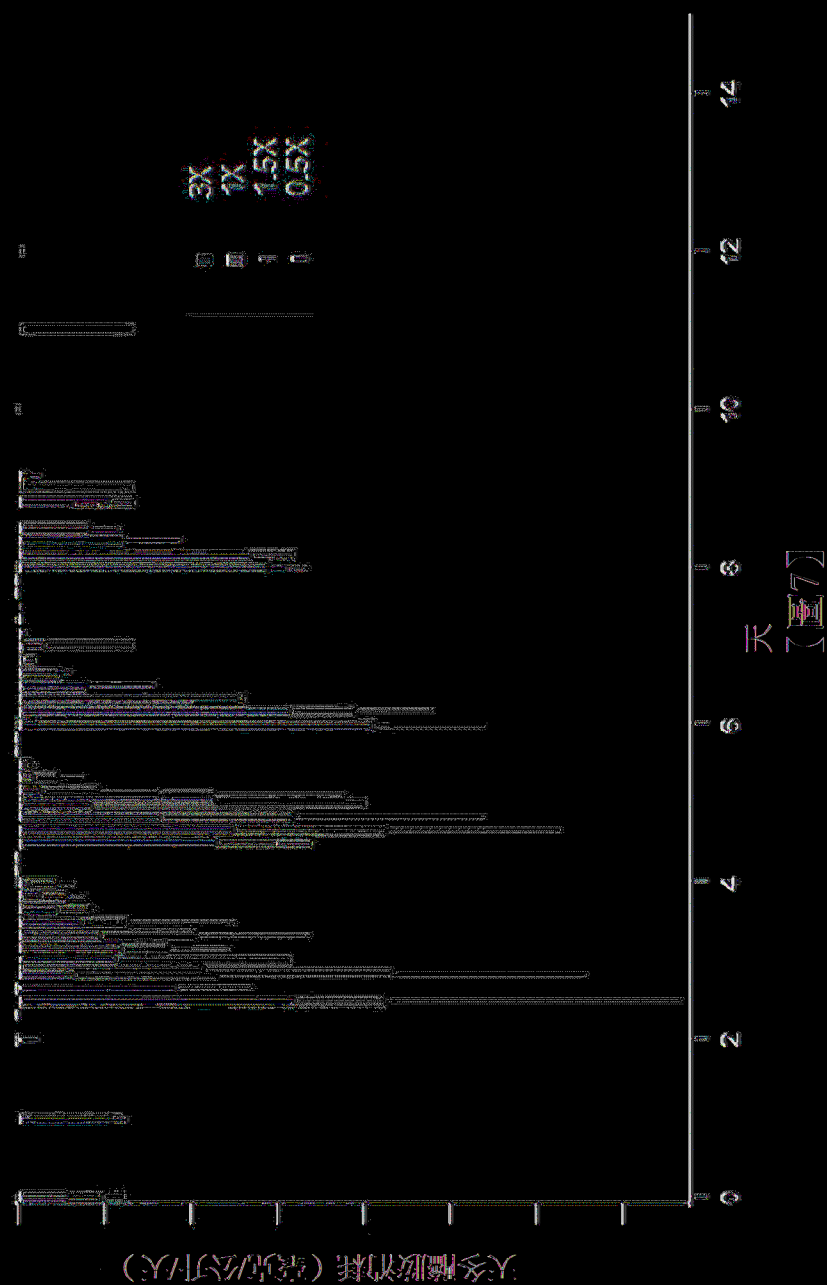


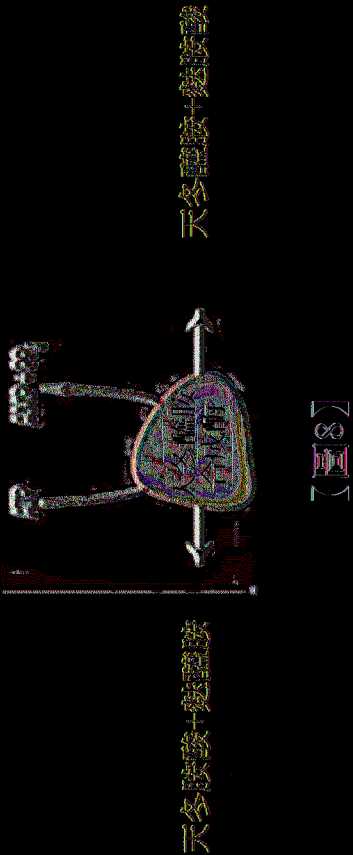


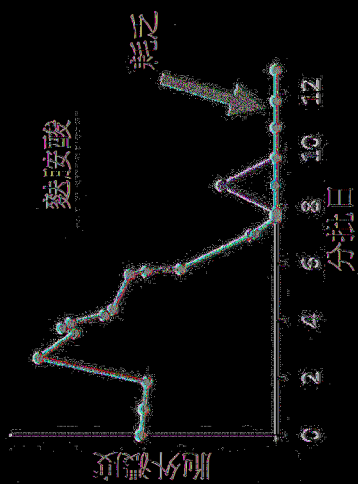




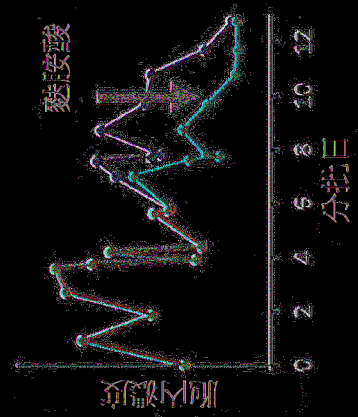




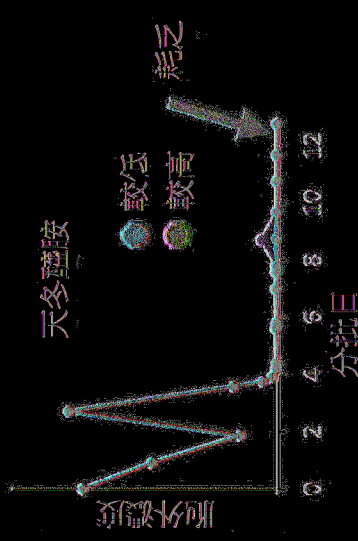




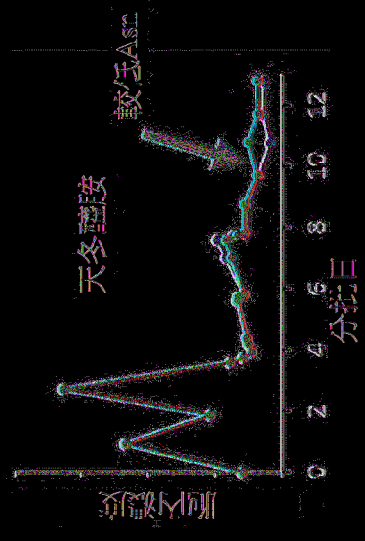
[圖9B]



[圖9C]

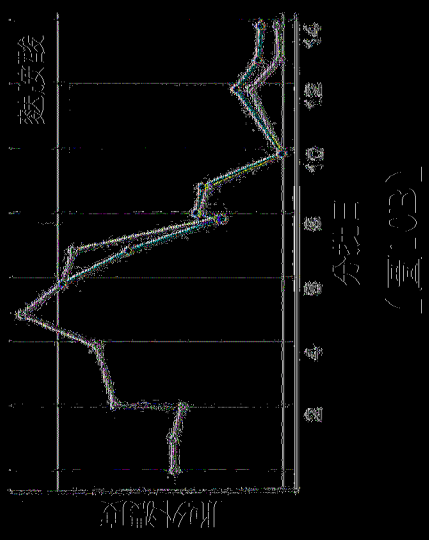
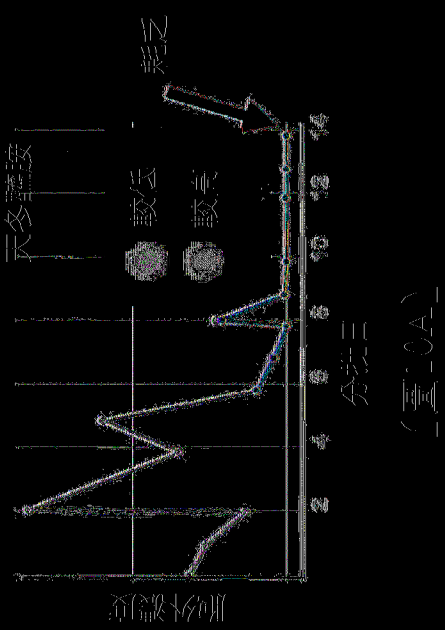


[圖9A]

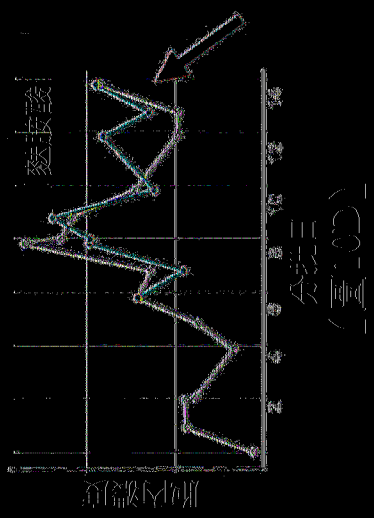
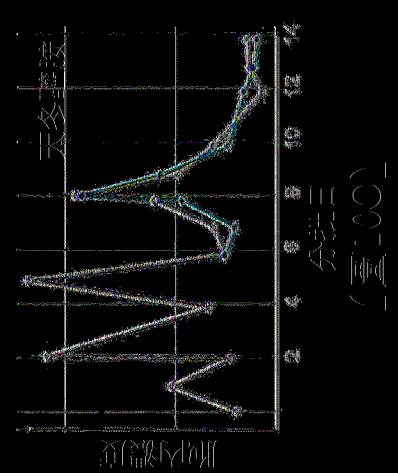


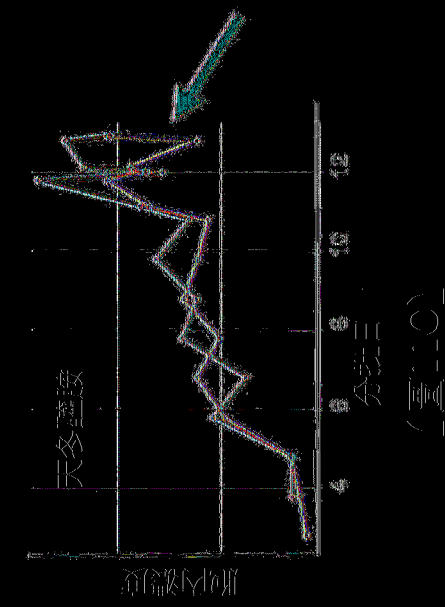
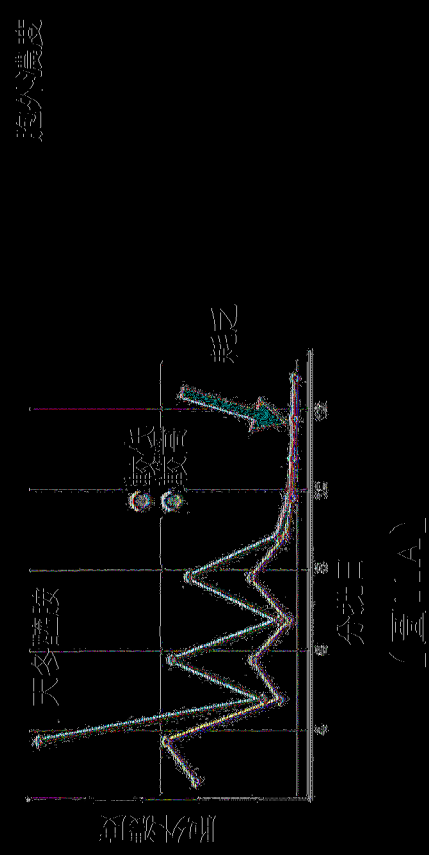
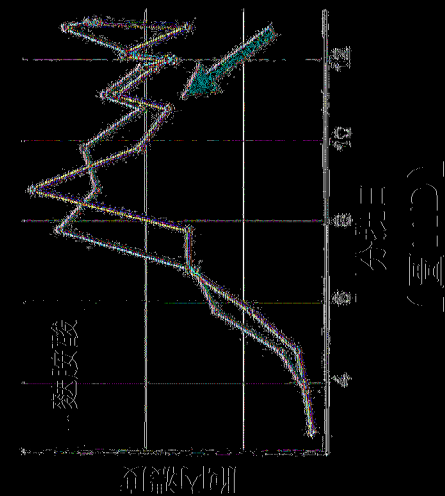
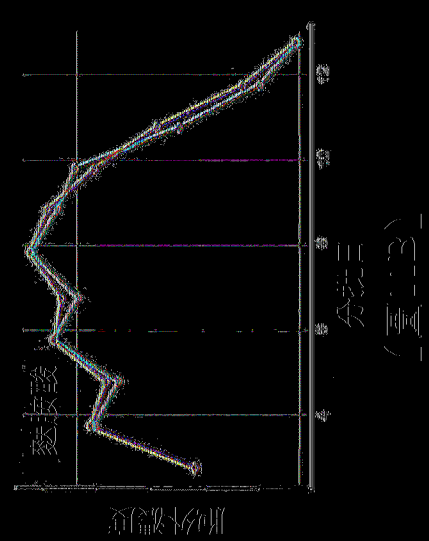
[圖9D]

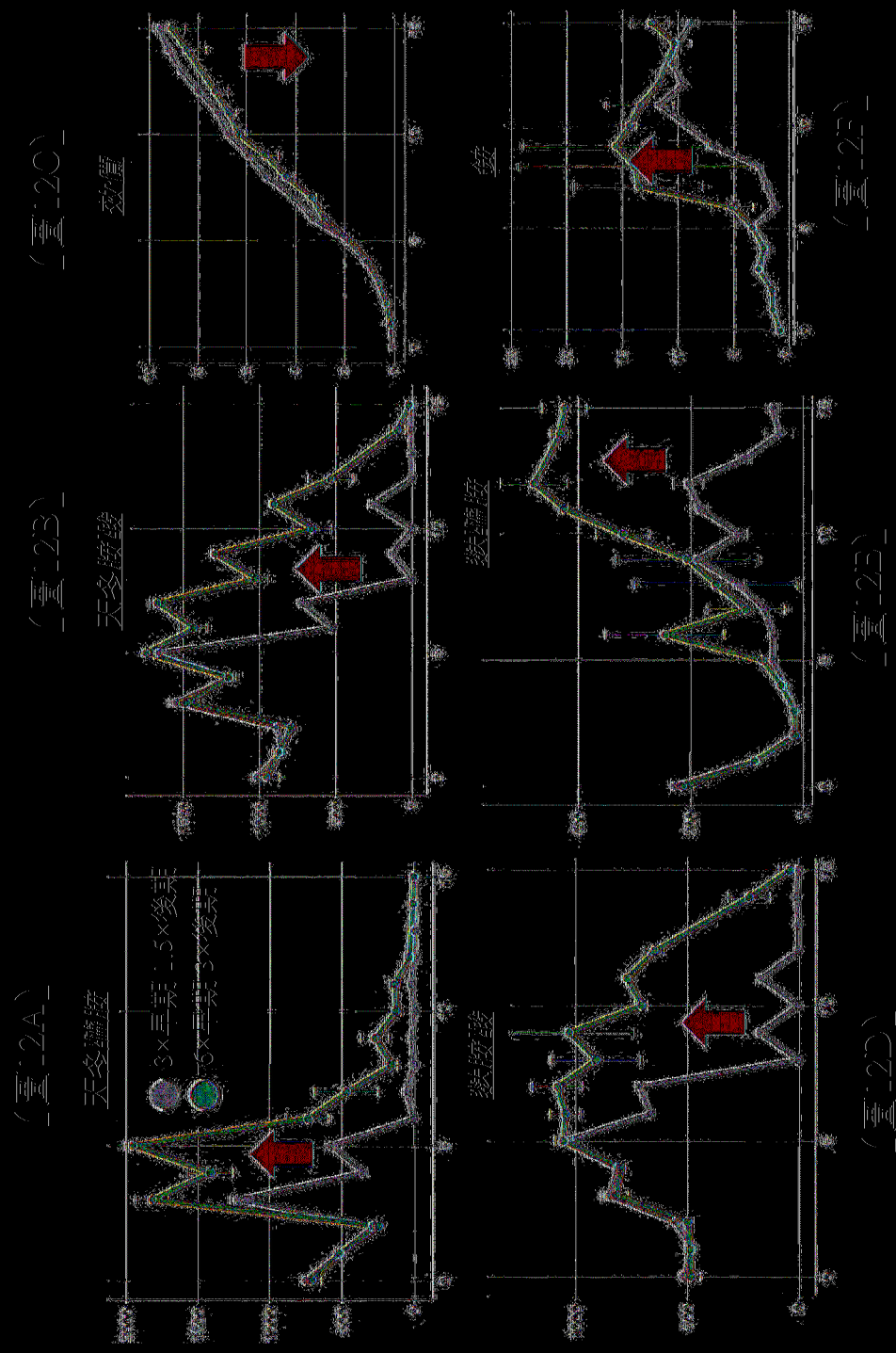
透皮濃度

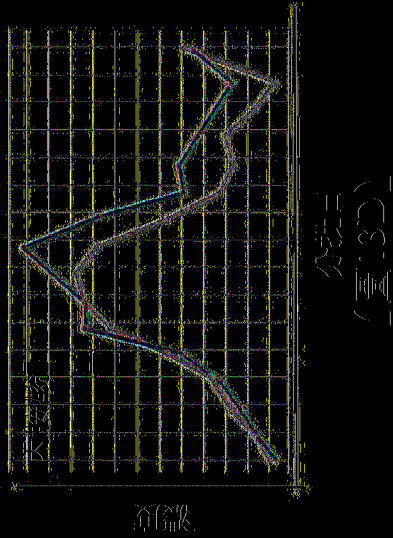
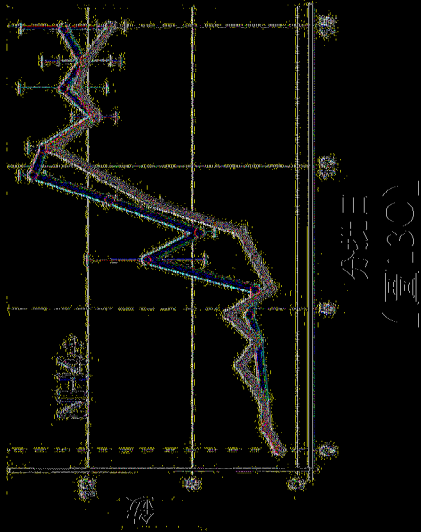
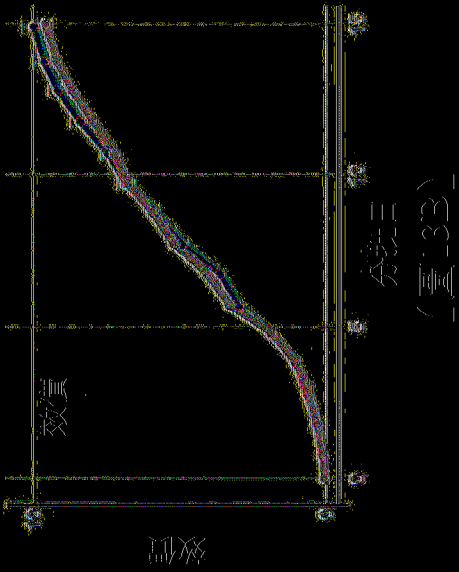
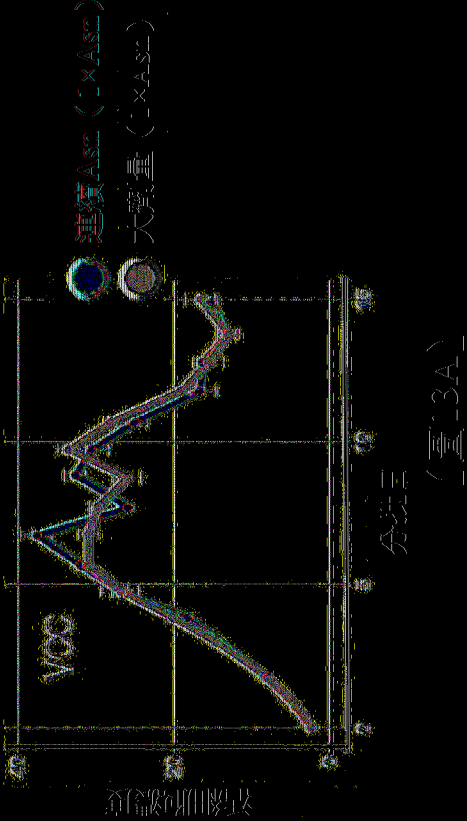


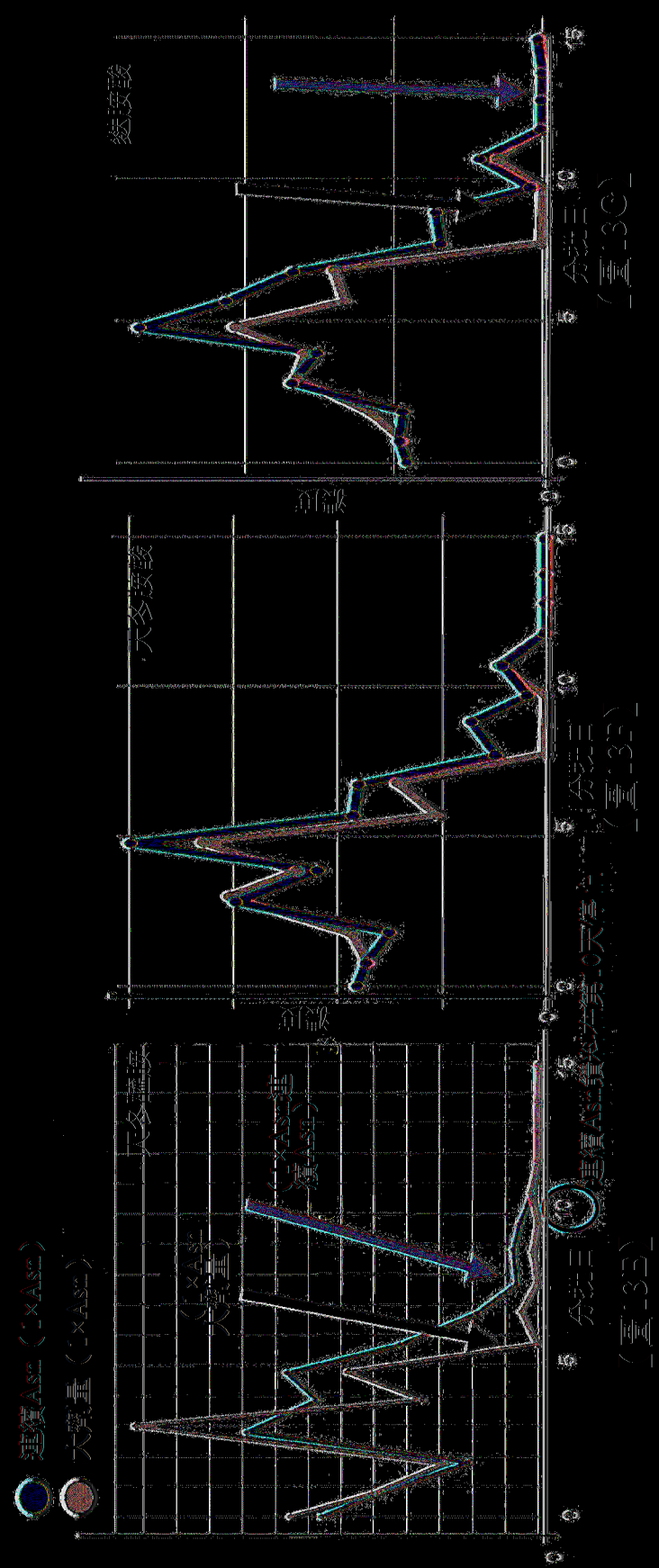
透皮濃度

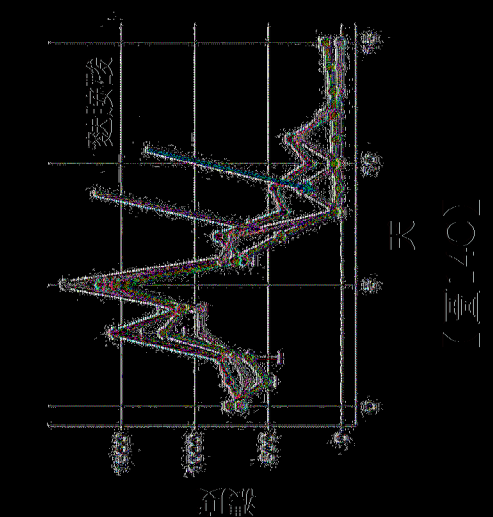
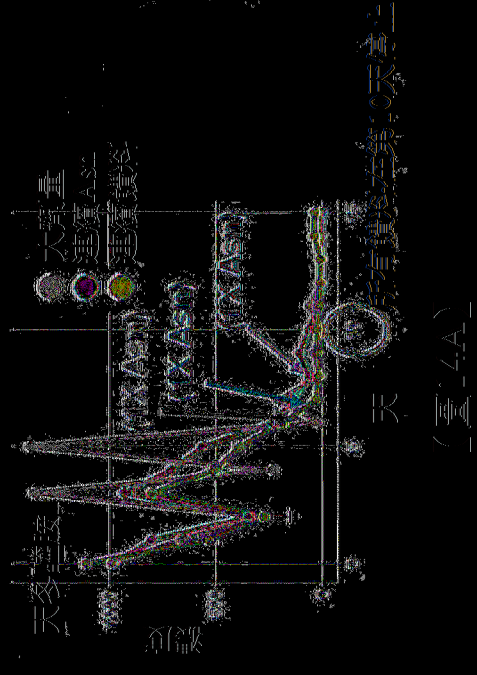
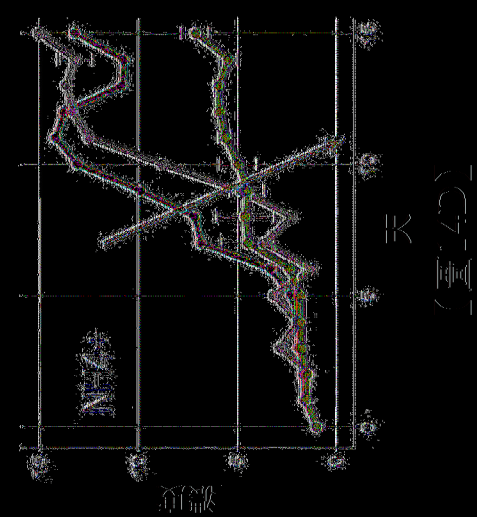
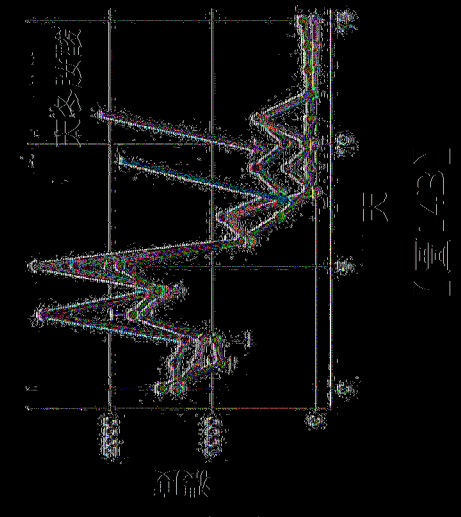


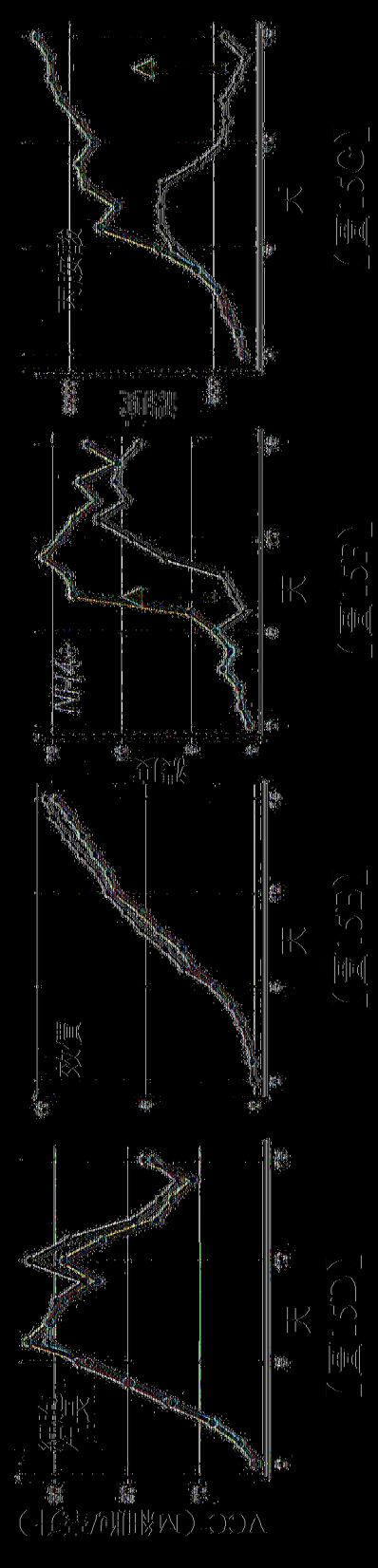
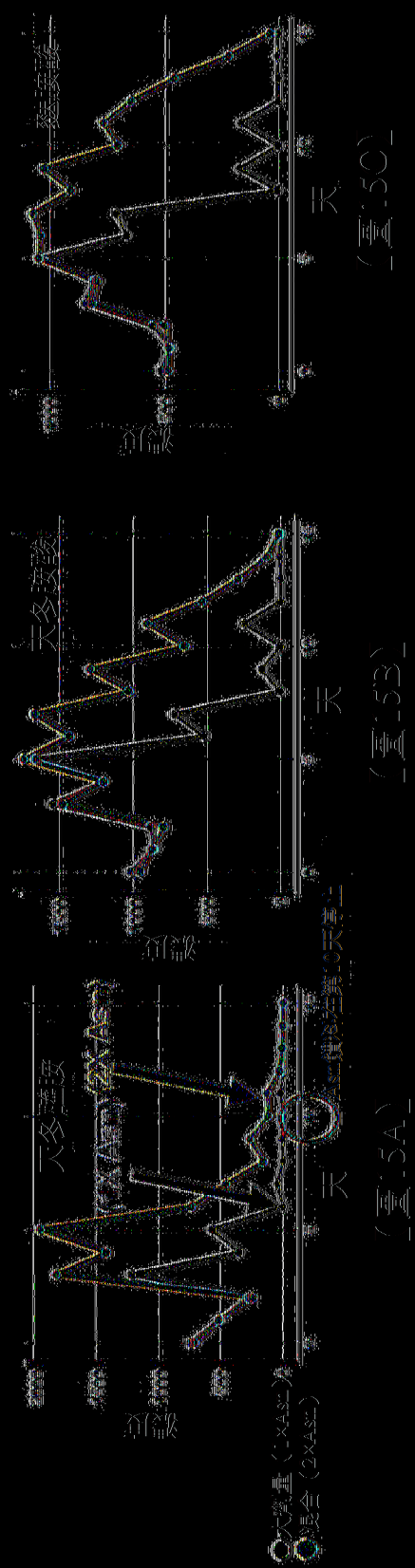


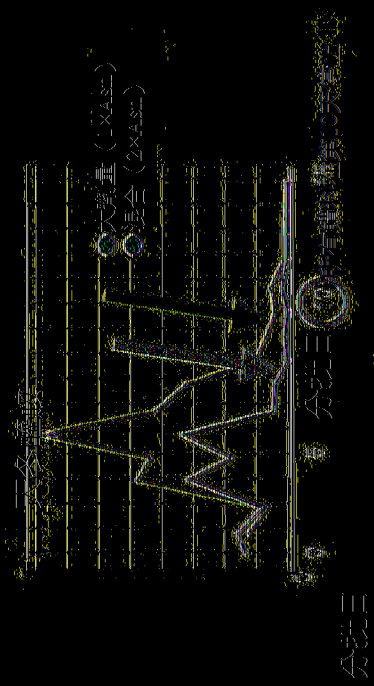












(圖: 6A)



