



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110914293 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 13

(21) 申请号 201880045238.2

(22) 申请日 2018.07.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110914293 A

(43) 申请公布日 2020.03.24

(30) 优先权数据
62/529471 2017.07.06 US
62/625744 2018.02.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/040734 2018.07.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/010191 EN 2019.01.10

(73) 专利权人 里珍纳龙药品有限公司
地址 美国纽约州.塔里敦.旧锯木厂河路
777号

(72) 发明人 J.陈 S.劳伦斯 A.约翰逊
T.罗尼 R.潘古尔 T-C.航
S.卡弗 B.希林

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 罗文锋 黄登高

(51) Int.Cl.
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

(56) 对比文件
US 20160333385 A1, 2016.11.17
US 20160076068 A1, 2016.03.17

审查员 戎晓媛

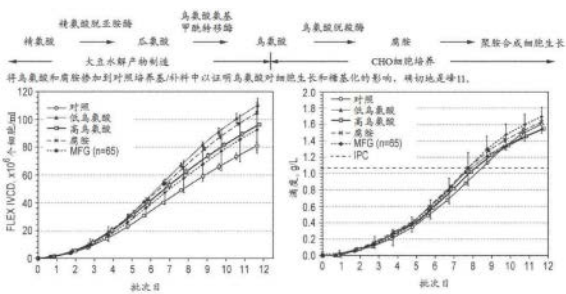
权利要求书2页 说明书22页
序列表8页 附图7页

(54) 发明名称

用于制备糖蛋白的细胞培养工艺

(57) 摘要

本申请提供了一种用于将多个批次的大豆水解产物针对所希望的量的其组分诸如鸟氨酸或腐胺进行筛选,并仅选择具有所希望的量的这种组分的那些批次的大豆水解产物的方法。本公开还提出了在补充有所选择批次的大豆的培养基中培养细胞的方法,以产生更一致、更高品质的批的目的蛋白。另外,本公开提供了多种蛋白制剂,其各自通过在补充有单独批次的含有所希望的量的鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物的培养基中培养细胞而生产,由此所产生的每个批次的蛋白展现出改善的目的蛋白品质和所产生的优质蛋白的量。



1. 一种方法,其包括:
 - (a) 测定大豆水解产物中鸟氨酸的量;
 - (b) 选择包含0.003%至0.027% (w/w) 鸟氨酸的大豆水解产物;
 - (c) 将步骤(b)中选择的大豆水解产物添加到细胞培养基中,使得细胞培养基包含最终浓度0.6-3mg/L的鸟氨酸;以及
 - (d) 在步骤(c)的细胞培养基中培养表达重组异源糖蛋白的细胞群以生产所述重组异源糖蛋白,其中所述重组异源糖蛋白是利纳西普或阿柏西普,并且包含(SA) (Gal)₂ (GlcNAc)₂ (Man)₃ (GlcNAc)₃ (A1)N-聚糖和至少一种其他N-聚糖种类。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述细胞群是通过表达重组异源糖蛋白的细胞的克隆扩增而获得的。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述重组异源糖蛋白是利纳西普。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中A1 N-聚糖的相对量为所述重组异源糖蛋白的所有N-聚糖种类的总量的 $\geq 10\%$ (w/w)。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述A1 N-聚糖的相对量是通过比较由毛细管电泳获得的低聚糖指纹中所述A1 N-聚糖的峰下面积与所有N-聚糖的峰下总面积来确定的。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述A1 N-聚糖的相对量为10%-17% (w/w)。
7. 如权利要求3所述的方法,其中所述重组异源糖蛋白是利纳西普,每摩尔重组异源糖蛋白具有35-65摩尔唾液酸。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述利纳西普包含SEQ ID NO:1的N37、N98、N418和N511残基中的任一个或多个处的A1 N-聚糖。
9. 如权利要求3所述的方法,其中所述重组异源糖蛋白是阿柏西普,每摩尔重组异源糖蛋白具有8-12摩尔唾液酸。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述阿柏西普包含SEQ ID NO:2的N123和N196残基中的任一个或多个处的A1 N-聚糖。
11. 如权利要求1所述的方法,其中所述细胞群包含CHO细胞。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述CHO细胞包含CHO-K1细胞。
13. 一种方法,其包括:
 - a. 在包含大豆水解产物的细胞培养基中培养表达糖基化蛋白的细胞群以产生所述糖基化蛋白;
 - b. 纯化所述糖基化蛋白;
 - c. 对纯化的糖基化蛋白进行低聚糖指纹分析;
 - d. 确定与所述糖基化蛋白的N-聚糖种类的总量相比的(SA) (Gal)₂ (GlcNAc)₂ (Man)₃ (GlcNAc)₃ (A1)N-聚糖的相对量;以及
 - e. 选择提供与所述糖基化蛋白的N-聚糖种类的总量相比至少10% (w/w) A1 N-聚糖的大豆水解产物,其中所选择的大豆水解产物包含0.003%-0.027% (w/w) 鸟氨酸,其中所述糖基化蛋白是利纳西普或阿柏西普,并且包含(SA) (Gal)₂ (GlcNAc)₂ (Man)₃ (GlcNAc)₃ (A1)N-聚糖和至少一种其他N-聚糖种类。
14. 如权利要求13所述的方法,其中所述糖基化蛋白是利纳西普。

15. 如权利要求13所述的方法, 其中所述糖基化蛋白包含每摩尔糖基化蛋白8-12摩尔唾液酸, 或每摩尔糖基化蛋白35-65摩尔唾液酸。

16. 如权利要求13所述的方法, 其中所述A1 N-聚糖的相对量是通过比较在低聚糖指纹分析期间由毛细管电泳获得的低聚糖指纹中所述A1 N-聚糖的峰下面积与所有N-聚糖的峰下总面积来确定的。

17. 如权利要求13所述的方法, 其中所述A1 N-聚糖的相对量为10%-17% (w/w)。

18. 如权利要求13所述的方法, 其中所述糖基化蛋白是利纳西普, 每摩尔糖基化蛋白具有35-65摩尔唾液酸。

19. 如权利要求18所述的方法, 其中所述利纳西普包含SEQ ID NO:1的N37、N98、N418和N511残基中的任一个或多个处的A1 N-聚糖。

20. 如权利要求14所述的方法, 其中所述糖基化蛋白是阿柏西普, 每摩尔糖基化蛋白具有8-12摩尔唾液酸。

21. 如权利要求20所述的方法, 其中所述阿柏西普包含SEQ ID NO:2的N123和N196残基中的任一个或多个处的A1 N-聚糖。

22. 如权利要求13所述的方法, 其中所述细胞群包含CHO细胞。

23. 如权利要求22所述的方法, 其中所述CHO细胞包含CHO-K1细胞。

用于制备糖蛋白的细胞培养工艺

[0001] 序列表的并入

[0002] 文件名为“REGE009P02US_SeqList.txt”的文本文件(创建于2018年2月1日,大小为11.2KB)的内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于细胞培养和重组蛋白生产的方法。本发明确切地涉及在含有大豆水解产物的培养基中培养细胞以实现高品质重组蛋白的一致生产的方法。

背景技术

[0004] 含有蛋白质水解产物(诸如大豆水解产物)的细胞培养基通常用于从培养细胞中生产重组蛋白。但是,蛋白质水解产物可能包含会对细胞生长或重组蛋白质生产产生负面影响的化合物。尽管有这些缺点,蛋白质水解产物已被广泛用作细胞培养的补充剂。

[0005] 人类生物治疗剂(生物药物)通常在哺乳动物细胞培养中生产。然而,生物治疗剂的品质和性能高度依赖于制造工艺。关于具有一致糖基化的生物药物的制造,将Tebbey, P. 和Declerck, P. Generics and Biosimilars Initiative Journal (2016) 5:2, 第70-73页并入本文中。用于制造糖蛋白的细胞培养工艺的变化可能会导致糖基化模式、酸性物质(例如,唾液酸)的存在或蛋白质上聚糖的量的差异。Id. 这种差异增加了作为结果的蛋白质生产中蛋白质亚型的异质性,这可以改变生物治疗剂的稳定性、功效或免疫原性,并最终导致该批蛋白质的不合格(rejection)。

[0006] 因此,消除药品产量和组成的批之间差异的细胞培养方法是非常希望的。本公开鉴定了植物蛋白水解产物(例如,大豆水解产物)中的某些组分,这些组分可能因批次而异,并改变使用大豆水解产物进行的培养中产生的高品质糖蛋白的组成和产量。除了其他方面以外,本公开通过对植物蛋白水解产物的批次进行筛选并选择包含理想浓度的植物蛋白水解产物组分的批次用于生物药物的生产,从而解决改善细胞培养方法的需求。

发明内容

[0007] 本公开部分基于大豆水解产物批次中的鸟氨酸或腐胺的浓度会影响使用大豆水解产物进行的细胞培养中产生的蛋白质的品质和组成这一发现。本公开还提供,在包含含有特定浓度的鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生更大量的高品质蛋白质,这些蛋白质展现出批之间更一致的糖基化模式、聚糖量和唾液酸图谱。

[0008] 在一个方面,本发明涉及一种在包含大豆水解产物的细胞培养基中培养表达重组异源糖蛋白的细胞群以生产重组异源糖蛋白的方法,并且其中所述大豆水解产物包含 $\leq 0.067\%$ (w/w)的鸟氨酸或腐胺。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法包括在包含大豆水解产物的细胞培养基中培养表达重组异源糖蛋白的细胞群的步骤,其中所述大豆水解产物含有 ≤ 0.67 毫克(mg)鸟氨酸/克(g)大豆(w/w),或约 $0.003\% - 0.067\%$ (w/w)鸟氨酸。在一个实施方案中,所述培养基含有 \leq

5mg/L鸟氨酸,或约0.6-3mg/L鸟氨酸。在一些实施方案中,所述细胞群是通过表达重组异源糖蛋白的细胞的克隆扩增而获得的。

[0010] 在一个方面,本发明涉及一种用于生产糖蛋白的方法。在一个实施方案中,所述方法包括在含有大豆水解产物的培养基中培养表达重组异源糖蛋白的细胞群的步骤,所述大豆水解产物含有 ≤ 0.67 毫克(mg)腐胺/克(g)大豆(w/w),或约0.003%-0.067%(w/w)腐胺。在一个实施方案中,所述培养基含有 ≤ 5 mg/L腐胺或约0.6-3mg/L腐胺。在一些实施方案中,所述细胞群是通过表达重组异源糖蛋白的细胞的克隆扩增而获得的。

[0011] 在一个实施方案中,所述糖蛋白是陷阱分子,诸如利纳西普(IL1-陷阱,例如,美国专利号6,927,004中公开的)、阿柏西普(VEGF-陷阱,例如,美国专利号7,087,411中公开的)、康柏西普(VEGF-陷阱,例如,美国专利号7,750,138和8,216,575中公开的)和依那西普(TNF-陷阱,例如,美国专利号5,610,279中公开的)。在一个实施方案中,所述糖蛋白的所有N-聚糖种类的总量中 $\geq 10\%$ (w/w)是A1 N-聚糖。

[0012] 在一个方面,本发明涉及一种生产糖蛋白的方法。在另一个方面,本发明涉及一种在生产糖蛋白时使用大豆水解产物的方法。在另一个方面,本发明涉及一种通过评估所生产的糖蛋白的品质来选择用于生产糖蛋白的大豆水解产物的方法。在一个实施方案中,所述方法包括在细胞培养基中培养表达糖基化蛋白的细胞以产生糖蛋白,纯化所述糖基化蛋白,对纯化的糖基化蛋白进行低聚糖指纹分析,确定与所述糖蛋白的N-聚糖种类的总量相比A1 N-聚糖的相对量;以及选择提供与所述糖蛋白的N-聚糖种类的总量相比至少10%(w/w)A1 N-聚糖的大豆水解产物。

[0013] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:制备含有大豆水解产物的细胞培养基,在细胞培养基中培养表达糖蛋白的细胞,纯化所述糖基化蛋白,对纯化的糖基化蛋白进行低聚糖指纹分析,确定与所述糖蛋白的N-聚糖种类的总量相比A1 N-聚糖的相对量,并且然后选择可用于生产与所述糖蛋白的N-聚糖种类的总量相比具有至少10%(w/w)A1 N-聚糖的糖蛋白的大豆水解产物。

[0014] 在一个实施方案中,所选择的大豆水解产物含有 ≤ 0.67 mg鸟氨酸/克大豆(w/w),或约0.003%-0.067%(w/w)鸟氨酸。在一个实施方案中,所述培养基含有 ≤ 5 mg/L鸟氨酸,或约0.6-3mg/L鸟氨酸。

[0015] 在一个实施方案中,所选择的大豆水解产物含有 ≤ 0.67 mg腐胺/克大豆(w/w),或约0.003%-0.067%(w/w)腐胺。在一个实施方案中,所述培养基含有 ≤ 5 mg/L腐胺或约0.6-3mg/L腐胺。

[0016] 在一个方面,本发明涉及一种通过测量大豆水解产物中鸟氨酸或腐胺的量来选择用于生产糖蛋白的大豆水解产物的方法。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:测量大豆水解产物中鸟氨酸的量,选择具有 ≤ 0.67 mg鸟氨酸/g大豆或约0.003%-0.067%(w/w)鸟氨酸的大豆水解产物,并将所选择的大豆水解产物与其他成分组合以形成具有 ≤ 5 mg/L鸟氨酸或约0.6-3mg/L鸟氨酸的细胞培养基。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:测量潜在有用的大豆水解产物中的腐胺量,选择具有 ≤ 0.67 mg腐胺/g大豆或约0.003%-0.067%(w/w)腐胺的大豆水解产物,并将所选择的大豆水解产物与其他成分组合以形成具有 ≤ 5 mg/L腐胺或约0.6-3mg/L腐胺的细胞培养基。

[0017] 在一个方面,本发明涉及一种糖蛋白,其包含A1 N-聚糖和至少一种其他N-聚糖种

类,其中所述A1 N-聚糖的相对量为所述糖蛋白的N-聚糖总量的至少10% (w/w)。在一个实施方案中,所述A1 N-聚糖的相对量为约10%-17% (w/w)。

[0018] 在一个实施方案中,所述糖蛋白还具有A2 N-聚糖、A2F N-聚糖、A1F N-聚糖、NGA2F N-聚糖、NA2G1F N-聚糖、NA2 N-聚糖和NA2F N-聚糖。

[0019] 在一个实施方案中,所述糖蛋白含有8-65摩尔唾液酸/摩尔糖蛋白。在所述糖蛋白为利纳西普的一个实施方案中,SEQ ID NO:1的天冬酰胺残基N37、N98、N418和N511中的任一个含有A1 N-聚糖。在所述糖蛋白为阿柏西普的一个实施方案中,SEQ ID NO:2的天冬酰胺残基N123和N196中的任一个含有A1 N-聚糖。

[0020] 在一个实施方案中,所述糖蛋白的A1 N-聚糖的相对量是通过比较由毛细管电泳获得的所述糖蛋白的低聚糖指纹图谱中该A1 N-聚糖的峰下面积与所有N-聚糖的峰下总面积来确定的。

[0021] 在一个方面,提供了一种制造具有减少量的鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物的方法。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:在无残留反应容器中酶解大豆提取物,测量大豆水解产物中的鸟氨酸的量,并且选择含有 $\leq 0.067\%$ (w/w) 鸟氨酸或腐胺的那些批的大豆水解产物用于细胞培养基中。在一个实施方案中,该方法包括以下步骤:在无残留反应容器中酶解大豆提取物,测量大豆水解产物中的腐胺的量,并且选择具有 $\leq 0.067\%$ (w/w) 鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物用于细胞培养基中。

[0022] 术语“约”可以理解为所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内。除非上下文另有明确说明,否则本文提供的所有数值均由术语“约”修饰。

[0023] 尽管可以在本公开的实践或测试中使用与本文所述的那些类似或等同的方法和材料,但下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其整体并入本文。不承认本文所引用的参考文献是所要求的公开内容的现有技术。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,所述材料、方法和实施例仅是说明性的,并不意图是限制性的。从以下具体实施方式和权利要求书中,本公开的其他特征和优势将显而易见。

附图说明

[0024] 如在发明内容和/或具体实施方式部分中所公开的,上述方面和实施方案中任一个均可以与任何其他方面或实施方案相组合。

[0025] 专利或申请文件包含至少一张彩色附图。在请求并支付必要的费用后,官方将会提供带有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本。

[0026] 通过参考以下具体实施方式和所附权利要求,当结合其中随附的附图时,本发明的各种目的和优点以及对本发明的更全面的理解是显而易见的,并且更加容易理解,其中:

[0027] 图1描绘了茛三酮衍生的氨基酸的色谱洗脱图谱。X轴描绘了从色谱柱洗脱的时间(保留时间),并且Y轴表示570nm处的吸光度。图A描绘了不满足生产FDA标准可接受的N-聚糖混合物的标准的批次。图B描绘了大豆蛋白水解产物的可接受的氨基酸分析。代表鸟氨酸的峰在两个色谱图中均被圈出。

[0028] 图2描绘了通过肽:N-糖苷酶F(PNGase F)消化从糖蛋白释放的低聚糖的毛细管电

泳图。X轴描绘了从毛细管洗脱的时间,并且Y轴描绘了吸光度或荧光强度。各峰编号为1-21。峰1代表N-聚糖A2;峰4代表N-聚糖A2F;峰11代表N-聚糖A1;峰14代表N-聚糖A1F;峰16代表N-聚糖NGA2F;峰19代表N-聚糖NA2G1F;峰20代表N-聚糖NA2;峰21代表N-聚糖NA2F。

[0029] 图3描绘了A1 N-聚糖的相对量作为大豆蛋白水解产物中鸟氨酸和瓜氨酸浓度的函数的斑点印迹。X轴描绘了瓜氨酸或鸟氨酸的以mg/L计的浓度。Y轴描绘了峰11(代表A1 N-聚糖)的相对面积。

[0030] 图4是描绘了大豆水解产物中鸟氨酸浓度(右下象限)与阿柏西普中峰11的相对量(A1 N-聚糖,左上象限)的负相关的相关性绘图。

[0031] 图5是描绘了(i)大豆水解产物中的鸟氨酸浓度(左下象限)与利纳西普的最终滴度(右上象限)的负相关性;以及(ii)大豆水解产物中的鸟氨酸浓度(左下象限)与培养基中乳酸积累(左下象限)的正相关的相关性绘图。

[0032] 图6A是一对图,描绘了从CHO细胞培养中合成的多胺的量,描绘为IVCD $\times 10^6$ 个细胞-天/ml或滴度(以克/ml计),作为各种条件(包括对照、高和低鸟氨酸浓度、腐胺、MFC和IPC)下批次日的函数。

[0033] 图6B是提供图6A中所描绘的每个研究组的实验条件的表格。

具体实施方式

[0034] 应当理解,本公开的范围不限于所描述的特别方法和实验条件,因为此类方法和条件可以变化。还应理解,本文中所用术语仅用于描述具体实施方案的目的,而不意图具有限制性。

[0035] 除非另外定义,本申请中所用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。虽然与本申请中描述的那些类似或等同的任何方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,现在将对某些特定方法和材料进行描述。单位、前缀和符号可以其标准的、行业认可的形式表示。本文列举的数字范围用方括号括起来,意味着它们包括定义所述范围的数字。除非另有说明,否则术语“一个”或“一种”应被解释为表示“至少一个/种”。

[0036] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,而不应被解释为限制所描述的主题。本文所述的方法和技术通常根据本领域已知的常规方法并且如本说明书通篇所引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所述进行,除非另有说明。参见,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (2001);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Publishing Associates(1992),Harlow and Lane Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1990);和Julio E.Celis,Cell Biology:A Laboratory Handbook,第二版,Academic Press,New York,N.Y. (1998);以及Dieffenbach and Dveksler,PCR Primer:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1995)。贯穿本公开所提及的所有出版物均通过引用以其整体并入本文。

[0037] 定义

[0038] 除非另外定义,本申请中所用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域

的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0039] 短语“相对量”是指一个分子种类的量相对于一般类型的所有分子种类的总量的量。例如,A1聚糖(即(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Gal)2(SA)1)的相对量计算为A1的量/所有N聚糖的量之和。相对量可以表示为绝对质量-质量的量(即,克/克)或百分比,即%(w/w)。

[0040] “鸟氨酸”是参与尿素循环、多胺合成和精氨酸代谢的一种非蛋白质编码氨基酸。还已知鸟氨酸会影响重组蛋白的糖型含量。参见PCT/US2014/069378。鸟氨酸受几种酶作用。例如,在多胺生物合成途径中鸟氨酸脱羧酶催化鸟氨酸向腐胺的转化。参见Pegg A, J. of Biol. Chem. (2006) 281:21页码14532。另外,作为尿素循环的一部分,鸟氨酸转氨甲酰酶催化鸟氨酸向瓜氨酸转化。鸟氨酸代谢发生在培养的细胞的胞质溶胶和线粒体中。腐胺的存在或鸟氨酸的存在被认为对于化学成分确定的培养基中培养的细胞的生长和产量至关重要,但是对此类细胞产生的蛋白质的关键品质属性的影响尚没有描述。

[0041] “腐胺”是参与尿素循环的非蛋白质编码氨基酸,为一种多胺。腐胺(也称为1,4-二氨基丁烷,化学式为 $C_4H_{12}N_2$)是通过鸟氨酸的脱羧基作用生成的,并充当伽马-氨基丁酸(γ -氨基丁酸)的前体。

[0042] 如本文所用,“肽”、“多肽”和“蛋白质”在全文中可互换使用,并且是指包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸残基的分子。肽、多肽和蛋白质还可包括修饰,诸如糖基化、脂质附接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧基化、烷基化、羟基化和ADP-核糖基化。肽、多肽和蛋白质可能具有科学或商业意义,包括基于蛋白质的药物(生物治疗剂)。除了其他方面以外,肽、多肽和蛋白质还包括抗体和嵌合蛋白或融合蛋白。肽、多肽和蛋白质可以使用细胞培养方法通过重组动物细胞系(诸如哺乳动物细胞系)产生。

[0043] 如本文所用,术语“多核苷酸序列”或“肽序列”是指编码目的蛋白质的核酸聚合物,诸如作为生物药物原料药生产的嵌合蛋白质(像陷阱分子)、抗体或抗体部分(例如,VH、VL、CDR3)。可以通过基因工程技术来制造多核苷酸序列(例如,编码嵌合蛋白的序列,或密码子优化的序列,无内含子的序列),并将其引入细胞中,在细胞中其可以作为附加体存在或整合入细胞的基因组。所述多核苷酸序列可以是天然存在的序列,其被引入宿主细胞基因组内的异位位点。所述肽序列可以是异源的,诸如来自另一生物体的天然存在的序列、重组序列、基因修饰的序列,或者尤其是在不同于野生型的启动子的控制下表达的序列,例如编码人直系同源物的核苷酸序列,其中宿主(生产)细胞是CHO细胞。

[0044] 短语“抗原结合蛋白”包括具有至少一个CDR并且能够选择性地识别抗原(即能够以至少在微摩尔范围内的KD结合抗原)的蛋白。治疗性抗原结合蛋白(例如,治疗性抗体)经常需要纳摩尔或皮摩尔范围内的KD。典型地,抗原结合蛋白包括两个或更多个CDR,例如,2、3、4、5或6个CDR。抗原结合蛋白的例子包括抗体、抗体的抗原结合片段,诸如含有抗体的重链和轻链的可变区的多肽(例如,Fab片段,F(ab')₂片段),以及含有抗体的重链和轻链的可变区和含有来自重链和/或轻链的恒定区(诸如一个或多个恒定结构域,即CL、CH1、铰链、CH2和CH3结构域中的一个或多个)的其他氨基酸的蛋白质。

[0045] “抗体”是指由通过二硫键互连的两个重(H)链和两个轻(L)链四个多肽链组成的免疫球蛋白分子。每个重链具有重链可变区(HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。每个轻链具有轻链可变区(VL)和轻链恒定区。轻链恒定区由一个

结构域(CL)组成。VH和VL区可以进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。术语“抗体”包括任何亚型或亚类的糖基化和非糖基化免疫球蛋白。术语“抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的抗体分子,诸如从用核苷酸序列转染以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体。术语“抗体”还包括双特异性抗体,其包括可以与多于一个表位结合的异四聚体免疫球蛋白。双特异性抗体通常如美国专利申请公开号2010/0331527中描述,其通过引用并入本文。

[0046] 术语抗体(或抗体片段)或目的蛋白的“抗原结合部分”是指抗体或目的蛋白的保留特异性结合抗原能力的一个或多个片段。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的蛋白质结合片段的非限制性例子包括:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,在铰链区包含通过二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,Nature (1989) 241:544-546);(vi) 分离的CDR;以及(vii) scFv,其由Fv片段的两个结构域VL和VH组成,这两个结构域通过合成接头连接形成一条单蛋白链,其中VL和VH区配对形成单价分子。术语“抗体”也涵盖其他形式的单链抗体,诸如双抗体。参见,例如,Holliger等人,PNAS USA (1993) 90:6444-6448;Poljak等人,Structure (1994) 2:1121-1123。

[0047] 更进一步地,抗体或其抗原结合部分可以是较大的免疫粘附分子的一部分,其通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合形成。此类免疫粘附分子的非限制性例子包括使用链霉亲和素核心区域来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov等人,Human Antibodies and Hybridomas (1995) 6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多聚组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov等人Mol. Immunol. (1994) 31:1047-1058)。抗体部分,诸如Fab和F(ab')₂片段,可以使用常规技术(诸如通过对整个抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化)从整个抗体中制备。此外,可以使用本领域公知的标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附分子(参见Sambrook等人,1989)。

[0048] 术语“人抗体”旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中,并且特别是在CDR3中。如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合人抗体文库中分离的抗体、从针对人免疫球蛋白基因为转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见,例如,Taylor等人,Nucl. Acids Res. (1992) 20:6287-6295)或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,对此类重组人抗体进行了体外诱变(或者,当使用针对人Ig序列为转基因的动物时,进行了体内体细胞诱变),并且因此所述重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是如下的序列,在衍生自人种系VH和VL序列并与之相关时,所述序列可能不会体内天然存在于人抗体种系库中。

[0049] “Fc融合蛋白”包含两个或多个蛋白质的一部分或全部,其中一个免疫球蛋白分

子的Fc部分,发现在自然界中它们不在一起。例如,Ashkenazi等人,PNAS USA (1991) 88: 10535;Byrn等人,Nature (1990) 344:677;以及Hollenbaugh等人,Current Protocols in Immunology (1992) 增刊4,页码10.19.1-10.19.11中描述了包含与抗体衍生的多肽的各个部分(包括Fc结构域)融合的某些异源多肽的融合蛋白的制备。“受体Fc融合蛋白”包含与Fc部分偶联的受体的一个或多个胞外结构域,在一些实施方案中,所述受体包含铰链区,随后是免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。在一些实施方案中,所述Fc-融合蛋白包含与一个或多个配体结合的两条或更多条不同的受体链。

[0050] 在某些实施方案中,“Fc-融合蛋白”是“陷阱”分子,该陷阱分子是诱饵受体分子,其包含模仿相应内源受体的结合结构域和抗体的Fc部分的两个不同的受体组分。陷阱分子的非限制性例子包括IL-1陷阱(例如,利纳西普,其包含与IL-1R1胞外区融合的IL-1RAcP配体结合区,而IL-1R1胞外区又与hIgG1的Fc融合)(例如,SEQ ID NO:1)(参见美国专利号6,927,004)或VEGF陷阱(例如阿柏西普,其包含与VEGF受体Flk1的Ig结构域3融合的VEGF受体Flt1的Ig结构域2,而VEGF受体Flk1的Ig结构域3又与hIgG1的Fc融合)。参见,例如,美国专利号7,087,411、7,279,159;关于依那西普(TNF陷阱),另参见美国专利号5,610,279。

[0051] “糖基化”包括糖蛋白的形成,其中低聚糖附接至蛋白质的天冬酰胺(Asn)残基(即N-连接的)或者丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基(即O-连接的)的侧链。“糖蛋白”包括含有O-连接的聚糖或N-连接的聚糖的任何蛋白质。聚糖可以是单糖残基的均聚物或杂聚物,它们可以是直链或支链的。已知N-连接的糖基化主要在内质网中起始,而O-连接的糖基化显示在ER或高尔基体中起始。术语“N-聚糖”可与“N-连接的低聚糖”互换使用。术语“O-聚糖”可与“O-连接的低聚糖”互换使用。

[0052] “N-聚糖蛋白”包括含有或可以接受N-连接的低聚糖的蛋白。N-聚糖可以由N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、神经氨酸(NANA)和其他单糖构成,但是N-聚糖通常具有共同的核心五糖结构,包括三个甘露糖和两个N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)。具有连续氨基酸序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr(其中X是除脯氨酸以外的任何氨基酸)的蛋白质可以为N-聚糖提供附接位点。

[0053] N-聚糖包括表1中列出的N-连接的低聚糖。所列出的低聚糖的简写名称在本文中作为简化名称使用来描述低聚糖。因此,例如,A1 N-聚糖含有与由(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3组成的低聚糖连接的精氨酸。

[0054] 表1:N-连接的低聚糖

[0055]	分子名称*	简写名称	预期质量 (g/mol)	图形化描述**
	(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A1	2051.7	
	(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A1F	2197.7	
	(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	A2	2343.2	
	(SA)2(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	A2F	2488.8	
	(Man)5(GlcNAc)2	Man5	1354.4	
	(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2	1760.6	
	(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2F	1906.6	
	(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3	NA2G1	1598.5	
	(Gal)(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3(Fuc)	NA2G1F	1744.1	
	(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2	NGA2	1436.5	
	(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)2(Fuc)	NGA2F	1582.5	

[0056] *单糖的缩写是唾液酸 (SA)、半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、GlcNAc (N-乙酰氨基葡萄糖) 和岩藻糖 (Fuc)。**聚糖关键: 三角形=岩藻糖; 正方形=N-乙酰氨基葡萄糖; 圆圈=甘露糖; 星形=唾液酸。

[0057] 筛选

[0058] “水解产物”是从植物材料、动物材料、乳清、酵母等的水解衍生的复合材料。术语“水解产物”可与“蛋白质水解产物”互换使用。“植物水解产物”(植物蛋白水解产物)是水解的植物材料,诸如米粉、小麦粉、玉米粉、大豆粉等。蛋白质水解产物可以通过三种通用方法制造:酸水解、碱水解和酶促水解。对于包括生物治疗剂制造在内的生物学应用,蛋白质水解产物主要通过酶促水解制备。例如,通过胃蛋白酶消化制备的大豆水解产物可以被称为“大豆蛋白胨”,或者通过胰蛋白酶消化制备的酵母水解产物,可以被称为“酵母胰蛋白胨”。关于植物蛋白水解产物及其制造方法的Franek等人,Biotechnol.Prog.16(5):688-92(2000)被并入本文。

[0059] 在一些实施方案中,所述主题水解产物是植物水解产物。在一个特定的实施方案中,所述主题蛋白质水解产物是大豆水解产物。“大豆水解产物”是衍生自粗大豆粉(soybean grit)的酶解大豆产物,其在很大程度上是化学成分不明确的。通常,大豆水解产物由氨基酸、蛋白质、碳水化合物、矿物质和维生素的聚合物构成。大豆水解产物是衍生自植物的蛋白质水解产物,其可商购,例如以高浓度溶液(例如,HyClone™ HyQ大豆水解产物溶液)或粉末(例如,SigmaAldrich® S1674(Amisoy™),大豆蛋白质水解产物)的形式。如本

文所用,大豆水解产物的“批次(batch)”或“批(lot)”是指由粗大豆粉的水解得到的大豆水解产物的制造量。例如,每个水解工艺都可以得到独特“批次”或“批”的具有不同浓度的组分(诸如维生素、氨基酸、肽和糖)的大豆水解产物。大豆水解产物通常与不含动物蛋白的细胞培养基一起使用,用于哺乳动物细胞系在商用生物治疗剂(诸如抗体)生产期间的生长。更确切地,在细胞接种之前或期间,将大豆水解产物添加到细胞培养基中。然后将细胞在含有水解产物的培养基中培养,直到将其收获。由于大豆水解产物的性质不明确,各批次大豆水解产物在批次之间(批之间)会有所不同,这可能导致生物治疗剂的商业制造中的不一致性。

[0060] 本公开已经鉴定出大豆水解产物批次中某些组分的浓度会影响使用大豆水解产物在细胞培养中生产的蛋白质的品质和组成。本公开提供了用于筛选各批次大豆水解产物以选择含有所希望量的组分(诸如像鸟氨酸、腐胺、瓜氨酸、精氨酸或其组合)的某些批次大豆水解产物的方法。

[0061] 在某些实施方案中,所述筛选方法包括测量一个批次的大豆水解产物的至少一部分(即,样品)中鸟氨酸或腐胺的量。在一个特定的实施方案中,对大豆水解产物样品进行称重,并将其一部分溶解至所希望的浓度。在一些实施方案中,然后将大豆水解产物溶液在溶剂中稀释至第二所希望浓度(例如,1g/L至25g/L),并且然后可以确定所得到的大豆水解产物溶液的组成。

[0062] 在一些实施方案中,所述测量步骤采用合适的用于确定大豆水解产物样品的分子组成的方法,其包括例如在柱后茚三酮反应后进行的比色检测,或洗脱的茚三酮阳性化合物的色谱分析,诸如HPLC或UPLC,并且用于表示每种组分(例如,鸟氨酸或腐胺)的测量的量的单位可以是任何合适的单位(例如,微摩尔/L,mg/L或g/L)。在一些实施方案中,测量鸟氨酸或腐胺的量包括测量样品中鸟氨酸的浓度或测量大豆水解产物样品中鸟氨酸的总量。然而,测量鸟氨酸或腐胺的量,并且无论使用什么单位表示测量的量,所选批次的大豆水解产物中的鸟氨酸或腐胺的浓度均小于或等于0.67mg鸟氨酸或腐胺/g大豆。

[0063] 在一个实施方案中,获得了一个批次的大豆水解产物的样品,并通过柱后茚三酮检测在离子交换柱上进行氨基酸色谱分析,测量了所述样品的鸟氨酸或腐胺含量。更确切地,在一个特定的实施方案中,筛选方法包括酸水解大豆水解产物样品并在样品缓冲液中重建。然后对水解的样品进行高效阳离子交换分离,例如,在磺化聚苯乙烯树脂(Dowex 50)柱上进行,随后进行柱后衍生,柱后衍生可以灵敏地检测样品中的各种氨基酸。参见,例如,Moore和Stein.J.Biol.Chem. (1954) 第211卷第907-913页;Nemkov等人,Amino Acids 2015年11月;47(11):2345-2357;Wahl和Holzgrabe,“Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes,”Talanta 154:150-163,2016年7月1日。用茚三酮试剂进行柱后显色后,在茚三酮紫色范围内(例如,570nm)测量吸光度。使用色谱分析软件(例如,EZChrom Elite for Hitachi3.1.5b版色谱分析软件)完成数据采集,以提供定量色谱图,色谱图显示每种氨基酸摩尔微摩尔/L,每种氨基酸mg/L或每种氨基酸g/L。

[0064] 本领域普通技术人员将理解,可以根据本公开的方法使用用于样品组合中氨基酸的鉴定和测量的其他方法,诸如使用液相色谱和质谱的柱前衍生色谱法或反相液相色谱法。

[0065] 在某些实施方案中,使用液相色谱-质谱法筛选大豆水解产物样品。例如,可以按

本文所述获得一个批次的大豆水解产物的样品,并对其进行色谱分析,或在高效液相色谱分析(HPLC)系统(诸如Agilent1100或Agilent 1200SL)上进行一系列色谱分析。可以进行质谱分析以提供高分辨率的定量数据,这些数据描述了被测量的大豆水解产物样品的组成。

[0066] 在一些实施方案中,本公开提供了一种方法,其包括筛选各批次的大豆水解产物中所希望量的组分,诸如鸟氨酸、腐胺和/或瓜氨酸,并选择具有所希望量的这种组分的那些批次的大豆水解产物。例如,可以如上所述筛选包括一个批次的大豆水解产物粉末的一部分的样品,并将其与在和样品运行相同的条件下生成的氨基酸标准图谱进行比较。如图1A至图1B所示,所得到的一个或多个色谱图将提供大豆水解产物样品中存在的每种氨基酸组分的浓度(例如,每种氨基酸微摩尔/L,每种氨基酸mg/L或每种氨基酸g/L)。分析色谱图有助于鉴定含有所希望浓度的组分(诸如鸟氨酸、腐胺和/或瓜氨酸)的大豆水解产物(即样品)的批次。然后,选择包含所希望量的一种或多种特定组分的每个批次大豆水解产物供进一步使用,例如,用于细胞培养中,如本文所述。图1的图A描绘了氨基酸鉴定后的不合格批次。图1的图B描绘了在相同条件下运行的可接受大豆水解产物批次的实施例。在两个图中都圈出了对应于鸟氨酸的氨基酸峰。可以确定鸟氨酸或腐胺的浓度,生成标准曲线并插入样品鸟氨酸或腐胺浓度。可选地,可以通过确定鸟氨酸或腐胺峰的曲线下面积并将其除以所有氨基酸峰下面积的总和,或将峰面积与标准品相比较,来确定鸟氨酸或腐胺的相对量。

[0067] 在某些实施方案中,待选择的大豆水解产物组分(例如鸟氨酸或腐胺)的所希望浓度为5mg/L或更低。在一个实施方案中,待选择的大豆水解产物批次中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度为0.5mg/L至5.0mg/L或0.5mg/L至2.0mg/L。在其他实施方案中,所选择的大豆水解产物批次中鸟氨酸或腐胺的浓度范围为0.5mg/L至4.5mg/L、0.5mg/L至4.0mg/L、0.5mg/L至3.5mg/L、0.5mg/L至3.0mg/L、0.5mg/L至2.5mg/L、0.5mg/L至2.0mg/L、0.5mg/L至1.5mg/L或0.5mg/L至1.0mg/L。在一些实施方案中,所选择的大豆水解产物批次中鸟氨酸或腐胺的浓度范围为1.0mg/L至5.0mg/L、1.5mg/L至5.0mg/L、2.0mg/L至5.0mg/L、2.5mg/L至5.0mg/L、3.0mg/L至5.0mg/L、3.5mg/L至5.0mg/L、4.0mg/L至5.0mg/L或4.5mg/L至5.0mg/L。

[0068] 在特定的实施方案中,大豆水解产物批次中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度为至少0.5mg/L、0.6mg/L、0.7mg/L、0.8mg/L、0.9mg/L、1.1mg/L、1.2mg/L、1.3mg/L、1.4mg/L、1.5mg/L、1.6mg/L、1.7mg/L、1.8mg/L、1.9mg/L、2.0mg/L、2.1mg/L、2.2mg/L、2.3mg/L、2.4mg/L、2.5mg/L、2.6mg/L、2.7mg/L、2.8mg/L、2.9mg/L、3.0mg/L、3.1mg/L、3.2mg/L、3.3mg/L、3.4mg/L、3.5mg/L、3.6mg/L、3.7mg/L、3.8mg/L、3.9mg/L、4.0mg/L、4.1mg/L、4.2mg/L、4.3mg/L、4.4mg/L、4.5mg/L、4.6mg/L、4.7mg/L、4.8mg/L、4.9mg/L、或5.0mg/L鸟氨酸或腐胺。

[0069] 在其他实施方案中,一个批次的大豆水解产物鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过0.67mg鸟氨酸/g大豆。在仍其他实施方案中,一个批次的大豆水解产物鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过0.27mg鸟氨酸/g大豆。在另一个实施方案中,一个批次的大豆水解产物鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过0.24mg鸟氨酸或腐胺/g大豆。在一些实施方案中,一个批次的大豆中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过0.067mg至0.67mg鸟氨酸或腐胺/g大豆。在仍其他实施方案中,一个批次的大豆水解产物鸟氨酸或腐胺的所希望浓度在0.067mg至0.27mg鸟氨酸/g大豆的范围内。在又另一个实施方案中,一个批次的大豆水解产物鸟氨酸

或腐胺的所希望浓度在0.067mg至0.24mg鸟氨酸或腐胺/g大豆的范围内。

[0070] 在一个实施方案中,所选大豆水解产物中鸟氨酸或腐胺的按质量计的相对量(% w/w) (w/w = 鸟氨酸或腐胺的质量/水解产物的总质量) $\leq 0.067\%$, 诸如0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.0015%、0.002%、0.0025%、0.003%、0.0035%、0.004%、0.0045%、0.005%、0.0055%、0.006%、0.0061%、0.0062%、0.0063%、0.0064%、0.0065%、0.0066%,全部以w/w计。

[0071] 在一个实施方案中,基于产生具有特定品质属性的糖蛋白来选择植物蛋白水解产物。糖蛋白的品质可以通过评估糖蛋白上一种或多种特定N-聚糖的水平,或通过评估糖蛋白上一种或多种特定糖的水平,或多种属性的组合来确定。例如,具有特定岩藻糖水平(例如,每摩尔糖蛋白5-10摩尔岩藻糖)的糖蛋白可以是一项品质属性标准;或特定的唾液酸水平(例如,每摩尔糖蛋白5-15摩尔唾液酸);或A1N-聚糖相对于所有N-聚糖总量的特定比例,例如10%-17% (w/w),可以认为具有必要的品质属性。使所述糖蛋白的生产成为可能的植物蛋白水解产物被认为是可选择的。

[0072] 在一个实施方案中,如下选择所述植物蛋白水解产物:在含有潜在选择的(潜在可选择的)植物蛋白水解产物(例如,大豆水解产物)的培养基中培养的细胞中产生糖蛋白,纯化糖蛋白,对糖蛋白进行低聚糖指纹分析,并且通过计算与A1 N-聚糖相关的峰下面积然后将该值除以所有N-聚糖的峰下总面积以确定A1 N-聚糖的相对量,并且选择能够生产A1 N-聚糖相对含量为 $\geq 10\%$ 、 $\geq 10.5\%$ 、10-17%、10%、10.5%、11%、11.5%、12%、12.5%、13%、13.5%、14%、14.5%、15%、15.5%、16%、16.5%、17%、17.5%或18%的糖蛋白的植物蛋白水解产物。

[0073] 细胞培养

[0074] 本公开提供了一种使用如上所述的所选择批次的大豆水解产物在细胞培养基中培养表达目的蛋白的细胞的方法。本公开首次发现,在细胞培养基中使用所选择批次的包含5.0mg/L或更少的鸟氨酸的大豆水解产物减少批之间的差异并改善蛋白质产品的品质。本公开首次发现,在细胞培养基中使用所选择批次的包含5.0mg/L腐胺或更少的大豆水解产物减少批之间的差异并改善蛋白质产品的品质。

[0075] “细胞培养”或“培养”意指在多细胞生物或组织外部的细胞的生长和繁殖。合适的哺乳动物细胞培养条件是本领域已知的。参见,例如,Animal cell culture:A Practical Approach,D.Rickwood编,Oxford University Press,New York(1992)。哺乳动物细胞可以悬浮培养或附着在固体基质上培养。带有或不带有微载体的在分批、补料分批、连续、半连续或灌注模式操作的流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶、摇瓶或搅拌槽生物反应器可用于哺乳动物细胞培养。可将细胞培养基或浓缩的补料培养基连续地或在培养过程中间隔地添加到培养物中。例如,可以每天、每隔一天、每三天进行一次培养基补料,或者可以在所监测的特定培养基组分的浓度处于所希望范围之外时补料。

[0076] 如本文所用,术语“细胞培养基(cell culture media/cell media/cell culture medium)”或“培养基(media/culture medium)”是指用于使细胞(例如,动物或哺乳动物细胞)生长的任何营养液,并且通常提供来自以下的至少一种或多种组分:能量源(通常为碳水化合物形式,如葡萄糖);所有必需氨基酸中的一种或多种,并且通常是二十种碱性氨基

酸,再加上半胱氨酸;典型地需要的低浓度的维生素和/或其他有机化合物;脂质或游离脂肪酸;以及痕量元素,例如典型地需要的非常低的浓度(通常在微摩尔范围内)的无机化合物或天然存在的元素。在一些实施方案中,细胞培养基是通过将大豆或其他植物蛋白水解产物与其他成分组合而形成的。

[0077] 如本文所用,“其他成分”包括以下细胞培养基组分中的任一种或多种:包括但不限于水;能量源;所有必需氨基酸中的一种或多种,并且通常是二十种碱性氨基酸,加上半胱氨酸;典型地需要的低浓度的维生素和/或其他有机化合物,脂质或游离脂肪酸以及痕量元素。

[0078] 在特定的实施方案中,所述细胞培养基补充有一定量的所选批次的大豆水解产物。在某些实施方案中,所述细胞培养基补充有约0.5g/L至约25g/L的所选大豆水解产物。在一些实施方案中,所述细胞培养基补充有约0.5g/L、1g/L、1.5g/L、2g/L、2.5g/L、2g/L、2.5g/L、3g/L、3.5g/L、4g/L、4.5g/L、5g/L、5.5g/L、6g/L、6.5g/L、7g/L、7.5g/L、8g/L、8.5g/L、9g/L、9.5g/L、10g/L、10.5g/L、11g/L、11.5g/L、12g/L、12.5g/L、13g/L、13.5g/L、14g/L、14.5g/L、15g/L、15.5g/L、16g/L、16.5g/L、17g/L、17.5g/L、18g/L、18.5g/L、19g/L、19.5g/L、20g/L、20.5g/L、21g/L、21.5g/L、22g/L、22.5g/L、23g/L、23.5g/L、24g/L、24.5g/L或约25g/L的所选批次的大豆水解产物。

[0079] 在一个实施方案中,添加植物蛋白水解产物后细胞培养基中鸟氨酸或腐胺的浓度为 $\leq 5\text{mg/L}$ 、0.6-3mg/L、0.01mg/L、0.02mg/L、0.03mg/L、0.04mg/L、0.05mg/L、0.06mg/L、0.07mg/L、0.08mg/L、0.09mg/L、0.010mg/L、0.015mg/L、0.02mg/L、0.025mg/L、0.03mg/L、0.035mg/L、0.04mg/L、0.045mg/L、0.05mg/L、0.055mg/L、0.06mg/L、0.065mg/L、0.07mg/L、0.075mg/L、0.08mg/L、0.085mg/L、0.09mg/L、0.095mg/L、0.1mg/L、0.15mg/L、0.2mg/L、0.25mg/L、0.3mg/L、0.35mg/L、0.4mg/L、0.45mg/L、0.5mg/L、0.55mg/L、0.6mg/L、0.65mg/L、0.7mg/L、0.75mg/L、0.8mg/L、0.85mg/L、0.9mg/L、0.95mg/L、1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L、4mg/L、4.5mg/L或5mg/L。

[0080] 在一个实施方案中,所培养的细胞是能够产生生物治疗性蛋白的细胞系的细胞。用于产生蛋白质生物治疗剂的细胞系的非限制性例子尤其包括原代细胞、BSC细胞、HeLa细胞、HepG2细胞、LLC-MK细胞、CV-1细胞、COS细胞、VERO细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、CRFK细胞、RAF细胞、RK细胞、TCMK-1细胞、LLCPK细胞、PK15细胞、LLC-RK细胞、MDOK细胞、BHK细胞、BHK-21细胞、CHO细胞、CHO-K1细胞、NS-1细胞、MRC-5细胞、WI-38细胞、BHK细胞、3T3细胞、293细胞、RK细胞、Per.C6细胞和鸡胚细胞。在一个实施方案中,所述细胞系是CHO细胞系或是为大规模蛋白质生产而优化的几种特定CHO细胞变体中的一种或多种,例如,CHO-K1,或CHO-K1衍生的EESYR®(增强的表达和稳定性区域)细胞(美国专利号7,771,997)。

[0081] 在一个实施方案中,所培养的并表达异源糖蛋白的细胞是通过将包含并表达编码糖蛋白或者糖蛋白的亚基的多核苷酸的细胞(即,组细胞)克隆扩增而获得的细胞群,其中所述糖蛋白是复合的多亚基蛋白,像抗体。在一些实施方案中,从祖细胞通过克隆扩增获得或传代的细胞群中至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或约100%的成分细胞含有编码糖蛋白的多核苷酸并且表达所述糖蛋白。

[0082] 哺乳动物细胞,诸如CHO细胞,可以在小规模细胞培养容器中进行培养,诸如在具有约25ml培养基的125ml容器中,在具有约50至100ml培养基的250ml容器中,在具有约100

至200ml培养基的500ml容器中。可选地,这些培养可以是大规模的,诸如像具有约300至1000ml培养基的1000ml容器,具有约500ml至3000ml培养基的3000ml容器,具有约2000ml至8000ml培养基的8000ml容器,以及具有约4000ml至15000ml培养基的15000ml容器。用于制造的培养(即,生产用细胞培养)可以包含10,000L或更多的培养基。大规模细胞培养或“生产用细胞培养”(诸如用于临床制造蛋白质治疗剂的细胞培养)典型地维持数天甚至数周,在此期间细胞产生一种或多种所希望的蛋白质。在这段时间内,培养基可以补充含有在培养过程中消耗的组分(诸如营养物质和氨基酸)的浓缩补料培养基。

[0083] 在某些实施方案中,使用了浓缩补料培养基。浓缩补料培养基可以基于任何细胞培养基配方。这种浓缩的补料培养基可以包含本文所述细胞培养基的大多数组分,其含量为例如其正常使用量的约5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100X、200X、400X、600X、800X或甚至约1000X。浓缩补料培养基常用于补料分批培养工艺。

[0084] 在一些实施方案中,在细胞生长或蛋白质生产过程中,细胞培养基补充了“使用点添加物”,也称为添加物、使用点成分或使用点化学物质。使用点添加物包括以下中的任一种或多种:生长因子或其他蛋白质、缓冲液、能量源、盐、氨基酸、金属和螯合剂。其他蛋白质包括转铁蛋白和白蛋白。包括细胞因子和趋化因子的生长因子通常是本领域中已知的,并且已知会刺激细胞生长,或在一些情况下,刺激细胞分化。生长因子通常是蛋白质(例如胰岛素)、小肽或类固醇激素,诸如雌激素、DHEA、睾酮等。在一些情况下,生长因子可以是促进细胞增殖或蛋白质产生的非天然化学物质,诸如像四氢叶酸(THF)、甲氨蝶呤等。蛋白质和肽生长因子的非限制性例子包括血管生成素、骨形态发生蛋白(BMP)、脑衍生神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子(EGF)、促红细胞生成素(EPO)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、生长分化因子-9(GDF9)、肝细胞生长因子(HGF)、肝细胞瘤源性生长因子(HDGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子(IGF)、迁移刺激因子、肌肉生长抑制素(GDF-8)、神经生长因子(NGF)和其他神经营养素、血小板源性生长因子(PDGF)、促血小板生成素(TPO)、转化生长因子 α (TGF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、wnt信号传导途径激动剂、胎盘生长因子(PlGF)、胎牛生长激素(FBS)、白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7等。在一个实施方案中,所述细胞培养基补充有使用点添加生长因子胰岛素。在一个实施方案中,培养基中胰岛素的浓度,即添加后细胞培养基中胰岛素的量为约0.1 μ M至10 μ M。一些实施方案的培养基配方中也可以包含一种或多种使用点添加物。

[0085] 缓冲液是本领域众所周知的。本发明不限于任一种或多种特别缓冲液,并且任何一个本领域普通技术人员都可以选择适当的缓冲液或缓冲液体系与产生特别蛋白质的特别细胞系一起使用。在一个实施方案中,使用点添加缓冲液是NaHCO₃/CO₂体系。在一个实施方案中,所述使用点添加缓冲液包含NaHCO₃。在另一个实施方案中,所述缓冲液是HEPES。

[0086] 在细胞培养中用作使用点添加物的能量源在本领域中也是众所周知的。在一个实施方案中,非限制性地,所述使用点添加能量源为葡萄糖。在一个实施方案中,考虑到特别细胞系和要生产的蛋白质的特别和特定要求,可以将葡萄糖添加至在培养基中的浓度约为1至20mM。

[0087] 螯合剂同样是细胞培养和蛋白质生产领域众所周知的。乙二胺四乙酸四钠脱水物

和柠檬酸盐是本领域中使用的两种常见的螯合剂,尽管在本发明的实践中可以使用其他螯合剂。在一个实施方案中,使用点添加螯合剂是乙二胺四乙酸四钠二水合物。在一个实施方案中,使用点添加螯合剂是柠檬酸盐,诸如Na₃C₆H₅O₇。

[0088] 在一个实施方案中,所述细胞培养基可以补充一种或多种使用点添加氨基酸,诸如谷氨酰胺。其他使用点添加物包括各种金属盐(诸如铁、镍、锌和铜的盐)中的一种或多种。在一个实施方案中,所述细胞培养基补充有硫酸铜、硫酸锌、氯化铁和硫酸镍中的任一种或多种。

[0089] 在一个实施方案中,根据补料分批工艺,在细胞培养过程中间隔地补充培养基。补料分批培养是本领域众所周知的,并且用于优化蛋白质生产。参见,例如,Y.M.Huang等人,Biotechnol Prog. (2010) 26(5) 第1400-1410页。

[0090] 在本公开的另一个方面,与在包含含有浓度大于5mg/L的鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物的培养基中培养的细胞相比,在包含含有所希望浓度(即小于或等于5.0mg/L,例如,0.5mg/L至5.0mg/L或0.5mg/L至2.0mg/L)的鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生具有改善的品质的目的蛋白。在某些实施方案中,改善的蛋白质品质可通过以下测量:目的蛋白上一个或多个氨基酸处糖基化的存在或不存在,目的蛋白上聚糖的量,目的蛋白上一个或多个糖基化位点处唾液酸的存在,或其组合。如本文所用,“增强的品质”、“改善的品质”或“高品质”的蛋白质产品还可以指更一致的品质,例如,在生物治疗性蛋白质生产批中观察到的翻译后修饰。一致的品质包括,例如,在复制生产线之后具有例如可重复的所希望糖基化图谱。关于品质的一致性是指一定程度的均匀性和标准化,而重复生产批次基本上不存在差异。

[0091] 在某些实施方案中,所述蛋白质产品(目的蛋白)是抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、抗原结合抗体片段、单链抗体、双抗体、三抗体或四抗体、Fab片段或F(ab')₂片段、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。在一个实施方案中,所述抗体是IgG1抗体。在一个实施方案中,所述抗体是IgG2抗体。在一个实施方案中,所述抗体是IgG4抗体。在一个实施方案中,所述抗体是嵌合IgG2/IgG4抗体。在一个实施方案中,所述抗体是嵌合IgG2/IgG1抗体。在一个实施方案中,所述抗体是嵌合IgG2/IgG1/IgG4抗体。

[0092] 在一些实施方案中,所述抗体选自下组,该组由以下组成:抗程序化细胞死亡1抗体(例如,如美国专利申请公开号US 2015/0203579 A1中所述的抗PD1抗体)、抗程序化细胞死亡配体1(例如,美国专利申请公开号US 2015/0203580 A1中所述的抗PD-L1抗体)、抗D114抗体、抗血管生成素2抗体(例如,如美国专利号9,402,898中所述的抗ANG2抗体)、抗血管生成素样3抗体(例如,如美国专利号9,018,356中所述的抗AngPt13抗体)、抗血小板源性生长因子受体抗体(例如,如美国专利号9,265,827中所述的抗PDGFR抗体)、抗Erb3抗体、抗催乳素受体抗体(例如,如美国专利号9,302,015中所述的抗PRLR抗体)、抗补体5抗体(例如,如美国专利申请公开号US 2015/0313194 A1中所述的抗C5抗体)、抗TNF抗体、抗表皮生长因子受体抗体(例如,美国专利号9,132,192所述的抗EGFR抗体或如美国专利号US 2015/0259423 A1所述的抗EGFRvIII抗体)、抗前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶Kexin-9抗体(例如,如美国专利号8,062,640或美国专利申请公开号US 2014/0044730 A1中所述的抗PCSK9抗体)、抗生长和分化因子-8抗体(例如,抗GDF8抗体,也称为抗肌肉生长抑制素抗体,如美国

专利号8,871,209或9,260,515所述)、抗胰高血糖素受体(例如,如美国专利申请公开号US 2015/0337045 A1或US 2016/0075778 A1描述的抗GCGR抗体)、抗VEGF抗体、抗IL1R抗体、白介素4受体抗体(例如,如美国专利申请公开号US 2014/0271681 A1或美国专利号8,735,095或8,945,559所述的抗IL4R抗体)、抗白介素6受体抗体(例如,如美国专利号7,582,298、8,043,617或9,173,880中所述的抗IL6R抗体)、抗IL1抗体、抗IL2抗体、抗IL3抗体、抗IL4抗体、抗IL5抗体、抗IL6抗体、抗IL7抗体、抗白介素33(例如,如美国专利申请公开号US 2014/0271658 A1或US 2014/0271642 A1所述的抗IL33抗体)、抗呼吸道合胞病毒抗体(例如,如美国专利申请公开号US 2014/0271653 A1所述的抗RSV抗体)、抗分化簇3(例如,如美国专利申请公开号US 2014/0088295 A1和US 20150266966 A1以及美国申请号62/222,605所述的抗CD3抗体)、抗分化簇20(例如,如美国专利申请公开号US 2014/0088295 A1和US 20150266966 A1以及美国专利号7,879,984中所述的CD20抗体)、抗CD19抗体、抗CD28抗体、抗分化簇48(例如,如美国专利号9,228,014所述的抗CD48抗体)、抗Fε1 d1抗体(例如,如美国专利号9,079,948所述)、抗中东呼吸系统综合征病毒(例如,如美国专利申请公开号US 2015/0337029 A1所述的抗MERS抗体)、抗埃博拉病毒抗体(例如,如美国专利申请公开号US 2016/0215040所述)、抗寨卡病毒抗体、抗淋巴细胞激活基因3抗体(例如,抗LAG3抗体或抗CD223抗体)、抗神经生长因子抗体(例如,如美国专利申请公开号US 2016/0017029和美国专利号8,309,088和9,353,176所述的抗NGF抗体)以及抗激活素A抗体。在一些实施方案中,所述双特异性抗体选自下组,该组由以下组成:抗CD3 x抗CD20双特异性抗体(如美国专利申请公开号US 2014/0088295 A1和US 20150266966 A1所述)、抗CD3 x抗粘蛋白16双特异性抗体(例如,抗CD3 x抗Muc16双特异性抗体)和抗CD3 x抗前列腺特异性膜抗原双特异性抗体(例如,抗CD3 x抗PSMA双特异性抗体)。在一些实施方案中,所述目的蛋白选自下组,该组由以下组成:阿利珠单抗、沙利鲁单抗、法西奴单抗(fasimumab)、耐斯伐库单抗(nesvacumab)、杜匹鲁单抗(dupilumab)、曲弗单抗(trevogrumab)、依凡纳单抗(evinacumab)和利诺库单抗(rinucumab)。贯穿本公开所提及的所有出版物均通过引用以其整体并入本文。

[0093] 在其他实施方案中,所述目的蛋白质是含有Fc部分和另一个结构域的重组蛋白(例如Fc-融合蛋白)。在一些实施方案中,Fc-融合蛋白是受体Fc-融合蛋白,其含有与Fc部分偶联的受体的一个或多个胞外结构域。在一些实施方案中,所述Fc部分包含铰链区,随后是IgG的CH2和CH3结构域。在一些实施方案中,所述受体Fc-融合蛋白包含与单个配体或多个配体结合的两条或更多条不同的受体链。例如,Fc-融合蛋白是陷阱蛋白,诸如像IL-1陷阱(例如,利纳西普,其含有与IL-1R1胞外区融合的IL-1RAcP配体结合区,所述IL-1R1胞外区与hIgG1的Fc融合;参见美国专利号6,927,004,通过引用以其整体并入本文),VEGF陷阱(例如,阿柏西普或ziv-阿柏西普,其含有VEGF受体F1t1的Ig结构域2,VEGF受体F1t1的Ig结构域2与VEGF受体F1k1的Ig结构域3融合,VEGF受体F1k1的Ig结构域3与hIgG1的Fc融合;参见美国专利号7,087,411和7,279,159;或康柏西普,其含有VEGF受体F1k1的Ig结构域2,VEGF受体F1k1的Ig结构域2与VEGF受体F1t1的Ig结构域3融合,VEGF受体F1k1的Ig结构域3与VEGF受体F1t1的Ig结构域4融合,VEGF受体F1t1的Ig结构域4与hIgG1的Fc融合;参见美国专利号8,216,575),或TNF陷阱(例如依那西普,其含有与hIgG1的Fc融合的TNF受体;参见美国专利号5,610,279)。在其他实施方案中,Fc-融合蛋白是ScFv-Fc-融合蛋白,其含有一个

或多个抗原结合结构域中的一个或多个,诸如与Fc部分偶联的抗体的可变重链片段和可变轻链片段。

[0094] 蛋白质生产

[0095] 目的蛋白可以使用本领域普通技术人员已知的方法由宿主细胞表达。通常,任何适合在哺乳动物细胞中表达的目的蛋白都可以通过本发明的方法生产,但是糖蛋白将尤其受益于本发明的方法。例如,在特定实施方案中,目的蛋白是抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或其片段、嵌合抗体或其片段、ScFv或其片段、带有Fc标签的蛋白(例如,陷阱蛋白)或其片段、生长因子或其片段、细胞因子或其片段、或者细胞表面受体的胞外结构域或其片段。

[0096] 具有天冬酰胺连接的(N-连接的)聚糖的糖蛋白在真核细胞中普遍存在。这些聚糖的生物合成及其向多肽的转移发生在内质网(ER)中。N-聚糖结构被ER和高尔基复合体中的多种糖苷酶和糖基转移酶进一步修饰。使用本发明方法进行的蛋白质生产旨在改善所希望N-聚糖结构的一致性,以消除免疫原性表位(“糖表位(glycotope)”)。聚糖连接的蛋白质的详细结构分析可与蛋白质的功能特征关联进行。这种表征蛋白质糖基化的分析典型地涉及几个步骤:i) 附接的聚糖的酶促或化学释放;ii) 通过芳族胺或脂族胺的还原胺化或者完全甲基化进行的释放的聚糖的衍生化;iii) 聚糖的分析。分析糖基化模式的许多变化是技术人员已知的。糖蛋白可以携带特定数量的占据各个位点的几种类型的糖型,因此它们的复杂性可能使其难以在某些生产方法中复制。糖型的类型和数量的一致性是可测量的,并且代表了治疗性蛋白生产的所希望结果。

[0097] 本公开显示,通过在包含大豆水解产物的培养基中培养表达目的蛋白的细胞(所述大豆水解产物具有特定浓度的鸟氨酸和腐胺),在分批或补料分批培养中生产许多批次的目的蛋白导致所生产的蛋白质的品质的增加以及批次间一致性的改善。因此,本公开的另一个方面提供了多种蛋白质制剂,这些蛋白质制剂各自通过在包含单独批次的大豆水解产物的培养基中培养细胞来生产,所述大豆水解产物含有预定量鸟氨酸或腐胺。在某些实施方案中,选择用于细胞培养的每批大豆水解产物具有的鸟氨酸或腐胺浓度为0.67mg/g大豆或更低,特别是0.0067mg至0.67mg鸟氨酸或腐胺/g大豆,或0.0067mg至0.27mg鸟氨酸或腐胺/g大豆。

[0098] 在其他实施方案中,含有大豆水解产物的细胞培养基中的鸟氨酸或腐胺的浓度范围为0.5mg/L至4.5mg/L、0.5mg/L至4.0mg/L、0.5mg/L至3.5mg/L、0.5mg/L至3.0mg/L、0.5mg/L至2.5mg/L、0.5mg/L至2.0mg/L、0.5mg/L至1.5mg/L或0.5mg/L至1.0mg/L。在一些实施方案中,含有大豆水解产物的细胞培养基中的鸟氨酸或腐胺的浓度范围为1.0mg/L至5.0mg/L、1.5mg/L至5.0mg/L、2.0mg/L至5.0mg/L、2.5mg/L至5.0mg/L、3.0mg/L至5.0mg/L、3.5mg/L至5.0mg/L、4.0mg/L至5.0mg/L或4.5mg/L至5.0mg/L。

[0099] 在特定的实施方案中,含有大豆水解产物的细胞培养基包含0.5mg/L、0.6mg/L、0.7mg/L、0.8mg/L、0.9mg/L、1.1mg/L、1.2mg/L、1.3mg/L、1.4mg/L、1.5mg/L、1.6mg/L、1.7mg/L、1.8mg/L、1.9mg/L、2.0mg/L、2.1mg/L、2.2mg/L、2.3mg/L、2.4mg/L、2.5mg/L、2.6mg/L、2.7mg/L、2.8mg/L、2.9mg/L、3.0mg/L、3.1mg/L、3.2mg/L、3.3mg/L、3.4mg/L、3.5mg/L、3.6mg/L、3.7mg/L、3.8mg/L、3.9mg/L、4.0mg/L、4.1mg/L、4.2mg/L、4.3mg/L、4.4mg/L、4.5mg/L、4.6mg/L、4.7mg/L、4.8mg/L、4.9mg/L,或5.0mg/L的量的鸟氨酸或腐胺。

[0100] 在其他实施方案中,含有大豆水解产物的一个批次的培养基中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过5.0mg/L。在仍其他实施方案中,含有大豆水解产物的一个批次的培养基中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过2.0mg/L。在另一个实施方案中,含有大豆水解产物的一个批次的培养基中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度不超过1.8mg/L。在一些实施方案中,含有大豆的一个批次的培养基中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度为0.5mg/L至5.0mg/L。在仍其他实施方案中,含有大豆水解产物的一个批次的培养基中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度在0.5mg/L至2.0mg/L的范围内。在又另一个实施方案中,含有大豆水解产物的一个批次的培养基中鸟氨酸或腐胺的所希望浓度在0.5mg/L至1.8mg/L的范围内。

[0101] 在某些实施方案中,与通过在补充有含有浓度大于5mg/L的鸟氨酸或腐胺的大豆水解产物的培养基中培养细胞的方法制得的蛋白质制剂相比,多种蛋白质制剂的每种蛋白质制剂中产生的目的蛋白质的品质或某些聚糖的量得到改善。在某些实施方案中,每种蛋白质制剂展现出的改善的蛋白质品质可通过以下测量:目的蛋白上一个或多个氨基酸处糖基化的存在或不存在,目的蛋白上聚糖的量,目的蛋白上一个或多个糖基化位点处唾液酸的存在,或其组合。在一个实施方案中,蛋白质品质对应于培养中产生的蛋白质群中各个成员的糖基化状态。在某些实施方案中,在补充有大豆水解产物的培养基中培养细胞,通过调节培养中产生的蛋白质群中单个糖蛋白上存在的糖基化取代来改善品质,所述大豆水解产物具有浓度为5.0mg/L或更低的鸟氨酸或腐胺,或0.5mg/L至5.0mg/L的鸟氨酸或腐胺,或0.5mg/L至2.0mg/L的鸟氨酸或腐胺。

[0102] 在一个实施方案中,通过将来自多种蛋白质制剂的每个批次的蛋白质中至少一种聚糖分子的丰度与另一个批次的蛋白质中相同的一种或多种聚糖分子的丰度进行比较来确定蛋白质品质。如本文所用,术语“丰度”是指特别生产批中具有特别聚糖分子的蛋白质的百分比,或相对于生产批中所有类型的聚糖分子的量的具有特别聚糖分子的蛋白质的量。在一些实施方案中,所述聚糖分子选自下组,该组由以下组成:A1、A1F、A2、A2F、Man5、NA2、NA2F、NA2G1、NA2G1F、NGA2和NGA2FI。在特定的实施方案中,所述聚糖分子为A1(例如,图2的峰11)。

[0103] 通过本公开的细胞培养方法产生的目的蛋白显示出有利的品质特征。蛋白质品质可以,例如,通过使用本领域技术人员众所周知的方法来测量,如弱阳离子交换色谱、毛细管等电聚焦、尺寸排阻色谱、高效液相色谱(HPLC)、ELISA和/或western印迹分析。在一些实施方案中,蛋白质品质是通过质谱法测量的,诸如毛细管电泳质谱法(CE-MS)。在特定的实施方案中,蛋白质品质是通过比较来自多种蛋白质制剂的每个批次的蛋白质的质谱读数来确定的。

[0104] 通过对示例性生产批的荧光检测进行的高效液相色谱(HPLC)表明,从包括大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生的目的蛋白(糖蛋白)具有更一致的聚糖表达和糖基化模式,如本文表2-4所例示,所述大豆水解产物具有浓度为0.5mg/L至5.0mg/L的鸟氨酸或腐胺。

[0105] 低聚糖图谱分析

[0106] 糖蛋白上特异性N-连接的糖链的范围和分布可通过低聚糖谱分析确定。在一个实施方案中,所述糖蛋白用肽:N-糖苷酶F(PNGase F)去糖基化,以从天冬酰胺侧链上切割并除去N-连接的低聚糖。然后将所述低聚糖用荧光试剂(如氨基苊酸)衍生化。然后通过正相阴

离子交换HPLC分离这些糖链,并用荧光检测器对其进行检测,生成HPLC色谱图。

[0107] 在另一个实施方案中,作为整体碳水化合物表征分析的一部分,在还原和烷基化糖蛋白的胰蛋白酶消化之后分离出单个糖肽。通过如下分离单个胰蛋白酶糖肽:反相HPLC,与后续的C18柱耦合以根据需要增加分辨率。通过PNGase F消化将这些低聚糖从每个分离的糖肽中释放出来,用氨茴酸衍生化,并且通过荧光HPLC分析以获得所述糖蛋白的位点特异性低聚糖图谱。在所述糖蛋白为利纳西普(SEQ ID NO:1)的一个实施方案中,N37、N87、N91、N98处,任选地N176、N189、N279、N418、N511、N551、N567、N581、N615和N730处的天冬酰胺残基被糖基化。在一个实施方案中,利纳西普的N37、N98、N418和N511残基中的任一个或多个(与SEQ ID NO:1相关的残基位置)处含有A1低聚糖。在所述糖蛋白为阿柏西普(SEQ ID NO:2)的一个实施方案中,N36、N68、N123、N196和N282处的天冬酰胺残基被糖基化。在一个实施方案中,阿柏西普的残基N123和N196中的任一个或两个(与SEQ ID NO:2相关的残基位置)处含有A1低聚糖。

[0108] 在另一个实施方案中,来自所述糖蛋白的低聚糖池是通过用PNGase F对蛋白质进行去糖基化,随后进行氨茴酸衍生化并随后进行固相萃取(SPE)生成的。然后使用MALDI-TOF在负线性模式下以2,4,6-三羟基苯乙酮(THAP)为基质测量低聚糖的质量。

[0109] 根据重组蛋白中通常观察到的N-连接的聚糖的质量,将每个观察到的质量分配给独特的低聚糖结构。表1汇总了所有峰的预期质量分配。预期质量是基于所提出的N-连接的糖链结构而计算出的平均质量加上氨茴酸残基质量。单糖组合也基于所提出的N-连接的糖链结构而列出。

[0110] 在另一个实施方案中,使用毛细管电泳的定量低聚糖指纹测定来表征主题糖蛋白的N-聚糖(低聚糖)结构。使所述糖蛋白变性,并且然后通过用PNGase F处理使其去糖基化。然后通过除去蛋白质后进行沉淀来分离释放的低聚糖。分离的低聚糖池用荧光团8-氨基芴1,3,6-三磺酸盐(APTS)标记。然后通过毛细管电泳分离标记的低聚糖,并通过激光诱导荧光检测器使用488nm的激发波长和520nm的发射波长进行监测。

[0111] 如图2所描绘的,生成阿柏西普糖蛋白的电泳图,所有可量化的峰均已编号(在此例子中共21个峰)。确定低聚糖指纹的完整积分峰面积(总峰面积)。每种低聚糖的相对量可以通过将特别低聚糖的峰面积(例如,A1峰面积)除以总峰面积来确定。

[0112] 在一些实施方案中,主题糖蛋白的品质通过确定唾液酸化水平(每个糖蛋白的唾液酸残基的量)或岩藻糖基化水平(每个糖蛋白的岩藻糖残基的量)来评估。在一个实施方案中,使用定量HPLC测定来确定糖蛋白上的唾液酸总数。在该测定中,使用温和的酸水解作用将唾液酸从糖蛋白中释放出来,然后用邻苯二胺衍生化,通过HPLC进行分离,并用UV或荧光检测器检测。可以使用例如唾液乳糖相对于标准曲线评估唾液酸的定量。唾液酸含量根据释放的唾液酸摩尔数和反应中使用的糖蛋白摩尔数计算。

[0113] 在一个实施方案中,利纳西普糖蛋白的唾液酸含量为每1摩尔糖蛋白约30至70摩尔唾液酸(mol/mol)、约35至65mol/mol、30mol/mol、31mol/mol、32mol/mol、33mol/mol、34mol/mol、35mol/mol、36mol/mol、37mol/mol、38mol/mol、39mol/mol、40mol/mol、41mol/mol、42mol/mol、43mol/mol、44mol/mol、45mol/mol、46mol/mol、47mol/mol、48mol/mol、49mol/mol、50mol/mol、51mol/mol、52mol/mol、53mol/mol、54mol/mol、55mol/mol、56mol/mol、57mol/mol、58mol/mol、59mol/mol、60mol/mol、61mol/mol、62mol/mol、63mol/mol、

64mol/mol、65mol/mol、66mol/mol、67mol/mol、68mol/mol、69mol/mol或70mol/mol。

[0114] 在一个实施方案中,阿柏西普糖蛋白的唾液酸含量为每1摩尔糖蛋白约5至15摩尔唾液酸(mol/mol)、约8至12mol/mol、4mol/mol、5mol/mol、6mol/mol、7mol/mol、8mol/mol、9mol/mol、10mol/mol、11mol/mol、12mol/mol、13mol/mol、14mol/mol、15mol/mol、16mol/mol、17mol/mol、18mol/mol、19mol/mol或20mol/mol。

[0115] 在一个实施方案中,采用低聚糖图谱分析来确定糖蛋白上N-连接的糖链的唾液酸化程度和分布。将所述糖蛋白用PNGase F去糖基化,然后用荧光试剂氨基苧酸对其衍生化。然后通过正相阴离子交换HPLC将所述低聚糖分离,并用荧光检测器进行检测,以生成低聚糖图谱的HPLC色谱图。糖蛋白的Z数(其测量平均唾液酸化程度)由以下公式计算得出:

[0116]
$$(0S \ A*0) + (1SA*111 - (2SA*2) + (3SA*3) + \dots (nSA*n) \ 1 / (0SA + 15A + 2SA + 35A + \dots n5A)$$

[0117] 为了确定Z数,对低聚糖图谱中每个峰的面积进行积分。总唾液酸计算为0唾液酸/链峰乘以0,1唾液酸/链峰乘以1,2唾液酸/链峰乘以2,3唾液酸乘以3等等依此类推的面积总和。按照所有峰的面积总和生成糖链的总数。Z数为唾液酸总面积除以糖链总面积。

[0118] 在一个实施方案中,利纳西普糖蛋白的唾液酸Z数为约1.3-1.6、1.4-1.5、1.41-1.48、1.3、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59或1.60。

[0119] 在一个实施方案中,阿柏西普糖蛋白的唾液酸Z数为约0.5-2,1-1.5、1-1.2、0.5、0.51、0.52、0.53、0.54、0.55、0.56、0.57、0.58、0.59、0.6、0.61、0.62、0.63、0.64、0.65、0.66、0.67、0.68、0.69、0.7、0.71、0.72、0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.8、0.81、0.82、0.83、0.84、0.86、0.87、0.88、0.89、0.9、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99、1、1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.1、1.11、1.12、1.13、1.14、1.15、1.16、1.17、1.18、1.19、1.2、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29或1.3。

[0120] 实施例

[0121] 列举以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本文所述的方法和组合物,而并不意图限制诸位发明人视为其发明的范围。虽然已经努力确保关于所使用的数字(例如量、温度等)的准确性,但是仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是以摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。

[0122] 实施例1:筛选大豆水解产物以确定氨基酸浓度。

[0123] 称量大豆水解产物样品并将其20克部分溶解在1L水中至20g/L的起始浓度。然后将所得到的大豆水解产物溶液在水中进一步稀释至用于细胞培养的所希望浓度,并通过色谱法测定所得到的大豆水解产物溶液的分子组成。

[0124] 所述大豆水解产物样品中氨基酸的浓度通过离子交换柱上的色谱分析与柱后茚三酮检测来测量。参见,例如,Moore和Stein.J.Biol.Chem.(1954)第211卷第907-913页。将大豆水解产物样品稀释以允许从HPLC柱洗脱出的各个峰(氨基酸)的灵敏分离和分辨率并与标准品进行比较。将如图1A和图1B所示的色谱图的每个峰面积与标准品进行比较以确定

每种洗脱液的浓度。

[0125] 为了确定一个批次的大豆水解产物粉末是否含有小于0.67毫克鸟氨酸或腐胺/克大豆,将每种代表性样品的色谱图与标准品进行比较。例如,图1A显示了一个批次的大豆水解产物,洗脱液含有鸟氨酸,保留时间为89.02,与标准品相比,其揭示了相当于1.57mg鸟氨酸/g大豆的鸟氨酸的峰面积。图1B示出了一个批次的大豆水解产物,其鸟氨酸浓度小于0.67mg鸟氨酸/g大豆。选择每g大豆中含0.067与0.67mg之间的鸟氨酸的大豆水解产物批次用于细胞培养方法中,以生产具有批之间更一致的蛋白质糖基化的生物治疗性蛋白质。然而,在进一步的实验中使用了含有大于小于0.67mg鸟氨酸/g大豆的浓度的鸟氨酸的大豆水解产物批次,如下所述,以确定大豆水解产物鸟氨酸浓度对蛋白质生产的影响。

[0126] 实施例2:目的蛋白的表达和糖基化图谱。

[0127] 将表达陷阱蛋白(受体-Fc融合蛋白,VEGF-陷阱)的CHO细胞在专有培养基中培养,所述专有培养基包含含有不同量鸟氨酸、腐胺和瓜氨酸或其组合的大豆水解产物,以确定哪些氨基酸组分影响所生产的蛋白质的品质。表2显示,所述水解产物中的鸟氨酸水平与蛋白质生产批的品质呈负相关,如作为在补充有大豆水解产物的培养基中培养CHO细胞的结果而产生的蛋白质批的关键N-聚糖的曲线下面积增加所揭示的,所述大豆水解产物含有小于5.0mg/L的浓度的鸟氨酸,与瓜氨酸浓度无关。

[0128] 如表2和图3所示,与在包含多于5.0mg/L鸟氨酸、瓜氨酸或腐胺的培养基中培养的细胞相比,在包含2.0mg/L或更低的浓度的鸟氨酸的大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生的VEGF-陷阱蛋白产品批产生了品质更高的蛋白质产品。

[0129] 表2

[0130]	大豆氨基酸浓度	A1 N-聚糖相对量 (%曲线下面积)
	1.6 mg/L 鸟氨酸	12.5
	6.6 mg/L 鸟氨酸	9.8
	31.6 mg/L 鸟氨酸	9.3
	36.6 mg/L 腐胺	9.0
	1.6 mg/L 鸟氨酸; 0 mg/L 瓜氨酸	12.0
	1.6 mg/L 鸟氨酸; 30 mg/L 瓜氨酸	11.5
	31.6 mg/L 鸟氨酸; 0 mg/L 瓜氨酸	8.8

[0131] 使用色谱法基于众所周知的HPLC方法和荧光氨基酸(AA)标签对每批糖蛋白进行详细的聚糖分析(Anumula和Dhume,Glycobiology(1998)8(7)第685-694页),以确定鸟氨酸对蛋白质糖基化图谱是否有影响。如表3所示,在包含含有小于或等于0.67mg鸟氨酸/g大豆的大豆水解产物的培养基中培养细胞时,得到批之间更一致的蛋白质生产。更确切地,在包含所选择的大豆水解产物的培养基中培养的约90%的生产批满足FDA生产标准。相比之下,在包含具有多于5mg/L鸟氨酸的大豆水解产物的培养基中培养的生产批中的仅57%满足

FDA生产标准(特定N-聚糖峰的曲线下面积)。如表3所示,在包含具有0.67mg鸟氨酸/g大豆或更低的浓度的鸟氨酸的大豆水解产物的培养基中培养的细胞所产生的VEGF-陷阱蛋白产品批展现出增加的产品品质,且批之间品质更加一致。

[0132] 表3:

[0133]	mg 鸟氨酸 /g 大豆	聚糖量大于 10.5% (品质参 数) 的批次	合适的蛋白 质产品批	失败的蛋白 质产品批
	≤ 0.67	21	19/21	2/21
	> 0.67	4	4/7	3/7

[0134] 还将每个生产批与参考标准品进行比较(关于聚糖图谱),所述参考标准品代表示例性VEGF-陷阱蛋白的治疗上可接受的蛋白质批次。表4示出在补充有大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生的蛋白质批的代表性聚糖分析,得到的鸟氨酸的终浓度为0.5mg/L与2.0mg/L之间。与参考品相比,产生的各陷阱蛋白均包含一致的聚糖图谱,其峰在可接受范围内(75%的分析批)。相比之下,在补充有包含超出5.0mg/L鸟氨酸的大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生的每个批均未能满足FDA的接受标准。如表4所示,如A1 N-聚糖水平低于产品接受标准所证明的,与在包含具有大于5.0mg/L的鸟氨酸浓度的大豆水解产物的培养基中培养的细胞相比,在包含具有0.5mg/L至2.0mg/L或更低的鸟氨酸浓度的大豆水解产物的培养基中培养的细胞产生的蛋白质产品批产生了更高品质的批。

[0135] 表4:

[0136]

聚糖	A2	A2F	A1	A1F	NGA2 F	NA2G1 F	NA 2	NA2F	鸟氨酸 (mg/L)
产 品 批 接 受 标 准 (曲 线 下 面 积 %)	4-9	10-2 3	10-1 7	11-1 9	5-17	8-13	4-1 1	2-8	——
大 豆 水 解 产 物 批 次 #1	6.4	15.2	12.5	14.1	9.9	9.6	6.7	4.4	1.8
大 豆 水 解 产 物 批 次 #2	7.0	16.8	13.2	13.9	9.6	9.9	6.7	4.1	0.5
大 豆 水 解 产 物 批 次 #3	7.0	18.5	11.9	13.5	9.5	10.2	5.9	4	1.5
大 豆 水 解 产 物 批 次 #4	9.7	18.1	14.7	11.0	8.5	9.5	5.5	3.6	0.6
大 豆 水 解 产 物 批 次 #5	6.0	16.6	9.8	13.5	11.6	9.9	5.8	4.3	13.6
大 豆 水 解 产 物 批 次 #6	5.6	15.7	9.2	14.2	12.1	10.5	6.3	4.5	28.6

[0137] 图4显示了大豆水解产物中的鸟氨酸水平与糖蛋白(阿柏西普)品质之间的强负相关,如A1 N-聚糖水平所证明的。

[0138] 实施例3:糖蛋白生产滴度

[0139] 对16个大豆水解产物批关于其影响利纳西普的CHO细胞生产代谢组学的能力进行了测试。测量了大约426种大豆水解产物分析物,并将其与最终糖蛋白滴度和乳酸代谢进行了比较。图5描绘了大豆水解产物分析物与最大乳酸和最终糖蛋白滴度之间的相关性的负荷图。乳酸和糖蛋白滴度的测定证明与大豆水解产物中的鸟氨酸呈负相关。

[0140] 实施例4:通过掺加研究进行标记物确认

[0141] 图6A和图6B描绘了在对照培养基和补料条件下的CHO细胞培养物,它们接受了鸟氨酸或腐胺的掺加,以分别证明鸟氨酸和腐胺对细胞生长和糖基化的影响。表6B突出显示了在峰11处的影响,该处的影响特别明显。

[0142] 已经参考附图描述了本发明的实施方案,应当理解,本发明不限于精确的实施方案,并且本领域技术人员可以在不脱离如所附权利要求书所定义的本发明的范围或精神的情况下对其进行各种改变和修改。

序列表

<110> 再生元制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)

<120> 用于制备糖蛋白的细胞培养工艺

<130> REGE-009/P02US

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 879

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 合成

<400> 1

[0001]

Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met Arg Gln Ile Gln
1 5 10 15

Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro Leu Phe Glu His
20 25 30

Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala Gly Leu Thr Leu
35 40 45

Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu Glu Pro Ile Asn
50 55 60

Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys Asp Val Leu Trp
65 70 75 80

Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Met Leu
85 90 95

Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro Leu Glu Val Val

	100	105	110
	Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu Pro Val His Lys		
	115	120	125
	Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys Pro Asn Val Asp		
	130	135	140
	Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr Trp Tyr Met Gly		
	145	150	155 160
	Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro Glu Gly Met Asn		
	165	170	175
	Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Cys		
	180	185	190
[0002]	Val Val Thr Tyr Pro Glu Asn Gly Arg Thr Phe His Leu Thr Arg Thr		
	195	200	205
	Leu Thr Val Lys Val Val Gly Ser Pro Lys Asn Ala Val Pro Pro Val		
	210	215	220
	Ile His Ser Pro Asn Asp His Val Val Tyr Glu Lys Glu Pro Gly Glu		
	225	230	235 240
	Glu Leu Leu Ile Pro Cys Thr Val Tyr Phe Ser Phe Leu Met Asp Ser		
	245	250	255
	Arg Asn Glu Val Trp Trp Thr Ile Asp Gly Lys Lys Pro Asp Asp Ile		
	260	265	270
	Thr Ile Asp Val Thr Ile Asn Glu Ser Ile Ser His Ser Arg Thr Glu		
	275	280	285
	Asp Glu Thr Arg Thr Gln Ile Leu Ser Ile Lys Lys Val Thr Ser Glu		
	290	295	300

	Asp	Leu	Lys	Arg	Ser	Tyr	Val	Cys	His	Ala	Arg	Ser	Ala	Lys	Gly	Glu	
	305						310				315					320	
	Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Pro	Arg	Tyr	
				325						330					335		
	Thr	Val	Glu	Lys	Cys	Lys	Glu	Arg	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Leu	Val	Ser	
				340					345					350			
	Ser	Ala	Asn	Glu	Ile	Asp	Val	Arg	Pro	Cys	Pro	Leu	Asn	Pro	Asn	Glu	
			355					360					365				
	His	Lys	Gly	Thr	Ile	Thr	Trp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr	Pro	Val	
		370					375					380					
	Ser	Thr	Glu	Gln	Ala	Ser	Arg	Ile	His	Gln	His	Lys	Glu	Lys	Leu	Trp	
	385					390				395					400		
[0003]	Phe	Val	Pro	Ala	Lys	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	His	Tyr	Tyr	Cys	Val	Val	
					405					410					415		
	Arg	Asn	Ser	Ser	Tyr	Cys	Leu	Arg	Ile	Lys	Ile	Ser	Ala	Lys	Phe	Val	
				420					425					430			
	Glu	Asn	Glu	Pro	Asn	Leu	Cys	Tyr	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Phe	Lys	Gln	
			435					440					445				
	Lys	Leu	Pro	Val	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Val	Cys	Pro	Tyr	Met	Glu	
		450					455					460					
	Phe	Phe	Lys	Asn	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu	Pro	Lys	Leu	Gln	Trp	Tyr	Lys	
	465					470					475				480		
	Asp	Cys	Lys	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Asn	Ile	His	Phe	Ser	Gly	Val	Lys	
					485					490					495		
	Asp	Arg	Leu	Ile	Val	Met	Asn	Val	Ala	Glu	Lys	His	Arg	Gly	Asn	Tyr	

	500	505	510
	Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr		
	515	520	525
	Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro		
	530	535	540
	Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser		
	545	550	555 560
	Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala		
	565	570	575
	Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu		
	580	585	590
[0004]	Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser		
	595	600	605
	Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr		
	610	615	620
	Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala		
	625	630	635 640
	Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Ser Gly Asp Lys Thr		
	645	650	655
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
	660	665	670
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	675	680	685
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	690	695	700

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
705 710 715 720

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
725 730 735

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
740 745 750

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
755 760 765

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
770 775 780

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
785 790 795 800

[0005]

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
805 810 815

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
820 825 830

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
835 840 845

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
850 855 860

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
865 870 875

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 合成

<400> 2

Ser Asp Thr Gly Pro Arg Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
1 5 10 15

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
20 25 30

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
35 40 45

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
50 55 60

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
65 70 75 80

[0006]

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
85 90 95

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile
100 105 110

Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr
115 120 125

Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys
130 135 140

His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly
145 150 155 160

Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr
165 170 175

Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met

	180	185	190
	Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr		
	195	200	205
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
	210	215	220
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	225	230	235 240
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	245	250	255
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	260	265	270
[0007]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	275	280	285
	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	290	295	300
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	305	310	315 320
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	325	330	335
	Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
	340	345	350
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
	355	360	365
	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	370	375	380

	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
	385						390				395					400
[0008]	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
					405					410					415	
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
				420					425					430		

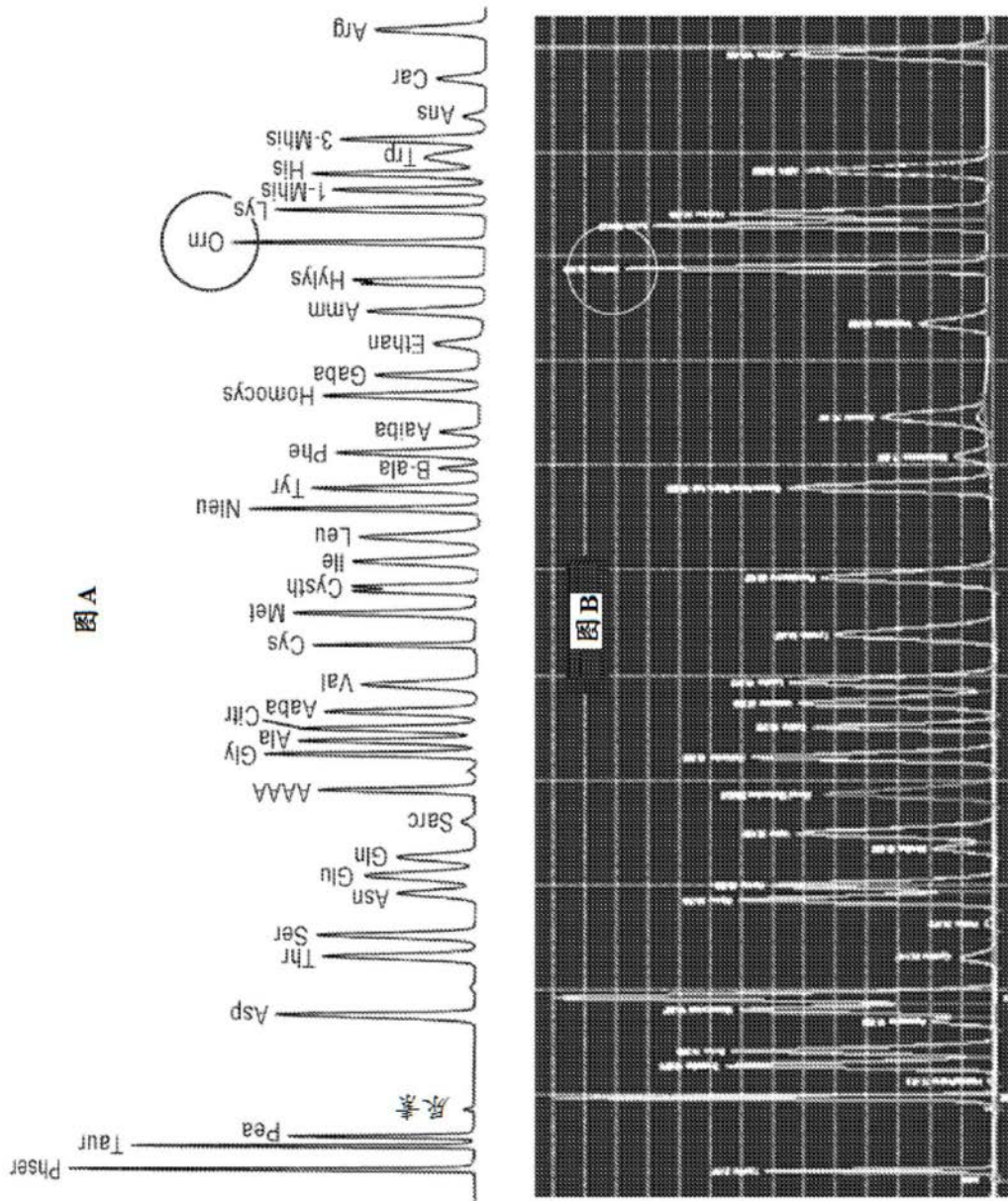


图1

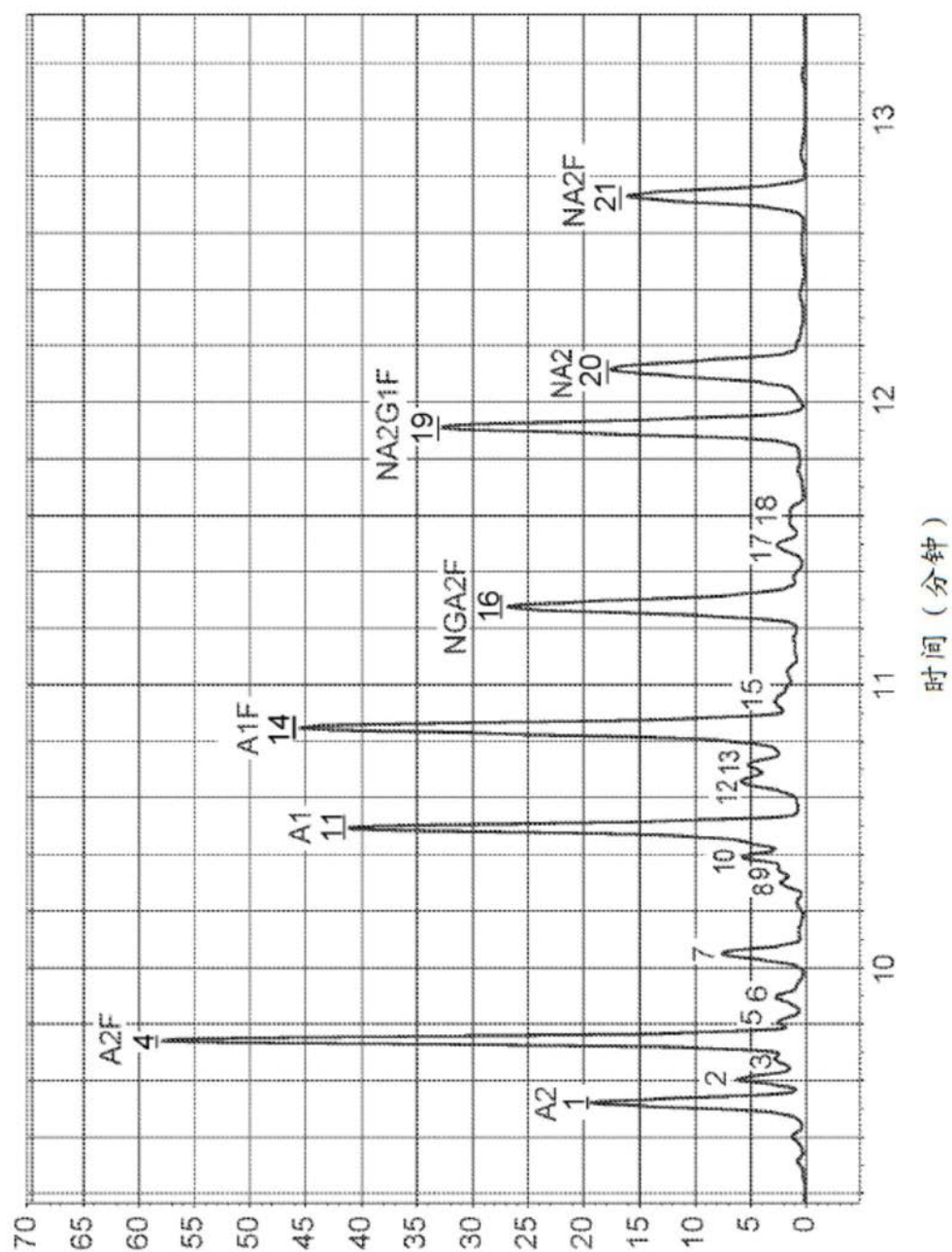


图2

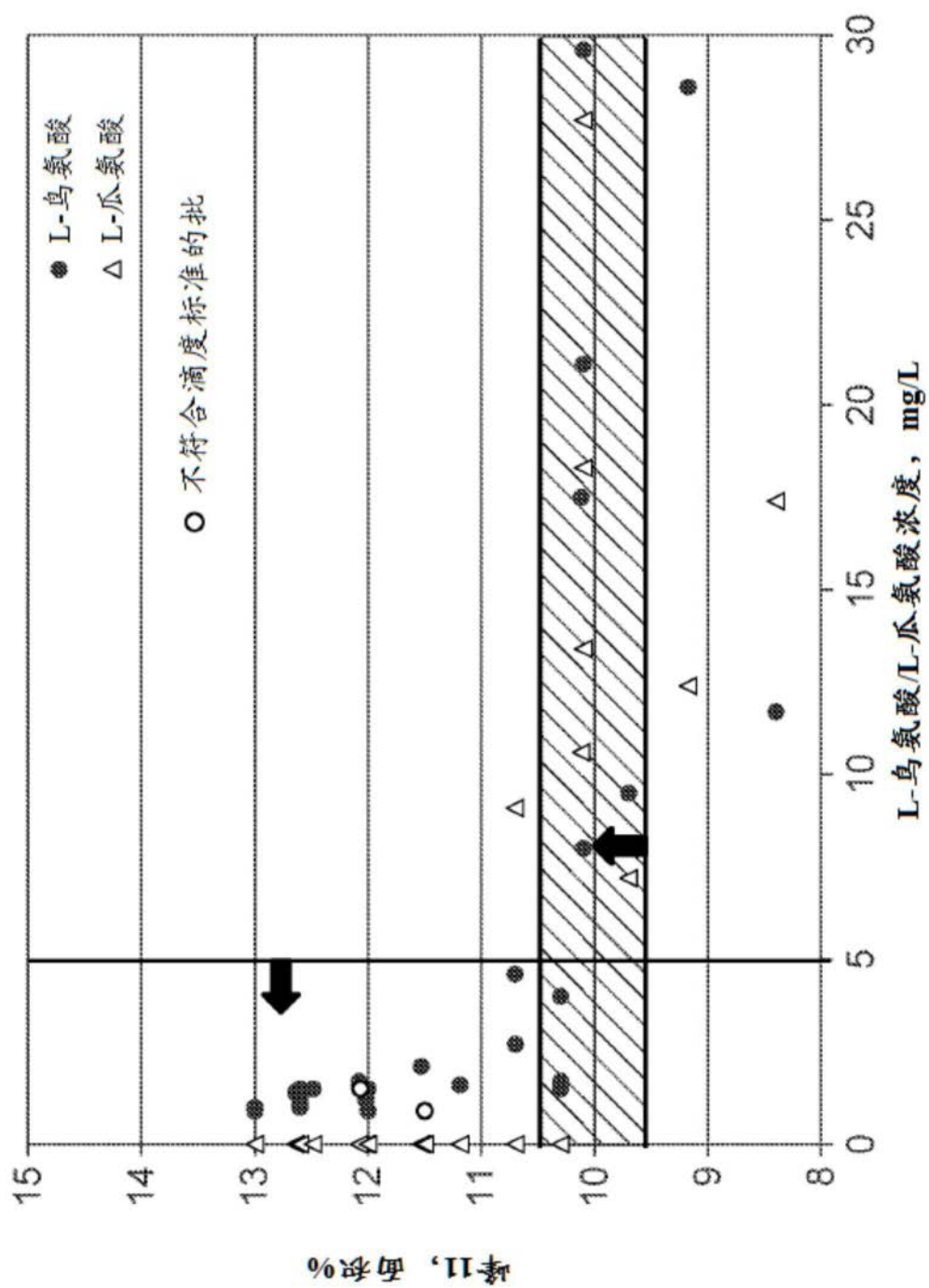


图3

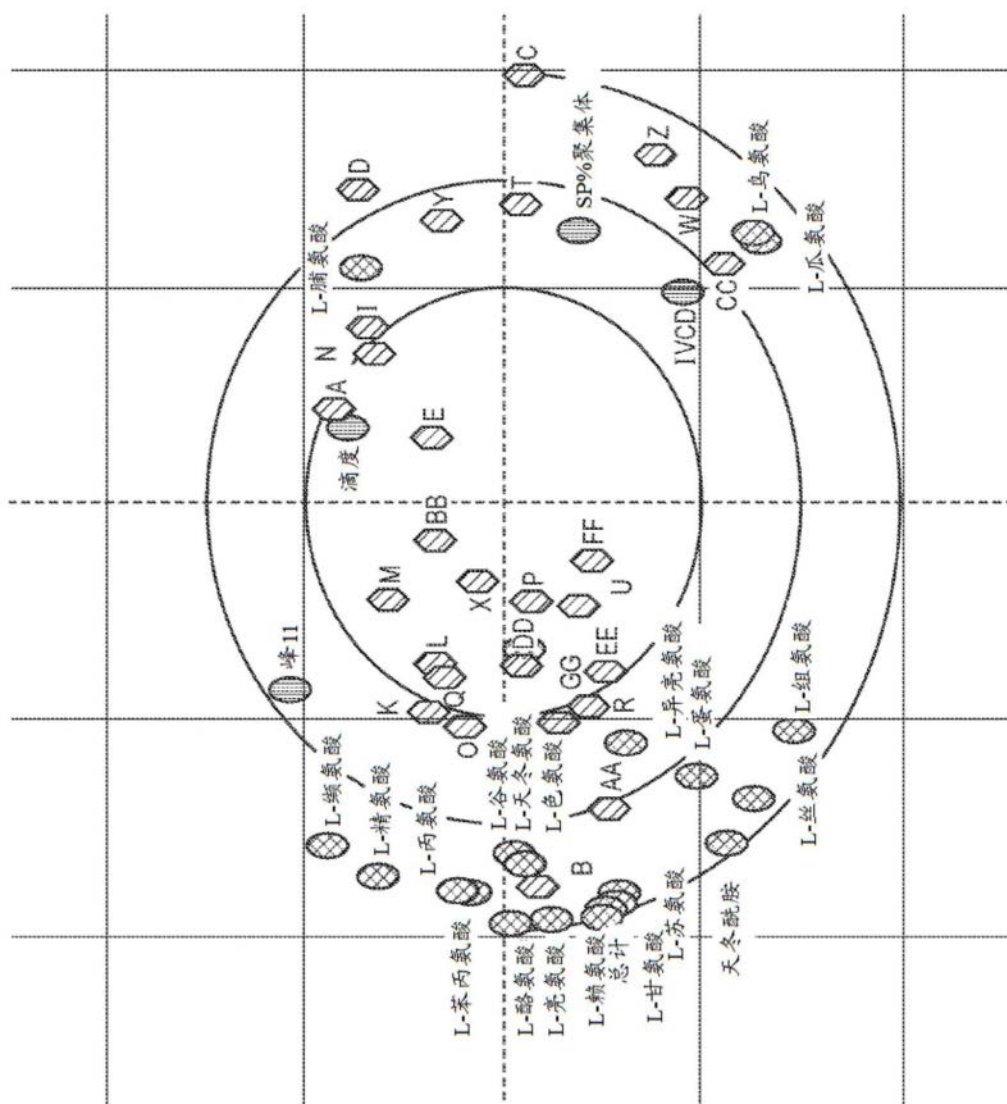


图4

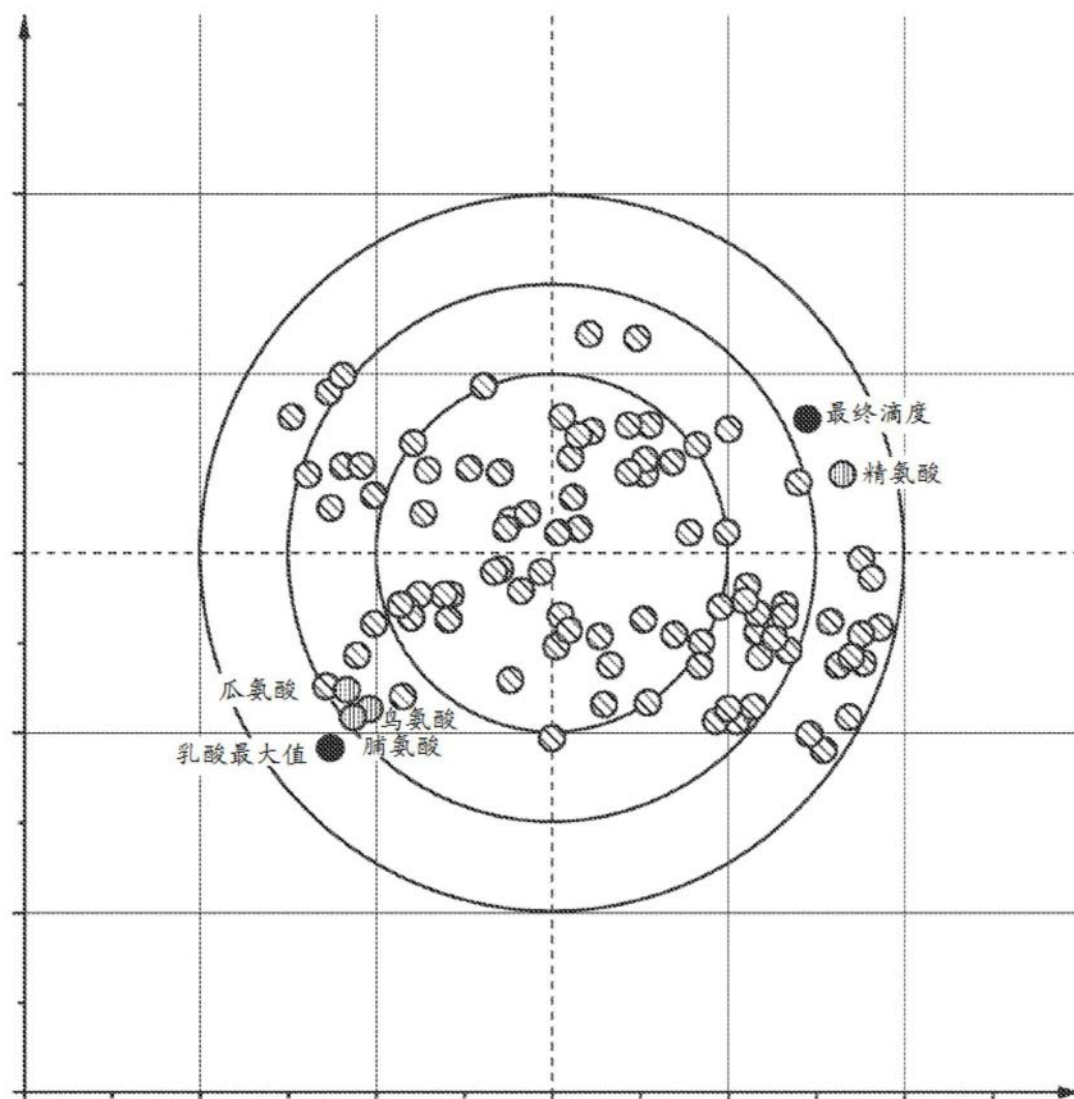


图5

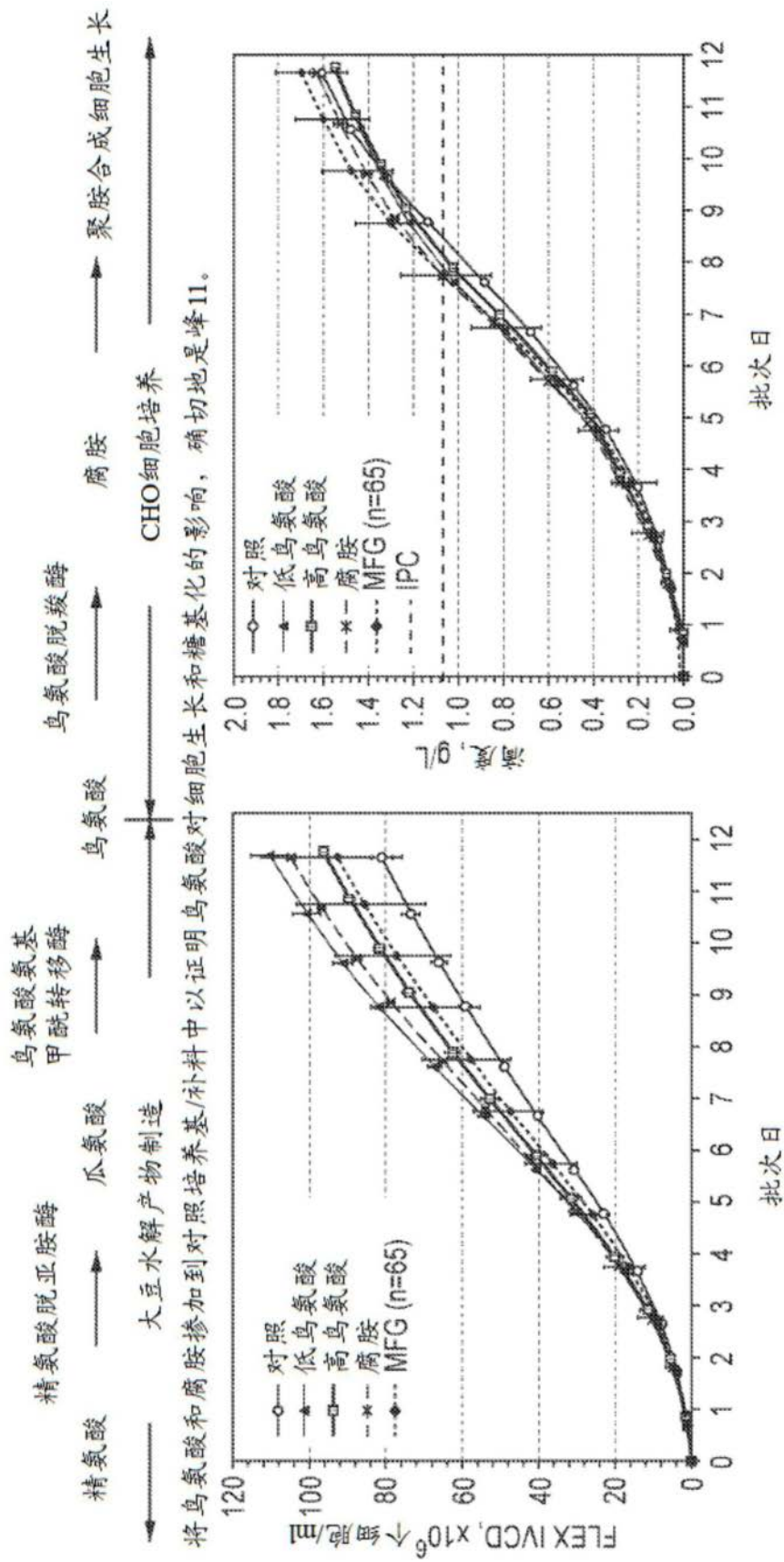


图6A

条件	对照	低鸟氨酸添加	高鸟氨酸添加	腐胺添加
浓度, mg/L	1.6	6.6	31.6	36.6
滴度, g/L	1.61	1.55	1.55	1.63
IVCD, x10 ⁶ 个细胞-天/ml	80.9	110.4	96.2	104.8
峰11, %	12.5	9.8	9.3	9.0

图6B