



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I734775 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：106113819

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 04 月 25 日

(51)Int. Cl. : C12N5/07 (2010.01)

C12N15/85 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

(30)優先權：2016/04/26 美國

62/327,964

(71)申請人：美商美國泰福生技股份有限公司(美國) TANVEX BIOPHARMA USA, INC. (US)
美國(72)發明人：萊柏 克里斯多夫 T LEBER, CHRISTOPHER T. (US)；沈 麥克 W Y SHEN,
MICHAEL W. Y. (US)；陶伊文 TAO, YIWEN (CN)；莫瑞 休 尤金 四世
MURRAY, HUGH EUGENE IV (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Yoichi Ishii, et al. " Titer of trastuzumab produced by a Chinese hamster ovary cell line is associated with tricarboxylic acid cycle activity rather than lactate metabolism" Journal of Bioscience and Bioengineering, April 2015, Vol: 119, No: 4, Page(s): 478-485

Tae Kwang Ha, et al. "Effect of lithium chloride on the production and sialylation of Fc-fusion protein in Chinese hamster ovary cell culture" Appl Microbiol Biotechnol, 19 August 2014, Vol: 98, No: 22, Page(s): 9239-9248.

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：20 共 100 頁

(54)名稱

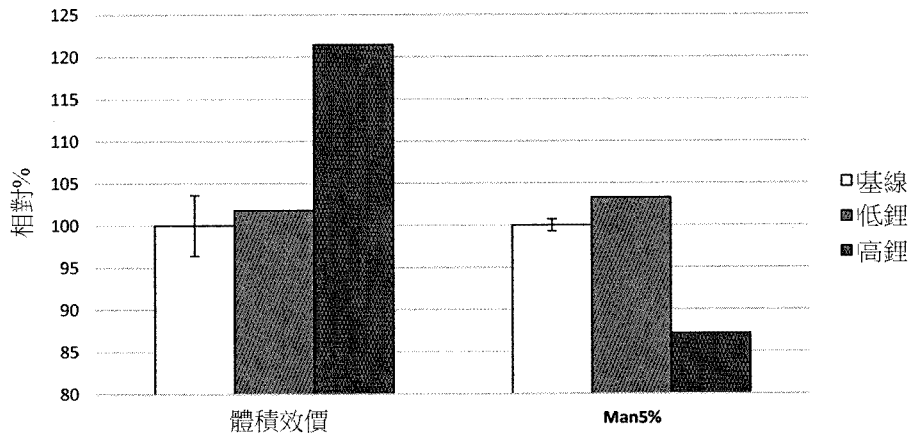
細胞培養基

(57)摘要

本文特別提供用於培養哺乳動物細胞之組合物及方法。在某些態樣中，該組合物為含有鋰離子源、一或多種脂肪酸及/或乙醇中之一或多者的培養基。使用本文所述之任何細胞培養基培養已經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽(例如抗體)的細胞，與在不含鋰離子源、一或多種脂肪酸及/或乙醇中之一或多者的培養基中培養的細胞相比，可使得效價升高、糖基化概況更有利、及/或調節(例如降低)高分子量及低分子量種類的量、及/或調節(例如降低)酸性或鹼性電荷變異體的量。

Provided herein, inter alia, are compositions and methods for culturing mammalian cells. In certain aspects, the composition is a medium containing one or more of a lithium ion source, one or more fatty acids, and/or ethanol. Use of any of the cell culture media described herein to culture cells that have been genetically engineered to produce one or more recombinant polypeptides (for example, antibodies) can result in increased titers, a more favorable glycosylation profile, and/or modulated (e.g. decreased) amounts of high and low molecular weight species, and/or modulated (e.g. decreased) amounts of acidic or basic charge variants, compared to cells cultured in a medium that does not contain one or more of a lithium ion source, one or more fatty acids, and/or ethanol.

指定代表圖：



【圖2】



申請日：

IPC分類：

I734775

【發明摘要】

【中文發明名稱】

細胞培養基

【英文發明名稱】

CELL CULTURE MEDIUM

【中文】

本文特別提供用於培養哺乳動物細胞之組合物及方法。在某些態樣中，該組合物為含有鋰離子源、一或多種脂肪酸及/或乙醇中之一或多者的培養基。使用本文所述之任何細胞培養基培養已經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽(例如抗體)的細胞，與在不含鋰離子源、一或多種脂肪酸及/或乙醇中之一或多者的培養基中培養的細胞相比，可使得效價升高、糖基化概況更有利、及/或調節(例如降低)高分子量及低分子量種類的量、及/或調節(例如降低)酸性或鹼性電荷變異體的量。

【英文】

Provided herein, *inter alia*, are compositions and methods for culturing mammalian cells. In certain aspects, the composition is a medium containing one or more of a lithium ion source, one or more fatty acids, and/or ethanol. Use of any of the cell culture media described herein to culture cells that have been genetically engineered to produce one or more recombinant polypeptides (for example, antibodies) can result in increased titers, a more favorable glycosylation profile, and/or modulated (*e.g.* decreased) amounts of high and low molecular weight species, and/or modulated (*e.g.* decreased) amounts of acidic or basic charge variants, compared to cells cultured in a medium that does not contain one or more of a lithium

ion source, one or more fatty acids, and/or ethanol.

【指定代表圖】

圖2

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細胞培養基

【英文發明名稱】

CELL CULTURE MEDIUM

【技術領域】

本發明大體上係關於細胞培養基及使用其產生有用的培養細胞衍生產物之方法的領域。

【先前技術】

商業生產細胞培養物衍生產物(例如，基於蛋白質之產物，諸如單株抗體(mAb))需要使細胞培養物參數最佳化，以便細胞產生足以滿足臨床及商業需求的產物。然而，當細胞培養物參數經最佳化以提高蛋白質產物之生產率時，同樣必需維持產物所需的品質規格，諸如糖基化概況、聚集水準、電荷不均勻性及胺基酸序列完整性(Li等人, 2010, *mAbs.*, 2(5):466-477)。

舉例而言，超過20%的體積效價升高使得大規模單株抗體生產經濟顯著改善。另外，控制細胞培養物中產生之蛋白質的聚糖形式的能力是重要的。已顯示聚糖種類顯著影響諸如mAb之治療性蛋白質的藥物動力學(PK)及藥效學(PD)。此外，調節各種聚糖種類之相對百分比的能力可使得活體內蛋白質行為劇變。舉例而言，已顯示甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2(「Man5」)及其他高甘露糖聚糖種類的增加降低mAb活體內半衰期(Liu, 2015, *J Pharm Sci.*, 104(6):1866-84 ; Goetze等人, 2011, *Glycobiology*, 21(7):949-59 ; 及 Kanda等人 2007, *Glycobiology*,

17(1):104-18)。另一方面，已顯示具有甘露糖-3-N-乙醯基葡糖胺-4(「G0」)聚糖種類之糖基化mAb影響抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

已成功採用生物反應器使用分批進料、固定、灌注及連續模式基於細胞產生治療性蛋白質。諸如溫度使用、培養基調配(包括添加生長抑制劑、自分泌因子或環狀單核苷酸)及藉由滲透壓過度刺激之策略已用於增強培養物中細胞的蛋白質產生。在完全起作用的程度上，此等方法僅已顯示略有成效。

因此，特別需要經改良的組合物用於細胞培養物以產生醫學上或工業上有用的產物，諸如抗體。理想地，此類組合物及利用其之方法將使得細胞培養物之衍生產物具有較高效價、經調節(例如降低)之高分子量及低分子量種類以及更有利的糖基化概況。

在本說明書通篇，提及各種專利、專利申請案及其他類型之出版物(例如，雜誌文章、電子資料庫條目等)。本文中所列舉之所有專利、專利申請案及其他出版物的揭示內容以全文引用的方式併入本文中用於所有目的。

【發明內容】

本文所提供之本發明特別揭示用於培養哺乳動物細胞之組合物及方法。在某些態樣中，組合物為含有鋰離子源、一或多種脂肪酸及/或乙醇中之一或多者的培養基。使用本文所述之任何細胞培養基培養已經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽(例如抗體)的細胞，與使用不含鋰離子源、一或多種脂肪酸及/或乙醇中之一或多者的培養基相比，可使得效價升高、調節糖基化概況、調節酸性或鹼性電荷種類的量及/或調節高分子量及低分子量種類的量。

因此，在一些態樣中，本文提供一種用於培養哺乳動物細胞之培養基，其包含：(a) (i)基礎培養基或(ii)進料培養基；及(b)一或多種鋰離子源。在一些實施例中，細胞已經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，培養基另外包含(c)乙醇；及/或(d)一或多種脂肪酸。在一些實施例中，該一或多種脂肪酸係選自由以下組成之群：油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸及硬脂酸。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種鋰離子源係選自乙酸鋰、氯化鋰、碳酸鋰、氧基丁酸鋰、乳清酸鋰、溴化鋰、檸檬酸鋰、氟化鋰、碘化鋰、硝酸鋰及硫酸鋰中之一或多者之群。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該等鋰離子係以約0.1 μM 至約25 mM 之濃度存在。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽之效價與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生的重組多肽之效價相比有所升高。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的高分子量種類的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的低分子量種類的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的糖基化概況(例如糖基化的量)與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節。在一些實施例中，該經調節之糖基化包含經調節(例如降低)之末端甘露糖聚糖種類。在一些實施例中，該經調節之糖基化包含調節選自以下之一或多個聚糖種類：甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-6-N-

乙醯基葡萄糖胺-2 (Man6)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-海藻糖(G0F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖(G1F)或甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的酸性或鹼性電荷變異體的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，乙醇係以約0.001%至約4% (v/v)之濃度存在。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，一或多種脂肪酸係以約1 μ M至約4 mM (諸如約1 μ M、10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M、500 μ M、600 μ M、700 μ M、800 μ M、900 μ M、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM或4 mM中之任一者，包括落在此等數目之間的所有值)之濃度(諸如每日進料濃度)存在。

在其他態樣中，本文提供一種用於培養哺乳動物細胞之培養基，其包含：(a) (i)基礎培養基或(ii)進料培養基；及(b)乙醇。在一些實施例中，細胞已經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，培養基另外包含(c)一或多種脂肪酸。在一些實施例中，該一或多種脂肪酸係選自丁酸(C4)、戊酸(C5)、己酸(C6)、庚酸(C7)、辛酸(C8)、壬酸(C9)、癸酸(C10)、十一酸(C11)、月桂酸(C12)、十三酸(C13)、肉豆蔻酸(C14)、十五酸(C15)、棕櫚酸(C16)、十七酸(C17)、硬脂酸(C18)、十九酸(C19)、花生酸(C20)、二十一酸(C21)、二十二酸(C22)、二十三酸(C23)、二十四酸(C24)、二十五酸(C25)、蠟酸(C26)、二十七酸(C27)、二十八酸(C28)、二十九酸(C29)、

三十酸(C30)、三十一酸(C31)、三十二酸(C32)、三十三酸(C33)、三十四酸(C34)、三十五酸(C35)、三十六酸(C36)、三十七酸(C37)或三十八酸(C38)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，乙醇係以約0.001%至約4% (v/v)之濃度存在。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽之效價與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生的重組多肽之效價相比有所升高。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的高分子量種類的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的低分子量種類的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的糖基化概況(例如糖基化的量)與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節。在一些實施例中，該經調節之糖基化包含經調節(例如降低)之末端甘露糖聚糖種類。在一些實施例中，經調節之糖基化包含調節選自以下之一或多個聚糖種類：甘露糖-5-N-乙醯基葡糖胺-2 (Man5)、甘露糖-6-N-乙醯基葡糖胺-2 (Man6)、甘露糖-3-N-乙醯基葡糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡糖胺-4-海藻糖(G0F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖(G1F)或甘露糖-3-N-乙醯基葡糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的酸性或鹼性電荷變異體的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，一或多種脂肪酸係以約1 μ M

至約4 mM (諸如約1 μ M、10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M、500 μ M、600 μ M、700 μ M、800 μ M、900 μ M、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM或4 mM中之任一者，包括落在此等數目之間的所有值)之濃度(諸如每日進料濃度)存在。

在其他態樣中，本文提供一種用於培養哺乳動物細胞之培養基，其包含：(a) (i)基礎培養基或(ii)進料培養基；及(b)一或多種脂肪酸。在一些實施例中，細胞已經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，一或多種脂肪酸係以約1 μ M - 1 mM之每日進料濃度存在。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的高分子量種類之量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的低分子量種類之量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多肽的糖基化概況(例如糖基化的量)與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節。在一些實施例中，該經調節之糖基化包含經調節(例如降低)之末端甘露糖聚糖種類。在一些實施例中，經調節之糖基化包含調節選自以下之一或多個聚糖種類：甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖 (G1F)或甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，由該等細胞產生之該一或多種重組多

肽的酸性或鹼性電荷變異體的量與由不在該培養基中培養之哺乳動物細胞產生之重組多肽相比有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽之糖基化概況與不在該培養基中培養之哺乳動物細胞相比有所調節(例如改變)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，脂肪酸為瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及/或肉豆蔻酸中之一或多者。

在其他態樣中，本文提供一種由經工程改造之哺乳動物細胞產生一或多種重組多肽的方法，該方法包含：(a)在本文所揭示之任何細胞培養基中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養該經工程改造之哺乳動物細胞；及(b)產生該一或多種重組多肽。在一些實施例中，該方法另外包含(c)分離該一或多種重組多肽。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，培養基為基礎培養基。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，培養基為進料培養基。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽為抗體或其片段。在一些實施例中，該抗體為單株抗體。在一些實施例中，單株抗體抑制增生細胞的生長。在一些實施例中，該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/科星蛋白酶9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)、達比加群(dabigatran)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4

(CTLA4)、介白素-5 (IL-5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌(*B. anthracis*)之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6 (IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (delta like ligand 4, DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子(Von Willebrand factor, vWF)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 $\alpha_4\beta_7$ 。在一些實施例中，該單株抗體為曲妥珠單抗(trastuzumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、貝伐單抗(bevacizumab)、蘭比珠單抗(ranibizumab)、那他珠單抗(natalizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、阿侖單抗(alemtuzumab)、達利珠單抗(daclizumab)、依法利珠單抗(efalizumab)、戈利木單抗(golimumab)、賽妥珠單抗(certolizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕利珠單抗(palivizumab)、阿昔單抗(abciximab)、巴利昔單抗(basiliximab)、替伊莫單抗(ibritumomab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、依庫麗單抗(eculizumab)、阿昔單抗(abciximab)、阿利若單抗(alirocumab)、巴利昔單抗(basiliximab)、貝利單抗(belimumab)、布林莫單抗(blinatumomab)、貝倫妥單抗(brentuximab)、康納單抗(canakinumab)、卡羅單抗(capromab)、達土木單抗(daratumumab)、德諾單抗(denosumab)、迪奴圖單抗(dinutuximab)、依庫麗單抗、埃羅妥珠單

抗 (elotuzumab) 、 依 伏 洛 單 抗 (evolocumab) 、 艾 達 西 單 抗 (idarucizumab) 、 伊 匹 單 抗 (ipilimumab) 、 美 泊 利 單 抗 (mepolizumab) 、 耐 昔 妥 珠 單 抗 (necitumumab) 、 尼 沃 單 抗 (nivolumab) 、 奧 妥 珠 單 抗 (obinutuzumab) 、 奧 法 木 單 抗 (ofatumumab) 、 帕 利 珠 單 抗 (palivizumab) 、 派 姆 單 抗 (pembrolizumab) 、 雷 莫 蘆 單 抗 (ramucirumab) 、 瑞 西 巴 單 抗 (raxibacumab) 、 依 庫 其 單 抗 (ecukinumab) 、 思 圖 昔 單 抗 (siltuximab) 、 托 珠 單 抗 (tocilizumab) 、 優 特 克 單 抗 (ustekinumab) 、 阿 西 珠 單 抗 (alacizumab) 、 德 諾 單 抗 (denosumab) 、 布 洛 蘇 單 抗 (blosozumab) 、 洛 莫 松 單 抗 (romosozumab) 、 司 他 莫 單 抗 (stamulumab) 、 阿 利 若 單 抗 (alirocumab) 、 阿 斯 科 林 單 抗 (ascrinvacumab) 、 伊 諾 替 珠 單 抗 (enoticumab) 、 艾 維 那 單 抗 (evinacumab) 、 依 伏 洛 單 抗 (evolocumab) 、 依 庫 克 單 抗 (icrucumab) 、 因 克 拉 單 抗 (inclacumab) 、 內 斯 瓦 庫 單 抗 (nesvacumab) 、 奧 替 庫 單 抗 (orticumab) 、 雷 莫 蘆 單 抗 、 瑞 奴 庫 單 抗 (rinucumab) 、 韋 森 庫 單 抗 (vesencumab) 、 玻 可 昔 單 抗 (bococizumab) 、 卡 普 拉 單 抗 (caplacizumab) 、 登 西 珠 單 抗 (demcizumab) 、 埃 達 珠 單 抗 (etaracizumab) 、 艾 達 西 單 抗 、 拉 帕 珠 單 抗 (ralpancizumab) 、 他 度 珠 單 抗 (tadocizumab) 、 阿 杜 卡 單 抗 (aducanumab) 、 阿 提 努 單 抗 (atinumab) 、 法 神 單 抗 (fasinumab) 、 弗 蘭 努 單 抗 (fulranumab) 、 甘 特 羅 單 抗 (gantenerumab) 、 歐 匹 西 單 抗 (opicinumab) 、 貝 頻 珠 單 抗 (bapineuzumab) 、 克 雷 內 單 抗 (crenezumab) 、 歐 紮 尼 單 抗 (ozanezumab) 、 泊 尼 株 單 抗 (ponezumab) 、 瑞 法 尼 單 抗 (refanezumab) 、 索 拉 珠 單 抗 (solanezumab) 、 他 尼 珠 單 抗 (tanezumab) 及 維 多 珠 單 抗 (vedolizumab) 。

在另一態樣中，本文提供用於調節由經遺傳工程改造之哺乳動物細

胞產生之一或多種重組多肽的糖基化概況的方法，該方法包含：(a)在本文所揭示之任何細胞培養基中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養該哺乳動物細胞；及(b)產生該一或多種重組多肽，其中該一或多種重組多肽與由不在本文所揭示之任何細胞培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽相比，具有經調節之糖基化概況。在一些實施例中，該經調節之糖基化概況包含經調節(例如降低)之末端甘露糖聚糖種類。在一些實施例中，該經調節之糖基化包含調節選自以下之一或多個聚糖種類：甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-6-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man6)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-海藻糖 (G0F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖(G1F)及/或甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，末端甘露糖聚糖種類比聚糖種類總和之比率經調節(例如降低)約40%至約50%。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽為抗體或其片段。在一些實施例中，該抗體為單株抗體。在一些實施例中，單株抗體抑制增生細胞的生長。在一些實施例中，該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/科星蛋白酶9型(PCSK9)、達比加群、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、介白素-5 (IL-5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6

(IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子(vWF)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 $\alpha_4\beta_7$ 。在一些實施例中，單株抗體為曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、英利昔單抗、阿達木單抗、貝伐單抗、蘭比珠單抗、那他珠單抗、利妥昔單抗、阿侖單抗、達利珠單抗、依法利珠單抗、戈利木單抗、賽妥珠單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗、帕利珠單抗、阿昔單抗、巴利昔單抗、替伊莫單抗、奧馬珠單抗、依庫麗單抗、阿昔單抗、阿利若單抗、巴利昔單抗、貝利單抗、布林莫單抗、貝倫妥單抗、康納單抗、卡羅單抗、達土木單抗、德諾單抗、迪奴圖單抗、依庫麗單抗、埃羅妥珠單抗、依伏洛單抗、艾達西單抗、伊匹單抗、美泊利單抗、耐昔妥珠單抗、尼沃單抗、奧妥珠單抗、奧法木單抗、帕利珠單抗、派姆單抗、雷莫蘆單抗、瑞西巴單抗、依庫其單抗、思圖昔單抗、托珠單抗、優特克單抗、阿西珠單抗、德諾單抗、布洛蘇單抗、洛莫松單抗、司他莫單抗、阿利若單抗、阿斯科林單抗、伊諾替珠單抗、艾維那單抗、依伏洛單抗、依庫克單抗、因克拉單抗、內斯瓦庫單抗、奧替庫單抗、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗、韋森庫單抗、玻可昔單抗、卡普拉單抗、登西珠單抗、埃達珠單抗、艾達西單抗、拉帕珠單抗、他度珠單抗、阿杜卡單抗、阿提努單抗、法神單抗、弗蘭努單抗、甘特羅單抗、歐匹西單抗、貝頻珠單抗、克雷內單抗、歐紮尼單抗、泊尼株單抗、瑞法尼單抗、

索拉珠單抗、他尼珠單抗及維多珠單抗。

在另一態樣中，本文提供用於調節(例如減少)由經工程改造之哺乳動物細胞產生之一或多種重組多肽的高分子量或低分子量種類的量的方法，該方法包含：(a)在本文所揭示之任何細胞培養基中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養該哺乳動物細胞；及(b)產生該一或多種重組多肽，其中該一或多種重組多肽與由不在本文所揭示之任何細胞培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽相比，高分子量或低分子量種類的量有所減少。在一些實施例中，該一或多種重組多肽的高分子量種類的量減少。在一些實施例中，該一或多種重組多肽的低分子量種類的量減少。在一些實施例中，該低分子量種類包含未完全組裝及/或摺疊的多肽片段。在一些實施例中，該高分子量種類包含大於一個次單位的重組多肽。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，低分子量種類比所有(1)非聚集體；(2)低分子量種類；及(3)高分子量種類之總和的特定百分比比率，與由不在本文所揭示之任何細胞培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽相比，相對於特定百分比比率有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，高分子量種類比所有(1)非聚集體；(2)低分子量種類；及(3)高分子量種類之總和的特定百分比比率，與由不在本文所揭示之任何細胞培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽相比，相對於特定百分比比率有所調節(例如降低)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽為抗體或其片段。在一些實施例中，該抗體為單株抗體。在一些實施例中，單株抗體抑制增生細胞的生長。在一些實施例中，該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖

蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/科星蛋白酶9型(PCSK9)、達比加群、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、介白素-5 (IL-5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6 (IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子(vWF)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 $\alpha_4\beta_7$ 。在一些實施例中，該單株抗體為曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、英利昔單抗、阿達木單抗、貝伐單抗、蘭比珠單抗、那他珠單抗、利妥昔單抗、阿侖單抗、達利珠單抗、依法利珠單抗、戈利木單抗、賽妥珠單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗、帕利珠單抗、阿昔單抗、巴利昔單抗、替伊莫單抗、奧馬珠單抗、依庫麗單抗、阿昔單抗、阿利若單抗、巴利昔單抗、貝利單抗、布林莫單抗、貝倫妥單抗、康納單抗、卡羅單抗、達土木單抗、德諾單抗、迪奴圖單抗、依庫麗單抗、埃羅妥珠單抗、依伏洛單抗、艾達西單抗、伊匹單抗、美泊利單抗、耐昔妥珠單抗、尼沃單抗、奧妥珠單抗、奧法木單抗、帕利珠單抗、派姆單抗、雷莫蘆單抗、瑞西巴單抗、依庫其單抗、思圖昔單抗、托珠單抗、優特克單抗、阿西珠單抗、德諾單抗、布洛蘇單抗、洛莫松單

抗、司他莫單抗、阿利若單抗、阿斯科林單抗、伊諾替珠單抗、艾維那單抗、依伏洛單抗、依庫克單抗、因克拉單抗、內斯瓦庫單抗、奧替庫單抗、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗、韋森庫單抗、玻可昔單抗、卡普拉單抗、登西珠單抗、埃達珠單抗、艾達西單抗、拉帕珠單抗、他度珠單抗、阿杜卡單抗、阿提努單抗、法神單抗、弗蘭努單抗、甘特羅單抗、歐匹西單抗、貝頻珠單抗、克雷內單抗、歐紮尼單抗、泊尼株單抗、瑞法尼單抗、索拉珠單抗、他尼珠單抗及維多珠單抗。

在其他態樣中，本文提供用於調節(例如減少)由經工程改造之哺乳動物細胞產生之一或多種重組多肽的酸性或鹼性電荷種類的量的方法，該方法包含：**(a)**在本文所揭示之任何細胞培養基中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養該哺乳動物細胞；及**(b)**產生該一或多種重組多肽，其中該一或多種重組多肽與由不在本文所揭示之任何細胞培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽相比，酸性電荷種類的量有所減少。在一些實施例中，酸性或鹼性電荷種類比所有(1)酸性種類；(2)主要種類；及(3)鹼性電荷種類之總和的特定百分比比率相對於由不在本文所揭示之任何細胞培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽有所減少。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種重組多肽為抗體或其片段。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該抗體為單株抗體。在一些實施例中，該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白

酶/科星蛋白酶9型(PCSK9)、達比加群、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、介白素-5 (IL -5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6 (IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白 (oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子 (vWF)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 $\alpha_4\beta_7$ 。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該單株抗體為曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、英利昔單抗、阿達木單抗、貝伐單抗、蘭比珠單抗、那他珠單抗、利妥昔單抗、阿侖單抗、達利珠單抗、依法利珠單抗、戈利木單抗、賽妥珠單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗、帕利珠單抗、阿昔單抗、巴利昔單抗、替伊莫單抗、奧馬珠單抗、依庫麗單抗、阿昔單抗、阿利若單抗、巴利昔單抗、貝利單抗、布林莫單抗、貝倫妥單抗、康納單抗、卡羅單抗、達土木單抗、德諾單抗、迪奴圖單抗、依庫麗單抗、埃羅妥珠單抗、依伏洛單抗、艾達西單抗、伊匹單抗、美泊利單抗、耐昔妥珠單抗、尼沃單抗、奧妥珠單抗、奧法木單抗、帕利珠單抗、派姆單抗、雷莫蘆單抗、瑞西巴單抗、依庫其單抗、思圖昔單抗、托珠單抗、優特克單抗、阿西珠單抗、德諾單抗、布洛蘇單抗、洛莫松單抗、司他莫單抗、阿利若單抗、阿斯科林單抗、伊諾替珠單抗、艾維那單抗、依伏洛單抗、依庫克單抗、因克拉單抗、內斯瓦庫單抗、奧替庫單抗、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗、韋森庫單

抗、玻可昔單抗、卡普拉單抗、登西珠單抗、埃達珠單抗、艾達西單抗、拉帕珠單抗、他度珠單抗、阿杜卡單抗、阿提努單抗、法神單抗、弗蘭努單抗、甘特羅單抗、歐匹西單抗、貝頻珠單抗、克雷內單抗、歐紮尼單抗、泊尼株單抗、瑞法尼單抗、索拉珠單抗、他尼珠單抗及維多珠單抗。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，培養基為基礎培養基。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，培養基為進料培養基。

在另一態樣中，本文提供一種套組，其包含：(a) (i)哺乳動物細胞培養基礎培養基及/或(ii)哺乳動物細胞培養進料培養基；及(b)一或多種鋰離子源。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該套組另外包含(c)乙醇及/或(d)一或多種脂肪酸。在一些實施例中，該一或多種脂肪酸係選自丁酸(C4)、戊酸(C5)、己酸(C6)、庚酸(C7)、辛酸(C8)、壬酸(C9)、癸酸(C10)、十一酸(C11)、月桂酸(C12)、十三酸(C13)、肉豆蔻酸(C14)、十五酸(C15)、棕櫚酸(C16)、十七酸(C17)、硬脂酸(C18)、十九酸(C19)、花生酸(C20)、二十一酸(C21)、二十二酸(C22)、二十三酸(C23)、二十四酸(C24)、二十五酸(C25)、蠟酸(C26)、二十七酸(C27)、二十八酸(C28)、二十九酸(C29)、三十酸(C30)、三十一酸(C31)、三十二酸(C32)、三十三酸(C33)、三十四酸(C34)、三十五酸(C35)、三十六酸(C36)、三十七酸(C37)或三十八酸(C38)。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該套組另外包含(e)用於培養哺乳動物細胞之書面說明書。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該一或多種鋰離子源係選自乙酸鋰、氯化鋰、碳酸鋰、氧基丁酸鋰、乳清酸鋰、溴化鋰、檸檬酸鋰、氟化鋰、碘化鋰、硝酸鋰及硫酸鋰中之一或多者之群。

在其他態樣中，本文提供藉由如下方式產生之重組多肽：在本文所

揭示之任何細胞培養基中，在適合產生該重組多肽之條件下培養經工程改造之哺乳動物細胞。在一些實施例中，該多肽為抗體或其片段。在本文所揭示之任何實施例的一些實施例中，該抗體為單株抗體。在一些實施例中，單株抗體抑制增生細胞的生長。在一些實施例中，該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/科星蛋白酶9型(PCSK9)、達比加群、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、介白素-5 (IL -5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6 (IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子(vWF)、整合素 α _v β ₃、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 α _{IIb} β ₃、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 α 4 β 7。在一些實施例中，該單株抗體為曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、英利昔單抗、阿達木單抗、貝伐單抗、蘭比珠單抗、那他珠單抗、利妥昔單抗、阿倫單抗、達利珠單抗、依法利珠單抗、戈利木單抗、賽妥珠單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗、帕利珠單抗、阿昔單抗、巴利昔單抗、替伊莫單抗、奧馬珠單抗、依庫麗單抗、阿昔單抗、阿

利若單抗、巴利昔單抗、貝利單抗、布林莫單抗、貝倫妥單抗、康納單抗、卡羅單抗、達土木單抗、德諾單抗、迪奴圖單抗、依庫麗單抗、埃羅妥珠單抗、依伏洛單抗、艾達西單抗、伊匹單抗、美泊利單抗、耐昔妥珠單抗、尼沃單抗、奧妥珠單抗、奧法木單抗、帕利珠單抗、派姆單抗、雷莫蘆單抗、瑞西巴單抗、依庫其單抗、思圖昔單抗、托珠單抗、優特克單抗、阿西珠單抗、德諾單抗、布洛蘇單抗、洛莫松單抗、司他莫單抗、阿利若單抗、阿斯科林單抗、伊諾替珠單抗、艾維那單抗、依伏洛單抗、依庫克單抗、因克拉單抗、內斯瓦庫單抗、奧替庫單抗、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗、韋森庫單抗、玻可昔單抗、卡普拉單抗、登西珠單抗、埃達珠單抗、艾達西單抗、拉帕珠單抗、他度珠單抗、阿杜卡單抗、阿提努單抗、法神單抗、弗蘭努單抗、甘特羅單抗、歐匹西單抗、貝頻珠單抗、克雷內單抗、歐紮尼單抗、泊尼株單抗、瑞法尼單抗、索拉珠單抗、他尼珠單抗及維多珠單抗。

除非自實施例或態樣之上下文明確或清楚地排除，否則本文所述之態樣及實施例中之每一者能夠一起使用。

【圖式簡單說明】

圖1描繪按照典型成熟路徑的主要N-聚糖連接種類的示意圖。糖基化加工開始於內質網中，在順面、中間及反面高爾基體中進一步加工。所展示之主要聚糖種類包括：甘露糖-6-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man6)、甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-海藻糖(G0F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖(G1F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖-1-N-乙醯基神經胺糖酸-1

(G1F-NANA)及甘露糖-3-N-乙醯基葡糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖-1-N-乙醯基神經胺糖酸-2 (G2F-2NANA)。

圖2描繪對於效價及Man5%聚糖種類之影響。效價係以體積效價形式報告且Man5%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在12天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器濃度升高0.11 mM (低鋰)及1.11 mM (高鋰)。與基線相比，較高劑量的鋰使效價升高超過21%且使Man5%減少超過13%

圖3描繪使用2 L實驗室規模生物反應器之效價、Man5%、G0%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類的預測響應概況。在14天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器濃度升高1 mM。值相對於所觀測到的每一響應的最高值歸一化。點線表示每一響應的信賴區間。

圖4描繪效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類的預測響應概況。物理條件係藉由改變溫度及pH設定點而改變。在12天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器工作濃度升高0.5 mM或1 mM。響應值相對於所觀測到的每一響應的最高值歸一化。點線表示每一響應的信賴區間。

圖5描繪效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類的組合預測響應概況。在12天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器工作濃度升高0.5 mM或1 mM。響應值相對於所觀測到的每一響應的最高值歸一化。點線表示每一響應的信賴區間。

圖6描繪使用產生mAb2之CHO DG44宿主對Man6%、Man5%及HMW%水準的影響。Man6%及Man5%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集

合體之百分比形式報告。HMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在13天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器濃度升高0.11 mM (低鋰)、0.44 mM (中等鋰)及1.11 mM (高鋰)。高鋰分別使Man6%及Man5%聚糖種類相對於基線減少29%及12%。與基線相比，高鋰使高分子量種類減少24%。

圖7描繪使用產生mAb1之CHO.DXB11宿主(細胞株A)對Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、酸性%及鹼性%種類的影響。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在12天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.0% (基線)及0.057% (具有乙醇) v/v。

圖8描繪使用產生mAb1之CHO.DXB11宿主(細胞株B)對Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、酸性%及鹼性%種類的影響。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在12天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.0% (基線)及0.057% (具有乙醇) v/v。

圖9描繪效價、Man5%、G0%、酸性%及鹼性%種類之預測響應概況。在12天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.0%或0.1% v/v。響應值相對於所觀測到的每一響應的最高值歸一化。點線表示每一響應的信賴區間。

圖10描繪使用實驗室規模生物反應器對Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%及LMW%種類之影響。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。HMW%及LMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。值相對於低乙醇歸一化。在14天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.072% (低乙醇)及0.144% (高乙醇) v/v。

圖11描繪使用兩種不同進料調配物對Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、酸性%及鹼性%種類之影響。在調配物1及2中使用相同的基礎培養基。調配物1及2進料在組成上極為類似，含有相同類型及量之胺基酸及維生素。鹽及金屬離子類型及濃度略有變化。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於不具有乙醇之基線歸一化。在14天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.0% (基線)及0.018% (調配物1及調配物2) v/v。

圖12描繪使用微小規模生物反應器及CHO.DG44細胞株產生mAb 2對Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%及HMW%之影響。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。HMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在13天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.0% (基線)、0.05% (低乙醇)及0.15% (高乙醇) v/v。

圖13描繪使用補充有乙醇及油酸之實驗室規模生物反應器對效價、

Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%之協同影響。效價係以體積效價形式報告。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。HMW%及LMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於不含乙醇或油酸之基線歸一化。在14天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器濃度升高0.0% (基線)及0.057% (具有乙醇 + 油酸) v/v且每日饋入油酸以使生物反應器濃度升高0 μM (基線)及40 μM (具有乙醇 + 油酸)。

圖14描繪使用實驗室規模生物反應器對效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%之影響。效價係以體積效價形式報告。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。HMW%及LMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於具有乙醇之基線歸一化。在14天分批進料方法中，每日饋入油酸以使生物反應器濃度升高0 μM (具有乙醇之基線)及40 μM (具有乙醇 + 油酸)。

圖15A描繪使用微小規模生物反應器且用氯化鈉摻入細胞培養基對效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F、G2F%、酸性%及鹼性%種類之影響。方法策略1涉及單一溫度變化策略。效價係以體積效價形式報告。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在12天分批進料方法

中，每日饋入氯化鈉以使生物反應器濃度升高4.59 mM (L NaCl)及9.18 mM (H NaCl)。

圖15B描繪使用微小規模生物反應器且用氯化鈉摻入細胞培養基對效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F、G2F%、酸性%及鹼性%種類之影響。方法策略2涉及雙重溫度變化策略。效價係以體積效價形式報告。Man5%、G0%、G0F%、G1F%及G2F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。酸性%及鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於基線歸一化。在12天分批進料方法中，每日饋入氯化鈉以使生物反應器濃度升高4.59 mM (L NaCl)及9.18 mM (H NaCl)。

圖16描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)之效價的影響。效價係以體積效價形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖17A描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)的高分子量(HMW)種類的影響。HMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖17B描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)的低分子量(LMW)種類的影響。LMW%係以所偵測到之總多肽分子量變異體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖18A描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)之酸性電荷種類的影響。酸性%

係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖18B描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)之鹼性電荷種類的影響。鹼性%係以所偵測到之總多肽電荷種類變異體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖19A描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)之Man5%聚糖種類的影響。Man5%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖19B描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)之G0%聚糖種類的影響。G0%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

圖20描繪向培養基中添加各種類型之脂肪酸對於由兩種單獨細胞株產生之兩種單獨單株抗體(mAb1及mAb4)之G0F%聚糖種類的影響。G0F%聚糖種類係以所偵測到之總聚糖集合體之百分比形式報告。值相對於對照物歸一化。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

本申請案主張2016年4月26日申請之美國臨時專利申請案第62/327,964號的優先權，該臨時專利申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

本發明特別提供用於培養哺乳動物細胞之方法、組合物及套組。本發明部分基於發明人的以下發現：在含有鋰離子源、乙醇及/或一或多種脂肪酸中之一或多者的培養基中，培養經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽的哺乳動物細胞使得多肽效價升高以及高分子量及低分子量種類減少。另外，與不在本文所述之培養基中培養之哺乳動物細胞相比，使用本文所述之組合物產生的多肽產物具有更有利的糖基化概況。因此，使用本文所揭示之細胞培養基組合物不僅可增加由經工程改造之哺乳動物細胞產生之產物的量，由此使得生產經濟更有利，而且亦可使得產物具有賦予活體內投與彼等產物之附加益處的糖基化概況，該等益處諸如經改良之藥物動力學(PK)及/或藥效學(PD)。

I. 通用技術

除非另外指明，否則本發明之實踐將採用分子生物學、微生物學、細胞生物學、生物化學、核酸化學及免疫學之習知技術，其為所屬領域的技術人員所熟知的。此類技術充分說明於以下文獻中，諸如 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第四版 (Sambrook 等人, 2012) 及 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版 (Sambrook 及 Russel, 2001), (在本文中共同稱為「Sambrook」)； *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel 等人編, 1987, 包括直至2014年的增刊)； *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等人編, 1994)； *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (Greenfield 編, 2014), Beaucage 等人編, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000, (包括直至2014年的增刊), *Gene*

Transfer and Expression in Mammalian Cells (Makrides 編, Elsevier Sciences B.V., Amsterdam, 2003) 及 *Current Protocols in Immunology* (Horgan K及S. Shaw (1994) (包括直至2014年的增刊)。

II. 定義

如本文所用，「基礎培養基」為用於培養真核細胞之培養基，其本身直接用於培養細胞且不作為添加劑用於其他培養基，不過可以向基礎培養基中添加各種組分。舉例而言，若在眾所周知用於哺乳動物細胞之市售培養基DMEM中培養CHO細胞，且定期饋入葡萄糖或其他營養物，則DMEM將視為基礎培養基。基礎培養基之其他實例包括(但不限於) MEM培養基、IMDM培養基、199/109培養基、HamF10/F12培養基、McCoy's 5A培養基及RPMI 1640培養基。

「進料培養基」為用作真核細胞培養物中之進料的培養基，該等真核細胞可為例如哺乳動物細胞。進料培養基，像基礎培養基一樣，依據所培養之特定細胞的需要加以設計。因此，基礎培養基可用作設計進料培養基之基礎。如以下更詳細地描述，進料培養基可具有較高濃度的基礎培養基之大部分(而非全部)組分。舉例而言，一些組分，諸如包括胺基酸或碳水化合物之營養物，可為約2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、10×、12×、14×、16×、20×、30×、50×、100×、200×、400×、600×、800×或甚至約1000×其在基礎培養基中之正常濃度。其他組分，諸如鹽，可保持在約1×基礎培養基濃度，因為吾人將想要保持進料與基礎培養基等張。因此，在一些實施例中，添加各種組分以保持進料培養基生理性，且添加其他組分，因為其向細胞培養物中補給營養物。

「重組多肽」或「重組蛋白」為由遺傳工程改造方法產生之蛋白

質。當允許表現重組蛋白之重組核酸序列已引入至細胞中(諸如用重組病毒進行病毒感染、轉染、轉化或電穿孔)時，細胞係「經遺傳工程改造」。參見例如Kaufman等人(1990), *Meth. Enzymol.* 185: 487-511；*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等人, 編(Wiley & Sons, New York, 1988，及直至2015年之季度更新)。在一些實施例中，重組多肽為抗體或其功能性片段。

術語「遺傳工程改造」係指用於產生以升高水準或以降低水準表現基因或表現基因突變體形式之宿主細胞的重組DNA或RNA方法。換言之，細胞已經重組聚核苷酸分子轉染、轉化或轉導，且由此改變，從而致使細胞改變所需蛋白質之表現。「遺傳工程改造」之方法亦涵蓋許多方法，包括(但不限於)使用聚合酶鏈反應擴增核酸、藉由在大腸桿菌中選殖重組DNA分子而將其組裝、限制酶消化核酸、連接核酸及將鹼基轉移至核酸末端，以及此項技術中熟知的許多其他方法。參見例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989以及直至當前之更新

過渡術語「包含」，其與「包括」、「含有」或「特徵在於」同義，為包括性或開放性的，且不排除額外未列出之要素或方法步驟。相比之下，過渡片語「由……組成」排除申請專利範圍中未規定之任何要素、步驟或成分。過渡片語「基本上由……組成」將申請專利範圍之範疇侷限於規定材料或步驟「及實質上不影響所主張發明之基本及新穎特徵的材料或步驟」。

除非本文中另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有與一般熟習本發明所屬技術者通常所理解相同之含義。

除非上下文另外明確指出，否則如本文所用，單數術語「一(a/an)」及「該」包括複數個指代物。

III. 本發明之組合物

在一些態樣中，本文提供一種用於培養哺乳動物細胞之培養基，其含有基礎培養基或進料培養基以及(1)鋰離子源、(2)乙醇及/或(3)一或多種脂肪酸中之一或多者。

A. 哺乳動物細胞

任何能夠培養之哺乳動物細胞均適用於本發明。其包括來源於人類之細胞(例如HeLa細胞)以及來源於嚙齒動物之細胞，嚙齒動物諸如小鼠、大鼠、倉鼠(例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞)或天竺鼠。其亦包括來源於其他物種、尤其靈長類物種之哺乳動物細胞。

可在根據本發明之培養基中培養的哺乳動物細胞之實例包括(但不限於)鼠類C127細胞、3T3細胞、COS細胞、人類骨肉瘤細胞、MRC-5細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞、VERO細胞、HEK 293細胞、rHEK 293細胞、正常人類纖維母細胞、基質細胞、肝細胞或PER.C6細胞。可在根據本發明之方法中培養的雜交瘤之實例包括例如DA4.4細胞、123A細胞、127A細胞、GAMMA細胞及67-9-B細胞。

適合與本文所揭示之組合物一起使用之哺乳動物細胞的其他實例為COP細胞、L細胞、C 127細胞、Sp2/0細胞、NS-O細胞、NS-I細胞、NIH3T3細胞、PC12細胞、PC12h細胞、COS1細胞、COS3細胞、COS7細胞、CV1細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、非洲綠猴腎(AGMK)細胞、或來源於二倍體纖維母細胞、癌細胞(諸如骨髓瘤細胞)及HepG2細胞之細胞。

B. 經遺傳工程改造以產生重組多肽之細胞

在另一態樣中，在本文所述之培養基中之任一者中培養的哺乳動物細胞可經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽。出於本發明之目的，哺乳動物細胞可根據此項技術中已知之任何方法經遺傳工程改造。舉例而言，表現載體可經設計以含有使某些宿主哺乳動物細胞株之基因表現最佳化的核酸序列。此類最佳化組件包括(但不限於)複製起點、啟動子及強化子。本文中所提及之載體及組件係出於例示性目的加以描述且不意欲使本發明之範疇變窄。合適載體為與所採用之哺乳動物宿主細胞相容的載體。合適載體可來源於例如細菌、病毒(諸如噬菌體T7或M-13源性噬菌體)、黏質體、酵母或植物。合適載體可以低、中等或高複本數維持在哺乳動物宿主細胞中。用於獲得及使用此類載體之方案為熟習此項技術者所已知(參見例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第4版, Cold Spring Harbor, 2012)。

可使用將DNA構築體或載體引入至哺乳動物宿主細胞中之標準技術，諸如轉化、電穿孔、核顯微注射、轉導、轉染(例如，脂質體轉染介導或DEAE-聚葡萄糖介導之轉染或使用重組噬菌體病毒之轉染)、與磷酸鈣DNA沈澱物一起培育、用經DNA塗佈之微彈高速轟擊及原生質體融合，將編碼所需多肽之核酸序列或包含其之表現載體插入至哺乳動物細胞(例如，CHO細胞或本文所述之任何其他哺乳動物細胞)中。通用轉化技術為此項技術中已知的(參見例如*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第4版., Cold Spring Harbor, 2012)。引入之核酸可整合於染色體DNA中或保持作為染色體外複製序列。可藉由此項技術中已知之任何方法選擇轉化體。

C. 鋰離子源

在本文所述之任何哺乳動物細胞培養基的一些態樣中，培養基含有一或多種鋰離子源。任何鋰離子源均適用於本發明且包括鋰鹽、溶劑合物及金屬。

非限制性鋰離子源包括氫氧化鋰(LiOH及LiOH·H₂O)、碳酸鋰(Li₂CO₃)、甲醇鋰、乙酸鋰、氧化鋰(Li₂O)過氧化鋰(Li₂O₂)、氫化鋰(LiH)、氯化鋰(LiCl)、氟化鋰(LiF)、碘化鋰(LiI)、硫化鋰(Li₂S)、亞硫酸鋰(LiSO₃)、硫酸鋰(LiSO₄)、超氧化鋰(LiO₂)、碳化鋰(Li₂C₂)、四氯鋁酸鋰(LiAlCl₄)、氫化鋰鋁(LiAlH₄)、氧化鋰鋁(LiAlO₂)、四氟硼酸鋰(LiBF₄)、硼氫化鋰(LiBH₄)、偏硼酸鋰(LiBO₂)、四硼酸鋰(Li₂B₄O₇)、三硼酸鋰(LiB₃O₅)、次氯酸鋰(LiClO)、氯酸鋰(LiClO₃)、過氯酸鋰(LiClO₄)、氧化鋰鈷(LiCoO₂)、碘酸鋰(LiIO₃)、胺化鋰(LiNH₂)、亞胺化鋰(Li₂NH)、疊氮化鋰(LiN₃)、亞硝酸鋰(LiNO₂)、硝酸鋰(LiNO₃)、四硼酸鋰(Li₂B₄O₇)、碳化鋰(Li₂C₂)及鉬酸鋰(Li₂MoO₄)。

在一些實施例中，培養基(例如，基礎培養基或進料培養基)中所存在之鋰離子源的量可在約0.05 mM至約15 mM、諸如約0.05 mM至約0.5 mM、約0.1 mM至約0.75 mM、約0.25 mM至約1 mM、約0.5 mM至約1.25 mM、約0.75 mM至約1.5 mM、約1 mM至約1.75 mM、約1.25 mM至約1.75 mM、約1.25 mM至約2.25 mM、約1.5 mM至約2.5 mM、約1.75 mM至約2.75 mM、約2 mM至約3 mM、約2.5 mM至約3.5 mM、約3 mM至約4 mM、約3.5 mM至約4.5 mM、約4 mM至約5 mM、約4.5 mM至約5.5 mM、約5 mM至約6 mM、約5.5 mM至約6.5 mM、約6 mM至約7 mM、約6.5 mM至約8.5 mM、約7.5 mM至約9.5 mM、約8.5 mM至約

11.5 mM、約9.5 mM至約12.5 mM、約11.5 mM至約13.5 mM、約12.5 mM至約15 mM、約14 mM至約17 mM、約16 mM至約19 mM、約18 mM至約21 mM、約20 mM至約23 mM、約22 mM至約25 mM、約0.75 mM至約1.75 mM、約0.5 mM至約10 mM、約0.5 mM至約7.5 mM、約1 mM至約5 mM、約1 mM至約4 mM、約1 mM至約3 mM、約1 mM至約2 mM或約1 mM至約1.25 mM中之任一者的範圍內。

在其他實施例中，培養基(例如，基礎培養基或進料培養基)中所存在之鋰離子源的量為約0.05 mM、0.1 mM、0.15 mM、0.2 mM、0.25 mM、0.3 mM、0.35 mM、0.4 mM、0.45 mM、0.5 mM、0.55 mM、0.6 mM、0.65 mM、0.7 mM、0.75 mM、0.8 mM、0.85 mM、0.9 mM、0.95 mM、1 mM、1.1 mM、1.2 mM、1.3 mM、1.4 mM、1.5 mM、1.6 mM、1.7 mM、1.8 mM、1.9 mM、2 mM、2.1 mM、2.2 mM、2.3 mM、2.4 mM、2.5 mM、2.6 mM、2.7 mM、2.8 mM、2.9 mM、3 mM、3.1 mM、3.2 mM、3.3 mM、3.4 mM、3.5 mM、3.6 mM、3.7 mM、3.8 mM、3.9 mM、4 mM、4.1 mM、4.2 mM、4.3 mM、4.4 mM、4.5 mM、4.6 mM、4.7 mM、4.8 mM、4.9 mM、5 mM、5.1 mM、5.2 mM、5.3 mM、5.4 mM、5.5 mM、5.6 mM、5.7 mM、5.8 mM、5.9 mM、6 mM、6.1 mM、6.2 mM、6.3 mM、6.4 mM、6.5 mM、6.6 mM、6.7 mM、6.8 mM、6.9 mM、7 mM、7.1 mM、7.2 mM、7.3 mM、7.4 mM、7.5 mM、7.6 mM、7.7 mM、7.8 mM、7.9 mM、8 mM、8.1 mM、8.2 mM、8.3 mM、8.4 mM、8.5 mM、8.6 mM、8.7 mM、8.8 mM、8.9 mM、9 mM、9.1 mM、9.2 mM、9.3 mM、9.4 mM、9.5 mM、9.6 mM、9.7 mM、9.8 mM、9.9 mM、10

mM、10.1 mM、10.2 mM、10.3 mM、10.4 mM、10.5 mM、10.6 mM、10.7 mM、10.8 mM、10.9 mM、11 mM、11.1 mM、11.2 mM、11.3 mM、11.4 mM、11.5 mM、11.6 mM、11.7 mM、11.8 mM、11.9 mM、12 mM、12.1 mM、12.2 mM、12.3 mM、12.4 mM、12.5 mM、12.6 mM、12.7 mM、12.8 mM、12.9 mM、13 mM、13.1 mM、13.2 mM、13.3 mM、13.4 mM、13.5 mM、13.6 mM、13.7 mM、13.8 mM、13.9 mM、14 mM、14.1 mM、14.2 mM、14.3 mM、14.4 mM、14.5 mM、14.6 mM、14.7 mM、14.8 mM、14.9 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM 或大於25 mM中之任一者，包括落在此等數目之間的所有值。

D. 脂肪酸

在本文所述之任何哺乳動物細胞培養基的一些態樣中，培養基含有一或多種脂肪酸。任何脂肪酸均適用於本發明。如本文所用，「脂肪酸」係指含有羧酸及至少一個飽和、不飽和、部分不飽和或共軛碳-碳鍵之天然存在或合成產生之烴家族的任何成員。此外，術語脂肪酸一般用於描述脂肪酸、C2-C38脂肪酸、共軛脂肪酸、脂質、磷脂、油、脂肪、三醯甘油酯、脂肪酸衍生物、二醯基甘油、類異戊二烯、鞘脂、甘油酯及其類似物。

在一些實施例中，脂肪酸為飽和脂肪酸，諸如(但不限於)丁酸(C4)、戊酸(C5)、己酸(C6)、庚酸(C7)、辛酸(C8)、壬酸(C9)、癸酸(C10)、十一酸(C11)、月桂酸(C12)、十三酸(C13)、肉豆蔻酸(C14)、十五酸(C15)、棕櫚酸(C16)、十七酸(C17)、硬脂酸(C18)、十九酸(C19)、花生酸(C20)、二十一酸(C21)、二十二酸(C22)、二十三酸(C23)、二十四酸

(C24)、二十五酸(C25)、蠟酸(C26)、二十七酸(C27)、二十八酸(C28)、二十九酸(C29)、三十酸(C30)、三十一酸(C31)、三十二酸(C32)、三十三酸(C33)、三十四酸(C34)、三十五酸(C35)、三十六酸(C36)、三十七酸(C37)或三十八酸(C38)中之一或多者。

在其他實施例中，脂肪酸為 ω -3不飽和脂肪酸，諸如(但不限於) α -次亞麻油酸(18:3)、十八碳四烯酸(18:4)、二十碳五烯酸(20:5)或二十二碳六烯酸(22:6)中之一或多者。

在額外實施例中，脂肪酸為 ω -6不飽和脂肪酸，諸如(但不限於)亞麻油酸(18:2)、 γ -次亞麻油酸(18:3)、二高- γ -次亞麻油酸(20:3)、二十碳四烯酸(20:4)或腎上腺酸(22:4)中之一或多者。

在其他實施例中，脂肪酸為 ω -7不飽和脂肪酸，諸如(但不限於)棕櫚油酸(16:1)、異油酸(18:1)或二十碳烯酸(20:1)中之一或多者。

在另一個實施例中，脂肪酸為 ω -9不飽和脂肪酸，諸如(但不限於)油酸(18:1)、反油酯(反式-18:1)、巨頭鯨魚酸(20:1)、芥子酸(22:1)、神經酸(24:1)或蜂蜜酸(20:3)中之一或多者。

如本文所用，術語「類異戊二烯」係指由兩個或大於兩個烴單元構成的天然存在之有機化合物類別中之一個大量且多樣化的類別，其中每個單元由以特定模式排列之五個碳原子組成。如本文所用，術語「萜類」係指衍生自五碳類異戊二烯單元之一個大量且多樣化類別的有機分子，其以多種方式組裝及修飾且基於基團成員中所用類異戊二烯單元之數目分組。半萜類具有一個類異戊二烯單元。單萜類具有兩個類異戊二烯單元。倍半萜類具有三個類異戊二烯單元。二萜類具有四個異戊二烯單元。二倍半萜類具有五個類異戊二烯單元。三萜類具有六個類異戊二烯單元。四萜類具

有八個類異戊二烯單元。多萜類具有大於八個類異戊二烯單元。

在一些實施例中，培養基(例如，基礎培養基或進料培養基)中所存在之脂肪酸的量可在約1 μM 至約1 mM 、諸如約1 μM 至約5 μM 、約1 μM 至約10 μM 、約1 μM 至約15 μM 、約1 μM 至約20 μM 、約1 μM 至約25 μM 、約1 μM 至約30 μM 、約1 μM 至約35 μM 、約1 μM 至約40 μM 、約1 μM 至約45 μM 、約1 μM 至約50 μM 、約1 μM 至約55 μM 、約1 μM 至約60 μM 、約1 μM 至約65 μM 、約1 μM 至約70 μM 、約1 μM 至約75 μM 、約1 μM 至約80 μM 、約10 μM 至約20 μM 、約10 μM 至約30 μM 、約10 μM 至約40 μM 、約10 μM 至約50 μM 、約10 μM 至約60 μM 、約10 μM 至約70 μM 、約10 μM 至約80 μM 、約10 μM 至約90 μM 、約20 μM 至約40 μM 、約20 μM 至約60 μM 、約20 μM 至約80 μM 、約20 μM 至約100 μM 、約30 μM 至約50 μM 、約30 μM 至約60 μM 、約30 μM 至約70 μM 、約30 μM 至約80 μM 、約30 μM 至約90 μM 、約40 μM 至約50 μM 、約40 μM 至約60 μM 、約40 μM 至約80 μM 、約40 μM 至約90 μM 、約50 μM 至約60 μM 、約50 μM 至約70 μM 、約50 μM 至約80 μM 、約50 μM 至約90 μM 、約50 μM 至約100 μM 、約60 μM 至約70 μM 、約60 μM 至約80 μM 、約60 μM 至約90 μM 、約60 μM 至約100 μM 、約70 μM 至約80 μM 、約70 μM 至約90 μM 、約70 μM 至約100 μM 、約50 μM 至約150 μM 、約100 μM 至約200 μM 、約150 μM 至約250 μM 、約200 μM 至約300 μM 、約250 μM 至約350 μM 、約300 μM 至約400 μM 、約350 μM 至約450 μM 、約400 μM 至約500 μM 、約450 μM 至約550 μM 、約500 μM 至約600 μM 、約550 μM 至約650 μM 、約600 μM 至約700 μM 、約650 μM 至約750 μM 、約700 μM 至約800 μM 、約750 μM 至約850 μM 、約800 μM 至約900 μM 、約850 μM 至約950 μM 。

μM 、或約900 μM 至約1 mM中之任一者之範圍內。

在其他實施例中，培養基(例如，基礎培養基或進料培養基)中所存在之脂肪酸的量為約1 μM 、2 μM 、3 μM 、4 μM 、5 μM 、6 μM 、7 μM 、8 μM 、9 μM 、10 μM 、11 μM 、12 μM 、13 μM 、14 μM 、15 μM 、16 μM 、17 μM 、18 μM 、19 μM 、20 μM 、21 μM 、22 μM 、23 μM 、24 μM 、25 μM 、26 μM 、27 μM 、28 μM 、29 μM 、30 μM 、31 μM 、32 μM 、33 μM 、34 μM 、35 μM 、36 μM 、37 μM 、38 μM 、39 μM 、40 μM 、41 μM 、42 μM 、43 μM 、44 μM 、45 μM 、46 μM 、47 μM 、48 μM 、49 μM 、50 μM 、51 μM 、52 μM 、53 μM 、54 μM 、55 μM 、56 μM 、57 μM 、58 μM 、59 μM 、60 μM 、61 μM 、62 μM 、63 μM 、64 μM 、65 μM 、66 μM 、67 μM 、68 μM 、69 μM 、70 μM 、71 μM 、72 μM 、73 μM 、74 μM 、75 μM 、76 μM 、77 μM 、78 μM 、79 μM 、80 μM 、81 μM 、82 μM 、83 μM 、84 μM 、85 μM 、86 μM 、87 μM 、88 μM 、89 μM 、90 μM 、91 μM 、92 μM 、93 μM 、94 μM 、95 μM 、96 μM 、97 μM 、98 μM 、99 μM 、100 μM 、125 μM 、150 μM 、175 μM 、200 μM 、225 μM 、250 μM 、275 μM 、300 μM 、325 μM 、350 μM 、375 μM 、400 μM 、425 μM 、450 μM 、475 μM 、500 μM 、525 μM 、550 μM 、575 μM 、600 μM 、625 μM 、650 μM 、675 μM 、700 μM 、725 μM 、750 μM 、775 μM 、800 μM 、825 μM 、850 μM 、875 μM 、900 μM 、925 μM 、950 μM 、975 μM 或1 mM中之任一者，包括落在此等數目之間的所有值。

在一些實施例中，脂肪酸為瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚

酸、硬脂酸及肉豆蔻酸中之一或多者。

在一個實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的效價，補充有瑞香草酚、1-辛醯基-外消旋-甘油、亞麻油酸及/或次亞麻油酸中之一或多者的細胞培養基使得由在該培養基中生長之細胞株產生之重組蛋白的效價升高約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在一些實施例中，關於1)HMW及/或LMW種類；或2)酸性及/或鹼性電荷種類之相對百分比的片語「調節(modulating或modulates)」係指增加重組多肽之1)特定HMW及/或LMW種類；或2)特定酸性及/或鹼性電荷種類的相對百分比。然而，在其他實施例中，關於1)HMW及/或LMW種類；或2)酸性及/或鹼性電荷種類之相對百分比的片語「調節」係指降低重組多肽之1)特定HMW及/或LMW種類；或2)特定酸性及/或鹼性電荷種類的相對百分比。

在另一個實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的HMW種類的量，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸中之一或多者的細胞培養基調節由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之HMW種類的相對百分比達約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、

60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在另一個實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的LMW種類的量，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、亞麻油酸、次亞麻油酸、棕櫚酸及硬脂酸中之一或多者的細胞培養基調節由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之LMW種類的相對百分比達約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在其他實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的酸性電荷種類的量，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、棕櫚酸及肉豆蔻酸中之一或多者的細胞培養基調節由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之酸性電荷種類的相對百分比達約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在額外實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的鹼性電荷種類的量，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸中

之一或多者的細胞培養基調節由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之鹼性電荷種類的相對百分比達約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在另一個實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的Man5%聚糖種類的量，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸中之一或多者的細胞培養基調節(例如，升高或降低)由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之Man5%聚糖種類的相對百分比達約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在其他實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的G0%聚糖種類的量，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸中之一或多者的細胞培養基調節(例如，升高或降低)由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之G0%聚糖種類的相對百分比約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、

25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

在額外實施例中，相對於在未補充有一或多種脂肪酸之培養基中產生之重組蛋白的GOF%聚糖種類的量，補充有膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸及肉豆蔻酸中之一或多者的細胞培養基調節(例如，升高或降低)由在該培養基中生長之重組蛋白產生細胞株產生之GOF%聚糖種類的相對百分比達約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中之任一者，包括落在此等值之間的百分比。

E. 乙醇

在本文所述之任何哺乳動物細胞培養基的其他態樣中，培養基含有乙醇。

在一些實施例中，培養基(例如，基礎培養基或進料培養基)中所存在之乙醇的量可在約0.001%至約4% (v/v)、諸如約0.001%至約0.01% (v/v)、約0.001%至約0.02% (v/v)、約0.001%至約0.05% (v/v)、約0.001%至約0.075% (v/v)、約0.001%至約0.09% (v/v)、約0.001%至約0.1% (v/v)、約0.001%至約0.15% (v/v)、約0.001%至約0.2% (v/v)、約0.001%至約0.25% (v/v)、約0.001%至約0.3% (v/v)、約0.05%至約0.075% (v/v)、約0.05%至約0.1% (v/v)、約0.05%至約0.15% (v/v)、約0.05%至約0.2% (v/v)、約0.05%至約0.25% (v/v)、約0.05%至約0.3% (v/v)、約0.1%至約0.15% (v/v)、約0.1%至約0.2% (v/v)、約0.1%至約

0.25% (v/v)、約0.1%至約0.3% (v/v)、約0.1%至約0.4% (v/v)、約0.1%至約0.5% (v/v)、約0.25%至約0.5% (v/v)、約0.5%至約1.5% (v/v)、約0.75%至約1.75% (v/v)、約1%至約2% (v/v)、約1.25%至約2.25% (v/v)、約1.5%至約2.5% (v/v)、約1.75%至約2.75% (v/v)、約2%至約3% (v/v)、約2.25%至約3.25% (v/v)、約2.5%至約3.5% (v/v)、約2.75%至約3.75% (v/v)、約3%至約4% (v/v)中之任一者的範圍內。

在其他實施例中，培養基(例如，基礎培養基或進料培養基)中所存在之乙醇的量可為約0.001% (v/v)、0.005% (v/v)、0.01% (v/v)、0.011% (v/v)、0.012% (v/v)、0.013% (v/v)、0.014% (v/v)、0.015% (v/v)、0.016% (v/v)、0.017% (v/v)、0.018% (v/v)、0.019% (v/v)、0.02% (v/v)、0.021% (v/v)、0.022% (v/v)、0.023% (v/v)、0.024% (v/v)、0.025% (v/v)、0.026% (v/v)、0.027% (v/v)、0.028% (v/v)、0.029% (v/v)、0.03% (v/v)、0.031% (v/v)、0.032% (v/v)、0.033% (v/v)、0.034% (v/v)、0.035% (v/v)、0.036% (v/v)、0.037% (v/v)、0.038% (v/v)、0.039% (v/v)、0.04% (v/v)、0.041% (v/v)、0.042% (v/v)、0.043% (v/v)、0.044% (v/v)、0.045% (v/v)、0.046% (v/v)、0.047% (v/v)、0.048% (v/v)、0.049% (v/v)、0.05% (v/v)、0.051% (v/v)、0.052% (v/v)、0.053% (v/v)、0.054% (v/v)、0.055% (v/v)、0.056% (v/v)、0.057% (v/v)、0.058% (v/v)、0.059% (v/v)、0.06% (v/v)、0.061% (v/v)、0.062% (v/v)、0.063% (v/v)、0.064% (v/v)、0.065% (v/v)、0.066% (v/v)、0.067% (v/v)、0.068% (v/v)、0.069% (v/v)、0.07、% (v/v) 0.071、% (v/v) 0.072、% (v/v) 0.073% (v/v)、0.074% (v/v)、0.075% (v/v)、0.076% (v/v)、0.077% (v/v)、0.078% (v/v)、

0.079% (v/v)、0.08% (v/v)、0.081% (v/v)、0.082% (v/v)、0.083% (v/v)、0.084% (v/v)、0.085% (v/v)、0.086% (v/v)、0.087% (v/v)、0.088% (v/v)、0.089% (v/v)、0.09% (v/v)、0.091% (v/v)、0.092% (v/v)、0.093% (v/v)、0.094% (v/v)、0.095% (v/v)、0.096% (v/v)、0.097% (v/v)、0.098% (v/v)、0.099% (v/v)、0.1% (v/v)、0.11% (v/v)、0.12% (v/v)、0.13% (v/v)、0.14% (v/v)、0.15% (v/v)、0.16% (v/v)、0.17% (v/v)、0.18% (v/v)、0.19% (v/v)、0.2% (v/v)、0.21% (v/v)、0.22% (v/v)、0.23% (v/v)、0.24% (v/v)、0.25% (v/v)、0.26% (v/v)、0.27% (v/v)、0.28% (v/v)、0.29% (v/v)、0.3% (v/v)、0.31% (v/v)、0.32% (v/v)、0.33% (v/v)、0.34% (v/v)、0.35% (v/v)、0.36% (v/v)、0.37% (v/v)、0.38% (v/v)、0.39% (v/v)、0.4% (v/v)、0.41% (v/v)、0.42% (v/v)、0.43% (v/v)、0.44% (v/v)、0.45% (v/v)、0.46% (v/v)、0.47% (v/v)、0.48% (v/v)、0.49% (v/v)、0.5% (v/v)、0.6% (v/v)、0.7% (v/v)、0.8% (v/v)、0.9% (v/v)、1% (v/v)、1.1% (v/v)、1.2% (v/v)、1.3% (v/v)、1.4% (v/v)、1.5% (v/v)、1.6% (v/v)、1.7% (v/v)、1.8% (v/v)、1.9% (v/v)、2% (v/v)、2.1% (v/v)、2.2% (v/v)、2.3% (v/v)、2.4% (v/v)、2.5% (v/v)、2.6% (v/v)、2.7% (v/v)、2.8% (v/v)、2.9% (v/v)、3% (v/v)、3.1% (v/v)、3.2% (v/v)、3.3% (v/v)、3.4% (v/v)、3.5% (v/v)、3.6% (v/v)、3.7% (v/v)、3.8% (v/v)、3.9% (v/v)、或4% (v/v)或大於4% (v/v)中之任一者，包括落在此等百分比之間的所有值。

IV. 本發明之方法

A. 用於產生重組多肽之方法

在一些態樣中，本文提供由經工程改造之哺乳動物細胞產生一或多

種重組多肽之方法。該方法需要在本文所述之任何哺乳動物細胞培養基組合物中，在適合產生一或多種重組多肽之條件下培養經工程改造之哺乳動物細胞；及產生一或多種重組多肽。

培養重組哺乳動物細胞以產生重組多肽為此項技術中所熟知的。可藉由根據本發明之細胞培養基產生之多肽不受限制。如本文所用，術語「多肽」涵蓋由利用肽鏈接合之大於兩個胺基酸的鏈構成的分子；含有兩個或大於兩個此類鏈之分子；包含一或多個例如經糖基化另外修飾之此類鏈的分子。術語多肽意欲涵蓋蛋白質。

可根據本發明產生可在哺乳動物宿主細胞中表現之任何多肽。在多肽已在本發明之培養基中產生之後，其分泌至胞外、結合於細胞或保留在細胞中，視特定產物及所用細胞株而定。多肽產物可直接或在藉由標準程序溶解細胞之後自培養上清液回收。在其他實施例中，使用此項技術中已知的標準技術進行重組多肽之分離及純化。此等標準技術可包括(但不限於)尺寸排阻層析、蛋白質A親和層析、陰離子交換層析、陽離子交換層析、混合模式層析或疏水性相互作用層析。

藉由根據本發明之細胞培養基產生之一個非限制性類別的多肽為重組抗體。術語「抗體」係以最廣泛的意義使用且特別涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)、奈米抗體經修飾之抗體、抗體次單位、抗體衍生物、人工抗體、抗體與蛋白質之組合及長至足以呈現所需生物活性之抗體片段。如本文所用之單株抗體可為人類抗體或人類化抗體。在一個實施例中，重組多肽為選自由以下組成之群之單株抗體：曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、英利昔單抗、阿達木單抗、貝伐單抗、蘭比珠單抗、那他珠單抗、利妥昔單抗、阿侖單抗、達利

珠單抗、依法利珠單抗、戈利木單抗、賽妥珠單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗、帕利珠單抗、阿昔單抗、巴利昔單抗、替伊莫單抗、奧馬珠單抗、依庫麗單抗、阿昔單抗、阿利若單抗、巴利昔單抗、貝利單抗、布林莫單抗、貝倫妥單抗、康納單抗、卡羅單抗、達土木單抗、德諾單抗、迪奴圖單抗、依庫麗單抗、埃羅妥珠單抗、依伏洛單抗、艾達西單抗、伊匹單抗、美泊利單抗、耐昔妥珠單抗、尼沃單抗、奧妥珠單抗、奧法木單抗、帕利珠單抗、派姆單抗、雷莫蘆單抗、瑞西巴單抗、依庫其單抗、思圖昔單抗、托珠單抗、優特克單抗、阿西珠單抗、德諾單抗、布洛蘇單抗、洛莫松單抗、司他莫單抗、阿利若單抗、阿斯科林單抗、伊諾替珠單抗、艾維那單抗、依伏洛單抗、依庫克單抗、因克拉單抗、內斯瓦庫單抗、奧替庫單抗、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗、韋森庫單抗、玻可昔單抗、卡普拉單抗、登西珠單抗、埃達珠單抗、艾達西單抗、拉帕珠單抗、他度珠單抗、阿杜卡單抗、阿提努單抗、法神單抗、弗蘭努單抗、甘特羅單抗、歐匹西單抗、貝頻珠單抗、克雷內單抗、歐紮尼單抗、泊尼株單抗、瑞法尼單抗、索拉珠單抗、他尼珠單抗及維多珠單抗。

然而，除抗體以外之多肽亦可使用細胞培養物及根據本發明之細胞培養基產生，例如治療性多肽，諸如(但不限於)跨膜蛋白、受體、激素、生長因子、蛋白酶、凝結及抗凝結蛋白、抑制蛋白、介白素、轉運因子、融合蛋白及其類似物。因此，在根據本發明之細胞培養基中產生之另一個非限制性類別的多肽為治療性多肽。在一個實施例中，重組多肽為選自由以下組成之群之治療性多肽：阿巴西普(abatacept)、A型阿博肉毒毒素(abobotulinumtoxinA)、阿柏西普(aflibercept)、半乳糖苷酶 β (agalsidase beta)、阿必魯肽(albiglutide)、阿地介白素(aldesleukin)、阿糖苷酶 α

(alglucosidase alfa)、阿替普酶(alteplase)、cathflo activase、阿那白滯素(anakinra)、艾斯福酶 α (asfotase alfa)、天冬醯胺酶、貝卡普明(belatacept)、膠原酶、溶組織梭菌膠原酶(collagenase clostridium histolyticum)、達貝泊汀 α (darbepoetin alfa)、地尼白介素(denileukin)、迪夫托斯(diftitox)、鏈道酶 α (dornase alfa)、度拉糖肽(dulaglutide)、艾卡拉肽(ecallantide)、艾洛硫酸酯酶 α (elosulfase alfa)、依泊汀 α (epoetin alfa)、依那西普(etanercept)、非格司亭(filgrastim)、加硫酶(galsulfase)、穀卡匹酶(glucarpidase)、艾度硫酸酯酶(idursulfase)、A型因可肉毒毒素(incobotulinumtoxinA)、干擾素 α -2b、干擾素 α -n3、干擾素 β -1a、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、干擾素 β -1b、干擾素 γ -1b、拉羅尼酶(laronidase)、甲氧基聚乙二醇-依泊汀 β 、美曲普汀(metreleptin)、奧瑞拉明(ocriplasmin)、A型歐娜肉毒毒素(onabotulinumtoxinA)、奧普瑞介白素(oprelvekin)、帕利夫明(palifermin)、甲狀旁腺激素、培門冬酶(pegaspargase)、聚乙二醇非格司亭(pegfilgrastim)、聚乙二醇干擾素 α -2a、聚乙二醇干擾素 α -2a、利巴韋林(ribavirin)、聚乙二醇干擾素 α -2b、聚乙二醇干擾素 β -1a、培羅替酶(pegloticase)、拉布立酶(rasburicase)、瑞替普酶(reteplase)、利納西普(riloncept)、B型瑞嗎肉毒毒素(rimabotulinumtoxinB)、羅米司亭(romiplostim)、沙格司亭(sargramostim)、塞貝利酶(sebelipase)、替博非格司亭(tbo-filgrastim)、替奈普酶(tenecteplase)及澤福阿柏西普(ziv-aflibercept)。

在一些實施例中，在培養哺乳動物細胞之過程期間改變溫度可為有利的且包括在某些時間點起始之一或多個溫度變化。溫度之改變/變化不是指溫度之自發性波動，而是指吾人所欲的至少1°C或至少2°C、3°C、4°C、5

°C、6°C、7°C、8°C、9°C或10°C之溫度改變，且其中第二溫度維持至少一天。改變/變化可藉由改變培養物之溫度設定點來實施。時序視培養物之生長狀態、在培養開始之後的預定天數或細胞代謝需要而定。因此，溫度可在培養開始之後約1至10天的時段內變化。在一些實施例中，溫度變化係在細胞生長期期間或在此期即將結束之際及在重組蛋白產生期開始之前進行。視培養容器體積而定，改變可快速或較慢發生且持續數小時，在一個實例中，此類溫度變化係在培養物生長期期間實施，此時密度在最大密度之約40%與約90%之間。在一個實例中，第一溫度在約33與約38°C之間，而在其他實例中，第一溫度在約35與約37°C之間。第二溫度在約28與約36°C之間，或者在約29與約35°C之間。

在本發明之另一個實施例中，在培養哺乳動物細胞之過程期間藉由包括一或多個pH變化來改變pH可為有利的。在本發明之其他態樣中，溫度變化亦可與一或多個pH變化組合。在其他實施例中，培養基(諸如本文所述之任何哺乳動物細胞培養基)之pH值可在醱酵過程期間變化，諸如自約pH 6.7至約pH 7.3，諸如約6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2或7.3之任何pH值。

根據本發明之細胞培養基可用於不同哺乳動物細胞培養方法。細胞培養可以貼壁培養(例如單層培養)或懸浮培養形式進行。大規模細胞培養可藉由例如工業生物技術中建立的各種醱酵方法使用例如小規模或大規模生物反應器來進行。可採用使用根據本發明之細胞培養基的連續及不連續細胞培養方法。亦可採用其他已知反應器技術，例如灌注技術或其類似物。

分批方法亦為一個可能的實施例。分批細胞培養包括分批進料培養

或簡單分批培養。術語「分批進料細胞培養」係指如下細胞培養，其中首先將哺乳動物細胞及細胞培養基供應至培養容器且在培養方法期間在存在或不存在定期細胞及/或產物採集之情況下將額外培養營養物連續或以離散增量饋入培養物，隨後終止培養。術語「簡單分批培養」係關於如下程序，其中用於細胞培養之所有組分，包括哺乳動物細胞及細胞培養基，在培養方法開始時供應至培養容器。

根據本發明之一個實施例，培養物之進料係在分批進料方法中進行。此類進料有益於細胞更換在培養方法期間培養基中耗盡之培養基組分及營養物。進料溶液通常包含胺基酸、至少一種碳水化合物作為能量來源、痕量元素、維生素或特定離子。進料溶液依據細胞需要而添加，其係基於已針對特定細胞株或細胞純系及產物所測定或在培養方法期間所量測之預定時程。尤其有利的是使用濃縮進料溶液以避免培養基之大量增加及稀釋。在一些實施例中，亦可使用至少兩種不同進料溶液。此允許向細胞獨立供給兩個或大於兩個不同群組之營養物及組分，且因此較佳調節與某些營養物之最佳供應有關的進料條件。

自此類細胞培養方法獲得之產物可用於製備醫藥組合物。術語「醫藥組合物」指示適合或適於向哺乳動物(例如，人類)投與之組合物。另外，根據本發明之蛋白質可連同生物學活性劑之其他組分一起投與，諸如醫藥學上可接受之界面活性劑、受體、載劑、稀釋劑及媒劑。在其他實施例中，根據本發明方法中之任一者產生之重組多肽可經凍乾及調配以用於靜脈內、非經腸或皮下投與。

在一些實施例中，與藉由並非根據本文所揭示之方法中之任一者在本文所揭示之任何培養基中培養之哺乳動物細胞生產相比，根據本文所揭

示之方法中之任一者在本文所揭示之任何培養基中培養哺乳動物細胞使得重組蛋白效價升高。在一些實施例中，與由不在本文所揭示之培養基中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的效價相比，該方法使重組多肽之效價升高約1%至約2%、約1%至約3%、約1%至約4%、約1%至約5%、約2.5%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約1%至約15%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約7.5%至約17.5%、約10%至約12.5%、約10%至約15%、約10%至約17.5%、約10%至約20%、約12.5%至約15%、約12.5%至約17.5%、約12.5%至約20%、約12.5%至約22.5%、約15%至約17.5%、約15%至約20%、約15%至約22.5%、約15%至約25%、約17.5%至約20%、約17.5%至約22.5%、約17.5%至約25%、約17.5%至約27.5%、約20%至約22.5%、約20%至約25%、約20%至約27.5%、約20%至約30%、約22.5%至約25%、約22.5%至約27.5%、約22.5%至約30%、約22.5%至約32.5%、約25%至約27.5%、約25%至約30%、約25%至約32.5%或約25%至約35%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。

B. 用於調節重組多肽之糖基化概況的方法

已顯示聚糖種類顯著影響諸如mAb之治療性蛋白質的藥物動力學(PK)及藥效學(PD)。因此，在本發明之其他態樣中，本文提供用於調節由經遺傳工程改造之哺乳動物細胞產生之一或多種重組多肽的糖基化概況

的方法。在一些實施例中，該方法涉及在本文所述之任何細胞培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養哺乳動物細胞；及產生該一或多種重組多肽，其中該一或多種重組多肽的糖基化概況與由不在本文所述之任何細胞培養基中培養之哺乳動物細胞產生的重組多肽相比有所調節。在一些實施例中，「調節糖基化概況」係指增加重組多肽上特定聚糖種類之相對百分比。然而，在其他實施例中，片語「調節糖基化概況」係指降低重組多肽上特定聚糖種類之相對百分比。當根據本文所揭示之方法產生時，可改變能夠添加至重組多肽之任何聚糖種類的任何相對百分比。

在一些實施例中，在本文所述之任何培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中培養已經遺傳工程改造以產生重組多肽之哺乳動物細胞調節一或多個聚糖種類之量。聚糖種類之實例包括(但不限於)結合於重組多肽之甘露糖-9-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man9)、甘露糖-8-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man8)、甘露糖-7-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man7)、甘露糖-6-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man6)、甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man3)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-3、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-3-海藻糖、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-海藻糖(G0F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1 (G1)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2 (G2)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖(G1F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖-1-N-乙醯基神經胺糖酸-1 (G1F-NANA)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖-1-N-乙醯基神經胺糖酸-1 (G2F-NANA)及/或甘露糖-3-N-乙醯

基葡糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖-1-N-乙醯基神經胺糖酸-2 (G2F-2NANA)。
圖1描繪主要N-聚糖連接種類之示意圖。

重組多肽上聚糖種類之改變可為單獨的且根據此項技術中已知的任何方式量測，諸如(但不限於)高效液相層析(HPLC)、正相HPLC (NP)、親水性相互作用液相層析(HILIC)、離子交換HPLC (IEX)、弱陰離子交換HPLC (WAX-HPLC)、兩性離子磺基甜菜鹼(ZIC-HILIC)、多孔石墨碳HPLC (PGC)、毛細管電泳雷射激發螢光(CE-LIF)、基質輔助雷射脫附/電離飛行時間(MALDI-TOF)、電噴霧電離質譜分析(ESI-MS)、液相層析質譜分析(LC-MS)及串聯質譜分析(MS/MS)。

在一些實施例中，經歸一化或相對於重組多肽上之總聚糖集合體，本文所提供之培養方法減少特定聚糖種類。舉例而言，在一些實施例中，與由不在本文所揭示之培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的聚糖種類的量相比，該方法調節(例如降低)重組多肽上一或多個特定聚糖種類達約1%至約2%、約1%至約3%、約1%至約4%、約1%至約5%、約2.5%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約1%至約15%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約7.5%至約17.5%、約10%至約12.5%、約10%至約15%、約10%至約17.5%、約10%至約20%、約12.5%至約15%、約12.5%至約17.5%、約12.5%至約20%、約12.5%至約22.5%、約15%至約17.5%、約15%至約20%、約15%至約22.5%、約15%至約25%、約17.5%至約20%、約17.5%至約22.5%、約17.5%至約25%、約17.5%至約27.5%、約20%至約22.5%、約20%至約25%、約20%至約27.5%、約20%至約30%、約22.5%至約25%、約22.5%至約27.5%、

約22.5%至約30%、約22.5%至約32.5%、約25%至約27.5%、約25%至約30%、約25%至約32.5%或約25%至約35%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。在一些實施例中，聚糖種類為Man5、G0或G0F。

在一些實施例中，經歸一化或相對於重組多肽上之總聚糖集合體，本文所提供之培養方法增加特定聚糖種類。舉例而言，在其他實施例中，與由不在本文所揭示之培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的聚糖種類的量相比，該方法使一或多個特定聚糖種類增加約1%至約2%、約1%至約3%、約1%至約4%、約1%至約5%、約2.5%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約1至約15%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約7.5%至約17.5%、約10%至約12.5%、約10%至約15%、約10%至約17.5%、約10%至約20%、約12.5%至約15%、約12.5%至約17.5%、約12.5%至約20%、約12.5%至約22.5%、約15%至約17.5%、約15%至約20%、約15%至約22.5%、約15%至約25%、約17.5%至約20%、約17.5%至約22.5%、約17.5%至約25%、約17.5%至約27.5%、約20%至約22.5%、約20%至約25%、約20%至約27.5%、約20%至約30%、約22.5%至約25%、約22.5%至約27.5%、約22.5%至約30%、約22.5%至約32.5%、約25%至約27.5%、約25%至約30%、約25%至約32.5%或約25%至約35%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、

7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%或40%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。

在一些實施例中，與多肽上所有聚糖種類之總和相比，根據本文所述之方法在本文所揭示之任何培養基中培養經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽之哺乳動物細胞調節(例如減少)末端甘露糖聚糖種類之量。如本文所用，片語「末端甘露糖聚糖種類」係指甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-6-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man6)、甘露糖-7-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man7)、甘露糖-8-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man8)及/或甘露糖-9-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man9)部分中之一或多者。

因此，對於根據本文所述之方法中之任一者使用本文所揭示之任何細胞培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)產生之重組多肽，末端甘露糖聚糖種類比多肽上聚糖種類之總和的比率可經調節(例如，降低)達約30%至約70%、約35%至約65%、約40%至約60%、約45%至約55%或約47.5%至約52.5%，諸如約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%或70%或大於70%中之任一者。

在一些實施例中，與多肽上所有聚糖種類之總和相比，根據本文所述之方法在本文所揭示之任何含乙醇培養基中培養經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽之哺乳動物細胞調節G1F、G2F及/或G0F聚糖種類中之

任一者的量。因此，對於根據本文所述之方法中之任一者使用本文所揭示之任何細胞培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)產生之重組多肽，G1F、G2F及/或G0F聚糖種類中之任一者比多肽上聚糖種類之總和的比率可經調節達約30%至約70%、約35%至約65%、約40%至約60%、約45%至約55%或約47.5%至約52.5%，諸如約30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%或70%或大於70%中之任一者。

C. 用於調節高分子量或低分子量種類之方法

在其他態樣中，本文提供用於調節(例如減少)由經工程改造之哺乳動物細胞產生之一或多種重組多肽的高分子量或低分子量種類的量的方法。該方法需要在本文所述之任何細胞培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養哺乳動物細胞；及產生該一或多種重組多肽，其中該重組多肽與由不在本發明之任何細胞培養基中培養之重組哺乳動物細胞產生的重組多肽相比，具有量減少的高分子量或低分子量種類。

如本發明之上下文中所用，「高分子量種類」(HMWS)意謂產生由重組多肽之大於一個次單位組成的任何粒子，亦包括寡聚物，諸如二聚體、三聚體、四聚體、五聚體及其類似物。HMWS亦可由大於2個次單位組成，諸如3、4、5、6、7、8或大於8個中之任一者。HMWS可具有不同尺寸，其質量大於完整組裝之重組多肽。

如本發明之上下文中所用，「低分子量種類」(LMWS)意謂產生由重

組多肽之一或多個次單位組成的任何粒子，亦包括寡聚物，諸如二聚體、三聚體、四聚體、五聚體及其類似物。LMWS可包含未完全組裝及/或摺疊之多肽片段。LMWS可具有不同尺寸，其質量小於完整組裝之重組多肽。

重組多肽之高分子量或低分子量種類之量可根據此項技術中已知的任何方法量測，諸如(但不限於)尺寸排阻層析(SEC)、分析超離心(AUC)、動態或靜態光散射光譜分析(DLS)、差示掃描熱量測定(DSC)或不對稱流場流分級分離(AF4)。

在一些實施例中，與由不在本文所揭示之培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的HMW種類的量相比，本文所揭示之細胞培養方法調節(例如降低)相比於所偵測到之總多肽分子量變異體的HMW種類的量達約1%至約2%、約1%至約3%、約1%至約4%、約1%至約5%、約2.5%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約1至約15%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約7.5%至約17.5%、約10%至約12.5%、約10%至約15%、約10%至約17.5%、約10%至約20%、約12.5%至約15%、約12.5%至約17.5%、約12.5%至約20%、約15%至約17.5%、約15%至約20%、約17.5%至約20%、約17.5%至約22.5%、約17.5%至約25%、約20%至約22.5%、約20%至約25%、約22.5%至約25%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%或大於25%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。

在其他實施例中，與由不在本文所揭示之培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的LMW種類的量相比，本文所揭示之細胞培養方法調節(例如降低)相比於所偵測到之總多肽分子量變異體的LMW種類的量達約1%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約7.5%至約17.5%、約10%至約15%、約10%至約17.5%、約10%至約20%、約12.5%至約17.5%、約12.5%至約20%、約12.5%至約22.5%、約15%至約20%、約15%至約22.5%、約15%至約25%、約17.5%至約22.5%、約17.5%至約25%、約17.5%至約27.5%、約20%至約25%、約20%至約27.5%、約20%至約30%、約22.5%至約27.5%、約22.5%至約30%、約22.5%至約32.5%、約25%至約30%、約25%至約32.5%、約25%至約35%、約27.5%至約37.5%、約30%至約40%、約32.5%至約44.5%、約35%至約45%、約37.5%至約47.5%、約40%至約50%、約42.5%至約52.5%、約45%至約55%、約47.5%至約57.5%、約50%至約60%、約52.5%至約62.5%、約55%至約65%、約57.5%至約67.5%、約60%至約70%、約62.5%至約72.5%或約65%至約75%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、

73%、74%、75%或大於75%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。

D. 用於調節酸性或鹼性電荷種類之量的方法

在其他態樣中，本文提供用於調節(例如減少)由經工程改造之哺乳動物細胞產生之一或多種重組多肽的酸性或鹼性電荷種類的方法。該方法需要在本文所述之任何細胞培養基中，在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養哺乳動物細胞；及產生該一或多種重組多肽，其中該重組多肽與由不在本文所述之任何細胞培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中培養之哺乳動物細胞產生的重組多肽相比，具有量減少的酸性或鹼性電荷種類。

如本文所用，或「酸性電荷種類」或「酸性電荷變異體」係指哺乳動物細胞培養物中攜有酸性電荷的重組產生之蛋白質相比於重組產生之蛋白質之總群體的總多肽電荷變異體的百分比。類似地，如本文所用，「鹼性電荷種類」或「鹼性電荷變異體」係指哺乳動物細胞培養物中攜有鹼性電荷的重組產生之蛋白質相比於重組產生之蛋白質之總群體的總多肽電荷變異體的百分比。

在一些實施例中，與由不在本文所揭示之培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的酸性電荷種類的量相比，本文所揭示之細胞培養方法調節(例如降低)相比於所偵測到之總多肽電荷變異體的酸性電荷種類的量達約1%至約2%、約1%至約3%、約1%至約4%、約1%至約5%、約2.5%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約1至約15%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約10%至約12.5%、約

10%至約15%或約12.5%至約15%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、或15%或大於15%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。

在其他實施例中，與由不在本文所揭示之培養基(諸如含鋰、含乙醇及/或含脂肪酸之細胞培養基)中且未根據本文所述之方法培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽的鹼性電荷種類的量相比，本文所揭示之細胞培養方法調節(例如降低)相比於所偵測到之總多肽電荷變異體的鹼性電荷種類的量達約1%至約2%、約1%至約3%、約1%至約4%、約1%至約5%、約2.5%至約5%、約2.5%至約7.5%、約5%至約7.5%、約5%至約10%、約1%至約15%、約7.5%至約12.5%、約7.5%至約15%、約10%至約12.5%、約10%至約15%或約12.5%至約15%中之任一者，或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、或15%或大於15%中之至少任一者，包括落在此等百分比之間的值。

V. 套組

另外，本發明包括一種用於根據本文所揭示之方法中之任一者培養哺乳動物細胞的套組。套組可含有哺乳動物細胞培養基礎培養基及/或哺乳動物細胞培養進料培養基中之一或多者。另外，套組可另外含有鋰離子源、乙醇及一或多種脂肪酸中之一或多者。套組亦可包括使用套組之書面說明書，諸如製造本文所揭示之任何哺乳動物細胞培養基的說明書以及使用培養基培養哺乳動物細胞(諸如培養經遺傳工程改造以產生一或多種重組多肽之哺乳動物細胞)之說明書。

預期本說明書通篇所給出的每一個最大數值限制包括每一個較低的數值限制，如同此類較低的數值限制明確地書寫在本文中一樣。本說明書

通篇所給出的每一個最小數值限制將包括每一個較高的數值限制，如同此類較高的數值限制明確地書寫在本文中一樣。本說明書通篇所給出的每一個數值範圍將包括落在此類較寬數值範圍內之每一個較窄數值範圍，如同此類較窄數值範圍全部明確地書寫在本文中一般。

可參考以下實例進一步理解本發明，該等實例係以說明方式提供且不意欲為限制性的。

實例

實例1：添加鋰至細胞培養基改良重組多肽之生產及品質

此實例顯示鋰添加至培養基對於重組抗體生產之效應。

I. 測定細胞毒性

氯化鋰對CHO.DXB11細胞之細胞毒性係藉由單次劑量推注摻入來測定。將4 mL細胞密度為 6×10^6 /mL之CHO細胞接種於6孔深盤中，在150 RPM下混合，且摻入氯化鋰達到5 mM至250 mM之工作濃度範圍。當單次劑量摻入氯化鋰超過10 mM時，細胞生長速率及細胞存活率受負面影響。

II. 使用用於單株抗體生產之微小規模生物反應器添加鋰

為測定LiCl是否改變mAb特性，將其併入充分限定的合成進料培養基中且在分批進料方法中使用微型(15 mL工作體積)生物反應器每日饋入。

材料及方法

單株抗體1 (mAb 1)為使用重組DNA技術產生之單株抗體。表現載體為全合成的，其中重鏈及輕鏈基因序列均由強組成性啟動子調控。基因序列係藉由DNA定序來確認。表現載體係藉由限制酶線性化且藉由電穿孔

穩定轉染至CHO.DXB11細胞中。

在基因擴增之後進行單細胞選殖。擴增選擇單細胞純系且低溫保藏。

使用偵測波長設定在280 nm下之Thermo Ultimate 3000系列HPLC來量測效價。移動相A含有磷酸鈉及氯化鈉，而移動相B含有乙酸及氯化鎂。使用 Applied Biosystems POROS A20 管柱且使用 Thermo Chromeleon軟體進行分析。使用經純化抗體作為定量標準。

使用Thermo Ultimate 3000系列HPLC及Thermo Q Exactive質譜儀量測糖基化種類。移動相A由甲酸及三氟乙酸/水組成，而移動相B由甲酸及三氟乙酸/乙腈組成。使用Agilent PLRP-S 1000A 5 μ M管柱且使用 Thermo Excalibur軟體結合Thermo Protein Deconvolution軟體進行分析。

每日饋入LiCl以提高工作生物反應器濃度在0.11 mM與1.11 mM之間。計算所得的鋰的累積細胞培養濃度(在細胞收集時容器中之濃度)介於1 mM-10 mM。生物反應器物理條件維持在pH 7.0 \pm 0.2、30%空氣飽和度之溶氧及對於對數細胞生長期37°C或35°C且在細胞生產期期間變化至31°C(溫度在達到最大活細胞密度前一天變化)之溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果

顯示鋰在所用高濃度端升高抗體效價(圖2)。與基線相比，較高劑量之鋰使效價升高超過21%。此外，較高濃度之鋰使Man5聚糖種類減少超過13% (圖2)。

III. 在實驗設計(DOE)研究中使用用於單株抗體生產之微小規模生物反應

器添加鋰

將鋰用於使用 JMP 統計學軟體 (World Wide Web.jmp.com/en_us/home.html) 以常規 DOE 設計創建之實驗設計 (DOE) 中。在 12 天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器工作濃度升高 0.5 mM 或 1 mM。使用標準最小平方法創建響應模型以確定來自鋰補充物之響應的顯著性。亦考慮與其他補充組分之潛在相互作用。

圖 3 描繪 DOE 分析之結果。評定效價、Man5%、G0%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類。預測概況顯示模型如何隨著個別因素變化而改變，以便判定模型對於彼等因素變化之靈敏性。如下表 1 中所示，添加 1 mM 鋰使效價升高超過 20%，使 Man5 聚糖種類降低超過 6%，分別使高分子量及低分子量種類降低超過 9% 及 46%，且亦分別使酸性及鹼性電荷變異體種類降低超過 9% 及 3%。

表 1：自效價、Man5%、G0%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類之預測概況提取的響應值的改變。

	效價	Man5%	G0%	HMW%	LMW%	酸性%	鹼性%
0.5 mM 鋰	+ 10.7%	- 3.1%	+ 5.2%	- 4.5%	- 23.0%	- 4.5%	- 1.5%
1.0 mM 鋰	+ 21.3%	- 6.3%	+ 10.4%	- 9.1%	- 46.0%	- 9.1%	- 3.0%

IV. 在使用替代變量之實驗設計 (DOE) 研究中使用用於單株抗體生產之微小規模生物反應器添加鋰

將鋰用於使用替代方法條件之如上所述之實驗設計中。物理條件係藉由改變溫度及 pH 設定點而改變。進料調配物經修改以包括額外胺基酸及痕量元素。在 13 天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器工作濃度升高 0.5 mM 或 1 mM。使用標準最小平方法創建響應模型以確定來自鋰補充物之響應的顯著性。亦考慮與其他補充組分之潛在相互作用。

結果展示於圖 4 中。評定效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F%、

G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類。自預測概況提取之響應值的改變展示於下表2中。與基線相比，在1 mM濃度下，鋰使效價升高幾乎17%，使Man5聚糖變異體降低大於26%，分別使高分子量及低分子量種類降低大於12%及大於61%，且使酸性及鹼性電荷變異體降低大於4%。

表2：自效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類之預測概況提取的響應值的改變。

	效價	Man5%	G0%	G0F%	G1F%	G2F%	HMW%	LMW%	酸性%	鹼性%
0.5 mM 鋰	+ 8.5%	- 13.2%	- 2.0%	- 0.5%	+ 0.8%	- 0.3%	- 6.1%	- 30.9%	- 2.4%	- 2.3%
1.0 mM 鋰	+ 16.9%	- 26.4%	- 4.0%	- 0.9%	+ 1.6%	- 0.6%	- 12.2%	- 61.8%	- 4.8%	- 4.5%

將上文所述之兩項分析的DOE實驗結果組合成一個使用總共48個獨立生物反應器條件之預測模型。藉由組合資料集，信賴區間收緊且p值降低，從而使得響應顯著性較高。此結合資料之預測響應概況展示於圖5中且自預測概況提取之響應值的改變展示於下表3中。如所示，在1 mM濃度下，鋰使效價升高幾乎20%，使Man5聚糖變異體降低大於14%，分別使高分子量及低分子量種類降低大於10%及大於52%，且分別使酸性及鹼性電荷變異體降低大於6%及3%。

表3：自效價、Man5%、G0%、G0F%、G1F%、G2F%、HMW%、LMW%、酸性%及鹼性%種類之預測概況提取的響應值的改變。

	效價	Man5%	G0%	G0F%	G1F%	G2F%	HMW%	LMW%	酸性%	鹼性%
0.5 mM 鋰	+ 9.7%	- 7.3%	+ 1.6%	+ 2.6%	- 2.6%	- 5.8%	- 5.2%	- 26.2%	- 3.4%	- 1.8%
1.0 mM 鋰	+ 19.4%	- 14.6%	+ 3.2%	+ 5.3%	- 5.1%	- 11.5%	- 10.4%	- 52.4%	- 6.9%	- 3.6%

V. 使用補充鋰之培養基產生不同單株抗體

單株抗體2 (mAb 2)為使用重組DNA技術產生之單株抗體。表現載體為全合成的，其中重鏈及輕鏈基因序列均由強組成性啟動子調控。基因序

列係藉由DNA定序來確認。表現載體係藉由限制酶線性化且藉由電穿孔穩定轉染至CHO.DG44細胞中。進行兩輪單細胞選殖。擴增單細胞純系且低溫保藏。

鋰係使用產生單株抗體2號(mAb2)之不同CHO宿主(CHO DG44)來測試。如上所述進行細胞培養及單株抗體生產。細胞係在微小規模生物反應器中生長且在13天分批進料方法中，每日饋入鋰以使生物反應器濃度升高0.11 mM (低Li)、0.44 mM (中等Li)及1.11 mM (高Li)。結果表明，向細胞培養基中補充鋰分別使Man6%聚糖水準(圖6)及Man5%聚糖水準(圖6)與基線相比減少29%及12%。另外，較高鋰濃度使高分子量種類與基線相比減少24% (圖6)。

實例2：添加乙醇至細胞培養基改良重組多肽之生產

此前，研發出基於乙醇之膽固醇補充劑以在基於線性、低密度聚丙烯之拋棄式生物反應器系統中培養膽固醇依賴性NS0細胞。此基於乙醇之補充劑含有膽固醇、油酸及亞麻油酸(Tao等人, *Biotechnol Lett.*, 2012; 34(8):1453-8)。此實例研究使用乙醇作為各種脂肪酸之增溶劑用於產生mAb產物。

I. 測定細胞毒性

乙醇對CHO.DXB11細胞之細胞毒性係藉由每日進料供給來測定。將4 mL細胞密度為 3×10^6 /mL之CHO細胞接種於6孔深盤中，在150 RPM下混合，且每日饋入範圍介於0.1%至0.4%體積比體積(v/v)之乙醇一次。當每日乙醇進料超過0.3% v/v時，細胞生長速率及細胞存活率受負面影響。

II. 使用用於單株抗體生產之微小規模生物反應器添加乙醇

為測定乙醇是否改變mAb特性，將其併入充分限定的合成進料培養

基中且在分批進料方法中使用微型(15 mL工作體積)生物反應器每日饋入。

材料及方法：

如上文關於mAb 1所述進行抗體生產。

細胞株A為產生mAb 1之CHO.DXB11源性純系。細胞株B為產生mAb1之不同CHO.DXB11源性純系。表現卡匣在兩個細胞株之間為相同的。

使用微小規模生物反應器及兩種不同的產生mAb1之細胞純系，每日饋入0.0%或0.057% v/v乙醇。計算所得的乙醇的累積細胞培養濃度(在細胞收集時容器中之濃度)介於0.0%-0.51% v/v。生物反應器物理條件維持在pH 7.0 ± 0.2 、30%空氣飽和度之溶氧及在對數細胞生長期期間35°C且在細胞生產期期間變化至31°C(溫度在達到最大活細胞密度前一天變化)之溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果：

觀測到乙醇補充改變糖基化概況、改變高分子量及低分子量種類且改變酸性及鹼性電荷種類。如圖7及圖8中所示，乙醇減少所用兩種細胞株中之總體Man5%聚糖種類，而對G0%及G0F%聚糖種類之效應相對於細胞株不同(圖7及圖8)。另外，乙醇增加相對於所用兩種細胞株不同之總體G1F%及G2F%聚糖種類(圖7及圖8)。此外，當與針對所測試之兩種細胞株所偵測到之總電荷種類變異體相比時，乙醇減少酸性電荷變異體之相對量，同時略微增加鹼性電荷變異體之相對百分比(圖7及圖8)。

III. 在實驗設計(DOE)研究中使用用於單株抗體生產之微小規模生物反應器添加乙醇

將乙醇用於使用 JMP 統計學軟體 (World Wide Web.jmp.com/en_us/home.html) 以常規 DOE 設計創建之實驗設計 (DOE) 中。使用標準最小平方法創建響應模型以確定來自鋰補充物之響應的顯著性。亦考慮與其他補充組分之潛在相互作用。使用微小規模生物反應器每日饋入 0.0% 至 0.1% 乙醇。圖 9 為效價、Man5%、G0%、酸性%及鹼性%種類之預測響應概況，而此等中之每一者的響應值的改變展示在下表 4 中。

表 4：自效價、Man5%、G0%、酸性%及鹼性%種類之預測概況提取的響應值的改變。在 12 天分批進料方法中，每日饋入乙醇以使生物反應器工作濃度升高 0.05% 及 0.1% v/v。

	效價	Man5%	G0%	酸性%	鹼性%
0.05% v/v 乙醇	+ 2.0%	- 1.9%	- 0.7%	- 4.7%	+ 1.0%
0.1% v/v 乙醇	+ 3.9%	- 3.8%	- 1.3%	- 9.3%	+ 1.9%

IV. 使用實驗室規模生物反應器添加乙醇

材料及方法：

如上文關於 mAb 1 所述進行抗體生產。

每日饋入 0.072% (低乙醇) 或 0.144% (高乙醇) v/v 乙醇。計算所得的乙醇的累積細胞培養濃度 (在細胞收集時容器中之濃度) 介於 0.79% - 1.58% v/v。生物反應器物理條件維持在 pH 7.0 ± 0.2、維持在 30% 空氣飽和度之溶氧、在對數細胞生長期期間 35°C 且在細胞生產期期間變化至 31°C (溫度在達到最大活細胞密度前一天變化) 之溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果

如圖 10 中所示，高乙醇濃度與較少 Man5 及 G0 聚糖種類、較多 G1F 及 G2F 聚糖種類及較少高分子量及低分子量種類相關聯。

V. 使用實驗室規模生物反應器及兩種不同進料調配物添加乙醇

材料及方法：

如上文關於mAb 1所述進行抗體生產。

每日饋入0.0%至0.018% v/v乙醇。計算所得的乙醇的累積細胞培養濃度(在細胞收集時容器中之濃度)介於0.0%-0.2% v/v。生物反應器物理條件維持在pH 7.0 ± 0.2 變化至 6.8 ± 0.1 、維持在30%空氣飽和度之溶氧及35°C之恆定溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

在調配物1號及2號中使用相同的基礎培養基。進料調配物1號及2號在組成上類似，含有相同類型及量的胺基酸及維生素。鹽及金屬離子類型及濃度略有變化。兩種進料均為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果

如圖11中所示，乙醇補充至調配物1中使得Man5、G1F及G2F聚糖種類以及鹼性電荷變異體增加。相比之下，此組合產生較少G0及G0F聚糖種類以及較少酸性電荷變異體。調配物2補充乙醇產生減少的Man5、G0及G1F聚糖種類，但較多G0F及G2F聚糖種類以及較大量酸性電荷變異體(圖11)。

III. 使用用於生產不同單株抗體之微小規模生物反應器添加乙醇

材料及方法：

如上文關於mAb 2所述進行抗體生產。此細胞株為產生mAb 2之CHO.DG44源性純系。

每日饋入0.0%至0.15% v/v乙醇。計算所得的乙醇的累積細胞培養濃度(在細胞收集時容器中之濃度)介於0.0%-1.35% v/v。生物反應器物理條件

維持在pH 7.0 ± 0.1 變化至 6.8 ± 0.1 、維持在30%空氣飽和度之溶氧及 35°C 之恆定溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果

如圖12中所示，較高乙醇濃度與Man5及G0F聚糖種類減少、G0、G1F及G2F聚糖種類增加以及高分子量種類減少相關聯。

乙醇補充改變糖基化概況、抗體聚集物以及酸性及鹼性電荷變異體。此等效應有時在不同細胞株、mAb產物及/或進料調配物當中有所不同。

在大多數情況下，乙醇減少Man5%、G0%及G0F%且增加成熟聚糖種類G1F%及G2F%。

實例3：添加脂肪酸至細胞培養基改良重組多肽之生產

外源性脂肪酸補充可能降低細胞內能量消耗，因為三磷酸腺苷(ATP)在乙醯CoA轉化成丙二醯CoA時被消耗，丙二醯CoA為細胞內脂肪酸之主要構築嵌段。此外，脂肪酸補充可能強化完整性，因為大部分細胞膜由C16及C18長磷脂構成。

I. 測定細胞毒性

脂肪酸對CHO.DXB11細胞之細胞毒性係藉由每日進料供給來測定。將4 mL細胞密度為 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 之CHO細胞接種於6孔深盤中，在150 RPM下混合且每日饋入脂肪酸。將脂肪酸溶解於乙醇中且每日饋入一次以使得孔盤濃度自 $10 \mu\text{M}$ 升高至 $160 \mu\text{M}$ 。細胞生長速率及細胞存活率在不同水準下受負面影響，視個別脂肪酸而定。油酸、亞麻油酸及次亞麻油酸在約 $40 \mu\text{M}$ 每日進料濃度下變得有毒。肉豆蔻酸、棕櫚酸及硬脂酸在約 $80 \mu\text{M}$ 每

日進料濃度下變得有毒。膽固醇在約50 μM 每日進料濃度下開始變得有毒。

II. 使用實驗室規模生物反應器添加油酸

材料及方法：

如上文關於mAb 1所述進行抗體生產。

進料培養基補充有脂肪酸以測定脂肪酸是否改變mAb特性。在分批進料方法中，使用實驗室規模(2 L工作體積)生物反應器每日饋入進料培養基。每日饋入油酸以使工作生物反應器濃度升高40 μM 。計算所得的油酸的累積細胞培養濃度(在細胞收集時容器中之濃度)為440 μM 。用於基線量測之培養基不含任何脂肪酸或乙醇。

生物反應器物理條件維持在pH 7.0 \pm 0.2、30%空氣飽和度之溶氧、在對數細胞生長期期間35°C且在細胞生產期期間變化至29°C(溫度在達到最大活細胞密度前一天變化)之溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果：

如圖13中所示，添加油酸至培養基升高單株抗體效價、減少Man5、G0及G0F聚糖種類、增加G1F及G2F聚糖種類、減少高分子量種類且減少酸性電荷變異體。

III. 使用實驗室規模生物反應器在不同物理及進料條件下添加油酸

材料及方法：

如上文關於mAb 1所述進行抗體生產。

補充乙醇之培養基另外補充有脂肪酸以測定脂肪酸是否改變mAb特性。在分批進料方法中，使用實驗室規模(2 L工作體積)生物反應器每日

饋入進料培養基。每日饋入油酸以使工作生物反應器濃度升高40 μM 。計算所得的油酸的累積細胞培養濃度(在細胞收集時容器中之濃度)為440 μM 。用於基線量測之培養基含有乙醇，但不含脂肪酸。

生物反應器物理條件維持在 $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ 、30%空氣飽和度之溶氧、在對數細胞生長期期間 35°C 且在細胞生產期期間變化至 31°C (溫度在達到最大活細胞密度前一天變化)之溫度。基礎及進料培養基為全合成且化學限定的，不含動物源性組分。

結果：

如圖14中所示，添加油酸使得抗體效價降低、Man5、G0、G1F及G2F聚糖種類減少、G0F聚糖種類增加、高分子量及低分子量種類增加、酸性電荷變異體減少及鹼性電荷變異體增加。補充油酸似乎使Man5%水準與僅補充乙醇相比進一步減少。其另外改變海藻糖基化聚糖種類且減少酸性電荷變異體。

總體而言，觀測到溶解於乙醇中之油酸增加G0F%聚糖分佈。除減少酸性電荷種類以外，補充似乎減少Man5%、G0%、G1F%、G2F%聚糖分佈。

實例4：添加氯化鈉至培養基以與添加氯化鋰相比較

在正常細胞間質環境中，鈉濃度通常為136-145 mM且氯離子通常為96-106 mM。對於上文所述之補充鋰之培養基，每日添加大致1 mM氯化鋰，其使得氯離子濃度大致升高1%。因此，此實例顯示由鋰離子濃度升高而非氯離子量增加引起的細胞生產率提高。

材料及方法：

單株抗體3 (mAb3)為使用重組DNA技術產生之單株抗體。表現載體

為全合成的，其中重鏈及輕鏈基因序列均由強組成性啟動子調控。基因序列係藉由DNA定序來確認。表現載體係藉由限制酶線性化且藉由電穿孔穩定轉染至CHO.DXB11細胞中。在甲胺喋呤濃度升高之情況下，進行基因擴增步驟。在基因擴增之後進行單細胞選殖。擴增選擇單細胞純系且低溫保藏。所用細胞株為CHO.DXB11源性純系。

使用兩種不同方法策略每日饋入4.59 mM及9.18 mM氯化鈉。方法策略1維持在36.5°C，隨後在生產期期間變化至31°C。方法策略2維持在36.5°C，隨後在生產期期間變化至31°C，隨後在後生產期期間再變化回至36.5°C。兩種方法策略均維持在30%空氣飽和度及pH 7.0 ± 0.2。其他聚糖種類及HMW%與LMW%由於未自氯化鈉補充觀測到顯著水準變化而未列出。

結果：

如圖15A及圖15B中所示，添加氯化鈉至培養基降低單株抗體效價及G0F聚糖種類。Man5、G0、G1F及G2F聚糖種類隨著酸性及鹼性電荷變異體而增加。

當補充含量增加的氯化鈉時，mAb特性改變且與補充有氯化鋰時顯著不同。氯化鈉降低效價水準，以不同方式改變糖基化概況，增加鹼性%且未改變LMW%或HMW%。資料表明在氯化鋰下所觀測到的效應歸因於鋰離子而非氯離子。

實例5：用脂肪酸、甲酯、固醇、甘油酯及類異戊二烯補充培養基

將多種脂肪酸、甲酯、固醇、甘油酯及類異戊二烯添加至用於產生兩種單獨單株抗體之細胞培養基中，隨後評估效價及產物品質。

材料及方法：

根據先前實例中所述之方法，使用兩種單獨的細胞株產生單株抗體1 (mAb1)及4 (mAb4)。如先前實例中一般評定效價、高分子量及低分子量種類、酸性及鹼性電荷變異體之百分比以及糖基化種類概況。

將脂肪酸溶解於乙醇中且根據表5，使用針對mAb1及mAb4之兩種不同方法策略每日饋入。mAb1方法策略維持在37°C，隨後在後指數期期間變化至31°C，而pH值在整個培養中維持在7.0 ± 0.2。mAb4方法策略維持在36.5°C，隨後在生產期期間變化至33°C，而pH值在後指數期自7.0 ± 0.1變化至6.8 ± 0.1。兩種方法策略均維持在30%空氣飽和度

表5：用於細胞培養之進料條件。

補充物	mAb1進料條件		mAb4進料條件	
	每日脂肪酸進料(μM)	每日乙醇進料(% v/v)	每日脂肪酸進料(μM)	每日乙醇進料(% v/v)
對照物	0.0	0.05	0.0	0.09
瑞香草酚	2.7	0.05	5.0	0.09
膽固醇乙酸酯	10.7	0.05	20.0	0.09
辛酸甲酯	2.7	0.05	5.0	0.09
1-辛醯基-外消旋-甘油	2.7	0.05	5.0	0.09
油酸	10.7	0.05	20.0	0.09
亞麻油酸	10.7	0.05	20.0	0.09
次亞麻油酸	10.7	0.05	20.0	0.09
膽固醇	7.4	0.05	20.0	0.09
棕櫚酸	10.7	0.05	20.0	0.09
硬脂酸	10.7	0.05	20.0	0.09
肉豆蔻酸	10.7	0.05	20.0	0.09

結果

如圖16中所示，培養基補充有瑞香草酚、1-辛醯基-外消旋-甘油、亞麻油酸及次亞麻油酸使得mAb1之效價升高，同時次亞麻油酸使得mAb4之產量增加。關於HMW種類，棕櫚酸降低mAb1相對於對照物之相對百分比(圖17A)，而瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸降低mAb4之HMW種類的相對百分比

(圖17A)。使用瑞香草酚、1-辛醯基-外消旋-甘油、亞麻油酸、次亞麻油酸、棕櫚酸及硬脂酸使mAb1之低分子量種類減少(圖17B)，而瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、亞麻油酸及棕櫚酸減少mAb4之LMW種類(圖17B)。

對於mAb1生產，經由補充瑞香草酚、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、棕櫚酸及肉豆蔻酸減少酸性電荷變異體(圖18A)，而瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸減少mAb4之酸性電荷變異體(圖18A)。對於mAb1生產，培養基補充有膽固醇、棕櫚酸及硬脂酸減少鹼性電荷變異體(圖18B)，而瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸降低mAb4之鹼性電荷變異體的相對百分比(圖18B)。

對於mAb1生產，在培養基補充有膽固醇乙酸酯之後觀測到Man5聚糖種類減少(圖19A)，而對於mAb4生產，補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸降低Man5聚糖種類之相對百分比(圖19A)。在培養基補充有瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸之後觀測到mAb1之G0聚糖種類減少(圖19B)，而對於mAb4生產，補充有膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、膽固醇、棕櫚酸、硬脂酸及肉豆蔻酸降低G0聚糖種類之相對百分比(圖19B)。最後，在培養基補充有膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、油酸及肉豆蔻酸之後觀測到mAb1之G0F聚糖種類減少(圖20)，而對於mAb4生產，補充有1-辛醯基-外消旋-甘油降低G0F聚糖種類之相對百分比(圖20)。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種由經工程改造之哺乳動物細胞產生一或多種重組多肽的方法，該方法包含：

(a) 於培養基中在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養該經工程改造之哺乳動物細胞，且在培養時增加該培養基中之鋰離子濃度，其中鋰離子在該培養基中之濃度每日升高約0.1 mM至約1.11 mM；及

(b) 產生該一或多種重組多肽，

其中該培養基包含：

(i) 基礎培養基或進料培養基；及

(ii) 一或多種鋰離子源。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該方法另外包含(c)分離該一或多種重組多肽。

【請求項3】

如請求項1或請求項2之方法，其中該培養基為(a)基礎培養基；或(b)進料培養基。

【請求項4】

如請求項1或2之方法，其中該一或多種重組多肽為抗體或其片段。

【請求項5】

如請求項4之方法，其中該抗體為單株抗體。

【請求項6】

如請求項5之方法，其中該單株抗體抑制增生細胞的生長。

【請求項7】

如請求項4之方法，其中該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/科星蛋白酶9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)、達比加群(dabigatran)、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA4)、介白素-5 (IL-5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌(*B. anthracis*)之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6 (IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (delta like ligand 4, DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子(Von Willebrand factor, vWF)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 $\alpha_4\beta_7$ 。

【請求項8】

如請求項5之方法，其中該單株抗體係選自曲妥珠單抗(trastuzumab)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、貝伐單抗(bevacizumab)、蘭比珠單抗(ranibizumab)、那他珠單抗(natalizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、阿

侖單抗(alemtuzumab)、達利珠單抗(daclizumab)、依法利珠單抗(efalizumab)、戈利木單抗(golimimumab)、賽妥珠單抗(certolizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、帕尼單抗(panitumumab)、帕利珠單抗(palivizumab)、阿昔單抗(abciximab)、巴利昔單抗(basiliximab)、替伊莫單抗(ibritumomab)、奧馬珠單抗(omalizumab)、依庫麗單抗(eculizumab)、阿利若單抗(alirocumab)、貝利單抗(belimumab)、布林莫單抗(blinatumomab)、貝倫妥單抗(brentuximab)、康納單抗(canakinumab)、卡羅單抗(capromab)、達土木單抗(daratumumab)、德諾單抗(denosumab)、迪奴圖單抗(dinutuximab)、埃羅妥珠單抗(elotuzumab)、依伏洛單抗(evolocumab)、艾達西單抗(idarucizumab)、伊匹單抗(ipilimumab)、美泊利單抗(mepolizumab)、耐昔妥珠單抗(necitumumab)、尼沃單抗(nivolimumab)、奧妥珠單抗(obinutuzumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、派姆單抗(pembrolizumab)、雷莫蘆單抗(ramucirumab)、瑞西巴單抗(raxibacumab)、依庫其單抗(ecukinumab)、思圖昔單抗(siltuximab)、托珠單抗(tocilizumab)、優特克單抗(ustekinumab)、阿西珠單抗(alacizumab)、布洛蘇單抗(blosozumab)、洛莫松單抗(romosozumab)、司他莫單抗(stamulumab)、阿斯科林單抗(ascrinvacumab)、伊諾替珠單抗(enoticumab)、艾維那單抗(evinacumab)、依庫克單抗(icrucumab)、因克拉單抗(inclacumab)、內斯瓦庫單抗(nesvacumab)、奧替庫單抗(orticumab)、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗(rinucumab)、韋森庫單抗(vesencumab)、玻可昔單抗(bococizumab)、卡普拉單抗(caplacizumab)、登西珠單抗(demcizumab)、埃達珠單抗(etaracizumab)、拉帕珠單抗

(ralpencizumab)、他度珠單抗(tadocizumab)、阿杜卡單抗(aducanumab)、阿提努單抗(atinumab)、法神單抗(fasinumab)、弗蘭努單抗(fulranumab)、甘特羅單抗(gantenerumab)、歐匹西單抗(opicinumab)、貝頻珠單抗(bapineuzumab)、克雷內單抗(crenezumab)、歐紮尼單抗(ozanezumab)、泊尼株單抗(ponezumab)、瑞法尼單抗(refanezumab)、索拉珠單抗(solanezumab)、他尼珠單抗(tanezumab)及維多珠單抗(vedolizumab)。

【請求項9】

一種用於調節由經遺傳工程改造之哺乳動物細胞產生之一或多種重組多肽的糖基化概況的方法，該方法包含：

(a) 於培養基中在適合產生該一或多種重組多肽之條件下培養該哺乳動物細胞，且在培養時增加該培養基中之鋰離子濃度，其中鋰離子在該培養基中之濃度每日升高約0.1 mM至約1.11 mM；
及

(b) 產生該一或多種重組多肽，

其中該培養基包含：

- (i) 基礎培養基或進料培養基；及
- (ii) 一或多種鋰離子源，

且其中該一或多種重組多肽與由不在該培養基中培養的哺乳動物細胞產生之重組多肽相比，具有經調節之糖基化概況。

【請求項10】

如請求項9之方法，其中該經調節之糖基化概況包含經調節之末端甘露糖聚糖種類。

【請求項11】

如請求項9之方法，其中該經調節之糖基化包含調節選自以下之一或多個聚糖種類：甘露糖-5-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man5)、甘露糖-6-N-乙醯基葡萄糖胺-2 (Man6)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4 (G0)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-海藻糖(G0F)、甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-1-海藻糖(G1F)及/或甘露糖-3-N-乙醯基葡萄糖胺-4-半乳糖-2-海藻糖(G2F)。

【請求項12】

如請求項9至11中任一項之方法，其中該末端甘露糖聚糖種類比聚糖種類總和之比率經調節約40%至約50%。

【請求項13】

如請求項9至11中任一項之方法，其中該一或多種重組多肽為抗體或其片段。

【請求項14】

如請求項13之方法，其中該抗體為單株抗體。

【請求項15】

如請求項14之方法，其中該單株抗體抑制增生細胞的生長。

【請求項16】

如請求項13之方法，其中該抗體或其片段結合於HER2、TNF- α 、VEGF-A、 α 4-整合素、CD20、CD52、CD25、CD11a、EGFR、呼吸道融合病毒(RSV)、糖蛋白IIb/IIIa、IgG1、IgE、補體成分5 (C5)、B細胞活化因子(BAFF)、CD19、CD30、介白素-1 β (IL1 β)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD38、RANKL、GD2、SLAMF7 (CD319)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/科星蛋白酶9型(PCSK9)、達比加群、細胞毒性T淋巴細

胞相關蛋白4 (CTLA4)、介白素-5 (IL-5)、計劃性細胞死亡蛋白(PD-1)、VEGFR2 (KDR)、炭疽芽孢桿菌之保護性抗原(PA)、介白素-17 (IL-17)、介白素-6 (IL-6)、介白素-6受體(IL6R)、介白素-12 (IL-12)、介白素23 (IL-23)、硬骨素(SOST)、肌肉抑制素(GDF-8)、活化素受體樣激酶1、德耳塔樣配體4 (DLL4)、血管生成素3、VEGFR1、選擇素、氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、血小板衍生生長因子受體 β 、神經纖毛蛋白1、溫韋伯氏因子(vWF)、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、神經細胞凋亡調節蛋白酶1、整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 β -澱粉狀蛋白、內質網蛋白4 (RTN4)/神經突生長抑制劑(NOGO-A)、神經生長因子(NGF)、LINGO-1、髓鞘相關糖蛋白或整合素 $\alpha_4\beta_7$ 。

【請求項17】

如請求項14之方法，其中該單株抗體係選自曲妥珠單抗、帕妥珠單抗、英利昔單抗、阿達木單抗、貝伐單抗、蘭比珠單抗、那他珠單抗、利妥昔單抗、阿侖單抗、達利珠單抗、依法利珠單抗、戈利木單抗、賽妥珠單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗、帕利珠單抗、阿昔單抗、巴利昔單抗、替伊莫單抗、奧馬珠單抗、依庫麗單抗、阿利若單抗、貝利單抗、布林莫單抗、貝倫妥單抗、康納單抗、卡羅單抗、達土木單抗、德諾單抗、迪奴圖單抗、埃羅妥珠單抗、依伏洛單抗、艾達西單抗、伊匹單抗、美泊利單抗、耐昔妥珠單抗、尼沃單抗、奧妥珠單抗、奧法木單抗、派姆單抗、雷莫蘆單抗、瑞西巴單抗、依庫其單抗、思圖昔單抗、托珠單抗、優特克單抗、阿西珠單抗、布洛蘇單抗、洛莫松單抗、司他莫單抗、阿斯科林單抗、伊諾替珠單抗、艾維那單抗、依庫克單抗、因克拉單抗、內斯瓦庫單抗、奧替庫單抗、雷莫蘆單抗、瑞奴庫單抗、韋森庫單抗、玻可昔單抗、卡普拉單抗、登西珠單抗、埃達珠單抗、拉帕珠單抗、他度珠單抗、阿杜

卡單抗、阿提努單抗、法神單抗、弗蘭努單抗、甘特羅單抗、歐匹西單抗、貝頻珠單抗、克雷內單抗、歐紮尼單抗、泊尼株單抗、瑞法尼單抗、索拉珠單抗、他尼珠單抗及維多珠單抗。

【請求項18】

如請求項1之方法，其中該培養基另外包含(c)乙醇；及/或(d)一或多種脂肪酸。

【請求項19】

如請求項18之方法，其中該一或多種脂肪酸係選自由以下組成之群：油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、肉豆蔻酸、棕櫚酸、硬脂酸、瑞香草酚、膽固醇乙酸酯、辛酸甲酯、1-辛醯基-外消旋-甘油、膽固醇、丁酸(C4)、戊酸(C5)、己酸(C6)、庚酸(C7)、辛酸(C8)、壬酸(C9)、癸酸(C10)、十一酸(C11)、月桂酸(C12)、十三酸(C13)、肉豆蔻酸(C14)、十五酸(C15)、十七酸(C17)、十九酸(C19)、花生酸(C20)、二十一酸(C21)、二十二酸(C22)、二十三酸(C23)、二十四酸(C24)、二十五酸(C25)、蠟酸(C26)、二十七酸(C27)、二十八酸(C28)、二十九酸(C29)、三十酸(C30)、三十一酸(C31)、三十二酸(C32)、三十三酸(C33)、三十四酸(C34)、三十五酸(C35)、三十六酸(C36)、三十七酸(C37)及三十八酸(C38)。

【請求項20】

如請求項1之方法，其中該一或多種鋰離子源係選自乙酸鋰、氯化鋰、碳酸鋰、氧基丁酸鋰、乳清酸鋰、溴化鋰、檸檬酸鋰、氟化鋰、碘化鋰、硝酸鋰及硫酸鋰中之一或多者之群。

【請求項21】

如請求項1之方法，其中該等鋰離子係以約0.1 μM 至約25 mM之濃度存在。

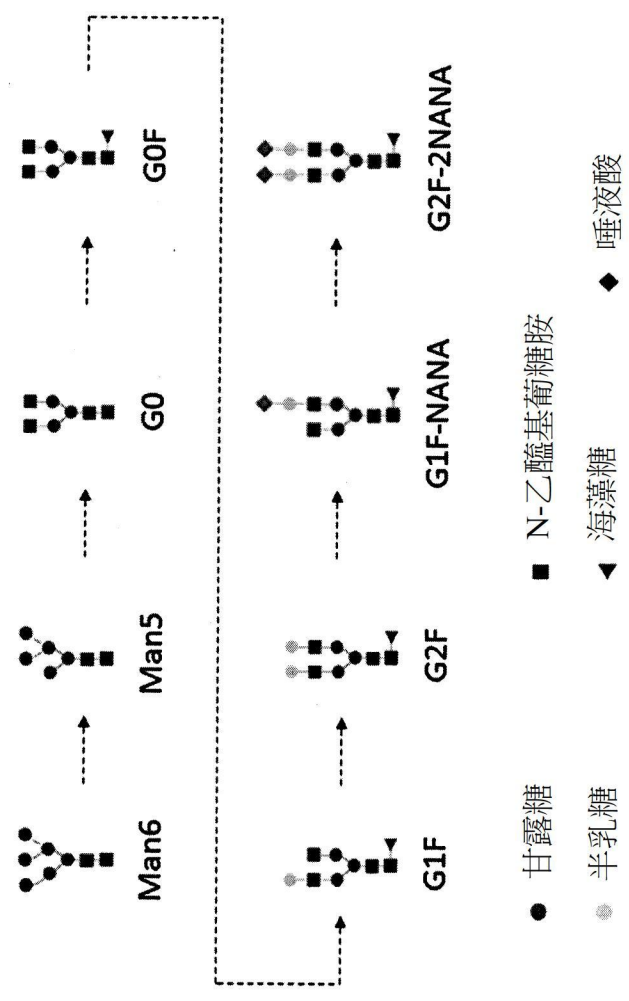
【請求項22】

如請求項1之方法，其中鋰離子在該培養基中之濃度每日升高約0.1 mM、約0.11 mM、約0.5 mM、約0.44 mM、約1 mM或約1.11 mM。

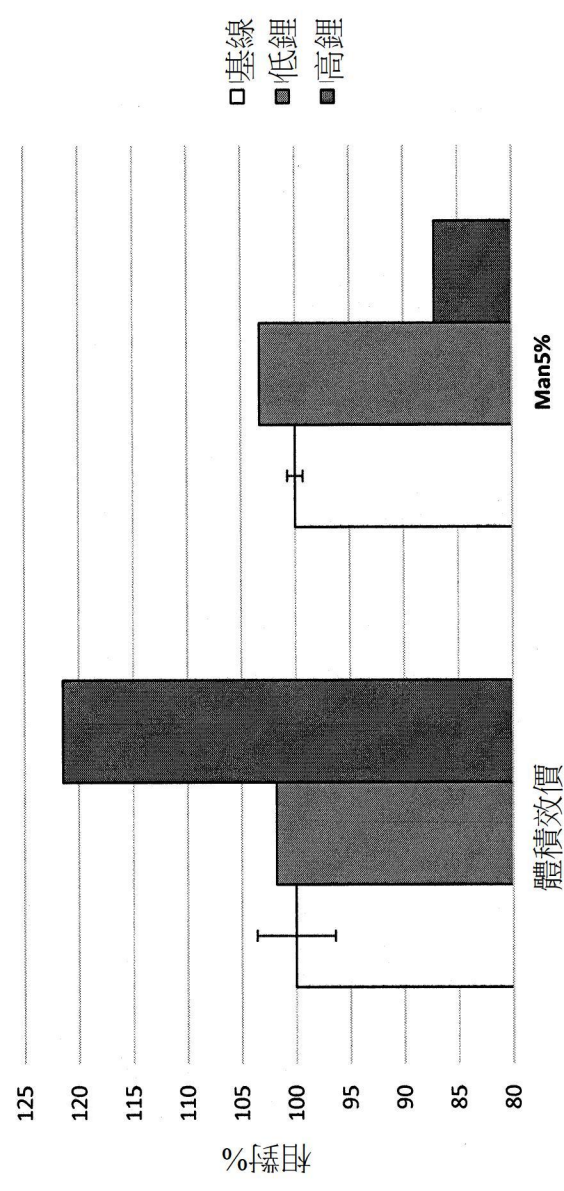
【請求項23】

如請求項9之方法，其中鋰離子在該培養基中之濃度每日升高約0.1 mM、約0.11 mM、約0.5 mM、約0.44 mM、約1 mM或約1.11 mM。

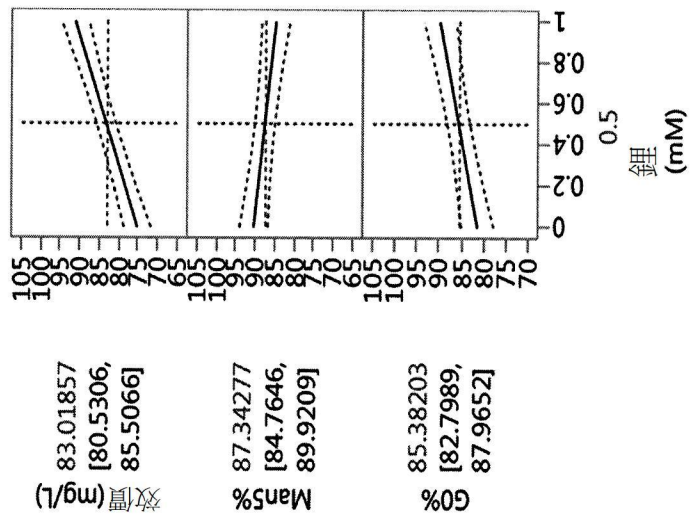
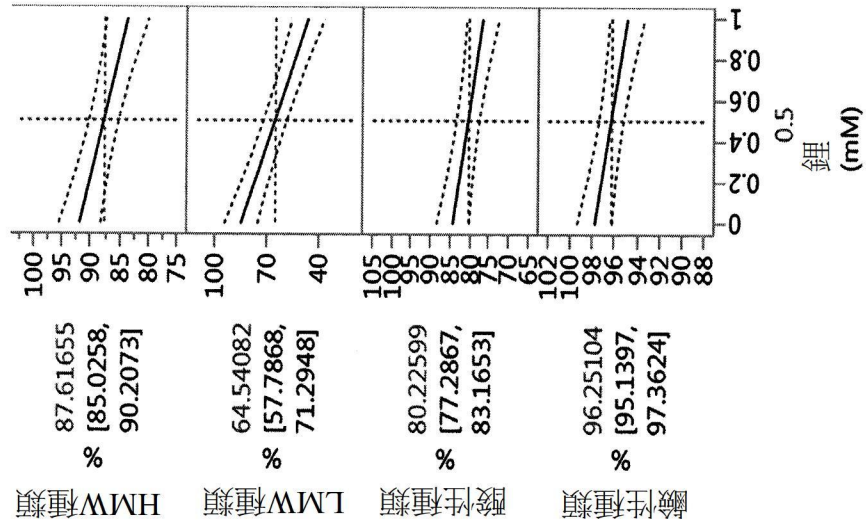
【發明圖式】



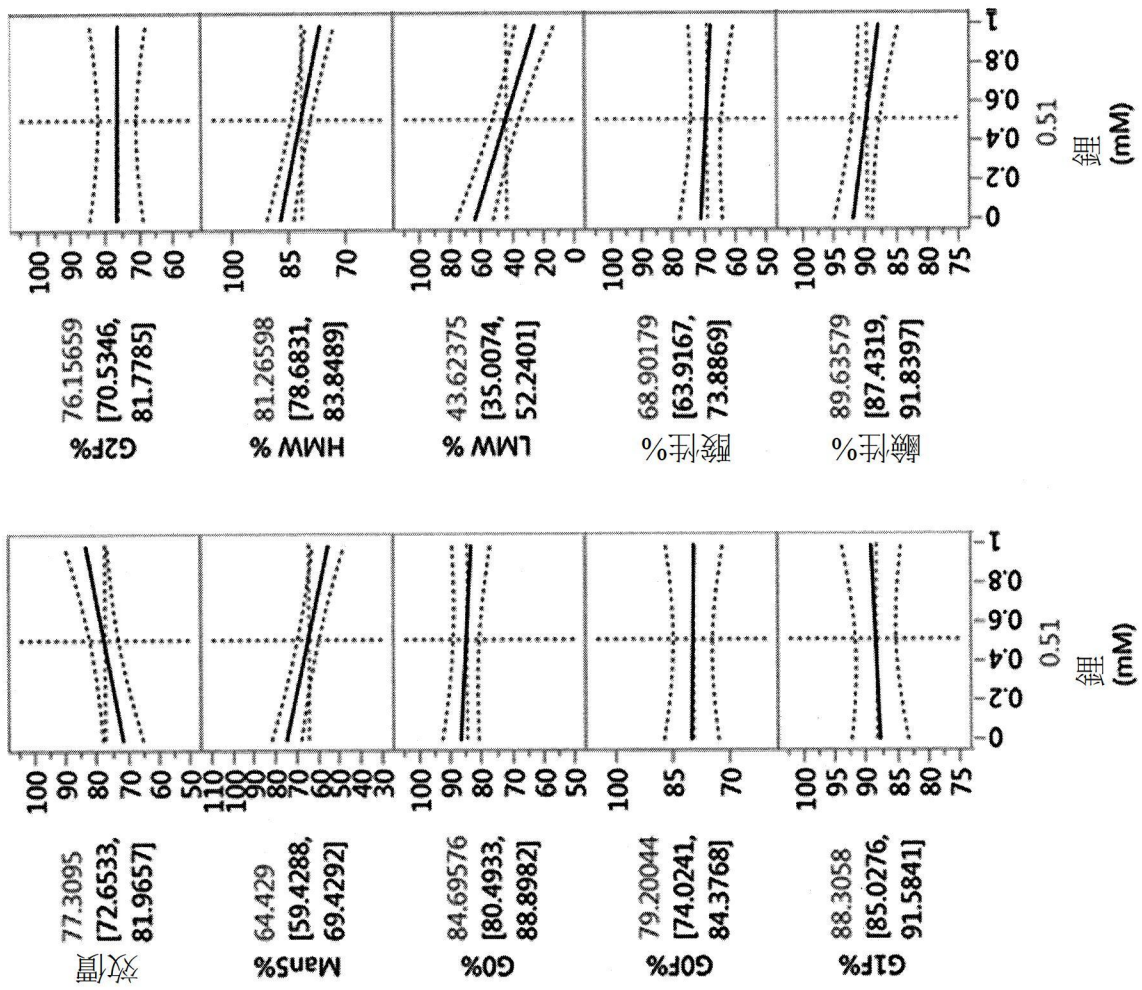
【圖1】



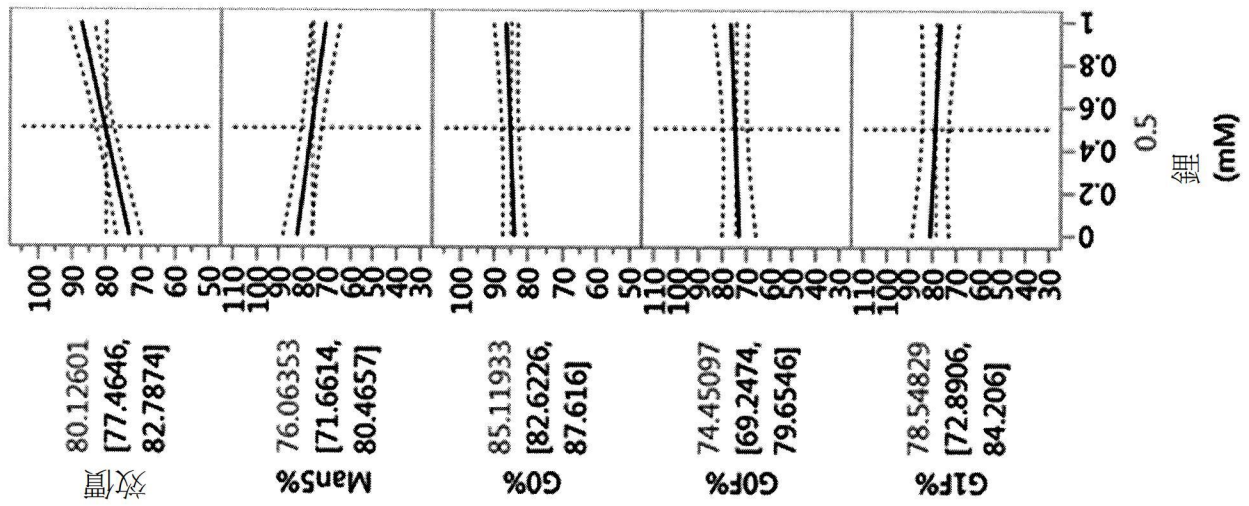
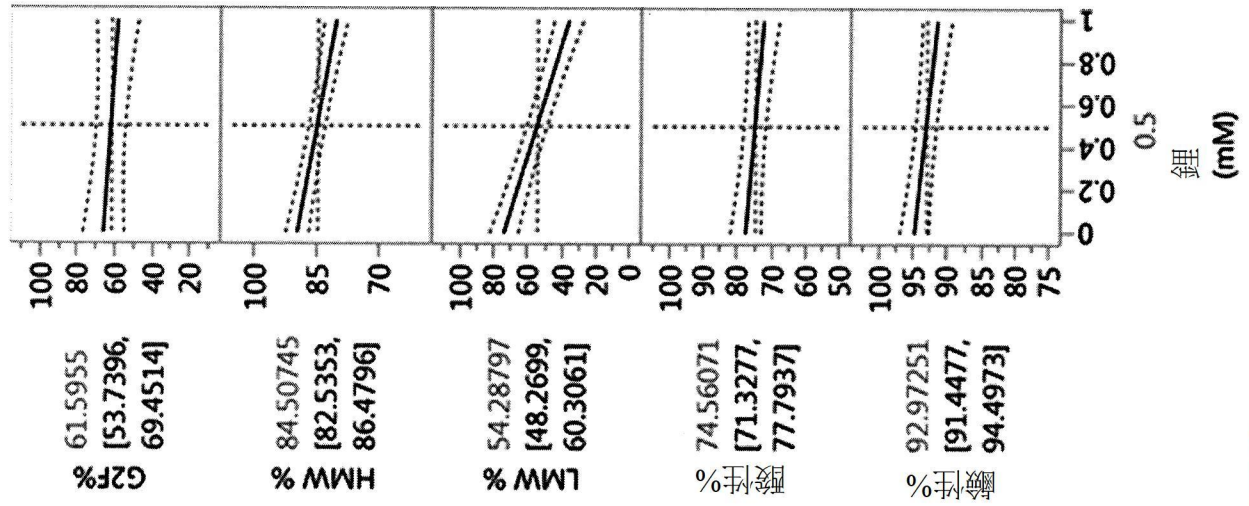
【圖2】



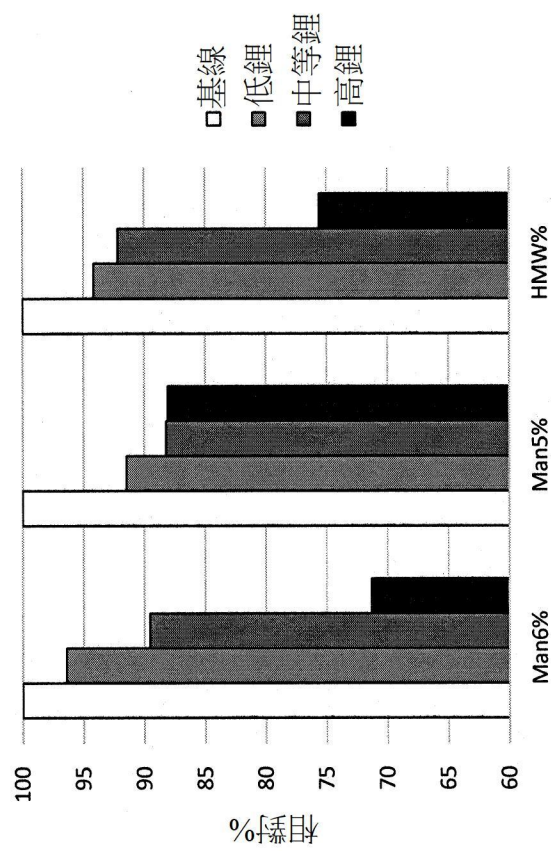
【圖3】



【圖4】

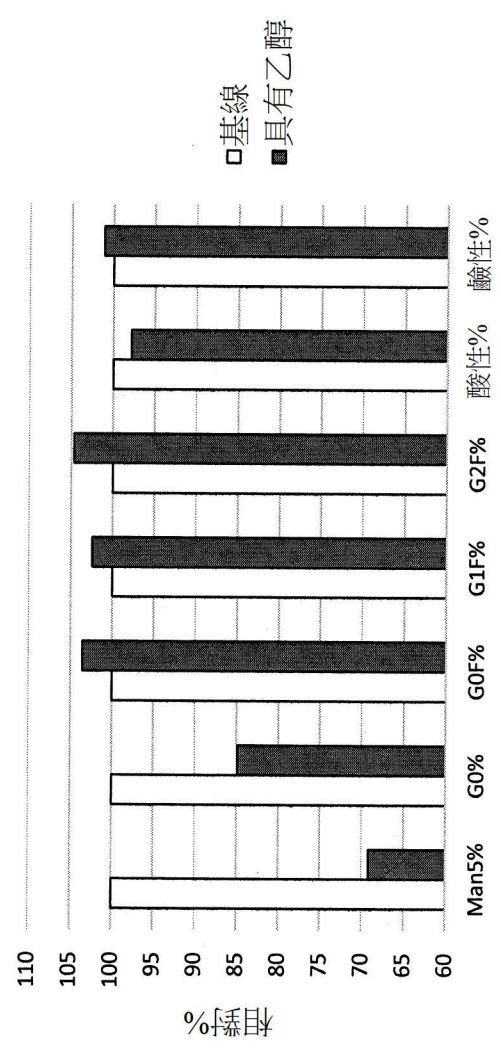


【圖5】

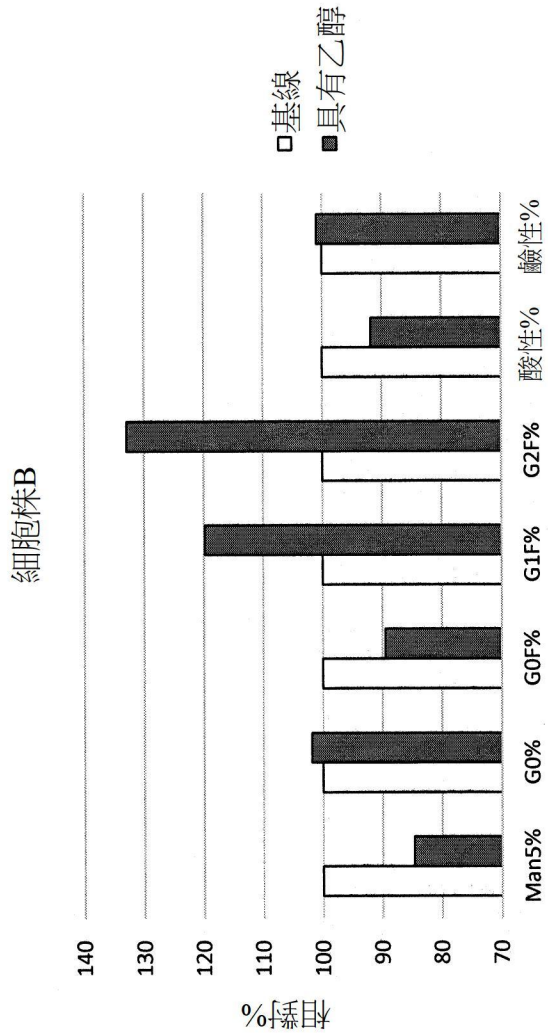


【圖6】

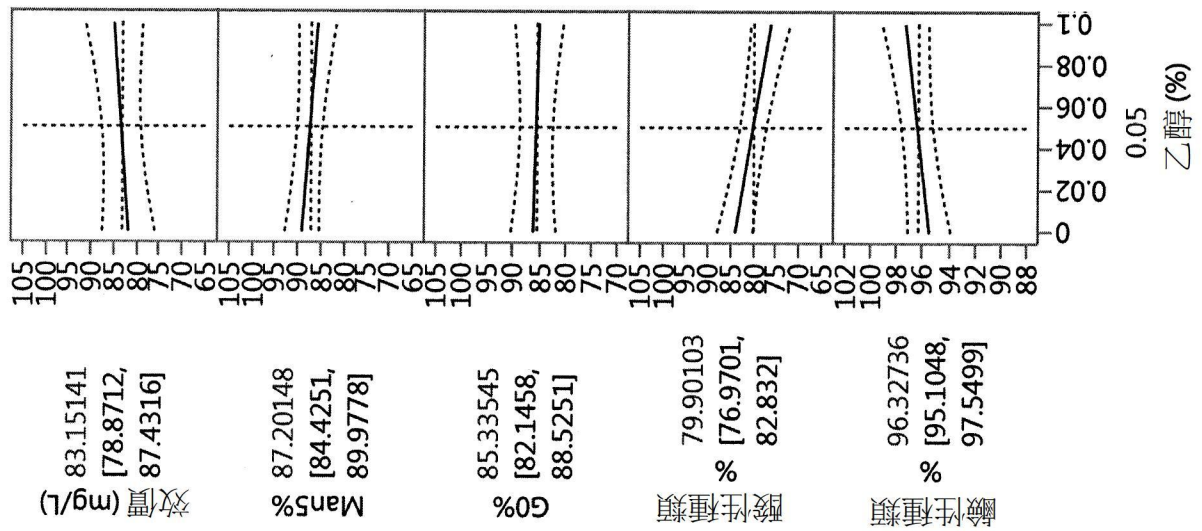
細胞株A



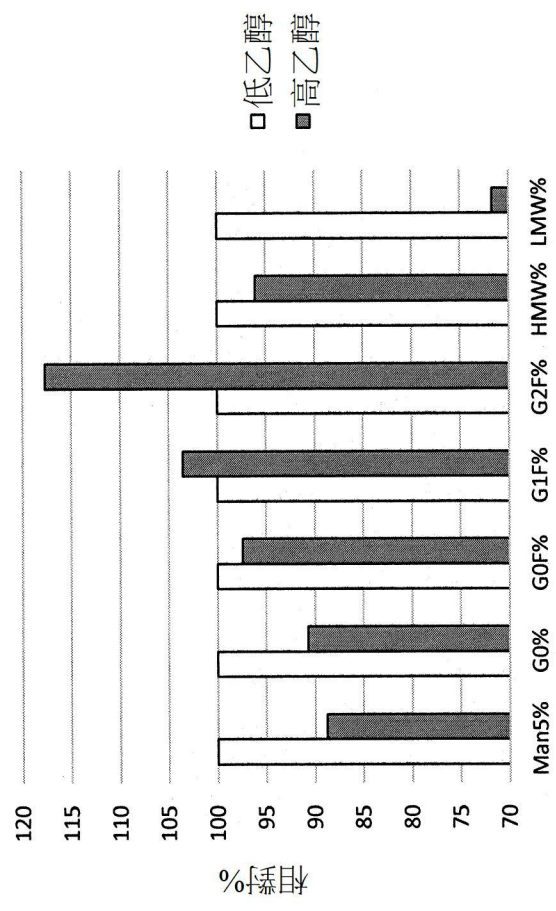
【圖7】



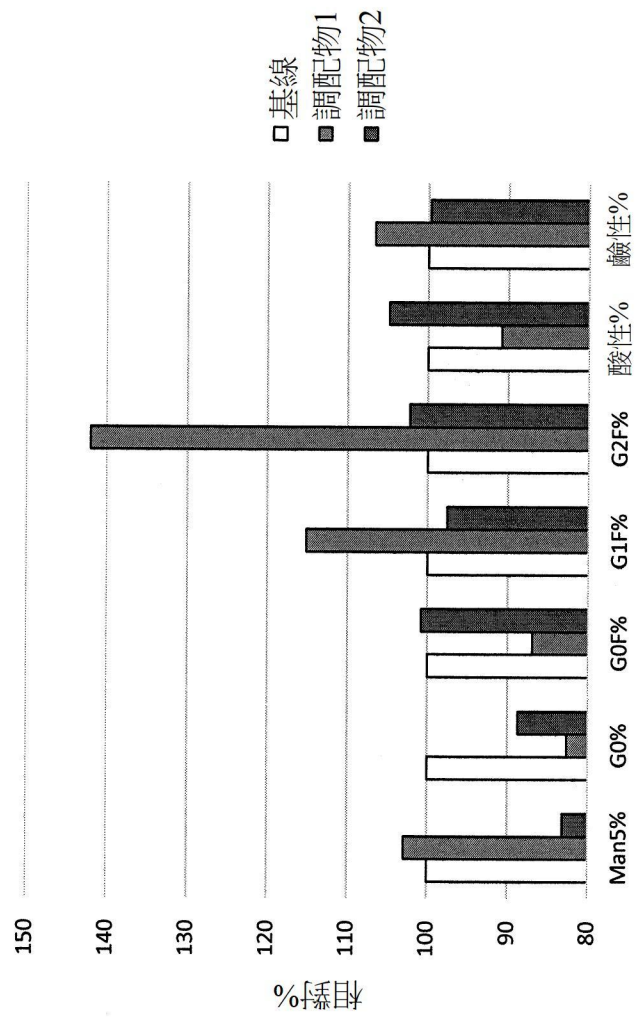
【圖8】



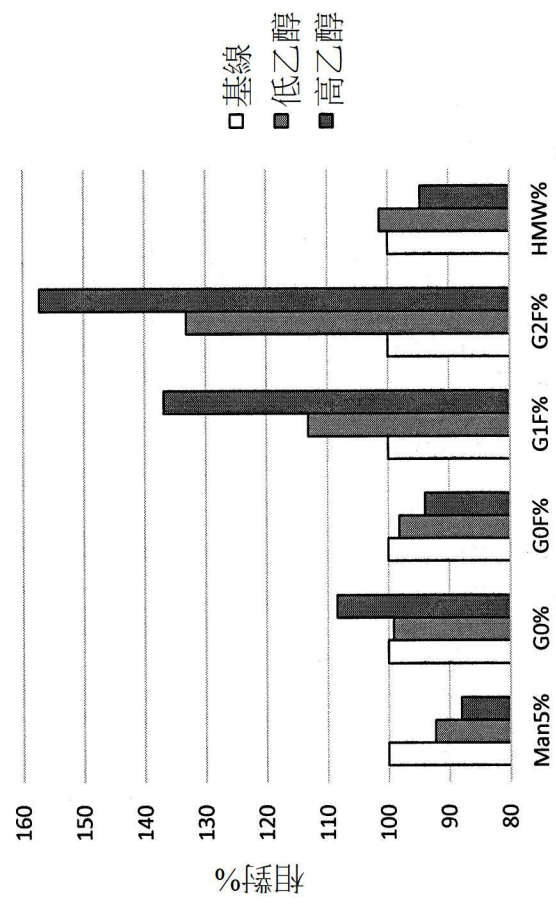
【圖9】



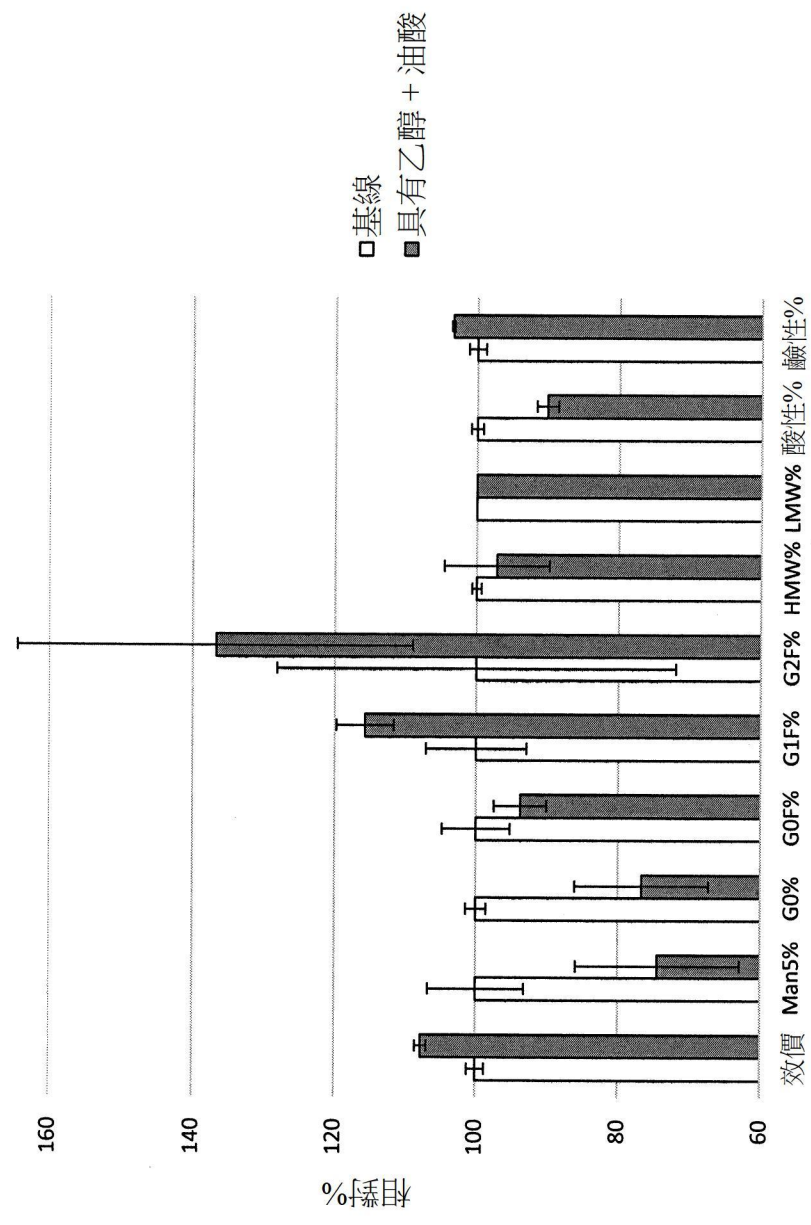
【圖10】



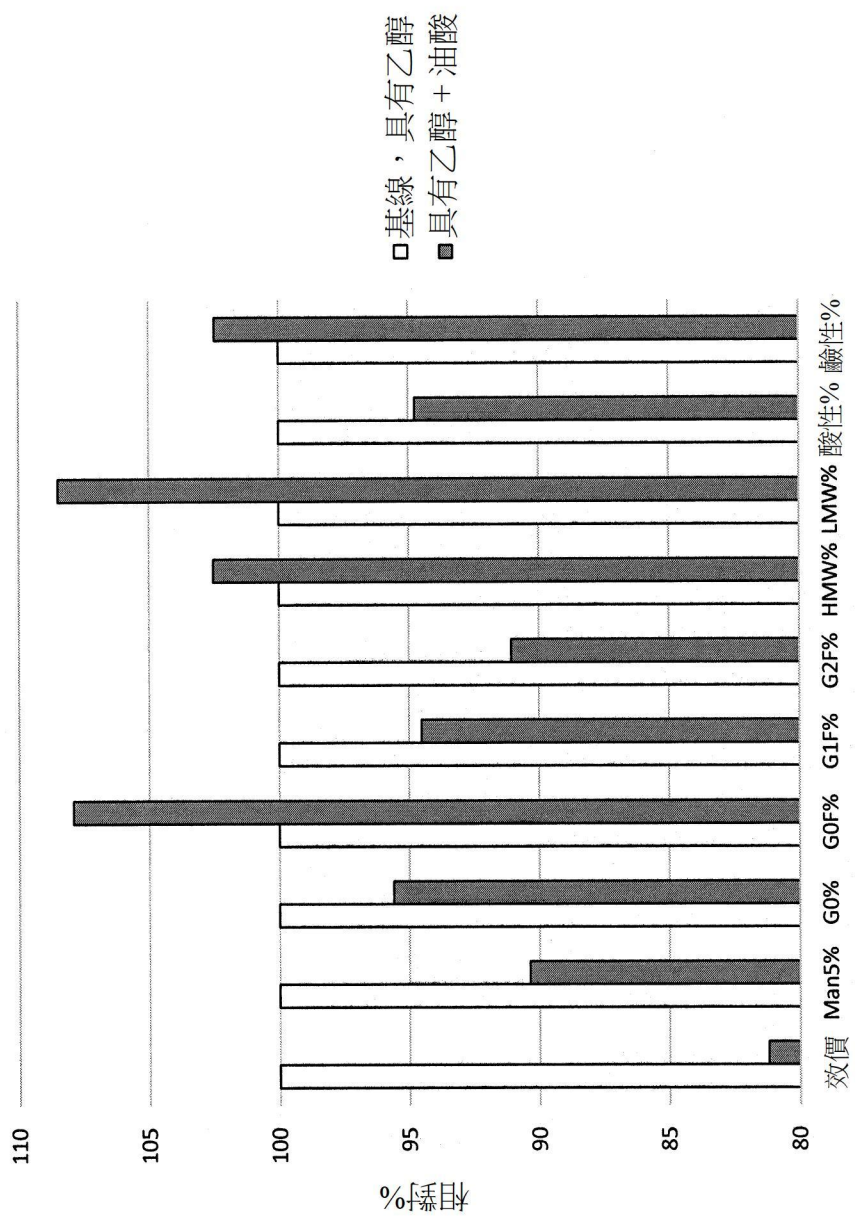
【圖11】



【圖12】

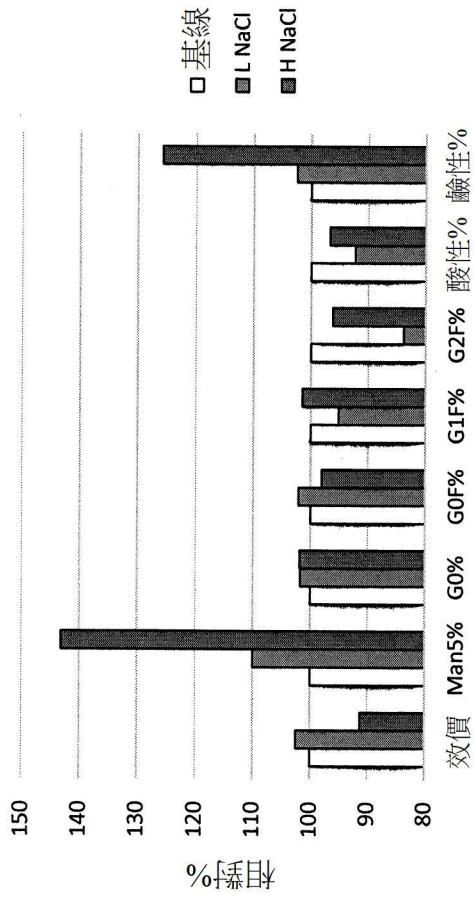


【圖13】



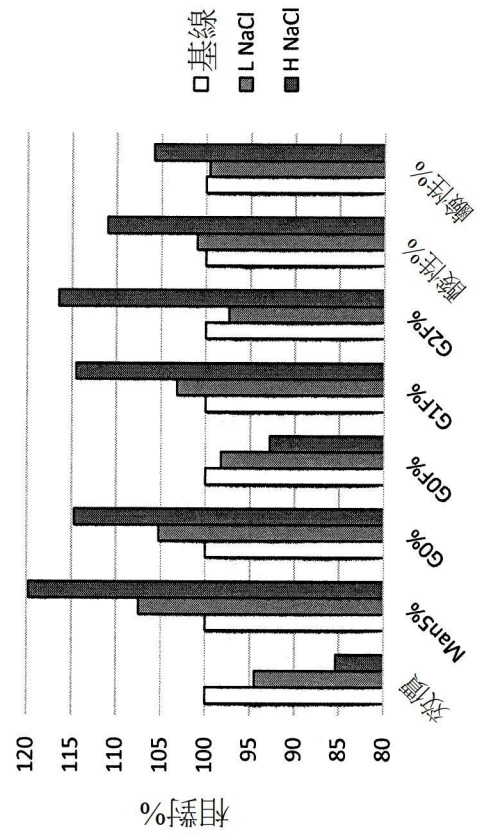
【圖14】

方法策略1

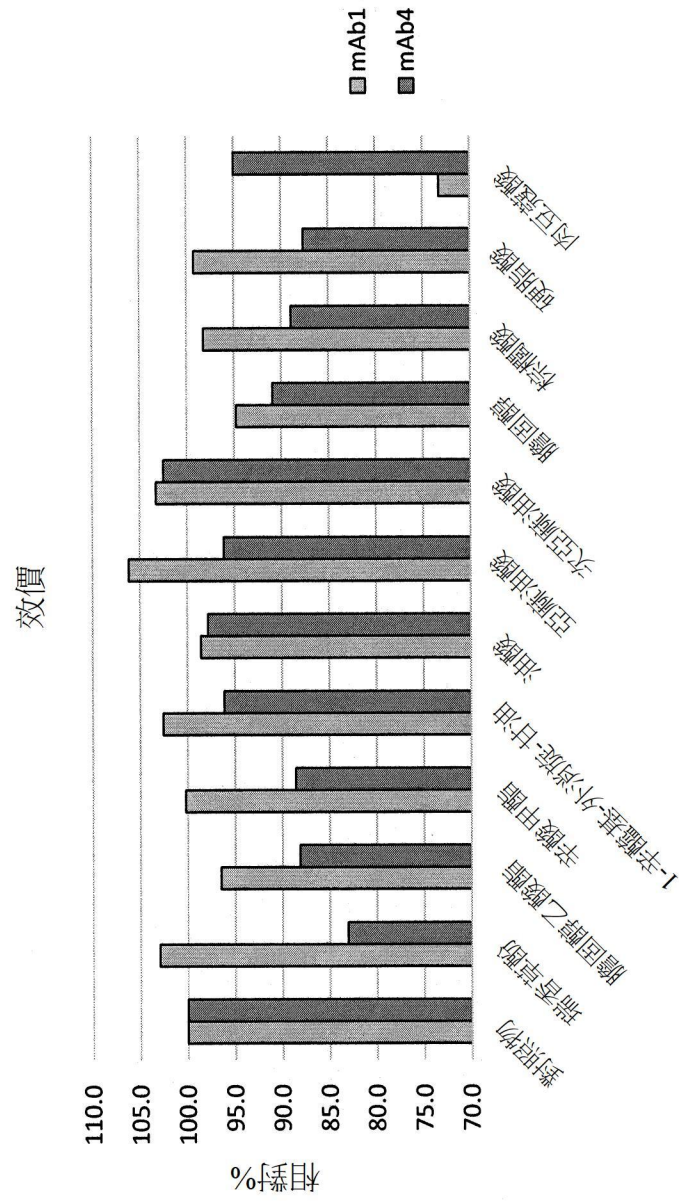


【圖15A】

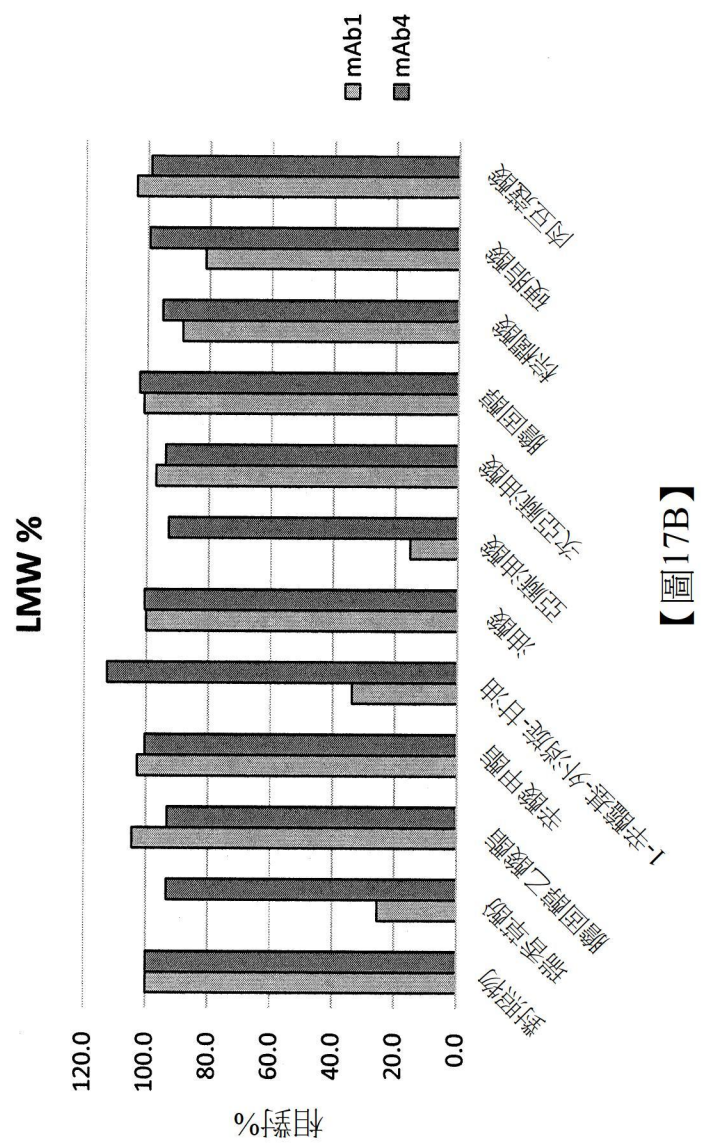
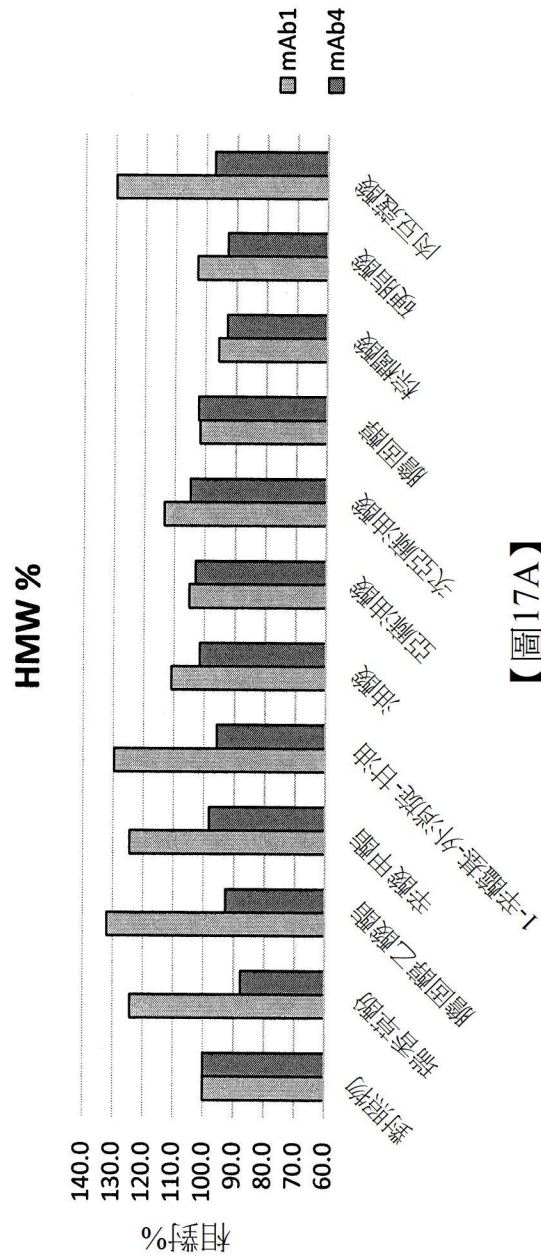
方法策略2

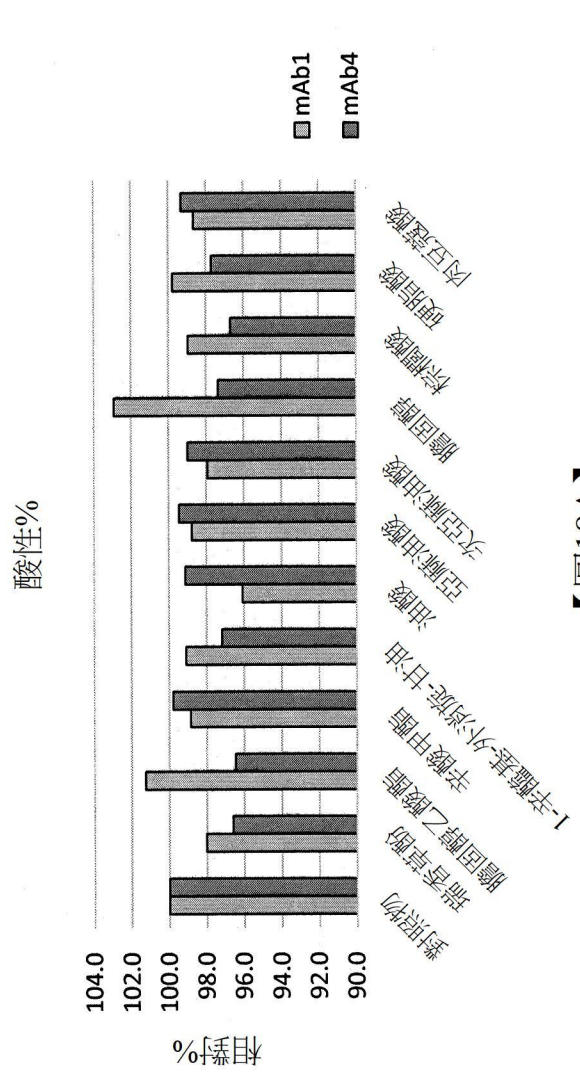


【圖15B】

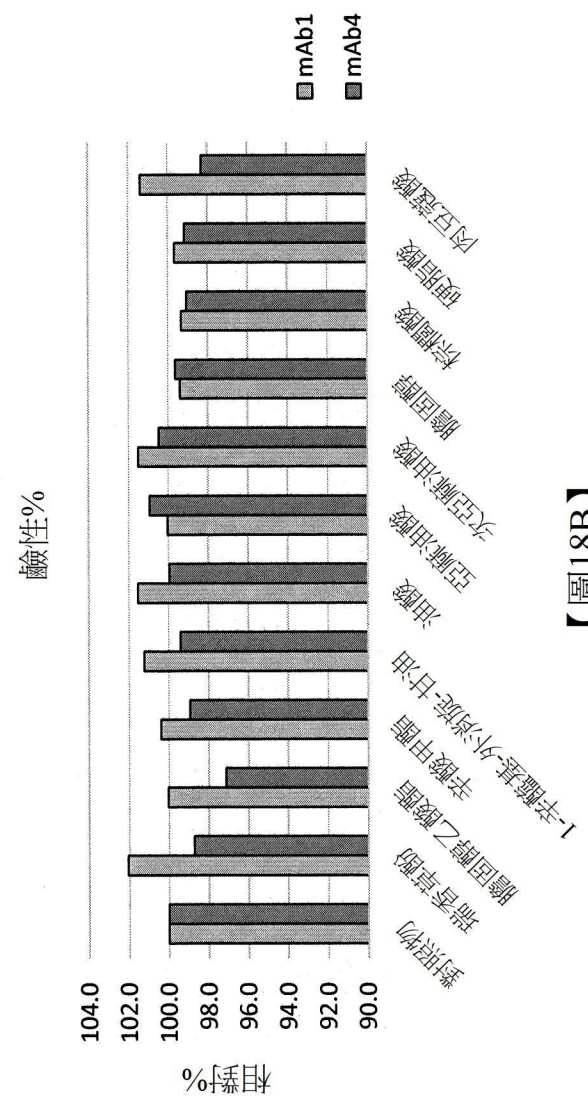


【圖16】

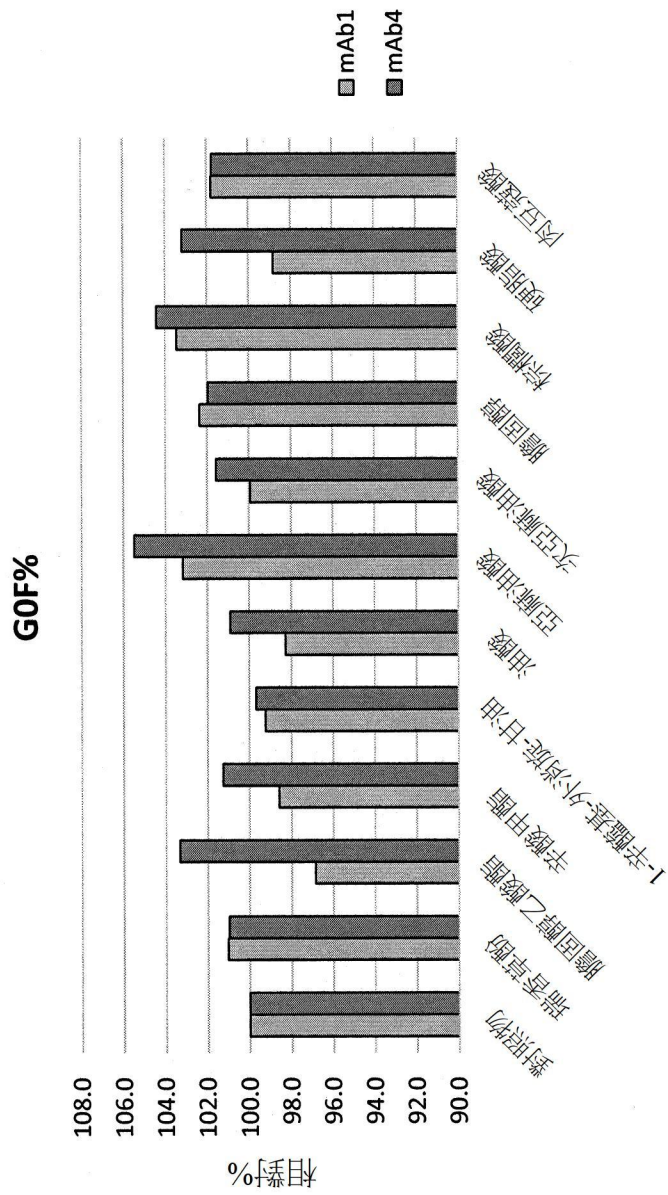




【圖18A】



【圖18B】



【圖20】