



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202526028 A

(43)公開日：中華民國 114 (2025) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：114106933

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 07 月 03 日

(51)Int. Cl.：

*C12P21/06 (2006.01)**C07K14/415 (2006.01)**C12N15/09 (2006.01)**C12N5/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/07/06

美國

62/529,471

2018/02/02

美國

62/625,744

(71)申請人：美商雷傑納榮製藥公司(美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)  
美國(72)發明人：陳 約翰 CHEN, JOHN (US)；勞倫斯 尚恩 LAWRENCE, SHAWN (US)；強森  
艾咪 JOHNSON, AMY (US)；羅尼 席歐多 LONEY, THEODORE (US)；潘古勒  
拉凡德拉 PANGULE, RAVINDRA (IN)；韓 達春 HANG, TA-CHUN (US)；卡  
佛 史考特 CARVER, SCOTT (US)；斯奇林 伯哈德 SCHILLING, BERNHARD  
(DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：6 共 71 頁

(54)名稱

供製備糖蛋白之細胞培養方法

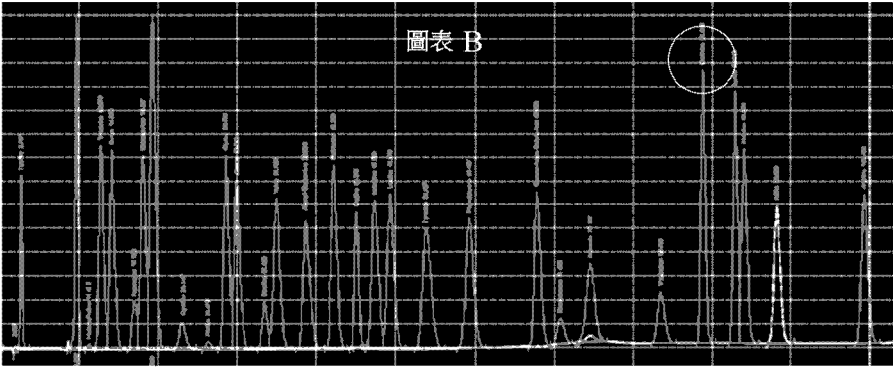
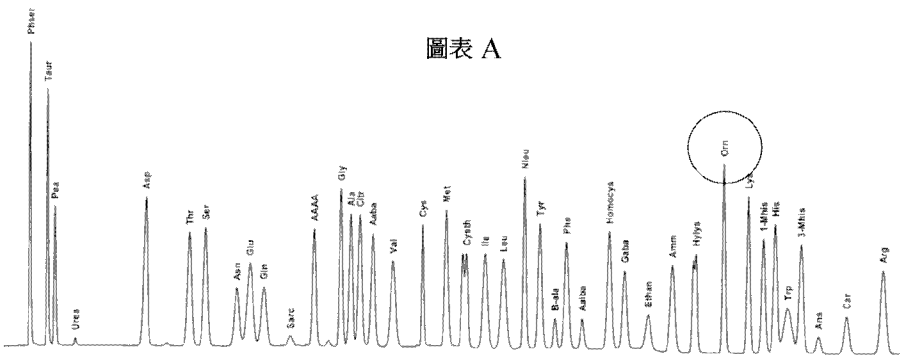
(57)摘要

本申請案提供針對具有所欲量之大豆水解產物的組分(諸如鳥胺酸或腐胺(putrescine))篩選大豆水解產物批次並僅選擇具有所欲量之該等組分的該等大豆水解產物批次之方法。本發明亦提出用於在補充有選擇之大豆批次之培養基中培養細胞以產生較為一致的高品質之所欲蛋白質批量的方法。此外，本發明提供多種各自藉由在培養基中培養細胞所產生之蛋白製劑，該培養基補充有不同批次之含有所欲量之鳥胺酸或腐胺的大豆水解產物，從而使每批產生之蛋白質顯現所欲蛋白質之品質改善或所產生之優質蛋白質的量改善。

The instant application provides a method for screening batches of soy hydrolysate for a desired amount of a component thereof, such as ornithine or putrescine, and selecting only those batches of soy hydrolysate that have a desired amount of such component. The present disclosure also sets forth methods for culturing cells in media supplemented with selected batches of soy to produce more consistent, high quality lots of a protein of interest. Further, the present disclosure provides a plurality of protein preparations that have each been produced by culturing cells in media supplemented with separate batches of soy hydrolysate containing a desired amount of ornithine or putrescine, whereby each batch of protein produced exhibits improved quality of the protein of interest or amount of quality protein produced.

指定代表圖：

第 1 圖



## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

供製備糖蛋白之細胞培養方法

### 【英文發明名稱】

CELL CULTURE PROCESS FOR MAKING A GLYCOPROTEIN

### 【中文】

本申請案提供針對具有所欲量之大豆水解產物的組分(諸如鳥胺酸或腐胺(putrescine))篩選大豆水解產物批次並僅選擇具有所欲量之該等組分的該等大豆水解產物批次之方法。本發明亦提出用於在補充有選擇之大豆批次之培養基中培養細胞以產生較為一致的高品質之所欲蛋白質批量的方法。此外，本發明提供多種各自藉由在培養基中培養細胞所產生之蛋白製劑，該培養基補充有不同批次之含有所欲量之鳥胺酸或腐胺的大豆水解產物，從而使每批產生之蛋白質顯現所欲蛋白質之品質改善或所產生之優質蛋白質的量改善。

## 【 英文 】

The instant application provides a method for screening batches of soy hydrolysate for a desired amount of a component thereof, such as ornithine or putrescine, and selecting only those batches of soy hydrolysate that have a desired amount of such component. The present disclosure also sets forth methods for culturing cells in media supplemented with selected batches of soy to produce more consistent, high quality lots of a protein of interest. Further, the present disclosure provides a plurality of protein preparations that have each been produced by culturing cells in media supplemented with separate batches of soy hydrolysate containing a desired amount of ornithine or putrescine, whereby each batch of protein produced exhibits improved quality of the protein of interest or amount of quality protein produced.

【指定代表圖】第( 1 )圖。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

供製備糖蛋白之細胞培養方法

## 【英文發明名稱】

CELL CULTURE PROCESS FOR MAKING A GLYCOPROTEIN

## 【技術領域】

【0001】本發明關於用於培養細胞和用於生產重組蛋白之方法。本發明具體關於用於在含有大豆水解產物之培養基中培養細胞以達到一致性生產高品質重組蛋白之方法。

## 合併序列表

【0002】創建於2018年2月1日，以“REGE009P02US\_SeqList.txt”名稱提交且大小為11.2KB之文本的全部內容以引用方式併入本文。

## 【先前技術】

【0003】含有蛋白質水解產物(諸如大豆水解產物)之細胞培養基常用於從培養之細胞產生重組蛋白。然而，蛋白質水解產物可能含有對細胞生長或重組蛋白生產造成負面影響的化合物。儘管有這些缺點，蛋白質水解產物已被廣泛用來作為細胞培養中之補充物。

【0004】人類生物治療劑(生物製藥)通常係在哺乳動物細胞培養物中產生。然而，生物治療劑之品質和性能高度依賴該製造過程。Tebbey, P. and Declerck, P. *Generics and Biosimilars Initiative Journal* (2016) 5:2, pp. 70-73併入本文中以用於製造具有一致之糖基化的生物藥物。改變用於製造糖蛋白之細胞培養過程可能導致糖基化模式、存在之酸性物種(例如唾液酸)或蛋白質上之聚醣量變化。該等變化導致所產生之蛋白質產品中之蛋白質同種型的異質性增加，此可能改變該生物治療劑之穩定性、效力或免疫原性而最終導致排斥該批蛋白質。

【0005】因此，對於排除藥物產量和組成物中批次間之差異的細胞培養方法具有高度需求。本發明鑑定植物蛋白質水解產物(例如大豆水解產物)中某些在批次間可能有變化的組分並改變在使用大豆水解產物之培養中產生的高品質糖蛋白之組成和在產率。本發明藉由，尤其是，篩選植物蛋白質水解產物之批次和選擇那些包含用於產生生物藥劑之植物蛋白質水解產物組分的所需濃度之批次以解決對改善之細胞培養方法的需求。

### 【發明內容】

【0006】本發明之預測係部分基於發現在大豆水解產物中之鳥胺酸(ornithine)或腐胺(putrescine)濃度影響使用大豆水解產物之細胞培養中所產生之蛋白質的品質和組成。本發明亦提供在包括大豆水解產物之培養基中培養的

細胞，該包含某些濃度之鳥胺酸或腐胺的大豆水解產物可產生較大量之高品質蛋白質，該高品質蛋白質顯示批次之間較為一致之糖基化模式、聚醣和唾液酸變化形廓。

【0007】於一態樣中，本發明關於在包含大豆水解產物之細胞培養基中培養表現重組異源糖蛋白之細胞群以產生重組異源糖蛋白之方法，且其中該大豆水解產物包含 $\leq 0.067\%$ (w/w(重量/重量))鳥胺酸或腐胺。

【0008】於一些實施態樣中，該方法包括在包含大豆水解產物之細胞培養基中培養表現重組異源糖蛋白之細胞群之步驟，該大豆水解產物含有 $\leq$ 少於0.67毫克(mg)鳥胺酸/克大豆(w/w)或約0.003%至0.067%(w/w)鳥胺酸。於一實施態樣中，該培養基含有 $\leq 5$  mg/L鳥胺酸，或約0.6至3 mg/L鳥胺酸。於一些實施態樣中，該細胞群係藉由選殖擴增表現重組異源糖蛋白之細胞獲得。

【0009】於一態樣中，本發明關於用於產生糖蛋白之方法。於一實施態樣中，該方法包括在含有大豆水解產物之培養基中培養表現重組異源糖蛋白之細胞群的步驟，該大豆水解產物含有 $\leq$ 少於0.67毫克(mg)腐胺/克大豆(w/w)，或約0.003%至0.067%(w/w)腐胺。於一實施態樣中，該培養基含有 $\leq 5$  mg/L腐胺或約0.6至3 mg/L腐胺。於一些實施態樣中，該細胞群係藉由選殖擴增表現重組異源糖蛋白之細胞獲得。

【0010】於一實施態樣中，該糖蛋白為捕捉分子，諸如利納西普(rilonacept)(IL1-trap，揭示於，例如美國專利

案第 6,927,004 號中)、柔癌捕 (aflibercept)(VEGF-trap, 揭示於, 例如美國專利案第 7,087,411 號中)、康柏西普 (conbercept)(VEGF-捕捉劑, 揭示於, 例如美國專利案第 7,750,138 和 8,216,575 號中) 和依那西普 (etanercept)(TNF-捕捉劑, 揭示於, 例如美國專利案第 5,610,279 號中)。於一實施態樣中, 糖蛋白之所有 N-聚醣物種之總量中  $\geq 10\%$ (w/w) 為 A1 N-聚醣。

【0011】於一態樣中, 本發明關於產生糖蛋白之方法。於另一態樣中, 本發明關於使用大豆水解產物產生糖蛋白之方法。於另一態樣中, 本發明關於選擇用於產生糖蛋白之大豆水解產物的方法, 該方法係藉由評估所產生之糖蛋白的品質進行。於一實施態樣中, 該方法包含在細胞培養基中培養表現糖基化之蛋白質之細胞以產生糖蛋白、純化該糖基化之蛋白質、令該純化之糖基化蛋白質進行寡醣指紋分析、測定 A1 N-聚醣之相對量(與糖蛋白之 N-聚醣物種之總量相比較); 及選擇可提供至少  $10\%$ (w/w) A1 N-聚醣產量(與糖蛋白之 N-聚醣物種之總量相比較)之大豆水解產物。

【0012】於一實施態樣中, 該方法包括下列步驟: 製備含有大豆水解產物之細胞培養基, 在該細胞培養基中培養表現糖蛋白之細胞, 純化該糖基化蛋白, 令該純化之糖基化蛋白進行寡醣指紋分析, 測定 A1 N-聚醣之相對量(與糖蛋白之 N-聚醣物種之總量相比較); 然後選擇可提供至少  $10\%$ (w/w) A1 N-聚醣產量(與糖蛋白之 N-聚醣物種之總量

相比較)之大豆水解產物。

【0013】於一實施態樣中，該選擇之大豆水解產物含有 $\leq 0.67$  mg 鳥胺酸 /g 大豆 (w/w)、或約 0.003% 至 0.067% (w/w) 鳥胺酸。於一實施態樣中，該培養基含有 $\leq 5$  mg/L 鳥胺酸，或約 0.6 至 3 mg/L 鳥胺酸。

【0014】於一實施態樣中，該選擇之大豆水解產物含有 $\leq 0.67$  mg 腐胺 /g 大豆 (w/w)、或約 0.003% 至 0.067% (w/w) 腐胺。於一實施態樣中，該培養基含有 $\leq 5$  mg/L 腐胺或約 0.6 至 3 mg/L 腐胺。

【0015】於一態樣中，本發明關於選擇用於產生糖蛋白之大豆水解產物之方法，該方法係藉由測量在大豆水解產物中之鳥胺酸或腐胺的量進行。於一實施態樣中，該方法包括下列步驟：測量在大豆水解產物中之鳥胺酸的量，選擇每克大豆具有 $\leq 0.67$  mg 鳥胺酸或約 0.003% 至 0.067% (w/w) 鳥胺酸之大豆水解產物並將該選擇之大豆水解產物與另外之成分組合以形成具有 $\leq 5$  mg/L 鳥胺酸或約 0.6 至 3 mg/L 鳥胺酸之細胞培養基。於一實施態樣中，該方法包括下列步驟：測量在可能有用之大豆水解產物中之腐胺的量，選擇每克大豆具有 $\leq 0.67$  mg 腐胺或約 0.003% 至 0.067% (w/w) 腐胺之大豆水解產物並將該選擇之大豆水解產物與另外之成分組合以形成具有 $\leq 5$  mg/L 腐胺或約 0.6 至 3 mg/L 腐胺之細胞培養基。

【0016】於一態樣中，本發明關於包含 A1 N-聚醣和至少一種其他 N-聚醣物種之糖蛋白，其中該 A1 N-聚醣之

相對量為提供之糖蛋白的 N-聚醣總量的至少 10%(w/w)。於一實施態樣中，該 A1 N-聚醣之相對量為約 10% 至 17%(w/w)。

【0017】於一實施態樣中，該糖蛋白亦具有 A2 N-聚醣、A2F N-聚醣、A1F N-聚醣、NGA2F N-聚醣、NA2G1F N-聚醣、NA2 N-聚醣和 NA2F N-聚醣。

【0018】於一實施態樣中，該糖蛋白含有每莫耳糖蛋白 8 至 65 莫耳唾液酸。於一實施態樣中，其中該糖蛋白為利納西普，任一下列 SEQ ID NO：1 之天門冬醯胺殘基 N37、N98、N418 和 N511 含有 A1 N-聚醣。於一實施態樣中，其中該糖蛋白為柔癌捕，任一下列 SEQ ID NO：2 之天門冬醯胺殘基 N123 和 N196 含有 A1 N-聚醣。

【0019】於一實施態樣中，該糖蛋白之 A1 N-聚醣之相對量係藉由比較從該糖蛋白之寡醣指紋分析獲得之 A1 N-聚醣的波峰下面積與所有 N-聚醣之波峰下總面積測定，該糖蛋白之寡醣指紋係藉由毛細管電泳獲得。

【0020】於一態樣中，提供製造具有減低量之鳥胺酸或腐胺的大豆水解產物之方法。於一實施態樣中，該方法包含下列步驟：在無殘餘物之反應容器中酶催化分解大豆萃取物，測量在該大豆水解產物中之鳥胺酸的量並選擇那些含有  $\leq 0.067\%$ (w/w) 鳥胺酸或腐胺之大豆水解產物之批次以用於細胞培養基中。於一實施態樣中，該方法包含下列步驟：在無殘餘物之反應容器中酶催化分解大豆萃取物，測量在該大豆水解產物中之腐胺的量並選擇那些具有

≤0.067%(w/w)鳥胺酸或腐胺之大豆水解產物以用於細胞培養基中。

【0021】術語“約”可被理解為在所陳述之數值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%之內。除非另外從上下文清楚明白，否則本文提供之所有數值均藉由術語“約”修飾。

【0022】雖然可使用與本文描述者類似或相等之方法和材料實行或測試本發明，下文中描述合適之方法和材料。本文提及之所有出版物、專利申請案、專利案和其他參考文獻之全部內容以引用方式併入本文。本文列舉之參考文獻不被承認為是申請專利之揭示內容的先前技藝。在發生衝突之情況下，以本說明書(包括定義)為準。此外，材料、方法和實施例僅用於說明，而不意圖用來限制。本發明之其他特性和優點將從下列詳細描述和申請專利範圍顯明。

### 【圖式簡單說明】

【0023】任何上述之態樣和實施態樣可與本文中揭示於發明內容及/或詳細描述部分中之任何其他態樣或實施態樣組合。

【0024】該專利或申請文件包含至少一個彩色附圖。具有彩色附圖之本專利或專利申請出版物的副本將在請求和支付必要費用後由主管局提供。

【0025】本發明之各種目的和優點，及對本發明之較全面的理解可經由參考下列詳細描述和所附之申請專利範圍並結合附圖而顯明且更易於理解，其中：

【0026】第1圖描繪由茚三酮(ninhydrin)衍生之胺基酸的色層分析洗提變化形廓。X軸描繪從色層分析柱洗提之時間(保留時間)且Y軸描繪在570nm處之吸光度。圖表A描繪不符合用於生產符合FDA標準之可接受的N-聚醣混合物之標準的批次。圖表B描繪可接受之大豆蛋白質水解產物之胺基酸的分析。在二個色層分析圖中之代表鳥胺酸之波峰被圈起來。

【0027】第2圖描繪藉由肽：N-糖苷酶F(PNGaseF)分解而從糖蛋白釋出之寡醣的毛細管電泳圖。X軸描繪從毛細管洗提之時間且Y軸描繪吸光度或螢光強度。該波峰之編號為1至21。波峰1代表N-聚醣A2；波峰4代表N-聚醣A2F；波峰11代表N-聚醣A1；波峰14代表N-聚醣A1F；波峰16代表N-聚醣NGA2F；波峰19代表N-聚醣NA2G1F；波峰20代表N-聚醣NA2；且波峰21代表N-聚醣NA2F。

【0028】第3圖描繪作為大豆蛋白水解產物中鳥胺酸和瓜胺酸濃度之函數的A1 N-聚醣之相對量的斑點印跡。X軸描繪以mg/L計之瓜胺酸或鳥胺酸的濃度。Y軸描繪波峰11(其代表A1 N-聚醣)之相對面積。

【0029】第4圖為關係圖，其描繪大豆水解產物中之鳥胺酸濃度(右下象限)與柔癌捕中之波峰11(A1 N-聚醣，左上象限)之相對量的負相關。

【0030】第5圖為相關圖，其描繪(i)大豆水解產物中之鳥胺酸濃度(左下象限)與利納西普之最終效價(右上象限)的負相關；及(ii)大豆水解產物中之鳥胺酸濃度(左下象限)與培養基中累積之乳酸鹽(左下象限)的正相關。

【0031】第6A圖為一對圖形，其描繪在各種條件下，包括對照組、高和低鳥胺酸濃度、腐胺、MFC和IPC，作為批次日之函數的從CHO細胞培養物合成之多胺的量，該量或是以IVCD $\times 10^6$ 細胞-天/ml之形式或是以效價(以g/ml計)之形式描繪。

【0032】第6B圖為表格，其提供第6A圖中描繪之各研究組的實驗條件。

### 【實施方式】

【0033】應理解的是，本發明之範圍並不限於所描述之特定方法和實驗條件，因為該等方法和條件可以改變。亦應理解的是，本文所使用之術語僅用於描述特定之實施態樣，而非用於限制。

【0034】除非另外定義，否則本申請案中所使用三所有技術和科學術語具有與本發明所屬技藝中之一般技術人士所通常理解者相同的含義。雖然可使用與本申請案中描述者類似或相等之任何方法和材料實行或測試本發明，現在描述某些特定之方法和材料。單位、前綴和符號可以其標準，業界可接受之形式表示。本文所引用之數字範圍為開放式括號，意指其包括定義該範圍之數字。除非另外指

明，否則術語“一”應解釋為“至少一個”。

【0035】本文所使用之章節標題僅用於組織目的而不應被解釋為限制所描述之主題。除非另有說明，否則本文所描述之方法和技術通常係根據本技藝已知之習知方法和依本專利說明書全文中所引用和討論之各種一般和較特殊之參考文獻進行。參見，例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)和 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates(1992)、Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1990)，及 Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998)和 Dieffenbach and Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(1995)。本揭示內容全文提及之所有出版物的全部內容均以引用方式併入本文。

【0036】

定義

【0037】除非另外定義，否則本申請案中所使用之所有技術和科學術語具有與本發明所屬技藝之一般技術人士所通常理解者相同的含義。

【0038】短語“相對量”意指分子物種之量除以全體類型之所有分子物種的總量。例如 A1 聚醣（即，

(GlcNAc)<sub>2</sub>(Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>(Gal)<sub>2</sub>(SA)<sub>1</sub>)之相對量的計算方式為A1之量/所有N聚醣之量的總和。該相對量可以絕對之質量對質量之量(即，克/克)或百分比，即，%(w/w)表示。

【0039】“鳥胺酸”為參與尿素循環、多胺合成和精胺酸代謝之非蛋白質編碼胺基酸。亦已知鳥胺酸影響重組蛋白之糖型含量。參見PCT/US2014/069378。鳥胺酸係藉由若干種酶起作用。例如，鳥胺酸脫羧酶催化多胺生物合成途徑中鳥胺酸轉化為腐胺。參見Pegg A, J. of Biol. Chem. (2006) 281:21 pp. 14532。此外，鳥胺酸轉化為瓜胺酸係由尿素循環之一部分的鳥胺酸胺甲醯基轉移酶催化。鳥胺酸代謝發生在培養之細胞的細胞質和粒線體中。腐胺之存在或鳥胺酸之存在被認為對培養在化學成分確定之培養基中的細胞之生長和生產力具關鍵性，然而對由該等細胞產生之蛋白質的關鍵品質屬性之影響仍未曾被說明過。

【0040】“腐胺”為參與尿素循環之非蛋白質編碼胺基酸，一種多胺。腐胺(亦稱為1,4-二胺基丁烷，其具有化學式C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>)係藉由鳥胺酸脫羧產生並作為伽瑪-胺基丁酸酯(γ-胺基丁酸酯)之先質。

【0041】如本文所使用之“肽”、“多肽”和“蛋白質”在全文中可互換使用且係指包含二或更多個藉由肽鍵彼此連接之胺基酸殘基的分子。肽、多肽和蛋白質亦可包括諸如下列之修飾：糖基化、脂質連接、硫酸化、麩胺酸殘基之γ-羧基化、烷基化、羥基化和ADP-核糖基化。肽、多肽和

蛋白質可具有科學或商業價值，包括以蛋白質為底質之藥物(生物治療劑)。尤其是，肽、多肽和蛋白質包括抗體和嵌合型或融合蛋白。肽、多肽和蛋白質可使用細胞培養方法藉由重組動物細胞株(諸如哺乳動物細胞株)產生。

【0042】如本文所使用之術語“多核苷酸序列”或“肽序列”係指編碼所欲蛋白質之核酸聚合物，該所欲蛋白質為，諸如以生物製藥藥物產生之嵌合型蛋白質(如捕捉分子)、抗體或抗體部分(例如VH、VL、CDR3)。該多核苷酸序列可藉由基因工程技術(例如編碼嵌合型蛋白質之序列或密碼子優化之序列、無內含子序列)製造並引入細胞中，其可以游離基因組之形式停留在細胞中或整合入細胞之基因組中。該多核苷酸序列可為被引入宿主細胞基因組內之異位點的天然存在之序列。該肽序列可為異源的，諸如來自另一生物體之天然存在的序列、重組序列、經遺傳修飾之序列，或尤其是，在不同於野生型之啟動子的控制下表現之序列，例如編碼人直系同源物之核苷酸序列，所憑藉之宿主(生產)細胞為CHO細胞。

【0043】短語“抗原結合蛋白”包括具有至少一個CDR且能夠選擇性識別抗原(即，能夠以至少在微莫耳範圍內之KD與抗原結合)之蛋白質。治療性抗原結合蛋白(例如治療性抗體)經常需要在奈米莫耳或皮莫耳範圍內之KD。通常，抗原結合蛋白包括二或更多個CDR，例如2、3、4、5或6個CDR。抗原結合蛋白之實例包括抗體、抗體之抗原結合片段，諸如含有抗體之重鏈和輕鏈可變區之多肽(例

如 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段)及含有抗體之重鏈和輕鏈可變區和含有來自重鏈及/或輕鏈恆定區(諸如一或多個恆定結構域，即，一或多個 CL、CH1、鉸鏈、CH2 和 CH3 結構域)之額外胺基酸的蛋白質。

【0044】“抗體”係指由四條多肽鏈(藉由二硫鍵相互連接的二條重鏈(H)和二條輕鏈(L))組成之免疫球蛋白分子。各重鏈具有重鏈可變區(HCVR 或 VH)和重鏈恆定區。該重鏈恆定區含有三個結構域，CH1、CH2 和 CH3。各輕鏈具有輕鏈可變區(VL)和輕鏈恆定區。該輕鏈恆定區係由一個結構域(CL)組成。該 VH 和 VL 區可進一步細分為稱為互補決定區(CDR)之高度可變區，該高度可變區之間穿插著較為被保留之區域，稱為框架區(FR)。各 VH 和 VL 係由三個 CDR 和四個 FR 組成，按下列順序從胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。術語“抗體”包括任何同種型或亞類之糖基化和非糖基化免疫球蛋白。術語“抗體”包括藉由重組方法製備、表現、產生或分離之抗體分子，諸如從以核苷酸序列轉染以表現該抗體之宿主細胞中分離出之抗體。術語“抗體”亦包括雙特異性抗體，該雙特異性抗體包括可與一個以上之抗原決定部位結合的異四聚體免疫球蛋白。雙特異性抗體大致上描述於美國專利申請出版物第 2010/0331527 號中，該篇以引用方式併入本文。

【0045】術語抗體(或抗體片段)或所欲蛋白質之“抗原結合部分”係指保留與抗原特異性結合之能力的抗體或所

欲蛋白質之一或多個片段。包含在術語抗體之“抗原結合部分”內之蛋白質結合片段之非限制性實例包括(i) Fab片段，其為由VL、VH、CL和CH1結構域組成之單價片段；(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段，其包含二個在鉸鏈區藉由二硫鍵連接之Fab片段的二價片段；(iii) Fd片段，其係由VH和CH1結構域所組成；(iv) Fv片段，其係由抗體之單臂的VL和VH結構域所組成；(v) dAb片段(Ward et al., Nature(1989)241:544-546)，其係由VH結構域組成；(vi) 經分離之CDR，和(vii) scFv，其係由Fv片段的二個結構域VL和VH所組成，該VL和VH係藉由合成連接子連接以形成單一蛋白質鏈，其中該VL和VH區域配對以形成單價分子。其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體亦包含在術語“抗體”之內。參見，例如Holliger et al., PNAS USA (1993) 90:6444-6448；Poljak et al., Structure (1994) 2:1121-1123。

【0046】再者，抗體或其抗原結合部分可為較大免疫黏附分子之一部分，該較大免疫黏附分子係經由抗體或抗體部分與一或多個其他蛋白質或肽藉由共價或非共價結合形成。該等免疫黏附分子之非限制性實例包括使用鏈親和素核心區製造四聚體scFv分子(Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas (1995) 6:93-101)及使用半胱胺酸殘基、標記肽和C-端多組胺酸標籤製造二價和生物素化之scFv分子(Kipriyanov et al. Mol. Immunol. (1994) 31:1047-1058)。抗體部分(諸如Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段)可使用習知技術從完整抗體製備，諸如經由木瓜蛋白酶或胃蛋白

酶分解該完整抗體。再者，抗體、抗體部分和免疫黏附分子可使用本技藝周知之標準重組DNA技術獲得(參見Sambrook等人，1989)。

【0047】術語“人抗體”意圖包括具有源自人種系免疫球蛋白序列之可變區和恆定區之抗體。本發明之人抗體可包括非由人種系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如在玻管內藉由隨機或定點誘變引入之突變或在體內藉由體細胞突變)，例如在CDR中，特別是在CDR3中。如本文所使用之術語“重組人抗體”意圖包括藉由重組方式製備、表現、創造或分離之所有人抗體，諸如使用轉染入宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體、從重組、組合之人抗體集合庫中分離出之抗體、從用於人免疫球蛋白基因之轉基因動物(例如小鼠)中分離出之抗體(參見，例如Taylor et al. Nucl. Acids Res. (1992) 20:6287-6295)或藉由涉及將人免疫球蛋白基因序列剪切成其他DNA序列之任何其他方式製備、表現、創造或分離之抗體。該等重組人抗體具有源自人種系免疫球蛋白序列之可變區和恆定區。然而，於某些實施態樣中，該等重組人抗體經受玻管內誘變(或者，當使用用於人Ig序列之轉基因時動物為體內體細胞誘變)，因此當源自人種系VH和VL序列且與人種系VH和VL序列有關時，該重組抗體之VH和VL區的胺基酸序列為那些可能非天然存在於體內之人抗體種系集合庫中的序列。

【0048】“Fc融合蛋白”包含在自然界中並非一起發現的二或更多種蛋白質之一部分或全部，該二或更多種蛋白

質的其中之一為免疫球蛋白分子之Fc部分。包含某些與各種源自抗體之多肽部分(包括Fc結構域)融合之異源多肽的融合蛋白之製備方法已描述於，例如 Ashkenazi et al., PNAS USA (1991) 88:10535；Byrn et al., Nature (1990) 344:677；和 Hollenbaugh et al., Current Protocols in Immunology (1992) Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11中。“受體Fc融合蛋白”包含一或多個與Fc部分偶聯之受體的胞外結構域，於一些實施態樣中，該Fc部分包含鉸鏈區，其後為免疫球蛋白之CH2和CH3結構域。於一些實施態樣中，該Fc-融合蛋白含有二或更多個與一或多個配體結合之不同受體鏈。

【0049】於某些實施態樣中，“Fc融合蛋白”為“捕捉”分子，其為包括二個不同受體組分的誘餌受體分子，該二個不同受體組分係模仿對應之內源性受體和抗體之Fc部分。捕捉分子之非限制性實例包括IL-1捕捉劑(例如利納西普，其含有與IL-1R1胞外區融合之IL-1RAcP配體結合區，該IL-1R1胞外區再依次與hIgG1之Fc融合)(例如，SEQ ID NO：1)(參見美國專利案第6,927,004號)或VEGF捕捉劑(例如柔癌捕，其含有與VEGF受體Flk1之Ig結構域3融合之VEGF受體Flt1之Ig結構域2，該VEGF受體Flk1之Ig結構域3再依次與hIgG1之Fc融合)。參見，例如美國專利案第7,087,411、7,279,159號；在依那西普(TNF捕捉劑)方面亦參見美國專利案第5,610,279號。

【0050】“糖基化”包括形成其中寡醣或是與蛋白質之

天門冬醯胺(Asn)殘基(即，N-連接)或是與蛋白質之絲胺酸(Ser)或蘇胺酸(Thr)殘基(即，O-連接)之側鏈連接的糖蛋白。“糖蛋白”包括含有O-連接之聚醣或N-連接之聚醣的任何蛋白質。聚醣可為單醣殘基之均聚物或雜聚物，該單醣殘基可為直鏈型或支鏈型。已知N-連接之糖基化主要在內質網中起始，而O-連接之糖基化顯示係在ER或高爾基體中起始。術語“N-聚醣”可與“N-連接之寡醣”互換使用。術語“O-聚醣”可與“O-連接之寡醣”互換使用。

【0051】“N-聚醣蛋白”包括含有或可接受N-連接之寡醣的蛋白質。N-聚醣可由N-乙醯半乳糖胺(GalNAc)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)、神經胺酸(NANA)和其他單醣組成，然而N-聚醣通常具有共同的核心五醣結構包括：三個甘露糖和二個N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)糖。具有連續胺基酸序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr(其中X為除了脯胺酸外之任何胺基酸)之蛋白質可提供N-聚醣之附著位點。

【0052】N-聚醣包括表1中列出之那些N-連接之寡醣。所列之寡醣的簡寫名稱在本文中作為用於描述該寡醣之簡化名稱。因此，例如A1 N-聚醣含有與由(SA)(Gal)<sub>2</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>(Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>3</sub>所組成之寡醣連接的精胺酸。

表 1 N-糖聚之結構

| 分子名稱                                     | 編號名稱   | 分子量    | 結構圖式 |
|------------------------------------------|--------|--------|------|
| (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   | 1357.4 |      |
| (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 |      |

註：(SA)之結構為半乳糖(Gal)~半乳糖(Man)~GlcNAc(N-乙酰葡萄糖胺)~GlcNAc(fuc)之結構，其中SA為半乳糖(Gal)~半乳糖(Man)~GlcNAc(N-乙酰葡萄糖胺)~GlcNAc(fuc)之結構。

篩選

〔0053〕“水解產物”為從植物材料、動物材料、乳清、酵母，等水解衍生之複合材料。術語“水解產物”可與“蛋白質水解產物”互換使用。“植物水解產物”(植物蛋白質水解產物)為水解之植物材料，諸如米粉、小麥粉、玉米粉、大豆粉，等。蛋白質水解產物可藉由三種通用方法製造：酸水解、鹼水解和酶催化水解。在生物應用方面(包括生物治療劑製造)，蛋白質水解產物主要係藉由酶催化

水解製造。例如藉由胃蛋白酶分解製造之大豆水解產物可稱為“大豆蛋白腴”，或者藉由胰蛋白酶分解製造之酵母水解產物可稱為“酵母胰蛋白腴”。Franek et al., *Biotechnol. Prog.* 16(5): 688-92 (2000)之植物蛋白質水解產物及製備彼等之方法方面被併入本文中。

【0054】於一些實施態樣中，該主題水解產物為植物水解產物。於一特定之實施態樣中，該主題蛋白質水解產物為大豆水解產物。“大豆水解產物”為源自碎大豆之酶催化分解之大豆產品，該碎大豆很大程度上為化學上不確定的。一般而言，大豆水解產物係由胺基酸、蛋白質、碳水化合物、礦物質和維生素之聚集體組成。大豆水解產物為可在，例如高濃度溶液中商購獲得之源自植物的蛋白質水解產物(例如 HyClone™ HyQ Soy Hydrolyzate 溶液)或粉末(例如 Sigma Aldrich® S1674(Amisoy™)，大豆蛋白質水解產物)形式。如本文所使用之大豆水解產物的“批次(batch)”或“批(lot)”係指由碎大豆水解產生之大豆水解產物的製造量。例如各水解過程可產生具有不同組分(諸如維生素、胺基酸、肽和糖)濃度之獨特的大豆水解產物“批次”或“批”。大豆水解產物通常在產生生物治療劑商品(諸如抗體)期間與不含動物蛋白質之細胞培養基一起用於生長哺乳動物細胞株。更具體地，在接種細胞之前或期間將大豆水解產物加入細胞培養基中。然後將細胞培養在含有水解產物之培養基中，直至收穫該等細胞。由於大豆水解產物之不確定性質，大豆水解產物之批次將在批次之間

(或批之間)變化，這可能導致在商業製造生物治療劑時的不一致性。

**【0055】** 本發明已鑑別在大豆水解產物之批次中的某些組分之濃度會影響使用大豆水解產物之細胞培養中所產生之蛋白質的品質和組成。本發明提供用於篩選大豆水解產物之批次的方法，以選擇含有所欲量之組分(諸如，例如鳥胺酸、腐胺、瓜胺酸、精胺酸或彼等之組合)的大豆水解產物的某些批次。

**【0056】** 於某些實施態樣中，該篩選方法包括：測量在至少一部分(即，樣品)之大豆水解產物批次中的鳥胺酸或腐胺之量。於特定之實施態樣中，為大豆水解產物樣品稱重並將彼一部分溶解至所需濃度。於一些實施態樣中，再將該大豆水解產物溶液在溶劑中稀釋至第二所需濃度(例如 1g/L 至 25g/L)然後可測定所產生之大豆水解產物溶液的組成。

**【0057】** 於一些實施態樣中，該測量步驟採用合適之方法測定大豆水解產物樣品之分子組成，包括，例如在柱後茛三酮反應後進行之比色檢測或洗提出茛三酮陽性化合物之色層分析(如 HPLC 或 UPLC)，而用於表示各組分(例如鳥胺酸或腐胺)之測量的量之單位可為任何合適之單位(例如微莫耳/L、mg/L 或 g/L)。於一些實施態樣中，測量該鳥胺酸或腐胺之量包括測量樣品中之鳥胺酸的濃度或測量大豆水解產物樣品中之鳥胺酸的總量。然而，測量鳥胺酸或腐胺之量並使用任何單位表示該測量之量，在所選擇之

大豆水解產物之批次中鳥胺酸或腐胺的濃度小於或等於 0.67mg鳥胺酸或腐胺/g大豆。

【0058】於一實施態樣中，獲得一個大豆水解產物批次之樣本並藉由在離子交換柱上進行胺基酸之色層分析法和柱後茚三酮檢測測量樣品之鳥胺酸或腐胺含量。更具體地，於一特定之實施態樣中，篩選方法包括酸水解大豆水解產物樣品並在樣品緩衝液中重建。然後，令該水解之樣品在，例如磺化之聚苯乙烯樹脂(Dowex 50)柱上進行高性能陽離子交換分離，接著進行柱後衍生化，以容許靈敏地檢測樣品內之個別胺基酸。參見，例如 Moore and Stein. J. Biol. Chem. (1954) Vol. 211 pp. 907-913；Nemkov ,et al., Amino Acids 2015 Nov; 47(11): 2345-2357；Wahl and Holzgrabe, “Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes,” Talanta 154:150-163,1 July 2016。藉由茚三酮試劑進行柱後顯色後，測量在茚三酮紫色範圍內之吸光度，例如 570nm。使用色層分析軟體(例如用於日立版本 3.1.5b 色層分析軟體之 EZChrom Elite)完成數據採集以提供顯示微莫耳/L胺基酸、mg/L胺基酸或 g/L胺基酸之定量性色層分析圖。

【0059】本技藝之一般技術人士將理解可根據本發明之方法使用其他方法鑑別和測量樣品組成物中之胺基酸，諸如使用液態色層分析法和質譜法之柱前衍生化色層分析法或逆相液態色層分析法。

【0060】於某些實施態樣中，使用液相質譜篩選大豆

水解產物樣品。例如，可依本文所提出者獲得大豆水解產物之批次的樣品並在高效液相色層分析(HPLC)系統(諸如Agilent 1100或Agilent 1200SL)上運行一次色層分析或一系列色層分析。可進行質譜分析以提供描述該測量之大豆水解產物樣品之組成的高解析定量數據。

【0061】於一些實施態樣中，本發明提供包括篩選具有所欲量之組分(諸如鳥胺酸、腐胺及/或瓜胺酸)的大豆水解產物批次之方法，並選擇具有所欲量之該等組分的大豆水解產物批次。例如可依上述篩選包含一部分大豆水解產物粉末之批次的樣品，並與在如該樣品運行之相同條件下產生之胺基酸標準變化形廓相比較。如第1A至1B圖中所示，所產生之色層分析圖將提供存在於該大豆水解產物樣品中之各胺基酸組分之濃度(例如微莫耳/L胺基酸、mg/L胺基酸或g/L胺基酸)。分析該色層分析法圖有助於鑑別含有所需濃度之組分(諸如鳥胺酸、腐胺及/或瓜胺酸)的大豆水解產物(即，樣品)。然後選擇包含所欲量之特定組分的各批大豆水解產物以供進一步用於，例如如本文所描述之細胞培養中。第1圖之圖表A描繪在胺基酸鑑定後被拒絕之批次。第1圖之圖表B描繪在相同條件下運行之可接受的大豆水解產物批次之實例。在二個圖中圈出對應於鳥胺酸之胺基酸峰。可測定產生標準曲線之鳥胺酸或腐胺濃度並將樣品鳥胺酸或腐胺濃度內插入曲線。或者，鳥胺酸或腐胺之相對量可藉由測定鳥胺酸或腐胺波峰之曲線下面積並將其除以所有胺基酸之波峰下面積之總和測定或將波峰面積

與標準相比較。

【0062】於某些實施態樣中，欲選擇之大豆水解產物組分(例如鳥胺酸或腐胺)的所需濃度為5 mg/L或更低。於一實施態樣中，欲選擇之大豆水解產物批次中之組分(例如鳥胺酸或腐胺)的所需濃度之範圍係在0.5 mg/L至5.0 mg/L或0.5 mg/L至2.0 mg/L。於其他實施態樣中，在選擇之大豆水解產品批次中之鳥胺酸或腐胺的濃度範圍係在0.5 mg/L至4.5 mg/L、0.5 mg/L至4.0 mg/L、0.5 mg/L至3.5 mg/L、0.5 mg/L至3.0 mg/L、0.5 mg/L至2.5 mg/L、0.5 mg/L至2.0 mg/L、0.5 mg/L至1.5 mg/L或0.5 mg/L至1.0 mg/L。於一些實施態樣中，在選擇之大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的濃度範圍係在1.0 mg/L至5.0 mg/L、1.5 mg/L至5.0 mg/L、2.0 mg/L至5.0 mg/L、2.5 mg/L至5.0 mg/L、3.0 mg/L至5.0 mg/L、3.5 mg/L至5.0 mg/L、4.0 mg/L至5.0 mg/L或4.5 mg/L至5.0 mg/L。

【0063】於特定之實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度為至少0.5 mg/L、0.6 mg/L、0.7 mg/L、0.8 mg/L、0.9 mg/L、1.1毫克/L、1.2 mg/L、1.3 mg/L、1.4 mg/L、1.5 mg/L、1.6 mg/L、1.7 mg/L、1.8 mg/L、1.9 mg/L、2.0 mg/L、2.1 mg/L、2.2 mg/L、2.3 mg/L、2.4 mg/L、2.5 mg/L、2.6 mg/L、2.7 mg/L、2.8 mg/L、2.9 mg/L、3.0 mg/L、3.1 mg/L、3.2 mg/L、3.3 mg/L、3.4 mg/L、3.5 mg/L、3.6 mg/L、3.7 mg/L、3.8 mg/L、3.9 mg/L、4.0 mg/L、4.1 mg/L、4.2

mg/L、4.3 mg/L、4.4 mg/L、4.5 mg/L、4.6 mg/L、4.7 mg/L、4.8 mg/L、4.9 mg/L或5.0 mg/L。

【0064】於其他實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度不超過0.67 mg鳥胺酸/g大豆。再於其他實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度不超過0.27 mg鳥胺酸/g大豆。於另一實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度不超過0.24 mg鳥胺酸或腐胺/g大豆。於一些實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度為0.067 mg至0.67 mg鳥胺酸或腐胺/g大豆。再於其他實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度落在0.067 mg至0.27 mg鳥胺酸/g大豆之範圍內。再於另一實施態樣中，在大豆水解產物批次中之鳥胺酸或腐胺的所需濃度落在0.067 mg至0.24 mg鳥胺酸或腐胺/g大豆。

【0065】於一實施態樣中，在選擇之大豆水解產物中之鳥胺酸或腐胺質量的相對量(% w/w)(w/w=鳥胺酸或腐胺之質量/水解產物之總質量)為 $\leq 0.067\%$ ，諸如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%(均以w/w計)。

【0066】於一實施態樣中，該植物蛋白質水解產物係

基於產生具有特定品質屬性之糖蛋白選擇。糖蛋白之品質可藉由評估糖蛋白上之一或多種特定N-聚醣的水準或藉由評估糖蛋白上之一或多種特定糖的水準或多種屬性之組合測定。例如具有特定岩藻糖水準之糖蛋白(例如5-10莫耳岩藻糖/莫耳糖蛋白)可為品質屬性標準；或特定之唾液酸水準，例如5-15莫耳唾液酸/莫耳糖蛋白；或A1 N-聚醣對所有N-聚醣總量之特定比例，例如10-17%(w/w)可被認為是具有該必要品質屬性。能夠產生該糖蛋白之植物蛋白質水解產物被認為是可選擇的。

【0067】於一實施態樣中，該植物蛋白質水解產物係藉由下述方法選擇：在培養在含有可能之選擇的(可能可選擇的)植物蛋白質水解產物(例如大豆水解產物)之培養基中的細胞產生糖蛋白，純化該糖蛋白，令該糖蛋白經受寡醣指紋鑑定並藉由計算與A1 N-聚醣相關之波峰下面積，將該值除以所有N-聚醣之波峰下的總面積測定A1 N-聚醣之相對量，再選擇能產生具有 $\geq 10\%$ 、 $\geq 10.5\%$ 、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%之A1 N-聚醣相對量的糖蛋白之植物蛋白質水解產物。

#### 【0068】

#### 細胞培養

【0069】本發明提供培養表現所欲蛋白質之細胞的方法，該方法係將細胞培養在使用如上述之選擇的大豆水解

產物批次的細胞培養基中。本發明首次發現在細胞培養基中使用選擇之包含 5.0 mg/L 或更少之鳥胺酸的大豆水解產物批次可以降低批次間之變異性並提高蛋白質產物品質。本發明首次發現在細胞培養基中使用選擇之包含 5.0 mg/L 或更少之腐胺的大豆水解產物批次可以降低批次間之變異性並提高蛋白質產物品質。

【0070】“細胞培養”或“培養”意指在多細胞生物體或組織外部生長和繁殖細胞。哺乳動物細胞之合適培養條件為本技藝所已知。參見，例如 *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992)。可將哺乳動物細胞培養在懸浮液中或附著在固體基質上。哺乳動物細胞培養可使用流體化床生物反應器、中空纖維生物反應器、滾筒瓶、搖瓶或攪拌槽生物反應器，具有或不具有微載體並以分批、餵料分批、連續、半連續或灌注模式操作。可將細胞培養基或濃縮之餵料培養基在培養期間連續或間隔添加入培養物中。例如培養物可每天、每二天、每三天餵料一次或可在被監測之特定培養基組分的濃度落在所需範圍之外時餵料。

【0071】如本文所使用之術語“細胞培養基 (cell culture media)”、“培養基 (media)”、“細胞培養基 (cell media)”、“細胞培養基 (cell culture medium)”或“培養基 (culture medium)”係指用於生長細胞(例如動物或哺乳動物細胞)之任何營養液且其通常提供至少一或多種下列組分：能量來源(通常為碳水化合物之形式，諸如葡萄糖)；

全部必需胺基酸之一或多者且通常為該二十種鹼性胺基酸加半胱胺酸；通常需要低濃度之維生素及/或其他有機化合物；脂質或游離脂肪酸；和微量元素，例如通常需要非常低之濃度(通常在微莫耳範圍內)的無機化合物或天然存在之元素。於一些實施態樣中，細胞培養基通常係藉由將大豆或其他植物蛋白質水解產物與附加成分組合形成。

**【0072】**如本文所使用之“附加成分”包括細胞培養基組分之任何一或多者，該細胞培養基組分包括，但不限於水、能量來源、全部必需胺基酸之一或多者且通常為二十種鹼性胺基酸加半胱胺酸；通常需要低濃度之維生素及/或其他有機化合物、脂質或游離脂肪酸和微量元素。

**【0073】**於特定之實施態樣中，該細胞培養基具有補充之選擇之大豆水解產物批次的量。於某些實施態樣中，該細胞培養基中係補充約0.5 g/L -約25 g/L之選擇的大豆水解產物。於一些實施態樣中，該細胞培養基被補充約0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L、2 g/L、2.5 g/L、3 g/L、3.5 g/L、4 g/L、4.5 g/L、5 g/L、5.5 g/L、6 g/L、6.5 g/L、7 g/L、7.5 g/L、8 g/L、8.5 g/L、9 g/L、9.5 g/L、10 g/L、10.5 g/L、11 g/L、11.5 g/L、12 g/L、12.5 g/L、13 g/L、13.5 g/L、14 g/L、14.5 g/L、15 g/L、15.5 g/L、16 g/L、16.5 g/L、17 g/L、17.5 g/L、18 g/L、18.5 g/L、19 g/L、19.5 g/L、20 g/L、20.5 g/L、21 g/L、21.5 g/L、22 g/L、22.5 g/L、23 g/L、23.5 g/L、24 g/L、24.5 g/L或約25 g/L之選擇的大豆水解產物批次。

【0074】於一實施態樣中，加入植物蛋白質水解產物後細胞培養基中之鳥胺酸或腐胺之濃度為 $\leq 5$  mg/L、0.6-3 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.03 mg/L、0.04 mg/L、0.05 mg/L、0.06 mg/L、0.07 mg/L、0.08 mg/L、0.09 mg/L、0.010 mg/L、0.015 mg/L、0.02 mg/L、0.025 mg/L、0.03 mg/L、0.035 mg/L、0.04 mg/L、0.045 mg/L、0.05 mg/L、0.055 mg/L、0.06 mg/L、0.065 mg/L、0.07 mg/L、0.075 mg/L、0.08 mg/L、0.085 mg/L、0.09 mg/L、0.095 mg/L、0.1 mg/L、0.15 mg/L、0.2 mg/L、0.25 mg/L、0.3 mg/L、0.35 mg/L、0.4 mg/L、0.45 mg/L、0.5 mg/L、0.55 mg/L、0.6 mg/L、0.65 mg/L、0.7 mg/L、0.75 mg/L、0.8 mg/L、0.85 mg/L、0.9 mg/L、0.95 mg/L、1 mg/L、1.5 mg/L、2 mg/L、2.5 mg/L、3 mg/L、3.5 mg/L、4 mg/L、4.5 mg/L或5 mg/L。

【0075】於一實施態樣中，該培養之細胞為能夠產生生物治療性蛋白質之細胞株的細胞。用於產生蛋白質生物治療劑之細胞株的非限制性實例包括，尤其是，初代細胞、BSC細胞、HeLa細胞、HepG2細胞、LLC-MK細胞、CV-1細胞、COS細胞、VERO細胞、MDBK細胞、MDCK細胞、CRFK細胞、RAF細胞、RK細胞、TCMK-1細胞、LLCPK細胞、PK15細胞、LLC-RK細胞、MDOK細胞、BHK細胞、BHK-21細胞、CHO細胞、CHO-K1細胞、NS-1細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、BHK細胞、3T3細胞、293細胞、RK細胞、Per.C6細胞和雞胚細胞。於一實施態

樣中，該細胞株為CHO細胞株或經優化以用於大規模蛋白質生產之數種特異性CHO細胞變體之一或多者，例如CHO-K1或CHO-K1衍生之EESYR®(增強之表現和穩定性區域)細胞(美國專利案第7,771,997號)。

【0076】於一實施態樣中，該培養和表現異源糖蛋白之細胞為藉由選殖擴增底有和表現編碼該糖蛋白或糖蛋白之次單位的多核苷酸之細胞(即，祖細胞)所得到之細胞群，其中該糖蛋白為如抗體般之複雜的多亞單位蛋白質。於一些實施態樣中，該藉由選殖擴增從祖細胞獲得或來自祖細胞之細胞群的構成細胞有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或約100%含有編碼糖蛋白之多核苷酸並表現該糖蛋白。

【0077】哺乳動物細胞(諸如CHO細胞)可培養在小規模之細胞培養容器中，諸如在具有約25ml培養基之125ml容器、具有約50至100ml培養基之250ml容器、具有約100至200ml培養基之500ml容器中。或者，該培養物可為大規模的，諸如，例如具有約300至1000ml培養基之1000ml容器、具有約500ml至3000ml培養基之3000ml容器、具有約2000ml至8000ml培養基之8000ml容器和具有約4000ml至15000ml培養基之15000ml容器。用於製造之培養物(即，生產細胞培養物)可含有10,000L或更多之培養基。大規模細胞培養或“生產細胞培養”(諸如用於臨床製造蛋白質治療劑)通常係維持數天或甚至數週，同時該細胞產生所需

之蛋白質。在此期間，可以含有在培養過程中消耗之組分(諸如營養素和胺基酸)的濃縮之餌料培養基補充培養物。

【0078】於某些實施態樣中係使用濃縮之餌料培養基。濃縮之餌料培養基可以任何細胞培養基配方為底質。該等濃縮之餌料培養基可含有本文所描述之細胞培養基的大多數組分，例如其正常使用量之約5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100X、200X、400X、600X、800X或甚至約1000倍。濃縮之餌料培養基通常用於餌料分批培養過程中。

【0079】於一些實施態樣中，在細胞生長或蛋白質生產過程中係以“使用點添加劑”(亦稱為添加劑、使用點成分或使用點化學劑)來補充細胞培養基。使用點添加劑包括下列群組之任何一或多者：生長因子或其他蛋白質、緩衝液、能量來源、鹽、胺基酸、金屬和螯合劑。其他蛋白質包括轉鐵蛋白和白蛋白。生長因子(其包括細胞因子和趨化因子)為本技藝普遍所知且已知可刺激細胞生長或在某些情況下可刺激細胞分化。生長因子通常為蛋白質(例如胰島素)、小肽或類固醇激素，諸如雌激素、DHEA、睾酮，等。在一些情況下，生長因子可為促進細胞增殖或蛋白質生產的非天然化學物質，諸如，例如四氫葉酸(THF)、甲胺蝶呤，等。蛋白質和肽生長因子之非限制性實例包括血管生成素、骨形態發生蛋白(BMP)、源自腦之神經營養因子(BDNF)、表皮生長因子(EGF)、紅血球生成素(EPO)、纖維母細胞生長因子(FGF)、源自神經膠質細胞

株之神經營養因子(GDNF)、粒細胞集落刺激因子(G-CSF)、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF)、生長分化因子-9(GDF9)、肝細胞生長因子(HGF)、源自肝細胞瘤之生長因子(HDGF)、胰島素、胰島素樣生長因子(IGF)、移行刺激因子、肌肉生長抑制素(GDF-8)、神經生長因子(NGF)和其他神經營養因子、血小板衍生之生長因子(PDGF)、血小板生成素(TPO)、轉化生長因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )、轉化生長因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )、腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、血管內皮生長因子(VEGF)、wnt信號傳導通路激動劑、胎盤生長因子(PlGF)、胎牛生長激素(FBS)、介白素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7，等。於一實施態樣中，該細胞培養基補充有使用點添加生長因子胰島素。於一實施態樣中，該培養基中之胰島素的濃度(即，添加後在細胞培養基中之胰島素的量)為約0.1 $\mu$ M至10 $\mu$ M。於集些實施態樣之培養基配方中亦可包括之一或多種使用點添加劑。

【0080】緩衝液為本技藝普遍所知。本發明並不限於任何特定之緩衝液，且本技藝之一般技藝的任何一位人士可選擇合適之緩衝液或緩衝液系統與產生特定蛋白質之特定細胞株一起使用。於一實施態樣中，使用點添加緩衝液為NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>系統。於一實施態樣中，該使用點添加緩衝液包含NaHCO<sub>3</sub>。於另一實施態樣中，該緩衝液為HEPES。

【0081】用來作為細胞培養中之使用點添加劑的能量

來源亦為本技藝所周知。不限於此，於一實施態樣中，該使用點添加能量來源為葡萄糖。鑑於特定細胞株和欲產生之蛋白質的特定和具體要求，於一實施態樣中，該培養基中可添加濃度為約1至20mM之葡萄糖。

【0082】螯合劑同樣為細胞培養和蛋白質生產之技藝所周知。EDTA四鈉脫水物和檸檬酸為本技藝中常用的二種螯合劑，雖然可使用其他螯合劑實行本發明。於一實施態樣中，使用點添加螯合劑為EDTA四鈉二水合物。於一實施態樣中，使用點添加螯合劑為檸檬酸鹽，諸如 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 。

【0083】於一實施態樣中，該細胞培養物可補充以一或多種使用點添加胺基酸，諸如麩胺醯胺。其他使用點添加劑包括各種金屬鹽之一或多者，諸如鐵、鎳、鋅和銅之鹽。於一實施態樣中，該細胞培養基係補充以下列群組之任何一或多者：硫酸銅、硫酸鋅、氯化鐵；和硫酸鎳。

【0084】於一實施態樣中，該培養基可在細胞培養期間根據餵料分批方法間隔補充。餵料分批培養為該技藝普遍已知且可用於優化蛋白質生產。參見，例如 Y.M. Huang et al., *Biotechnol Prog.* (2010) 26(5) pp.1400-1410。

【0085】於本發明之另一態樣中，與培養在包含含有濃度高於5 mg/L之鳥胺酸或腐胺之大豆水解產物的培養基中之細胞相比較，培養在包含含有所需濃度(即，小於或等於5.0 mg/L，例如0.5 mg/L至5.0 mg/L或0.5 mg/L至2.0 mg/L)之鳥胺酸或腐胺之大豆水解產物的培養基中之細胞

可產生具有改善品質之所欲蛋白質。於某些實施態樣中，改善之蛋白質品質係藉由下述方法測量：所欲蛋白質上之一或多種胺基酸處有或無糖基化存在、所欲蛋白質上之聚醣的量、所欲蛋白質上之一或多個糖基化處存有唾液酸或彼等之組合。如本文所使用之“增進之品質”、“改善之品質”或“高品質”蛋白質產品亦可指較為一致之品質，例如在生物治療性蛋白質生產批次中觀察到之轉譯後修飾。一致之品質包括具有，例如在複製生產線之後可重複的所需糖基化變化形廓。關於品質方面之一致性係指均勻性和標準化之程度，而複製生產批次基本上沒有變化。

【0086】於某些實施態樣中，該蛋白質產品(所欲蛋白質)為抗體、人抗體、人化抗體、嵌合型抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙抗體、三抗體或四抗體、Fab片段或F(ab')<sub>2</sub>片段、IgD抗體、IgE抗體、IgM抗體、IgG抗體、IgG1抗體、IgG2抗體、IgG3抗體或IgG4抗體。於一實施態樣中，該抗體為IgG1抗體。於一實施態樣中，該抗體為IgG2抗體。於一實施態樣中，該抗體為IgG4抗體。於一實施態樣中，該抗體為嵌合型IgG2/IgG4抗體。於一實施態樣中，該抗體為嵌合型IgG2/IgG1抗體。於一實施態樣中，該抗體為嵌合型IgG2/IgG1/IgG4抗體。

【0087】於一些實施態樣中，該抗體係選自由下列所組成之群組：抗程序性細胞死亡1抗體(例如，如美國專利申請出版物第US2015/0203579A1號中描述之抗-PD1抗

體)、抗程序性細胞死亡配體-1(例如,如美國專利申請出版物第US2015/0203580A1號中描述之抗PD-L1抗體)、抗-D114抗體、抗血管生成素-2抗體(例如,如美國專利案第9,402,898號中描述之抗ANG2抗體)、抗血管生成素樣3抗體(例如,如美國專利案第9,018,356號中描述之抗AngPt13抗體)、抗血小板衍生之生長因子受體抗體(例如,如美國專利案第9,265,827號中描述之抗PDGFR抗體)、抗Erb3抗體、抗催乳素受體抗體(例如,如美國專利案第9,302,015號中描述之抗PRLR抗體)、抗補體5抗體(例如,如美國專利申請出版物第US2015/0313194A1號中描述之抗C5抗體)、抗TNF抗體、抗表皮生長因子受體抗體(例如,如美國專利案第9,132,192號中描述之EGFR抗體或如美國專利申請出版物第US2015/0259423A1號中描述之EGFRvIII抗體)、抗前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶(subtilisin)Kexin-9抗體(例如,如美國專利案第8,062,640號或美國專利申請出版物第US2014/0044730A1號中描述之抗PCSK9抗體)、抗生長和分化因子-8抗體(例如,如美國專利案第8,871,209或9,260,515號中描述之抗GDF8抗體,亦稱為抗肌肉生長抑制素(myostatin)抗體)、抗胰高血糖素(glucagon)受體(例如,如美國專利申請出版物第US2015/0337045A1或US2016/0075778A1號中描述之抗GCGR抗體)、抗VEGF抗體、抗IL1R抗體、介白素4受體抗體(例如,如美國專利申請出版物第US2014/0271681A1或美國專利案第8,735,095或8,945,559號中描述之抗IL4R抗

體)、抗介白素6受體抗體(例如,如美國專利案第7,582,298、8,043,617或9,173,880號中描述之抗IL6R抗體)、抗IL1抗體、抗IL2抗體、抗IL3抗體、抗IL4抗體、抗IL5抗體、抗IL6抗體、抗IL7抗體、抗白介素33(例如,如美國專利申請出版物第US2014/0271658A1或US2014/0271642A1號中描述之抗IL33抗體)、抗呼吸道融合瘤病毒(Respiratory syncytial virus)抗體(例如,如美國專利申請出版物第US2014/0271653A1號中描述之抗RSV抗體)、抗分化簇3(例如,如美國專利申請出版物第US2014/0088295A1和US20150266966A1,及美國申請案第62/222,605號中描述之抗CD3抗體)、抗分化簇20(例如,如美國專利申請出版物第US2014/0088295A1和US20150266966A1,及美國專利案第7,879,984號中描述之抗CD20抗體)、抗CD19抗體、抗CD28抗體、抗分化簇48(例如,如美國專利案第9,228,014號中描述之抗CD48抗體)、抗Fcl d1抗體(例如,如美國專利案第9,079,948號中描述者)、抗中東呼吸症候群病毒(例如,如美國專利申請出版物第US2015/0337029A1號中描述之抗MERS抗體)、抗伊波拉病毒抗體(例如,如美國專利申請出版物第US2016/0215040號中描述者)、抗茲卡病毒抗體、抗淋巴細胞活化基因3抗體(例如抗-LAG3抗體或抗-CD223抗體)、抗神經生長因子抗體(例如,如美國專利申請出版物第US2016/0017029號及美國專利案第8,309,088和9,353,176號中描述之抗-NGF抗體)及抗激活素(Activin)A

抗體。於一些實施態樣中，該雙特異性抗體係選自由下列所組成之群組：抗CD3x抗CD20雙特異性抗體(如美國專利申請出版物第US2014/0088295A1和US20150266966A1號中描述者)、抗CD3x抗黏蛋白16雙特異性抗體(例如抗CD3x抗Muc16雙特異性抗體)和抗CD3x抗前列腺特異性膜抗原雙特異性抗體(例如抗CD3x抗PSMA雙特異性抗體)。於一些實施態樣中，該所欲蛋白質係選自由下列所組成之群組：艾利洛單抗(alirocumab)、沙里洛單抗(sarilumab)、法西努單抗(fasinumab)、內瓦單抗(nesvacumab)、杜比洛單抗(dupilumab)、崔瓦單抗(trevogrumab)、伊維納單抗(evinacumab)和里努單抗(rinucumab)。本揭示內容全文提及之所有出版物之全部內容均以引用方式併入本文。

【0088】於其他實施態樣中，所欲蛋白質為含有Fc部分和另一結構域之重組蛋白(例如Fc融合蛋白)。於一些實施態樣中，Fc-融合蛋白為受體Fc-融合蛋白，其含有一或多個與Fc部分偶聯之受體的胞外結構域。於一些實施態樣中，該Fc部分包含鉸鏈區，隨後為IgG之CH2和CH3結構域。於一些實施態樣中，該受體Fc-融合蛋白含有二或更多個與單一配體或多個配體結合之不同受體鏈。例如，Fc融合蛋白為捕獲蛋白，諸如例如IL-1捕獲蛋白(例如利納西普，其含有與II-1R1胞外區融合之IL-1RAcP配體結合區，該II-1R1胞外區與hIgG1之Fc融合；參見美國專利案第6,927,004號，其全部內容以引用方式併入本文)、VEGF捕捉蛋白(例如柔癌捕或ziv-柔癌捕，其含有與VEGF受體

Flk1之Ig結構域3融合之VEGF受體Flt1，該VEGF受體Flt1之Ig結構域3與hIgG1之Fc融合；參見美國專利案第7,087,411和7,279,159號)；或康柏西普，其含有與VEGF受體Flk1之Ig結構域3融合之VEGF受體Flt1之Ig結構域2，該VEGF受體Flt1之Ig結構域3與VEGF受體Flk1之Ig結構域4融合，該VEGF受體Flk1之Ig結構域4與hIgG1之Fc融合；參見美國專利案第8,216,575號)或TNF捕捉蛋白(例如依那西普，其含有與hIgG1之Fc融合之TNF受體；參見美國專利案第5,610,279號)。於其他實施態樣中，Fc-融合蛋白為ScFv-Fc-融合蛋白，其含有一或多個抗原結合結構域之一或多者，諸如與Fc部分偶聯之抗體的可變重鏈片段和可變輕鏈片段。

#### 【0089】

#### 蛋白質產製

【0090】所欲蛋白質可使用本技藝中之一般技術人士已知之方法藉由宿主細胞表現。一般而言，任何適合在哺乳動物細胞中表現之所欲蛋白質可藉由本發明方法產生，然而糖蛋白將特別受益於本發明方法。例如，於特定之實施態樣中，該所欲蛋白質為抗體或其抗原結合片段、雙特異性抗體或其片段、嵌合型抗體或其片段、ScFv或其片段、Fc標記之蛋白質(例如捕捉蛋白質)或其片段、生長因子或其片段、細胞因子或其片段或細胞表面受體或其片段之胞外結構域。

【0091】具有天門冬醯胺連接(N-連接)之聚醣的糖蛋

白廣泛存在於真核細胞中。這些聚醣之生物合成及其轉移至多肽係在內質網(ER)中發生。N-聚醣結構進一步藉由ER和高爾基複合體中之許多醣苷酶和糖基轉移酶修飾。使用本發明之方法產生蛋白質係針對改善所需之N-聚醣結構的一致性以排除免疫原性抗原決定部位(“glycotopes”)。聚醣連接之蛋白質的詳細結構分析可能與該蛋白質之功能特徵有關。該等表徵蛋白質糖基化之分析通常涉及幾個步驟：i) 酶催化或化學釋出連接之聚醣；ii) 經由以芳香胺或脂族胺之還原性胺化或全甲基化來將該釋出之聚醣衍生化；iii) 分析該聚醣。本技藝之技術熟習人士已知多種用於分析糖基化模式之變化。糖蛋白可攜帶數種類型之糖型，該糖型以特定量佔據各種位點，因此它們複雜性可能使其在某些生產方法中難以複製。糖型之類型和數量之一致性是可測量的且代表生產治療性蛋白質之理想結果。

【0092】本發明內容顯示藉由在包含大豆水解產物之培養基中培養表現所欲蛋白質之細胞，而以分批或餵料分批培養之方式產生許多批次之所欲蛋白質，該大豆水解產物具有特定濃度之鳥胺酸或腐胺而導致產生之蛋白質的品質提升且批次之間的一致性改善。因此，本發明之另一態樣係提供多種蛋白質製劑，該多種蛋白質製劑各自藉由將細胞培養在包含不同批次之大豆水解產物的培養基中產生，該不同批次之大豆水解產物含有預定量之鳥胺酸或腐胺。於某些實施態樣中，所選擇之用於細胞培養的每批大豆水解產物之濃度為0.67 mg鳥胺酸或腐胺/g大豆或更少，

特別是0.0067 mg至0.67 mg鳥胺酸或腐胺/g大豆或0.0067 mg至0.27 mg鳥胺酸或腐胺/g大豆。

【0093】於其他實施態樣中，含有大豆水解產物之細胞培養基中之鳥胺酸或腐胺的濃度係在0.5 mg/L至4.5 mg/L、0.5 mg/L至4.0 mg/L、0.5 mg/L至3.5 mg/L、0.5 mg/L至3.0 mg/L、0.5 mg/L至2.5 mg/L、0.5 mg/L至2.0 mg/L、0.5 mg/L至1.5 mg/L或0.5 mg/L至1.0 mg/L之範圍內。於一些實施態樣中，含有大豆水解產物之細胞培養基中之鳥胺酸或腐胺的濃度係在1.0 mg/L至5.0 mg/L、1.5 mg/L至5.0 mg/L、2.0 mg/L至5.0 mg/L、2.5 mg/L至5.0 mg/L、3.0 mg/L至5.0 mg/L、3.5 mg/L至5.0 mg/L、4.0 mg/L至5.0 mg/L或4.5 mg/L至5.0 mg/L之範圍內。

【0094】於特定之實施態樣中，含有大豆水解產物之細胞培養基包括鳥胺酸或腐胺，其含量為0.5 mg/L、0.6 mg/L、0.7 mg/L、0.8 mg/L、0.9 mg/L、1.1毫克/L、1.2 mg/L、1.3 mg/L、1.4 mg/L、1.5 mg/L、1.6 mg/L、1.7 mg/L、1.8 mg/L、1.9 mg/L、2.0 mg/L、2.1 mg/L、2.2 mg/L、2.3 mg/L、2.4 mg/L、2.5 mg/L、2.6 mg/L、2.7 mg/L、2.8 mg/L、2.9 mg/L、3.0 mg/L、3.1 mg/L、3.2 mg/L、3.3 mg/L、3.4 mg/L、3.5 mg/L、3.6 mg/L、3.7 mg/L、3.8 mg/L、3.9 mg/L、4.0 mg/L、4.1 mg/L、4.2 mg/L、4.3 mg/L、4.4 mg/L、4.5 mg/L、4.6 mg/L、4.7 mg/L、4.8 mg/L、4.9 mg/L或5.0 mg/L。

【0095】於其他實施態樣中，在含有大豆水解產物之

一批培養基中該鳥胺酸或腐胺之所需濃度不超過 5.0 mg/L。再於其他實施態樣中，在含有大豆水解產物之一批培養基中該鳥胺酸或腐胺之所需濃度不超過 2.0 mg/L。於另一實施態樣中，在含有大豆水解產物之一批培養基中該鳥胺酸或腐胺之所需濃度不超過 1.8 mg/L。於一些實施態樣中，在含有大豆水解產物之一批培養基中該鳥胺酸或腐胺之所需濃度為 0.5 mg/L 至 5.0 mg/L。再於其他實施態樣中，在含有大豆水解產物之一批培養基中該鳥胺酸或腐胺之所需濃度落在 0.5 mg/L 至 2.0 mg/L 之範圍內。再於另一實施態樣中，在含有大豆水解產物之一批培養基中該鳥胺酸或腐胺之所需濃度落在 0.5 mg/L 至 1.8 mg/L 之範圍內。

【0096】於某些實施態樣中，當與藉由包括將細胞培養在補充有包含濃度高於 5 mg/L 之鳥胺酸或腐胺的大豆水解產物之培養基中之方法所產生的蛋白質製劑相比較時，在多種蛋白質製劑之各蛋白質製劑中產生之所欲蛋白質的品質或某些聚醣之量有所改善。於某些實施態樣中，各蛋白質製劑所表現出之改善的蛋白質品質係藉由下述方法測量：所欲蛋白質之一或多個胺基酸處是否存有糖基化、所欲蛋白質上之聚醣的量、所欲蛋白質上之一或多個糖基化位置處存有唾液酸或彼等之組合。於一實施態樣中，該蛋白質品質對應於在培養物中產生之蛋白質群體的個別成員之糖基化狀態。於某些實施態樣中，品質係藉由調節在培養物中產生之蛋白質群體的個別糖蛋白上出現之糖基化取代來改善，該調節係藉由將細胞培養在補充有包含 5.0

mg/L或更低濃度之鳥胺酸或腐胺(0.5 mg/L至5.0 mg/L之鳥胺酸或腐胺或0.5 mg/L至2.0 mg/L之鳥胺酸或腐胺)的大豆水解產物之培養基中進行。

【0097】於一實施態樣中，蛋白質品質係藉由將來自多個蛋白質製劑之每批蛋白質中至少一個聚醣分子之豐度與另一批次之蛋白質中之相同聚醣分子之豐度相比較來確定。如本文所使用之術語“豐度”係指在特定生產批次中具有特定聚醣分子之蛋白質的百分比或具有特定聚醣分子之蛋白質的量相對於一個生產批次中所有聚醣分子類型之量。於一些實施例中，該聚醣分子係選自由下列所組成之群組：A1、A1F、A2、A2F、的Man5、NA2、NA2F、NA2G1、NA2G1F、NGA2和NGA2FI。於一特定之實施態樣中，該聚醣分子為A1(例如第2圖之波峰11)。

【0098】藉由本發明之細胞培養方法產生之所欲蛋白質顯示有利之品質特徵。蛋白質品質可，例如藉由使用本技藝之技術熟習人士熟知之方法測量，諸如弱陽離子交換色層分析法、毛細管等電聚焦、尺寸排阻色層分析法、高效液相色層分析法(HPLC)、ELISA及/或西方點墨分析。於一些實施態樣中，蛋白質品質係藉由質譜法測量，諸如毛細管電泳質譜法(CE-MS)。於特定之實施態樣中，蛋白質品質係藉由比較來自多種蛋白質製劑之每批蛋白質的質譜讀數測定。

【0099】以高效液相色層分析法(HPLC)加螢光檢測之示例性生產批次顯示由培養在包括含有濃度為0.5 mg/L至

5.0 mg/L之鳥胺酸或腐胺的大豆水解產物之培養基中之細胞產生的所欲蛋白質(糖蛋白)具有較為一致之聚醣表現和糖基化模式(如本文之表2-4中所示例者)。

#### 【0100】

##### 寡醣剖析

【0101】糖蛋白上之特定之N-連接的糖鏈之長度和分佈可藉由寡醣剖析確定。於一實施態樣中，該糖蛋白係以肽：N-糖苷酶F(PNGaseF)去糖基化以從天門冬醯胺側鏈裂解並除去N-連接之寡醣。然後，以螢光試劑(諸如鄰胺基苯甲酸)進行寡醣之衍生。然後，藉由正相陰離子交換HPLC分離糖鏈並以螢光檢測器檢測，產生HPLC色層分析圖。

【0102】於另一實施態樣中，作為總體碳水化合物表徵分析之一部分，以胰蛋白酶分解還原和烷基化之糖蛋白後分離出個別之糖肽。藉由逆相HPLC分離個別之胰蛋白酶糖肽，並隨後與C18柱偶聯以依需要提高解析度。該寡醣係藉由PNGase F分解從每一分離之糖肽釋出，再以鄰胺基苯甲酸衍生並藉由螢光HPLC分析，以獲得該糖蛋白之位點特異性寡醣變化形廓。於其中該糖蛋白為利納西普(SEQ ID NO：1)之實施態樣中，在N37、N87、N91、N98，可選擇地N176、N189、N279、N418、N511、N551、N567、N581、N615和N730處之天門冬醯胺殘基被糖基化。於一實施態樣中，利納西普之殘基N37、N98、N418和N511(與SEQ ID NO：1相關之殘基位置)中的任何

一或多者含有A1寡醣。於其中該糖蛋白為柔癌捕(SEQ ID NO: 2)之實施態樣中，N36、N68、N123、N196和N282處之天門冬醯胺殘基被糖基化。於一實施態樣中，柔癌捕之殘基N123和N196(與SEQ ID NO: 2相關之殘基位置)中的任何一或二者含有A1寡醣。

【0103】於另一實施態樣中，來自糖蛋白之寡醣池係藉由下述步驟產生：以PNGase F將蛋白去糖基化，隨後進行鄰胺基苯甲酸衍生化和接下去之固相萃取(SPE)。然後，使用負線性模式之MALDI-TOF，以2,4,6-三羥基苯乙酮(THAP)作為基質來測量寡醣之質量。

【0104】基於通常在重組蛋白之N-連接的聚醣中觀察到的質量將每個觀察到之質量分配至獨特之寡醣結構。表1中總結所有波峰之預期的質量分配。預期之質量係基於所提出之N-連接之糖鏈結構且加上鄰胺基苯甲酸殘基之質量計算出的平均質量。該單醣組成物亦基於所提出之N-連接之糖鏈結構列出。

【0105】於另一實施態樣中，使用毛細管電泳之定量性寡醣指紋分析來表徵該主題糖蛋白之N-聚醣(寡醣)結構。將糖蛋白變性然後以PNGase F處理來去糖基化。移除該蛋白質後再藉由沉澱來分離釋出之寡醣。以螢光團8-胺基芘-1,3,6-三磺酸鹽(APTS)標記分離出之寡醣池。然後藉由毛細管電泳分離經標記之寡醣並以由雷射光誘導之螢光檢測器監測，使用之激發波長為488nm且發射波長為520nm。

【0106】產生之電泳圖如第2圖中描繪之柔癌捕糖蛋白，所有可量化之峰均加以編號(此實例中共有21個峰)。測定寡醣指紋分析之完整的整合波峰面積(總波峰面積)。各寡醣之相對量可藉由將該特定寡醣之波峰面積(例如A1波峰面積)除以總波峰面積測定。

【0107】於一些實施態樣中，該主題糖蛋白之品質係藉由測定唾液酸化水準(每一糖蛋白之唾液酸殘基的量)或岩藻糖基化水準(每一糖蛋白之岩藻糖殘基的量)評估。於一實施態樣中，使用定量性HPLC分析測定糖蛋白上之唾液酸的總數。在該分析中，使用溫和酸水解從糖蛋白釋出唾液酸，然後以鄰苯二胺衍生化，藉由HPLC分離並以UV或螢光檢測器檢測。唾液酸之定量可相對於標準曲線(使用，例如唾液基乳糖)評估。唾液酸含量係從釋出之唾液酸的莫耳數和反應中使用之糖蛋白的莫耳數計算。

【0108】於一實施態樣中，該利納西普糖蛋白之唾液酸含量為每1莫耳糖蛋白約30至70莫耳唾液酸(mol/mol)、約35至65 mol/mol、30 mol/mol、31mol/mol、32 mol/mol、33 mol/mol、34 mol/mol、35 mol/mol、36 mol/mol、37 mol/mol、38 mol/mol、39 mol/mol、40 mol/mol、41 mol/mol、42 mol/mol、43 mol/mol、44 mol/mol、45 mol/mol、46 mol/mol、47 mol/mol、48 mol/mol、49 mol/mol、50 mol/mol、51 mol/mol、52 mol/mol、53 mol/mol、54 mol/mol、55 mol/mol、56 mol/mol、57 mol/mol、58 mol/mol、59 mol/mol、60

mol/mol、61 mol/mol、62 mol/mol、63 mol/mol、64 mol/mol、65 mol/mol、66 mol/mol、67 mol/mol、68 mol/mol、69 mol/mol或70 mol/mol。

【0109】於一實施態樣中，該阿柏西普糖蛋白之唾液酸含量為每1莫耳糖蛋白約5至15莫耳唾液酸(mol/mol)、約8至12 mol/mol、4 mol/mol、5 mol/mol、6 mol/mol、7 mol/mol、8 mol/mol、9 mol/mol、10 mol/mol、11 mol/mol、12 mol/mol、13 mol/mol、14 mol/mol、15 mol/mol、16 mol/mol、17 mol/mol、18 mol/mol、19 mol/mol或20 mol/mol。

【0110】於一實施態樣中，使用寡醣剖析測定糖蛋白上N-連接之糖鏈的唾液酸化程度和分佈。以PNGaseF將糖蛋白去糖基化，再以螢光試劑鄰胺基苯甲酸衍生化。然後，藉由正相陰離子交換HPLC分離寡醣並以螢光檢測器檢測以產生寡醣變化形廓之HPLC色層分析圖。從下式計算糖蛋白之Z值(其測量平均唾液酸化程度)：

【0111】

$$(OS \ A*O)+(ISA*111-(2SA*2)+(3SA*3)+...(nSA*n)1/(OSA+15A+2SA+35A+...n5A)$$

【0112】為了測定Z值，整合來自寡醣變化形廓的每個波峰之面積。總唾液酸之計算方式為：0唾液酸/鏈波峰乘以0，1唾液酸/鏈波峰乘以1，2唾液酸/鏈波峰乘以2及3唾液酸/鏈波峰乘以3，等之面積的總和。產生之糖鏈總數為所有波峰面積之總和。Z值為總唾液酸面積除以總糖鏈面積。

【0113】於一實施態樣中，利納西普糖蛋白之唾液酸Z值為約1.3至1.6、1.4至1.5、1.41至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、1.45、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59或1.60。

【0114】於一實施態樣中，阿柏西普糖蛋白之唾液酸Z值為約0.5至2、1至1.5、1至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。

#### [實施例]

【0115】提出下列實施例以便提供本技藝之一般技術人士如何製造和使用本文所描述之方法和組成物，且不意圖限制本發明者看待其發明之範圍。關於所使用之數字(例如量、溫度，等)已經努力確保準確性，但應該考慮一些實驗誤差和偏差。除非另外指明，份數為重量份，分子

量為平均分子量，溫度為攝氏溫度，壓力為大氣壓或接近大氣壓。

實施例1：篩選大豆水解產物以測定胺基酸濃度。

【0116】為大豆水解產物樣品稱重並將其20克部分溶解在1升水中使起始濃度為20g/L。然後將所得之大豆水解產物溶液在水中進一步稀釋至所需濃度以用於細胞培養中並使用色層分析法測定所產生之大豆水解產物溶液之分子組成。

【0117】在離子交換柱上藉由色層分析法加柱後茛三酮檢測測量大豆水解產物樣品中之胺基酸的濃度。參見，例如 Moore and Stein. J. Biol. Chem. (1954) Vol. 211 pp. 907-913。將大豆水解產物樣品稀釋以允許個別波峰(胺基酸)從HPLC柱洗提出時之敏感性分離和解析並與標準相比較。如第1A和1B圖所示，將該色層分析圖的每個波峰面積與標準進行比較以測定各洗提液之濃度。

【0118】為了測定大豆水解產物之粉末批次是否每克大豆含有少於0.67毫克鳥胺酸或腐胺，將各代表性樣品之色層分析法圖與標準品相比較。例如，第1A圖顯示一個大豆水解產物批次在保留時間89.02之含有鳥胺酸的洗提液，與標準品相比較，其揭露之波峰面積相當於每克大豆含有1.57 mg鳥胺酸。第1B圖說明其鳥胺酸濃度小於0.67 mg鳥胺酸/g大豆之大豆水解產物批次。選擇具有0.067至0.67 mg鳥胺酸/g大豆之大豆水解產物批次來用於細胞培養

方法中以產生批次間具有較為一致之蛋白質糖基化的生物治療性蛋白質。然而，在如下述之進一步的實驗中使用含有鳥胺酸濃度高於 $\leq 0.67$  mg鳥胺酸/克大豆之大豆水解產物批次以測定大豆水解產物鳥胺酸濃度對產生蛋白質之影響。

實施例2：所欲蛋白質之表現和糖基化變化形廓。

【0119】將表現捕獲蛋白(受體Fc融合蛋白，VEGF-捕獲劑)之CHO細胞培養在包含含有各種量之鳥胺酸、腐胺和瓜胺酸或彼等之組合之大豆水解產物的專有培養基中以測定哪些胺基酸組分影響所產生之蛋白質的品質。表2顯示水解產物中之鳥胺酸的含量與蛋白質生產批次之品質呈負相關，此可由該培養在補充了具有低於5.0 mg/L之鳥胺酸濃度的大豆水解產物之培養基中的CHO細胞所產生之蛋白質批次中關鍵N-聚醣之曲線下面積增加指明，而蛋白質生產批次之品質與瓜胺酸濃度無關。

【0120】如表2中所示及第3圖中所描繪者，當與培養在包含超過5.0 mg/L鳥胺酸、瓜胺酸或腐胺之培養基中的細胞相比較，由培養在包括具有濃度為2.0 mg/L或更少之鳥胺酸的大豆水解產物之培養基中的細胞所產生之VEGF-捕捉蛋白產品批次可產生較高品質之蛋白質產品。

表 2

| 大豆胺基酸濃度                      | A1 N-聚醣相對量<br>(% 曲線下面積) |
|------------------------------|-------------------------|
| 1.6 mg/L 鳥胺酸                 | 12.5                    |
| 6.6 mg/L 鳥胺酸                 | 9.8                     |
| 31.6 mg/L 鳥胺酸                | 9.3                     |
| 36.6 mg/L 腐胺                 | 9.0                     |
| 1.6 mg/L 鳥胺酸;<br>0 mg/L 瓜胺酸  | 12.0                    |
| 1.6 mg/L 鳥胺酸;<br>30 mg/L 瓜胺酸 | 11.5                    |
| 31.6 mg/L 鳥胺酸;<br>0 mg/L 瓜胺酸 | 8.8                     |

【0121】使用基於為人熟知之用於HPLC的方法之色層分析和螢光鄰胺基苯甲酸(AA)標籤(Anumula, and Dhume, Glycobiology (1998) 8(7) pp. 685-694)進行各批糖蛋白之詳細聚醣分析以測定鳥胺酸是否對蛋白質糖基化變化形廓有影響。如表3中所示，在包括含有少於或 $\leq 0.67$  mg鳥胺酸/克大豆之大豆水解產物的培養基中培養細胞可導致批次間較為一致之蛋白質生產。更具體地說，~90%之培養在包含選擇之大豆水解產物的培養基中的生產批次符合FDA生產標準。相反地，培養在包含具有超過5 mg/L鳥胺酸之大豆水解產物的培養基中之生產批次僅有57%符合FDA生產標準(特定N-聚醣波峰之曲線下面積)。如表3中所示，由培養在包括具有0.67 mg或更少之鳥胺酸/g大豆水解產物之鳥胺酸濃度的大豆水解產物之培養基中之細胞製造的VEGF-捕捉蛋白產品批次顯示其產品品質提高且批次之間品質較為一致。

表 3:

| mg 鳥胺酸/<br>g 大豆 | 聚醣量超過 10.5%<br>(品質參數) 批次 | 合適之蛋白質<br>產品批次 | 失敗之蛋白質<br>產品批次 |
|-----------------|--------------------------|----------------|----------------|
| ≤ 0.67          | 21                       | 19/21          | 2/21           |
| > 0.67          | 4                        | 4/7            | 3/7            |

【0122】亦將各生產批次與參考標準相比較(相關於聚醣變化形廓)，該參考標準代表示例性 VEGF-捕捉蛋白之治療上可接受之蛋白質批次。由培養在補充有大豆水解產物之培養基(導致鳥胺酸之最終濃度在 0.5 mg/L 至 2.0 mg/L 之間)中的細胞產生之蛋白質批次的代表性聚醣分析顯示於表 4 中。與該參考物相比較，每一產生之捕捉蛋白包含一致之具有在可接受之範圍內的峰值(分析之批次的 75%)之聚醣變化形廓。相反地，由培養在補充有包含超過 5.0 mg/L 鳥胺酸之大豆水解產物之培養基中的細胞產生之各批次無法符合 FDA 之接受標準。如表 4 中所示，如藉由落在低於產品可接受標準之 A1 N-聚醣水準所證明者，由培養在包含具有 0.5 mg/L 至 2.0 mg/L 或更低之鳥胺酸濃度的大豆水解產物之培養基中的細胞所產生之高品質蛋白質產品批次較培養在包含更多具有高於 5.0 mg/L 之鳥胺酸濃度的大豆水解產物之培養基中的細胞所產生者多。

表 4:

| 聚醣                              | A2  | A2F   | A1    | A1F   | NGA2F | NA2G1F | NA2  | NA2F | 鳥胺酸<br>(mg/L) |
|---------------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|--------|------|------|---------------|
| 產品批次可<br>接受之標準<br>(% 曲線下<br>面積) | 4-9 | 10-23 | 10-17 | 11-19 | 5-17  | 8-13   | 4-11 | 2-8  | _____         |
| 大豆水解產<br>物批次 # 1                | 6.4 | 15.2  | 12.5  | 14.1  | 9.9   | 9.6    | 6.7  | 4.4  | 1.8           |
| 大豆水解產<br>物批次 # 2                | 7.0 | 16.8  | 13.2  | 13.9  | 9.6   | 9.9    | 6.7  | 4.1  | 0.5           |
| 大豆水解產<br>物批次 # 3                | 7.0 | 18.5  | 11.9  | 13.5  | 9.5   | 10.2   | 5.9  | 4    | 1.5           |
| 大豆水解產<br>物批次 # 4                | 9.7 | 18.1  | 14.7  | 11.0  | 8.5   | 9.5    | 5.5  | 3.6  | 0.6           |
| 大豆水解產<br>物批次 # 5                | 6.0 | 16.6  | 9.8   | 13.5  | 11.6  | 9.9    | 5.8  | 4.3  | 13.6          |
| 大豆水解產<br>物批次 # 6                | 5.6 | 15.7  | 9.2   | 14.2  | 12.1  | 10.5   | 6.3  | 4.5  | 28.6          |

【0123】第4圖顯示如藉由A1 N-聚醣水準證實者，大豆水解產物中之鳥胺酸水準與糖蛋白(柔癌捕)品質之間呈強烈負相關。

實施例3：糖蛋白生產效價

【0124】測試16個大豆水解產物批次之影響CHO細胞產生利納西普的代謝組學之能力。測量約426個大豆水解產物分析物並與最終糖蛋白效價和乳酸鹽代謝進行比較。第5圖描繪大豆水解產物分析物與最大乳酸鹽和最終糖蛋白效價之間的相關性的加載圖。乳酸鹽和糖蛋白效價之測定證明大豆水解產物中之鳥胺酸的負相關性。

實施例4：使用加標研究(Spiking Study)確認標記

【0125】第6A和6B圖描繪在對照培養基和接受摻加

鳥胺酸或腐胺之餵料條件下的CHO細胞培養物以分別證明鳥胺酸和腐胺對細胞生長和糖基化之效果。表6B突顯波峰11處之效果(其為特別顯著的)。

【0126】在將本發明描述之實施態樣參考附圖後應當理解，本發明不限於該精確之實施態樣且本技藝之技術熟習人士可在不背離所附之申請專利範圍中所限定之本發明的範圍或精神下對該實施態樣做各種改變和修飾。

【序列表】

<110> 美商雷傑納榮製藥公司 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)  
<120> 供製備糖蛋白之細胞培養方法  
<140> TW  
<141> 2018-07-03  
<150> US 62/529,471  
<151> 2017-07-06  
<150> US 62/625,744  
<151> 2018-02-02  
<160> 2  
<170> PatentIn 3.5版  
<210> 1  
<211> 879  
<212> PRT  
<213> 人工  
<220>  
<223> 合成的  
<400> 1  
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  
888094-1 第1頁，共6頁(序列表)

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 130        |            |            |            |            | 135        |            |            |            |            | 140        |            |            |            |            |            |
| Gly<br>145 | Tyr        | Phe        | Pro        | Ser        | Ser<br>150 | Val        | Lys        | Pro        | Thr        | Ile<br>155 | Thr        | Trp        | Tyr        | Met        | Gly<br>160 |
| Cys        | Tyr        | Lys        | Ile        | Gln<br>165 | Asn        | Phe        | Asn        | Asn        | Val<br>170 | Ile        | Pro        | Glu        | Gly        | Met<br>175 | Asn        |
| Leu        | Ser        | Phe        | Leu<br>180 | Ile        | Ala        | Leu        | Ile        | Ser<br>185 | Asn        | Asn        | Gly        | Asn        | Tyr<br>190 | Thr        | Cys        |
| Val        | Val        | Thr<br>195 | Tyr        | Pro        | Glu        | Asn        | Gly<br>200 | Arg        | Thr        | Phe        | His        | Leu<br>205 | Thr        | Arg        | Thr        |
| Leu        | Thr<br>210 | Val        | Lys        | Val        | Val        | Gly<br>215 | Ser        | Pro        | Lys        | Asn        | Ala<br>220 | Val        | Pro        | Pro        | Val        |
| Ile<br>225 | His        | Ser        | Pro        | Asn        | Asp<br>230 | His        | Val        | Val        | Tyr        | Glu<br>235 | Lys        | Glu        | Pro        | Gly        | Glu<br>240 |
| Glu        | Leu        | Leu        | Ile        | Pro<br>245 | Cys        | Thr        | Val        | Tyr        | Phe<br>250 | Ser        | Phe        | Leu        | Met        | Asp<br>255 | Ser        |
| Arg        | Asn        | Glu        | Val<br>260 | Trp        | Trp        | Thr        | Ile        | Asp<br>265 | Gly        | Lys        | Lys        | Pro        | Asp<br>270 | Asp        | Ile        |
| Thr        | Ile        | Asp<br>275 | Val        | Thr        | Ile        | Asn        | Glu<br>280 | Ser        | Ile        | Ser        | His        | Ser<br>285 | Arg        | Thr        | Glu        |
| Asp        | Glu<br>290 | Thr        | Arg        | Thr        | Gln        | Ile<br>295 | Leu        | Ser        | Ile        | Lys        | Lys<br>300 | Val        | Thr        | Ser        | Glu        |
| Asp<br>305 | Leu        | Lys        | Arg        | Ser        | Tyr<br>310 | Val        | Cys        | His        | Ala        | Arg<br>315 | Ser        | Ala        | Lys        | Gly        | Glu<br>320 |
| Val        | Ala        | Lys        | Ala        | Ala<br>325 | Lys        | Val        | Lys        | Gln        | Lys<br>330 | Val        | Pro        | Ala        | Pro        | Arg<br>335 | Tyr        |
| Thr        | Val        | Glu        | Lys<br>340 | Cys        | Lys        | Glu        | Arg        | Glu<br>345 | Glu        | Lys        | Ile        | Ile        | Leu<br>350 | Val        | Ser        |
| Ser        | Ala        | Asn<br>355 | Glu        | Ile        | Asp        | Val        | Arg<br>360 | Pro        | Cys        | Pro        | Leu<br>365 | Asn        | Pro        | Asn        | Glu        |
| His        | Lys<br>370 | Gly        | Thr        | Ile        | Thr        | Trp<br>375 | Tyr        | Lys        | Asp        | Asp        | Ser<br>380 | Lys        | Thr        | Pro        | Val        |

Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp  
385 390 395 400

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

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 |     |
| 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

<220>  
<223> 合成的

<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  
  
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 |     |     |  |
| 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 |  |
| 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 |     |     |  |

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種用於選擇大豆水解產物以降低重組異源糖蛋白之產生批次間的差異之方法，其包含：

a. 在包含該大豆水解產物之不含動物蛋白質之細胞培養基中培養表現重組異源糖蛋白之細胞群以產生該重組異源糖蛋白；

b. 純化該重組異源糖蛋白；

c. 令該經純化之重組異源糖蛋白接受寡醣指紋分析；

d. 測定與該重組異源糖蛋白之N-聚醣物種之總量相比較的(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣之相對量；及

e. 選擇提供與該重組異源糖蛋白之N-聚醣物種之總量相比較至少10%(w/w)之(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣的該大豆水解產物。

【請求項2】如請求項1之方法，其中該選擇之大豆水解產物包含0.003%至0.027%(w/w)之鳥胺酸或腐胺。

【請求項3】如請求項1之方法，其中該細胞培養基包含0.5至6 mg/L之鳥胺酸或腐胺。

【請求項4】如請求項3之方法，其中該細胞培養基包含0.6至3 mg/L之鳥胺酸或腐胺。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之方法，其中該重組異源糖蛋白為捕捉分子。

【請求項6】如請求項5之方法，其中該捕捉分子係選

自由下列所組成之群組：依那西普(etanercept)、利納西普(rilonacept)及柔癌捕(aflibercept)。

【請求項7】如請求項1至4中任一項之方法，其中該重組異源糖蛋白包含每莫耳重組異源糖蛋白8至12莫耳之唾液酸或每莫耳重組異源糖蛋白35至65莫耳之唾液酸。

【請求項8】如請求項1至7中任一項之方法，其中該(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣之相對量係經由比較藉由毛細管電泳獲得之該(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣之波峰下面積與所有N-聚醣物種之波峰下總面積測定。

【請求項9】如請求項1至8中任一項之方法，其中該(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣之相對量為10%至17% (w/w)。

【請求項10】如請求項6之方法，其中該捕捉分子為利納西普，該利納西普具有每莫耳重組異源糖蛋白35至65莫耳之唾液酸。

【請求項11】如請求項10之方法，其中該利納西普在SEQ ID NO：1之殘基N37、N98、N418及N511的任一者或多者包含(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣。

【請求項12】如請求項6之方法，其中該捕捉分子為柔癌捕，該柔癌捕具有每莫耳重組異源糖蛋白8至12莫耳之唾液酸。

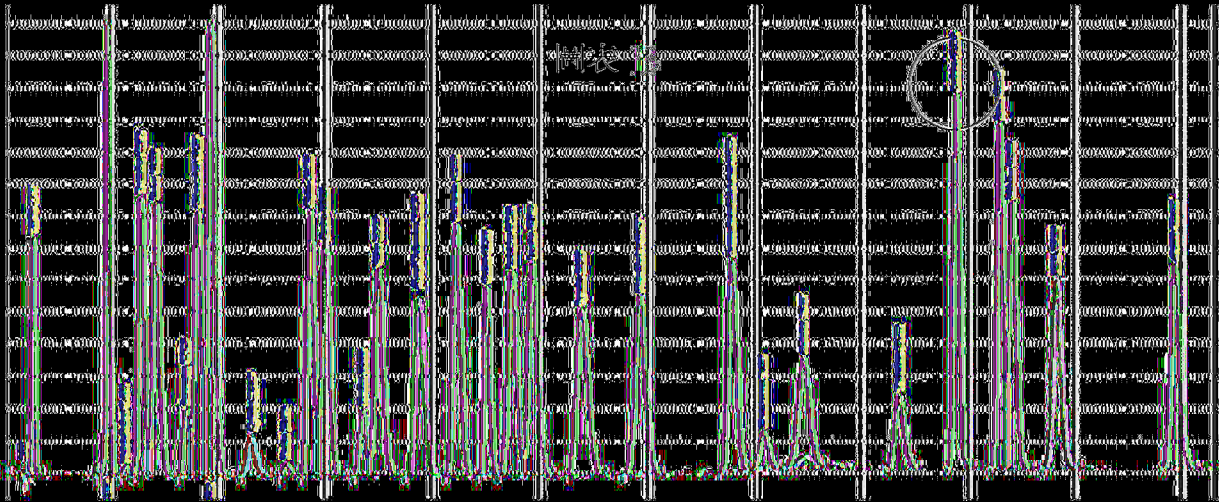
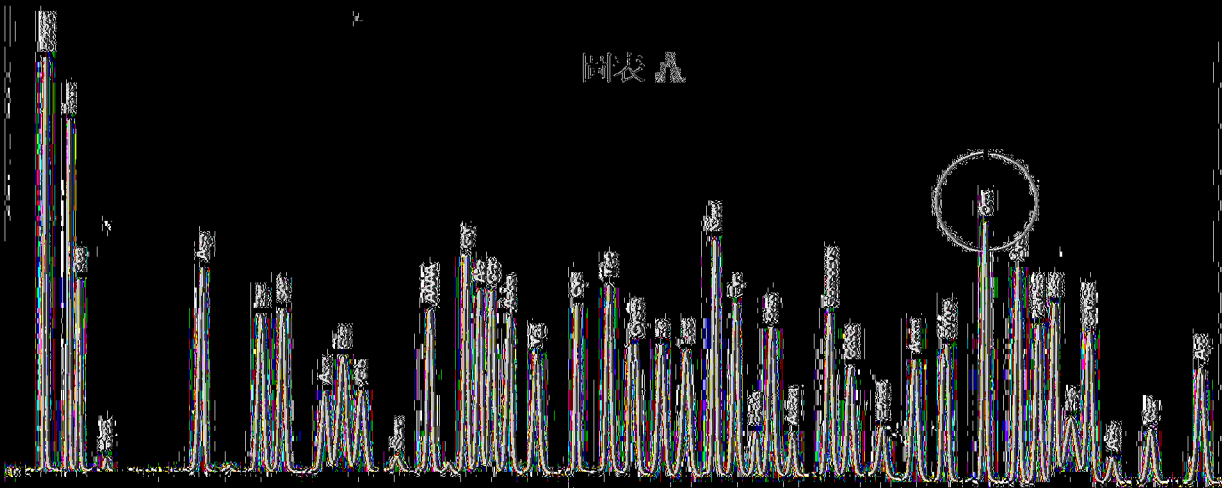
【請求項13】如請求項12之方法，其中該柔癌捕在SEQ ID NO：2之殘基N123和N196的任一者或多者包含

(SA)(Gal)2(GlcNAc)2(Man)3(GlcNAc)3 N-聚醣。

【請求項 14】如請求項 1 至 13 中任一項之方法，其中該細胞群包含 CHO 細胞。

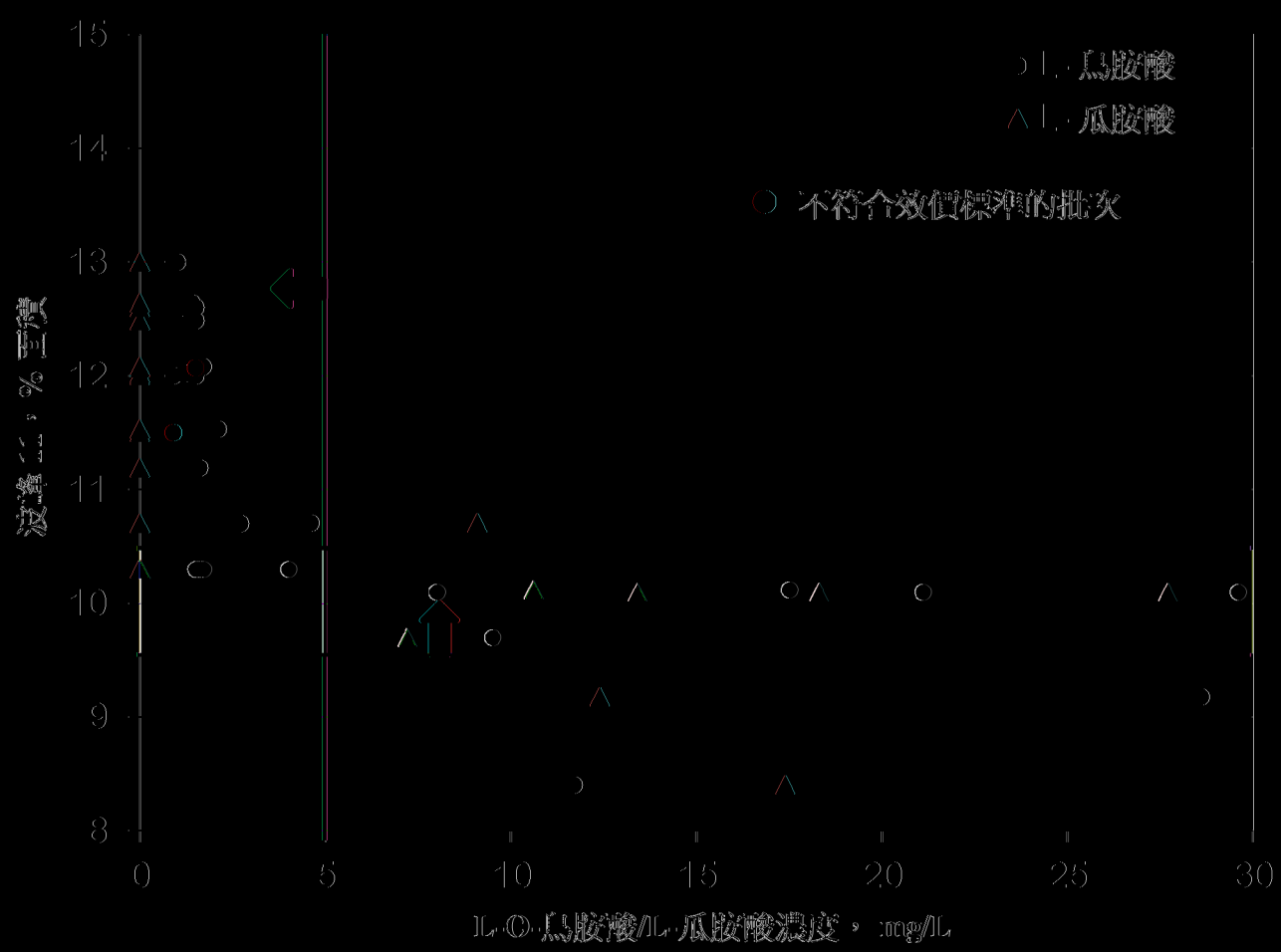
【請求項 15】如請求項 14 之方法，其中該 CHO 細胞包含 CHO-K1 細胞。

第 1 圖



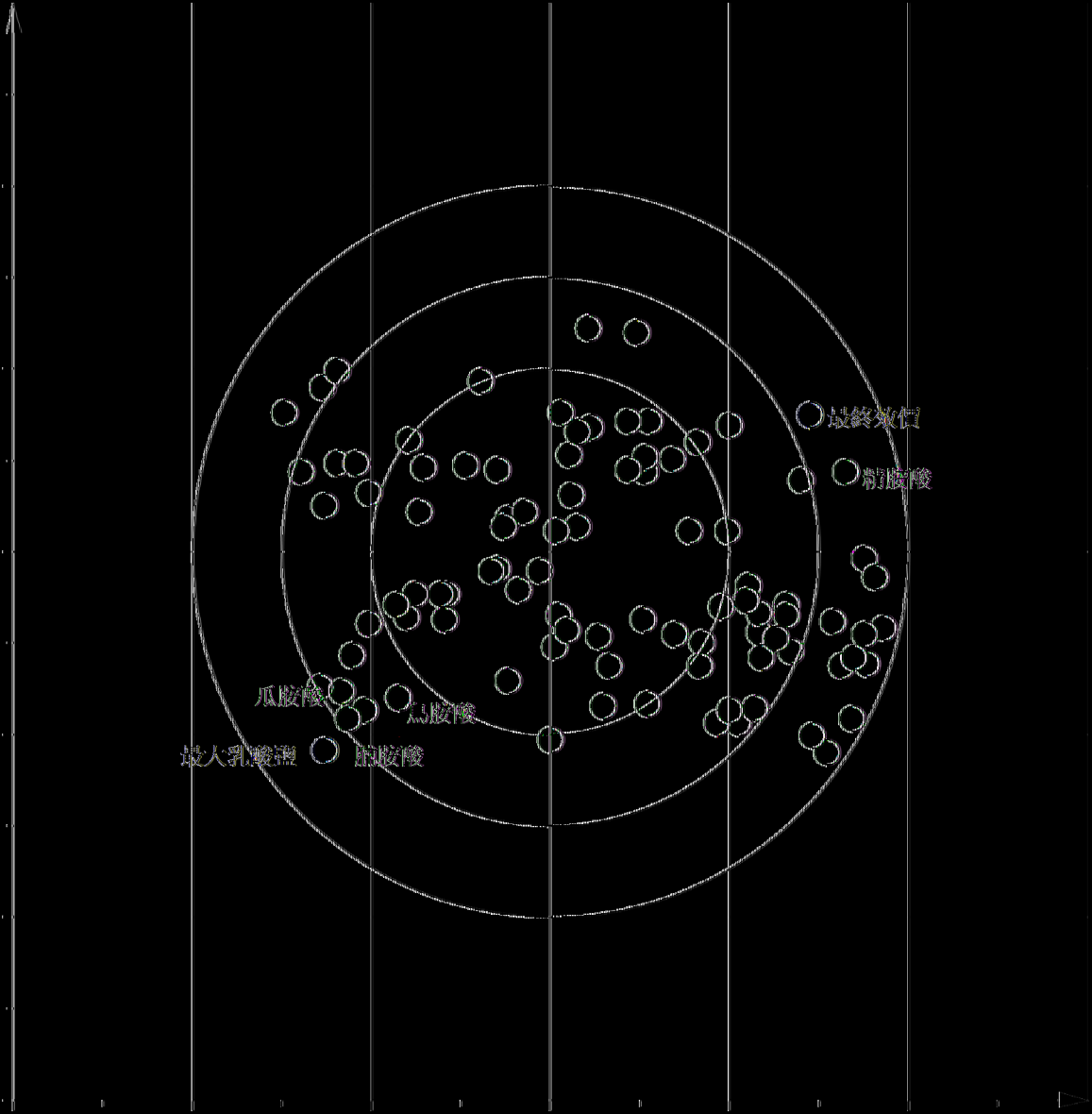


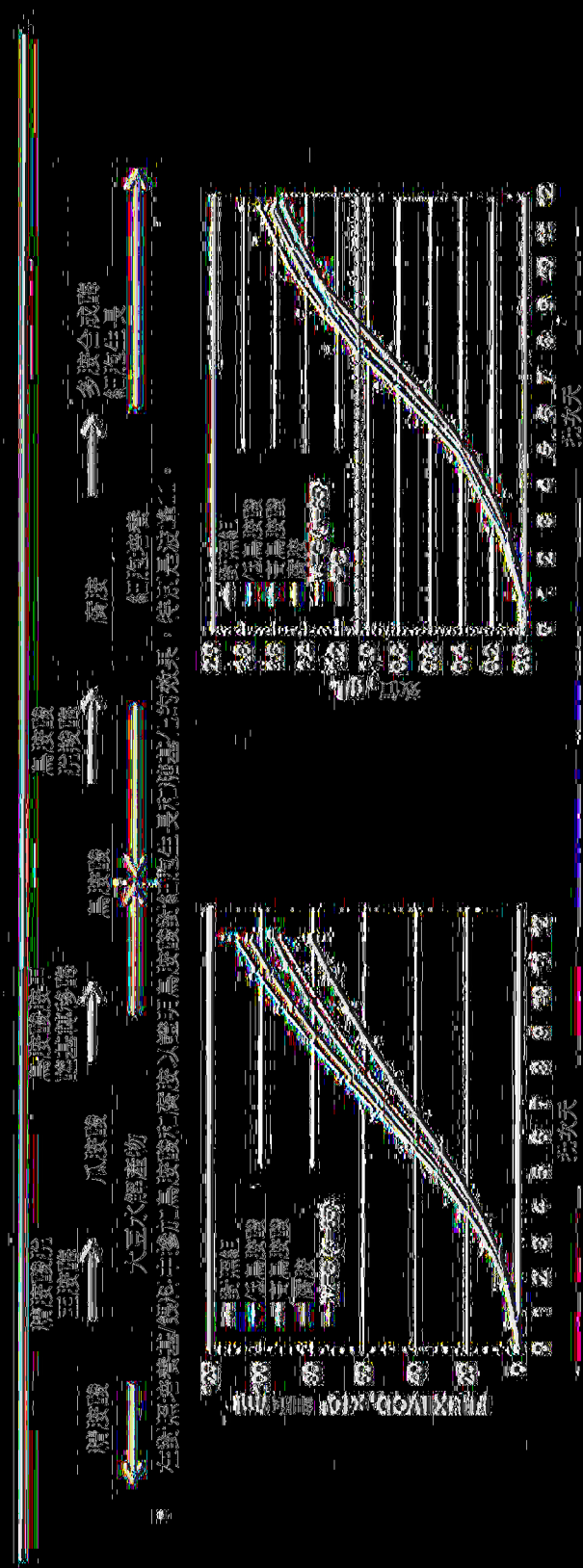
第 3 圖





第5圖



6A  
 1800  
 1800

第 63 頁

|                    |     |      |      |      |     |
|--------------------|-----|------|------|------|-----|
| 602526028          | 雙面鏡 | 雙面鏡  | 雙面鏡  | 雙面鏡  | 雙面鏡 |
| 濃度, mg/l           | 16  | 66   | 33.6 | 35.6 |     |
| 效率, %              | 162 | 153  | 153  | 156  |     |
| 100, 200 紅海, 天 / 天 | 809 | 1104 | 952  | 1043 |     |
| 效率, %              | 125 | 98   | 93   | 99   |     |