



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116209772 A

(43) 申请公布日 2023.06.02

(21) 申请号 202180063115.3

(22) 申请日 2021.08.27

(30) 优先权数据

63/072,740 2020.08.31 US

63/072,745 2020.08.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/047870 2021.08.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/047108 EN 2022.03.03

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 S·本努恩-色拉诺 S·M·劳伦斯

A·S·约翰逊

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 陈晓娜

(51) Int.Cl.

C12P 21/02 (2006.01)

权利要求书5页 说明书31页 附图45页

(54) 发明名称

用于提高细胞培养性能和减少天冬酰胺序列变体的天冬酰胺补料策略

(57) 摘要

提供了一种用于培养真核细胞以提高细胞培养性能的方法。所述方法总体上包括：在限定性细胞培养基中繁殖或维持真核细胞，其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约2.6mM至约43.2mM的天冬酰胺，并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约2.6mM至约21.6mM的天冬酰胺；以及将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中，持续所述早期补料分批细胞培养的至少一部分和所述后期补料分批细胞培养的至少一部分，其中与在所述早期和/或后期补料分批细胞培养中进行较低量的天冬酰胺补充的类似方法相比，通过所述天冬酰胺补充，所述细胞培养的性能得到改善。

1. 一种用于培养真核细胞以提高细胞培养性能的方法,所述方法包括:
在限定性细胞培养基中繁殖或维持真核细胞,
其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约43.2mM的天冬酰胺,并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约21.6mM的天冬酰胺;以及
将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中,持续所述早期补料分批细胞培养和所述后期补料分批细胞培养的至少一部分,
其中与在早期和/或后期补料分批细胞培养中进行较低量的天冬酰胺补充或没有天冬酰胺补充的类似方法相比,通过所述天冬酰胺补充,至少一个细胞培养性能参数得到改善。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中,天冬酰胺补充物作为散装补料的一部分或作为单独的天冬酰胺补充物补料提供。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中,天冬酰胺补充物连续提供或以团注形式提供。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约7.2mM至约21.6mM的天冬酰胺,并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约10.8mM的天冬酰胺。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括在所述补料分批细胞培养期间从所述真核细胞表达所关注重组蛋白。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述至少一个细胞培养性能参数选自以下组成的组:增加的细胞活力、增加的细胞生长速率、增加的细胞密度、增加的所述所关注重组蛋白的滴度、增加的所述所关注重组蛋白的产量、所述细胞培养的至少一部分中的必需氨基酸的耗竭减少、所述细胞培养的至少一部分中的至少一种细胞培养副产物的形成减少,以及至少一个蛋白质质量指标的改善。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一种细胞培养副产物选自铵离子和丙氨酸组成的组。
8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一个蛋白质质量指标是蛋白质序列变体减少。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中与在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞相比,所述所关注重组蛋白的所述滴度比所述滴度高至少3%、5%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或至少20%。
10. 根据权利要求6所述的方法,其中与其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充培养细胞的类似方法相比,所述所关注重组蛋白的产量增加至少0.1g/L、至少0.5g/L、至少1g/L、至少1.2g/L、至少1.4g/L、至少1.6g/L、至少1.8g/L、至少2g/L、至少2.2g/L、至少2.4g/L或至少2.5g/L。
11. 根据权利要求6所述的方法,其中在所述后期补料分批细胞培养的至少一部分期间,所述细胞培养维持至少约10-50M个细胞/ml的活细胞计数。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述细胞维持在天冬酰胺补充的细胞培养条件下,持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天,或者持续所述早期和/或后期补料分批细胞培养的持续时间。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中对于所述早期补料分批细胞培养的至少一部分,至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、每天或连续提供所述天冬酰胺补充物。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中对于所述后期补料分批细胞培养的至少一部分,至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、每天或连续提供所述天冬酰胺补充物。

15. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述天冬酰胺补充物连续提供持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天,或持续所述早期补料分批细胞培养的所述持续时间。

16. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述天冬酰胺补充物连续提供持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天,或持续所述后期补料分批细胞培养的所述持续时间。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述天冬酰胺补充物在所述补料分批细胞培养的第5天或之后开始连续提供,并且此后持续所述后期补料分批细胞培养的至少一部分。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中在所述细胞培养的补料分批的第10天或之后,停止所述连续的天冬酰胺补充物。

19. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中,所述天冬酰胺补充物连续提供。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述天冬酰胺补充物作为连续散装补料的一部分提供。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述天冬酰胺补充物作为单独连续天冬酰胺补充物补料的一部分提供。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中与在早期和/或后期补料分批细胞培养中以团注补料形式提供天冬酰胺补充的类似方法相比,在所述细胞培养中天冬酰胺、天冬氨酸和谷氨酸的细胞外氨基酸耗竭被延迟至少1天、至少2天、至少3天或至少4天或更长时间。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述真核细胞是CHO细胞。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述真核细胞是高天冬酰胺消耗细胞系,使得所述细胞消耗至少约1.8mM/天至约9.3mM/天的天冬酰胺。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述真核细胞是低天冬酰胺消耗细胞系,使得所述细胞消耗至少约0.32mM/天至约1.8mM/天的天冬酰胺。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述真核细胞是高产细胞系,使得所述所关注重组蛋白以至少4g/L、至少5g/L、至少6g/L、至少7g/L、至少8g/L、至少9g/L或至少10g/L、至少11g/L、至少12g/L、至少13g/L、至少14g/L的产量产生。

28. 根据权利要求5所述的方法,其中所述所关注重组蛋白是抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、抗原结合抗体片段、单链抗体、双抗体、三抗体或四抗体、Fab片段或F(ab')₂片段、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体或IgG4抗体。

29. 根据权利要求5所述的方法,其中所述所关注重组蛋白包括Fc结构域。

30. 根据权利要求5所述的方法,其中所述所关注重组蛋白选自由以下组成的组:Fc融

合蛋白、受体Fc融合蛋白 (TRAP)、抗体、抗体片段和ScFv-Fc融合蛋白。

31. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述所关注重组蛋白选自由以下组成的组: 抗PD1抗体、抗PDL-1抗体、抗D114抗体、抗ANG2抗体、抗AngPt13抗体、抗PDGFR抗体、抗Erb3抗体、抗PRLR抗体、抗TNF抗体、抗EGFR抗体、抗PCSK9抗体、抗GDF8抗体、抗GCGR抗体、抗VEGF抗体、抗IL1R抗体、抗IL4R抗体、抗IL6R抗体、抗IL1抗体、抗IL2抗体、抗IL3抗体、抗IL4抗体、抗IL5抗体、抗IL6抗体、抗IL7抗体、抗RSV抗体、抗NGF抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CD19抗体、抗CD28抗体、抗CD48抗体、抗CD3/抗CD20双特异性抗体、抗CD3/抗MUC16双特异性抗体以及抗CD3/抗PSMA双特异性抗体。

32. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述所关注重组蛋白选自由以下组成的组: 抗流感病毒抗体、抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗体、抗中东呼吸道综合征 (MERS) 病毒、抗埃博拉病毒抗体、抗寨卡病毒抗体、抗严重急性呼吸道综合征 (SARS) 抗体和抗COVID-19抗体。

33. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述所关注重组蛋白选自至少一种阿利库单抗 (alirocumab)、萨瑞鲁单抗 (sarilumab)、法西奴单抗 (fasinumab)、奈斯瓦单抗 (nesvacumab)、度匹鲁单抗 (dupilumab)、曲戈卢单抗 (trevogrumab)、依维那库单抗 (evinacumab)、利努苏单抗 (rinucumab)、卡西瑞单抗 (casirivimab) 或伊德单抗 (imdevimab)。

34. 一种用于在细胞培养中防止从哺乳动物细胞表达的所关注多肽中的天冬酰胺序列变体的方法, 所述方法包括:

在限定性细胞培养基中繁殖或维持哺乳动物细胞,

其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约43.2mM的天冬酰胺, 并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约21.6mM的天冬酰胺; 以及

在足以表达所述所关注多肽的条件下, 将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中, 持续所述早期补料分批细胞培养和所述后期补料分批细胞培养的至少一部分,

其中所述细胞培养基中的细胞外天冬酰胺水平至少在早期补料分批细胞培养期间维持在约0.1mM的耗竭极限以上, 使得由所述哺乳动物细胞表达的所述所关注多肽在所有单独序列变体基因座处包括少于0.30%的天冬酰胺序列变体。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中在所述细胞培养的第12天之后, 由所述哺乳动物细胞表达的所述所关注多肽在所有单独序列变体基因座处包括少于0.30%的天冬酰胺序列变体。

36. 根据权利要求34或35述的方法, 其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中, 天冬酰胺补充物作为散装补料的一部分或作为单独的天冬酰胺补充物补料提供。

37. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法, 其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中, 天冬酰胺补充物连续提供或以团注形式提供。

38. 根据权利要求34至37中任一项中任一项所述的方法, 其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约7.2mM至约21.6mM的天冬酰胺, 并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约10.8mM的天冬酰胺。

39. 根据权利要求34至38中任一项所述的方法, 其中将所述细胞维持在天冬酰胺补充的细胞培养条件下, 持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天, 或者持续所述早期和/或后

期补料分批细胞培养的持续时间。

40. 根据权利要求34至38中任一项所述的方法, 其中对于所述早期补料分批细胞培养的至少一部分, 至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、每天或连续提供所述天冬酰胺补充物。

41. 根据权利要求34至38中任一项所述的方法, 其中对于所述后期补料分批细胞培养的至少一部分, 至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、每天或连续提供所述天冬酰胺补充物。

42. 根据权利要求34至38中任一项所述的方法, 其中所述天冬酰胺补充物连续提供持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天, 或持续所述早期补料分批细胞培养的所述持续时间。

43. 根据权利要求34至38中任一项所述的方法, 其中所述天冬酰胺补充物连续提供持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天, 或持续所述后期补料分批细胞培养的所述持续时间。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其中所述天冬酰胺补充物在所述补料分批细胞培养的第5天或之后开始连续提供, 并且此后持续所述后期补料分批细胞培养的至少一部分。

45. 根据权利要求43所述的方法, 其中在所述细胞培养的补料分批的第10天或之后, 停止所述连续的天冬酰胺补充物。

46. 根据权利要求34至38中任一项所述的方法, 其中在早期和/或后期补料分批细胞培养中, 所述天冬酰胺补充物连续提供。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述天冬酰胺补充物作为连续散装补料的一部分提供。

48. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述天冬酰胺补充物作为单独连续天冬酰胺补充物补料的一部分提供。

49. 根据权利要求34至48中任一项所述的方法, 其中所述天冬酰胺序列变体是在所述所关注多肽的翻译期间误掺入的代替天冬酰胺的丝氨酸。

50. 一种用于在细胞培养中检测从哺乳动物细胞表达的所关注多肽中的天冬酰胺序列变体的方法, 所述方法包括:

在限定性细胞培养基中繁殖或维持哺乳动物细胞;

从所述真核细胞表达所关注重组蛋白;

测量所述细胞培养或所述限定性细胞培养基中的天冬酰胺或一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的细胞内和/或细胞外浓度; 以及

将测得的天冬酰胺或一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的浓度与所表达的所关注多肽中的天冬酰胺序列变体的存在相关联。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述测得的天冬酰胺或所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的浓度与天冬酰胺序列变体的存在呈负相关。

52. 根据权利要求50或51所述的方法, 其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约43.2mM的天冬酰胺, 并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约21.6mM的天冬酰胺; 并且将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中, 持续所述早期补料分批细胞培养和所述后期补料分批细胞培养的至少一

部分。

53. 根据权利要求50至52中任一项所述的方法,其中所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸选自天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)和其组合。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸是谷氨酸(Glu)。

55. 根据权利要求50至54中任一项所述的方法,其中所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸能够在后期补料分批细胞培养期间测量。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸能够在所述细胞培养的第5天之后、第6天之后、第7天之后、第8天之后、第9天之后或第10天之后测量。

57. 根据权利要求50至56中任一项所述的方法,其中所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸在细胞内测量。

58. 根据权利要求50至57中任一项所述的方法,其中所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸在细胞外测量。

59. 一种用于监测和控制一个或多个细胞培养参数的方法,所述方法包括:

使用凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学中的一种或多种原位测量细胞培养中的一个或多个细胞培养参数;

将测得的一个或多个细胞培养参数与所述细胞培养参数的预定设定点值进行比较,以确定所述一个或多个细胞培养参数是否在预定阈值范围内;以及

如果细胞培养参数被确定为在所述预定阈值范围之外,则调整所述细胞培养参数中的一个或多个细胞培养参数。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述一个或多个细胞培养参数选自由以下组成的组:细胞生长速率、细胞密度、细胞活力、天冬酰胺浓度、天冬酰胺相关氨基酸浓度、铵离子浓度和丙氨酸浓度。

61. 根据权利要求59所述的方法,其中所述一个或多个细胞培养参数选自天冬酰胺浓度和铵离子浓度。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中如果铵离子浓度被确定为在预定阈值范围之外,则调整天冬酰胺补料输入。

用于提高细胞培养性能和减少天冬酰胺序列变体的天冬酰胺补料策略

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年8月31日提交的美国临时申请第63/072,740号和于2020年8月31日提交的美国临时申请第63/072,745号的申请日期的权益,所述申请的内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于培养细胞以提高细胞培养性能的方法。本发明具体涉及用于使用天冬酰胺补充来培养细胞以提高细胞培养性能和减少天冬酰胺序列变体的方法,以及用于产生蛋白质生物药物的方法。

背景技术

[0004] 生物药剂,具体地蛋白质和多肽,通常被开发作为新的生物制药产品。产生高水平特定所关注蛋白质的工程化细胞对于这些生物制药产品的成功商业产生已经变得至关重要。细胞培养条件的控制和优化各不相同,并且对细胞培养中产生的治疗性蛋白的水平和质量有很大影响。

[0005] 通常在分批或补料分批过程中通过细胞培养来制造蛋白质。小瓶解冻之后接种物生长的早期阶段包含在种子培养物中培养细胞。通常,细胞以指数生长速率生长,如在种子培养生物反应器中,以便逐渐增加细胞群体的大小和/或体积。在细胞团通过若干生物反应器阶段按比例增加之后,在细胞仍处于指数生长(对数期)的同时,然后将细胞转移到补料分批产生生物反应器中(Gambhir,A等人,2003,《生物科学和生物工程杂志(JBioscience Bioeng)》95(4):317-327)。

[0006] 在转移至补料分批培养后,细胞被培养持续一定时间段,而培养基的组成被监测和控制以允许所关注蛋白质或多肽的产生。在达到特定的产量或细胞活力、废物积聚或营养耗竭确定培养应该终止后,分离产生的蛋白质或多肽。在过去的十年中,为了提高重组蛋白产量,已经取得了许多重要的进展,目前所述重组蛋白产量已经达到了每升几克的滴度。蛋白质制造工艺的进步,以及细胞系工程化和细胞培养基以及补料开发的进步,都有助于蛋白质产量的增加。例如,用于优化细胞培养基和补料的方案包含营养补充和化学限定性无血清培养基的设计,以支持连续的细胞生长和最佳的产物分泌。

[0007] 然而,本领域仍然需要用于培养细胞的培养基和方法,其中所述培养基允许健康和稳健的细胞生长和维持,以及重组蛋白的高滴度产生。

发明内容

[0008] 一方面,提供了一种用于培养真核细胞以提高细胞培养性能的方法。所述方法总体上包括:在限定性细胞培养基中繁殖或维持真核细胞,其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约43.2mM的天冬酰胺,并且在后期补料分

批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约21.6mM的天冬酰胺;以及将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中,持续所述早期补料分批细胞培养的至少一部分和所述后期补料分批细胞培养的至少一部分,其中与在早期和/或后期补料分批细胞培养中进行较低量的天冬酰胺补充或没有天冬酰胺补充的类似方法相比,通过所述天冬酰胺补充,至少一个细胞培养性能参数得到改善。

[0009] 在某些实施例中,天冬酰胺补充物可以在团注补料补充物(例如,在早期期间在一种团注补料补充物和在后期间在一次团注补料补充物)中,在所述细胞培养的至少一部分的过程中在多种团注补料补充物(例如,在早期期间在2、3、4或5种团注补料补充物,在后期间在2、3、4或5种团注补料补充物)中,或在所述细胞培养的至少一部分的过程中连续提供到细胞培养(早期和后期两者)。

[0010] 在某些实施例中,所述至少一个细胞培养性能参数选自由以下组成的组:增加的细胞活力、增加的细胞生长速率、增加的细胞密度、增加的所述所关注重组蛋白的滴度、增加的所述所关注重组蛋白的产量、所述细胞培养的至少一部分中的必需氨基酸的耗竭减少、所述细胞培养的至少一部分中的至少一种细胞培养副产物的形成减少,以及至少一个蛋白质质量指标的改善。在某些实施例中,所述至少一种细胞培养副产物选自由铵离子和丙氨酸组成的组。在某些实施例中,所述至少一个蛋白质质量指标是蛋白质序列变体减少。

[0011] 在某些实施例中,所述真核细胞可以是哺乳动物细胞、鸟类细胞、昆虫细胞或酵母细胞。在特定实施例中,所述真核细胞可以是CHO细胞。在其它实施例中,所述重组蛋白可以选自Fc融合蛋白、受体Fc融合蛋白(TRAP)、抗体、抗体片段或ScFv-Fc融合蛋白。

[0012] 在其它方面,提供了一种用于在细胞培养中防止从哺乳动物细胞表达的所关注多肽中的天冬酰胺序列变体的方法。在某些实施例中,所述方法可以包括:在限定性细胞培养基中繁殖或维持哺乳动物细胞,其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约43.2mM的天冬酰胺,并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约3.6mM至约21.6mM的天冬酰胺;以及在足以表达所述所关注多肽的条件下,将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中,持续所述早期补料分批细胞培养和所述后期补料分批细胞培养的至少一部分。在某些实施例中,所述细胞培养基中的细胞外天冬酰胺水平至少在早期补料分批细胞培养期间维持在约0.1mM的耗竭极限以上,使得由所述哺乳动物细胞表达的所述所关注多肽在所有单独序列变体基因座处包括少于0.30%的天冬酰胺序列变体。

[0013] 在其它方面,提供了一种用于在细胞培养中检测从真核细胞表达的所关注重组多肽中的天冬酰胺序列变体的方法。在某些实施例中,所述方法可以包括:在限定性细胞培养基中繁殖或维持真核细胞;从所述真核细胞表达所关注重组蛋白;测量所述限定性细胞培养基中的一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的细胞内和/或细胞外浓度;以及将测得的一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的浓度与所表达的所关注重组蛋白中存在的天冬酰胺序列变体的量相关联。所述测得的所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的浓度与天冬酰胺序列变体的量呈负相关。

[0014] 在又其它方面,提供了一种用于监测和控制细胞培养基条件的方法。所述方法总体上包括:使用利用凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学中的一种或多种原位测量细胞培养中的一个或多个细胞培养参数来测量细胞培养中的

一个或多个细胞培养参数;将测得的一个或多个细胞培养参数与所述细胞培养参数的预定设定点值进行比较,以确定所述一个或多个细胞培养参数是否在预定阈值范围内;以及如果细胞培养参数被确定为在所述预定阈值范围之外,则调整所述细胞培养参数中的一个或多个细胞培养参数。在某些实施例中,可以监测铵离子浓度,并且如果确定铵离子浓度在特定细胞培养物的预定阈值范围之外,可以调整天冬酰胺补充物补料,使得所述细胞培养产生较少的铵,同时仍然接收足够的天冬酰胺。

[0015] 虽然公开了多个实施例,但是根据以下详细描述,本公开的又其它实施例对于本领域技术人员而言将变得显而易见,所述详细描述示出并描述了本公开的说明性实施例。如将认识到的,本发明能够在各个方面进行修改,所有这些修改均不脱离本公开的精神和范围。因此,详细描述被认为本质上是说明性的而不是限制性的。

附图说明

[0016] 图1A展示了在使用标准补料策略进行补料分批细胞培养期间的细胞外必需氨基酸消耗,而图1B展示了在使用标准补料策略进行补料分批细胞培养期间的天冬酰胺消耗。

[0017] 图2A和2B展示了根据本公开的实施例的在使用各种补料策略进行补料分批细胞培养期间的细胞外氨基酸(图2A)和天冬酰胺(图2B)消耗。

[0018] 图3A展示了根据本公开的实施例的具有低量、中量和高量补充物的一系列早期补料分批天冬酰胺补充物。图3B展示了根据本公开的实施例的随着天冬酰胺补充物量的增加,细胞培养物生长的增加,而图3C展示了随着天冬酰胺补充物的增加,细胞培养物滴度的增加。

[0019] 图4A展示了根据本公开的实施例的后期补料中的低和高天冬酰胺补充物。图4C展示了根据本公开的实施例的整体细胞培养生产率没有受到负面影响,而图4B展示了副产物形成的增加。

[0020] 图5A-5D展示了根据本公开的实施例的改善的天冬酰胺补充补料策略。图5A展示了根据本公开的实施例的补料分批细胞培养中的细胞外必需氨基酸浓度,并且图5B展示了补料分批细胞培养中的细胞外天冬酰胺浓度。图5C展示了根据本公开的实施例的细胞培养物生长的增加;而图5D展示了细胞培养物滴度的增加。

[0021] 图5E-5G展示了根据本公开的实施例的在另一个示例性细胞系中天冬酰胺补充物后的细胞滴度(图5E)、活细胞计数(图5F)和细胞活力(图5G)。

[0022] 图6A展示了根据本公开的实施例的在早期补料分批细胞培养中天冬酰胺补充物后的天冬酰胺消耗,而图6B展示了在后期补料分批细胞培养中天冬酰胺补充物后的天冬酰胺消耗。

[0023] 图7展示了根据本公开的实施例的示例性高消耗细胞系在一系列天冬酰胺补料策略下的天冬酰胺消耗速率。

[0024] 图8展示了利用天冬氨酸和谷氨酸合成天冬酰胺的通路。

[0025] 图9A-9D展示了根据本公开的实施例的在示例性高消耗细胞系的后期补料分批细胞培养中天冬酰胺水平的影响,其中图9A-9B示出了细胞外天冬酰胺(图9A)和细胞外谷氨酸(图9B)浓度,并且图9C-9D示出了细胞内天冬酰胺(图9C)和细胞内谷氨酸(图9D)浓度。

[0026] 图10A-10D展示了根据本公开的实施例的在另一个示例性高消耗细胞系的后期补

料分批细胞培养中天冬酰胺水平的影响,其中图10A-10B示出了细胞外天冬酰胺(图10A)和细胞外谷氨酸(图10B)浓度,并且图10C-10D示出了细胞内天冬酰胺(图10C)和细胞内谷氨酸(图10D)浓度。

[0027] 图11A-11D展示了根据本公开的实施例的在示例性低消耗细胞系的后期补料分批细胞培养中天冬酰胺水平的影响,其中图11A-11B示出了细胞外天冬酰胺(图11A)和细胞外谷氨酸(图11B)浓度,并且图11C-11D示出了细胞内天冬酰胺(图11C)和细胞内谷氨酸(图11D)浓度。

[0028] 图12A-12F展示了根据本公开的实施例的在补料分批细胞培养中高(3倍早期,1.5倍后期)和非常高(6倍早期,3倍后期)天冬酰胺水平的影响,其中图12A示出了天冬酰胺浓度,图12B示出了天冬氨酸浓度,图12C示出了滴度,图12D示出了谷氨酸浓度,图12E示出了谷氨酰胺浓度,并且图12F示出了铵浓度。

[0029] 图13A-13D展示了根据本公开的实施例的团注和连续天冬酰胺补料的效果,其中图13A示出了活细胞计数,图13B示出了滴度,图13C示出了铵形成,并且图13D示出了丙氨酸形成。图13E-13G示出了,根据本公开的实施例,与具有相同总天冬酰胺补充物量的团注天冬酰胺补充物补料相比,连续的天冬酰胺补充物补料延迟了细胞外天冬酰胺(图13E)、天冬氨酸(图13F)和谷氨酸(图13G)耗竭。

[0030] 图14A-14D展示了根据本公开的实施例的团注和连续天冬酰胺补料的效果。图14A示出了天冬酰胺的消耗,而图14B-14C示出了天冬酰胺相关代谢物的消耗(天冬氨酸,图14B,以及谷氨酸,图14C)。图14D示出了细胞培养副产物铵的形成。

[0031] 图15A-15G展示了根据本公开的实施例的在示例性细胞系中的混合补料方法(连续天冬酰胺补充物补料与团注天冬酰胺补充物补料组合),其中图15A展示了细胞外天冬酰胺,图15B展示了细胞外天冬氨酸,图15C展示了细胞外谷氨酸,图15D展示了活细胞计数,图15E展示了滴度,图15F展示了铵形成,并且图15G展示了丙氨酸形成。

[0032] 图16A-16E展示了根据本公开的实施例的在另一个示例性细胞系中的混合补料方法(连续天冬酰胺补充物补料与团注天冬酰胺补充物补料组合),其中图16A展示了细胞外天冬酰胺,图16B展示了活细胞计数,图16C展示了滴度,图16D展示了铵形成,并且图16E展示了丙氨酸形成。

[0033] 图17A展示了根据本公开的实施例的在天冬酰胺补料策略后的补料分批细胞培养中天冬酰胺消耗,其中图17B示出了天冬酰胺序列变体形成的减少。

[0034] 图18A展示了根据本公开的实施例的在天冬酰胺补料策略后的补料分批细胞培养中天冬酰胺消耗。图18B示出了根据本公开的实施例的细胞内谷氨酸水平,并且图18C示出了天冬酰胺序列变体形成的减少。

[0035] 图19A-19G展示了根据本公开的实施例的示例性细胞系的天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸和天冬酰胺序列变体之间的相关性。图19B-19D展示了细胞外天冬酰胺(图19B)、天冬氨酸(图19C)和谷氨酸(图19D),而图19E-19G展示了示例性细胞内天冬酰胺(图19E)、天冬氨酸(图19F)和谷氨酸(图19G)。

[0036] 图20A-20D展示了根据本公开的实施例的另一个示例性细胞系(高消耗细胞系)的天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸和天冬酰胺序列变体之间的相关性。图20B-20D展示了细胞外天冬酰胺(图20B)、细胞内天冬氨酸(图20C)和细胞内谷氨酸(图20D)。

[0037] 图21A-21F展示了根据本公开的实施例的示例性细胞系的天冬酰胺序列变体趋势。图21A和21C展示了高天冬酰胺早期补料策略(图21A,如通过质谱法测定的序列变体量,图21C,细胞内谷氨酸的浓度)。图21B和21D展示了低天冬酰胺早期补料策略(图21B,如通过质谱法测定的序列变体量,图21D,细胞内谷氨酸的浓度)。图21E示出了一种示例性细胞系的细胞内谷氨酸水平,并且图21F示出了另一种示例性细胞系的细胞内谷氨酸谱。

[0038] 图22A-22H展示了示例性细胞系的天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸和天冬酰胺序列变体之间的相关性。图22A-22D展示了高和低天冬酰胺补料策略的示例性细胞系的细胞外天冬酰胺(图22A)、细胞外天冬氨酸(图22B)、细胞外谷氨酸(图22C)和细胞外谷氨酰胺(图22D)。图22E-22H展示了高和低天冬酰胺补料策略的另一种示例性细胞系的细胞外天冬酰胺(图22E)、细胞外天冬氨酸(图22F)、细胞外谷氨酸(图22G)和细胞外谷氨酰胺(图22H)。

[0039] 图23A-23C进一步展示了细胞外谷氨酰胺可以用作后期补料分批细胞培养中天冬酰胺序列变体的替代物。图23A示出了在示例性细胞系中通过高天冬酰胺补料策略进行的谷氨酰胺产生。类似地,图23B示出了在示例性细胞系中通过高天冬酰胺补料策略进行的谷氨酰胺产生。并且最后,图23C示出了,当在第6天和第8天没有补充天冬酰胺时,检测到天冬酰胺序列变体,并且细胞外谷氨酰胺低于耗竭极限(即,通过天冬酰胺补料策略产生的谷氨酰胺不足)。

具体实施方式

[0040] 根据本公开的各方面,已经意外地发现,相对于没有此类优化的天冬酰胺补料策略的细胞培养操作,用优化的天冬酰胺补料策略进行细胞培养操作可以改善细胞培养性能,包含改善细胞培养中细胞的细胞生长和蛋白质产生。

[0041] 通过非限制性实例的方式,细胞培养性能的改善可以通过评估细胞生长速率、细胞密度、细胞活力、蛋白质产生、细胞生长副产物的产生(例如,铵离子浓度、丙氨酸浓度等)以及其各种组合来确定。如本文所公开的,可以相对于没有优化的天冬酰胺补料策略的细胞培养操作来评估所述改善。

[0042] 天冬酰胺是一种非必需氨基酸,经常被培养中的细胞大量消耗,在细胞培养代谢中起着重要作用。在本公开的某些方面,研究了天冬酰胺在补料分批细胞培养的细胞培养性能中的作用,以及细胞内和细胞外天冬酰胺和相关代谢物的代谢研究。

[0043] 如图1A和1B中所展示的,发现细胞外必需氨基酸(图1A)被高度消耗,并且主要在补料分批细胞培养结束时耗竭,而细胞外天冬酰胺,一种非必需氨基酸(图1B),在按照标准团注天冬酰胺补料策略的补料分批细胞培养的时间线上耗竭。

[0044] 本公开的实施例涉及细胞培养方法,所述细胞培养方法利用天冬酰胺补充物来最小化、延迟和防止氨基酸耗竭,同时改善细胞培养性能。例如,参考图2A-2B,发现细胞外必需氨基酸耗竭可以通过必需氨基酸补充来防止(图2A),但是在补料分批细胞培养的产生期的生长期(早期)和稳定/衰退期(后期)期间,较高量的天冬酰胺补充不能防止示例性高产细胞系中的细胞外天冬酰胺耗竭,这表明天冬酰胺消耗速率超过化学计量需求(图2B)。因此,根据本公开的实施例,评估了在补料分批细胞培养的早期、生长期和后期、稳定/衰退期间和之后的天冬酰胺补充的影响,以选择平衡的天冬酰胺补料策略,如本文所描述。

[0045] 在此使用的小节标题仅是为了编排的目的并且不应该被解释为对所述主题进行

限制。除非另外说明,否则通常根据本领域已知的常规方法以及如在本说明书通篇引用和讨论的各个一般和更具体的参考文献中所描述的方法执行本文所描述的方法和技术。参见例如,Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第3版,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.) (2001)以及Ausubel等人,《分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版协会(Greene Publishing Associates) (1992)、Harlow和Lane《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(1990)以及Julio E.Celis,《细胞生物学:实验室手册(Cell Biology:A Laboratory Handbook)》,第2版,纽约州纽约的学术出版社(Academic Press,New York,N.Y.) (1998)以及Dieffenbach和Dveksler,《PCR引物(PCR Primer:ALaboratory Manual)》,纽约冷泉港的冷泉港实验室出版社(1995)。本公开中所提到的所有出版物都通过引用整体并入本文。

[0046] 定义

[0047] 除非另有定义,否则本文所使用的全部技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。尽管类似或等效于本文所描述的任何方法和材料的方法和材料可以用于实践本发明,但现在对特定方法和材料进行描述。

[0048] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在全文中可互换使用并且是指包括通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸残基的分子。肽、多肽和蛋白质还可以包含修饰,如糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、烷基化、羟基化和ADP-核糖基化。肽、多肽和蛋白质可以具有科学或商业意义,包含基于蛋白质的药物。肽、多肽和蛋白质尤其包含抗体和嵌合蛋白或融合蛋白。使用细胞培养方法通过重组动物细胞系产生肽、多肽和蛋白质。

[0049] 如本文所用,术语“异源多核苷酸序列”是指编码所关注蛋白质的核酸聚合物,如作为生物制药药物物质产生的嵌合蛋白(如trap分子)、抗体或抗体部分(例如,VH、VL、CDR3)。异源多核苷酸序列可以通过基因工程技术(例如,如编码嵌合蛋白的序列,或密码子优化的序列,无内含子序列等)产生,并且引入到细胞中,在所述细胞中,其可以作为附加体驻留或整合到细胞的基因组中。异源多核苷酸序列可以是被引入到生产细胞基因组内的异位位点中的天然存在的序列。异源多肽序列可以是来自另一种生物的天然存在的序列,如编码人类直系同源物的序列。

[0050] “抗体”是指由四条多肽链,即通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链组成的免疫球蛋白分子。每条重链具有重链可变区(HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区含有三个结构域CH1、CH2和CH3。每个轻链均具有轻链可变区和轻链恒定区。轻链恒定区由一个结构域(CL)组成。VH区和VL区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,所述超变区散布有更保守的被称作框架区(FR)的区。每个VH和VL由按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。术语“抗体”包含提及任何同种型或亚类的糖基化和非糖基化免疫球蛋白。术语“抗体”包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的抗体分子,如从经转染以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体。术语抗体还包含双特异性抗体,所述双特异性抗体包含可以结合到多于一个不同表位的异四聚体免疫球蛋白。双特异性抗体在美国专利申请公开第2010/0331527号中进行了总体描述,所述美国专利申请公开通过引用并入此申请中。

[0051] 术语抗体的“抗原结合部分”(或“抗体片段”)是指保留特异性结合抗原的能力的抗体的一个或多个片段。涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包含(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包括在铰链区处由二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,(1989)《自然(Nature)》241:544-546);(vi) 分离的CDR;以及(vii) 由Fv片段的两个结构域VL和VH组成的scFv,所述两个结构域通过合成接头连接以形成单个蛋白质链,其中所述VL区和VH区配对以形成单价分子。其它形式的单链抗体,如双抗体也涵盖在术语“抗体”下(参见例如,Holliger等人(1993)《美国国家科学院院刊(PNAS USA)》90:6444-6448;Poljak等人(1994)《结构(Structure)》2:1121-1123)。

[0052] 仍进一步地,抗体或其抗原结合部分可以是较大免疫粘附分子的一部分,其通过抗体或抗体部分与一种或多种其它蛋白质或肽的共价或非共价结合形成。此类免疫粘附分子的实例包含使用链霉亲和素核心区来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov等人(1995)《人抗体和杂交瘤(Human Antibodies and Hybridomas)》6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标志肽和C端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov等人(1994)《分子免疫学(Mol.Immunol.)》31:1047-1058)。抗体部分如Fab和F(ab')₂片段可以使用常规技术从完整抗体制备,如通过木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体。此外,抗体、抗体部分和免疫粘附分子可以使用本领域公知的标准重组DNA技术获得(参见Sambrook等人,1989)。

[0053] 术语“人抗体”旨在包含具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包含并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变),例如在CDR区中,特别是在CDR3区中。然而,如本文所用,术语“人抗体”并非旨在包含以下抗体,在这些抗体中源自另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植于人类构架区序列上。

[0054] 如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包含通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体、从重组的组合人抗体库中分离的抗体、从人免疫球蛋白基因转基因动物(例如,小鼠)中分离的抗体(参见例如,Taylor等人,(1992)《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》20:6287-6295),或通过任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体,所述方式涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列上。此类重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,此类重组人抗体经历体外诱变(或者,当使用针对人Ig序列而转基因的动物时,经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是尽管衍生自人种系VH和VL序列并与所述人种系VH和VL序列相关但可能并非天然存在于体内的人抗体种系库内的序列。

[0055] “Fc融合蛋白”包括两种或更多种蛋白质的部分或全部,其中一种是免疫球蛋白分子的Fc部分,所述两种或更多种蛋白质的部分或全部在自然界中不会一起发现。以下中已经描述了包括与源自抗体的多肽的不同部分(包含Fc结构域)融合的某些异源多肽的融合蛋白的制备:例如,Ashkenazi等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci USA)》88:10535,1991;Byrn等人,《自然》344:677,1990;以及Hollenbaugh等人,“免疫球蛋白融合蛋白的构建(Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins)”,《当代免疫学实验指南

(Current Protocols in Immunology)》,增刊4,第10.19.1-10.19.11页,1992。“受体Fc融合蛋白”包括与Fc部分偶联的受体的一个或多个细胞外结构域,在一些实施例中,所述Fc部分包括免疫球蛋白的铰链区和随后的CH2和CH3结构域。在一些实施例中,Fc融合蛋白含有与一种或多种配体结合的两条或更多条不同的受体链。例如,Fc融合蛋白是trap,如例如IL-1trap(例如,利纳西普(rilonacept),其含有与融合到hIgG1的Fc的IL-1R1细胞外区融合的IL-1RAcP配体结合区;参见美国专利第6,927,004号,或VEGF trap(例如,阿柏西普(aflibercept),其含有与融合到hIgG1的Fc的VEGF受体Flk1的Ig结构域3融合的VEGF受体Flt1的Ig结构域2;参见美国专利第7,087,411号和第7,279,159号)。

[0056] 天冬酰胺补充

[0057] 在本公开的某些方面,发现用天冬酰胺补充补料分批细胞培养会影响细胞培养性能。然而,还发现不管天冬酰胺补充的量如何,在补料分批细胞培养期间天冬酰胺的耗竭是不可避免的。在这方面,不受限制地,在本公开的某些方面,意外地发现,虽然在补料-浴细胞培养期间的天冬酰胺耗竭可能对细胞培养性能有负面影响,但是以过高水平补料的天冬酰胺也可能对细胞培养性能有负面影响,例如以副产物形成如铵的形式。

[0058] 在某些实施例中,提供了一种用于培养真核细胞以提高细胞培养性能的方法。所述方法总体上包括:在限定性细胞培养基中繁殖或维持真核细胞,其中所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约2.6mM至约28.6mM的天冬酰胺,并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约2.6mM至约21.6mM的天冬酰胺;以及将所述细胞维持在所述天冬酰胺补充的细胞培养基中,持续所述早期补料分批细胞培养的至少一部分和所述后期补料分批细胞培养的至少一部分,其中与在所述早期和/或后期补料分批细胞培养中进行较低量的天冬酰胺补充的类似方法相比,通过所述天冬酰胺补充,所述细胞培养的性能得到改善。

[0059] 如本文将进一步详细描述,天冬酰胺补充物可以在团注补料补充物(例如,在早期期间在一种团注补料补充物和在后期间在一次团注补料补充物)中,在所述细胞培养的至少一部分的过程中在多种团注补料补充物(例如,在早期期间在2、3、4或5种团注补料补充物,在后期间在2、3、4或5种团注补料补充物)中,或在所述细胞培养的至少一部分的过程中连续提供到细胞培养(早期和后两者)。

[0060] 在某些实施例中,天冬酰胺补充物可以作为散装补料的一部分或作为所述散装补料的单独补充物补料提供。更具体地,可以以团注或连续补料的形式向细胞培养(早期和后两者)提供补充物,作为散装补料的一部分或作为散装补料的单独补充物补料。

[0061] 在某些实施例中,与在早期和/或后期补料分批细胞培养中进行较低量的天冬酰胺补充的类似方法相比,细胞培养密度和/或滴度增加。在某些方面,在天冬酰胺补充后的后期补料分批细胞培养的至少一部分期间,细胞培养可以维持至少约10-50M细胞/ml,例如约10-35M细胞/ml的活细胞计数。

[0062] 在某些实施例中,所述真核细胞是高天冬酰胺消耗细胞系,使得所述细胞消耗至少约1.8mM/天至约9.3mM/天的天冬酰胺。在其它实施例中,所述真核细胞是低天冬酰胺消耗细胞系,使得所述细胞消耗至少约0.32mM/天至约1.8mM/天的天冬酰胺。

[0063] 在某些实施例中,所述方法进一步包括在所述补料分批细胞培养期间从所述真核细胞表达所关注重组蛋白。与在非天冬酰胺补充的培养中培养的细胞相比,所述所关注重

组蛋白的所述滴度比所述滴度高至少3%、5%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或至少20%。与其中在非天冬酰胺补充的培养中培养细胞的类似方法相比,所述所关注重组蛋白的产量可以增加至少0.1g/L、至少0.5g/L、至少1g/L、至少1.2g/L、至少1.4g/L、至少1.6g/L、至少1.8g/L、至少2g/L、至少2.2g/L、至少2.4g/L或至少2.5g/L。在某些实施例中,所述真核细胞是高产细胞系,使得所述所关注重组蛋白以至少4g/L、至少5g/L、至少6g/L、至少7g/L、至少8g/L、至少9g/L或至少10g/L、至少11g/L、至少12g/L、至少13g/L、至少14g/L的产量产生。

[0064] 在某些实施例中,所述限定性细胞培养基在早期补料分批细胞培养期间补充有量为约2.6mM至约28.6mM、约3.0mM至约25.0mM、约5.0mM至约23.0mM、约6.0mM至约22.0mM、约7.2mM至约21.6mM、约10.6mM等的天冬酰胺,并且在后期补料分批细胞培养期间补充有量为约2.6mM至约21.6mM、约2.6mM至约20.0mM、约2.6mM至约18.0mM、约2.6mM至约16.0mM、约2.6mM至约14.4mM、约5.3mM等的天冬酰胺。在其它实施例中,所述限定性细胞培养基在早期补料分批期间补充有量为约7.2mM至约21.6mM的天冬酰胺,并且在后期补料分批期间补充有量为约2.6mM至约14.4mM的天冬酰胺。在其它实施例中,所述限定性细胞培养基在早期补料分批期间补充有量为约10.6mM的天冬酰胺,并且在后期补料分批期间补充有量为约5.3mM的天冬酰胺。

[0065] 在某些实施例中,可以将所述细胞维持在天冬酰胺补充的细胞培养条件下,持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天,或者持续所述补料分批细胞培养的持续时间。对于所述早期补料分批细胞培养的至少一部分,可以至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、每天或连续提供天冬酰胺补充物。同样地,对于所述后期补料分批细胞培养的至少一部分,可以至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、每天或连续提供天冬酰胺补充物。

[0066] 在某些实施例中,可以在体积为至少500升、至少750升、至少1,000升、至少1,500升、至少2,000升、至少2,500升、至少5,000升、至少7,500升、至少10,000升、至少12,500升、至少15,000升、至少20,000升、至少25,000升、介于500升与25,000升之间等的细胞培养物中,在天冬酰胺补充的细胞培养条件下维持所述细胞。

[0067] 在某些实施例中,可以在早期和/或后期补料分批细胞培养中连续提供天冬酰胺补充物。在某些方面,与在早期和/或后期补料分批细胞培养中以团注补料形式提供天冬酰胺补充的类似方法相比,在细胞培养中连续的天冬酰胺补充使得天冬酰胺、天冬氨酸和谷氨酸的细胞外氨基酸耗竭延迟至少1天、至少2天、至少3天或至少4天或更长时间。

[0068] 更具体地,在某些实施例中,如本文所描述,天冬酰胺补充物可以连续提供持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天,或持续早期补料分批细胞培养的持续时间。在某些实施例中,天冬酰胺补充物可以连续提供持续至少2天、至少3天、至少4天、至少5天,或者持续所述后期补料分批细胞培养的持续时间。

[0069] 不限于此,在某些实施例中,天冬酰胺补充物可以在补料分批细胞培养的第2天或之后开始连续提供,并且此后持续早期补料分批细胞培养的至少一部分,或补料分批细胞培养的第5天或之后开始连续提供,并且此后持续后期补料分批细胞培养的至少一部分。此类后期补料分批连续天冬酰胺补充物可以在后期补料分批细胞培养的第10天或之后停止。

[0070] 进行天冬酰胺补充以减少天冬酰胺序列变体

[0071] 在其它方面,已经发现,在补料分批细胞培养期间天冬酰胺(Asn)的耗竭会导致在细胞培养中从哺乳动物细胞表达的所关注多肽中出现天冬酰胺序列变体(SV)。作为背景,如美国专利第9,096,879号(其通过引用并入本文)所公开的,已知在哺乳动物细胞中重组表达所关注多肽期间,特定氨基酸的耗竭会引发氨基酸的错误掺入。例如,在哺乳动物细胞中重组表达所关注多肽期间,特定氨基酸的耗竭可能导致所述氨基酸在哺乳动物细胞中翻译所关注多肽期间被第二氨基酸取代。观察到Asn→Ser天冬酰胺序列变体(即,在翻译所关注多肽期间错掺入的代替天冬酰胺的丝氨酸),但可以通过使细胞培养基补充有天冬酰胺来使所述变体最小化。

[0072] 在这方面,发现用天冬酰胺补充补料分批细胞培养可以最小化天冬酰胺SV的形成。根据本公开的实施例,出乎意料地发现,通过在至少早期补料分批细胞培养期间将细胞培养基中的细胞外天冬酰胺水平维持在约1.0mM、约0.5mM、约0.25mM、约0.2mM、约0.1mM等的耗竭极限以上,可以使天冬酰胺SV最小化。在某些实施例中,在早期补料分批细胞培养的至少前6天、早期补料分批细胞培养的至少前5天,早期补料分批细胞培养的至少前4天、早期补料分批细胞培养的至少前3天、早期补料分批细胞培养的至少前2天等期间,细胞培养基中的细胞外天冬酰胺水平可以维持在此类耗竭极限以上。通过实例的方式,维持在此类耗竭极限以上的持续时间可以包含在早期补料分批细胞培养期间至少一次、至少两次、至少三次、每天、连续地等提供天冬酰胺补充物。

[0073] 根据本公开的某些实施例,向补料分批细胞培养中补充天冬酰胺可以减少,即,防止天冬酰胺SV的含量小于所关注多肽中的约0.50%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.45%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.40%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.35%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.30%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.25%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.20%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.15%天冬酰胺SV、含量小于所关注多肽中的约0.10%天冬酰胺SV、没有检测到天冬酰胺SV的量等。

[0074] 在某些实施例中,在后期补料分批细胞培养期间在例如细胞培养的第4天、细胞培养的第5天、细胞培养的第6天、细胞培养的第7天、细胞培养的第8天、细胞培养的第9天、细胞培养的第10天、细胞培养的第11天、细胞培养的第12天、细胞培养的第13天、细胞培养的第14天等之后,用天冬酰胺补充补料分批细胞培养可以将天冬酰胺SV形成减少到此类水平。

[0075] 在某些实施例中,在早期补料分批细胞培养期间,细胞培养可以补充有如本文总体上描述的例如量为约2.6mM至约28.6mM,例如约7.2mM至约21.6mM、约10.6mM等的天冬酰胺,并且在后期补料分批细胞培养期间,补充有量为约2.6mM至约21.6mM,例如约2.6mM至约14.4mM、约5.3mM等的天冬酰胺。在某些实施例中,天冬酰胺补充物可以作为散装补料的一部分或作为单独天冬酰胺补充物补料提供。

[0076] 在某些方面,意外地发现,如果在早期补料分批细胞培养期间提供足够的天冬酰胺补充,以在补料分批细胞培养的至少第4天(例如,在某些实施例中,第二次团注补料)防止天冬酰胺耗竭,则可以减轻天冬酰胺SV形成。在某些实施例中,在早期补料分批细胞培养中进行补充,随后在其后和在后期补料分批细胞培养期间进行足够的天冬酰胺补充,以防止天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)耗竭(或产生足够的谷氨酰胺(Gln),即>100mg/L),同时平

衡过量铵的形成,提供了天冬酰胺SV的优化减少。

[0077] 在某些实施例中,意外地发现在早期补料分批细胞培养期间提供足够的天冬酰胺补充以将水平维持在耗竭极限以上(例如,通过补料分批细胞培养的至少第4天),并且其后在后期补料分批细胞培养期间提供足够的天冬酰胺补充,以使不期望的副产物(例如,铵)形成最小化。通过非限制性实例的方式,在早期和后期补料分批细胞培养期间进行天冬酰胺补充可以符合以下标准中的任何标准,以提供天冬酰胺SV的低风险。

[0078] 非限制性示例性早期补料分批条件

[0079]	氨基酸	0.1 mM 耗竭极限	最小值补料准则 (mg/L) 第 4 天/第二补料
	L-天冬酰胺.H ₂ O	15 mg/L	100 mg/L

[0080] 非限制性示例性后期补料分批条件

[0081]	氨基酸	0.1 mM 耗竭极限	最小值补料准则 (mg/L) 第 8 天-补料分批结束
	L-谷氨酸	15 mg/L	100 mg/L
	L-天冬氨酸	13 mg/L	100 mg/L
	L-天冬酰胺.H ₂ O	15 mg/L	15 mg/L
	L-谷氨酰胺	15 mg/L	100 mg/L

[0082] 天冬酰胺相关氨基酸

[0083] 在本公开的其它方面,已经发现靶向天冬酰胺耗竭可能影响通过细胞代谢通路与天冬酰胺相关的非必需氨基酸。作为背景,天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln)可以通过细胞代谢通路相互转化。如果需要天冬酰胺,细胞可以增加对天冬氨酸和谷氨酸的利用来合成补充的天冬酰胺。较高的细胞内/细胞外天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺浓度可以表明细胞具有足够的细胞内天冬酰胺来支持细胞需求。然而,天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺浓度的下降可以表明天冬酰胺限制。

[0084] 作为天冬酰胺序列变体(SV)的替代标志物的天冬酰胺相关氨基酸

[0085] 在其它方面,已经发现天冬酰胺相关氨基酸,包含天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln)可以用作在所关注多肽产生期间形成的天冬酰胺序列变体的替代标志物。根据本公开的某些实施例,已经发现天冬酰胺相关氨基酸的细胞内浓度和细胞外浓度可以用作天冬酰胺序列变体形成的定性指标。

[0086] 不受理论的限制,较高水平的细胞内和/或细胞外天冬酰胺相关氨基酸浓度通常表明细胞具有足够的细胞内天冬酰胺来支持细胞需求。此类足够的细胞内天冬酰胺将导致所产生的所关注多肽中的天冬酰胺序列变体最少。相反,较低水平的细胞内和/或细胞外天冬酰胺相关氨基酸浓度通常表明细胞内天冬酰胺不足以支持细胞需求。此类不足的细胞内天冬酰胺将导致所产生的所关注多肽中的天冬酰胺序列变体增加。因此,基于一般反向相关性,天冬酰胺相关氨基酸可以用作天冬酰胺序列变体的替代标志物。这些替代物的相关性强度取决于靶向天冬酰胺补充对相关氨基酸的细胞外和细胞内氨基酸谱的影响,这进而可以部分地由细胞系和天冬酰胺浓度决定。

[0087] 在某些实施例中,细胞内和细胞外天冬酰胺和天冬酰胺相关的氨基酸浓度可以用作天冬酰胺序列变体的替代标志物。不受限制,已经意外地发现,通过在早期补料分批细胞

培养中补充足够的天冬酰胺,可以具体地最小化天冬酰胺SV,并且可以使用细胞内和细胞外天冬酰胺以及天冬酰胺相关的氨基酸浓度来监测天冬酰胺SV的形成。通过实例的方式,可以通过监测天冬酰胺或天冬酰胺相关氨基酸的细胞内或细胞外浓度来原位监测天冬酰胺SV的形成。在某些实施例中,可以在早期补料分批细胞培养中监测细胞外天冬酰胺(Asn)作为天冬酰胺SV的替代物,而可以在后期补料分批细胞培养中监测细胞外天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)和谷氨酰胺(Gln)。在替代性实施例中,细胞内Asn、Asp、Glu和Gln可以在后期补料分批细胞培养中监测。

[0088] 在某些实施例中,提供了用于检测、测量或筛选所关注多肽中的天冬酰胺序列变体的方法。所述方法总体上包括:在限定性细胞培养基中繁殖或维持真核细胞;从所述真核细胞表达所关注重组蛋白;测量所述限定性细胞培养基中的天冬酰胺或一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的细胞内和/或细胞外浓度;以及将测得的天冬酰胺或一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的浓度与所表达的所关注重组蛋白中存在的天冬酰胺序列变体的存在相关联。在一些实施例中,所述测得的天冬酰胺或所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸的浓度与天冬酰胺序列变体的存在呈负相关。

[0089] 在某些实施例中,如本文所描述,限定性细胞培养基可以补充有天冬酰胺。在某些实施例中,天冬酰胺相关氨基酸可以选自天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)以及其组合。在一些实施例中,天冬酰胺相关氨基酸是谷氨酸。在一些实施例中,天冬酰胺相关氨基酸可以在细胞内测量。

[0090] 在一些实施例中,所述一种或多种天冬酰胺相关氨基酸可以在后期补料分批细胞培养期间测量,例如在补料分批细胞培养的第5天之后、第6天之后、第7天之后、第8天之后、第9天之后、第10天之后等测量。

[0091] 在某些方面,用于使用天冬酰胺相关氨基酸作为替代标志物来检测、测量或筛选天冬酰胺序列变体的方法可以提供高通量筛选和优化技术,用于鉴定所关注特定多肽的最佳细胞培养参数。例如,所述方法可以用于靶向最佳天冬酰胺补料水平,使所关注特定多肽的天冬酰胺序列变体最小化。

[0092] 天冬酰胺补充、原位监测和控制的优化

[0093] 在某些实施例中,提供了用于监测和控制细胞培养参数的方法,所述方法包含天冬酰胺补充。此类方法可以监测和控制各种细胞培养过程参数,从而为所关注细胞系和/或所关注多肽提供最佳的天冬酰胺补充。可以被监测和控制的示例性细胞培养过程参数包含但不限于天冬酰胺浓度、天冬酰胺相关氨基酸浓度、活细胞计数、死细胞计数、蛋白质滴度、铵离子、丙氨酸、摩尔渗透压浓度以及其组合。

[0094] 在某些方面,本公开的监测和控制方法可以用于优化和防止细胞培养基中的天冬酰胺耗竭,同时控制细胞培养副产物如铵离子和丙氨酸的形成。因此,此类监测和控制可以提供对细胞培养性能参数(例如,活细胞计数和蛋白质滴度)的改善控制。

[0095] 在某些实施例中,提供了一种用于监测和控制细胞培养基条件的方法。所述方法总体上可以包括:使用凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学原位测量细胞培养中的一个或多个细胞培养参数;将测得的一个或多个细胞培养参数与所述细胞培养参数的预定设定点值进行比较,以确定所述一个或多个细胞培养参数是否在预定阈值范围内;以及如果细胞培养参数被确定为在所述预定阈值范围之外,则调整所

述细胞培养参数中的一个或多个细胞培养参数。在某些实施例中,可以监测铵离子浓度,并且如果确定铵离子浓度在特定细胞培养物的预定阈值范围之外,可以调整天冬酰胺补充物补料,使得所述细胞培养产生较少的铵,同时仍然接收足够的天冬酰胺。此类方法可以用于提供最佳和最大量的天冬酰胺补充,同时最小化细胞副产物如铵离子和丙氨酸的产生。

[0096] 在某些实施例中,本公开的监测和控制方法可以利用原位凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学或其它合适的原位细胞培养参数测量方法和化学计量学建模技术,用于细胞培养参数的实时评估,与信号处理技术组合,用于细胞培养过程参数的精确和连续的反馈和模型预测控制。生物反应器内容物的原位凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学允许对一个或多个过程变量进行分析,而无需实际取出样品进行测试。此类技术可以提供细胞培养过程参数的实时反馈控制,包含天冬酰胺补充。

[0097] 在一个实施例中,可以设定铵离子和/或丙氨酸的预定最大设定点值。同样,可以设定天冬酰胺补充连续流动速率的预定设定点值。在补料分批细胞培养期间的期望点(例如,早期补料分批时间范围,第1天、第2天、第3天、第4天,后期补料分批时间范围,第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天等)可以开始连续补料天冬酰胺补充。天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸、铵离子和/或丙氨酸的一种或多种浓度可以在细胞培养操作期间通过凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学进行监测。在某些实施例中,为了确保原始光谱数据持续更新,约每10分钟至2小时获取一次来自凝固点降低、电化学、数字成像、光度测定、生物过程分析仪或拉曼光谱学的数据。在另一个实施例中,可以约每15分钟至1小时获取一次数据。在仍另一个实施例中,可以约每20分钟至30分钟获取一次数据。

[0098] 对所述一个或多个细胞培养过程参数的监测可以通过任何可商购获得的分析仪进行分析,所述分析仪允许原位分析。原位分析仪应该能够获得细胞培养物中的原始数据(例如,分析仪应该配备有可以插入到生物反应器中的探针)。合适的分析仪包含但不限于RamanRXN2和RamanRXN4分析仪(密歇根州安阿伯市的凯泽光学系统公司(Kaiser Optical Systems, Inc. Ann Arbor, Mich.))或in BioProfile Flex自动细胞培养分析仪。

[0099] 由原位分析仪获得的原始光谱数据可以与要监测或控制的特定过程参数的离线测量结果(例如,离线天冬酰胺浓度测量结果)进行比较,以便使过程参数内的数据相互关联。离线测量数据可以通过任何适当的分析方法来收集。另外地,任何类型的多变量软件包,例如SIMCA 13(瑞典于默奥的MKS数据分析解决方案公司(MKS Data Analytic Solutions, Umea, Sweden)),可以用于将数据与要监测或控制的特定过程变量的离线测量结果相关联。然而,在一些实施例中,可能需要用滤波器预处理原始数据,以去除任何变化的基线。例如,原始数据可以用任何类型的点平滑技术或归一化技术进行预处理。例如,可能需要归一化来校正任何功率变化和曝光时间。在一个实施例中,原始数据可以用点平滑如 21cm^{-1} 点平滑的1阶导数,以及归一化如标准正态变量(SNV)归一化处理。

[0100] 还可以对获得的光谱数据进行化学计量建模。在某些实施例中,可以对光谱数据使用一种或多种多变量方法,包含但不限于偏最小二乘法(PLS)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法(OPLS)、多变量回归、典型相关、因子分析、聚类分析、图形程序等。在一个实施例中,所获得的光谱数据用于创建PLS回归模型。PLS回归模型可以通过将预测变量和观察

到的变量投影到新的空间来创建。在此方面,可以使用从拉曼分析获得的测量值和离线测量值来创建PLS回归模型。PLS回归模型提供预测的过程值,例如,预测的营养物浓度值。

[0101] 在化学计量建模之后,信号处理技术可以应用于预测的过程值(例如,预测的天冬酰胺浓度值)。在一个实施例中,信号处理技术包含降噪技术。在某些实施例中,一种或多种降噪技术可以应用于预测的过程参数。可以利用本领域技术人员已知的任何降噪技术。例如,降噪技术可以包含数据平滑和/或信号抑制。平滑是通过一系列平滑算法和滤波器实现的,而信号抑制使用信号特性来识别不应包含在分析的频谱数据中的数据。在一个实施例中,预测的过程值被降噪滤波器进行噪音减少。降噪滤波器提供最终经滤波的过程值(例如,最终经滤波的营养物浓度值)。在此方面,降噪技术将原始测量结果与基于模型的估计值组合,以根据模型来估计测量应该产生的结果。在一个实施例中,降噪技术将当前预测的过程值与其不确定性组合。不确定性可以由预测过程值和当前过程条件的可重复性来确定。一旦观察到下一个预测的过程值,就使用加权平均来更新预测的过程值的估计值(例如,预测的营养物浓度值),其中对具有较高确定性的估计值给予较大权重。使用迭代方法,可以基于先前的测量结果和当前过程条件来更新最终的过程值。在此方面,算法应该是递归的,并且能够实时运行,以便利用当前预测的过程值、先前的值和实验确定的常数。降噪技术通过降低自动反馈控制器将起作用的噪声来提高从拉曼分析和PLS预测接收到的测量结果的稳健性。

[0102] 在获得最终经滤波的过程值(例如,最终经滤波的营养物浓度值)后,最终值可以被发送到自动反馈控制器。自动反馈控制器可以用于将过程参数(例如,监测铵浓度和控制天冬酰胺浓度)控制和维持在预定的设定点处或在预定的设定点以下。在一个实施例中,如果检测到铵浓度高于最大设定值,自动反馈控制器可以被提示在阈值范围内减少天冬酰胺补料的量。自动反馈控制器可以包含任何类型的控制器,所述控制器能够将误差值计算为期望的设定点(例如,预定的设定点)与测得的过程参数之间的差,并且自动地应用准确和响应的校正。自动反馈控制器还应该具有能够从平台界面实时改变的控件。例如,自动反馈控制器应该具有允许调整预定的设定点的用户界面。自动反馈控制器应该能够响应预定的设定点的变化。

[0103] 在一个实施例中,自动反馈控制器可以是比例积分微分(PID)控制器。在此方面,PID控制器可操作来计算预定的设定点与测得的过程变量(例如,测得的天冬酰胺浓度)之间的差,并且自动应用精确的校正。例如,当要控制细胞培养物的营养物浓度时,PID控制器可操作来计算经滤波的营养物值与预定的设定点之间的差,并且提供营养物量的校正。在此方面,PID控制器可以操作性地连接到生物反应器上的营养物泵,使得校正营养物量可以被泵送到生物反应器中。

[0104] 通过使用实时分析和反馈控制,本公开的方法能够为靶细胞系和/或所关注多肽提供最佳的天冬酰胺补充。也就是说,本发明的方法能够为细胞培养提供最佳的天冬酰胺补充,同时使细胞培养物副产物(包含有害的细胞培养副产物)的产生最小化。

[0105] 细胞培养基

[0106] 术语“细胞培养基”和“培养基”指用于生长细胞(例如,真核细胞)的营养液,其通常提供增强细胞生长所必需的营养物,如碳水化合物能量源、必需氨基酸(例如,苯丙氨酸、缬氨酸、苏氨酸、色氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸和组氨酸)和非必需氨基酸(例

如,丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸)、微量元素、能量源、脂质、维生素等。细胞培养基可以含有供应支持细胞生长的原材料的提取物,例如血清或蛋白胨(水解产物)。培养基可以含有酵母源性或大豆提取物,而不是动物源性提取物。化学限定性培养基是指细胞培养基,其中所有的化学组分都是已知的(即,具有已知的化学结构)。通常,化学限定性培养基不含动物源性组分,如血清或动物源性蛋白胨以及酵母和大豆提取物。在一个实施例中,所述培养基是化学限定性培养基。

[0107] 培养基还可以含有在最小速率以上增强生长和/或存活组合,包含激素和生长因子。优选地将培养基调配成对细胞存活和增殖最佳的pH和盐浓度。

[0108] 在某些方面,细胞培养基可以是无血清的。“无血清”适用于不含动物血清如胎牛血清的细胞培养基。无血清培养基可以含有 $\leq 16\text{g/L}$ 的水解产物,如大豆水解产物。本公开还提供了化学限定性培养基,其不仅无血清,而且无水解产物。“无水解产物”适用于不含外源蛋白水解产物如动物或植物蛋白水解产物如例如蛋白胨、胰蛋白胨等的细胞培养基。

[0109] “基础培养基”是细胞在其中繁殖的初始培养基(例如,存在于种子培养物中和/或细胞培养物产生的第0天),并且含有所有必需的营养物,包含氨基酸的基础混合物。基础培养基的各种配方(即,调配物)可以批量制造或购买。同样,“基础补料培养基”含有补充营养物的混合物,所述营养物通常在生产培养期间被消耗,并且在补料策略中被利用(用于所谓的“补料分批”培养)。各种基础补料培养基是可商购获得的。“补料”包含定期添加或以定期间隔添加到培养基中,如根据方案,包含连续补料培养系统,如在恒化器中(参见C.Altamirano等人,《生物技术进展(Biotechnol Prog.)》2001年11月-12月;17(6):1032-41)或根据补料分批过程(Y.M.Huang等人,《生物技术进展》2010年9月-10月;26(5):1400-10)。例如,培养物可以每天、每隔一天、每三天补料一次,或者可以在被监测的特定培养基组分的浓度落在期望范围之外时补料。

[0110] 不希望受到限制,本公开可以用多种基础培养基中的任何一种或多种或其组合来实践。基础培养基通常在本领域中是已知的,并且尤其包含伊格尔氏MEME(最小必需培养基)(Eagle,《科学(Science)》,1955,112(3168):501-504)、Ham's F12(Ham,《美国国家科学院院刊》,1965,53:288-293)、F-12K培养基、杜氏培养基(Dulbecco's medium)、杜氏改性伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(《美国国家科学院院刊》,1952年8月;38(8):747-752)、DMEM/Ham's F12 1:1、Trowell's T8、A2培养基(Holmes和Wolf,《生物物理、生物化学与细胞学(Biophys.Biochem.Cytol.)》,1961,10:389-401)、维莫斯培养基(Waymouth media)(Davidson和Waymouth,《生物化学杂志(Biochem.J.)》,1945,39(2):188-199)、Williams E培养基(William等人,《实验细胞研究(Exp.Cell Res.)》,1971,69:105及以下)、RPMI 1640(Moore等人,《美国医学协会杂志(J.Amer.Med.Assoc.)》1967,199:519-524)、MCDB 104/110培养基(Bettger等人,《美国国家科学院院刊》,1981,78(9):5588-5592)、Ventrex HL-1培养基、白蛋白-球蛋白培养基(Orr等人,《应用微生物学(Appl.Microbiol.)》,1973,25(1):49-54)、RPMI-1640培养基、RPMI-1641培养基、伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、McCoy's 5A培养基、Leibovitz's L-15培养基和无血清培养基如EX-CELL™300系列(堪萨斯州莱内克萨的JRH生物科学公司(JRH Biosciences, Lenexa, Kans.))、精蛋白-锌-胰岛素培养基(Weiss等人,1974,美国专利第4,072,565号)、生物素-叶酸培养基(Cartaya,1978,US Re30,985)、转铁

蛋白-脂肪酸培养基(Baker, 1982, 美国专利第4,560,655号)、转铁蛋白-EGF培养基(Hasegawa, 1982, 美国专利第4,615,977号;Chessebeuf, 1984, 美国专利第4,786,599号)以及其它培养基排列(参见Inlow, 美国专利第6,048,728号;Drapeau, 美国专利第7,294,484号;Mather, 美国专利第5,122,469号;Furukawa, 美国专利第5,976,833号;Chen, 美国专利第6,180,401号;Chen, 美国专利第5,856,179号;Etcheverry, 美国专利第5,705,364号;Etcheverry, 美国专利第7,666,416号;Ryll, 美国专利第6,528,286号;Singh, 美国专利第6,924,124号;Luan, 美国专利第7,429,491号;等等)。

[0111] 细胞培养基也可以周期性地补料(如在所谓的“补料分批”培养中),根据要培养的细胞的要求或期望的细胞培养参数,可以添加或不添加另外的成分,如聚胺或增加浓度的组分,如氨基酸、盐、糖、维生素、激素、生长因子、缓冲剂、抗生素、脂质、微量元素等。

[0112] 在某些方面,细胞培养基可以在重组蛋白生产过程中耗竭氨基酸,其中不提供另外的氨基酸补充,或者细胞培养基可以是“非耗竭的”,其中为耗竭的氨基酸提供氨基酸补充(如下文所描述)。

[0113] 在一个实施例中,培养基另外地含有 $100\mu\text{M}\pm 15\mu\text{M}$ 鸟氨酸、或 $300\mu\text{M}\pm 45\mu\text{M}$ 鸟氨酸、或 $600\mu\text{M}\pm 90\mu\text{M}$ 鸟氨酸或甚至 $900\mu\text{M}\pm 135\mu\text{M}$ 鸟氨酸。在另一个实施例中,培养基含有至少约 $29\mu\text{M}\pm 1\mu\text{M}$ 鸟氨酸、或至少约 $59\mu\text{M}\pm 12\mu\text{M}$ 鸟氨酸、 $80\mu\text{M}\pm 13\mu\text{M}$ 鸟氨酸、或至少约 $296\mu\text{M}\pm 44\mu\text{M}$ 鸟氨酸、或至少约 $593\mu\text{M}\pm 89\mu\text{M}$ 鸟氨酸或至少约 $889\mu\text{M}\pm 133\mu\text{M}$ 鸟氨酸。

[0114] 腐胺可以任选地添加到补充的培养基中。腐胺已经以低浓度例如0.01-120mg/L作为一种组分包含在一些细胞培养基调配物中;参见例如WO 2005/028626,其描述了0.02-0.08mg/L腐胺;美国专利第5,426,699号(0.08mg/L);美国专利第RE30,985号(0.16mg/L);美国专利第5,811,299号(0.27mg/L);美国专利第5,122,469号(0.5635mg/L);美国专利第5,063,157号(1mg/L);WO 2008/154014(约100-82M-约1000 μM);美国专利申请第2007/0212770号(0.5-30mg/L聚胺;2mg/L腐胺;2mg/L腐胺+2mg/L鸟氨酸;2mg/L腐胺+10mg/L鸟氨酸)。

[0115] 在一些实施例中,细胞培养基进一步补充有鸟氨酸和腐胺的组合,其中腐胺的浓度可以为至少约150至720 μM 。在一些实施例中,培养基进一步补充有浓度约为170至230 μM 的腐胺。在一个实施例中,除了 $\geq 90\mu\text{M}\pm 15\mu\text{M}$ 鸟氨酸,培养基还含有 $200\mu\text{M}\pm 30\mu\text{M}$ 腐胺。在一个实施例中,除了 $\leq 89\mu\text{M}\pm 13\mu\text{M}$ 鸟氨酸,培养基还含有 $\leq 186\mu\text{M}\pm 28\mu\text{M}$ 腐胺。在另一个实施例中,除了 $\geq 89\mu\text{M}\pm 13\mu\text{M}$ 鸟氨酸,培养基还含有 $\geq 186\mu\text{M}\pm 28\mu\text{M}$ 腐胺。(参见2014年9月18日公布的国际公开第W02014/144198A1号,所述国际公开通过引用整体并入本文。)

[0116] 在仍其它实施例中,鸟氨酸以范围为 $0.09\pm 0.014\text{mM}$ 至 $0.9\pm 0.14\text{mM}$,如 $0.09\pm 0.014\text{mM}$ 、 $0.3\pm 0.05\text{mM}$ 、 $0.6\pm 0.09\text{mM}$ 或 $0.9\pm 0.14\text{mM}$ 鸟氨酸的浓度存在于培养基中。在一些实施例中,培养基还含有至少 $0.20\pm 0.03\text{mM}$ 腐胺。在一些实施例中,另外的腐胺的浓度范围为 $0.20\pm 0.03\text{mM}$ 至 $0.714\pm 0.11\text{mM}$,如 $0.20\pm 0.03\text{mM}$ 、 0.35 ± 0.06 或 $0.714\pm 0.11\text{mM}$ 腐胺。

[0117] 仍其它实施例,培养基可以添加有浓度(以毫摩尔/升表示)为至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mM的牛磺酸。

[0118] 可以向培养基中添加各种其它补充物,并且在本领域技术人员的技能范围内确定另外的适当条件。在某些实施例中,补充物可以是如本文所描述的天冬酰胺补充物。在一些实施例中,培养基补充有氨基酸的混合物,以便不被耗竭或作为需要的补充营养物(即,散

装补料),所述氨基酸选自由以下组成的组:天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、酪氨酸和色氨酸。

[0119] 在一个实施例中,培养基进一步补充有约170 μ M至175 μ M核苷。在一个实施例中,培养基含有累积浓度为至少40 μ M、至少45 μ M、至少50 μ M、至少55 μ M、至少60 μ M、至少65 μ M、至少70 μ M、至少75 μ M、至少80 μ M、至少85 μ M、至少90 μ M、至少95 μ M、至少100 μ M或至少105 μ M的嘌呤衍生物。在一个实施例中,培养基含有约100 μ M至110 μ M的嘌呤衍生物。嘌呤衍生物包含次黄嘌呤以及核苷腺苷和鸟苷。在一个实施例中,培养基含有累积浓度为至少30 μ M、至少35 μ M、至少40 μ M、至少45 μ M、至少50 μ M、至少55 μ M、至少60 μ M或至少65 μ M的嘧啶衍生物。在一个实施例中,培养基含有约65 μ M至75 μ M的嘧啶衍生物。嘧啶衍生物包含核苷、胸苷、尿苷和胞苷。在一个特定实施例中,培养基含有腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷、胸苷和次黄嘌呤。

[0120] 除了包含任何上述添加剂之外,在一个实施例中,培养基进一步补充有微摩尔量的脂肪酸(或脂肪酸衍生物)和生育酚。在一个实施例中,脂肪酸包含亚油酸、亚麻酸、硫辛酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、花生四烯酸、月桂酸、山嵛酸、癸酸、十二酸、己酸、二十四酸、肉豆蔻酸和辛酸中的任何一种或多种。在一个实施例中,培养基含有生育酚、亚油酸和硫辛酸。

[0121] 在一个实施例中,培养基还可以进一步补充有维生素混合物,其包含其它营养物和必需营养物,累积浓度为至少约700 μ M或至少约2mM。在一个实施例中,维生素的混合物含有D-生物素、氯化胆碱、叶酸、肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醇、D-泛酸(hemiCa)、核黄素、盐酸硫胺素、维生素B12等中的一种或多种。在一个实施例中,维生素的混合物包含D-生物素、氯化胆碱、叶酸、肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醇、D-泛酸(hemiCa)、核黄素、盐酸硫胺素和维生素B12中的所有。

[0122] 在特定实施例中,细胞培养基可以是化学限定性的并且可以包括:如本文所描述的氨基酸混合物CaCl₂·2H₂O;KCl;MgSO₄;NaCl;Na₂HPO₄或其它磷酸盐;丙酮酸盐;D-生物素;氯化胆碱;叶酸;肌醇;烟酰胺;盐酸吡哆醇;D-泛酸;核黄素;盐酸硫胺素;维生素B12;对-氨基苯甲酸;乙醇胺盐酸盐;泊洛沙姆188;DL- α -生育酚磷酸酯;亚油酸;Na₂SeO₃;硫辛酸;一种或多种缓冲剂,以及葡萄糖;以及任选地腺苷;鸟苷;胞苷;尿苷;胸苷;以及次黄嘌呤2Na。

[0123] 在一个实施例中,本公开的培养基的起始渗透压为200-500、250-400、275-350或约300mOsm。在细胞在本公开的培养基中生长期间,并且具体地在根据补料分批方案进行任何补料之后,培养物的渗透压可以增加至约350、400、450、500或至约550mOsm。

[0124] 在其中培养基的渗透压小于约300的一些实施例中,可以通过添加超过指定量的一种或多种盐将渗透压调节至约300。在一个实施例中,通过添加选自氯化钠、氯化钾、镁盐、钙盐、氨基酸盐、脂肪酸盐、碳酸氢钠、碳酸钠、碳酸钾、盐螯合剂、糖(例如,半乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、岩藻糖等)以及其组合的渗透物中的一种或多种,将渗透压增加到期望的水平。在一个实施例中,添加的渗透物超过其在组分中的浓度,所述组分已经存在于限定性培养基中(例如,添加的糖超过糖组分的指定浓度)。

[0125] 细胞培养

[0126] 如本文所描述,本公开的一方面提供了一种细胞培养物,其包括与天冬酰胺补充物一起培养的表达所关注重组蛋白的细胞系。常规用于产生重组蛋白的细胞系的实例尤其

包含原代细胞、BSC细胞、HeLa细胞、HepG2细胞、LLC-MK细胞、CV-1细胞、COS细胞、VERO细胞、MDBK细胞、MDCK细胞、CRFK细胞、RAF细胞、RK细胞、TCMK-1细胞、LLCPK细胞、PK15细胞、LLC-RK细胞、MDOK细胞、BHK细胞、BHK-21细胞、CHO细胞、CHO-K1细胞、NS-1细胞、MRC-5细胞、WI-38细胞、3T3细胞、293细胞、Per.C6细胞和鸡胚细胞。在一个实施例中，细胞系是CHO细胞系或针对大规模蛋白质生产而优化的特定CHO细胞变体中的一种或多种，例如CHO-K1。

[0127] 本公开的另一方面涉及一种使用如本文所描述的天冬酰胺补充物培养细胞的方法，其中与在早期和/或后期补料分批细胞培养中进行较低量的天冬酰胺补充的类似方法相比，使用此类天冬酰胺补充物增强了真核细胞的生长，同时提高了此类细胞的一种或多种所关注重组蛋白的滴度并维持了细胞活力，具体地通过在早期补料分批细胞培养和/或后期补料分批细胞培养中使用。

[0128] 在一些方面，相对于在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充生长的细胞，重组蛋白滴度得到提高。在一些实施例中，在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充生长的细胞培养物产生的蛋白质滴度比在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞产生的蛋白质滴度(产量)高至少约4%、至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、高至少约22%、高至少约23%、高至少约24%、高至少约25%、高至少约26%、高至少约27%、高至少约28%或至少约29%。在一些实施例中，在早期和/或后期补料分批细胞培养中，用本公开的天冬酰胺补充物培养的细胞产生的蛋白质滴度高于用较低量的天冬酰胺补充培养的类似或相同细胞的蛋白质滴度。

[0129] 在一些方面，相对于在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充生长的细胞，细胞生长(例如，加倍速率)、活细胞密度、细胞活力以及其组合得到改善。

[0130] 在一些实施例中，在早期和/或后期补料分批细胞培养中，用本公开的天冬酰胺补充物培养的活细胞的加倍速率比用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞的加倍速率高至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%、至少29%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%或至少3倍。在一些实施例中，在早期和/或后期补料分批细胞培养中，用本公开的天冬酰胺补充物培养的活细胞的加倍速率比用较低量的天冬酰胺补充培养的活细胞的加倍速率高约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%或30%。

[0131] 在一些实施例中，与在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞相比，当用本公开的天冬酰胺补充物培养时，活跃循环的哺乳动物细胞的加倍时间小于30小时、小于29小时、小于28小时、小于27小时、小于26小时、小于25小时、小于24小时、小于23小时、小于22小时、小于21小时、小于20小时、小于19小时或小于18小时。在一些实施例中，与在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞相比，当用本公开的天冬酰胺补充物培养时，活跃生长的哺乳动物细胞的加倍时间小于28小时。在一些实施例中，与在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺

胺补充培养的细胞相比,当用本公开的天冬酰胺补充物培养时,哺乳动物细胞的加倍时间为约 27 ± 1 小时、约 26 ± 1 小时、约 25 ± 1 小时、约 24 ± 1 小时、约 23 ± 1 小时、约 22 ± 1 小时或约 21 ± 1 小时。在一些实施例中,与在早期和/或后期补料分批细胞培养中用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞相比,当用本公开的天冬酰胺补充物培养时,活跃循环的哺乳动物细胞的加倍时间为约 24 ± 1 小时。在一些实施例中,在早期和/或后期补料分批细胞培养中,当用本公开的天冬酰胺补充物培养时,活跃分裂细胞的加倍时间比用较低量的天冬酰胺补充培养的活跃循环细胞的加倍时间短至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%或至少25%。

[0132] 关于细胞活力,在早期和/或后期补料分批细胞培养中,用本公开的天冬酰胺补充物培养的细胞显示出的活力比用较低量的天冬酰胺补充培养的细胞的活力高至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%或至少3倍。

[0133] 在生产培养容器或生物反应器中,在种子培养或生长期后,将基础培养基和细胞供应到培养容器中。在某些实施例中,生产培养后采集细胞上清液或细胞裂解物。在其它实施例中,使用本领域众所周知的技术,从培养基或细胞裂解物中回收所关注多肽或蛋白质,或者根据所关注蛋白质的位置的任何情况。

[0134] “细胞系”是指通过细胞的连续传代或传代培养从特定谱系衍生的一个或多个细胞。术语“细胞”与“细胞群体”可互换使用。

[0135] 术语“细胞”包含任何适于表达重组核酸序列的细胞。细胞包含真核生物的细胞,如非人动物细胞、哺乳动物细胞、人细胞、鸟类细胞、昆虫细胞、酵母细胞或细胞融合体,如例如杂交瘤或正交瘤。在某些实施例中,细胞是人、猴、猿、仓鼠、大鼠或小鼠细胞。在其它实施例中,细胞选自以下细胞:CHO (例如,CHO K1、DXB-11CHO、Veggie-CHO)、COS (例如,COS-7)、视网膜细胞、Vero、CV1、肾细胞 (例如,HEK293、293EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK21)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴细胞,例如Jurkat (T淋巴细胞)或Daudi (B淋巴细胞)、A431 (表皮细胞)、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT细胞、干细胞、肿瘤细胞以及源自上述细胞的细胞系。在一些实施例中,细胞包括一种或多种病毒基因,例如表达病毒基因的视网膜细胞 (例如,PER.C6®细胞)。在一些实施例中,细胞是CHO细胞。在其它实施例中,细胞是CHO K1细胞。

[0136] 在重组蛋白生产阶段,“补料分批细胞培养”或“补料分批培养”是指分批培养,其中最初将动物细胞和培养基供应到培养容器中,并且在终止培养之前有或没有周期性的细胞和/或产物采集的情况下,在培养期间将另外的培养营养物缓慢地、连续地或以不连续的增量补料到培养物中。补料分批培养包含“半连续补料分批培养”,其中周期性地去除整个培养物 (其可以包含细胞和培养基) 并用新鲜培养基替代。补料分批培养不同于简单的“分批培养”,而在分批培养中,在培养过程开始时,将用于细胞培养的所有组分 (包含动物细胞和所有培养营养物) 供应到培养容器中。补料分批培养可以进一步区别于灌注培养,因为在所述过程期间不从培养容器中去除上清液,而在灌注培养中,通过例如过滤将细胞限制在培养物中,并且连续或间歇地将培养基引入到培养容器中和从培养容器中去除。然而,考虑在补料分批细胞培养期间出于测试目的去除样品。补料分批过程持续到确定达到最大工作

体积和/或蛋白质产生。

[0137] 当在本文中使用时,短语“连续细胞培养”涉及用于连续,通常在特定的生长期生长细胞的技术。例如,如果需要恒定的细胞供应,或者需要产生所关注特定多肽或蛋白质,则细胞培养可能需要在特定的生长期维持。因此,必须不断地监测和相应地调整条件,以便将细胞维持在特定期。

[0138] 本公开的一方面涉及补料分批生产细胞培养,其中产生和采集蛋白质。在生产期之前,通常存在生长期(也被称为种子培养(seed train)或种子培养(seed culture)),其中在培养过程开始时,将用于细胞培养的所有组分供应到培养容器中,然后细胞群体扩增,直到准备好生产规模。因此,根据起始细胞系,培养容器以合适的接种密度接种细胞用于初始细胞生长期。在一些方面,如本文进一步所描述,本公开的天冬酰胺补充物可以用于补料分批生产细胞培养。

[0139] 培养容器包含但不限于孔板、T形烧瓶、摇瓶、搅拌容器、旋转瓶、中空纤维、气升式生物反应器等。合适的细胞培养容器是生物反应器。生物反应器是指任何被制造或工程化以操纵或控制环境条件的培养容器。此类培养容器在本领域中是众所周知的。

[0140] 已经开发了生物反应器工艺和系统来优化气体交换,以供应足够的氧气来维持细胞生长和生产力,并且去除CO₂。维持气体交换的效率是确保成功按比例增加细胞培养和蛋白质生产的重要标准。此类系统对于本领域技术人员来说是众所周知的。

[0141] 在一个实施例中,根据补料分批过程,在细胞培养期间不时补充培养基。补料分批培养在本领域通常是已知的,并且用于优化蛋白质生产(参见Y.M.Huang等人,《生物技术进展》2010年9月-10月;26(5):1400-10)。补料分批过程通常在生产期期间使用。

[0142] 在生产培养的持续时间内,可以以每天或每2-3天的频率间隔进行补充补料,以包含另外的营养物,如维生素、氨基酸和如上文所描述的其它营养物。在2周或更长时间培养的生产培养持续时间中,可以进行至少2次或至少8次补充补料(添加含有营养物的补充培养基)。在另一个实施例中,在培养的持续时间内,可以每天进行补充补料。也设想了替代性培养物补料时间表。

[0143] 还可以进行另外的氨基酸补充以提供非耗竭的培养基,其中耗竭的氨基酸根据本领域已知的和本文所描述的方法来确定。当采用此方案时,在生产培养的持续时间内,根据对氨基酸耗竭的确定,每隔一段时间,优选地以每天或每2-3天的频率补充或添加另外的氨基酸。在一个实施例中,在第1天或约第1天、在第2天或约第2天、在第3天或约第3天、在第4天或约第4天、在第5天或约第5天、在第6天或约第6天、在第7天或约第7天、在第8天或约第8天、在第9天或约第9天、在第10天或约第10天、在第11天或约第11天、在第12天或约第12天、在第13天或约第13天、在第14天或约第14天,向培养物中添加另外的氨基酸混合物以维持非耗竭的细胞培养基,持续2周或更长时间的培养。也设想了替代性培养物补料时间表。

[0144] 真核细胞,如CHO细胞,可以在小规模培养物中培养,如在具有约25mL培养基的125mL容器中、具有约50至100mL培养基的250mL容器中、具有约150至240mL培养基的250mL容器中、具有约100至200mL培养基的500mL容器中。可替代地,培养可以是大规模的,如例如具有约300至1000mL培养基的1000mL容器、具有约500mL至3000mL培养基的3000mL容器、具有约2000mL至8000mL培养基的8000mL容器以及具有约4000mL至15000mL培养基的15000mL容器。用于制造的培养物可以含有10,000L培养基或更多培养基。大规模细胞培养,如例如

用于蛋白质治疗剂的临床制造,通常维持数天,或甚至数周,同时细胞产生期望的蛋白质。在此时间期间,培养物可以用浓缩的补料培养基补充,所述补料培养基含有在培养过程期间消耗的组分,如营养物和氨基酸。浓缩的补料培养基可以基于任何细胞培养基调配物。此类浓缩的补料培养基可以含有细胞培养基的大部分组分,例如约 $5\times$ 、 $6\times$ 、 $7\times$ 、 $8\times$ 、 $9\times$ 、 $10\times$ 、 $12\times$ 、 $14\times$ 、 $16\times$ 、 $20\times$ 、 $30\times$ 、 $50\times$ 、 $100\times$ 、 $200\times$ 、 $400\times$ 、 $600\times$ 、 $800\times$ 或甚至约 $1000\times$ 于其正常有用量。浓缩的补料培养基经常用于补料分批培养过程。

[0145] 在一些实施例中,在细胞生长或蛋白质生产过程期间,细胞培养物可以进一步补充有“使用点添加物”,也被称为添加物、使用点成分或使用点化学品。使用点添加物包含生长因子或其它蛋白质、缓冲剂、能量源、盐、氨基酸、金属和螯合剂中的任何一种或多种。其它蛋白质包含转铁蛋白和白蛋白。生长因子,包含细胞因子和趋化因子,是本领域通常已知的,并且已知刺激细胞生长,或者在一些情况下,刺激细胞分化。生长因子通常是蛋白质(例如,胰岛素)、小肽或类固醇激素,如雌激素、DHEA、睾酮等。在一些情况下,生长因子可以是促进细胞增殖或蛋白质生产的非天然化学品,例如四氢叶酸(THF)、甲氨蝶呤等。蛋白质和肽生长因子的非限制性实例包含血管生成素、骨形态发生蛋白(BMP)、脑源性神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子(EGF)、红细胞生成素(EPO)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、生长分化因子-9(GDF9)、肝细胞生长因子(HGF)、肝癌衍生生长因子(HDGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子(IGF)、迁移刺激因子、肌生长抑制素(GDF-8)、神经生长因子(NGF)以及其它神经营养因子、血小板衍生生长因子(PDGF)、血小板生成素(TPO)、转化生长因子 α (TGF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、wnt信号通路激动剂、胎盘生长因子(PIGF)、胎牛生长激素(FBS)、白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7等。在一个实施例中,细胞培养基补充有使用点添加生长因子胰岛素。在一个实施例中,培养基中的胰岛素的浓度,即添加之后细胞培养基中的胰岛素的量,为约 $0.1\mu\text{M}$ 至 $10\mu\text{M}$ 。

[0146] 缓冲剂在本领域中通常是已知的。本发明不限于任何特定的一种或多种缓冲剂,本领域普通技术人员可以选择适当的缓冲剂或缓冲剂系统用于产生特定蛋白质的特定细胞系。在一个实施例中,使用点添加缓冲剂是 NaHCO_3 。在另一个实施例中,缓冲剂是HEPES。在其它实施例中,使用点添加缓冲剂包括 NaHCO_3 和HEPES两者。

[0147] 在细胞培养中用作使用点添加物的能量源也是本领域众所周知的。非限制性地,在一个实施例中,使用点添加物能量源是葡萄糖。考虑到特定细胞系和要生产的蛋白质的特定和具体要求,在一个实施例中,可以在培养基中添加浓度为约1至20mM的葡萄糖。在一些情况下,葡萄糖可以以20g/L或更高的高水平添加。

[0148] 螯合剂在细胞培养和蛋白质生产领域同样是众所周知的。EDTA四钠二水合物和柠檬酸盐是本领域常用的两种螯合剂,尽管在本发明的实践中也可以使用其它螯合剂。在一个实施例中,使用点添加螯合剂是EDTA四钠二水合物。在一个实施例中,使用点添加螯合剂是柠檬酸盐,如 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 。

[0149] 在一个实施例中,细胞培养基可以另外地补充有一种或多种使用点添加氨基酸作为能量源,如例如谷氨酰胺。在一个实施例中,细胞培养基补充有最终浓度为约1mM至13mM的使用点添加谷氨酰胺。

[0150] 其它使用点添加物包含各种金属盐,例如铁盐、镍盐、锌盐和铜盐中的一种或多种。在一个实施例中,细胞培养基补充有硫酸铜、硫酸锌、氯化铁和硫酸镍中的任何一种或多种。

[0151] 蛋白质产生

[0152] 在某些方面,本公开提供了用于改善细胞培养性能的方法,所述方法包含通过培养真核细胞来改善重组蛋白产生中的重组蛋白滴度。在一些实施例中,真核细胞包括编码重组蛋白的稳定整合的核酸。在其它实施例中,本公开的方法提供了改善的细胞生长(例如,加倍速率)、活细胞密度、细胞活力以及其组合。

[0153] 在一些实施例中,本公开的方法包含:提供本公开的天冬酰胺补充物;在所述天冬酰胺补充物中培养真核细胞;从所述真核细胞表达所关注重组蛋白,并且与在早期和/或后期补料分批细胞培养中培养的较低量天冬酰胺补充或非天冬酰胺补充的类似或相同真核细胞相比,从在所述天冬酰胺补充物中培养的所述真核细胞中产生更高滴度的所述重组蛋白。

[0154] 在一些实施例中,用本公开的天冬酰胺补充物培养的细胞的蛋白质产生量或滴度为至少100mg/L、至少1g/L、至少1.2g/L、至少1.4g/L、至少1.6g/L、至少1.8g/L、至少2g/L、至少2.5g/L、至少3g/L、at least, 3.5g/L、至少4g/L、至少4.5g/L、至少5g/L、至少5.5g/L、至少6g/L、至少6.5g/L、至少7g/L、至少7.5g/L、至少8g/L、至少8.5g/L、至少9g/L、至少9.5g/L、至少10g/L、至少15g/L或至少20g/L,其可以用每升培养基中蛋白质产物的克数表示。

[0155] 在一些实施例中,在早期和/或后期补料分批细胞培养中,用本公开的天冬酰胺补充物培养的细胞产生的蛋白质滴度比用较低量天冬酰胺补充或非天冬酰胺补充培养的类似或相同细胞产生的蛋白质滴度(产量)高至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约6%、至少约7%、至少约8%、至少约9%、至少约10%、至少约11%、至少约12%、至少约13%、至少约14%、至少约15%、至少约16%、至少约17%、至少约18%、至少约19%、至少约20%、至少约21%、至少约22%、高至少约23%、高至少约24%、高至少约25%、高至少约26%、高至少约27%、高至少约28%或至少约29%。

[0156] 在一些实施例中,在早期和/或后期补料分批细胞培养中,用本公开的天冬酰胺补充物培养的哺乳动物细胞的蛋白质滴度(产量)比用较低量天冬酰胺补充或非天冬酰胺补充培养的类似或相同细胞的蛋白质滴度高至少100mg/L、至少0.5g/L、至少1g/L、至少1.2g/L、至少1.4g/L、至少1.6g/L、至少1.8g/L、至少2g/L、至少2.5g/L。

[0157] 本公开的方法可用于通过细胞培养过程提高蛋白质产生。本发明中使用的细胞系可以被基因工程化以表达具有商业或科学意义的重组蛋白。对细胞系进行基因工程化涉及用重组多核苷酸分子转染、转化或转导细胞,或以其它方式改变(例如,通过同源重组和基因激活或重组细胞与非重组细胞的融合)以使宿主细胞表达期望的重组多肽。用于基因工程化细胞或细胞系以表达所关注多肽的方法和载体是本领域技术人员熟知的;例如,在以下中展示了各种技术:《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology.)》Ausubel等人,编辑(纽约的约翰威利父子公司(Wiley&Sons, New York), 1988, 以及季刊更新); Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》(冷泉港实验室出版社, 1989); Kaufman, R. J., 《大规模哺乳动物细胞培养(Large Scale Mammalian Cell Culture)》,

1990, 第15-69页。适合在培养物中生长的多种细胞系可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(弗吉尼亚州马纳萨斯)和商业供应商处获得。

[0158] 在一些实施例中,蛋白质产物(所关注蛋白质)是抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、抗原结合抗体片段、单链抗体、双抗体、三抗体或四抗体、Fab片段或F(ab')₂片段、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体或其组合。在一个实施例中,所述抗体是IgG1抗体。在一个实施例中,所述抗体是IgG2抗体。在一个实施例中,所述抗体是IgG4抗体。在一个实施例中,所述抗体是嵌合IgG2/IgG4抗体。在一个实施例中,所述抗体是嵌合IgG2/IgG1抗体。在一个实施例中,所述抗体是嵌合IgG2/IgG1/IgG4抗体。

[0159] 在一些实施例中,所述抗体选自由以下组成的组:抗程序性细胞死亡1抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2015/0203579A1号中所描述的抗PD1抗体)、抗程序性细胞死亡配体-1(例如,如在美国专利申请公开第US2015/0203580A1号中所描述的抗PD-L1抗体)、抗DII4抗体、抗血管生成素-2抗体(例如,如在美国专利第9,402,898号中所描述的抗ANG2抗体)、抗血管生成素样3抗体(例如,如在美国专利第9,018,356中所描述的抗AngPt13抗体)、抗血小板源性生长因子受体抗体(例如,如在美国专利第9,265,827号中所描述的抗PDGFR抗体)、抗Erb3抗体、抗催乳素受体抗体(例如,如在美国专利第9,302,015中所描述的抗PRLR抗体)、抗补体5抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2015/0313194A1号中所描述的抗C5抗体)、抗TNF抗体、抗表皮生长因子受体抗体(例如,如在美国专利第9,132,192中所描述的抗EGFR抗体或者如在美国专利申请公开第US2015/0259423A1号中所描述的抗EGFRvIII抗体)、抗前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶Kexin-9抗体(例如,如在美国专利第8,062,640号或美国专利申请公开US2014/0044730A1中所描述的抗PCSK9抗体)、抗生长和分化因子-8抗体(例如,抗GDF8抗体,也被称为抗肌肉生长抑制素抗体,如在美国专利第8,871,209号或第9,260,515号中所描述的)、抗胰高血糖素抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2015/0337045A1号或第US2016/0075778A1号中所描述的抗GCGR抗体)、抗VEGF抗体、抗IL1R抗体、白细胞介素4受体抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2014/0271681A1号或美国专利第8,735,095号或第8,945,559号中所描述的抗IL4R抗体)、抗白介素6受体抗体(例如,如在美国专利第7,582,298号、第8,043,617号或第9,173,880号中所描述的抗IL6R抗体)、抗IL1抗体、抗IL2抗体、抗IL3抗体、抗IL4抗体、抗IL5抗体、抗IL6抗体、抗IL7抗体、抗白细胞介素33(例如,如在美国专利申请公开第US2014/0271658A1号或第US2014/0271642A1号中所描述的抗IL33抗体)、抗分化簇3(例如,如在美国专利申请公开第US2014/0088295A1号和第US20150266966A1号以及美国申请第62/222,605号中所描述的抗CD3抗体)、抗分化簇20(例如,如在美国专利申请公开第US2014/0088295A1号和第US20150266966A1号以及美国专利第7,879,984号中所描述的抗CD20抗体)、抗CD19抗体、抗CD28抗体、抗分化簇-48(例如,如在美国专利第9,228,014号中所描述的抗CD48抗体)、抗Fε1 d1抗体(例如,如在美国专利第9,079,948号中所描述的)、抗流感病毒抗体、抗呼吸道合胞病毒抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2014/0271653A1号中所描述的抗RSV抗体)、抗中东呼吸综合征病毒(例如,如在美国专利申请公开第US2015/0337029A1号中所描述的抗MERS-CoV抗体)、抗埃博拉病毒抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2016/0215040号中所描述的)、抗寨卡病毒抗体、抗严重急性呼吸道综合征(SARS)抗体(例如,抗

SARS-CoV抗体)、抗COVID-19抗体(例如,抗SARS-CoV-2抗体)、抗淋巴细胞活化基因3抗体(例如,抗LAG3抗体或抗CD223抗体)、抗神经生长因子抗体(例如,如美国专利申请公开第US2016/0017029号和美国专利第8,309,088号和第9,353,176号中所描述的抗NGF抗体)以及抗活化素A抗体。在一些实施例中,双特异性抗体选自由以下组成的组:抗CD3×抗CD20双特异性抗体(如在美国专利申请公开第US2014/0088295A1号和第US20150266966A1号中所描述的)、抗CD3×抗粘蛋白16双特异性抗体(例如,抗CD3×抗Muc16双特异性抗体)和抗CD3×抗前列腺特异性膜抗原双特异性抗体(例如,抗CD3×抗PSMA双特异性抗体)。在一个实施例中,所关注蛋白质包括任何前述的组合。

[0160] 在一些实施例中,所关注蛋白质选自由以下组成的组:抗流感病毒抗体,抗呼吸道合胞病毒抗体(例如,如美国专利申请公开第US2014/0271653A1号中所描述的抗RSV抗体)、抗中东呼吸综合征病毒(例如,如在美国专利申请公开第US2015/0337029A1号中所描述的抗MERS-CoV抗体)、抗埃博拉病毒抗体(例如,如在美国专利申请公开第US2016/0215040号中所描述)、抗寨卡病毒抗体、抗严重急性呼吸道综合征(SARS)抗体(例如,抗SARS-CoV抗体)、抗COVID-19抗体(例如,抗SARS-CoV-2抗体)。在一个实施例中,所关注蛋白质包括任何前述的组合。

[0161] 在一些实施例中,所关注蛋白质选自由以下组成的组:阿利库单抗(alirocumab)、萨瑞鲁单抗(sarilumab)、法西奴单抗(fasinumab)、奈斯瓦单抗(nesvacumab)、度匹鲁单抗(dupilumab)、曲戈卢单抗(trevogrumab)、依维那库单抗(evinacumab)和利努苏单抗(rinucumab)。在一个实施例中,所关注蛋白质包括任何前述的组合。

[0162] 在一些实施例中,所关注蛋白质是含有Fc部分和另一个结构域的重组蛋白质(例如,Fc融合蛋白)。在一些实施例中,Fc融合蛋白是受体Fc融合蛋白,其含有与Fc部分偶联的受体的一个或多个细胞外结构域。在一些实施例中,Fc部分包括IgG的铰链区和随后的CH2和CH3结构域。在一些实施例中,受体Fc融合蛋白含有与单个配体或多个配体结合的两条或更多条不同的受体链。例如,Fc融合蛋白是TRAP蛋白,如例如IL-1trap(例如,利纳西普(rilonacept),其含有与融合到hIgG1的Fc的II-1R1细胞外区融合的IL-1RAcP配体结合区;参见美国专利第6,927,004号,所述美国专利通过引用以其整体并入本文),或VEGF trap(例如,阿柏西普(aflibercept)或ziv-阿柏西普(ziv-aflibercept)),其含有与融合到hIgG1的Fc的VEGF受体Flk1的Ig结构域3融合的VEGF受体Flt1的Ig结构域2;参见美国专利第7,087,411号和第7,279,159号)。在其它实施例中,Fc融合蛋白是ScFv-Fc融合蛋白,其含有与Fc部分偶联的抗体的一个或多个抗原结合结构域(如可变重链片段和可变轻链片段)中的一个或多个。

[0163] 同样,本公开不限于用于重组蛋白产生的任何特定类型的细胞。适于重组蛋白产生的细胞类型的实例包含哺乳动物细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、细菌细胞和酵母细胞。细胞可以用载体转化的干细胞或重组细胞,用于重组基因表达,或者用病毒转染的细胞,用于产生病毒产物。细胞可以含有编码所关注蛋白质的重组异源多核苷酸构建体。所述构建体可以是附加体,或者其可以是物理整合到细胞的基因组中的元件。细胞也可以产生所关注蛋白质,而不需要在异源多肽构建体上编码的蛋白质。换句话说,细胞可以天然编码所关注蛋白质,如产生抗体的B细胞。细胞也可以是原代细胞,如鸡胚细胞,或原代细胞系。

[0164] 有用细胞的实例包含CHO、COS、视网膜细胞、Vero、CV1、肾脏细胞、HeLa、HepG2、

WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴细胞、A431、CV-1、U937、3T3、L细胞、C127细胞、SP2/0、NS-0、MMT细胞、干细胞、肿瘤细胞以及源自上述细胞的细胞系。在各个实施例中，所述细胞系是CHO细胞衍生物，如CHO-K1、CHO DUX B-11、CHO DG-44、Veggie-CHO、GS-CHO、S-CHO或CHO Iec突变体系。

[0165] 生产期可以在任何规模的培养中进行，从摇瓶或波形袋，至250mL生物反应器，至一升生物反应器，以及大规模工业生物反应器。同样，种子培养扩增期可以在任何规模的培养中进行，从摇瓶或波形袋，至250mL生物反应器，至一升或更大的生物反应器。大规模过程可以在约100升至20,000升或更多的体积中进行。若干种方法中的一种或多种可以用于控制蛋白质产生，如温度变化或化学诱导。生长期可以在比产生期更高的温度下发生。例如，生长期可发生在约35℃至38℃的第一温度，并且产生期可以发生在约29℃至37℃的第二温度，任选地约30℃至36℃或约30℃至34℃。另外，蛋白质产生的化学诱导剂，如咖啡因、丁酸盐、他莫昔芬、雌激素、四环素、强力霉素和六亚甲基双乙酰胺 (HMB)A，可以在温度变化的同时、之前或之后添加。如果在温度变化之后添加诱导剂，它们可以在温度变化之后一小时至五天添加，例如在温度变化之后一至两天添加。生产细胞培养物可以作为连续补料培养系统运行，如在恒化器中（参见C.Altamirano等人，2001，同上），或根据补料分批过程（Huang，2010，同上）。

[0166] 本公开不限于本文所描述的具体实施例，所述实施例旨在作为本发明的单独方面或实施例的说明。功能等效的方法和组件在本发明的范围内。根据前文的描述和附图，除了本文所描述的修改之外，本发明的各种修改对于所属领域技术的人员来说也变得显而易见。此类修改落入本发明的范围内。

[0167] 本公开中所提到的所有出版物都通过引用整体并入本文。

[0168] 实例

[0169] 仅出于说明性目的提供以下实例，并且所述实例并不旨在限制本发明的范围。

[0170] 补料分批方法

[0171] 如本文所描述，补料分批补料开发通过自动化AMBR250，24路平行生物反应器系统进行。AMBR250高通量工作站提供对24个一次性生物反应器的集成并行控制。更具体地，AMBR250 (24路) 是一个完全集成的高通量系统，由24个生物反应器组成，每个反应器的最大工作体积为250ml，在全自动控制下，细胞培养过程并行进行。提供对每个生物反应器容器的单独连续控制和监测，包含温度、叶轮速度、pH和溶解氧 (DO)、废气分析。所述系统提供全自动培养基填充、接种、采样和补料。所述系统使用带有叶轮、喷雾器或顶部空间气体、pH和DO探针以及至多四条补料管线的生物反应器。

[0172] 在进行本公开的补料策略开发时，AMBR250生物反应器（赛多利斯斯泰帝公司 (Sartorius Stedim)）以至多250mL的工作体积运行。使用专有的化学限定性基础培养基和补料培养基。不同细胞系的补料培养基和补料策略是不同的。每天对葡萄糖进行补料，并根据目标控制水平。生物反应器接种有细胞培养物。在研究期间，通过控制维持氧气，并通过喷雾器以不同的流动速率添加纯氧。类似地，通过控制较高pH带的CO₂喷射来维持pH，而不控制较低带pH。接种细胞密度、溶解氧、温度、pH和死区保持恒定。空气和氧气的搅拌和流动速率根据规模而变化。

[0173] 除非另有说明，否则在所有实例中使用高天冬酰胺消耗的CHO细胞系1，表达示例

性多肽A。

[0174] 细胞外氨基酸测量

[0175] 如本文所描述,可以测量氨基酸的细胞外水平。在某些实施例中,根据以下程序测量此类水平。使用Waters AccQ • Tag方法方案和Waters AccQ • Tag试剂盒(马萨诸塞州米尔福德市的沃特世公司(Waters, Milford, MA))衍生和制备废细胞培养基样品。样品稀释10倍,并且在衍生前添加100mg/L的肌氨酸内标(马萨诸塞州伯灵顿的密理博西格玛公司(Millipore Sigma, Burlington, MA))。使用配备有AccQ • Tag Ultra C18柱(1.7 μ M, 2.1x10mm)的UPLC进行对衍生氨基酸的分离并进行后续测量,在260nm波长下收集数据。流动相和梯度遵循Waters AccQ • Tag方法方案。

[0176] 细胞内氨基酸测量

[0177] 如本文所描述,可以测量氨基酸的细胞内水平。在某些实施例中,根据以下程序测量此类水平。从生物反应器中收集细胞,并在室温下离心,从细胞团粒中分离出上清液。将细胞团粒用1X PBS洗涤,离心。去除PBS,并且将细胞团粒用液氮冷淬灭。研究样品掺入稳定的标记内标,提取,并用有机溶剂进行蛋白质沉淀。离心之后,将等份上清液稀释并注入到配备有C18反相UHPLC柱的安捷伦1290/AB Sciex QTrap 5500LC-MS/MS系统上。质谱仪使用电喷雾电离(ESI)在正模式下操作。在伪MRM模式下,针对对应内标物的母离子的峰面积测量单独分析物母离子的峰面积。使用加权最小二乘回归分析进行定量,所述分析由每次运行前立即制备的强化校准标准物生成。使用AB SCIEX软件Analyst 1.6.2收集和处理LC-MS/MS原始数据。使用Office 365v.16的Microsoft Excel进行数据简化。

[0178] 天冬酰胺序列变体分析

[0179] 如本文所描述,可以测量所关注多肽的天冬酰胺序列变体。虽然可以使用任何合适的方法来测量此类序列变体,但是天冬酰胺序列变体的定量可以如下确定。集中于约50种可能的肽中的三种肽的基于LC-MS的快速、灵敏的测定可以用作筛选工具,以鉴定取代情况并获得对取代程度的定量估计。可以使用适当的纯化方法小规模纯化所关注多肽。所关注多肽然后可以被还原和变性,随后进行酶消化。以此方式,可以产生所关注多肽的胰蛋白酶图谱,并分析蛋白质序列以确定是否与预期序列有任何差异。随后可以进行基于HPLC梯度的分离,并且可以通过Q-TOF MS系统分析单独的肽。特定的肽可以通过质谱法详细分析。可以分析肽序列的变化。通过实例的方式,观察到天冬酰胺到丝氨酸取代的27Da移位。

[0180] 实例1-天冬酰胺对细胞培养和补料策略开发的影响

[0181] 使用示例性CHO细胞系和不同的天冬酰胺补充来评估补料分批细胞培养性能和补料策略。如本文所描述,可以使用AMBR250生物反应器系统和氨基酸测量来进行补料分批细胞培养性能和补料策略开发。

[0182] 参考图3A-3C,在某些方面,发现在早期补料分批细胞培养中增加天冬酰胺导致细胞生长增加,并且当与其它细胞营养需求平衡时,不会负面影响培养生产率。图3A展示了一系列早期补料分批天冬酰胺补充物,具有低、中和高量补充物(范围例如每次补料约1.8mM至约5.4mM精氨酸),但是此类天冬酰胺补充物不能防止后期补料分批天冬酰胺耗竭。图3B展示了根据本公开的实施例的随着天冬酰胺补充物量的增加,细胞培养物生长的增加,而图3C展示了随着天冬酰胺补充物的增加,细胞培养物滴度增加,直到由于一些必需氨基酸的耗竭而达到平台期。

[0183] 参考图4A-4C,还发现在后期补料分批细胞培养中增加天冬酰胺,尽管增加了副产物如铵的形成,但并不显著影响细胞培养生产率。更具体地,图4A展示了后期补料中的低和高天冬酰胺补充物(范围为每次补料约1.8mM至约7.2mM),但是此类天冬酰胺补充物不能防止后期补料分批天冬酰胺耗竭。虽然总的细胞培养生产率没有受到负面影响(图4C),但在后期补料分批细胞培养中较高量的天冬酰胺补充物可能导致过量副产物的形成(图4B),这表明如果需要,可以向细胞培养中补料更多的天冬酰胺,但耗竭仍然难以防止。

[0184] 根据本公开的实施例,开发了一种改善的天冬酰胺补充补料策略(即,“新补料平台”,在早期补料分批中进行3倍天冬酰胺补料,在后期补料分批中进行1.5倍天冬酰胺补料),其防止了早期补料分批细胞培养中必需氨基酸和天冬酰胺的耗竭,并且提供了细胞培养整体性能的提高。如图5A-5D所示,早期补料分批天冬酰胺补充防止了早期补料分批天冬酰胺耗竭,并且增加了细胞培养物生长。进一步地,如所示出的,天冬酰胺相关的细胞培养物生长的增加以及必需氨基酸耗竭的消除提高了细胞培养物生产率,以及生产性补料分批时间延长并产生更高的滴度。然而,在后期补料分批细胞培养中更高的天冬酰胺补充仍然不能避免后期补料分批中天冬酰胺耗竭。参考图5E-5G,在另一个示例性细胞系中,通过更高的天冬酰胺补充物,细胞滴度、活细胞计数和细胞活力都得到提高。

[0185] 参考图6A,在早期补料分批细胞培养中补充不同量的天冬酰胺产生类似时间处的耗竭。然而,增加天冬酰胺补充物量会增加天冬酰胺消耗速率(参见图7),表明细胞没有有效利用天冬酰胺。参考图6B,在后期补料分批细胞培养中补充增加的天冬酰胺量不能防止后期补料分批天冬酰胺耗竭,可能导致过量副产物形成,这再次表明细胞没有有效利用天冬酰胺。

[0186] 在这方面,图7展示了示例性高消耗细胞系在一系列天冬酰胺补料策略下的天冬酰胺消耗速率。如所示出的,与现有的已知平台补料策略相比,本公开的新平台补料策略导致在细胞培养持续时间内消耗较少天冬酰胺的补料分批细胞培养。进一步地,如所示出的,与低天冬酰胺补料策略相比,高天冬酰胺补料策略产生更高的天冬酰胺消耗速率。此数据表明,本公开的新平台补料策略提供了天冬酰胺的最有效使用。

[0187] 总之,天冬酰胺被鉴定为在高消耗细胞系中耗竭。早期补料分批细胞培养中的补充影响细胞培养性能。后期补料分批细胞培养中的补充增加了副产物例如铵的产生。出乎意料地发现,防止必需氨基酸耗竭、克服早期补料分批中天冬酰胺耗竭并最小化铵影响的平衡天冬酰胺补料策略导致细胞培养生产率增加。

[0188] 实例2-补料分批细胞培养中天冬酰胺对天冬酰胺相关氨基酸的影响

[0189] 如本文所描述,可以使用AMBR250生物反应器系统和氨基酸测量来研究天冬酰胺与通过代谢通路与天冬酰胺相关的非必需氨基酸之间的相互关系。

[0190] 参考图8,如果需要天冬酰胺,细胞可以增加对天冬氨酸和谷氨酸的利用来合成补充的天冬酰胺。较高的细胞内/细胞外天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺浓度可以表明细胞具有足够的细胞内天冬酰胺来支持细胞需求。然而,天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺浓度的下降可以表明天冬酰胺限制。

[0191] 参考图9A-9D,展示了在示例性高消耗细胞系1的后期补料分批细胞培养中天冬酰胺水平的影响。如所示出的,低天冬酰胺会影响相关非必需氨基酸的细胞内谱(细胞内谷氨酸随低天冬酰胺而减少)。

[0192] 参考图10A-10D,展示了在另一个示例性高消耗细胞系2的后期补料分批细胞培养中天冬酰胺水平的影响。如所示出的,然而,低天冬酰胺影响相关非必需氨基酸的细胞内谱(细胞内谷氨酸随低天冬酰胺而减少),其程度低于在示例性高消耗细胞系1中观察到的程度。

[0193] 参考图11A-11D,展示了在示例性低消耗细胞系的后期补料分批细胞培养中天冬酰胺水平的影响。如所示出的,对于此示例性细胞系,低天冬酰胺不影响相关非必需氨基酸的细胞外或细胞内谱(谷氨酸的细胞内谱不随低天冬酰胺而降低)。如所示出的,在补料分批循环结束时,存在高水平的细胞内天冬酰胺和谷氨酸。

[0194] 最后,如图12A-12F所示,高(3倍早期,1.5倍后期)和非常高(6倍早期,3倍后期)的效果,这表明细胞外天冬酰胺的增加可以增加天冬酰胺相关氨基酸,但也可以影响滴度和铵水平。如所示出的,更高水平的补充天冬酰胺(图12A)可以导致天冬酰胺相关氨基酸的增加(图12B、12D和12E),但所得不期望的细胞培养副产物(即,图12F,铵)的增加可以导致细胞培养性能下降(即,图12C,滴度)。

[0195] 图9A-9D、图10A-10D、图11A-11D和图12A-12F一起展示了不同天冬酰胺补料水平的天冬酰胺相关氨基酸谱和细胞培养性能因细胞系而不同,表明天冬酰胺补料要求可以针对细胞系的特定需要。

[0196] 总之,细胞内天冬酰胺相关氨基酸的浓度表明了特定细胞系对天冬酰胺的特殊需求。更具体地,进行天冬酰胺补充对相关氨基酸的细胞外和细胞内氨基酸谱的影响可以针对细胞系的特定需要。

[0197] 实例3-克服天冬酰胺耗竭

[0198] 如本文所描述,可以使用AMBR250生物反应器系统和氨基酸测量来开发改善的天冬酰胺补料策略和平台,所述改善的天冬酰胺补料策略和平台被优化以克服天冬酰胺耗竭,同时维持细胞培养性能。

[0199] 下文表1展示了所研究的示例性天冬酰胺补料策略。

[0200]

补料方法	散装补料	Asn补料
标准补料分批(团注)	团注	团注
连续单独的Asn补料	团注	连续
连续散装+Asn补料	连续	连续
混合补料	团注	团注(1)+连续(1)

[0201] 表1

[0202] 如表1所示,将标准补料分批团注天冬酰胺补料与若干种天冬酰胺补料策略进行比较,即,连续天冬酰胺补充物补料(与团注细胞培养散装补料分开)、连续组合散装加天冬酰胺补料、以及利用团注天冬酰胺补料和连续天冬酰胺补充物补料(与团注细胞培养散装补料分开)两者的混合补料策略,使得向细胞培养物提供两倍的总天冬酰胺补充物量。

[0203] 参考图13A-13D,发现对于相同总天冬酰胺补充物量,团注和连续天冬酰胺补料具有相当的细胞培养性能(活细胞计数如图13A所展示,培养生产率如图13B所展示)。进一步地,细胞培养副产物的形成(图13C展示了铵形成,图13D展示了丙氨酸形成)在团注和连续天冬酰胺补料中相对恒定。然而,参考图13E-13G,与具有相同总天冬酰胺补充物量的团注天冬酰胺补充物补料相比,连续天冬酰胺补充物补料延迟了细胞外天冬酰胺(图13E)、天冬

氨酸(图13F)和谷氨酸(图13G)耗竭。根据本公开的各方面,意外地发现,当连续补料时,相同总天冬酰胺补充物量降低了天冬酰胺、天冬氨酸和谷氨酸的消耗速率。在这方面,具有相当的细胞培养性能的改善的氨基酸耗竭曲线表明细胞培养物进行更有效地天冬酰胺消耗。

[0204] 参考图14A-14D,已经发现,与通过连续散装补料和标准团注补充进行天冬酰胺的连续补充相比,通过连续独立的天冬酰胺补料(与团注散装补料分开)进行天冬酰胺补充,对于相同的总天冬酰胺补充物量,不能防止细胞外天冬酰胺耗竭(图14A),但确实减少了细胞培养副产物形成(图14D)并调节了天冬酰胺相关代谢物的消耗速率(图14B和图14C)。所有展示的补料策略具有可比的细胞培养性能。

[0205] 发现与团注天冬酰胺补充相比,混合补料方法(连续天冬酰胺补充物补料与团注天冬酰胺补充物补料组合)延迟了氨基酸耗竭,但增加了多种示例性细胞系的副产物形成。

[0206] 参考图15A-15G,在第一示例性细胞系中,发现混合补料方法可延迟天冬酰胺和相关代谢物耗竭(图15A展示了细胞外天冬酰胺,图15B展示了细胞外天冬氨酸,并且图15C展示了细胞外谷氨酸),并且产生可比的细胞培养性能(活细胞计数展示在图15D中,培养产量展示在图15E中),但是还发现增加了副产物形成(图15F展示了铵形成,图15G展示了丙氨酸形成)。

[0207] 参考图16A-16E,在第二示例性细胞系中,发现混合补料方法可延迟天冬酰胺(图16A展示了细胞外天冬酰胺),并且导致细胞培养生产率下降(活细胞计数展示在图16B中,培养产量展示在图16C)。还发现混合补料方法增加了副产物形成(图16D展示了铵形成,图16E展示了丙氨酸形成)。

[0208] 总之,通过鉴定新的天冬酰胺补充物补料策略,解决了后期补料分批中细胞外天冬酰胺耗竭的影响。出乎意料地发现,连续天冬酰胺补充是一种用于进行天冬酰胺补料的更有效平台。连续天冬酰胺补充,具体地作为独立的单独的天冬酰胺补料,降低了天冬酰胺和相关代谢物的消耗速率。

[0209] 实例4-在补料分批细胞培养中减少和控制天冬酰胺序列变体,以及使用天冬酰胺相关氨基酸作为天冬酰胺序列变体的替代标志物

[0210] 如本文所描述,可以使用AMBR250生物反应器系统和氨基酸测量来研究使用天冬酰胺补充物来减少天冬酰胺序列变体,以及使用天冬酰胺相关氨基酸作为所关注多肽中的天冬酰胺序列变体的替代标志物。

[0211] 返回参考图10A-10D,展示了天冬酰胺水平在示例性高消耗细胞系2的后期补料分批细胞培养中的作用,在补料分批细胞培养的最后一天通过质谱法分析天冬酰胺序列变体。发现低天冬酰胺补充的细胞培养物具有0.30%天冬酰胺序列变体存在,并且发现高天冬酰胺补充的细胞培养物具有0.24%天冬酰胺序列变体存在。这些SV值相对较低,并且与在细胞培养中观察到的较高水平的细胞内谷氨酸一致,如图10D所展示。

[0212] 类似地,参考图11A-11D,展示了天冬酰胺水平在示例性低消耗细胞系的后期补料分批细胞培养中的作用,在补料分批细胞培养的最后一天通过质谱法分析天冬酰胺序列变体。发现低天冬酰胺补充的细胞培养物具有0.11%天冬酰胺序列变体存在,并且发现高天冬酰胺补充的细胞培养物具有0.04%天冬酰胺序列变体存在。同样,这些SV值相对较低,并且与在细胞培养中观察到的较高水平的细胞内谷氨酸一致,如图11D所展示。

[0213] 参考图17A-17B,已经发现,在早期补料分批中细胞外天冬酰胺耗竭可以是Asn→

Ser, 天冬酰胺序列变体形成的指标。如图17A所示, 维持细胞外天冬酰胺水平高于0.1mM (15mg/L) 的耗竭极限直到早期细胞培养的至少第4天的高天冬酰胺补料策略 (在10.8mM下3倍早期, 1.5倍后期) (例如, 通过补料2) 能够将天冬酰胺序列变体的形成减少至低于约0.20% SV的水平 (图17B)。

[0214] 参考图18A, 已经发现, 后期补料中较低的天冬酰胺水平会增加Asn→Ser, 天冬酰胺序列变体, 具体地在峰值活细胞浓度之后。在图18A中所描绘的实验中, 早期补料中的天冬酰胺水平是相同的。图18B展示了与低天冬酰胺后期补料策略相比, 高天冬酰胺后期补料策略的细胞内谷氨酸(Glu)水平。进一步地, 出乎意料地发现, 向细胞培养基中添加Gln进一步减少了天冬酰胺序列变体的形成 (图18C)。

[0215] 如所示出的, 细胞内谷氨酸浓度与天冬酰胺序列变体的存在呈负相关。在天冬酰胺序列变体发生率较低的细胞培养物中发现较高的细胞内谷氨酸水平, 并且在天冬酰胺序列变体发生率较高的细胞培养物中发现较低的细胞内谷氨酸水平。以此方式, 细胞内谷氨酸可以用作所关注多肽中的天冬酰胺序列变体量的替代标志物。

[0216] 图19A-19G展示了示例性细胞系1的天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸和天冬酰胺序列变体之间的相关性。图19B-19D展示了细胞外天冬酰胺 (图19B)、天冬氨酸 (图19C) 和谷氨酸 (图19D), 而图19E-19G展示了示例性细胞内天冬酰胺 (图19E)、天冬氨酸 (图19F) 和谷氨酸 (图19G)。图19G展示了后期补料分批细胞内谷氨酸(Glu)可以用作使用图19A的高和低天冬酰胺补料策略产生的多肽的天冬酰胺序列变体的替代标志物。如所示出的, 高天冬酰胺补充物补料导致高后期补料分批细胞内谷氨酸和低天冬酰胺序列变体。低天冬酰胺补充物补料导致低后期细胞内谷氨酸和较高天冬酰胺序列变体。替代细胞内谷氨酸测量结果与质谱天冬酰胺序列变体分析一致。然而, 对于此特定细胞系, 没有关于细胞外或细胞内天冬酰胺或天冬氨酸或细胞外谷氨酸的明确趋势。

[0217] 图20A-20D展示了另一个示例性细胞系 (高消耗细胞系) 的天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸和天冬酰胺序列变体之间的类似相关性。图20B-20D展示了细胞外天冬酰胺 (图20B)、细胞内天冬氨酸 (图20C) 和细胞内谷氨酸 (图20D)。图20C和20D展示了后期补料分批细胞内天冬氨酸和细胞内谷氨酸均可以用作使用图20A的高和低天冬酰胺补料策略产生的多肽的天冬酰胺序列变体的替代标志物。如所示出的, 高天冬酰胺补充物补料导致高后期补料分批细胞内天冬氨酸和高后期补料分批细胞内谷氨酸, 以及低天冬酰胺序列变体。低天冬酰胺补充物补料导致低后期补料分批细胞内天冬氨酸和低后期补料分批细胞内谷氨酸, 以及较高天冬酰胺序列变体。替代细胞内天冬氨酸和细胞内谷氨酸测量结果与质谱天冬酰胺序列变体分析一致。

[0218] 图21A-21F展示了示例性细胞系1的天冬酰胺序列变体趋势与细胞内谷氨酸趋势一致, 表明细胞内天冬酰胺相关氨基酸可以用作天冬酰胺序列变体的替代物。图21A和21C展示了高天冬酰胺早期补料策略 (图21A, 如通过质谱法测定的序列变体量, 图21C, 细胞内谷氨酸的浓度)。图21B和21D展示了低天冬酰胺早期补料策略 (图21B, 如通过质谱法测定的序列变体量, 图21D, 细胞内谷氨酸的浓度)。图21E示出了示例性细胞系4的细胞内谷氨酸水平, 其与天冬酰胺序列变体的较高出现率和较低出现率相关, 并且21F示出了另一种示例性细胞系5的类似细胞内谷氨酸谱。

[0219] 图22A-22H展示了示例性细胞系的天冬酰胺、天冬酰胺相关氨基酸和天冬酰胺序

列变体之间的相关性。图22A-22D展示了高和低天冬酰胺补料策略的示例性细胞系1的细胞外天冬酰胺(图22A)、细胞外天冬氨酸(图22B)、细胞外谷氨酸(图22C)和细胞外谷氨酰胺(图22D)。如所示出,没有观察到细胞外天冬酰胺、天冬氨酸或谷氨酸和天冬酰胺序列变体形成的明显趋势。然而,在后期补料分批细胞外谷氨酰胺与天冬酰胺序列变体形成之间存在相关性(具体地假设在早期补料分批细胞培养中天冬酰胺的补充超过耗竭极限)。图22E-22H示出了示例性细胞系4的类似趋势,展示了高和低天冬酰胺补料策略的细胞外天冬酰胺(图22E)、细胞外天冬氨酸(图22F)、细胞外谷氨酸(图22G)和细胞外谷氨酰胺(图22H)。

[0220] 图23A-23C进一步展示了细胞外谷氨酰胺可以用作后期补料分批细胞培养中天冬酰胺序列变体的替代物。图23A示出了在示例性细胞系1中通过高天冬酰胺补料策略可以产生足够的谷氨酰胺(例如,高于谷氨酰胺耗竭极限)。类似地,图23B示出了在示例性细胞系1中通过高天冬酰胺补料策略可以产生足够的谷氨酰胺,这与其中通过质谱法没有检测到天冬酰胺序列变体的实施例相关。并且最后,图23C示出了,当在第6天和第8天没有补充天冬酰胺时,检测到天冬酰胺序列变体,并且细胞外谷氨酰胺低于耗竭极限(即,通过天冬酰胺补料策略产生的谷氨酰胺不足)。然而,当通过高天冬酰胺补料策略产生足够的谷氨酰胺时,细胞外谷氨酰胺与天冬酰胺序列变体形成相关。

[0221] 本说明书中所引用的所有出版物和专利申请都通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指示通过引用并入本文。

[0222] 尽管已参考示例性实施例描述了本发明,但本领域的技术人员将理解,在不背离本发明的范围的情况下,可以做出各种改变并且可以用等效物取代本发明的要素。此外,在不脱离本公开的基本范围的情况下,可以进行许多修改以使特定情况或材料适应教导。因此,本发明的意图并不局限于作为设想用于实施本发明的最佳模式而公开的特定实施例,而是本发明将包含落入所附权利要求的范围内的所有实施例。

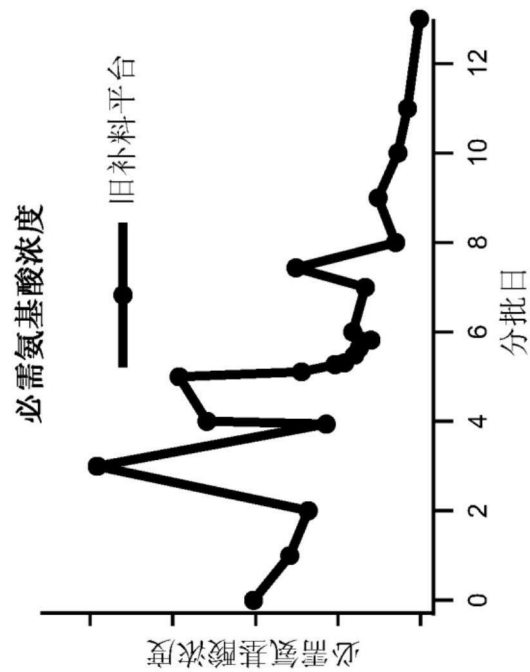


图1A

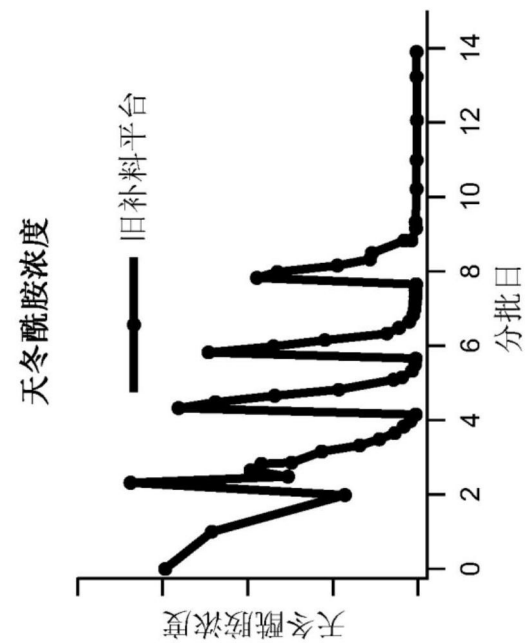


图1B

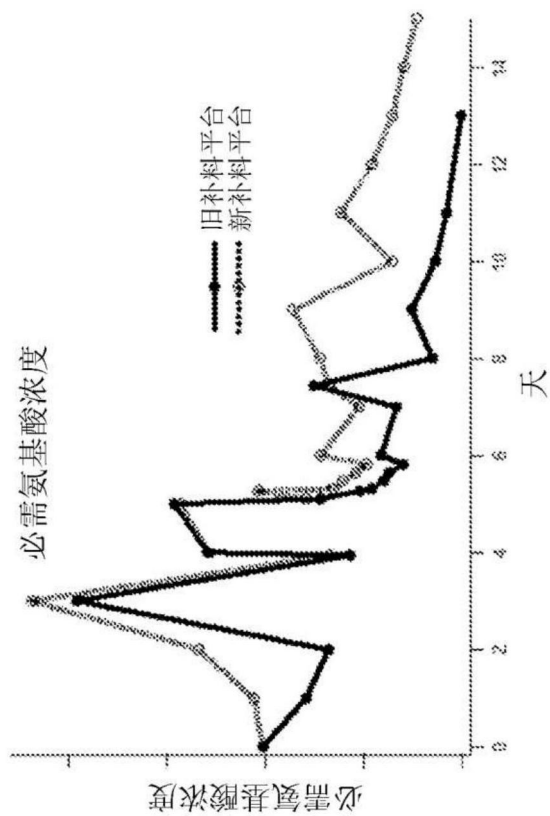


图2A

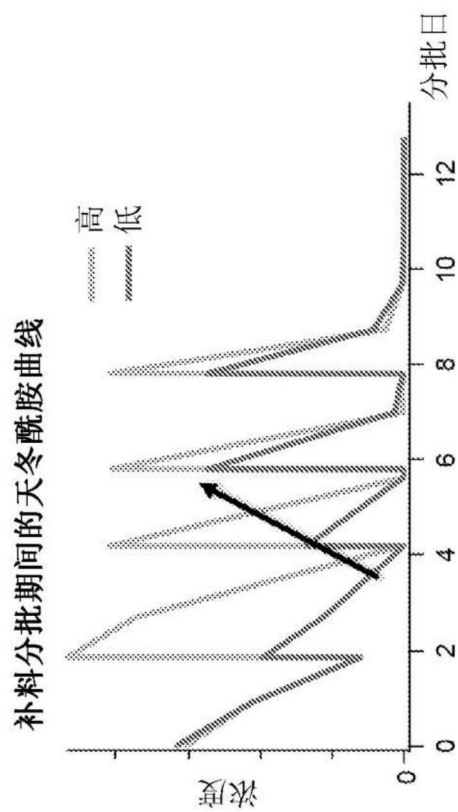


图2B

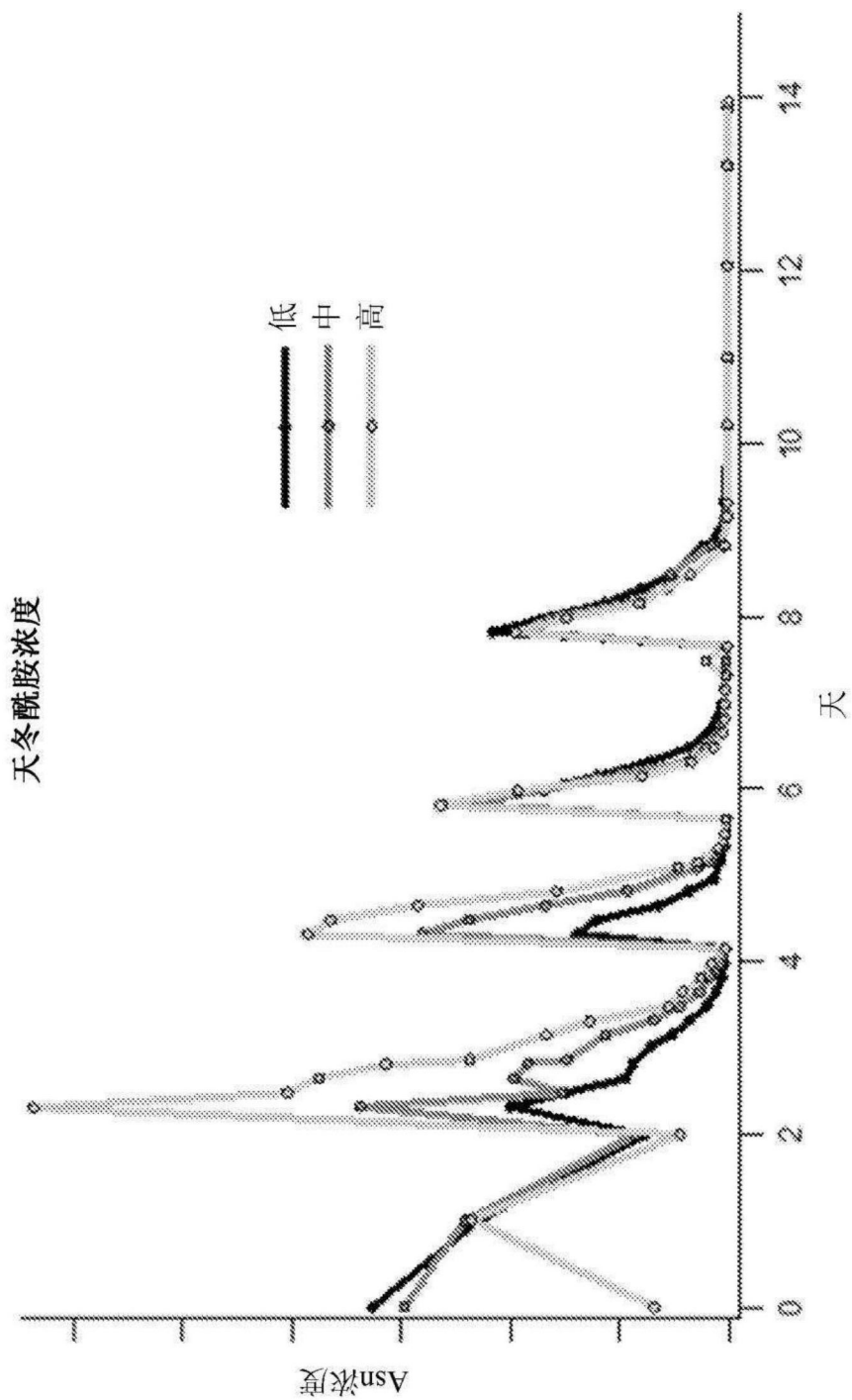


图3A

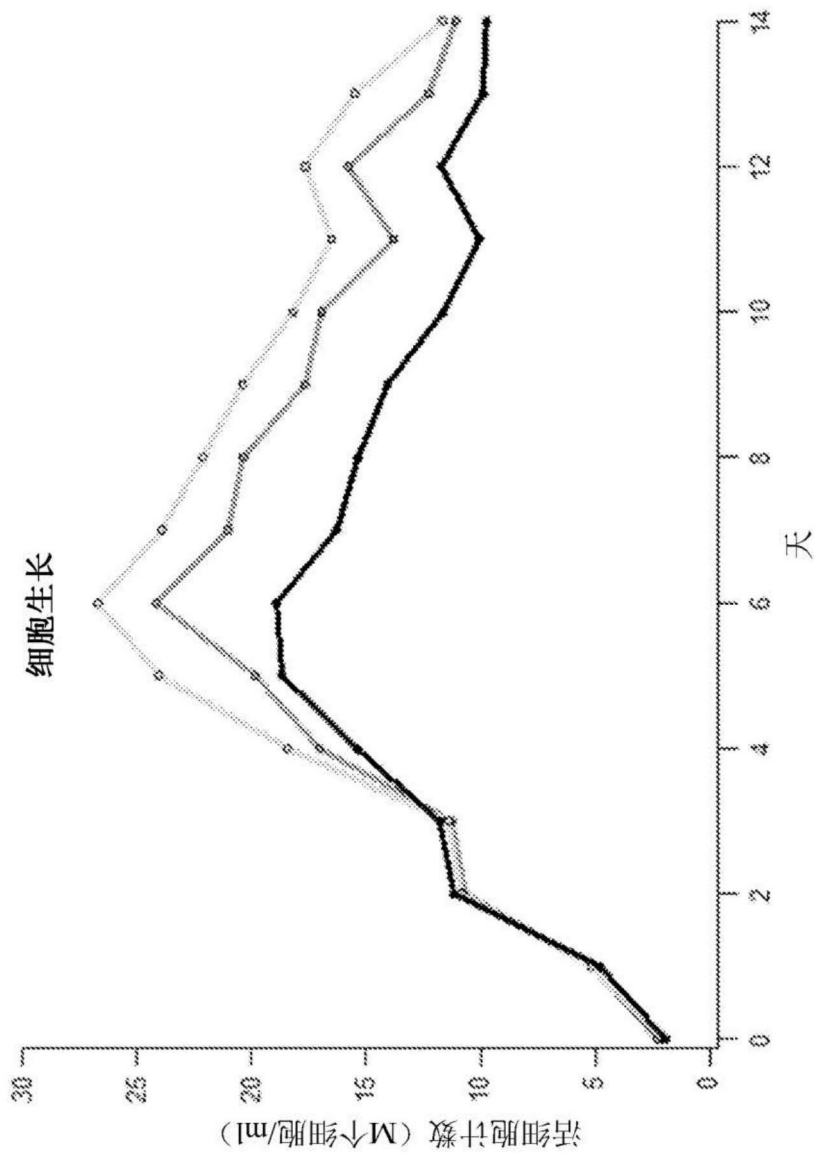


图3B

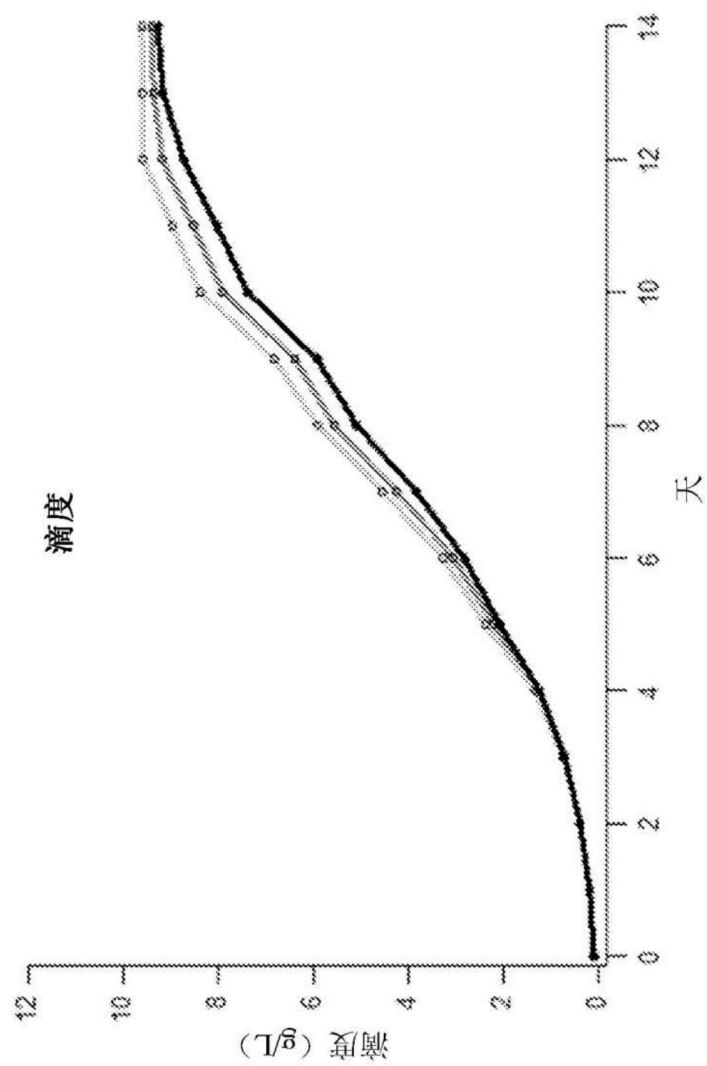


图3C

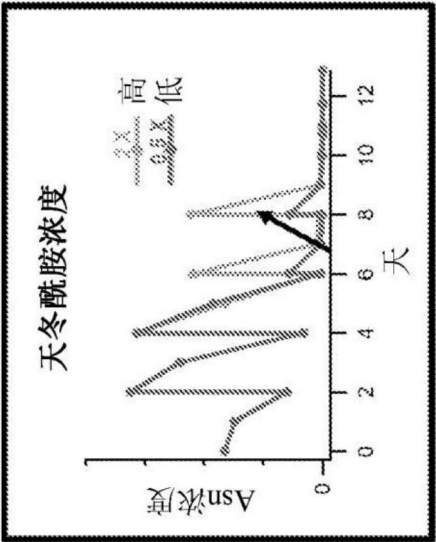


图4A

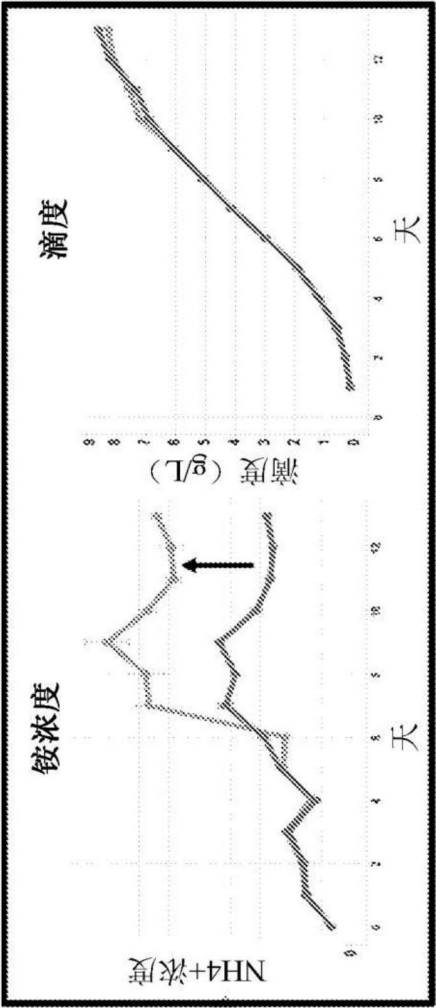


图4B

图4C

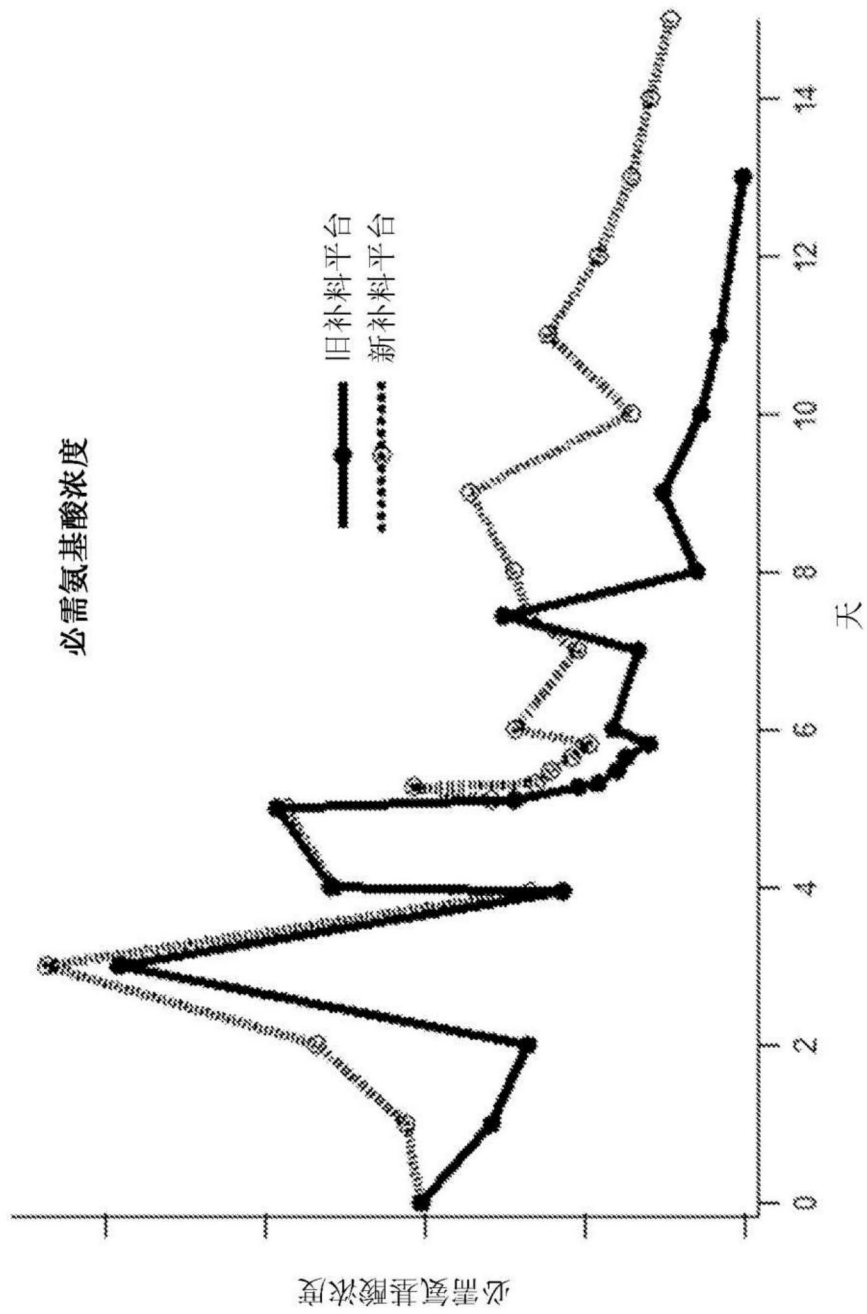


图5A

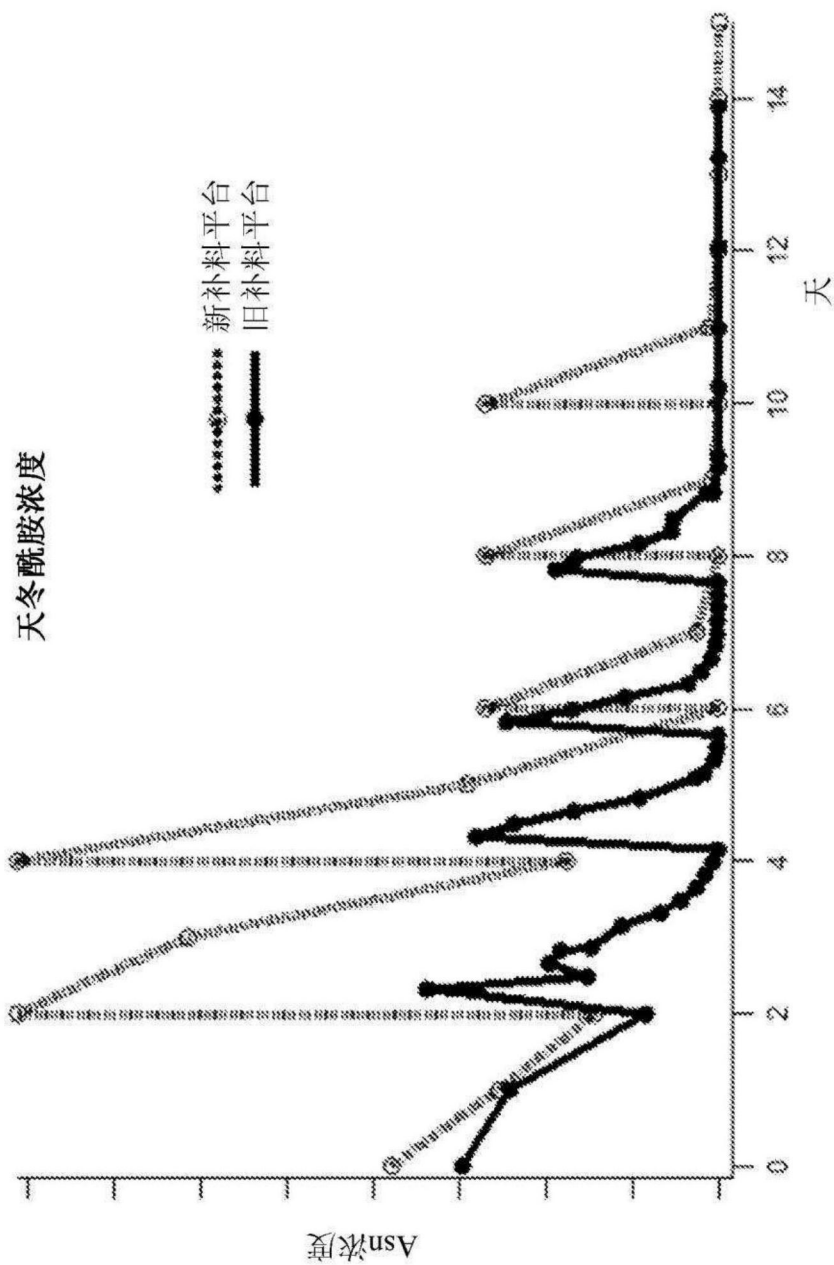


图5B

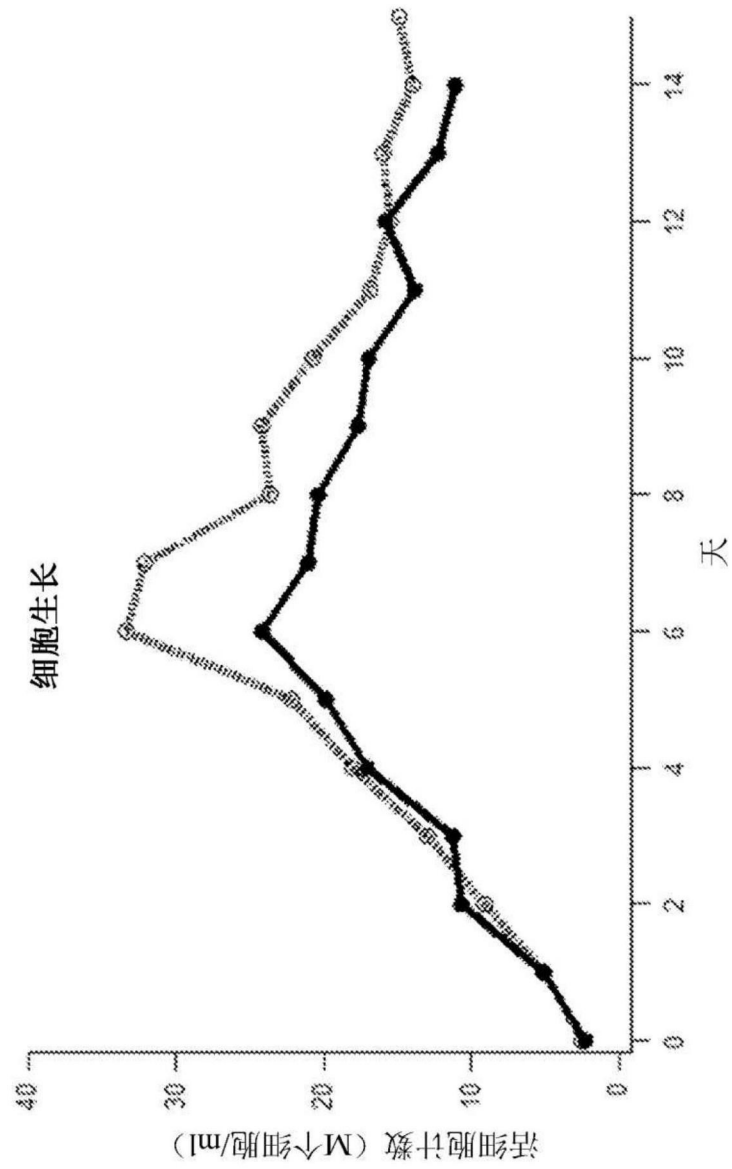


图5C

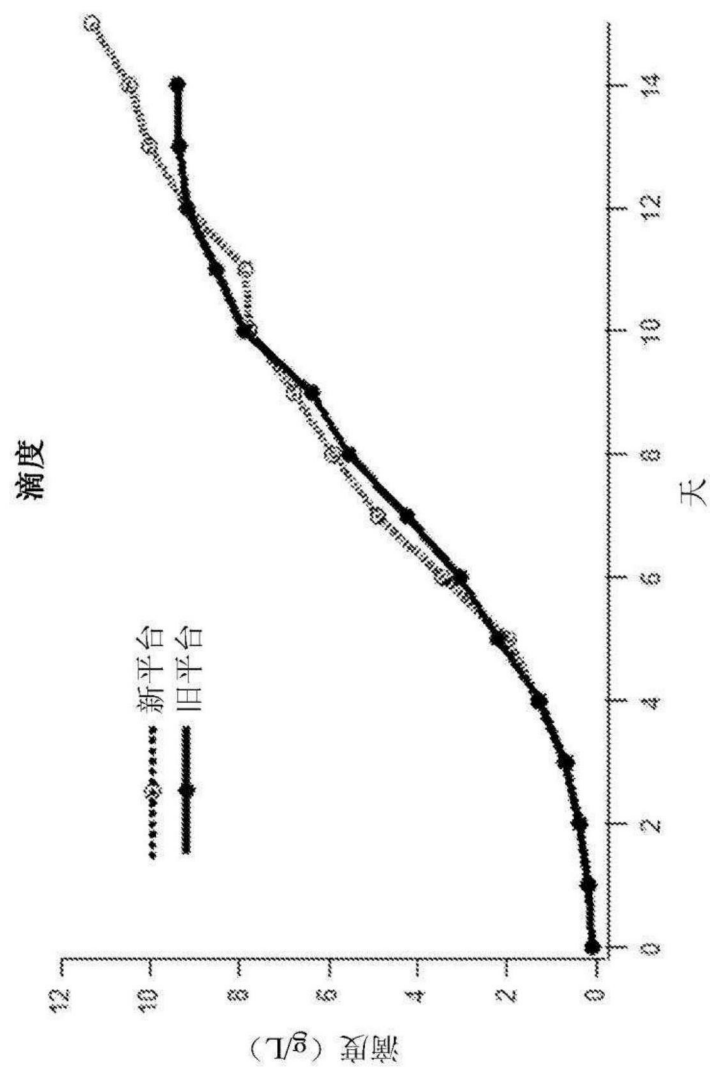


图5D

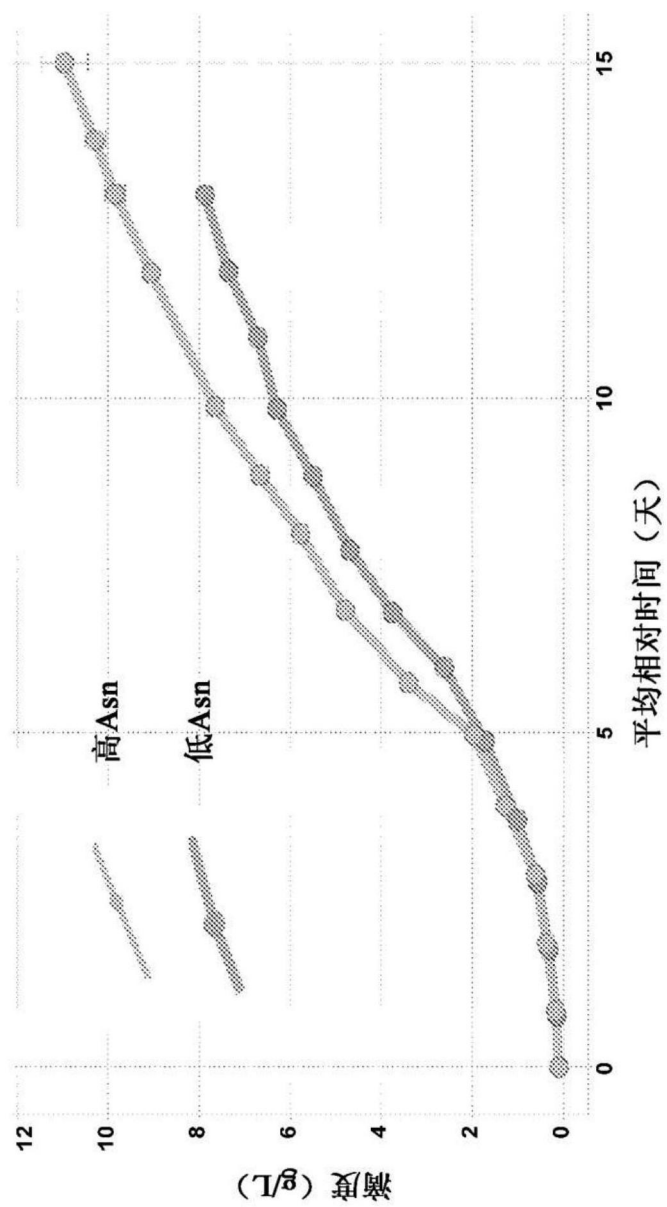


图5E

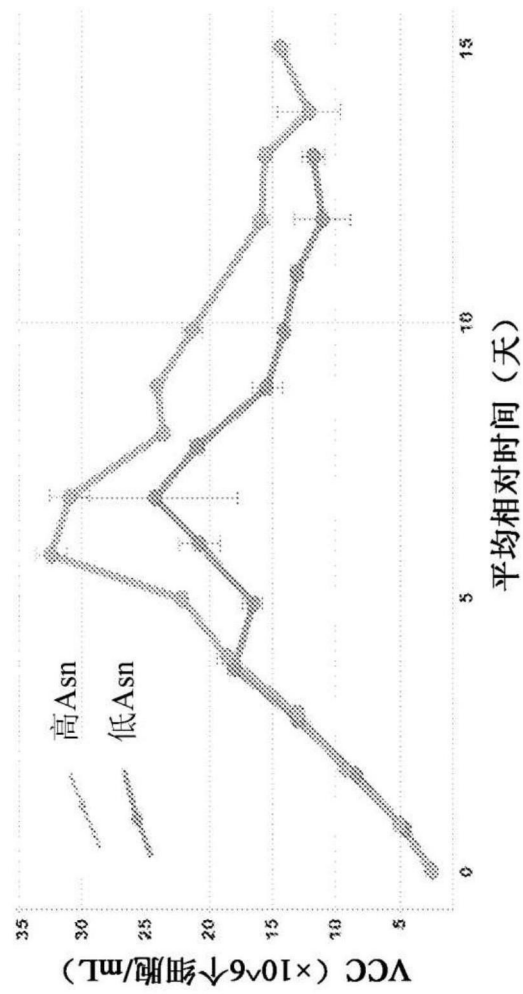


图5F

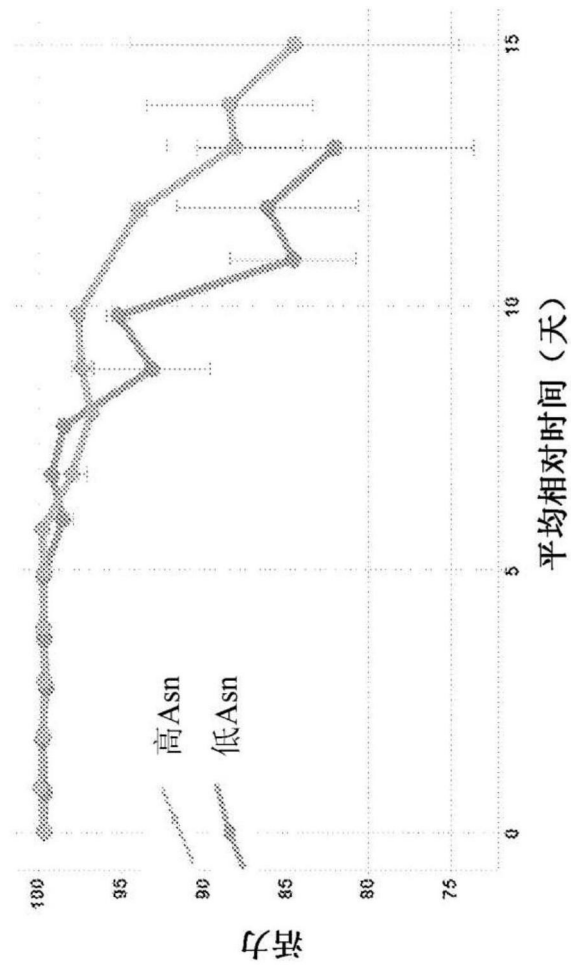


图5G

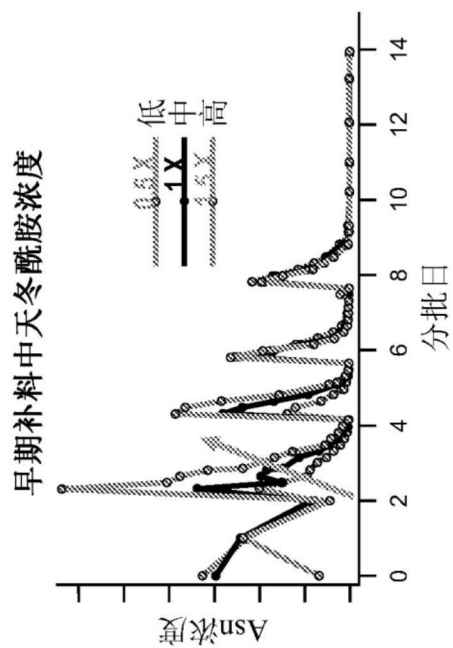


图6A

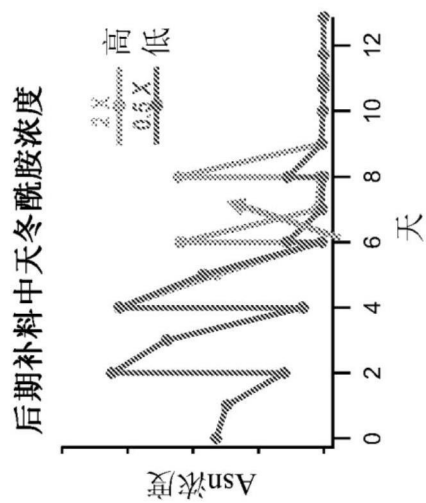


图6B

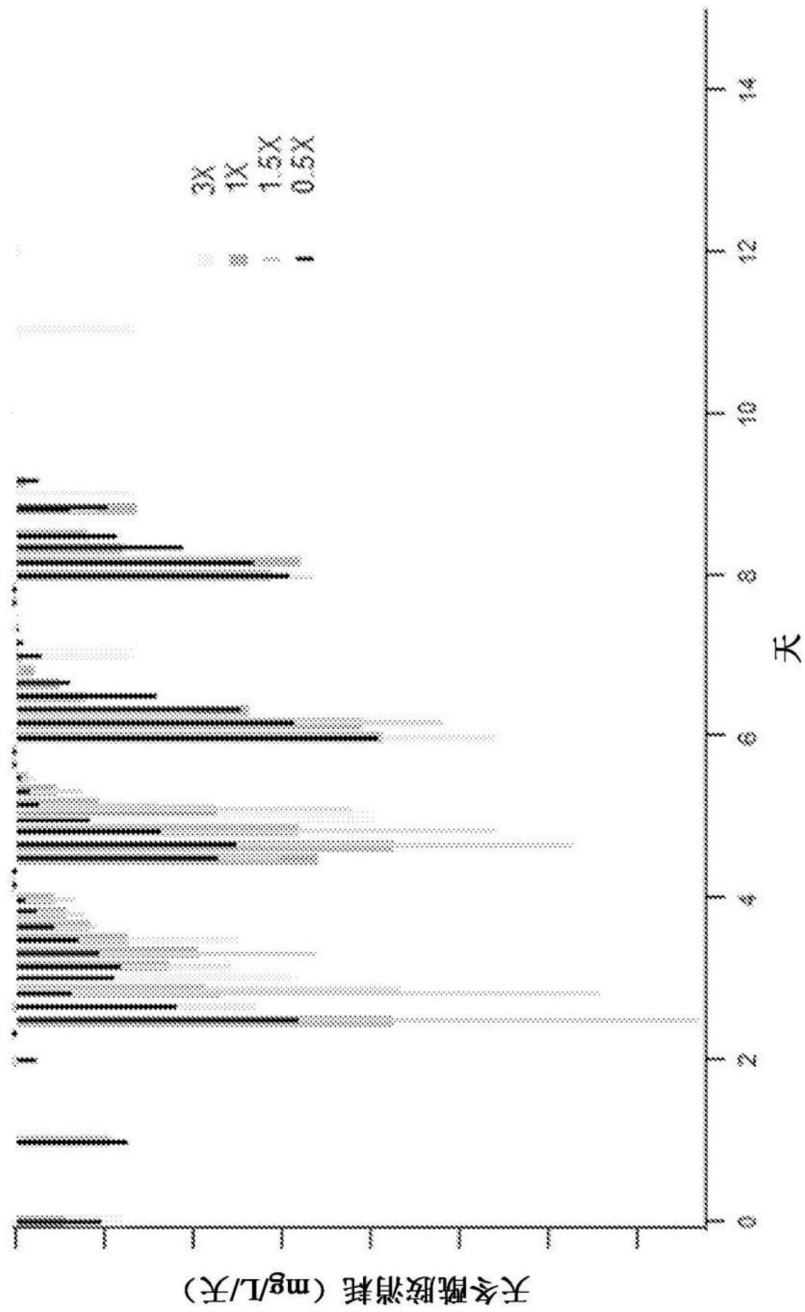


图7

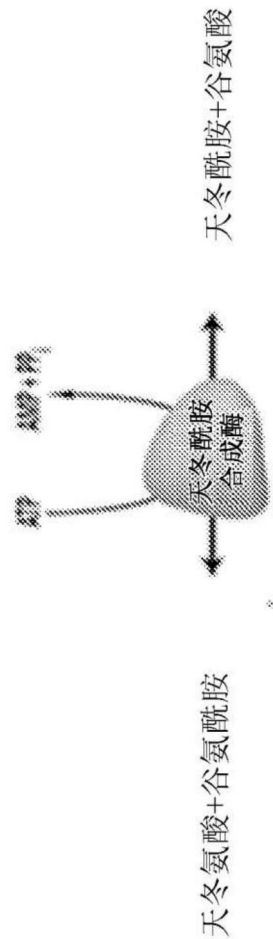


图8

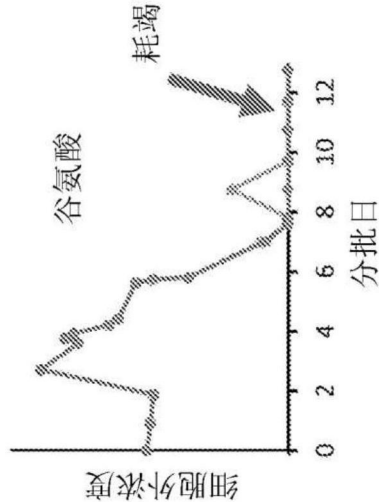


图9A

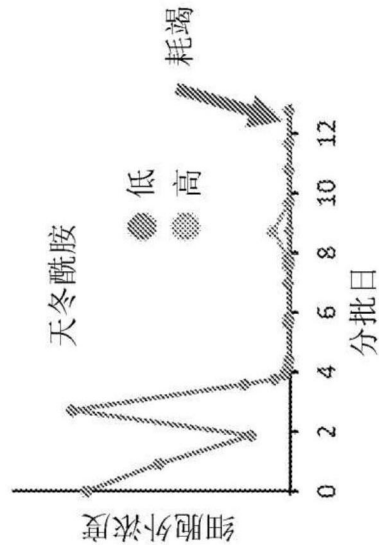


图9B

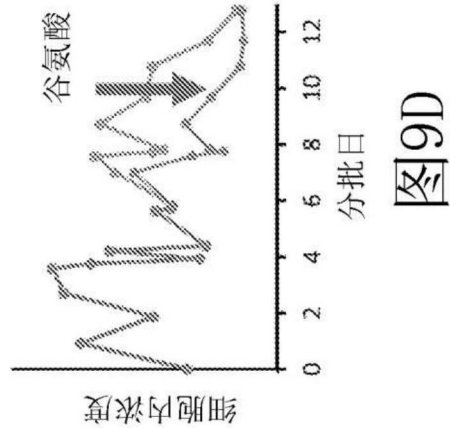


图9D

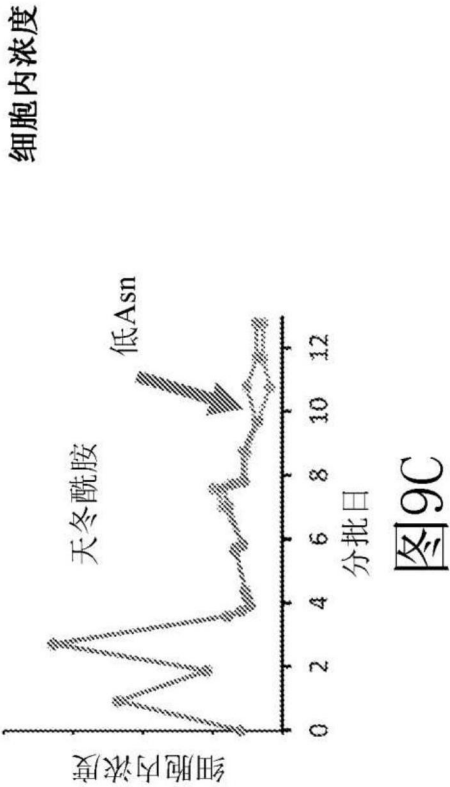


图9C

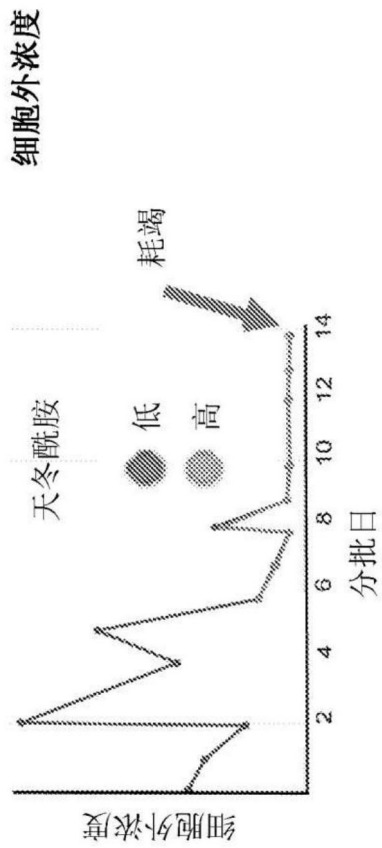


图10A

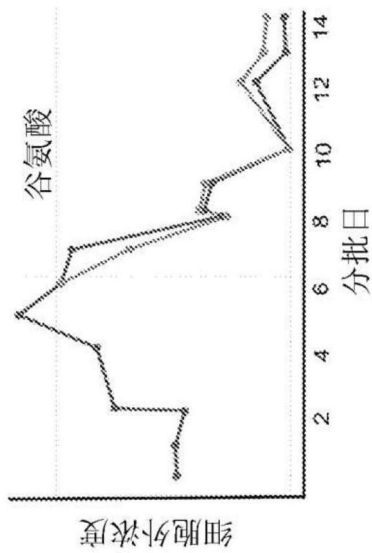


图10B

细胞内浓度

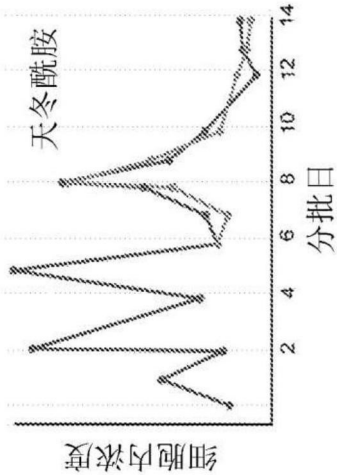


图10C

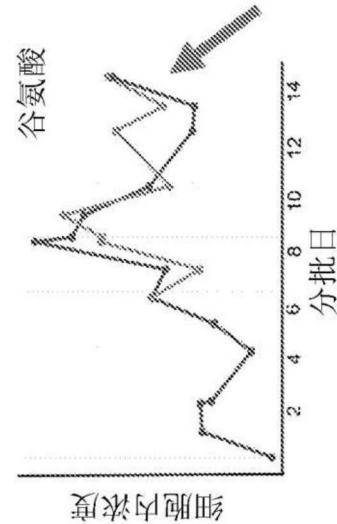


图10D

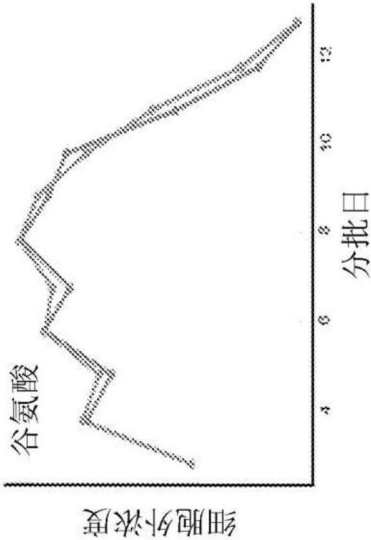


图11B

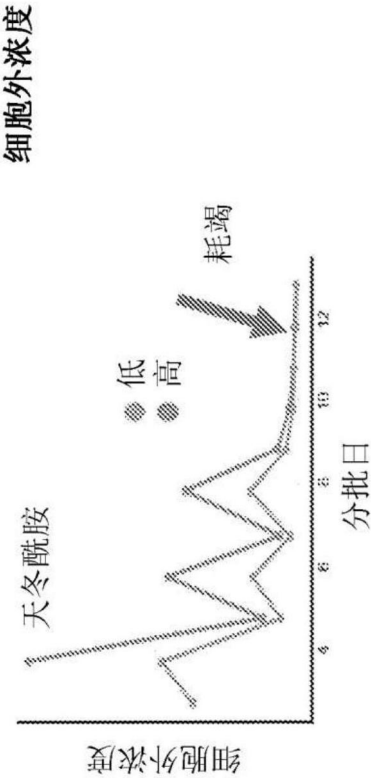
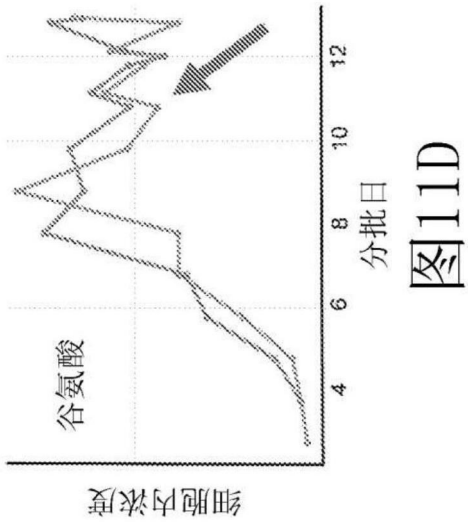
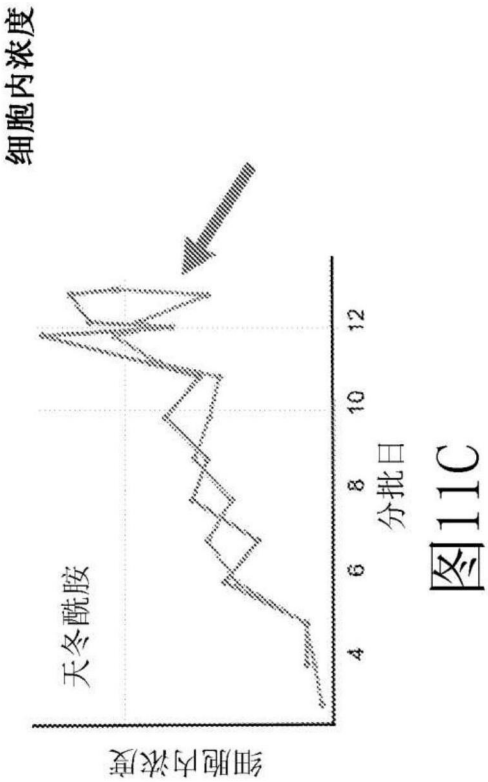


图11A



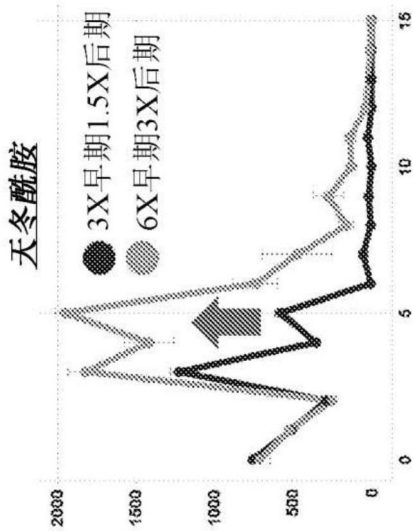


图12A

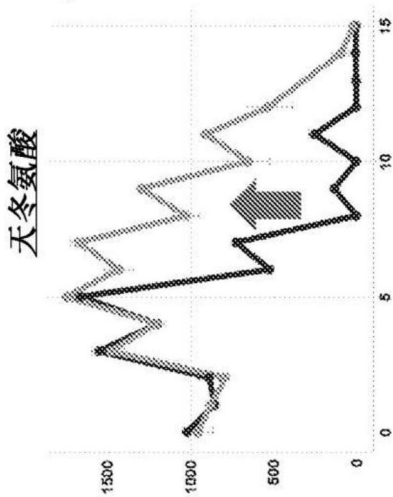


图12B

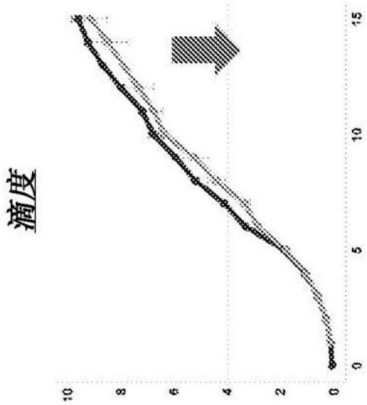


图12C

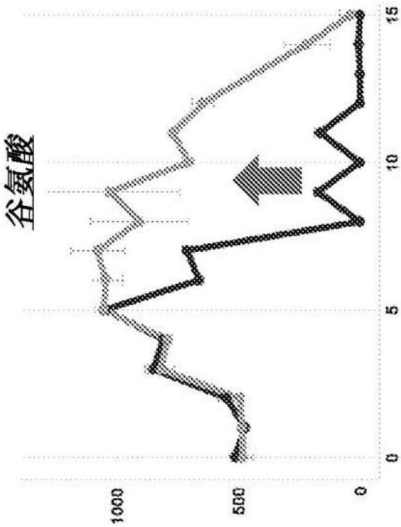


图12D

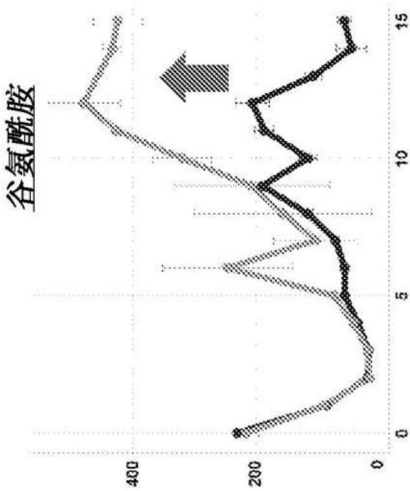


图12E

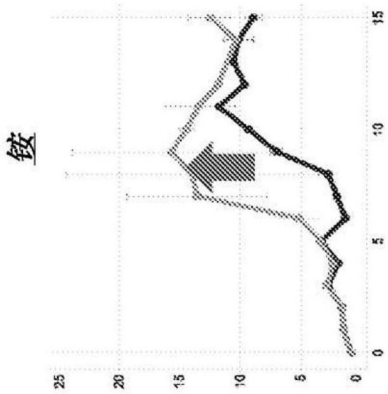


图12F

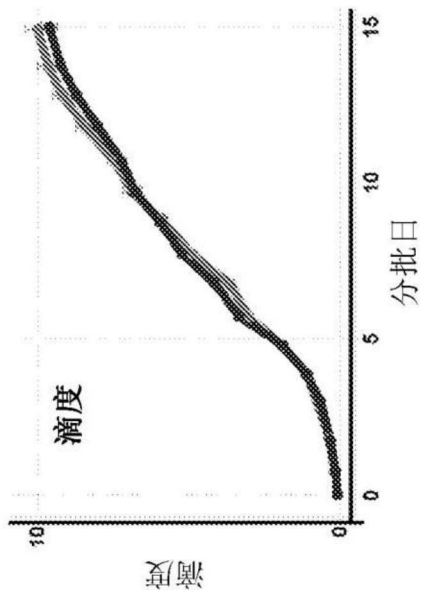


图13B

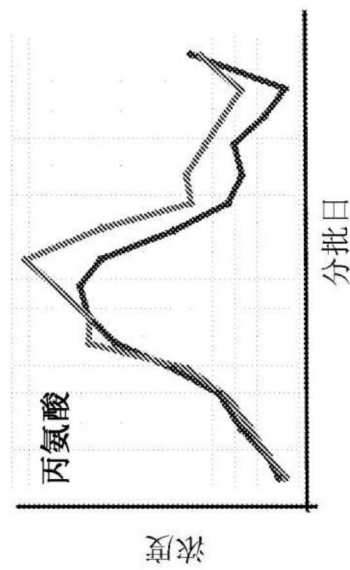


图13D

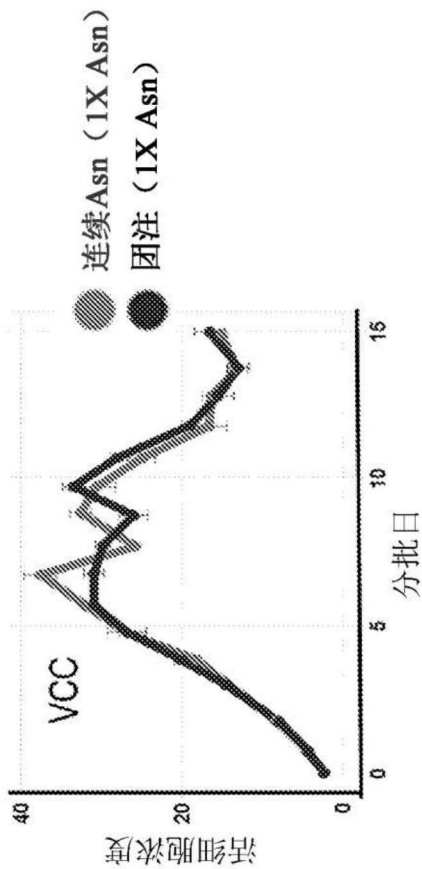


图13A

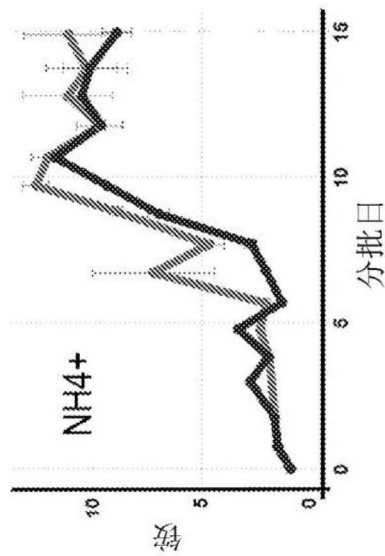


图13C

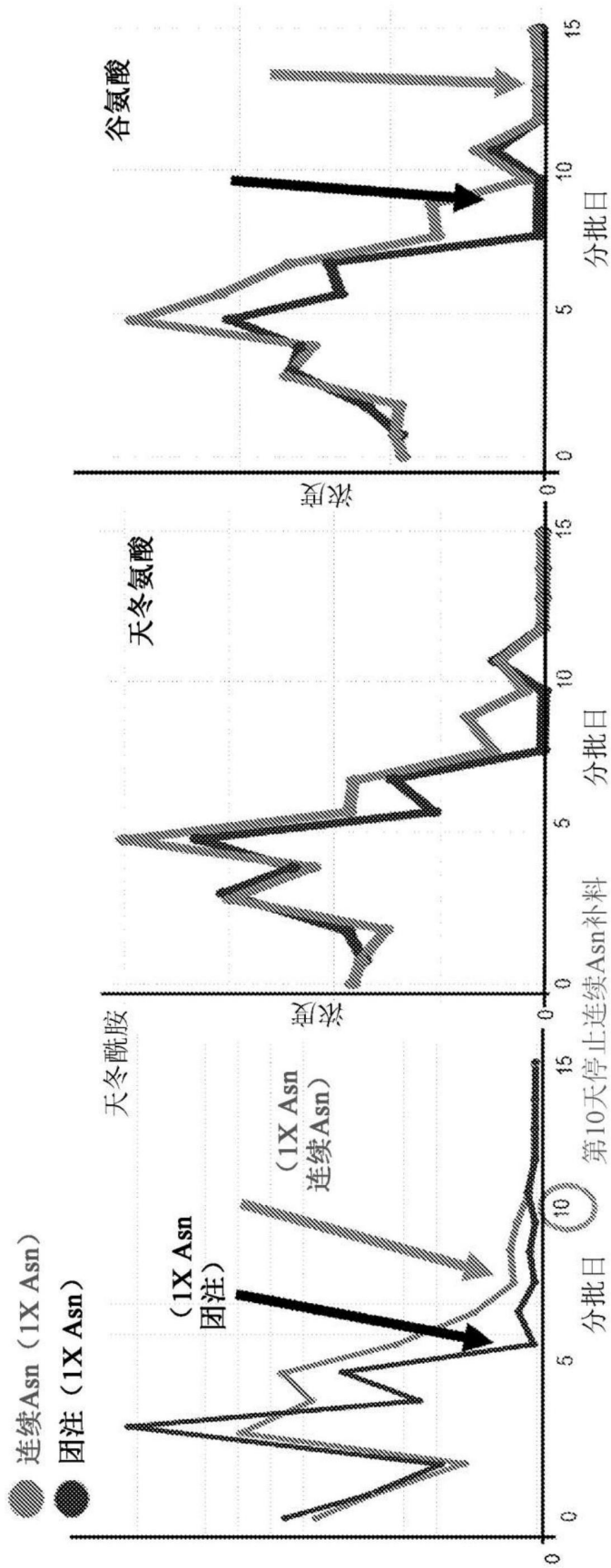


图13E

图13F

图13G



图14A

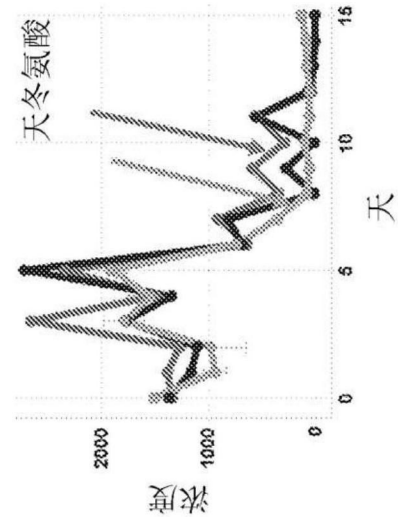


图14B

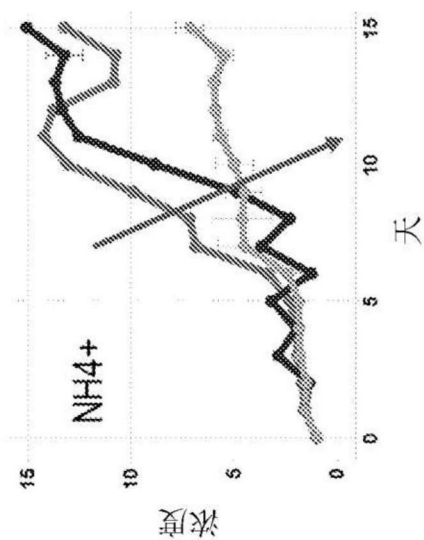


图14D

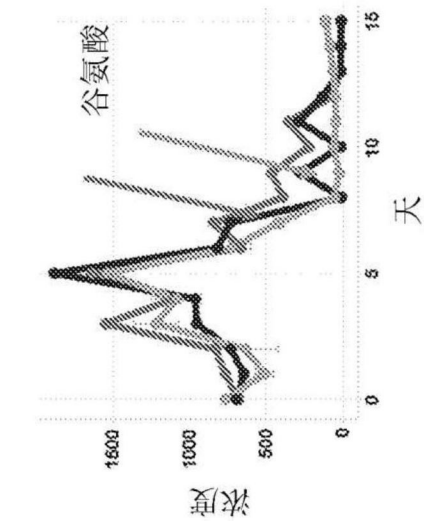


图14C

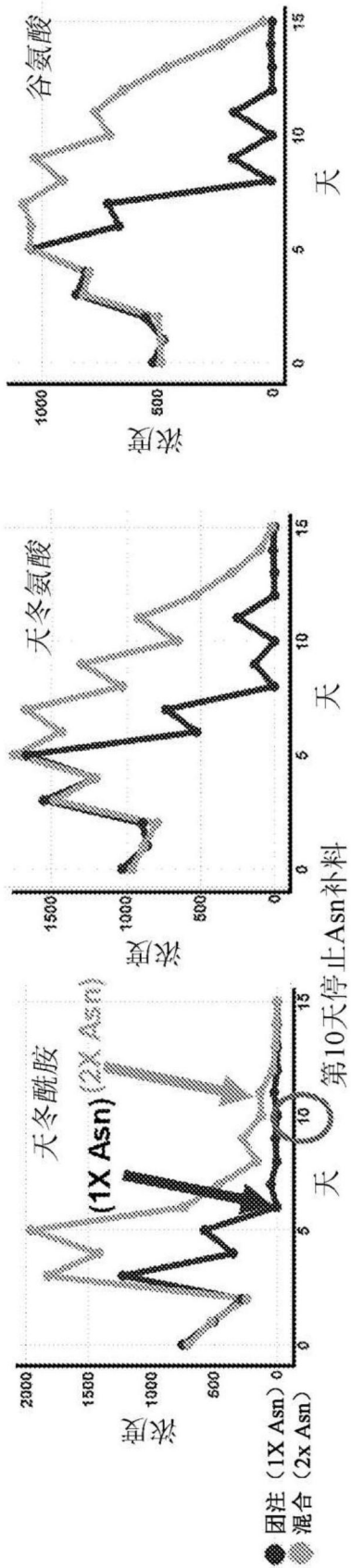


图15A

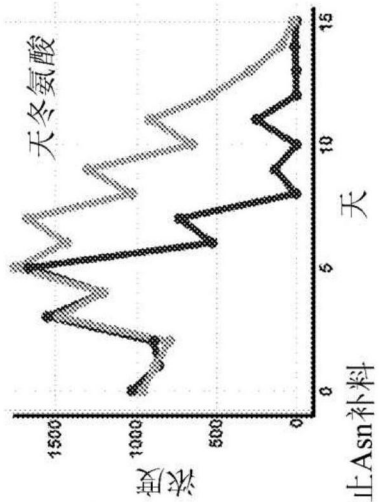


图15B

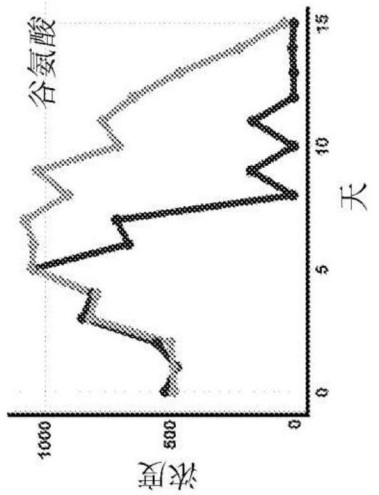


图15C

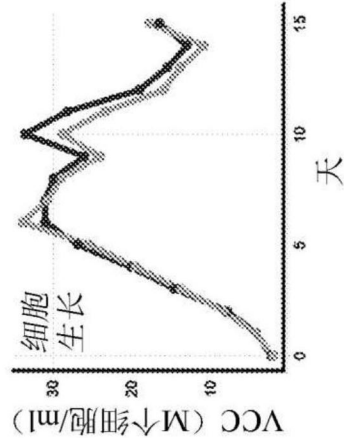


图15D

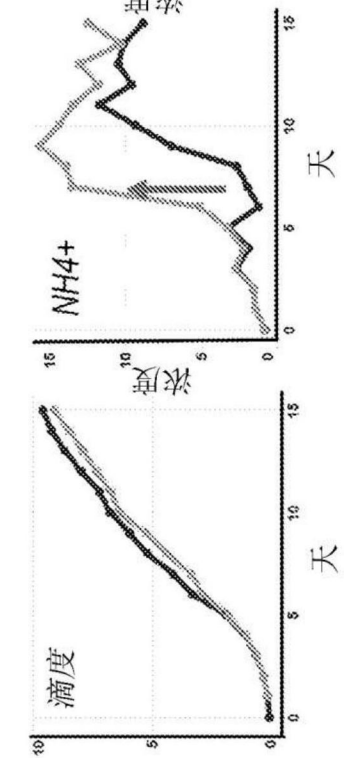


图15E

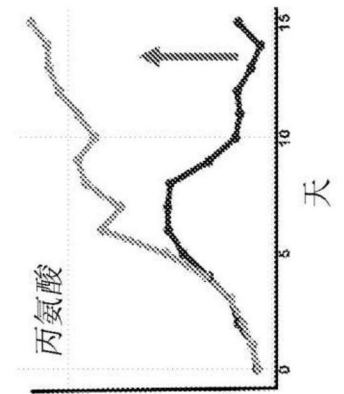


图15F

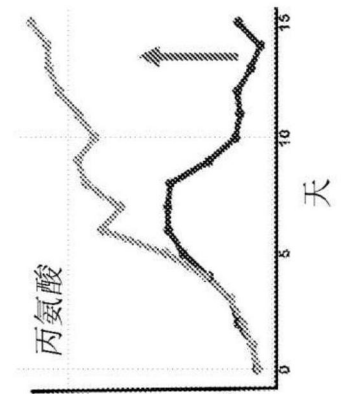


图15G

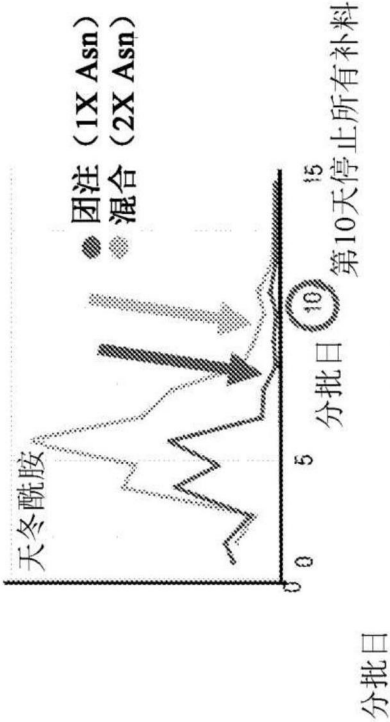


图16A

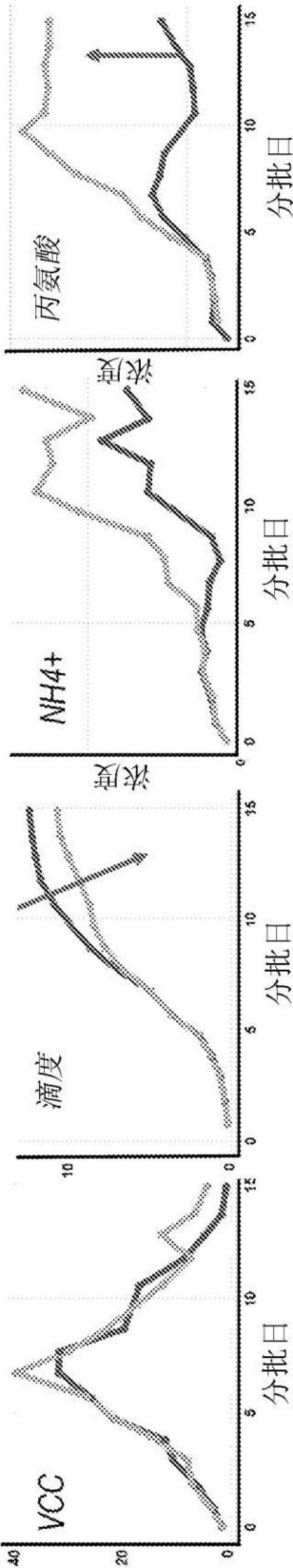


图16B

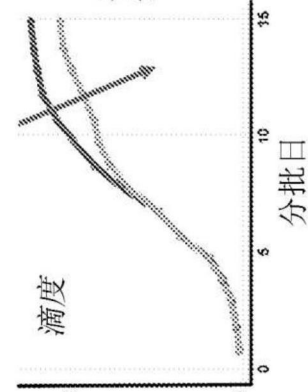


图16C

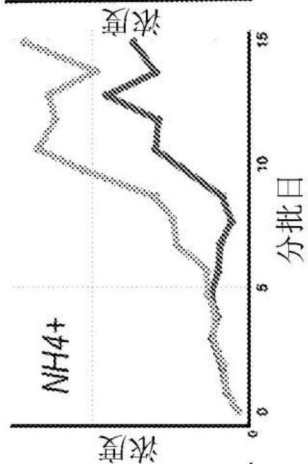


图16D

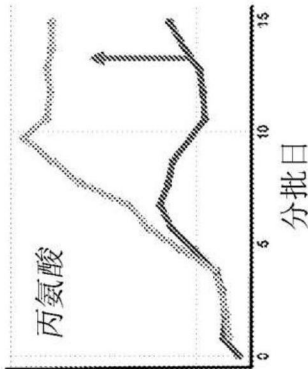


图16E

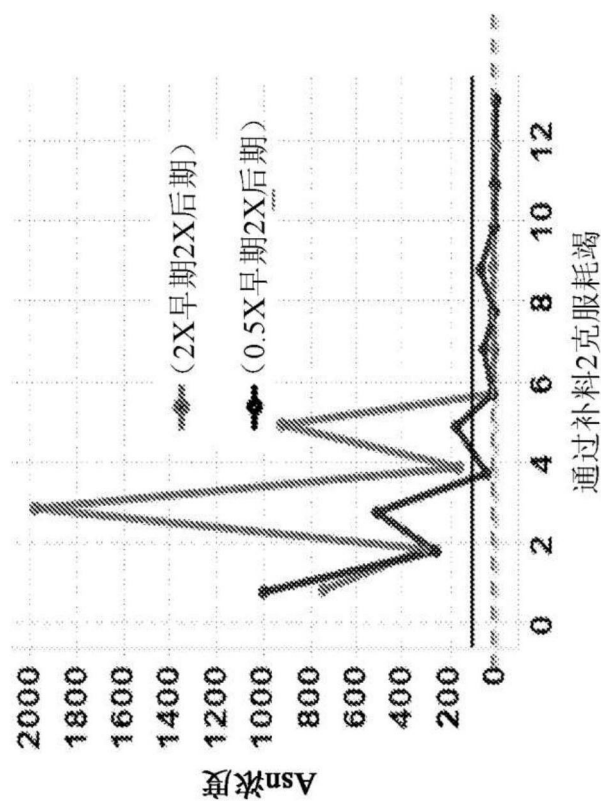


图17A

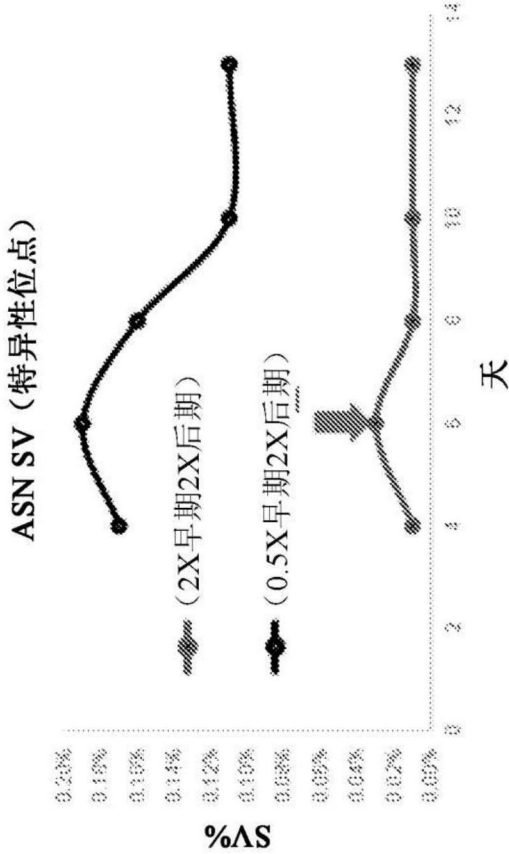


图17B

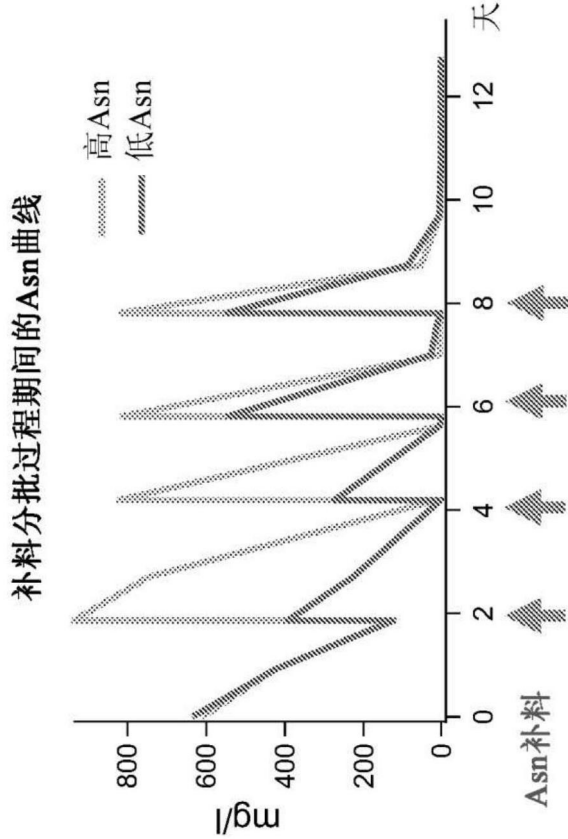


图18A

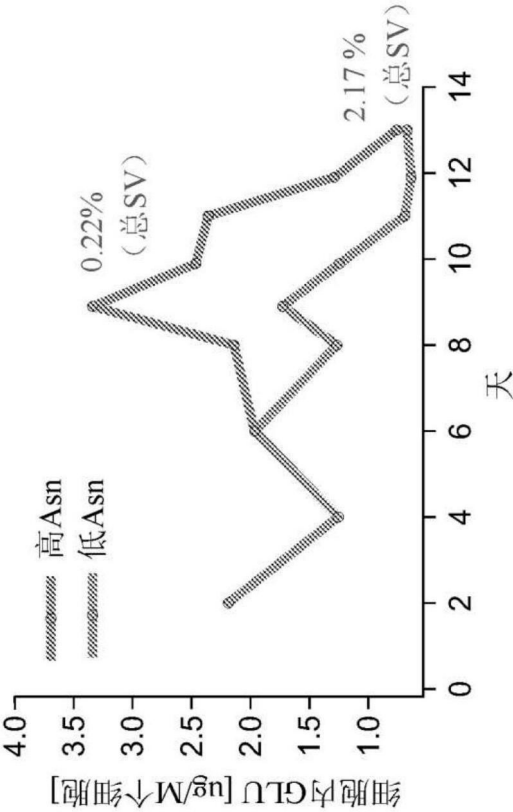


图18B

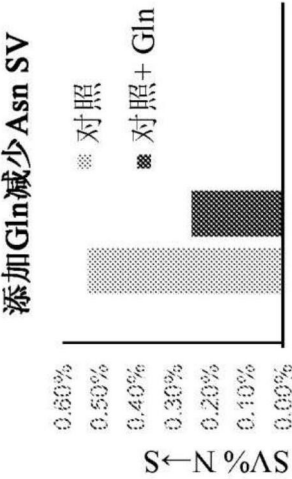


图18C

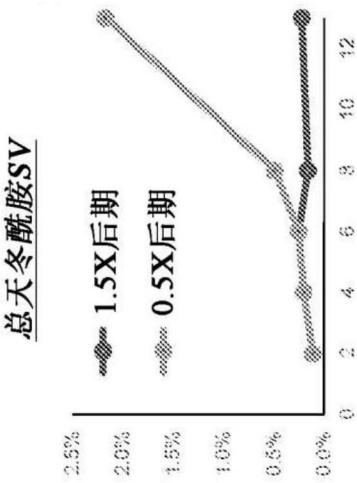


图19A

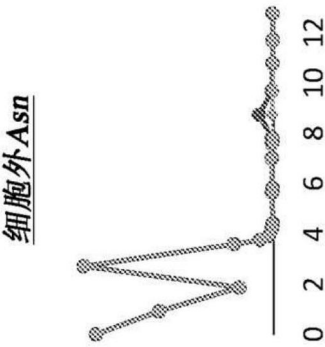


图19B

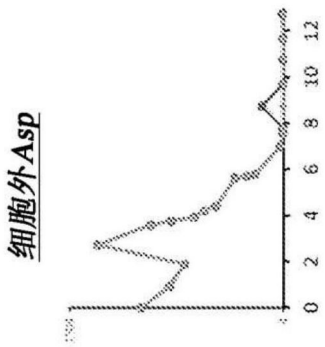


图19C

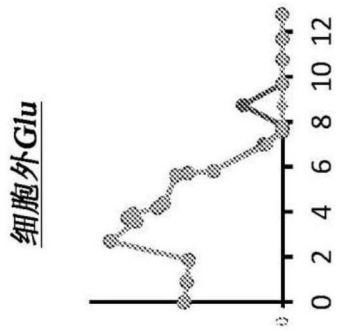


图19D

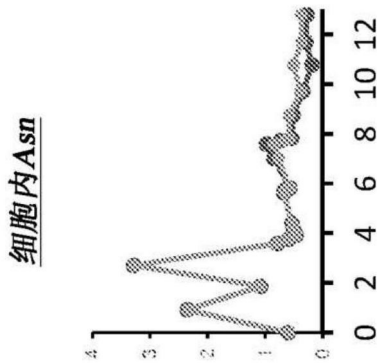


图19E

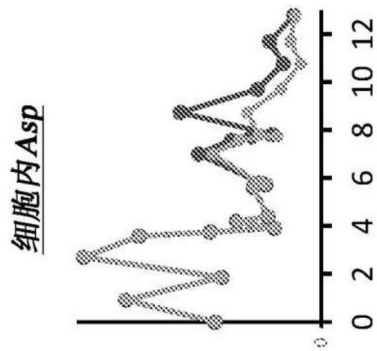


图19F

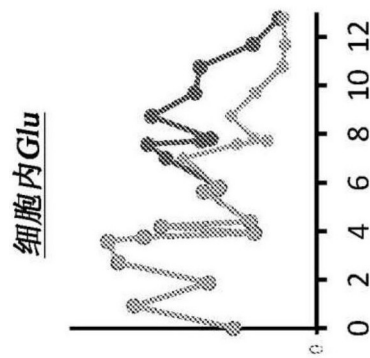


图19G

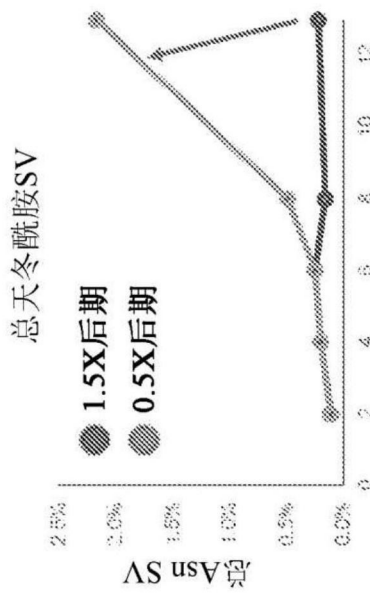


图20A

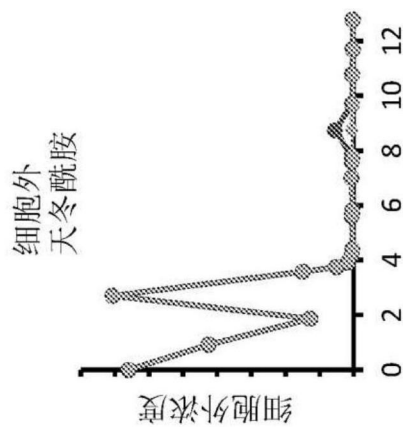


图20B

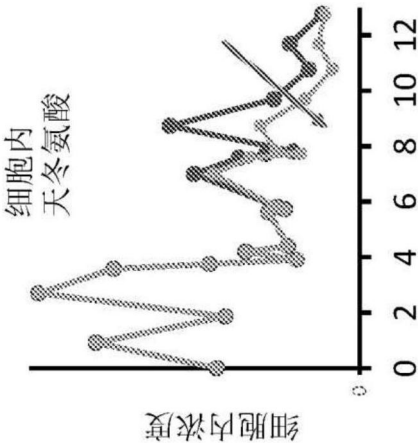


图20C

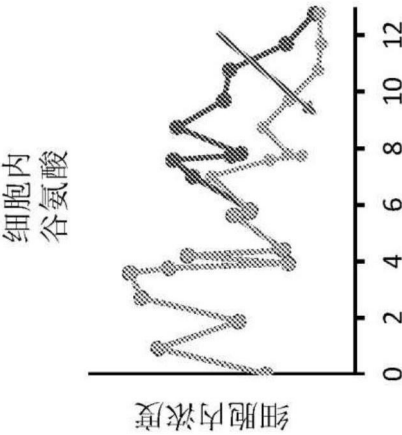


图20D

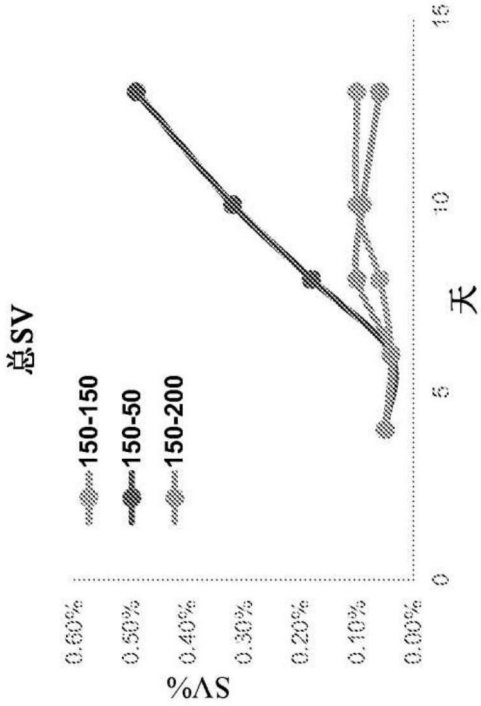


图21A

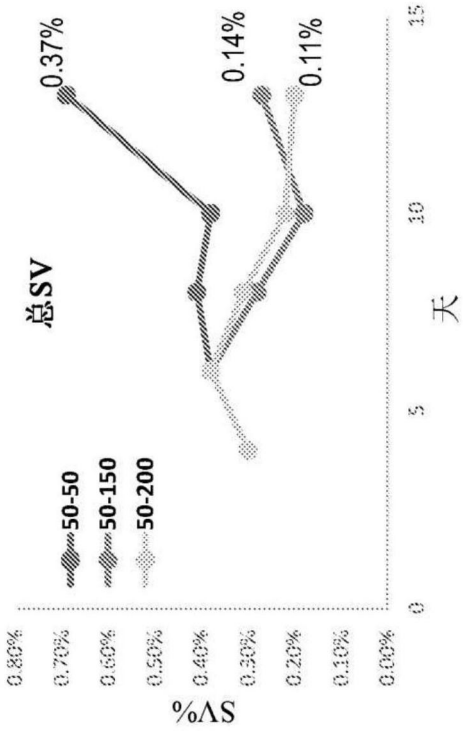


图21B

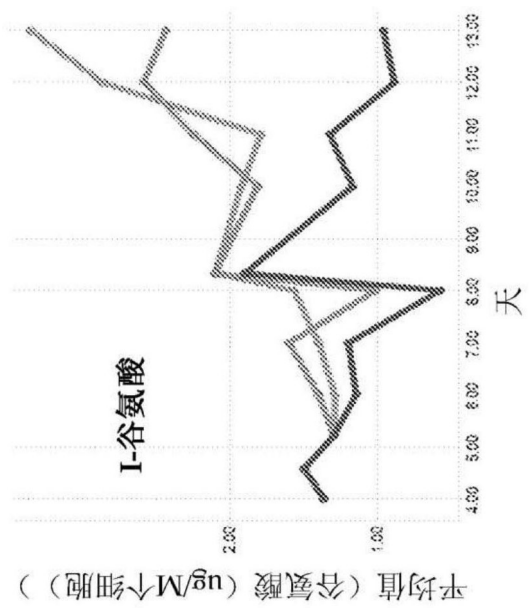


图21C

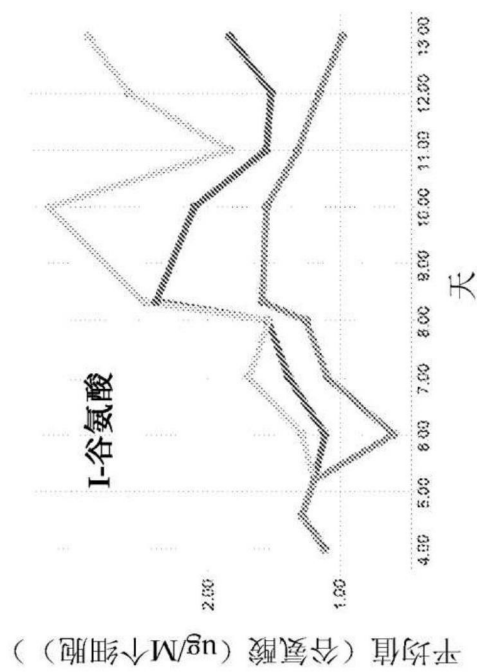


图21D

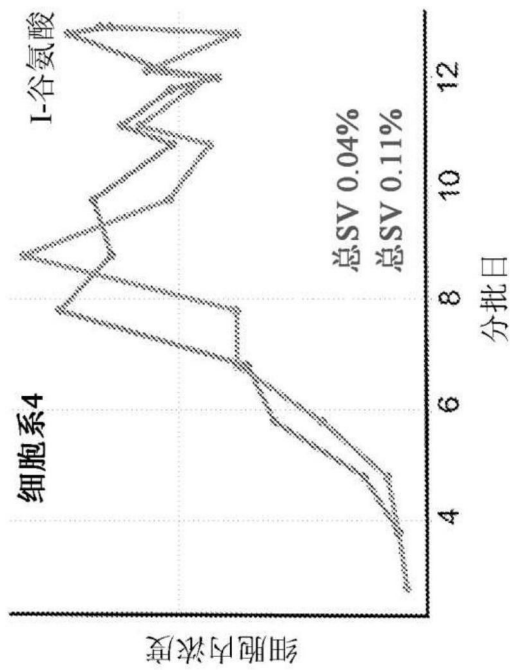


图21E

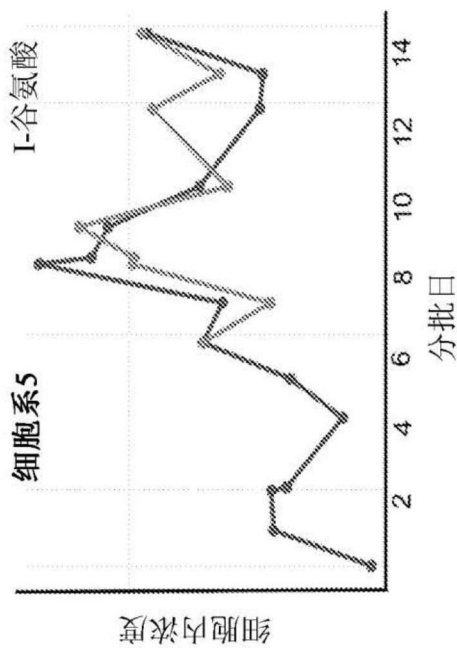


图21F

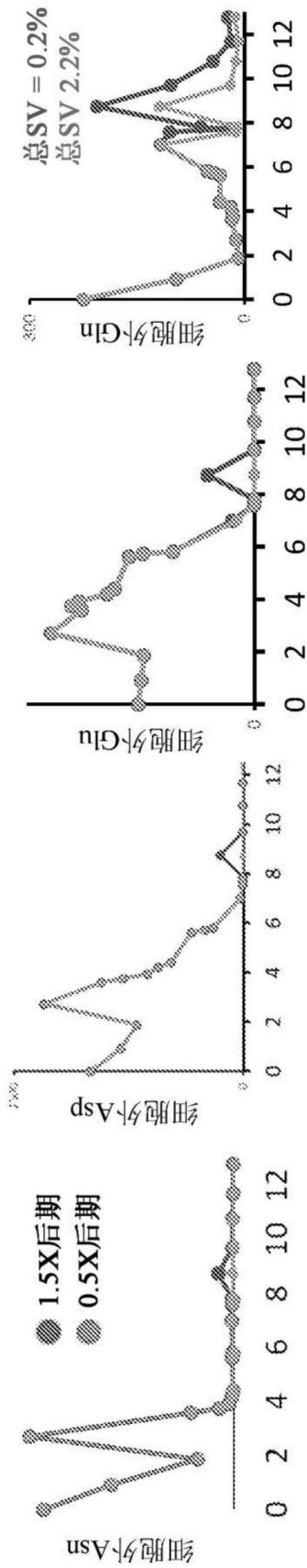


图22A

图22B

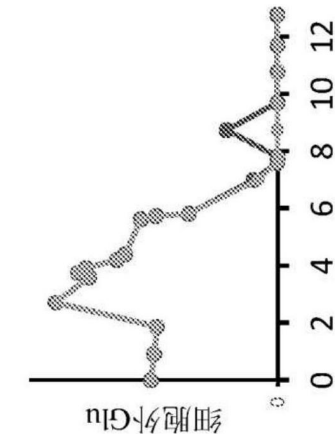


图22C

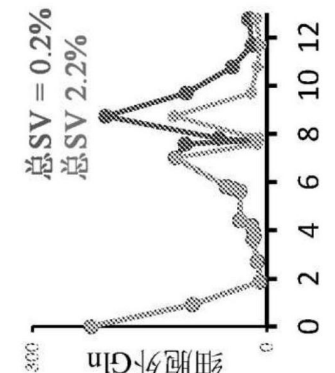


图22D

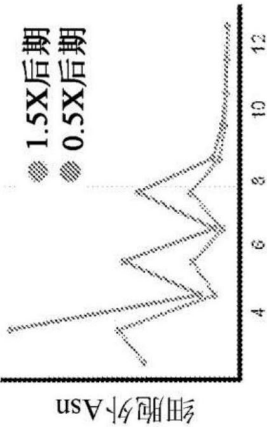


图22E

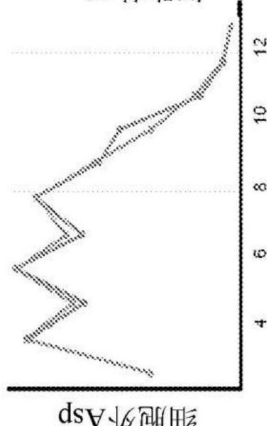


图22F

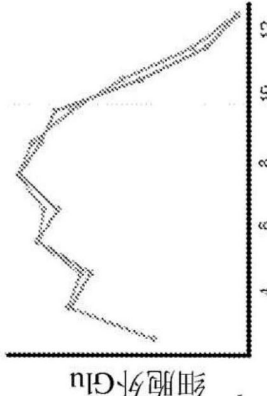


图22G

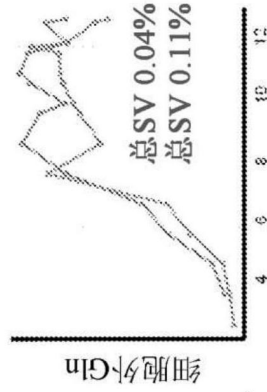


图22H

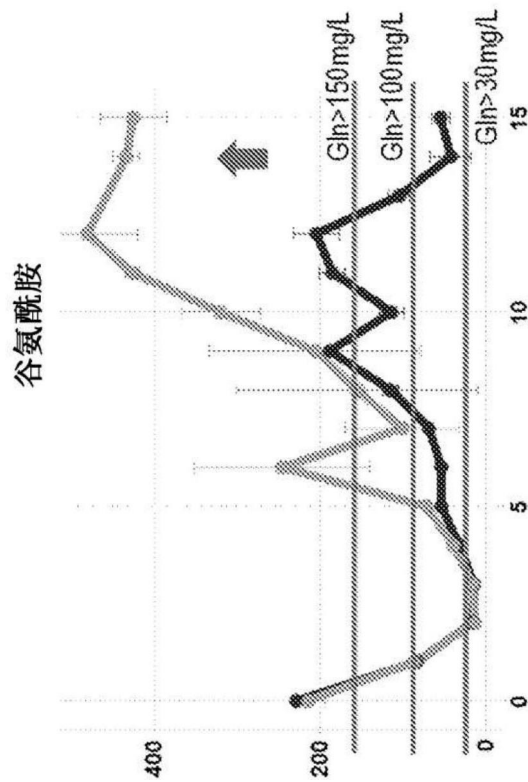


图23A

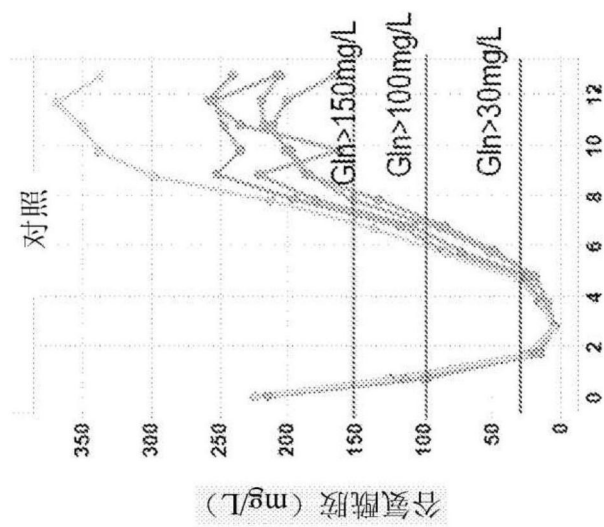


图23B

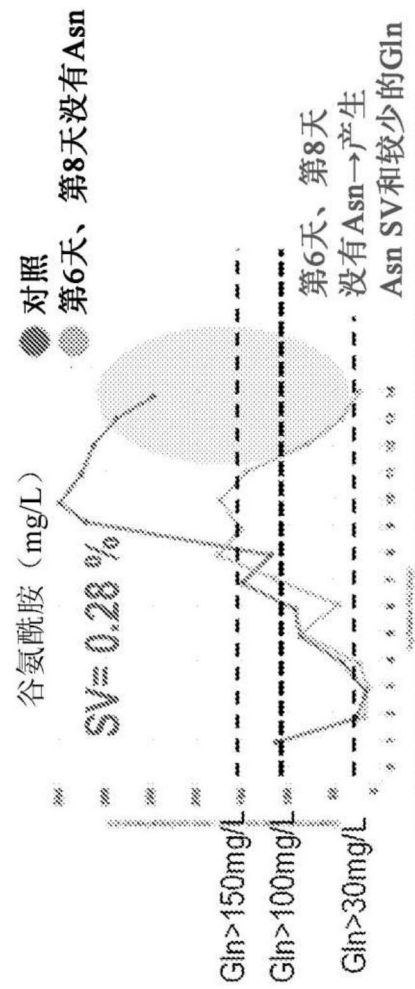


图23C