



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105246510 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201480027392. 9

(22) 申请日 2014. 03. 14

(30) 优先权数据

61/801, 247 2013. 03. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/029758 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/145091 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 V·卡瓦利亚尔 N·维贾雅桑卡兰

L·布朗 T·迪罗科 N·麦克奈特

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

C07K 16/00(2006. 01)

C12N 5/00(2006. 01)

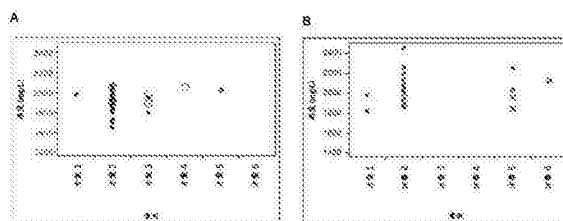
权利要求书15页 说明书50页 附图3页

(54) 发明名称

细胞培养培养基和抗体生产方法

(57) 摘要

本文中提供细胞培养培养基以及使用该培养基进行细胞培养及自细胞生成抗体的方法。还提供通过本文中的方法生成的包含抗体及其片段的组合物。



1. 一种生成贝伐珠单抗 (bevacizumab) 或其片段的方法, 其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的步骤, 其中该细胞培养培养基包含两种或更多种选铜, 胰岛素, 和胱氨酸的成分, 且其中该细胞生成贝伐珠单抗或其片段。

2. 权利要求 1 的方法, 其中该细胞培养培养基包含铜和胰岛素。

3. 权利要求 1 的方法, 其中该细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。

4. 权利要求 1 的方法, 其中该细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。

5. 权利要求 1 的方法, 其中该细胞培养培养基包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基进一步包含植物衍生的水解产物, 动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

8. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

9. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

10. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

11. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

12. 权利要求 1-6 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 25mg/L 的浓度包含胰岛素。

13. 权利要求 1-12 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 69nM 至约 1,000nM 的浓度包含铜。

14. 权利要求 1-12 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 375nM 的浓度包含铜。

15. 权利要求 1-12 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 350nM 的浓度包含铜。

16. 权利要求 1-12 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一浓度包含铜。

17. 权利要求 1-12 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 339nM 的浓度包含铜。

18. 权利要求 1-17 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 0.7mM 至约 2.0mM 的浓度包含胱氨酸。

19. 权利要求 1-17 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1.0mM 至约 1.6mM 的浓度包含胱氨酸。

20. 权利要求 1-17 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1.2mM 至约 1.4mM 的浓度包含胱氨酸。

21. 权利要求 1-17 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 1.3mM 的浓度包含胱氨酸。

22. 权利要求 1-21 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

23. 权利要求 1-21 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 8.0g/L 至约 12.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

24. 权利要求 1-21 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 9.0g/L 至约 11.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

25. 权利要求 1-21 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 13g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

26. 权利要求 1-25 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.0g/L 至约 10.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

27. 权利要求 1-25 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 2.0g/L 至约 3.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

28. 权利要求 1-25 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 2.25g/L 至约 2.75g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

29. 权利要求 1-25 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 3.1g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

30. 权利要求 1-29 任一项的方法,其中该细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者,且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。

31. 权利要求 1-30 任一项的方法,其中该细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。

32. 权利要求 31 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素一次。

33. 权利要求 31 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。

34. 权利要求 31 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。

35. 权利要求 31-34 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

36. 权利要求 31-34 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

37. 权利要求 31-34 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

38. 权利要求 31-34 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

39. 权利要求 31-34 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

40. 权利要求 31-34 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以约 15mg/L 的浓度提供胰岛素。

41. 权利要求 1-40 任一项的方法,其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加半胱氨酸的步骤。

42. 权利要求 41 的方法,其中半胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.5 至约 2.0mM 半胱氨酸。

43. 权利要求 41 的方法,其中半胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供约 0.8mM 半胱氨酸。

44. 权利要求 1-43 任一项的方法,其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加胱氨酸的步骤。

45. 权利要求 44 的方法,其中胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1 至约 1.5mM 胱氨酸。

46. 权利要求 44 的方法,其中胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供约 0.2mM 胱氨酸。

47. 权利要求 1-46 任一项的方法,其中于范围为自约 28℃至约 37℃的温度培养细胞。

48. 权利要求 47 的方法,其中于范围为自约 31℃至约 35℃的温度培养细胞。

49. 权利要求 1-46 任一项的方法,其中细胞于约 35℃的第一温度培养第一时间段,于约 33℃的第二温度培养第二时间段,并于约 31℃的第三温度培养第三时间段。

50. 权利要求 1-49 任一项的方法,其中贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基中。

51. 权利要求 1-50 任一项的方法,其进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。

52. 通过权利要求 1-51 任一项的方法生成的贝伐珠单抗或其片段。

53. 一种组合物,其包含:(i)通过权利要求 1-51 任一项的方法生成的贝伐珠单抗或其片段,和(ii)药学可接受载体。

54. 一种培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法,该方法包括使哺乳动物细胞与包含两种或更多种选自铜,胰岛素和胱氨酸的成分的细胞培养培养基接触的步骤。

55. 权利要求 54 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜和胰岛素。

56. 权利要求 54 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。

57. 权利要求 54 的方法,其中该细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。

58. 权利要求 54 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜,胰岛素,和胱氨酸。

59. 权利要求 54-58 任一项的方法,其中该细胞培养培养基进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。

60. 权利要求 54-59 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

61. 权利要求 54-59 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

62. 权利要求 54-59 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

63. 权利要求 54-59 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约

35. 0mg/L 的浓度包含胰岛素。

64. 权利要求 54-59 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10. 0mg/L 至约 25. 0mg/L 的浓度包含胰岛素。

65. 权利要求 54-59 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 25mg/L 的浓度包含胰岛素。

66. 权利要求 54-65 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 69nM 至约 1, 000nM 的浓度包含铜。

67. 权利要求 54-65 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 375nM 的浓度包含铜。

68. 权利要求 54-65 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 350nM 的浓度包含铜。

69. 权利要求 54-65 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一的浓度包含铜。

70. 权利要求 54-65 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 339nM 的浓度包含铜。

71. 权利要求 54-70 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 0. 7mM 至约 2. 0mM 的浓度包含胱氨酸。

72. 权利要求 54-70 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1. 0mM 至约 1. 6mM 的浓度包含胱氨酸。

73. 权利要求 54-70 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1. 2mM 至约 1. 4mM 的浓度包含胱氨酸。

74. 权利要求 54-70 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 1. 3mM 的浓度包含胱氨酸。

75. 权利要求 54-74 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 6. 0g/L 至约 20. 0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

76. 权利要求 54-74 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 8. 0g/L 至约 12. 0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

77. 权利要求 54-74 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 9. 0g/L 至约 11. 0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

78. 权利要求 54-74 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 13g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

79. 权利要求 54-78 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1. 0g/L 至约 10. 0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

80. 权利要求 54-78 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 2. 0g/L 至约 3. 0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

81. 权利要求 54-78 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 2. 25g/L 至约 2. 75g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

82. 权利要求 54-78 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 3. 1g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

83. 权利要求 54-82 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物

和植物衍生的水解产物二者,且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。

84. 权利要求 54-83 任一项的方法,其中该细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。

85. 权利要求 84 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素一次。

86. 权利要求 84 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。

87. 权利要求 84 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。

88. 权利要求 84-87 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

89. 权利要求 84-87 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

90. 权利要求 84-87 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

91. 权利要求 84-87 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

92. 权利要求 84-87 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

93. 权利要求 84-87 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以约 15mg/L 的浓度提供胰岛素。

94. 权利要求 54-93 任一项的方法,其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加半胱氨酸的步骤。

95. 权利要求 94 的方法,其中半胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.5 至约 2.0mM 半胱氨酸。

96. 权利要求 94 的方法,其中半胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供约 0.8mM 半胱氨酸。

97. 权利要求 54-96 任一项的方法,其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加胱氨酸的步骤。

98. 权利要求 97 的方法,其中胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1 至约 1.5mM 胱氨酸。

99. 权利要求 97 的方法,其中胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供约 0.2mM 胱氨酸。

100. 权利要求 54-99 任一项的方法,其中该细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者,且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。

101. 权利要求 54-100 任一项的方法,其中于范围为自约 28°C 至约 37°C 的温度培养细胞。

102. 权利要求 101 的方法,其中于范围为自约 28℃至约 35℃的温度培养细胞。

103. 权利要求 54-100 任一项的方法,其中细胞于约 35℃的第一温度培养第一时间段,于约 33℃的第二温度培养第二时间段,并于约 31℃的第三温度培养第三时间段。

104. 权利要求 54-103 任一项的方法,其中贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基中。

105. 权利要求 54-104 任一项的方法,其中在细胞的生长阶段期间使哺乳动物细胞与细胞培养培养基接触。

106. 权利要求 54-105 任一项的方法,其中在细胞的生产阶段期间使哺乳动物细胞与细胞培养培养基接触。

107. 一种用于补充细胞培养培养基供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的试剂盒,该试剂盒包含成分 (i)-(iii) 中的至少两项:(i) 如下量的胰岛素,使得在细胞培养培养基中提供自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 胰岛素;(ii) 如下量的胱氨酸,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.7mM 至约 2.0mM 胱氨酸;和 (iii) 如下量的铜,使得在细胞培养培养基中提供自约 69.0nM 至约 1,000.0nM 铜。

108. 权利要求 107 的试剂盒,其中该试剂盒进一步包含植物衍生的水解产物。

109. 权利要求 108 的试剂盒,其中该试剂盒包含如下量的植物衍生的水解产物,使得在细胞培养培养基中提供自约 1.0g/L 至约 10.0g/L 植物衍生的水解产物。

110. 权利要求 107-109 任一项的试剂盒,其中该试剂盒进一步包含动物衍生的水解产物。

111. 权利要求 110 的试剂盒,其中该试剂盒包含如下量的动物衍生的水解产物,使得在细胞培养培养基中提供自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 动物衍生的水解产物。

112. 一种供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的细胞培养培养基,该细胞培养培养基包含成分 (i)-(iii) 中的至少两项:(i) 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 胰岛素;(ii) 自约 69.0nM 至约 1,000.0nM 铜;和 (iii) 自约 0.7mM 至约 2.0mM 胱氨酸。

113. 权利要求 112 的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基包含:(i) 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 胰岛素;和 (ii) 自约 69.0nM 至约 1,000.0nM 铜。

114. 权利要求 112 的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基包含:(i) 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 胰岛素;和 (iii) 自约 0.7mM 至约 2.0mM 胱氨酸。

115. 权利要求 112 的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基包含:(ii) 自约 69.0nM 至约 1,000.0nM 铜;和 (iii) 自约 0.7mM 至约 2.0mM 胱氨酸。

116. 权利要求 112-115 任一项的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基进一步包含自约 1.0g/L 至约 10.0g/L 植物衍生的水解产物。

117. 权利要求 112-116 任一项的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基进一步包含自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 动物衍生的水解产物。

118. 权利要求 112-117 任一项的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基以选自下组的浓度包含胰岛素:

自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L;

自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L;

自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L ;
自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L ;
自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L ;和
约 10.0mg/L。

119. 权利要求 112-118 任一项的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基以选自下组的浓度包含铜:

自约 69nM 至约 1,000nM ;
自约 300nM 至约 400nM ;
自约 325nM 至约 375nM ;
自约 325nM 至约 350nM ;
约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一 ;和
约 339nM。

120. 权利要求 112-119 任一项的细胞培养培养基,其中该细胞培养培养基以选自下组的浓度包含胱氨酸:

自约 0.7mM 至约 2.0mM ;
自约 1.0mM 至约 2.0mM ;
自约 1.0mM 至约 1.6mM ;
自约 1.2mM 至约 1.4mM ;和
约 1.3mM。

121. 一种组合物,其包含:(a) 包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞;和 (b) 依照权利要求 112-120 任一项的细胞培养培养基。

122. 一种组合物,其包含:(a) 贝伐珠单抗或其片段;和 (b) 依照权利要求 112-120 任一项的细胞培养培养基。

123. 权利要求 122 的组合物,其中贝伐珠单抗或其片段由包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞分泌入培养基中。

124. 一种提高自包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量的方法,该方法包括在包含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞的步骤,其中自哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量相对于在不含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞升高。

125. 权利要求 124 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜和胰岛素。

126. 权利要求 124 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。

127. 权利要求 124 的方法,其中该细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。

128. 权利要求 124 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜,胰岛素,和胱氨酸。

129. 权利要求 124-128 任一项的方法,其中该细胞培养培养基进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。

130. 权利要求 124-129 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

131. 权利要求 124-129 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约

100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

132. 权利要求 124-129 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

133. 权利要求 124-129 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

134. 权利要求 124-129 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

135. 权利要求 124-129 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 25.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

136. 权利要求 124-135 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 69nM 至约 1,000nM 的浓度包含铜。

137. 权利要求 124-135 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 375nM 的浓度包含铜。

138. 权利要求 124-135 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 350nM 的浓度包含铜。

139. 权利要求 124-135 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一的浓度包含铜。

140. 权利要求 124-135 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 339nM 的浓度包含铜。

141. 权利要求 124-140 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 0.7mM 至约 2.0mM 的浓度包含胱氨酸。

142. 权利要求 124-140 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1.0mM 至约 1.6mM 的浓度包含胱氨酸。

143. 权利要求 124-140 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1.2mM 至约 1.4mM 的浓度包含胱氨酸。

144. 权利要求 124-140 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 1.3mM 的浓度包含胱氨酸。

145. 权利要求 124-144 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

146. 权利要求 124-144 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 8.0g/L 至约 12.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

147. 权利要求 124-144 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 9.0g/L 至约 11.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

148. 权利要求 124-144 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 13g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

149. 权利要求 124-148 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 1.0g/L 至约 10.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

150. 权利要求 124-148 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 2.0g/L 至约 3.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

151. 权利要求 124-148 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 2.25g/L 至约 2.75g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

152. 权利要求 124-148 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以约 3.1g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

153. 权利要求 124-152 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者, 且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。

154. 权利要求 124-153 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。

155. 权利要求 154 的方法, 其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素一次。

156. 权利要求 154 的方法, 其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。

157. 权利要求 154 的方法, 其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。

158. 权利要求 154-157 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

159. 权利要求 154-157 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

160. 权利要求 154-157 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

161. 权利要求 154-157 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

162. 权利要求 154-157 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

163. 权利要求 154-157 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以约 15.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

164. 权利要求 124-163 任一项的方法, 其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加半胱氨酸的步骤。

165. 权利要求 164 的方法, 其中半胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供自约 0.5 至约 2.0mM 半胱氨酸。

166. 权利要求 164 的方法, 其中半胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供约 0.8mM 半胱氨酸。

167. 权利要求 124-166 任一项的方法, 其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加胱氨酸的步骤。

168. 权利要求 167 的方法, 其中胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1 至约 1.5mM 胱氨酸。

169. 权利要求 167 的方法, 其中胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供约 0.2mM 胱氨酸。

170. 权利要求 124-169 任一项的方法,其中于范围为自约 28℃至约 37℃的温度培养细胞。

171. 权利要求 170 的方法,其中于范围为自约 31℃至约 35℃的温度培养细胞。

172. 权利要求 124-169 任一项的方法,其中细胞于约 35℃的第一温度培养第一时间段,于约 33℃的第二温度培养第二时间段,并于约 31℃的第三温度培养第三时间段。

173. 权利要求 124-172 任一项的方法,其中贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基中。

174. 权利要求 124-173 任一项的方法,其进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。

175. 一种在包含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法,其中自哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量相对于在不含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞升高。

176. 权利要求 175 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜和胰岛素。

177. 权利要求 175 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。

178. 权利要求 175 的方法,其中该细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。

179. 权利要求 175 的方法,其中该细胞培养培养基包含铜,胰岛素,和胱氨酸。

180. 权利要求 175-179 任一项的方法,其中该细胞培养培养基进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。

181. 权利要求 175-180 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

182. 权利要求 175-180 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

183. 权利要求 175-180 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

184. 权利要求 175-180 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

185. 权利要求 175-180 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

186. 权利要求 175-180 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 25.0mg/L 的浓度包含胰岛素。

187. 权利要求 175-186 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 69nM 至约 1,000nM 的浓度包含铜。

188. 权利要求 175-186 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 375nM 的浓度包含铜。

189. 权利要求 175-186 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 325nM 至约 350nM 的浓度包含铜。

190. 权利要求 175-186 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 330nM,335nM,339nM,340nM,345nM 或 350nM 任一浓度包含铜。

191. 权利要求 175-186 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 339nM 的浓度包含铜。

192. 权利要求 175-191 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 0.7mM 至约 2.0mM 的浓度包含胱氨酸。

193. 权利要求 175-191 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.0mM 至约 1.6mM 的浓度包含胱氨酸。

194. 权利要求 175-191 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.2mM 至约 1.4mM 的浓度包含胱氨酸。

195. 权利要求 175-191 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 1.3mM 的浓度包含胱氨酸。

196. 权利要求 175-195 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

197. 权利要求 175-195 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 8.0g/L 至约 12.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

198. 权利要求 175-195 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 9.0g/L 至约 11.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

199. 权利要求 175-195 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 13g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

200. 权利要求 175-199 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 1.0g/L 至约 10.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

201. 权利要求 175-199 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 2.0g/L 至约 3.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

202. 权利要求 175-199 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以自约 2.25g/L 至约 2.75g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

203. 权利要求 175-199 任一项的方法,其中该细胞培养培养基以约 3.1g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

204. 权利要求 175-203 任一项的方法,其中该细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者,且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。

205. 权利要求 175-204 任一项的方法,其中该细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。

206. 权利要求 205 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素一次。

207. 权利要求 205 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。

208. 权利要求 205 的方法,其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。

209. 权利要求 205-208 任一项的方法,其中额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

210. 权利要求 205-208 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

211. 权利要求 205-208 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

212. 权利要求 205-208 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

213. 权利要求 205-208 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

214. 权利要求 205-208 任一项的方法, 其中额外量的胰岛素以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中以约 15.0mg/L 的浓度提供胰岛素。

215. 权利要求 175-214 任一项的方法, 其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加半胱氨酸的步骤。

216. 权利要求 215 的方法, 其中半胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供自约 0.5 至约 2.0mM 半胱氨酸。

217. 权利要求 215 的方法, 其中半胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供约 0.8mM 半胱氨酸。

218. 权利要求 175-217 任一项的方法, 其中该方法进一步包括对细胞培养培养基添加胱氨酸的步骤。

219. 权利要求 218 的方法, 其中胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1 至约 1.5mM 胱氨酸。

220. 权利要求 218 的方法, 其中胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供约 0.2mM 胱氨酸。

221. 权利要求 175-220 任一项的方法, 其中于范围为自约 28°C 至约 37°C 的温度培养细胞。

222. 权利要求 221 的方法, 其中于范围为自约 31°C 至约 35°C 的温度培养细胞。

223. 权利要求 175-220 任一项的方法, 其中细胞于约 35°C 的第一温度培养第一时间段, 于约 33°C 的第二温度培养第二时间段, 并于约 31°C 的第三温度培养第三时间段。

224. 权利要求 175-223 任一项的方法, 其中贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基中。

225. 权利要求 175-223 任一项的方法, 其进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。

226. 一种生成贝伐珠单抗或其片段的方法, 其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的步骤, 其中细胞培养周期中的初始细胞培养培养基包含两种或更多种选自下组的成分: 浓度为自约 69nM 至约 1,000nM 的铜, 浓度为自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的胰岛素, 和浓度为自约 0.7mM 至约 2.0mM 的胱氨酸, 且其中细胞生成贝伐珠单抗或其片段。

227. 权利要求 226 的方法, 其中该初始细胞培养培养基包含 (1) 铜和胰岛素; (2) 铜和胱氨酸; (3) 胰岛素和胱氨酸; 或 (4) 铜, 胰岛素, 和胱氨酸。

228. 权利要求 226 或 227 的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约

50. 0mg/L 的浓度包含胰岛素。

229. 权利要求 228 的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 10. 0mg/L 至约 20. 0mg/L 的浓度包含胰岛素。

230. 权利要求 228 的方法, 其中该初始细胞培养培养基以约 10. 0mg/L, 15mg/L, 20mg/L, 和 25mg/L 任一的浓度包含胰岛素。

231. 权利要求 226-230 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 325nM 至约 375nM 的浓度包含铜。

232. 权利要求 226-230 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 325nM 至约 350nM 的浓度包含铜。

233. 权利要求 226-230 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 和 350nM 任一的浓度包含铜。

234. 权利要求 226-233 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 0. 7mM 至约 2. 0mM 的浓度包含胱氨酸。

235. 权利要求 226-233 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 1. 0mM 至约 1. 6mM 的浓度包含胱氨酸。

236. 权利要求 226-233 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以约 1. 0mM, 1. 2mM, 1. 3mM, 1. 4mM, 1. 5mM 和 1. 6mM 任一的浓度包含胱氨酸。

237. 权利要求 226-236 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物。

238. 权利要求 226-236 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 6. 0g/L 至约 20. 0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

239. 权利要求 226-236 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 8. 0g/L 至约 12. 0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

240. 权利要求 226-236 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 9. 0g/L 至约 11. 0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

241. 权利要求 226-236 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以约 13g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。

242. 权利要求 226-241 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以自约 1. 0g/L 至约 10. 0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

243. 权利要求 226-242 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 2. 0g/L 至约 3. 0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

244. 权利要求 226-243 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基以自约 2. 25g/L 至约 2. 75g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

245. 权利要求 226-244 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基以约 2. 5g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。

246. 权利要求 226-245 任一项的方法, 其中该细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者, 且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。

247. 权利要求 226-246 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基包含胰岛素且该方

法进一步包括在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。

248. 权利要求 247 的方法, 其中在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少一次, 至少两次, 至少三次, 至少四次, 至少五次, 或至少六次。

249. 权利要求 248 的方法, 其中每次添加的胰岛素为自约 5mg/L 至约 25mg/L。

250. 权利要求 248 的方法, 其中每次添加的胰岛素为约 5mg/L, 10mg/L, 15mg/L, 20mg/L, 和 25mg/L 任一。

251. 权利要求 248-250 任一项的方法, 其中在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为自约 20mg/L 至约 100mg/L。

252. 权利要求 251 的方法, 其中在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为约 20mg/L, 25mg/L, 30mg/L, 35mg/L, 40mg/L, 45mg/L, 50mg/L, 55mg/L, 60mg/L, 65mg/L, 70mg/L, 75mg/L, 80mg/L 和 85mg/L 任一。

253. 权利要求 226-252 任一项的方法, 其中该初始细胞培养培养基包含胱氨酸且该方法进一步包括在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胱氨酸的步骤。

254. 权利要求 253 的方法, 其中胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1 至约 1.5mM 额外的胱氨酸。

255. 权利要求 254 的方法, 其中胱氨酸以如下量添加, 使得在细胞培养培养基中提供约 0.4 至约 0.7mM 额外的胱氨酸。

256. 权利要求 253-255 任一项的方法, 其中在细胞培养周期期间以分批补料添加胱氨酸。

257. 权利要求 226-256 任一项的方法, 其中该方法进一步包括在细胞培养周期期间的至少一次分批补料。

258. 权利要求 257 的方法, 其中该方法包括在细胞培养周期期间的两次, 三次, 或四次分批补料。

259. 权利要求 257 或 259 的方法, 其中该分批补料培养基包含动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。

260. 权利要求 226-259 任一项的方法, 其中在细胞培养周期期间培养基的温度相对于培养开始时的温度降低至少约 2, 至少约 3, 至少约 4, 或至少约 5 摄氏度。

261. 权利要求 260 的方法, 其中在细胞培养周期期间培养基的温度降低至少一次或至少两次。

262. 权利要求 261 的方法, 其中温度在培养开始后第 8 天和第 10 天降低。

263. 权利要求 226-262 任一项的方法, 其中于范围为自约 31°C 至约 35°C 的温度培养细胞。

264. 权利要求 263 的方法, 其中细胞于约 35°C 的第一温度培养第一时间段, 于约 33°C 的第二温度培养第二时间段, 并于约 31°C 的第三温度培养第三时间段。

265. 权利要求 226-264 任一项的方法, 其中在具有处于约 7.0 至约 7.3 的 pH 的培养基中培养细胞。

266. 权利要求 226-265 任一项的方法, 其中该方法包括: (a) 在包含约 10mg/L 胰岛素, 约 325nM 至约 350nM 铜, 和约 1.3mM 胱氨酸的初始细胞培养培养基中培养细胞; (b) 在培养开始后第 3 天对细胞培养培养基提供第一次分批补料和胰岛素补料, 从而以约 15mg/L 的

浓度提供额外的胰岛素 ;并 (c) 在培养开始后第 6 天对细胞培养培养基提供包含胱氨酸的第二次分批补料,从而以约 0.4 至约 0.7mM 的浓度提供额外的胱氨酸 ;其中于约 35℃ 的初始温度培养细胞,且温度在培养开始后第 8 天降低至约 33℃ 并在第 10 天进一步降低至约 31℃。

267. 权利要求 226-266 任一项的方法,其中贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基中。

268. 权利要求 226-267 任一项的方法,其进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。

269. 权利要求 226-268 任一项的方法,其中该哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞。

270. 通过权利要求 226-269 任一项的方法生成的贝伐珠单抗或其片段。

271. 一种组合物,其包含 : (i) 通过权利要求 226-269 任一项的方法生成的贝伐珠单抗或其片段 ;和 (ii) 药学可接受载剂。

细胞培养培养基和抗体生产方法

[0001] 对相关申请的交叉援引

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的流水号 61/801,247 的美国临时申请的优先权权益,通过援引将其完整收入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的细胞培养培养基及在贝伐珠单抗生成中使用培养基的方法,以及包含通过本文中提供的方法生成的贝伐珠单抗或其片段的组合物和试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 细胞培养制造技术广泛用于生产基于蛋白质的治疗剂(诸如抗体),供药物配制剂使用。基于蛋白质的产品(诸如抗体产品)的商业生产需要优化细胞培养参数以使细胞生成足够的蛋白质产品以达到制造需求。然而,在优化细胞培养参数以提高蛋白质生产的生产力时,还必须维持产品的期望品质属性,诸如糖基化样式,聚集体水平,电荷异质性,和氨基酸序列完整性(Li, et al., 2010, mAbs., 2(5):466-477)。

[0006] 贝伐珠单抗(也称作“Avastin®”)是一种重组人源化单克隆抗体,其在体外和体内测定系统中结合血管内皮生长因子(US 7227004;US 6884879;US 7060269;US 7169901;US 7297334)且用于治疗癌症,其中它通过阻断新血管形成来抑制肿瘤生长。贝伐珠单抗具有 149,000 道尔顿的近似分子量,是糖基化的,且是在有营养的细胞培养培养基中在哺乳动物细胞(中国仓鼠卵巢)表达系统中生成的。

[0007] 想要改良且划算的生产贝伐珠单抗或其片段的方法。包含使细胞能够生成期望量的贝伐珠单抗或其片段,同时维持贝伐珠单抗或其片段的可接受产品品质属性的成分的细胞培养培养基会是有益的。供生产制造规模的量的贝伐珠单抗或其片段使用的细胞培养培养基会是特别有利的。

[0008] 发明概述

[0009] 本文中提供的发明公开在包含铜,胰岛素,和胱氨酸中至少两种且任选包含动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物的细胞培养培养基中生成贝伐珠单抗或其片段的方法,等等。还提供使用本文中提供的细胞培养培养基培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞)的方法。本文中进一步公开提高细胞培养中自哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量(例如提高滴度)的细胞培养培养基组合物,以及包含通过本文中描述的方法生成的贝伐珠单抗或其片段的组合物。

[0010] 因而,一方面,本发明提供生成贝伐珠单抗或其片段的方法,其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的步骤,其中细胞培养培养基包含两种或更多种选自铜,胰岛素,和胱氨酸的成分,且其中细胞生成贝伐珠单抗或其片段。在一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胰岛素。在另一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。在还有另一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。在仍有另一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含铜,胰岛素,

和胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基以选自表 1 中所列浓度的浓度包含铜。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基以选自表 1 中所列浓度的浓度包含胰岛素。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基以选自表 1 中所列浓度的浓度包含胱氨酸。理解的是,想要铜,胰岛素和 / 或胱氨酸的量(例如表 1 中提供的量)的任意组合,就像是具体和个别列出量的每种和每一种组合。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 69.0nM 至约 400.0nM 的浓度包含铜。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 0.8mM 至约 2.5mM 的浓度包含胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基为基础细胞培养培养基。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基为补料细胞培养培养基。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基为包含铜,胰岛素,和胱氨酸中至少一种的基础细胞培养培养基,且其中基础细胞培养培养基补充(例如于细胞培养周期启动后的一个时间段,诸如一个细胞培养周期至少一次,至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,至少六次,至少七次,等任一)有包含胰岛素,动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中任一种或多种的补料细胞培养培养基。在另一种变化中,补料细胞培养培养基包含胰岛素,动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物,半胱氨酸和胱氨酸中任一种或多种。在另一种变化中,补料细胞培养培养基包含胰岛素,动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物和半胱氨酸。在另一种变化中,补料细胞培养培养基包含胰岛素,动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物和胱氨酸中任一种或多种。补料细胞培养培养基可以以本文中提供的任何量包含胰岛素,动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物,半胱氨酸和胱氨酸中任一种或多种。在本文的一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在一些实施方案中,额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供胰岛素。在一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少一次。在另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。在还有另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。在本文的一些实施方案中,额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 5.6mg/L 至约 66.0mg/L 的浓度提供胰岛素。在本文的一些实施方案中,方法进一步包括对本文中提供的细胞培养培养基添加额外量的动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文的一些实施方案中,额外量的动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物以如下量添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物。在本文中的任何实施方案中,可以于范围为自约 28℃ 至约 37℃ 或约 31℃ 至约 37℃ 的温度培养细胞(例如能够生

成贝伐珠单抗或其片段的CHO细胞)。在本文中的任何实施方案中,贝伐珠单抗或其片段可以分泌入细胞培养培养基中。在本文中的任何实施方案中,方法可以进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。在一种特定变化中,纯化回收的贝伐珠单抗。

[0011] 本文中还提供在包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物且任选进一步包含铜,胰岛素和/或胱氨酸的细胞培养培养基中生成贝伐珠单抗或其片段的方法。在一个此类方面,动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。在一种此类变化中,动物衍生的水解产物在细胞培养培养基中以自约5.6g/L至约38.0g/L或自约7.0g/L至约35.0g/L或自约7.0g/L至约25.0g/L或自约7.0g/L至约15.0g/L或自约8.0g/L至约12.0g/L或自约7.0g/L至约11.0g/L或约5g/L,10g/L,15g/L,20g/L,25g/L,30g/L,35g/L,40g/L,45g/L或50g/L任一或约5g/L,6g/L,7g/L,8g/L,9g/L,10g/L,11g/L,或12g/L或约10g/L任一的浓度存在。在另一种变化中,植物衍生的水解产物在细胞培养培养基中以自约1.4g/L至约6.2g/L或自约1.5g/L至约5.5g/L或自约1.5g/L至约4.5g/L或自约1.5g/L至约3.5g/L或自约1.5g/L至约2.5g/L或自约1.75g/L至约2.75g/L或自约2.0g/L至约3.0g/L或自约2.25g/L至约2.75g/L或约1.75g/L,2.0g/L,2.25g/L,2.5g/L,3.0g/L,3.25,3.5g/L,3.75g/L,或4.0g/L任一或约2.0g/L,2.25g/L,2.5g/L或3.0g/L或约2.5g/L任一的浓度存在。理解的是,描述动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物的量的每种和每一种组合,就像是具体和个别列出每种和每一种组合。

[0012] 在一些方面,本发明提供通过本文中描述的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段。

[0013] 在其它方面,本发明提供组合物,其包含:(i)通过本文中描述的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段,和(ii)药学可接受载体。

[0014] 在一些方面,本发明还提供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法,方法包括使哺乳动物细胞与包含两种或更多种选自铜,胰岛素和胱氨酸的成分的细胞培养培养基接触的步骤。在一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胰岛素。在另一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。在还有另一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。在仍有还有另一个进一步实施方案中,细胞培养培养基包含铜,胰岛素,和胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约7.0mg/L至约11.0mg/L的浓度包含胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约69.0nM至约400.0nM的浓度包含铜。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约0.8mM至约2.5mM的浓度包含胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约5.6g/L至约38.0g/L的浓度包含动物衍生的水解产物。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约1.4g/L至约6.2g/L的浓度包含植物衍生的水解产物。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为基础细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为补料细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为包含铜,胰岛素,和胱氨酸中至少一种的基础细胞培养培养基,且其中基础细胞培养培养基补充(例如于细胞培养周期启动后的一个时间段,诸如一个细胞培养周期至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,至少六次,至少七次,等任一)有包含胰岛素,动物衍生的水解产物和植物衍

生的水解产物中任一种或多种的补料细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。在一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少一次。在另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。在还有另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。在一些实施方案中,额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 5.6mg/L 至约 66.0mg/L 的浓度提供胰岛素。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括对本文中提供的细胞培养培养基添加额外量的动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文中的一些实施方案中,额外量的动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物以如下量添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。在本文中的一些实施方案中,于范围为约 28℃ 至约 37℃ 或自约 31℃ 至约 37℃ 的温度培养细胞。在本文中的任何实施方案中,贝伐珠单抗或其片段可以分泌入细胞培养培养基中。在本文中的一些实施方案中,在细胞的生长阶段期间哺乳动物细胞与细胞培养培养基接触。在本文中的一些实施方案中,在细胞的生产阶段期间哺乳动物细胞与细胞培养培养基接触。

[0015] 在其它方面,本发明提供用于补充细胞培养培养基供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的试剂盒,试剂盒包含成分 (i)-(iii) 中的至少两项:(i) 如下量的胰岛素,使得在细胞培养培养基中提供自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素;(ii) 如下量的胱氨酸,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸;和(iii) 如下量的铜,使得在细胞培养培养基中提供自约 25.0nM 至约 400.0nM 铜。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含植物衍生的水解产物。在一个进一步实施方案中,试剂盒包含如下量的植物衍生的水解产物,使得在细胞培养培养基中提供自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 植物衍生的水解产物。在本文中的任何实施方案中,试剂盒可以进一步包含动物衍生的水解产物。在一些实施方案中,试剂盒包含如下量的动物衍生的水解产物,使得在细胞培养培养基中提供自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 动物衍生的水解产物。试剂盒可以额外含有使用说明,诸如补充细胞培养培养基中的使用说明。

[0016] 在另一个方面,本发明提供供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的细胞培养培养基,该细胞培养培养基包含成分 (i)-(iii) 中的至少两项:(i) 自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素;(ii) 自约 25.0nM 至约 400.0nM 铜;和(iii) 自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素;和自约 25.0nM 至约 400.0nM 铜。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含:自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素;和自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含自约 25.0nM 至约 400.0nM 铜;和自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以进一步包含自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 植物衍生的水解产物。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以进一步包含自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 动物衍生的水解产物。

[0017] 在还有另一个方面,本发明还提供组合物,其包含:(a) 包含编码贝伐珠单抗或其

片段的核酸的哺乳动物细胞 ;和 (b) 本文中提供的任何细胞培养培养基。

[0018] 在另一个方面,本发明提供组合物,其包含:(a) 贝伐珠单抗或其片段 ;和 (b) 本文中提供的任何细胞培养培养基。在一个进一步实施方案中,贝伐珠单抗或其片段由包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞分泌入培养基中。

[0019] 在一些方面,本文中还提供提高来自包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的贝伐珠单抗或其片段的滴度的方法,方法包括在包含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞的步骤,其中滴度相对于在不含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞升高。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胰岛素。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜,胰岛素,和胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 69.0nM 至约 400.0nM 的浓度包含铜。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 0.8mM 至约 2.5mM 的浓度包含胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基为基础细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为补料细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为包含铜,胰岛素,和胱氨酸中至少一种的基础细胞培养培养基,且其中基础细胞培养培养基补充(例如于细胞培养周期启动后的一个时间段,诸如一个细胞培养周期至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,至少六次,至少七次,等任一)有包含胰岛素,动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中任一种或多种的补料细胞培养培养基。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。在一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少一次。在另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。在还有另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。在本文中的一些实施方案中,额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 5.6mg/L 至约 66.0mg/L 的浓度提供胰岛素。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括对本文中提供的细胞培养培养基添加额外量的动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文中的一些实施方案中,额外量的动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物以如下量添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。在本文中的任何实施方案中,可以于范围为自约 28℃ 至约 37℃ 或自约 31℃ 至约 37℃ 的温度培养细胞。在本文中的任何实施方案中,贝伐珠单抗或其片段可以分泌入细胞培养培养基。在本文中的任何实施方案中,方法可以进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。在一个进一步方面,纯化回收的贝伐珠单抗或其片段。

[0020] 在另一个方面,本文中的发明提供在包含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法,其中贝伐珠单抗或其片段的滴度相对于在不含胰岛素,铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞升高。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胰岛素。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜,胰岛素,和胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 69.0nM 至约 400.0nM 的浓度包含铜。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 0.8mM 至约 2.5mM 的浓度包含胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基为基础细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为补料细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基为包含铜,胰岛素,和胱氨酸中至少一种的基础细胞培养培养基,且其中基础细胞培养培养基补充(例如于细胞培养周期启动后的一个时间段,诸如一个细胞培养周期至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,至少六次,至少七次,等任一)有包含胰岛素,动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中任一种或多种的补料细胞培养培养基。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以包含胰岛素且该方法可以进一步包括对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。在一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少一次。在另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少三次。在还有另一个进一步实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少六次。在本文中的一些实施方案中,额外量的胰岛素以如下量添加,使得在细胞培养培养基中以自约 5.6mg/L 至约 66.0mg/L 的浓度提供胰岛素。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括对本文中提供的细胞培养培养基添加额外量的动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文中的一些实施方案中,额外量的动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物以如下量添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。在本文中的一些实施方案中,于范围为自约 28℃ 至约 37℃ 或自约 31℃ 至约 37℃ 的温度,诸如约 31℃,33℃ 或 35℃ 的温度培养细胞。理解的是,温度贯穿细胞培养过程可以有所变化(或是升高或是降低),例如在自约 28℃ 至约 37℃ 的温度范围内。一方面,细胞于约 35℃ 的第一温度培养第一时间段(诸如约 1-10 或 1-8 或 1-7 天),于约 33℃ 的第二温度培养第二时间段(诸如约 1-5 或 1-4 或 1-3 或 1-2 天),并于约 31℃ 的第三温度培养第三时间段(诸如约 1-5 或 1-4 或 1-3 或 1-2 天)。在本文中的任何实施方案中,贝伐珠单抗或其片段可以分泌入细胞培养培养基。在一些实施方案中,方法进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。一方面,纯化回收的贝伐珠单抗或其片段。

[0021] 在另一个方面,本发明提供生成贝伐珠单抗或其片段的方法,其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞)的步骤,其中细胞培养周期中的初始细胞培养培养基包含两种或更多种选自下组的成分:浓度为自约 69nM 至约 1,000nM 的铜,浓度为自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的胰岛素,和浓度为自约 0.7mM 至约 2.0mM 的胱氨酸,且其中细胞生成贝伐珠单抗或片段。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含:(1) 铜和胰岛素;(2) 铜和胱氨酸;(3) 胰岛素和胱氨酸;或(4) 铜,胰岛素,和胱氨酸。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 10.0mg/L 至约 20.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以约 10.0mg/L, 15mg/L, 20mg/L, 和 25mg/L 任一的浓度包含胰岛素。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 325nM 至约 375nM 的浓度包含铜。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 325nM 至约 350nM 的浓度包含铜。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 和 350nM 任一的浓度包含铜。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 0.7mM 至约 2.0mM 的浓度包含胱氨酸。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 1.0mM 至约 1.6mM 的浓度包含胱氨酸。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以约 1.0mM, 1.2mM, 1.3mM, 1.4mM, 1.5mM 和 1.6mM 任一的浓度包含胱氨酸。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 8.0g/L 至约 12.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 9.0g/L 至约 11.0g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以约 13g/L 的浓度包含动物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以自约 1.0g/L 至约 10.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 2.0g/L 至约 3.0g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 2.25g/L 至约 2.75g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以约 2.5g/L 的浓度包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者,且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素的步骤。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胰岛素至少一次,至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,或至少六次。在一些实施方案中,每次添加的胰岛素为自约 5mg/L 至约 25mg/L。在一些实施方案中,每次添加的胰岛素为约 5mg/L, 10mg/L, 15mg/L, 20mg/L, 和 25mg/L 任一。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为自约 20mg/L 至约 100mg/L。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为约 20mg/L, 25mg/L, 30mg/L, 35mg/L, 40mg/L, 45mg/L, 50mg/L, 55mg/L, 60mg/L, 65mg/L, 70mg/L, 75mg/L, 80mg/L, 85mg/L, 90mg/L, 95mg/L, 和 100mg/L 任一。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含胱氨酸且该方法进一步包括在细胞培养周期期间对细胞培养培养基添加额外量的胱氨酸的步骤。在一些实施方案中,胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1mM 至约 1.5mM 额外的胱氨酸。在一些实施方案中,

胱氨酸以如下量添加,使得在细胞培养培养基中提供约 0.4mM 至约 0.7mM(例如约 0.4mM 至约 0.6mM,约 0.4mM 至约 0.5mM) 额外的胱氨酸。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间以分批补料添加胱氨酸。在一些实施方案中,方法进一步包括在细胞培养周期期间的至少一次分批补料。在一些实施方案中,一次分批补料在第 3 天(例如在 14 天的细胞培养周期中)。在一些实施方案中,方法包括在细胞培养周期期间的两次,三次,或四次分批补料。在一些实施方案中,方法包括第 3 天的第一次分批补料和第 6 天的第二次分批补料(例如在 14 天的细胞培养周期中)。在一些实施方案中,分批补料培养基包含动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间培养基的温度相对于培养开始时的温度降低至少约 2,至少约 3,至少约 4,或至少约 5 摄氏度。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间培养基的温度降低至少一次或至少两次。在一些实施方案中,在培养开始后温度在第 8 天和第 10 天降低。在一些实施方案中,于范围为自约 31℃至约 35℃的温度培养细胞。在一些实施方案中,细胞于约 35℃的第一温度培养第一时间段,于约 33℃的第二温度培养第二时间段,并于约 31℃的第三温度培养第三时间段。在一些实施方案中,在具有处于约 7.0 至约 7.3 的 pH 的培养基中培养细胞。在一些实施方案中,方法包括:(a) 在包含约 10mg/L 胰岛素,约 325nM 至约 350nM 铜,和约 1.3mM 胱氨酸的初始细胞培养培养基中培养细胞;(b) 在培养开始后第 3 天对细胞培养培养基提供第一分批补料和胰岛素补料以提供浓度为约 15mg/L 的额外的胰岛素;并(c) 在培养开始后第 6 天对细胞培养培养基提供包含胱氨酸的第二分批补料以提供浓度为约 0.4mM 至约 0.7mM 的额外的胱氨酸;其中于约 35℃的初始温度培养细胞,且温度在培养开始后第 8 天降低至约 33℃并在第 10 天进一步降低至约 31℃。在一些实施方案中,细胞培养周期为 14 天细胞培养周期。在一些实施方案中,贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基中。在一些实施方案中,方法进一步包括自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段的步骤。在另一个方面,本发明提供通过任何上文所述方法生成的贝伐珠单抗或其片段。在另一个方面,本发明提供组合物,其包含:(i) 通过任何上文所述方法生成的贝伐珠单抗或其片段和(ii) 药学可接受载剂。要理解,可以组合本文中描述的各种实施方案的一种,一些,或所有特性以形成本发明的其它实施方案。

[0022] 认为本说明书足以使得本领域技术人员能够实施本发明。在本文中显示和描述的那些之外,本发明的各种变更根据前述描述对本领域技术人员会变得显而易见,而且落入所附权利要求书的范围内。在此通过援引完整收录本文中引用的所有出版物,专利,和专利申请用于所有目的。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1 是一系列图,显示来自在补充有胰岛素的细胞培养培养基中培养的贝伐珠单抗生成 CHO 细胞的抗体滴度产量的升高。图 1A 和图 1B 显示在生成贝伐珠单抗的 CHO 细胞的 14 天细胞培养期间评估的六种不同细胞培养方案的实验中的抗体滴度。抗体生成表述成滴度(mg/L)。图 1A 显示第 3 天一次分批补料的结果。图 1B 显示第 3 天一次分批补料和第 6 天第二次分批补料的结果。

[0025] 图 2 是一系列图,演示作为与细胞年龄的关系,在 14 天细胞培养周期期间提供有一次或两次分批补料的细胞培养对细胞生物量积累和抗体生成的影响。图 2A 显示与提供有第 3 天一次分批补料和第 6 天第二次分批补料的贝伐珠单抗生成 CHO 细胞相比,提供有

第 3 天一次分批补料的贝伐珠单抗生成 CHO 细胞中的细胞生物量积累。 $p < 0.004^*$, 对于一次补料工艺; $p < 0.018^*$, 对于两次补料工艺。图 2B 显示与提供有第 3 天一次分批补料和第 6 天第二次分批补料的贝伐珠单抗生成 CHO 细胞相比, 来自提供有第 3 天一次分批补料的贝伐珠单抗生成 CHO 细胞的抗体生成。 $p < 0.042^*$, 对于一次补料工艺; $p < 0.82$, 对于两次补料工艺。 $*$ 指示显著值。“1”指示给细胞补料第 3 天一次分批补料;“2”指示给细胞补料第 3 天一次分批补料和第 6 天第二次分批补料。

[0026] 图 3 是一幅图, 演示来自在一种新的细胞培养工艺中生长的贝伐珠单抗生成 CHO 细胞的抗体产量的升高。方案 1 (三角形) 指示与方案 2 的细胞培养工艺不同的一种细胞培养工艺; 方案 2 (菱形) 指示新的细胞培养工艺。

[0027] 发明详述

[0028] 提供改良且划算的生产贝伐珠单抗或其片段的方法。描述包含使细胞能够一贯生成期望量的贝伐珠单抗或其片段, 同时维持贝伐珠单抗或其片段的可接受产品品质属性的成分的细胞培养培养基。本文中提供的细胞培养培养基可用于生成制造规模量的贝伐珠单抗或其片段。

[0029] 本文中提供的方法, 包括: (i) 生产贝伐珠单抗或其片段的方法; (ii) 培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法; 和 (iii) 提高自包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞生成贝伐珠单抗或其片段的方法 (例如提高贝伐珠单抗或其片段的滴度产量), 一方面利用包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸中两种或更多种的细胞培养培养基 (诸如包含铜和胰岛素的细胞培养培养基, 或包含铜和胱氨酸的细胞培养培养基, 或包含胰岛素和胱氨酸的细胞培养培养基, 或包含铜, 胰岛素和胱氨酸的细胞培养培养基)。还作为包含贝伐珠单抗或其片段的组合物提供通过本文中详述的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段。一方面, 通过本文中详述的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段展现贝伐珠单抗或其片段的可接受产品品质属性, 诸如 N-糖基化概况, 电荷异质性, 和序列完整性。在一种特定变化中, 若贝伐珠单抗或其片段与通过不使用包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基的方法生成的贝伐珠单抗或其片段实质性相似, 则它们的产品品质属性是可接受的。还提供包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸中两种或更多种的细胞培养培养基 (例如包含: (i) 铜和胰岛素; (ii) 铜和胱氨酸; (iii) 胰岛素和胱氨酸; 或 (iv) 铜, 胰岛素和胱氨酸的细胞培养培养基)。在一种变化中, 相对于在不含胰岛素, 铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞, 包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸中两种或更多种的细胞培养培养基提高在培养基中培养的哺乳动物细胞生成贝伐珠单抗或其片段 (例如提高贝伐珠单抗或其片段的滴度产量)。本文中还提供一种组合物, 其包含: 包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基和 (i) 包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞和 / 或 (ii) 贝伐珠单抗或其片段。提供装有本文中提供的任何细胞培养培养基的培养器皿。一方面, 培养器皿为制造规模培养器皿, 诸如能够根据自细胞培养生成制造规模量的贝伐珠单抗的需要容纳至少 2 升, 至少 10 升, 至少 100 升, 至少 500 升, 至少 1,000 升, 至少 2,500 升, 至少 5,000 升, 至少 7,500 升, 至少 10,000 升, 至少 12,000 升或更多本文中提供的细胞培养培养基的培养器皿。如此, 本文中提供的方法可用于贝伐珠单抗或其片段的制造规模生产。

[0030] I. 定义

[0031] 术语“贝伐珠单抗 (bevacizumab)”指依照 Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 生成的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体, 也称作“rhUMAb VEGF”或“AVASTIN®”。它包含突变的人 IgG1 框架区和来自阻断人 VEGF 结合其受体的鼠抗人 VEGF 单克隆抗体 A. 4. 6. 1 的抗原结合互补决定区。贝伐珠单抗大约 93% 的氨基酸序列 (包括大部分框架区) 衍生自人 IgG1, 而约 7% 的序列衍生自鼠抗体 A4. 6. 1。贝伐珠单抗与由杂交瘤 ATCC HB 10709 生成的单克隆抗 VEGF 抗体 A4. 6. 1 结合相同表位。贝伐珠单抗和其它人源化抗 VEGF 抗体进一步记载于美国专利 No. 6, 884, 879。

[0032] 术语“培养基”和“细胞培养培养基”指用于细胞生长或维持的营养源。正如本领域技术人员理解的, 营养源可以含有细胞生长和 / 或存活所要求的成分, 或者可以含有帮助细胞生长和 / 或存活的成分。维生素, 必需或非必需氨基酸 (例如半胱氨酸和胱氨酸), 和痕量元素 (例如铜) 是培养基成分的例子。还可以给本文中提供的任何培养基补充胰岛素, 植物水解产物和动物水解产物中的任一种或多种。

[0033] “培养”细胞指在适合于细胞存活和 / 或生长和 / 或增殖的条件下使细胞与细胞培养培养基接触。

[0034] “分批培养”指在培养工艺开始时将细胞培养的所有成分 (包括细胞和所有培养营养物) 供应至培养器皿的培养。

[0035] 如本文中使用的, “补料分批细胞培养”指其中最初将细胞和培养培养基供应至培养器皿, 并在期间培养工艺持续地或以离散增量将额外的培养营养物补料至培养, 在培养终止前有或无周期性细胞和 / 或产品收获的分批培养。

[0036] “灌注培养”为通过例如过滤, 封装, 锚定至微载体, 等将细胞约束在培养中, 且持续地或间歇地将培养培养基引入和移出培养器皿的培养。

[0037] “培养器皿”指用于培养细胞的容器。培养器皿可以是任何大小, 只要它可用于培养细胞。

[0038] 如本文中使用的, 术语“滴度”指通过细胞培养生成的重组表达的抗体的总量除以给定量的培养基体积。滴度通常表述成毫克抗体每毫升培养基的单位。可以就相对测量而言来表述或评估滴度, 诸如比较在不同培养条件下获得蛋白质产品时滴度的百分比升高。

[0039] “核酸”指任何长度的核苷酸聚合物, 而且包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸, 核糖核苷酸, 经修饰的核苷酸或碱基, 和 / 或它们的类似物, 或能由 DNA 或 RNA 聚合酶, 或通过合成反应掺入聚合物中的任何底物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸, 诸如甲基化核苷酸及其类似物。如果存在的话, 可以在聚合物组装之前或之后给予对核苷酸结构的修饰。

[0040] “分离的核酸”表示和涵盖在它的通常背景以外或与它的通常背景分开的非天然发生的, 重组的或天然发生的序列。分离的核酸分子不同于在自然界中找到它时的形式或背景。因此, 分离的核酸分子有别于像它在天然细胞中存在那样的核酸分子。然而, 分离的核酸分子包括通常表达蛋白质的细胞中包含的核酸分子, 其中, 例如, 核酸分子在与天然细胞中的染色体位置不同的染色体位置。

[0041] “分离的”蛋白质 (例如分离的抗体) 为已经鉴定及与 / 自它的天然环境的成分分开和 / 或回收的蛋白质。它的天然环境的污染物成分为会干扰蛋白质的研究, 诊断或治疗用途的材料, 而且可以包括酶, 激素, 和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。分离的蛋

白质包括重组细胞内原位的蛋白质,因为蛋白质的天然环境的至少一种成分不会存在。然而,分离的蛋白质通常会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0042] “纯化的”蛋白质(例如抗体)表示蛋白质的纯度已经提高,使得它存在的形式比它在它的天然环境中存在和/或最初在实验室条件下生成和/或合成和/或扩增时要更纯。纯度是一个相对术语,并不必然表示绝对纯度。

[0043] “污染物”指与期望的蛋白质产品(例如抗体产品)不同的材料。污染物可以包括但不限于:宿主细胞材料,诸如 CHO[®];核酸;期望蛋白质的变体,片段,聚集体或衍生物;另一种多肽;内毒素;病毒污染物;细胞培养培养基成分,等。

[0044] 本文中术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如双特异性抗体),及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。抗体可以是人的,人源化的和/或亲和力成熟的。

[0045] 术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用,指基本上完整形式的抗体,而非下文定义的抗体片段。该术语具体指重链包含 Fc 区的抗体。

[0046] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。抗体片段的例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0047] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,及一个剩余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 F(ab')₂ 片段,它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。Fab 片段包含重链和轻链可变域,而且还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的区别之处在于重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带游离巯基的 Fab' 的称谓。F(ab')₂ 抗体片段最初是作为在 Fab' 片段之间有铰链半胱氨酸的成对 Fab' 片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0048] “Fv”是包含完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链 Fv 种类由紧密,非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。在单链 Fv(scFv)种类中,一个重链可变域和一个轻链可变域可以通过柔性肽接头共价相连接,使得轻链和重链可以在与双链 Fv 种类类似的“二聚体”结构中相结合。正是在这种构造中,每个可变域的三个 HVR 相互作用而在 V_H-V_L 二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个 HVR 一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个 HVR 的半个 Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

[0049] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。一般而言,scFv 多肽在 V_H 与 V_L 结构域之间进一步包含多肽接头,其使得 scFv 能够形成结合抗原的期望结构。关于 scFv 的综述参见例如 Plückthun, 于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》,第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页, 1994。

[0050] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,例如构成群体的各个抗体相同,除了可能以极少量存在的可能的突变,例如天然存在的突变。如此,修饰语“单克隆”表明抗体不是分立的抗体的混合物的特征。在某些实施方案中,此类单

克隆抗体典型地包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。例如,选择过程可以是从小克隆诸如杂交瘤克隆,噬菌体克隆或重组 DNA 克隆的集合中选择独特克隆。应当理解,所选择的靶物结合序列可进一步改变,例如为了提高对靶物的亲和力,将靶物结合序列人源化,提高其在细胞培养物中的产量,降低其在体内的免疫原性,创建多特异性抗体等,而且包含改变后的靶物结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性外,单克隆抗体制备物的优势在于它们通常未受到其它免疫球蛋白的污染。

[0051] 修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如 Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97(1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14(3):253-260(1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling et al., In: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681(Elsevier, N. Y., 1981)), 重组 DNA 法(参见例如美国专利 No. 4,816,567), 噬菌体展示技术(参见例如 Clackson et al., *Nature* 352:624-628(1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310(2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472(2004); Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004)), 及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如 WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551(1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258(1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.* 7:33(1993); 美国专利 No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和 5,661,016; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-813(1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851(1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826(1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995))。

[0052] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成人抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581(1991))。还可用于制备人单克隆抗体的是以下文献中记载的方法: Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner et al., *J. Immunol.* 147(1):86-95(1991)。还可参见 van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74(2001)。可通过给已经修饰以应答抗原性刺激而生成人抗体但其内源基因组已经失能的转基因动物例如经过免疫的异种小鼠(xenomice)施用抗原来制备人

抗体（参见例如美国专利 6,075,181 和 6,150,584, 关于 XENOMOUSE™ 技术）。还可参见例如 Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006), 关于经人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体。

[0053] 术语“高变区”，“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常，抗体包含六个 HVR：三个在 VH 中（H1, H2, H3），三个在 VL 中（L1, L2, L3）。在天然抗体中，H3 和 L3 展示这六个 HVR 的最大多样性，而且认为特别是 H3 在赋予抗体以精密特异性中发挥独特作用。参见例如 Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, In: Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)。事实上，仅由重链组成的天然存在 camelid 抗体在缺乏轻链时是有功能的且稳定的。参见例如 Hamers-Casterman et al. Nature 363:446-448, (1993); Sheriff et al. Nature Struct. Biol. 3:733-736, (1996)。

[0054] 本文中使用且涵盖许多 HVR 的叙述。Kabat 互补决定区 (CDR) 是以序列变异性为基础的，而且是最常用的 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia 改为指结构环的位置 (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVR 代表 Kabat HVR 与 Chothia 结构环之间的折衷，而且得到 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件的使用。“接触”HVR 是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些 HVR 中每一个的残基。

[0055]

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
---	-----	-----	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Kabat编号)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1	H31-H35 (Chothia编号)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0056] HVR 可包括如下“延伸的 HVR”：VL 中的 24-36 或 24-34 (L1)，46-56 或 50-56 (L2) 和 89-97 或 89-96 (L3) 及 VH 中的 26-35 (H1)，50-65 或 49-65 (H2) 和 93-102, 94-102 或 95-102 (H3)。对于这些定义中的每一个，可变域残基是依照 Kabat 等，见上文编号的。

[0057] “框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的 HVR 残基外的那些残基。

[0058] 术语“依照 Kabat 的可变域残基编号方式”或“依照 Kabat 的氨基酸位置编号方式”

及其变化形式指 Kabat et al., 见上文中的用于抗体重链可变域或轻链可变域编辑的编号系统。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可包含较少或另外的氨基酸,对应于可变域 FR 或 HVR 的缩短或插入。例如,重链可变域可包含 H2 残基 52 后的单一氨基酸插入(依照 Kabat 为残基 52a)及重链 FR 残基 82 后的插入残基(例如依照 Kabat 为残基 82a,82b 和 82c 等)。给定抗体的 Kabat 残基编号方式可通过将抗体序列与“标准”Kabat 编号序列对比同源区来确定。

[0059] Kabat 编号系统一般在提及可变域中的残基(大约是轻链残基 1-107 和重链残基 1-113)时使用(例如 Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。“EU 编号系统”或“EU 索引”一般在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如 Kabat et al., 见上文中报告的 EU 索引)。“如 Kabat 中的 EU 索引”指人 IgG1EU 抗体的残基编号方式。

[0060] 术语“药物配制剂”指如下形式的制备物,使得容许活性组分的生物学活性有效,且不含会对接受配制剂施用的受试者有不可接受的毒性的别的成分。此类配制剂是无菌的。

[0061] “药学可接受”载剂,赋形剂,或稳定剂在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的(Remington's Pharmaceutical Sciences(第 20 版),A. Gennaro 编,2000, Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia, PA)。通常,生理学可接受载剂为含水 pH 缓冲溶液。生理学可接受载剂的例子包括缓冲剂,诸如磷酸盐,柠檬酸盐,和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;和/或非离子型表面活性剂,诸如 Tween™,聚乙二醇(PEG),和 Pluronic™。

[0062] “无菌”配制剂没有活菌或者没有或基本上没有所有活的微生物及其孢子。

[0063] 如本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”,“一种”和“该”包括复数所指物,除非内容另外明确指明。如此,例如,提及“一个/种化合物”任选包括两个/种或更多个/种此类化合物的组合,诸如此类。

[0064] 理解的是,本文所述发明的各个方面和实施方案包括“包含”,“由……组成”,和“基本上由……组成”方面和实施方案。

[0065] 本文中提到“约”数值或参数包括(且描述)涉及该数值或参数本身的实施方案。例如,提及“约 X”的描述包括“X”的描述。数值范围包括限定范围的数值。

[0066] 在就马库什组或其它备选方案分组而言描述本发明的各个方面或实施方案的情况下,本发明不仅涵盖作为整体列出的整个组,单独的每个组成员和组主体的所有可能亚组,而且涵盖缺失一个或多个组成员的组主体。本发明还涵盖明确排除要求保护的发明中的一个或多个任何组成员。

[0067] II. 细胞培养培养基

[0068] 本文中提供的细胞培养培养基可用于本文中详述的方法(例如生成贝伐珠单抗或其片段的方法;培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法;和/

或提高自包含编码贝伐珠单抗的核酸的哺乳动物细胞生成贝伐珠单抗或其片段（诸如通过提高贝伐珠单抗的滴度产量）的方法）和组合物（例如包含铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基和（i）包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞和 / 或（ii）贝伐珠单抗或其片段的组合物）。

[0069] 在一些方面，本文中提供的细胞培养培养基包含可用于培养生成贝伐珠单抗或其片段的细胞的成分（例如铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种），其中细胞当在培养基成分（例如铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种）存在下培养时以期望量生成贝伐珠单抗或其片段，期望量可以是比由在不含培养基成分的细胞培养培养基（例如不含铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基）中培养的细胞生成的贝伐珠单抗的量要大的量。一方面，本文中提供的细胞培养培养基用于培养生成贝伐珠单抗或其片段的细胞，其中细胞当在培养基成分（例如铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种）存在下培养时以期望量且以可接受品质属性（诸如可接受分子量）生成贝伐珠单抗或其片段。如本文中使用的，贝伐珠单抗的“可接受品质属性”可以指贝伐珠单抗的监管批准或销售要求的化学和 / 或物理属性，而且可以是用于评估由细胞生成的各批次贝伐珠单抗或其片段的批与批一致性的化学和 / 或物理属性。

[0070] 在本发明的其它方面，细胞培养培养基成分（例如铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种）已经鉴定为能够给抗体生成细胞提供改良的或可接受的品质属性，其有助于与生成贝伐珠单抗且在不含这些成分的细胞培养培养基（不含铜，胰岛素和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基）中培养的细胞相比更高地生成贝伐珠单抗（例如导致更高的贝伐珠单抗滴度）。某些鉴定的培养基成分（例如铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种）可用于给抗体生成细胞（例如 CHO 细胞）提供以可接受滴度生成贝伐珠单抗或其片段的能力，其在一个方面是比当细胞在不含铜，胰岛素，和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中生成贝伐珠单抗或其片段时获得的滴度要大的滴度。如本文中使用的，作为一个非限制性例子，自培养的细胞生成的抗体（例如自 CHO 细胞生成的贝伐珠单抗）的“可接受滴度”可以指达到抗体的制造规模生产需要的抗体量或评估各批次抗体产品的批与批一致性需要的抗体量。本文中提供的细胞培养培养基可以与自在不同培养基中培养的包含编码贝伐珠单抗的核酸的细胞生成的贝伐珠单抗的量相比提高自该细胞生成的贝伐珠单抗的量。

[0071] 提供细胞培养培养基，供培养细胞使用，供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用，其中细胞培养培养基包含下述任一项或多项：(a) 铜；(b) 胰岛素；(c) 胱氨酸；(d) 动物衍生的水解产物；和 (e) 植物衍生的水解产物。在一些实施方案中，细胞培养培养基包含成分 (a)，(b)，(c)，(d) 和 (e) 中的 2 或 3 或 4 或 5 项。理解的是，本文中提供的细胞培养培养基可以含有成分 (a)，(b)，(c)，(d) 和 (e) 的任意组合，就像是具体和个别列出每种和每一种组合。例如，理解的是，包含成分 (a)，(b)，(c)，(d) 和 (e) 中三项的细胞培养培养基可以包含成分的任意组合，只要存在至少三种成分（例如涵盖包含成分 (a)，(b) 和 (c) 或包含成分 (a)，(d) 和 (e) 或包含成分 (c)，(d) 和 (e) 的细胞培养培养基）。在一些实施方案中，本文中提供的细胞培养培养基包含成分 (a)，(b)，(c)，(d) 和 (e)。在一些实施方案中，本文中提供的细胞培养培养基包含 (a) 和 (b)。在一些实施方案中，本文中提供的细胞培养培养基包含 (a) 和 (c)。在一些实施方案中，本文中提供的细胞培养培养基包含 (b) 和 (c)。

[0072] 在一些方面,本文中提供的细胞培养培养基以表 1 中描述的量含有一种或多种选自铜,胰岛素,胱氨酸的培养基成分。在一些实施方案中,细胞培养培养基进一步以表 1 中描述的量包含动物衍生的水解产物。在其它实施方案中,细胞培养培养基进一步以表 1 中描述的量包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基进一步以表 1 中描述的量包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者。

[0073] 还理解的是,本文中提供的细胞培养培养基可以以表 1 中列出的任何量包含表 1 的细胞培养培养基成分中任一种或多种(铜,胰岛素,胱氨酸,动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中任一种或多种),就像是具体和个别列出成分和量的每种和每一种组合。在一种变化中,本文中提供的细胞培养培养基以表 1 中列出的任何量包含铜,胰岛素,胱氨酸,动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中两种或三种或四种或每种,就像是具体和个别列出成分和量的每种和每一种组合。一方面,细胞培养培养基以表 1 中列出的任何量包含铜,胰岛素和胱氨酸中至少两种,而且在又一种变化中进一步以表 1 中列出的任何量包含动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物。

[0074] 表 1 :培养基成分的例示性量

[0075]

成分	培养基中成分的量
(a) 胰岛素	自约1.0 mg/L至约100.0 mg/L; 自约5.0 mg/L至约80.0 mg/L; 自约5.0 mg/L至约60.0 mg/L; 自约5.0 mg/L至约50.0 mg/L; 自 约5.0 mg/L至约40.0 mg/L; 自约5.0 mg/L至约30.0 mg/L; 自约 5.0 mg/L至约25.0 mg/L; 自约10.0 mg/L至约25.0 mg/L; 自约 10.0 mg/L至约30.0 mg/L; 自约15.0 mg/L至约20.0 mg/L; 自约 5.0 mg/L至约15.0 mg/L; 自约6.0 mg/L至约12.0 mg/L; 自约7.0 mg/L至约11.0 mg/L; 自约8.0 mg/L至约10.0 mg/L; 自约10 mg/L至约100 mg/L; 自约10 mg/L至约50 mg/L; 自约10 mg/L 至约35 mg/L; 自约10 mg/L至约250 mg/L; 自约1.0 mg/L至约 66 mg/L; 自约1.0 mg/L至约60 mg/L; 自约1.0 mg/L至约50 mg/L; 自约1.0 mg/L至约40 mg/L; 自约1.0 mg/L至约30 mg/L; 自约1.0 mg/L至约20 mg/L; 自约1.0 mg/L至约10 mg/L; 自约 10 mg/L至约66 mg/L; 自约20 mg/L至约66 mg/L; 自约30 mg/L 至约66 mg/L; 自约40 mg/L至约66 mg/L; 自约50 mg/L至约66 mg/L; 自约60 mg/L至约66 mg/L; 自约5.6 mg/L至约66 mg/L; 自约10 mg/L至约60 mg/L; 自约20 mg/L至约50 mg/L; 自约30 mg/L至约40 mg/L; 自约1 mg/L至约14 mg/L; 自约1.3 mg/L至 约13 mg/L; 自约1.6 mg/L至约12 mg/L; 自约1.4 mg/L至约11 mg/L; 自约5.6 mg/L至约14 mg/L; 自约5.9 mg/L至约13 mg/L; 自约6.2 mg/L至约12 mg/L; 自约7 mg/L至约11 mg/L; 约1.0 或2.0或3.0或4.0或5.0或6.0或7.0或8.0或9.0或10或11或12或13 或14或15或16或17或18或19或20或21或22或23或24或25或26 或27或27或28或29或30或31或32或33或34或35或36或37或38 或39或40或41或42或43或45 mg/L任一; 5.6 mg/L, 6 mg/L,

[0076]

	6.2 mg/L, 7 mg/L, 8 mg/L, 9 mg/L, 10 mg/L, 11 mg/L, 12 mg/L, 13 mg/L, 14 mg/L或15 mg/L或16 mg/L或17 mg/L或18 mg/L或19 mg/L或20 mg/L或21 mg/L或22 mg/L或23 mg/L或24 mg/L或25 mg/L任一; 至少约1.0或3.0或5.0或7.0或10或11或12或13或14或15或16或17或18或19或20 mg/L任一且不超过约44或24或14或11 mg/L。
(b) 胱氨酸	自约0.5 mM至约2.5 mM; 自约0.5 mM至约2.0 mM; 自约0.5 mM至约1.75 mM; 自约0.5 mM至约2.5 mM; 自约0.8 mM至约2.5 mM; 自约0.8 mM至约2.25 mM; 自约0.8 mM至约2.0 mM; 自约0.8 mM至约1.75 mM; 自约0.8 mM至约1.6 mM; 自约0.8 mM至约1.25 mM; 自约0.8 mM至约1.0 mM; 自约1.0 mM至约1.6 mM; 自约1.0 mM至约2.5 mM; 自约1.25 mM至约2.5 mM; 自约1.5 mM至约2.5 mM; 自约1.75 mM至约2.5 mM; 自约2.0 mM至约2.5 mM; 自约2.25 mM至约2.5 mM; 自约0.9 mM至约2.0 mM; 自约0.8 mM至约1.75 mM; 自约0.9 mM至约1.5 mM; 自约1.0 mM至约1.25 mM; 自约1.0 mM至约2.0 mM; 自约1.0 mM至约1.5 mM; 自约1.2 mM至约1.4 mM; 约0.8或0.9或1.0或1.1或1.2或1.3或1.4或1.5或1.6 mM任一; 0.8 mM, 0.85 mM, 0.9 mM, 0.95 mM, 1.0 mM, 1.05 mM, 1.1 mM, 1.15 mM, 1.2 mM, 1.25 mM, 1.3 mM, 1.35 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.55 mM, 1.6 mM, 1.65 mM, 1.7 mM, 或1.75 mM任一; 至少约0.8或0.9或1.0或1.1 mM任一且不超过约1.75或1.6或1.5或1.4 mM。
(c) 铜	自约69 nM至约1,000.0 nM; 自约20 nM至约480.0 nM; 自约20 nM至约400 nM; 自约20 nM至约350 nM; 自约20 nM至约300 nM; 自约20 nM至约250 nM; 自约20 nM至约200 nM; 自约20 nM至约150 nM; 自约20 nM至约100 nM; 自约20 nM至约50 nM; 自约50 nM至约480 nM; 自约100 nM至约480 nM; 自约150 nM至约480 nM; 自约200 nM至约480 nM; 自约250 nM至约480 nM; 自约300 nM至约480 nM; 自约325 nM至约375 nM; 自约350 nM至约480 nM; 自约400 nM至约480 nM; 自

[0077]

	约50 nM至约450 nM; 自约100 nM至约400 nM; 自约150 nM至约350 nM; 自约200 nM至约300 nM; 自约22 nM至约440 nM; 自约26 nM至约400 nM; 自约30 nM至约360 nM; 自约54 nM至约480 nM; 自约62 nM至约440 nM; 自约69 nM至约400 nM; 自约80 nM至约400 nM; 自约100 nM至约400 nM; 自约125 nM至约400 nM; 自约150 nM至约400 nM; 自约200 nM至约400 nM; 自约250 nM至约400 nM; 自约300 nM至约400 nM; 自约325 nM至约375 nM; 自约325 nM至约350 nM; 约25或26或27或28或29或30或40或50或60或69或100或110或120或125或130或140或150或160或170或175或180或190或200或210或220或225或230或240或250或260或270或275或280或290或300或310或320或325或330或335或336或337或338或339或340或345或350或360或370或375或380或390或400 nM任一; 54 nM, 56 nM, 58 nM, 60 nM, 62 nM, 64 nM, 66 nM, 68 nM, 69 nM, 70 nM, 71 nM, 72 nM, 73 nM, 74 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM, 150 nM, 175 nM, 200 nM, 225 nM, 250 nM, 275 nM, 300 nM, 325 nM, 350 nM, 375 nM, 或400 nM任一; 至少约20或25或30或35或40或45或50或55或60或65或70或80 nM任一且不超过约420或400或380或360 nM。
(d) 动物衍生的水解产物	自约6.0 g/L至约20 g/L; 自约5.6 g/L至约38 g/L; 自约5.6 g/L至约30 g/L; 自约5.6 g/L至约25 g/L; 自约5.6 g/L至约20 g/L; 自约7.0 g/L至约20 g/L; 自约9.0至约11.0 g/L; 自约5.6 g/L至约10 g/L; 自约5.6 g/L至约38 g/L; 自约10 g/L至约38 g/L; 自约15 g/L至约38 g/L; 自约20 g/L至约38 g/L; 自约25 g/L至约38 g/L; 自约30 g/L至约38 g/L; 自约35 g/L至约38 g/L; 自约10 g/L至约30 g/L; 自约15 g/L至约25 g/L; 自约5.6 g/L至约14 g/L; 自约5.9 g/L至约13 g/L; 自约6.2 g/L至约12 g/L; 自约7.0 g/L至约11.0 g/L; 自约7.0 g/L至约35.0 g/L; 自约7.0 g/L至约25.0 g/L; 自约7.0 g/L至约15.0 g/L; 自约8.0 g/L至约12.0 g/L; 约2.8或3.0或3.2或3.4或3.6或3.8或4.0或4.2或4.4或4.6或4.8或

[0078]

	5.0或5.2或5.4或5.6或6或6.2或7或7.4或7.8或8或9或10或11或12或13或14或15或20或25或30或35或40或45或50 g/L任一； 2.8 g/L, 3.0 g/L, 3.2 g/L, 3.4 g/L, 3.6 g/L, 3.8 g/L, 4.0 g/L, 4.2 g/L, 4.4 g/L, 4.6 g/L, 4.8 g/L, 5.0 g/L, 6 g/L, 6.2 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13 g/L, 或14 g/L任一；至少约2.8或3.2或3.4或3.6或3.8或4.0或4.2或4.6或5.0或5.6或6或6.2或7或8或9 g/L任一且不超过约14或13或12或11 g/L。
(e) 植物衍生的水解产物	自约1.0 g/L至约10.0 g/L；自约1.4 g/L至约6.2 g/L；自约1.4 g/L至约6.0 g/L；自约1.4 g/L至约5.5 g/L；自约1.4 g/L至约5.0 g/L；自约1.4 g/L至约4.5 g/L；自约1.4 g/L至约4.0 g/L；自约1.4 g/L至约3.5 g/L；自约1.4 g/L至约3.0 g/L；自约1.4 g/L至约2.5 g/L；自约1.4 g/L至约2.0 g/L；自约2.0 g/L至约6.2 g/L；自约2.5 g/L至约6.2 g/L；自约3.0 g/L至约6.2 g/L；自约3.5 g/L至约6.2 g/L；自约4.0 g/L至约6.2 g/L；自约4.5 g/L至约6.2 g/L；自约5.0 g/L至约6.2 g/L；自约5.5 g/L至约6.2 g/L；自约1.5 g/L至约6.0 g/L；自约2.0 g/L至约5.5 g/L；自约2.5 g/L至约5.0 g/L；自约3.0 g/L至约4.5 g/L；自约3.0 g/L至约3.2 g/L；自约3.5 g/L至约4.0 g/L；自约1.4 g/L至约3.4 g/L；自约1.5 g/L至约3.0 g/L；自约1.75 g/L至约2.8 g/L；自约1.5 g/L至约5.5 g/L；自约1.5 g/L至约4.5 g/L；自约1.5 g/L至约3.5 g/L；自约1.5 g/L至约2.5 g/L；自约1.75 g/L至约2.75 g/L；自约2.0 g/L至约3.0 g/L；自约2.25 g/L至约2.75 g/L；约1.4或1.5或1.75或2.0或2.25或2.5或2.8或3.0或3.1或3.25或3.4或3.5或3.75或4.0 g/L任一；1.4 g/L, 1.5 g/L, 1.75 g/L, 2.0 g/L, 2.25 g/L, 2.5 g/L, 2.8 g/L, 3.0 g/L, 3.2 g/L, 3.25 g/L, 3.4, 3.75, 或4.0 g/L任一；至少约1.4或1.5或1.75 g/L任一且不超过约3.4或3或2.8 g/L。

[0079] 在一种变化中,胰岛素在细胞培养培养基中以自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 60.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 40.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 30.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L 或自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L 或自约 10.0mg/L 至约 30.0mg/L 或自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L 或自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L 或自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L 或自约 7.0mg/L

至约 11.0mg/L 或自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L 的浓度或以约 5.0mg/L, 6.0mg/L, 7.0mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L, 11.0mg/L, 12.0mg/L, 13.0mg/L, 14.0mg/L, 15.0mg/L, 16.0mg/L, 17.0mg/L, 18.0mg/L, 19.0mg/L, 20.0mg/L, 21.0mg/L, 22.0mg/L, 23.0mg/L, 24.0mg/L, 25.0mg/L, 26.0mg/L, 27.0mg/L, 28.0mg/L, 29.0mg/L 或 30.0mg/L 任一的浓度或以约 7mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L 或 11.0mg/L 任一的浓度存在。

[0080] 在一种变化中, 铜在细胞培养培养基中以自约 69.0nM 至约 400.0nM 或自约 80nM 至约 400nM 或自约 100nM 至约 400nM 或自约 125nM 至约 400nM 或自约 150nM 至约 400nM 或自约 200nM 至约 400nM 或自约 250nM 至约 400nM 或自约 300nM 至约 400nM 或自约 325nM 至约 375nM 或自约 325nM 至约 350nM 的浓度或以约 100nM, 125nM, 150nM, 175nM, 200nM, 225nM, 250nM, 275nM, 300nM, 325nM, 350nM, 375nM 或 400nM 任一的浓度或以约 330nM, 335nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一的浓度或以约 335nM, 336nM, 337nM, 338nM, 339nM 或 400nM 任一的浓度或以约 339nM 的浓度存在。

[0081] 在一种变化中, 胱氨酸在细胞培养培养基中以自约 0.8mM 至约 2.5mM 或自约 0.8mM 至约 2.0mM 或自约 0.8mM 至约 1.75mM 或自约 0.8mM 至约 1.5mM 或自约 1.0mM 至约 2.0mM 或自约 1.0mM 至约 1.5mM 或自约 1.2mM 至约 1.4mM 的浓度或以约 0.8mM 或 0.9mM 或 1.0mM 或 1.1mM 或 1.2mM 或 1.3mM 或 1.4mM 或 1.5mM 任一的浓度或以约 1.1mM, 1.3mM 或 1.5mM 任一的浓度或以约 1.3mM 的浓度存在。

[0082] 在一种变化中, 动物衍生的水解产物在细胞培养培养基中以自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 或自约 7.0g/L 至约 35.0g/L 或自约 7.0g/L 至约 25.0g/L 或自约 7.0g/L 至约 15.0g/L 或自约 8.0g/L 至约 12.0g/L 或自约 7.0g/L 至约 11.0g/L 或约 5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L, 25g/L, 30g/L, 35g/L, 40g/L, 45g/L 或 50g/L 任一或约 5g/L, 6g/L, 7g/L, 8g/L, 9g/L, 10g/L, 11g/L, 或 12g/L 任一或约 10g/L 的浓度存在。

[0083] 在一种变化中, 植物衍生的水解产物在细胞培养培养基中以自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 或自约 1.5g/L 至约 5.5g/L 或自约 1.5g/L 至约 4.5g/L 或自约 1.5g/L 至约 3.5g/L 或自约 1.5g/L 至约 2.5g/L 或自约 1.75g/L 至约 2.75g/L 或自约 2.0g/L 至约 3.0g/L 或自约 2.25g/L 至约 2.75g/L 或约 1.75g/L, 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L, 3.0g/L, 3.25, 3.5g/L, 3.75g/L, 或 4.0g/L 任一或约 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L 或 3.0g/L 任一或约 2.5g/L 的浓度存在。

[0084] 在又一种变化中, 细胞培养培养基中存在半胱氨酸。一方面, 可以将半胱氨酸添加至基础细胞培养培养基 (例如通过给基础细胞培养培养基补充包含半胱氨酸的补料培养基)。在一种变化中, 细胞培养培养基以自约 0.5mM 至约 5.0mM 或自约 1.0mM 至约 12.0mM 或自约 2.0mM 至约 10.0mM 或自约 2.0mM 至约 8.0mM 或约 1.0mM 至约 10.0mM 或自约 1.0mM 至约 8.0mM 或自约 2.0mM 至约 12.0mM 或自约 3.0mM 至约 12.0mM 或自约 4.0mM 至约 12.0mM 或自约 5.0mM 至约 12.0mM 或自约 6.0mM 至约 12.0mM 或自约 6.0mM 至约 10.0mM 或自约 6.0mM 至约 8.0mM 或约 0.5mM, 0.8mM, 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM, 2.5mM, 5.0mM, 5.5mM, 6.0mM, 6.5mM, 7.0mM, 7.5mM, 8.0mM, 8.5mM 或 9.0mM 任一的浓度包含半胱氨酸 (其可以经包含半胱氨酸的补料培养基添加至不含半胱氨酸的基础细胞培养培养基)。一方面, 以如下量将半胱氨酸添加至基础细胞培养培养基 (添加可以是在细胞培养周期的任何时间点且可以是以一种或多种可以相同或不同的量), 使得半胱氨酸在细胞培养培养基中以约 7.5mM 的浓度存在。

[0085] 在又一种变化中,细胞培养培养基中存在胱氨酸。一方面,可以将胱氨酸添加至基础细胞培养培养基(例如通过给可以早就包含或不包含胱氨酸的基础细胞培养培养基补充包含胱氨酸的补料培养基)。在一种变化中,细胞培养培养基以自约 0.5mM 至约 5.0mM 的浓度包含胱氨酸(其可以经包含胱氨酸的补料培养基添加至基础细胞培养培养基),诸如以如下量,使得在细胞培养培养基中提供约 0.8mM 半胱氨酸。

[0086] 在某些实施方案中,细胞培养培养基包含胱氨酸但不含半胱氨酸。

[0087] 可以给细胞培养培养基(例如基础细胞培养培养基)进一步补充额外的细胞培养培养基成分(例如诸如经补料细胞培养培养基)。一方面,额外的细胞培养培养基成分包含胰岛素。在另一个方面,额外的细胞培养培养基成分包含胰岛素和半胱氨酸。可以给本文中提供的细胞培养培养基补充适合于培养细胞的任何量的胰岛素和/或半胱氨酸。一方面,以如下量将胰岛素添加至细胞培养培养基(例如在细胞培养周期的一个或多个时间点添加至基础细胞培养培养基),使得在细胞培养中提供约 15mg/L 或约 25mg/L 浓度的胰岛素。一方面,以如下量将胰岛素添加至细胞培养培养基(例如在细胞培养周期的一个或多个时间点添加至基础细胞培养培养基),使得在细胞培养中提供选自下组的浓度的胰岛素:自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L;自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L;自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L;自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L;自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 60.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 30.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L;自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L;自约 10.0mg/L 至约 30.0mg/L;自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L;自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L;自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L;自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L;约 5.0mg/L,6.0mg/L,7.0mg/L,8.0mg/L,9.0mg/L,10.0mg/L,11.0mg/L,12.0mg/L,13.0mg/L,14.0mg/L,15.0mg/L,16.0mg/L,17.0mg/L,18.0mg/L,19.0mg/L,20.0mg/L,21.0mg/L,22.0mg/L,23.0mg/L,24.0mg/L,25.0mg/L,26.0mg/L,27.0mg/L,28.0mg/L,29.0mg/L 或 30.0mg/L 任一;约 7mg/L,8.0mg/L,9.0mg/L,10.0mg/L 和 11.0mg/L 任一。在另一个方面,以如下量将半胱氨酸添加至细胞培养培养基(例如在细胞培养周期的一个或多个时间点添加至基础细胞培养培养基),使得在细胞培养中提供选自下组的浓度的半胱氨酸:自约 1.0mM 至约 12.0mM 或自约 2.0mM 至约 10.0mM 或自约 2.0mM 至约 8.0mM 或约 1.0mM 至约 10.0mM 或自约 1.0mM 至约 8.0mM 或自约 2.0mM 至约 12.0mM 或自约 3.0mM 至约 12.0mM 或自约 4.0mM 至约 12.0mM 或自约 5.0mM 至约 12.0mM 或自约 6.0mM 至约 12.0mM 或自约 6.0mM 至约 10.0mM 或自约 6.0mM 至约 8.0mM 或约 5.0mM,5.5mM,6.0mM,6.5mM,7.0mM,7.5mM,8.0mM,8.5mM 或 9.0mM 任一。在另一个方面,以如下量将胱氨酸添加至细胞培养培养基(例如在细胞培养周期的一个或多个时间点添加至基础细胞培养培养基),使得在细胞培养中提供自约 0.1mM 至约 1.5mM 的浓度,诸如约 0.2mM 的浓度的胱氨酸。

[0088] 在一些方面,本文中提供的细胞培养培养基包含自约 5.0mg/L 至约 14.0mg/L,自约 5.5mg/L 至约 13.0mg/L,自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L,自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L,自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L,或自约 8.5mg/L 至约 14.0mg/L 胰岛素。理解的是,包含胰岛素的细胞培养培养基可以以本文中提供的任何量进一步包含铜和胱氨酸中任一种或多种。例如,理解的是,包含自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L 胰岛素的细胞培养培养基可以进一步包含自约 70nM 至约 400nMf 铜和/或自约 0.5mM 至约 2.5mM 胱氨酸且可以进一步包含动物衍生

的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物,例如自约 5.5g/L 至约 40.0g/L 动物衍生的水解产物和 / 或自约 1.5g/L 至约 6.5g/L 植物衍生的水解产物。

[0089] 在其它方面,本文中提供的细胞培养培养基包含自约 65nM 至约 400nM,自约 70nM 至约 375nM,自约 75nM 至约 350nM,自约 80nM 至约 325nM,自约 85nM 至约 300nM,或自约 90nM 至约 275nM 铜。理解的是,包含铜的细胞培养培养基可以以本文中提供的任何量进一步包含胰岛素和胱氨酸中任一种或多种。例如,理解的是,包含自约 85nM 至约 300nM 铜的细胞培养培养基可以进一步包含自约 0.8mM 至约 1.75mM 胱氨酸和 / 或自约 8.0mg/L 至约 12.0mg/L 胰岛素且可以进一步包含动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物,例如自约 5.5g/L 至约 40.0g/L 动物衍生的水解产物和 / 或自约 1.5g/L 至约 6.5g/L 植物衍生的水解产物。

[0090] 在一些方面,本文中提供的细胞培养培养基包含自约 0.8mM 至约 1.75mM,自约 0.9mM 至约 1.50mM,自约 1.0mM 至约 1.40mM,或自约 1.0mM 至约 1.30mM 胱氨酸。理解的是,包含胱氨酸的细胞培养培养基可以以本文中提供的任何量进一步包含胰岛素和铜中任一种或多种。例如,理解的是,包含自约 0.8mM 至约 1.75mM 胱氨酸的细胞培养培养基可以进一步包含自约 70nM 至约 375nM 铜和 / 或自约 8.0mg/L 至约 12.0mg/L 胰岛素且可以进一步包含动物衍生的水解产物和 / 或植物衍生的水解产物,例如自约 5.5g/L 至约 40.0g/L 动物衍生的水解产物和 / 或自约 1.5g/L 至约 6.5g/L 植物衍生的水解产物。

[0091] 在一些实施方案中,细胞培养培养基进一步以表 1 中描述的量包含动物衍生的水解产物。在其它实施方案中,细胞培养培养基进一步以表 1 中描述的量包含植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,细胞培养培养基进一步以表 1 中描述的量包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者。

[0092] 在一些方面,本文中提供的细胞培养培养基包含自约 1.5g/L 至约 6.0g/L,自约 2.0g/L 至约 5.5g/L,自约 2.5g/L 至约 5.0g/L,自约 3.0g/L 至约 4.5g/L,或自约 3.5g/L 至约 4.0g/L 植物衍生的水解产物。理解的是,包含植物衍生的水解产物的细胞培养培养基可以以本文中提供的任何量进一步包含胱氨酸,胰岛素和铜中任一种或多种。例如,理解的是,包含自约 0.8mM 至约 1.75mM 胱氨酸的细胞培养培养基可以进一步包含自约 70nM 至约 375nM 铜和 / 或自约 8.0mg/L 至约 12.0mg/L 胰岛素且可以进一步包含动物衍生的水解产物,例如自约 6.0g/L 至约 20.0g/L 动物衍生的水解产物。

[0093] 在一些方面,本文中提供的细胞培养培养基包含自约 6.0g/L 至约 35.0g/L,自约 7.0g/L 至约 30.0g/L,自约 8.0g/L 至约 25.0g/L,自约 9.0g/L 至约 20g/L,或自约 10.0g/L 至约 15.0g/L 动物衍生的水解产物。理解的是,包含动物衍生的水解产物的细胞培养培养基可以以本文中提供的任何量进一步包含胱氨酸,胰岛素和铜中任一种或多种。例如,理解的是,包含自约 0.8mM 至约 1.75mM 胱氨酸的细胞培养培养基可以进一步包含自约 70nM 至约 375nM 铜和 / 或自约 8.0mg/L 至约 12.0mg/L 胰岛素且可以进一步包含植物衍生的水解产物,例如自约 1.5g/L 至约 3.0g/L 植物衍生的水解产物。

[0094] 在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含自约 0.9mM 至约 1.5mM 胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含自约 1.4mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素或自约 1.44mg/L 至约 66.0mg/L 胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含自约 26.0nM 至约 400.0nM 铜。在一些方面,细胞培养培养基包含两种或更多种选自下述的成分:

(a) 自约 69.0nM 至约 400.0nM 铜, (b) 自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素或自约 1.44mg/L 至约 66mg/L 胰岛素, 和 (c) 自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸。

[0095] 可以以本领域知道的形式将本文中描述的细胞培养培养基成分(例如包含铜, 胰岛素, 胱氨酸, 动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中任一种或多种的细胞培养培养基)添加至细胞培养培养基, 诸如盐, 水合物或其组合。还可以作为溶液, 提取物, 或以固体形式将细胞培养培养基成分提供给细胞培养培养基。在一些实施方案中, 作为 CuSO_4 将铜提供给细胞培养培养基。作为一个非限制性例子, 可以作为二钠盐单水合物粉将胱氨酸提供给细胞培养培养基。蛋白质水解产物(也称作胨)通常是通过多种生物学基础的起始材料(诸如动物组织, 乳衍生产品, 微生物或植物)的酶促消化而制造的。在本文中提供的细胞培养培养基中使用的水解产物可以衍生自植物或动物(例如植物衍生的水解产物和/或动物衍生的水解产物)。本文中描述的植物水解产物可以衍生自但不限于麦麸(wheat gluten), 玉蜀黍, 谷物, 大豆, 或棉籽。本文中描述的动物水解产物可以衍生自但不限于牛, 鸡, 山羊, 马, 人, 绵羊, 猪, 或家兔或其它动物。

[0096] 还提供制备供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的细胞培养培养基的方法, 其中该方法包括在适合于细胞培养的组合物中组合铜, 胰岛素和胱氨酸中任两种或更多种。一方面, 方法包括将铜, 胰岛素和胱氨酸中任两种或更多种添加至适合于细胞培养的组合物, 其中可以序贯地或同时地将铜, 胰岛素和胱氨酸中两种或更多种添加至组合物。在又一种变化中, 提供制备供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的细胞培养培养基的方法, 其中该方法包括在第一时间段在适合于细胞培养的组合物中组合铜, 胰岛素和胱氨酸中任两种或更多种且其中该方法进一步包括在第二时间段添加一定量的胰岛素, 诸如一个细胞生长周期至少一次, 至少两次, 至少三次, 至少四次, 至少五次, 至少六次, 至少七次, 等。在一些实施方案中, 细胞生长周期是至少 1 天, 2 天, 3 天, 4 天, 5 天, 6 天, 7 天, 8 天, 9 天, 10 天, 11 天, 12 天, 13 天, 14 天, 15 天, 16 天, 17 天, 18 天, 19 天, 20 天, 或任何量的天, 其中细胞可以维持在细胞培养中同时仍维持存活。在制备细胞培养培养基的方法的一种变化中, 以如下量添加胱氨酸, 使得在细胞培养培养基中提供约 0.9mM 至约 1.5mM 胱氨酸。在制备细胞培养培养基的方法的另一种变化中, 以如下量添加胰岛素, 使得在细胞培养培养基中提供自约 1.4mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素或自约 1.44mg/L 至约 66.0mg/L 胰岛素。在制备细胞培养培养基的方法的另一种变化中, 以如下量添加铜, 使得在细胞培养培养基中提供自约 26.0nM 至约 400.0nM 铜。在一些方面, 通过组合两种或更多种选自下述的成分来制备细胞培养培养基: (a) 如下量的铜, 使得在细胞培养培养基中提供约 69.0nM 至约 400.0nM 铜, (b) 如下量的胰岛素, 使得在细胞培养培养基中提供自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 或自约 1.44mg/L 至约 66mg/L 胰岛素, 和 (c) 如下量的胱氨酸, 使得在细胞培养培养基中提供自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸。

[0097] 在本文中的一些实施方案中, 细胞培养培养基为基础细胞培养培养基。在本文中的其它实施方案中, 细胞培养培养基为补料细胞培养培养基。在本文中的一些实施方案中, 细胞培养培养基为包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸中至少一种的基础细胞培养培养基, 且其中给基础细胞培养培养基补充(例如于细胞培养周期启动后的一个时间段, 诸如一个细胞培养周期至少两次, 至少三次, 至少四次, 至少五次, 至少六次, 至少七次, 等任一)包含胰岛素, 动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物中任一种或多种的补料细胞培养培养基。

[0098] 本文中提供各种培养基成分可以以如下量存在,其导致一种或多种对于培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的细胞和/或自细胞培养生成贝伐珠单抗有利的特性。有利的特性包括但不限于细胞培养中升高的细胞存活力,自细胞生成的贝伐珠单抗的量增多(例如升高的贝伐珠单抗滴度)和/或降低的贝伐珠单抗氧化。本文中提供的细胞培养培养基的有利的特性还可以包括维持或提高由细胞生成的贝伐珠单抗的量(例如抗体滴度)同时维持贝伐珠单抗或其片段的N-糖基化概况,电荷异质性和/或氨基酸序列完整性。这些有利的特性适用于培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的细胞的方法和在细胞培养中生成贝伐珠单抗或其片段的方法,如本文中描述的。

[0099] 一方面,本文中提供的细胞培养培养基当在生成贝伐珠单抗或其片段的方法中使用导致一种或多种有利的产品品质属性或有利的特性。在一种变化中,与由在不同细胞培养培养基中培养的生成贝伐珠单抗的细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量相比,本文中提供的细胞培养培养基的使用提高由胞生成的贝伐珠单抗的量(例如提高抗体滴度)。

[0100] 如熟练技术人员会理解的,本文中详述的细胞培养培养基可以包含其它可用于细胞培养的成分(例如除铜,胰岛素,和胱氨酸,和任选的胨水解产物中的一种或多种以外)。例如,理解的是,细胞培养培养基可以包含额外的成分诸如氨基酸(例如谷氨酰胺,精氨酸,或天冬酰胺),维生素(包括但不限于B维生素,诸如维生素B1,维生素B2,维生素B3,维生素B6,维生素B7,维生素B9,或维生素B12中任一种或多种),痕量元素,过渡金属(包括但不限于镍,铁(例如三价铁或二价铁),或锌),和其它培养基成分。还可以给本文中提供的任何培养基补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素,运铁蛋白,或表皮生长因子),离子(诸如钠,氯,钙,镁,和磷酸),缓冲剂(诸如HEPES),核苷(诸如腺苷和胸苷),痕量元素和葡萄糖或等效能源。额外的细胞培养培养基成分(诸如本文中列出的那些)可以以本领域技术人员会知道的适宜浓度包括在细胞培养培养基中。

[0101] III. 本发明的方法和用途

[0102] 本文中提供贝伐珠单抗或其片段生产中使用的培养细胞的方法,和包含铜,胰岛素和胱氨酸中一种或多种的细胞培养培养基的用途。在一些方面,提供用于培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法,其中该方法包括使哺乳动物细胞与包含铜,胰岛素和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基接触的步骤,其中细胞培养培养基可以额外包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者。在一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含铜和胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基中成分的量(例如铜,胰岛素,胱氨酸,植物衍生的水解产物和/或动物衍生的水解产物的量)为选自表1中提供的值的量。在一些实施方案中,方法进一步包括将额外量的胰岛素添加至培养基的步骤。可以在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基至少1次,至少3次,至少6次或至少12次。在本文中的一些实施方案中,以如下添加量将额外量的胰岛素添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表1诸如自约1mg/L至约44mg/L的浓度提供胰岛素。在一些方面,细胞培养培养基进一步包含动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物,

或动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者。

[0103] 在一些其它方面,提供用于培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的细胞的方法,其中该方法包括使细胞与包含两种或更多种选自铜,胰岛素,和胱氨酸的成分的细胞培养培养基接触的步骤。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 69.0nM 至约 400.0nM 的浓度包含铜。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 0.8mM 至约 2.5mM 的浓度包含胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含浓度为自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的胰岛素和浓度为自约 69.0nM 至约 400.0nM 的铜。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含浓度为自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的胰岛素和浓度为自约 0.8mM 至约 2.5mM 的胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含浓度为自约 69.0nM 至约 400.0nM 的铜和浓度为自约 0.8mM 至约 2.5mM 的胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基包含浓度为自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的胰岛素,浓度为自约 69.0nM 至约 400.0nM 的铜和浓度为自约 0.8mM 至约 2.5mM 的胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以选自表 1 的量包含胱氨酸,胰岛素和 / 或铜。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括将额外量的胰岛素添加至本文中提供的细胞培养培养基的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。可以在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基至少一次,至少两次,至少三次,至少六次,至少九次,至少十二次,或至少十四次。在本文中的一些实施方案中,以如下添加量将额外量的胰岛素添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1,诸如 5.6mg/L 至约 66mg/L 的浓度提供胰岛素。在一些方面,细胞培养培养基进一步包含动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物,或动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括将额外量的动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物添加至本文中提供的细胞培养培养基的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文中的一些实施方案中,以如下添加量将额外量的动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物。

[0104] 在另一个方面,本文中提供生产贝伐珠单抗或其片段的方法,其中该方法包括使能够生成贝伐珠单抗或其片段的细胞与包含两种或更多种选自铜,胰岛素,和胱氨酸的成分的细胞培养培养基接触的步骤。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 的浓度包含胰岛素。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 69.0nM 至约 400.0nM 的浓度包含铜。在本文中的一些实施方案中,细胞培养培养基以自约 0.8mM 至约 2.5mM 的浓度包含胱氨酸。在本文中的任何实施方案中,细胞培养培养基可以以选自表 1 的量包含胱氨酸,胰岛素或铜。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括将额外量的胰岛素添加至本文中提供的细胞培养培养基的步骤。可以以任何适合于细胞培养的量将胰岛素添加至细胞培养培养基。一方面,以如下量将胰岛素添加至细胞培养培养基,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供胰岛素。在一个特定方面,以如下量将胰岛素添加至细胞培养培养基,使得在细胞培养培养基中以选自下组的浓度提供胰岛素:自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L;自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L;自约 5.0mg/L

L 至约 60.0mg/L ;自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L ;自约 5.0mg/L 至约 40.0mg/L ;自约 5.0mg/L 至约 30.0mg/L ;自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L ;自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L ;自约 10.0mg/L 至约 30.0mg/L ;自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L ;自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L ;自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L ;自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 和自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L。在另一个方面,以如下量将胰岛素添加至细胞培养培养基,使得在细胞培养培养基中以约 5.0mg/L, 6.0mg/L, 7.0mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L, 11.0mg/L, 12.0mg/L, 13.0mg/L, 14.0mg/L, 15.0mg/L, 16.0mg/L, 17.0mg/L, 18.0mg/L, 19.0mg/L, 20.0mg/L, 21.0mg/L, 22.0mg/L, 23.0mg/L, 24.0mg/L, 25.0mg/L, 26.0mg/L, 27.0mg/L, 28.0mg/L, 29.0mg/L 或 30.0mg/L 任一的浓度提供胰岛素。在又一个方面,以如下量将胰岛素添加至细胞培养培养基,使得在细胞培养培养基中以约 7mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L 或 11.0mg/L 任一的浓度提供胰岛素。可以在细胞培养周期期间的任何时间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基。例如,可以在 20 天细胞培养周期的第 1-20 天中任一天或多天(例如在第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 或 20 天中任一天或多天)添加胰岛素。当添加额外量的胰岛素时,可以以任何量添加,当在细胞培养周期期间添加胰岛素超过一次时,量可以相同或不同。因此,领会的是,对于 14 天细胞培养周期,可以在第 1-14 天中任一天或多天(例如在第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 或 14 天中任一天或多天)以任何量添加胰岛素,当在细胞培养周期期间添加胰岛素超过一次时,量可以相同或不同。可以在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基至少一次,至少两次,至少三次,至少六次,至少九次,至少十二次,或至少十四次。在本文中的一些实施方案中,以如下添加量将额外量的胰岛素添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1, 诸如 5.6mg/L 至约 66mg/L 的浓度提供胰岛素。在一些方面,细胞培养培养基进一步包含动物衍生的水解产物,植物衍生的水解产物,或动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括将额外量的动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物添加至本文中提供的细胞培养培养基的步骤(例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文中的一些实施方案中,以如下添加量将额外量的动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物。

[0105] 在另一个方面,本文中提供生产贝伐珠单抗或其片段的方法,其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的步骤,其中细胞培养周期中的初始细胞培养培养基包含两种或更多种选自下组的成分:浓度为自约 69nM 至约 1,000nM 的铜,浓度为自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的胰岛素,和浓度为自约 0.7mM 至约 2.0mM 的胱氨酸,且其中细胞生成贝伐珠单抗或片段。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含(1)铜和胰岛素;(2)铜和胱氨酸;(3)胰岛素和胱氨酸;或(4)铜,胰岛素,和胱氨酸。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以选自表 1 中描述的浓度的浓度包含铜,胱氨酸,和/或胰岛素。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基以选自表 1 中描述的浓度的浓度包含动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含胰岛素且该方法进一步包括在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基的步骤。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基至少一次,至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,或至少六

次。在一些实施方案中,每次添加的胰岛素为自约 5mg/L 至约 25mg/L(例如约 5mg/L,10mg/L,15mg/L,20mg/L 和 25mg/L 任一)。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为自约 20mg/L 至约 100mg/L(例如约 20mg/L,25mg/L,30mg/L,35mg/L,40mg/L,45mg/L,50mg/L,55mg/L,60mg/L,65mg/L,70mg/L,75mg/L,80mg/L,85mg/L,90mg/L,95mg/L,和 100mg/L 任一)。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基包含胱氨酸且该方法进一步包括在细胞培养周期期间将额外量的胱氨酸添加至细胞培养培养基的步骤。例如,以如下量添加胱氨酸,使得在细胞培养培养基中提供自约 0.1 至约 1.5mM 额外的胱氨酸(例如在细胞培养培养基中约 0.1mM,约 0.2mM,约 0.3mM,约 0.4mM,约 0.5mM,约 0.6mM,约 0.7mM,约 1mM,或约 1.5mM 额外的胱氨酸)。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间以分批补料添加胱氨酸。在一些实施方案中,方法进一步包括在细胞培养周期期间的至少一次分批补料(例如在细胞培养周期期间的两次,三次,或四次分批补料)。在一些实施方案中,分批补料培养基进一步包含动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物(例如以选自表 1 中描述的浓度的浓度)。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间,将培养基的温度相对于培养开始时的温度降低至少约 2,至少约 3,至少约 4,或至少约 5 摄氏度。在一些实施方案中,在细胞培养周期期间将培养基的温度降低至少一次或至少两次。在一些实施方案中,在培养开始后第 8 天和第 10 天降低温度。在一些实施方案中,于范围为自约 31℃ 至约 35℃ 的温度培养细胞。在一些实施方案中,将细胞于约 35℃ 的第一温度培养第一时间段,于约 33℃ 的第二温度培养第二时间段,并于约 31℃ 的第三温度培养第三时间段。在一些实施方案中,在具有处于约 7.0 至约 7.3 的 pH 的培养基中培养细胞。

[0106] 如本文中使用的,术语“初始细胞培养培养基”指细胞培养周期开始时的细胞培养培养基。在一些实施方案中,初始细胞培养培养基为在基础培养基中接种细胞后的细胞培养培养基。

[0107] 如本文中使用的,术语“累积”指在细胞培养周期上添加的一种或多种特定成分的总量,包括细胞培养周期开始使添加的成分和随后添加的成分。在一些实施方案中,累积量为添加后在细胞培养培养基中测量或计算的添加入细胞培养培养基中的一种或多种成分的总浓度。在一些实施方案中,通过含有浓缩成分(一种或多种)的补料溶液将成分(一种或多种)添加入细胞培养培养基中。例如,如果初始培养培养基具有 10mg/L 胰岛素,且在细胞培养周期期间以 15mg/L 添加额外量的胰岛素以在细胞培养培养基中实现 15mg/L 的增量,那么在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为 25mg/L。

[0108] 在一些实施方案中,细胞培养周期指自将细胞接种入基础细胞培养培养基中用于生成由细胞表达的多肽至生产时段结束的时间段。在一些实施方案中,细胞培养周期为至少 10 天,至少 11 天,至少 12 天,至少 13 天,至少 14 天,至少 15 天,至少 16 天,至少 17 天,至少 18 天,至少 19 天,至少 20 天,至少 21 天,至少 22 天,至少 23 天,或任何量的天数,其中细胞可以维持存活以生成由细胞表达的多肽。

[0109] 在本文中的一些实施方案中,与当在不含表 1 中所列成分中一种或多种的细胞培养培养基中培养时由哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量相比,方法提高由哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量。在一些实施方案中,当在包含铜,胰岛素和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养时由细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量与当在不含铜,胰岛素和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养时由细胞生成的贝伐珠单抗

或其片段的量相比升高至少 5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,16%,18%,19%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,或 50%。

[0110] 本文中提供的细胞培养培养基可用作基础细胞培养培养基和 / 或补料细胞培养培养基。在一些实施方案中,本文中提供的细胞培养培养基用于在细胞的生长阶段期间培养细胞的方法。在一些实施方案中,本文中提供的细胞培养培养基用于在细胞的生产阶段期间培养细胞的方法。

[0111] 理解的是,可以以任何合适规模(例如任何生产贝伐珠单抗或其片段的规模)进行本文中详述的任何方法,包括:(i) 生产贝伐珠单抗或其片段的方法;(ii) 培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法;和(iii) 提高自包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞生成贝伐珠单抗或其片段的方法(例如提高贝伐珠单抗或其片段的滴度产量)。一方面,以在范围上与贝伐珠单抗或其片段的商业性生产相称的规模实施本文中详述的任何方法。例如,在一种变化中,可以在本文中提供的细胞培养培养基中培养能够生成贝伐珠单抗的细胞,其中培养在能够容纳商业性批次的贝伐珠单抗的培养器皿中,诸如在能够容纳至少 10,000L 细胞培养物的培养器皿中发生(例如一方面,以至少 10,000L 细胞培养规模,诸如 12,000L 细胞培养规模进行方法)。

[0112] 在本文中提供的方法的进一步实施方案中,自细胞培养物回收贝伐珠单抗或其片段。可以对包含回收的贝伐珠单抗或其片段的组合物进行至少一个纯化步骤,之后评估例如品质属性。在一个进一步实施方案中,组合物为包含贝伐珠单抗或其片段和药学可接受载剂的药物组合物。

[0113] 贯穿全文提供其它方法和细胞培养培养基,诸如在发明概述和其它部分。

[0114] 多肽生成

[0115] 本文中详述的细胞培养培养基可用于培养细胞以生成贝伐珠单抗或其片段的方法。培养基可用于培养能够生成贝伐珠单抗或其片段的细胞的方法,无论通过分批培养,补料分批培养或灌注培养。在一个实施方案中,贝伐珠单抗或其片段直接由宿主细胞分泌入培养基中。在另一个实施方案中,贝伐珠单抗或其片段通过裂解包含编码抗体或其片段的核酸的细胞而释放入培养基中。

[0116] 在宿主细胞中可表达的贝伐珠单抗或其片段可以依照本公开文本来生产且可以存在于提供的组合物中。

[0117] 用于在细胞培养中生产抗体及其片段的方法是本领域公知的。本文中提供用于在细胞培养中生产抗体的非限制性例示性方法(例如全长抗体,抗体片段和多特异性抗体)。关于普遍较好理解的且常常采用的用于生产抗体(例如贝伐珠单抗)的技术和规程,参见 Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook et al.,4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2012);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel,et al.eds.,2003);Short Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al.,eds.,J.Wiley and Sons,2002);Current Protocols in Protein Science(Horswill et al.,2006);Antibodies,A Laboratory Manual(Harlow and Lane,eds.,1988);Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications(R.I.Freshney,6th ed.,J.Wiley and Sons,2010),通过援引将它们均完整收入本文中。

[0118] 细胞培养和抗体生成

[0119] 通常,在促进细胞生长,维持和 / 或抗体生成任一的一种或多种条件下将细胞与本文中描述的任何细胞培养培养基组合(接触)。培养细胞和生成抗体的方法采用培养器皿(生物反应器)来装细胞和细胞培养培养基。培养器皿可以由任何适合于培养细胞的材料构成,包括玻璃,塑料或金属。典型地,培养器皿会是至少 1 升,而且可以是 10, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 8000, 10, 000 升或更多(例如 12, 000 升器皿)。一方面,根据自细胞培养生成制造规模量的贝伐珠单抗的需要,培养器皿能够容纳至少 2 升,至少 10 升,至少 100 升,至少 500 升,至少 1, 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, 000 升或更多本文中提供的细胞培养培养基。如此,本文中提供的组合物和方法可用于贝伐珠单抗或其片段的制造规模生产。培养条件(诸如温度,pH,等等)是先前为表达选择的与宿主细胞一起使用的那些,而且对于普通技术人员会是显而易见的。在培养工艺期间可以调节的培养条件包括但不限于 pH 和温度。在本文中的一些实施方案中, pH 为至少 7.0, 7.15, 7.2, 7.25, 7.30, 7.35, 7.4, 7.45, 或 7.50 但不超过 8.0。可以接种入本文中提供的细胞培养培养基中的包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的细胞数目对本领域技术人员会是显而易见的。例如,可以在本文中提供的培养基中接种约 1.0×10^6 至约 2.0×10^6 个包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的细胞(包括约 1.1×10^6 , 约 1.2×10^6 , 约 1.3×10^6 , 约 1.4×10^6 , 约 1.5×10^6 , 约 1.6×10^6 , 约 1.7×10^6 , 约 1.8×10^6 或约 1.9×10^6 任一)来启动细胞培养周期。一方面,可以接种入本文中提供的细胞培养培养基中的包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的细胞的数目为自约 1.2×10^6 至约 1.8×10^6 个细胞或自约 1.3×10^6 至约 1.7×10^6 个细胞或自约 1.5×10^6 至约 1.7×10^6 个细胞。

[0120] 通常,在有助于细胞培养的存活,生长和存活力(维持)的条件下将细胞培养维持于初始生长阶段。精确条件会随细胞类型,衍生细胞的生物体,和所表达的抗体或其片段的性质和特征而变化。

[0121] 细胞培养在初始生长阶段中的温度主要会根据细胞培养保持可存活温度范围来选择。例如,在初始生长阶段期间,CHO 细胞于 37°C 生长较好。一般而言,大多数哺乳动物细胞在约 25°C 至 42°C 的范围内生长较好。优选地,哺乳动物细胞在约 35°C 至 40°C 的范围内生长较好。本领域普通技术人员会能够根据细胞和生产要求的需要来选择细胞在其中生长的适宜温度(一种或多种)。

[0122] 在本发明的一个实施方案中,将初始生长阶段的温度维持于一个恒定温度。在另一个实施方案中,将初始生长阶段的温度维持在一个温度范围内。例如,可以在初始生长阶段期间稳定地提高或降低温度。或者,可以在初始生长阶段期间在多个时间以离散的量提高或降低温度。本领域普通技术人员会能够确定是否应当使用一种或多种温度,及是否应当稳定地或以离散的量调节温度。

[0123] 可以在初始生长阶段期培养细胞或大或小量的时间。在一种变化中,培养细胞一段时间,其足以实现细胞在容许不受扰乱地生长时最终会实现的最高可存活细胞密度给定百分比的可存活细胞密度。例如,可以培养细胞一段时间,其足以实现最高可存活细胞密度 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 或 99 百分比的期望可存活细胞密度。

[0124] 在另一个实施方案中,容许细胞生长限定的时间段。例如,根据细胞培养的起始浓

度,培养细胞的温度,和细胞的内在生长速率,可以培养细胞 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20 或更多天。在一些情况中,可以容许细胞生长一个月或更多。

[0125] 在初始培养阶段期间可以搅动或摇动细胞培养以提高氧合和营养物对细胞的分散。依照本发明,本领域普通技术人员会理解,在初始生长阶段期间控制或调节生物反应器某些内部条件可能是有益的,包括但不限于 pH,温度,氧合,等。例如,可以通过供应适宜量的酸或碱来控制 pH,而且可以用本领域公知的喷射装置来控制氧合。

[0126] 初始培养步骤为生长阶段,其中变更分批细胞培养条件以增强重组细胞的生长,以生成种子训练(seed train)。生长阶段一般指指数式生长时段,其中细胞一般快速分裂,例如生长。在这个阶段期间,培养细胞一段时间,通常 1 至 4 天,例如 1,2,3,或 4 天,且在使得细胞生长最佳的条件下。宿主细胞的生长周期的确定可以通过本领域技术人员知道的方法为特定宿主细胞确定。

[0127] 在生长阶段,可以以分批方式在培养器皿中供应本文中提供的基础培养培养基和细胞。一方面,培养培养基含有少于约 5%或少于 1%或少于 0.1%血清和自植物或动物衍生的其它蛋白质(例如动物衍生的水解产物和/或植物衍生的水解产物)。在一些实施方案中,基础培养基不含动物衍生的或植物衍生的水解产物。然而,如果需要,可以使用血清和动物衍生的蛋白质。在它们生长中的特定点,细胞可以形成接种体以在生产阶段中的培养开始时接种培养培养基。或者,生产阶段可以继以生长阶段。细胞生长阶段一般继以多肽生产阶段(例如抗体生产阶段)。

[0128] 在多肽生产阶段期间,可以在有益于细胞培养的存活和存活力且适宜于期望多肽(例如贝伐珠单抗或其片段)表达的第二套培养条件(与生长阶段相比)下维持细胞培养。例如,在随后生产阶段期间,CHO 细胞完全在 25℃至 35℃的范围内表达重组多肽。可以采用多个离散温度转换来提高细胞密度或存活力或提高重组多肽表达。在一个实施方案中,提高多肽生成(例如提高贝伐珠单抗或其片段生成)的方法在多肽生产阶段期间包括一个或多个温度转换步骤。在一个进一步实施方案中,一个或多个温度转换步骤包括自 37℃至 35℃,自 35℃至 33℃,或自 33℃至 31℃的温度转换。在本文中的一些实施方案中,一个或多个温度转换步骤包括自第 0 天约 37℃至第 1 天 35℃至第 8 天 33℃及至第 10 天 31℃的温度转换。在本文中的一些实施方案中,一个或多个温度转换步骤包括自第 0 天约 37℃至第 3 天 35℃至第 8 天 33℃及至第 10 天 31℃的温度转换。在本文中的一些实施方案中,一个或多个温度转换步骤包括自第 0 天约 37℃至第 2.5 天 34℃的温度转换。

[0129] 可以在随后的生产阶段中维持细胞直至达到期望细胞密度或生产滴度。在一个实施方案中,在随后的生产阶段中维持细胞直至重组多肽(例如贝伐珠单抗或其片段)的滴度达到最大。在其它实施方案中,可以在这个点之前收获培养物。例如,可以维持细胞一段时间,其足以实现最大可存活细胞密度 1,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95 或 99 百分比的可存活细胞密度。在一些情况中,可能期望容许可存活细胞密度达到最大,然后容许可存活细胞密度下降一些水平,之后收获培养物。

[0130] 在某些情况中,在随后的生产阶段期间给细胞培养补充已经被细胞消减或代谢的营养物或其它培养基成分可能是有益的或必须的。例如,给细胞培养补充在监测细胞培养期间观察到已经消减的营养物或其它培养基成分可能是有利的。或者/另外,在随后的生产阶段之前给细胞培养进行补充可能是有益的或必须的。作为非限制性例子,给细胞培养

补充激素和 / 或其它生长因子,特定离子 (诸如钠,氯,钙,镁,和磷酸),缓冲剂,维生素,核苷或核苷酸,痕量元素 (通常以很低的终浓度存在的无机化合物),氨基酸,脂质,或葡萄糖或其它能源可能是有益的或必须的。一方面,给基础细胞培养补充胰岛素和 / 或植物衍生的水解产物和 / 或动物衍生的水解产物,如本文中详述的。

[0131] 在本文中的一些实施方案中,本发明的方法包括在细胞生产阶段期间将额外量的胰岛素补充入细胞培养中。例如,可以在细胞培养周期的生产阶段的日子将额外的 15mg/L 胰岛素添加至细胞培养。在另一个例子中,可以在细胞培养周期的生产阶段期间将额外的 5mg/L 胰岛素添加至细胞培养至少三次。在仍有另一个例子中,可以在细胞培养周期的生产阶段期间将额外的 5mg/L 胰岛素添加至细胞培养至少六次。细胞培养周期可以为至少 3 天,4 天,5 天,6 天,7 天,8 天,9 天,10 天,11 天,12 天,13 天,或 14 天长。在一些实施方案中,细胞培养周期长至 20 天。在一些实施方案中,细胞培养为至少 20 天长。在一些实施方案中,可以培养细胞超过一个细胞培养周期。在本文中的一些实施方案中,方法进一步包括将额外量的动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物添加至本文中提供的细胞培养培养基的步骤 (例如诸如经于细胞培养周期启动后的一个时间段引进至基础细胞培养培养基的补料培养基)。在本文中的一些实施方案中,以如下添加量将额外量的动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物添加至细胞培养,使得在细胞培养培养基中以选自表 1 中所列浓度的浓度提供动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物。

[0132] 抗体纯化

[0133] 优选作为分泌的多肽自培养培养基回收贝伐珠单抗或其片段,尽管当在没有分泌信号的情况中直接表达时也可以自宿主细胞裂解物回收它。

[0134] 可以将培养培养基或裂解物离心以去除颗粒状细胞碎片。此后可以用作为合适纯化规程的例示的下述规程自污染物可溶性蛋白质和多肽纯化贝伐珠单抗或其片段:免疫亲和或离子交换柱上的分级;乙醇沉淀;反相 HPLC;硅石或阳离子交换树脂诸如 DEAE 上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤;和用于去除污染物诸如 IgG 的蛋白 A Sepharose 柱。蛋白酶抑制剂 (诸如苯基甲基磺酰氯 (PMSF)) 也可用于抑制纯化期间的蛋白水解降解。本领域技术人员会领会,适合于感兴趣抗体或其片段的纯化方法可能需要更改以考虑抗体或其片段在重组细胞培养中表达时的特征变化。通常可以使用层析技术 (例如具有低 pH 洗脱步骤的亲层析和用于去除工艺杂质的离子交换层析) 来纯化抗体或其片段。可以将纯化的贝伐珠单抗或其片段浓缩以提供浓缩蛋白质组合物,例如具有至少 100mg/mL 或 125mg/mL 或 150mg/mL 的抗体浓度或约 100mg/mL 或 125mg/mL 或 150mg/mL 的浓度的。理解的是,可以将浓缩多肽产品浓缩至在浓缩条件下允许的水平,例如多肽不再在溶液中可溶的浓度。用于为药物配制剂生成和纯化抗体的方法的非限制性例子记载于 Kelley, B. MAbs., 2009, 1 (5): 443-452, 通过援引将其完整收入本文。

[0135] IV. 药物配制剂

[0136] 还提供包含本文中提供的细胞培养培养基和一种或多种其它成分 (诸如细胞或期望的抗体或其片段 (即贝伐珠单抗或其片段)) 的组合物。包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞能在细胞培养期间将抗体或其片段分泌入本发明的细胞培养培养基中。因而,本发明的组合物可包含生成贝伐珠单抗或其片段的哺乳动物细胞和贝伐珠单抗或其片段分泌入其中的本文中提供的细胞培养培养基。还涵盖包含贝伐珠单抗或其片段

和本文中提供的细胞培养培养基的组合物。在本发明的一些方面,组合物包含(a)包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞;和(b)本文中提供的细胞培养培养基。在一些方面,组合物包含(a)贝伐珠单抗或其片段;和(b)本文中提供的细胞培养培养基,其中抗体或其片段由包含分离的编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞分泌入培养基中。在其它方面,组合物包含:(a)贝伐珠单抗或其片段;和(b)本文中提供的细胞培养培养基,其中贝伐珠单抗或其片段通过裂解包含分离的编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞释放入培养基中。组合物的哺乳动物细胞可以是本文中详述的任何哺乳动物细胞(例如CHO细胞),而且组合物的培养基可以是本文中详述的任何培养基,诸如包含一种或多种表1中详述的化合物的培养基。

[0137] 通过混合具有期望纯度的贝伐珠单抗或其片段与一种或多种任选的药学可接受载剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. 编(1980))来制备通过本文中描述的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段的组合物(例如药物配制剂),其可以是冷冻配制剂或水溶液的形式。药学可接受载剂在所采用的剂量和浓度对接受者一般是无毒的,而且包括但不限于:缓冲剂;抗氧化剂;防腐剂;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质;亲水性聚合物;氨基酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物;螯合剂;糖;成盐反荷离子;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂。在一些实施方案中,将药物配制剂施用于哺乳动物,诸如人。贝伐珠单抗或其片段的药物配制剂可以通过任何合适手段来施用,包括胃肠外,肺内,和鼻内,及需要局部处理时的病变内施用。胃肠外输注包括肌肉内,静脉内,动脉内,腹膜内,或皮下施用。剂量给药可以通过任何合适路径,例如注射,诸如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长时间的。因而,本文中提供的含有抗体的配制剂可以是适合于注射(诸如皮下注射)入个体中的(例如皮下注射入人中)。要用于体内施用的药物配制剂一般是无菌的。无菌可以容易实现,例如通过穿过无菌滤膜过滤。

[0138] 在一些方面,本文中提供的组合物(例如药物配制剂)以至少100mg/mL,125mg/mL,150mg/mL,200mg/mL,或250mg/mL的浓度,或以约100mg/mL,约125mg/mL,约150mg/mL,约175mg/mL,或约200mg/mL的浓度包含贝伐珠单抗或其片段。在其它方面,本文中提供的组合物(例如药物配制剂)以至少1mg/mL,10mg/mL,25mg/mL,50mg/mL,或75mg/mL的浓度,或以约1mg/mL,约10mg/mL,约25mg/mL,约50mg/mL,或约75mg/mL的浓度包含贝伐珠单抗或其片段。

[0139] V. 制品和试剂盒

[0140] 提供用于给细胞培养培养基补充铜,胰岛素和胱氨酸中至少两种的试剂盒。铜,胰岛素和胱氨酸中至少两种可以以如下量存在,使得以表1中提供的浓度提供成分。试剂盒可以含有要重建的干燥组分,而且还可以含有使用说明(例如供给培养基补充试剂盒组分使用的)。试剂盒可以以适合于补充供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用的细胞培养培养基的量含有本文中提供的组分。一方面,试剂盒以如下量包含胱氨酸,使得在细胞培养培养基中提供自约0.9mM至约1.5mM胱氨酸。在本文中的一些实施方案中,试剂盒进一步以如下量包含胰岛素,使得在细胞培养培养基中提供自约1.4mg/L至约11mg/L胰岛素。在本文中的一些实施方案中,试剂盒进一步以如下量包含铜,使得在细胞培养培养基中提供自约26nM至约400nM铜。在一些实施方案中,试剂盒包含两种或更

多种选自下组的组分：如下量的胰岛素，使得在细胞培养培养基中提供自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L 胰岛素，如下量的胱氨酸，使得在细胞培养培养基中提供自约 0.8mM 至约 2.5mM 胱氨酸，和如下量的铜，使得在细胞培养培养基中提供自约 25.0nM 至约 400.0nM 铜。

[0141] 在本文中的任何方面，试剂盒可以进一步包含动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物或动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者。在本文中的一些实施方案中，试剂盒进一步以如下量包含植物衍生的水解产物，使得在细胞培养培养基中提供自约 1.4g/L 至约 6.2g/L 植物衍生的水解产物。在本文中的一些实施方案中，试剂盒进一步以如下量包含动物衍生的水解产物，使得在细胞培养培养基中提供自约 5.6g/L 至约 38.0g/L 动物衍生的水解产物。

[0142] 在本发明的另一个方面，提供一种制品，其包含装有本发明的细胞培养培养基的容器和任选的关于其使用的说明。例如，合适的容器包括瓶和袋。容器可以自多种材料形成，诸如玻璃或塑料。容器装有细胞培养培养基，而且容器上的或与容器相关的标签可以指示关于使用的方向（例如用于培养细胞）。制品可以进一步包括从商业和使用者立场看想要的其它材料，包括其它缓冲剂，稀释剂和印有使用说明书的包装插页。

[0143] 还提供一种制品，其包含装有通过本文中详述的方法生成的贝伐珠单抗或其片段的容器和任选的关于其使用的说明。

[0144] 实施方案

[0145] 本文中和贯穿全文详述本发明的各个实施方案和方面。实施方案包括但不限于下述：

[0146] 方法 1：一种生成贝伐珠单抗或其片段的方法，其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的步骤，其中细胞培养培养基包含两种或更多种选自铜，胰岛素，和胱氨酸的成分，且其中细胞生成贝伐珠单抗或其片段。

[0147] 方法 2：一种培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法，该方法包括使哺乳动物细胞与包含两种或更多种选自铜，胰岛素和胱氨酸的成分的细胞培养培养基接触的步骤。

[0148] 方法 3：一种提高自包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量的方法，该方法包括在包含胰岛素，铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞的步骤，其中自哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量相对于在不含胰岛素，铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞升高。

[0149] 方法 4：一种在包含胰岛素，铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的方法，其中自哺乳动物细胞生成的贝伐珠单抗或其片段的量相对于在不含胰岛素，铜和胱氨酸中至少两种的细胞培养培养基中培养哺乳动物细胞升高。

[0150] 对于方法 1-4 任一，该方法可包含下述特征 (i)-(xviii) 中任一项或多项或其子特征或特征或子特征的任意组合：

[0151] (i) 包含铜和胰岛素的细胞培养培养基

[0152] (ii) 包含铜和胱氨酸的细胞培养培养基

[0153] (iii) 包含胰岛素和胱氨酸的细胞培养培养基

[0154] (iv) 包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸的细胞培养培养基

[0155] (v) 进一步包含植物衍生的水解产物, 动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(iv) 任一的培养基)。

[0156] (vi) 以下述任一浓度包含胰岛素的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(v) 中任一项或多项或全部的培养基) :

[0157] a. 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L

[0158] b. 自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L

[0159] c. 自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L

[0160] d. 自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L

[0161] e. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L

[0162] f. 自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L

[0163] g. 自约 5.0mg/L 至约 60.0mg/L

[0164] h. 自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L

[0165] i. 自约 5.0mg/L 至约 40.0mg/L

[0166] j. 自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L

[0167] k. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L

[0168] l. 自约 10.0mg/L 至约 40.0mg/L

[0169] m. 自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L

[0170] n. 自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L

[0171] o. 自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L

[0172] p. 自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L

[0173] q. 自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L

[0174] r. 约 5.0mg/L, 6.0mg/L, 7.0mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L, 11.0mg/L, 12.0mg/L, 13.0mg/L, 14.0mg/L, 15.0mg/L, 16.0mg/L, 17.0mg/L, 18.0mg/L, 19.0mg/L, 20.0mg/L, 21.0mg/L, 22.0mg/L, 23.0mg/L, 24.0mg/L, 25.0mg/L, 26.0mg/L, 27.0mg/L, 28.0mg/L, 29.0mg/L 或 30.0mg/L 或 31.0mg/L 或 32mg/L 或 33mg/L 或 34mg/L 或 35mg/L 或 36mg/L 或 37mg/L 或 38mg/L 或 39mg/L 或 40mg/L 任一

[0175] s. 约 7mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L 或 11.0mg/L 任一

[0176] t. 约 25mg/L

[0177] (vii) 以下述任一浓度包含铜的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(vi) 中任一项或多项或全部的培养基) :

[0178] a. 自约 69nM 至约 1,000nM

[0179] b. 自约 69.0nM 至约 400.0nM

[0180] c. 自约 80nM 至约 400nM。

[0181] d. 自约 100nM 至约 400nM

[0182] e. 自约 125nM 至约 400nM

[0183] f. 自约 150nM 至约 400nM

[0184] g. 自约 200nM 至约 400nM

- [0185] h. 自约 250nM 至约 400nM
- [0186] i. 自约 300nM 至约 400nM
- [0187] j. 自约 325nM 至约 375nM
- [0188] k. 自约 325nM 至约 350nM
- [0189] l. 约 100nM, 125nM, 150nM, 175nM, 200nM, 225nM, 250nM, 275nM, 300nM, 325nM, 350nM, 375nM 或 400nM 任一
- [0190] m. 约 330nM, 335nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一
- [0191] n. 约 335nM, 336nM, 337nM, 338nM, 339nM 或 400nM
- [0192] o. 约 339nM
- [0193] (viii) 以下述任一浓度包含胱氨酸的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(vii) 中任一项或多项或全部的培养基) :
- [0194] a. 自约 0.7mM 至约 2.0mM
- [0195] b. 自约 0.8mM 至约 2.5mM
- [0196] c. 自约 0.8mM 至约 2.0mM
- [0197] d. 自约 0.8mM 至约 1.75mM
- [0198] e. 自约 0.8mM 至约 1.6mM
- [0199] f. 自约 1.0mM 至约 2.0mM
- [0200] g. 自约 1.0mM 至约 1.6mM
- [0201] h. 自约 1.2mM 至约 1.4mM
- [0202] i. 约 0.8mM 或 0.9mM 或 1.0mM 或 1.1mM 或 1.2mM 或 1.3mM 或 1.4mM 或 1.5mM 任一
- [0203] j. 约 1.1mM, 1.3mM 或 1.5mM 任一
- [0204] (ix) 以下述任一浓度包含动物衍生的水解产物的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(viii) 中任一项或多项或全部的培养基) :
- [0205] a. 自约 6.0g/L 至约 20.0g/L
- [0206] b. 自约 5.6g/L 至约 38.0g/L
- [0207] c. 自约 7.0g/L 至约 25.0g/L
- [0208] d. 自约 7.0g/L 至约 20.0g/L
- [0209] e. 自约 7.0g/L 至约 15.0g/L
- [0210] f. 自约 8.0g/L 至约 12.0g/L
- [0211] g. 自约 9.0g/L 至约 11.0g/L
- [0212] h. 自约 7.0g/L 至约 11.0g/L
- [0213] i. 约 5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L, 25g/L, 30g/L, 35g/L, 40g/L, 45g/L 或 50g/L 任一
- [0214] j. 约 5g/L, 6g/L, 7g/L, 8g/L, 9g/L, 10g/L, 11g/L, 或 12g/L 任一
- [0215] k. 约 10g/L
- [0216] l. 约 13g/L
- [0217] (x) 以下述任一浓度包含植物衍生的水解产物的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(ix) 中任一项或多项或全部的培养基) :
- [0218] a. 自约 1.0g/L 至约 10.0g/L
- [0219] b. 自约 1.4g/L 至约 11.0g/L

- [0220] c. 自约 1.4g/L 至约 6.2g/L
- [0221] d. 自约 1.5g/L 至约 5.5g/L
- [0222] e. 自约 1.5g/L 至约 4.5g/L
- [0223] f. 自约 1.5g/L 至约 3.5g/L
- [0224] g. 自约 2.0g/L 至约 3.0g/L
- [0225] h. 自约 1.5g/L 至约 2.5g/L
- [0226] i. 自约 1.75g/L 至约 2.75g/L
- [0227] j. 自约 2.25g/L 至约 2.75g/L
- [0228] k. 约 1.75g/L, 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L, 3.0g/L, 3.25, 3.5g/L, 3.75g/L, 或 4.0g/L 任一
- [0229] l. 约 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L 或 3.0g/L 任一
- [0230] m. 约 2.5g/L
- [0231] n. 约 3.1g/L
- [0232] (xi) 包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者, 且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(x) 中任一项或多项或全部的培养基)
- [0233] (xii) 包含胰岛素的细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(xi) 中任一项或多项或全部的培养基) 且该方法进一步包括将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基的步骤, 其中: (a) 可以在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基一次或至少三次或至少六次, 且 (b) 可以以如下量添加额外量的胰岛素, 使得在细胞培养培养基中以下述任一浓度提供胰岛素:
- [0234] a. 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L
- [0235] b. 自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L
- [0236] c. 自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L
- [0237] d. 自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L
- [0238] e. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L
- [0239] f. 自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L
- [0240] g. 自约 5.0mg/L 至约 60.0mg/L
- [0241] h. 自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L
- [0242] i. 自约 5.0mg/L 至约 40.0mg/L
- [0243] j. 自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L
- [0244] k. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L
- [0245] l. 自约 10.0mg/L 至约 40.0mg/L
- [0246] m. 自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L
- [0247] n. 自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L
- [0248] o. 自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L
- [0249] p. 自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L
- [0250] q. 自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L
- [0251] r. 约 5.0mg/L, 6.0mg/L, 7.0mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L, 11.0mg/L,

12.0mg/L, 13.0mg/L, 14.0mg/L, 15.0mg/L, 16.0mg/L, 17.0mg/L, 18.0mg/L, 19.0mg/L, 20.0mg/L, 21.0mg/L, 22.0mg/L, 23.0mg/L, 24.0mg/L, 25.0mg/L, 26.0mg/L, 27.0mg/L, 28.0mg/L, 29.0mg/L 或 30.0mg/L 或 31.0mg/L 或 32mg/L 或 33mg/L 或 34mg/L 或 35mg/L 或 36mg/L 或 37mg/L 或 38mg/L 或 39mg/L 或 40mg/L 任一

[0252] s. 约 7mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L 或 11.0mg/L 任一

[0253] t. 约 25mg/L

[0254] u. 约 15mg/L

[0255] (xiii) 方法进一步包括将半胱氨酸添加至细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(xii) 中任一项或多项或全部的培养基) 的步骤, (a) 可以作为添加至不含半胱氨酸的基础培养基的分批补料的成分将半胱氨酸添加至细胞培养培养基, 和 / 或 (b) 可以以如下量添加半胱氨酸, 使得在细胞培养培养基中以自约 0.5 至约 5.0mM 或自约 0.5 至约 2.0mM 或自约 0.5 至约 2.0mM (诸如以 0.8mM 的浓度) 或自约 7.0 至约 8.0mM (诸如以约 7.5mM 的浓度) 的浓度提供半胱氨酸

[0256] (xiv) 方法进一步包括将胱氨酸添加至细胞培养培养基的步骤 (包括含有特征 (i)-(xii) 中任一项或多项或全部的培养基), 可以作为添加至基础培养基的分批补料的成分将胱氨酸添加至细胞培养培养基, 而且可以以如下量添加胱氨酸, 使得在细胞培养培养基中以自约 0.1 至约 1.5mM 的浓度 (诸如以 0.2mM 的浓度) 提供胱氨酸

[0257] (xv) 于范围为自约 28°C 至约 37°C 或自约 31°C 至约 35°C 的温度培养细胞 (例如在任何细胞培养培养基中, 包括那些具有特征 (i)-(xiv) 中任一项或多项或全部的)

[0258] (xvi) 将细胞 (例如在任何细胞培养培养基中, 包括那些具有特征 (i)-(xiv) 中任一项或多项或全部的) 于约 35°C 的第一温度培养第一时间段, 于约 33°C 的第二温度培养第二时间段, 并于约 31°C 的第三温度培养第三时间段

[0259] (xvii) 贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(xvi) 中任一项或多项或全部的培养基) 中

[0260] (xviii) 方法进一步包括自细胞培养物 (包括含有特征 (i)-(xvi) 中任一项或多项或全部的培养基) 回收贝伐珠单抗或其片段的步骤,

[0261] 本文中还提供通过本文中提供的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段, 包括但不限于方法 1-4 任一, 该方法可进一步包括特征 (i)-(xviii) 中的任一项或多项或全部或其子特征或前述的任意组合。

[0262] 还提供一种组合物, 其包含: (i) 通过本文中提供的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段, 包括但不限于方法 1-4 任一, 该方法可进一步包括特征 (i)-(xviii) 中的任一项或多项或全部或其子特征或前述的任意组合, 和 (ii) 药学可接受载体。

[0263] 还提供一种试剂盒, 用于补充细胞培养培养基, 供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用, 该试剂盒包含成分 (i)-(iii) 中的至少两项:

[0264] (i) 如下量的胰岛素, 使得提供下述任一浓度:

[0265] a. 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L

[0266] b. 自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L

[0267] c. 自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L

[0268] d. 自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L

- [0269] e. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L
- [0270] f. 自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L
- [0271] g. 自约 5.0mg/L 至约 60.0mg/L
- [0272] h. 自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L
- [0273] i. 自约 5.0mg/L 至约 40.0mg/L
- [0274] j. 自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L
- [0275] k. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L
- [0276] l. 自约 10.0mg/L 至约 40.0mg/L
- [0277] m. 自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L
- [0278] n. 自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L
- [0279] o. 自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L
- [0280] p. 自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L
- [0281] q. 自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L
- [0282] r. 约 5.0mg/L, 6.0mg/L, 7.0mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L, 11.0mg/L, 12.0mg/L, 13.0mg/L, 14.0mg/L, 15.0mg/L, 16.0mg/L, 17.0mg/L, 18.0mg/L, 19.0mg/L, 20.0mg/L, 21.0mg/L, 22.0mg/L, 23.0mg/L, 24.0mg/L, 25.0mg/L, 26.0mg/L, 27.0mg/L, 28.0mg/L, 29.0mg/L 或 30.0mg/L 或 31.0mg/L 或 32mg/L 或 33mg/L 或 34mg/L 或 35mg/L 或 36mg/L 或 37mg/L 或 38mg/L 或 39mg/L 或 40mg/L 任一
- [0283] s. 约 7mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L 或 11.0mg/L 任一
- [0284] t. 约 25mg/L
- [0285] (ii) 如下量的胱氨酸, 使得提供下述任一浓度:
- [0286] a. 自约 0.7mM 至约 2.0mM
- [0287] b. 自约 0.8mM 至约 2.5mM
- [0288] c. 自约 0.8mM 至约 2.0mM
- [0289] d. 自约 0.8mM 至约 1.75mM
- [0290] e. 自约 0.8mM 至约 1.6mM
- [0291] f. 自约 1.0mM 至约 2.0mM
- [0292] g. 自约 1.0mM 至约 1.6mM
- [0293] h. 自约 1.2mM 至约 1.4mM
- [0294] i. 约 0.8mM 或 0.9mM 或 1.0mM 或 1.1mM 或 1.2mM 或 1.3mM 或 1.4mM 或 1.5mM 任一
- [0295] j. 约 1.1mM, 1.3mM 或 1.5mM 任一
- [0296] (iii) 下述任一浓度的铜:
- [0297] a. 自约 69.0nM 至约 1,000.0nM
- [0298] b. 自约 69.0nM 至约 400.0nM
- [0299] c. 自约 80nM 至约 400nM
- [0300] d. 自约 100nM 至约 400nM
- [0301] e. 自约 125nM 至约 400nM
- [0302] f. 自约 150nM 至约 400nM
- [0303] g. 自约 200nM 至约 400nM

- [0304] h. 自约 250nM 至约 400nM
- [0305] i. 自约 300nM 至约 400nM
- [0306] j. 自约 325nM 至约 375nM
- [0307] k. 自约 325nM 至约 350nM
- [0308] l. 约 100nM, 125nM, 150nM, 175nM, 200nM, 225nM, 250nM, 275nM, 300nM, 325nM, 350nM, 375nM 或 400nM 任一
- [0309] m. 约 330nM, 335nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一
- [0310] n. 约 335nM, 336nM, 337nM, 338nM, 339nM 或 400nM
- [0311] o. 约 339nM
- [0312] 试剂盒可进一步包含其它成分, 包括下述任一种或多种:
- [0313] i. 动物衍生的水解产物, 诸如以如下量, 使得提供下述任一浓度:
- [0314] a. 自约 6.0g/L 至约 20.0g/L
- [0315] b. 自约 5.6g/L 至约 38.0g/L
- [0316] c. 自约 7.0g/L 至约 25.0g/L
- [0317] d. 自约 7.0g/L 至约 20.0g/L
- [0318] e. 自约 7.0g/L 至约 15.0g/L
- [0319] f. 自约 8.0g/L 至约 12.0g/L
- [0320] g. 自约 9.0g/L 至约 11.0g/L
- [0321] h. 自约 7.0g/L 至约 11.0g/L
- [0322] i. 约 5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L, 25g/L, 30g/L, 35g/L, 40g/L, 45g/L 或 50g/L 任一
- [0323] j. 约 5g/L, 6g/L, 7g/L, 8g/L, 9g/L, 10g/L, 11g/L, 或 12g/L 任一
- [0324] k. 约 10g/L
- [0325] l. 约 13g/L
- [0326] ii. 植物衍生的水解产物, 诸如以如下量, 使得提供下述任一浓度:
- [0327] a. 自约 1.0g/L 至约 10.0g/L
- [0328] b. 自约 1.4g/L 至约 11.0g/L
- [0329] c. 自约 1.4g/L 至约 6.2g/L
- [0330] d. 自约 1.5g/L 至约 5.5g/L
- [0331] e. 自约 1.5g/L 至约 4.5g/L
- [0332] f. 自约 1.5g/L 至约 3.5g/L
- [0333] g. 自约 2.0g/L 至约 3.0g/L
- [0334] h. 自约 1.5g/L 至约 2.5g/L
- [0335] i. 自约 1.75g/L 至约 2.75g/L
- [0336] j. 自约 2.25g/L 至约 2.75g/L
- [0337] k. 约 1.75g/L, 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L, 3.0g/L, 3.25, 3.5g/L, 3.75g/L, 或 4.0g/L 任一
- [0338] l. 约 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L 或 3.0g/L 任一
- [0339] m. 约 2.5g/L
- [0340] n. 约 3.1g/L

[0341] 还提供一种细胞培养培养基供培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞使用,该细胞培养培养基包含成分(i)-(iii)中的至少两项:

[0342] (i) 如下量的胰岛素,使得提供下述任一浓度:

[0343] a. 自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L

[0344] b. 自约 10.0mg/L 至约 100.0mg/L

[0345] c. 自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L

[0346] d. 自约 10.0mg/L 至约 35.0mg/L

[0347] e. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L

[0348] f. 自约 5.0mg/L 至约 80.0mg/L

[0349] g. 自约 5.0mg/L 至约 60.0mg/L

[0350] h. 自约 5.0mg/L 至约 50.0mg/L

[0351] i. 自约 5.0mg/L 至约 40.0mg/L

[0352] j. 自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L

[0353] k. 自约 10.0mg/L 至约 25.0mg/L

[0354] l. 自约 10.0mg/L 至约 40.0mg/L

[0355] m. 自约 15.0mg/L 至约 20.0mg/L

[0356] n. 自约 5.0mg/L 至约 15.0mg/L

[0357] o. 自约 6.0mg/L 至约 12.0mg/L

[0358] p. 自约 7.0mg/L 至约 11.0mg/L

[0359] q. 自约 8.0mg/L 至约 10.0mg/L

[0360] r. 约 5.0mg/L, 6.0mg/L, 7.0mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L, 11.0mg/L, 12.0mg/L, 13.0mg/L, 14.0mg/L, 15.0mg/L, 16.0mg/L, 17.0mg/L, 18.0mg/L, 19.0mg/L, 20.0mg/L, 21.0mg/L, 22.0mg/L, 23.0mg/L, 24.0mg/L, 25.0mg/L, 26.0mg/L, 27.0mg/L, 28.0mg/L, 29.0mg/L 或 30.0mg/L 或 31.0mg/L 或 32mg/L 或 33mg/L 或 34mg/L 或 35mg/L 或 36mg/L 或 37mg/L 或 38mg/L 或 39mg/L 或 40mg/L 任一

[0361] s. 约 7mg/L, 8.0mg/L, 9.0mg/L, 10.0mg/L 或 11.0mg/L 任一

[0362] t. 约 25mg/L

[0363] (ii) 如下量的胱氨酸,使得提供下述任一浓度:

[0364] a. 自约 0.7mM 至约 2.0mM

[0365] b. 自约 0.8mM 至约 2.5mM

[0366] c. 自约 0.8mM 至约 2.0mM

[0367] d. 自约 0.8mM 至约 1.75mM

[0368] e. 自约 0.8mM 至约 1.6mM

[0369] f. 自约 1.0mM 至约 2.0mM

[0370] g. 自约 1.0mM 至约 1.6mM

[0371] h. 自约 1.2mM 至约 1.4mM

[0372] i. 约 0.8mM 或 0.9mM 或 1.0mM 或 1.1mM 或 1.2mM 或 1.3mM 或 1.4mM 或 1.5mM 任一

[0373] j. 约 1.1mM, 1.3mM 或 1.5mM 任一

[0374] (iii) 下述任一浓度的铜:

- [0375] a. 自约 69.0nM 至约 1,000.0nM
- [0376] b. 自约 69.0nM 至约 400.0nM
- [0377] c. 自约 80nM 至约 400nM。
- [0378] d. 自约 100nM 至约 400nM
- [0379] e. 自约 125nM 至约 400nM
- [0380] f. 自约 150nM 至约 400nM
- [0381] g. 自约 200nM 至约 400nM
- [0382] h. 自约 250nM 至约 400nM
- [0383] i. 自约 300nM 至约 400nM
- [0384] j. 自约 325nM 至约 375nM
- [0385] k. 自约 325nM 至约 350nM
- [0386] l. 约 100nM, 125nM, 150nM, 175nM, 200nM, 225nM, 250nM, 275nM, 300nM, 325nM, 350nM, 375nM 或 400nM 任一
- [0387] m. 约 330nM, 335nM, 340nM, 345nM 或 350nM 任一
- [0388] n. 约 335nM, 336nM, 337nM, 338nM, 339nM 或 400nM
- [0389] o. 约 339nM
- [0390] 细胞培养培养基可包含其它成分, 包括下述任一种或多种:
- [0391] 1) 动物衍生的水解产物, 诸如以如下量, 使得提供下述任一浓度:
- [0392] a. 自约 6.0g/L 至约 20.0g/L
- [0393] b. 自约 5.6g/L 至约 25.0g/L
- [0394] c. 自约 7.0g/L 至约 25.0g/L
- [0395] d. 自约 7.0g/L 至约 20.0g/L
- [0396] e. 自约 7.0g/L 至约 15.0g/L
- [0397] f. 自约 8.0g/L 至约 12.0g/L
- [0398] g. 自约 9.0g/L 至约 11.0g/L
- [0399] h. 自约 7.0g/L 至约 11.0g/L
- [0400] i. 约 5g/L, 10g/L, 15g/L, 20g/L 或 25g/L 任一
- [0401] j. 约 5g/L, 6g/L, 7g/L, 8g/L, 9g/L, 10g/L, 11g/L, 或 12g/L 任一
- [0402] k. 约 10g/L
- [0403] l. 约 13g/L
- [0404] 2) 植物衍生的水解产物, 诸如以如下量, 使得提供下述任一浓度:
- [0405] a. 自约 1.0g/L 至约 10.0g/L
- [0406] b. 自约 1.4g/L 至约 11.0g/L
- [0407] c. 自约 1.4g/L 至约 6.2g/L
- [0408] d. 自约 1.5g/L 至约 5.5g/L
- [0409] e. 自约 1.5g/L 至约 4.5g/L
- [0410] f. 自约 1.5g/L 至约 3.5g/L
- [0411] g. 自约 2.0g/L 至约 3.0g/L
- [0412] h. 自约 1.5g/L 至约 2.5g/L

[0413] i. 自约 1.75g/L 至约 2.75g/L

[0414] j. 自约 2.25g/L 至约 2.75g/L

[0415] k. 约 1.75g/L, 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L, 3.0g/L, 3.25, 3.5g/L, 3.75g/L, 或 4.0g/L 任一

[0416] l. 约 2.0g/L, 2.25g/L, 2.5g/L 或 3.0g/L 任一

[0417] m. 约 2.5g/L

[0418] n. 约 3.1g/L

[0419] 可以进一步给细胞培养培养基补充额外的细胞培养培养基成分, 其中额外的细胞培养培养基成分可包含例如胰岛素和 / 或半胱氨酸, 诸如如下量的胰岛素, 使得提供本文中提供的任何浓度的胰岛素, 包括当前实施方案中所列的浓度 (诸如 15mg/L) 和 / 或如下量的半胱氨酸, 使得提供本文中提供的任何浓度的半胱氨酸 (诸如 0.8mM), 包括当前实施方案中所列的浓度。

[0420] 可以进一步给细胞培养培养基补充额外的细胞培养培养基成分, 其中额外的细胞培养培养基成分可包含例如胰岛素和 / 或半胱氨酸和 / 或胱氨酸, 诸如如下量的胰岛素, 使得提供本文中提供的任何浓度的胰岛素, 包括当前实施方案中所列浓度 (诸如 15mg/L) 和 / 或如下量的半胱氨酸, 使得提供本文中提供的任何浓度的半胱氨酸 (诸如 0.8mM), 包括当前实施方案中所列浓度和 / 或如下量的胱氨酸, 使得提供本文中提供的任何浓度的胱氨酸 (诸如 0.2mM), 包括当前实施方案中所列浓度。

[0421] 本文中还提供一种组合物, 其包含 (a) 包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞; 和 (b) 本文中详述的细胞培养培养基, 包括但不限于当前实施方案中提供的细胞培养培养基。进一步提供一种组合物, 其包含: (a) 贝伐珠单抗或其片段; 和 (b) 本文中详述的细胞培养培养基, 包括但不限于当前实施方案中提供的细胞培养培养基。

[0422] 本文中还提供一种生产贝伐珠单抗或其片段的方法, 其包括在细胞培养培养基中培养包含编码贝伐珠单抗或其片段的核酸的哺乳动物细胞的步骤, 其中细胞培养周期中的初始细胞培养培养基包含两种或更多种选自下组的成分: 浓度为自约 69nM 至约 1,000nM 的铜, 浓度为自约 1.0mg/L 至约 100.0mg/L 的胰岛素, 和浓度为自约 0.7mM 至约 2.0mM 的胱氨酸, 且其中细胞生成贝伐珠单抗或片段。

[0423] 在一些实施方案中, 方法可包含但不限于下述特征 (i)-(xxiii) 中任一项或多项或其子特征或特征或子特征的任意组合:

[0424] (i) 初始细胞培养培养基包含铜和胰岛素

[0425] (ii) 初始细胞培养培养基包含铜和胱氨酸

[0426] (iii) 初始细胞培养培养基包含胰岛素和胱氨酸

[0427] (iv) 初始细胞培养培养基包含铜, 胰岛素, 和胱氨酸

[0428] (v) 初始细胞培养培养基 (包括含有中特征 (i)-(iv) 任一项或多项或全部的培养基) 以下述任一浓度包含胰岛素:

[0429] a. 自约 10.0mg/L 至约 50.0mg/L

[0430] b. 自约 10.0mg/L 至约 20.0mg/L

[0431] c. 约 10.0mg/L, 15.0mg/L, 20.0mg/L, 和 25.0mg/L 任一

[0432] (vi) 初始细胞培养培养基 (包括含有特征 (i)-(v) 中任一项或多项或全部的培养

基)以下述任一浓度包含铜:

[0433] a. 自约 325nM 至约 375nM

[0434] b. 自约 325nM 至约 350nM

[0435] c. 约 330nM, 335nM, 339nM, 340nM, 345nM 和 350nM 任一

[0436] (vii) 初始细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(vi)中任一项或多项或全部的培养基)以下述任一浓度包含胱氨酸:

[0437] a. 自约 0.7mM 至约 2.0mM

[0438] b. 自约 1.0mM 至约 1.6mM

[0439] c. 约 1.0mM, 1.1mM, 1.2mM, 1.3mM, 1.4mM, 1.5mM 和 1.6mM 任一

[0440] (viii) 初始细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(vii)中任一项的培养基)进一步包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者

[0441] (ix) 初始细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(viii)中任一项或多项或全部的培养基)以下述任一浓度包含动物衍生的水解产物:

[0442] a. 自约 6.0g/L 至约 20.0g/L

[0443] b. 自约 8.0g/L 至约 12.0g/L

[0444] c. 自约 9.0g/L 至约 11.0g/L

[0445] d. 约 13g/L

[0446] (x) 初始细胞培养培养基(包括含有中特征(i)-(ix)任一项或多项或全部的培养基)以下述任一浓度包含植物衍生的水解产物:

[0447] a. 自约 1.0g/L 至约 10.0g/L

[0448] b. 自约 2.0g/L 至约 3.0g/L

[0449] c. 自约 2.25g/L 至约 2.75g/L

[0450] d. 约 2.5g/L

[0451] (xi) 初始细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(x)中任一项或多项或全部的培养基)包含动物衍生的水解产物和植物衍生的水解产物二者,且其中动物衍生的水解产物以比植物衍生的水解产物要大的量存在

[0452] (xii) 初始细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(xi)中任一项或多项或全部的培养基)包含胰岛素且该方法进一步包括在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基的步骤,且任选其中 a) 可以在细胞培养周期期间将额外量的胰岛素添加至细胞培养培养基至少一次,至少两次,至少三次,至少四次,至少五次,或至少六次;和/或 b) 每次添加的胰岛素为下述任一:自约 5.0mg/L 至约 25.0mg/L 或约 5.0mg/L, 10.0mg/L, 15.0mg/L, 20.0mg/L, 和 25.0mg/L 任一;和/或 c) 在细胞培养周期期间添加的胰岛素的累积量为下述任一:自约 20.0mg/L 至约 100.0mg/L 或约 20.0mg/L, 25.0mg/L, 30mg/L, 35mg/L, 40mg/L, 45mg/L, 50mg/L, 55mg/L, 60mg/L, 65mg/L, 70mg/L, 75mg/L, 80mg/L 和 85mg/L 任一

[0453] (xiii) 初始细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(xii)中任一项或多项或全部的培养基)包含胱氨酸且该方法进一步包括在细胞培养周期期间将额外量的胱氨酸添加至细胞培养培养基的步骤,和任选其中 a) 以如下量添加胱氨酸,使得提供下述任一:在细胞培养培养基中自约 0.1mM 至约 1.5mM 额外的胱氨酸或在细胞培养培养基中自约 0.4mM 至约

0.7mM(例如约0.4mM至约0.6mM,约0.4mM至约0.5mM)额外的胱氨酸;和/或b)在细胞培养周期期间以分批补料添加胱氨酸

[0454] (xiv) 方法进一步包括添加下述任一的步骤:在细胞培养周期期间至少一次分批补料,或在细胞培养周期期间两次,三次,或四次分批补料;且任选其中分批补料培养基可包含植物衍生的水解产物,动物衍生的水解产物或植物衍生的水解产物和动物衍生的水解产物二者

[0455] (xv) 在细胞培养周期期间,将培养基(包括含有特征(i)-(xiv)中任一项或多项或全部的培养基)的温度相对于培养开始时的温度降低至少2,至少约3,至少约4,或至少约5摄氏度

[0456] (xvi) 在细胞培养周期期间,将培养基(包括含有特征(i)-(xv)中任一项或多项或全部的培养基)的温度a)在细胞培养周期期间降低至少一次或至少两次;和/或b)其中在培养开始后第8天和第10天降低温度

[0457] (xvii) 于范围为自约31℃至约35℃的温度培养(例如在任何细胞培养培养基中,包括那些具有特征(i)-(xvi)中任一项或多项或全部的)细胞

[0458] (xviii) 将细胞于约35℃的第一温度培养第一时间段,于约33℃的第二温度培养第二时间段,并于约31℃的第三温度培养第三时间段(例如在任何细胞培养培养基中,包括那些具有特征(i)-(xvii)中任一项或多项或全部的)

[0459] (xix) 在具有处于约7.0至约7.3的pH的培养基(例如在任何细胞培养培养基中,包括那些具有特征(i)-(xviii)中任一项或多项或全部的)中培养细胞

[0460] (xx) 方法包括(a)在包含约10mg/L胰岛素,约325nM至约350nM铜,和约1.3mM胱氨酸的初始细胞培养培养基中培养细胞;(b)对细胞培养培养基提供第一分批补料和胰岛素补料,从而在培养开始后第3天以约15mg/L的浓度提供额外的胰岛素;和(c)对细胞培养培养基提供包含胱氨酸的第二分批补料,从而在培养开始后第6天以约0.4mM至约0.7mM的浓度提供额外的胱氨酸;其中于约35℃的初始温度培养细胞,并在培养开始后第8天将温度降低至约33℃并在第10天进一步降低至约31℃

[0461] (xxi) 贝伐珠单抗或其片段分泌入细胞培养培养基(包括含有特征(i)-(xx)中任一项或多项或全部的培养基)中

[0462] (xxii) 方法进一步包括自细胞培养物(包括含有特征(i)-(xxi)中任一项或多项或全部的培养基)回收贝伐珠单抗或其片段的步骤

[0463] (xxiii) 哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞

[0464] 本文中还提供通过本文中提供的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段,该方法可进一步包括特征(i)-(xxiii)中的任一项或多项或全部或其子特征或前述的任意组合。

[0465] 还提供一种组合物,其包含:(i)通过本文中提供的任何方法生成的贝伐珠单抗或其片段,该方法可进一步包括特征(i)-(xxiii)中的任一项或多项或全部或其子特征或前述的任意组合,和(ii)药学可接受载体。

[0466] 提供下述实施例以例示而非限制发明。

实施例

[0467] 实施例1:细胞培养培养基成分对由哺乳动物细胞系生成的贝伐珠单抗的量的影

响

[0468] 在含有各种量的胰岛素的细胞培养培养基中培养生成贝伐珠单抗的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,并评估胰岛素对生成的贝伐珠单抗的量的影响。通过在含有 339nM 铜,1% 动物水解产物和 0.25% 植物水解产物的基础培养基中接种细胞,在细胞培养中启动贝伐珠单抗的生成,并在生物反应器中在 14 天细胞培养周期上的第 3 天添加分批补料培养基。给对照细胞培养的基础细胞培养培养基补充少于 10mg/L 胰岛素,而且在细胞培养周期期间不给予额外的胰岛素。在两个代表性的实验案例 (案例 1 和案例 2) 中,基础细胞培养培养基中的胰岛素水平为 10mg/L。在细胞培养周期期间添加额外的胰岛素三至六次,从而提供在 14 天细胞培养周期结束时最终量分别为 25mg/L 和 40mg/L 胰岛素的细胞培养案例 1 和细胞培养案例 2 (表 A)。在第 1 天于 37℃ 培养细胞,随后将温度向下转换至第 1 天 35℃,第 8 天 33℃,和第 10 天 31℃。通过相对于对照的百分比升高来量化滴度改进。细胞培养周期期间自少于 10mg/L 至 25mg/L 或 40mg/L 总胰岛素添加分别导致与对照相比约 16% 或约 18% 的滴度升高 (表 A)。

[0469] 表 A。例示性胰岛素添加方案和结果

[0470]

	胰岛素添加案例1	胰岛素添加案例2
14天持续时间期间添加的总胰岛素浓度	25 mg/L	40 mg/L
滴度改进百分比升高	16%	18%

[0471] 在含有不同量的来自不同来源的水解产物的细胞培养培养基中培养生成贝伐珠单抗的 CHO 细胞,并评估特定水解产物对生成的贝伐珠单抗的量的影响。在两个代表性方案中,通过在含有 339nM 铜的基础细胞培养培养基中接种细胞,在细胞培养中启动贝伐珠单抗的生成,并在生物反应器中在 14 天细胞培养周期上的第 3 天添加分批补料培养基。用于方案 1 的基础细胞培养培养基具有 1% 动物衍生的水解产物,不含植物衍生的水解产物,而方案 2 具有补充有 0.75% 动物衍生的水解产物与 0.25% 植物衍生的水解产物的组合的基础细胞培养培养基 (表 B)。分析通过两种方案生成的抗体滴度证明方案 2 提供自细胞生成的贝伐珠单抗的量与由使用方案 1 培养的细胞生成的贝伐珠单抗的量相比的 27% 升高 (表 B)。

[0472] 表 B。例示性实验方案

[0473]

	方案 1	方案 2
猪豚	1%	0.75%
植物豚	无	0.25%
滴度改进百分比升高	不适用	27%

[0474] 实施例 2 :细胞培养培养基成分对由哺乳动物细胞系生成的贝伐珠单抗的量的影

响。

[0475] 在具有单体形式 (Cys, 半胱氨酸) 或二聚体形式 (Cys-Cys, 胱氨酸) 的氨基酸半胱氨酸的基础培养基中培养生成贝伐珠单抗的 CHO 细胞 (表 C)。通过在含有 339nM 铜, 1% 动物水解产物和 0.25% 植物水解产物的基础培养基中接种细胞, 在细胞培养中启动贝伐珠单抗的生成, 并在生物反应器中在 14 天细胞培养周期上的第 3 天添加分批补料。基础培养基中的胰岛素水平处于少于 10mg/L 或 10mg/L 的浓度。两种实验细胞培养 (半胱氨酸 + 胰岛素和胱氨酸 + 胰岛素) 在细胞培养周期期间添加额外的胰岛素三次或六次, 从而提供 25mg/L 或 40mg/L 的最终量 (表 C)。在第 1 天于 37℃ 培养细胞, 随后将温度向下转换至第 1 天 35℃, 第 8 天 33℃, 和第 10 天 31℃。通过相对于对照的百分比升高来量化滴度改进。用胱氨酸 (Cys-Cys) 替换半胱氨酸 (Cys) 相对于对照改进滴度达 11%。在使用胱氨酸 (Cys-Cys) 制成的基础培养基中也观察到胰岛素添加的影响。

[0476] 表 C. 方案和结果的汇总

[0477]

	半胱氨酸 (对照)	胱氨酸	半胱氨酸 +胰岛素	胱氨酸 +胰岛素
基础培养基中的 半胱氨酸 (Cys) 浓度	2.6 mM	0 mM	2.6 mM	0 mM
基础培养基中的 胱氨酸 (Cys-Cys) 浓度	0 mM	1.3 mM	0 mM	1.3 mM
14天持续时间期间 添加的总胰岛素浓度	少于10 mg/L	少于10 mg/L	25 mg/L	40 mg/L
滴度改进百分比升高	不适用	11%	11%	14%

[0478] 实施例 3: 胰岛素添加对由哺乳动物细胞系生成的贝伐珠单抗的量的影响。

[0479] 在含有各种量的胰岛素的细胞培养培养基中培养生成贝伐珠单抗的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 并评估胰岛素添加对生成的贝伐珠单抗的量的影响。通过在基础培养基中接种细胞, 在细胞培养中启动贝伐珠单抗的生成。接种后, 培养基 (即初始细胞培养培养基) 含有 300nM 硫酸铜 (CuSO_4), 1% 动物水解产物和 0.25% 植物水解产物, 和 1.3mM 胱氨酸。接种后, 培养基还含有 10mg/L 或 20mg/L 胰岛素 (表 D)。在生物反应器中在 14 天细胞培养周期上在第 3 天添加分批补料培养基或添加两次分批补料培养基 (第 3 天一次分批补料和第 6 天第二次分批补料)。一些细胞培养在细胞培养周期期间接受额外的胰岛素一至六次, 从而在 14 天细胞培养周期结束时给细胞培养提供累积量 25mg/L 至 85mg/L 的胰岛素 (表 D)。在第 1 天于 37℃ 培养细胞, 随后将温度向下转换至第 1 天 35℃, 第 8 天 33℃, 和第 10 天 31℃。在两项代表性实验中在不同培养间比较滴度改进, 而且测定了初始细胞培养培养基中 10mg/L 胰岛素及第 3 天添加胰岛素达累积量 25mg/L 胰岛素生成最高的滴度产量 (图 1A (一次分批补料) 和 1B (两次分批补料))。初始细胞培养培养基中含有 20mg/mL 胰岛素且无额外的胰岛素补充的细胞培养展示与初始细胞培养培养基中有 10mg/mL 胰

胰岛素且在细胞培养周期期间添加额外的胰岛素的培养相当的滴度产量,指示初始细胞培养培养基中的胰岛素是提高滴度产量的一项重要因子(表D,图1A和1B)。

[0480] 表D。例示性胰岛素添加方案

[0481]

方案	初始细胞培养培养基中的胰岛素	胰岛素补料	胰岛素补料的日子	14天时细胞培养中的累积胰岛素
1	20 mg/L	无	无	20 mg/L
2	10 mg/L	15 mg/L	第3天	25 mg/L
3	10 mg/L	5 mg/L	第3, 6, 和9天	25 mg/L
4	10 mg/L	5 mg/L	第3, 5, 7, 9, 11, 和13天	40 mg/L
5	10 mg/L	15 mg/L	第3, 6, 和9天	55 mg/L
6	10 mg/L	25 mg/L	第3, 6, 和9天	85 mg/L

[0482] 实施例4:额外的分批培养基补料对由哺乳动物细胞系生成的贝伐珠单抗的量的影响。

[0483] 在细胞培养培养基中培养生成贝伐珠单抗的CHO细胞的四份不同样品,并补料一或两次分批培养基补料以测定对生成的贝伐珠单抗的量的影响。通过在基础培养基中接种细胞,在细胞培养中启动贝伐珠单抗的生成。接种后,培养基(即初始细胞培养培养基)含有300nM铜硫酸(CuSO_4),1%动物水解产物和0.25%植物水解产物,和1.3mM胱氨酸。在一种方案中,在生物反应器中在14天细胞培养周期上的第3天添加分批补料培养基。在第二种方案中,在生物反应器中在14天细胞培养周期上的第3天和第6天添加分批补料培养基(表E)。第3天投递的分批补料培养基含有2.5%动物水解产物和0.625%植物水解产物,而且以125ml/L的体积添加入细胞培养中。第6天投递的分批补料培养基含有7.5mM半胱氨酸和7.5mM胱氨酸,而且以90ml/L的体积添加入细胞培养中。因而,细胞培养在补料后胱氨酸浓度有0.62mM的升高。在第1天于37℃培养细胞,随后将温度向下转换至第1天35℃,第8天33℃,和第10天31℃。在第6天接收第二次补料的细胞培养中观察到滴度改进,其中只接收一次补料的培养展现平均滴度,而两次补料工艺导致高至0.3g/L的滴度升高(约20%滴度升高)。第14天生物量积累(图2A)和滴度(图2B)的测量指示第6天第二次补料改进产量,而且这个第二次补料对具有更高细胞年龄的培养更重要,其中观察到更高的生长和更早的存活力下降。

[0484] 表E。例示性分批补料添加方案

[0485]

培养基	方案1	方案2
初始细胞培养培养基	1%动物水解产物 0.25%植物水解产物 1.3 mM胱氨酸 10 mg/L胰岛素 300 nM CuSO ₄	1%动物水解产物 0.25%植物水解产物 1.3 mM胱氨酸 10 mg/L胰岛素 300 nM CuSO ₄
第3天分批补料	2.5%动物水解产物 0.625%植物水解产物 (以125 mL/L提供)	2.5%动物水解产物 0.625%植物水解产物 (以125 mL/L提供)
第6天分批补料	无	7.5 mM半胱氨酸 7.5 mM胱氨酸 (以90 mL/L提供)

[0486] 分析上文所述结果提供了用于培养生成贝伐珠单抗的 CHO 细胞的新工艺的开发。新工艺合并使用含有 10mg/L 胰岛素以及胱氨酸代替半胱氨酸的初始细胞培养培养基,在细胞培养期间第 3 天和第 6 天的分批补料和细胞培养的第 3 天添加胰岛素(表 F,方案 2)。将这些成分添加至细胞培养工艺导致高至约 60%的滴度升高。见图 3 和表 F,方案 2,与方案 1 相比。

[0487] 表 F。新的细胞培养工艺

[0488]

培养基	方案1	方案2
初始细胞培养培养基	1%动物水解产物 2.6 mM半胱氨酸 2 mg/L胰岛素	1%动物水解产物 0.25%植物水解产物 1.3 mM胱氨酸 10 mg/L胰岛素

[0489]

		300 nM CuSO ₄
第3天分批补料	2.5%动物水解产物 (以125 mL/L提供)	2.5%动物水解产物 0.625%植物水解产物 (以125 mL/L提供)
第3天胰岛素补料	无	15 mg/L胰岛素
第6天分批补料	无	7.5 mM半胱氨酸 7.5 mM胱氨酸 (以90 mL/L提供)
温度	33°C	第1天35°C, 第8天33°C, 和第10天31°C

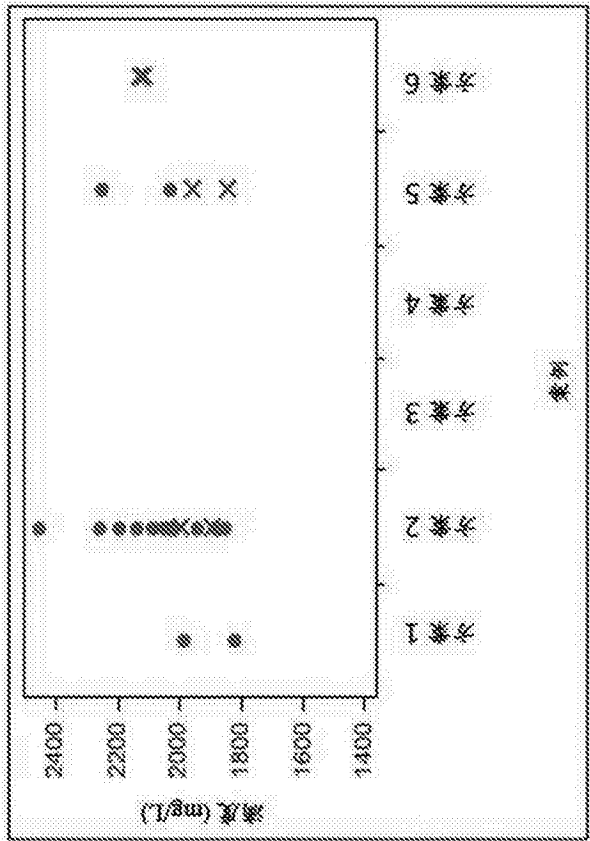


图 1B

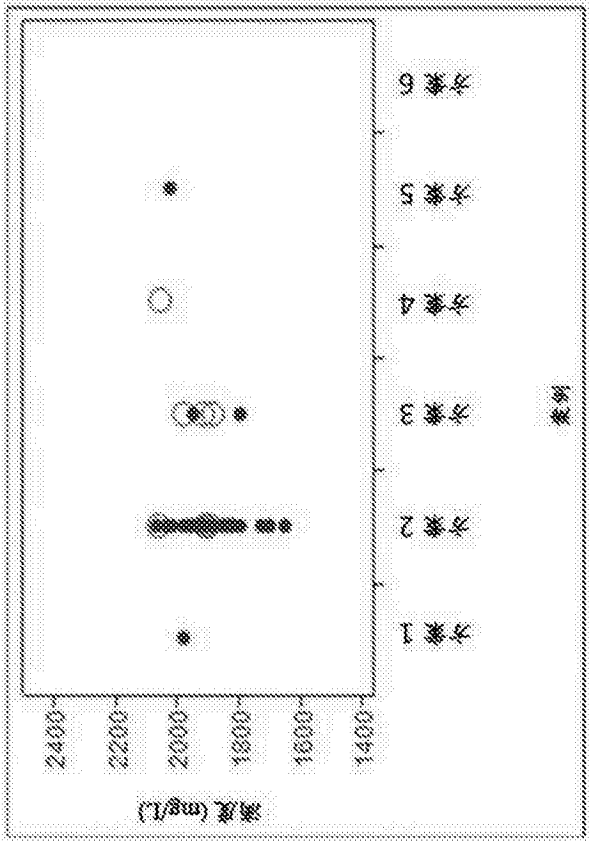


图 1A

图 1

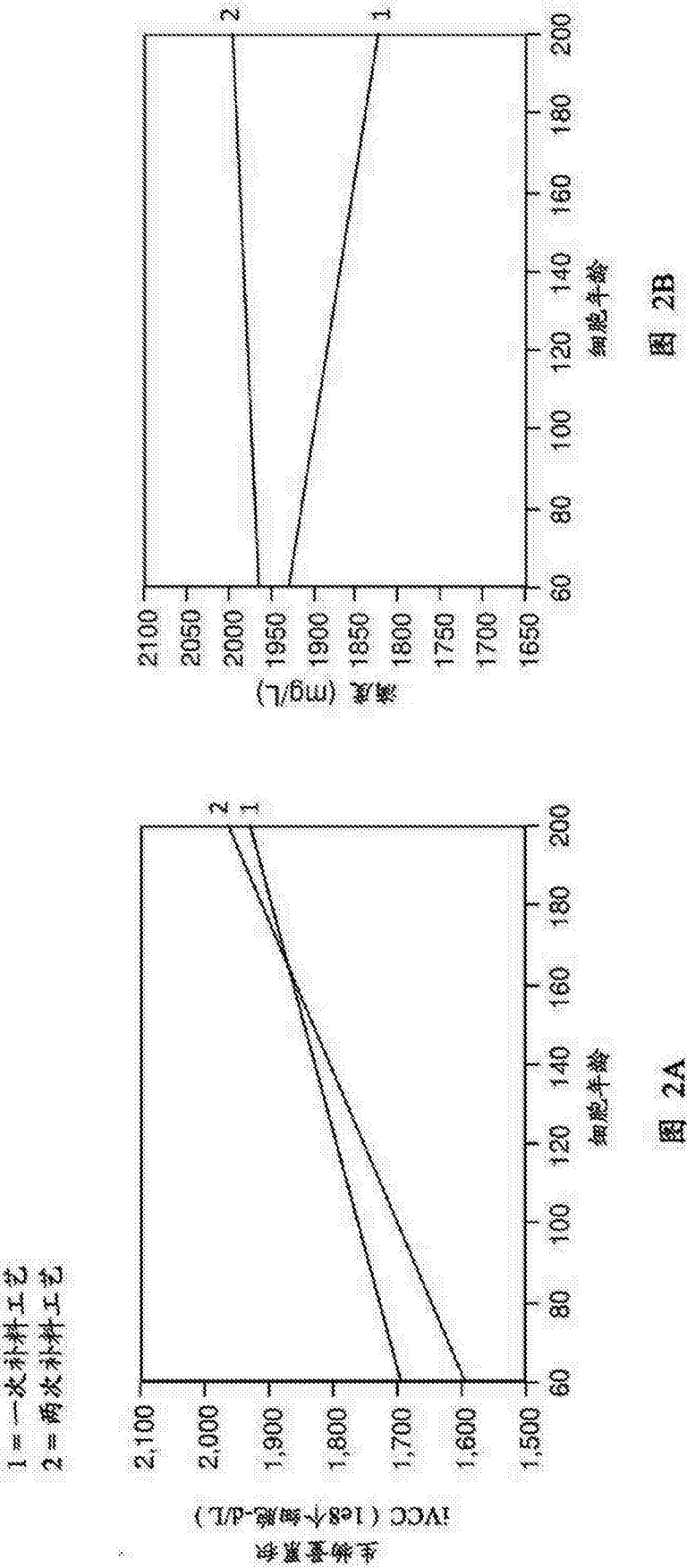


图 2

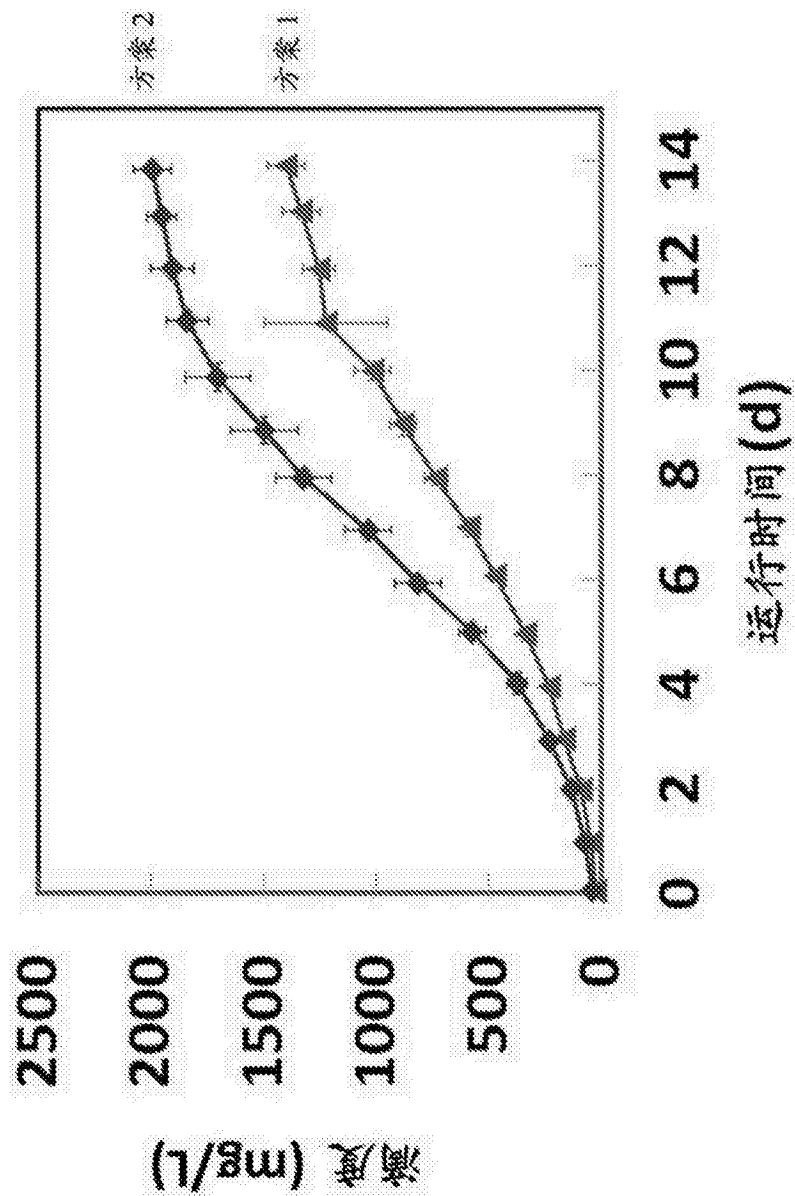


图 3