

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880013275.1

[51] Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月24日

[11] 公开号 CN 101679943A

[22] 申请日 2008.4.22

[21] 申请号 200880013275.1

[30] 优先权

[32] 2007.4.23 [33] US [31] 60/913,382

[86] 国际申请 PCT/US2008/061123 2008.4.22

[87] 国际公布 WO2008/131374 英 2008.10.30

[85] 进入国家阶段日期 2009.10.23

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 乔斯·曼纽尔·戈梅斯

格雷戈里·沃尔特·希勒

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责
任公司
代理人 刘国伟

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 45 页

[54] 发明名称

低温和/或低 pH 值在细胞培养中的使用

[57] 摘要

本发明提供一种通过使细胞培养物在较低的温度和/或较低的 pH 值下生长来减少细胞培养物中的蛋白质错误折叠和聚集的新颖方法。由此,可极大地改良细胞培养物中所产生的蛋白质的质量。因此,本发明有助于改良细胞培养物中所产生的治疗性蛋白质的功效。

1. 一种在细胞培养物中产生蛋白质的方法，其包含以下至少一个步骤：
 - (a) 在较低的温度下，使细胞在所述细胞培养物中生长；和
 - (b) 在较低的 pH 值下，使细胞在所述细胞培养物中生长；以减少错误折叠的蛋白质和/或聚集蛋白质的产生。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其包含在较低的温度和较低的 pH 值下使细胞在所述细胞培养物中生长。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述细胞培养物为大规模细胞培养物。
4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述细胞培养物为补料分批细胞培养物。
5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述细胞培养物为哺乳动物细胞培养物。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述细胞培养物为 CHO 细胞培养物。
7. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述较低的温度在 27.0°C 到低于 30.0°C 的范围内。
8. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述较低的 pH 值在 6.80 到小于 7.00 的范围内。
9. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所产生的蛋白质为可溶性受体。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述可溶性受体为 TNFR-Fc。
11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述较低的温度为 29.5°C。
12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述较低的 pH 值为 6.95。
13. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述可溶性受体为 sIL-13R。
14. 一种在细胞培养物中产生蛋白质的方法，其包含以下至少一个步骤：

(a)通过改变所述细胞培养物的温度使所产生的蛋白质的蛋白质糖基化水平改变为预定水平；和

(b)通过改变所述细胞培养物的 pH 值使所产生的蛋白质的蛋白质糖基化水平改变为预定水平。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述蛋白质糖基化为 N-聚糖唾液酸化。
16. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述细胞培养物为大规模细胞培养物。
17. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述细胞培养物为补料分批细胞培养物。
18. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述细胞培养物为哺乳动物细胞培养物。
19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述细胞培养物为 CHO 细胞培养物。
20. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述方法包括在介于 27.0°C 到低于 30.0°C 的范围内的温度下使所述细胞培养物生长。
21. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述方法包括在介于 6.80 到小于 7.00 的范围内的 pH 值下使所述细胞培养物生长。
22. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所产生的蛋白质为可溶性受体。
23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述可溶性受体为 TNFR-Fc。
24. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述可溶性受体为 sIL-13R。
25. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所产生的蛋白质为治疗性蛋白质。
26. 一种医药组合物，其包含由根据权利要求 25 所述的方法制备的治疗性蛋白质和药学上可接受的载剂。

27. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所产生的蛋白质为治疗性蛋白质。
28. 一种医药组合物，其包含由根据权利要求 27 所述的方法制备的治疗性蛋白质和药学上可接受的载剂。
29. 根据权利要求 1 至 25 或 27 中任一权利要求所述的方法，其另外包含从所述细胞培养物中分离所述蛋白质的步骤。
30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述蛋白质另外经纯化或加工以供调配。
31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中将所述蛋白质调配成医药组合物。

低温和/或低 pH 值在细胞培养中的使用

相关申请案

本申请案主张 2007 年 4 月 23 日申请的美国临时申请案第 60/913,382 号的权利，所述申请案以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

本发明提供对通过培养细胞、尤其哺乳动物细胞产生蛋白质进行改良的方法。具体地说，本发明涉及制备蛋白质产物（例如糖蛋白产物）的方法，其中通过操纵细胞培养物环境来控制蛋白质产物特征。本发明也涉及通过降低细胞培养物的温度和/或 pH 值来操纵蛋白质糖基化且减少蛋白质聚集和错误折叠，从而改良在例如哺乳动物细胞中产生的蛋白质产物（例如糖蛋白产物）的治疗功效和/或免疫原性的方法。

背景技术

大部分市售的或在研制中的生物技术产物为蛋白质治疗剂。对于在动物细胞培养物中产生蛋白质和涉及所述产生的改良方法的需求较大，并逐渐增长。因为通常需要动物细胞的细胞机构来产生多种形式的蛋白质治疗剂，例如经翻译后修饰的蛋白质，尤其糖基化蛋白质，所以需要所述改良方法。

在大规模的治疗性蛋白质产生方法中遇到的常见问题是，大部分的蛋白质产物以错误折叠或聚集形式（即，以高分子量聚集物（“HMWA”）形式）产生。举例来说，多肽在细胞中的重组性过度表达可使内质网（ER）机构超负荷，从而使得越来越多的错误折叠的蛋白质和/或聚集蛋白质避开降解途径并离开 ER。因此，当前蛋白质产生方法可产生大量聚集的无功能且由此无法以原样使用的产物。错误折叠的蛋白质和/或聚集蛋白质的存在是不合需要的，这是因为其可导致在投药后出现不良事件，包括（但不限于）可能在投药后出现免疫原性（例如补体激活或过敏反应）。因此，过多的治疗性蛋白质错误折叠和/或聚集可能导致例如临床试验失败。因此，此项技术中需要限制或减少蛋白质错误折叠和/或聚集的新方法。

蛋白质糖基化是常见的翻译后修饰过程，其中通过 ER 中的一系列专用酶（即糖基转移酶和糖苷酶）的作用将复合糖部分添加到蛋白质上。这一过程可控制新合成的多肽的适当折叠，使得仅正确折叠的多肽离开 ER，而错误折叠的蛋白质则降解。蛋白质糖基化模式会影响蛋白质靶向输送、结构、热力学稳定性和酶活性（参见例如索拉（Solá）

等人(2007) 细胞和分子生命科学 (Cell. Mol. Life Sci.) 64:2133-52; 索拉 (Solá) 和格力博诺 (Griebenow) (2006) 欧洲生物化学会联盟期刊 (FEBS Lett.) 580:1685-90)。举例来说, N-聚糖唾液酸化可能导致糖蛋白寿命增加, 这是因为靶向未唾液酸化的蛋白质以供降解的去唾液酸糖蛋白受体无法识别所述糖蛋白 (参见例如博克 (Bork) 等人(2007) 欧洲生物化学会联盟期刊 (FEBS Letters) 581:4195-98)。因此, 蛋白质糖基化的改变可影响产物的质量和功效。

此外, 异常蛋白质糖基化可导致最终治疗性蛋白质产物的免疫原性。在非天然的次优条件下产生的蛋白质可获得人类蛋白质上无法天然发现的糖和糖模式, 且由此导致个体的免疫原性反应 (杰佛瑞 (Jefferis) (2006) 生物技术进展 (Biotechnol. Prog.) 21:11-16)。所述非天然糖基化在蛋白质治疗剂中尤其普遍, 例如抗体治疗剂或 Fc 融合蛋白治疗剂, 例如可溶性受体 Fc 融合蛋白治疗剂。

由于这些原因, FDA 要求将治疗性蛋白质的糖型概况维持在严格限度内。因此, 在制药工业中需要一种在细胞培养物中产生治疗性蛋白质的方法, 其使得能够控制蛋白质糖基化水平。

发明内容

因此, 本发明为一种在细胞培养物中产生蛋白质的方法, 其包含以下至少一个步骤: (a) 在较低的温度下, 使细胞在细胞培养物中生长; 和 (b) 在较低的 pH 值下, 使细胞在细胞培养物中生长; 以便减少错误折叠的蛋白质和/或聚集蛋白质的产生。在实施例中, 在较低的温度下且在较低的 pH 值下, 使细胞在细胞培养物中生长。

在优选实施例中, 本发明涉及改变 pH 值和温度参数以在哺乳动物细胞培养物且尤其中国仓鼠卵巢 (“CHO”) 细胞培养物中减少错误折叠的蛋白质和/或聚集蛋白质的产生。在优选实施例中, 细胞培养物产生为可溶性受体的蛋白质 (“所产生的蛋白质”), 例如 (不限于) TNFR-Fc 或 sIL-13R 蛋白质。在这些优选实施例中, 所述较低的温度可在 27.0°C 到低于 30.0°C 的范围内。在其它的优选实施例中, 所述较低的 pH 值在 6.80 到小于 7.00 的范围内。也可使用在上述范围内的 pH 值和温度的组合。

另一方面, 本发明为一种在细胞培养物中产生蛋白质的方法, 其中通过改变细胞培养物的温度和/或 pH 值来控制所产生的蛋白质的蛋白质糖基化水平。因此, 可通过增加温度和/或 pH 值来增加糖基化 (例如 (不限于) N-聚糖唾液酸化) 水平, 或通过降低温度和/或 pH 值来降低糖基化水平。

另一方面, 本发明为一种通过控制上述参数来产生治疗性蛋白质的方法。另一方面, 本发明为一种包含由所述方法制备的治疗性蛋白质和医药学上可接受的载剂的医药组

合物。

附图说明

图 1A 表示在 27.0°C[◆]、28.0°C[▲]、29.0°C[■]或 30.0°C[○]下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的总活细胞数目 (Y 轴; IVC[归一化的 e^9 细胞*日/升]) (归一化为平均采集日 IVC) 与时间 (X 轴; 培养时间以日[d]为单位) 的关系; 图 1B 表示相同细胞的细胞活力 (Y 轴) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 2A 表示在 27.0°C[◆]、28.0°C[▲]、29.0°C[■]或 30.0°C[○]下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物中的残留葡萄糖概况 (Y 轴; 葡萄糖[g/L]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 图 2B 表示相同细胞的谷氨酰胺概况 (Y 轴; 谷氨酰胺[mM]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 3A 表示在 27.0°C[◆]、28.0°C[▲]、29.0°C[■]或 30.0°C[○]下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物的培养基中的乳酸盐浓度 (Y 轴; 乳酸盐[g/L]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 图 3B 表示相同细胞的铵概况 (Y 轴; NH_4^+ [mM]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 4A 描述在 27.0°C[◆]、28.0°C[▲]、29.0°C[■]或 30.0°C[○]下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物的由累积平均 Q_p (X 轴; 累积平均 Q_p [归一化的毫克/ e^9 细胞/日]) 表示的细胞比生产率 (归一化为平均采集日累积平均 Q_p) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 而图 4B 表示相同细胞的 TNFR-Fc 滴度 (X 轴; 产物滴度[归一化的 mg/L]) (归一化为平均采集日滴度) 与时间 (培养时间[d]) 的关系。

图 5A 中显示改变经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物中的生长温度 (X 轴; [°C]) 对于错误折叠和/或聚集 TNFR-Fc 的产量 (Y 轴; 错误折叠产物/聚集产物%) 的影响; 而图 5B 中显示温度对于 HMWA 的产量 (Y 轴; 高分子量物质%) 的影响。

图 6A 中显示改变经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物中的生长温度 (X 轴; 温度[°C]) 对于 TNFR-Fc 的总唾液酸化 (N-和 O 连接的唾液酸化) 的百分率 (Y 轴; 参考物质的总唾液酸化的百分率) 的影响。所使用的参考物质为具有已知且优选的糖基化模式的特定等分试样的 TNFR-Fc, 检验结果可与所述已知且优选的糖基化模式比较。图 6B 显示改变相同细胞的细胞培养物中的生长温度 (X 轴; 温度[°C]) 对于总唾液酸化 (□) 或未唾液酸化 (●) N 连接聚糖的百分率 (Y 轴; 总 N 连接聚糖的百分率) 的影响。

图 7 显示在不同温度 (27.0°C[◆]、28.0°C[▲]、29.0°C[■]或 30.0°C[○]) 下使细胞生长对于 CHO 细胞培养物的 pH 值的影响 (Y 轴) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 8A 表示在 7.20[◇]、7.10[■]、7.00[◆]、6.90[●]或 6.80[▲]pH 值设定点下生长的

经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的总活细胞数目 (Y 轴; IVC[归一化的 e^9 细胞*日/升]) (归一化为平均采集日 IVC) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 而图 8B 表示相同细胞的细胞活力 (Y 轴) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 9A 表示在 7.20[◇]、7.10[■]、7.00[◆]、6.90[●]或 6.80[▲]pH 值设定点下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物的葡萄糖概况 (Y 轴; 葡萄糖[g/L]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 而图 9B 表示相同细胞的谷氨酰胺概况 (Y 轴; 谷氨酰胺 [mM]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 10A 表示在 7.20[◇]、7.10[■]、7.00[◆]、6.90[●]或 6.80[▲]pH 值设定点下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物的培养基中的乳酸盐浓度 (Y 轴; 乳酸盐 [g/L]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 而图 10B 表示相同细胞的铵概况 (Y 轴; NH_4^+ [mM]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 11A 表示在 7.20[◇]、7.10[■]、7.00[◆]、6.90[●]或 6.80[▲]pH 值设定点下使经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞生长时细胞培养物的 pH 值与 pH 值设定点的偏差 (X 轴; 培养物的 pH 值) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。图 11B 表示在 7.20[◇]、7.10[■]、7.00[◆]、6.90[●]或 6.80[▲]pH 值设定点下生长的相同细胞的摩尔渗透压浓度 (X 轴; 摩尔渗透压浓度[mOsm/kg]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 12A 表示在 7.20[◇]、7.10[■]、7.00[◆]、6.90[●]或 6.80[▲]pH 值设定点下生长的经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物的由累积平均 Qp (X 轴; Cum. Avg. Qp[归一化的毫克/ e^9 细胞/日]) 表示的细胞比生产率 (归一化为平均采集日累积平均 Qp) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系; 而图 12B 表示相同细胞的 TNFR-Fc 滴度 (X 轴; 产物滴度[归一化 mg/L]) (归一化为平均采集日滴度) 与时间 (培养时间[d]) 的关系。

图 13A 表示改变经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的培养物的 pH 值设定点 (X 轴; pH 值) 对于错误折叠/聚集 TNFR-Fc 的产量 (Y 轴; 错误折叠产物/聚集产物%) 的影响。图 13B 表示改变细胞培养物的 pH 值设定点 (X 轴; pH 值) 对于 HMWA 的产量 (Y 轴; 高分子量物质%) 的影响。

图 14A 中显示改变经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的培养物中的 pH 值设定点 (X 轴; pH 值) 对于 TNFR-Fc 的总唾液酸化的百分率 (Y 轴; 参考物质的总唾液酸化的百分率) 的影响。图 14B 显示改变相同细胞的细胞培养物中的细胞培养物 pH 值设定点 (X 轴; pH 值) 对于总唾液酸化 (□) 或未唾液酸化 (●) N 连接聚糖的百分率 (Y 轴; 总 N 连接聚糖的百分率) 的影响。

图 15 描述如通过使胨释放的 2-氨基苯甲酰胺-(2-AB)-标记的蛋白质糖型经受正相色

谱所观察到的描述 N 连接聚糖唾液酸化的典型荧光（Y 轴；荧光以 mV 为单位测量）相较于保留时间（X 轴；分钟）的概况。

图 16 描述如通过经 TNFR-Fc 转染的 CHO 细胞的细胞培养物在培养物的不同 pH 值设定点下使胨释放的 2-氨基苯甲酰胺-(2-AB)-标记的蛋白质糖型经受正相色谱所观察到的描述 N 连接聚糖唾液酸化的荧光（Y 轴；mV）相较于保留时间（X 轴；分钟）的概况。

图 17 表示在 37.0°C [◆]、33.0°C [■]、32.0°C [●]、31.0°C [◇]、29.0°C [△] 或 RT [□] 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞的细胞培养物的 (A) 活细胞密度 (Y 轴；细胞/毫升)、(B) 包括活细胞和非活细胞的总细胞密度 (Y 轴；细胞/毫升)、(C) 细胞活力 (Y 轴) 和 (D) 总活细胞数目 (IVC) (Y 轴； e^9 细胞*日/升) 与时间 (X 轴；培养时间[d]) 的关系。

图 18 表示在 37.0°C [◆]、33.0°C [■]、32.0°C [●]、31.0°C [◇]、29.0°C [△] 或 RT [□] 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞培养物的二聚物和 HMWA sIL-13R 滴度 (Y 轴；sIL-13R[mg/L]) 与时间 (X 轴；培养时间[d]) 的关系。

图 19A 表示在 37.0°C、33.0°C、32.0°C、31.0°C、29.0°C 或 RT 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞培养物在各个时段 (X 轴) 期间的每日比 sIL-13R 生长速率 (Y 轴； Q_p [微克/ e^9 细胞/日])。图 19B 表示在 37.0°C、33.0°C、32.0°C、31.0°C、29.0°C 或 RT 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞培养物的累积平均细胞比生产率 (Y 轴；Cum. Avg. Q_p [毫克/ e^9 细胞/日]) 与时间 (X 轴；培养时间[d]) 的关系。

图 20 表示在 37.0°C、33.0°C、32.0°C、31.0°C、29.0°C 或 RT 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞培养物的不同时段 (X 轴) 的每日比葡萄糖消耗率 (Y 轴； Q_{glc} [克/ e^9 细胞/日])。

图 21 表示在 37.0°C、33.0°C、32.0°C、31.0°C、29.0°C 或 RT 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞培养物的不同时段 (X 轴) 的每日比谷氨酰胺消耗率 (Y 轴； Q_{glc} [毫摩尔/ e^9 细胞/日])。

图 22 表示在 37.0°C [◆]、33.0°C [■]、32.0°C [●]、31.0°C [◇]、29.0°C [△] 或 RT [□] 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞的细胞培养基中的乳酸盐浓度 (Y 轴；乳酸盐[g/L]) 与时间 (X 轴；培养时间[d]) 的关系。

图 23 表示在 37.0°C [◆]、33.0°C [■]、32.0°C [●]、31.0°C [◇]、29.0°C [△] 或 RT [□] 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞的细胞培养基中的铵浓度 (Y 轴；铵[mM]) 与时间 (X 轴；培养时间[d]) 的关系。

图 24 表示在过度表达 sIL-13R 的细胞的培养第 9 日，细胞培养物温度 (X 轴；生长

温度[°C]) 对于 HMWA 产量 (Y 轴; 高分子量物质%) 的影响。

图 25 表示在过度表达 sIL-13R 的细胞的培养第 18 日, 细胞培养物温度 (X 轴; 生长温度[°C]) 对于 HMWA 产量 (Y 轴; 高分子量物质%) 的影响。

图 26A 表示由在 37.0°C[◆]、33.0°C[■]、32.0°C[●]、31.0°C[◇]、29.0°C[△]或 RT[□] 下生长的过度表达 sIL-13R 的细胞的培养基中产生的总 sIL-13R 蛋白质回收的 sIL-13R 二聚物的百分率 (Y 轴; sIL-13R 二聚物%) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。图 26B 表示过度表达 sIL-13R 的细胞的培养基中相对于总 sIL-13R 的 HMWA 的百分率 (Y 轴; 高分子量物质%) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

图 27 表示在 37.0°C[◆]、33.0°C[■]、32.0°C[●]、31.0°C[◇]、29.0°C[△]或 RT[□] 下生长的细胞的培养基中的 sIL-13R 二聚物滴度 (Y 轴; 仅 sIL-13R 二聚物[mg/L]) 与时间 (X 轴; 培养时间[d]) 的关系。

具体实施方式

在哺乳动物细胞培养物中产生治疗性蛋白质的普遍常识为, 生长阶段期间的温度应为至少 30.0°C 且 pH 值应为至少 7.00。然而, 在生长阶段期间, 在高于 30.0°C 的温度下且在高于 7.00 的 pH 值下使细胞在细胞培养物中生长可导致蛋白质聚集 (在本文中也称为高分子量聚集物或 HMWA 形成) 和蛋白质错误折叠增多, 且因此产生较少量的功能性可用蛋白质。

本发明提供一种在细胞培养物中产生蛋白质的新颖方法, 其中所述方法导致蛋白质错误折叠减少和/或蛋白质聚集减少。另一方面, 本发明提供控制蛋白质糖基化水平的方法。

由本发明方法产生的蛋白质

如本文中所用, 短语“多肽”或“多肽产物”分别与术语“蛋白质”和“蛋白质产物”同义, 且如此项技术中通常所理解, 是指至少一个通过连续肽键连接的氨基酸链。在某些实施例中, “所关注的蛋白质”或“所关注的多肽”等为由已经转染或转化到宿主细胞中 (例如瞬时或稳定地转染或转化到宿主细胞中) 的外源核酸分子编码的蛋白质。在已转染或转化宿主细胞的外源性 DNA 编码“所关注的蛋白质”的某些实施例中, 外源 DNA 的核酸序列决定氨基酸序列。这一序列可为天然存在的序列, 或者可为由人类工程改造的序列。在某些实施例中, “所关注的蛋白质”为由宿主细胞的内源性核酸分子编码的蛋白质。这类所关注的内源性蛋白质的表达可通过用外源性核酸分子转染宿主细胞而改变, 所述外源性核酸分子可例如含有一个或多个调节序列和/或编码会增强所关注的蛋白质的表达的蛋白质。在本发明的实施例中, 在例如细胞培养物中产生所关注的

多肽，随后进行纯化。

术语“糖蛋白”、“糖基化蛋白质”等是指天冬酰胺侧链（N-糖基化）或丝氨酸和/或苏氨酸侧链（O-糖基化）上连接有糖部分（例如寡糖部分）的蛋白质。举例来说，一种常见类型的蛋白质 N-糖基化为蛋白质唾液酸化（也称为 N-聚糖唾液酸化）。ER 和/或高尔基体（Golgi apparatus）中的大多数分泌蛋白和膜蛋白（例如膜受体）经糖基化。此项技术中已知，糖基化可控制 ER 中的蛋白质折叠和释放。另外，高尔基体中也发生多个步骤的糖基化/去糖基化。以下文献中评述目前对于 ER 和高尔基体中的蛋白质糖基化过程的了解：海伦尼斯（Helenius）等人(2001) *科学 (Science)* 291:2364-69；帕罗迪（Parodi）(2000) *生物化学学报 (Biochem. J.)* 348:1-13；和帕罗迪（Parodi）(2000) *生物化学年评 (Annu. Rev. Biochem.)* 69:69-93。因此，在本发明的某些实施例中，所关注的多肽为所关注的糖蛋白，且所关注的糖蛋白是在例如细胞培养物中产生，随后进行纯化。在本发明的一个实施例中，所关注的糖蛋白为受体，且可能为可溶性受体。

可使用本发明的方法和组合物来产生所关注的任何蛋白质，包括（但不限于）具有医药性质、诊断性质、农艺性质和/或可在商业、实验和/或其它应用中使用的各种其它性质中的任一性质的蛋白质。另外，所关注的蛋白质可为蛋白质治疗剂。换句话说，蛋白质治疗剂（或治疗性蛋白质）为对于承受作用的身体区域具有生物效应或对于通过中间物远距离地承受作用的身体区域具有生物效应的蛋白质。在某些实施例中，可加工和/或修饰使用本发明的方法和/或组合物所产生的蛋白质，然后将其作为治疗性蛋白质投与个体。

可使用本发明来培养细胞以有利地产生任何治疗性蛋白质，例如医药学上或商业上相关的酶、受体、受体融合体、可溶性受体、可溶性受体融合体、抗体（例如单克隆和/或多克隆抗体）、抗体的抗原结合片段、Fc 融合蛋白、SMIP、细胞因子、激素、调节因子、生长因子、凝血因子（coagulation/clotting factor）或抗原结合剂。以上蛋白质清单事实上仅为示范性的，且不打算作限制性列举。所属领域的技术人员应了解可根据本发明产生的其它蛋白质，且应能够使用本文中所揭示的方法来产生所述蛋白质。

术语“抗体”包括包含至少一个且通常两个 VH 结构域或其部分和/或至少一个且通常两个 VL 结构域或其部分的蛋白质。在某些实施例中，抗体为两个免疫球蛋白重链和两个免疫球蛋白轻链的四聚物，其中免疫球蛋白重链和轻链通过例如二硫键互连。抗体或其一部分可从任何起源获得，所述起源包括（但不限于）啮齿动物、灵长类动物（例如人类和非人类灵长类动物）、骆驼科动物、鲨鱼，以及重组产生的抗体，例如嵌合抗体、人类化抗体和/或例如通过所属领域的技术人员所熟知的方法活体外产生的抗体。

本发明也涵盖“抗体的抗原结合片段”，其包括 (i) Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，包含两个在铰链区通过二硫键连接的 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段；(vi) 骆驼科动物或骆驼科动物化可变域，例如 VHH 结构域；(vii) 单链 Fv (scFv)；(viii) 双特异性抗体；和 (ix) 免疫球蛋白的一个或多个与 Fc 区融合的抗原结合片段。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由独立基因编码，但可使用重组方法由合成连接子使其连接，所述合成连接子使其能够制成 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单一蛋白链(称为单链 Fv (scFv)；参见例如博德 (Bird) 等人(1988) *科学 (Science)* 242:423-26；休斯顿 (Huston) 等人(1988) *美国科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)* 85:5879-83)。术语抗体的“抗原结合片段”也打算涵盖所述单链抗体。使用所属领域的技术人员所知的常规技术获得这些抗体片段，且以与完整抗体相同的方式评测所述片段的功能。

本发明也涵盖单域抗体。单域抗体可包括互补决定区为单域多肽的一部分的抗体。实例包括(但不限于)重链抗体、天然缺乏轻链的抗体、来源于常规的 4 链抗体的单域抗体、经工程改造的抗体和单域支架(来源于抗体的单域支架除外)。单域抗体可为此项技术中的任何单域抗体，或将来出现的任何单域抗体。单域抗体可来源于任何物种，包括(但不限于)老鼠、人类、骆驼、美洲驼、山羊、兔、母牛和鲨鱼。根据本发明的一个方面，如本文中所述的单域抗体为天然存在的单域抗体，其已知为缺乏轻链的重链抗体。所述单域抗体揭示于例如 WO 9404678 中。为清楚起见，本文中将这一来源于天然缺乏轻链的重链抗体的可变域称为 VHH 或纳米抗体 (nanobody)，以便将其与四链免疫球蛋白的常规 VH 相区分。这类 VHH 分子可来源于在骆驼科 (Camelidae) 物种中增殖的抗体，例如在骆驼、美洲驼、单峰驼 (dromedary)、羊驼 (alpaca) 和原驼 (guanaco) 中增殖的抗体。除骆驼科以外，其它物种也可产生天然缺乏轻链的重链抗体；所述 VHH 在本发明的范畴内。单域抗体也包括鲨鱼 IgNAR；参见例如多利 (Dooley) 等人，*美国科学院学报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)*, 103:1846-1851 (2006)。

应了解，除“双特异性”或“双功能”抗体以外，抗体所具有的各结合位点是相同的。“双特异性”或“双功能抗体”为具有两个不同的重链/轻链对和两个不同结合位点的人工杂交抗体。双特异性抗体可由多种方法产生，所述方法包括使杂交瘤融合或连接 Fab' 片段。参见例如宋斯维莱和拉切曼 (Songsivilai & Lachmann), *临床和实验免疫学 (Clin. Exp. Immunol.)* 79:315-321 (1990)；科斯托尼 (Kostelny) 等人，*免疫学杂志 (J. Immunol.)* 148, 1547-1553 (1992)。

在蛋白质为抗体或其片段的实施例中，所述蛋白质可包括至少一个或两个全长重链，和至少一个或两个轻链。或者，抗体或其片段可仅包括抗原结合片段（例如 Fab、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv 片段）。抗体或其片段可为单克隆或单特异性抗体。抗体或其片段也可为人类、人类化、嵌合、CDR 移植或活体外产生的抗体。在其它实施例中，抗体具有选自例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区。在另一个实施例中，抗体具有选自例如 κ 或 λ 的轻链。在一个实施例中，使恒定区变化（例如突变）以改变抗体性质（例如增加或减少以下一者或多者：Fc 受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基的数目、效应细胞功能或补体功能）。通常，抗体或其片段特异性地结合预定抗原，例如可能导致病症（例如神经退行性、代谢性、炎性、自身免疫性和/或恶性病症）的抗原。

本文所描述的蛋白质任选地另外包括增强以下一者或多者的部分：例如稳定性、效应细胞功能或补体结合。举例来说，抗体或抗原结合蛋白可另外包括聚乙二醇化部分、白蛋白或重链和/或轻链恒定区。

通常，例如通过传统杂交瘤技术（科勒（Kohler）等人，自然（Nature）256:495 499 (1975)）、重组 DNA 方法（美国专利第 4,816,567 号）或使用抗体文库的噬菌体呈现技术（克拉克逊（Clackson）等人，自然（Nature）352:624 628 (1991)；马克斯（Marks）等人，分子生物学杂志（J. Mol. Biol.）222:581 597 (1991)）来制造抗体。至于各种其它的抗体产生技术，参见抗体：实验室手册（Antibodies: A Laboratory Manual），哈露（Harlow）等人编，冷泉港实验室出版社（Cold Spring Harbor Laboratory），1988。

另外，可用可检测或功能标记来标记抗体。这些标记包括放射性标记（例如 ¹³¹I 或 ⁹⁹Tc）、酶标记（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）和其它化学部分（例如生物素）。

“小模块化免疫医药（Small Modular ImmunoPharmaceutical）”或（SMIP™）药物（崔比安医药公司（Trubion Pharmaceuticals），华盛顿州西雅图（Seattle, WA））为由同源结构（例如抗原、反受体等）的结合域、具有一个半胱氨酸残基或不具有半胱氨酸残基的铰链区多肽和免疫球蛋白 CH₂ 和 CH₃ 结构域组成的单链多肽（也参见 www.trubion.com）。SMIP 和其使用和应用是揭示于例如美国公开专利申请案第 2007/002159 号、第 2003/0118592 号、第 2003/0133939 号、第 2004/0058445 号、第 2005/0136049 号、第 2005/0175614 号、第 2005/0180970 号、第 2005/0186216 号、第 2005/0202012 号、第 2005/0202023 号、第 2005/0202028 号、第 2005/0202534 号和第 2005/0238646 号和其有关的专利族成员中，所有专利都是以全文引用的方式并入本文中。

在本发明的一个实施例中，所关注的蛋白质为可溶性受体，例如可溶性受体融合蛋

白。例如受体等膜蛋白通常为糖基化蛋白质。因此，本发明方法尤其有利于产生未聚集的经适当折叠且经糖基化的可溶性受体融合蛋白。

可根据此项技术中所熟知的方法产生可溶性蛋白质，例如可溶性受体。在本发明的一个实施例中，可溶性受体包含受体的细胞外区域或受体的细胞外区域的片段。在本发明的另一个实施例中，可溶性受体包含两个多肽。第一多肽包含全长受体；或者，第一多肽包含不足全长的受体，例如受体的细胞外部分。在本发明的一个实施例中，第一多肽为全长细胞因子受体；或者，第一多肽为不足全长的细胞因子受体，例如细胞因子受体的细胞外部分。这类可溶性受体也可包含其它多肽，例如 GST、Lex-A、MBP 多肽序列，或免疫球蛋白链，包括例如 Fc 片段、各种同型（包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE）的重链恒定区。

在本发明的一个实施例中，第二多肽优选为可溶性的。在一些实施例中，第二多肽会增强所连接多肽的半衰期（例如血清或循环半衰期）。在优选实施例中，第二多肽包括免疫球蛋白多肽的至少一个区域。免疫球蛋白融合多肽在此项技术中为已知的且描述于例如美国专利第 5,516,964 号、第 5,225,538 号、第 5,428,130 号、第 5,514,582 号、第 5,714,147 号和第 5,455,165 号中。已知可溶性融合蛋白在产生期间易于聚集，因此本发明方法针对产生这一类型的蛋白质的细胞培养物提供特殊益处。

在一些实施例中，第二多肽包含全长免疫球蛋白多肽。或者，第二多肽包含不足全长的免疫球蛋白多肽，例如重链、轻链、Fab、Fab₂、Fv 或 Fc。第二多肽可包括免疫球蛋白多肽的重链。第二多肽可包括免疫球蛋白多肽的 Fc 区。

在本发明的一个实施例中，可溶性受体融合蛋白包含肿瘤坏死因子抑制剂。在某些实施例中，根据本发明的系统和方法（关于评述，参见以全文引用的方式并入本文中的奈史密斯（Naismith）和斯普兰（Sprang），*炎症杂志* (*J. Inflamm.*) 47(1-2): 1-7, 1995-96) 来表达呈肿瘤坏死因子 α 和 β 受体形式的肿瘤坏死因子抑制剂（TNFR-1；1991 年 3 月 20 日公开的 EP 417,563；和 TNFR-2，1991 年 3 月 20 日公开的 EP 417,014，其各自以全文引用的方式并入本文中）。根据一些实施例，肿瘤坏死因子抑制剂包含可溶性 TNF 受体。在某些实施例中，本发明的 TNF 抑制剂为 TNFR I 和 TNFR II 的可溶性形式。在某些实施例中，本发明的 TNF 抑制剂为可溶性 TNF 结合蛋白质。在某些实施例中，本发明的 TNF 抑制剂为 TNFR 融合蛋白，例如 TNFR-Ig 或 TNFR-Fc。如本文中所用，“依那西普（etanercept）”是指 TNFR-Fc，其为 p75 TNF- α 受体的细胞外部分的两个分子的二聚物，各分子由人类 IgG1 的 235 个氨基酸的 Fc 部分组成。根据本发明，在较低的温度和/或较低的 pH 值下，使表达 TNFR-Fc 的细胞在细胞培养物中生长，以减少 TNFR-Fc

产生期间错误折叠的蛋白质和/或高分子量聚集物的量。在某些实施例中，在较低的温度和/或较低的 pH 值下，使表达 TNFR-Fc 的细胞在细胞培养物中生长以调节 TNFR-Fc 产生期间的糖基化。

在本发明的另一个实施例中，可溶性受体融合蛋白为 sIL-13R。如本文中所示，可溶性 IL-13 受体 (sIL-13R) 是指包括人类白细胞介素 (IL)-13- α 2 受体的细胞外域 (ECD) 和人类 IgG1 重链的 Fc 区的重组融合蛋白。sIL-13R 由两个似乎通过分子间二硫键连接的相同多肽链组成 (即两个多肽链的二聚物)。sIL-13R 可溶性受体融合蛋白和其使用揭示于美国专利第 5,710,023 号中，所述专利以全文引用的方式并入本文中。

在一些实施例中，第二多肽具有比野生型免疫球蛋白重链的 Fc 区的效应功能少的效应功能。Fc 效应功能包括例如 Fc 受体结合、补体结合和 T 细胞耗尽活性 (参见例如美国专利第 6,136,310 号)。分析 T 细胞耗尽活性、Fc 效应功能和抗体稳定性的方法在此项技术中为已知的。在一个实施例中，第二多肽对于 Fc 受体具有较低亲和力或无亲和力。在另一个实施例中，第二多肽对于补体蛋白 C1q 具有较低亲和力或无亲和力。

融合蛋白 (例如可溶性受体融合蛋白) 可另外包括使可溶性受体或其片段与第二部分连接的连接序列。举例来说，融合蛋白可包括肽连接子，例如约 2 到 20 个、更优选约 5 到 10 个氨基酸长度的肽连接子。

在其它实施例中，可将其它氨基酸序列添加到融合蛋白的 N 末端或 C 末端以有助于表达、检测和/或分离或纯化。举例来说，可溶性受体融合蛋白可与一个或多个其它部分 (例如 GST、His6 标签、FLAG 标签) 连接。举例来说，融合蛋白可另外与融合蛋白序列与 GST (即谷胱甘肽 S-转移酶) 序列的 C 末端融合的 GST 融合蛋白连接。所述融合蛋白可有助于溶解性，即增加准确折叠，且由此改良融合蛋白的纯化。

在细胞培养物中产生蛋白质的方法

如本文中所示，术语“培养”和“细胞培养物”是指在适于存活和/或生长的条件下与细胞培养基接触的细胞群体。如本文中所示，这些术语可指包含细胞群体 (例如动物细胞培养物) 和与所述群体接触的培养基的组合。

本发明中所用的细胞可为重组宿主细胞 (例如真核宿主细胞)，即经含有编码所关注的多肽的核酸的表达构筑体转染的细胞，包括动物细胞。短语“动物细胞”涵盖无脊椎动物、非哺乳动物脊椎动物 (例如鸟类、爬行动物和两栖动物) 和哺乳动物细胞。无脊椎动物细胞的非限制性实例包括以下昆虫细胞：草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*; 毛虫)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*; 蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*; 蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*; 果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*; 桑蚕/蚕蛾)。在优选实施

例中，细胞培养物为哺乳动物细胞培养物。

许多哺乳动物细胞系为适于重组表达所关注的多肽的宿主细胞。哺乳动物宿主细胞系包括例如 COS、PER.C6、TM4、VERO076、MDCK、BRL-3A、W138、Hep G2、MMT、MRC 5、FS4、CHO、293T、A431、3T3、CV-1、C3H10T1/2、Colo205、293、海拉细胞 (HeLa)、L 细胞、BHK、HL-60、FRhL-2、U937、HaK、Jurkat 细胞、Rat2、BaF3、32D、FDCP-1、PC12、M1x、鼠科动物骨髓瘤 (例如 SP2/0 和 NS0) 和 C2C12 细胞，以及经转化的灵长类动物细胞系、杂交瘤、正常二倍体细胞和来源于初始组织和初始外植体的细胞外培养物的细胞株。任何能够表达所关注的多肽的真核细胞都可用于所揭示的方法中。许多细胞系可以从商业来源中获得，所述来源为例如美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection; ATCC)。在本发明的一个实施例中，细胞培养物 (例如大规模细胞培养物) 使用 CHO 细胞。

虽然在某些实施例中细胞培养物包含哺乳动物细胞，但所属领域的技术人员应理解，有可能在低等真核生物 (例如酵母) 中或在原核生物 (例如细菌) 中重组产生所关注的多肽。所属领域的技术人员应了解，酵母和细菌细胞培养物的培养条件将不同于动物细胞的培养条件，且应理解将需要如何调整这些条件以便使细胞生长和/或蛋白质产生最优化。

合适菌株包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)，或任何能够表达所关注的多肽的菌株。细菌中的表达可导致形成合并有重组蛋白的包涵体。因此，可能需要对重组蛋白进行再折叠以便产生活性或更具活性的物质。此项技术中已知多种从细菌包涵体获得正确折叠的异源蛋白质的方法。这些方法通常包括溶解来自包涵体的蛋白质，然后利用离液剂使所述蛋白质完全变性。当半胱氨酸残基存在于蛋白质的初始氨基酸序列中时，通常有必要在允许正确形成二硫键的环境 (氧化还原系统) 中完成再折叠。再折叠的一般方法在此项技术中为已知的且揭示于例如科诺 (Kohno) (1990) *酶学方法 (Meth. Enzymol.)* 185:187-95、EP 0433225 和美国专利第 5,399,677 号中。

适于产生多肽的酵母菌株包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 菌株、假丝酵母 (*Candida*) 或任何能够表达所关注的多肽的酵母菌株。

如本文中所示，术语“生物反应器”是指任何用于使真核细胞培养物 (例如动物细胞培养物，例如哺乳动物细胞培养物) 生长的容器。生物反应器可具有任何大小，只要其适用于培养细胞，例如哺乳动物细胞。通常，生物反应器应为至少 30 ml 且可为至少

1、10、100、250、500、1000、2500、5000、8000、10,000、12,000 升或 12,000 升以上，或任何中间体积。通常，在培养期期间控制生物反应器的内部条件，包括（但不限于）pH 值和温度。如本文中所示，术语“产生生物反应器”是指用于产生所关注的多肽或蛋白质的最终生物反应器。大规模细胞培养物产生生物反应器的体积一般大于约 100 ml，通常为至少约 10 升，且可为 500、1000、2500、5000、8000、10,000、12,000 升或 12,000 升以上，或任何中间体积。合适的生物反应器或产生生物反应器可由任何适于将悬浮在培养基中的细胞培养物保持在本发明的培养条件下且有助于细胞生长和活力的物质组成（即由其构成），所述物质包括玻璃、塑料或金属；所述物质不应该干扰所产生的产物（例如治疗性蛋白质产物）的表达或稳定性。所属领域的技术人员应了解且能够选择适用于实践本发明的生物反应器。

如本文中所示，术语“培养基”和“细胞培养基”是指含有养育正在生长的动物细胞（例如哺乳动物细胞）的营养物的溶液，且也可指与细胞组合的培养基。术语“接种培养基”是指用于形成细胞培养物的培养基。接种培养基的组成可能与剩余细胞生长期期间所使用的培养基不同，或者也可能与剩余细胞生长期期间所使用的培养基并无不同。通常，培养基溶液提供（不限于）细胞的至少最低限度生长和/或存活所需要的必需和非必需氨基酸、维生素、能源、脂质和微量元素。溶液也可含有高于最低标准来增强生长和/或存活的组分，包括激素和生长因子。优选将溶液调配到对于细胞存活和增殖最为理想的 pH 值和盐浓度。在至少一个实施例中，培养基为成分明确培养基。成分明确培养基为所有组分都具有已知的化学结构的培养基。在本发明的其它实施例中，培养基可含有来源于此项技术中已知的任何来源或方法的氨基酸，包括（但不限于）来源于单纯氨基酸添加或来源于蛋白胨或蛋白质水解产物添加（包括动物或植物来源）的氨基酸。在本发明的其它实施例中，细胞生长期期间所使用的培养基可含有浓缩培养基，即含有较高浓度的通常为生长培养物所必需且通常提供给生长培养物的营养物的培养基。所属领域的技术人员应确认哪些细胞培养基、接种培养基等等适于培养特定细胞（例如动物细胞，例如 CHO 细胞），和培养基应含有的葡萄糖和其它营养物（例如谷氨酰胺、铁、微量 D 元素）或设计用于控制其它培养物变量（例如泡沫量、摩尔渗透压浓度）的试剂的量（参见例如 J.P.马瑟(Mather, J.P.)等人(1999)“培养基,动物细胞,大规模产生(Culture media, animal cells, large scale production),” *生物工艺技术百科全书: 发酵, 生物催化和生物分离 (Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation)*, 第 2 卷:777-85; 美国公开专利申请案第 2006/0121568 号; 这两个文献都是以全文引用的方式并入本文中)。本发明也涵盖所述已知培养基的变化形式，包括

例如所述培养基的营养物富集的变化形式。如本文中所用，术语“细胞密度”是指存在于指定体积的培养基中的细胞数目。如本文中所用，术语“活细胞密度”是指在一组指定的实验条件下存在于指定体积的培养基中的活细胞数目。

如本文中所用，术语“细胞活力”是指所培养的细胞在一组指定的培养条件或实验变化形式下存活的能力。如本文中所用，所述术语也指在特定时间存活的那部分细胞占当时培养物中的活细胞和死细胞的总数的比例。

如本文中所用，术语“总活细胞密度”、“总活细胞数目”或“IVC”是指培养过程中活细胞的平均密度乘以培养物运作的时间量。当所产生的蛋白质的量与培养过程中存在的活细胞数目成比例时，总活细胞密度为估算培养过程中所产生的蛋白质的量的有用工具。

本发明方法可适用于在分批培养、补料分批培养、灌注培养、改良的补料分批培养（参见美国临时申请案第 60/954,922 号）、分批重新补料培养或其任何组合中生长的细胞。

如本文中所用，术语“分批培养”是指一种培养细胞的方法，其中最终将用于培养细胞的所有组分（包括培养基以及细胞自身）都是在培养过程开始时提供。通常，在某一时间停止分批培养，并采集培养基中的细胞和/或组分且任选纯化。

如本文中所用，术语“补料分批培养”是指一种培养细胞的方法，其中在培养过程开始后的某一时间将额外组分提供给培养物。所提供的组分通常包含已在培养过程期间耗尽的用于细胞的营养补充物。通常，在某一时间停止补料分批培养，并采集培养基中的细胞和/或组分且任选纯化。

如本文中所用，术语“灌注培养”是指一种培养细胞的方法，其中在某一段时间内连续地或在某一段时间内间歇地将额外的新鲜培养基提供给培养物（在培养过程开始后），且同时去除失效的培养基。新鲜培养基通常提供已在培养过程期间耗尽的用于细胞的营养补充物。任选纯化可能存在于失效的培养基中的多肽产物。灌注也容许从生物反应器中生长的细胞培养物中去除细胞废弃物（冲洗）。

如本文中所用，术语“改良的补料分批培养”是指一种培养细胞的方法，其将补料分批培养方法与灌注培养方法相结合。改良的补料分批培养方法描述于美国临时申请案第 60/954,922 号中，所述申请案以全文引用的方式并入本文中。

本发明也可用分批重新补料方法来实践。据信在这一类型的细胞培养中，较低的 pH 值对于减少蛋白质错误折叠和/或聚集以及对于改良糖基化将提供良好控制。

在本发明的一个实施例中，所述方法包含首先在细胞培养物的生长期期间用接种培养基来接种细胞培养物，和随后将细胞转换到生长阶段，其中将细胞培养物的温度和/

或 pH 值调整到较低的温度和/或较低的 pH 值。如本文中所示，生长期是指使细胞生长并达到对于蛋白质产生最为理想的细胞密度的细胞培养阶段。

在另一个实施例中，在生长期后，可将细胞转换到生长阶段，所述阶段可在与生长期不同的温度和/或不同的 pH 值（例如较低的温度和/或较低的 pH 值）下延续。在实施例中，可在接种后一天，将细胞培养物从生长期转换到生长阶段。在其它实施例中，可在接种后五天，将细胞培养物从生长期转换到生长阶段。当将细胞培养物从生长期转变到生长阶段时，所述转变可为相对渐进的。或者，所述转变可为突然的。在渐进变化下，可稳定地调整（例如降低）温度和/或 pH 值。或者，可以不连续时间间隔调整温度和/或 pH 值。

细胞培养物的生长阶段是在对于所关注的多肽（例如治疗性蛋白质）的产生最为理想的条件下使细胞生长的细胞培养阶段。在生长阶段期间，可以细胞培养物保持存活、产生高水平蛋白质、代谢性废产物（例如乳酸和氨）的产生和累积降到最低程度、蛋白质的产物质量得到适当控制所处的温度和/或 pH 值，和/或从业者认为重要的这些或其它因素的任何组合为基础来选择细胞培养物的较低的温度和/或 pH 值。

在本发明的另一个实施例中，本发明的方法包含在较低的温度和/或较低的 pH 值下接种细胞培养物，从而不需要在生长阶段开始时转变温度或 pH 值。所属领域的技术人员应了解监测细胞培养物的温度和 pH 值以使得温度和 pH 值不偏离既定温度和 pH 值设定点。举例来说，所属领域的技术人员应了解使用碱（例如碳酸钠碱）来防止培养物偏离到低于设定 pH 值。

在下文实例中，细胞培养基在高于目标 pH 值设定点的 pH 值下开始且不打算对 pH 值设定点进行调节。然而，如所属领域的技术人员所理解，也可包括在细胞培养的过程中利用 pH 值调整。同样地，也可能在低温下开始培养而不进行调节。举例来说，所述方法可仅包含生长阶段。

如本文中所示，“较低的温度”是指比所述细胞类型的细胞生长的常规温度（细胞生长的典型温度）低的温度。举例来说，在细胞为哺乳动物细胞的本发明的实施例中，生长阶段的细胞培养物优选处于 24.0°C 到低于 30.0°C 的范围中，且更优选处于 27.0°C 到低于 30.0°C 的范围中。举例来说，细胞培养物的较低的温度为 24.0°C、24.5°C、25.0°C、25.5°C、26.0°C、26.5°C、27.0°C、27.5°C、28.0°C、28.5°C、29.0°C、29.5°C、29.6°C、29.7°C、29.8°C 和 29.9°C。在本文中描述的本发明的最优选实施例中，细胞培养物的较低的温度为约 29.5°C 的温度。除哺乳动物以外的细胞的较低的温度可由所属领域的技术人员根据不同情况确定。

如本文中所示，“较低的 pH 值”是指比所述特定细胞类型的细胞生长的常规 pH 值（细胞生长的典型 pH 值）低的 pH 值设定点。在细胞为哺乳动物细胞的本发明的实施例中，生长阶段的细胞培养物的较低的 pH 值低于 7.00。在本发明实施例中，细胞培养物的较低的 pH 值在 6.50 到小于 7.00 的范围中，优选在 6.80 到小于 7.00 的范围中。举例来说，细胞培养物的较低的 pH 值为 6.80、6.85、6.90、6.95、6.96、6.97、6.98 和 6.99。在本发明的最优选实施例中，细胞培养物的较低的 pH 值为约 6.95。除哺乳动物以外的细胞的较低的 pH 值可由所属领域的技术人员根据不同情况确定。

所属领域的技术人员应理解，取决于细胞培养物的细胞类型，常规温度和 pH 值（与较低的温度和 pH 值相区别）是不同的。举例来说，大多数哺乳动物细胞（例如 CHO 细胞）的常规温度和 pH 值分别高于 30.0°C（例如 37.0°C）且高于 7.00（例如 7.20）。所属领域的技术人员也应理解，因为其它细胞类型（例如昆虫细胞）的常规温度和 pH 值不同于哺乳动物细胞的常规温度，所以本发明方法对于所述细胞利用不同的较低的温度和不同的较低的 pH 值。

在本发明的某些实施例中，从业者可能发现定期监测生长的细胞培养物的特定状况为有利的或必要的。作为非限制性实例，监测例如温度、pH 值、溶解氧、细胞密度、细胞活力、总活细胞密度、乳酸盐水平、铵水平、葡萄糖水平、谷氨酰胺水平、摩尔渗透压浓度、所表达多肽的滴度等等可能为有利的或必要的。所属领域的技术人员熟知用于测量所述状况/标准的许多方法。举例来说，可使用血细胞计数器、自动细胞计数装置（例如库尔特计数器（Coulter counter），贝克曼库尔特公司（Beckman Coulter Inc.），加利福尼亚州富勒敦（Fullerton, CA））或细胞密度检查（例如赛迪斯（CEDEX）®，罗氏公司（Innovatis），宾夕法尼亚州莫尔文（Malvern, PA））来测量细胞密度。可通过用锥虫蓝（Trypan blue）将培养样本染色来测定活细胞密度。可例如使用测量细胞培养基中的关键营养物、代谢产物和气体的拜尔普 400（BioProfile 400）化学分析器（诺华生物医学公司（Nova Biomedical），马萨诸塞州沃尔瑟姆（Waltham, MA））来测量乳酸盐、铵、葡萄糖和谷氨酰胺水平以及溶解氧和 pH 值。也可使用例如血气分析器（例如拜耳瑞匹莱博（Bayer Rapidlab）248 pH 值/血气分析器（拜耳医药保健有限公司（Bayer HealthCare LLC），马萨诸塞州东沃尔波尔（East Walpole, MA））来测量溶解氧和 pH 值。也可通过例如各种类型的原位探针来测量温度、pH 值和溶解氧。可通过例如冰点渗透压计来测量细胞培养物的摩尔渗透压浓度。可使用 HPLC 来测定例如乳酸盐、铵或所表达多肽或蛋白质的水平。在本发明的一个实施例中，可通过使用例如蛋白质 A HPLC 来测定所表达多肽的水平。或者，所表达多肽或蛋白质的水平可通过标准技术来测定，例

如 SDS-PAGE 凝胶的考马斯 (Coomassie) 染色、免疫蛋白印迹 (Western blotting)、布雷德福 (Bradford) 分析、洛里 (Lowry) 分析、双缩脲分析和 UV 吸光度。监测所表达多肽或蛋白质的翻译后修饰 (例如糖基化) 可能为必要的。监测蛋白质的其它翻译后修饰 (例如磷酸化作用等等) 可能也为有利的。为了监测某些细胞培养物状况, 移出较小等分试样的培养物以进行分析可能为必要的。所属领域的技术人员应理解所述移出可能潜在地将污染引入细胞培养物中, 且应适当谨慎行事以使所述污染的风险降到最低程度。

在本发明的一个实施例中, 从业者监测在较低的细胞培养物温度和/或较低的 pH 值下的总活细胞数目。优选在较低的温度和/或较低的 pH 值下使细胞生长的总活细胞密度降低 20%, 更优选低于 20% (例如 15%)。在本发明的另一个实施例中, 从业者监测在较低的细胞培养物温度和/或较低的 pH 值下的细胞活力。优选在较低的温度和/或较低的 pH 值下使细胞生长的细胞活力降低小于 15%, 更优选小于 5%。

葡萄糖为细胞培养物的主要能量来源。细胞培养物中葡萄糖消耗量的显著偏差可指示细胞培养物条件对于细胞培养物的健康状态有消极影响。因此, 在本发明的优选实施例中, 使细胞在较低的温度和/或较低的 pH 值下生长所引起的细胞培养物的葡萄糖消耗量的变化 (例如减少) 程度最少。

谷氨酰胺为细胞培养物的另一能量来源, 且为细胞培养物中各种分子 (例如氨基酸) 的重要氮源。因此, 在本发明的优选实施例中, 使细胞在较低的温度和/或较低的 pH 值下生长所引起的细胞培养物的谷氨酰胺消耗量的变化 (例如减少) 程度最少。

在本发明的另一个实施例中, 作业人员监测细胞培养物中废产物的产生 (例如乳酸盐和氨产生)。因此, 在本发明的优选实施例中, 使细胞在较低的温度和/或 pH 值下生长所引起的乳酸盐和氨产生的变化 (例如增加) 程度最小。在本发明的一些实施例中, 使细胞在较低的温度和/或 pH 值下生长可使乳酸盐和氨产生降到最低程度。

另外, 在本发明的优选实施例中, 使细胞在较低的温度和/或 pH 值下生长所引起的累积平均生产率和产物滴度的降低程度最小。如本文中所用, 术语“滴度”是指由细胞培养物 (例如动物细胞培养物) 产生的所关注的多肽 (例如所关注的糖蛋白) 的总量除以既定量的培养基体积; 因此“滴度”是指浓度。滴度通常以每升培养基中的多肽毫克数为单位来表示。优选地, 细胞培养物所经历的细胞生产率和产物滴度的任何降低都由聚集或错误折叠的蛋白质产物的产量减少 (例如 HMWA 的产量减少) 所抵消。

如本文中所用, 术语“聚集蛋白质”是指产生非功能性的次优或不需要的蛋白质产物的蛋白质群组 (即高分子量聚集物)。术语“错误折叠的蛋白质”是指不恰当折叠的

蛋白质，通常为不再显示正常生物活性（例如正常酶活性）的蛋白质。所属领域的技术人员应了解蛋白质聚集物可包含正确折叠和/或错误折叠的蛋白质中的任一种或两种。聚集或错误折叠的蛋白质通常是在过度表达的细胞培养物（例如过度表达所关注的蛋白质（例如所关注的糖蛋白）的细胞培养物）中形成。举例来说，可由未折叠多肽链的非特异性疏水性相互作用或由折叠中间物的相互作用引起聚集。在本发明的一个实施例中，使细胞在较低的温度和/或较低的 pH 值下生长使得蛋白质错误折叠/聚集减少至少 50%，优选地使得蛋白质错误折叠/聚集减少约 60%。所属领域的技术人员应了解监测蛋白质聚集/错误折叠所需要的技术，例如疏水性相互作用 HPLC（HIC-HPLC）。

术语“高分子量聚集物”（HMWA）是指由至少两个蛋白质之间的缔合所产生的蛋白质产生中的不合需要的副产物。“高分子量聚集物”可为至少两个相同蛋白质之间的缔合和/或所关注的蛋白质与在细胞培养物中发现的其它蛋白质（例如宿主细胞蛋白质）之间的缔合。缔合可由包括（但不限于）以下的任何方法所引起：共价、非共价、二硫键和/或非还原性交联。所属领域的技术人员应理解当蛋白质在呈多聚物形式（例如二聚物形式）时具活性时，即当需要一个以上多肽链来产生蛋白质活性时，术语“高分子量聚集物”是指两个或更多所述多聚物形式之间的缔合。在本发明的一个实施例中，呈多聚物形式的活性蛋白质为受体，例如细胞因子受体（例如 sIL-13R）。在一个实施例中，使细胞在较低的温度和/或 pH 值下生长导致高分子量聚集物减少至少约 10%、优选减少约 40%、更优选减少约 50%、并且甚至更优选减少约 80%或更多，或任何中间值。所属领域的技术人员应了解监测高分子量聚集物的产生所需要的技术，例如尺寸排阻高效液相色谱法（SEC-HPLC）。

在本发明的另一个方面中，使用细胞培养物中的温度和/或 pH 值将蛋白质糖基化（例如蛋白质唾液酸化）改变到预定水平。举例来说，降低细胞培养物的 pH 值和/或温度可导致 N-和 O-连接的糖基化的减少，例如 N-聚糖唾液酸化减少。蛋白质糖基化（例如唾液酸化）的变化可影响治疗性蛋白质的稳定性、酶活性、循环寿命和免疫原性。所属领域的技术人员可监测糖基化（例如唾液酸化）的程度以确保改变温度和/或 pH 值达到所需类型和水平的蛋白质糖基化。例如正相色谱法（NPC）的色谱技术可用来监测蛋白质产物的蛋白质糖基化。

在生长阶段结束时，采集细胞且收集和纯化所关注的多肽。优选在生长阶段结束时，所关注的多肽显示较少的错误折叠和/或聚集，同时保持可接受的糖基化模式。在本发明的一个实施例中，在生产过程结束时所关注的多肽呈可溶性形式（例如所关注的多肽为可溶性受体，例如可溶性细胞因子受体）。可从条件培养基纯化所述可溶性形式的多肽。

可通过由表达细胞制备总膜部分且用例如特立顿 (TRITON)[®] X-100 (仪艾姆迪生物科学 (EMD Biosciences), 加利福尼亚圣迭哥 (San Diego, CA)) 的非离子洗涤剂萃取膜来纯化膜结合形式的多肽。可通过溶解宿主细胞 (经由机械力、帕尔高压容器 (Parr bomb)、超声波处理、洗涤剂等等), 通过离心去除细胞膜部分, 且保留上清液, 来制备胞浆蛋白或核蛋白。

可使用所属领域的技术人员已知的其它方法纯化多肽。举例来说, 可使用市售的蛋白质浓缩过滤器 (例如阿米康 (AMICON)[®] 或派立康 (PELLICON)[®] 超滤单元 (密理博 (Millipore), 马萨诸塞州比尔里卡 (Billerica, MA)) 浓缩由所揭示的方法产生的多肽。在浓缩步骤之后, 可将浓缩物施加到纯化基质上, 例如凝胶过滤介质。或者, 可使用阴离子交换树脂 (例如莫诺克 (MonoQ) 柱, 安玛西安生物科学 (Amersham Biosciences), 新泽西州皮斯卡塔韦 (Piscataway, NJ)); 所述树脂含有具有二乙氨基乙基 (DEAE) 或聚乙烯亚胺 (PEI) 侧基的基质或底物。用于纯化的基质可为丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或蛋白质纯化常用的其它类型。或者, 可将阳离子交换步骤用于纯化蛋白质。合适的阳离子交换剂包括各种包含磺丙基或羧甲基的不溶性基质 (例如斯-赛佛若斯 (S-SEPHAROSE)[®] 柱, 西格马-阿尔里奇 (Sigma-Aldrich), 密苏里州圣路易 (St. Louis, MO))。

从培养物上清液纯化多肽也可包括一个或多个在亲和性树脂上进行的柱步骤, 所述亲和性树脂例如伴刀豆凝集素 A (concanavalin A)-琼脂糖、AF-黑珀琳 (HEPARIN) 650、肝素-托跃坡 (TOYOPEARL)[®] 或汽巴蓝 (Cibacron blue) 3GA 赛佛若斯 (SEPHAROSE)[®] (托实生物科学 (Tosoh Biosciences), 加利福尼亚州旧金山 (San Francisco, CA)); 使用例如苯基醚、丁基醚或丙基醚的树脂的疏水性相互作用色谱柱; 或使用针对经标记蛋白质的抗体的免疫亲和柱。最后, 可使用一个或多个利用疏水性 HPLC 介质 (例如具有甲基或其它脂族基侧基的硅胶, 例如 Ni-NTA 柱) 的 HPLC 步骤来进一步纯化蛋白质。或者, 可以有助于纯化的形式重组表达多肽。举例来说, 可以与例如麦芽糖结合蛋白 (MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 或硫氧还蛋白 (TRX) 的蛋白融合的形式表达多肽; 表达且纯化所述融合蛋白的试剂盒可分别从新英格兰生物实验室 (New England BioLabs) (马萨诸塞州贝弗利 (Beverly, MA))、法玛西亚 (Pharmacia) (新泽西州皮斯卡塔韦 (Piscataway, NJ)) 和英杰 (Invitrogen) (加利福尼亚州卡尔斯巴德 (Carlsbad, CA)) 购得。也可用较小抗原决定基 (例如 His、myc 或 Flag 标签) 来标记蛋白质且随后使用针对所选抗原决定基的特异性抗体来进行识别或纯化。针对常见抗原决定基的抗体可以从许多商业来源获得。可使用一些或所有上述纯化步骤的各种组合或利用其它已知方法

的一些或所有上述纯化步骤来纯化由本发明方法所产生的所关注的多肽，例如治疗性蛋白质。

医药组合物

在本发明的某些实施例中，根据一种或多种本发明方法产生的蛋白质可用于制备药物。根据一种或多种本发明方法产生的蛋白质可投与个体，或可首先经调配以便通过任何可用途径递送，所述途径包括（但不限于）例如不经肠（例如静脉内）、皮内、皮下、口服、经鼻、经支气管、经眼、透皮（表面）、经粘膜、经直肠和经阴道途径。本发明的医药组合物通常包括从哺乳动物细胞系表达的经纯化蛋白质、递送剂（例如，如上所述的阳离子聚合物、肽分子转运体、表面活性剂等等）以及医药学上可接受的载剂。如本文中所示，措辞“医药学上可接受的载剂”包括不干扰活性成分的生物活性的有效性且可与医药投药相容的无毒物质，例如溶剂、分散介质、涂料、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。载剂特征将取决于投药途径。也可将补充活性化合物并入组合物中。

调配医药组合物以使其与其预定的投药途径可相容。当根据一种或多种本发明方法产生的治疗性蛋白质以口服形式投与时，医药组合物应呈片剂、胶囊、散剂、溶液或酞剂形式。当以片剂形式投与时，本发明的医药组合物可另外含有固体载剂，例如明胶或佐剂。片剂、胶囊和散剂将含有约 5%到 95%结合剂，且优选约 25%到 90%结合剂。当以液体形式投与时，可添加液体载剂，例如水、石油、来源于动物或植物的油类，例如芝麻油、花生油（考虑到在群体中会发生过敏性反应）、矿物油或大豆油或芝麻油，或合成油。医药组合物的液体形式可另外含有生理盐水溶液、右旋糖或其它糖溶液，或二醇，例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。当以液体形式投与时，医药组合物含有以重量计约 0.5%到 90%的结合剂，且优选以重量计约 1%到 50%的结合剂。

当根据一种或多种本发明方法产生的治疗性蛋白质是通过静脉内、皮肤或皮下注射投与时，治疗性蛋白质应呈无热原、不经肠可接受的水溶液形式。适当顾及 pH 值、等渗性、稳定性等，所述不经肠可接受的蛋白质溶液的制备在所属领域的技术人员的技术范围之内。用于静脉内、皮肤或皮下注射的优选医药组合物除治疗性蛋白质之外，也应含有等渗媒剂，例如氯化钠注射液、林格注射液（Ringer's injection）、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、乳酸盐林格注射液或此项技术中已知的其它媒剂。本发明的医药组合物也可含有稳定剂、防腐剂、缓冲剂、抗氧化剂或所属领域的技术人员已知的其它添加剂。

所属领域的技术人员已知包含通过一种或多种本发明方法产生的治疗性蛋白质的

医药组合物的其它配方。所属领域的技术人员也应了解根据本发明产生的蛋白质的适当的单位剂量调配物。

本申请案通篇引用的所有参考文献、专利和专利申请案的全部内容都是以引用的方式并入本文中。

实例

阐述以下实例以帮助理解本发明，但是无论如何不打算且不应该解释为限制本发明范畴。实例不包括常规方法的详细描述，例如克隆（cloning）、转染和在细胞系中过度表达蛋白质的方法的基本方面。所属领域的技术人员熟知所述方法。

实例 1

TNFR-Fc 蛋白质产生

实例 1.1: 较低的温度对于重组 CHO 细胞的细胞培养效能和对于 TNFR-Fc 融合蛋白的产物质量的影响

实例 1.1.1: 材料和方法

在 37.0°C 下，将过度表达重组糖蛋白 TNFR-Fc 的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞在相同浓度和条件下接种于四个独立的实验室规模生物反应器中。在补料分批培养物中使细胞生长一天，然后温度转变为 30.0°C、29.0°C、28.0°C 或 27.0°C。培养物的初始 pH 值设定点下限为 7.00。每天从培养物中移除细胞样本以测量细胞培养物的各种状况，例如总活细胞数目、细胞活力、残留葡萄糖概况、残留谷氨酰胺概况、乳酸盐和氨浓度、累积平均细胞生产率（ Q_p ）、产物滴度、错误折叠产物/聚集产物水平、高分子量聚集物水平、唾液酸化水平和 pH 值。

通过使用细胞密度检查（例如赛迪斯（CEDEX）®，罗氏公司（Innovatis），宾夕法尼亚州莫尔文（Malvern, PA））测量细胞密度来计算总活细胞数目（IVC）且归一化为平均采集日 IVC。通过计算所有所测试的实验条件下采集日（例如第 10 日）总活细胞密度的算术平均值来测定平均采集日 IVC。然后将所有个别 IVC 值相对于平均采集 IVC 进行调整以产生归一化值。

通过使用细胞密度检查（例如赛迪斯（CEDEX）®，罗氏公司（Innovatis），宾夕法尼亚州莫尔文（Malvern, PA））用锥虫蓝染色来测量细胞活力。另外，使用 BioProfile 化学分析器（诺华生物医学公司（Nova Biomedical），马萨诸塞州沃尔瑟姆（Waltham, MA））来测量细胞培养物中的残留葡萄糖概况和残留谷氨酰胺概况。使用 BioProfile 化学分析器（诺华生物医学公司（Nova Biomedical），马萨诸塞州沃尔瑟姆（Waltham, MA））来测量废弃物、乳酸盐和氨的浓度。

使用蛋白 A HPLC 来测量累积平均细胞生产率 (Q_p) 和产物滴度且归一化为平均采集日累积平均 Q_p 和滴度。通过计算所有所测试的实验条件下采集日 (例如第 10 日) 滴度来测定平均采集日滴度。然后将所有个别滴度值相对于平均采集日滴度进行调整以产生归一化值。通过计算所有所测试的实验条件下采集日累积平均 Q_p 来测定平均采集日累积平均 Q_p 。然后将所有个别值相对于平均采集日滴度进行调整以产生归一化值。

使用 HIC-HPLC 来测量错误折叠产物/聚集产物的水平, 且使用 SEC-HPLC 来测量高分子量聚集物的水平。通过使 2-氨基苯甲酰胺-(2-AB)-标记的蛋白质糖型经受正相色谱 (NPC) 来测量总体 N 连接的聚糖唾液酸化水平。总唾液酸化 (N 和 O 连接) 的量是定义为相对于参考物质 (即具有已知且优选唾液酸化模式的 TNFR-Fc 等分试样) 的总唾液酸化的量的百分率。通过经由血液气体分析器 (Bayer Rapidlab 248 pH 值/血液气体分析器 (拜耳医药保健有限公司 (Bayer Healthcare LLC), 马萨诸塞州东沃尔波尔 (East Walpole, MA)) 离线测量来测定细胞培养物的 pH 值。

实例 1.1.2: 结果

在较低的温度下使细胞生长对 IVC 数目具有最低限度的影响。具体地说, 较低的操作温度产生较低的最终 IVC 数目; 然而, 将细胞培养物温度降低到 27°C 所产生的影响较小, 观察到 IVC 数目仅减少约 20% (图 1A)。细胞活力并未明显受到温度降低影响; 最低温度条件 (即 27°C) 具有低 5% 的采集日活力 (图 1B)。

另外, 较低的操作温度导致较高的残留葡萄糖概况, 其指示细胞培养物的葡萄糖消耗量较低 (图 2A); 然而, 谷氨酰胺概况没有因温度降低而显著变化 (图 2B)。

在一些情况下, 在细胞培养后期, 细胞培养物也可消耗乳酸和氨。乳酸和氨产生的停止或乳酸和氨的消耗促进细胞活力、细胞生产率, 且可具有增加多肽产物滴度的影响。在较低的温度下使细胞生长具有在补料分批培养的后半段改变乳酸盐的净消耗量的影响 (图 3A)。较低的温度也导致较高的氨产量 (图 3B)。较低的温度导致较低的细胞比生产率 (较低 Q_p) (图 4A) 和较低的产物滴度 (图 4B)。较低的产物滴度是由较低的细胞比生产率和较低的总活细胞数目所引起。然而, 较低的产物滴度和细胞生产率由显著降低比例的错误折叠产物和聚集产物所抵消 (图 5A)。此外, 降低细胞培养物的温度会显著地减小细胞培养物中的高分子量聚集物的比例 (图 5B)。因此, 降低温度导致 TNFR-Fc 蛋白质产物改良。

这一温度降低可引起总产物唾液酸化 (N 和 O 连接的唾液酸化) 减少 (图 6A)。事实上, 在降低细胞培养物温度与降低唾液酸化 N 连接聚糖的比例之间存在直接的关系 (图 6B), 这表明必须选择生产温度以平衡减少 HMWA 和蛋白质错误折叠的有利影响与

减少糖基化的不利影响。举例来说，使细胞在 29.5°C 的较低温度下生长会显著地降低错误折叠和聚集 TNFR-Fc 的浓度，同时对于 TNFR-Fc 糖基化具有最低程度的影响。

在不同温度下生长的细胞培养物之间的乳酸盐净消耗量的差异导致在收获时细胞培养物的 pH 值存在差异（图 7）。这是因为，由于从环境中去除了酸，较大的乳酸盐（乳酸）净消耗量导致培养物 pH 值的较大升高。

实例 1.2: 较低的 pH 值对重组 CHO 细胞的细胞培养效能和对 TNFR-Fc 融合蛋白的产物质量的影响

实例 1.2.1: 材料和方法

在 37.0°C 下且在 pH 值设定点 7.20、7.10、7.00、6.90 或 6.80 下，以相同浓度接种过度表达重组糖蛋白 TNFR-Fc 的 CHO 细胞。利用添加碳酸钠碱来防止培养物偏离到低于设定点 pH 值。所使用的 pH 值对照均不超过设定点 pH 值。在第 1 日（接种后一天，即实验开始后一天），生物反应器的温度转变为 30.0°C。如实例 1.1.1 中所描述，测量细胞培养物的各种条件。

实例 1.2.2: 结果

在与 pH 7.00 偏离 0.2 个 pH 值单位的 pH 值设定点下使细胞生长会导致 IVC 稍微减少；具体地说，在 pH 6.80 下使细胞生长导致与在 pH 7.00 下生长的细胞相比 IVC 减少约 15%（图 8A）。另外，在 pH 7.20 下使细胞生长会导致较低的细胞活力（图 8B）。

另外，较低的操作 pH 值设定点会导致较低的葡萄糖消耗量（图 9A）。谷氨酰胺概况没有因在 6.80 到 7.10 的 pH 值设定点下使细胞生长而显著地变化（图 9B）。

毫不意外地，较高的操作 pH 值设定点会导致较高的乳酸盐产量（图 10A）。在 pH 值设定点 6.80 下，在补料分批的后半段并未发生乳酸盐的净消耗。较低的操作 pH 值设定点导致较高的氨产量（图 10B）。

在实验的后半段乳酸盐的净消耗量的差异导致培养物的 pH 值偏离操作 pH 值设定点，这是因为仅使用碱添加而非酸添加来保持 pH 值（图 11A）。由于 pH 值设定点、乳酸盐概况和滴定剂添加存在差异，所以在各 pH 条件之间，摩尔渗透压浓度也有所不同（图 11B）。

在与 pH 7.00 偏离 0.2 个 pH 值单位的 pH 值设定点下操作培养物导致细胞比生产率（即 Qp）稍微降低（图 12A）。利用 pH 值设定点 6.80 或 7.20 导致较低的产物滴度，这是因为细胞比生产率降低且总活细胞数目也降低（图 12B）。

然而，较低的操作 pH 值设定点会导致产物错误折叠和聚集减少（图 13A）。另外，在较低 pH 值设定点下观察到高分子量聚集物的比例显著减小（图 13B）。

较低的操作 pH 值设定点导致较低的总唾液酸化（N 和 O 连接的聚糖）（图 14A）以及较低比例的 N 连接聚糖唾液酸化（图 14B）。因为总唾液酸化（N 和 O 连接）的量是定义为相对于参考物质的总唾液酸化的量的百分率，所以任何低于 100% 的值都表示总唾液酸化减少且超过 100% 的值都表示总唾液酸化增加。糖基化模式可描述糖蛋白的聚糖概况（图 15）。在较低的 pH 值下使细胞生长导致总糖基化概况显著变化（图 16）。虽然在较低的 pH 值下未检测到新的糖型，但是存在的糖型比率显著变化；在较低的 pH 值下使细胞生长导致复合二唾液酸化和单唾液酸化糖型减少。由于较低的 pH 值对于蛋白质糖基化的潜在不利影响，因此必须以使得对于蛋白糖基化的有害影响与减少错误折叠和/或聚集蛋白质的有利影响达到平衡的方式来选择细胞培养物的 pH 值。举例来说，在较低的 pH 值 6.95 下使细胞生长已显著地降低错误折叠和聚集 TNFR-Fc 蛋白质的比例，同时对于 TNFR-Fc 的糖基化具有最低程度的影响。

实例 1.3: 讨论

这些研究显示在 27.0°C 到 30.0°C 的温度范围内或在 6.80 到 7.20 的 pH 值设定点范围内，细胞培养物的细胞生长和比生产率可受到显著影响。然而，虽然温度仅改变 1-2°C 且 pH 值设定点仅改变 0.1-0.2 并未显著地影响细胞生长和比生产率，但是可在蛋白质折叠和蛋白质聚集方面观察到显著（有利）差异。因此，未显著影响细胞生长、活力或生产率的细胞培养条件的较小差异可能显著地改变产物质量，例如减少蛋白质折叠和蛋白质聚集或影响糖基化。

实例 2

温度对于 sIL-13R 产量的影响和新的产生 sIL-13R 的细胞系的评估

实例 2.1: 材料和方法

在 Applikon 生物反应器中，将过度表达重组糖蛋白 sIL-13R 的经稳定转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞以 3×10^5 个细胞/毫升接种于具有消泡剂 (Antifoam; 道康宁公司 (Dow Corning Corporation), 密歇根州米德兰 (Midland, MI)) 的接种培养基中。必要时，添加额外消泡剂。降浓缩营养物培养基用作补料培养基。pH 值设定点下限为 6.80。dO₂ 设定点为 23%，其利用 7% CO₂/93% 空气喷射气体，同时搅动为 200 rpm。在第 5 日，使生物反应器的温度从 37.0°C 进行转变。生长阶段温度为 37.0°C、33.0°C、32.0°C、28.0°C 或室温 (RT; 约 24.0°C)。实验条件的补料时程概述于表 1 中。补料体积以生物反应器中培养物体积的百分率形式列出。在约 6×10^6 个细胞/毫升下进行细胞培养物的温度转变。

表 1. 生物反应器补料时程

实验条件:	37.0°C	33.0°C	32.0°C	31.0°C	29.0°C	RT
日						
3	10.2%	10.2%	10.2%	10.2%	10.2%	10.2%
5	5%	5%	5%	5%	5%	5%
6	5%					
7	10.2%	5%	5%	5%	5%	5%
9	10.2%	5%	5%	5%	5%	5%
11	5%	5%	5%	5%	5%	5%
13	5%		5%	5%	5%	5%
16			5%	5%	5%	5%

实例 2.2.结果

与较高温度(约 8×10^6 个细胞/毫升)下相比,在 RT(约 6×10^6 个细胞/毫升)和 29.0°C (约 7×10^6 个细胞/毫升)下,在温度转变之后所获得的活细胞密度略低(图 17A)。同样地,与较高温度(约 8 到 9×10^6 个细胞/毫升)下相比,在 RT(约 6.5×10^6 个细胞/毫升)和 29.0°C (约 7.5×10^6 个细胞/毫升)下,在温度转变之后所获得的总细胞密度略低(图 17B)。在较低温度下,在整个补料分批过程中较好地保持活力(图 17C)。活力的下降速率随温度而变化;RT 和 29.0°C 培养物的活力概况显著高于 31.0°C 、 32.0°C 、 33.0°C 和 37.0°C 下的剩余培养物(图 17C)。

在 18 天补料分批培养结束时,由 31.0°C 培养物实现最高滴度(组合 sIL-13R 二聚物和 HMWA 滴度),其后为 32.0°C 培养物(188 mg/L)、 29.0°C 培养物(178 mg/L)和 33.0°C 培养物(151 mg/L)(图 18)。RT 和 37.0°C 培养物具有显著较低的滴度。在 RT 和 37.0°C 下,产生 sIL-13R 的细胞系的细胞比生产率或每日比 sIL-13R 生产率(Q_p)显著降低(图 19A)。另外,在 37.0°C 和 RT 下,累积平均比生产率或累积平均 Q_p 也较低(图 19B)。有趣的是,沿 37.0°C 、 33.0°C 、 32.0°C 和 31.0°C 培养物的引述顺序所发现的比生产率的较大增加与培养物活力的显著减小相对应(数据未展示)。

比葡萄糖消耗量(Q_{glc})随着温度降低而减少(图 20)。比谷氨酰胺消耗量(Q_{gln})也似乎随着温度降低而减少(图 21)。然而,应注意关于比谷氨酰胺消耗量的数据并未顾及培养基中的谷氨酰胺降解,所述降解在较大程度上会随着温度增加而发生。因此,温度对于比谷氨酰胺消耗量的影响可能有偏差。RT、 29.0°C 、 31.0°C 和 32.0°C 培养物的乳酸盐浓度概况为相似的,且乳酸盐浓度在温度转变之日或其前后到达最高点,随后在第 18 日降低到 0.7 与 2.0 g/L 之间(图 22)。对于 33.0°C 和 37.0°C 培养物来说,生长期期间的乳酸盐概况与其它培养物类似,但在生长阶段期间存在显著不同。对于 33.0°C 培养物来说,乳酸盐浓度在温度转变之后并未降低,且实际上保持基本上恒定。对于 37.0°C

培养物来说，乳酸盐在补料分批的整个持续时间内增加。

在生长阶段期间，氨浓度根据温度而变化（图 23）。对于 29.0°C 培养物来说，氨浓度在温度转变之日或其前后到达最高点，在补料分批的中间阶段期间降低，且随后在补料分批的后期期间增加。随着温度增加到超过 29.0°C，在补料分批的后期氨浓度的增加更大且更早发生。对于 37.0°C 培养物来说，氨浓度在整个补料分批过程中增加。对于 RT 培养物来说，氨水平在温度转变后保持大致恒定。

通过批料结合蛋白 A 洗出液的尺寸排阻色谱法（SEC）来分析来自这些生物反应器运作的条件培养基样本的高分子量聚集物（HMWA）。根据细胞系的结果显而易见的趋势为，存在于条件培养基中的 HMWA 的百分率随着温度增加而相对增大（图 24 和图 25）。因此，在较低温度下操作细胞培养物导致 sIL-13R 产物聚集减少。

sIL-13R 二聚物的百分率减小可能导致 HMWA 的百分率增大。（图 26A 和 26B）。与其它培养物相比，RT 培养物具有较低的 HMWA%（图 26B），以及较高百分率的二聚物形成（图 26A）。RT 培养物和 31.0°C 培养物获得相似的净二聚物滴度，而 29.0°C 培养物获得最高的净二聚物滴度（图 27）。

为了证实来自 SEC 分析的结论，使用西方印迹法来分析条件培养基样本。检查以 HMWA 物质形式存在的 sIL-13R 的量相较于二聚物的定性差异。西方印迹法显示存在于条件培养基中的 HMWA 聚集物的量相较于所存在的二聚物的量随温度增加而增大的趋势（数据未展示）。

这些实验证实活力和活细胞密度、比生产率和 HMWA 形成的温度依赖性变量对于 sIL-13R 二聚物的体积生产率的重要性。虽然 31.0°C 培养物达到最高滴度（测量数据包括 HMWA 和二聚物），但当仅依据二聚物测量时，较低温度（例如 29.0°C）下的培养物可获得可相当或改良的体积生产率。

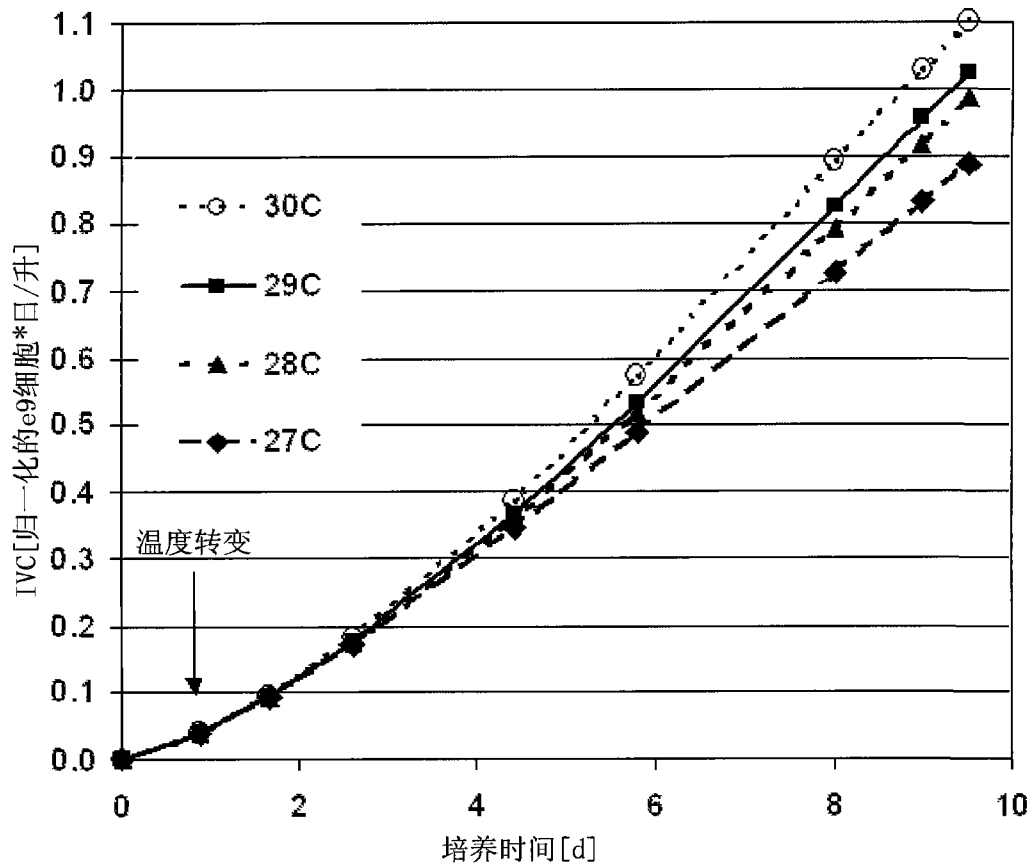


图1A

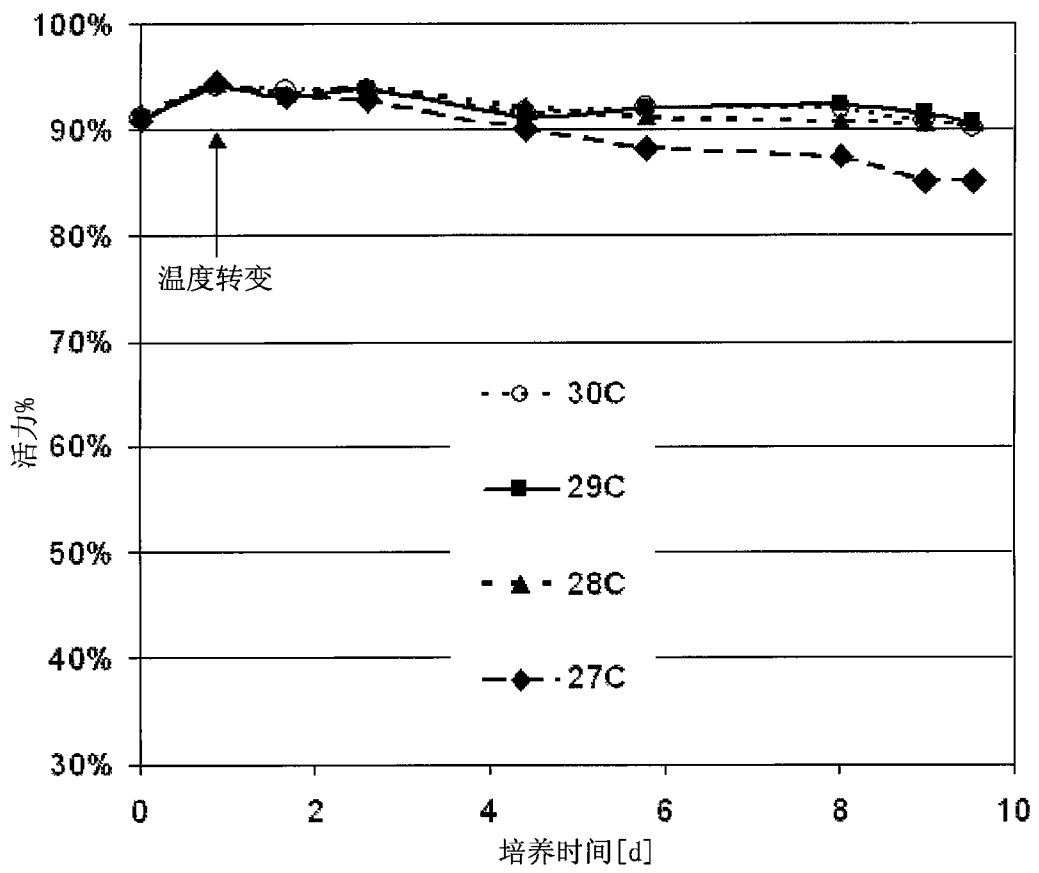


图1B

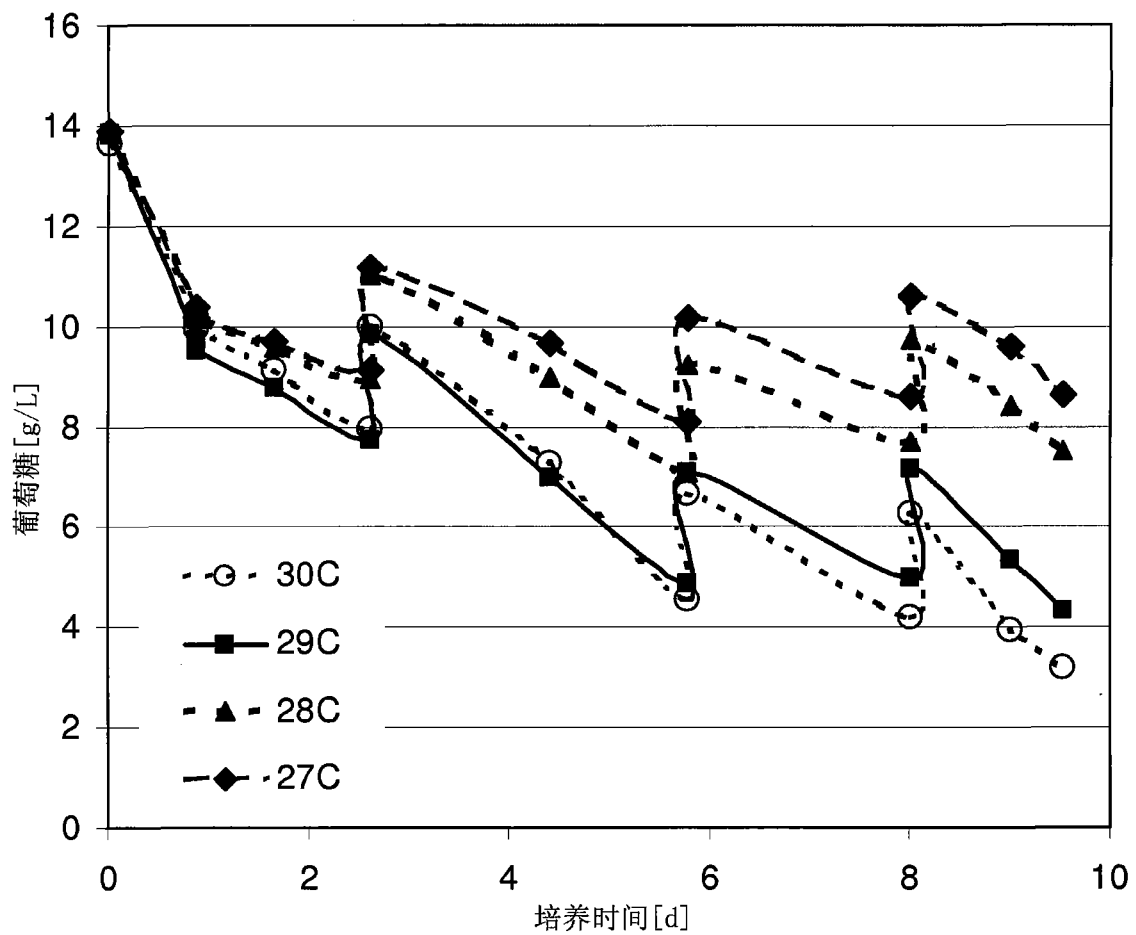


图2A

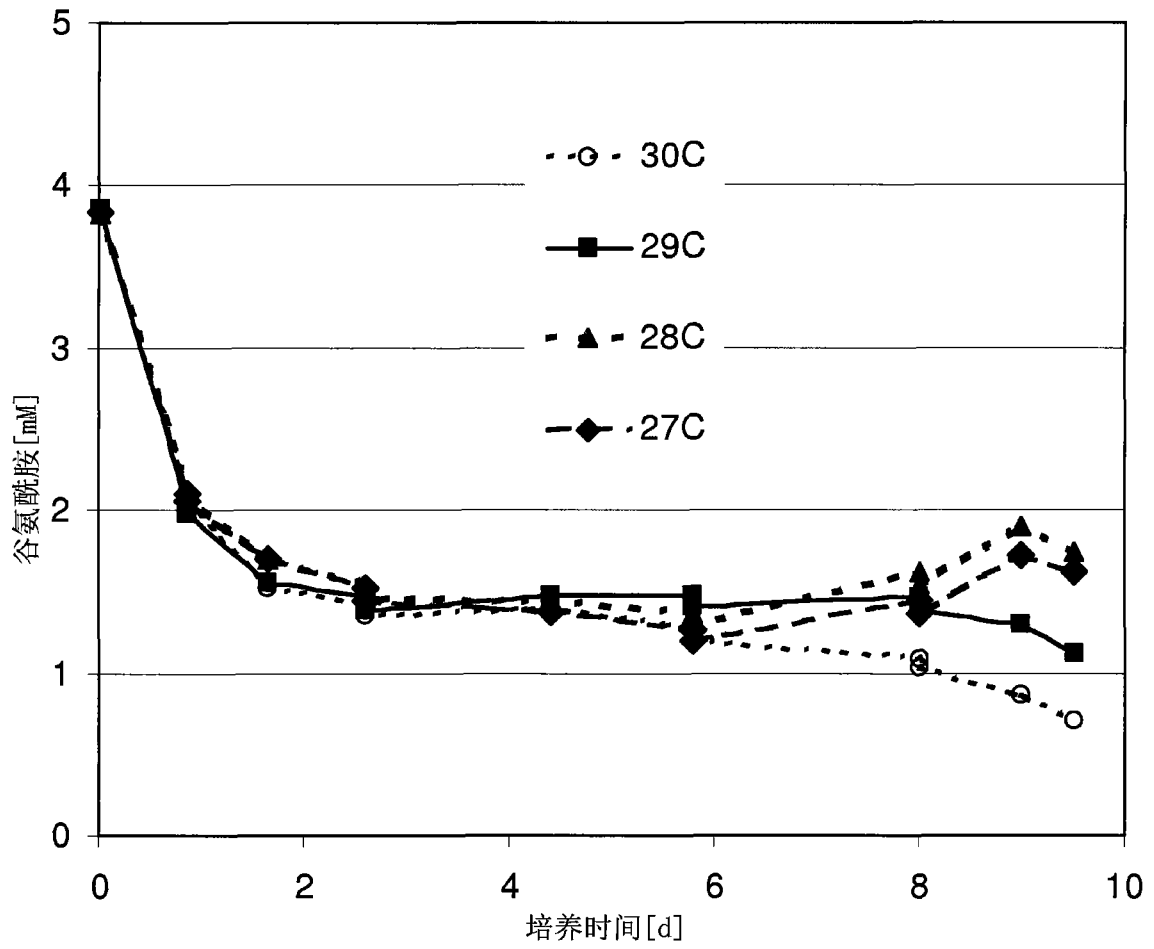


图2B

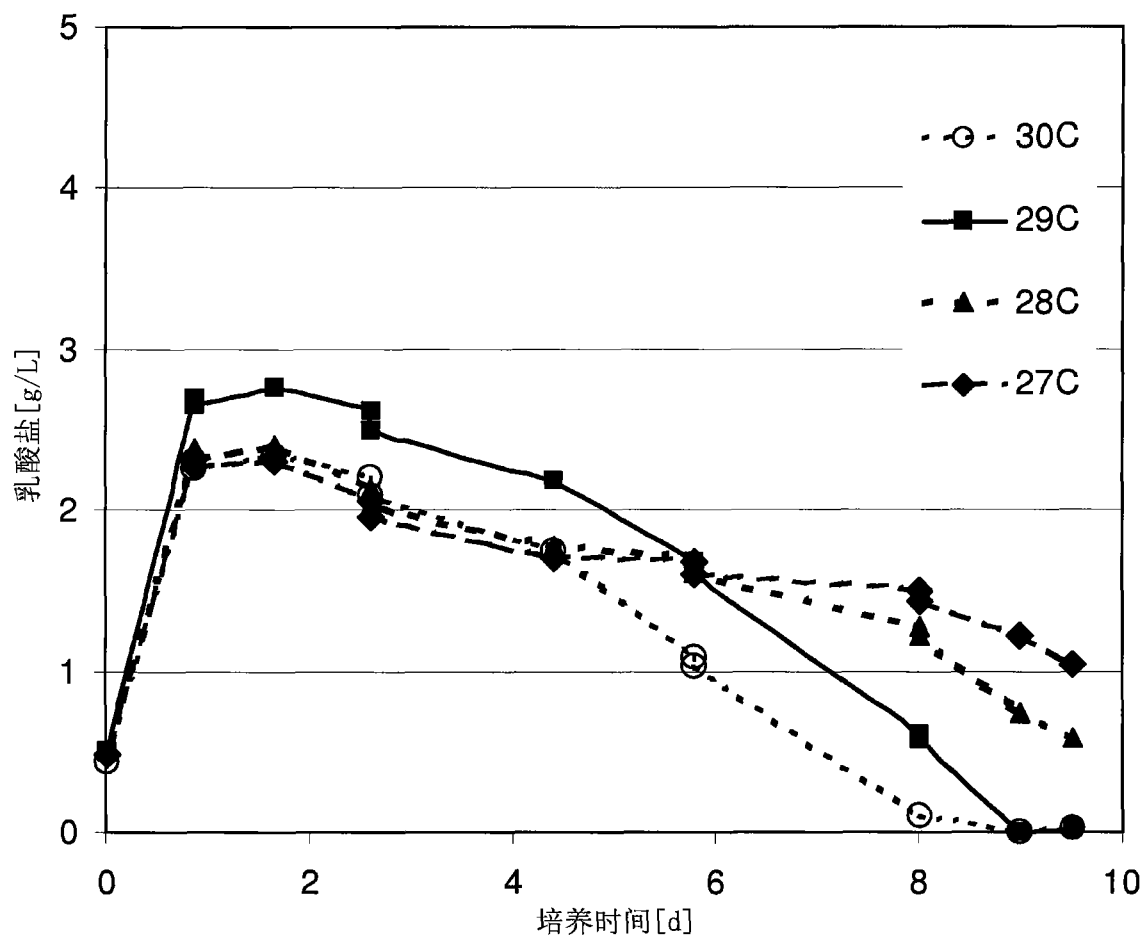


图3A

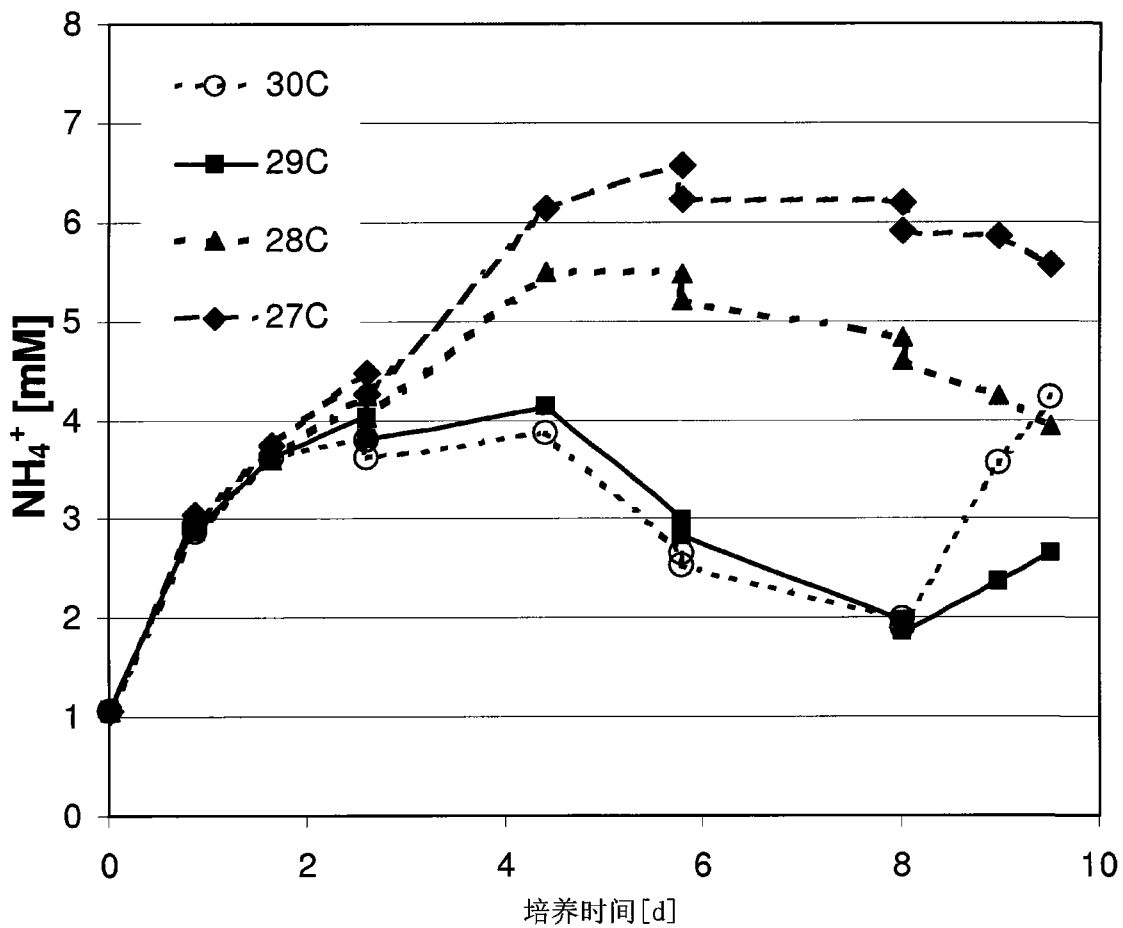


图3B

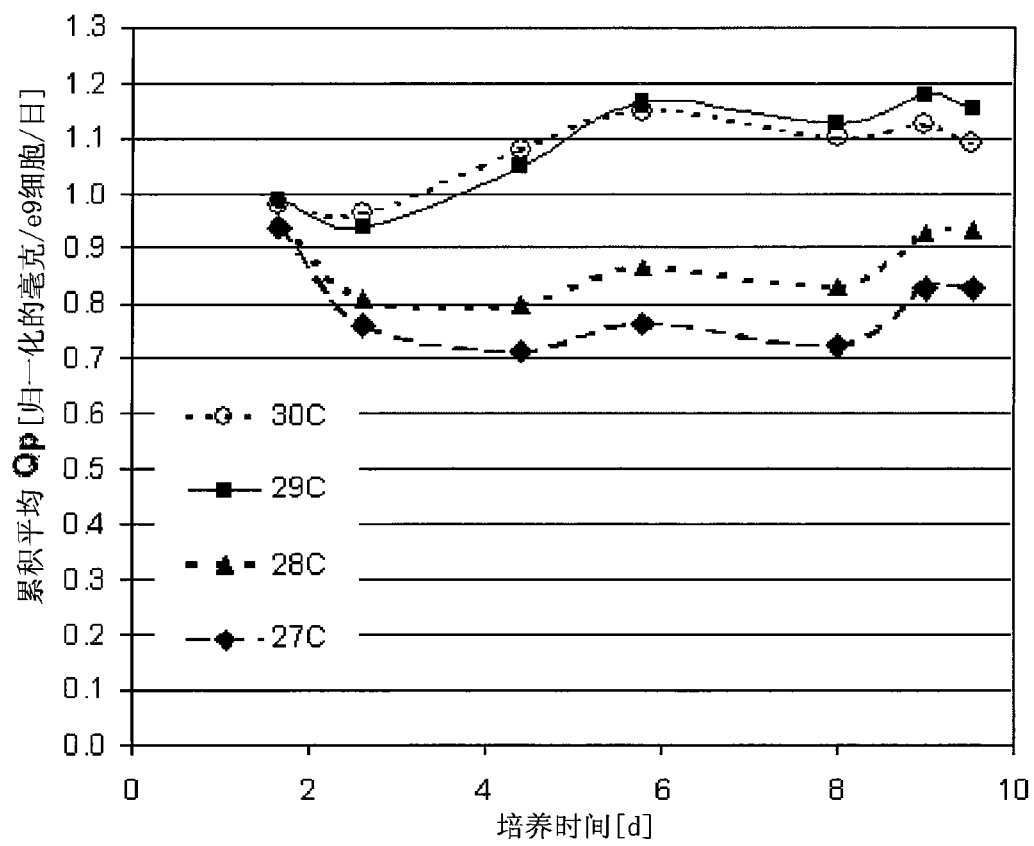


图4A

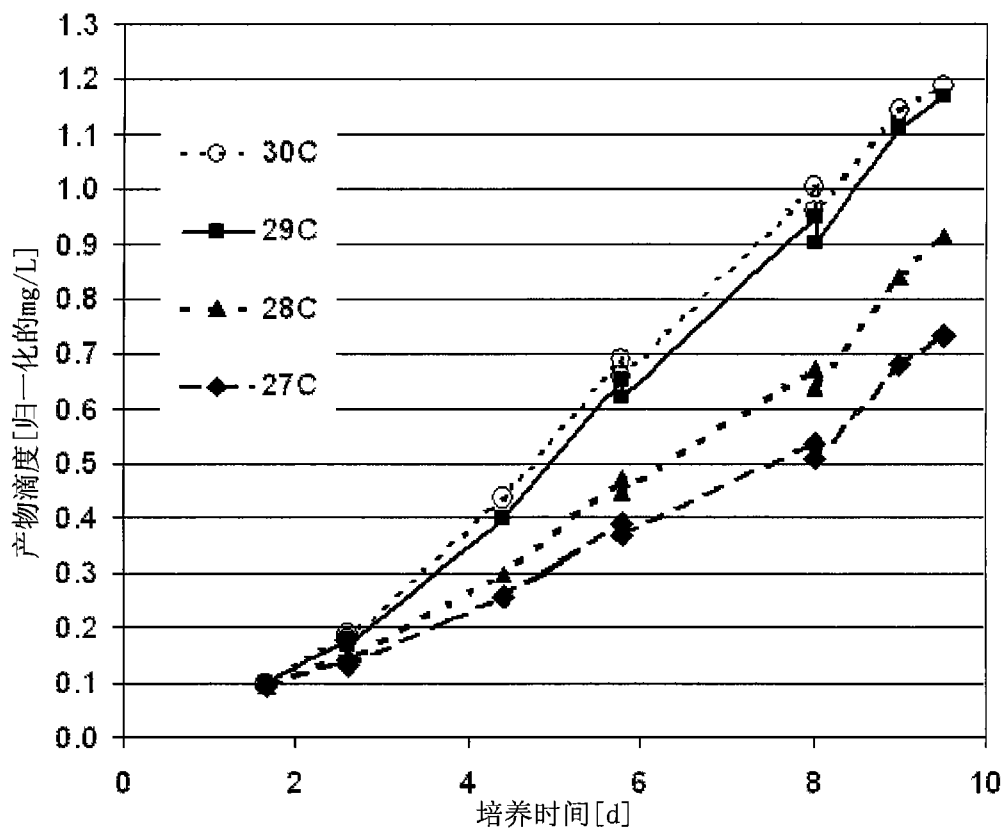


图4B

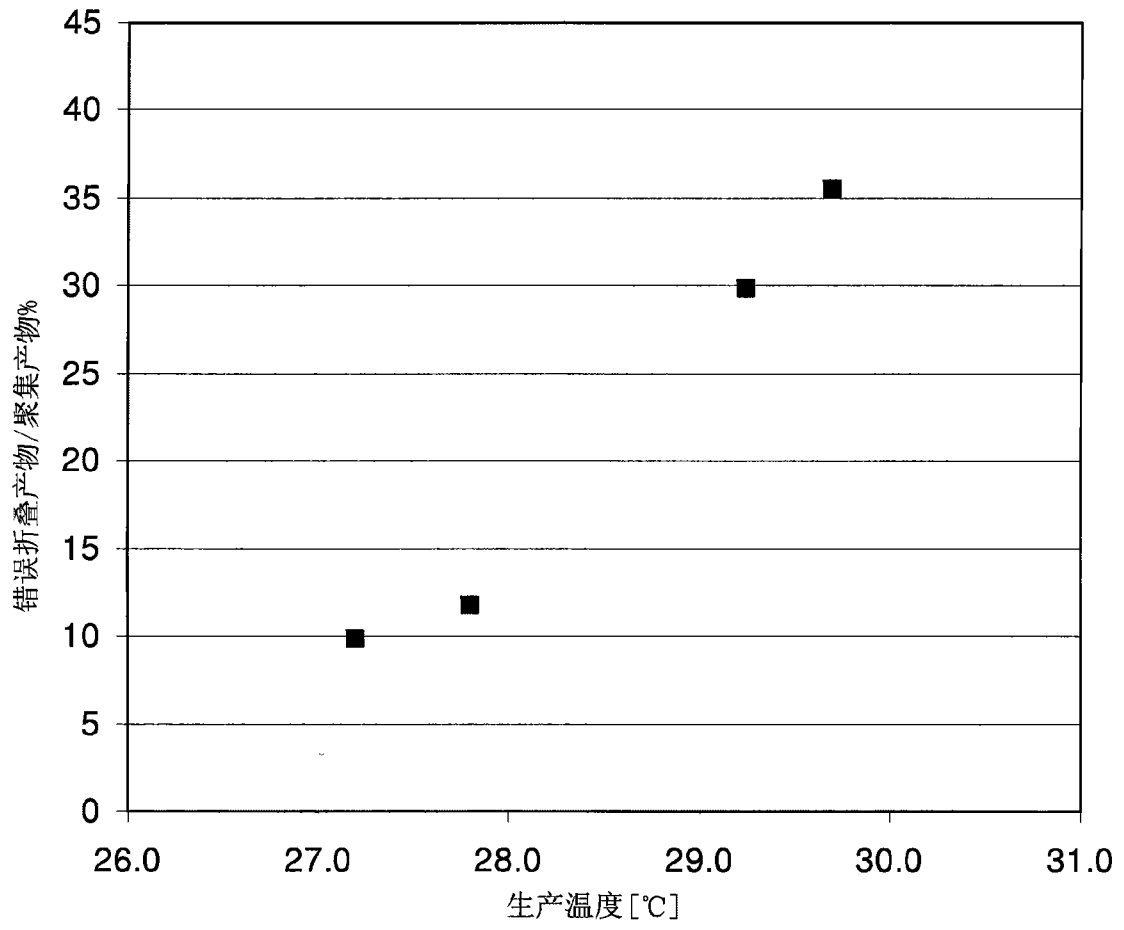


图5A

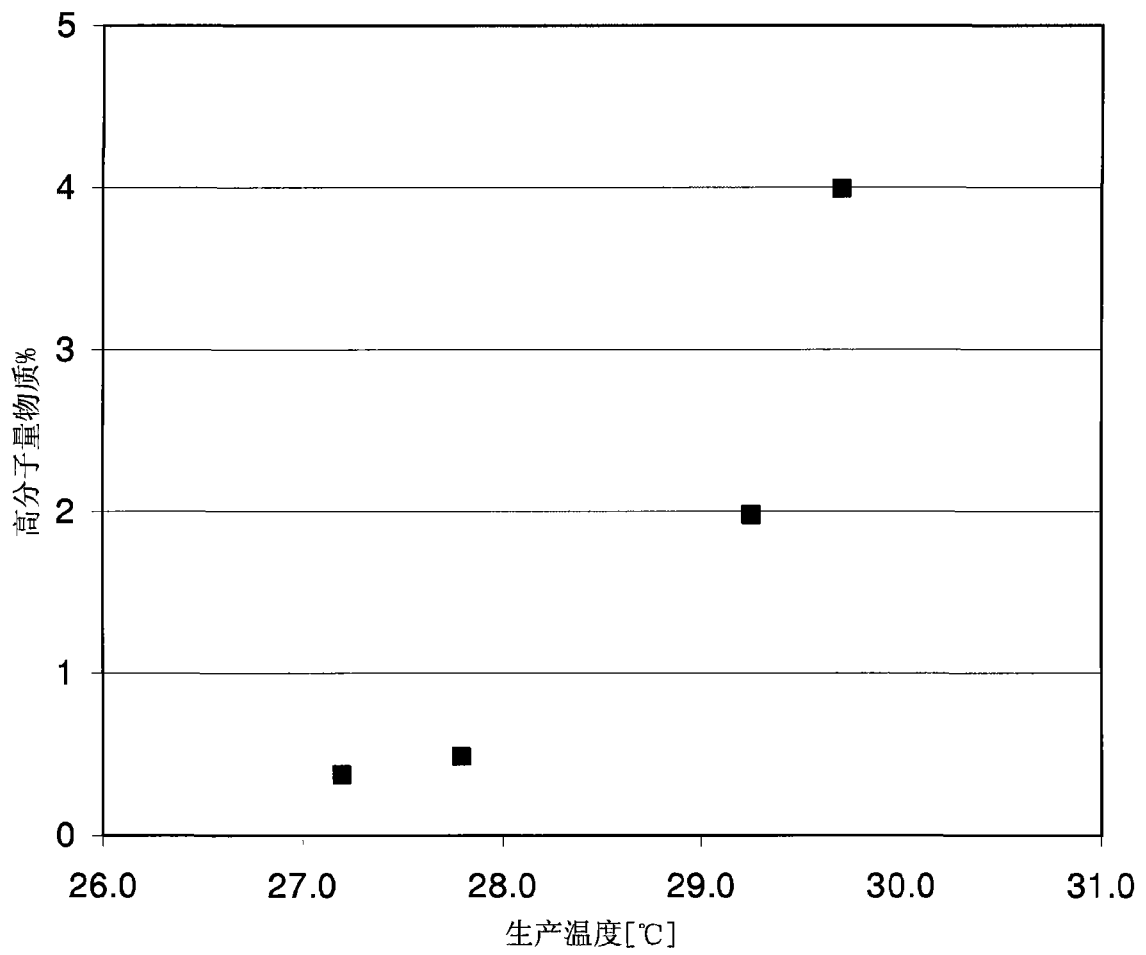


图5B

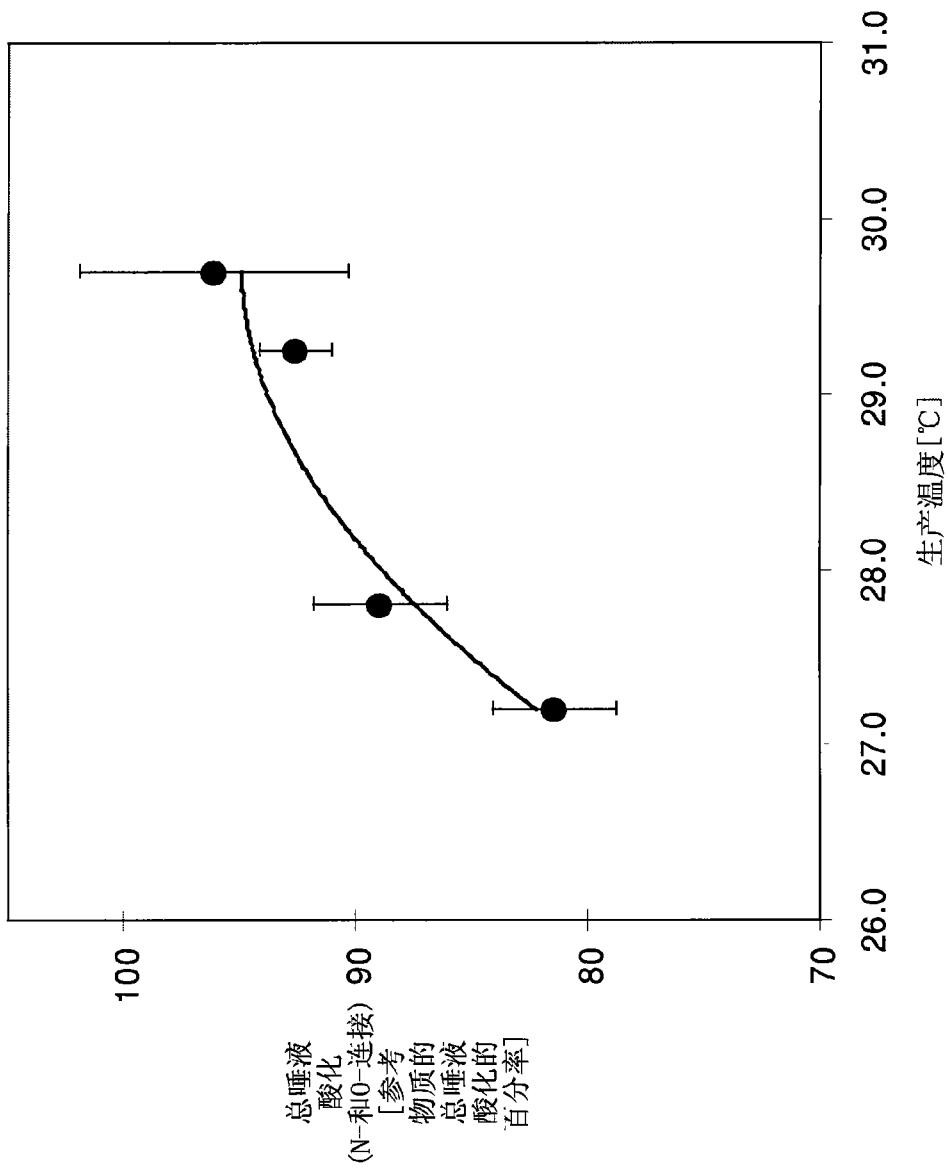


图6A

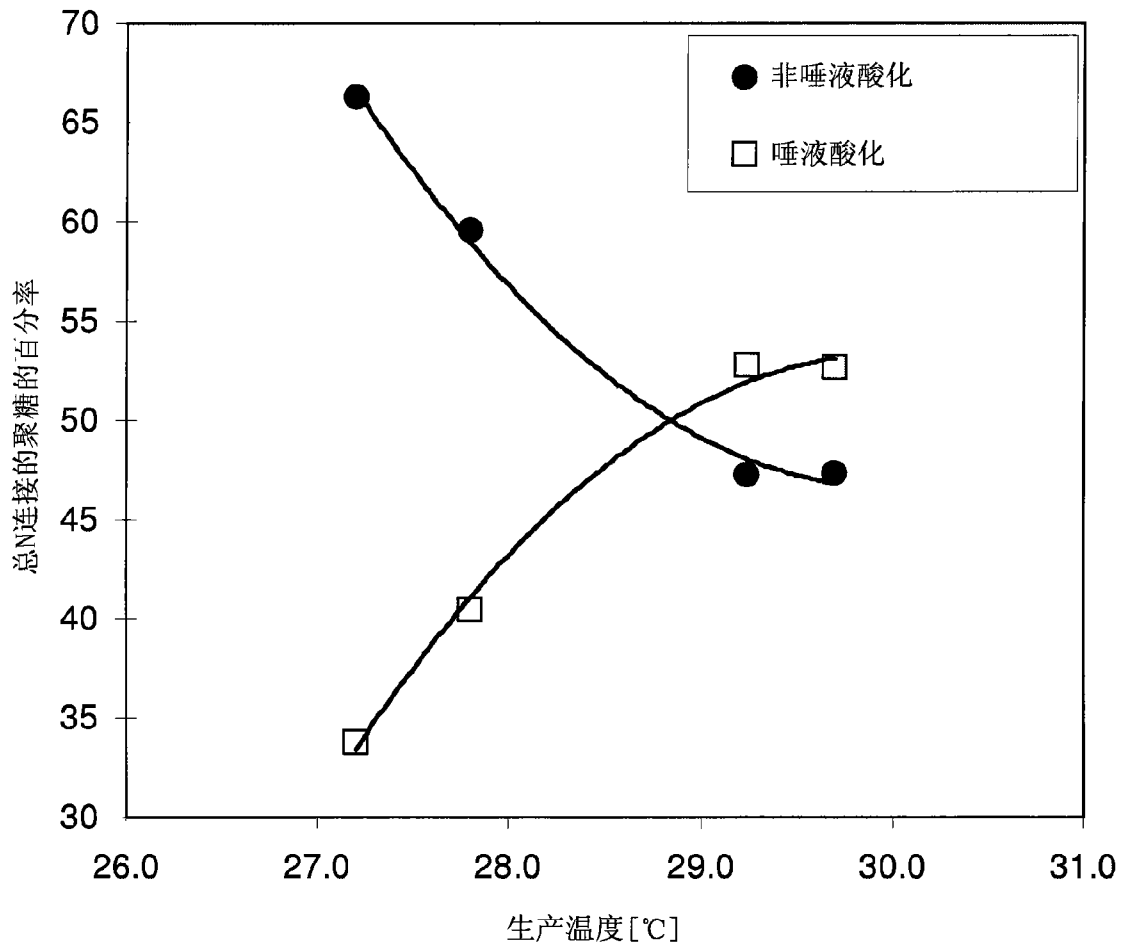


图6B

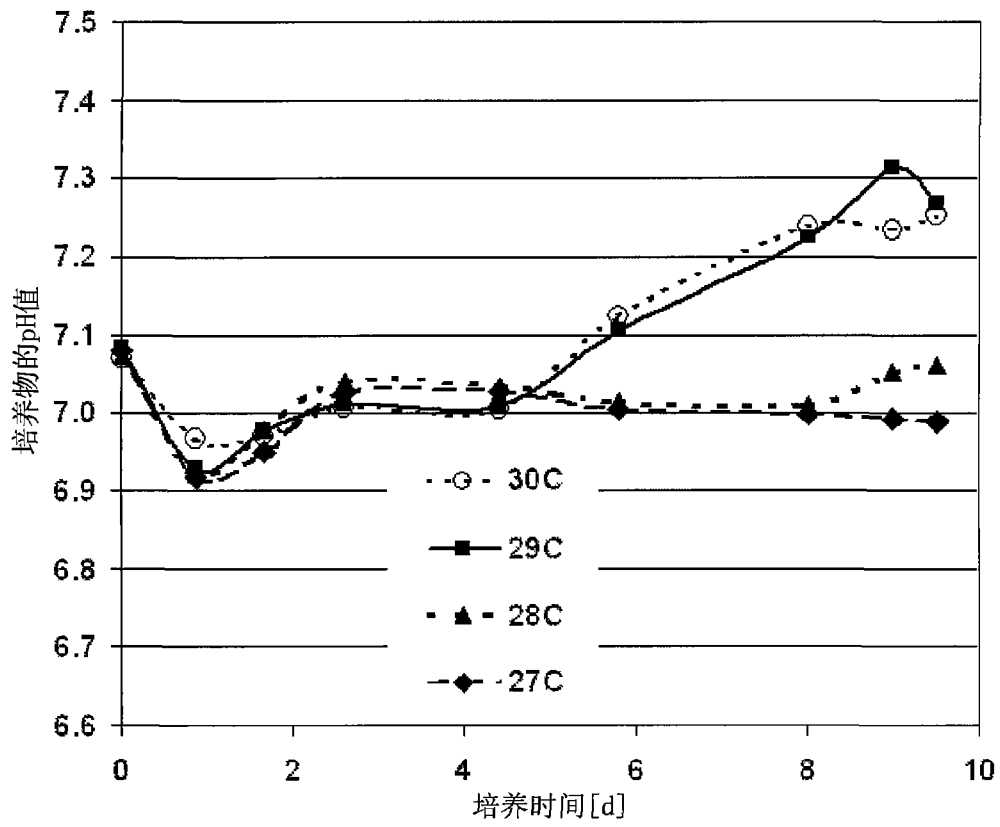


图7

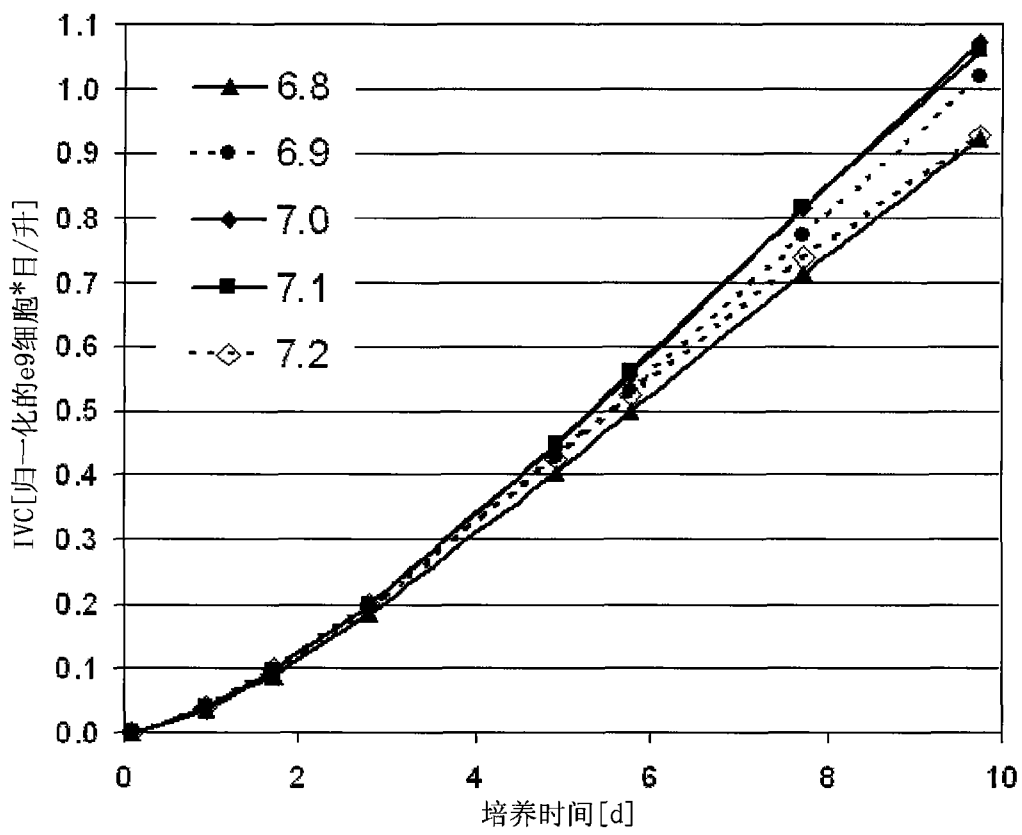


图8A

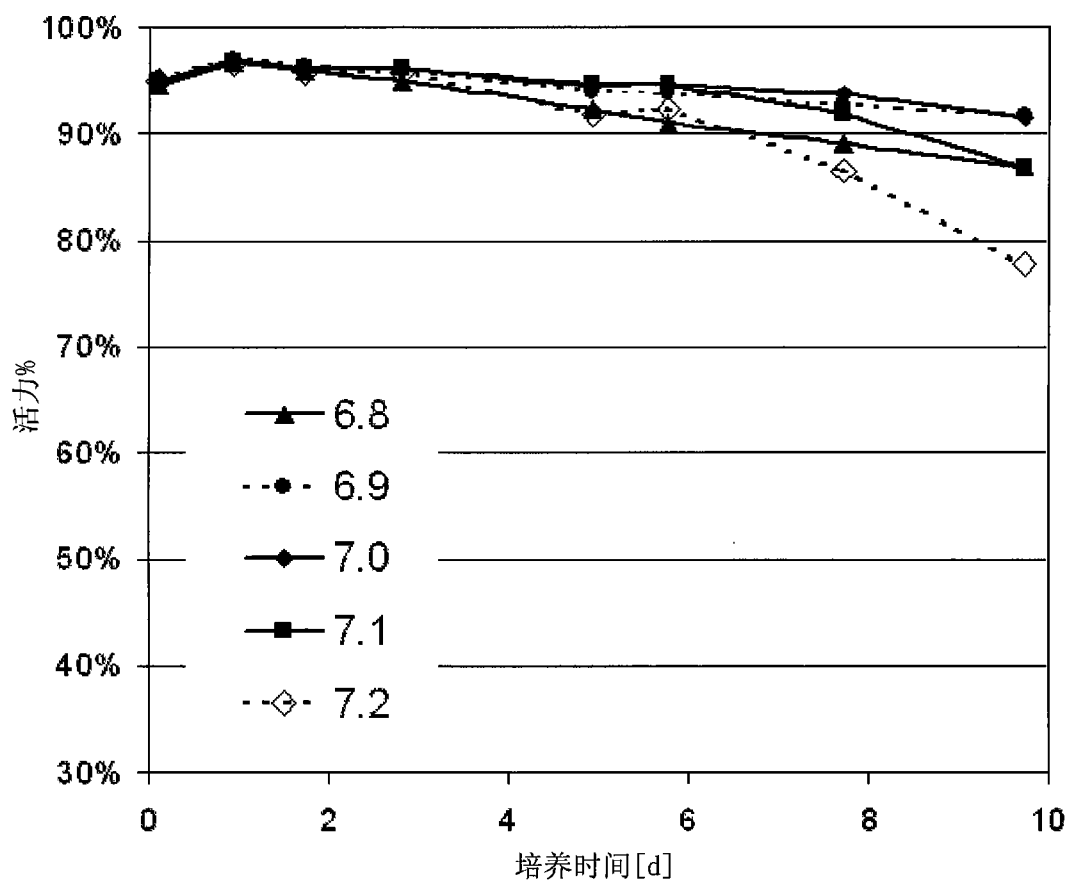


图8B

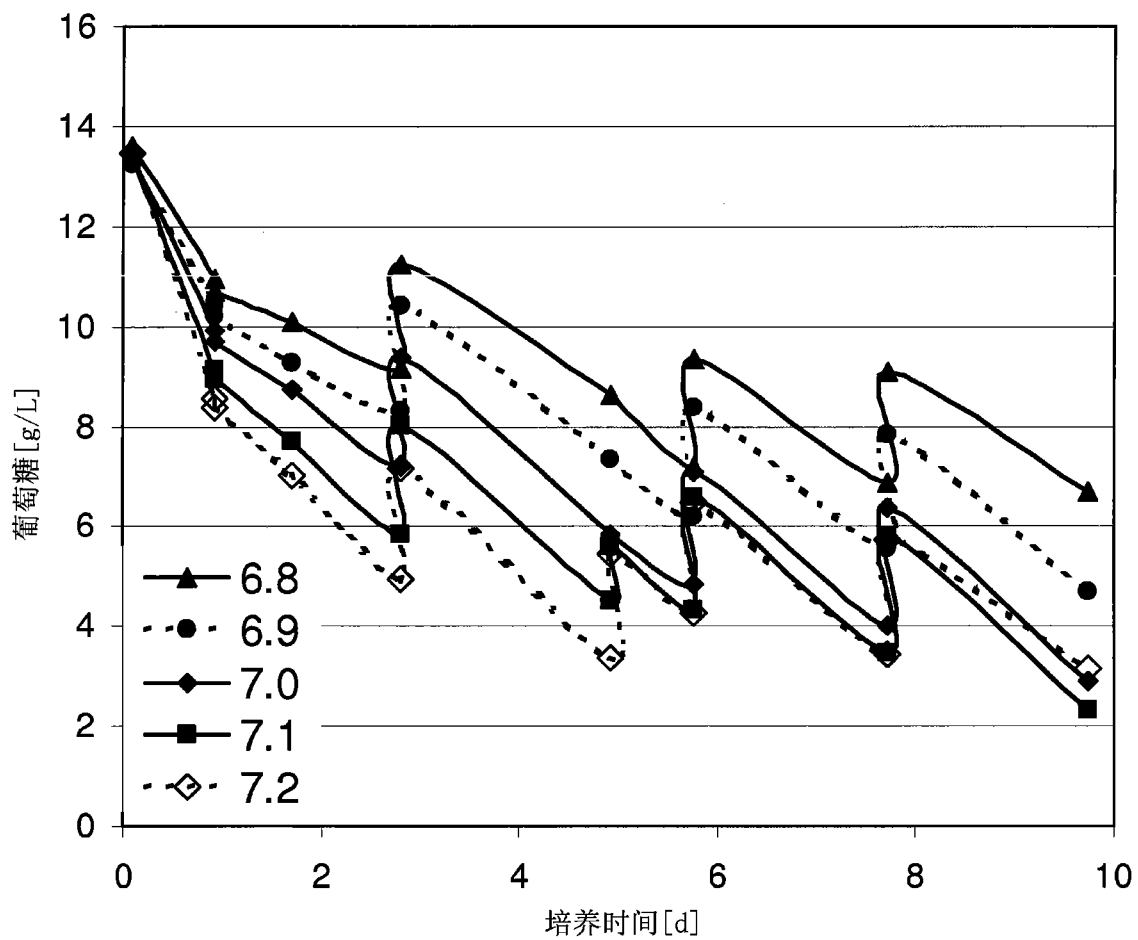


图9A

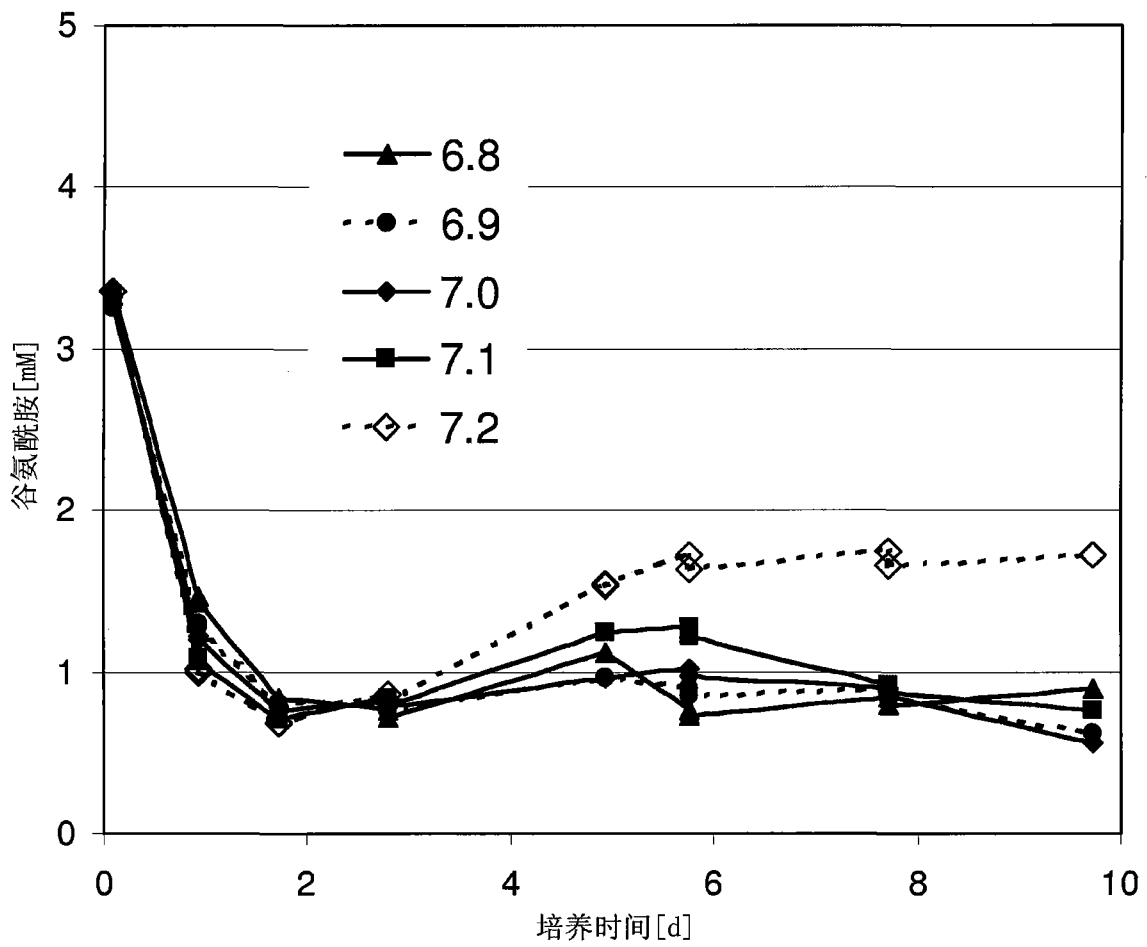


图9B

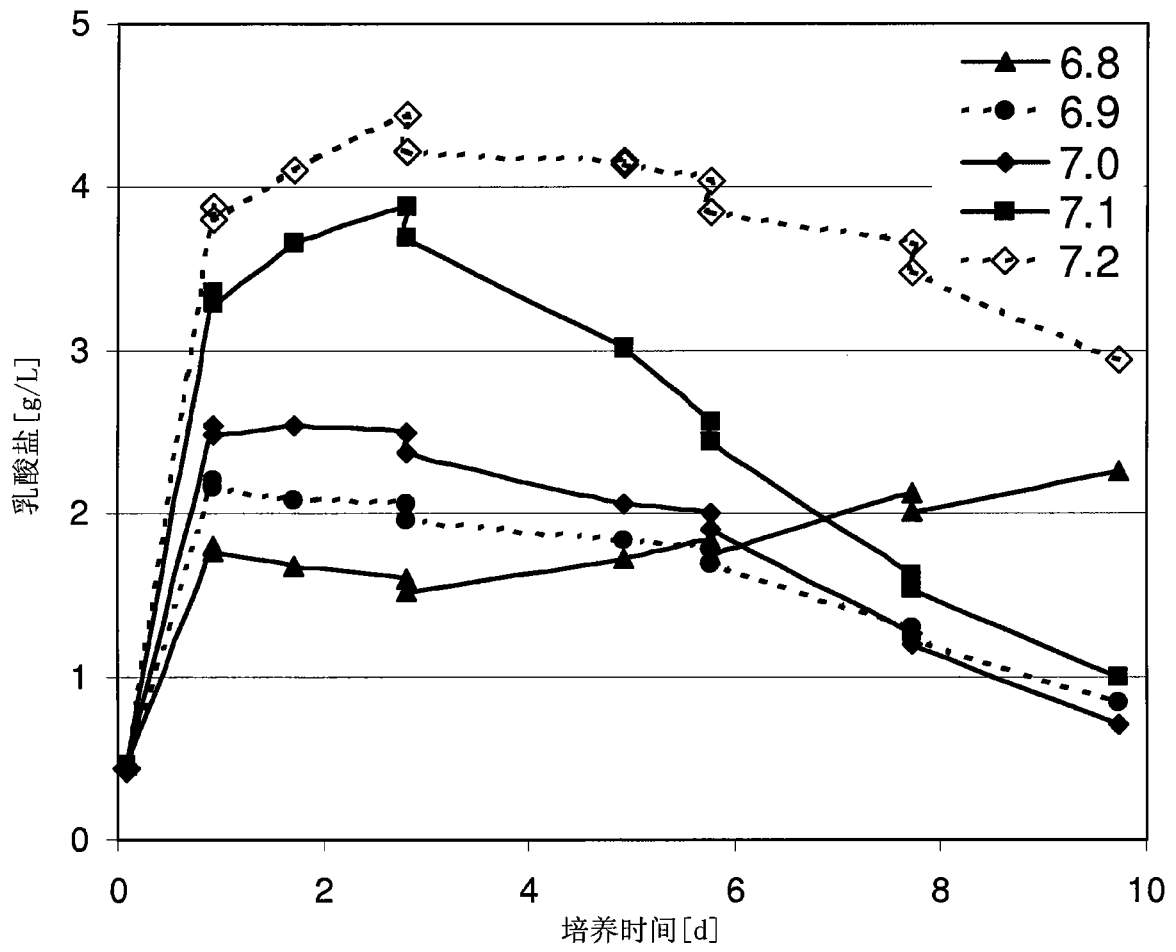


图10A

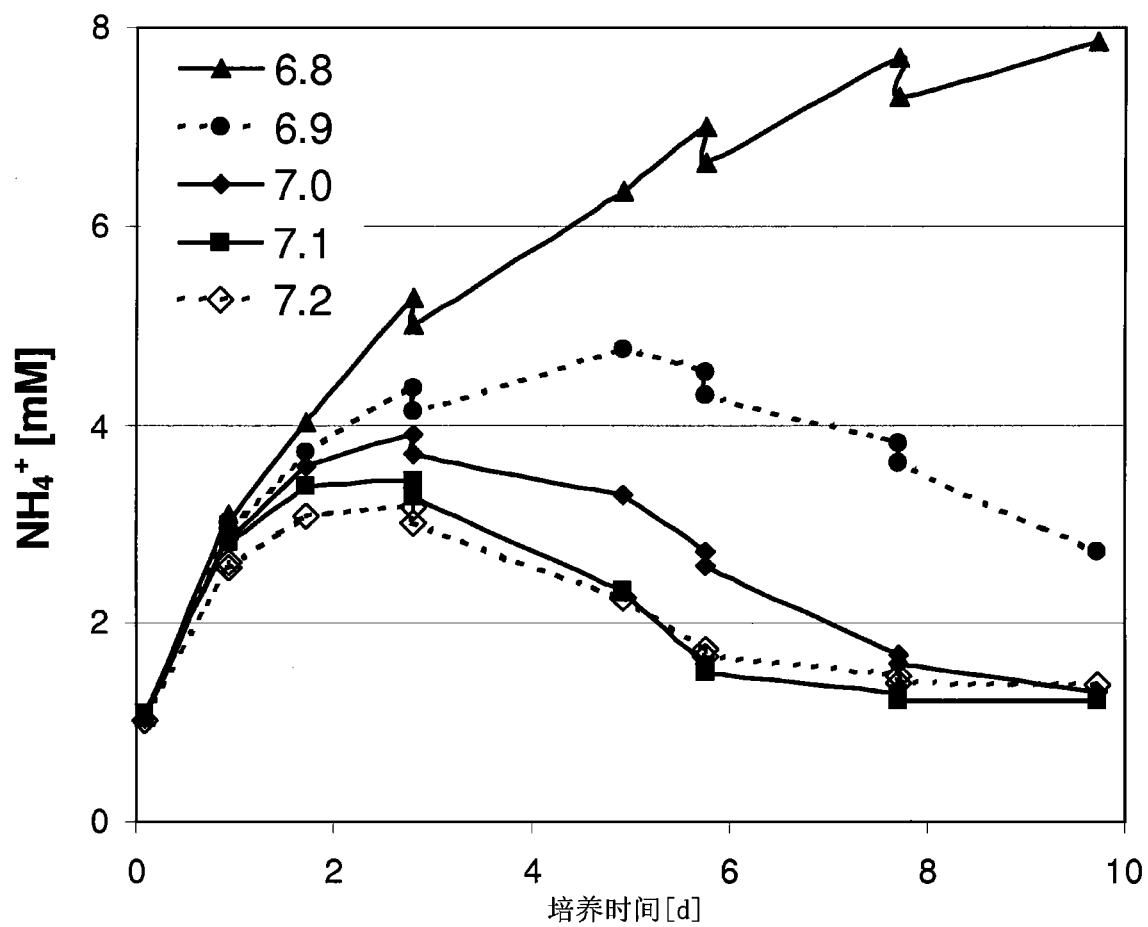


图10B

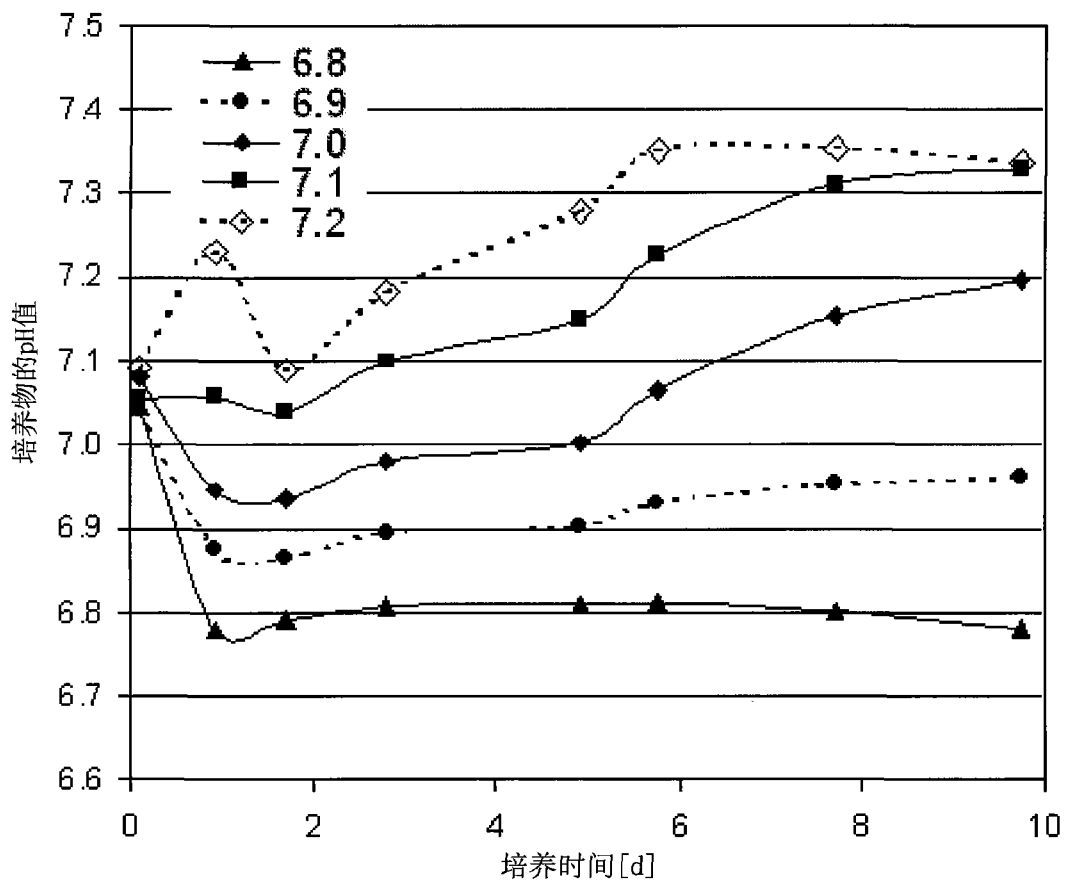


图11A

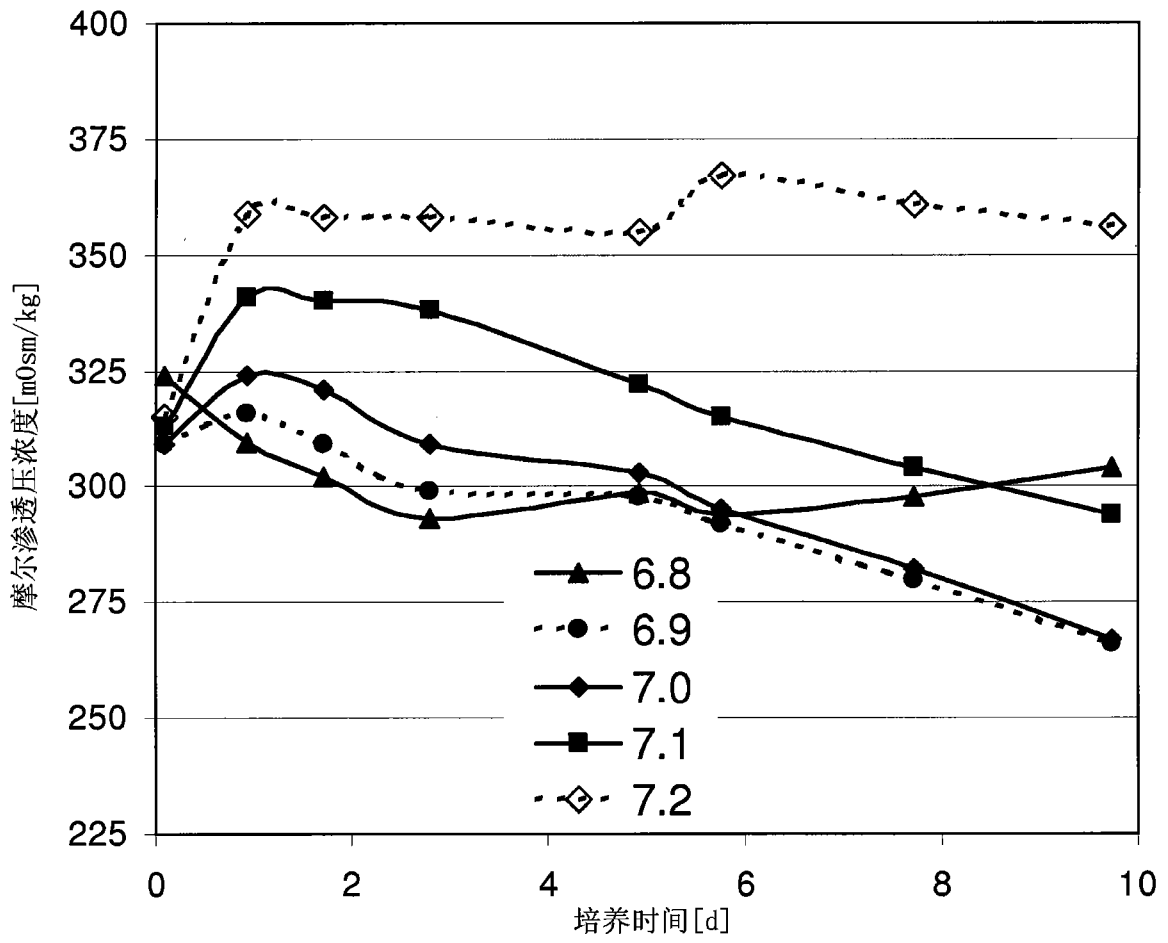


图11B

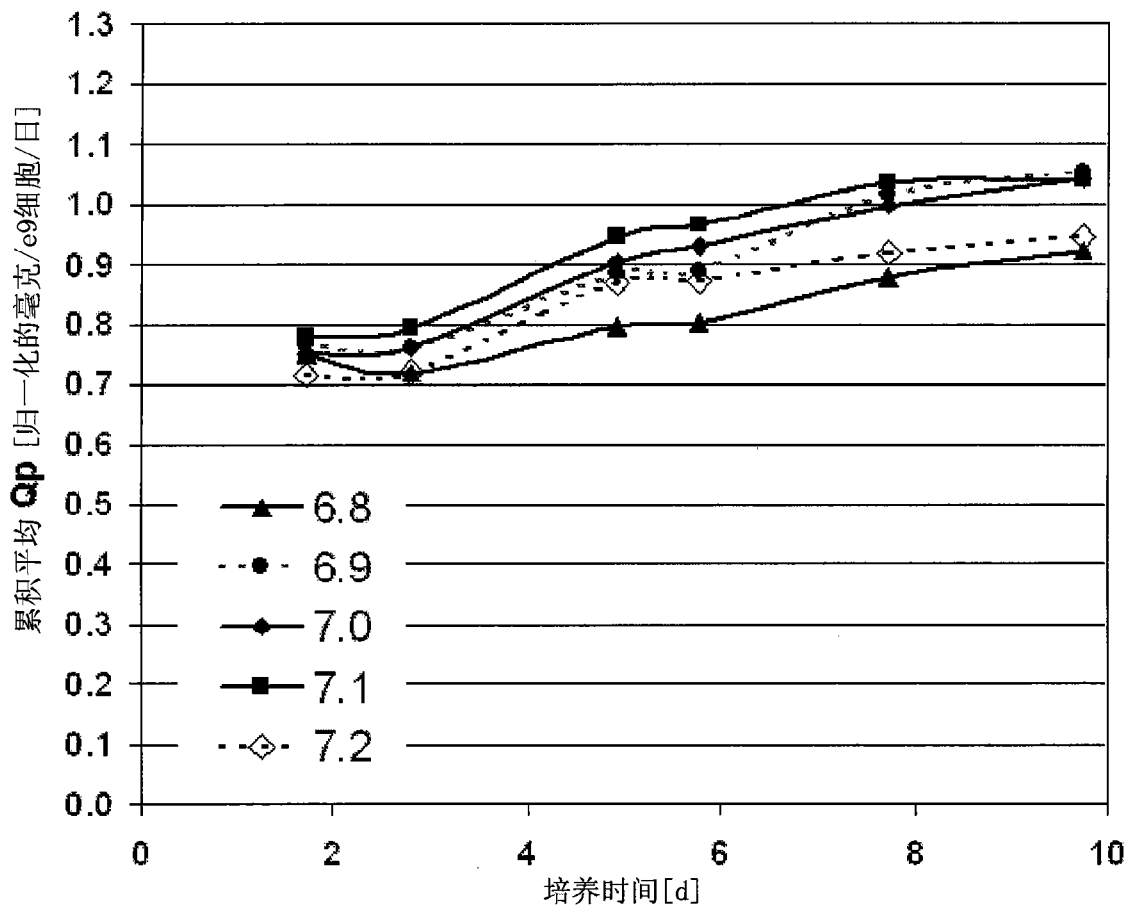


图12A

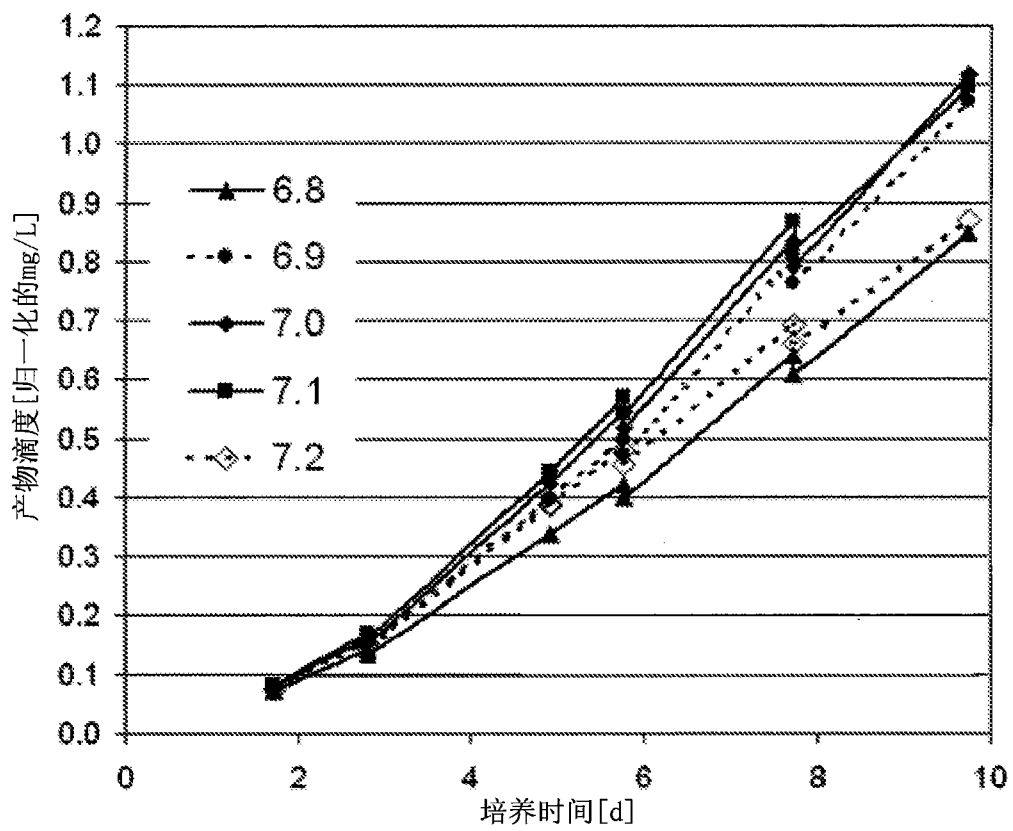


图12B

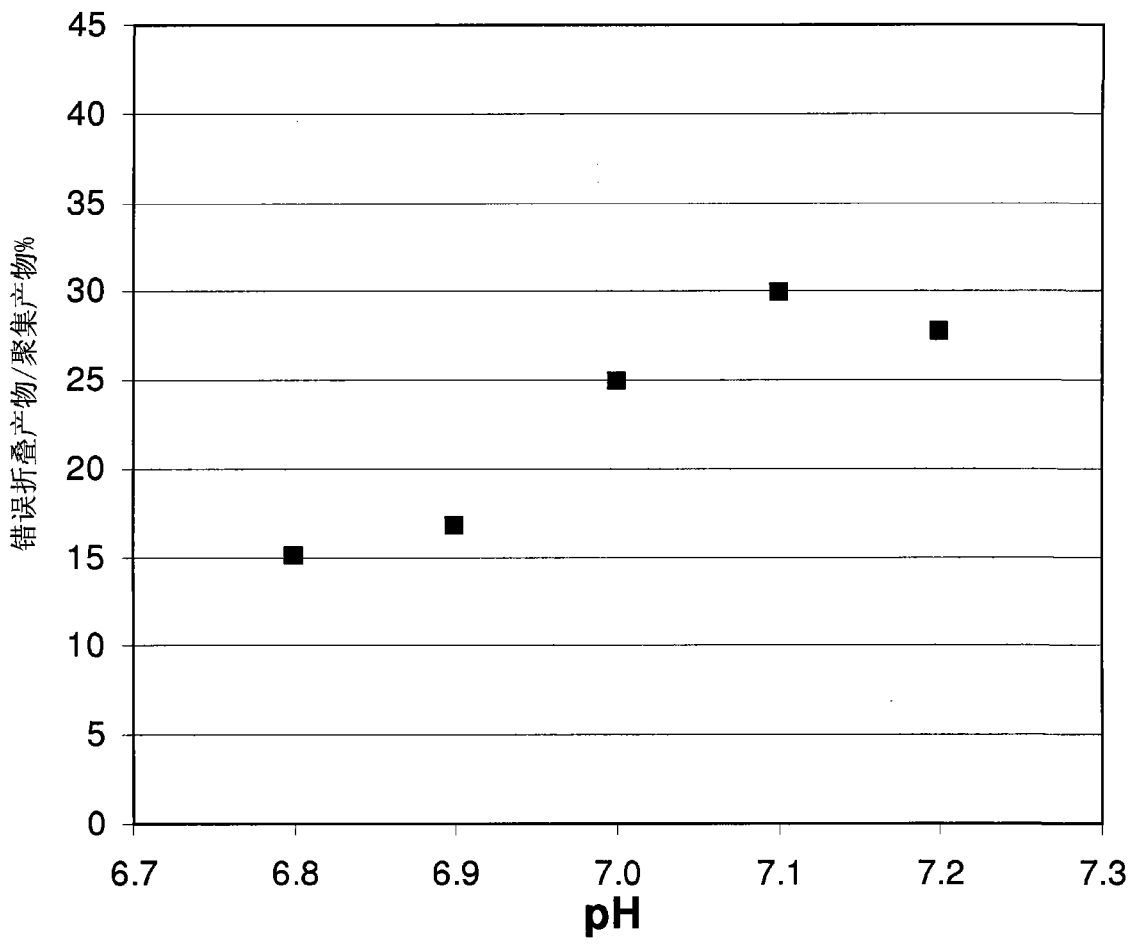


图13A

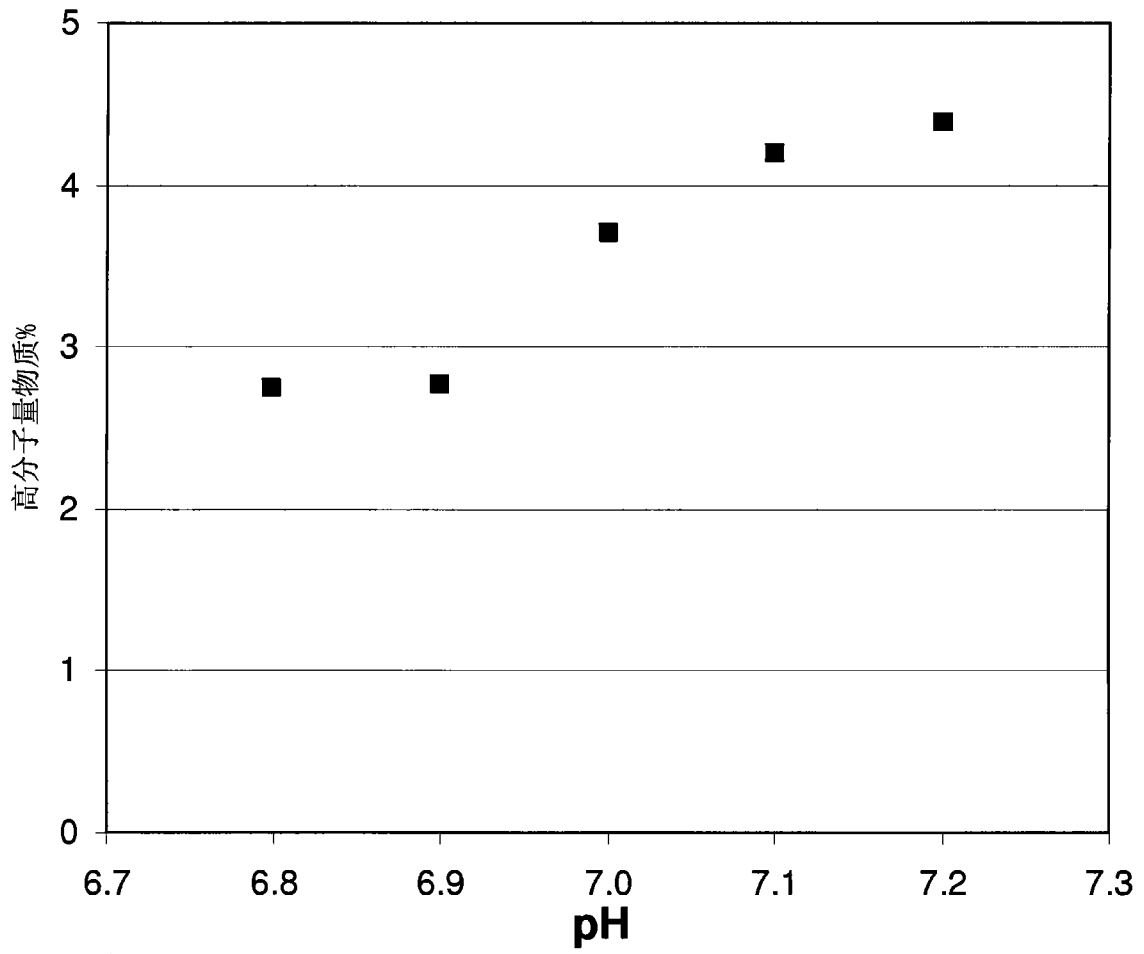


图13B

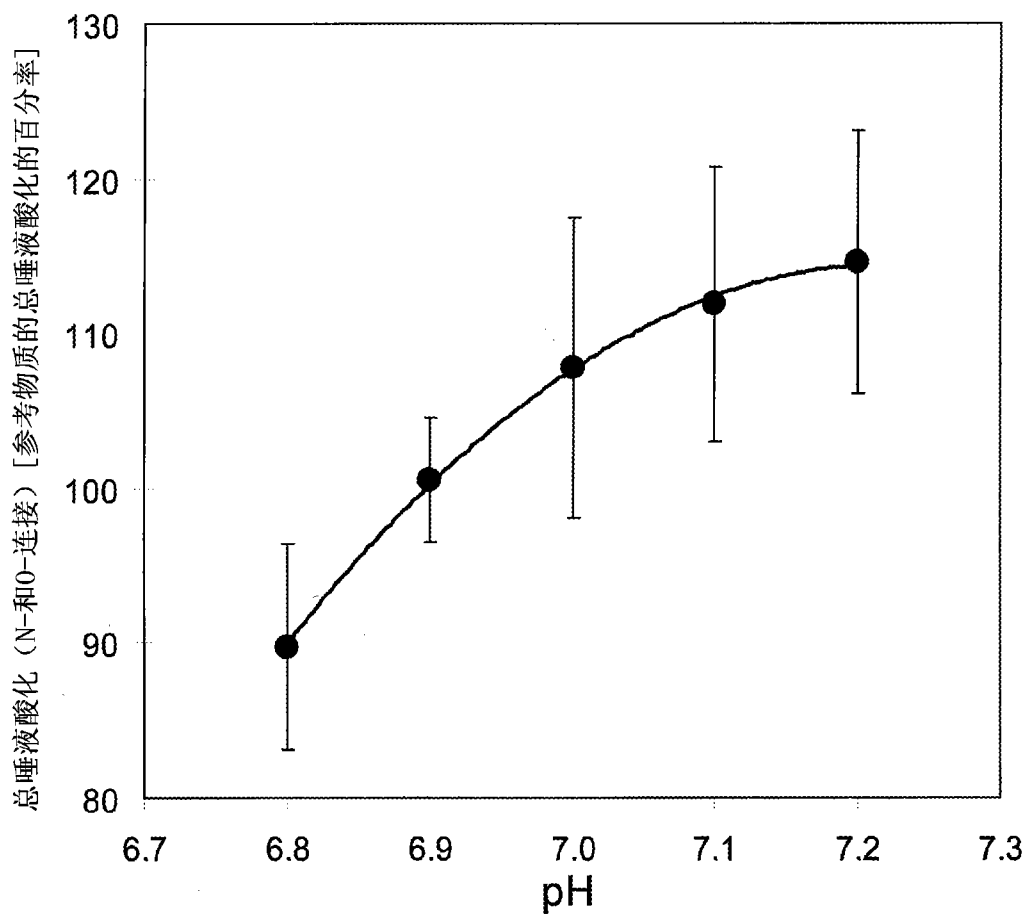


图14A

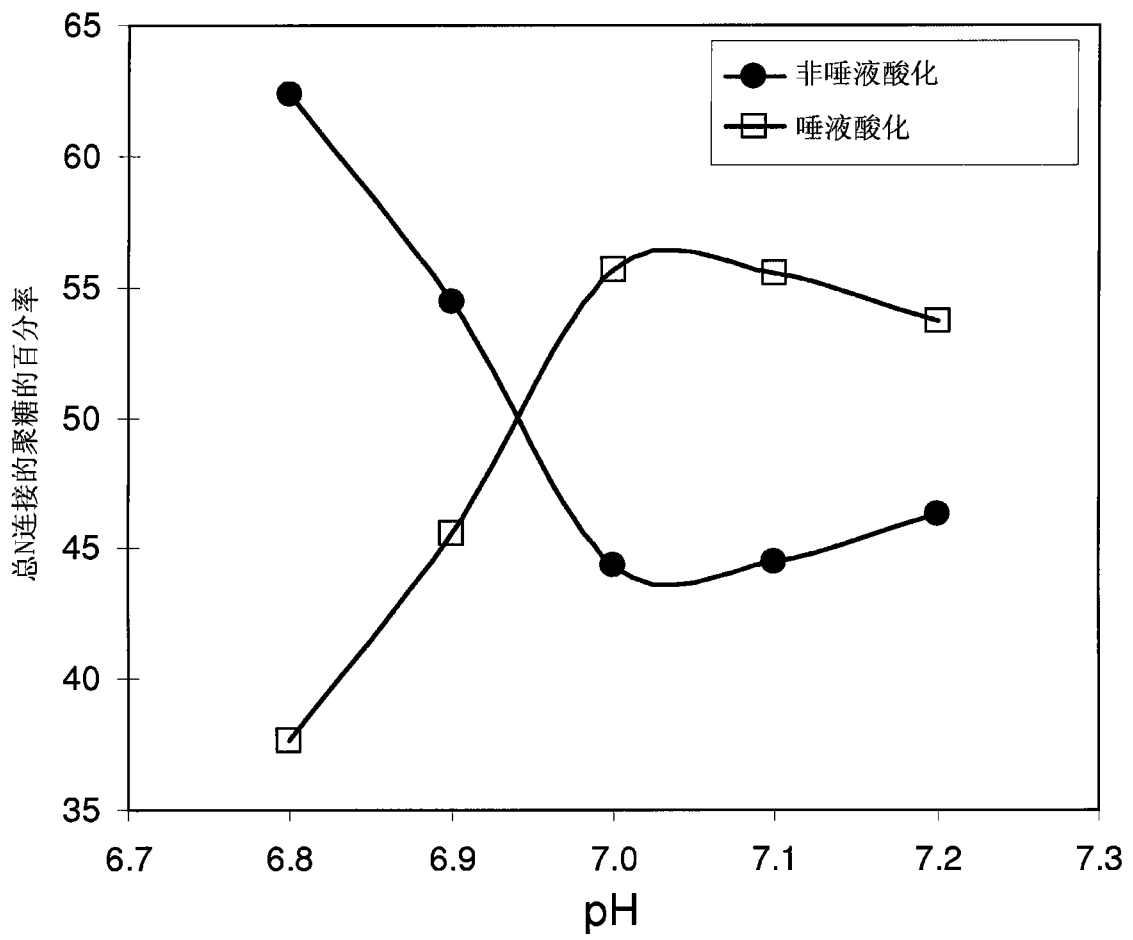


图14B

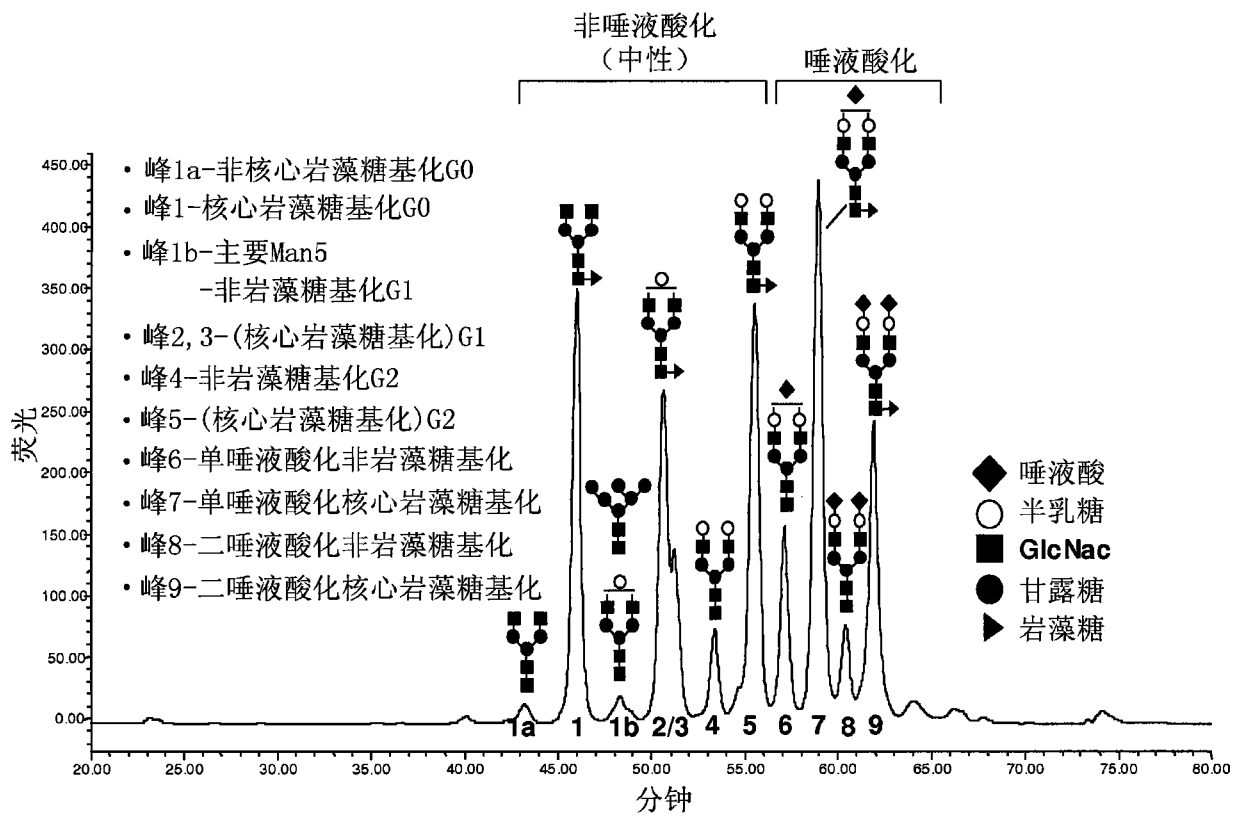


图15

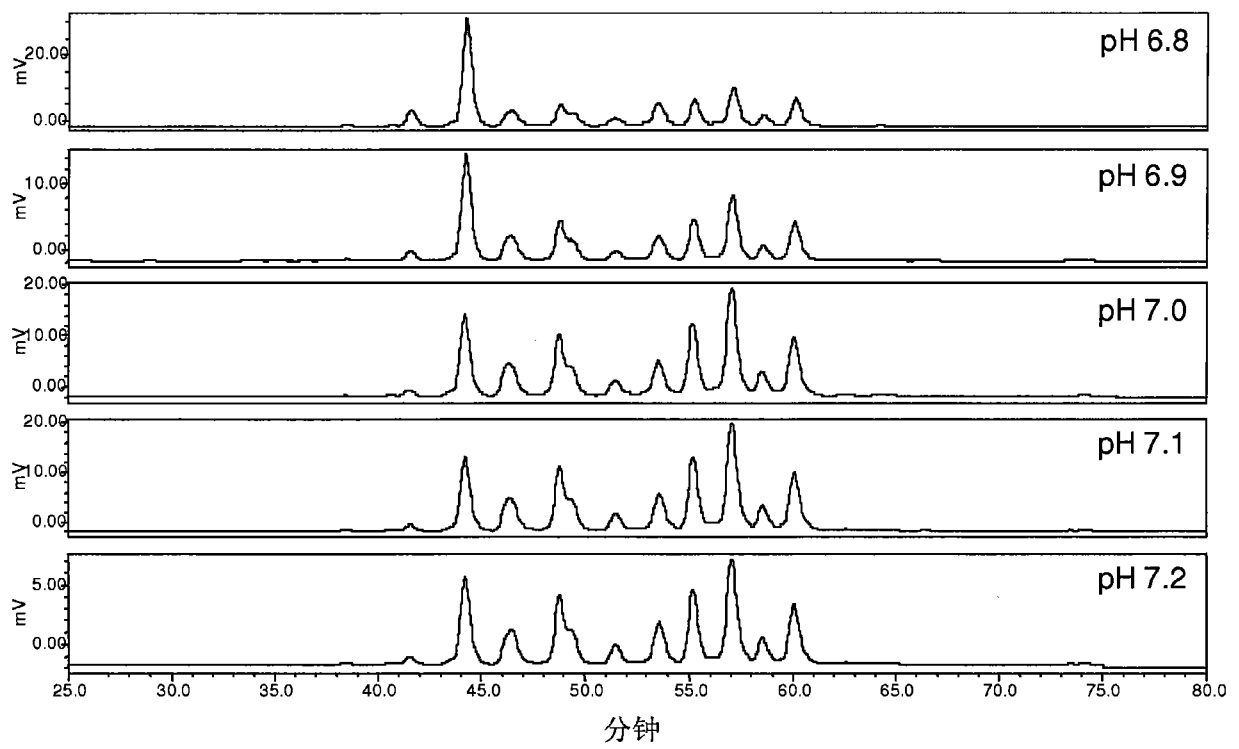


图16

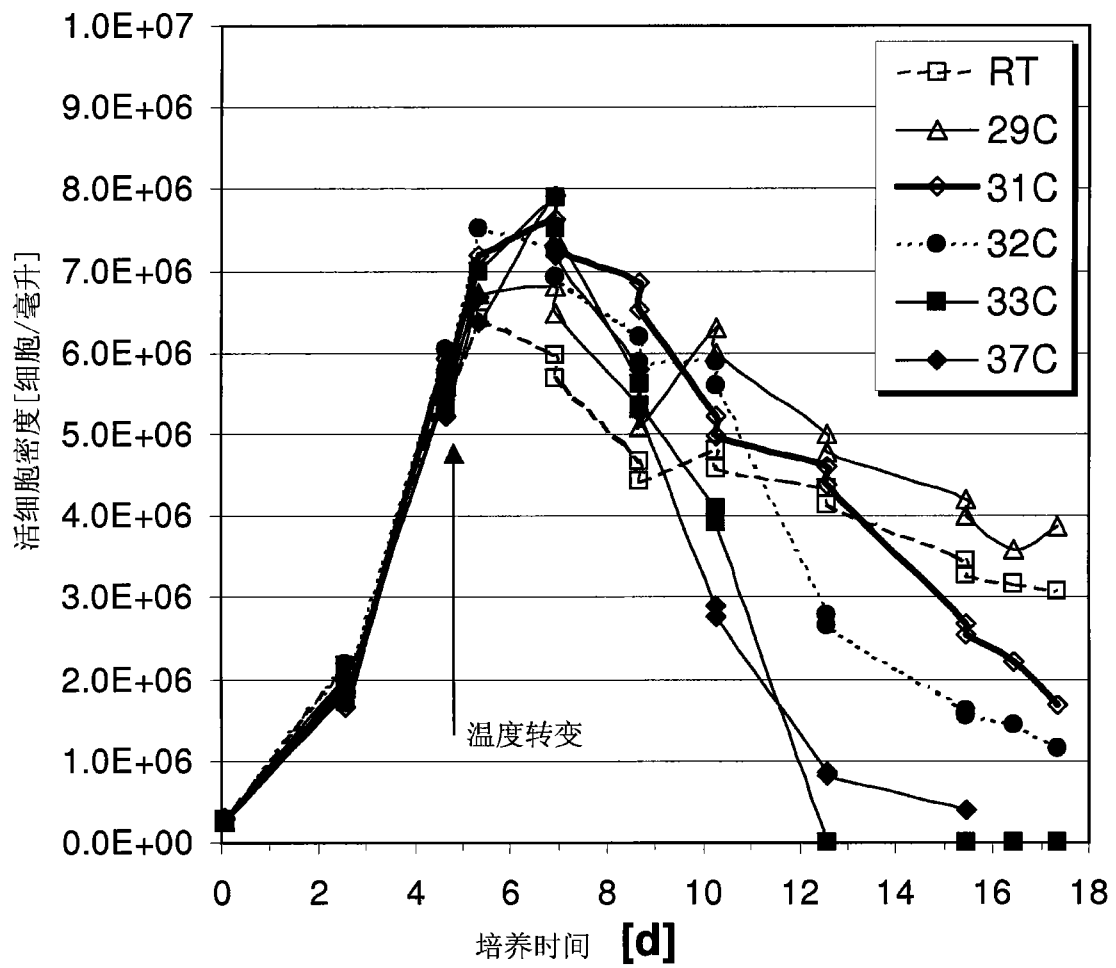


图17A

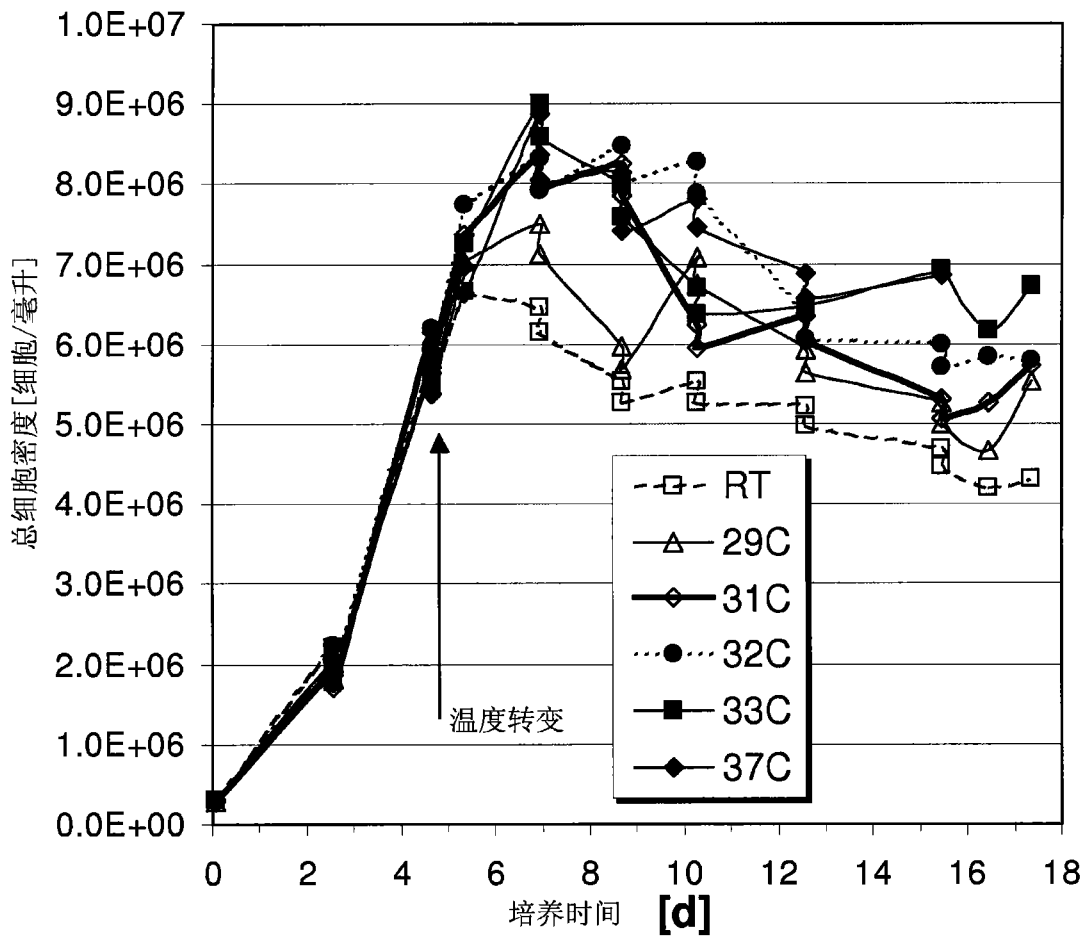


图17B

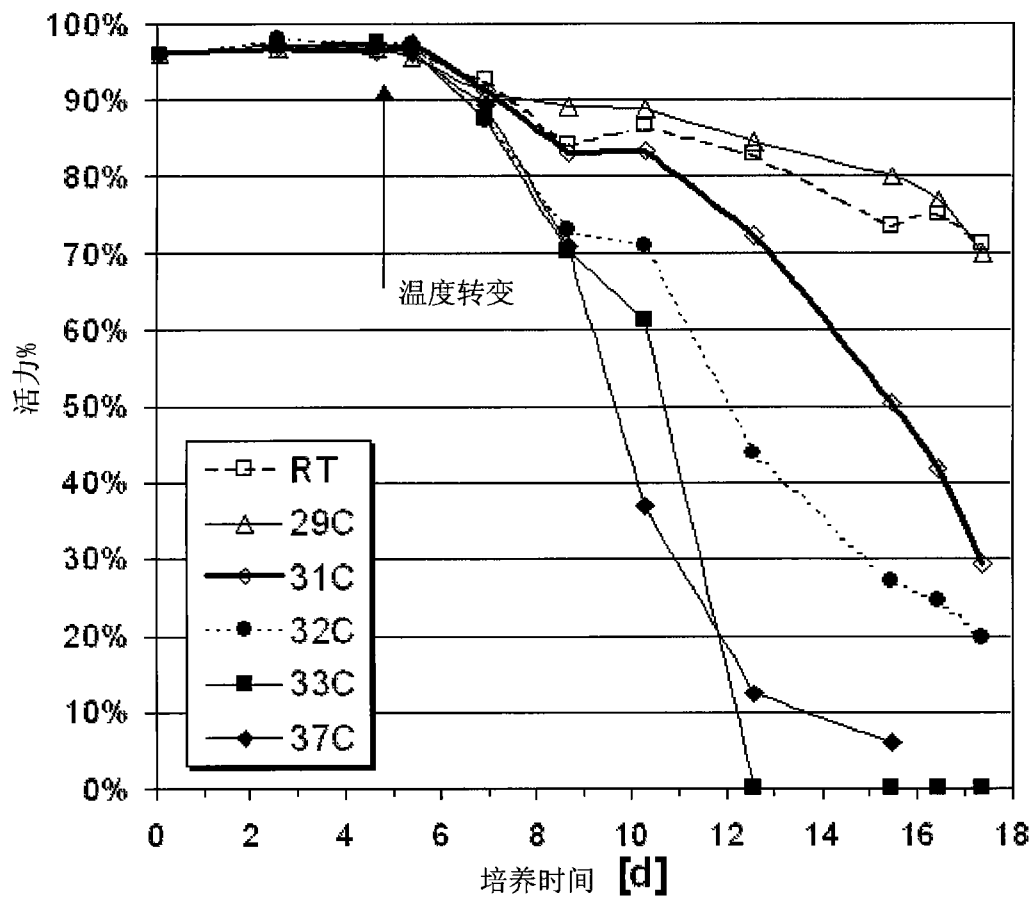


图17C

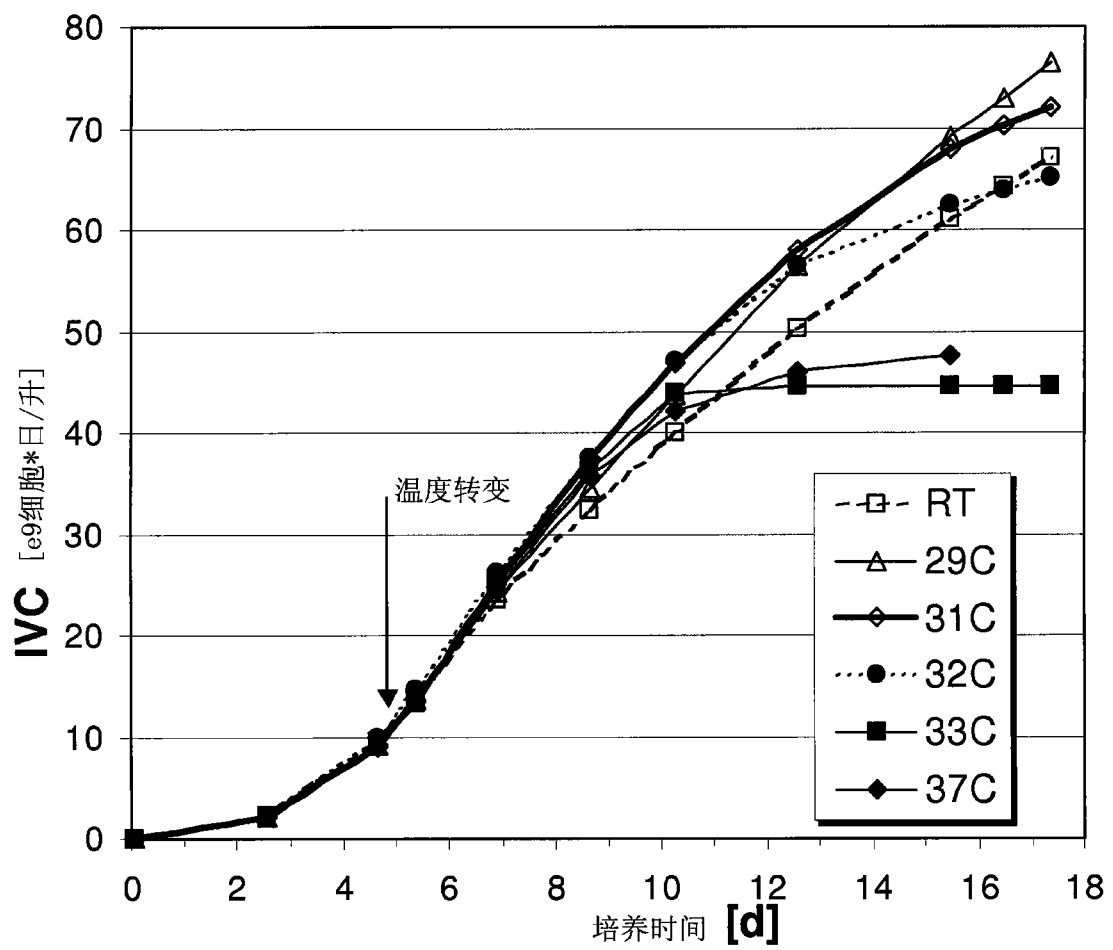


图17D

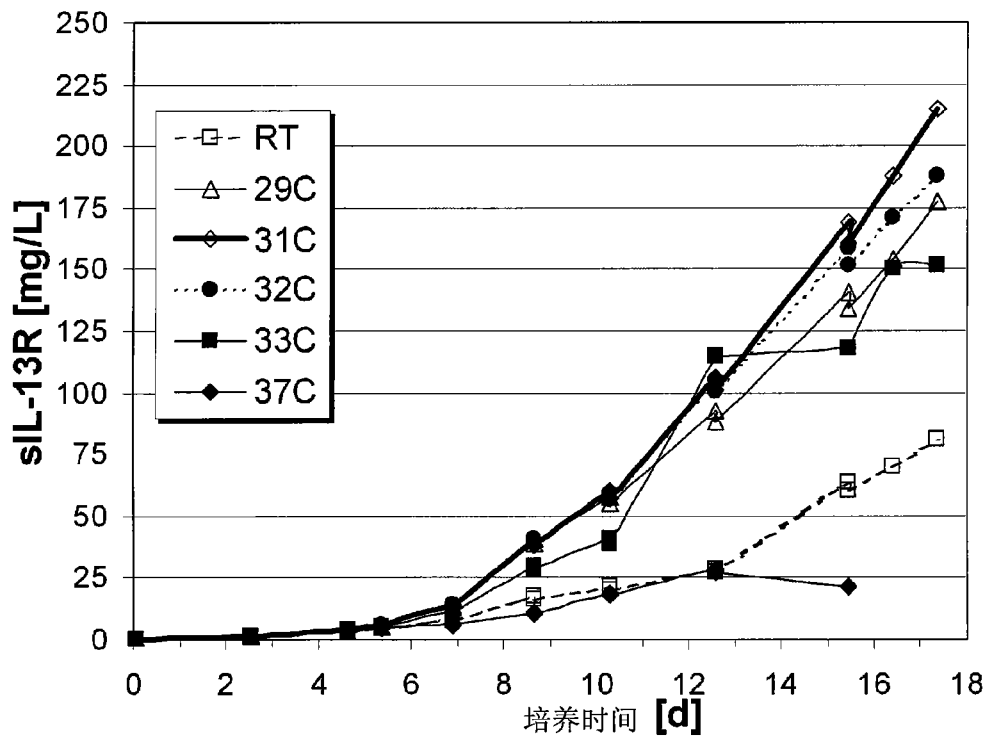
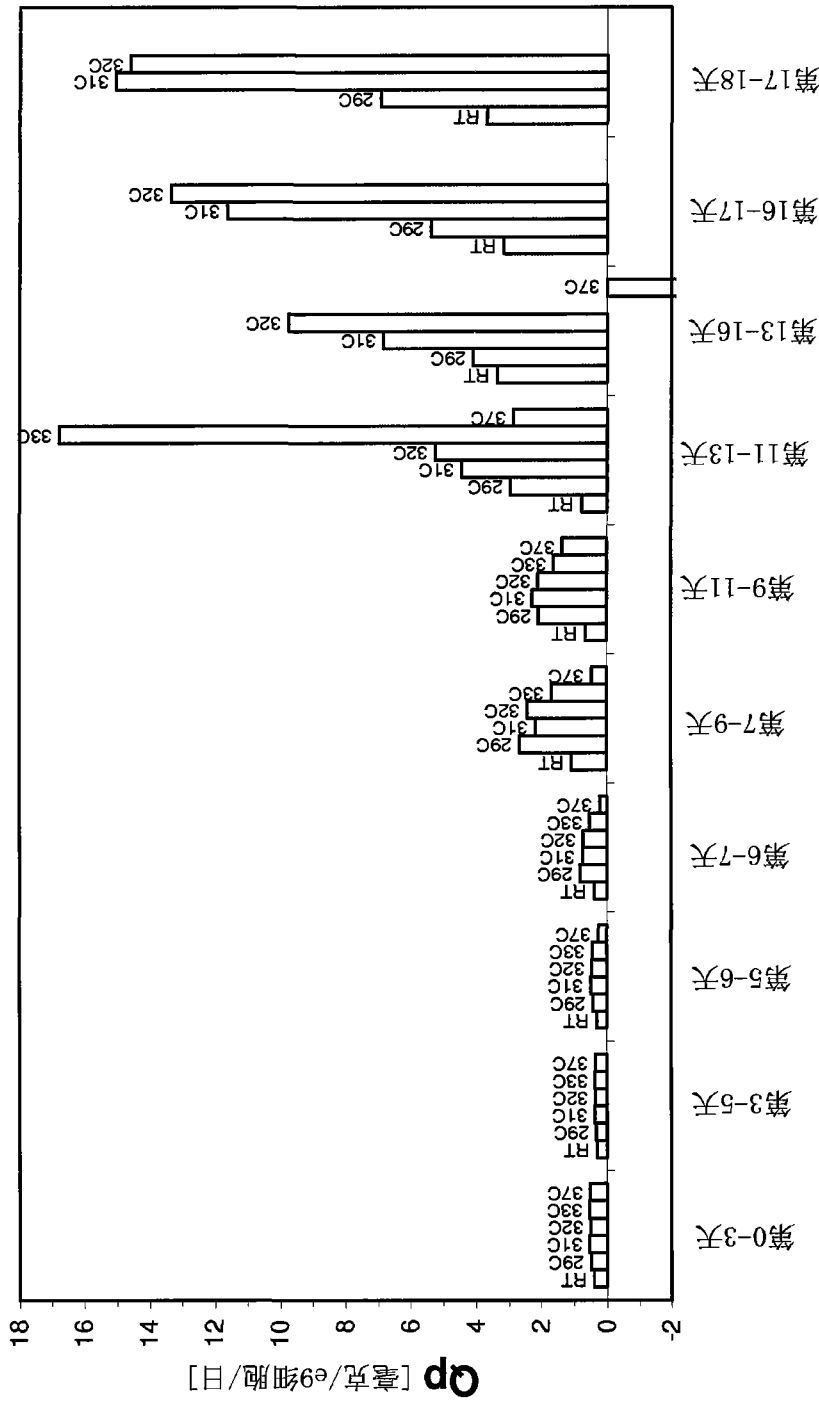


图18



时间(天)

图 19A

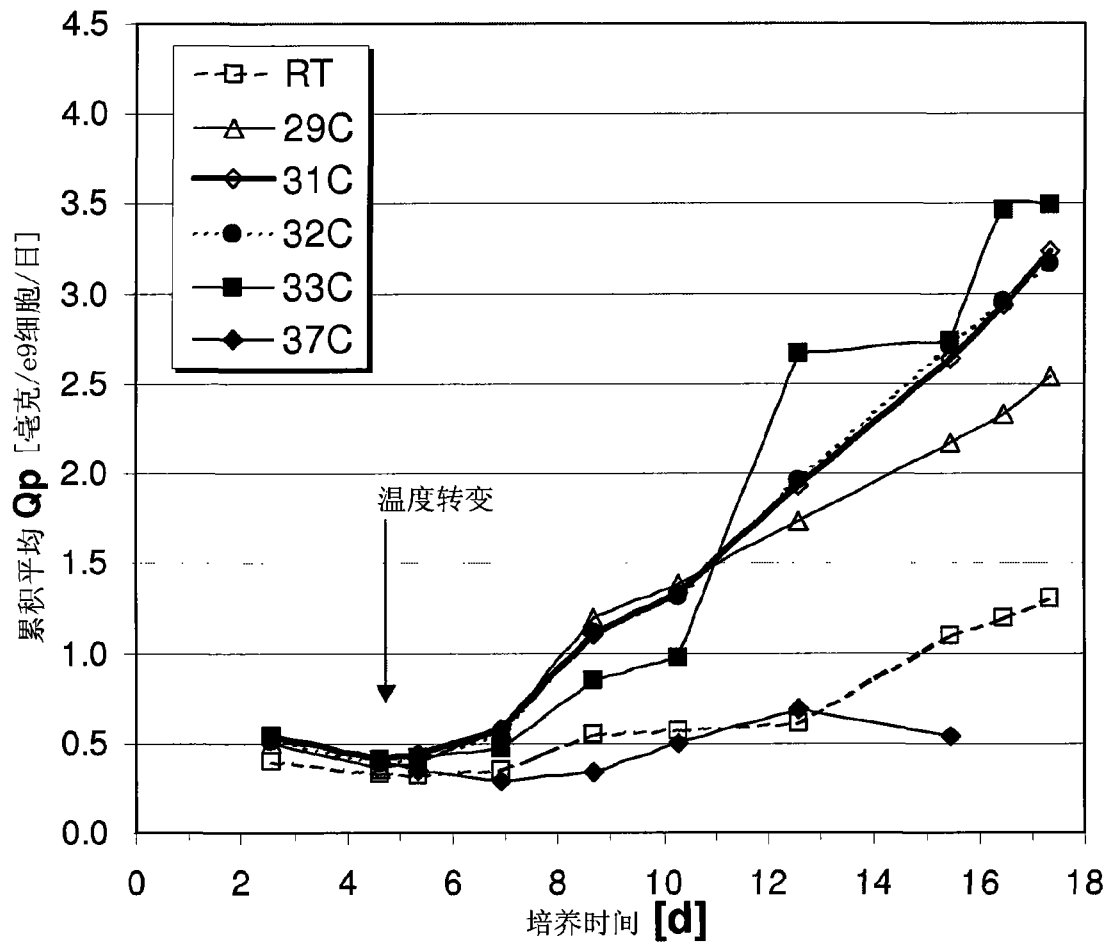


图19B

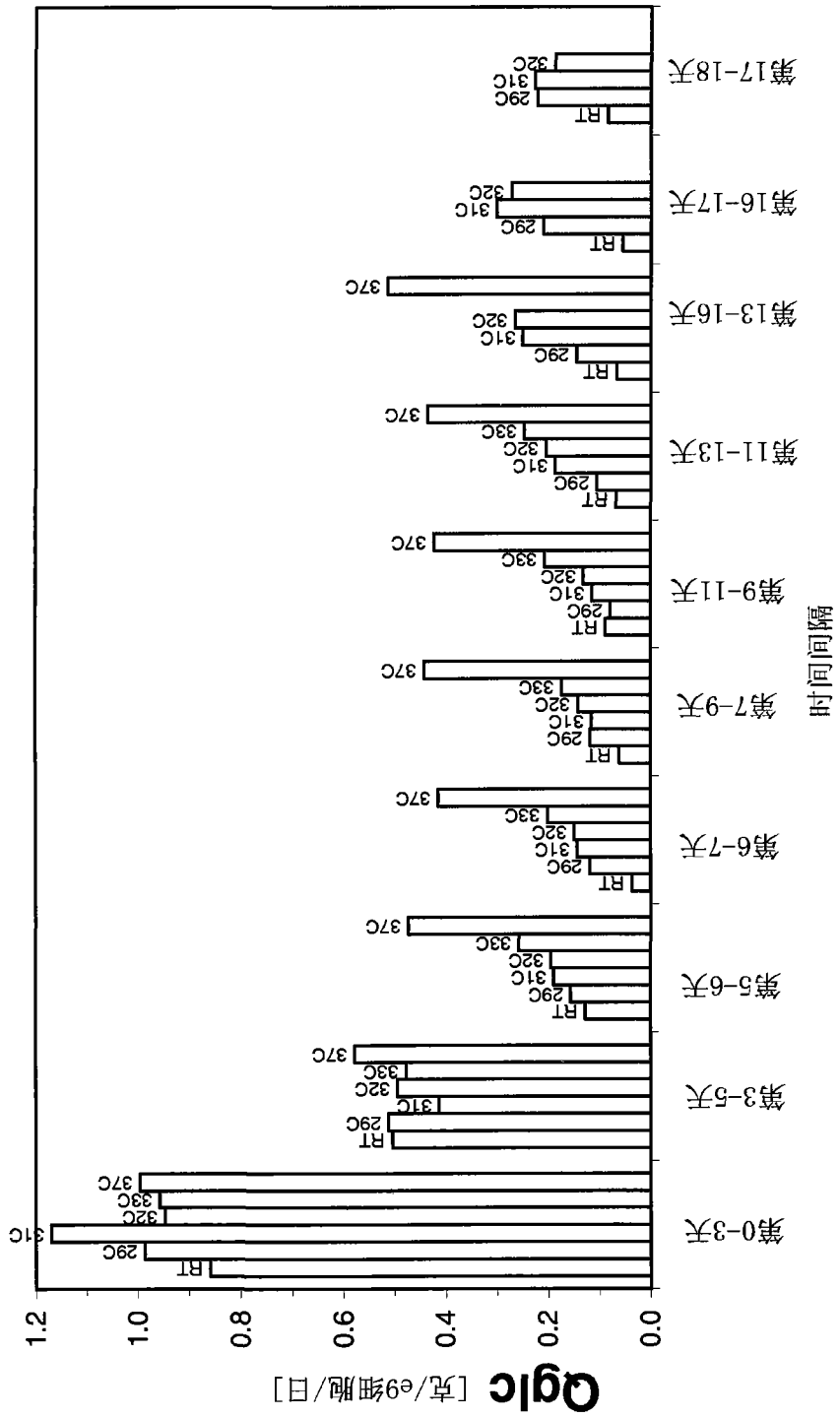
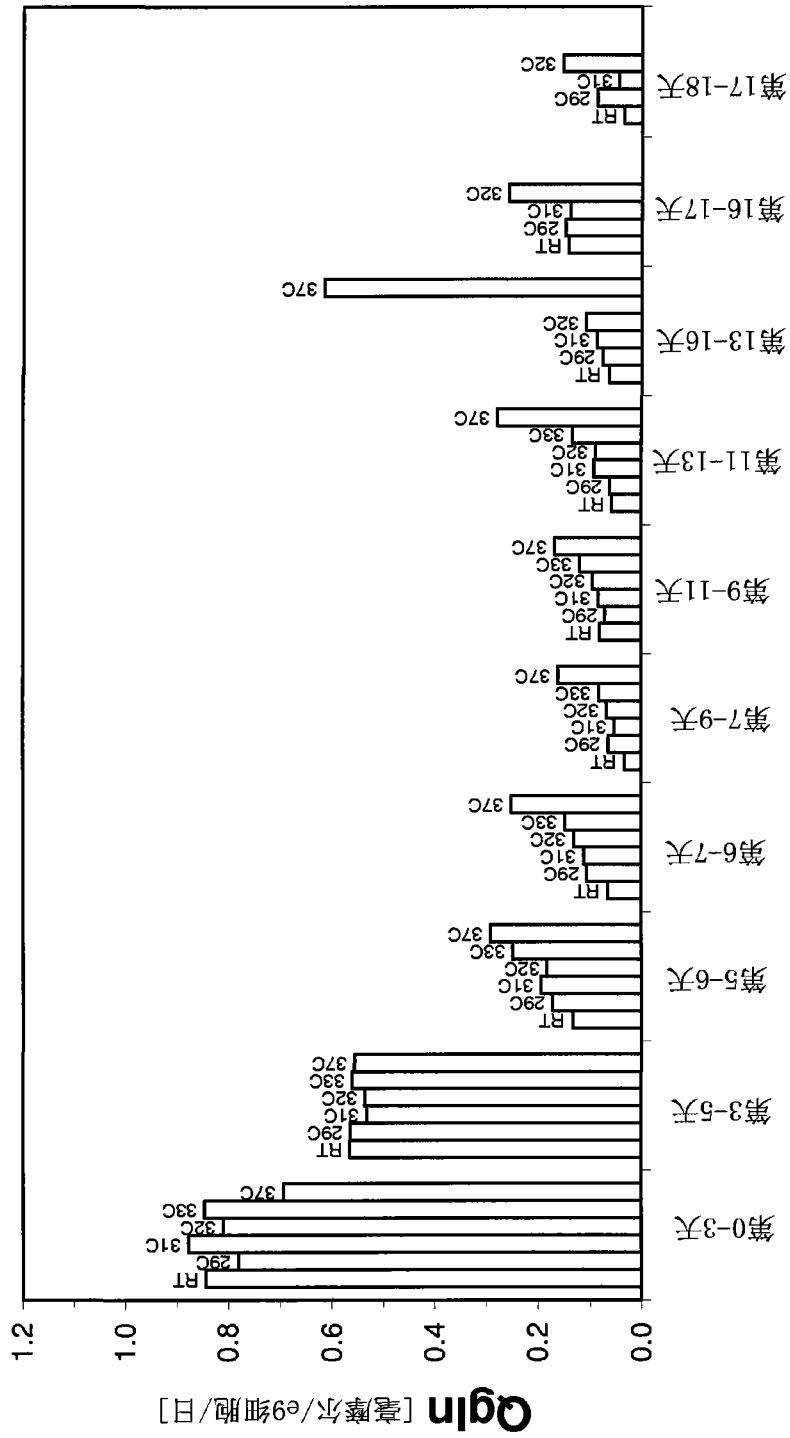


图20



细胞回回回回

图21

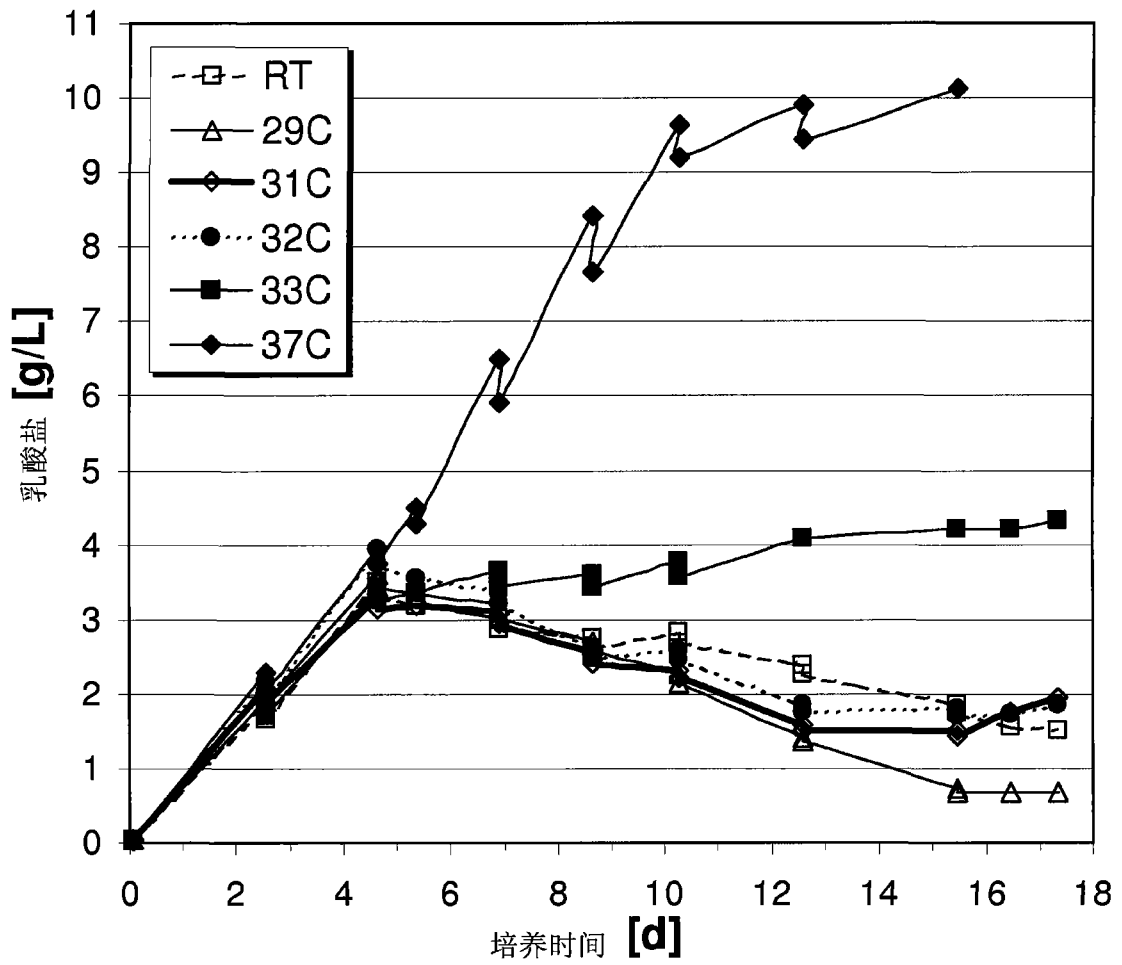


图22

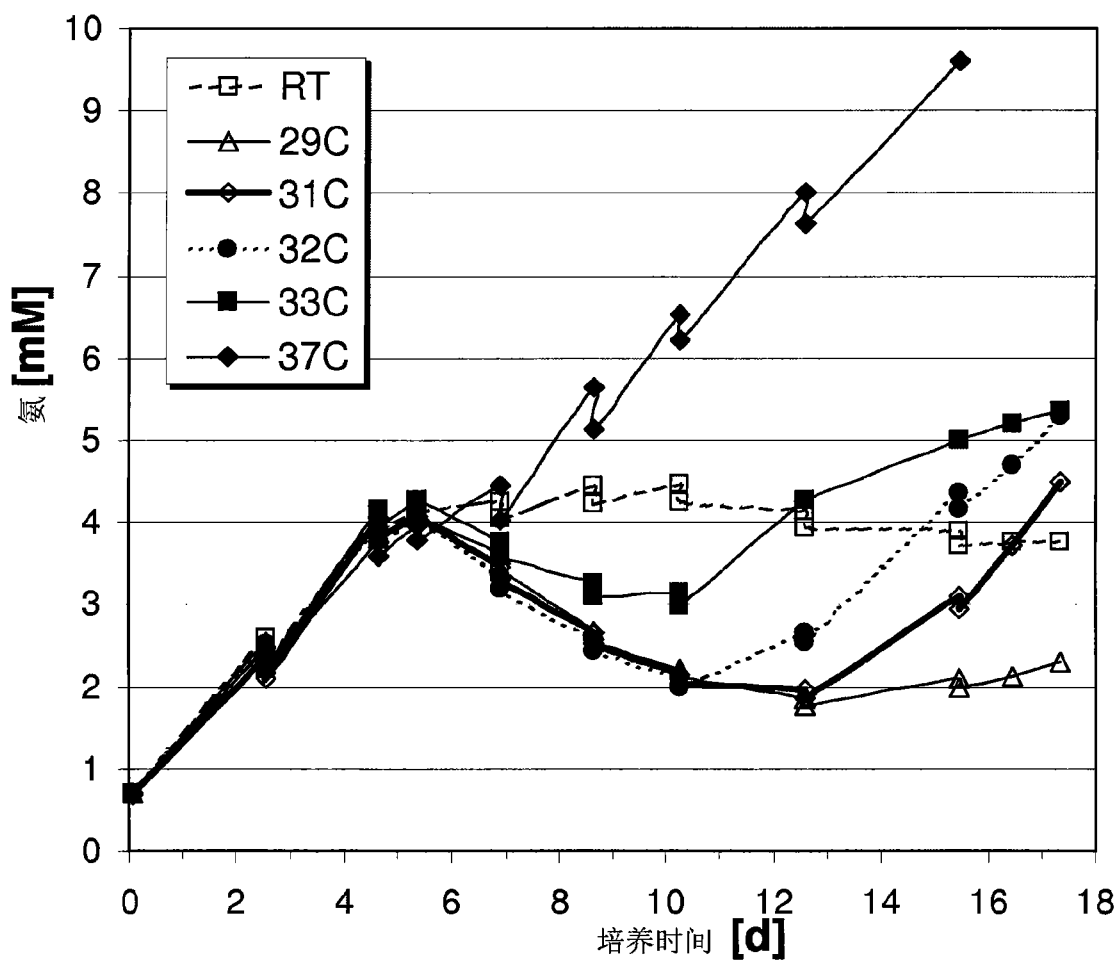


图23

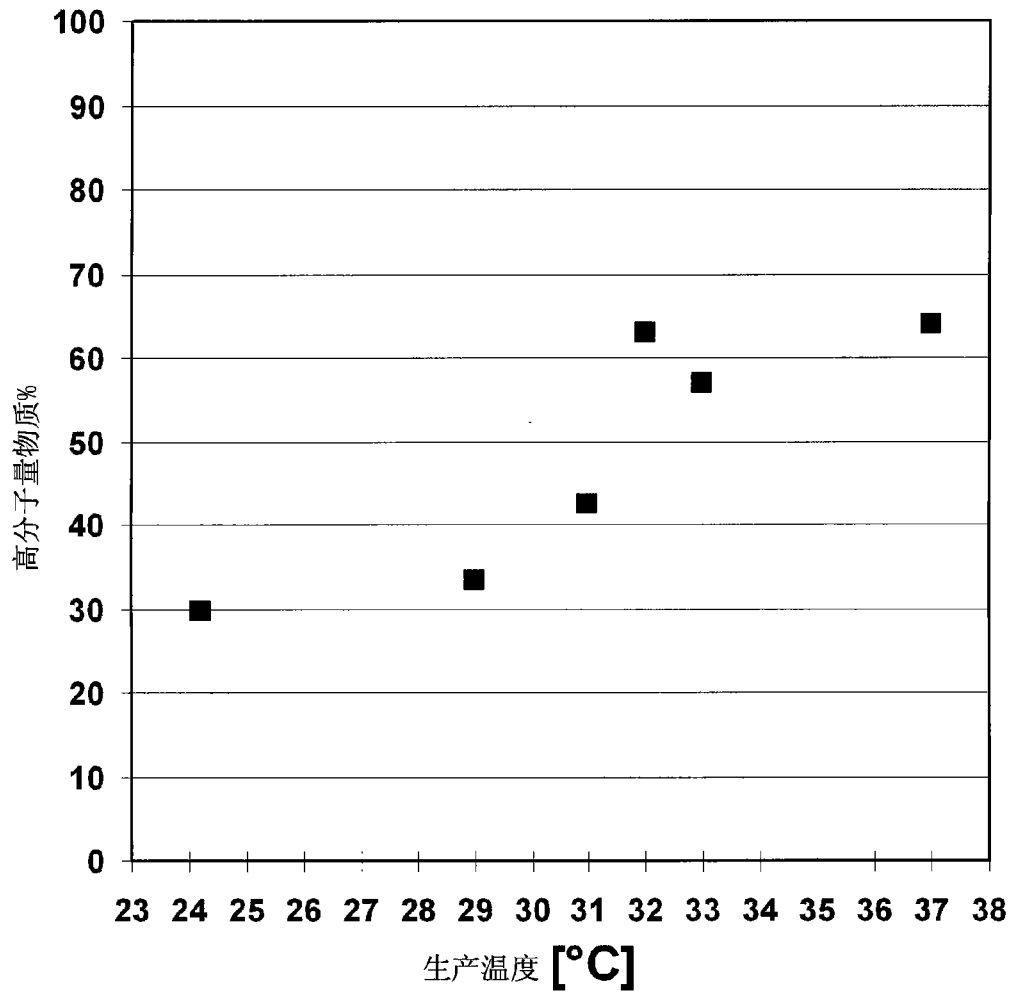


图24

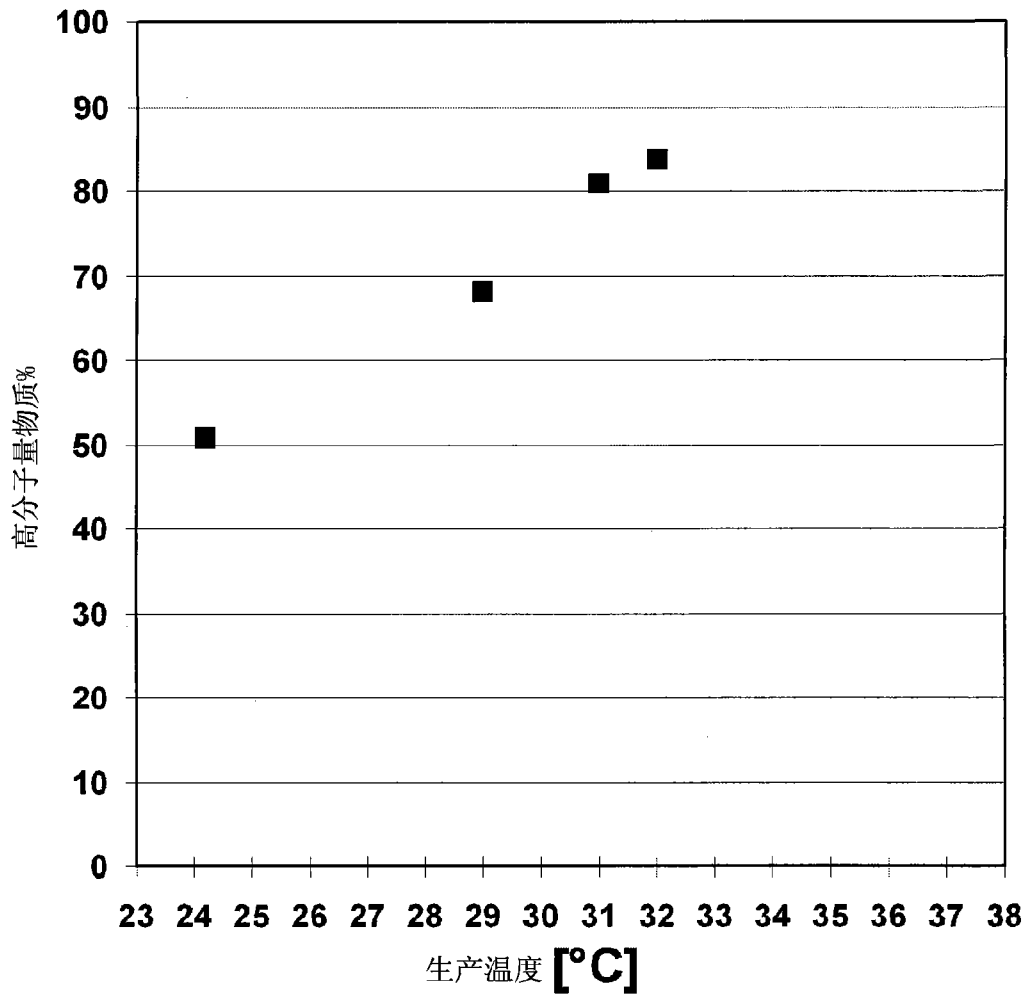


图25

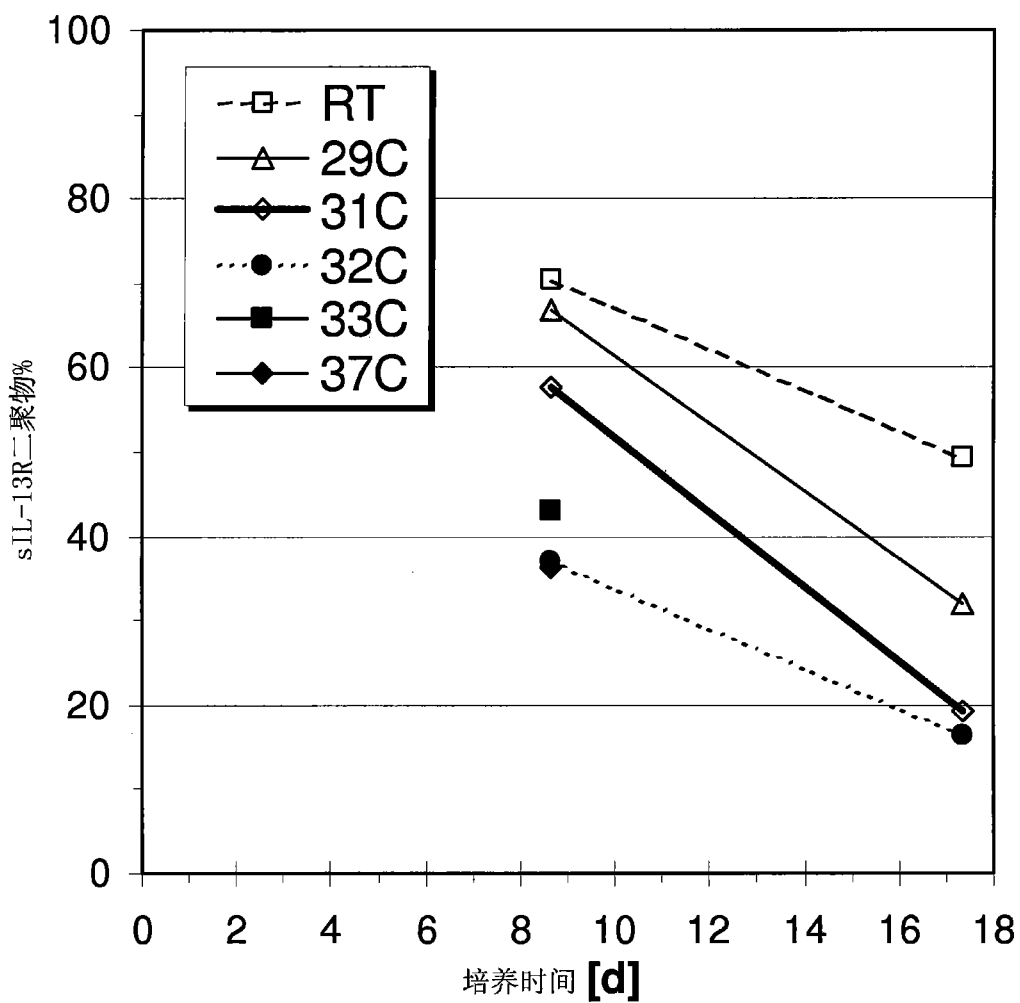


图26A

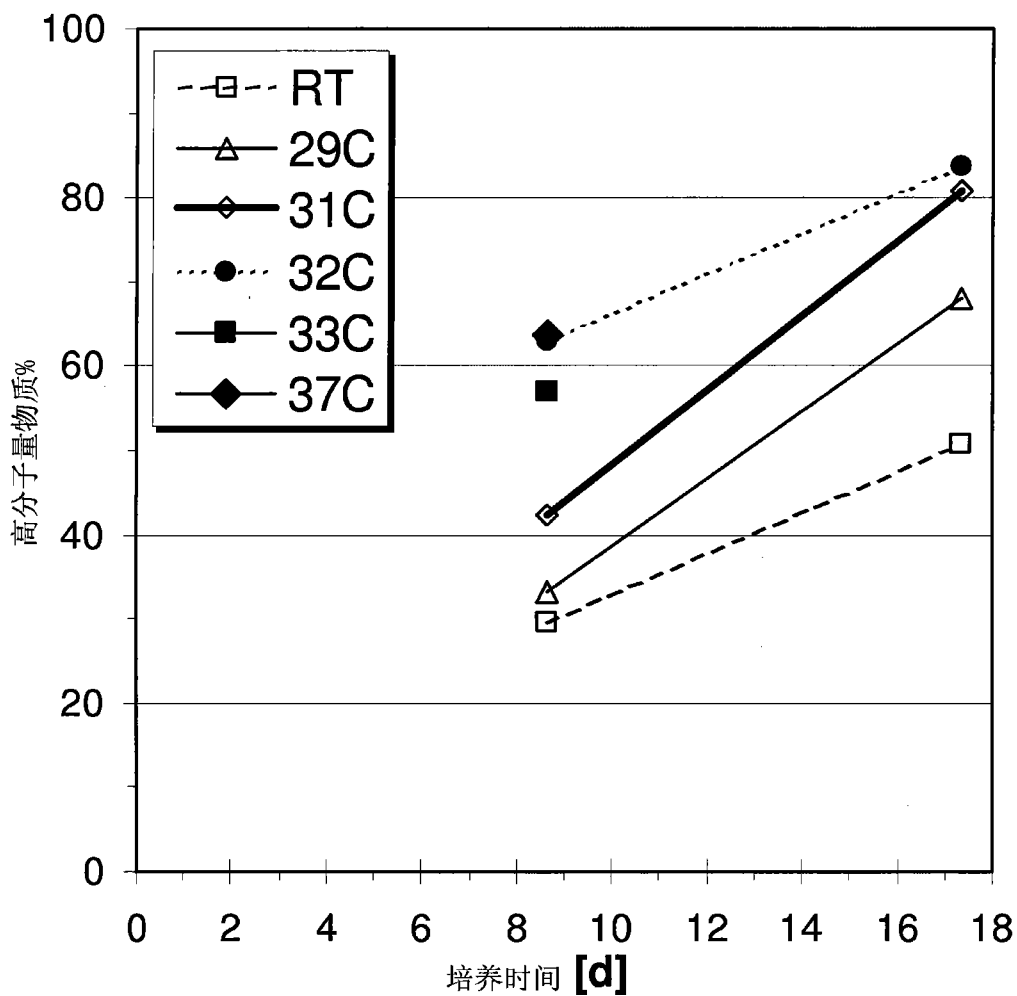


图26B

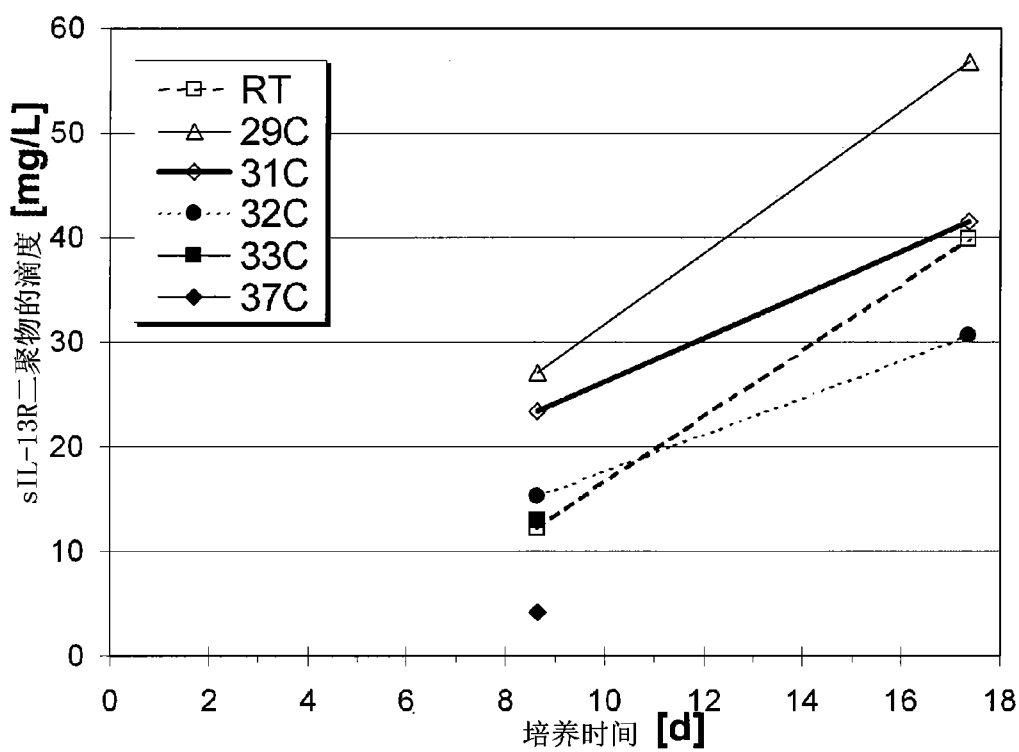


图27