



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201540837 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：104124637 (22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 26 日
 (51)Int. Cl. : C12N15/13 (2006.01) C07K16/00 (2006.01)
 (30)優先權：2009/10/26 歐洲專利局 09013455.2
 (71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
 瑞士
 中外製藥股份有限公司 (日本) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (JP)
 日本
 (72)發明人：法蘭茲 蘭哈德 FRANZE, REINHARD (DE)；林克 湯瑪斯 LINK, THOMAS
 (DE)；平島親 HIRASHIMA, CHIKASHI (JP)；高本良智 TAKAGI, YOSHINORI
 (JP)；田熊晉也 TAKUMA, SHINYA (JP)；津田祐理子 TSUDA, YURIKO (JP)
 (74)代理人：陳長文
 申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：5 共 38 頁

(54)名稱

製造糖化免疫球蛋白之方法

METHOD FOR THE PRODUCTION OF A GLYCOSYLATED IMMUNOGLOBULIN

(57)摘要

本發明係關於一種製造免疫球蛋白之方法，其包括下列步驟：a)提供一種包含可編碼該免疫球蛋白之核酸的真核細胞，b)將該真核細胞培養於培養基中，其中培養基中每時間單位可利用之葡萄糖含量保持恆定，且限制在該等細胞在培養基中每時間單位之最大可利用量之 80% 以下，及 c) 自培養物回收該免疫球蛋白。

Herein is reported a method for the production of an immunoglobulin comprising the following steps: a) providing a eukaryotic cell comprising a nucleic acid encoding the immunoglobulin, b) cultivating the eukaryotic cell in a cultivation medium wherein the amount of glucose available in the cultivation medium per time unit is kept constant and limited to less than 80 % of the amount that could maximally be utilized by the cells in the cultivation medium per time unit, and c) recovering the immunoglobulin from the culture.

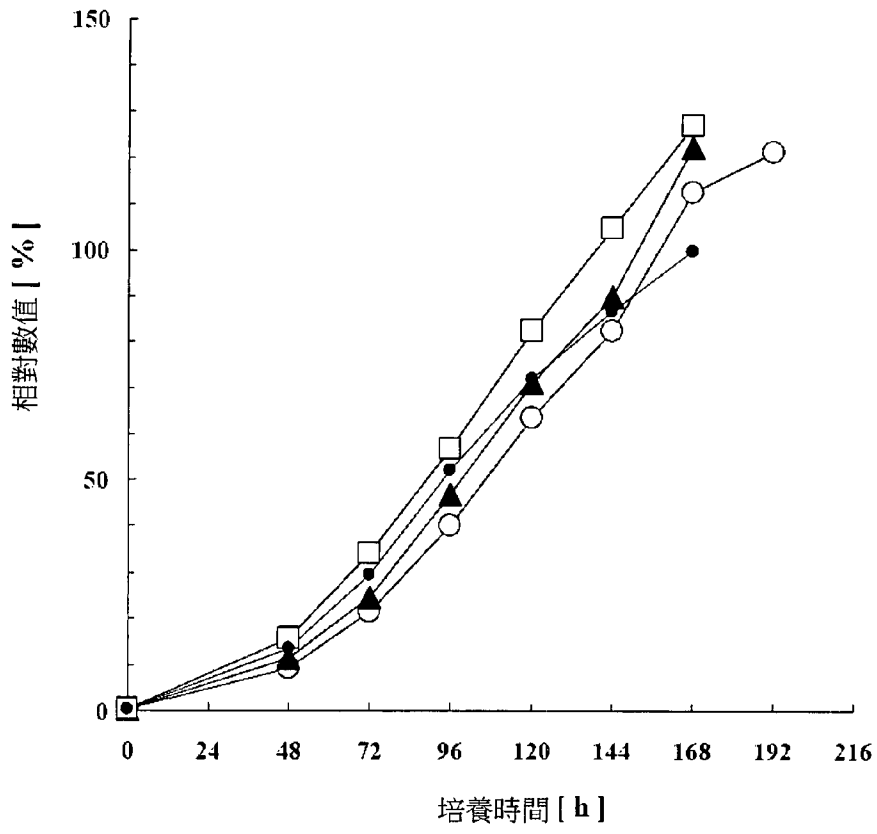


圖4

201540837

發明摘要

※ 申請案號 :

104124637 (由99136580分割)

C12N 15/13 (2006.01)

※ 申請日 :

99.10.26

※IPC 分類 : C07K 16/00.(2006.01)

【發明名稱】

製造糖化免疫球蛋白之方法

METHOD FOR THE PRODUCTION OF A GLYCOSYLATED
IMMUNOGLOBULIN

● 【中文】

本發明係關於一種製造免疫球蛋白之方法，其包括下列步驟：a) 提供一種包含可編碼該免疫球蛋白之核酸的真核細胞，b)將該真核細胞培養於培養基中，其中培養基中每時間單位可利用之葡萄糖含量保持恆定，且限制在該等細胞在培養基中每時間單位之最大可利用量之80%以下，及c)自培養物回收該免疫球蛋白。

【英文】

Herein is reported a method for the production of an immunoglobulin comprising the following steps: a) providing a eukaryotic cell comprising a nucleic acid encoding the immunoglobulin, b) cultivating the eukaryotic cell in a cultivation medium wherein the amount of glucose available in the cultivation medium per time unit is kept constant and limited to less than 80 % of the amount that could maximally be utilized by the cells in the cultivation medium per time unit, and c) recovering the immunoglobulin from the culture.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 4 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無元件符號說明）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

製造糖化免疫球蛋白之方法

METHOD FOR THE PRODUCTION OF A GLYCOSYLATED
IMMUNOGLOBULIN

【技術領域】

本發明係報導一種於細胞中製造免疫球蛋白之方法，據此，該所製得免疫球蛋白之糖化型態可根據培養條件加以變更。

【先前技術】

近年來，免疫球蛋白之產量穩步增長，且在不久的將來，免疫球蛋白可能成為最大一類用於治療各種疾病之療法。免疫球蛋白的作用係產生自其特異性，包括其特異性標靶識別及結合功能、及在抗原/Fc-受體結合之同時或之後活化特異性之作用。

特異性標靶識別及結合係由免疫球蛋白之可變區所介導。產生作用之免疫球蛋白分子其他部分是轉譯作用後經過修飾的，諸如，糖化型態。轉譯後修飾作用確實會影響免疫球蛋白之效力、安定性、潛在免疫原性、結合力等。與此相關，必須解決補體依賴性細胞毒性作用(CDC)、抗體依賴性細胞毒性作用(ADCC)、及誘發細胞凋亡之問題。

咸已報導，免疫球蛋白之糖化型態(亦即糖分子組合及所附接之糖結構之數量)在生物特性上具有強烈的影響(參見例如Jefferis, R., *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 11-16)。哺乳動物細胞所產生之免疫球蛋白含有2至3質量%碳水化合物(Taniguchi, T., 等人, *Biochem.* 24 (1985) 5551-5557)。例如就G類免疫球蛋白(IgG)而言，該質量百分比

相當於鼠源性IgG中具2.3個寡糖殘基(Mizuochi, T., 等人, Arch. Biochem. Biophys. 257 (1987) 387-394), 且相當於人源性IgG中具2.8個寡糖殘基(Parekh, R.B., 等人, Nature 316 (1985) 452-457), 且其中兩個通常是位於Fc區, 且其餘則係位於可變區中(Saba, J.A., 等人, Anal. Biochem. 305 (2002) 16-31)。

於G類免疫球蛋白之Fc區中, 寡糖殘基可經由N-糖化作用而引入在胺基酸殘基297(其係天冬醯胺殘基(稱為Asn²⁹⁷))。Youings等人已說明, 15%至20%多株IgG分子之Fab區中存在另一N-糖化位點(Youings, A., 等人, Biochem. J., 314 (1996) 621-630; 例如亦參見Endo, T., 等人, Mol. Immunol. 32 (1995) 931-940)。由於寡糖處理之非均質性(亦即非對稱性), 具有不同糖化型態之多種免疫球蛋白異型是存在的(Patel, T.P., 等人, Biochem. J. 285 (1992) 839-845; Ip, C.C., 等人, Arch. Biochem. Biophys. 308 (1994) 387-399; Lund, J., 等人, Mol. Immunol. 30 (1993) 741-748)。同時, 寡糖結構及分佈具高度可再生性(亦即非隨機)及位點特異性(Dwek, R.A., 等人, J. Anat. 187 (1995) 279-292)。

免疫球蛋白的一些特性係直接與Fc區之糖化有關(參見例如Dwek, R.A., 等人, J. Anat. 187 (1995) 279-292; Lund, J., 等人, J. Immunol. 157 (1996) 4963-4969; Lund, J., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Wright, A.及Morrison, S.L., J. Immunol. 160 (1998) 3393-3402), 諸如, 例如熱穩定性及溶解性(West, C.M., Mol. Cell. Biochem. 72 (1986) 3-20); 抗原性(Turco, S.J., Arch. Biochem. Biophys. 205 (1980) 330-339); 免疫原性(Bradshaw, J.P., 等人, Biochim. Biophys. Acta 847 (1985) 344-351; Feizi, T.及Childs, R.A., Biochem. J. 245 (1987) 1-11; Schauer, R., Adv. Exp. Med. Biol. 228 (1988) 47-72); 清除速率/循環半衰期(Ashwell, G.及Harford, J., Ann. Rev. Biochem. 51 (1982) 531-

554 ; McFarlane, I.G., Clin. Sci. 64 (1983) 127-135 ; Baenziger, J.U., Am. J. Path. 121 (1985) 382-391 ; Chan, V.T.及 Wolf, G., Biochem. J. 247 (1987) 53-62 ; Wright, A., 等人, Glycobiology 10 (2000) 1347-1355 ; Rifai, A., 等人, J. Exp. Med. 191 (2000) 2171-2182 ; Zukier, L.S., 等人, Cancer Res. 58 (1998) 3905-3908)、及生物學特異性活性 (Jefferis, R.及Lund, J., Engineering, 編者Capra, J.D., Chem. Immunol. Basel, Karger, 65 (1997) 111-128)。

影響糖化型態之因素已被研究，諸如，例如發酵性培養基中胎牛血清的存在(Gawlitsek, M., 等人, J. Biotechnol. 42(2) (1995) 117-131)；緩衝條件(Müthing, J., 等人, Biotechnol. Bioeng. 83 (2003) 321-334)；溶解氧濃度(Saba, J.A., 等人, Anal. Biochem. 305 (2002) 16-31 ; Kunkel, J.P., 等人, J. Biotechnol. 62 (1998) 55-71 ; Lin, A.A., 等人, Biotechnol. Bioeng. 42 (1993) 339-350)；寡糖之位置及構形、及宿主細胞類型及細胞生長狀態(Hahn, T.J.及Goochee, C.F., J. Biol. Chem. 267 (1992) 23982-23987 ; Jenkins, N., 等人, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 975-981)；細胞核苷酸-糖代謝(cellular nucleotide-sugar metabolism)(Hills, A.E., 等人, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 239-251)；營養限制(Gawlitsek, M., 等人, Biotechnol. Bioeng. 46 (1995) 536-544 ; Hayter, P.M., 等人, Biotechnol. Bioeng. 39 (1992) 327-335)，尤其係葡萄糖限制(Tachibana, H., 等人, Cytotechnology 16 (1994) 151-157)；及胞外pH(Borys, M.C., 等人, Bio/Technology 11 (1993) 720-724)。

藉由例如於NS0骨髓瘤細胞中免疫球蛋白的重組表現，已觀察到越來越多的寡甘露糖結構及截短寡糖結構(Ip, C.C., 等人, Arch. Biochem. Biophys. 308 (1994) 387-399 ; Robinson, D.K., 等人, Biotechnol. Bioeng. 44 (1994) 727-735)。在葡萄糖飢餓條件下，已於

CHO細胞、鼠類3T3細胞、大鼠肝癌細胞、大鼠腎臟細胞及鼠類骨髓瘤細胞中觀察到糖化的變化，諸如附接較小之前驅體寡糖或完全不存在寡糖部分(Rearick, J.I., 等人, J. Biol. Chem. 256 (1981) 6255-6261 ; Davidson, S.K.及Hunt, L.A., J. Gen. Virol. 66 (1985) 1457-1468 ; Gershman, H.及Robbins, P.W., J. Biol. Chem. 256 (1981) 7774-7780 ; Baumann, H.及Jahreis, G.P., J. Biol. Chem. 258 (1983) 3942-3949 ; Strube, K.-H., 等人, J. Biol. Chem. 263 (1988) 3762-3771 ; Stark, N.J.及Heath, E.C., Arch. Biochem. Biophys. 192 (1979) 599-609) 。 Wong, D.C.F., 等人, Biotechnol. Bioeng. 89 (2005) 164-177已報導以低麩胺醯胺/葡萄糖濃度為基礎之策略。

日本專利申請案JP 62-258252報導一種哺乳動物細胞之灌流式培養法，而US 5,443,968報導一種蛋白分泌型細胞之批次進料培養法。WO 98/41611報導一種細胞培養方法，其可有效使細胞適應於特徵為製造低乳酸鹽的代謝狀態。WO 2004/048556報導一種為了製造基質之細胞培養方法。於Elbein, A.D., Ann. Rev. Biochem. 56 (1987) 497-534中報導，當哺乳動物細胞於沒有葡萄糖下培養時，會將含甘露糖-5結構而非含甘露糖-9結構轉向蛋白質。Takuma, S., 等人在Biotechnol. Bioeng. 97 (2007) 1479-1488中報導，對pCO₂之依賴性會影響處於葡萄糖限制期間之CHO細胞的生長、新陳代謝及IgG製造。

【發明內容】

咸已發現，真核細胞所製造多肽的糖化型態中之甘露糖-5糖結構數量可根據培養過程中提供給細胞之葡萄糖量而加以改變。藉由減少可獲得之葡萄糖量，例如藉由使DGL值自1.0變化至較小值(例如0.8、0.6、0.5、0.4、或0.2)，即可獲得糖化型態中甘露糖-5糖結構數量之改變。DGL值或換言之每時間單位可獲得之葡萄糖量應在每時間單位維持恆定且處於所限定之較小值。

本發明所述第一態樣為一種於真核細胞中製造多肽之方法，在一個實施例中，該多肽為免疫球蛋白。該方法包括如下步驟：

- a) 提供一種包含可編碼該多肽之核酸的真核細胞，
- b) 將該細胞培養在其中葡萄糖限制度 (degree glucose limitation ; DGL)保持恆定，且其中DGL小於0.8之條件下，
及
- c) 自培養物回收該多肽，

其中，具甘露糖-5糖結構之多肽係占包括具甘露糖-5糖結構之多肽、多肽G(0)同功異型物、多肽G(1)同功異型物、及多肽G(2)同功異型物之總和的10%或以下。

【圖式簡單說明】

圖1：採用DGL控制，於批次進料模式下之活細胞密度(a)及細胞存活率曲線(b)；空心圓：初始細胞密度為 8×10^5 個細胞/毫升；實心三角形：初始細胞密度為 10×10^5 個細胞/毫升；空心方塊：初始細胞密度為 12×10^5 個細胞/毫升。

圖2：於依批次進料模式進行之免疫球蛋白製造中，DGL隨時間之趨向；圓：初始細胞密度為 8×10^5 個細胞/毫升；三角形：初始細胞密度為 10×10^5 個細胞/毫升；方形：初始細胞密度為 12×10^5 個細胞/毫升。

圖3：於依批次進料模式進行之免疫球蛋白製造過程中，基於DGL之進料曲線；圓：初始細胞密度為 8×10^5 個細胞/毫升；三角形：初始細胞密度為 10×10^5 個細胞/毫升；方形：初始細胞密度為 12×10^5 個細胞/毫升。

圖4：於DGL控制下，依批次進料模式之免疫球蛋白製造曲線；空心圓：初始細胞密度為 8×10^5 個細胞/毫升；實心三角形：初始細胞密度為 10×10^5 個細胞/毫升；空心方塊：初始細胞密度為 12×10^5 個細胞

/毫升；實心小圓：恆定進料方法；FR=0.02 g葡萄糖/時(對照)。

圖5：於批次進料培養細胞期間之DGL隨時間之曲線：方塊：每日進料一次，方形：每日進料兩次；三角形：根據單次進料曲線進料；X：根據雙次進料曲線進料。

【實施方式】

於一項實施例中，DGL保持在0.8至0.2的固定範圍內。於另一項實施例中，DGL保持在0.6至0.4的固定範圍內。於另一項實施例中，具甘露糖-5糖結構之多肽係占包括具甘露糖-5糖結構之多肽、多肽G(0)同功異型物、多肽G(1)同功異型物、及多肽G(2)同功異型物之總和的8%或以下。於另一項實施例中，該多肽為免疫球蛋白，於一項實施例中，免疫球蛋白為G類或E類免疫球蛋白。

本發明所述另一態樣為一種製造免疫球蛋白之方法，其包括下列步驟：

- a) 提供一種包含可編碼該免疫球蛋白之核酸的哺乳動物細胞，
- b) 將該細胞培養於培養基中，其中培養基中每時間單位可利用之葡萄糖量保持恆定，且限制細胞於每時間單位可自培養基利用最大量為80%以下，
- c) 自細胞或培養基回收該免疫球蛋白。

於一項實施例中，培養基中每時間單位可利用之葡萄糖量保持固定，且限制在80%至20%之數值範圍。於另一項實施例中，為60%至40%。於另一項實施例中，該培養基中之細胞為培養基中的活細胞。

本發明所述該等態樣的一項實施例中，該真核細胞係選自如下細胞：CHO細胞、NS0細胞、HEK細胞、BHK細胞、融合瘤細胞、PER.C6[®]細胞、昆蟲細胞、或Sp2/0細胞。於一項實施例中，該真核細

胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。本發明所述該等態樣的另一項實施例中，培養時之pH值為約pH 7.0至約pH 7.2。

本發明所述該等態樣之另一項實施例中，培養法為連續培養或批次進料培養。於另一項實施例中，該等方法包括最終純化多肽之步驟。於另一項實施例中，該細胞是培養6至20天或6至15天。於另一項實施例中，細胞是培養6至8天。

本發明所述另一態樣為一種包含免疫球蛋白之組合物，其中該組合物係藉由本發明所述方法製得。

於另一項實施例中，該免疫球蛋白為抗-IL-6R抗體。於另一項實施例中，該抗-IL-6R抗體包括托珠單抗(Tocilizumab)。於另一項實施例中，附接至抗-IL-6R抗體之甘露糖-5糖結構係8%或以下。於另一項實施例中，甘露糖-5糖結構係6%或以下。於另一項實施例中，甘露糖-5糖結構係4%或以下。於另一項實施例中，附接至抗-IL-6R抗體之G(0)糖結構係自40%至46%範圍，且附接至抗-IL-6R抗體之G(2)糖結構係自9%至11%範圍。

本發明闡述一種製造免疫球蛋白之方法，其包括下列步驟：

- a) 將包含可編碼免疫球蛋白之核酸的哺乳動物細胞培養在DGL小於0.8的恆定狀態(亦即，於每時間單位可利用之葡萄糖量是恆定的，且該細胞於每時間單位可利用之葡萄糖最大量為80%或以下)，及
- b) 自細胞或培養基回收該免疫球蛋白。

藉由本發明所述方法，可獲得一種免疫球蛋白，其中具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白之量取決於所調整之DGL值而定，且其中該具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白之量表示為占包括具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白、免疫球蛋白G(0)同功異型物、及免疫球蛋白G(1)同功異型物、及免疫球蛋白G(2)同功異型物之總數之小部分。於一項實施例

中，DGL為0.8至0.2。於該項實施例中，該小部分為10%或以下。於另一項實施例中，DGL為0.6至0.4。於該實施例中，該小部分為6%或以下。藉由本發明所述方法，可獲得一種免疫球蛋白，其中具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白係占包括具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白、免疫球蛋白G(0)同功異型物、免疫球蛋白G(1)同功異型物、及免疫球蛋白G(2)同功異型物之總量的10%或以下。於另一項實施例中，該小部分為於液態層析法中所測定之面積%小部分。於一項實施例中，DGL維持在0.8至0.2。於另一項實施例中，DGL維持在0.6至0.2。於另一項實施例中，DGL維持在0.6至0.4。於一項實施例中，細胞於每時間單位利用之最大葡萄糖量為：基於測定至少五個培養物，培養物中可利用之葡萄糖之平均量，其中於培養物中所有化合物均過量，亦即沒有化合物會限制細胞生長。於一項實施例中，於培養第七天測定該小部分。

適用於進行本發明且為相關技術者熟知之方法及技術闡述於例如如下文獻中：Ausubel, F.M.(編者)，*Current Protocols in Molecular Biology*，第I至III卷(1997)，Wiley及 Sons；Sambrook, J., 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory出版社，Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)；Glover, N.D.(編者)，*DNA Cloning: A Practical Approach*, 第I及II卷(1985)；Freshney, R.I.(編者)，*Animal Cell Culture* (1986)；Miller, J.H.及Calos, M.P. (編者)，*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Cold Spring Harbor Laboratory出版社，Cold Spring Harbor, N.Y. (1987)；Watson, J.D., 等人，*Recombinant DNA*, 第二版，N.Y., W.H. Freeman and Co (1992)；Winnacker, E.L., *From Genes to Clones*, N.Y., VCH出版商(1987)；Celis, J.(編者)，*Cell Biology*，第二版，Academic出版社(1998)；Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic*

Techniques, 第二版, Alan R. Liss公司, N.Y. (1987)。

利用重組DNA技術能夠製得多種多肽衍生物。該等衍生物例如可藉由取代、改變或交換而在個別或若干個胺基酸位置上加以修飾。可例如藉由位點導向型突變術進行衍生化。熟習此項技術者很容易地可進行該等改變 (Sambrook, J., 等人, Molecular Cloning : A laboratory manual, 第三版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory出版社, New York, USA ; Hames, B.D. 及 Higgins, S.G., Nucleic acid hybridization-a practical approach (1985) IRL 出版社, Oxford, England)。

術語「核酸」係指可編碼多肽之天然存在或部份非天然存在或完全非天然存在之核酸分子。核酸可以是經分離獲得或以化學方法合成之DNA-片段的一部份。核酸可整併至另一核酸中, 例如, 整併至表現質體或真核細胞之基因組/染色體。術語「質體」包括穿梭質體及表現質體。質體通常亦包括原核細胞增殖單元, 其包含原核細胞質體之複製起點(例如ColE1複製起點)及可選擇之標記(例如, 胺苄西林或四環素抵抗基因), 以分別用於進行質體複製及篩選質體。熟習此項技術者已熟知用於將例如多肽之胺基酸序列轉化成可編碼相關胺基酸序列之對應核酸的製程及方法。因此, 核酸的特徵在於由個別核苷酸所組成之核酸序列, 且同樣地, 其特徵在於由該核酸所編碼之多肽的胺基酸序列。

術語「表現卡匣」係指一種核酸, 其含有用於表現、及視需要用於分泌所含之細胞中之/來自細胞之結構基因所必須之元件, 諸如啟動子、聚腺苷酸化位點、及3'-與5'-未轉譯區。

術語「基因」係指例如染色體或質體中之片段, 其係表現多肽所必須的。除了編碼區, 基因還包含其他功能元件, 包括啟動子、內含子、及一或多種轉錄終止子。「結構基因」係指不包括信號序列之

基因編碼區。

術語「表現」係指結構基因在細胞內的轉錄作用及轉譯作用。結構基因在細胞中之轉錄作用程度可以細胞中所存在之對應mRNA之含量加以測定。例如，轉錄自所選定核酸之mRNA可藉由PCR或藉由北方式雜交作用加以定量(參見例如Sambrook 等人(等))。由核酸所編碼之多肽可藉由多種方法加以定量，例如藉由ELISA、藉由測定多肽的生物活性、或藉由採用與此活性無關的方法，諸如利用識別並結合多肽之抗體的西方墨點法或放射免疫分析法(參見例如Sambrook等人(等))。

術語「細胞」係指已導入可編碼多肽之核酸的細胞，在一項實施例中，該多肽為異源性多肽。術語「細胞」包括用於增殖質體/載體之原核細胞、及用於表現結構基因之真核細胞。於一項實施例中，用於表現免疫球蛋白之真核細胞為哺乳動物細胞。於另一項實施例中，該哺乳動物細胞係選自如下細胞：CHO細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、HEK細胞、BHK細胞、PER.C6[®]細胞、及融合瘤細胞。真核細胞可另外選自昆蟲細胞，諸如毛毛蟲(caterpillar)細胞(*Spodoptera frugiperda*、sf細胞)、果蠅細胞(*Drosophila melanogaster*)、蚊蟲細胞(*Aedes aegypti*、*Aedes albopictus*)、及蠶細胞(*Bombyx Mori*)，及類似者。

術語「多肽」係指藉由肽鍵相連之胺基酸殘基聚合物，其係天然產生或經合成產生的。具約20個以下胺基酸殘基之多肽可稱為「肽」。具100個以上胺基酸殘基之多肽、或包含一個以上多肽之共價及非共價聚集體可稱為「蛋白質」。多肽可包含非胺基酸組分，諸如糖基。非胺基酸組分可藉由產生多肽之細胞添加至多肽中，且其可隨細胞類型而有所不同。本發明所界定多肽之形式為：依N末端至C末端方向之胺基酸序列。此外，通常並不明確指出糖基，但其是存在

的。

術語「異源性DNA」或「異源性多肽」係指非天然存在於指定細胞中之DNA分子或多肽、或一類DNA分子族群或一類多肽族群。對特定細胞為異源性之DNA分子可含有衍生自該類細胞種類的DNA(亦即內源性DNA)，只要該DNA係與非宿主DNA(亦即外源性DNA)組合即可。例如，將含有非該細胞DNA片段(例如編碼多肽之DNA片段)以人為操作方式連接至該細胞DNA片段(例如，包含啟動子)之DNA分子即可被視為是異源性DNA分子。類似地，異源性DNA分子可包括與外源性啟動子以操作方式連接的內源性結構基因。由異源性DNA分子編碼之多肽為「異源性」多肽。

術語「表現質體」係指包含至少一個可編碼待表現多肽之結構基因的核酸。表現質體通常包括原核質體增殖單元，其包括例如大腸桿菌之複製起點及選擇標記、真核細胞選擇標記、及一或多個用於表現感興趣之結構基因的表現卡匣，表現卡匣分別又包含啟動子、至少一個結構基因、及包括聚腺苷酸化信號之轉錄終止子。基因表現通常處於啟動子之控制之下，且該結構基因稱為與該啟動子「以操作方式連接」。類似地，若調節元件介導核心啟動子之活性，則調節元件與核心啟動子係以操作方式連接。

術語「經分離多肽」係指一種多肽，其基本上沒有與細胞結合之組分，諸如碳水化合物、脂質、或其他蛋白質或非蛋白質雜質，這些組分不會以共價方式與多肽結合。在某些實施例中，經分離多肽製劑中含有高度純化形式之多肽，亦即純度至少約80%，純度至少約90%，純度至少約95%，純度95%以上，或純度99%以上。一種顯示特定蛋白質製劑含有經分離多肽的方法為：將製劑進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-page)，並將凝膠進行考馬斯亮藍染色(Coomassie Brilliant Blue staining)，隨後會出現特定的條帶。然而，

術語「經分離」並不排除存在呈其他物理形式(諸如二聚體)、或呈糖化或衍生形式之相同多肽。

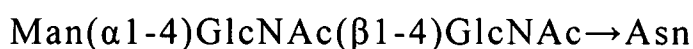
免疫球蛋白大體上分成5種不同類別：IgA(A類免疫球蛋白)、IgD、IgE、IgG及IgM。該等類別之免疫球蛋白之間的總體結構及/或胺基酸序列不同，但具有相同結構單元。完整免疫球蛋白係由兩對多肽鏈組成，每對包含免疫球蛋白輕多肽鏈(簡稱輕鏈)、及免疫球蛋白重多肽鏈(簡稱重鏈)。該等鏈又包含可變區及恆定區。於輕鏈中，可變區及恆定區皆係由一個結構域組成，而於重鏈中，其可變區係由一個結構域組成，且其恆定區包含至多五個結構域(沿N末端至C末端方向)：C_H1-結構域、視需要存在之鉸鏈區結構域、C_H2-結構域、C_H3-結構域、及視需要存在之C_H4-結構域。免疫球蛋白可斷裂成Fab-區及Fc-區。整個輕鏈、重鏈可變結構域及C_H1結構域係稱為Fab區(抗原結合區片段)。Fc區包含C_H2-結構域、C_H3-結構域、及視需要存在之C_H4-結構域。

如文中所用，術語「免疫球蛋白」係指由一或多種多肽組成之蛋白質。免疫球蛋白之編碼基因包含不同恆定區基因及多種免疫球蛋白可變區基因。於一項實施例中，術語「免疫球蛋白」包括單株抗體及其片段，諸如經分離重鏈、或重鏈恆定區、及融合多肽(包含至少一條免疫球蛋白重鏈C_H2-結構域)。本發明所述方法一項實施例中，免疫球蛋白為完整免疫球蛋白，於另一項實施例中，免疫球蛋白為完整免疫球蛋白之Fc區。於另一項實施例中，免疫球蛋白為免疫球蛋白、或免疫球蛋白片段、或免疫球蛋白共軛物。

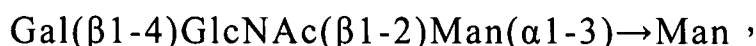
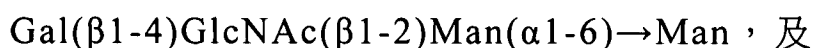
術語「免疫球蛋白片段」係指一種多肽，其至少包含免疫球蛋白 δ 、 ϵ 、或 α 重鏈之C_H2-結構域、及/或免疫球蛋白 ϵ 或 δ 重鏈之C_H3-結構域。亦包括其衍生物及變體，其中C_H2-或C_H3-結構域中之N-糖基元Asn-Xaa-Ser/Thr沒有改變。

術語「免疫球蛋白結合物」係指一種多肽，其包含免疫球蛋白 δ 、 ϵ 、或 α 重鏈之至少 C_{H2} -結構域、及/或免疫球蛋白 ϵ 或 δ 重鏈之 C_{H3} -結構域、及與之融合之非免疫球蛋白多肽。其中 C_{H2} -或 C_{H3} -結構域中之N-糖基元Asn-Xaa-Ser/Thr並未改變。

附接至免疫球蛋白重鏈 C_{H2} -結構域上之Asn²⁹⁷(IgG、IgE)或Asn²⁶³(IgA)及/或 C_{H3} -結構域上之Asn³⁹⁴、Asn⁴⁴⁵、或Asn⁴⁹⁶(IgE、IgD)的寡糖具有雙觸型結構(Mizuochi, T., 等人, Arch. Biochem. Biophys. 257 (1987) 387-394), 亦即其係由如下核心結構組成：



且視需要於末端GlcNAc殘基處具有Fuc($\alpha 1-6$)鍵結。兩個外臂係與核心結構上之末端甘露糖鍵結，其具有如下通式：



其中，末端半乳糖殘基係視需要存在(Man=甘露糖，GlcNAc=N-乙酰基葡萄糖、Gal=半乳糖；Fuc=果糖)。

表1：免疫球蛋白之糖化位點

免疫球蛋白類別	可附接糖結構之殘基
IgG	Asn 297
IgE	Asn 255、Asn 297、Asn 361、Asn 371、Asn 394
IgA	Asn 263、Asn 459
IgD	Asn 445、Asn 496
IgM	Asn 395

術語「免疫球蛋白G(0)同功異型物之量、免疫球蛋白G(1)同功

異型物之量、及免疫球蛋白G(2)同功異型物之量」係指以N鍵結至免疫球蛋白中天冬醯胺(Asn)之另外、異源性、雙觸型寡糖含量總和。G(2)同功異型物在寡糖結構之各外臂上皆具有末端半乳糖殘基，G(1)同功異型物僅在經(α 1-6)或(α 1-3)鍵結之外臂上具有半乳糖殘基，且G(0)同功異型物在兩條外臂上皆無半乳糖殘基。

術語「甘露糖-5糖結構」係指與多肽之Asn殘基鍵連的寡聚甘露糖結構，其包括如下殘基或係由如下殘基組成：五個甘露糖殘基及兩個N-乙醯基葡萄糖核心殘基，其形成三觸型結構。

本發明所述一態樣係一種製造免疫球蛋白之方法，其包括下列步驟：

- a) 將含有可編碼免疫球蛋白之一或多種核酸之真核細胞(較佳為哺乳動物細胞)培養於培養基中，其中於每時間單位可利用培養基之葡萄糖量保持恆定，且限制真核細胞在所培養每時間單位可利用最大量為80%以下，及
- b) 自細胞或培養基回收該免疫球蛋白，並藉此製造免疫球蛋白。

利用該方法，可獲得一種免疫球蛋白，其包含最多10%具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白。10%係基於如下量之總和計算所得：具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白之量、免疫球蛋白G(0)同功異型物之量、免疫球蛋白G(1)同功異型物之量、及免疫球蛋白G(2)同功異型物之量。

術語「葡萄糖限制度」及其簡寫「DGL」於文中可相互交換使用，其係指培養物中單個細胞之當前比葡萄糖消耗速率相對於該單個細胞或相同種類之單個細胞之最大已知比葡萄糖消耗速率的比例。葡萄糖限制度之定義為

$$DGL = \frac{qGlc}{qGlc_{max}}$$

其中 q_{Glc} = 單個細胞之當前比葡萄糖消耗速率；

$q_{Glc_{max}}$ = 該單個細胞或相同類型之單個細胞之最大已知比葡萄糖消耗速率。

DGL可在DGL_{維持}與1之間變化，其中DGL_{維持} (<1且>0)係指完全生長限制，且1係指無限制或葡萄糖過量。

將糖結構導入多肽(例如免疫球蛋白)是為轉譯後修飾作用。由於各細胞之糖化加工不完全，每一表現之多肽獲得包含不同糖結構之糖化型態。因此，自表現該多肽之細胞所獲得之多肽係呈組合物形式，其包含相同多肽(亦即具有相同胺基酸序列之多肽)之不同糖化形式。個別糖結構之總和稱為糖化型態，包括例如具完全缺失之糖結構、經不同加工之糖結構、及/或組成不同之糖結構之多肽。

一種糖結構為甘露糖-5糖結構(亦稱為高-甘露糖、Man5、M5、或寡聚-甘露糖)。業已報導，經重組製得之具甘露糖-5糖結構之多肽所占部分會隨培養時間延長或處於葡萄糖飢餓條件下而增加(Robinson, D.K., 等人, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 727-735 ; Elbein, A.D., *Ann. Rev. Biochem.* 56 (1987) 497-534)。

咸已發現，可基於在培養製程中對細胞提供之葡萄糖量而改變由真核細胞所製造多肽之糖化型態中之甘露糖-5糖結構數量。已發現，藉由減少葡萄糖量，亦即藉由使DGL值自1.0變化至較小數值(例如0.8、0.6、0.5、0.4、或0.2)，可改變糖化型態中之甘露糖-5糖結構量。於一項實施例中，將DGL值保持恆定，諸如0.8至0.2、或0.6至0.4之範圍內。亦即，可在限制所培養細胞之可利用葡萄糖量的條件下製造多肽(於一項實施例中為免疫球蛋白)，以使所獲得之多肽中具有有限量之甘露糖-5糖結構糖化型態。已發現，採用每時間單位可獲得之葡萄糖量在該細胞每時間單位可利用最大葡萄糖量(於一項實施例中為呈指數生長之細胞)之80%或以下(亦即DGL為0.8或以下)進行培養

所產生之多肽的糖化型態中，甘露糖-5糖結構量不同於DGL為1.0之培養基，亦即其量減少。於一項實施例中，細胞密度為活細胞密度。此外，所獲得之多肽產量得以維持。

術語「於每時間單位細胞可利用之最大葡萄糖量」係指於無任何營養素限制之培養基中，由處於指數生長期且處於較佳生長條件下之單個細胞於每時間單位消耗或利用或代謝之最大葡萄糖量。因此，每時間單位細胞可利用之最大葡萄糖量的測定法為：測定於無任何營養素限制之培養基中，由處於指數生長期且處於較佳生長條件下之細胞於每時間單位所代謝之葡萄糖量。進一步增加可獲得之葡萄糖量並不會使每時間單位由該細胞所利用之最大葡萄糖量進一步增加(亦即改變)。該量之定義為單個細胞之最大葡萄糖消耗量。其並無意於指經遺傳學改質之細胞不會具有更高之最大葡萄糖消耗量。或者，可基於先前之培養及監測數據，確定每時間單位可由細胞利用之最大葡萄糖量。

本發明所述方法特別易於進行，其最易於測定及控制，且特別經濟。

在無限制情況下(例如，不充分之營養素供應)，經培養細胞會以不經濟之方式，以最大速率生長並消耗營養素。其中一種所消耗之培養基營養素為葡萄糖，經培養細胞代謝葡萄糖係為產生能量及用於細胞代謝的建構基礎。過量葡萄糖存在下，該細胞的代謝作用係依最大葡萄糖轉化速率進行。可由細胞於每時間單位利用之最大葡萄糖量的測定方法為：於存在過量葡萄糖下，採用或處於與當利用限量葡萄糖(亦即利用於每時間單位可獲得葡萄糖量少於可由該細胞利用之葡萄糖量)進行培養時之相同培養條件進行培養時，處於指數期生長之細胞的葡萄糖消耗量。藉由測定於固定時間段開始及結束時之細胞密度及葡萄糖濃度可很容易計算出最大量。該數值通常處於0.006至190

mmol/小時/ 10^9 個細胞之範圍內(Baker, K.N., 等人, Biotechnol. Bioeng. 73 (2001) 188-202; WO 98/41611; Müthing, J., 等人, Biotechnol. Bioeng. 83 (2003) 321-334; WO 2004/048556)。於一項實施例中, 於pH 7.0下之標準製程條件下, $q_{\text{Glc}_{\text{max}}}$ 為約0.142 mmol/時/ 10^9 個細胞。

於一項實施例中, 本發明所述方法係在其中每時間單位可獲得葡萄糖量保持恆定, 且為可由細胞於每時間單位利用最大葡萄糖量的80%或以下之條件下進行($0.8 \geq \text{DGL} > 0$), 於一項實施例中, 可獲得之葡萄糖量恆定維持在60%或以下($0.6 \geq \text{DGL} > 0$), 於一項實施例中, 為50%或以下($0.5 \geq \text{DGL} > 0$), 且於另一項實施例中, 為約40%。如本申請案中所用, 術語「約」係指該數值並非精確之數值, 其僅為一段範圍之中心, 其中數值可變化至多10%, 亦即術語「約40%」係指處於自44%至36%之範圍($\text{DGL} = 0.44$ 至 0.36)。

於一項實施例中, 具有恆定維持在細胞於每時間單位利用最大葡萄糖量之該培養是介於80%至10%範圍內($0.8 \geq \text{DGL} \geq 0.1$)之每時間單位可獲得之葡萄糖量。於另一實施例中, 可獲得之葡萄糖量恆定維持在60%至10%之範圍內($0.6 \geq \text{DGL} \geq 0.1$)。於另一項實施例中, 可獲得之葡萄糖量恆定維持在50%至10%之範圍內($0.5 \geq \text{DGL} \geq 0.1$)。於另一項實施例中, 可獲得之葡萄糖量恆定維持在45%至20%之範圍內($0.45 \geq \text{DGL} \geq 0.2$)。於另一項實施例中, 可獲得之葡萄糖量維持為80%至60%($0.8 \geq \text{DGL} \geq 0.6$)。

於一項實施例中, 本發明方法包括於其中DGL維持恆定且數值為約0.4之條件下培養細胞之步驟, 其中該培養法包括開始之DGL為1.0至0.5, 降低DGL至約0.4, 且隨後維持DGL恆定。於一項實施例中, 於100小時內降低DGL。術語「維持DGL恆定」及其公克當量係指在一段時間內維持該DGL數值, 亦即DGL數值之變化幅度為該數值之

10%以內(參見例如圖1)。

該免疫球蛋白是在製造後回收，可直接回收或在裂解細胞之後回收。於一項實施例中，利用熟習此項技術者所知之方法純化所收集之免疫球蛋白。用以蛋白質純化之各種不同的方法已建立並廣為知曉，諸如利用微型蛋白質之親和層析術(例如蛋白質A或蛋白質G親和層析術)、離子交換層析術(例如陽離子交換術(羧甲基樹脂)、陰離子交換術(胺基乙基樹脂)及混合模式交換術、親水吸附術(例如利用 β -巰基乙醇及其他SH配體)、疏水性相互作用或芳香族吸附層析術(例如利用苯基瓊脂糖凝膠(phenyl-sepharose)、氮雜-親芳烴樹脂、或間胺基苯基硼酸)、金屬螯合親和層析術(例如利用Ni(II)-及Cu(II)-親和材料)、尺寸排除層析法、及電泳法(諸如凝膠電泳法、毛細電泳法)(Vijayalakshmi, M.A., *Appl. Biochem. Biotech.* 75 (1998) 93-102)。

例如，用以純化免疫球蛋白之方法一般包括多步驟之層析術。於第一步驟中，(例如)利用蛋白質A或G，藉由親和層析術，自免疫球蛋白溶離份中將非免疫球蛋白型多肽分開。隨後，(例如)進行離子交換層析術來分離各免疫球蛋白類別，並去除微量蛋白質A，該蛋白質A已自第一管柱共溶離掉。最後，採用層析步驟，將免疫球蛋白單體從多聚物及相同類別之片段中分開。

熟習此項技術者已熟知一般之層析法及其用法。參見例如 *Chromatography*，第五版，A部份：Fundamentals and Techniques, Heftmann, E.(編者)，Elsevier Science出版公司，New York, (1992)；Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Deyl, Z. (編者)，Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998)；Chromatography Today, Poole, C. F.及Poole, S. K., Elsevier Science 出版公司，New York, (1991)；Scopes, R.K., *Protein Purification：Principles and Practice* (1982)；Sambrook, J., 等

人(編者), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory出版社, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; 或 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. M., 等人(編者), John Wiley & Sons公司, New York (1990)。

於一項實施例中, 經回收免疫球蛋白之特徵為具有甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白之量相對於由甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白、免疫球蛋白G(0)同功異型物、免疫球蛋白G(1)同功異型物、及免疫球蛋白G(2)同功異型物所組成之類群之量的百分比。利用如文中所述之方法, 於一項實施例中, 具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白之量係占該類群之10%或以下, 於另一項實施例中, 係占該類群之8%或以下, 且於另一項實施例中, 係占該類群之6%或以下。

在某些實施例中, 本發明所述方法可為連續培養法、批次進料培養法、或其組合, 例如開始為批次進料培養法, 且隨後轉換成連續培養法。此外, 本發明所述方法可依不同方式進行。例如, 於一項實施例中, 在採用DGL值低於1.0之條件(亦即例如於其中每一時間單位, 培養物中可獲得葡萄糖量為細胞利用之最大葡萄糖量之80%或以下的條件下)培養之前, 利用過量葡萄糖(亦即DGL值為1.0)進行培養。於另一項實施例中, 開始以與標準培養基所含相同之葡萄糖量(例如1至10 g/l培養基)進行培養, 例如以獲得預定之細胞密度, 例如於一項實施例中為 10^5 個細胞/毫升。於另一項實施例中, 開始於存在過量葡萄糖(亦即DGL為1.0)下進行培養, 並於每一時間單位內添加一定量之葡萄糖, 其為可由所培養之細胞於每時間單位可利用之最大葡萄糖量之80%或以下。於另一項實施例中, 於培養期間, 一旦培養基中之葡萄糖量降至或低於預定數值, 即開始進料。於後兩種情形中, 培養基中可獲得之葡萄糖量之減少係由於所培養之細胞進行新陳代謝。

於一項實施例中，於文中所述之方法中，於每時間單位可獲得或所添加之葡萄糖量少於可利用之最大葡萄糖量，且維持為相同數值，亦即恆定。例如，若可獲得之量為於每時間單位可利用之最大葡萄糖量之50%，則可於進行限制量葡萄糖進料之方法的所有時間單位中獲得該量。必須指出，該數值為相對數值。雖然，於培養期間，活細胞密度在變化(亦即活細胞密度開始時增加，到達最大值，且隨後再次下降)，但可獲得之葡萄糖的絕對數量亦相應變化，因為其係視絕對活細胞密度而變化之相對數值。當相對數值保持恆定(亦即為例如80%)，但絕對參照數值在變化時，相關之絕對數值亦在變化(80%之增加之數值亦增加)。

術語「每一時間單位」係指固定之時間段，諸如1分鐘、1小時、6小時、12小時、或24小時。於一項實施例中，時間單位為12小時或24小時。如本申請案所用，術語「每一時間單位可獲得之葡萄糖量」係指如下兩部份之總和：1)於固定之時間段開始時含於培養基中之葡萄糖量，及2)於該時間單位內所添加(亦即進料)之葡萄糖量。因此，將一定量葡萄糖添加至細胞培養基中，例如至培養罐中，其使培養基中之葡萄糖量自固定時間段開始時之數值增加至預定量。所添加之該數量之葡萄糖可例如呈溶解於水中，溶解於緩衝液中，或溶解於營養培養基中之固體之形式，其中之水及緩衝液不含有葡萄糖。計畫添加之葡萄糖量等於計畫獲得之葡萄糖量減去於培養罐之培養基中所存在之葡萄糖量。添加該量葡萄糖之方法可為單次添加、多次添加少量等份、或於上述時間單位內連續添加。

本發明所述方法適用於任一類型之培養法及任一培養規模。例如，於一項實施例中，將該方法用於連續或批次進料製程；於另一項實施例中，培養基體積為從100毫升至50,000公升，於另一項實施例中，為100公升至10,000公升。本發明所述方法適用於製造含有10%或

以下、或8%或以下、或6%或以下具甘露糖-5糖結構之免疫球蛋白的免疫球蛋白。於一項實施例中，免疫球蛋白為免疫球蛋白G或E。本發明所述方法包括真核細胞，其中該細胞包括可編碼免疫球蛋白重鏈或其片段之核酸、及可編碼免疫球蛋白輕鏈或其片段之核酸。該真核細胞於一項實施例中係選自：CHO細胞、NS0細胞、BHK細胞、融合瘤細胞、PER.C6[®]細胞、Sp2/0細胞、HEK細胞、及昆蟲細胞。

熟習此項技術者熟悉培養基組合物及組分、及使不同細胞最佳生長所需之營養素濃度、及葡萄糖量，且會選擇適宜之培養基來培養細胞(參見例如 Mather, J.P., 等人, Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2 (1999) 777-785)。

於一項實施例中，由根據本發明所述方法進行培養之細胞所必須獲得葡萄糖量之計算方法為：活細胞密度(通常係於培養之某一時間點，於培養罐中獲得)乘以培養罐容積，乘以每時間單位由呈指數生長之細胞之細胞可利用之最大葡萄糖量，乘以計畫之DGL。更詳言之，從實際時間點前之培養基中葡萄糖濃度趨向及培養基中細胞密度趨向，可預測葡萄糖濃度及細胞密度之未來趨向。利用該種預測，根據如下公式計算出為獲得計畫之DGL而必須向培養基添加之葡萄糖量：

(計畫添加之葡萄糖[皮克葡萄糖/毫升/時])=

(現行細胞密度)[個細胞/毫升])×

(細胞之最大葡萄糖消耗速率[皮克葡萄糖/個細胞/時])×(DGL值)-

於培養罐中，培養基中已存在之葡萄糖量。

於一項實施例中，培養物之pH值介於pH 6.5至pH 7.8。於另一項實施例中，pH值介於pH 6.9至pH 7.3。於另一項實施例中，pH值介於pH 7.0至7.2。咸已發現且已於實例1中所示，在固定進料方法中，較

之pH值7.2，限制葡萄糖進料與pH值7.0之組合，可有效調節M5含量至所限定之數值，亦即低於8%。在分別於pH值7.0或7.2下，依批次進料方法進行之培養過程中，已發現，利用該種DGL控制法，M5含量可調節至5.5%以下。已發現，藉由降低培養物之pH值，M5量會增加，此係由於DGL值降低之故。

於一項實施例中，於溫度27°C至39°C下進行培養，於另一項實施例中，為35°C至37.5°C。

利用如本發明所述方法，可製得任一種含有糖結構之多肽，諸如免疫球蛋白、干擾素、細胞激素、生長因子、激素、纖維蛋白溶酶原活化因子、紅細胞生成素及類似物。

可利用任一種用於培養哺乳動物細胞之攪拌型或振盪型培養裝置來依照本發明所述方法進行培養，例如發酵罐型罐式培養裝置、氣提型培養裝置、培養瓶型培養裝置、攪拌瓶反應器型培養裝置、微載體型培養裝置、流化床型培養裝置、中空纖維型培養裝置、旋轉瓶型培養裝置、或填充床型培養裝置。

於一項實施例中，進行本發明所述方法至多達15天。於另一項實施例中，該培養可達6至15天。於一項實施例中，該免疫球蛋白為抗-IL-6R抗體。

利用(例如)於EP 0 409 607、EP 0 628 639、US 5,670,373、或US 5,795,965(其全文係以引用的方式併入文中)中所報導之針對人類介白素-6受體之抗體來舉例說明本發明方法，因為於進行本發明時，吾人實驗室可足量獲得該種抗體及表現該抗體之細胞株。此並無意用以限制本發明的範圍。

下列實例及圖示可用以幫助理解本發明，本發明之真正範圍係示於隨附之專利申請範圍中。咸應瞭解，在不脫離本發明精神下，可變更所提出的程序。

實例

材料及方法

細胞株：

所含經重組製得之免疫球蛋白中甘露糖-5糖結構量可改變之CHO細胞株實例為包含可編碼如EP 0 409 607及US 5,795,965中之抗-IL-6受體抗體的核酸之CHO細胞株。為培養該重組CHO細胞，可使用任一培養基，只要可根據本發明方法補充葡萄糖。培養基實例為IMDM、DMEM或Ham's F12培養基或其組合，其已經調試適於文中所述之方法，其中已選定培養基組分對葡萄糖之質量比。培養基中亦可不含葡萄糖，而對培養物另外添加葡萄糖。

培養：

在1公升或2公升發酵容器中培養可表現抗-IL-6R抗體之CHO細胞。進料培養基中含有15至40公克/公升葡萄糖。可利用另外含有(例如)400公克/公升葡萄糖之濃縮溶液添加葡萄糖。在pH值為pH 7.0至pH 7.2之範圍進行培養。

測定糖結構：

為分析IgG糖化型態，採用根據Kondo等人(Kondo, A., 等人, Agric. Biol. Chem. 54 (1990) 2169-2170)之方法。利用小規模蛋白質A管柱，自離心後之培養基上清液純化出IgG。利用N-醣苷酶F(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)釋放出純淨之IgG之寡糖，並於還原末端利用2-胺基吡啶加以標記。藉由反相層析術(HPLC)分析經標記之寡糖。根據質譜及寡糖標準訂出各峰。

測定葡萄糖：

利用YSI 2700 SELECT™分析計(YSI, Yellow Springs, OH, USA)，採用製造商手冊中之方法，測定葡萄糖濃度。

測定活細胞密度：

採用自動造影處理及分析系統(CEDEX[®] ; Innovatis, Germany)及台盼藍染料排除法(trypan blue dye-exclusion method)測定活細胞密度。

實例1

DGL控制及pH對抗體產量及甘露糖-5糖結構(M5)含量之影響

利用可製造人源化抗-人類IL-6受體抗體之CHO細胞株進行測試，該細胞株係根據闡述在日本未經檢查之專利公開案第99902/1996號中之對照實例2中之方法，利用如於國際專利申請公開案第WO 92/19759號(對應於US 5,795,965、US 5,817,790、及US 7,479,543)之實例10中所述之人類延長因子I α 啟動子製得。

於恆定絕對量進料方法中，觀察pH控制對免疫球蛋白製造之影響。表2顯示，於恆定進料模式中，pH控制對抗體寡糖製造及M5含量之影響。

表2：於恆定絕對量進料模式中，pH控制之效應。

編號	於第幾天採樣	pH設定點	DGL	相對抗體濃度[%]	M5含量[%]
1	7	7.0	0.80-0.45	90.1	3.6
2	7	7.0	0.49-0.21	100	5.4
3	7	7.2	0.73-0.35	135.1	11.7
4	7	7.2	0.69-0.30	120	10.8
5	7	7.2	0.35-0.29	127	25.2
6	7	7.2	0.64-0.25	122.5	8.7

於pH 7.0下，甘露糖-5糖結構(M5)量被調節至5.5%以下。由於細胞密度之變化，DGL值自0.80下降至0.21。另一方面，於pH 7.2下，M5量係在8.7%與25.2%之間波動，且高於處於pH 7.0下時。於pH 7.2下之DGL值係自0.73變化至0.25。此外，於該情形下，於pH 7.2下之免疫球蛋白產量高於120%(對比於pH 7.0下之相對數值)。於恆定絕對

數量進料方法中，更高免疫球蛋白產量誘發M5含量增加8%以上。因此，於恆定絕對數量進料方法中，較之pH 7.2控制方法，採用pH 7.0控制可有效調節M5含量至較低數值。

亦採用DGL控制法(=恆定相對數量進料方法)，於不同pH值下，依批次進料模式製造免疫球蛋白，並分析M5含量。表3說明，於開始進料後之第2至第3天進行之DGL控制、及pH對免疫球蛋白產量及M5含量之影響。

表3： 於批次進料模式中，DGL及pH控制之影響

編號	於第幾天採樣	pH設定點	DGL	相對抗體濃度[%]	M5含量[%]
1	7	7.0	0.8	102.7	2.9
2	7	7.0	0.6	96.2	2.7
3	7	7.0	0.4	100.0	3.3
4	7	7.0	0.3	91.1	3.9
5	7	7.0	0.2	83.0	4.0
6	7	7.2	0.6	100.9	4.4
7	7	7.2	0.4	90.1	5.3

於pH 7.0下，於DGL為0.2至0.8下，採用DGL控制法。結果，M5含量被調節至等於或小於4.0%。另一方面，於pH 7.2下，於0.4至0.6範圍內調節DGL值。此時，M5含量可控制在5.5%以下。

實例2

於不同DGL值下之培養

採用不同DGL值培養包含可編碼抗-IL-6R抗體之核酸的CHO細胞。結果概括於下表4中。

表4： DGL控制值對免疫球蛋白產量及M5含量之影響

編號	於第幾天採樣	DGL	相對抗體濃度 [%]	M5含量 [%]	G(0)含量 [%]	G(1)含量 [%]	G(2)含量 [%]
1	7	0.6-0.5	107.3	3.5	38.4	46.7	11.4
2	7	0.4	111.0	3.5	38.8	46.9	10.8
3	7	0.2	111.5	4.5	40.1	45.2	10.1
4	8	恆定進料	100.0	5.9	43.8	42.0	8.3

該結果說明，對比於恆定進料法，DGL值為0.4至0.6之DGL受控策略使甘露糖-5含量減少。

實例3

採用不同進料策略進行培養

採用一個DGL值，但採用不同進料策略，培養包含可編碼抗-IL-6R抗體之核酸的CHO細胞。結果概括於下表5中。

表5：進料策略對存活率及活細胞密度之影響

編號	於第幾小時後採樣[h]	DGL	進料	調整	存活率 [%]	活細胞密度 [$\times 10^6$ 個細胞/毫升]
1	112	0.4	單次	每日	71	5.1
2	115	0.4	雙次	每日	75	5.8
3	115	0.4	單次	根據曲線	73	4.9
4	115	0.4	雙次	根據曲線	70	5.1

於單次進料實驗中，使用含有所有營養素及葡萄糖之單次進料。於雙次進料實驗中，使用兩種進料：第一進料含有所有營養素及低濃度之葡萄糖(15 g/l)，且第二進料含有高濃度之葡萄糖。呈如下兩組進行該等不同進料實驗：一組每日調整進料速率，且另一組係根據基於先前培養過程中之活細胞密度發展記錄的預定曲線來調整進料速率。如表5中可見，存活率及活細胞密度相當，其係與所採用之進料策略無關。

實例4

依批次進料模式進行之免疫球蛋白製造中之葡萄糖限制度(DGL)控制

將CHO細胞(8.0 至 12×10^5 個細胞/毫升)接種至上述之無血清培養基中。細胞生長條件為： 37°C ， 98% 相對濕度，及 10% CO_2 氛圍。於批次進料培養中，在培養開始後之第2或第3天，開始向主要發酵槽添加含有葡萄糖之進料培養基。進料策略係根據如美國專利申請公開案第US 2006/0127975 A1號之用於控制葡萄糖限制度(DGL)之方法。DGL之定義為：所觀察到之比葡萄糖消耗速率相對於當該等細胞可自由獲取葡萄糖時之最大已知比葡萄糖消耗速率的比例($\text{DGL} = Q(\text{glc})/Q(\text{glc})_{\text{max}}$ ，其中 $Q(\text{glc})$ =當前所觀察到之比葡萄糖消耗速率； $Q(\text{glc})_{\text{max}}$ =該等細胞之最大已知比葡萄糖消耗速率)。

圖1說明培養過程中之活細胞密度及細胞存活率曲線。如圖2所示，於不同細胞密度下，均將DGL控制在 0.4 至 0.5 之數值。取決於進料當時之細胞密度，每日一次或兩次改變進料速率。圖3說明於批次進料模式下之基於DGL之進料曲線。取決於細胞密度，使進料速率在 0.8 與 1.6 毫升/時之間變化。採用該種進料策略，可獲得如圖4所示之免疫球蛋白製造曲線。如表6所示，採用 10×10^5 個細胞/毫升及 12×10^5 個細胞/毫升之接種規模(inoculation size)，免疫球蛋白產量幾乎相同，且第七天之免疫球蛋白產量為依恆定進料方法(進料速率 0.02 g葡萄糖/時)時之免疫球蛋白產量的 120% 以上。雖然初始細胞密度存在 20% 之差異，但採用該種DGL控制法，可獲得近似相等之免疫球蛋白效價。此外，當接種規模設定為 8.0×10^5 個細胞/毫升時，雖然進料起點延遲了 20 小時，但於第七天所獲得之免疫球蛋白卻高於 110% (相對數值)。自該等結果可知，該DGL控制法於不同接種規模下均可獲得穩定之免疫球蛋白產量。

實例5

DGL控制對甘露糖-5糖結構及寡糖之半乳糖化之影響

對採用DGL控制之批次進料培養法所製造之免疫球蛋白的糖化型態進行分析。表6所示，對獲自DGL受控制之批次進料培養法與獲自恆定進料法(進料速率：0.02 g葡萄糖/時)之免疫球蛋白進行寡糖分析後之結果。接種規模為 8.0×10^5 個細胞/毫升，甘露糖-5糖結構(M5)含量為2.8%。接種規模為 10×10^5 個細胞/毫升及 12×10^5 個細胞/毫升，M5含量則分別為4.1%及3.8%。於所有接種條件下，DGL控制法能夠調節M5含量至5.0%以下。

同時，於各條件下，免疫球蛋白G(0)同功異型物及免疫球蛋白G(2)同功異型物被分別控制在40%至46%及9.0%至11%之範圍內。

表6： DGL控制值對免疫球蛋白產量及糖化型態之影響

編號	於第幾天採樣	DGL	接種細胞密度 [$\times 10^5$ 個細胞/ 毫升]	相對抗體 濃度 [%]	M5含量 [%]	G(0)含量 [%]	G(1)含量 [%]	G(2)含量 [%]
1	7	恆定 進料	10	100.0	3.5	45.7	41.5	9.2
2	7	0.4	8	112.5	2.8	41.7	44.7	10.8
3	7	0.4	10	122.6	4.1	42.9	43.1	9.8
4	7	0.4	12	127.1	3.8	45.5	41.5	9.1

【符號說明】

無

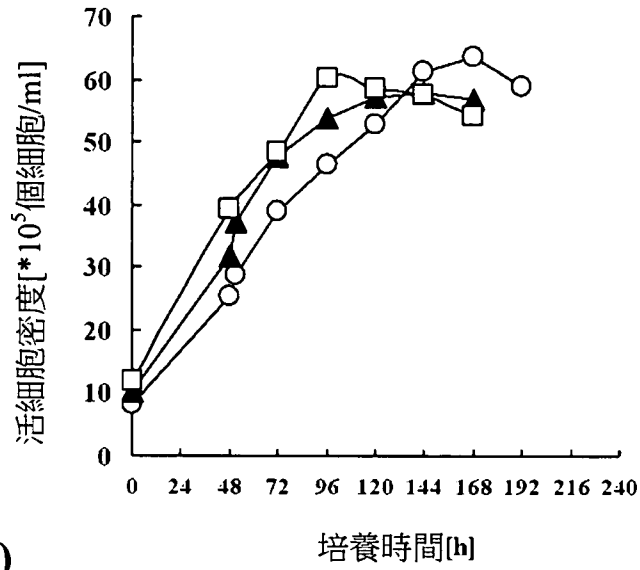
申請專利範圍

1. 一種製造免疫球蛋白之方法，其包括
 - a) 將包含可編碼該免疫球蛋白之核酸的真核細胞培養於培養基中，其中處於培養基中單個細胞的現行比葡萄糖消耗速率相對於該種細胞之最大已知比葡萄糖消耗速率之比例保持恆定，及
 - b) 自該培養基中回收該免疫球蛋白。
2. 如請求項1之方法，其特徵為該比例為0.8至0.2。
3. 如請求項2之方法，其特徵為該比例為0.6至0.4。
4. 一種製造免疫球蛋白之方法，其包括
 - a) 將包含可編碼該免疫球蛋白之核酸的真核細胞培養於培養基中，其中於每一時間單位可自培養基獲得之葡萄糖量維持恆定，且限制在該等細胞於每一時間單位可自培養基之最大利用量之80%以下之固定數值，及
 - b) 自該培養基回收該免疫球蛋白。
5. 如請求項4之方法，其特徵為該固定數值為80%以下，且為20%以上。
6. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵為該培養為批次進料培養。
7. 如請求項6之方法，其特徵為該培養為批次進料培養，其中進料是在培養第2天或第3天開始。
8. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於該培養係處於自pH 6.5至7.5之pH值。
9. 如請求項8之方法，其特徵在於該培養係處於自pH 6.9至7.3之pH值。

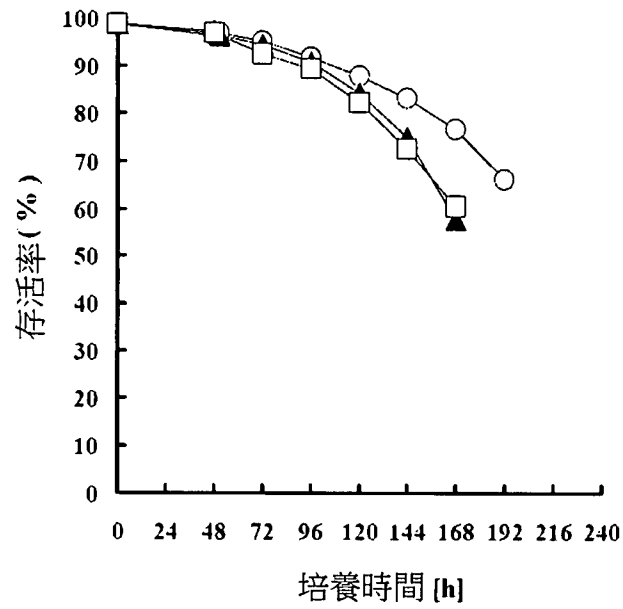
10. 如請求項9之方法，其特徵在於該培養係處於自pH 6.95至pH 7.05之pH值或處於自pH 7.15至pH 7.25之pH值。
11. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於該免疫球蛋白為G類或E類免疫球蛋白。
12. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於該真核宿主細胞係選自由如下組成之群：CHO細胞、NS0細胞、HEK細胞、BHK細胞、融合瘤細胞、PER.C6[®]細胞、昆蟲細胞、及Sp2/0細胞。
13. 如請求項12之方法，其特徵在於該真核細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。
14. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於培養該宿主細胞達6至20天。
15. 如請求項1至5中任一項之方法，其特徵在於該免疫球蛋白為抗-IL-6R抗體。
16. 一種包含免疫球蛋白之組合物，其特徵在於該組合物係根據如請求項1至15中任一項之方法製得。
17. 如請求項16之組合物，其特徵在於該免疫球蛋白為抗-IL-6R抗體。
18. 如請求項16之組合物，其特徵在於該抗-IL-6R抗體包括托珠單抗(Tocilizumab)。
19. 如請求項16至18中任一項之組合物，其特徵在於附接至該抗-IL-6R抗體之甘露糖-5糖結構係8%或以下。
20. 如請求項19之組合物，其特徵在於該甘露糖-5糖結構係6%或以下。
21. 如請求項20之組合物，其特徵在於該甘露糖-5糖結構係4%或以下。
22. 如請求項17或18之組合物，其特徵在於附接至該抗-IL-6R抗體之

G(0)糖結構係在40%至46%之範圍內，且附接至該抗-IL-6R抗體之G(2)糖結構係在9%至11%之範圍內。

圖式



(a)



(b)

圖1

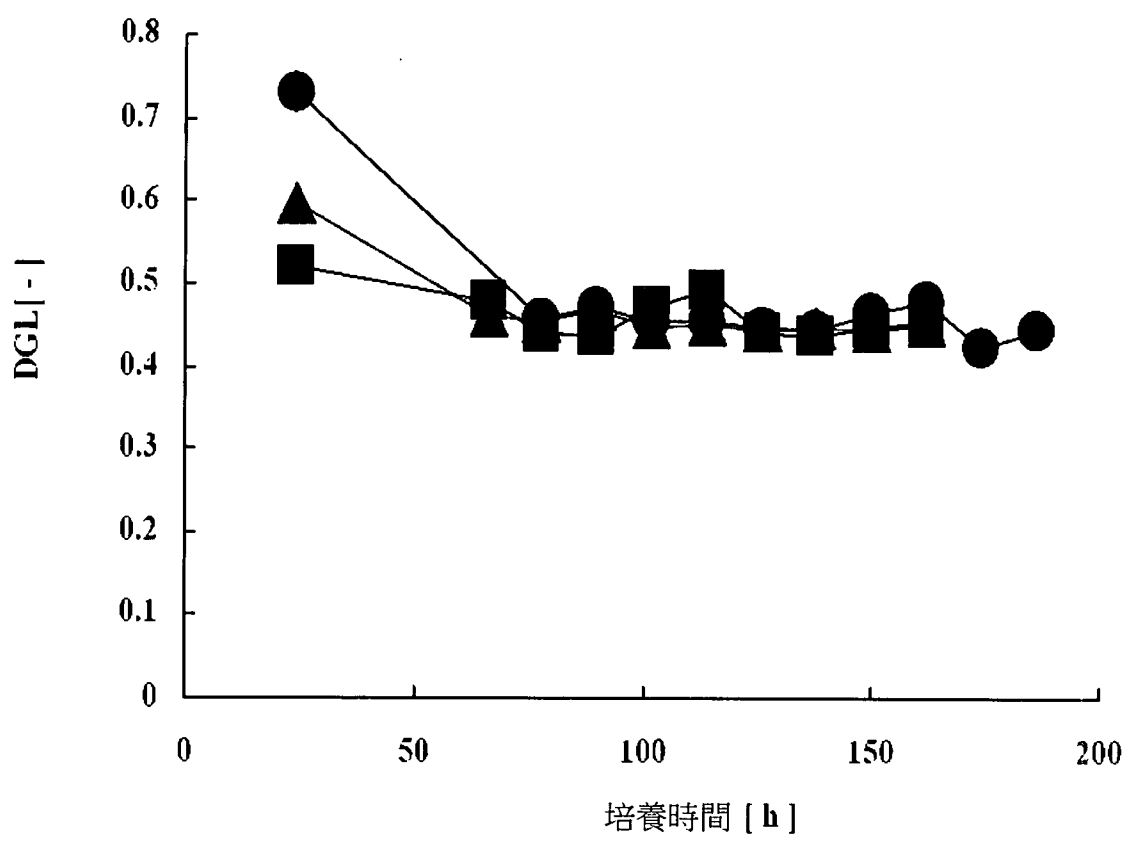


圖2

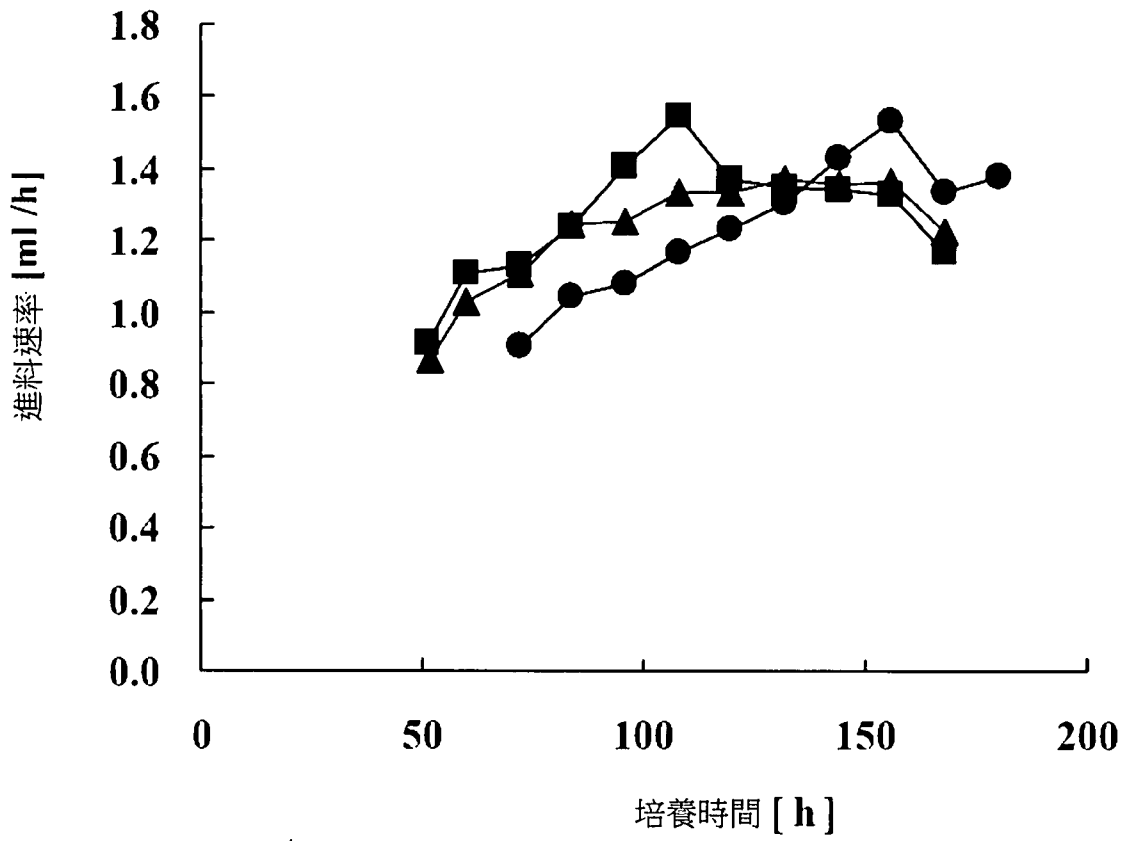


圖3

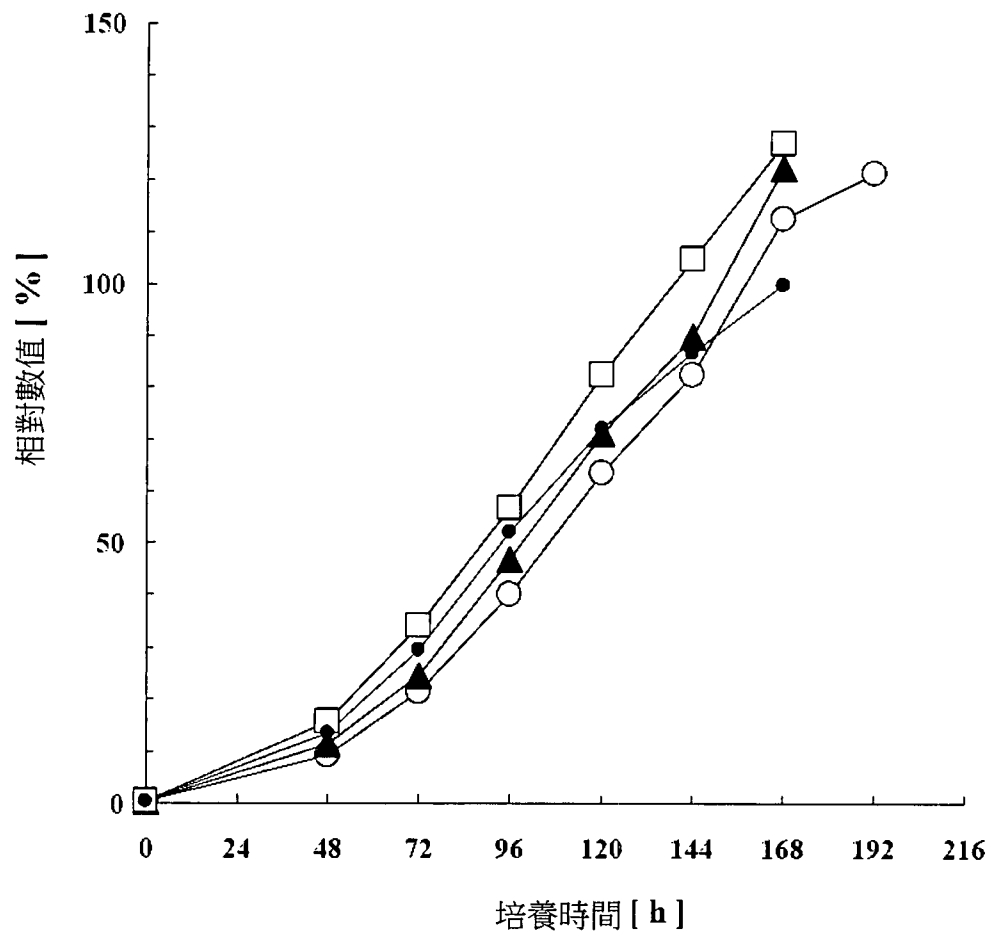


圖4

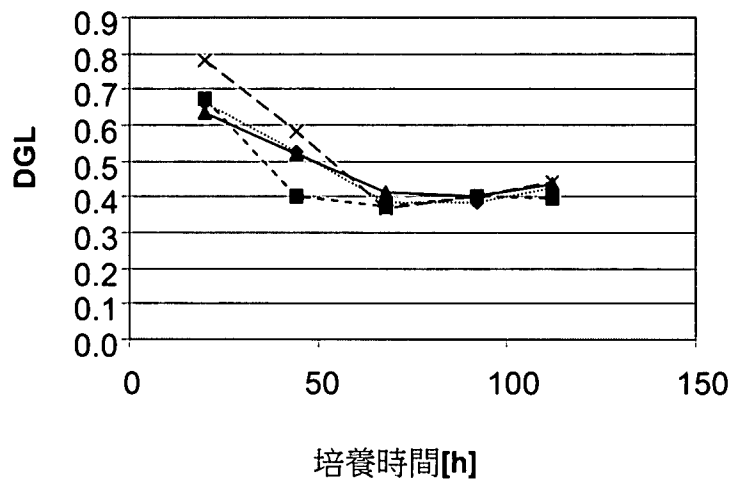


圖5