



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106029896 B

(45) 授权公告日 2020.10.27

(21) 申请号 201480073081.6
 (22) 申请日 2014.12.09
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106029896 A
 (43) 申请公布日 2016.10.12
 (30) 优先权数据
 61/926481 2014.01.13 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2016.07.13
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2014/069378 2014.12.09
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02015/105609 EN 2015.07.16
 (73) 专利权人 美国安进公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 S.康 C.小黄 H.巴霍尔达里安
 P.邦达伦科 Z.张
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
 司 72001
 代理人 罗文锋 彭昶
 (51) Int.Cl.
 C12P 21/00 (2006.01)
 C07K 16/00 (2006.01)
 C12N 1/38 (2006.01)
 C12N 5/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 WO 2008154014 A2,2008.12.18
 V. Hendrick等.Increased productivity

of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: A cell cycle phases analysis.《Cytotechnology》.2001,第36卷(第1期),第71-83页.

V. Hendrick等.Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: A cell cycle phases analysis.《Cytotechnology》.2001,第36卷(第1期),第71-83页.

Weekes R G等.Inhibition by putrescine of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity and tumor promotion caused by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.《Cancer Research》.1980,第40卷(第11期),第4013-4018页.

Berkowitz D E等.Arginase Reciprocally Regulates Nitric Oxide Synthase Activity and Contributes to Endothelial Dysfunction in Aging Blood Vessels.《Circulation》.2003,第108卷(第16期),第2000-2006页.

Matsui I等.Effect of sodium butyrate on induction of ornithine decarboxylase activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes.《Chemico-Biological Interactions》.1984,第51卷(第2期),第141-149页.

审查员 陈晋

权利要求书3页 说明书21页 附图8页

(54) 发明名称
 调控鸟氨酸代谢以操控重组蛋白的高甘露糖糖型含量
 (57) 摘要
 本发明涉及一种用于通过在细胞培养期间调控鸟氨酸代谢来操控重组糖蛋白的高甘露糖

糖型含量的方法。

CN 106029896 B

1. 一种用于减少重组蛋白的高甘露糖糖型含量的方法,其包括在含有精氨酸酶抑制剂的细胞培养基中培养表达重组蛋白的宿主细胞,以减少所述宿主细胞中的鸟氨酸积累。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂选自NG-羟基-L-精氨酸单醋酸盐、N ω -羟基-去甲精氨酸二醋酸盐、BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸) 和DL-a-二氟甲基鸟氨酸。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂是BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂是DL-a-二氟甲基鸟氨酸。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂是:

(a) NG-羟基-L-精氨酸单醋酸盐,其浓度为1 μ M、10 μ M或20 μ M;

(b) N ω -羟基-去甲精氨酸二醋酸盐,其浓度为10 μ M或20 μ M;

(c) BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸),其浓度为1 μ M、10 μ M、20 μ M或0.5 mM;

或

(d) DL-a-二氟甲基鸟氨酸,其浓度为1 μ M、10 μ M、20 μ M、1 mM或2 mM。

6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂的浓度选自至少10 μ M、10 μ M至2 mM、0.5 mM至2 mM、0.5 mM至1 mM和1 mM至2 mM。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂选自N ω -羟基-去甲精氨酸二醋酸盐、BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸) 和DL-a-二氟甲基鸟氨酸,其中所述精氨酸酶抑制剂的浓度为10 μ M。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂是BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸),其中所述精氨酸酶抑制剂的浓度为0.5 mM。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂是DL-a-二氟甲基鸟氨酸,其中所述精氨酸酶抑制剂的浓度为1 mM。

10. 根据权利要求6所述的方法,其中所述精氨酸酶抑制剂是DL-a-二氟甲基鸟氨酸,其中所述精氨酸酶抑制剂的浓度为2 mM。

11. 一种减少重组蛋白的高甘露糖糖型含量的方法,其包括在含有精胺的细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞,和通过减少培养基中精胺的浓度使得所述宿主细胞中的鸟氨酸积累减少,以减少重组蛋白的高甘露糖糖型含量。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中向所述细胞培养基中添加35 μ M或更少的精胺。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中精胺的浓度为7 μ M至35 μ M。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中精胺的浓度为17 μ M至35 μ M。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中精胺的浓度为7 μ M至17 μ M。

16. 根据权利要求12所述的方法,其中精胺的浓度为35 μ M。

17. 根据权利要求12所述的方法,其中精胺的浓度为17 μ M。

18. 根据权利要求12所述的方法,其中精胺的浓度为7 μ M。

19. 一种增加重组蛋白的高甘露糖糖型含量的方法,包括在含有选自鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸转氨酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂和精氨酸脱羧酶抑制剂之一的细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞,其中与表达重组蛋白的宿主细胞在缺乏选自鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸转氨酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂和精氨酸脱羧酶抑制剂之一的细胞培养物中培

养相比,通过增加鸟氨酸积累来减少宿主细胞中的鸟氨酸代谢,和

与在缺乏选自鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸转氨酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂和精氨酸脱羧酶抑制剂之一的细胞培养物中表达重组蛋白时相比,所述重组蛋白具有增加的高甘露糖糖型含量。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中通过向所述细胞培养物中添加至少0.6 mM鸟氨酸来增加所述宿主细胞中的鸟氨酸积累。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中鸟氨酸的浓度为0.6 mM至14.8 mM。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中鸟氨酸的浓度为6 mM至14.8 mM。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中鸟氨酸的浓度为0.6 mM。

24. 根据权利要求20所述的方法,其中鸟氨酸的浓度为6 mM。

25. 根据权利要求20所述的方法,其中鸟氨酸的浓度为14.8 mM。

26. 根据权利要求20所述的方法,其中通过向细胞培养基中添加至少8.7 mM精氨酸来调控所述宿主细胞中的鸟氨酸积累。

27. 根据权利要求20所述的方法,其中精氨酸的浓度为8.7 mM至17.5 mM。

28. 根据权利要求20所述的方法,其中精氨酸的浓度为8.7 mM。

29. 根据权利要求20所述的方法,其中精氨酸的浓度为17.5 mM。

30. 一种生产其中高甘露糖糖型含量减少的重组蛋白的方法,其包括在包含精氨酸酶抑制剂的细胞培养物中培养表达所述重组蛋白的宿主细胞,其中与表达重组蛋白的宿主细胞在缺乏精氨酸酶抑制剂的细胞培养物中培养相比,宿主细胞中的鸟氨酸代谢减少,和

其中与在缺乏精氨酸酶抑制剂的细胞培养物中的重组蛋白相比,所述重组蛋白具有减少的高甘露糖糖型含量。

31. 一种生产其中高甘露糖糖型含量增加的重组蛋白的方法,其包括在含有选自鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸转氨酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂和精氨酸脱羧酶抑制剂之一的细胞培养物中培养表达所述重组蛋白的宿主细胞,其中与表达重组蛋白的宿主细胞在缺乏选自鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸转氨酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂和精氨酸脱羧酶抑制剂之一的细胞培养物中培养相比,通过增加鸟氨酸积累来减少宿主细胞中的鸟氨酸代谢,和

与在缺乏选自鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸转氨酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂和精氨酸脱羧酶抑制剂之一的细胞培养物中表达重组蛋白时相比,所述重组蛋白具有增加的高甘露糖糖型含量。

32. 根据权利要求1、11、19、30或31中任一项所述的方法,其中以分批培养、补料分批培养、灌流培养或其组合培养表达所述重组蛋白的所述宿主细胞。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述培养为灌流培养。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中灌流包括连续灌流。

35. 根据权利要求32所述的方法,其中灌流的速率是恒定的。

36. 根据权利要求32所述的方法,其中所述灌流以每天小于或等于1.0个工作容积的速率进行。

37. 根据权利要求32所述的方法,其中所述灌流通过交替式切向流来实现。

38. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中表达所述重组蛋白的所述宿主细胞是在生物反应器中培养。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述生物反应器的容量为至少500 L。
40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述生物反应器的容量为500 L至2000 L。
41. 根据权利要求38所述的方法,其中所述生物反应器的容量为1000 L至2000 L。
42. 根据权利要求38所述的方法,其中用至少 0.5×10^6 个细胞/mL接种所述生物反应器。
43. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中表达所述重组蛋白的所述宿主细胞是在无血清细胞培养基中培养。
44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述无血清培养基是灌流细胞培养基。
45. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞。
46. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。
47. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中所述重组蛋白是糖蛋白。
48. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中所述重组蛋白选自人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组融合蛋白或细胞因子。
49. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其还包括收获由所述宿主细胞产生的所述重组蛋白的步骤。
50. 根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法,其中将所述宿主细胞产生的所述重组蛋白纯化并配制成药学上可接受的制剂。
51. 一种重组蛋白,其是通过根据权利要求1、11、19、30或31所述的方法来生产的,其中所述重组蛋白选自人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组融合蛋白或细胞因子。
52. 根据权利要求51所述的重组蛋白,所述重组蛋白是经过纯化的。
53. 根据权利要求51所述的重组蛋白,其被配制成药学上可接受的制剂。

调控鸟氨酸代谢以操控重组蛋白的高甘露糖糖型含量

[0001] 本申请要求2014年1月13日提交的美国临时申请号61/926,481的权益,所述临时申请以引用的方式整体并入本文。

[0002] 发明背景

[0003] 高等真核生物进行多种翻译后修饰,包括甲基化、硫酸化、磷酸化、脂质的添加和糖基化。已知分泌蛋白、膜蛋白和靶向囊泡和某些细胞内细胞器的蛋白中的许多都是糖基化的。糖基化,是糖部分与特定氨基酸的共价连接,是一种最常见但却重要的重组蛋白的翻译后修饰。蛋白质糖基化在细胞中具有多种功能,包括其在蛋白质折叠和质量控制、分子运输和分选以及细胞表面受体相互作用中的重要作用。

[0004] N-连接糖基化包括寡糖添加至存在于蛋白质中某些识别序列中的天冬酰胺残基上(例如,Asn-X-Ser/Thr)。N-连接糖基化含有由甘露糖(Man)、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺和神经氨酸构成的标准支链结构。高甘露糖寡糖通常包含两个N-乙酰葡萄糖胺以及多个甘露糖残基(5个或更多个)。哺乳动物细胞培养物中产生的糖蛋白可含有不同水平的这些高甘露糖(HM或HMN)糖型,诸如甘露糖5(Man5)、甘露糖6(Man6)、甘露糖7(Man7)、甘露糖8(Man8)和甘露糖9(Man9)。

[0005] 虽然中国仓鼠卵巢(CHO)宿主细胞表达的重组糖蛋白的糖型主要由内在遗传因素决定,但是高甘露糖糖型含量也可受细胞培养条件影响(Pacis,等,(2011)Biotechnol Bioeng 108,2348-2358)。

[0006] 糖基化会影响重组蛋白药物的治疗效能。糖基化对生物活性、药物代谢动力学、免疫原性、可溶性和治疗性糖蛋白的体内清除率的影响已使得对糖基化的监测和控制成为了生物制药生产的关键参数。治疗性蛋白质的高甘露糖糖型含量是已发现影响了某些治疗性抗体的药物代谢动力学性质的关键质量属性(Goetze,等,(2011)Glycobiology21,949-59; Yu,等,(2012)MAbs 4,475-87)。因此,用于控制治疗性蛋白质的高甘露糖糖型含量的方法将是有益的。

[0007] 在制药工业中存在操控和控制重组治疗性糖蛋白的高甘露糖糖型含量的需要,并且用于为此的方法将是有益的。本发明提供一种用于通过调控宿主细胞中的鸟氨酸代谢来操控重组糖蛋白的高甘露糖糖型含量的方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供一种用于操控重组蛋白的高甘露糖糖型含量的方法,其包括在调控宿主细胞中鸟氨酸代谢的条件下在细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞。

[0010] 在一个实施方案中,通过减少鸟氨酸在宿主细胞中的积累来调控宿主细胞中的鸟氨酸代谢。在一个相关实施方案中,通过在含有精氨酸酶抑制剂或精胺的细胞培养基中培养宿主细胞来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在另一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加精氨酸酶抑制剂来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在另一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是BEC(S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)或DL- α -二氟甲基鸟氨酸。在另一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是BEC(S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)。在另一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是DL- α -二氟甲基鸟氨酸。在另一个相关实

实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为至少10 μ M。在另一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为10 μ M至2mM。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为10 μ M。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为0.5mM。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为1mM。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为2mM。

[0011] 在另一个实施方案中,通过向细胞培养基中添加35 μ M或更少的精胺来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在一个相关实施方案中,精胺的浓度为7 μ M至35 μ M。在另一个相关实施方案中,精胺的浓度为17 μ M至35 μ M。在另一个相关实施方案中,精胺的浓度为7 μ M至17 μ M。在另一个相关实施方案中,精胺的浓度为35 μ M。在另一个相关实施方案中,精胺的浓度为17 μ M。在另一个相关实施方案中,精胺的浓度为7 μ M。

[0012] 在另一个实施方案中,通过增加鸟氨酸在宿主细胞中的积累来调控宿主细胞中的鸟氨酸代谢。在一个相关实施方案中,通过在含有鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸脱羧酶抑制剂、鸟氨酸转氨酶、一氧化氮合酶抑制剂或精氨酸脱羧酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加至少0.6mM鸟氨酸来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为0.6mM至14.8mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为6mM至14.8mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为0.6mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为6mM。

[0013] 在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为14.8mM。在另一个实施方案中,通过向细胞培养基中添加至少8.7mM精氨酸来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,精氨酸的浓度为8.7mM至17.5mM。在又一个相关实施方案中,精氨酸的浓度为8.7mM。在又一个相关实施方案中,精氨酸的浓度为17.5mM。

[0014] 在另一个实施方案中,通过向细胞培养基中添加鸟氨酸脱羧酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂、鸟氨酸转氨酶抑制剂或精氨酸脱羧酶抑制剂来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加鸟氨酸脱羧酶抑制剂来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,所述鸟氨酸脱羧酶抑制剂为 α -二氟甲基鸟氨酸(α -defluoromethylornithine) (DMFO)。在又一个相关实施方案中,所述鸟氨酸脱羧酶抑制剂为胡椒基丁醚(PBO)。

[0015] 在另一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加鸟氨酸转氨酶抑制剂来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个实施方案中,所述鸟氨酸转氨酶抑制剂为5-氟甲基鸟氨酸(5-fluoromethylornithine) (F-FMOrn)。在又一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加一氧化氮合酶抑制剂来调控宿主细胞。在又一个相关实施方案中,所述一氧化氮合酶抑制剂为2-乙基-2-硫代异脲或N-硝基-L-精氨酸和L^G-单甲基-L-精氨酸。在又一个相关实施方案中,所述一氧化氮合酶抑制剂为N-硝基-L-精氨酸和L^G-单甲基-L-精氨酸。

[0016] 在另一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加精氨酸脱羧酶抑制剂来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸脱羧酶抑制剂为非对称性二甲基精氨酸(ADMA)。

[0017] 本发明提供一种生产具有减少的高甘露糖糖型含量的重组蛋白的方法,其包括在细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞,其中通过减少宿主细胞中的鸟氨酸积累来调控鸟氨酸代谢。在一个相关实施方案中,通过在含有精氨酸酶抑制剂或精胺的细胞培养基

中培养宿主细胞来减少宿主细胞中的鸟氨酸积累。

[0018] 在一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加精氨酸酶抑制剂来减少宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)或DL- α -二氟甲基鸟氨酸。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是BEC (S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是DL- α -二氟甲基鸟氨酸。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为至少10 μ M。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为10 μ M至2mM。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为10 μ M至20 μ M。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为10 μ M。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为0.5mM。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为1mM。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂为2mM。

[0019] 在另一个实施方案中,通过在细胞培养基中含有35 μ M或更少的精胺的细胞培养基中培养宿主细胞来减少宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,精胺的浓度为7 μ M至35 μ M。在又一个相关实施方案中,精胺的浓度为17 μ M至35 μ M。在又一个相关实施方案中,精胺的浓度为0.07mL/L至0.17mL/L。在又一个相关实施方案中,精胺的浓度为35 μ M。在又一个相关实施方案中,精胺的浓度为17 μ M。在又一个相关实施方案中,精胺的浓度为7 μ M。

[0020] 本发明提供一种生产高甘露糖糖型含量增加的重组蛋白的方法,其包括在细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞,其中通过增加宿主细胞中的鸟氨酸积累来调控鸟氨酸代谢。在一个相关实施方案中,通过向细胞培养基中添加鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸脱羧酶抑制剂、鸟氨酸转氨酶、一氧化氮合酶抑制剂或精氨酸脱羧酶抑制剂来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。

[0021] 在另一个相关实施方案中,通过在含有至少0.6mM鸟氨酸的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为0.6mM至14.8mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为6mM至14.8mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为0.6mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为6mM。在又一个相关实施方案中,鸟氨酸的浓度为14.8mM。

[0022] 在另一个相关实施方案中,通过在含有至少8.7mM精氨酸的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,精氨酸的浓度为8.7mM至17.5mM。在又一个相关实施方案中,精氨酸的浓度为8.7mM。在又一个相关实施方案中,精氨酸的浓度为17.5mM。

[0023] 在另一个相关实施方案中,通过在含有鸟氨酸脱羧酶抑制剂、一氧化氮合酶抑制剂、鸟氨酸转氨酶抑制剂或精氨酸脱羧酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在另一个相关实施方案中,通过在含有鸟氨酸脱羧酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,所述鸟氨酸脱羧酶抑制剂为 α -二氟甲基鸟氨酸(alpha-defluoromethylornithine) (DMFO)。在又一个相关实施方案中,所述鸟氨酸脱羧酶抑制剂为胡椒基丁醚(PBO)。

[0024] 在另一个相关实施方案中,通过在含有鸟氨酸转氨酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个实施方案中,所述鸟氨酸转氨酶抑制剂为5-氟甲基鸟氨酸(5-fluoromethylornithine) (F-FMOrn)。

[0025] 在另一个相关实施方案中,通过在含有一氧化氮合酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,所述一氧化氮合酶抑制剂为2-乙基-2-硫代异脲或N-硝基-L-精氨酸和L^G-单甲基-L-精氨酸。

[0026] 在另一个实施方案中,通过在含有精氨酸脱羧酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累。在又一个相关实施方案中,所述精氨酸脱羧酶抑制剂为非对称性二甲基精氨酸(ADMA)。

[0027] 在另一个实施方案中,以分批培养、补料分批培养、灌流培养或其组合中培养所述表达重组蛋白的宿主细胞。在又一个相关实施方案中,所述培养是灌流培养。在又一个相关实施方案中,灌流包括连续灌流。在又一个相关实施方案中,灌流的速率是恒定的。在又一个相关实施方案中,灌流以每天小于或等于1.0个工作容积的速率进行。在又一个相关实施方案中,灌流通过交替式切向流来实现。

[0028] 在另一个实施方案中,表达重组蛋白的宿主细胞在生物反应器中培养。在又一个相关实施方案中,生物反应器的容量为至少500L。在又一个相关实施方案中,生物反应器的容量为至少500L至2000L。在又一个相关实施方案中,生物反应器的容量为至少1000L至2000L。在又一个相关实施方案中,用至少 0.5×10^6 个细胞/mL接种生物反应器。

[0029] 在另一个实施方案中,表达重组蛋白的宿主细胞在无血清细胞培养基中培养。在另一个相关实施方案中,所述无血清培养基是灌流细胞培养基。在又一个相关实施方案中,所述宿主细胞是哺乳动物细胞。在又一个相关实施方案中,所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0030] 在另一个实施方案中,重组蛋白是糖蛋白。在另一个实施方案中,重组蛋白选自自由人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组融合蛋白或细胞因子组成的组。

[0031] 在另一个实施方案中,以上方法还包括收获由宿主细胞产生的重组蛋白的步骤。

[0032] 在另一个实施方案中,将宿主细胞产生的重组蛋白纯化并配制成药学上可接受的制剂。

[0033] 在另一个实施方案中,提供了由以上任何方法产生的重组蛋白。在一个相关实施方案中,重组蛋白是经过纯化的。在另一个实施方案中,将重组蛋白配制成药学上可接受的制剂。

[0034] 附图简述

[0035] 图1鸟氨酸代谢总览。ARG,精氨酸;AZ,抗酶;AZIN,抗酶抑制剂;P5C,二氢吡咯-5-羧酸盐;ASP,天冬氨酸盐;ORNT,鸟氨酸转运蛋白;GATM,甘氨酸脒基转移酶;NOS,一氧化氮合酶;OAT,鸟氨酸转氨酶;ODC,鸟氨酸脱羧酶;OTC,鸟氨酸转氨甲酰酶;SMS,精胺合成酶;SRS,亚精胺合成酶。

[0036] 图2鸟氨酸作为与高甘露聚糖水平相关的代谢指标的鉴别。来自在培养基#1(A)或培养基#2(B)下评估的补料分批方法的第8天(D8,白色柱)、第9天(D9,灰色柱)和第10天(D10,黑色柱)检测的八种不同细胞系(细胞系A至H)的分泌型重组单克隆抗体的高甘露聚糖水平(%HM)。在废培养基(C)中检测到的高甘露聚糖水平与细胞外鸟氨酸水平之间的相关性。比较来自八种细胞系的第9天的平均鸟氨酸水平和平均高甘露聚糖水平。皮尔逊系数R值, $R=0.83$ 。

[0037] 图3高甘露糖与细胞外鸟氨酸水平之间的相关性:A)当细胞系H暴露于八种不同生

产条件(#1至#8)下时检测到的高甘露糖糖型含量。B)对应的细胞外相对鸟氨酸水平。C)高甘露糖糖型含量%与细胞外相对鸟氨酸水平之间的相关性。皮尔逊相关系数R值, $R=0.78$ 。

[0038] 图4来自从第3天、第6天、第8天、第9天和第10天的八种不同细胞系收集的细胞团的精氨酸酶1的相对mRNA表达水平。也示出了对应的高甘露糖糖型含量。

[0039] 图5在含有0 μ M、7 μ M、17 μ M、35 μ M和100 μ M浓度的精胺四盐酸盐的细胞培养基中生长的细胞表达的重组糖蛋白上的高甘露糖糖型含量。在模拟灌流试验的第5天收集样品。35 μ M样品作为对照。

[0040] 图6由暴露于0 μ M、7 μ M、17 μ M、35 μ M和100 μ M浓度的精胺四盐酸盐的细胞培养物内源产生的细胞外鸟氨酸的浓度(mg/L)。在模拟灌流试验的第5天收集样品。35 μ M样品作为对照。

[0041] 图7在含有0mM、0.6mM、6mM和14.8mM浓度的L-鸟氨酸单盐酸盐的细胞培养基中生长的细胞表达的重组糖蛋白上的高甘露糖糖型含量。在模拟灌流试验的第5天收集样品。0mM样品充当对照。

[0042] 图8在含有0.1g/LL-鸟氨酸单盐酸盐的细胞培养基(黑色柱)或不含外源添加的鸟氨酸的对照细胞培养物(白色柱)中生长的细胞系“1”表达的重组糖蛋白上的高甘露糖糖型含量。在第6天、第8天和第12天收集样品。

[0043] 图9在含有2.2mM、4.4mM、6.5mM、8.7mM和17.5mM浓度的精氨酸单盐酸盐的细胞培养基中生长的细胞表达的重组糖蛋白上的高甘露糖糖型含量。8.7mM样品作为对照。在模拟灌流试验的第4天收集样品。

[0044] 图10在增补有1 μ M、10 μ M和20 μ M浓度的不同精氨酸酶抑制剂:BEC盐酸盐(BEC)、DL- α 、二氟甲基鸟氨酸盐酸盐(DL-a)、N^G-羟基-L-精氨酸单醋酸盐(NG)和N ω -羟基-去甲精氨酸二醋酸盐(N ω -Hydroxy-nor-arginine diacetate salt)(Nw)的细胞培养基中生长的细胞表达的重组糖蛋白上的高甘露糖糖型含量。对照不含抑制剂。在模拟灌流试验的第4天收集样品。

[0045] 图11在含有0.0mM、0.01mM、和0.5mM浓度的精氨酸酶抑制剂BEC盐酸盐(BEC)和0.0mM、0.01mM、1.0mM和2.0mM浓度的DL- α 、二氟甲基鸟氨酸盐酸盐(DL-a)的细胞培养基中生长的细胞表达的重组糖蛋白上的高甘露糖糖型含量。在模拟灌流试验的第4天收集样品。

[0046] 发明详述

[0047] 据发现,表达的重组糖蛋白的高甘露糖糖型含量受宿主细胞中鸟氨酸积累的影响,并且因此可通过调控宿主细胞中的鸟氨酸代谢来操控。

[0048] 鸟氨酸是一种涉及尿素循环、聚胺合成和精氨酸代谢的非蛋白质编码氨基酸。鸟氨酸也是谷氨酸盐和脯氨酸通过鸟氨酸- δ -转氨酶(OAT)活性的前体,参见图1。人中OAT的缺陷导致脉络膜和视网膜的脑回状萎缩(GA),其为一种特征在于视网膜变性和血浆鸟氨酸积累的病症(Takki K等,Br J Ophthalmol.1974;58(11):907-16)。在OAT缺陷的小鼠模型中,精氨酸限制饮食已显示了降低血浆鸟氨酸水平并且防止视网膜变性(Wang T等,PNAS 2000;97(3):1224-1229)。催化鸟氨酸转化为腐胺的鸟氨酸脱羧酶(ODC)是聚胺生物合成途径的限速酶(Pegg A,JBC.2006;281(21):14529-14532)。ODC的合成和稳定性以及聚胺转运蛋白活性受外界渗透条件的影响(Munro G等,BBA 1975;411(2):263-281;Tohyama等,Eur J Biochem.1991;202(3):1327-1331;Michell J等,1998;329:453-459)。增加的聚胺生物

合成一直与植物中对渗透胁迫增加的抗性相关 (Alcazar R等, *Biotechnol Lett* 2006;28:1867-1876)。作为尿素循环的一部分,鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) 催化鸟氨酸转化为瓜氨酸。人中OTC缺乏症引起氨在血液中的积累 (Hopkins等, *Arch. Dis. Childh.*, 196944:143-148)。鸟氨酸代谢存在于细胞溶胶和线粒体中,其中OTC和OAT催化的代谢步骤发生于线粒体中。线粒体的鸟氨酸转运蛋白ORNT1是鸟氨酸输入至线粒体中所需的。人中ORNT1的突变造成特征在于升高的鸟氨酸和氨血浆水平的高鸟氨酸血症-高氨血症-同型瓜氨酸尿 (HHH) 综合征 (Camacho等, *Nat Genet* (1999);22:151-158); (Valle D等, 2001, 1857-1896)。

[0049] 如本文所述,如通过细胞培养基中鸟氨酸的细胞外水平所测定的,发现宿主细胞中鸟氨酸积累的程度与表达的重组糖蛋白的高甘露糖糖型含量相关。操控高甘露糖含量可通过调控宿主细胞中的鸟氨酸代谢来实现。本发明提供一种用于操控重组蛋白的高甘露糖糖型含量的方法,其包括在调控宿主细胞中鸟氨酸代谢的条件下在细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞。鸟氨酸代谢可通过减少或增加宿主细胞中的鸟氨酸积累来调控。本发明提供用于生产具有减少的或增加的高甘露糖糖型含量的重组蛋白的方法,其包括在调控宿主细胞中的鸟氨酸积累的细胞培养物中培养表达重组蛋白的宿主细胞。

[0050] 鸟氨酸代谢是指涉及鸟氨酸生物合成、转运、分解代谢过程和代谢转化的化学或酶促反应和途径。尿素循环、聚胺合成、肌酸合成和线粒体鸟氨酸分解代谢途径是鸟氨酸代谢的实例。图1提供了总览。

[0051] 宿主细胞中的鸟氨酸积累是改变的鸟氨酸代谢的结果。宿主细胞中鸟氨酸积累的程度可通过调控鸟氨酸代谢来调节。细胞内代谢物水平可在细胞外水平中有所反应(即,在细胞培养基中检测到)。宿主细胞中鸟氨酸积累的指标可通过测定分泌至细胞培养基中的鸟氨酸的量来制成。如本文所述,鸟氨酸水平的增加存在于缺乏外源性鸟氨酸的细胞培养基中。

[0052] “高甘露糖糖型含量”、“高甘露聚糖水平”和“高甘露糖物质的水平”可互换使用并由缩写“HM”、“%HM”、“HMN”或“%HMN”来表示,并且是指细.合的甘露糖5 (Man5)、甘露糖6 (Man6)、甘露糖7 (Man7)、甘露糖8 (Man8) 和甘露糖9 (Man9) 聚糖物质的相对百分比。

[0053] 据发现,分泌至细胞培养基中的鸟氨酸的水平与细胞培养物中宿主细胞表达的重组糖蛋白的高甘露糖糖型含量相关。当通过在含有精氨酸酶抑制剂或精胺的细胞培养基中培养宿主细胞来减少宿主细胞中的鸟氨酸积累时,表达的糖蛋白的高甘露糖糖型含量减少。当通过在含有鸟氨酸或精氨酸的细胞培养基中培养宿主细胞来增加宿主细胞中的鸟氨酸积累时,表达的糖蛋白的高甘露糖糖型含量增加。

[0054] 本发明提供一种用于通过在含有精氨酸酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来调控宿主细胞中鸟氨酸积累的方法。精氨酸是鸟氨酸的代谢前体,并且精氨酸酶是催化精氨酸变成鸟氨酸的转化的酶。据观察,当比较不同细胞系的代谢和表达谱时,精氨酸酶mRNA表达水平与鸟氨酸积累的量相关。用精氨酸酶抑制剂阻断精氨酸酶活性可潜在地降低鸟氨酸产生水平。然而,由于细胞培养基中高水平的精氨酸,精氨酸酶抑制剂的效力可能降低。此外,存在可促成鸟氨酸积累的鸟氨酸的其他代谢前体(即,谷氨酸盐和脯氨酸,参加图1)。

[0055] 如本文所述,据发现培养的宿主细胞表达的重组蛋白的高甘露糖糖型含量可通过向细胞培养基中添加精氨酸酶抑制剂来调节。阻断精氨酸酶活性减少了宿主细胞中鸟氨酸

产生的量,降低了表达的重组糖蛋白的高甘露聚糖水平。

[0056] 精氨酸酶也抑制鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)(Visser等,(1982) J.Gen.Microbio.128:1235-1247)。阻断精氨酸酶活性不但减少鸟氨酸自精氨酸的产生,而且可潜在地解除OTC活性的抑制,允许鸟氨酸至瓜氨酸的转化,允许鸟氨酸积累的进一步减少(参见,图1)。

[0057] 在OTC缺乏症患者中,氨水平升高。如果表达具有高水平高甘露聚糖的重组蛋白的宿主细胞中的精氨酸酶表达或活性增强诱导OTC抑制,那么这还可导致氨水平升高。细胞内氨水平的升高可潜在地改变高尔基体中的pH梯度,并引起糖基转移酶的次最优重新定位,这导致由于高尔基复合体中不完整的聚糖分支而引起更高水平的高甘露聚糖(Campbell等,(1973)NJM 288(1):1-6;Hopkins等,(1969)Archive of Disease in Childhood 44(234):143-148;Mühling等,(2001)Amino Acids 21(3):303-318;Park等,(2000) J.Biotechnol81(2):129-140;Rivinoja等,(2009)J.Cell Physiol.220(1):144-154;以及Axelsson等,(2001)Glycobiology 11(8):633-644)。

[0058] 适用的抑制剂是本领域中已知的,并且可从商业来源获得。此类精氨酸酶抑制剂包括BEC盐酸盐;DL- α -二氟甲基鸟氨酸盐酸盐; N^G -羟基-L-精氨酸和 N^{ω} -羟基-去甲精氨酸。在一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是BEC(S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)或DL- α -二氟甲基鸟氨酸。在本发明的一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是BEC(S-(2-二羟硼基乙基)-1-半胱氨酸)。在本发明的一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂是DL- α -二氟甲基鸟氨酸。

[0059] 可以至少 $10\mu\text{M}$ 的浓度向细胞培养基中添加精氨酸酶抑制剂以降低表达的重组蛋白的高甘露聚糖水平,而不会显著影响生产率。在一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为 $10\mu\text{M}$ 至 2mM 。在另一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为 $10\mu\text{M}$ 。在另一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为 0.5mM 。在另一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为 1mM 。在另一个实施方案中,所述精氨酸酶抑制剂的浓度为 2mM 。

[0060] 如以下实施例所描述的,宿主细胞中的鸟氨酸积累还可通过在含有精胺的细胞培养基中培养宿主细胞来调控。通过鸟氨酸脱羧酶(ODC)的作用,鸟氨酸是聚胺途径和聚胺类腐胺、亚精胺和精胺合成的起点。可使用外源添加的精胺或通过抗酶来直接使ODC失活,参见图1。如以下所描述的,ODC的失活可导致鸟氨酸的积累。可通过限制外源添加的精胺的量解除ODC活性的抑制,并且鸟氨酸可通过聚胺途径来代谢,因此减少了宿主细胞中的总体鸟氨酸积累。

[0061] 可以小于或等于 $35\mu\text{M}$ 的浓度向细胞培养基中添加精胺以降低表达的重组蛋白的高甘露聚糖水平,而不会显著影响生产率。在一个实施方案中,精胺的浓度为 $7\mu\text{M}$ 至 $35\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中,精胺的浓度为 $17\mu\text{M}$ 至 $35\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中,精胺的浓度为 $7\mu\text{M}$ 至 $17\mu\text{M}$ 。在另一个实施方案中,精胺的浓度为 $35\mu\text{M}$ 。在另一个实施方案中,精胺的浓度为 $17\mu\text{M}$ 。在另一个实施方案中,精胺的浓度为 $7\mu\text{M}$ 。

[0062] 用于调控鸟氨酸代谢的另一种方法是增加鸟氨酸的积累。在一个实施方案中,本发明提供了通过在含有鸟氨酸、精氨酸、鸟氨酸脱羧酶抑制剂、鸟氨酸转氨酶、一氧化氮合酶抑制剂或精氨酸脱羧酶抑制剂的细胞培养基中培养宿主细胞来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。

[0063] 如本文所述,发现条件细胞培养基中的细胞外鸟氨酸水平与重组糖蛋白上的高甘露聚糖水平相关。据发现,在含有鸟氨酸的细胞培养基中培养表达重组蛋白的宿主细胞产生了具有升高水平的高甘露聚糖的重组糖蛋白。

[0064] 如以上所描述的,细胞培养基中的鸟氨酸积累很可能反应了鸟氨酸代谢的改变,所述改变可导致与携带缺陷性鸟氨酸代谢基因(例如,OTC缺陷或ORNT1突变)的患者相似的氨积累。然而,氨诱导的高甘露聚糖增加背后的细胞机理是未知的,已经表明高尔基体中pH梯度的改变可导致糖基转移酶的次最优重新定位。这些变化可导致糖基化酶完成聚糖分支的有效性降低,并因此导致更高水平的高甘露聚糖水平。

[0065] 另一个可能性是鸟氨酸积累潜在地诱导氧化还原稳态的紊乱(Zanatta等,(2013) Life sciences 93(4):161-168)。鸟氨酸明确地与高甘露聚糖相关,表明了通过细胞氧化还原状态来调控高甘露聚糖糖型含量的可能性。鸟氨酸可升高脂质氧化的水平。因为许多糖基化调节酶是脂膜结合的,所以由鸟氨酸积累引起的脂质氧化的改变可潜在地改变高尔基体和ER中糖基化调节酶的完整性和活性,并随后影响高甘露聚糖糖型含量。

[0066] 可以至少0.6mM的浓度向细胞培养基中添加鸟氨酸以升高表达的重组蛋白的高甘露聚糖水平,而不会显著影响生产率。在一个实施方案中,鸟氨酸的浓度为0.6mM至14.8mM。在一个实施方案中,鸟氨酸的浓度为6mM至14.8mM。在另一个实施方案中,鸟氨酸的浓度为0.6mM。在另一个实施方案中,鸟氨酸的浓度为6mM。在另一个实施方案中,鸟氨酸的浓度为14.8mM。

[0067] 精氨酸是鸟氨酸的代谢前体。据发现,高甘露聚糖水平在含有外源性精氨酸的细胞培养基中培养的宿主细胞中表达的重组蛋白中升高。增加外源性精氨酸的量增加了可供用于鸟氨酸合成的代谢前体的量,因此升高宿主细胞中鸟氨酸的水平。

[0068] 本发明提供了通过添加至少8.7mM浓度的精氨酸以升高表达的重组蛋白的高甘露聚糖水平而不会显著影响生产率来调控宿主细胞中的鸟氨酸积累。在一个实施方案中,精氨酸的浓度为8.7mM至17.5mM。在另一个实施方案中,精氨酸的浓度为8.7mM。在另一个实施方案中,精氨酸的浓度为17.5mM。

[0069] 可通过向细胞培养基中添加鸟氨酸脱羧酶抑制剂(ODC)、鸟氨酸转氨酶(OAT)、一氧化氮合酶(NOS)或精氨酸脱羧酶(ADC)来调控鸟氨酸积累,因此提供了调控宿主细胞中鸟氨酸代谢和鸟氨酸积累以操控重组蛋白的高甘露聚糖糖型含量的方式。

[0070] 可通过阻断鸟氨酸代谢酶诸如ODC和OAT(参见图1)的活性来增加鸟氨酸积累。对ODC特异的小分子抑制剂诸如 α -二氟甲基鸟氨酸(DFMO)和胡椒基丁醚(PBO)是可商购获得的。OAT被5-氟甲基鸟氨酸(5-FMOrn) T阻断(Daune等,1988,Biochem J.253:481-488)。本发明提供了用这些抑制剂增补细胞培养物来增加宿主细胞中鸟氨酸积累以操控重组蛋白的高甘露聚糖糖型含量。

[0071] 可通过阻断调控精氨酸积累的酶(图1)的活性来调控鸟氨酸积累。通过小分子抑制剂诸如2-乙基-2-硫代异脲和N-硝基-L-精氨酸和L^G-单甲基-L-精氨酸抑制一氧化氮合酶活性和/或通过非对称性二甲基精氨酸(ADMA)抑制精氨酸脱羧酶活性可增加鸟氨酸自精氨酸转化的通量。本发明提供了用这些抑制剂增补细胞培养物来增加宿主细胞中鸟氨酸积累以操控重组蛋白的高甘露聚糖糖型含量。

[0072] 在本发明的一个实施方案中提供的细胞培养基是无血清细胞培养基。在一个实施

方案中,所述细胞培养基是灌流细胞培养基。

[0073] 如本文所用,术语“细胞培养基”(也称为“培养基”、“细胞培养基(cell culture media)”、“组织培养基”)是指用于使细胞例如动物或哺乳动物细胞生长的任何营养液,并且其通常提供来自以下的至少一种或多种组分:能量来源(通常呈碳水化合物的形式,诸如葡萄糖);所有必需氨基酸中的一种或多种,并且通常为20种基本氨基酸,外加半胱氨酸;通常以低浓度需要的维生素和/或其他有机化合物;脂质或游离脂肪酸;以及微量元素,例如通常以极低的浓度(常在微摩尔浓度范围内)需要的无机化合物或天然存在的元素。

[0074] 取决于要培养的细胞的需要和/或所需的细胞培养参数,所述营养液可任选地增补有附加组分以使细胞生长优化,诸如激素和其他生长因子例如胰岛素、转铁蛋白、表皮生长因子、血清等;盐类,例如钙、镁和磷酸盐以及缓冲液,例如HEPES;核苷和碱基,例如腺苷、胸苷、次黄嘌呤;以及蛋白质和组织水解产物,例如水解动物蛋白(蛋白胨或蛋白胨混合物,其可获得自动物副产品、精制明胶或植物物质);抗生素,例如庆大霉素;细胞保护剂或表面活性剂,例如Pluronic[®]F68;聚胺,例如腐胺、亚精胺或精胺(参见,例如,WIPO公布号WO 2008/154014)以及丙酮酸盐(参见,例如,美国专利号8053238)。

[0075] 细胞培养基包括通常在任何细胞培养方法中采用的和/或已知用于任何细胞培养方法的那些,诸如但不限于细胞的分批培养、延长分批培养、补料分批培养和/或灌流培养或连续培养。

[0076] 细胞培养基组分可完全地碾磨成粉末培养基制剂;部分地与液体增补物一起碾磨,按需添加到细胞培养基中;或者营养物可以完全液体形式向细胞培养物中添加。

[0077] “基础”(或分批)细胞培养基是指通常用来启动细胞培养,并且足够完全支持细胞培养的细胞培养基。

[0078] “生长”细胞培养基是指通常用于指数生长期(“生长期”)期间的细胞培养物中并且足够完全支持此阶段期间的细胞培养物的细胞培养基。生长细胞培养基还可含有赋予对并入宿主细胞系内的选择标记的抗性或存活性的选择剂。此类选择剂包括但不限于遗传霉素(G4118)、新霉素、潮霉素B、嘌呤霉素、博莱霉素、蛋氨酸亚砷亚胺、氨甲蝶呤、无谷氨酰胺细胞培养基、缺乏甘氨酸、次黄嘌呤和胸苷或单独缺乏胸苷的细胞培养基。

[0079] “生产”细胞培养基是指通常在指数生长结束且蛋白生产取而代之时用于过渡期和生产期期间的细胞培养物中并且足够完全维持这些阶段所需的细胞密度、细胞活力和/或产物效价的细胞培养基。

[0080] “灌流”细胞培养基是指通常用于通过灌流培养或连续培养方法维持的细胞培养物中,并且足够完全支持此过程期间的细胞培养的细胞培养基。灌流细胞培养基制剂可被浓缩或比基础细胞培养基制剂更为浓缩以适应用来除去废培养基的方法。灌流细胞培养基可在生长期和生产期期间使用。

[0081] 浓缩细胞培养基可含有一些或所有维持细胞培养所需的营养物;特别是可含有鉴定为或已知是在细胞培养物的生产期过程期间消耗的营养物的浓缩培养基。浓缩培养基可基于几乎任何细胞培养基制剂。此类浓缩补料培养基可含有例如约2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100x、200X、400X、600X、800X乃至1000X它们的正常量的细胞培养基的一些或所有组分。

[0082] 细胞培养物还可增补有可能难以制备或在细胞培养物中快速耗乏的特定营养物

的独立浓缩补料。此类营养物可为氨基酸,诸如酪氨酸、半胱氨酸和/或胱氨酸(参见,例如,WIPO公布号2012/145682)。在一个实施方案中,独立地向在含有酪氨酸的细胞培养基中生长的细胞培养物中补料浓缩的酪氨酸溶液,以使酪氨酸在细胞培养物中的浓度不超过8mM。在另一个实施方案中,独立地向在缺乏酪氨酸、胱氨酸或半胱氨酸的细胞培养基中生长的细胞培养物中补料酪氨酸和胱氨酸的浓缩溶液。所述独立补料可在生产期之前或生产期开始时开始。所述独立补料可在与浓缩补料培养基相同或不同的日子通过细胞培养基的分批补料来实现。所述独立补料还可在与灌流培养基相同或不同的日子进行灌流。

[0083] 在某些实施方案中,细胞培养基不含血清和/或不含动物来源的产物或成分。在某些实施方案中,细胞培养基是化学限定的,其中所有化学组分都是已知的。

[0084] 如从业者所理解的,动物或哺乳动物细胞在适合于培养特定细胞的培养基中培养,并且这可被本领域技术人员在没有过多实验的情况下确定。可商购获得的培养基可被利用,并且包括但不限于Iscove氏改良的Dulbecco氏培养基、RPMI 1640、最低必需培养基- α .(MEM- α)、Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基(DMEM)、DME/F12、 α MEM、含有Earle氏BSS的Eagle基础培养基、含有谷氨酸盐的高葡萄糖DMEM、不含谷氨酸盐的高葡萄糖DMEM、不含谷氨酸盐的低葡萄糖DMEM、含有谷氨酸盐的DMEM:F121:1、GMEM(Glasgow氏MEM)、含有谷氨酸盐的GMEM、Grace氏完全昆虫培养基、不含FBS的Grace氏昆虫培养基、含有谷氨酸盐的Ham氏F-10、含有谷氨酸盐的Ham氏F-12、含有HEPES和谷氨酸盐的IMDM、含有HEPES且不含谷氨酸盐的IMDM、IP41昆虫培养基、不含谷氨酸盐或酚红的15(Leibovitz)(2X)、不含谷氨酸盐的15(Leibovitz)、McCoy氏5A改良培养基、培养基199、不含谷氨酸盐或酚红的MEM Eagle(2X)、含有谷氨酸盐的MEM Eagle-Earle氏BSS、不含谷氨酸盐的MEM Eagle-Earle氏BSS、不含谷氨酸盐的MEM Eagle-Hanks BSS、含有谷氨酸盐的NCTC-109、含有谷氨酸盐的Richter氏CM培养基、含有HEPES、谷氨酸盐和/或青霉素-链霉素的RPMI 1640、含有谷氨酸盐的RPMI 1640、不含谷氨酸盐的RPMI 1640、Schneider氏昆虫培养基或配制用于特定细胞类型的本领域技术人员已知的任何其他培养基。需要时或根据需要,可以适当的浓度或量向前述的示例性培养基中添加补充性组分或成分(包括任选组分),并且这将被本领域技术人员利用常规技能知晓并实践。

[0085] 在本发明的一个实施方案中提供的宿主细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方案中,所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0086] 本发明所用的细胞系(也称为“宿主细胞”)经基因工程改造以表达具有商业或科学价值的多肽。细胞系通常从起源于原代培养物的谱系而得到,所述原代培养物可在培养中维持无限时间。所述细胞可含有例如通过转化、转染、感染或注射而引入的表达载体(构建体),诸如质粒等,所述表达载体带有编码用于在培养过程中表达和生产的蛋白的编码序列或其部分。此类表达载体含有用于转录和翻译插入编码序列的必要元件。可以使用本领域技术人员所熟知并实践的方法来构建含有编码生产的蛋白和多肽的序列以及适当转录和翻译控制元件的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。在J.Sambrook等人,2012,Molecular Cloning, A Laboratory Manual,第4版Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. 或任何先前版本;F.M.Ausubel等人,2013,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. 或任何先前版本;Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990中描述了此类技术,所有这些

文献为了任何目的而并入本文。

[0087] 动物细胞、哺乳动物细胞、培养的细胞、动物或哺乳动物宿主细胞、宿主细胞、重组细胞、重组宿主细胞等是用于可根据本发明方法而培养的细胞的所有术语。此类细胞通常是获自或来源于哺乳动物的细胞系，并且当在含有适当营养物和/或其他因子诸如本文描述的那些的培养基中处于单层培养物或悬浮培养物中时能够生长并存活。通常选择可表达并分泌蛋白质或者可经分子工程改造以表达并向培养基中分泌大量特定蛋白质，更具体地说是目标糖蛋白的细胞。将会理解由宿主细胞产生的蛋白质可以是内源性的或与所述宿主细胞同源。另选地，所述蛋白质与所述宿主细胞异源，即异质的，例如由中国仓鼠卵巢(CHO)宿主细胞产生并分泌的人蛋白。此外，哺乳动物蛋白，即最初获自或来源于哺乳动物有机体的那些蛋白可通过本发明的方法取得，并可由细胞分泌至培养基中。

[0088] 本发明的方法可在多种细胞的培养中使用。在一个实施方案中，培养的细胞是真核细胞，诸如植物和/或动物细胞。所述细胞可为哺乳动物细胞、鱼类细胞、昆虫细胞、两栖动物细胞或禽类细胞。适于在培养物中生长的多种多样的哺乳动物细胞系可从美国种质保存中心(Manassas, Va.)和其他贮藏所以及商业供应商获得。可在本发明的方法中使用的细胞包括但不限于MK2.7细胞、PER-C6细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)诸如CHO-K1(ATCC CCL-61)、DG44(Chasin等,1986,Som.Cell Molec.Genet.,12:555-556;Kolkekar等,1997,Biochemistry,36:10901-10909;以及WO 01/92337 A2)、二氢叶酸还原酶阴性CHO细胞(CHO/-DHFR,Urlaub和Chasin,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216)和dp12.CHO细胞(美国专利号5,721,121);猴肾细胞(CV1,ATCC CCL-70);由SV40转化的猴肾CV1细胞(COS细胞、COS-7、ATCC CRL-1651);HEK 293细胞和Sp2/0细胞、5L8杂交瘤细胞、Daudi细胞、EL4细胞、HeLa细胞、HL-60细胞、K562细胞、Jurkat细胞、THP-1细胞、Sp2/0细胞、原代上皮细胞(例如,角质细胞、宫颈上皮细胞、支气管上皮细胞、气管上皮细胞、肾上皮细胞和视网膜上皮细胞)以及已建立的细胞系和它们的品系(例如,人胚肾细胞(例如,293细胞或亚克隆的用于在悬浮培养中生长的293细胞,Graham等,1977,J.Gen.Virol.,36:59);幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL-10);小鼠支持细胞(TM4,Mather,1980,Biol.Reprod.,23:243-251);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL-2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL-34);人肺细胞(W138,ATCC CCL-75);人肝癌细胞(HEP-G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562,ATCC CCL-51);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL-1442);TRI细胞(Mather,1982,Annals NYAcad.Sci.,383:44-68);MCR 5细胞;FS4细胞;PER-C6视网膜细胞、MDBK(NBL-1)细胞、911细胞、CRFK细胞、MDCK细胞、BeWo细胞、Chang细胞、Detroit 562细胞、HeLa229细胞、HeLa S3细胞、Hep-2细胞、KB细胞、LS 180细胞、LS 174T细胞、NCI-H-548细胞、RPMI 2650细胞、SW-13细胞、T24细胞、WI-28 VA13、2RA细胞、WISH细胞、BS-C-1细胞、LLC-MK₂细胞、克隆M-3细胞、1-10细胞、RAG细胞、TCMK-1细胞、Y-1细胞、LLC-PK₁细胞、PK(15)细胞、GH₁细胞、GH₃细胞、L2细胞、LLC-RC256细胞、MH₁C₁细胞、XC细胞、MDOK细胞、VSW细胞以及TH-I、B1细胞或其衍生物)、来自任何组织或器官的成纤维细胞(包括但不限于心脏、肝、肾、结肠、肠、食管、胃、神经组织(脑、脊髓)、肺、维管组织(动脉、静脉、毛细管)、淋巴组织(淋巴结、腺样体、扁桃体、骨髓和血液)、脾以及成纤维细胞和成纤维细胞样细胞系(例如,TRG-2细胞、IMR-33细胞、Don细胞、GHK-21细胞、瓜氨酸血症细胞、Dempsey细胞、Detroit 551细胞、Detroit 510细胞、Detroit 525细胞、Detroit 529细胞、Detroit 532细胞、Detroit 539细胞、Detroit 548细胞、Detroit 573细

胞、HEL 299细胞、IMR-90细胞、MRC-5细胞、WI-38细胞、WI-26细胞、MiCl₁细胞、CV-1细胞、COS-1细胞、COS-3细胞、COS-7细胞、非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587; VERO, ATCC CCL-81); DBS-FrhL-2细胞、BALB/3T3细胞、F9细胞、SV-T2细胞、M-MSV-BALB/3T3细胞、K-BALB细胞、BLO-11细胞、NOR-10细胞、C₃H/IOTI/2细胞、HSDM₁C₃细胞、KLN205细胞、McCoy细胞、小鼠L细胞、品系2071(小鼠L)细胞、L-M品系(小鼠L)细胞、L-MTK(小鼠L)细胞、NCTC克隆2472和2555、SCC-PSA1细胞、Swiss/3T3细胞、印度莫塔克细胞(Indian muntac cell)、SIRC细胞、C₁₁细胞和Jensen细胞或其衍生物)或本领域技术人员已知的任何其他细胞类型。

[0089] 细胞可适用于贴壁培养、单层培养或悬浮培养、转染和表达蛋白质,例如抗体。所述细胞可用于分批培养、补料分批培养和灌流培养或连续培养方法。

[0090] 在本发明的一个实施方案中,表达重组蛋白的宿主细胞在生物反应器中培养。在本发明的另一个实施方案中,生物反应器的容量为至少500L。在一个相关实施方案中,生物反应器的容量为至少500L至2000L。在又一个相关实施方案中,生物反应器的容量为至少1000L至2000L。在本发明的一个实施方案中,细胞培养通过用无血清培养基中的至少 0.5×10^6 个细胞/mL接种生物反应器来建立。在一个实施方案中,本发明还包括收获由宿主细胞产生的重组蛋白的步骤。在本发明的一个实施方案中,设想将宿主细胞产生的重组蛋白纯化并配制成药学上可接受的制剂。

[0091] 为了理解而没有限制的目的,熟练从业者将会明白用于蛋白生产的细胞培养和培养操作可包括三个一般类型;即,分批培养、延长培养、补料分批培养、灌流培养或其组合。在分批培养中,细胞最初培养在培养基中,并且不移除、替换或增补这种培养基,即,在培养操作结束期间或之前,不用新鲜培养基“饲喂”所述细胞。在培养操作结束时收获所需产物。

[0092] 对于补料分批培养,在操作期间通过每日一次或多次(或连续地)用新鲜培养基增补培养基来增加培养操作时间,即,在培养期期间用新的培养基(“补料培养基”)“饲喂”所述细胞。补料分批培养可包括如以上所描述的各种补料方案和时间,例如每日、每隔一天、每两天等、每天不止一次或每天不到一次等等。此外,可用补料培养基连续地补料补料分批培养。然后在培养/生产操作结束时收获所需产物。

[0093] 灌流培养是细胞培养物接受新鲜灌流培养基并且移除废培养基的一种培养。新鲜培养基至细胞培养物中的灌流和废培养基的移除可为连续的、逐步的、间歇的或这些情况中的任何或所有的组合。灌流速率的范围可为每天小于一个工作容积至每天许多个工作容积。优选地,细胞保留在培养物中并且移除的废培养基基本不含细胞或比所述培养物具有显著较少的细胞。由细胞培养物表达的重组蛋白也可在培养物中保留或与废培养基一起移除。废培养基的移除可通过包括离心、沉降或过滤的若干手段来实现,参见,例如,Voisard等,(2003), *Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65。优选的过滤方法为交替式切向流过滤。交替式切向流通过利用ATF装置将培养基泵送通过中空纤维滤器组件来维持。参见,例如,美国专利号6,544,424; Furey (2002) *Gen. Eng. News*. 22 (7), 62-63。滤器基于大小或分子量而分离颗粒。根据本申请,可基于孔径或截留分子量(MWCO)值而选择滤器。滤器包括膜滤器、陶瓷滤器和金属滤器,并且可为任何形状,包括螺旋缠绕式或螺旋管状或薄片形式。

[0094] 术语“灌流流速”是在给定时间内从生物反应器穿过(添加和移除)的培养基的量,通常表现为一部分或多倍的工作容积。“工作容积”是指用于细胞培养的生物反应器容积的

量。在一个实施方案中,所述灌流流速为每天一个工作容积或更少。

[0095] 可在用于小规模至大规模生产重组蛋白的条件下,利用常规用于动物或哺乳动物细胞培养的培养容器和/或培养装置来实施细胞培养。本领域技术人员明白,组织培养皿、T-瓶和转瓶通常以试验台规模使用。对于在更大规模设备上培养,可使用诸如但不限于发酵罐式槽培养装置、气升式培养装置、流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养、搅拌槽生物反应器系统、填充床式培养装置和单次使用一次性袋或本领域技术人员已知的任何其他适合的装置。微载体可或不可与滚瓶或搅拌槽生物反应器系统一起使用。可以分批模式、补料分批模式或灌流模式/连续模式操作所述系统。此外,培养装置或系统可装备有附加装置,诸如利用滤器、重力、离心力等的细胞分离器。

[0096] 在多阶段培养过程中可完成重组蛋白的生产。在多阶段过程中,以两个或更多个不同阶段培养细胞。例如,细胞可首先以一个或多个生长期在使细胞增殖和活力最大化的环境条件下培养,然后在使蛋白质生产最大化的条件下过渡至生产期。在用于通过哺乳动物细胞生产重组蛋白的商业过程中,在最终生产培养之前,通常有存在于不同培养容器中的多个(例如,至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)生长期(N-x至N-1)。一个或多个过渡期可先于或隔开生长期和生产期。可以大规模进行生产期。

[0097] 细胞培养的术语“生长期”是指细胞通常快速分裂的指数细胞生长时期(即,对数期)。细胞在生长期维持约一天,或约两天,或约三天,或约四天或超过四天的时期。例如,细胞在生长期维持的持续时间将基于细胞类型和细胞生长率以及培养条件而变化。

[0098] 术语“过渡期”是指在生长期与生产期之间的时间段。通常,过渡期是可控制培养条件以支持从生长期至生产期的转换的时间。可控制的各种细胞培养参数包括但不限于温度、重量摩尔渗透压浓度、维生素、氨基酸、糖、蛋白胨、铵和盐中的一个或多个。

[0099] 细胞培养的术语“生产期”是指细胞生长已经稳定的时间段。对数细胞生长通常在此阶段之前或在此阶段期间结束,并且蛋白生产取而代之。补料分批和灌流细胞培养方法增补细胞培养基或提供新鲜培养基以便达到并维持在此阶段所需的细胞密度、细胞活力和产物效价。可以大规模进行生产期。可以至少约100、500、1000、2000、3000、5000、7000、8000、10,000、15,000、20,000升的容积维持大规模细胞培养。在一个优选的实施方案中,生产期在500L、1000L和/或2000L生物反应器中进行。

[0100] 通常,在最终生产培养之前的细胞培养经受两个先前阶段,种子和接种物训练。种子训练阶段(N-x)以细胞在数量上快速扩张的小规模发生。在接种物训练阶段(N-1),细胞进一步扩张以产生用于生产型生物反应器的接种物,诸如至少 0.5×10^6 个细胞/mL的接种物。种子和N-1训练可通过任何培养方法来产生,通常为分批细胞培养。 $>15 \times 10^6$ 个细胞/mL的N-1细胞密度对于接种生产型生物反应器是典型的。更高的N-1细胞密度可减少乃至消除达到生产型生物反应器中所需细胞密度所需的时间。用于达到更高的N-1细胞密度的优选方法是利用交替式切向流过滤的灌流培养。通过利用交替式切向流过滤的灌流方法来生长的N-1细胞培养物可提供任何所需密度(诸如 $>90 \times 10^6$ 个细胞/mL或更多的密度)的细胞。N-1细胞培养物可用来产生快速灌注接种培养物或可用作滚种储备培养物(rolling seed stock culture),维持所述滚种储备培养物以接种多个生产型生物反应器。接种密度可具有对产生的重组蛋白水平的积极影响。产物水平倾向于随着增加接种密度而升高。效价的改善不但受制于更高的接种密度,而且很可能受置于生产中的细胞的代谢状态和细胞周期

状态的影响。

[0101] 术语“细胞密度”是指给定容积的培养基中的细胞数目。“活细胞密度”是指如通过标准活力测定(诸如台盼蓝染料排斥方法)所确定的给定容积的培养基中的活细胞数目。术语“细胞压积”(PCV),也称为“细胞压积百分比”(PCV),是细胞所占容积与细胞培养物的总容积的比率,表示为百分比(参见,Stettler,等,(2006) *Biotechnol Bioeng*. Dec20:95(6):1228-33)。细胞压积是细胞密度和细胞直径的函数;细胞压积的增加可由细胞密度或细胞直径或两者的增加而引起。细胞压积是细胞培养物中固体水平的度量。

[0102] 在生产期间,生长期可在比生产期更高的温度下存在。例如,生长期可在约35°C至约38°C的第一温度设定点下存在,并且生产期可在约29°C至37°C,任选地约30°C至约36°C或约30°C至约34°C的第二温度设定点下存在。

[0103] 此外,可在温度变化的同时、之前或之后添加蛋白生产的化学诱导物,诸如咖啡因、丁酸盐和/或六亚甲基二乙酰胺(HMBA)。如果在温度变化后添加诱导物,则它们可在温度变化后一小时至五天,任选地在温度变化后一至两天添加。当细胞产生所需蛋白质时,细胞培养可维持数天乃至数周。

[0104] 使细胞维持在所需生理状态的另一种方法需通过使细胞培养物暴露于低L-天冬酰胺条件下而诱导细胞生长停滞(参见,例如,WIPO公布号W02013/006479)。细胞生长停滞可通过含有限制浓度的L-天冬酰胺的培养基并且维持L-天冬酰胺在细胞培养物中的低浓度来达到并维持。维持5mM或更少的L-天冬酰胺的浓度可用来使细胞维持在生长停滞状态,由此生产率增加。

[0105] 已知或怀疑调控细胞周期进程和相关的转录过程、DNA修复、分化、衰老和与此有关的凋亡的细胞周期抑制剂、化合物也对诱导细胞生长停滞有用。与周期时钟(诸如细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK))相互作用的细胞周期抑制剂如同与来自其他途径的蛋白(诸如AKT、mTOR)和直接或间接影响细胞周期的其他途径相互作用的那些分子一样有用。

[0106] 适用于本发明方法的细胞培养条件是通常用于或已知用于细胞的分批培养、补料分批培养或灌流(连续)培养或这些方法的任何组合的那些条件,其中注意到pH、溶解氧(O₂)和二氧化碳(CO₂)、搅拌和湿度以及温度。

[0107] 本发明的方法可用来培养表达目标重组蛋白的细胞。表达的重组蛋白可分泌至培养基中,可从所述培养基中回收和/或收集它们。此外,可利用已知的方法和本领域已知的和/或从商业供应商获得的产品来纯化或部分地纯化来自此类培养物或组分(例如,来自培养基)的蛋白质。然后可将纯化的蛋白“配制”(意指将缓冲液交换成药学上可接受的制剂)、灭菌、成批包装和/或包装以用于最终用户。药学上可接受的制剂可包括稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。制备药学上可接受的制剂在本领域技术人员技术范围内,并且包括在Remington's *Pharmaceutical Sciences*,第18版1995,Mack Publishing Company,Easton,PA中描述的那些。

[0108] 在本发明的一个实施方案中提供的重组蛋白是糖蛋白。在本发明的一个实施方案中提供的重组蛋白选自由人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组融合蛋白或细胞因子组成的组。还提供了通过本发明的方法产生的重组蛋白。在一个实施方案中,将相应的重组蛋白配制成药学上可接受的制剂。

[0109] 如本文所用的“肽”、“多肽”和“蛋白质”通篇可互换地使用,并且是指包含两个或

更多个通过肽键互相连接的氨基酸残基的分子。肽、多肽和蛋白质还包括了包括但不限于产生糖蛋白的糖基化、脂质连接、硫酸化、谷氨酸残基的 γ -羧化、羟化和ADP-核糖基化的修饰。

[0110] 如本文所用,术语“糖蛋白”是指具有至少一个包括甘露糖残基的寡糖侧链的肽和蛋白质,包括抗体。糖蛋白可与宿主细胞同源,或可与所利用的宿主细胞异源,即,异质的,例如像中国仓鼠卵巢(CHO)宿主细胞产生的人糖蛋白。此类糖蛋白通常被称为“重组糖蛋白”。在某些实施方案中,宿主细胞表达的糖蛋白直接分泌至培养基中。

[0111] 蛋白质可具有科学或商业价值,包括基于蛋白质的药物。除了其他情况,蛋白质还包括抗体、融合蛋白和细胞因子。肽、多肽和蛋白质可通过重组动物细胞系利用细胞培养方法来生产,并且可被称为“重组肽”、“重组多肽”和“重组蛋白”。表达的蛋白可在细胞内产生或分泌至培养基中,可从所述培养基中回收和/或收集它。

[0112] 可通过本发明方法来方便地生产的哺乳动物蛋白的非限制性实例包括了包含与以下蛋白质之一的全部或部分相同或基本相似的氨基酸序列的蛋白质:肿瘤坏死因子(TNF)、f1t3配体(WO 94/28391)、促红细胞生成素、促血小板生成素、降钙素、IL-2、血管生成素-2(Maisonpierre等人(1997),*Science* 277(5322):55-60)、NF- κ B的受体激活物的配体(RANKL,WO 01/36637)、肿瘤坏死因子(TNF)相关的凋亡诱导配体(TRAIL,WO 97/01633)、胸腺基质淋巴细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,澳大利亚专利号588819)、肥大细胞生长因子、干细胞生长因子(美国专利号6,204,363)、表皮生长因子、角质化细胞生长因子、巨核细胞(megakaryote)生长和发育因子、RANTES、人纤维蛋白原样2蛋白(FGL2;NCBI登录号NM_00682;Rüegg和Pytela(1995),*Gene*160:257-62)、生长激素、胰岛素、促胰岛素、胰岛素样生长因子、甲状旁腺素、包括 α -干扰素、 γ -干扰素和共有序列干扰素(consensus interferon)的干扰素(美国专利号4,695,623和4,897471)、神经生长因子、脑源性神经营养因子、突触结合蛋白样蛋白(SLP 1-5)、神经营养因子-3、胰高血糖素、白细胞介素、集落刺激因子、淋巴毒素- β 、白血病抑制因子和制瘤素-M。对可根据本发明方法生产的蛋白质的描述可见于例如Human Cytokines:Handbook for Basic and Clinical Research,全册(Aggarwal和Gutterman,编Blackwell Sciences,Cambridge,MA,1998);Growth Factors:A Practical Approach(McKay和Leigh,编,Oxford University Press Inc.,New York,1993);以及The Cytokine Handbook,第1册和第2册(Thompson和Lotze编,Academic Press,San Diego,CA,2003)中。

[0113] 此外,本发明的方法将用来生产包含任何上述蛋白质的受体的全部或部分氨基酸序列的蛋白质、此类受体或任何上述蛋白质的拮抗剂和/或基本类似于此类受体或拮抗剂的蛋白质。这些受体和拮抗剂包括:两种形式的肿瘤坏死因子受体(TNFR,也称为p55和p75,美国专利号5,395,760和美国专利号5,610,279)、白细胞介素-1(IL-1)受体(I型和II型;欧洲专利号0460846、美国专利号4,968,607和美国专利号5,767,064,)、IL-1受体拮抗剂(美国专利号6,337,072)、IL-1拮抗剂或抑制剂(美国专利号5,981,713、6,096,728和5,075,222)、IL-2受体、IL-4受体(欧洲专利号0 367 566和美国专利号5,856,296)、IL-15受体、IL-17受体、IL-18受体、Fc受体、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体、粒细胞集落刺激因子受体、制瘤素-M的受体和白血病抑制因子的受体、NF- κ B的受体激活物(RANK,WO 01/36637和美国专利号6,271,349)、骨保护素(美国专利号6,015,938)、TRAIL的受体(包括TRAIL受

体1、2、3和4)以及包含死亡结构域的受体,诸如Fas或凋亡诱导受体(AIR)。

[0114] 可利用本发明来生产的其他蛋白质包括包含了分化抗原(也称为CD蛋白)或它们的配体或基本类似于这两者之一的蛋白质的全部或部分氨基酸序列的蛋白质。在 Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani等人,编, Kobe, Japan, 1996) 中公开了此类抗原。在随后的研讨会中公开了类似的CD蛋白。此类抗原的实例包括CD22、CD27、CD30、CD39、CD40和另外配体(CD27配体、CD30配体等)。若干CD抗原是TNF受体家族的成员,所述TNF家族还包括41BB和OX40。配体通常是TNF家族的成员,41BB配体和OX40配体也是。

[0115] 也可利用本发明生产酶促活性蛋白或它们的配体。实例包括了包含以下蛋白质或它们的配体或基本类似于这两者之一的蛋白质中的一个的全部或部分的蛋白质:包括TNF- α 转化酶的解联蛋白和金属蛋白酶结构域家族成员、各种激酶、葡糖脑苷脂酶、超氧化物歧化酶、组织纤溶酶原激活物、因子VIII、因子IX、载脂蛋白E、载脂蛋白A-I、珠蛋白、IL-2拮抗剂、 α -1抗胰蛋白酶、任何上述酶类的配体和为数众多的其他酶类和它们的配体。

[0116] 术语“抗体”包括对任何同种型或亚类的糖基化的和非糖基化的免疫球蛋白或与完整抗体竞争以特异性结合的其抗原结合区的提及,除非另外说明,否则包括人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体、单克隆抗体、多克隆抗体和其寡聚体或抗原结合片段。还包括了具有抗原结合片段或抗原结合区(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、双抗体、Fd、dAb、大抗体、单链抗体分子、互补决定区(CDR)片段、scFv、双抗体、三体抗体、四体抗体和含有足以使特异性抗原结合至靶多肽的至少一部分免疫球蛋白的多肽)的蛋白质。术语“抗体”包括但不限于通过重组手段制备、表达、产生或分离的那些抗体,诸如从受转染而表达抗体的宿主细胞中分离的抗体。

[0117] 抗体的实例包括但不限于识别包括但不限于上述蛋白质和/或以下抗原的蛋白质中的任何一种或组合的那些抗体:CD2、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD14、CD18、CD20、CD22、CD23、CD25、CD33、CD40、CD44、CD52、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD147、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-7、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-2受体、IL-4受体、IL-6受体、IL-13受体、IL-18受体亚基、FGL2、PDGF-B及其类似物(参见,美国专利号5,272,064和5,149,792)、VEGF、TGF、TGF- β 2、TGF- β 1、EGF受体(参见,美国专利号6,235,883)、VEGF受体、肝细胞生长因子、骨保护素配体、干扰素 γ 、B淋巴细胞刺激物(BlyS,也称为BAFF、THANK、TALL-1和zTNF4;参见,Do和Chen-Kiang(2002), Cytokine Growth Factor Rev. 13(1):19-25)、C5补体、IgE、肿瘤抗原CA125、肿瘤抗原MUC1、PEM抗原、LCG(其是表达的与肺癌相关的基因产物)、HER-2、HER-3、肿瘤相关糖蛋白TAG-72、SK-1抗原、在结肠癌和/或胰腺癌患者血清中以升高的水平存在的肿瘤相关表位、在乳腺、结肠、鳞状细胞、前列腺、胰腺、肺和/或肾癌细胞和/或黑色素瘤、胶质瘤或成神经细胞瘤细胞上表达的癌症相关表位或蛋白、肿瘤坏死中心、整联蛋白 α 4 β 7、整联蛋白VLA-4、B2整联蛋白、TRAIL受体1、2、3和4、RANK、RANK配体、TNF- α 、黏附分子VAP-1、上皮细胞黏附分子(EpCAM)、细胞间黏附分子-3(ICAM-3)、白细胞整联蛋白粘附素、血小板糖蛋白gp IIb/IIIa、心肌肌球蛋白重链、甲状旁腺素、rNAPc2(其是因子VIIa组织因子的抑制剂)、MHC I、癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)、肿瘤坏死因子(TNF)、CTLA-4(其是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原)、Fc- γ -1受体、HLA-DR 10 β 、HLA-DR抗原、硬化蛋白、L-选择素、呼吸融合病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、变异链球菌(*Streptococcus*

mutan) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。可利用本发明方法来生产的已知抗体的具体实例包括但不限于阿达木单抗、贝伐单抗、英夫利昔单抗、阿昔单抗、阿仑单抗、巴匹珠单抗、巴利昔单抗、贝利木单抗、布雷奴单抗、康纳单抗、培舍珠单抗、西妥昔单抗、可那木单抗 (conatumumab)、地诺单抗 (denosumab)、依库珠单抗、吉妥珠单抗奥唑米星、戈利木单抗 (golimumab)、替伊莫单抗、拉贝珠单抗、马帕木单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗、莫他珠单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、帕利珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、奥戈伏单抗 (oregovomab)、帕利珠单抗、帕尼单抗、pemtumomab、培妥珠单抗、兰尼单抗、利妥昔单抗、罗维珠单抗、塔西单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、优特克单抗、维多珠单抗 (vedolizomab)、扎芦木单抗和扎木单抗。

[0118] 本发明还可用来生产包含例如任何上述蛋白质的重组融合蛋白。例如,可利用本发明的方法来生产包含上述蛋白质之一加上多聚化结构域诸如亮氨酸拉链、卷曲螺旋、免疫球蛋白或基本类似的蛋白质的Fc部分的重组融合蛋白。参见,例如,W094/10308;Lovejoy等(1993),*Science* 259:1288-1293;Harbury等(1993),*Science* 262:1401-05;Harbury等(1994),*Nature* 371:80-83;Håkansson等(1999),*Structure* 7:255-64。明确地包括在此类重组融合蛋白中的是受体的部分融合到抗体诸如依那西普 (a p75 TNFR:Fc) 和贝拉西普 (CTLA4:Fc) 的Fc部分的蛋白质。任何前述蛋白质和多肽的嵌合蛋白和嵌合多肽以及片段或部分或突变体、变体或类似物也包括在可通过本发明方法来生产的适合的蛋白质、多肽和肽中。

[0119] 虽然在本申请中使用的术语在本领域中是标准的,但是本文也提供了某些术语的定义以确保权利要求意思的清楚和明确。单位、前缀和符号可以他们的SI接受的形式来表示。本文列举的数值范围包括界定了范围的数字,并且包括并支持所界定的范围内的每个整数。除非另外指示,否则本文描述的方法和技术一般根据本领域中所熟知且如在整篇本说明书中所引用并论述的各种一般参考文献和更特定参考文献中所述的常规方法来进行。参见,例如,Sambrook等*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (2001) 和Ausubel等,*Current Protocols in Molecular Biology*,Greene Publishing Associates (1992),以及Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,N.Y. (1990)。本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文,均特此明确地以引用的方式并入。本发明的一个实施方案中描述的可与本发明的其他实施方案组合。

[0120] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方案限制,所述具体实施方案意欲作为本发明的个别方面的说明,并且功能上等同的方法和组分构成本发明的方面。确实,除了本文示出和描述的那些之外,根据以上描述和所附附图,本发明的各种修改将对于本领域技术人员而言变得显而易见。此类修改旨在处于所附权利要求书的范围内。

实施例

[0121] 实施例1

[0122] 发现细胞外鸟氨酸水平与高甘露糖糖型含量相关。选择表达具有在<5%至>20%范围内的高甘露糖糖型含量的重组抗体的八种CHO细胞系用于此实验(细胞系A-细胞

系H)。在摇瓶中利用各自不含鸟氨酸的两种不同的专有细胞培养基(培养基#1和培养基#2)使细胞在10天的补料分批培养中生长。在培养的第8天、第9天和第10天将废培养基样品取出并进行大规模代谢组学分析。利用Endo-H rCE-SDS方法,随后由以下描述的HILIC方法替换来确定%HM。通过大规模代谢组学分析来确定鸟氨酸在废培养基中的相对水平,在所述大规模代谢组学分析中,将培养基组分通过液相色谱分离并通过高分辨光谱测定法检测。通过使碎片光谱与已知化合物的光谱库相匹配来鉴定组分。从质谱信号的峰面积来求出每个组分的相对丰度。图2A和2B示出来自第8天、第9天和第10天培养基#1和培养基#2中细胞系A-H的分泌型单克隆抗体的高甘露糖水平(%HM)。图2C示出高甘露糖%与细胞外鸟氨酸水平之间的相关性。通过利用来自第9天样品的数据比较全部8种细胞系(由正方形表示)来确定相关性。结果表明了高甘露糖糖型含量与细胞外鸟氨酸水平之间的强相关性。

[0123] 然后,使细胞系H在补料分批培养中于3L生物反应器中生长。培养持续时间为12天。在第3天、第5天、第7天和第9天进行7%、9%、9%和9%的四次灌注补料。此外,按需要在第3天开始每日添加50%葡萄糖溶液以维持2g/L以上的葡萄糖浓度。在生长4天后,以 15×10^5 个细胞/ml接种生产型生物反应器。使细胞维持在生长培养基中直至启动生产期。然后比较八种不同的工艺条件。条件#1作为对照。不对生产补料培养基做出改变。

[0124] 在条件#2中,在第0天将甜菜碱以24mM的浓度增补于生产补料培养基中。不提供进一步的甜菜碱增补物。在第3天、第5天、第7天和第9天进行7%、9%、9%和9%的四次灌注补料。此外,按需要在第3天开始每日添加50%葡萄糖溶液以维持2g/L以上的葡萄糖浓度。

[0125] 在条件#3和#4中,测试硫酸铜的去除。将硫酸铜从生产基础培养基粉末中去除。条件#3充当对照,将硫酸铜储备液添加至基础培养基中。在条件#4中,不向任何培养基中添加硫酸铜,产生了铜缺乏的培养环境。对于条件#3和#4,两者都用同样的含有铜的灌注“补料”培养基来处理。

[0126] 在条件#5-#8中,测试高重量摩尔渗透压浓度和低重量摩尔渗透压浓度。在条件#5和#6中,用90%生产分批培养基饲喂细胞,即,提供了少于10%的营养物,这致使细胞经历减少的克分子渗透压浓度。在条件#6中,通过用NaCl滴定使细胞培养基恢复到控制水平~300mOsm。在条件#7和#8中,将细胞用85%补料培养基饲喂,其中通过用NaCl滴定使条件#8中的培养基恢复到控制水平。

[0127] 在培养的第3天、第6天、第8天、第9天和第10天将废培养基样品取出并进行大规模代谢组学分析。

[0128] 再次,存在细胞外鸟氨酸与高甘露糖糖型含量之间的显著相关性。图3A示出当细胞系H暴露于8种不同生物反应器条件(#1至#8)下时检测到的高甘露糖含量百分比。图3B示出对应的细胞外鸟氨酸水平。图3C示出高甘露糖%与细胞外鸟氨酸水平之间的相关性。通过利用来自第9天样品的数据比较全部8种条件(由正方形表示)来确定相关性。

[0129] 实施例2

[0130] 在利用实施例1描述的八种细胞系的10天补料分批生产培养期间的选定日子,测定精氨酸酶1的mRNA表达水平。

[0131] 利用QuantiGene多路复用测定试剂盒(Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA)根据制造商的说明书来评估mRNA表达水平。

[0132] 发现精氨酸酶1(催化精氨酸至鸟氨酸的转化的酶)以时间进程依赖性的方式在细

胞系中上调了更高水平的高甘露糖,参见图4。这表明用精氨酸酶阻断精氨酸酶活性并减少鸟氨酸产生的量的特异性靶向可用来降低高甘露聚糖水平。

[0133] 实施例3

[0134] 此实施例证实了通过调控表达重组糖蛋白的宿主细胞中的鸟氨酸积累而着手解决对重组糖蛋白的高甘露糖糖型含量的操控。

[0135] 细胞系、细胞培养和培养基

[0136] 在此研究中使用细胞系H。将细胞用1L工作容积在3L锥形摇瓶(Corning Life Sciences, Lowell, MA)中维持并在36°C、5%CO₂标准湿润条件下培养,并且以70rpm在自动CO₂培养箱中振荡(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。将细胞每四天在含有500nM浓度的氨甲蝶呤(MTX)的选择生长培养基中传代培养,并且随后转染、接种并在生长培养基中培养四天后接种于24孔板中用于以下描述的实验。

[0137] 小规模模拟灌流

[0138] 24深孔板(Axygen, Union City, CA)中的改良模拟灌流用来评估精胺、精氨酸、鸟氨酸和精氨酸酶浓度对高甘露糖(HMN)调节的影响。根据实验设计,将无精氨酸制剂的灌流培养基用于小规模模拟灌流实验#3(精氨酸浓度研究)。在小规模模拟灌流实验#4中,将全部精氨酸酶抑制剂添加至灌流培养基中。从EMD Millipore公司(Billerica, MA)购买四种精氨酸酶抑制剂,BEC盐酸盐、DL- α -二氟甲基鸟氨酸盐酸盐、N^G-羟基-L-精氨酸单醋酸盐和N ω -羟基-去甲精氨酸二醋酸盐。

[0139] 简言之,将CHO细胞以范围为10x10⁶个细胞/mL-20x10⁶个细胞/mL的目标密度用每孔3mL工作容积接种于板中。将细胞在36°C、5%CO₂、85%相对湿度下培养,并且以225rpm在50-mm轨道直径Kuhner培养箱(Kuhner AG, Basel, Switzerland)中振荡3天或4天。每24小时,将细胞以200xg离心5分钟(Beckman Coulter, Brea, CA)以收集废培养基,并且然后将每个孔用3mL新鲜培养基补充。然后分析所收集的废培养基的效价、关键代谢物和高甘露糖%(%HMN)(必要时)。然后收获细胞,并测定细胞数目和细胞活力。

[0140] 细胞生长、代谢物和抗体效价分析

[0141] 利用Cedex细胞计数器(Roche Innovative, Beilefed, Germany)来确定活细胞密度和活力。包括葡萄糖、乳酸盐、氨、谷氨酰胺、谷氨酸盐在内的代谢物获得自NovaBioprofile Flex(Nova Biomedical, Waltham, MA)。利用装备有50mm x4.6mm i.d. POROS A/20蛋白A柱(Life Technologies, Carlsbad, CA)的亲蛋白A超高效液相色谱(UPLC)(Waters Corporation, Milford, MA)试验来确定废培养基中的抗体浓度。注入样品后,将柱通过pH=7.1的磷酸盐缓冲盐水(PBS)来洗涤以去除CHO宿主细胞蛋白。然后将结合的抗体在酸性PBS缓冲液(pH=1.9)中洗脱并通过280nm处的紫外(UV)吸光度来检测以量化抗体浓度。

[0142] HILIC聚糖图谱

[0143] 将不同N-聚糖类的抗体通过亲水相互作用液相色谱(HILIC)来分析。将纯化的抗体在37°C下通过N-糖苷酶F(New England BioLabs, Ipswich, MA)消化2小时以释放聚糖。将释放的聚糖用2-氨基苯甲酸标记,并利用GlycoClean S药液筒(Prozyme, Heyward, CA)来清理。然后将纯化的聚糖脱盐并在水中重构以用于测定。用100mm x2.1mm i.d. BEH聚糖柱利用UPLC(Waters Corporation, Milford, MA)来进行HILIC色谱,并将洗脱的聚糖通过荧光检

测器基于不同聚糖的不同洗脱时间而检测、鉴定并量化。

[0144] 小规模模拟灌流实验#1:精胺浓度研究

[0145] 此研究测试了五种不同浓度的精胺。测试了含有0 μ M、7 μ M、17 μ M、35 μ M和100 μ M精胺四盐酸盐(spermine 4HCl)的灌流细胞培养基。含有35 μ M精胺的灌流培养基作为对照。来自第5天样品的结果显示随着精胺浓度减少,%HMN减少,参见图5。精胺的减少/消耗没有影响效价。通过当培养基中精胺的量减少时鸟氨酸水平的降低来实现HM水平的降低。如图6所示,鸟氨酸的量随着精胺浓度的减少而减少。

[0146] 小规模模拟灌流实验#2:鸟氨酸浓度研究

[0147] 测试了四种不同浓度的L-鸟氨酸单盐酸盐。利用含有14.8mM、6mM、0.6mM和0(对照)mM L-鸟氨酸单盐酸盐(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)的灌流细胞培养基。结果显示随着鸟氨酸浓度减少,%HMN减少,参见图7。利用细胞系I在2L生物反应器中进行第二实验。细胞系I表达IgG2抗体并在补料分批条件下生长。在一个生物反应器中,培养基在培养的第0天接受0.1g/L L-鸟氨酸单盐酸盐的单一增补,第二生物反应器作为无鸟氨酸的对照。培养物在含有大豆水解物的细胞培养基中维持12天。在第4天和第8天补料含有大豆水解物的灌注补料培养基。

[0148] 通过作肽图来完成聚糖谱。将抗体通过胰蛋白酶用类似于Ren等(2009) Anal.Biochem.392 12-21)描述的方法来消化。确切地说,在37 $^{\circ}$ C下,用溶于0.2M tris缓冲液(pH 7.5)中的7.0M盐酸胍、6mM二硫苏糖醇(DTT)将约50 μ g-70 μ g的各抗体变性并还原持续30分钟。将各变性的/还原的样品在25 $^{\circ}$ C下用14mM碘乙酸来烷基化持续25分钟,随后通过添加8mM DTT来淬灭反应。然后用Pierce去污剂清除离心柱(detergent removal spin column)(Thermo Fisher Scientific Inc.,Rockford,IL)根据制造商建议的方案将还原的/烷基化的抗体样品交换成pH 7.5的0.1M tris缓冲液。在37 $^{\circ}$ C下用3.5 μ g胰蛋白酶将缓冲液交换的样品孵育60分钟。通过添加2.2 μ L的10%醋酸来淬灭消化。将约12 μ g-17 μ g消化的抗体注入以用于分析。

[0149] 利用与Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Elite质谱仪(Thermo Fisher Scientific Inc.,Rockford,IL)直接连接的Agilent 1260 HPLC系统来分析消化的抗体。在40 $^{\circ}$ C下用0.2mL/min的流速将蛋白水解的肽在2.1x150mm、1.7 μ 颗粒的Waters BEH 300 C18柱(Waters Corporation,Milford,MA)上分离。流动相A为0.02%TFA水溶液,并且流动相B为0.018%TFA在乙腈中的溶液。将肽在90分钟内用0.5-40%B的梯度洗脱,随后进行柱洗涤和再平衡。将质谱仪设置用于在轨道阱中用120,000分辨率进行全MS扫描,随后在线性阱中用动态排除进行五次数据依赖性CID MS/MS扫描。利用质量分析器进行聚糖谱的自动化数据分析(参见,Zhang,(2009) Analytical Chemistry 81:8354-8364)。

[0150] 结果再次显示随着鸟氨酸浓度减少,%HMN减少,参见图8。

[0151] 小规模模拟灌流实验#3:精氨酸浓度研究

[0152] 此研究测试了五种不同浓度的精氨酸。测试含有3.686g/L、1.38g/L、0.92g/L和0.46g/L精氨酸的灌流细胞培养基。将含有1.843g/L精氨酸的灌流培养基用作对照。结果显示随着精氨酸浓度减少,%HM减少,参见图9。

[0153] 小规模模拟灌流实验#4:精氨酸酶抑制剂研究

[0154] 进行两个系列的精氨酸酶抑制剂实验。在第一系列的实验中,向细胞培养物中以

三种不同浓度1 μ M、10 μ M和20 μ M添加四种可商购获得的精氨酸酶抑制剂，BEC盐酸盐、DL- α 、二氟甲基鸟氨酸盐酸盐、N^G-羟基-L-精氨酸单醋酸盐和N ω -羟基-去甲精氨酸二醋酸盐。对照不含抑制剂。从此实验断定抑制剂BEC和DL- α 在减少%HM方面是最有效的(图10)。

[0155] 利用BEC和DL- α 抑制剂来进行第二系列实验。以0(对照)、10 μ M和0.5mM浓度在灌流细胞培养基中测试BEC抑制剂。以0(对照)、10 μ M、1.0mM和2.0mM浓度在灌流培养基中测试DL- α 抑制剂。证实了%HM随着两种抑制剂浓度增加而减少，参见图11。

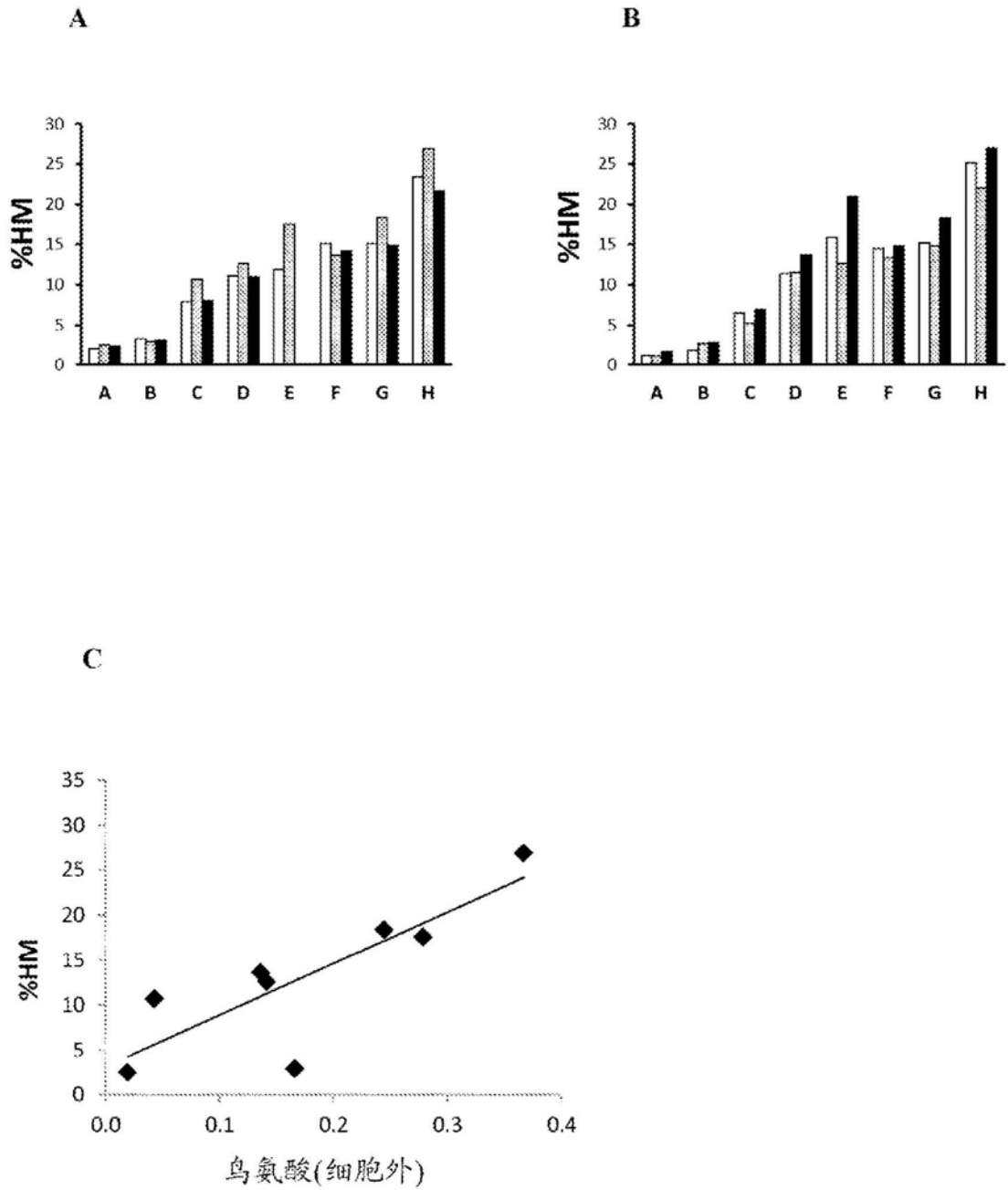


图2

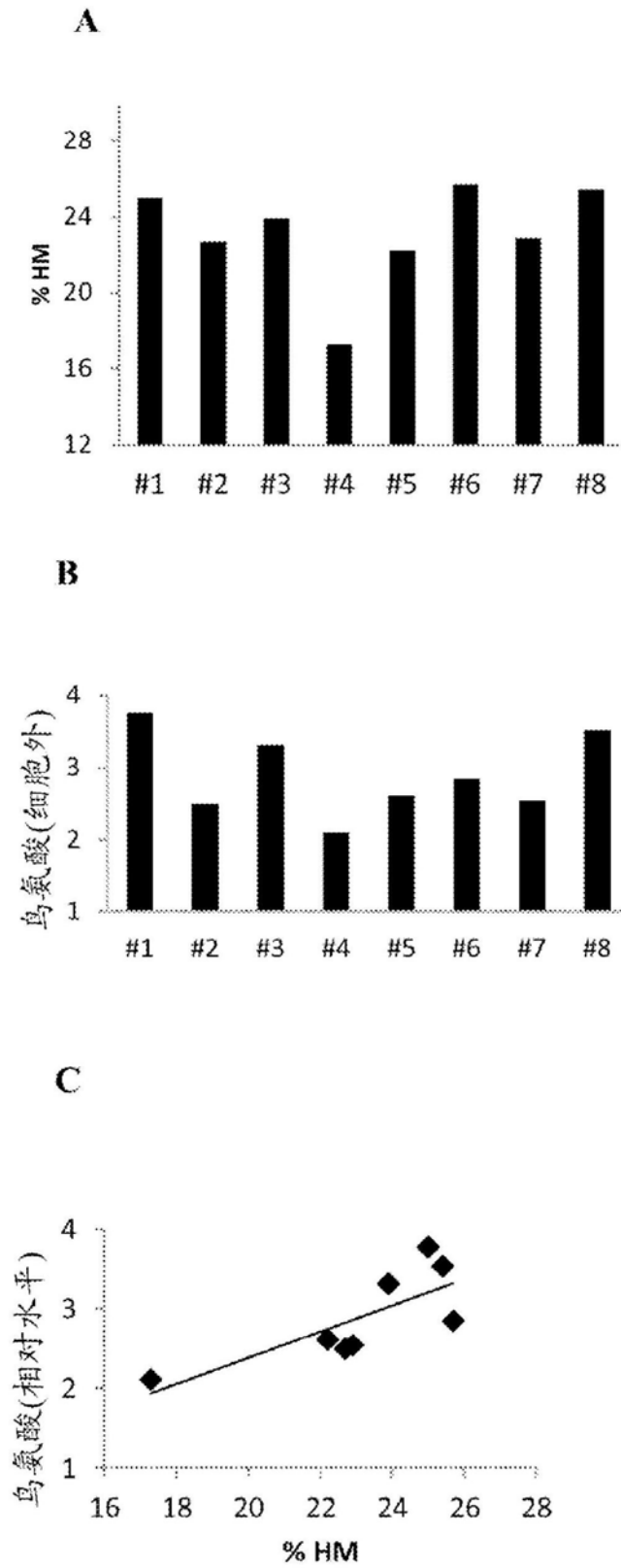


图3

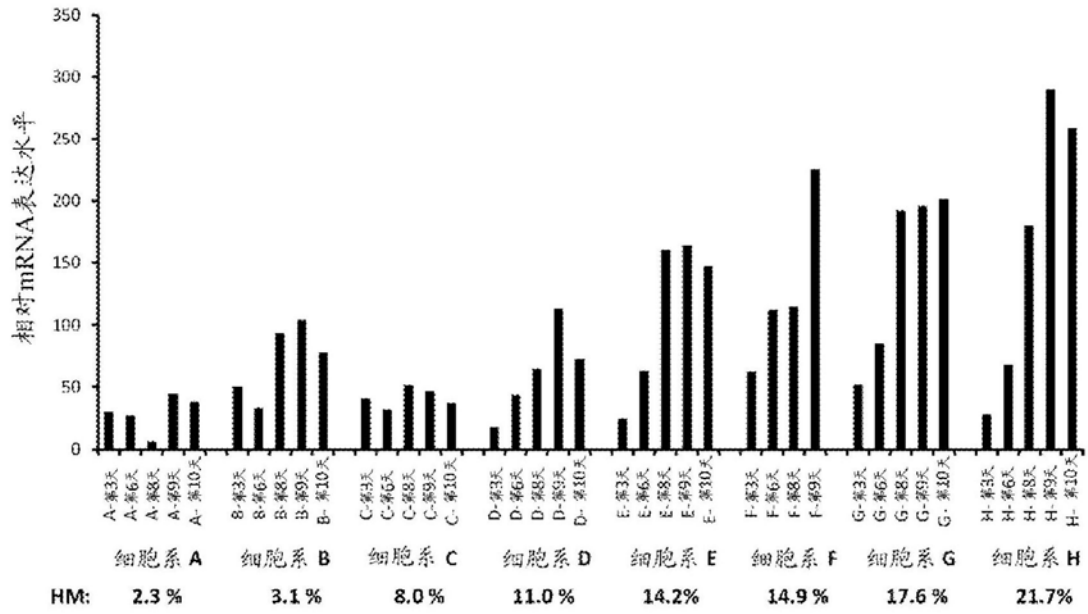


图4

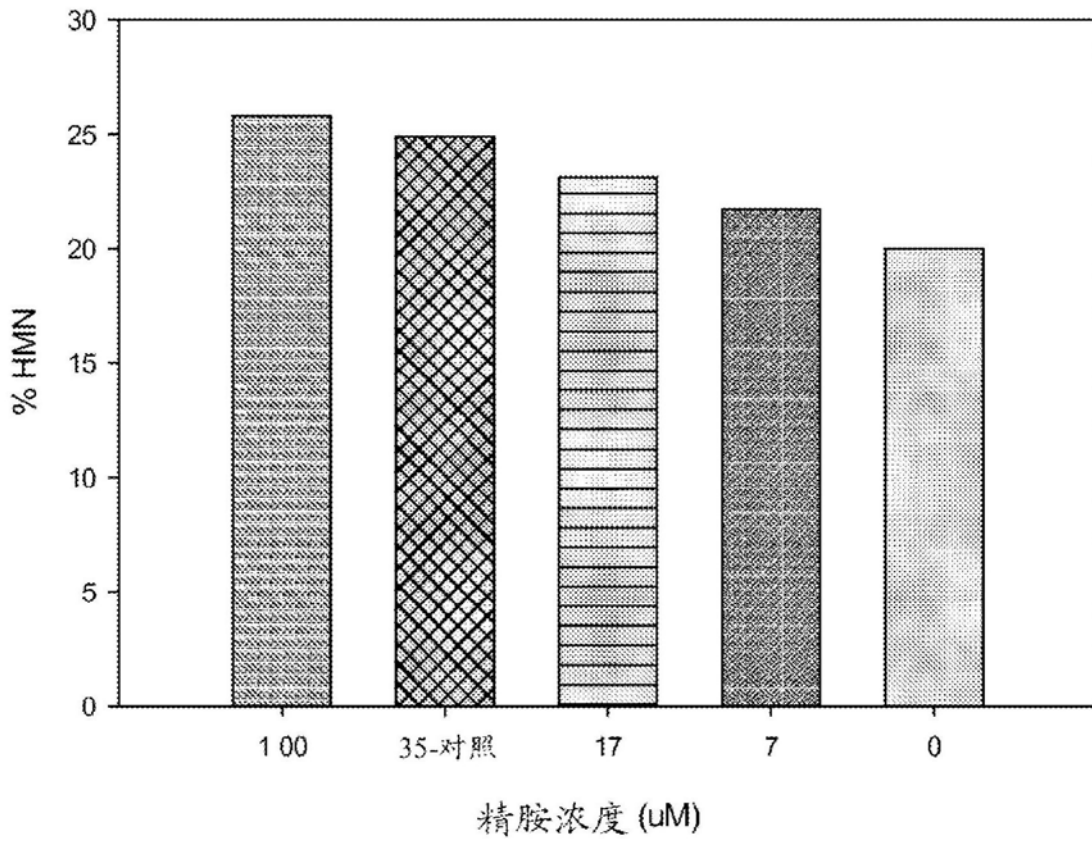


图5

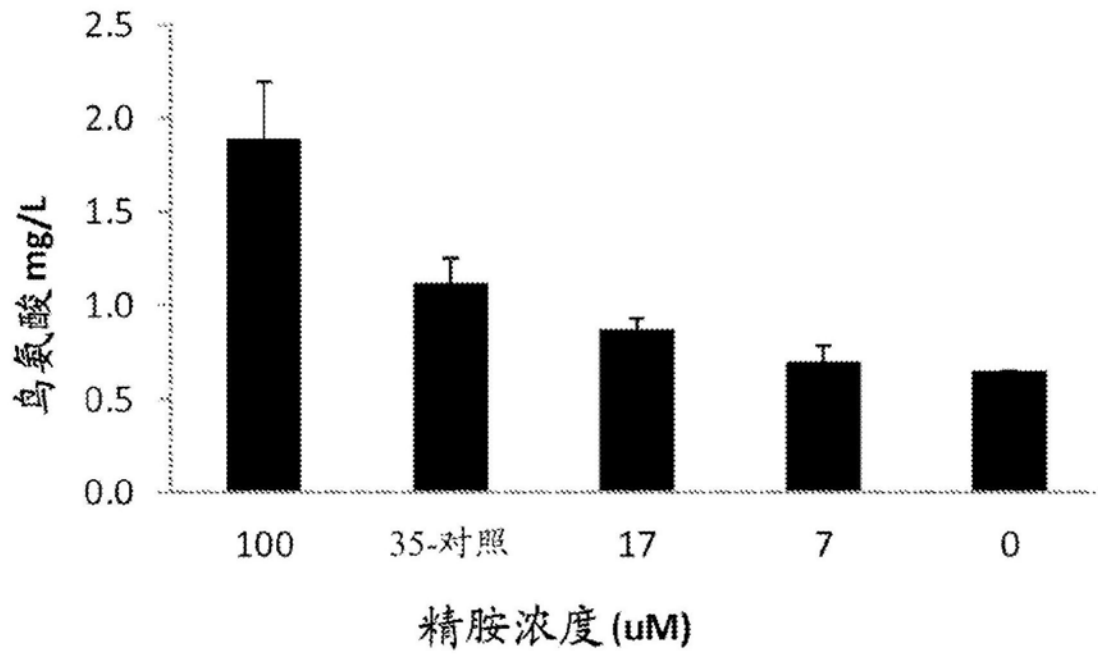


图6

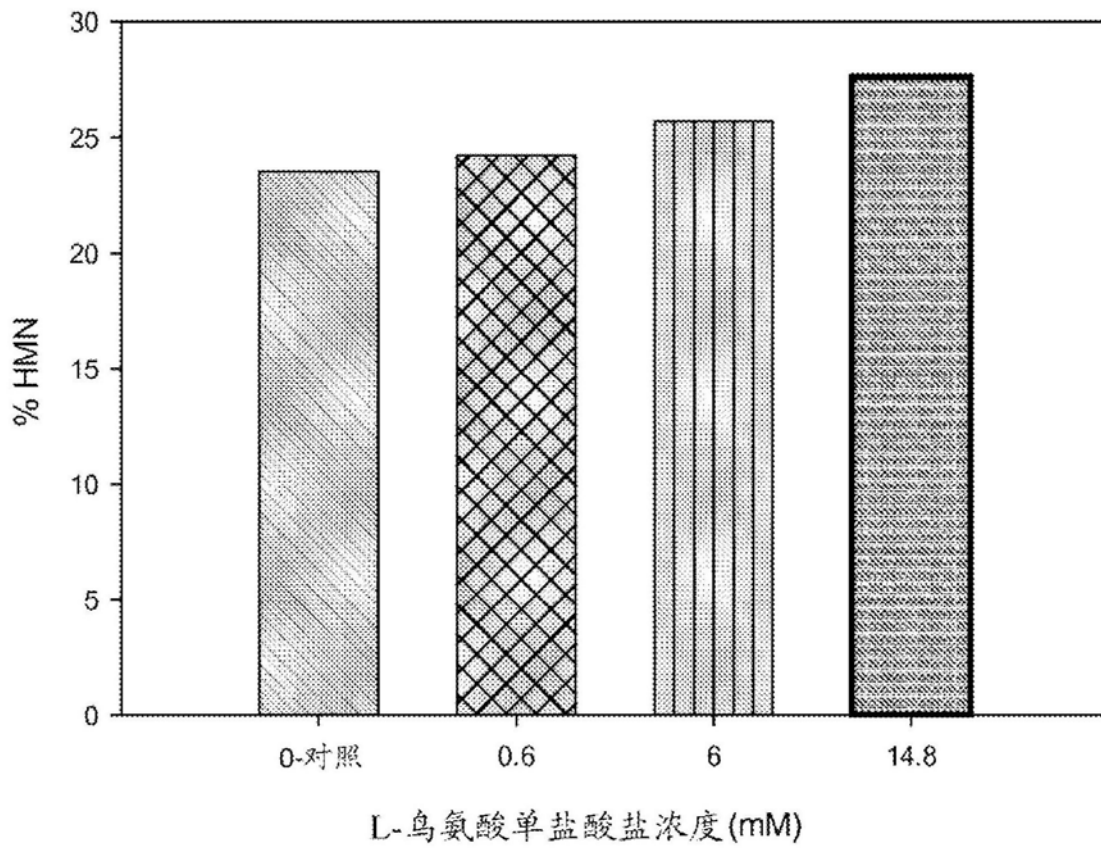


图7

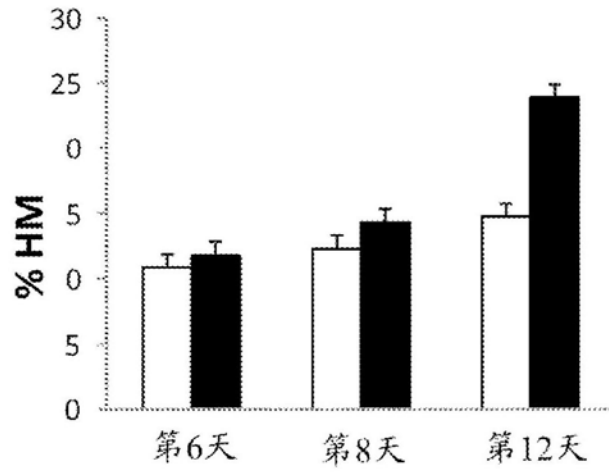


图8

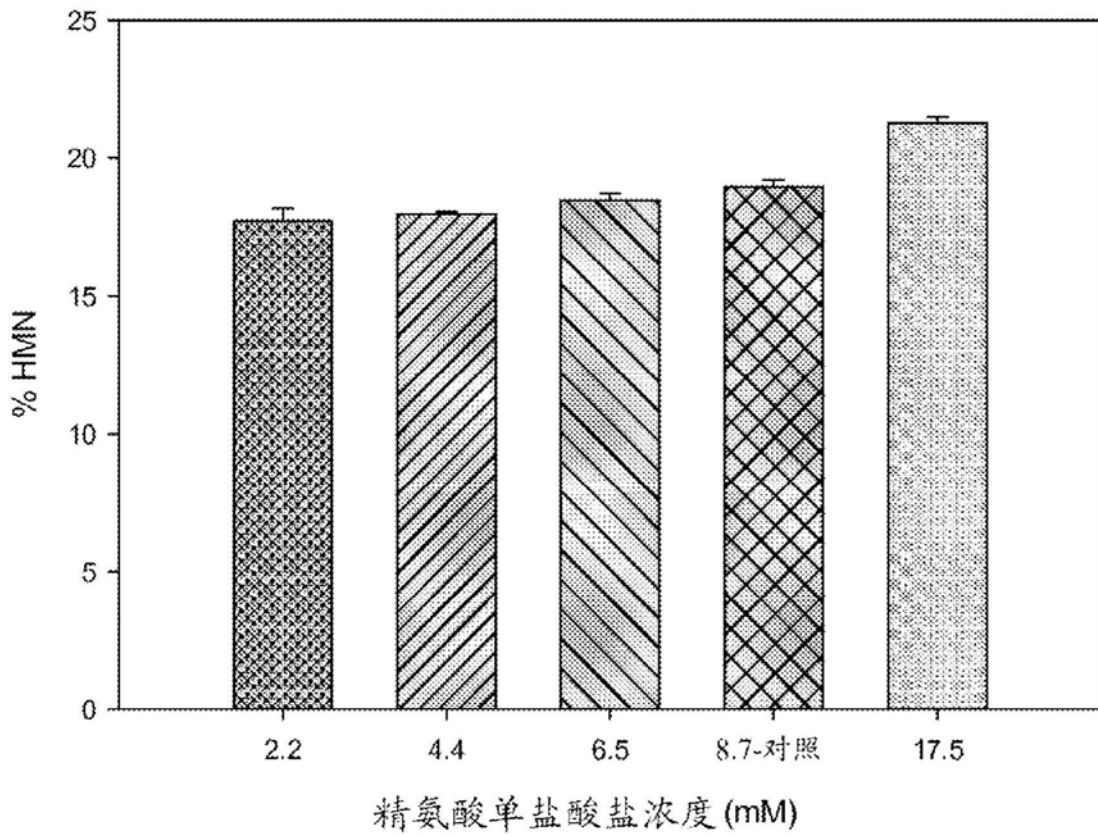


图9

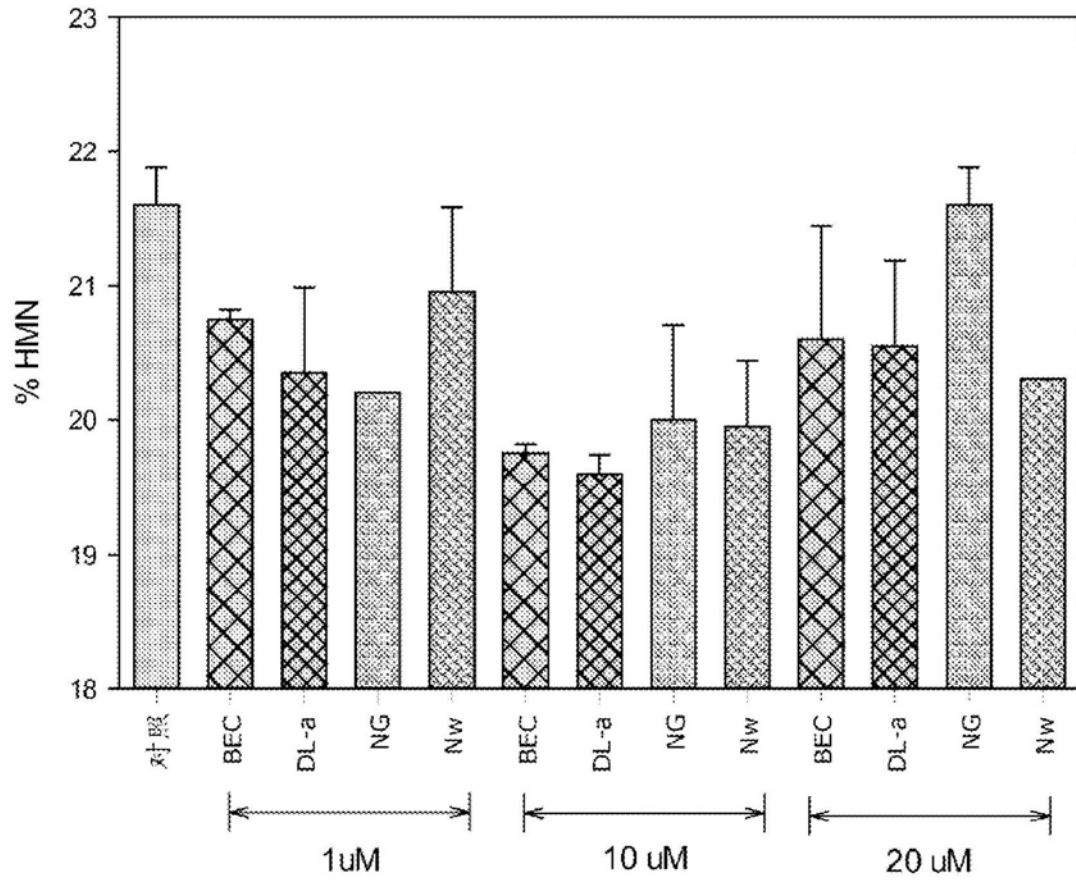


图10

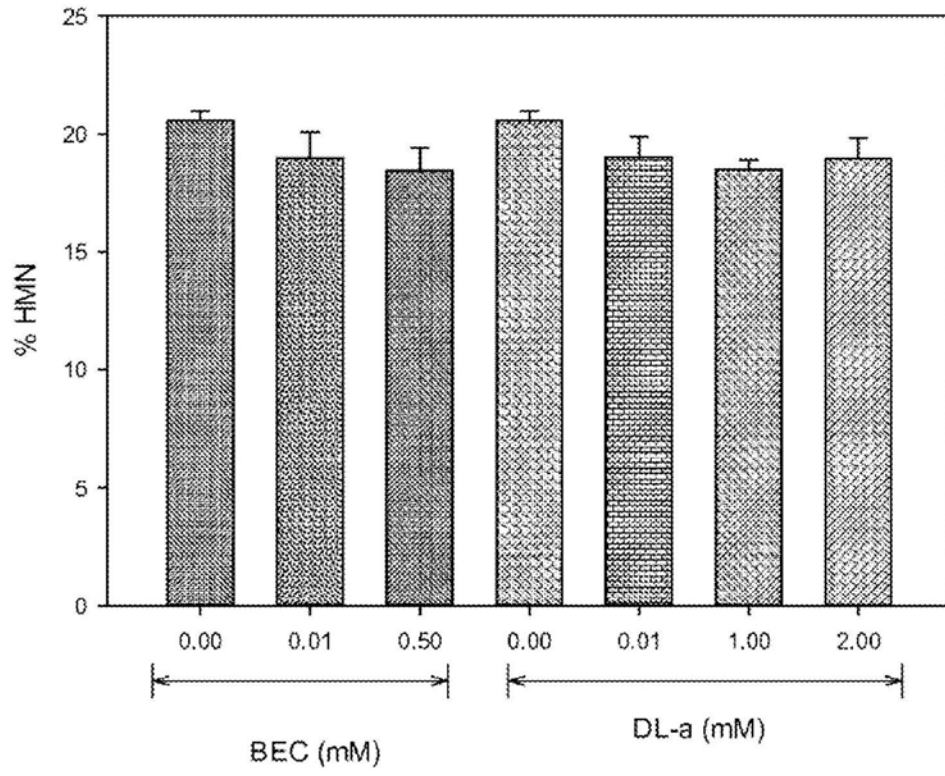


图11