



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105189761 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480013542. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 12

*C12P 1/00*(2006. 01)

(30) 优先权数据

*C12N 5/00*(2006. 01)

13/829, 249 2013. 03. 14 US

*C12N 5/02*(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/023900 2014. 03. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/159488 EN 2014. 10. 02

(71) 申请人 动量制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 B·E·柯林斯 H·普仁泰斯

B·毕龙贵 R·体佳妮

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 张全信

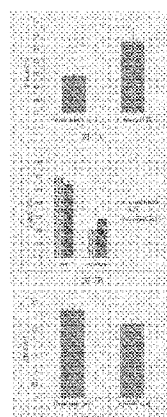
权利要求书6页 说明书39页 附图8页

(54) 发明名称

细胞培养方法

(57) 摘要

描述了具有目标水平的聚糖的多肽制剂以及使用铵和 / 或赖氨酸产生这类多肽制剂的方法。



1. 一种产生具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值的重组蛋白制剂的方法,该方法包括:

(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;

(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含铵的培养基中培养该细胞;并且

(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中该制剂具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中该重组蛋白是一种重组治疗性蛋白。

3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中该重组蛋白是一种重组治疗性抗体。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中该目标值是一种参考治疗性产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的一个水平。

5. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中该目标值是一种参考治疗性抗体产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的一个水平。

6. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法,其中该目标值是一个预先确定的药物产品规格。

7. 如权利要求 4 所述的方法,其中该参考治疗性产品选自下组,该组由以下各项组成:阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗;帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的方法,进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其中该目标值是以下各项中的一个或多个:

(a) 0.1%至 20%高甘露糖聚糖,

(b) 1%至 95%半乳糖基化聚糖,以及

(c) 70%至 100%岩藻糖基化聚糖。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中该培养基包括一个升高水平的铵。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中该升高水平的铵是 1mM 至 50mM 铵。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中高甘露糖聚糖的目标值高于在不包含该升高水平的铵的培养基中培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中该目标值比该相应水平高该相应水平的至少 10%。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其中半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值低于在不包含该升高水平的铵的培养基中培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中该目标值比该相应水平低该相应水平的至少 10%。

16. 如权利要求 1-15 中任一项所述的方法,其中该培养基进一步包括葡糖胺、赖氨酸、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

17. 一种产生重组蛋白制剂的方法,该方法包括:

(a) 提供高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的一个目标值；

(b) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞；

(c) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含铵的培养基中培养该细胞；

(d) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂；并且

(e) 如果该制剂满足高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值，将该制剂配制成一种药物产品。

18. 如权利要求 17 所述的方法，进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。

19. 如权利要求 17 或权利要求 18 所述的方法，其中该培养基进一步包括葡糖胺、赖氨酸、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

20. 一种增加重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的水平的方法，该方法包括：

(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞；

(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的铵的培养基中培养该细胞；并且

(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂，其中相对于使用不包含该升高水平的铵的培养基产生的重组蛋白制剂中的相应水平，该制剂的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的水平是增加的。

21. 如权利要求 20 所述的方法，进一步包括测量高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的水平。

22. 如权利要求 20 或权利要求 21 所述的方法，其中高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的增加了的水平比该相应水平高该相应水平的至少 10%。

23. 如权利要求 20-22 中任一项所述的方法，其中该培养基进一步包括葡糖胺、赖氨酸、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

24. 一种减少重组蛋白制剂中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平的方法，该方法包括：

(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞；

(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的铵的培养基中培养该细胞；并且

(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂，其中相对于使用不包含该升高水平的铵的培养基产生的重组蛋白制剂中的相应水平，该制剂的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平是减少的。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中这些岩藻糖基化聚糖包括 G1F 聚糖和 G2F 聚糖中的一种或多种。

26. 如权利要求 24 或权利要求 25 所述的方法，进一步包括测量半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。

27. 如权利要求 24-26 中任一项所述的方法，其中半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的减少的水平比该相应水平低该相应水平的至少 10%。

28. 如权利要求 24-27 中任一项所述的方法,其中该培养基进一步包括葡糖胺、赖氨酸、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胍、以及 DMSO 中的一种或多种。

29. 如权利要求 1-28 中任一项所述的方法,其中该培养基包括 10mM 至 20mM 铵。

30. 如权利要求 1-29 中任一项所述的方法,其中该培养基包括 15mM 铵。

31. 如权利要求 1-28 中任一项所述的方法,其中该培养步骤包括一个第一阶段和一个第二阶段。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其中该第一阶段包括在包含一个第一水平的铵的培养基中培养该细胞,并且该第二阶段包括在包含一个第二水平的铵的培养基中培养该细胞。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其中该第二水平是 1mM 至 50mM 铵。

34. 如权利要求 32 或 33 所述的方法,其中该第二水平是 10mM 至 20mM 铵。

35. 如权利要求 32-34 中任一项所述的方法,其中该第二水平是 15mM 铵。

36. 如权利要求 31-35 中任一项所述的方法,其中该第一阶段包括在该第一水平的铵中将该细胞培养 1 至 8 天。

37. 如权利要求 31-36 中任一项所述的方法,其中该第二阶段包括在该第二水平的铵中将该细胞培养 1 至 12 天。

38. 如权利要求 1-37 中任一项所述的方法,其中该细胞是一种 CHO 细胞。

39. 一种产生具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值的重组蛋白制剂的方法,该方法包括:

(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;

(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含赖氨酸的培养基中培养该细胞;并且

(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中该制剂具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中该重组蛋白是一种重组治疗性蛋白。

41. 如权利要求 39 所述的方法,其中该重组蛋白是一种重组治疗性抗体。

42. 如权利要求 39-41 中任一项所述的方法,其中该目标值是一种参考治疗性产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的一个水平。

43. 如权利要求 39-41 中任一项所述的方法,其中该目标值是一种参考治疗性抗体产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的一个水平。

44. 如权利要求 39-41 中任一项所述的方法,其中该目标值是一个预先确定的药物产品规格。

45. 如权利要求 42 所述的方法,其中该参考治疗性产品选自下组,该组由以下各项组成:阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗;帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

46. 如权利要求 39-45 中任一项所述的方法,进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水

平。

47. 如权利要求 39-46 中任一项所述的方法,其中该目标值是以下各项中的一个或多个:

- (a) 0.1% 至 20% 高甘露糖聚糖,
- (b) 1% 至 95% 半乳糖基化聚糖,
- (c) 70% 至 100% 岩藻糖基化聚糖, 以及
- (d) 0.1% 至 90% 唾液酸化聚糖。

48. 如权利要求 39-47 中任一项所述的方法,其中该培养基包括一个升高水平的赖氨酸。

49. 如权利要求 48 所述的方法,其中该升高水平的赖氨酸是 2g/L 至 30g/L 赖氨酸。

50. 如权利要求 48 或权利要求 49 所述的方法,其中高甘露糖聚糖的目标值高于在不包含该升高水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。

51. 如权利要求 50 所述的方法,其中该目标值比该相应水平高该相应水平的至少 10%。

52. 如权利要求 48 所述的方法,其中半乳糖基化聚糖、唾液酸化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值低于在不包含该升高水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。

53. 如权利要求 52 所述的方法,其中该目标值比该相应水平低该相应水平的至少 10%。

54. 如权利要求 39-53 中任一项所述的方法,其中该培养基进一步包括葡糖胺、铵、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

55. 一种产生重组蛋白制剂的方法,该方法包括:

(a) 提供高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的一个目标值;

(b) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;

(c) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含赖氨酸的培养基中培养该细胞;

(d) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂;并且

(e) 如果该制剂满足高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值,将该制剂配制成一种药物产品。

56. 如权利要求 55 所述的方法,进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。

57. 如权利要求 56 或权利要求 57 所述的方法,其中该培养基进一步包括葡糖胺、铵、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

58. 一种增加重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:

(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;

(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞;并且

(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于使用不包含该升高水平的赖氨酸

的培养基产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的水平是增加的。

59. 如权利要求 58 所述的方法,进一步包括测量高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的水平。

60. 如权利要求 58 或权利要求 59 所述的方法,其中高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的增加了的水平比该相应水平高该相应水平的至少 10%。

61. 如权利要求 58-60 中任一项所述的方法,其中该培养基进一步包括葡糖胺、铵、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

62. 一种减少重组蛋白制剂中的半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:

(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;

(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞;并且

(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于使用不包含该升高水平的赖氨酸的培养基产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平是减少的。

63. 如权利要求 62 所述的方法,其中这些岩藻糖基化聚糖包括 G1F 聚糖和 G2F 聚糖中的一种或多种。

64. 如权利要求 62 或权利要求 63 所述的方法,进一步包括测量半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。

65. 如权利要求 62-64 中任一项所述的方法,其中半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的减少的水平比该相应水平低该相应水平的至少 10%。

66. 如权利要求 62-65 中任一项所述的方法,其中该培养基进一步包括葡糖胺、铵、铜、腐胺、葡萄糖、生长因子、维生素、脂质、蛋白胨、以及 DMSO 中的一种或多种。

67. 如权利要求 39-66 中任一项所述的方法,其中该培养基包括 2g/L 至 10g/L 赖氨酸。

68. 如权利要求 39-67 中任一项所述的方法,其中该培养基包括 5g/L 赖氨酸。

69. 如权利要求 39-68 中任一项所述的方法,其中该培养步骤包括一个第一阶段和一个第二阶段。

70. 如权利要求 69 所述的方法,其中该第一阶段包括在包含一个第一水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞,并且该第二阶段包括在包含一个第二水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞。

71. 如权利要求 70 所述的方法,其中该第二水平是 2g/L 至 30g/L 赖氨酸。

72. 如权利要求 70 所述的方法,其中该第二水平是 2g/L 至 10g/L 赖氨酸。

73. 如权利要求 70 所述的方法,其中该第二水平是 5g/L 赖氨酸。

74. 如权利要求 70-73 中任一项所述的方法,其中该第一阶段包括在该第一水平的赖氨酸中将该细胞培养 1 至 8 天。

75. 如权利要求 70-74 中任一项所述的方法,其中该第二阶段包括在该第二水平的赖氨酸中将该细胞培养 1 至 12 天。

76. 如权利要求 39-75 中任一项所述的方法,其中该细胞是一种 CHO 细胞。

77. 一种产生具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值的重组蛋白制剂的方法,该方法包括:

- (a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;
- (b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含 pH 调节剂的培养基中培养该细胞;并且
- (c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中该制剂具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值。

## 细胞培养方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 14 日提交的美国申请号 13/829, 249 的权益, 该申请的内容特此以其全部内容结合在此。

### 发明领域

[0003] 本发明总体上涉及细胞培养方法。

[0004] 背景

[0005] 治疗性多肽是一类重要的治疗性生物技术产品, 并且治疗性抗体 (包括鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体以及它们的片段) 占据了治疗性生物产品的大多数。

[0006] 概述

[0007] 在一个方面中, 本发明的特征是一种产生具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值的重组蛋白制剂的方法, 该方法包括: (a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞; (b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含 (例如, 补充有) 铵的培养基中培养该细胞; 并且 (c) 收获 (例如, 从该细胞和 / 或培养基中纯化或分离) 由该细胞产生的重组蛋白制剂, 其中该制剂具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值。在一些实施例中, 该培养基包括铵, 铵存在的时间和数量有效于修饰 (例如, 增加或减少) 该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种。

[0008] 在一些实施例中, 该培养基包括至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵。在一些实施例中, 该培养基包括约 1mM 至约 50mM 铵, 例如, 约 1mM 至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM 铵。

[0009] 在一些实施例中, 该目标值是一种参考治疗性产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中, 该目标值是一种参考治疗性抗体产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中, 该目标值是一个预先确定的药物产品规格或一种药物制剂的质量控制标准, 例如分析证书 (CoFA)、检测证书 (CoFT) 或主生产批记录 (Master Batch Record)。在一些实施例中, 该产品规格是 FDA 标签、医嘱、USP 专论或 EP 专论中的一个产品描述。

[0010] 在一些实施例中, 该参考治疗性产品选自下组, 该组由以下各项组成: 阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依

莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗；帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

[0011] 在一些实施例中，该目标值是以下各项中的一个或多个：(a) 至少约 0.1% 至约 20% 高甘露糖聚糖，例如，至少约 0.1%、约 0.5%、约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、或更多的高甘露糖聚糖；(b) 至少约 1% 至约 95% 半乳糖基化聚糖，例如，至少约 1%、约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、或约 95% 的半乳糖基化聚糖；以及 (c) 至少约 70% 至 100% 岩藻糖基化聚糖，例如，至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、或约 100% 的岩藻糖基化聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如 HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合。

[0012] 在一些实施例中，高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值高于在未补充有铵（例如，不包含升高水平的铵）的培养基中通过培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。在一些实施例中，该目标值比该相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。

[0013] 在一些实施例中，该方法进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中，该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中，例如，在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检测证书 (CofT) 或分析证书 (CofA) 中记录该水平。

[0014] 在另一个方面中，本发明的特征是一种产生重组蛋白制剂的方法，该方法包括：(a) 提供高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的一个目标值；(b) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞；(c) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含（例如，补充有）铵的培养基中培养该细胞；(d) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂；并且 (e) 如果该制剂满足高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值，将该制剂加工（例如，配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种）成一种药物产品。在一些实施例中，该培养基包括铵（例如，升高水平的铵），铵存在的时间和数量有效于修饰（例如，增加或减少）该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种。

[0015] 在一些实施例中，该方法进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中，该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中，例如，在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、或检测证书 (CofT) 或分析证书 (CofA) 中记录该水平。

[0016] 在一些实施例中，该培养基包括至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵。在一些实施例中，该培养基包括约 1mM 至约 50mM 铵，例如，约 1mM 至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM

铵。

[0017] 在一些实施例中,该目标值是一种参考治疗性产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该目标值是一种参考治疗性抗体产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该目标值是一个预先确定的药物产品规格或一种药物制剂的质量控制标准,例如分析证书(CofA)、检测证书(CofT)或主生产批记录。在一些实施例中,该产品规格是FDA标签、医嘱、USP专论或EP专论中的一个产品描述。

[0018] 在一些实施例中,该参考治疗性产品选自下组,该组由以下各项组成:阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗;帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

[0019] 在一些实施例中,该目标值是以下各项中的一个或多个:(a)至少约0.1%至约20%高甘露糖聚糖,例如,至少约0.1%、约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、或更多的高甘露糖聚糖;(b)至少约1%至约95%半乳糖基化聚糖,例如,至少约1%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或约95%的半乳糖基化聚糖;以及(c)至少约70%至100%岩藻糖基化聚糖,例如,至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、或约100%的岩藻糖基化聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9或它们的组合。

[0020] 在一些实施例中,高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值高于在不包含升高水平的铵的培养基中通过培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。在一些实施例中,该目标值比该相应水平高该相应水平的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或更多。

[0021] 在另一个方面中,本发明的特征是一种增加重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a)提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b)在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的铵(例如,补充有铵)的培养基中培养该细胞;并且(c)收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含升高水平的铵的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种的水平是增加的。在一些实施例中,该培养基包括升高水平的铵,铵存在的时间和数量有效于增加该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种。在一些实施例中,如果该制剂满足高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0022] 在一些实施例中,该培养基包括至少约1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵。在一些实施例中,该培养基包括约1mM至约50mM铵,例如,约1mM

至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM 铵。

[0023] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检测证书 (CoFT) 或分析证书 (CoFA) 中记录该水平。

[0024] 在一些实施例中,高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的增加的水平比该相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。在一些实施例中,该增加的水平是以下各项中的一个或多个:(a) 至少约 0.1% 至约 20% 高甘露糖聚糖,例如,至少约 0.1%、约 0.5%、约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、或更多的高甘露糖聚糖;(b) 至少约 70% 至 100% 岩藻糖基化聚糖,例如,至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、或约 100% 的岩藻糖基化聚糖;以及 (c) 至少约 0.1% 至约 90% GOF 聚糖,例如,至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90% GOF 的聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如 HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合。

[0025] 在另一个方面中,本发明的特征是一种减少重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含降低水平的铵的培养基中培养该细胞;并且 (c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含降低水平的铵的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平是减少的。在一些实施例中,该培养基包括降低水平的铵,铵存在的时间和数量有效于减少该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,如果该制剂满足高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0026] 在一些实施例中,该培养基包括少于约 50mM、45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM、或更少的铵。

[0027] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检测证书 (CoFT) 或分析证书 (CoFA) 中记录该水平。

[0028] 在一些实施例中,高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的减少的水平比该相应水平低该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、

70%、80%、90%、95%、或 100%。在一些实施例中,该减少的水平是以下各项中的一个或多个:(a) 少于约 20% 高甘露糖聚糖;(b) 少于约 90% 岩藻糖基化聚糖;以及 (c) 少于约 90% G0F 聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如 HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合。

[0029] 在另一个方面中,本发明的特征是一种减少重组蛋白制剂中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的铵(例如,补充有铵)的培养基中培养该细胞;并且 (c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含升高水平的铵的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平是减少的。在一些实施例中,该培养基包括升高水平的铵,铵存在的时间和数量有效于减少该重组蛋白中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,如果该制剂满足半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0030] 在一些实施例中,该培养基包括至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵。在一些实施例中,该培养基包括约 1mM 至约 50mM 铵,例如,约 1mM 至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM 铵。

[0031] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格(MSDS)、批记录、检测证书(CofT) 或分析证书(CofA) 中记录该水平。

[0032] 在一些实施例中,半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的减少的水平比该相应水平低该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%。在一些实施例中,该减少的水平少于约 100% 岩藻糖基化聚糖,例如,少于约 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、或 10% 的岩藻糖基化聚糖。在一些实施例中,该一种或多种岩藻糖基化聚糖包括 G1F 聚糖和 G2F 聚糖中的一种或多种。在一些实施例中,该减少的水平少于约 95% 半乳糖基化聚糖,例如,少于约 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%、或 0.5% 的半乳糖基化聚糖。

[0033] 在另一个方面中,本发明的特征是一种增加重组蛋白制剂中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含降低水平的铵的培养基中培养该细胞;并且 (c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含降低水平的铵的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平是减少的。在一些实施例中,

该培养基包括降低水平的铵,铵存在的时间和数量有效于增加该重组蛋白中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,如果该制剂满足半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0034] 在一些实施例中,该培养基包括少于约 50mM、45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM、或更少的铵。

[0035] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格(MSDS)、批记录、检测证书(CofT)或分析证书(CofA)中记录该水平。

[0036] 在一些实施例中,半乳糖基化聚糖和岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的增加的水平比该相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或更多。在一些实施例中,该增加的水平是至少约 70%至 100%的岩藻糖基化聚糖,例如,至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%或约 100%的岩藻糖基化聚糖。在一些实施例中,该一种或多种岩藻糖基化聚糖包括 G1F 聚糖和 G2F 聚糖中的一种或多种。在一些实施例中,该增加的水平是至少约 1%至约 95%半乳糖基化聚糖。

[0037] 在另一个方面中,本发明的特征是一种产生重组治疗性抗体制剂(例如,阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗、帕木单抗、雷珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、或群司珠单抗)的方法,该方法包括:(a)提供高甘露糖聚糖(例如,HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9或它们的组合)、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的一个目标值(例如,一个预先确定的药物产品规格或一种药物制剂的质量控制标准,例如,一种参考治疗性抗体产品的分析证书(CofA)、检测证书(CofT)或主生产批记录);(b)提供一种被基因工程化为表达一种重组抗体的 CHO 细胞;(c)在该细胞表达该重组抗体的条件下在包含铵(例如,至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵,或约 1mM 至约 50mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、或约 14mM 至约 16mM 铵)的培养基中培养该细胞;(d)收获(例如,从该细胞和/或培养基中纯化或分离)由该细胞产生的重组抗体制剂;并且(e)如果该制剂满足高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、以及岩藻糖基化聚糖中的一种或多种的目标值,将该制剂配制(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0038] 在另一个方面中,本发明的特征是一种产生具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值的重组蛋白制剂的方法,该方法包括:(a)提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b)在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含(例如,补充有)赖氨酸的培养基中培养该细胞;并且(c)收获(例如,从该细胞和/或培养基中纯化或分离)由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中该制剂具有高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目

标值。在一些实施例中,该培养基包括赖氨酸,赖氨酸存在的时间和数量有效于修饰(例如,增加或减少)该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种。

[0039] 在一些实施例中,该培养基包括至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸、约 10g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 20g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 15g/L 赖氨酸、或约 15g/L 赖氨酸至约 30g/L 赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸。

[0040] 在一些实施例中,该目标值是一种参考治疗性产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该目标值是一种参考治疗性抗体产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该目标值是一个预先确定的药物产品规格或一种药物制剂的质量控制标准,例如分析证书(CofA)、检测证书(CofT)或主生产批记录。在一些实施例中,该产品规格是FDA 标签、医嘱、USP 专论或EP 专论中的一个产品描述。

[0041] 在一些实施例中,该参考治疗性产品选自下组,该组由以下各项组成:阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗;帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

[0042] 在一些实施例中,该目标值是以下各项中的一个或多个:(a) 至少约 0.1% 至约 20% 高甘露糖聚糖,例如,至少约 0.1%、约 0.5%、约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、或更多的高甘露糖聚糖;(b) 至少约 1% 至约 95% 半乳糖基化聚糖,例如,至少约 1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 的半乳糖基化聚糖;(c) 至少约 70% 至 100% 岩藻糖基化聚糖,例如,至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、或约 100% 的岩藻糖基化聚糖;以及 (d) 至少约 0.1% 至约 90% 唾液酸化聚糖,例如,至少约 0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90% 的唾液酸化聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如 HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合。

[0043] 在一些实施例中,高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值高于在不包含赖氨酸(例如,升高水平的赖氨酸)的培养

基中通过培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。在一些实施例中,该目标值比相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。

[0044] 在一些实施例中,该方法进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检测证书 (CofT) 或分析证书 (CofA) 中记录该水平。

[0045] 在另一个方面中,本发明的特征是一种产生重组蛋白制剂的方法,该方法包括:(a) 提供高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的一个目标值;(b) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(c) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含(例如,补充有)赖氨酸的培养基中培养该细胞;(d) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂;并且(e) 如果该制剂满足甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值,将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。在一些实施例中,该培养基包括赖氨酸,赖氨酸存在的时间和数量有效于修饰(例如,增加或减少)该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种。

[0046] 在一些实施例中,该方法进一步包括评价该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、或检测证书 (CofT) 或分析证书 (CofA) 中记录该水平。

[0047] 在一些实施例中,该培养基包括至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸、约 10g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 20g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 15g/L 赖氨酸、或约 15g/L 赖氨酸至约 30g/L 赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸。

[0048] 在一些实施例中,该目标值是一种参考治疗性产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该目标值是一种参考治疗性抗体产品中的高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该目标值是一个预先确定的药物产品规格或一种药物制剂的质量控制标准,例如分析证书 (CofA)、检测证书 (CofT) 或主生产批记录。在一些实施例中,该产品规格是 FDA 标签、医嘱、USP 专论或 EP 专论中的一个产品描述。

[0049] 在一些实施例中,该参考治疗性产品选自下组,该组由以下各项组成:阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗;帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

[0050] 在一些实施例中,该目标值是以下各项中的一个或多个:(a)至少约0.1%至约20%高甘露糖聚糖,例如,至少约0.1%、约0.5%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%、约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、约20%、或更多的高甘露糖聚糖;(b)至少约1%至约95%半乳糖基化聚糖,例如,至少约1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或95%的半乳糖基化聚糖;(c)至少约70%至100%岩藻糖基化聚糖,例如,至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、或约100%的岩藻糖基化聚糖;以及(d)至少约0.1%至约90%唾液酸化聚糖,例如,至少约0.1%、0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%的唾液酸化聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9或它们的组合。

[0051] 在一些实施例中,高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值高于在不包含赖氨酸(例如,升高水平的赖氨酸)的培养基中通过培养该细胞而产生的制剂中的相应水平。在一些实施例中,该目标值比相应水平高该相应水平的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%或更多。

[0052] 在另一个方面中,本发明的特征是一种增加重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a)提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b)在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的赖氨酸(例如,补充有赖氨酸)的培养基中培养该细胞;并且(c)收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含升高水平的赖氨酸的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种的水平是增加的。在一些实施例中,该培养基包括升高水平的赖氨酸,赖氨酸存在的时间和数量有效于增加该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种。在一些实施例中,如果该制剂满足高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及GOF聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0053] 在一些实施例中,该培养基包括至少约1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约1g/L至约30g/L赖氨酸、约1g/L至约10g/L赖氨酸、约1g/L至约9g/L赖氨酸、约2g/L至约8g/L赖氨酸、约3g/L至约7g/L赖氨酸、约4g/L至约6g/L赖氨酸、约10g/L至约20g/L赖氨酸、约20g/L至约30g/L赖氨酸、约1g/L至约20g/L赖氨酸、约1g/L至约15g/L赖氨酸、或约15g/L赖氨酸至约30g/L赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、

110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中，该培养基包括至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸。

[0054] 在一些实施例中，该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中，该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中，例如，在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检测证书 (CoFT) 或分析证书 (CoFA) 中记录该水平。

[0055] 在一些实施例中，高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的增加的水平比该相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。在一些实施例中，该增加的水平是以下各项中的一个或多个：(a) 至少约 0.1% 至约 20% 高甘露糖聚糖，例如，至少约 0.1%、约 0.5%、约 1%、约 2%、约 3%、约 4%、约 5%、约 6%、约 7%、约 8%、约 9%、约 10%、约 11%、约 12%、约 13%、约 14%、约 15%、约 16%、约 17%、约 18%、约 19%、约 20%、或更多的高甘露糖聚糖；(b) 至少约 10% 至 100% 无岩藻糖基化聚糖，例如，至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或约 100% 的无岩藻糖基化聚糖；以及 (c) 至少约 0.1% 至约 90% GOF 聚糖，例如，至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90% 的 GOF 聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如 HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合。

[0056] 在另一个方面中，本发明的特征是一种减少重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平的方法，该方法包括：(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞；(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含降低水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞；并且 (c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂，其中相对于在不包含降低水平的赖氨酸的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平，该制剂的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平是减少的。在一些实施例中，该培养基包括降低水平的赖氨酸，赖氨酸存在的时间和数量有效于减少该重组蛋白中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中，如果该制剂满足高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的目标值，该方法进一步包括将该制剂加工（例如，配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种）成一种药物产品。

[0057] 在一些实施例中，该培养基包括少于约 30g/L、29g/L、28g/L、27g/L、26g/L、25g/L、24g/L、23g/L、22g/L、21g/L、20g/L、19g/L、18g/L、17g/L、16g/L、15g/L、14g/L、13g/L、12g/L、11g/L、10g/L、9g/L、8g/L、7g/L、6g/L、5g/L、4g/L、3g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.25g/L、0.1g/L、或没有赖氨酸。在一些实施例中，该培养基包括少于约 200mM、190mM、180mM、170mM、160mM、150mM、140mM、130mM、120mM、110mM、100mM、90mM、80mM、70mM、60mM、50mM、40mM、30mM、20mM、10mM、5mM、1mM、或更少的赖氨酸。

[0058] 在一些实施例中，该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 GOF 聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中，该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中，例如，在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检

测证书 (CoFT) 或分析证书 (CoFA) 中记录该水平。

[0059] 在一些实施例中,高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖、以及 G0F 聚糖中的一种或多种的减少的水平比该相应水平低该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%。在一些实施例中,该减少的水平是以下各项中的一个或多个:(a) 少于约 20% 高甘露糖聚糖;(b) 少于约 90% 无岩藻糖基化聚糖;以及 (c) 少于约 90% G0F 聚糖。高甘露糖聚糖可以是例如 HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合。

[0060] 在另一个方面中,本发明的特征是一种减少重组蛋白制剂中的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含升高水平的赖氨酸(例如,补充有赖氨酸)的培养基中培养该细胞;并且 (c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含升高水平的赖氨酸的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平是减少的。在一些实施例中,该培养基包括升高水平的赖氨酸,赖氨酸存在的时间和数量有效于减少该重组蛋白中的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,如果该制剂满足岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0061] 在一些实施例中,该培养基包括至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸、约 10g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 20g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 15g/L 赖氨酸、或约 15g/L 赖氨酸至约 30g/L 赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸。

[0062] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格 (MSDS)、批记录、检测证书 (CoFT) 或分析证书 (CoFA) 中记录该水平。

[0063] 在一些实施例中,岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的减少的水平比该相应水平低该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%。在一些实施例中,该减少的水平少于约 100% 岩藻糖基化聚糖,例如,少于约 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、或 10% 的岩藻糖基化聚糖。在一些实施例中,该一种或多种岩藻糖基化聚糖包括 G1F 和 G2F 聚糖中的一种

或多种。在一些实施例中,该减少的水平少于约 95% 半乳糖基化聚糖,例如,少于约 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%、或 0.5% 的半乳糖基化聚糖。在一些实施例中,该减少的水平少于约 90% 唾液酸化聚糖,例如,少于约 80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、或 0.1% 的唾液酸化聚糖。

[0064] 在另一个方面中,本发明的特征是一种增加重组蛋白制剂中的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平的方法,该方法包括:(a) 提供一种被基因工程化为表达一种重组蛋白的细胞;(b) 在该细胞表达该重组蛋白的条件下在包含降低水平的赖氨酸的培养基中培养该细胞;并且(c) 收获由该细胞产生的重组蛋白制剂,其中相对于在不包含降低水平的赖氨酸的培养基中通过培养该细胞而产生的重组蛋白制剂中的相应水平,该制剂的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平是减少的。在一些实施例中,该培养基包括降低水平的赖氨酸,赖氨酸存在的时间和数量有效于增加该重组蛋白中的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,如果该制剂满足岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值,该方法进一步包括将该制剂加工(例如,配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种)成一种药物产品。

[0065] 在一些实施例中,该培养基包括少于约 30g/L、29g/L、28g/L、27g/L、26g/L、25g/L、24g/L、23g/L、22g/L、21g/L、20g/L、19g/L、18g/L、17g/L、16g/L、15g/L、14g/L、13g/L、12g/L、11g/L、10g/L、9g/L、8g/L、7g/L、6g/L、5g/L、4g/L、3g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.25g/L、0.1g/L、或没有赖氨酸。在一些实施例中,该培养基包括少于约 200mM、190mM、180mM、170mM、160mM、150mM、140mM、130mM、120mM、110mM、100mM、90mM、80mM、70mM、60mM、50mM、40mM、30mM、20mM、10mM、5mM、1mM、或更少的赖氨酸。

[0066] 在一些实施例中,该方法进一步包括测量该重组蛋白制剂中的岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的水平。在一些实施例中,该方法进一步包括在印刷品或计算机可读介质中,例如,在测试报告、材料安全数据表格(MSDS)、批记录、检测证书(CofT)或分析证书(CofA)中记录该水平。

[0067] 在一些实施例中,岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的增加的水平比该相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。在一些实施例中,该提高的水平是至少约 70% 至 100% 的岩藻糖基化聚糖,例如,至少约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或约 100% 的岩藻糖基化聚糖。在一些实施例中,该一种或多种岩藻糖基化聚糖包括 G1F 聚糖和 G2F 聚糖中的一种或多种。在一些实施例中,该增加的水平是至少约 1% 至约 95% 半乳糖基化聚糖,例如,至少约 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或 95% 的半乳糖基化聚糖。在一些实施例中,该增加的水平是至少约 0.1% 至 90% 唾液酸化聚糖,例如,至少约 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90% 的唾液酸化聚糖。

[0068] 在于此描述的一些方面中,培养步骤包括一个第一阶段和一个第二阶段。在一些实施例中,该第一阶段包括在包含一个第一水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养该细胞,并且该第二阶段包括在包含一个第二水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养该细胞。

在一些实施例中,该第一水平相对于该第二水平是一个降低的水平,并且该第二水平相对于该第一水平是一个升高的水平。在一些实施例中,该第一水平是一个升高的水平并且该第二水平是一个降低的水平。

[0069] 在一些实施例中,该第一阶段包括在第一水平的铵和 / 或赖氨酸中将该细胞培养约 1 至约 8 天,例如,1-7、1-6、1-5 天。在一些实施例中,该第二阶段包括在第二水平的铵和 / 或赖氨酸中将该细胞培养约 1 至约 12 天,例如,1-10、1-9、1-8、1-7、1-6 天。在一些实施例中,该第一阶段是一个生长阶段。在一些实施例中,该第二阶段是一个生产阶段。

[0070] 在于此描述的一些方面中,该培养基进一步包括以下各项中的一种或多种:半胱氨酸、锰、铜、钴、腐胺、蛋白胨、葡萄糖、半乳糖、葡糖胺、谷氨酰胺、脂质(例如,胆固醇)、硫酸葡聚糖、以及 DMSO。

[0071] 在于此描述的一些方面中,该细胞是一种哺乳动物细胞。在一些实施例中,该哺乳动物细胞是 CHO(例如,CHO-K1、DG44、CHO-DXB11、CHOK1SV、CHO-S)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、BHK、海拉细胞(HeLa)、COS、MDCK 或 HEK-293 细胞。

[0072] 在于此描述的一些方面中,该重组蛋白是一种重组治疗性产品。在一些实施例中,该重组蛋白是一种重组治疗性抗体产品。在一些实施例中,该重组蛋白是一种重组治疗性融合蛋白。在一些实施例中,该重组蛋白是阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、阿柏西普、阿法赛特、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、贝拉西普、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依那西普、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗;帕木单抗、雷珠单抗、利洛西普、利妥昔单抗、托西莫单抗、以及群司珠单抗。

[0073] 在于此描述的一些方面中,细胞(例如,哺乳动物细胞)表达重组蛋白的条件包括(i) 具有以下 pH 的培养基:约 6、约 6.5、约 6.6、约 6.7、约 6.8、约 6.9、约 7、约 7.1、约 7.2、约 7.3、约 7.4、约 7.5、或约 8;(ii) 以下温度:约 25°C、约 26°C、约 27°C、约 28°C、约 29°C、约 30°C、约 31°C、约 32°C、约 33°C、约 34°C、约 35°C、约 36°C、约 37°C、约 38°C、约 39°C、或约 40°C;和 / 或(iii) 以下培养体积:约 100mL、约 200mL、约 300mL、约 400mL、约 500mL、约 600mL、约 700mL、约 800mL、约 900mL、约 1L、约 2L、约 3L、约 5L、约 10L、约 20L、约 30L、约 40L、约 50L、约 100L、约 200L、约 300L、约 400L、约 500L、约 600L、约 700L、约 800L、约 900L、约 1000L、5,000L、10,000L、20,000L、或更多。

[0074] 在另一个方面中,本发明的特征是一种使用在此所述的方法产生的重组蛋白的制剂。

[0075] 在另一个方面中,本发明的特征是一种产生重组治疗性抗体制剂(例如,阿昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、巴利昔单抗、贝伐单抗、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、吉姆单抗、替依莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、奥马佐单抗、帕利珠单抗、帕木单抗、雷珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、或群司珠单抗)的方法,该方法包括:(a) 提供高甘露糖聚糖(例如,HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或它们的组合)、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的一个目标值(例如,一个预先确定的药物产品规格或一种药物制剂的质量控制标准,例如,一种参考治疗性抗体产品的分析证书(CofA)、检测证书(CofT)或主生产批记录);(b) 提供一种被基因工程化为表达一种重组抗体的 CHO 细胞;(c) 在该细胞表达该重组抗体的条件下

在包含赖氨酸（例如，至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸，或至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、或约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸）的培养基中培养该细胞；(d) 收获（例如，从该细胞和 / 或培养基中纯化或分离）由该细胞产生的重组抗体制剂；并且 (e) 如果该制剂满足高甘露糖聚糖、半乳糖基化聚糖、岩藻糖基化聚糖、以及唾液酸化聚糖中的一种或多种的目标值，将该制剂配制（例如，配制、填充进容器、贴标签、包装中的一种或多种）成一种药物产品。

#### [0076] 附图简要说明

[0077] 当伴随附图一起阅读时，从下文的说明性实施例的描述将更全面地理解在此所述的本发明的传授内容。应理解，下文描述的附图仅是出于说明目的，并且不意图以任何方式限制本发明传授内容的范围。

[0078] 图 1 是一个 IgG 抗体分子的示意图。

[0079] 图 2A 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的岩藻糖基化聚糖水平的图示。图 2B 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的 G0F、G1F、以及 G2F 聚糖水平的图示。图 2C 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的无岩藻糖基化聚糖水平的图示。

[0080] 图 3 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的唾液酸化聚糖水平的图示。

[0081] 图 4A 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的总高甘露糖聚糖水平的图示。图 4B 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的高甘露糖 5 (HM5) 聚糖水平的图示。图 4C 是来自在具有或不具有铵进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的高甘露糖 6 (HM6)、高甘露糖 8 (HM8) 或高甘露糖 3 和 4 (HM3 和 HM4) 聚糖水平的图示。

[0082] 图 5A 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的总岩藻糖基化聚糖水平的图示。图 5B 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的 G0F、G1F、以及 G2F 聚糖水平的图示。图 5C 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的无岩藻糖基化聚糖水平的图示。

[0083] 图 6 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的总唾液酸化聚糖水平的图示。

[0084] 图 7A 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的总高甘露糖聚糖水平的图示。图 7B 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的高甘露糖 5 (HM5) 聚糖水平的图示。图 7C 是来自在具有或不具有赖氨酸进料的培养基中生长的细胞的一个模型抗体的制剂中的高甘露糖 6 (HM6)、高甘露糖 8 (HM8) 或高甘露糖 3 和 4 (HM3 和 HM4) 聚糖水平的图示。

#### [0085] 详述

[0086] 诸位发明人已经发现,具有目标水平的聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的多肽(例如,抗体)的制剂可以产生自具有铵和/或赖氨酸的培养基中培养的细胞,例如,升高水平的铵和/或赖氨酸有效于引起这种效果。本披露涵盖具有目标水平的聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的多肽(例如,抗体)的制剂、制备这类多肽(例如,抗体)的方法、以及使用这类多肽(例如,抗体)的方法。

[0087] 定义

[0088] 如在此所使用,“纯化”(或“分离”)指代基本上不含其他成分的核酸序列(例如,多核苷酸)或氨基酸序列(例如,多肽)。在一些实施例中,一种纯化的多核苷酸或纯化的多肽可从它的天然环境中存在的其他成分上去除或分离。例如,一种分离的多肽是与产生它的一种细胞的其他成分(例如,内质网或胞浆蛋白以及 RNA)分离的一种多肽。一种分离的多核苷酸是与其他核成分(例如,组蛋白)和/或上游或下游核酸序列分离的一种多核苷酸。一种分离的核酸序列或氨基酸序列可以至少 60%、或至少 75%、或至少 90%、或至少 95% 不含所指示的核酸序列或氨基酸序列的天然环境中存在的其他成分。

[0089] 如在此所使用,“多核苷酸”(或“核苷酸序列”或“核酸分子”)指代寡核苷酸、核苷酸、或多核苷酸和它们的片段或部分,以及基因组或合成来源的 DNA 和 RNA,它们可以是单链或双链的,并且表示有义链或反义链。

[0090] 如在此所使用,“多肽”(或“氨基酸序列”或“蛋白质”)指代低聚肽、肽、多肽、或蛋白质序列、以及它们的片段或部分,以及天然存在的或合成的分子。“氨基酸序列”以及类似术语(例如“多肽”或“蛋白质”)并不旨在将指示的氨基酸序列限制为与引用的蛋白质分子相关的完全的天然氨基酸序列。

[0091] 术语“药学有效量”或“治疗有效量”指代能有效治疗患有在此所述的病症或病状的患者量(例如,剂量)。在此还应理解,“药学有效量”可以被解释为以一个剂量或以任何剂量或途径,单独服用或与其他治疗剂组合服用给出所希望的治疗效果的量。

[0092] 如在此所使用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”指代以有效于改进病状、症状、或与病症或病状相关联的参数,或预防或减轻病症或病状的发展,达到本领域技术人员可检测的程度的量、方式和/或模式给予一个治疗。有效的量、方式或模式可以根据受试者来变化,并且可以为受试者进行专门定制。

[0093] 如在此所使用,术语“抗体”指代包括至少一个免疫球蛋白可变区的多肽,例如,提供免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列的氨基酸序列。例如,抗体可以包括一个重(H)链可变区(在此缩写为 VH),以及一个轻(L)链可变区(在此缩写为 VL)。在另一个实例中,一种抗体包括两个重(H)链可变区以及两个轻(L)链可变区。术语“抗体”涵盖抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv 以及 dAb 片段)以及完全抗体例如完整的 IgA、IgG、IgE、IgD、IgM 型免疫球蛋白(以及它们的亚型)。免疫球蛋白的轻链可以是 κ 或 λ 型。在一些实施例中,一种抗体包括一个 Fc 区。在一些实施例中,一种抗体是一种治疗性抗体。

[0094] 如在此所使用,术语“Fc 区”指代两个“Fc 多肽”的二聚体,每个“Fc 多肽”包括抗体中排除第一恒定区免疫球蛋白结构域的恒定区。在一些实施例中,“Fc 区”包括通过一个或多个二硫键、化学连接体或肽连接体连接的两个 Fc 多肽。“Fc 多肽”指代 IgA、IgD

和 IgG 的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,以及 IgE 和 IgM 的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,并且还可以包括这些结构域的 N 端的柔性铰链的部分或全部。对于 IgG,“Fc 多肽”包括免疫球蛋白结构域 C $\gamma$ 2(C $\gamma$ 2) 和 C $\gamma$ 3(C $\gamma$ 3),以及 C $\gamma$ 1(C $\gamma$ 1) 与 C $\gamma$ 2 之间的铰链的下部。虽然 Fc 多肽的边界可以变化,但人 IgG 重链 Fc 多肽通常被定义为包括起始于 T223 或 C226 或 P230 至它们的羧基末端的残基,其中编号是根据卡巴特(Kabat) 等人(1991,美国国立卫生研究院出版物(NIH Publication)91-3242,国家技术信息服务(National Technical Information Services),斯普林菲尔德(Springfield),弗吉尼亚州(VA)) 中的 EU 指数。对于 IgA,Fc 多肽包括免疫球蛋白结构域 C $\alpha$ 2(C $\alpha$ 2) 和 C $\alpha$ 3(C $\alpha$ 3),以及 C $\alpha$ 1(C $\alpha$ 1) 与 C $\alpha$ 2 之间的铰链的下部。一个 Fc 区可以是合成的、重组的、或产生自天然来源如 IVIG。

[0095] 如在此所使用,“聚糖”是糖。聚糖可以是糖残基的单体或聚合物,但典型地含有至少三个糖,并且可以是直链的或支链的。一种聚糖可以包括天然糖残基(例如,葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰神经氨酸、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、己糖、阿拉伯糖、核糖、木糖等)和/或修饰的糖(例如,2'-氟代核糖、2'-脱氧核糖、磷酸甘露糖、6'-磺基 N-乙酰葡萄糖胺等)。术语“聚糖”包括糖残基的均聚物和杂聚物。术语“聚糖”还涵盖结合糖(例如,糖蛋白、糖脂、蛋白多糖等)的聚糖成分。术语还涵盖游离聚糖,包括已从结合糖裂解或另外释放的聚糖。

[0096] 如在此所使用,“高甘露糖聚糖”指代包括至少 3 个甘露糖残基并且在甘露糖中终止于聚糖的非还原末端的聚糖。在一些实施例中,“高甘露糖聚糖”包括至少 4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个甘露糖残基。

[0097] 一些实施例中,一种唾液酸化聚糖包括至少 1、2、3 或 4 个唾液酸。在一些实施例中,一种唾液酸化聚糖是一种单唾液酸化聚糖(例如,(例如,利用 NeuAc- $\alpha$ 2,6-Gal 端键)在支化聚糖的  $\alpha$ 1-3 臂上单唾液酸化的一种支化聚糖),和/或一种二唾液酸化聚糖(例如,在该支化聚糖的一个  $\alpha$ 1-3 臂和一个  $\alpha$ 1-6 臂上唾液酸化的一种支化聚糖)。

[0098] 如在此所使用,“半乳糖基化聚糖”指代包括至少 1 个半乳糖残基的聚糖。在一些实施例中,半乳糖基化聚糖是 G1、G2、G1F、G2F、A1 和/或 A2 聚糖。在一些实施例中,半乳糖基化聚糖包括一个或多个乳糖胺重复。在一些实施例中,半乳糖基化聚糖是包含半乳糖- $\alpha$ 1-3-半乳糖的聚糖。在一些实施例中,半乳糖基化聚糖是三触角聚糖或四触角聚糖。

[0099] 如在此所使用,术语“糖蛋白制剂”指代一组单独的糖蛋白分子,这些糖蛋白分子各自包括具有特定氨基酸序列的多肽(该氨基酸序列包括至少一个糖基化位点)以及共价附接到该至少一个糖基化位点上的至少一个聚糖。一种糖蛋白制剂内的一种特定糖蛋白的单独的分子典型地具有相同的氨基酸序列,但可能在该至少一个糖基化位点的占用度和/或连接到糖基化位点中的至少一个上的聚糖的一致性方面有所不同。也就是说,一种糖蛋白制剂可以仅含有一种特定糖蛋白的单一糖形,但更典型地含有多个糖形。相同糖蛋白的不同制剂可以在所存在的糖形的一致性(例如,一种制剂中存在的一种糖形可能不存在于另一种制剂中)和/或不同糖形的相对数量方面有所不同。

[0100] 术语“糖形”在此用于指代糖蛋白的一种特定形式。也就是说,当一种糖蛋白包括有可能连接到不同聚糖或聚糖组上的一种特定多肽时,那么每个糖蛋白的不同型式(即,

在这些型式中,该多肽连接到一种特定聚糖或聚糖组上)被称为“糖形”。

[0101] 如在此所使用,“参考糖蛋白”指代具有与在此所述的糖蛋白(例如,与之比较的糖蛋白)基本上相同的氨基酸序列(例如,与在此所述的糖蛋白的氨基酸约 95%至 100%一致)的糖蛋白。在一些实施例中,一种参考糖蛋白是在此所述的治疗性糖蛋白,例如 FDA 批准的治疗性糖蛋白。

[0102] 如在此所使用,“Fc 区的 N-糖基化位点”指代 Fc 区内 N-连接聚糖的氨基酸残基。

[0103] 如在此所使用,“目标值”指代一种或多种特定聚糖(如高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的预先确定的水平。在一些实施例中,目标值是一个绝对值。在一些实施例中,目标值是一个相对值。在一些实施例中,目标值是一种参考糖蛋白产品中的一种或多种特定聚糖(如高甘露糖聚糖(例如, HM3、HM4、HM5、HM6、HM7、HM8、HM9 或组合)、岩藻糖基化聚糖(例如, G0F、G1F、G2F 或组合)、半乳糖基化聚糖(例如, G1、G2、G1F、G2F、A1、A2 或组合)和/或唾液酸化聚糖(例如,单唾液酸化、二唾液酸化或组合))或一种药物产品的规格或主生产批记录中描述的一个水平。

[0104] 在一些实施例中,目标值指代一种糖蛋白制剂中的一种或多种聚糖(例如,高甘露糖聚糖(例如,高甘露糖聚糖的一个或多个种类)、岩藻糖基化聚糖(例如,岩藻糖基化聚糖的一个或多个种类)、半乳糖基化聚糖(例如,半乳糖基化聚糖的一个或多个种类)和/或唾液酸化聚糖(例如,唾液酸化聚糖的一个或多个种类))的绝对水平(例如,摩尔数)。在一些实施例中,目标值指代一种糖蛋白制剂中的一种或多种聚糖(例如,高甘露糖聚糖(例如,高甘露糖聚糖的一个或多个种类)、岩藻糖基化聚糖(例如,岩藻糖基化聚糖的一个或多个种类)、半乳糖基化聚糖(例如,半乳糖基化聚糖的一个或多个种类)和/或唾液酸化聚糖(例如,唾液酸化聚糖的一个或多个种类))相对于该糖蛋白制剂中的总聚糖水平的一个水平。在一些实施例中,目标值被表达为“百分比”,它指代一种糖蛋白制剂中的一种或多种聚糖(例如, Fc 聚糖)的摩尔数相对于聚糖(例如, Fc 聚糖)的总摩尔数。在一些实施例中,“百分比”指代一种或多种 N-糖酰胺酶 F 释放的 Fc 聚糖的摩尔数相对于所检测的 N-糖酰胺酶 F 释放的 Fc 聚糖的总摩尔数。

#### [0105] 细胞

[0106] 可以用来表达一种感兴趣的多肽(例如,一种抗体)的任何宿主细胞都可以用于在此所述的方法。细胞可以被基因工程化来含有编码一种感兴趣的多肽(例如,一种抗体)的一种重组核酸序列例如一种基因。例如,有用的细胞可以表达一种重组多肽。编码一种多肽的一种基因的重组表达可以包括构建含有编码该多肽的一种多核苷酸的一个表达载体。一旦获得一种多核苷酸,就可以通过重组 DNA 技术使用本领域中已知的技术来产生用于产生该多肽的一个载体。已知方法可以用来构建含有多肽编码序列以及适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组 DNA 技术、合成技术、以及体内基因重组。

[0107] 一种表达载体可以通过常规技术转移到一种宿主细胞中,并且转染的细胞然后通过常规技术进行培养,根据本披露进行修饰,以产生一种重组多肽。可以使用多种宿主表达载体系统(参见,例如美国专利号 5,807,715)。此类宿主表达系统(例如,基因工程化的宿主表达系统)可以用来产生多肽(例如,抗体)并且随后根据需要进行纯化。此类宿主表达系统包括但不限于:用含有多肽编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酵母菌属和毕赤酵母属);用含有多肽编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)

转染的昆虫细胞系统；用重组病毒表达载体（例如，花椰菜花叶病毒，CaMV；烟草花叶病毒，TMV）转染或用含有多肽编码序列的重组质粒表达载体（例如，Ti 质粒）转化的植物细胞系统；或拥有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统（例如，COS、CHO、BHK、293、NS0 以及 3T3 细胞），这些重组表达构建体含有来自哺乳动物细胞的基因组（例如，金属硫蛋白启动子）或哺乳动物病毒（例如，腺病毒晚期启动子；痘苗病毒 7.5K 启动子）的启动子。

[0108] 对于哺乳动物宿主细胞中的表达，可以利用基于病毒的表达系统（参见，例如，洛根 (Logan) 等人，1984，美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 8:355-359）。表达的效率可以通过包含适当的转录增强子元件、转录终止子等来增强（参见，例如，比特纳 (Bittner) 等人，1987，酶学方法 (Methods in Enzymol.) 153:516-544）。

[0109] 此外，可以选择调节插入序列的表达，或以所希望的特定方式修饰和加工基因产物的一种宿主细胞株。不同的宿主细胞具有特征性的且特定的对蛋白质和基因产物进行翻译后加工和修饰的机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统以确保所表达的多肽（例如，抗体）的正确修饰和加工。此类细胞包括例如已建立的哺乳动物细胞系和昆虫细胞系、动物细胞、真菌细胞、以及酵母细胞。哺乳动物宿主细胞包括但不限于 CHO、Vero、BHK、HeLa、COS、MDCK、HEK-293、NIH-3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0（不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系）、CRL7030、HsS78Bst 细胞、PER. C6、SP2/0-Ag14、以及杂交瘤细胞。此外，动物或哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 如 CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DG44 (蔡辛 (Chasin) 等人，1986，体细胞和分子遗传学 (Som. Cell Molec. Genet.)，12:555-556；和寇克卡 (Kolkekar) 等人，1997，生物化学 (Biochem.)，36:10901-10909)、CHO-DXB11 (G·乌尔劳布 (G. Urlaub) 和 L·A·蔡辛 (L. A. Chasin)，1980，美国国家科学院院刊，77:4216-4220，L·H·格拉芙 (L. H. Graf) 和 L·A·蔡辛，1982，分子细胞生物学 (Molec. Cell Biol.)，2:93-96)、CHO-K1Tet-On 细胞系（克隆技术公司 (Clontech)）、CHO 指定 ECACC 85050302 (CAMR，塞尔斯贝里 (Salisbury)，威尔特郡 (Wiltshire)，英国)、CHO 克隆 13 (GEIMG，热那亚 (Genova)，意大利 (IT))、CHO 克隆 B (GEIMG，热那亚，意大利)、CHO-K1/SF 指定 ECACC 93061607 (CAMR，塞尔斯贝里，威尔特郡，英国)、RR-CHOK1 指定 ECACC 92052129 (CAMR，塞尔斯贝里，威尔特郡，英国)、CHOK1sv (埃德蒙 (Edmonds) 等人，分子生物技术 (Mol. Biotech.)，34:179-190 (2006))、CHO-S (皮希勒 (Pichler) 等人，生物技术和生物工程 (Biotechnol. Bioeng.)，108:386-94 (2011))、二氢叶酸还原酶阴性 CHO 细胞 (CHO/-DHFR，乌尔劳布和蔡辛，1980，美国国家科学院院刊，77:4216) 以及 dp12. CHO 细胞（美国专利号 5,721,121）；通过 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞 (COS 细胞，COS-7，ATCC CRL-1651)；人胚胎肾细胞（例如，293 细胞，或亚克隆用于在悬浮培养物中生长的 293 细胞，格拉汉姆 (Graham) 等人，1977，基因病毒学杂志 (J. Gen. Virol.)，36:59)；幼仓鼠肾细胞 (BHK，ATCC CCL-10)；猴肾细胞 (CV1，ATCC CCL-70)；非洲绿猴肾细胞 (VERO-76，ATCC CRL-1587；VERO，ATCC CCL-81)；小鼠支持细胞 (TM4，马瑟 (Mather)，1980，繁殖生物学 (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)；小鼠乳腺癌细胞 (MMT 060562，ATCC CCL-51)；布法罗大鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A，ATCC CRL-1442)；TR1 细胞（马瑟，1982，纽约科学院年鉴 (Ann. NY Acad. Sci.)，383:44-68)；MCR 5 细胞；以及 FS4 细胞。

[0110] 对于长期的高产率的重组蛋白的生产,可以将宿主细胞工程化来稳定地表达一种多肽(例如,抗体)。宿主细胞可以使用受本领域中已知的适当的表达控制元件控制的 DNA 来转化,这些表达控制元件包括启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点、以及可选择性标记。重组 DNA 技术领域普遍已知的方法可以用来选择一种所希望的重组克隆。在一些实施例中,一种细胞被基因工程化来提高一种内源多肽的表达水平,例如通过增加编码多肽的一种基因的转录和/或提高 mRNA 稳定性。在一些实施例中,编码一种多肽的基因的转录通过以下各项来增加:例如在体细胞中例如通过添加一个正调节元件例如增强子或针对一种转录激活因子的 DNA 结合位点来改变内源基因的调节序列;缺失一个负调节元件,例如针对一种转录阻抑因子的 DNA 结合位点;和/或用另一基因的调节序列或其中的元件替换内源调节序列或其中的元件,从而允许该基因的编码区更有效地转录。

[0111] 一旦通过重组表达产生在此所述的一种多肽(例如,在此所述的一种抗体),可以通过本领域中已知用于纯化的任何方法来纯化,例如通过色谱法(例如,离子交换、亲和、以及筛柱色谱)、离心分离、差别性溶解度、或通过任何其他用于蛋白质纯化的标准技术。例如,一种抗体可以通过适当地选择并将亲和柱如蛋白质 A 柱与色谱柱,过滤、超滤、盐析以及透析程序进行组合来分离和纯化(参见,抗体:实验室手册 (Antibodies:A Laboratory Manual),艾德哈洛 (Ed Harlow),大卫莱恩 (David Lane),冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory),1988)。另外,如在此所述,可以将一种多肽(例如,一种抗体)融合至异源多肽序列以促进纯化。可以通过本领域中已知的方法使用凝集素柱分离具有所希望的糖链的多肽(参见,例如,WO 02/30954)。

[0112] 根据本披露,可以采用本领域技术范围内的常规分子生物、微生物、以及重组 DNA 技术。此类技术被描述于文献中(参见,例如,萨姆布鲁克 (Sambrook)、费里奇 (Fritsch) 和马尼亚蒂斯 (Maniatis),分子克隆:实验室手册 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual),第二版,(1989),冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港 (Cold Spring Harbor),纽约;DNA 克隆:实用方法 (DNA Cloning:A Practical Approach),卷 I 和卷 II (D·N·格洛维尔 (D.N.Glover) 编辑 1985);寡核苷酸合成 (Oligonucleotide Synthesis) (M·J·盖特 (M.J.Gait) 编辑 1984);核酸杂交 (Nucleic Acid Hybridization) (B·D·黑姆丝 (B.D.Hames) 和 S·J·希金斯 (S.J.Higgins) 编辑 (1985));转录和翻译 (Transcription And Translation) (B·D·黑姆丝和 S·J·希金斯 编辑 (1984));动物细胞培养 (Animal Cell Culture) (R·I·弗莱士内 (R.I.Freshney) 编辑 (1986));固定化细胞和酶 (Immobilized Cells and Enzymes) (IRL 出版社 (1986)); B·佩巴尔 (B.Perbal),分子克隆实用指南 (A Practical Guide To Molecular Cloning) (1984);F·M·奥苏贝尔 (F.M.Ausubel) 等人(编辑),现代分子生物学实验技术 (Current Protocols in Molecular Biology),约翰威利父子出版社 (John Wiley&Sons, Inc.) (1994)。

#### [0113] 培养方法

[0114] 通常,具有目标水平的聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的多肽(例如,抗体)可以通过在以下培养基中培养细胞来产生,这些培养基含有铵和/或赖氨酸,例如升高的有效水平的铵和/或赖氨酸(例如,在一个或多个培养阶段期间)。

[0115] 在一些实施例中, (例如, 在一个或多个培养阶段) 在包括铵和 / 或赖氨酸 (例如, 升高水平的铵和 / 或赖氨酸) 的培养基中培养被基因工程化为表达一种多肽的细胞, 以减少由这些细胞表达的多肽的制剂中的岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的水平。在一些实施例中, 岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的水平相对于使用不包括铵和 / 或赖氨酸 (例如, 升高水平的铵和 / 或赖氨酸) 的相同培养基产生的多肽的制剂中的一个或多个相应水平而言是减少的。在一些实施例中, 岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的该减少的水平比该一个或多个相应水平低该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%。

[0116] 在一些实施例中, (例如, 在一个或多个培养阶段) 在包括铵和 / 或赖氨酸 (例如, 升高水平的铵和 / 或赖氨酸) 的培养基中培养被基因工程化为表达一种多肽的细胞, 以增加由这些细胞表达的多肽的制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或 G0F 聚糖的水平。在一些实施例中, 高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或 G0F 聚糖的水平相对于使用不包括铵和 / 或赖氨酸 (例如, 升高水平的铵和 / 或赖氨酸) 的相同培养基产生的多肽的制剂中的一个或多个相应水平而言是增加的。在一些实施例中, 高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或 G0F 聚糖的该增加的水平比该一个或多个相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。

[0117] 在一些实施例中, (例如, 在一个或多个培养阶段) 在包括降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养被基因工程化为表达一种多肽的细胞, 以增加由这些细胞表达的多肽的制剂中的岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的水平。在一些实施例中, 岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的水平相对于使用不包括降低水平的铵和 / 或赖氨酸的相同培养基产生的多肽的制剂中的一个或多个相应水平而言是增加的。在一些实施例中, 岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的该提高的水平比该一个或多个相应水平高该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500% 或更多。

[0118] 在一些实施例中, (例如, 在一个或多个培养阶段) 在包括降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养被基因工程化为表达一种多肽的细胞, 以减少由这些细胞表达的多肽的制剂中的高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或 G0F 聚糖的水平。在一些实施例中, 高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或 G0F 聚糖的水平相对于使用不包括降低水平的铵和 / 或赖氨酸的相同培养基产生的多肽的制剂中的一个或多个相应水平而言是减少的。在一些实施例中, 高甘露糖聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或 G0F 聚糖的该减少的水平比该一个或多个相应水平低该相应水平的至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%。

[0119] 如在此所使用, “升高水平”的组分 (例如, 铵和 / 或赖氨酸) 意指该组分 (例如, 铵和 / 或赖氨酸) 的浓度比标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段使用的培养基和 / 或其中生长细胞和 / 或产生多肽的培养基中存在的要高。在一些实施例中, 组分不存在于标准和 / 或起始培养基、一个或多个其他培养阶段使用的培养基和 / 或其中生长细胞和 / 或产生多肽的培养基中, 并且“升高的水平”是任何量的该组分。培养基最初 (即, 在培养

的起始)可以包括一个升高水平的组分,和/或培养基可以补充有该组分以在培养过程中的一个或多个具体时间(例如,在一个或多个阶段)达到该组分的一个升高的水平。

[0120] 如在此所使用,“降低水平”的组分(例如,铵和/或赖氨酸)意指该组分(例如,铵和/或赖氨酸)的浓度比标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段使用的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中存在的要低。培养基最初(即,在培养的起始)可以包括一个降低水平的组分,培养基可以在培养过程中的一个或多个具体时间(例如,在一个或多个阶段)进行稀释,以降低组分的水平,和/或培养基可以在培养过程中的一个或多个具体时间(例如,在一个或多个阶段)使用具有一个降低水平的组分的培养基进行替换。在一些实施例中,降低水平的组分是在培养基中不可检测水平的该组分。

[0121] 在一些实施例中,铵的一个升高的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的铵的水平而言增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多。

[0122] 在一些实施例中,铵的一个升高的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的铵的水平而言铵的水平增加至少约1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM或更多。

[0123] 在一些实施例中,铵的一个升高的水平是约1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵。在一些实施例中,铵的一个升高的水平是约1mM至约50mM铵,例如,约1mM至约10mM铵、约10mM至约20mM铵、约11mM至约19mM铵、约12mM至约18mM铵、约13mM至约17mM铵、约14mM至约16mM铵、约20mM至约30mM铵、约30mM至约40mM铵、约40mM至约50mM铵、约1mM至约25mM铵、约25mM至约50mM铵、约1mM至约20mM铵、约1mM至约30mM铵、约1mM至约40mM铵、约10mM至约50mM铵、约20mM至约50mM铵、或约30mM至约50mM铵。

[0124] 在一些实施例中,铵的一个降低的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的铵的水平而言减少至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。

[0125] 在一些实施例中,铵的一个降低的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的铵的水平而言铵的水平减少至少1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM或更多。

[0126] 在一些实施例中,铵的一个降低的水平是少于约50mM、45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM、或更少的铵。

[0127] 在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的赖氨酸的水平而言增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、

800%、850%、900%、950%、1000%或更多。

[0128] 在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的赖氨酸的水平而言赖氨酸的水平增加至少约0.1g/L、0.5g/L、1g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L或更多。在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的赖氨酸的水平而言赖氨酸的水平增加至少约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM或更多。

[0129] 在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是约1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是约1g/L至约30g/L赖氨酸、约1g/L至约10g/L赖氨酸、约1g/L至约9g/L赖氨酸、约2g/L至约8g/L赖氨酸、约3g/L至约7g/L赖氨酸、约4g/L至约6g/L赖氨酸、约10g/L至约20g/L赖氨酸、约20g/L至约30g/L赖氨酸、约1g/L至约20g/L赖氨酸、约1g/L至约15g/L赖氨酸、或约15g/L赖氨酸至约30g/L赖氨酸。在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是至少约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是至少约10mM至约200mM赖氨酸、约10mM至约50mM赖氨酸、约50mM至约100mM赖氨酸、约100mM至约150mM赖氨酸、约150mM至约200mM赖氨酸、约10mM至约100mM赖氨酸、或约100mM至约200mM赖氨酸。

[0130] 在一些实施例中,赖氨酸的一个降低的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的赖氨酸的水平而言减少至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。

[0131] 在一些实施例中,赖氨酸的一个降低的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的赖氨酸的水平而言赖氨酸的水平减少至少约0.1g/L、0.5g/L、1g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L或更多。在一些实施例中,赖氨酸的一个升高的水平是相对于标准培养基、起始培养基、一个或多个培养阶段期间的培养基和/或其中生长细胞和/或产生多肽的培养基中的赖氨酸的水平而言赖氨酸的水平减少至少约10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM或更多。

[0132] 在一些实施例中,赖氨酸的一个降低的水平是少于约30g/L、29g/L、28g/L、27g/L、26g/L、25g/L、24g/L、23g/L、22g/L、21g/L、20g/L、19g/L、18g/L、17g/L、16g/L、15g/L、14g/L、13g/L、12g/L、11g/L、10g/L、9g/L、8g/L、7g/L、6g/L、5g/L、4g/L、3g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.25g/L、0.1g/L、或没有赖氨酸。在一些实施例中,赖氨酸的一个降低的水平是少于约

200mM、190mM、180mM、170mM、160mM、150mM、140mM、130mM、120mM、110mM、100mM、90mM、80mM、70mM、60mM、50mM、40mM、30mM、20mM、10mM、5mM、1mM、或更少的赖氨酸。

[0133] 可以在本领域已知的多种细胞培养基中培养细胞,这些培养基根据本披露进行修饰以包括如在此所述的铵和 / 或赖氨酸。本领域技术人员应理解,细胞培养基指代细胞如动物细胞或哺乳动物细胞在其中生长的营养液。一种细胞培养基通常包括以下成分中的一种或多种:能量源(例如,碳水化合物如葡萄糖);氨基酸;维生素;脂质或游离脂肪酸;以及微量元素,例如,在微摩尔范围内的无机化合物或天然存在的元素。细胞培养基还可以含有另外的成分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、血清等等);盐类(例如,钙、镁和磷酸盐);缓冲液(例如,HEPES);核苷和碱基(例如,腺苷、胸苷、次黄嘌呤);抗体(例如,庆大霉素);以及细胞保护试剂(例如,普朗尼克多聚醇(普朗尼克 F68(Pluronic F68)))。

[0134] 在一些实施例中,除升高或降低水平的铵和 / 或赖氨酸之外,细胞培养基还包括半胱氨酸、锰、铜、钴、腐胺、蛋白胍、葡萄糖、半乳糖、半乳糖胺、葡糖胺、谷氨酰胺、脂质(例如,胆固醇)、硫酸葡聚糖和 / 或 DMSO。例如,培养基可以包括约 0.1g/L 至约 1g/L 半胱氨酸;约 0.01mM 至约 0.5mM 锰;约 0.1  $\mu$ M 至约 0.5mM 铜;约 0.1mg/L 至约 30mg/L 钴;约 0.01mg/L 至约 5mg/L 腐胺;约 0.1g/L 至约 10g/L 葡萄糖;约 0.5g/L 至约 30g/L 蛋白胍,例如,非动物源性蛋白胍,如大豆或棉籽;约 1  $\mu$ M 至约 1mM 半乳糖胺;约 0.1g/L 至约 5g/L 葡糖胺;约 0.01g/L 至约 0.1g/L 硫酸葡聚糖;和 / 或约 0.1% 至约 5% DMSO(例如,约 0.1% 至约 2% DMSO、约 0.5% 至约 1% DMSO、约 1% 至约 1.5% DMSO、约 0.6% 至约 1.4% DMSO、约 0.7% 至约 1.3% DMSO、约 0.8% 至约 1.2% DMSO、约 0.9% 至约 1.1% DMSO、约 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、或约 2% DMSO,或更多)。

[0135] 已制备的或可商购的培养基可以根据本披露进行修改以在于此所述的方法中利用。此类培养基的非限制性实例包括最小必须培养基(MEM,西格玛公司(Sigma),圣路易斯(St. Louis),密苏里州(Mo.));哈姆氏 F10 培养基(西格玛公司);杜贝尔科氏改良伊格氏培养基(DMEM,西格玛公司);RPM I-1640 培养基(西格玛公司);HyClone 细胞培养基(HyClone,洛根市(Logan),犹他州(Utah));Power CH02(龙沙公司(Lonza Inc.),艾伦代尔(Allendale),新泽西州(NJ));以及针对特定细胞类型而配制的化学限定性(CD)培养基,例如,CD-CHO 培养基(英杰公司(Invitrogen),卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚州(Calif.))。适合于特定细胞培养的培养基可以由本领域普通技术人员确定而不需要过度实验,并且这种培养基可以根据本披露进行改变。

[0136] 适合于在此所述的多肽(例如,抗体)的细胞生产的细胞培养条件(包括 pH、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>、搅动速度以及温度)是本领域中已知的那些,如用于细胞的分批、连续或补料分批培养的条件。例如,细胞培养基的 pH 通常维持在约 6.8 至约 7.2。

[0137] 在一些实施例中,在一个或多个阶段中培养细胞,并且可以在一个或多个阶段中在具有一个升高或降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养细胞。例如,一种培养方法可以包括一个第一阶段(例如,使用具有一个降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基)以及一个第二阶段(例如,使用具有一个升高水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基)。在一些实施例中,一种培养方法可以包括一个第一阶段(例如,使用具有一个升高水平的铵和 / 或赖氨酸

酸的培养基) 以及一个第二阶段(例如, 使用具有一个降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基)。在一些实施例中, 一种培养方法包括多于两个阶段, 例如, 3、4、5、6 或更多阶段, 并且任何阶段可以包括具有一个升高水平的铵和 / 或赖氨酸或一个降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基。培养的时间长度不是限制性的。例如, 一种培养方法可以是 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 天或更多天。在一些实施例中, 一种培养方法包括至少两个阶段。例如, 一个第一阶段可以包括在具有一个降低水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养细胞(例如, 持续约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 天或更多天), 并且一个第二阶段可以包括在具有一个升高水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养细胞(例如, 持续约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 天或更多天)。

[0138] 在一些实施例中, 在具有一个降低水平的铵的初始培养基中将细胞培养 5 天, 并且在第 6 天为该培养基补充铵, 以形成升高水平的铵。在一些实施例中, 在具有一个降低水平的赖氨酸的初始培养基中将细胞培养 2 天, 并且在第 3 天为该培养基补充赖氨酸, 以形成升高水平的赖氨酸。

[0139] 在一些实施例中, 一个第一培养阶段是一个生长阶段。一般而言, 在一个生长阶段期间, 细胞培养经历细胞通常快速分裂的一个指数细胞生长时期(对数期)。在一些实施例中, 在此类条件下培养细胞, 这样使得细胞生长被最大化。可以由本领域普通技术人员针对一种特定宿主细胞确定用于使宿主细胞的生长最大化的生长周期和条件, 而不需要过度实验。在一些实施例中, 细胞的一个生长阶段维持在 1 天与 10 天之间的一个时期。在一些实施例中, 对于所有或部分生长阶段, 在具有一个降低水平的铵和 / 或赖氨酸或一个升高水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养细胞。

[0140] 在一些实施例中, 一个第二培养阶段是一个生产阶段。一般而言, 在一个生产阶段期间, 细胞生长稳定或维持在一个近乎恒定的水平。在一个生产阶段期间, 对数细胞生长已终止, 并且多肽生产被增加。在这个时间段期间, 通常可以补充一种培养基以支持连续的多肽生产并且实现一种所希望的多肽产物。在一些实施例中, 细胞的一个生产阶段维持在 1 天与 10 天之间的一个时期。在一些实施例中, 对于所有或部分产生阶段, 在具有一个降低水平的铵和 / 或赖氨酸或一个升高水平的铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养细胞。

[0141] 在一些实施例中, 通过改变一种或多种铵盐的水平而升高或降低培养基中的铵水平, 例如, 硝酸铵、碳酸铵、乙酸铵、甲磺酸铵、甲基磺酸铵、氯化铵、溴化铵、硫酸铵、或磷酸铵。在一些实施例中, 例如, 在一个或多个培养阶段过程中, 或在一个培养阶段的一个或多个部分过程中, 为在此描述的培养基补充一种或多种铵盐。

[0142] 在一些实施例中, 通过改变 L- 赖氨酸、D- 赖氨酸、H- 赖氨酸、Z- 赖氨酸、羟基赖氨酸和 / 或赖氨酸衍生物中的一种或多种的水平而升高或降低培养基中的赖氨酸水平。

[0143] 在一些实施例中, 通过在以下培养基中培养细胞而产生具有目标水平的聚糖(例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖) 的多肽(例如, 抗体), 这些培养基含有一种或多种能够直接或间接调节 pH(例如, 在此描述的细胞的胞内 pH) 的试剂(“pH 调节剂”)。这类 pH 调节剂包括但不限于, 铵盐、碱性氨基酸(例如, 赖氨酸、精氨酸和 / 或组氨酸), 极性氨基酸(例如, 谷氨酰胺、天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸)、葡萄糖、氯喹、甲胺、三丁胺、苄胺、以及三乙胺。在一些实施例中, 在具有一个升高水平或降低水平的一种或多种 pH 调节剂的培养基中培养细胞。

[0144] 在一些实施例中, (例如, 在一个或多个培养阶段) 在以下培养基中培养被基因工程化为表达一种多肽的细胞, 该培养基包括一个升高水平的氯喹、甲胺、三丁胺、苄胺、三乙胺、葡萄糖、组氨酸、精氨酸和 / 或谷氨酰胺, (i) 以降低岩藻糖基化聚糖、G1F 聚糖、G2F 聚糖和 / 或唾液酸化聚糖的水平; 和 / 或 (ii) 以增加由这些细胞表达的多肽的制剂中的 G0F 聚糖、无岩藻糖基化聚糖和 / 或高甘露糖聚糖的水平。

[0145] 在一些实施例中, 在具有一个升高水平的氯喹的培养基中培养细胞, 例如, 约  $10\ \mu\text{M}$  至约  $500\ \mu\text{M}$ , 例如, 约  $10\ \mu\text{M}$ 、约  $20\ \mu\text{M}$ 、约  $30\ \mu\text{M}$ 、约  $40\ \mu\text{M}$ 、约  $50\ \mu\text{M}$ 、约  $60\ \mu\text{M}$ 、约  $70\ \mu\text{M}$ 、约  $80\ \mu\text{M}$ 、约  $90\ \mu\text{M}$ 、约  $100\ \mu\text{M}$ 、约  $110\ \mu\text{M}$ 、约  $120\ \mu\text{M}$ 、约  $130\ \mu\text{M}$ 、约  $140\ \mu\text{M}$ 、约  $150\ \mu\text{M}$ 、约  $160\ \mu\text{M}$ 、约  $170\ \mu\text{M}$ 、约  $180\ \mu\text{M}$ 、约  $190\ \mu\text{M}$ 、约  $200\ \mu\text{M}$ 、约  $210\ \mu\text{M}$ 、约  $220\ \mu\text{M}$ 、约  $230\ \mu\text{M}$ 、约  $250\ \mu\text{M}$ 、约  $250\ \mu\text{M}$ 、约  $260\ \mu\text{M}$ 、约  $270\ \mu\text{M}$ 、约  $280\ \mu\text{M}$ 、约  $290\ \mu\text{M}$ 、约  $300\ \mu\text{M}$ 、约  $310\ \mu\text{M}$ 、约  $320\ \mu\text{M}$ 、约  $330\ \mu\text{M}$ 、约  $340\ \mu\text{M}$ 、约  $350\ \mu\text{M}$ 、约  $360\ \mu\text{M}$ 、约  $370\ \mu\text{M}$ 、约  $380\ \mu\text{M}$ 、约  $390\ \mu\text{M}$ 、约  $400\ \mu\text{M}$ 、约  $410\ \mu\text{M}$ 、约  $420\ \mu\text{M}$ 、约  $430\ \mu\text{M}$ 、约  $440\ \mu\text{M}$ 、约  $450\ \mu\text{M}$ 、约  $460\ \mu\text{M}$ 、约  $470\ \mu\text{M}$ 、约  $480\ \mu\text{M}$ 、约  $490\ \mu\text{M}$ 、约  $500\ \mu\text{M}$  或更多。

[0146] 在一些实施例中, 在具有一个升高水平的甲胺、三丁胺、苄胺、三乙胺或它们的组合培养基中培养细胞, 例如, 约  $10\ \mu\text{M}$  至约  $3\text{mM}$ , 例如, 约  $10\ \mu\text{M}$ 、约  $50\ \mu\text{M}$ 、约  $100\ \mu\text{M}$ 、约  $150\ \mu\text{M}$ 、约  $200\ \mu\text{M}$ 、约  $250\ \mu\text{M}$ 、约  $300\ \mu\text{M}$ 、约  $350\ \mu\text{M}$ 、约  $400\ \mu\text{M}$ 、约  $450\ \mu\text{M}$ 、约  $500\ \mu\text{M}$ 、约  $550\ \mu\text{M}$ 、约  $600\ \mu\text{M}$ 、约  $650\ \mu\text{M}$ 、约  $750\ \mu\text{M}$ 、约  $800\ \mu\text{M}$ 、约  $850\ \mu\text{M}$ 、约  $900\ \mu\text{M}$ 、约  $950\ \mu\text{M}$ 、约  $1\text{mM}$ 、约  $1.25\text{mM}$ 、约  $1.5\text{mM}$ 、约  $1.75\text{mM}$ 、约  $2\text{mM}$ 、约  $2.25\text{mM}$ 、约  $2.5\text{mM}$ 、约  $2.75\text{mM}$ 、约  $3\text{mM}$  或更多。

[0147] 在一些实施例中, 在具有一个升高水平的葡萄糖的培养基中培养细胞, 例如, 约  $0.1\text{g/L}$  至约  $10\text{g/L}$ , 例如, 约  $0.2\text{g/L}$ 、约  $0.3\text{g/L}$ 、约  $0.4\text{g/L}$ 、约  $0.5\text{g/L}$ 、约  $0.6\text{g/L}$ 、约  $0.7\text{g/L}$ 、约  $0.8\text{g/L}$ 、约  $0.9\text{g/L}$ 、约  $1\text{g/L}$ 、约  $1.1\text{g/L}$ 、约  $1.2\text{g/L}$ 、约  $1.3\text{g/L}$ 、约  $1.4\text{g/L}$ 、约  $1.5\text{g/L}$ 、约  $1.6\text{g/L}$ 、约  $1.7\text{g/L}$ 、约  $1.8\text{g/L}$ 、约  $1.9\text{g/L}$ 、约  $2\text{g/L}$ 、约  $2.1\text{g/L}$ 、约  $2.2\text{g/L}$ 、约  $2.3\text{g/L}$ 、约  $2.4\text{g/L}$ 、约  $2.5\text{g/L}$ 、约  $2.6\text{g/L}$ 、约  $2.7\text{g/L}$ 、约  $2.8\text{g/L}$ 、约  $2.9\text{g/L}$ 、约  $3\text{g/L}$ 、约  $3.5\text{g/L}$ 、约  $4\text{g/L}$ 、约  $4.5\text{g/L}$ 、约  $5\text{g/L}$ 、约  $5.5\text{g/L}$ 、约  $6\text{g/L}$ 、约  $6.5\text{g/L}$ 、约  $7\text{g/L}$ 、约  $7.5\text{g/L}$ 、约  $8\text{g/L}$ 、约  $8.5\text{g/L}$ 、约  $9\text{g/L}$ 、约  $9.5\text{g/L}$ 、约  $10\text{g/L}$  或更多。

[0148] 在一些实施例中, 在具有一个升高水平的组氨酸、精氨酸、或组氨酸和精氨酸的组合的培养基中培养细胞, 例如, 浓度为约  $1\text{g/L}$  至约  $50\text{g/L}$ , 例如, 至少约  $1\text{g/L}$ 、至少约  $1.5\text{g/L}$ 、至少约  $2\text{g/L}$ 、至少约  $2.5\text{g/L}$ 、至少约  $3\text{g/L}$ 、至少约  $3.5\text{g/L}$ 、至少约  $4\text{g/L}$ 、至少约  $4.5\text{g/L}$ 、至少约  $5\text{g/L}$ 、至少约  $5.5\text{g/L}$ 、至少约  $6\text{g/L}$ 、至少约  $6.5\text{g/L}$ 、至少约  $7\text{g/L}$ 、至少约  $7.5\text{g/L}$ 、至少约  $8\text{g/L}$ 、至少约  $8.5\text{g/L}$ 、至少约  $9\text{g/L}$ 、至少约  $9.5\text{g/L}$ 、至少约  $10\text{g/L}$ 、至少约  $10.5\text{g/L}$ 、至少约  $11\text{g/L}$ 、至少约  $11.5\text{g/L}$ 、至少约  $12\text{g/L}$ 、至少约  $12.5\text{g/L}$ 、至少约  $13\text{g/L}$ 、至少约  $13.5\text{g/L}$ 、至少约  $14\text{g/L}$ 、至少约  $14.5\text{g/L}$ 、至少约  $15\text{g/L}$ 、至少约  $15.5\text{g/L}$ 、至少约  $16\text{g/L}$ 、至少约  $16.5\text{g/L}$ 、至少约  $17\text{g/L}$ 、至少约  $17.5\text{g/L}$ 、至少约  $18\text{g/L}$ 、至少约  $18.5\text{g/L}$ 、至少约  $19\text{g/L}$ 、至少约  $19.5\text{g/L}$ 、至少约  $20\text{g/L}$ 、至少约  $25\text{g/L}$ 、至少约  $30\text{g/L}$ 、至少约  $35\text{g/L}$ 、至少约  $40\text{g/L}$ 、至少约  $45\text{g/L}$ 、至少约  $50\text{g/L}$  或更多。

[0149] 在一些实施例中, 在具有一个升高水平的谷氨酰胺的培养基中培养细胞, 例如, 约  $5\text{mM}$  至约  $80\text{mM}$ , 例如, 约  $5\text{mM}$ 、约  $10\text{mM}$ 、约  $15\text{mM}$ 、约  $20\text{mM}$ 、约  $25\text{mM}$ 、约  $30\text{mM}$ 、约  $35\text{mM}$ 、约  $40\text{mM}$ 、约  $45\text{mM}$ 、约  $50\text{mM}$ 、约  $55\text{mM}$ 、约  $60\text{mM}$ 、约  $65\text{mM}$ 、约  $70\text{mM}$ 、约  $75\text{mM}$ 、约  $80\text{mM}$  或更多。

[0150] 一般而言, 细胞培养方法被分为分批培养、连续培养、以及补料分批培养。这些培

养方法中的任一种都可以用来使产生具有目标水平聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体）的细胞生长。

[0151] 分批培养

[0152] 在分批培养中，将少量的种子培养溶液添加到一种培养基中，并且在培养过程中，细胞生长不添加任何新的培养基或者不排放培养溶液。对于使用分批培养产生具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体），该培养基在初始细胞培养阶段包括一个升高水平或降低水平的铵和 / 或赖氨酸。

[0153] 在一些实施例中，具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体）通过在具有一个升高水平的铵的培养基中分批培养表达该多肽的细胞来产生。在一些实施例中，在具有至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在具有至少约 1mM 至约 50mM 铵，例如，约 1mM 至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM 铵的培养基中培养细胞。

[0154] 在一些实施例中，具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体）通过在具有一个降低水平的铵的培养基中分批培养表达该多肽的细胞来产生。在一些实施例中，在具有少于约 50mM、45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM、或更少的铵的培养基中培养细胞。

[0155] 在一些实施例中，具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体）通过在具有一个升高水平的赖氨酸的培养基中分批培养表达该多肽的细胞来产生。在一些实施例中，在具有至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在具有至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸、约 10g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 20g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 15g/L 赖氨酸、或约 15g/L 赖氨酸至约 30g/L 赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，赖氨酸的一个升高的水平是至少约 10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中，赖氨酸的一个升高的水平是至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸。

[0156] 在一些实施例中，具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、

半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖) 的多肽 (例如, 抗体) 通过在具有一个降低水平的赖氨酸的培养基中分批培养表达该多肽的细胞来产生。在一些实施例中, 在具有少于约 30g/L、29g/L、28g/L、27g/L、26g/L、25g/L、24g/L、23g/L、22g/L、21g/L、20g/L、19g/L、18g/L、17g/L、16g/L、15g/L、14g/L、13g/L、12g/L、11g/L、10g/L、9g/L、8g/L、7g/L、6g/L、5g/L、4g/L、3g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.25g/L、0.1g/L、或没有赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中, 在具有少于约 200mM、190mM、180mM、170mM、160mM、150mM、140mM、130mM、120mM、110mM、100mM、90mM、80mM、70mM、60mM、50mM、40mM、30mM、20mM、10mM、5mM、1mM、或更少的赖氨酸的培养基中培养细胞。

#### [0157] 连续培养

[0158] 连续培养是在培养过程中连续添加并且连续排放培养基的一种培养方法。这种连续方法包括灌流培养。例如, 在使用连续培养产生具有目标水平的聚糖 (例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖) 的多肽 (例如, 抗体) 中, 在一个或多个培养阶段可以调整培养基中的铵和 / 或赖氨酸的水平, 以形成一个升高水平或降低水平的铵和 / 或赖氨酸。在某些方法中, 第一培养阶段使用的培养基不包括一个升高水平或降低水平的铵和 / 或赖氨酸, 但在连续培养过程中 (如生长阶段和 / 或产生阶段的全部或部分期间) 的一个具体时间点, 培养过程中添加的培养基的铵和 / 或赖氨酸的水平被升高或降低。

[0159] 在一些实施例中, 具有目标水平的聚糖 (例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖) 的多肽 (例如, 抗体) 通过在具有一个升高水平的铵 (例如, 在一个或多个连续培养阶段期间) 的培养基中连续培养表达该多肽的细胞来产生。在一些实施例中, 在一个或多个连续培养阶段期间, 在具有至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵的培养基中培养细胞。在一些实施例中, 在一个或多个连续培养阶段期间, 在具有至少约 1mM 至约 50mM 铵, 例如, 约 1mM 至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM 铵的培养基中培养细胞。

[0160] 在一些实施例中, 在一个或多个连续培养阶段期间, 在具有一个降低水平的铵的培养基中培养细胞。在一些实施例中, 在一个或多个连续培养阶段期间, 在具有少于约 50mM、45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM、或更少的铵的培养基中培养细胞。

[0161] 在一些实施例中, 具有目标水平的聚糖 (例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖) 的多肽 (例如, 抗体) 通过在具有一个升高水平的赖氨酸 (例如, 在一个或多个连续培养阶段期间) 的培养基中连续培养表达该多肽的细胞来产生。在一些实施例中, 在一个或多个连续培养阶段期间, 在具有至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L

L、30g/L、或更多的赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在一个或多个连续培养阶段期间，在具有至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸、约 10g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 20g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 15g/L 赖氨酸、或约 15g/L 赖氨酸至约 30g/L 赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在一个或多个连续培养阶段期间，在具有至少约 10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在一个或多个连续培养阶段期间，在具有至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸的培养基中培养细胞。

[0162] 在一些实施例中，在一个或多个连续培养阶段期间，在具有一个降低水平的赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在一个或多个连续培养阶段期间，在具有少于约 30g/L、29g/L、28g/L、27g/L、26g/L、25g/L、24g/L、23g/L、22g/L、21g/L、20g/L、19g/L、18g/L、17g/L、16g/L、15g/L、14g/L、13g/L、12g/L、11g/L、10g/L、9g/L、8g/L、7g/L、6g/L、5g/L、4g/L、3g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.25g/L、0.1g/L、或没有赖氨酸的培养基中培养细胞。在一些实施例中，在一个或多个连续培养阶段期间，在具有少于约 200mM、190mM、180mM、170mM、160mM、150mM、140mM、130mM、120mM、110mM、100mM、90mM、80mM、70mM、60mM、50mM、40mM、30mM、20mM、10mM、5mM、1mM、或更少的赖氨酸的培养基中培养细胞。

[0163] 补料分批培养

[0164] 补料分批培养是介于分批培养与连续培养之间的一种方法。在补料分批培养中，在培养过程中连续或顺序地进给或补充一种细胞培养物，但是不同于连续培养，在培养过程中并不实施培养溶液的排放。例如，对于使用补料分批培养产生具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体），在一个或多个培养阶段期间添加的培养基可以具有一个升高水平或降低水平的铵和 / 或赖氨酸。

[0165] 在一些实施例中，具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体）通过（在一个或多个阶段）将培养基添加到表达该多肽的细胞的补料分批培养中来产生，该添加足以（在一个或多个阶段）达到一个升高水平的铵。在一些实施例中，（例如，通过在例如一个或多个阶段添加或补充铵）达到至少约 1mM、2mM、3mM、4mM、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、或更多的铵。在一些实施例中，达到至少约 1mM 至约 50mM 铵，例如，约 1mM 至约 10mM 铵、约 10mM 至约 20mM 铵、约 11mM 至约 19mM 铵、约 12mM 至约 18mM 铵、约 13mM 至约 17mM 铵、约 14mM 至约 16mM 铵、约 20mM 至约 30mM 铵、约 30mM 至约 40mM 铵、约 40mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 25mM 铵、约 25mM 至约 50mM 铵、约 1mM 至约 20mM 铵、约 1mM 至约 30mM 铵、约 1mM 至约 40mM 铵、约 10mM 至约 50mM 铵、约 20mM 至约 50mM 铵、或约 30mM 至约 50mM 铵。

[0166] 在一些实施例中，具有目标水平的聚糖（例如，高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和 / 或唾液酸化聚糖）的多肽（例如，抗体）通过（在一个或多个阶段）

将培养基添加到表达该多肽的细胞的补料分批培养中来产生,该添加足以(在一个或多个阶段)达到一个降低水平的铵。在一些实施例中,(在一个或多个阶段)在培养基中达到少于约 50mM、45mM、40mM、35mM、30mM、25mM、20mM、15mM、10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM、或更少的铵。

[0167] 在一些实施例中,具有目标水平的聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的多肽(例如,抗体)通过(在一个或多个阶段)将培养基添加到表达该多肽的细胞的补料分批培养中来产生,该添加足以(在一个或多个阶段)达到一个升高水平的赖氨酸。在一些实施例中,(例如,通过在例如一个或多个阶段添加或补充赖氨酸)在培养基中达到至少约 1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/L、12g/L、13g/L、14g/L、15g/L、16g/L、17g/L、18g/L、19g/L、20g/L、21g/L、22g/L、23g/L、24g/L、25g/L、26g/L、27g/L、28g/L、29g/L、30g/L、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,(例如,通过在例如一个或多个阶段添加或补充赖氨酸)在培养基中达到至少约 1g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 10g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 9g/L 赖氨酸、约 2g/L 至约 8g/L 赖氨酸、约 3g/L 至约 7g/L 赖氨酸、约 4g/L 至约 6g/L 赖氨酸、约 10g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 20g/L 至约 30g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 20g/L 赖氨酸、约 1g/L 至约 15g/L 赖氨酸、或约 15g/L 赖氨酸至约 30g/L 赖氨酸。在一些实施例中,(例如,通过在例如一个或多个阶段添加或补充赖氨酸)在培养基中达到至少约 10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、180mM、190mM、200mM、或更多的赖氨酸。在一些实施例中,(例如,通过在例如一个或多个阶段添加或补充赖氨酸)在培养基中达到至少约 10mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 50mM 赖氨酸、约 50mM 至约 100mM 赖氨酸、约 100mM 至约 150mM 赖氨酸、约 150mM 至约 200mM 赖氨酸、约 10mM 至约 100mM 赖氨酸、或约 100mM 至约 200mM 赖氨酸。

[0168] 在一些实施例中,具有目标水平的聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的多肽(例如,抗体)通过(在一个或多个阶段)将培养基添加到表达该多肽的细胞的补料分批培养中来产生,该添加足以(在一个或多个阶段)达到一个降低水平的赖氨酸。在一些实施例中,(在一个或多个阶段)在培养基中达到少于约 30g/L、29g/L、28g/L、27g/L、26g/L、25g/L、24g/L、23g/L、22g/L、21g/L、20g/L、19g/L、18g/L、17g/L、16g/L、15g/L、14g/L、13g/L、12g/L、11g/L、10g/L、9g/L、8g/L、7g/L、6g/L、5g/L、4g/L、3g/L、2g/L、1g/L、0.5g/L、0.25g/L、0.1g/L、或没有赖氨酸。在一些实施例中,(在一个或多个阶段)在培养基中达到少于约 200mM、190mM、180mM、170mM、160mM、150mM、140mM、130mM、120mM、110mM、100mM、90mM、80mM、70mM、60mM、50mM、40mM、30mM、20mM、10mM、5mM、1mM、或更少的赖氨酸。

[0169] 根据本披露,细胞培养可以在用于大规模或小规模多肽(例如,抗体)生产的条件下,使用动物或哺乳动物细胞培养常规采用的培养瓶和/或培养装置实施。例如,能以实验室规模使用组织培养皿、T形烧瓶、振荡烧瓶、以及旋转烧瓶。对于更大规模(例如,1L、10L、100L、500L、5000L 或更多)的培养,可以使用流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养,或搅拌槽生物反应器系统(例如,如在美国专利号 7,541,164 和 7,332,303 中所描述)。

[0170] 在具体方法中,在细胞培养的一个或多个时间(例如,一个或多个阶段)监测多肽

(例如, 抗体) 的制剂中的一种或多种聚糖(例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的水平, 从而允许调整(例如, 在培养中增加或减少铵和/或赖氨酸的量)或者可能顺序地终止该培养, 例如, 以达到具有目标水平的聚糖(例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的多肽(例如, 抗体)的目标水平。

#### [0171] 多肽

[0172] 在此描述了多肽(例如, 糖蛋白)的治疗性制剂以及制备和使用此类制剂的方法。糖蛋白包括例如多种血液学制剂(包括, 例如, 促红细胞生成素、血液凝固因子等)、干扰素、集落刺激因子、抗体、酶、以及激素中的任一种。一种特定糖蛋白的一致性并不意图限制本披露, 并且在此所述的一种治疗性制剂可以包括感兴趣的任何糖蛋白, 例如具有一个 Fc 区的一种糖蛋白。

[0173] 在此所述的一种糖蛋白可以包括结合至一个感兴趣的靶标(例如, 结合至抗原)的一个靶标结合结构域。例如, 一种糖蛋白如一种抗体可以结合至一种跨膜多肽(例如, 受体)或配体(例如, 一种生长因子)。用于在此所述的糖蛋白(例如, 抗体)的示例性分子靶标(例如, 抗原)包括 CD 蛋白如 CD2、CD3、CD4、CD8、CD11、CD19、CD20、CD22、CD25、CD33、CD34、CD40、CD52; ErbB 受体家族成员如 EGF 受体(EGFR、HER1、ErbB1), HER2(ErbB2), HER3(ErbB3) 或 HER4(ErbB4) 受体; 巨噬细胞受体如 CR1g; 肿瘤坏死因子如 TNF  $\alpha$  或 TRAIL/Apo-2; 细胞黏着分子如 LFA-1、Mac1、p150, 95、VLA-4、ICAM-1、VCAM 和包括它们的  $\alpha$  或  $\beta$  亚单元的  $\alpha$  v  $\beta$  3 整联蛋白(例如, 抗 CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗体); 生长因子和受体如 EGF、FGFR(例如, FGFR3) 和 VEGF; IgE; 细胞因子如 IL1; 细胞因子受体如 IL2 受体; 血型抗原; f1k2/f1t3 受体; 肥胖症(OB)受体; mp1 受体; CTLA-4; 蛋白 C; 中性粒细胞; 肝配蛋白和受体; 导素和受体; slit 和受体; 趋化因子和趋化因子受体如 CCL5、CCR4、CCR5; 淀粉样蛋白  $\beta$ ; 补体因子如补体因子 D; 脂蛋白如氧化 LDL(oxLDL); 淋巴毒素如淋巴毒素  $\alpha$  (LT  $\alpha$ )。其他分子靶标包括 Tweak、B7RP-1、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 类型 9(PCSK9)、硬化蛋白、c-kit、Tie-2、c-fms、以及抗 M1。

#### [0174] 参考多肽

[0175] 在一些实施例中, 在此描述了具有目标水平的聚糖(例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的治疗性多肽(例如, 糖蛋白), 其中目标水平是一种参考多肽产品(例如, 糖蛋白产品)中的聚糖(例如, 高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的水平。非限制性的示例性参考糖蛋白产品可以包括阿巴西普(Orencia<sup>®</sup>, 施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))、阿昔单抗(ReoPro<sup>®</sup>, 罗氏公司(Roche))、阿达木单抗(Humira<sup>®</sup>, 施贵宝公司)、阿柏西普(Eylea<sup>®</sup>, 雷杰纳荣制药公司(Regeneron Pharmaceuticals))、阿法赛特(Amevive<sup>®</sup>, 阿斯泰来制药公司(Astellas Pharma))、阿仑单抗(Campath<sup>®</sup>, 健赞公司/拜耳公司(Genzyme/Bayer))、巴利昔单抗(Simulect<sup>®</sup>, 诺华公司(Novartis))、贝拉西普(Nulojix<sup>®</sup>, 施贵宝公司)、贝利木单抗(Benlysta<sup>®</sup>, 葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline))、贝伐单抗(Avastin<sup>®</sup>, 罗氏公司)、康纳单抗(Ilaris<sup>®</sup>, 诺华公司)、

brentuximab vedotin ( **Adcetris**® , 西雅图遗传学公司 (Seattle Genetics))、赛妥珠单抗 ( **CIMZIA**® , 优时比公司 (UCB), 布鲁塞尔 (Brussels)、比利时 (Belgium))、西妥昔单抗 ( **Erbix**® , 默克 - 雪兰诺公司 (Merck-Serono))、达利珠单抗 ( **Zenapax**® , 豪夫迈 - 罗氏公司 (Hoffmann-La Roche))、地尼白介素 - 毒素连接物 ( **Ontak**® , 卫材公司 (Eisai))、狄诺赛麦 (denosumab) ( **Prolia**® , 安进公司 (Amgen) ; **Xgeva**® ; 安进公司)、依库珠单抗 ( **Soliris**® , 亚力兄制药公司 (Alexion Pharmaceuticals))、依法珠单抗 ( **Raptiva**® , 基因泰克公司 (Genentech))、依那西普 ( **Enbrel**® , 安进 - 辉瑞公司 (Amgen-Pfizer))、吉姆单抗 ( **Mylotarg**® , 辉瑞制药 (Pfizer))、戈利木单抗 ( **Simponi**® , 杨森公司 (Janssen))、替依莫单抗 ( **Zevalin**® , 频谱制药 (Spectrum Pharmaceuticals))、英利昔单抗 ( **Remicade**® , 山陶克公司 (Centocor))、伊匹木单抗 (Yervoy™, 施贵宝公司)、莫罗莫那 (Orthoclone **OKT3**® , Janssen-Cilag (杨森制药公司))、那他珠单抗 ( **Tysabri**® , 百健艾迪公司 (Biogen Idec), Elan (宜兰))、奥法木单抗 ( **Arzerra**® , 葛兰素史克公司)、奥马佐单抗 ( **Xolair**® , 诺华制药)、帕利珠单抗 ( **Synagis**® , 米迪缪尼公司 (MedImmune))、帕木单抗 ( **Vectibix**® , 安进公司)、雷珠单抗 ( **Lucentis**® , 基因泰克公司)、利洛西普 ( **Arcalyst**® , 雷杰纳荣制药公司)、利妥昔单抗 ( **MabThera**® , 罗氏公司)、塔西单抗 ( **Actemra**® , 基因泰克公司 ; RoActemra, 霍夫曼拉罗氏公司 (Hoffman-La Roche))、托西莫单抗 ( **Bexxar**® , 葛兰素史克公司)、以及群司珠单抗 ( **Herceptin**® , 罗氏公司)。

[0176] 在一些实施例中,一种参考多肽产品中的一种或多种聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的水平通过分析该参考多肽的一种或多种制剂(例如,一个或多个批次)来确定。在一些实施例中,一种参考多肽产品中的一种或多种聚糖(例如,高甘露糖聚糖、岩藻糖基化聚糖、半乳糖基化聚糖和/或唾液酸化聚糖)的水平是该参考多肽的两种或更多种制剂(例如,该参考多肽产品的两个或多个批次)中的一种或多种聚糖的范围。在一些实施例中,一种或多种聚糖的水平是该多肽参考产品的两个或多个批次中的范围(例如,从一种或多种聚糖的最低水平跨越到该一种或多种聚糖的最高水平)。

[0177] N-连接的糖基化

[0178] N-连接的寡糖链被添加到内质网腔内的一种蛋白质中(参见细胞分子生物学 (Molecular Biology of the Cell), 加兰出版公司 (Garland Publishing, Inc.) (阿尔伯特 (Alberts) 等人, 1994))。具体而言,将一种初始寡糖(典型地是 14-糖)添加到 Asn-X-Ser/Thr 的靶共有序列内含有一个天冬酰胺残基的侧链上的氨基基团上,其中 X 可以是除脯氨酸外的任何氨基酸。这种初始寡糖的结构为大多数真核生物所共有,并且含有 3 个葡萄糖、9 个甘露糖、以及 2 个 N-乙酰葡萄糖胺残基。这种初始寡糖链可以通过内质网中的特异性糖苷酶来修整,从而产生由两个 N-乙酰葡萄糖胺和三个甘露糖残基构成的一个短的核心寡糖。

[0179] N-聚糖可以被划分成三个相异的组,称为“高甘露糖型”、“杂交型”、以及“复合型”,其中所有三个组中都存在一个共同的五糖核心 (Man( $\alpha$  1, 6)-(Man( $\alpha$  1, 3))-Man( $\beta$  1, 4)-GlcNAc( $\beta$  1, 4)-GlcNAc( $\beta$  1, N)-Asn)。

[0180] 在内质网中的初始加工之后,糖蛋白被运输至高尔基体,在此可以进行进一步加工。如果聚糖在它被完全修整成核心五糖结构之前被转移至高尔基体,会导致一种“高甘露糖聚糖”。

[0181] 另外或可替代地,可以将 N-乙酰葡萄糖胺的一个或多个单糖单元添加到核心甘露糖亚单元中以形成一种“复合聚糖”。半乳糖可以添加到 N-乙酰葡萄糖胺亚单元中,并且唾液酸亚单元可以添加到半乳糖亚单元中,从而产生以唾液酸、半乳糖或 N-乙酰葡萄糖胺残基中的任一个终止的链。另外,一个岩藻糖残基可以添加到核心寡糖的一个 N-乙酰葡萄糖胺残基中。这些添加各自通过本领域中已知的特异性糖基转移酶来催化。

[0182] 唾液酸属于具有杂环结构的 9-碳单糖家族。它们经由附接到环上的一个羧基团,以及包括 N-乙酰基和 N-羟乙酰基基团的其他化学修饰而携带负电荷。在哺乳动物表达系统中产生的糖蛋白中发现的唾液酸残基的两个主要类型是 N-乙酰-神经氨酸 (NeuAc) 以及 N-羟乙酰神经氨酸 (NeuGc)。这些通常作为附接到 N-和 O-连接的聚糖的非还原末端处的半乳糖 (Gal) 残基上的末端结构出现。这些唾液酸基团的糖苷键构型可以是  $\alpha$  2, 3 或  $\alpha$  2, 6。

[0183] “杂交聚糖”包括高甘露糖和复合聚糖两者的特征。例如,一种杂交聚糖的一个分支可以主要包括或仅包括甘露糖残基,而另一个分支可以包括 N-乙酰葡萄糖胺、唾液酸和/或半乳糖。

[0184] 抗体中 N-连接的糖基化

[0185] 抗体是在免疫球蛋白重链的 Fc 区中的保守的 N-连接的糖基化位点处被糖基化。例如,一个 IgG 抗体的每个重链在 CH2 结构域的 Asn297 处具有单一 N-连接的糖基化位点 (参见杰弗里斯 (Jefferis), 自然综述 (Nature Reviews) 8:226-234 (2009))。IgA 抗体具有 CH2 和 CH3 结构域内的 N-连接的糖基化位点, IgE 抗体具有 CH3 结构域内的 N-连接的糖基化位点,并且 IgM 抗体具有 CH1、CH2、CH3 以及 CH4 结构域内的 N-连接的糖基化位点 (参见阿诺德 (Arnold) 等人,生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 280:29080-29087 (2005); 马图 (Mattu) 等人,生物化学杂志 273:2260-2272 (1998); 内特尔顿 (Nettleton) 等人,国际过敏反应免疫档案 (Int. Arch. Allergy Immunol.) 107:328-329 (1995))。

[0186] 每个抗体同种型在恒定区内具有多种相异的 N-连接的碳水化合物结构。例如, IgG 在 Fc 区的每个 Fc 多肽中的 CH2 结构域的 Asn297 处具有单一的 N-连接的双触角碳水化合物,该 IgG 还含有 C1q 和 Fc $\gamma$ R 的结合位点 (参见杰弗里斯等人,免疫学综述 (Immunol. Rev.) 163:59-76 (1998); 以及莱特 (Wright) 等人,生物技术趋势 (Trends Biotech) 15:26-32 (1997))。对于人 IgG,核心寡糖通常由 GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc 组成,具有不同数量的外残基 (outer residues)。单独 IgG 当中的变化可以经由一个或两个末端 GlcNAc 处的半乳糖和/或半乳糖-唾液酸的附接或经由一个第三 GlcNAc 臂 (等分的 GlcNAc) 的附接、和/或岩藻糖的附接而发生。

[0187] 抗体

[0188] 图 1 中示出了一个 IgG 抗体的基础结构。如图 1 中所示,一个 IgG 抗体由二硫键

连接在一起的两个相同的轻多肽链和两个相同的重多肽链组成。定位于每条链的氨基端的第一结构域在氨基酸序列方面是可变的,从而提供在每个单独抗体中发现的抗体结合特异性。这些被称为可变重 (VH) 区和可变轻 (VL) 区。每条链的其他结构域在氨基酸序列方面是相对不变的,并且被称为恒定重 (CH) 区和恒定轻 (CL) 区。如图 1 中所示,对于一个 IgG 抗体,轻链包括一个可变区 (VL) 和一个恒定区 (CL)。一个 IgG 重链包括一个可变区 (VH)、一个第一恒定区 (CH1)、一个铰链区、一个第二恒定区 (CH2)、以及一个第三恒定区 (CH3)。在 IgE 和 IgM 抗体中,重链包括一个另外的恒定区 (CH4)。

[0189] 在此所述的抗体可以包括例如单克隆抗体、多克隆抗体 (例如, IVIG)、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、嵌合抗体、单链 Fvs(scFv)、二硫化物连接的 Fvs(sdFv)、和抗独特型 (抗 -Id) 抗体、以及上述任一者的抗原结合片段。抗体可以是任何类型 (例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY), 种类 (例 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或子类。

[0190] 如在此所使用,术语“Fc 片段”指代一种或多种保留在此所述的 Fc 功能和 / 或活性 (如结合至 Fc 受体) 的 Fc 区片段。这类片段的实例包括这样的片段,这些片段包括 Fc 区的一个 N-连接的糖基化位点 (例如, IgG 重链的 Asn297 或其他抗体同种型的同源位点), 如一个 CH2 结构域。如在此所使用,术语抗体的“抗原结合片段”指代保留特异结合抗原能力的一种或多种抗体片段。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”中的结合片段的实例包括 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、Fd 片段、Fv 片段、scFv 片段、dAb 片段 (沃德 (Ward) 等人, (1989) 自然 (Nature) 341:544-546)、以及分离的互补决定区 (CDR)。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且片段可以被筛选用于以与完整抗体相同的方式使用。

[0191] 在此所述的参考糖蛋白 (例如, 参考抗体) 或它们的片段可以通过本领域中已知的用于合成糖蛋白 (例如, 抗体) 的任何方法来生产 (参见, 例如, 哈洛 (Harlow) 等人, 抗体: 实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual), (冷泉港实验室出版社, 第二版 1988); 布林克曼 (Brinkman) 等人, 1995, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645)。可以使用描述于例如莫里森 (Morrison), 1985, 科学 (Science) 229:1202 中的方法生产嵌合抗体, 并且通过描述于例如美国专利号 6, 180, 370 中的方法生产人源化抗体。

[0192] 在此所述的另外的参考抗体是双特异性抗体和多价抗体, 如描述于例如西格尔 (Segal) 等人, 免疫学方法杂志 248:1-6 (2001); 以及塔特 (Tutt) 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol.) 147:60 (1991)。

[0193] 糖蛋白缀合物

[0194] 本披露包括缀合或融合至一个或多个异源部分的糖蛋白 (或 Fc 区或含有它的一个或多个 N-糖基化位点的 Fc 片段)。异源部分包括但不限于, 肽、多肽、蛋白质、融合蛋白、核酸分子、小分子、模拟剂、合成药物、无机分子、以及有机分子。在一些情况下, 一种糖蛋白缀合物是一种融合蛋白, 该融合蛋白包括肽、多肽、蛋白质支架、scFv、dsFv、双抗体、Tandab、或融合至 Fc 区的抗体模拟物如糖基化 Fc 区。一种融合蛋白可以包括将一个 Fc 区连接到一个异源部分上的一个连接子区 (参见, 例如, 哈勒威尔 (Hallewell) 等人, (1989), 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 264, 5260-5268; 阿尔夫坦 (Alfthan) 等人, (1995), 蛋白质工程 (Protein Eng.) 8, 725-731; 罗宾逊和萨乌尔 (Robinson&Sauer) (1996))。

[0195] 示例性的非限制性的参考糖蛋白缀合物产品包括阿巴西普 (Orencia®，施贵宝公司)、阿柏西普 (Eylea®，雷杰纳荣制药公司)、阿法赛特 (Amevive®，阿斯泰来制药公司)、贝拉西普 (Nulojix®，施贵宝公司)、地尼白介素 - 毒素连接物 (Ontak®，卫材公司)、依那西普 (Enbrel®，安进 - 辉瑞公司)、以及利洛西普 (Arcalyst®，雷杰纳荣制药公司)。

[0196] 在一些情况下，一种糖蛋白缀合物包括缀合至以下异源多肽的一个 Fc 区 (或含有它的一个或多个 N-糖基化位点的一个 Fc 片段)，该异源多肽具有至少 10 个、至少 20 个、至少 30 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 60 个、至少 70 个、至少 80 个、至少 90 个或至少 100 个氨基酸。

[0197] 在一些情况下，一种糖蛋白缀合物包括缀合至用于促进纯化的一个或多个标记物序列如多肽的一个 Fc 区 (或含有它的一个或多个 N-糖基化位点的一个 Fc 片段)。一种具体的标记物氨基酸序列是六组氨酸肽，如在 pQE 载体中提供的标签 (凯杰公司 (QIAGEN, Inc.)，伊顿大道 9259 (9259 Eton Avenue)，查茨沃思 (Chatsworth)，加利福尼亚，91311)。用于纯化的其他肽标签包括但不限于：对应于衍生自流感血球凝集素蛋白的一个表位的血球凝集素“HA”标签 (威尔逊 (Wilson) 等人，1984，细胞 (Cell)) 37:767) 以及“Flag”标签。

[0198] 在其他情况下，一种糖蛋白缀合物包括缀合至诊断或可检测试剂的一个 Fc 区 (或含有它的一个或多个 N-糖基化位点的一个 Fc 片段)。此类融合蛋白作为临床检测程序的部分用于监测或预测疾病或病症的发展或进展可以是有用的，例如确定一种特定治疗的疗效。此类诊断和检测可以通过将一种糖蛋白偶联到可检测的物质上来完成，这些可检测的物质包括但不限于：不同的酶，例如但不限于，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、β-半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶；辅基，例如但不限于，链霉抗生物素蛋白 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素；荧光物质，例如但不限于，伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪氨荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质，例如但不限于，鲁米诺；生物性发光物质，例如但不限于，荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白；放射性物质，例如但不限于，碘 (<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>123</sup>I)、碳 (<sup>14</sup>C)、硫 (<sup>35</sup>S)、氚 (<sup>3</sup>H)、铟 (<sup>115</sup>In、<sup>113</sup>In、<sup>112</sup>In、<sup>111</sup>In)、锝 (<sup>99</sup>Tc)、钛 (<sup>201</sup>Ti)、镓 (<sup>68</sup>Ga、<sup>67</sup>Ga)、钯 (<sup>103</sup>Pd)、钼 (<sup>99</sup>Mo)、氙 (<sup>133</sup>Xe)、氟 (<sup>18</sup>F)、<sup>153</sup>Sm、<sup>177</sup>Lu、<sup>153</sup>Gd、<sup>159</sup>Gd、<sup>149</sup>Pm、<sup>140</sup>La、<sup>169</sup>Yb、<sup>175</sup>Yb、<sup>166</sup>Ho、<sup>90</sup>Y、<sup>47</sup>Sc、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>142</sup>Pr、<sup>105</sup>Rh、<sup>97</sup>Ru、<sup>68</sup>Ge、<sup>57</sup>Co、<sup>65</sup>Zn、<sup>85</sup>Sr、<sup>32</sup>P、<sup>51</sup>Cr、<sup>54</sup>Mn、<sup>75</sup>Se、<sup>113</sup>Sn 以及 <sup>117</sup>Sn；使用不同的正电子放射断层造影术的正电子发射金属、非放射性顺磁金属离子、以及放射性同位素标记的或缀合至特异性放射性同位素的分子。

[0199] 用于将治疗性部分缀合至抗体的技术是众所周知的 (参见，例如，阿尔农 (Arnon) 等人，“癌症治疗中用于免疫靶向药物的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)”，在单克隆抗体和癌症治疗 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy) 中，莱斯菲尔德 (Reisfeld) 等人 (编辑)，第 243 页至第 256 页 (阿兰 R. 利斯有限公司 (Alan R. Liss, Inc.) 1985)；赫尔斯特伦 (Hellstrom) 等人，“用于药物递送的抗体 (Antibodies For Drug Delivery)”，在受控药物递送 (Controlled Drug Delivery) 中，(第二版)，罗宾逊 (Robinson) 等人 (编辑)，第 623 页至第 653 页 (马塞尔德克公司 (Marcel Dekker, Inc.) 1987))。

**[0200] 聚糖评价**

[0201] 在一些实施例中,糖蛋白的聚糖通过任何可行的适合的方法来分析。在一些情况下,如在此所述的聚糖结构和组合物例如通过以下各项中的一种或多种来分析:酶促法、色谱法、质谱法(MS)、先色谱后MS法、电泳法、先电泳后MS法、核磁共振(NMR)法、以及它们的组合。示例性酶促法包括使一种糖蛋白制剂与一种或多种酶接触,接触所处的条件和时间足以释放一种或多种聚糖(例如,一种或多种暴露的聚糖)。在一些情况下,该一种或多种酶包括N-糖酰胺酶F。示例性色谱法包括但不限于:使用脉冲电流检测的强阴离子交换色谱(SAX-PAD)、液相色谱(LC)、高效液相色谱(HPLC)、超高效液相色谱(UPLC)、薄层色谱(TLC)、酰胺柱色谱、以及它们的组合。示例性质谱(MS)包括但不限于:串联MS、LC-MS、LC-MS/MS、基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)、傅里叶变换质谱(FTMS)、离子迁移率分离质谱(IMS-MS)、电子转移解离(ETD-MS)、以及它们的组合。示例性电泳法包括但不限于:毛细管电泳法(CE)、CE-MS、凝胶电泳法、琼脂糖凝胶电泳法、丙烯酰胺凝胶电泳法、先SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)后蛋白质印迹法(使用识别特异性聚糖结构的抗体)、以及它们的组合。示例性核磁共振(NMR)包括但不限于:一维NMR(1D-NMR)、二维NMR(2D-NMR)、相关谱磁性角自旋NMR(COSY-NMR)、全相关光谱NMR(TOCSY-NMR)、异核单量子相干NMR(HSQC-NMR)、异核多级量子相干(HMQC-NMR)、旋转核欧沃豪斯效应谱NMR(ROESY-NMR)、核欧沃豪斯效应谱(NOESY-NMR)、以及它们的组合。

[0202] 在一些情况下,在此所述的技术可以与用于检测、分析和/或分离聚糖或糖蛋白的一种或多种其他技术组合。例如,在某些情况下,根据本披露使用一种或多种可用的方法来分析聚糖(仅给出一些实例,参见阿努姆拉(Anumula),分析生物化学(Anal. Biochem.), 350(1):1, 2006;克莱因(Klein)等人,分析生物化学,179:162, 1989;和/或汤森德(Townsend),“R. R. 碳水化合物分析(R. R. Carbohydrate Analysis)”高效液相色谱和毛细管电泳(High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis.), Z·El 拉西(Z. El Rassi)编辑,第181页至第209页,1995;WO 2008/128216;WO 2008/128220;WO 2008/128218;WO 2008/130926;WO 2008/128225;WO 2008/130924;WO 2008/128221;WO 2008/128228;WO 2008/128227;WO 2008/128230;WO 2008/128219;WO 2008/128222;WO 2010/071817;WO 2010/071824;WO 2010/085251;WO 2011/069056;以及WO 2011/127322,这些文献中的每一个通过引用以其全部内容结合在此)。例如,在一些情况下,使用色谱法、电泳法、核磁共振法、以及它们的组合中的一种或多种对聚糖进行表征。在一些实施例中,通过用一种荧光染料标记并且测量荧光水平来分析聚糖。

[0203] 在一些情况下,用于评价例如一种糖蛋白制剂中的一个或多个靶蛋白特异性参数例如在此披露的一个或多个参数的方法可以通过表1中所列方法中的一种或多种来进行。

[0204] 表1:评价参数的示例性方法:

[0205]

一种或多种方法	相关文献	参数
C18 UPLC 质谱*	陈 (Chen) 和弗琳 (Flynn) , 生物化学分析, 370:147-161 (2007) 陈和弗琳, 美国质谱学会志 (J. Am. Soc. Mass Spectrom.) , 20:1821-1833 (2009)	一种或多种聚糖 (例如, N-连接的聚糖、 暴露的 N-连接的聚糖、聚 糖检测、聚糖鉴别以及表 征; 位点特异性糖化; 糖 形检测 (例如, 参数 1- 7) ; 百分比糖基化; 和/或 未糖基化)
生物分析器 (还原的/ 非还原的) *	福雷尔 (Forrer) 等人, 生物化 学分析, 334:81-88 (2004)	聚糖 (例如, N-连接的聚 糖、暴露的 N-连接的聚 糖) (包括, 例如, 聚糖检 测、鉴别以及表征; 位点 特异性糖化; 糖形检测; 百分比糖基化; 和/或未糖 基化)
LC-MS (还原的/非 还原的/烷基化) * *方法包括去除 (例 如, 酶促法、化学法 和物理法) 聚糖	狄克 (Dick) 等人, 生物技术 和生物工程, 100:1132-1143 (2008) 格茨 (Goetze) 等人, 糖生物 学 (Glycobiol.) , 21:949-959 (2011) 谢 (Xie) 等人, 单克隆抗体杂 志 (mAbs) , 2:379-394 (2010)	聚糖 (例如, N-连接的聚 糖、暴露的 N-连接的聚 糖) (包括, 例如, 聚糖检 测、鉴别以及表征; 位点 特异性糖化; 糖形检测; 百分比糖基化; 和/或未糖 基化)

[0206]

阴离子交换色谱	安 (Ahn) 等人, 色谱杂志 B (J. Chrom. B) , 878:403-408 (2010)	唾液酸化聚糖
1,2-二氨基-4,5-亚甲 二氧基苯 (DMB) 标记方法	法华 (Hokke) 等人, 欧洲生物 学化学会联盟快报 (FEBS Lett.) , 275:9-14 (1990)	唾液酸

[0207] 上文引用的文献通过引用以其全部内容结合在此, 或者, 在替代方案中, 它们的结合程度为它们涉及用于确定在此所述的参数的方法中的一种或多种。

[0208] 药物组合物和给药

[0209] 在此所述的一种糖蛋白可以并入 (例如, 配制) 到一种药物组合物中。这种药物

组合物可用作用于预防和 / 或治疗与一种相应的参考糖蛋白相关的一种或多种疾病的一种替代的和 / 或改进的组合物。包含一种糖蛋白的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的方法来配制。该药物组合物能够以可注射配制品形式肠胃外给予, 该可注射配制品包含在水中或在另一种药学上可接受的液体中的一种无菌溶液或悬浮液。例如, 该药物组合物可以通过适当地将该糖蛋白与药学上可接受的媒介物或介质组合, 如无菌水和生理盐水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、调味赋形剂、稀释剂、媒介物、防腐剂、粘合剂, 随后在通常可接受的医学实践所需的单位剂型中混合而进行配制。药物制剂中包括的活性成分的量是提供在指定范围中的这种适合的剂量。

[0210] 一种用于注射的无菌组合物可以根据常规药学实践使用用于注射的蒸馏水作为一种媒介物来配制。例如, 生理盐水或含有葡萄糖和其他补充物如 D- 山梨糖醇、D- 甘露糖、D- 甘露醇以及氯化钠的等渗溶液可以用作用于注射的一种水溶液, 任选地结合一种适合的增溶剂, 例如醇如乙醇和多元醇如丙二醇或聚乙二醇; 以及一种非离子表面活性剂如聚山梨酯 80™、HCO-50 等等。

[0211] 油状液体的非限制性实例包括芝麻油和大豆油, 并且该油状液体可以与作为一种增溶剂的苯甲酸苄酯或苯甲醇组合。可以包括的其他物品是一种缓冲液如磷酸缓冲液、或乙酸钠缓冲液, 一种安抚剂如普鲁卡因盐酸盐, 一种稳定剂如苯甲醇或苯酚, 以及一种抗氧化剂。一种配制注射液可以被包装在一个适合的安瓿瓶中。

[0212] 在一些情况下, 在此所述的一种或多种聚糖的水平可以与一个预先确定的水平 (例如, 一个参考标准中的一个相应水平) 进行比较, 例如, 以作出与该多肽制剂的组合物有关的决定, 例如, 作出分类、选择、接受或丢弃、释放或留存、加工成一种药物产品、运输、移动到一个不同的位置、配制、贴标签、包装、准予进入贸易、或销售或许诺销售该多肽 (例如, 一种重组抗体) 的决定。在其他情况下, 该决定可以是接受、修改或拒绝用来制备该多肽 (例如, 一种抗体) 的一个或多个生产参数。具体而言, 参考标准的非限制性实例包括一个对照水平 (例如, 由一种不同的方法产生的一种多肽) 或者在产品说明书中的一个范围或值 (例如, FDA 标签或医嘱) 或者用于含有该多肽制剂的一种药物制剂的质量标准。

[0213] 在一些情况下, 方法 (即, 评价、鉴别以及生产方法) 包括采取行动 (例如, 身体活动) 对在此披露的方法进行响应。例如, 一种多肽制剂根据预选择的值或目标值是否达到而被分类、选择、接受或丢弃、释放或留存、加工成一种药物产品、运输、移动到一个不同的位置、配制、贴标签、包装、准予进入贸易、或销售或许诺销售。在一些情况下, 加工可以包括将该多肽制剂的至少一部分进行配制 (例如, 与药物赋形剂组合)、包装 (例如, 以注射器或小瓶包装)、贴标签、或运输。在一些情况下, 加工包括将作为在此所述的一种药物产品的制剂的至少一部分进行配制 (例如, 与药物赋形剂组合)、包装 (例如, 以注射器或小瓶包装)、以及贴标签。加工可以包括指导和 / 或联系另一方按照在此所述进行加工。

[0214] 在一些情况下, 评定一种多肽制剂 (例如, 一种抗体制剂) 的生物活性。该制剂的生物活性可以通过任何已知方法来分析。在一些实施例中, 评定一种多肽的结合活性 (例如, 结合至一个受体)。在一些实施例中, 评定一种多肽的治疗活性 (例如, 在减少疾病或病状的严重性或症状方面的一种多肽的活性, 或者在延迟疾病或病状的症状的出现方面的一种多肽的活性)。在一些实施例中, 评定一种多肽的药理学活性 (例如, 生物利用率、药物代谢动力学、药效动力学)。分析糖蛋白治疗剂的生物利用率、药物代谢动力学以

及药效动力学的方法可参见列如,韦纳 (Weiner) 等人,生物医学药物分析杂志 (J. Pharm. Biomed. Anal.) 15(5):571-9, 1997; 斯里尼瓦桑 (Srinivas) 等人,药物科学杂志 (J. Pharm. Sci.) 85(1):1-4, 1996; 以及斯里尼瓦桑等人,药物研究 (Pharm. Res.) 14(7):911-6, 1997。

[0215] 可以测试的特定的生物活性或治疗活性将根据特定多肽 (例如, 抗体) 而变化。可以通过任何可用的方法来分析多肽制剂的潜在的不利活性或毒性 (例如, 导致高血压、过敏反应、血栓形成事件、癫痫, 或其他不良事件的倾向)。在一些实施例中, 一种多肽制剂的免疫原性例如通过确定该制剂在受试者体内是否引发一个抗体反应来评定。

[0216] 给药途径可以是肠胃外的, 例如, 通过注射给药、经鼻给药、经肺给药或经皮给药。给药可以是全身或局部进行静脉内注射、肌内注射、腹腔内注射、皮下注射的。

[0217] 一种适合的给药方式可以根据患者的年龄和病状来选择。含有一种修饰的糖蛋白的单一剂量的药物组合物可以从 0.001 至 1000mg/kg 的体重的范围选择。另一方面, 一种剂量可以在 0.001 至 100000mg/ 体重的范围内选择, 但是本披露并不限于此类范围。给药的剂量和方法根据患者的体重、年龄、病状等等而变化, 并且可以适当地由本领域技术人员按需选择。

[0218] 所有出版物、专利申请、专利以及在此提及的其他参考文献都通过引用以其全部内容结合。此外, 材料、方法和实例仅是说明性的而并不意图具有限制性。除非另外定义, 在此所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然在本发明的实践或测试中可以使用与在此所述的那些相似或等效的方法和材料, 但是在此描述了适合的方法和材料。

[0219] 本披露通过以下实例进行进一步说明。仅仅提供了用于说明性目的实例。不应解释为以任何方式限制本披露的范围或内容。

[0220] 实例

[0221] 实例 1- 铵对糖基化的影响

[0222] 方法

[0223] 分析了铵对由 CHO 细胞产生的模型抗体的抗体糖形的影响。被基因工程化为表达该模型抗体的 CHO 细胞最初在含有大豆水解物、Lonza Power Feed A 以及另外的补充物的基础培养基 (Power CHO2, 目录号 #BE15-771, 龙沙有限公司 (Lonza Inc.), 艾伦代尔, 新泽西州) 中生长。在第 3 天, 用 Lonza Power Feed A 和大豆水解物喂养这些细胞。在第 6 天, 用 Lonza Power Feed A 培养基和具有  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10mM 终浓度) 或不具有  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的另外的补充物喂养这些细胞。当葡萄糖浓度下降到 2g/L 之下时, 用 2g/L 的葡萄糖喂养细胞。在第 14 天收获细胞, 并且评价所产生的抗体的滴度和聚糖组成。

[0224] 对使用 N-糖酰胺酶 F 从抗体酶促释放并且用荧光团 2-氨基苯甲酰胺标记的聚糖进行每种糖形的相对量化。相对数量是基于相关物质的荧光强度相对于色谱图中的总荧光强度。在相同保留时间洗脱出来的所有糖形被一起考虑。

[0225] 结果

[0226] 培养基中铵的存在或缺乏对滴度或最大 VCD 的影响极小。在铵的存在下生长的细胞具有  $8 \times 10^6$  个细胞 /mL 的平均最大 VCD 以及 1.0g/L 的滴度, 而在不存在铵下生长的细胞具有  $7.5 \times 10^6$  个细胞 /mL 的平均最大 VCD 以及 1.1g/L 的滴度。

[0227] 如图 2A 所示, 在铵的存在下生长的抗体中的岩藻糖基化聚糖的水平是减少的, 而

在铵的存在下生长的抗体中的无岩藻糖基化聚糖的水平是增加的（参见图 2C）。另外，如图 2B 所示，铵的存在使得 G0F 聚糖的水平略微增加，而 G1F/G2F 聚糖（其占岩藻糖基化种类的约 20% -30%）的水平在铵的存在下减少。

[0228] 铵还使得唾液酸化聚糖的水平减少（如图 3 所示）。

[0229] 铵对高甘露糖聚糖的影响示于图 4A、4B 和 4C 中。如图 4A 所示，与没有铵相比，铵增加了高甘露糖聚糖的总水平。另外，铵使得高甘露糖 5 聚糖（图 4B）以及高甘露糖 6 聚糖和高甘露糖 3/4 聚糖（参见图 4C）的水平增加。

[0230] 实例 2- 赖氨酸对糖基化的影响

[0231] 方法

[0232] 为表达该抗体的 CHO 细胞最初在含有大豆水解物、Lonza Power Feed A 以及另外的补充物的基础培养基（Power CHO2，目录号 #BE15-771，龙沙有限公司，艾伦代尔，新泽西州）（并且包括约 800-950mg/L 的初始浓度的赖氨酸）中生长。在第 3 天，用 Lonza Power Feed A 和不具有 L- 赖氨酸（目录号 #LL501，西格玛公司）或具有 L- 赖氨酸（5g/L 终浓度，“赖氨酸进料”）的大豆水解物喂养这些细胞。在第 6 天，用 Lonza Power Feed A 培养基和另外的补充物喂养这些细胞。当葡萄糖浓度下降到 2g/L 之下时，用 2g/L 的葡萄糖喂养细胞。

[0233] 在第 14 天收获细胞，并且评价所产生的抗体的滴度和聚糖组成。如实例 1 所述进行每种糖形的相对定量。

[0234] 结果

[0235] 赖氨酸进料的存在或缺乏对滴度或最大 VCD 的影响极小。在赖氨酸进料的存在下生长的细胞具有  $8.0 \times 10^6$  个细胞 /mL 的平均最大 VCD 以及 1.0g/L 的滴度，而在不存在赖氨酸进料下生长的细胞具有  $8.4 \times 10^6$  个细胞 /mL 的平均最大 VCD 以及 0.9g/L 的滴度。

[0236] 赖氨酸进料影响岩藻糖基化聚糖的水平，使得岩藻糖基化聚糖的水平减少（图 5A），并且无岩藻糖基化聚糖的水平增加（图 5C）。赖氨酸进料使得 G0F 聚糖的水平增加并且 G1F/G2F 聚糖的水平减少（图 5B）。另外，赖氨酸进料使得唾液酸化聚糖减少（图 6）。

[0237] 赖氨酸进料还增加了高甘露糖聚糖的水平（参见图 7A），同时高甘露糖 5 聚糖（图 7B）以及高甘露糖 6 聚糖、高甘露糖 8 聚糖和高甘露糖 3/4 聚糖（图 7C）增加。

[0238] 这些实例证明可以使用在含有或缺乏铵和 / 或赖氨酸的培养基中培养的细胞产生具有目标水平的聚糖的多肽。

[0239] 等效物

[0240] 应理解，虽然已经结合其详细说明描述了本披露，但上述说明意图说明而不是限制本发明的由随附权利要求书的范围限定的范围。其他方面、优点和修改都在以下权利要求书的范围之内。

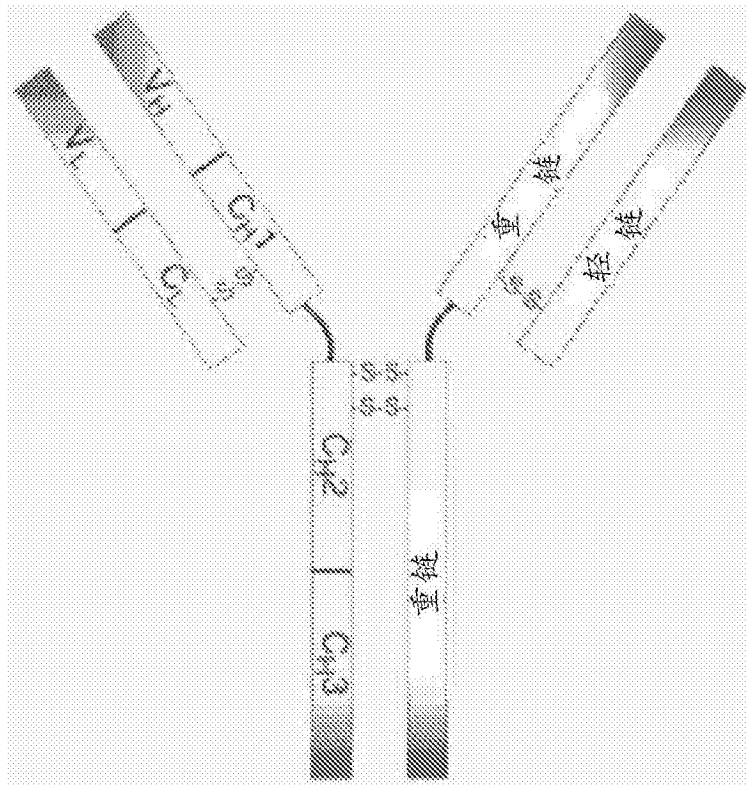


图 1

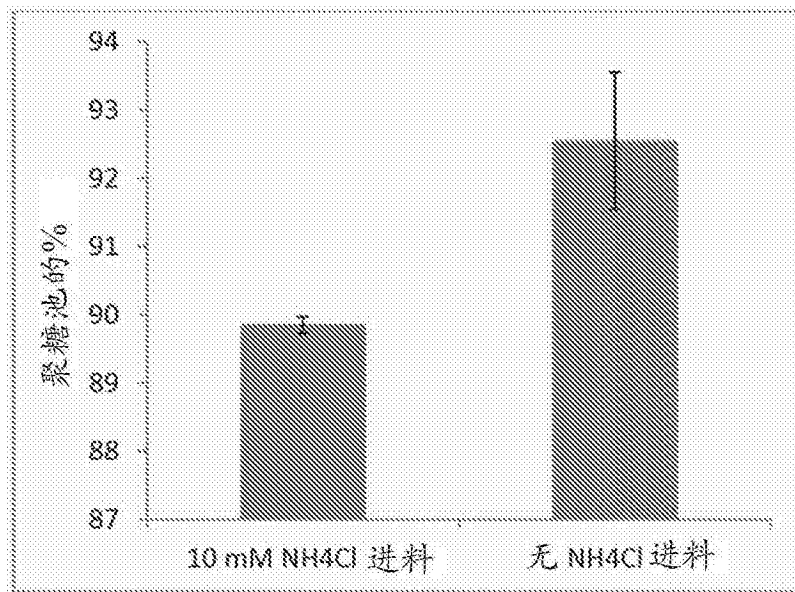


图 2A

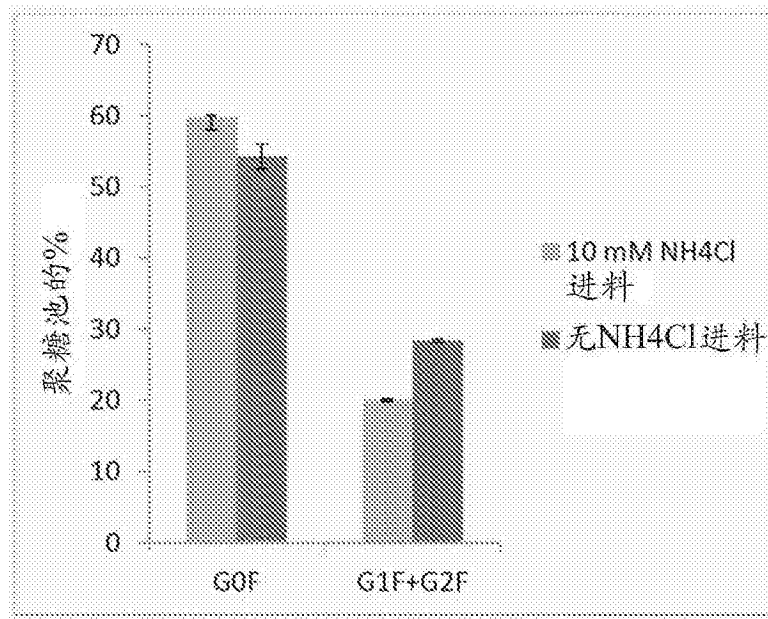


图 2B

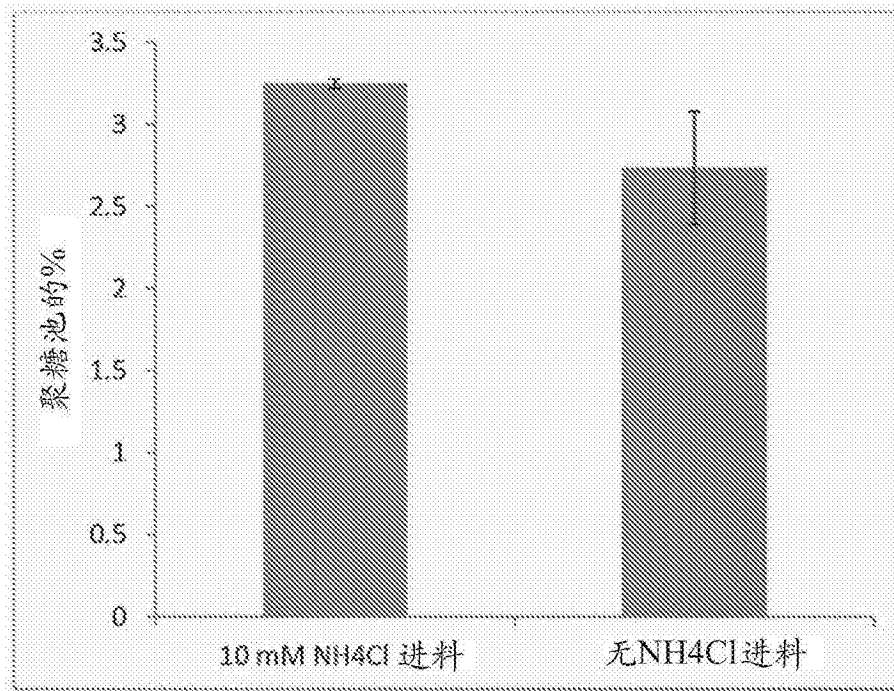


图 2C

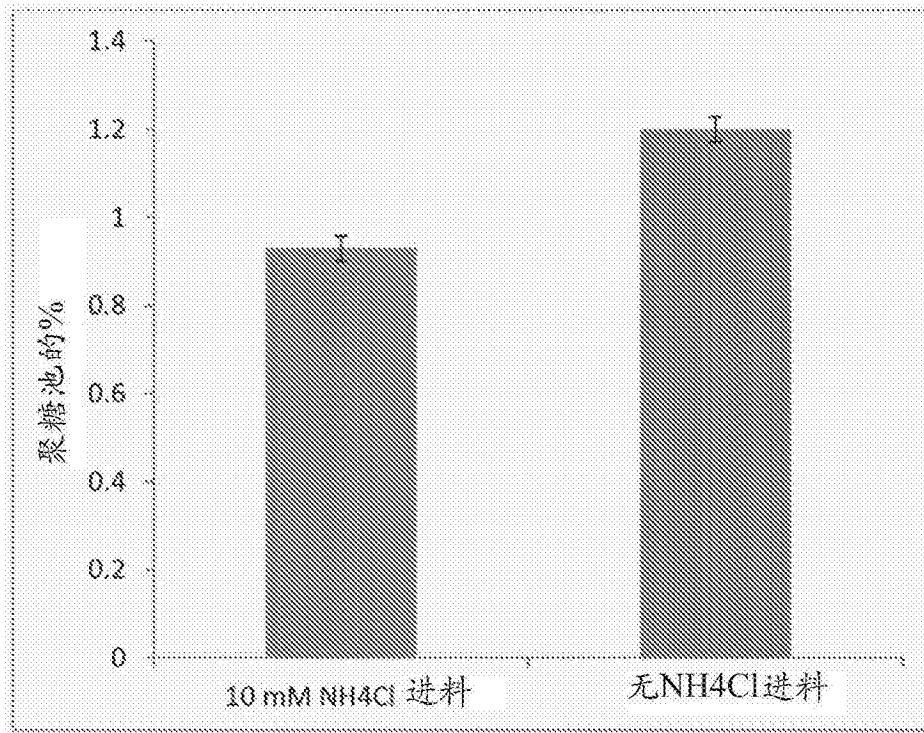


图 3

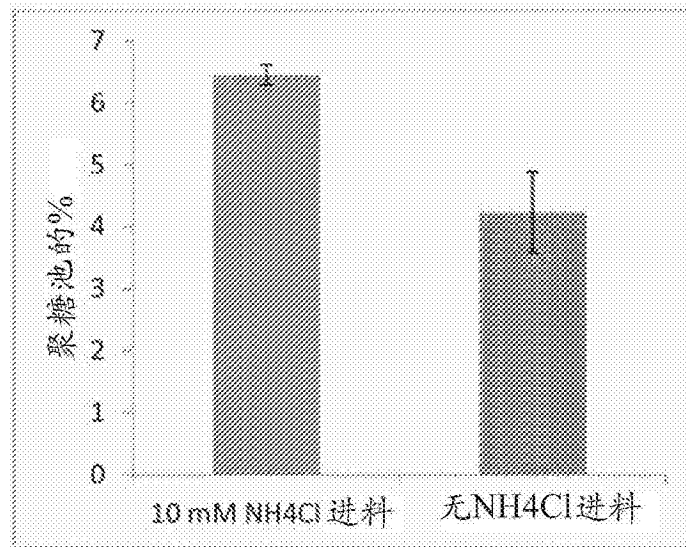


图 4A

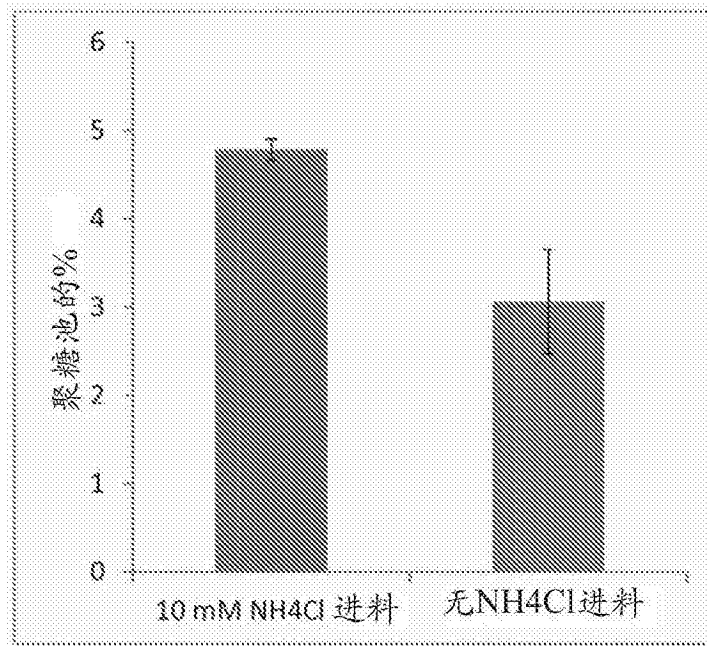


图 4B

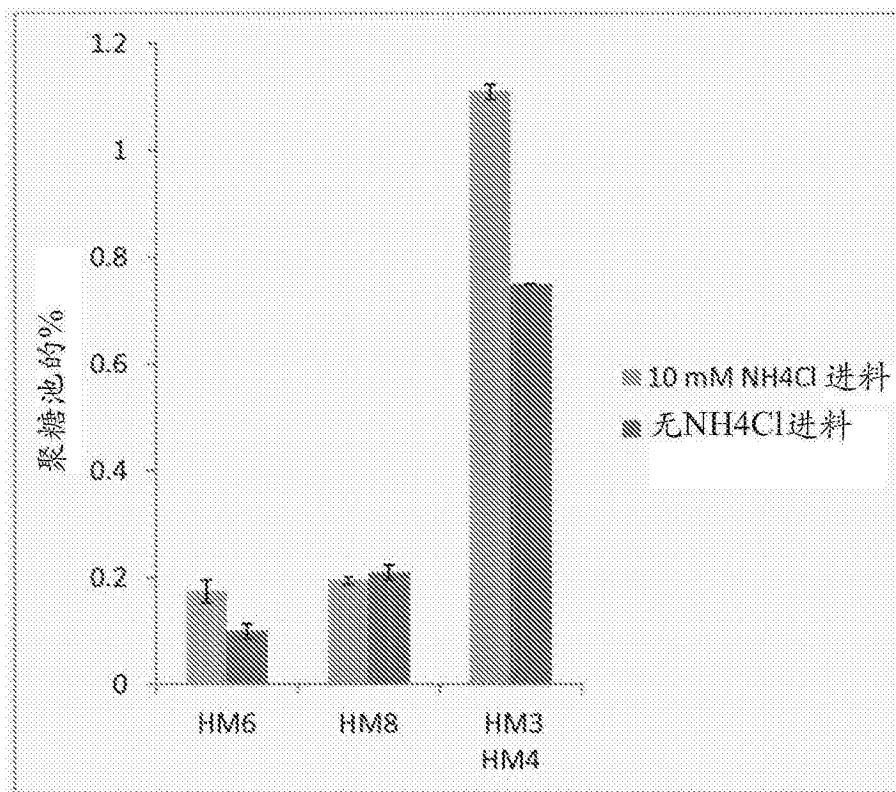


图 4C

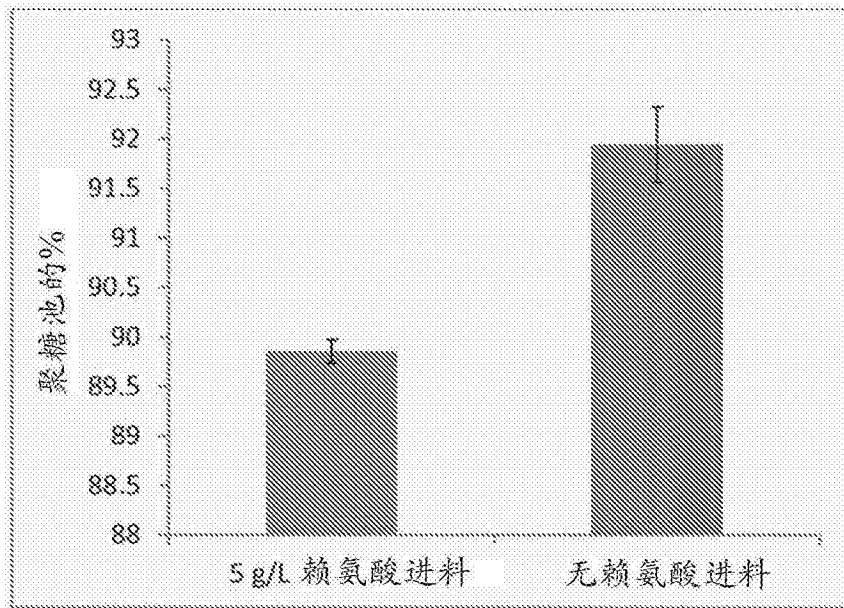


图 5A

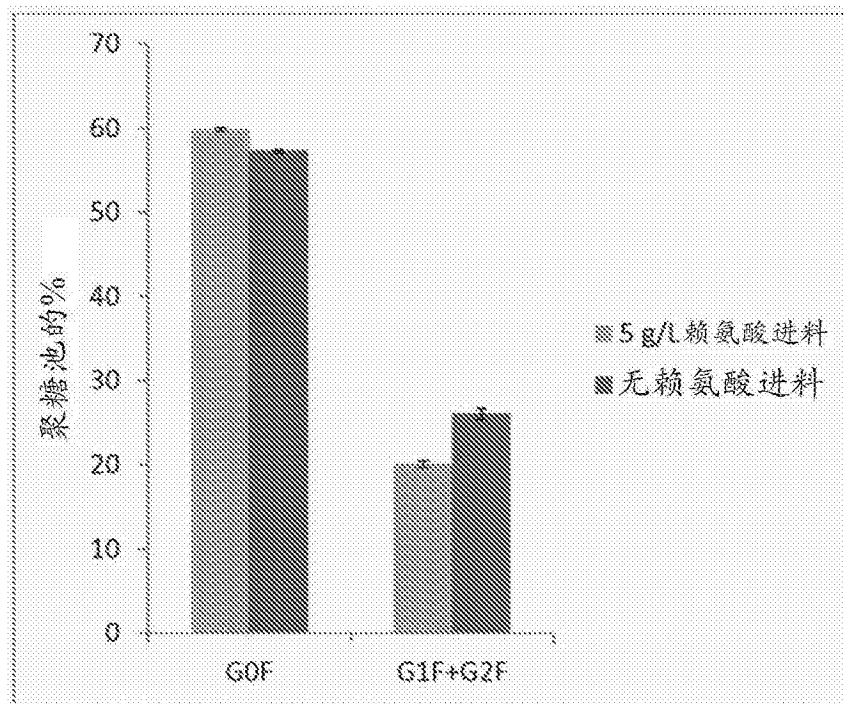


图 5B

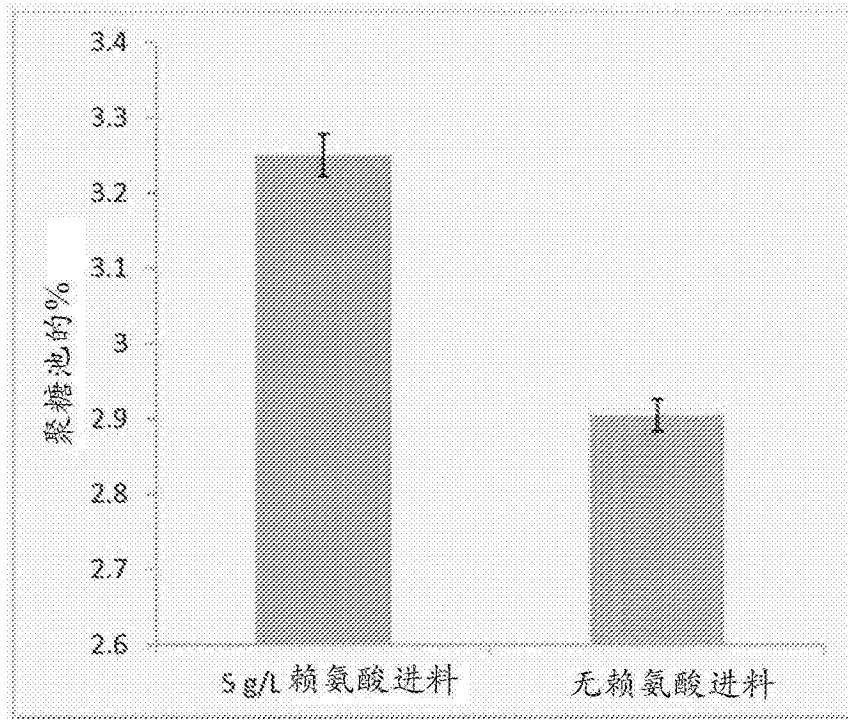


图 5C

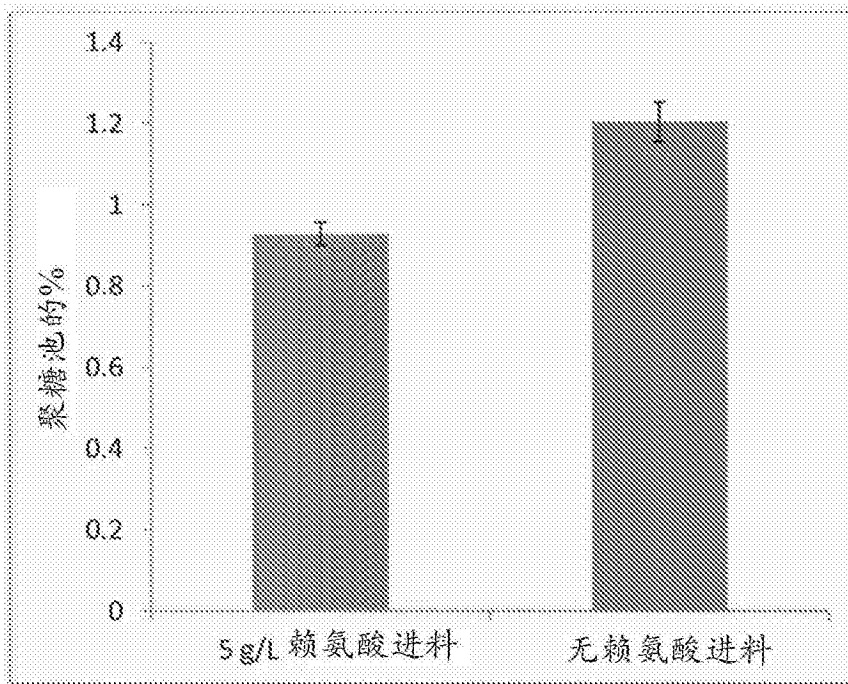


图 6

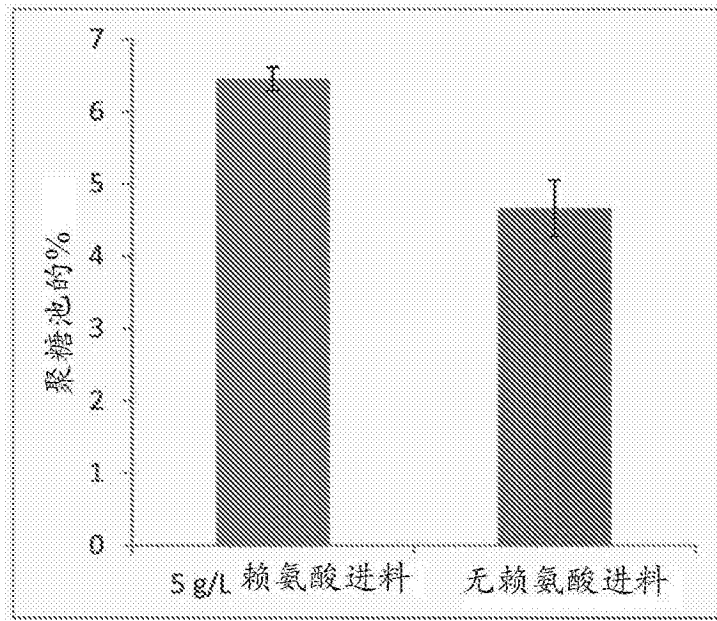


图 7A

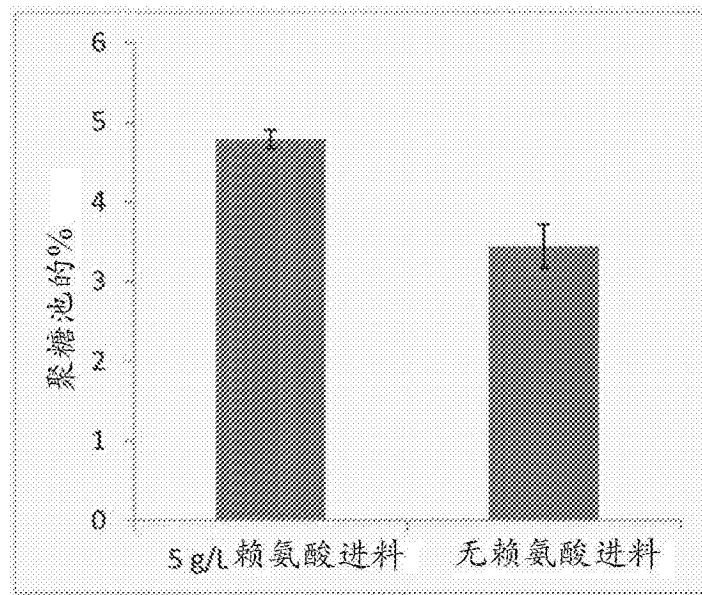


图 7B

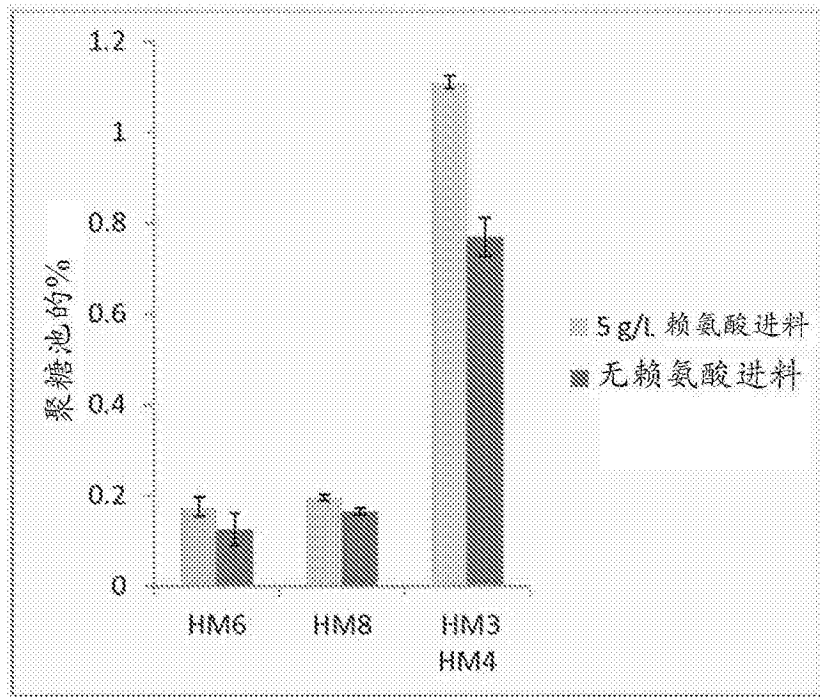


图 7C