



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111417715 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 27

(21) 申请号 201880076960.2

(22) 申请日 2018.11.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111417715 A

(43) 申请公布日 2020.07.14

(30) 优先权数据  
17204978.5 2017.12.01 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.05.28

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2018/083010 2018.11.29

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/106091 EN 2019.06.06

(73) 专利权人 UCB生物制药有限责任公司  
地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 V·车瓦里尔 N·寇查诺夫斯基  
L·马菲特斯 V·A·C·库尔

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038  
专利代理师 傅宇昌

(51) Int.Cl.  
C12N 5/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 2017186654 A1, 2017.11.02  
Manabu Kitazawa等. Intracellular redox  
regulation by a cystine derivative  
suppresses UV-induced NF-UB  
activation. FEBS Letters. 2002, 第526卷第106  
页右栏第3段.

审查员 季璇馨

权利要求书3页 说明书34页  
序列表7页 附图26页

(54) 发明名称  
细胞培养方法

(57) 摘要  
本发明涉及用于降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体的异质性的方法, 所述方法包括使产生重组蛋白质的宿主细胞在细胞培养基中生长, 其中所述细胞培养基包含一种或多种半胱氨酸/胱氨酸类似物。

1. 用于降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体的异质性的方法,所述方法包括使产生重组蛋白质的宿主细胞在细胞培养基中生长,

其中所述细胞培养基包含:(a) 一种或多种半胱氨酸/胱氨酸类似物,和(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,其中(a)与(b)的摩尔比为1:10至10:1,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自下列各项组成的组:N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯、N-乙酰基-L-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,

其中在产生过程结束时获得所述异质性降低而不降低所述重组蛋白质的滴度,并且其中所述异质性降低包括降低:

a. 颜色或颜色强度;和/或

b. 电荷异质性,通过降低酸性峰群组种类(APG),主要电荷种类并不由此下降,并且其中所述宿主细胞是CHO细胞。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述方法包括下列步骤:

(i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基包含初始量的:

(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

(b) 半胱氨酸和胱氨酸,

(ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:10至10:1。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述(a)与(b)的摩尔比为1:2至2:1。

4. 根据权利要求1或2的方法,其中所述细胞培养基包含:

(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

其中,(a)的摩尔量为依据(a)和(b)的总摩尔量而言的10%至90%,其中在使用半胱氨酸类似物的情况下,依据半胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量;和其中在使用胱氨酸类似物的情况下,依据胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量。

5. 根据权利要求1或2的方法,其中所述方法包括下列步骤:

(i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

(b) 半胱氨酸和胱氨酸,

(ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为10%至90%,其中在使用半胱氨酸类似物的情况下,依据半胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量;和其中在使用胱氨酸类似物的情况下,依据胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量。

6.根据权利要求2的方法,其中在所述基础培养基中(b)的浓度等价于0.2至0.6 mmol/L的半胱氨酸。

7.根据权利要求2的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基补充以(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,其中在整个产生期内添加至培养物的(a)和(b)之和等价于2至20 mmol/L的半胱氨酸。

8.根据权利要求2的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基每日补充以(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,其中每日添加将(a) + (b)的浓度带至等价于0.1至1 mmol/L的浓度的半胱氨酸。

9.根据权利要求1或2的方法,其中所述重组蛋白质为抗体或其抗原结合片段。

10.根据权利要求9的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段为:

i) 这样的抗体或其抗原结合片段,其

a. 包含由SEQ ID NO: 1中所定义的序列组成的CDR-H1;由SEQ ID NO: 2中所定义的序列组成的CDR-H2;由SEQ ID NO: 3中所定义的序列组成的CDR-H3;由SEQ ID NO: 4中所定义的序列组成的CDR-L1;由SEQ ID NO: 5中所定义的序列组成的CDR-L2;和由SEQ ID NO: 6中所定义的序列组成的CDR-L3;或

b. 包含由SEQ ID NO: 7中所定义的序列组成的轻链可变区和由SEQ ID NO: 8中所定义的序列组成的重链可变区;或

c. 包含由SEQ ID NO: 7中所定义的序列组成的轻链可变区和由SEQ ID NO: 11中所定义的序列组成的重链;或者

ii) 这样的抗体,其包含由SEQ ID NO: 9中所定义的序列组成的轻链和由SEQ ID NO: 10中所定义的序列组成的重链。

11.根据权利要求1或2的方法,其中所述重组蛋白质是这样的蛋白质,其当由在不包含半胱氨酸/胱氨酸类似物的细胞培养基中生长的宿主细胞产生时,在50 mg/ml或更高的浓度下不是无色的。

12.用于在细胞培养基中产生重组蛋白质制备物的方法,其包括:

(i) 将宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述宿主细胞是CHO细胞,其中所述基础培养基包含初始量的:

(a) 在权利要求1中所详细说明了的半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

(b) 半胱氨酸和胱氨酸,

(ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

(a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

(b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自由下列各项组成的组:N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸

酸-二甲基酯、N-乙酰基-L-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,并且

其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:10至10:1。

13.用于在细胞培养基中产生重组蛋白质制备物的方法,其包括:

(i)将宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述宿主细胞是CHO细胞,其中所述基础培养基包含初始量的:

(a)在权利要求1中所详细说明书的半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

(b)半胱氨酸和胱氨酸,

(ii)使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,

其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自由下列各项组成的组:N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯、N-乙酰基-L-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,

其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为10%至90%,其中在使用半胱氨酸类似物的情况下,依据半胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量;和其中在使用胱氨酸类似物的情况下,依据胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量。

14.根据权利要求1或2的方法,其中所述(a)与(b)的摩尔比为1.5:1至1:1.5。

15.根据权利要求1或2的方法,其中所述(a)与(b)的摩尔比1:1。

## 细胞培养方法

### 发明领域

[0001] 本发明属于重组蛋白质,特别是抗体的制备的领域。更特别地,本发明涉及用于在商业规模制备期间产生具有降低的异质性的重组蛋白质的细胞培养方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 重组蛋白质例如治疗性蛋白质(例如治疗性抗体)的开发需要以工业规模产生重组蛋白质。为了取得这一点,可以采用不同的表达系统,原核和真核系统两者。但是,在过去的二十年中,已经通过哺乳动物细胞培养物制备了大多数被批准为治疗剂的治疗性蛋白质,并且此类系统仍然是用于产生大量的用于人使用的重组蛋白质的优选的表达系统。

[0004] 但是,哺乳动物培养物具有重大的挑战。所产生的重组蛋白质的滴度通常是非常低的,相比于其他真核产生系统,例如基于酵母和昆虫细胞的那些而言。在过去的30年中,已做出了许多努力来建立细胞培养和重组蛋白质表达的基本参数,其中研究的许多焦点致力于通过细胞培养基的组成(参见例如Hecklau C.等人,J Biotech 218(2016)53-63;Zang Li.等人,Anal.Chem 83(2011)5422-5430)和操作条件的变化以及开发大的生物反应器来达到最佳细胞生长。例如,L-半胱氨酸是通常添加在培养基和补料中的必需氨基酸之一。半胱氨酸衍生物,例如S-磺基半胱氨酸和N-乙酰基-半胱氨酸,已经用于改善细胞培养中的比生产率(Hecklau等人,同上;Oh等人,(2005)Biotechnol.Prog.21:1154)。

[0005] 虽然产量仍然是哺乳动物细胞培养的一个非常重要的方面,但是近年来,焦点已朝着在开发和生产规模的所有阶段控制产物品质和工艺一致性转移。由哺乳动物细胞培养物所产生的治疗性蛋白质展示出变化水平的异质性。这样的异质性包括但不限于,不同的糖基化模式、由于脱酰胺或氧化而产生的差异、不同的电荷或大小变体。重组蛋白质的异质性还可以导致产物颜色的差异,例如在不同批次的通过相同制备过程制备的相同蛋白质之间。当以高浓度配制治疗性蛋白质时,目的重组蛋白质的这样的异质性和特别是颜色的差异变得更明显。近年来,已经存在朝着皮下递送治疗性蛋白质(其需要以高浓度配制治疗性蛋白质)的稳定趋势。还已将高浓度与增加的聚集体水平相关联(Purdie J.等人,Biotechnology Progress,2016)。增加的电荷变体,例如增加的酸性种类水平可以影响蛋白质稳定性(Banks D.D.等人,Journal of pharmaceutical sciences,2009),然而经浓缩的治疗性蛋白质的颜色可以是更深的。

[0006] 细胞培养条件,例如培养基的组成(Kshirsagar R.等人,Biotechnology and Bioengineering,109:10,2523-2532(2012);US2013/0281355;WO 2013/158275),和生长条件,包括pH和温度(US8,765,413),已显示出影响治疗性蛋白质的品质属性。至今仍然存在需要以提供进一步的经改善的用于以最小异质性产生治疗性蛋白质,和特别是治疗性抗体的细胞培养方法。

### [0007] 发明概述

[0008] 本发明通过在用于在细胞培养物中产生重组蛋白质的培养基中添加半胱氨酸/胱氨酸类似物和/或用半胱氨酸/胱氨酸类似物部分地替代半胱氨酸/胱氨酸来解决上面指出的需要。

[0009] 因此,在第一个方面,本发明涉及用于降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体的异质性的方法,所述方法包括使产生重组蛋白质的宿主细胞在细胞培养基中生长,其中所述细胞培养基包含一种或多种半胱氨酸/胱氨酸类似物。

[0010] 在第二个方面,本发明涉及用于产生重组蛋白质制备物的方法,其包括:

[0011] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0012] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0013] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0014] (ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0015] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0016] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0017] 其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

[0018] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:18至18:1。

[0019] 在第三个方面,本发明涉及用于产生重组蛋白质制备物的方法,其包括:

[0020] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0021] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0022] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0023] (ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0024] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0025] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0026] 其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

[0027] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:18至18:1。

[0028] 在一个进一步的方面,本发明涉及通过根据本发明的方法可获得的或获得的重组蛋白质制备物。

[0029] 在一个更进一步的方面,本发明涉及适合于培养哺乳动物细胞的细胞培养基,其包含N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯。

[0030] 附图简述

[0031] 图1:活细胞浓度。

[0032] 图2:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时Mab滴度的相对%变化。

[0033] 图3:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时颜色强度(b\*值)水平的相对%变化。

[0034] 图4:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时酸性种类水平的相对%变化。

[0035] 图5:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时主要电荷种类水平的相

对%变化。

[0036] 图6:活细胞浓度。

[0037] 图7:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时Mab滴度的相对%变化。

[0038] 图8:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时酸性种类水平的相对%变化。

[0039] 图9:相比于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时主要电荷种类水平的相对%变化。

[0040] 图10:在2L生物反应器中关于细胞系1的细胞生长特性曲线(活细胞浓度)。

[0041] 图11:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相比于对照而言Mab滴度的相对%变化。

[0042] 图12:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相比于对照而言酸性种类水平的相对%变化。

[0043] 图13:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相比于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化。

[0044] 图14:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相对于对照而言颜色强度(b\*值)的相对%变化。

[0045] 图15:在2L生物反应器中关于细胞系2的细胞生长特性曲线(活细胞浓度)。

[0046] 图16:在2L生物反应器中,对于细胞系2,相比于对照而言Mab滴度的相对%变化。

[0047] 图17:在2L生物反应器中,对于细胞系2,相比于对照而言酸性种类水平的相对%变化。

[0048] 图18:在2L生物反应器中,对于细胞系2,相比于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化。

[0049] 图19:在2L生物反应器中来自数据组1和2的平均细胞生长特性曲线(误差条=1SD)。

[0050] 图20:相对于对照而言Mab滴度的相对%变化(误差条=1SD)。

[0051] 图21:相对于对照而言酸性种类水平的相对%变化。数据组1和2平均值(误差条=1SD)。

[0052] 图22:相对于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化。数据组1和2平均值(误差条=1SD)。

[0053] 图23:相对于对照而言颜色强度(b\*值)的相对%变化。数据组1和2平均值(误差条=1SD)。

[0054] 图24:在15mL生物反应器中关于细胞系1的细胞生长特性曲线。

[0055] 图25:响应于不同的半胱氨酸/胱氨酸类似物水平,相对于对照而言酸性种类水平的相对%变化。

[0056] 图26:响应于不同的半胱氨酸/胱氨酸类似物水平,相对于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化。

[0057] 发明详述

[0058] 如上面所描述的,在第一个方面,本发明涉及用于降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体的异质性的方法,所述方法包括使产生重组蛋白质的宿主细胞在细胞培养基中生长,其中所述细胞培养基包含一种或多种半胱氨酸/胱氨酸类似物。

[0059] 本发明的方法特别地降低重组蛋白质的着色。因此,在一个独立的方面,本发明涉及用于降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体的着色的方法,所述方法包括使产生重组蛋白质的宿主细胞在包含一种或多种半胱氨酸/胱氨酸类似物的细胞培养基中生长。

[0060] 在一个进一步的独立方面,本发明涉及用于产生重组蛋白质制备物的方法,其包括:

[0061] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0062] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0063] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0064] (ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0065] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0066] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0067] 其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

[0068] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:18至18:1。

[0069] 异质性

[0070] 本发明基于这样的发现:通过在用于制备重组蛋白质的过程中在产生期期间向细胞培养基添加半胱氨酸/胱氨酸类似物,在产生结束时降低所产生的重组多肽的异质性,而不降低重组多肽的滴度。

[0071] 所述异质性优选地在下列方面被降低:

[0072] a. 颜色或颜色强度,

[0073] b. 电荷异质性,优选地通过降低酸性峰群组种类(APG)和/或碱性峰群组种类(BPG),主要电荷种类并不由此下降;和/或

[0074] c. 氨基酸氧化,优选地甲硫氨酸氧化。

[0075] 在本文中所使用的术语“异质性”是指通过相同的制备过程或在相同的制备批次内所产生的分子群体中,在个体分子(例如,重组蛋白质)之间的差异。异质性可以产生自重重组多肽的不完全或不均一的修饰,例如由于多肽的翻译后修饰或者在转录或翻译期间的错误掺入。翻译后修饰可以例如是小分子的脱氨基反应和/或氧化反应和/或共价加成(例如糖化反应和/或异构化反应和/或片段化反应和/或其他反应)的结果,并且还包括糖化模式的变化。此类异质性的化学-物理表现导致在所得的重组多肽制备物中的各种特征,其包括但不限于电荷变体特性谱、颜色或颜色强度和分子量特性谱。

[0076] 当在本文中使用时,术语“有色的”或“颜色”表明,液体溶液例如经浓缩的蛋白质制备物不是无色的。按照欧洲药典的定义,如果溶液具有水R或溶剂的外观或者不比参考溶液B9着色更深,那么它是无色的(欧洲药典2.2.2)。可以根据本发明进行使用的一种可能的用于测量在细胞培养物中重组蛋白质的颜色或颜色强度的降低的方法为使用透射式分光光度计,例如使用UltrascanPro来测量CIE Standard Illuminant A颜色强度的相对光谱功率分布,并且将数据与CIE(commission internationale de l'éclairage;国际照明委员会)量表进行比较,例如通过比较b\*值。

[0077] 电荷异质性的降低优选地通过测量在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体中的酸性峰群组 (APG) 种类来定义。一种可能的用于测量APG降低的方法为通过成像毛细管电泳 (例如, ProteinSimple iCE3) 来测定在具有或没有半胱氨酸/胱氨酸类似物的细胞培养基中所产生的重组蛋白质的酸性 (APG表示Acidic Peak Group (酸性峰群组)) 同工型的相对百分比, 所述重组蛋白质在测量之时优选地是经纯化的。当测量重组蛋白质的同工型时, 除了APG外, 还测量碱性同工型 (Basic Peak Group (碱性峰群组) (BPG)) 和主要电荷种类, 其中所述主要电荷种类表示人们希望获得的重组蛋白质的同工型。优选的是, 当APG下降时, 基本上不存在BPG的增加。优选地, 当APG下降时, 主要电荷种类水平增加。

[0078] 如所描述的, 本发明涉及制备重组蛋白质, 其中降低所产生的重组多肽的异质性, 而不降低重组多肽的产量。优选地, 重组多肽的滴度得到增加。根据本发明, “滴度” 是在产生期结束时重组多肽的浓度, 除非不同地指出。

[0079] 半胱氨酸/胱氨酸类似物

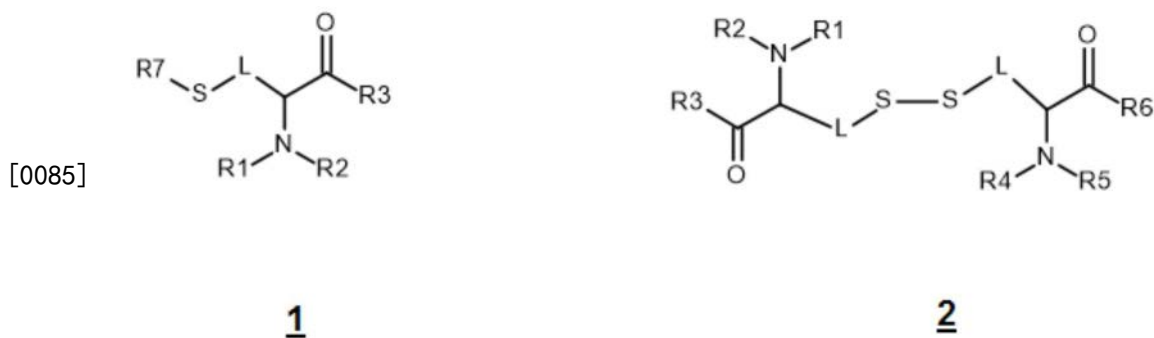
[0080] 当在本文中使用时, 术语“半胱氨酸类似物”或“半胱氨酸衍生物”意指一种或多种化合物, 其是半胱氨酸的结构类似物, 除了半胱氨酸自身之外。

[0081] 当在本文中使用时, 术语“胱氨酸类似物”或“胱氨酸衍生物”意指一种或多种化合物, 其是胱氨酸的结构类似物, 除了胱氨酸自身之外。

[0082] 术语“半胱氨酸/胱氨酸类似物”意指“半胱氨酸类似物”或“胱氨酸类似物”或者“半胱氨酸类似物”和“胱氨酸类似物”的混合物。

[0083] 术语“半胱氨酸/胱氨酸衍生物”意指“半胱氨酸衍生物”或“胱氨酸衍生物”或者“半胱氨酸衍生物”和“胱氨酸衍生物”的混合物。

[0084] 在根据本发明的一个实施方案中, 所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包含一种或多种选自下列各项的化合物或者由一种或多种选自下列各项的化合物组成: 由式1和2所表示的化合物, 及其盐:



[0086] 其中,

[0087] R1、R2、R4和R5独立地表示氢; 氨基羰基; C<sub>2-22</sub>酰基; C<sub>1-22</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>1-22</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>1-22</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基;

[0088] R3和R6独立地表示羟基; NH<sub>2</sub>; C<sub>1-22</sub>烷氧基, 其中C<sub>1-22</sub>烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; C<sub>1-22</sub>烷基氨基, 该基团任选地被羟基或C<sub>1-22</sub>烷基取代; 羟基氨基; C<sub>1-22</sub>烷氧基氨基; C<sub>1-22</sub>烷基氨基, 其中C<sub>1-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; C<sub>1-22</sub>杂烷基氨基; 二 (C<sub>1-22</sub>烷基) 氨基, 其任选地被羟基取代; 二 (C<sub>1-22</sub>烷基) 氨基, 其中C<sub>1-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; 或二 (C<sub>1-22</sub>杂烷基) 氨基;

[0089] R7表示氢、磷酸根或硫酸根；

[0090] L表示任选地经取代的C<sub>1-10</sub>亚烷基链；并且

[0091] 条件是,所述化合物不是半胱氨酸或胱氨酸。

[0092] 在本文中所使用的术语“C<sub>1-22</sub>烷基”是指脂族烃基团,其可以是直链或支化的并且可以在链中包含1至22个碳原子。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>1-22</sub>烷基基团包括C<sub>6-22</sub>烷基基团、C<sub>12-22</sub>烷基基团、C<sub>1-16</sub>烷基基团、C<sub>1-10</sub>烷基基团和C<sub>1-6</sub>烷基基团。C<sub>12-22</sub>烷基基团的例子包括棕榈基和硬脂基。

[0093] 在本文中所使用的术语“C<sub>5-22</sub>芳基”是指具有5至22个碳原子的不饱和芳族碳环基团,其具有单个环或多个稠环。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>5-22</sub>芳基基团包括C<sub>5-14</sub>芳基基团,合适地包括C<sub>5-10</sub>芳基基团。C<sub>5-22</sub>芳基基团的例子为苯基和萘基。

[0094] 在本文中所使用的术语“C<sub>5-22</sub>杂芳基”表示具有5至22个碳原子的芳族碳环基团,其具有单个环或多个稠环,其中所述碳原子中的一个或多个已被一个或多个选自氧、硫和氮的杂原子替代。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>5-22</sub>杂芳基基团包括C<sub>5-14</sub>杂芳基基团,合适地包括C<sub>5-10</sub>杂芳基基团。

[0095] 在本文中所使用的术语“C<sub>2-22</sub>酰基”是指由式-(C=O)R所表示的基团,其中R表示在本文中上面所定义的C<sub>1-22</sub>烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>2-22</sub>酰基基团包括C<sub>2-6</sub>酰基基团、C<sub>6-22</sub>酰基基团和C<sub>12-22</sub>酰基基团。这样的C<sub>2-6</sub>酰基的例子为甲基羰基、乙基羰基和丁基羰基。C<sub>12-22</sub>酰基基团的例子包括棕榈基羰基和硬脂基羰基。

[0096] 在本文中所使用的术语“C<sub>1-22</sub>烷氧基”是指由式-O-R所表示的基团,其中R表示在本文中上面所定义的C<sub>1-22</sub>烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>1-22</sub>烷氧基基团包括C<sub>1-6</sub>烷氧基基团、C<sub>6-22</sub>烷氧基基团和C<sub>12-22</sub>烷氧基基团。C<sub>1-6</sub>烷氧基基团的例子为甲氧基和乙氧基。C<sub>12-22</sub>烷氧基基团的例子包括棕榈基氧基和硬脂基氧基。

[0097] 在本文中所使用的术语“C<sub>1-22</sub>杂烷基”是指上面所定义的C<sub>1-22</sub>烷基,其中一个或多个碳原子被一个或多个氧或氮原子替代。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>1-22</sub>杂烷基基团包括C<sub>1-6</sub>杂烷基基团、C<sub>6-22</sub>杂烷基基团和C<sub>12-22</sub>杂烷基基团。C<sub>1-22</sub>杂烷基的例子包括乙二醇的寡聚物。

[0098] 在本文中所使用的术语“羟基磺酰基”是指由式-S(=O)<sub>2</sub>-OH所表示的基团。

[0099] 在本文中所使用的术语“C<sub>1-22</sub>烷基磺酰基”是指由式-S(=O)<sub>2</sub>-R所表示的基团,其中R表示在本文中上面所定义的C<sub>1-22</sub>烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>1-22</sub>烷基磺酰基基团包括C<sub>1-6</sub>烷基磺酰基基团和C<sub>6-22</sub>烷基磺酰基基团、C<sub>12-22</sub>烷基磺酰基基团。C<sub>1-22</sub>烷基磺酰基的例子包括甲基磺酰基、乙基磺酰基和叔丁基磺酰基。

[0100] 在本文中所使用的术语“C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基”是指由式-S(=O)<sub>2</sub>-R'所表示的基团,其中R'表示在本文中上面所定义的C<sub>5-22</sub>芳基基团。C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基的例子包括苯基磺酰基和甲苯基磺酰基。

[0101] 在本文中所使用的术语“C<sub>1-22</sub>烷基氨基”是指由式-NH-R所表示的基团,其中R表示在本文中上面所定义的C<sub>1-22</sub>烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的C<sub>1-22</sub>烷基氨基基团包括C<sub>1-6</sub>烷基氨基基团、C<sub>6-22</sub>烷基氨基基团和C<sub>12-22</sub>烷基氨基基团。C<sub>1-22</sub>烷基氨基的例子包括甲基氨基、乙基氨基和丁基氨基。

[0102] 在本文中所使用的术语“C<sub>1-22</sub>烷氧基氨基”是指由式-NH-OR所表示的基团,其中R

表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的 $C_{1-22}$ 烷氧基氨基基团包括 $C_{1-6}$ 烷氧基氨基基团、 $C_{6-22}$ 烷氧基氨基基团和 $C_{12-22}$ 烷氧基氨基基团。 $C_{1-22}$ 烷基氨基的例子包括甲基氨基、乙基氨基和丁基氨基。

[0103] 在本文中所使用的术语“二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基”是指由式-NRR'所表示的基团,其中R和R'独立地表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基基团包括二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基和二( $C_{12-22}$ 烷基)氨基。二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基的例子包括二甲基氨基、(甲基)(乙基)氨基、二乙基氨基、丙基氨基和丁基氨基。

[0104] 在本文中所使用的术语“ $C_{1-22}$ 杂烷基氨基”是指由式-NH-R所表示的基团,其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 杂烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的 $C_{1-22}$ 杂烷基氨基基团包括 $C_{1-6}$ 杂烷基氨基、 $C_{6-22}$ 杂烷基氨基和 $C_{12-22}$ 杂烷基氨基。

[0105] 在本文中所使用的术语“二( $C_{1-22}$ 杂烷基)氨基”是指由式-NRR'所表示的基团,其中R和R'独立地表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 杂烷基基团。通常,可以存在于在本发明中有用的化合物上的二( $C_{1-22}$ 杂烷基)氨基基团包括二( $C_{1-6}$ 杂烷基)氨基、二( $C_{6-22}$ 杂烷基)氨基和二( $C_{12-22}$ 杂烷基)氨基。

[0106] 术语“ $C_{1-10}$ 亚烷基链”是指包含1至10个碳原子的二价的直链或支化的亚烷基链。“ $C_{1-10}$ 亚烷基链”的典型例子包括亚甲基、亚乙基、亚丙基和亚丁基。

[0107] 在本文中所使用的术语“氨基羰基”是指由式-CO-N( $R_a R_b$ )所表示的基团,其中-CO的碳与半胱氨酸/胱氨酸类似物的氮相结合并且其中 $R_a$ 和 $R_b$ 相互独立地表示上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基。

[0108] 在根据本发明的一个实施方案中,所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自由式1所表示的半胱氨酸类似物,其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7和L如在本文中上面所定义。在该实施方案的一个特别的方面,R7表示氢。

[0109] 在根据本发明的另一个实施方案中,所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自由式2所表示的胱氨酸类似物,其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7和L如在本文中上面所定义。

[0110] 通常,R1、R2、R4和R5独立地表示氢; $C_{2-22}$ 酰基; $C_{1-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代;或 $C_{1-22}$ 杂烷基。

[0111] 通常,R3和R6独立地表示羟基; $NH_2$ ; $C_{1-22}$ 烷氧基,其中 $C_{1-22}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{1-22}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基取代;或二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代。

[0112] 通常,R7表示氢。

[0113] 通常,L表示 $C_{1-4}$ 亚烷基链,其任选地被一个或多个 $C_{1-6}$ 烷基,优选地两个甲基基团取代。

[0114] 合适地,R1表示氢或 $C_{2-22}$ 酰基。典型地,R1表示氢或 $C_{2-6}$ 酰基。作为举例说明,R1表示氢或乙酰基。在一个特别的实施方案中,R1表示氢。

[0115] 合适地,R2表示氢或 $C_{2-22}$ 酰基。典型地,R2表示氢或 $C_{2-6}$ 酰基。作为举例说明,R2表示氢或乙酰基。

[0116] 合适地,R3表示羟基或 $C_{1-22}$ 烷氧基。典型地,R3表示羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基。作为举例说明,R3表示羟基或甲氧基。

[0117] 合适地, R4表示氢或C<sub>2-22</sub>酰基。典型地, R4表示氢或C<sub>2-6</sub>酰基。作为举例说明, R4表示氢或乙酰基。在一个特别的实施方案中, R4表示氢。

[0118] 合适地, R5表示氢或C<sub>2-22</sub>酰基。典型地, R5表示氢或C<sub>2-6</sub>酰基。作为举例说明, R5表示乙酰基。

[0119] 合适地, R6表示羟基或C<sub>1-22</sub>烷氧基。典型地, R6表示羟基或C<sub>1-6</sub>烷氧基。作为举例说明, R6表示羟基或甲氧基。

[0120] 合适地, L表示亚甲基或亚乙基。作为举例说明, L表示亚甲基。

[0121] 在一个实施方案中, 所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包括一种或多种选自下列各项的化合物: 由式1所表示的化合物, 及其盐, 其中L、R1、R2、R3和R7如上面所定义,

[0122] 条件是

[0123] (i) 如果R1或R2基团之一表示C<sub>6-22</sub>酰基; C<sub>6-22</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>6-22</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>6-22</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基,

[0124] 那么余下的R1或R2基团独立地表示氢; 氨基羰基; C<sub>2-6</sub>酰基; C<sub>1-6</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-6</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>1-6</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>1-6</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-10</sub>芳基磺酰基; 和

[0125] R3表示羟基; NH<sub>2</sub>; C<sub>1-6</sub>烷氧基, 其中C<sub>1-6</sub>烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; C<sub>1-6</sub>烷基氨基, 该基团任选地被羟基或C<sub>1-6</sub>烷基取代; 羟基氨基; C<sub>1-6</sub>烷氧基氨基; C<sub>1-6</sub>烷基氨基, 其中C<sub>1-6</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; C<sub>1-6</sub>杂烷基氨基; 二(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基, 其任选地被羟基取代; 二(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基, 其中C<sub>1-6</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; 或二(C<sub>1-6</sub>杂烷基)氨基; 和

[0126] (ii) 如果R3表示C<sub>6-22</sub>烷氧基, 其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; C<sub>6-22</sub>烷基氨基, 该基团任选地被羟基或C<sub>1-22</sub>烷基取代; 羟基氨基; C<sub>6-22</sub>烷氧基氨基; C<sub>6-22</sub>烷基氨基, 其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; C<sub>6-22</sub>杂烷基氨基; 二(C<sub>6-22</sub>烷基)氨基, 其任选地被羟基取代; 二(C<sub>6-22</sub>烷基)氨基, 其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; 或二(C<sub>6-22</sub>杂烷基)氨基,

[0127] 那么R1和R2独立地表示氢; 氨基羰基; C<sub>2-6</sub>酰基; C<sub>1-6</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-6</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>1-6</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>1-6</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-10</sub>芳基磺酰基。

[0128] 在一个实施方案中, 所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包含下列各项或者由下列各项组成: 由式2所表示的化合物, 及其盐, 其中L、R1、R2、R3、R4、R5、R6和R7如上面所定义, 条件是:

[0129] (i) 如果R1和R2基团之一表示C<sub>6-22</sub>酰基; C<sub>6-22</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>6-22</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>6-22</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基; 和

[0130] 如果R4和R5基团之一表示C<sub>6-22</sub>酰基; C<sub>6-22</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>6-22</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>6-22</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基,

[0131] 那么余下的R1、R2、R4或R5基团独立地表示氢; 氨基羰基; C<sub>2-6</sub>酰基; C<sub>1-6</sub>烷基, 该基

团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-6}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{1-6}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{1-6}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-10}$ 芳基磺酰基;和

[0132] R3和R6独立地表示羟基; $NH_2$ ; $C_{1-6}$ 烷氧基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{1-6}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-6}$ 烷基取代;羟基氨基; $C_{1-6}$ 烷氧基氨基; $C_{1-6}$ 烷基氨基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{1-6}$ 杂烷基氨基;二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{1-6}$ 杂烷基)氨基;

[0133] (ii) 如果仅R1、R2、R4和R5基团之一独立地表示 $C_{6-22}$ 酰基; $C_{6-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{6-22}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{6-22}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基,

[0134] 那么R3和R6之一可以表示 $C_{6-22}$ 烷氧基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-22}$ 烷基取代; $C_{6-22}$ 烷氧基氨基; $C_{6-22}$ 烷基氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 杂烷基氨基;二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{6-22}$ 杂烷基)氨基;

[0135] (iii) 如果R1、R2、R4和R5基团中没有一个表示 $C_{6-22}$ 酰基; $C_{6-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{6-22}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{6-22}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基,

[0136] 那么R3和R6都可以独立地表示 $C_{6-22}$ 烷氧基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-22}$ 烷基取代; $C_{6-22}$ 烷氧基氨基; $C_{6-22}$ 烷基氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 杂烷基氨基;二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{6-22}$ 杂烷基)氨基。

[0137] 本发明在其范围内也包括式1和2的半胱氨酸/胱氨酸类似物的盐。

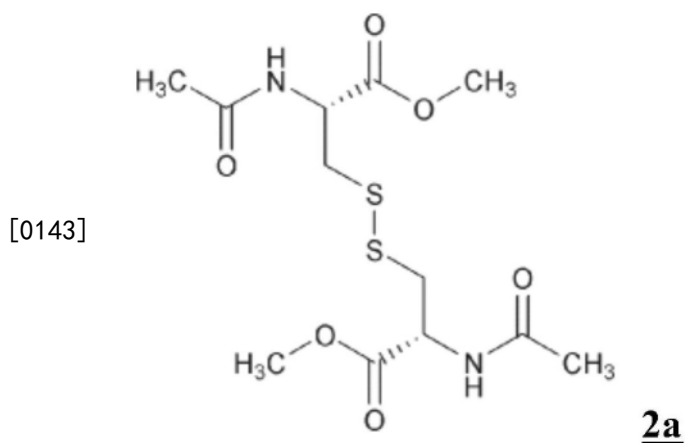
[0138] 根据本发明的盐可以通过在所述半胱氨酸/胱氨酸类似物上存在的羟基基团的反应来形成。此类盐包括碱金属盐,例如钠盐、钾盐或锂盐;碱土金属盐,例如镁盐或钙盐;铵盐,例如四烷基或芳基铵盐;铈盐,例如三烷基或芳基铈;和磷盐,例如四烷基或芳基磷盐。

[0139] 备选地,此类盐可以通过在所述半胱氨酸/胱氨酸类似物上存在的氨基基团的反应来形成。此类盐典型地产生自氨基基团与无机酸或有机酸的反应,并且包括单或二盐酸盐、 $H_2SO_4$ 盐、 $H_3PO_4$ 盐、乙酸盐和富马酸盐。

[0140] 合适地,在本文中上面所定义的半胱氨酸/胱氨酸类似物具有与L-半胱氨酸相同的手性。

[0141] 在本发明的一个特别的实施方案中,所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯、N-乙酰基-L-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸。

[0142] 在该实施方案的一个特别的方面,所述半胱氨酸/胱氨酸类似物由式2a所表示的N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯( $(Ac-Cys-OMe)_2$ )组成。



[0144] 根据本发明的半胱氨酸/胱氨酸类似物可以是商购可得的,或者可以通过本领域技术人员已知的方法从L-半胱氨酸或L-胱氨酸合成。

[0145] 细胞培养物

[0146] 正如将会从在下文中对本发明的描述中清晰明了的,在本发明的方法的大多数实施方案中,给所述细胞培养基补充以半胱氨酸和/或胱氨酸,即这样的补充可以用下列来进行:

[0147] • 半胱氨酸;或

[0148] • 胱氨酸;或

[0149] • 半胱氨酸和胱氨酸。

[0150] 在所述细胞培养基中的半胱氨酸和胱氨酸处于持续的平衡中,其中两个分子的半胱氨酸氧化为一个分子的胱氨酸并且还原回两个分子的半胱氨酸。

[0151] 术语“细胞培养物”或其语法变化形式包括但不限于,多个在细胞培养基中维持或生长经过特定的时间段(例如产生期)的宿主细胞,优选地哺乳动物宿主细胞,其合适地经改造和/或操作以表达(即,产生)一种或多种重组多肽。

[0152] 根据本发明的术语“产生期”包括在用于制备重组蛋白质的过程期间细胞培养的阶段,其间细胞表达(即,产生)重组多肽。产生期开始于所希望的产物的滴度增加时,并且结束于收获细胞或者细胞培养物流体或上清液。典型地,在产生期开始时,将细胞培养物转移至产生容器,例如生物反应器。收获是这样的步骤,在其期间将细胞培养物流体从例如产生容器中移出,以便回收重组蛋白质,例如重组抗体,并在随后的步骤中进行纯化。

[0153] 优选的宿主细胞为哺乳动物宿主细胞,最优选地中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。可以将哺乳动物细胞,特别地CHO细胞,在任何将会支持其生长和重组多肽表达的培养基中进行培养,优选地所述培养基为没有动物来源的产品例如动物血清和蛋白胨的培养基。存在不同的细胞培养基可供本领域专业人员使用,每种培养基包含维生素、氨基酸、激素、生长因子、离子、缓冲液、核苷、葡萄糖或等价能源的不同组合,其以使得细胞生长和蛋白质产生成为可能的合适浓度存在。合适的培养基已经例如描述在W098/08934和US2006/0148074(两者都以其整体而合并入本文)中。可以在本发明中使用或者可以进行改良以满足半胱氨酸/胱氨酸类似物和/或半胱氨酸和/或胱氨酸要求的进一步的合适的商购可得的培养基包括但不限于AmpliCHO CD培养基、Dynamis™培养基、**EX-CELL®** Advanced™ CHO补料分批系

统、CD FortiCHO™培养基、CP OptiCHO™培养基。极限必需培养基 (MEM)、**BalanCD®** CHO Growth A培养基、ActiPro™培养基、DMEM-Dulbecco改良的Eagle培养基和RPMI-1640培养基。

[0154] 在本发明的方法的一个优选的实施方案中,所述细胞培养基包含:

[0155] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

[0156] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0157] 其中 (a) 与 (b) 的摩尔比为1:18至18:1。

[0158] 优选地,所述 (a) 与 (b) 的摩尔比为1:15至15:1,例如1:12至12:1,例如1:10至10:1,例如1:8至8:1,例如1:6至6:1,例如1:4至4:1,例如1:3至3:1,例如1:2至2:1,例如1.5:1至1:1.5,例如1:1的摩尔比。

[0159] 如果提及上面优选的实施方案,需要注意的是,技术人员知道 (a) 与 (b) 的比率取决于是否将二聚体形式或单体形式当做参考点。由于在细胞培养基中的半胱氨酸和胱氨酸处于持续的平衡中,因而相对于半胱氨酸当量来考虑所述比率,其中假定所有胱氨酸都处于其还原形式。下面的表格作为例子给出了取决于是否考虑半胱氨酸类似物或胱氨酸类似物,所述比率怎样不同。

| [0160] | 半胱氨酸类似物 : 半胱氨酸<br>的摩尔比 | 胱氨酸类似物 : 半胱氨酸<br>的摩尔比 |
|--------|------------------------|-----------------------|
|        | 18 : 1                 | 9 : 1                 |
|        | 12 : 1                 | 6 : 1                 |
|        | 1 : 1                  | 1 : 2                 |
|        | 1 : 2                  | 1 : 1                 |
|        | 1 : 6                  | 1 : 3                 |
|        | 1 : 12                 | 1 : 6                 |
|        | 1 : 18                 | 1 : 9                 |

[0161] 在另一个优选的实施方案中,所述方法包括下列步骤:

[0162] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0163] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0164] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0165] (ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0166] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0167] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0168] 其中 (a) 和 (b) 可以同时地或顺次地添加,

[0169] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时, (a) 与 (b) 的摩尔比为1:18至18:1。

[0170] 优选地,在上面提及的实施方案中,所述 (a) 与 (b) 的摩尔比为1:15至15:1,例如1:

12至12:1,例如1:10至10:1,例如1:8至8:1,例如1:6至6:1,例如1:4至4:1,例如1:3至3:1,例如1:2至2:1,例如1.5:1至1:1.5,例如1:1的摩尔比。

[0171] 如果提及上面优选的实施方案,需要注意的是,技术人员知道(a)与(b)的比率取决于是否将二聚体形式或单体形式当做参考点。由于在细胞培养基中的半胱氨酸和胱氨酸处于持续的平衡中,因而相对于半胱氨酸当量来考虑所述比率,其中假定所有胱氨酸都处于其还原形式。

[0172] 在根据本发明的方法的一个优选的实施方案中,所述细胞培养基包含:

[0173] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

[0174] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0175] 其中,(a)的摩尔量为依据(a)和(b)的总摩尔量而言的10%至90%,其中在使用半胱氨酸类似物的情况下,依据半胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量;和其中在使用胱氨酸类似物的情况下,依据胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量。

[0176] 在上面的实施方案中,依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量优选地为20%至90%;例如30%至90%,例如40%至90%或者例如50%至90%,例如20%至80%;例如30%至80%,例如40%至80%或者例如50%至80%,例如20%至70%,30%至70%,例如40%至70%或者例如50%至70%。

[0177] 特别优选的是,其中所述胱氨酸类似物为N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯或N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,其中依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为20%至90%,更优选地30%至90%,例如20%至70%,例如30%至70%,或者其中所述半胱氨酸类似物为N-乙酰基-L-半胱氨酸,其中关于依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为50%至90%,优选地50%至80%,更优选地50%至70%。

[0178] 在另一个实施方案中,所述方法包括下列步骤:

[0179] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0180] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0181] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0182] (ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0183] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0184] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0185] 其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

[0186] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为10%至90%,其中在使用半胱氨酸类似物的情况下,依据半胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量;和其中在使用胱氨酸类似物的情况下,依据胱氨酸当量来计算(b)的摩尔量。

[0187] 在上面的实施方案中,依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量优选地为20%至90%;例如30%至90%,例如40%至90%或者例如50%至90%,例如20%至80%;30%至80%,例如40%至80%或者例如50%至80%,例如20%至70%,30%至70%,例如40%至70%或者例如50%至70%。

[0188] 特别优选的是,其中所述胱氨酸类似物为N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯或N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,其中依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为20%至90%,更优选地30%至90%,例如20%至70%,例如30%至70%,或者其中所述半胱氨酸类似物为N-乙酰基-L-半胱氨酸,其中关于依据(a)和(b)的总摩尔量而言的(a)的摩尔量为50%至90%,优选地50%至80%,更优选地50%至70%。

[0189] 在一个实施方案中,在所述基础培养基中(b)的浓度等价于0.05至5mmol/L的半胱氨酸,例如0.1至1mmol/L,例如0.2至0.6mmol/L。

[0190] 在本文中的“等价于X摩尔的半胱氨酸”表明,如果使用二聚体形式,例如胱氨酸或胱氨酸类似物,那么为了计算待使用或添加的量的目的,应当对它们加倍计数。例如,1mmol/L的胱氨酸等价于2mmol/L的半胱氨酸。

[0191] 在另一个实施方案中,在所述产生期期间,给所述培养基补充以(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,其中在整个产生期内添加至培养物的(a)和(b)之和等价于1至75mmol/L的半胱氨酸,例如1至50mmol/L,例如1至20mmol/L,例如2至20mmol/L,例如4至10mmol/L。

[0192] 在另一个实施方案中,在所述产生期期间,给所述培养基每日补充以(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,其中每日添加将(a)+(b)的浓度带至等价于0.05至5mmol/L的半胱氨酸,例如0.1至1mmol/L的浓度。

[0193] 所述产生期优选地以补料分批的方式进行操作,但是可以使用任何其他方式例如分批、灌注或恒化器方式作为备选方案。

[0194] 细胞培养可以在任何合适的容器例如摇瓶或生物反应器中进行,其可以或可以不以补料分批方式进行操作,取决于所需要的生产规模。这些生物反应器可以是搅拌釜反应器或气升式反应器。优选地,所述产生期在生物反应器中进行,所述生物反应器优选地具有等于或大于50L,等于或大于100L,等于或大于500L,等于或大于1000L,等于或大于2000L,等于或大于5000L,等于或大于10,000L,或者等于或大于20,000L的容积。

[0195] 优选地,所述重组蛋白质在产生期期间产生,其中所述产生期优选地具有至少7天,更优选地至少14天的持续时间。

[0196] 在优选的实施方案中,在产生期中给培养物每日进行补充。

[0197] 在本发明的方法的一个实施方案中,给所述培养基补充以:

[0198] • 半胱氨酸或胱氨酸,直至预期的所产生的重组蛋白质的总量的10wt%至30wt%的总量;和/或

[0199] • 色氨酸,直至预期的所产生的重组蛋白质的总量的8wt%至35wt%的总量。

[0200] 在本文中可以将所添加的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量表示为所产生的重组多肽的总量的百分比。在本文中所使用的术语“wt%”是指重量百分比。“总(的)”是指在产生期结束时所测定的总量,即在产生期的过程中所添加的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量和在产生期的过程中所产生的重组蛋白质的总量,其中所产生的重组蛋白质的总量在产生期结束时进行测量。

[0201] 所添加的半胱氨酸或胱氨酸或色氨酸的总量根据补料率(或补料体积)和在那种补料中的半胱氨酸或胱氨酸或色氨酸的浓度以及在其中添加了补料的培养基中的半胱氨酸或胱氨酸或色氨酸的浓度(每单位体积的所添加的补料)来进行计算。所产生的重组多肽

的量根据细胞培养基的最终体积和最终的重组多肽滴度来进行计算。这两个所计算的参数的比率为“所添加的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量/所产生的重组多肽的量”。

[0202] 所述宿主细胞可以最初(在步骤a.中)在可以已经或可以不包括半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸的细胞培养基中生长。如果所述细胞培养基已经包括初始量的半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸,那么所述总量将会包括该初始量。

[0203] 在本发明的过程的一个实施方案中,给所述细胞培养基补充以半胱氨酸或胱氨酸,直至预期的所产生的重组多肽的总量的12.06wt%至28.03wt%的总量,例如预期的所产生的重组多肽的总量的12wt%至28wt%,例如12wt%至25wt%,例如12wt%至20wt%的总量。

[0204] 在本发明的过程的另一个实施方案中,给所述细胞培养基补充以色氨酸,直至预期的所产生的重组多肽的总量的8.84wt%至32.06wt%的总量,例如预期的所产生的重组多肽的总量的8wt%至30wt%,例如8wt%至25wt%,例如8wt%至20wt%的总量。

[0205] 在本发明的方法的另一个实施方案中,

[0206] • 在细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.9g/L,优选地其中在细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.3g/L,和/或

[0207] • 在细胞培养物中的色氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.6g/L,优选地其中在细胞培养物中的色氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.3g/L。

[0208] 在本发明的方法的一个进一步的实施方案中,

[0209] • 在所述过程期间所提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/( $10^{12}$ 个细胞),例如2.9至7g/( $10^{12}$ 个细胞),例如5.6至7g/( $10^{12}$ 个细胞),其中细胞是指预期的在产生期结束时的完整活细胞计数,和/或

[0210] • 在所述过程期间所提供的色氨酸的总量为2.5至7g/( $10^{12}$ 个细胞),例如2.5至3.5g/( $10^{12}$ 个细胞/L),其中细胞是指预期的在产生期结束时的完整活细胞计数。

[0211] 应当理解的是,专业人员将会知道如何测量在特定时期(例如产生期)时添加至和/或存在于细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量。类似地,专业人员将会知道如何测量由细胞培养物所产生的重组多肽的总量并且因此应用本发明的教导以取得所希望的技术效果。

[0212] 为了设计其中“半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量/所产生的重组多肽的总量”保持在某些范围之内的过程,可能需要进行一次或多次初始实验以确定在特定培养条件下由特定宿主细胞所产生的重组多肽的大致水平。一旦知道了所产生的重组多肽的大致总水平,就可以设计根据本发明的过程,其中“半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量/所产生的重组多肽的总量”保持在指定范围之内。

[0213] 可以采用各种策略来达到在产生期期间在细胞培养基中的半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸的总量。在一个实施方案中,可以通过正好在产生期开始时添加(例如仅一次)半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸或者已经包括在生产细胞培养基中来达到所述总量。在另一个实施方案中,可以通过在产生期期间的添加(例如,每日添加或连续添加)的总计来达到所述总量。在另外一个实施方案中,可以通

过在产生期开始时在细胞培养液中的初始半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸浓度的组合以及经由添加来达到所述总量。

[0214] 因此,在本发明的过程的一个实施方案中,通过向细胞培养基添加半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸来达到在细胞培养基中的半胱氨酸/胱氨酸类似物、半胱氨酸、胱氨酸和/或色氨酸的总量:

[0215] a.在产生期开始时,

[0216] b.一次或多次,在产生期期间的任何时间点,

[0217] c.通过在产生期期间连续添加,或

[0218] d.以a、b和c的任何组合。

[0219] 在一个进一步的独立方面,本发明涉及适合于培养哺乳动物细胞的细胞培养基,其包含N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯。

[0220] 重组多肽

[0221] 本发明的过程可以用于产生任何类型的重组蛋白质或多肽,包括例如肽或更大的多肽(其具有显著的三级结构),以及例如糖蛋白和多聚体蛋白质。

[0222] 在一些实施方案中,所产生的重组蛋白质为这样的蛋白质,其当在标准条件下产生时,将会导致在高浓度下的有色的制备物。此类着色可以通过使用本发明的方法来降低或避免。因此,在本发明的方法的一个优选的实施方案中,所述重组蛋白质为在10mg/ml或更高,例如50mg/ml或更高的浓度下不是无色的蛋白质(当由在不包含半胱氨酸/胱氨酸类似物的细胞培养基中生长的宿主细胞产生时),其中例如如在本文中的实施例中所描述的那样来测定颜色。待皮下施用给患者的蛋白质制备物,例如抗体,经常具有更加高的蛋白质浓度,例如100mg/ml或更高,或甚至高于150mg/ml。在这样的浓度下,不希望的着色常常成为问题。因此,在另一个优选的实施方案中,所述重组蛋白质为这样的蛋白质,其当由在不包含半胱氨酸/胱氨酸类似物的细胞培养基中生长的宿主细胞产生时,在100mg/ml或更高,例如150mg/ml或更高的浓度下不是无色的。

[0223] 在一个优选的实施方案中,在根据本发明的过程中产生的重组蛋白质为抗体或其抗原结合片段。

[0224] 在本文中所使用的术语“抗体”包括例如单克隆和多克隆抗体,以及单特异性和多特异性(例如双特异性)抗体。“抗体”包括任何物种(特别是哺乳动物物种)的抗体,其典型地具有两条重链和两条轻链;任何同种型的人抗体,包括IgA<sub>1</sub>、IgA<sub>2</sub>、IgD、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgE和IgM以及其经修饰的变体;非人灵长类抗体,其例如来自黑猩猩、狒狒、恒河猴或食蟹猴;啮齿类抗体,其例如来自小鼠、大鼠或兔子;山羊或马抗体,及其衍生物;或者鸟类物种的抗体,例如鸡抗体;或者鱼类物种的抗体,例如鲨鱼抗体。术语“抗体”还是指“嵌合”抗体,其中至少一个重链和/或轻链抗体序列的第一部分来自第一物种并且所述重链和/或轻链抗体序列的第二部分来自第二物种。在本文中的目的嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其包含源自非人灵长类(例如,旧世界猴,例如狒狒、恒河猴或食蟹猴)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。“人源化”抗体为包含源自非人抗体的序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体为人抗体(受者抗体),其中来自受者的高变区的残基被来自具有所希望的特异性、亲和力和活性的非人物种(供者抗体)例如小鼠、大鼠、兔子、鸡或非人灵长类的高变区或互补性决定区(CDR)的残基所替代。在大多数情况下,在CDR之外的即在

构架区 (FR) 中的人 (受者) 抗体的残基另外还被相应的非人残基所替代。进一步地, 人源化抗体可以包含在受者抗体中或在供者抗体中不存在的残基。进行这些修饰以进一步精炼抗体性能。人源化降低了非人抗体在人的免疫原性, 因而有助于应用抗体以治疗人类疾病。人源化抗体和几种不同的用于产生它们的技术是本领域中熟知的。术语“抗体”还是指人抗体, 其可以作为对于人源化的备选方案而产生。例如, 可能的是产生转基因动物 (例如, 小鼠), 其能够在免疫接种后产生全套的人抗体, 而不产生内源的鼠类抗体。例如, 已经描述了在嵌合和种系突变型小鼠中抗体重链连接区 (JH) 基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这样的种系突变型小鼠中将会导致产生具有针对特定抗原的特异性的人抗体, 在用所述抗原免疫接种携带人种系免疫球蛋白基因的转基因动物后。用于产生此类转基因动物的技术以及用于从这样的转基因动物分离和产生人抗体的技术是本领域中已知的。备选地, 在转基因动物例如小鼠中, 仅编码小鼠抗体的可变区的免疫球蛋白基因用相应的人可变免疫球蛋白基因序列替代。编码抗体恒定区的小鼠种系免疫球蛋白基因保持不变。以这种方式, 抗体效应子在转基因小鼠的免疫系统中起作用, 并因此B细胞发育基本不变, 其可以导致在体内在抗原攻击时经改善的抗体应答。一旦已从此类转基因动物中分离出编码特定目的抗体的基因, 就可以用人恒定区基因替代编码恒定区的基因以便获得完全人的抗体。在本文中所使用的术语“抗体”还是指无糖基化的抗体。

[0225] 在本文中所使用的术语“其抗原结合片段”或其语法变化形式是指抗体片段。抗体的片段包含至少一个重链或轻链免疫球蛋白结构域 (如本领域中已知的) 并且与一种或多种抗原相结合。根据本发明的抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv和scFv片段; 以及双链抗体, 三链抗体, 四链抗体, 微型抗体, 结构域抗体 (dAb), 例如sdAb、VHH或骆驼科动物抗体 (例如, 其来自骆驼或美洲驼, 例如Nanobodies™) 和VNAR片段, 单链抗体, 从抗体片段或抗体形成的双特异性、三特异性、四特异性或多特异性抗体, 包括但不限于Fab-Fv或Fab-Fv-Fv构建体。当在本文中使用时, 抗体片段也包括这样的分子, 其除了免疫球蛋白结构域外, 还包含源自非免疫球蛋白的序列, 例如以融合蛋白的形式。上面所定义的抗体片段是本领域中已知的。

[0226] 在一个特别优选的实施方案中, 通过根据本发明的方法所产生的抗体或其抗原结合片段为 (参见下面的表格):

[0227] 1) 这样的抗体或其抗原结合片段, 其

[0228] a. 包含具有SEQ ID NO:1中所定义的序列的CDR-H1; 具有SEQ ID NO:2中所定义的序列的CDR-H2; 具有SEQ ID NO:3中所定义的序列的CDR-H3; 具有SEQ ID NO:4中所定义的序列的CDR-L1; 具有SEQ ID NO:5中所定义的序列的CDR-L2; 和具有SEQ ID NO:6中所定义的序列的CDR-L3; 或

[0229] b. 包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区; 或

[0230] c. 包含与SEQ ID NO:7中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性, 优选地90%同一性或相似性的轻链可变区和与SEQ ID NO:8中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性, 优选地90%同一性或相似性的重链可变区;

[0231] d. 包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中所定义的序列的重链; 或

[0232] e. 包含与SEQ ID NO:7中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链可变区和与SEQ ID NO:11中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链;或者

[0233] 2) 这样的抗体,其包含具有SEQ ID NO:9中所定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中所定义的序列的重链;或者

[0234] 3) 这样的抗体,其包含与SEQ ID NO:9中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链和与SEQ ID NO:10中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链。

[0235] 互补性决定区(“CDR”)在本文中按照Kabat定义来进行定义。Kabat定义是用于对在抗体中的残基进行编号的标准,并且它典型地用于标识CDR区(Kabat等人,(1991),第5版,NIH出版物编号91-3242)。

|        |                                      |                   |
|--------|--------------------------------------|-------------------|
| [0236] | <b>CDR-H1</b><br><b>SEQ ID NO: 1</b> | GFTFSNYGMV        |
|        | <b>CDR-H2</b><br><b>SEQ ID NO: 2</b> | YIDSDGDNTYYRDSVKG |
|        | <b>CDR-H3</b><br><b>SEQ ID NO: 3</b> | GIVRPFLY          |
|        | <b>CDR-L1</b><br><b>SEQ ID NO: 4</b> | KSSQSLVGASGKTYLY  |
|        | <b>CDR-L2</b><br><b>SEQ ID NO: 5</b> | LVSTLDS           |

|        |                                 |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                        |
|--------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [0237] | <b>CDR-L3<br/>SEQ ID NO: 6</b>  | LQGTHFPHT                                                                                                                                              |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                        |
|        | <b>轻链可变区<br/>SEQ ID NO: 7</b>   | DIQMTQSPSS<br>LFQKPGKAPK<br>SSLQPEDFAT                                                                                                                 | LSASVGDRVT<br>RLIYLVSTLD<br>YYCLQGTHFP                                                                                                                 | ITCKSSQSLV<br>SGIPSRFSGS<br>HTFGQGCKLE                                                                                                                 | GASGKTYLYW<br>GSGTEFTLTI<br>IK                                                                                                                         |
|        | <b>重链可变区<br/>SEQ ID NO: 8</b>   | EVPLVESGGG<br>PGKGLEWVAY<br>LQMNSLRAED                                                                                                                 | LVQPGGSLRL<br>IDSDGDNTYY<br>TAVYYCTTGI                                                                                                                 | SCAVSGFTFS<br>RDSVKGRFTI<br>VRPFLYWGQG                                                                                                                 | NYGMVWVRQA<br>SRDNAKSSLY<br>TLVTVS                                                                                                                     |
|        | <b>轻链<br/>SEQ ID NO: 9</b>      | DIQMTQSPSS<br>LFQKPGKAPK<br>SSLQPEDFAT<br>FIFPPSDEQL<br>SGNSQESVTE<br>VTHQGLSSPV                                                                       | LSASVGDRVT<br>RLIYLVSTLD<br>YYCLQGTHFP<br>KSGTASVVCL<br>QDSKDSTYSL<br>TKSFNRGEC                                                                        | ITCKSSQSLV<br>SGIPSRFSGS<br>HTFGQGCKLE<br>LNNFYPREAK<br>SSTLTLSKAD                                                                                     | GASGKTYLYW<br>GSGTEFTLTI<br>IKRTVAAPSV<br>VQWKVDNALQ<br>YEKHKVYACE                                                                                     |
|        | <b>重链<br/>SEQ ID NO: 10</b>     | EVPLVESGGG<br>PGKGLEWVAY<br>LQMNSLRAED<br>KGPSVFPLAP<br>GALTSGVHTF<br>NVDHKPSNTK<br>PPKPKDTLMI<br>VHNAKTKPRE<br>SNKGLPSSIE<br>SLTCLVKGFY<br>FFLYSRLTVD | LVQPGGSLRL<br>IDSDGDNTYY<br>TAVYYCTTGI<br>CSRSTSESTA<br>PAVLQSSGLY<br>VDKRVESKYG<br>SRTPEVTCVV<br>EQFNSTYRVV<br>KTISKAKGQP<br>PSDIAVEWES<br>KSRWQEGNVF | SCAVSGFTFS<br>RDSVKGRFTI<br>VRPFLYWGQG<br>ALGCLVKDYF<br>SLSSVVTGPS<br>PPCPPCPAPE<br>VDVSQEDPEV<br>SVLTVLHQDW<br>REPQVYTLPP<br>NGQPENNYKT<br>SCSVMHEALH | NYGMVWVRQA<br>SRDNAKSSLY<br>TLVTVSSAST<br>PEPVTVSWNS<br>SSLGKTKYTC<br>FLGGPSVFLF<br>QFNWYVDGVE<br>LNGKEYKCKV<br>SQEEMTKNQV<br>TPPVLDSDGS<br>NHYTQKSLSL |
|        | <b>Fab 重链<br/>SEQ ID NO: 11</b> | EVPLVESGGG<br>PGKGLEWVAY<br>LQMNSLRAED<br>KGPSVFPLAP<br>GALTSGVHTF<br>NVNHKPSNTK                                                                       | LVQPGGSLRL<br>IDSDGDNTYY<br>TAVYYCTTGI<br>SSKSTSGGTA<br>PAVLQSSGLY<br>VDKKVEPKSC                                                                       | SCAVSGFTFS<br>RDSVKGRFTI<br>VRPFLYWGQG<br>ALGCLVKDYF<br>SLSSVVTGPS                                                                                     | NYGMVWVRQA<br>SRDNAKSSLY<br>TLVTVSSAST<br>PEPVTVSWNS<br>SSLGTQTYIC                                                                                     |

[0238] 所述重组蛋白质或者优选的抗体或其抗原结合片段典型地可以由包含编码所述多肽或抗体核苷酸序列的载体的宿主细胞产生。抗体或其抗原结合片段可以仅包含重链或轻链多肽,在这种情况下仅需要使用编码重链或轻链多肽的序列来转染细胞。为了产生包含重链和轻链两者的产物,可以用两种载体(编码轻链多肽的第一载体和编码重链多肽的第二载体)转染细胞。备选地,可以使用单一载体,该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

[0239] 任选的进一步步骤

[0240] 本发明的方法任选地进一步包括从细胞培养基中回收重组蛋白质的步骤。随后,可以纯化所述重组蛋白质,例如,如果该蛋白质是抗体,那么使用A蛋白色谱法。所述方法任选地进一步包括将经纯化的重组蛋白质配制成例如具有高蛋白质浓度的制剂的步骤,所述高蛋白质浓度为例如10mg/ml或更高,例如50mg/ml或更高,例如100mg/ml或更高,例如150mg/ml或更高的浓度。在一个进一步的实施方案中,将所述蛋白质冻干或喷雾干燥。所述

蛋白质可以以干的形式施用给患者或者在施用之前重构成液体制剂。

[0241] 通过本发明的方法获得的或可获得的产物

[0242] 在一个进一步的方面,本发明涉及通过根据本发明的方法可获得的或获得的重组蛋白质制备物,例如大量重组蛋白质制备物。在如此获得的所述制备物中的重组蛋白质,优选地抗体或其抗原结合片段,展示出相比于用相同的但其中培养基不包括半胱氨酸/胱氨酸类似物的过程所获得的相同重组蛋白质而言降低的异质性。在优选的实施方案中,所述制备物是无色的。

[0243] 本发明的进一步方面和实施方案:

[0244] 1.用于降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质群体的异质性的方法,所述方法包括使产生重组蛋白质的宿主细胞在细胞培养基中生长,其中所述细胞培养基包含一种或多种半胱氨酸/胱氨酸类似物,其中在产生结束时获得异质性降低而不实质性地降低所述重组蛋白质的滴度。

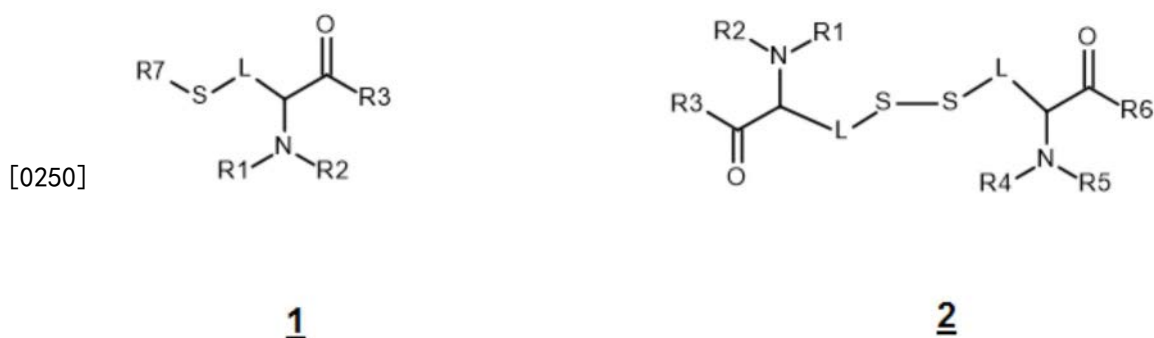
[0245] 2.根据实施方案1的方法,其中所述异质性降低包括降低:

[0246] a.颜色或颜色强度,

[0247] b.电荷异质性,优选地通过降低酸性峰群组种类(APG)和/或碱性峰群组种类(BPG),主要电荷种类并不由此实质性地下降;和/或

[0248] c.氨基酸氧化,优选地甲硫氨酸氧化。

[0249] 3.在根据本发明的一个实施方案中,所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包含一种或多种选自下列各项的化合物或者由一种或多种选自下列各项的化合物组成:由式1和2所表示的化合物,及其盐:



[0251] 其中,

[0252] R1、R2、R4和R5独立地表示氢;氨基羰基; $C_{2-22}$ 酰基; $C_{1-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{1-22}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{1-22}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基;

[0253] R3和R6独立地表示羟基; $NH_2$ ; $C_{1-22}$ 烷氧基,其中 $C_{1-22}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{1-22}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-22}$ 烷基取代;羟基氨基; $C_{1-22}$ 烷氧基氨基; $C_{1-22}$ 烷基氨基,其中 $C_{1-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{1-22}$ 杂烷基氨基;二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基,其中 $C_{1-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{1-22}$ 杂烷基)氨基;

[0254] R7表示氢、磷酸根或硫酸根;

[0255] L表示任选地经取代的 $C_{1-10}$ 亚烷基链;和

[0256] 条件是,所述化合物不是半胱氨酸或胱氨酸。

[0257] 4. 根据实施方案3的方法, 其中 $C_{1-22}$ 烷基是指脂族烃基团, 其可以是直链或支化的并且可以在链中包含1至22个碳原子, 例如 $C_{6-22}$ 烷基基团、 $C_{12-22}$ 烷基基团、 $C_{1-16}$ 烷基基团、 $C_{1-10}$ 烷基基团和 $C_{1-6}$ 烷基基团。

[0258] 5. 根据实施方案3或4的方法, 其中 $C_{5-22}$ 芳基是指具有5至22个碳原子的不饱和芳族碳环基团, 其具有单个环或多个稠环, 例如 $C_{5-14}$ 芳基基团、 $C_{5-10}$ 芳基基团。

[0259] 6. 根据实施方案3至5中任一项的方法, 其中 $C_{5-22}$ 杂芳基表示具有5至22个碳原子的芳族碳环基团, 其具有单个环或多个稠环, 其中所述碳原子中的一个或多个已被一个或多个选自氧、硫和氮的杂原子替代, 并且其中 $C_{5-22}$ 杂芳基包括 $C_{5-14}$ 杂芳基基团, 合适地包括 $C_{5-10}$ 杂芳基基团。

[0260] 7. 根据实施方案3至5中任一项的方法, 其中 $C_{2-22}$ 酰基是指由式 $-(C=O)R$ 所表示的基团, 其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团, 并且包括 $C_{2-6}$ 酰基基团、 $C_{6-22}$ 酰基基团和 $C_{12-22}$ 酰基基团。

[0261] 8. 根据实施方案3至7中任一项的方法, 其中 $C_{1-22}$ 烷氧基是指由式 $-O-R$ 所表示的基团, 其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团, 并且包括 $C_{1-6}$ 烷氧基基团、 $C_{6-22}$ 烷氧基基团和 $C_{12-22}$ 烷氧基基团。

[0262] 9. 根据实施方案3至8中任一项的方法, 其中 $C_{1-22}$ 杂烷基是指上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基, 其中一个或多个碳原子被一个或多个氧或氮原子替代, 并且包括 $C_{1-6}$ 杂烷基基团、 $C_{6-22}$ 杂烷基基团和 $C_{12-22}$ 杂烷基基团。

[0263] 10. 根据实施方案3至9中任一项的方法, 其中羟基磺酰基是指由式 $-S(=O)_2-OH$ 所表示的基团。

[0264] 11. 根据实施方案3至10中任一项的方法, 其中 $C_{1-22}$ 烷基磺酰基是指由式 $-S(=O)_2-R$ 所表示的基团, 其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团, 并且包括 $C_{1-6}$ 烷基磺酰基基团、 $C_{6-22}$ 烷基磺酰基基团和 $C_{12-22}$ 烷基磺酰基基团。

[0265] 12. 根据实施方案3至11中任一项的方法, 其中在本文中所使用的 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基是指由式 $-S(=O)_2-R'$ 所表示的基团, 其中 $R'$ 表示在本文中上面所定义的 $C_{5-22}$ 芳基基团。

[0266] 13. 根据实施方案3至12中任一项的方法, 其中 $C_{1-22}$ 烷基氨基是指由式 $-NH-R$ 所表示的基团, 其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团, 并且包括 $C_{1-6}$ 烷基氨基基团、 $C_{6-22}$ 烷基氨基基团和 $C_{12-22}$ 烷基氨基基团。

[0267] 14. 根据实施方案3至13中任一项的方法, 其中 $C_{1-22}$ 烷氧基氨基是指由式 $-NH-OR$ 所表示的基团, 其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团, 并且包括 $C_{1-6}$ 烷氧基氨基基团、 $C_{6-22}$ 烷氧基氨基基团和 $C_{12-22}$ 烷氧基氨基基团。

[0268] 15. 根据实施方案3至14中任一项的方法, 其中二( $C_{1-22}$ 烷基)氨基是指由式 $-NRR'$ 所表示的基团, 其中R和 $R'$ 独立地表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 烷基基团, 并且包括二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基和二( $C_{12-22}$ 烷基)氨基。

[0269] 16. 根据实施方案3至15中任一项的方法, 其中 $C_{1-22}$ 杂烷基氨基是指由式 $-NH-R$ 所表示的基团, 其中R表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 杂烷基基团, 并且包括 $C_{1-6}$ 杂烷基氨基、 $C_{6-22}$ 杂烷基氨基和 $C_{12-22}$ 杂烷基氨基。

[0270] 17. 根据实施方案3至16中任一项的方法, 其中二( $C_{1-22}$ 杂烷基)氨基是指由式 $-NRR'$ 所表示的基团, 其中R和 $R'$ 独立地表示在本文中上面所定义的 $C_{1-22}$ 杂烷基基团, 并且包

括二(C<sub>1-6</sub>杂烷基)氨基、二(C<sub>6-22</sub>杂烷基)氨基和二(C<sub>12-22</sub>杂烷基)氨基。

[0271] 18. 根据实施方案3至17中任一项的方法, 其中C<sub>1-10</sub>亚烷基链是指包含1至10个碳原子的二价的直链或支化的亚烷基链, 并且包括亚甲基、亚乙基、亚丙基和亚丁基。

[0272] 19. 根据实施方案3至18中任一项的方法, 其中氨基羰基是指由式-CO-N(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)所表示的基团, 其中-CO的碳与半胱氨酸/胱氨酸类似物的氮相结合并且其中R<sub>a</sub>和R<sub>b</sub>相互独立地表示上面所定义的C<sub>1-22</sub>烷基。

[0273] 20. 根据实施方案3至19中任一项的方法, 其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自由式1所表示的半胱氨酸类似物, 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7和L如在本文中上面所定义。

[0274] 21. 根据实施方案3至20中任一项的方法, 其中R7表示氢。

[0275] 22. 根据实施方案3至21中任一项的方法, 其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自由式2所表示的胱氨酸类似物, 其中R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7和L如在本文中上面所定义。

[0276] 23. 根据实施方案3至22中任一项的方法, R1、R2、R4和R5独立地表示氢; C<sub>2-22</sub>酰基; C<sub>1-22</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代; 或C<sub>1-22</sub>杂烷基。

[0277] 24. 根据实施方案3至23中任一项的方法, 其中R3和R6独立地表示羟基; NH<sub>2</sub>; C<sub>1-22</sub>烷氧基, 其中C<sub>1-22</sub>烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; C<sub>1-22</sub>烷基氨基, 该基团任选地被羟基取代; 或二(C<sub>1-22</sub>烷基)氨基, 其任选地被羟基取代。

[0278] 25. 根据实施方案3至24中任一项的方法, 其中L表示C<sub>1-4</sub>亚烷基链, 其任选地被一个或多个C<sub>1-6</sub>烷基, 优选地两个甲基基团取代。

[0279] 26. 根据实施方案3至25中任一项的方法, 其中R1表示氢或C<sub>2-22</sub>酰基, 例如氢或C<sub>2-6</sub>酰基。

[0280] 27. 根据实施方案3至26中任一项的方法, 其中R2表示氢或C<sub>2-22</sub>酰基, 例如C<sub>2-6</sub>酰基。

[0281] 28. 根据实施方案3至27中任一项的方法, 其中R3表示羟基或C<sub>1-22</sub>烷氧基, 例如C<sub>1-6</sub>烷氧基。

[0282] 29. 根据实施方案3至28中任一项的方法, 其中R4表示氢或C<sub>2-22</sub>酰基, 例如C<sub>2-6</sub>酰基。

[0283] 30. 根据实施方案3至29中任一项的方法, 其中R5表示氢或C<sub>2-22</sub>酰基, 例如氢或C<sub>2-6</sub>酰基。

[0284] 31. 根据实施方案3至30中任一项的方法, 其中R6表示羟基或C<sub>1-22</sub>烷氧基, 例如C<sub>1-6</sub>烷氧基。

[0285] 32. 根据实施方案3至31中任一项的方法, 其中L表示亚甲基或亚乙基。

[0286] 33. 根据实施方案3至32中任一项的方法, 其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包括一种或多种选自下列各项的化合物: 由式1所表示的化合物, 及其盐, 其中L、R1、R2、R3和R7如上面所定义,

[0287] 条件是

[0288] (i) 如果R1或R2基团之一表示C<sub>6-22</sub>酰基; C<sub>6-22</sub>烷基, 该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代; C<sub>6-22</sub>杂烷基; 羟基磺酰基; C<sub>6-22</sub>烷基磺酰基; 或C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基,

[0289] 那么余下的R1或R2基团独立地表示氢;氨基羰基; $C_{2-6}$ 酰基; $C_{1-6}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-6}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{1-6}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{1-6}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-10}$ 芳基磺酰基;和

[0290] R3表示羟基; $NH_2$ ; $C_{1-6}$ 烷氧基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{1-6}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-6}$ 烷基取代;羟基氨基; $C_{1-6}$ 烷氧基氨基; $C_{1-6}$ 烷基氨基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{1-6}$ 杂烷基氨基;二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{1-6}$ 杂烷基)氨基;和

[0291] (ii) 如果R3表示 $C_{6-22}$ 烷氧基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-22}$ 烷基取代;羟基氨基; $C_{6-22}$ 烷氧基氨基; $C_{6-22}$ 烷基氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 杂烷基氨基;二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{6-22}$ 烷基)氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{6-22}$ 杂烷基)氨基,

[0292] 那么R1和R2独立地表示氢;氨基羰基; $C_{2-6}$ 酰基; $C_{1-6}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-6}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{1-6}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{1-6}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-10}$ 芳基磺酰基。

[0293] 34. 根据实施方案3至33中任一项的方法,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包含下列各项或者由下列各项组成:由式2所表示的化合物,及其盐,其中L、R1、R2、R3、R4、R5、R6和R7如上面所定义,条件是:

[0294] (i) 如果R1和R2基团之一表示 $C_{6-22}$ 酰基; $C_{6-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{6-22}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{6-22}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基;和

[0295] 如果R4和R5基团之一表示 $C_{6-22}$ 酰基; $C_{6-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{6-22}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{6-22}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基,

[0296] 那么余下的R1、R2、R4或R5基团独立地表示氢;氨基羰基; $C_{2-6}$ 酰基; $C_{1-6}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-6}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{1-6}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{1-6}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-10}$ 芳基磺酰基;和

[0297] R3和R6独立地表示羟基; $NH_2$ ; $C_{1-6}$ 烷氧基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{1-6}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-6}$ 烷基取代;羟基氨基; $C_{1-6}$ 烷氧基氨基; $C_{1-6}$ 烷基氨基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{1-6}$ 杂烷基氨基;二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二( $C_{1-6}$ 烷基)氨基,其中 $C_{1-6}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二( $C_{1-6}$ 杂烷基)氨基;

[0298] (ii) 如果仅R1、R2、R4和R5基团之一独立地表示 $C_{6-22}$ 酰基; $C_{6-22}$ 烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和 $C_{1-22}$ 烷氧基的取代基取代; $C_{6-22}$ 杂烷基;羟基磺酰基; $C_{6-22}$ 烷基磺酰基;或 $C_{5-22}$ 芳基磺酰基,

[0299] 那么R3和R6之一可以表示 $C_{6-22}$ 烷氧基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 烷基氨基,该基团任选地被羟基或 $C_{1-22}$ 烷基取代; $C_{6-22}$ 烷氧基氨基; $C_{6-22}$ 烷基氨基,其中 $C_{6-22}$ 烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代; $C_{6-22}$ 杂烷基氨基;二

(C<sub>6-22</sub>烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二(C<sub>6-22</sub>烷基)氨基,其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二(C<sub>6-22</sub>杂烷基)氨基;

[0300] (iii) 如果R1、R2、R4和R5基团中没有表示C<sub>6-22</sub>酰基;C<sub>6-22</sub>烷基,该基团任选地被一个或两个选自羟基和C<sub>1-22</sub>烷氧基的取代基取代;C<sub>6-22</sub>杂烷基;羟基磺酰基;C<sub>6-22</sub>烷基磺酰基;或C<sub>5-22</sub>芳基磺酰基,

[0301] 那么R3和R6都可以独立地表示C<sub>6-22</sub>烷氧基,其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳可以任选地被芳基或杂芳基替代;C<sub>6-22</sub>烷基氨基,该基团任选地被羟基或C<sub>1-22</sub>烷基取代;C<sub>6-22</sub>烷氧基氨基;C<sub>6-22</sub>烷基氨基,其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;C<sub>6-22</sub>杂烷基氨基;二(C<sub>6-22</sub>烷基)氨基,其任选地被羟基取代;二(C<sub>6-22</sub>烷基)氨基,其中C<sub>6-22</sub>烷基的一个或多个碳被芳基或杂芳基替代;或二(C<sub>6-22</sub>杂烷基)氨基。

[0302] 35. 根据实施方案3至34中任一项的方法,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包含式1和2的盐或者由式1和2的盐组成。

[0303] 36. 根据实施方案35的方法,其中所述盐通过在所述半胱氨酸/胱氨酸类似物上存在的羟基基团的反应来形成。

[0304] 37. 根据实施方案35或36的方法,其中所述盐包括碱金属盐,例如钠盐、钾盐或锂盐;碱土金属盐,例如镁盐或钙盐;铵盐,例如四烷基或芳基铵盐;铈盐,例如三烷基或芳基铈;和磷盐,例如四烷基或芳基磷盐。

[0305] 38. 根据实施方案35至37中任一项的方法,其中所述盐通过在所述半胱氨酸/胱氨酸类似物上存在的氨基基团的反应(例如,所述氨基基团与无机酸或有机酸的反应)来形成,并且包括单或二盐酸盐、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>盐、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>盐、乙酸盐和富马酸盐。

[0306] 39. 根据实施方案3至38中任一项的方法,其中在本文中上面所定义的半胱氨酸/胱氨酸类似物具有与L-半胱氨酸相同的手性。

[0307] 40. 根据实施方案3至39中任一项的方法,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物选自N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯、N-乙酰基-L-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸或S-磺基半胱氨酸。

[0308] 41. 根据实施方案3至40中任一项的方法,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物包含具有与L-半胱氨酸相同的手性的化合物或者由具有与L-半胱氨酸相同的手性的化合物组成。

[0309] 42. 根据实施方案3至41中任一项的方法,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物由N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯组成。

[0310] 43. 根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述细胞培养基包含:

[0311] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和

[0312] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0313] 其中(a)与(b)的摩尔比为1:18至18:1。

[0314] 44. 根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述方法包括下列步骤:

[0315] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0316] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0317] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0318] (ii)使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0319] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0320] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0321] 其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

[0322] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:18至18:1。

[0323] 45.根据实施方案43或44的方法,其中所述(a)与(b)的摩尔比为1:15至15:1,例如1:12至12:1,例如1:10至10:1,例如1:8至8:1,例如1:6至6:1,例如1:4至4:1,例如1:3至3:1,例如1:2至2:1,例如1.5:1至1:1.5,例如1:1的摩尔比。

[0324] 46.根据实施方案43或44的方法,其中在所述基础培养基中(b)的浓度等价于0.05至5mmol/L的半胱氨酸,例如0.1至1mmol/L,例如0.2至0.6mmol/L。

[0325] 47.根据实施方案43至46中任一项的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基补充以(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,其中在整个产生期内添加至培养物的(a)和(b)之和等价于1至75mmol/L的半胱氨酸,例如2至20mmol/L,例如4至10mmol/L。

[0326] 48.根据实施方案43至46中任一项的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基每日补充以(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,其中每日添加将(a)+(b)的浓度带至等价于0.05至5mmol/L的半胱氨酸,例如0.1至1mmol/L的浓度。

[0327] 49.根据实施方案43至48中任一项的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基补充以:

[0328] • 半胱氨酸或胱氨酸,直至预期的所产生的重组蛋白质的总量的10wt%至30wt%的总量;和/或

[0329] • 色氨酸,直至预期的所产生的重组蛋白质的总量的8wt%至35wt%的总量。

[0330] 50.根据实施方案43至49中任一项的方法,其中

[0331] • 在细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.9g/L,优选地其中在细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.3g/L,和/或

[0332] • 在细胞培养物中的色氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.6g/L,优选地其中在细胞培养物中的色氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.3g/L。

[0333] 51.根据实施方案43至50中任一项的方法,其中

[0334] • 在所述过程期间所提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/( $10^{12}$ 个细胞),例如2.9至7g/( $10^{12}$ 个细胞),其中细胞是指预期的在产生期结束时的完整活细胞计数,和/或

[0335] • 在所述过程期间所提供的色氨酸的总量为2.5至7g/( $10^{12}$ 个细胞),例如2.5至3.5g/( $10^{12}$ 个细胞/L),其中细胞是指预期的在产生期结束时的完整活细胞计数。

[0336] 52.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述方法为分批方法。

[0337] 53.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述重组蛋白质在产生期期间产生,优选地其中所述产生期具有至少7天,更优选地至少14天的持续时间。

- [0338] 54.根据前述实施方案中任一项的方法,其中在产生期中给培养物每日进行补充。
- [0339] 55.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述产生期在生物反应器中进行,所述生物反应器优选地具有等于或大于50L,等于或大于100L,等于或大于500L,等于或大于1000L,等于或大于2000L,等于或大于5000L,等于或大于10,000L,或者等于或大于20,000L的容积。
- [0340] 56.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述宿主细胞为哺乳动物细胞,优选地CHO细胞。
- [0341] 57.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述重组蛋白质为抗体或其抗原结合片段。
- [0342] 58.根据实施方案57的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段为:
- [0343] i) 这样的抗体或其抗原结合片段,其
- [0344] a.包含具有SEQ ID NO:1中所定义的序列的CDR-H1;具有SEQ ID NO:2中所定义的序列的CDR-H2;具有SEQ ID NO:3中所定义的序列的CDR-H3;具有SEQ ID NO:4中所定义的序列的CDR-L1;具有SEQ ID NO:5中所定义的序列的CDR-L2;和具有SEQ ID NO:6中所定义的序列的CDR-L3;或
- [0345] b.包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区;或
- [0346] c.包含与SEQ ID NO:7中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链可变区和与SEQ ID NO:8中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链可变区;
- [0347] d.包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中所定义的序列的重链;或
- [0348] e.包含与SEQ ID NO:7中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链可变区和与以SEQ ID NO:11中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链;或者
- [0349] ii) 这样的抗体,其包含具有SEQ ID NO:9中所定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中所定义的序列的重链;或者
- [0350] iii) 这样的抗体,其包含与SEQ ID NO:9中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链和与SEQ ID NO:10中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链。
- [0351] 59.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述重组蛋白质为在10mg/ml或更高,例如50mg/ml或更高的浓度下不是无色的蛋白质(当由在不包含半胱氨酸/胱氨酸类似物的细胞培养基中生长的宿主细胞产生时),其中例如如在本文中的实施例中所描述的那样来测定颜色。
- [0352] 60.根据前述实施方案中任一项的方法,其中所述方法包括从细胞培养基中回收重组蛋白质的步骤和纯化重组蛋白质的进一步步骤。
- [0353] 61.根据实施方案60的方法,其中所述纯化包括A蛋白色谱法。
- [0354] 62.根据实施方案60或61的方法,其进一步包括配制经纯化的重组蛋白质的步骤。
- [0355] 63.用于产生重组蛋白质制备物的方法,其包括:

[0356] (i) 将所述宿主细胞接种在基础培养基中,其中所述基础培养基任选地包含初始量的:

[0357] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0358] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0359] (ii) 使所述培养进展经过产生期,其中由所述细胞产生所述重组蛋白质,其中在所述产生期期间,给所述细胞培养基补充以:

[0360] (a) 半胱氨酸/胱氨酸类似物;和/或

[0361] (b) 半胱氨酸和/或胱氨酸,

[0362] 其中(a)和(b)可以同时地或顺次地添加,

[0363] 其中,当将所述基础培养基的内容物和所添加的全部补充物相合计时,(a)与(b)的摩尔比为1:18至18:1。

[0364] 64.根据实施方案63的方法,其中所述半胱氨酸/胱氨酸类似物如在上面在实施方案3-41中所描述的。

[0365] 65.根据实施方案63或64的方法,所述(a)与(b)的摩尔比为1:15至15:1,例如1:12至12:1,例如1:10至10:1,例如1:8至8:1,例如1:6至6:1,例如1:4至4:1,例如1:3至3:1,例如1:2至2:1,例如1.5:1至1:1.5,例如1:1的摩尔比。

[0366] 66.根据实施方案63至65中任一项的方法,其中在所述基础培养基中(b)的浓度等价于0.05至5mmol/L的半胱氨酸,例如0.1至1mmol/L,例如0.2至0.6mmol/L。

[0367] 67.根据实施方案63至66中任一项的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基补充以(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,其中在整个产生期内添加至培养物的(a)和(b)之和等价于1至75mmol/L的半胱氨酸,例如2至20mmol/L,例如4至10mmol/L。

[0368] 68.根据实施方案63至67中任一项的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基每日补充以(a)半胱氨酸/胱氨酸类似物和(b)半胱氨酸和/或胱氨酸,其中每日添加将(a)+(b)的浓度带至等价于0.05至5mmol/L的半胱氨酸,例如0.1至1mmol/L的浓度。

[0369] 69.根据实施方案63至68中任一项的方法,其中在所述产生期期间,给所述培养基补充以:

[0370] • 半胱氨酸或胱氨酸,直至预期的所产生的重组蛋白质的总量的10wt%至30wt%的总量;和/或

[0371] • 色氨酸,直至预期的所产生的重组蛋白质的总量的8wt%至35wt%的总量。

[0372] 70.根据实施方案63至69中任一项的方法,其中

[0373] • 在细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.9g/L,优选地其中在细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.3g/L,和/或

[0374] • 在细胞培养物中的色氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.6g/L,优选地其中在细胞培养物中的色氨酸浓度在产生期期间的任何时间点不超过0.3g/L。

[0375] 71.根据实施方案63至70中任一项的方法,其中

[0376] • 在所述过程期间所提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/( $10^{12}$ 个细胞),例如2.9至7g/( $10^{12}$ 个细胞),其中细胞是指预期的在产生期结束时的完整活细胞计数,和/

或

[0377] • 在所述过程期间所提供的色氨酸的总量为2.5至7g/( $10^{12}$ 个细胞),例如2.5至3.5g/( $10^{12}$ 个细胞/L),其中细胞是指预期的在产生期结束时的完整活细胞计数。

[0378] 72.根据实施方案63至71中任一项的方法,其中所述方法为分批方法。

[0379] 73.根据实施方案63至72中任一项的方法,其中所述重组蛋白质在产生期期间产生,优选地其中所述产生期具有至少7天,更优选地至少14天的持续时间。

[0380] 74.根据实施方案63至73中任一项的方法,其中在产生期中给培养物每日进行补充。

[0381] 75.根据实施方案63至74中任一项的方法,其中所述产生期在生物反应器中进行,所述生物反应器优选地具有等于或大于50L,等于或大于100L,等于或大于500L,等于或大于1000L,等于或大于2000L,等于或大于5000L,等于或大于10,000L,或者等于或大于20,000L的容积。

[0382] 76.根据实施方案63至75中任一项的方法,其中所述宿主细胞为哺乳动物细胞,优选地CHO细胞。

[0383] 77.根据实施方案63至76中任一项的方法,其中所述重组蛋白质为抗体或其抗原结合片段。

[0384] 78.根据实施方案77的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段为:

[0385] i) 这样的抗体或其抗原结合片段,其

[0386] a.包含具有SEQ ID NO:1中所定义的序列的CDR-H1;具有SEQ ID NO:2中所定义的序列的CDR-H2;具有SEQ ID NO:3中所定义的序列的CDR-H3;具有SEQ ID NO:4中所定义的序列的CDR-L1;具有SEQ ID NO:5中所定义的序列的CDR-L2;和具有SEQ ID NO:6中所定义的序列的CDR-L3;或

[0387] b.包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区;或

[0388] c.包含与SEQ ID NO:7中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链可变区和与SEQ ID NO:8中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链可变区;

[0389] d.包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中所定义的序列的重链;或

[0390] e.包含与SEQ ID NO:7中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链可变区和与SEQ ID NO:11中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链;或者

[0391] ii) 这样的抗体,其包含具有SEQ ID NO:9中所定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中所定义的序列的重链;或者

[0392] iii) 这样的抗体,其包含与SEQ ID NO:9中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的轻链和与SEQ ID NO:10中所定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选地90%同一性或相似性的重链。

[0393] 79.根据实施方案63至78中任一项的方法,其中所述重组蛋白质为在10mg/ml或更高,例如50mg/ml或更高的浓度下不是无色的蛋白质(当由在不包含半胱氨酸/胱氨酸类似

物的细胞培养基中生长的宿主细胞产生时),其中例如如在本文中的实施例中所描述的那样来测定颜色。

[0394] 80.根据实施方案63至79中任一项的方法,其中所述方法包括从细胞培养基中回收重组蛋白质的步骤和纯化重组蛋白质的进一步步骤。

[0395] 81.根据实施方案80的方法,其中所述纯化包括A蛋白色谱法。

[0396] 82.根据实施方案80或81的方法,其进一步包括配制经纯化的重组蛋白质的步骤。

[0397] 83.根据实施方案63至82中任一项的方法,其中所述宿主细胞为CHO细胞,并且所述半胱氨酸/胱氨酸类似物为N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯。

[0398] 84.通过根据前述实施方案中任一项的方法可获得的或获得的重组蛋白质制备物。

[0399] 85.适合于培养哺乳动物细胞的细胞培养基,其包含N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯。

[0400] 现在,将会借助于实施例并参考在附图中图解说明的实施方案来进一步描述本发明。

## 实施例

### [0401] 缩写

[0402] mAb:单克隆抗体;Cys:半胱氨酸或胱氨酸;APG:酸性峰群组;VCC:活细胞计数;DO:溶解氧;CO<sub>2</sub>:二氧化碳;CHO:中国仓鼠卵巢;UPLC:超高效液相色谱法。

### [0403] 实施例1

[0404] 评价了半胱氨酸/胱氨酸衍生物降低由在细胞培养物中生长的宿主细胞重组产生的抗体制备物的颜色和酸性种类的能力。对于该实验,使用在摇瓶中的规模缩减的模型。将产生全长抗体(mAb1)的CHO-DG44细胞以 $0.35 \times 10^6$ 个细胞/mL的接种密度接种在100mL的基础培养基中。mAb1包含具有SEQ ID NO:9中所定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中所定义的序列的重链。

[0405] 摇瓶容器为布置在避光的搅动温育箱(Infors)中的250mL摇瓶(corning)。将细胞在36.8°C和80%湿度下培养14天。在该过程开始时,以140rpm搅动细胞培养物。在该过程期间逐渐增大搅动以达到250rpm,以便保持摇瓶中的DO%在40%,如在2L生物反应器过程中所做的那样。通过将在温育箱中的CO<sub>2</sub>从在该过程之前的5%降低至在该过程期间的2%,保持细胞培养物处于pH 7.0±0.2。通过在培养的每一天快速大量添加补料来以补料分批方式培养细胞。所述基础培养基包含0.04mmol/L的半胱氨酸+0.38mmol/L的胱氨酸。所述补料包含153.3mmol/L的胱氨酸。在整个14-天产生期中,所添加的补料的总体积相应于培养物起始体积的4.47%(v/v)。

[0406] 以如在表1中所给出的不同百分比,用不同的半胱氨酸和胱氨酸衍生物替换在补料中存在的半胱氨酸。使用来自Advanced Instruments的渗透压计每日监测重量摩尔渗透压浓度。使用BioProfile **pHOx®**型血液气体分析仪(Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA)每日监测离线pH、溶解O<sub>2</sub>和溶解CO<sub>2</sub>。使用CedexBioHT系统(Roche)每日测定代谢物浓度。使用ViCell自动细胞计数仪(Beckman Coulter)每日测量活细胞浓度和细胞生存力。通过离心1mL的细胞培养液来每日收集细胞培养液,以便通过使用A蛋白HPLC

(Waters) 来测定抗体滴度。在14天的培养结束时,通过离心来收获细胞培养液。然后,使用A蛋白亲和和色谱法(MabSelect Sure,GE)来纯化上清液。将A蛋白洗脱物用于通过使用UPLC大小排阻(Waters)的分子量测定。通过成像毛细管电泳(ProteinSimple iCE3)来测定经纯化的mAb的主要、酸性(APG,酸性峰群组)和碱性(BPG,碱性峰群组)同工型的相对百分比。使用Amicon centricon离心过滤装置(Millipore)将A蛋白洗脱物的另一部分浓缩至40mg/mL。

[0407] 使用透射式分光光度计(UltrascanPro)在经浓缩的A蛋白洗脱物中测量经浓缩的抗体组合物的颜色强度,并且与CIE(国际照明委员会)量表进行比较。将数字结果标准化至40mg/mL的浓度。

[0408] 图1显示了以不同的在补料中的半胱氨酸的替换比例,使用不同的半胱氨酸和胱氨酸衍生物的细胞生长特性曲线。在采用100%的Cys衍生物的条件下,相比于对照条件而言细胞生长从第6天放慢,除了100% S-磺基半胱氨酸条件外,其中细胞在第7天快速死亡。对于50%衍生物补料,活细胞浓度与对照条件相似,直至第10天。从第10天开始,活细胞密度高于对照条件。但是,对于50% S-磺基半胱氨酸,活细胞浓度达到 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL的最大值,显著低于对照条件。当100%的Cys被Cys衍生物替换时,细胞以及对照都不生长,这暗示半胱氨酸衍生物不能完全替换半胱氨酸。另一方面,采用50%衍生物的条件展示出比对照条件更好的生长,这暗示当存在最小量的半胱氨酸时半胱氨酸/胱氨酸衍生物的正影响。在使细胞生长成为可能方面,S-磺基半胱氨酸看起来不像所测试的其他衍生物那样起作用。

[0409] 鉴于用100%半胱氨酸衍生物所观察到的细胞死亡,仅对于50%半胱氨酸衍生物条件分析了其他性能和产物质量结果。

[0410] 在使用50%的半胱氨酸衍生物的培养物中,产物滴度高于对照条件,除了当所使用的衍生物为S-磺基半胱氨酸时(图2)。

[0411] 相比于对照条件而言,经浓缩的A蛋白洗脱物的b\*值下降6.5%至21.2%,其中用50%的N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯(CAS登记号32381-28-5,其例如从Bachem AG可获得)观察到最好的结果(图3)。同样地,也观察到相比于对照条件而言,酸性变体水平下降7.6%至24.8%,其中用50%的N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到最好的结果(图4)。酸性种类水平的该下降与主要电荷种类的增加相关(图5),没有碱性变体水平的显著增加,除了S-磺基半胱氨酸(未显示)外。这些结果证实了重组蛋白质的微异质性的降低。

[0412] 表1:所测试的补料的不同组成

|        | 所使用的衍生物              | 在补料中被衍生物替换的半胱氨酸的%(摩尔等价量) |    |
|--------|----------------------|--------------------------|----|
|        |                      | 100                      | 50 |
| [0413] | N-乙酰基-L-半胱氨酸         | 100                      | 50 |
|        |                      | 100                      | 50 |
|        | N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸      | 100                      | 50 |
|        |                      | 100                      | 50 |
|        | N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 | 100                      | 50 |
|        |                      | 100                      | 50 |
|        | S-磺基半胱氨酸             | 100                      | 50 |
|        |                      | 100                      | 50 |

#### [0414] 实施例2

[0415] 通过使用另一种产生抗体的细胞系(细胞系2)来评价半胱氨酸/胱氨酸衍生物降低在细胞培养物中的重组蛋白质制备物的颜色和酸性种类的能力。对于该实验,使用在摇瓶中的规模缩减的模型。将产生多特异性抗体衍生物的CHO-DG44细胞以 $0.35 \times 10^6$ 个细胞/mL的接种密度接种在100mL的基础培养基中。摇瓶容器为布置在避光的搅动温育箱(Infors)中的250mL摇瓶(corning)。将细胞在36.8°C和80%湿度下培养14天。在该过程开始时,以140rpm搅动细胞培养物。在该过程期间逐渐增大搅动以达到250rpm,以便保持摇瓶中的DO%在40%,如在2L生物反应器过程中所做的那样。通过将在温育箱中的CO<sub>2</sub>从在该过程之前的5%降低至在该过程期间的2%,保持细胞培养物处于pH 7.0±0.2。通过在培养的每一天快速大量添加补料来以补料分批方式培养细胞。所述基础培养基包含0.04mmol/L的半胱氨酸+0.38mmol/L的胱氨酸。所述补料包含153.3mmol/L的胱氨酸。在整个14-天产生期中,所添加的补料的总体积相应于培养物起始体积的2.81%(v/v)。

[0416] 以50%等摩尔的替换比例,用不同的半胱氨酸和胱氨酸衍生物替换在补料中存在的半胱氨酸(表1)。还增加了采用仅50%的对照半胱氨酸水平的条件,以测试所观察到的改善是由于半胱氨酸衍生物的存在还是仅由于半胱氨酸的降低。使用来自Advanced Instrument的渗透压计每日监测重量摩尔渗透压浓度。使用Nova Biomedical Phox(Nova biomedical)每日监测离线pH、溶解O<sub>2</sub>和溶解CO<sub>2</sub>。使用CedexBioHT系统(Roche)每日测定代谢物浓度。使用ViCell自动细胞计数仪(Beckman Coulter)每日测量活细胞浓度和细胞生存力。通过离心1mL的细胞培养液来每日收集细胞培养液,以便通过使用L蛋白Octet measurement(Pall)来测定抗体滴度。在14天的培养结束时,通过离心来收获细胞培养液。然后,使用L蛋白亲和色谱法(CaptoL,GE)来纯化上清液。将L蛋白洗脱物用于通过使用UPLC大小排阻(Waters)的分子量测定和用于通过使用毛细管等电聚焦(ProteinSimple iCE3)的电荷变体测定。用细胞系2所产生的重组蛋白质不是有色分子。因此,在该情况下未进行颜色测量。

[0417] 图6显示了以在补料中的半胱氨酸的50%的替换比例,使用不同的半胱氨酸和胱氨酸衍生物的细胞生长特性曲线。在对照条件和采用半胱氨酸和胱氨酸衍生物的条件之间观察到相似的细胞生长特性曲线。因此,对于该细胞系(细胞系2),这些组分不影响细胞生长。对于所有半胱氨酸和胱氨酸衍生物,产物滴度也与对照条件相似(图7)。

[0418] 如可以在图8中所看到的,相比于采用两种胱氨酸衍生物N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯的对照条件而言,观察到46.6%至50.2%的酸性变体水平的下降。用N-乙酰基-半胱氨酸观察到酸性变体水平的14.5%的下降。酸性种类水平的该下降与主要电荷种类的增加相关(图9),没有碱性变体水平的显著增加(数据未显示)。这些结果证实了通过胱氨酸衍生物降低了重组蛋白质的微异质性。另一方面,采用S-磺基半胱氨酸和仅采用半胱氨酸的降低,观察到酸性种类的5%至10%的增加。

#### [0419] 实施例3

[0420] 对于两种细胞系,在生物反应器中评价了半胱氨酸/胱氨酸衍生物降低在细胞培养物中所产生的重组蛋白质制备物的颜色和酸性种类的能力。由于几何学和另外的对照,该模型对于大规模生产比摇瓶更具代表性。在2L搅拌生物反应器(Sartorius)中将来自细胞系1和2的CHO-DG44细胞以 $0.35 \times 10^6$ 个细胞/mL的接种密度接种在1300mL的基础培养基

中。将细胞以补料分批方式培养14天。将细胞培养物以280rpm进行搅动并且将DO保持在40%。用自动CO<sub>2</sub>喷射调节将细胞培养物保持在pH 7.0±0.2。通过在培养的每一天快速大量添加补料来以补料分批方式培养细胞。所述基础培养基包含0.04mmol/L的半胱氨酸+0.38mmol/L的胱氨酸。所述补料包含153.3mmol/L的胱氨酸。在整个14-天产生期中,所添加的补料的总体积相应于培养物起始体积的5.7% (w/w) (对于细胞系1) 和培养物起始体积的3.1% (w/w) (对于细胞系2)。

[0421] 以如在表2中所给出的不同百分比,用不同的半胱氨酸和胱氨酸衍生物替换在补料中存在的半胱氨酸。还增加了采用仅50%的半胱氨酸的条件,以测试所观察到的改善是由于半胱氨酸衍生物还是仅由于半胱氨酸的降低。使用来自Advanced Instrument的渗透压计每日监测重量摩尔渗透压浓度。使用Nova Biomedical Phox(Nova biomedical)每日监测离线pH、溶解O<sub>2</sub>和溶解CO<sub>2</sub>。使用CedexBioHT系统 (Roche) 每日测定代谢物浓度。使用ViCell自动细胞计数仪 (Beckman Coulter) 每日测量活细胞浓度和细胞生存力。通过离心1mL的细胞培养液来每日收集细胞培养液,以便通过HPLC prot A(waters) 或通过使用L蛋白Octet measurement (Pall) 来测定抗体滴度。在14天的培养结束时,通过离心来收获细胞培养液。然后,使用A蛋白或L蛋白亲和色谱法 (GE) 来纯化上清液。将A蛋白或L蛋白洗脱物用于通过使用UPLC大小排阻 (Waters) 的分子量测定和用于通过使用毛细管等电聚集 (ProteinSimple iCE3) 的电荷变体测定。使用Amicon centricon离心过滤装置 (Millipore) 将A蛋白洗脱物的另一部分 (仅来自细胞系1) 浓缩至40mg/mL。使用透射式分光光度计 (UltrascanPro) 在经浓缩的A蛋白洗脱物中测量经浓缩的抗体组合物的颜色强度,并且与CIE (国际照明委员会) 量表进行比较。将数字结果标准化至40mg/mL的浓度。

[0422] 表2: 在2L生物反应器中用细胞系1和2进行测试的补料的不同组成

|        | 所使用的衍生物              | 在补料中被衍生物替换的半胱氨酸的% (摩尔等价量) |
|--------|----------------------|---------------------------|
| [0423] | N-乙酰基-L-半胱氨酸         | 50                        |
|        | N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸      | 50                        |
|        | N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 | 50                        |

[0424] 细胞系1

[0425] 对于所测试的所有条件,观察到相似的细胞生长趋势 (图10)。

[0426] 用N,N'-二乙酰基-胱氨酸和N-乙酰基-半胱氨酸观察到10%至17%的抗体滴度的显著下降,但用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到小于5%的非显著下降 (图11)。用仅50%半胱氨酸补料也观察到滴度的显著下降,这暗示N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯改善滴度。

[0427] 关于酸性种类水平,用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸观察到5%的下降,用N-乙酰基-L-半胱氨酸观察到10%的下降,和用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到15%的下降 (图12)。该降低与主要种类的增加相关 (图13)。与在摇瓶中一样,在2L规模下观察到对于电荷变体的相似影响。用仅50%半胱氨酸补料,也观察到该下降。这暗示,在这里的酸性种类水平降低可以归因于半胱氨酸的降低。用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸观察到2.5%的b值水平的下降,用N-乙酰基-L-半胱氨酸观察到13%的b值水平的下降,和用N,N'-二乙酰基-L-

胱氨酸-二甲基酯观察到25%的b值水平的下降。与在摇瓶中一样,在2L规模下观察到对于产物颜色强度的相似影响。用仅50%半胱氨酸补料,未观察到b\*值的降低。证实了N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯对于着色的影响。

[0428] 细胞系2

[0429] 对于所测试的所有条件,观察到相似的细胞生长趋势(图15)。

[0430] 用N,N'-二乙酰基-胱氨酸、N-乙酰基-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到15%至23%的抗体滴度的显著增加(图16)。因此,该结果不同于在摇瓶中获得的结果。

[0431] 关于酸性种类水平,用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸观察到8%的下降,用N-乙酰基-L-半胱氨酸观察到13%的下降,和用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到13%的下降(图17)。该降低与主要种类的增加相关(图18)。相比于摇瓶而言,在2L规模下观察到相似的关于电荷变体的趋势,除了N-乙酰基-半胱氨酸外。证实了用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯替换半胱氨酸对于电荷变体的影响。

[0432] 用50%半胱氨酸补料,观察到酸性种类水平的27%的下降。这表明,半胱氨酸的降低是酸性种类降低的主要驱动者。用50%半胱氨酸补料观察到10%的滴度增加,而不是用半胱氨酸/胱氨酸衍生物时的15%至23%。对于该细胞系,用半胱氨酸/胱氨酸衍生物替换50%的半胱氨酸是滴度增加和异质性降低之间的良好折衷。

[0433] 实施例4

[0434] 用细胞系1在生物反应器中评价了结果的再现性。用另外的对照和具有50%S-磺基胱氨酸50%半胱氨酸补料的生物反应器重复了实施例3的实验。分析了来自这两个实验的数据以证实先前用半胱氨酸/胱氨酸衍生物所观察到的效应。

[0435] 表3:用于分析的数据

| 补料                                 | 重复数目  |       |
|------------------------------------|-------|-------|
|                                    | 数据组 1 | 数据组 2 |
| 对照 100%半胱氨酸补料                      | 1     | 2     |
| 50%半胱氨酸补料                          | 1     | 1     |
| [0436] 50% N-乙酰基-L-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料  | 1     | 1     |
| 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸 50%半胱氨酸补料      | 1     | 1     |
| 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料 | 1     | 1     |
| 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料             | 0     | 1     |

[0437] 在第0和8天之间未观察到关于细胞生长的差异。从第9天开始,采用S-磺基半胱氨酸的条件比对照具有更高的细胞死亡。50%半胱氨酸补料、50%N,N'-二乙酰基-胱氨酸50%半胱氨酸补料和50%N-乙酰基-半胱氨酸50%半胱氨酸补料比对照条件具有更高的VCC。50%N,N'-二乙酰基-胱氨酸-二甲基酯50%半胱氨酸补料条件与对照条件平均值相似(图19)。

[0438] 用N,N'-二乙酰基-胱氨酸-二甲基酯观察到相比于对照平均值而言小于5%的抗体滴度的非显著下降。但是,对于50%半胱氨酸补料,观察到10%的下降。因此,N,N'-二乙酰基-半胱氨酸-二甲基酯的使用由于补料中的半胱氨酸降低而补偿了5%的滴度损失。而

且,用50%半胱氨酸补料所观察到的较高VCC表明了相比于50%半胱氨酸补料而言用N,N'-二乙酰基-胱氨酸-二甲基酯的比生产率的增加。该观察结果证实,由于半胱氨酸降低而引起的比生产率的损失可以通过添加N,N'-二乙酰基-胱氨酸-二甲基酯来进行补偿。用N-乙酰基-半胱氨酸和N,N'-二乙酰基-半胱氨酸也观察到10%的下降。对于该细胞系,这些分子不影响生产率。另一方面,用S-磺基半胱氨酸观察到滴度的25%的下降。这归因于VCC的下降和归因于由于半胱氨酸降低而引起的生产率的下降,但不归因于S-磺基半胱氨酸对于比生产率的特殊影响(图20)。

[0439] 关于酸性种类水平,用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸和N-乙酰基-L-半胱氨酸观察到10%的平均下降(图21)。该降低与主要种类的增加相关(图22)。

[0440] 用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸观察到15%的平均降低。用仅50%半胱氨酸补料也观察到该降低。这再次暗示,酸性种类水平降低归因于半胱氨酸水平的降低。在S-磺基半胱氨酸和对照条件之间观察到相似的酸性种类水平。这暗示,S-磺基半胱氨酸增加了通过半胱氨酸降低而通常下降的酸性种类水平。

[0441] 关于b值水平,用S-磺基半胱氨酸观察到5%的平均下降,用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸观察到14%的平均下降,用N-乙酰基-L-半胱氨酸观察到13%的平均下降,和用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到30%的平均下降。用仅50%半胱氨酸补料未观察到b\*值的降低。证实了N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯对于着色的影响(图23)。

#### [0442] 实施例5

[0443] 我们测试了不同浓度的半胱氨酸/胱氨酸衍生物对于在小型生物反应器中培养的细胞培养物中所产生的重组蛋白质制备物的APG水平的改善的影响。在Ambr15生物反应器(Sartorius)中将来自细胞系1的CHO-DG44细胞以 $0.35 \times 10^6$ 个细胞/mL的接种密度接种在12mL基础培养基中。将细胞以补料分批方式培养14天。用自动CO<sub>2</sub>喷射调节将DO保持在40%并且将pH保持在 $7.0 \pm 0.2$ 。使用ViCell自动细胞计数仪(Beckman Coulter)每日测量活细胞浓度和细胞生存力。通过每日快速大量添加补料来以补料分批方式培养细胞。所述基础培养基包含0.04mmol/L的半胱氨酸+0.38mmol/L的胱氨酸。所述补料包含153.3mmol/L的胱氨酸。在整个14-天产生期中,所添加的补料的总体积相应于培养物起始体积的4.7%(v/v)。

[0444] 用不同的半胱氨酸和胱氨酸类似物替换不同百分比的在补料中存在的半胱氨酸。表4提供了所测试的不同百分比和其相对于半胱氨酸或胱氨酸的以摩尔比的等价的概况。例如,对于N-乙酰基-L-半胱氨酸,10%意味着10%摩尔量的半胱氨酸当量已被10%摩尔量的N-乙酰基-L-半胱氨酸替换;对于N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,10%意味着10%摩尔量的胱氨酸当量已被10%摩尔量的N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸替换。在14天的培养结束时,通过离心来收获细胞培养液。然后,使用A蛋白亲和色谱法(GE)来纯化上清液。将A蛋白洗脱物用于通过使用毛细管等电聚焦(ProteinSimple iCE3)的电荷变体测定。

[0445] 表4:在Ambr15生物反应器中用细胞系1进行测试的补料的不同组成

[0446]

| 所使用的类似物                      | 在补料中被类似物替换的半胱氨酸/胱氨酸的% (摩尔等价量)* | 相对于半胱氨酸的摩尔比 (类似物/半胱氨酸) | 在补料中的类似物摩尔浓度 (mol/L) | 在补料中的等价的半胱氨酸摩尔浓度 (mol/L) | 在补料中的等价的胱氨酸摩尔浓度 (mmol/L) |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC)           | 10                             | 9.00 : 1.00            | 0.03065              | 0.27584                  | 0.13792                  |
|                              | 20                             | 4.00 : 1.00            | 0.06130              | 0.24519                  | 0.12259                  |
|                              | 30                             | 2.33 : 1.00            | 0.09195              | 0.21454                  | 0.10727                  |
|                              | 50                             | 1.00 : 1.00            | 0.15324              | 0.15324                  | 0.07662                  |
|                              | 70                             | 1.00 : 2.33            | 0.21454              | 0.09195                  | 0.04597                  |
|                              | 80                             | 1.00 : 4.00            | 0.24519              | 0.06130                  | 0.03065                  |
|                              | 90                             | 1.00 : 9.00            | 0.27584              | 0.03065                  | 0.01532                  |
| N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸 (DiNAC)      | 10                             | 18.00 : 1.00           | 0.01532              | 0.27584                  | 0.13792                  |
|                              | 20                             | 8.00 : 1.00            | 0.03065              | 0.24519                  | 0.12259                  |
|                              | 30                             | 4.67 : 1.00            | 0.04597              | 0.21454                  | 0.10727                  |
|                              | 50                             | 2.00 : 1.00            | 0.07662              | 0.15324                  | 0.07662                  |
|                              | 70                             | 1.00 : 1.17            | 0.10727              | 0.09195                  | 0.04597                  |
|                              | 80                             | 1.00 : 2.00            | 0.12259              | 0.06130                  | 0.03065                  |
|                              | 90                             | 1.00 : 4.50            | 0.13792              | 0.03065                  | 0.01532                  |
| N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 (DACDM) | 10                             | 18.00 : 1.00           | 0.01532              | 0.27584                  | 0.13792                  |
|                              | 20                             | 8.00 : 1.00            | 0.03065              | 0.24519                  | 0.12259                  |
|                              | 30                             | 4.67 : 1.00            | 0.04597              | 0.21454                  | 0.10727                  |
|                              | 50                             | 2.00 : 1.00            | 0.07662              | 0.15324                  | 0.07662                  |
|                              | 70                             | 1.00 : 1.18            | 0.10727              | 0.09195                  | 0.04597                  |
|                              | 80                             | 1.00 : 2.02            | 0.12259              | 0.06130                  | 0.03065                  |
|                              | 90                             | 1.00 : 4.54            | 0.13792              | 0.03065                  | 0.01532                  |

[0447] \*对于N-乙酰基-L-半胱氨酸,%替换是依据半胱氨酸当量的

[0448] 图24显示了细胞的生长特性曲线。在对照条件(未添加类似物)和大多数所测试的条件之间观察到相似的活细胞浓度特性曲线。用90%的N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸和90%的N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯观察到生长的抑制。

[0449] 图25和26表示在酸性种类和主要电荷种类水平方面,对于N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸、N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯或N-乙酰基-胱氨酸的不同的半胱氨酸/胱氨酸替换水平的响应。对于N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸,酸性种类水平随着替换百分比的增加而降低,达到27.5%的最大降低。微异质性的该降低通过在主要电荷种类水平方面所观察到的相关于对照的正差异而得到证实。以50%至70%的半胱氨酸/胱氨酸替换,用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯获得了最佳主要电荷种类水平。但是,N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯对于主要电荷种类水平具有正影响,15%至90%,按照拟合曲线。该结果通过在图25中的用N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯也观察到的酸性种类水平的下降而得到证实。用N-乙酰基-半胱氨酸观察到较低的影响,在大约70%的替换时具有最佳值,具有12.5%的酸性种类的下降。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> UCB Biopharma SPRL
- [0003] <120> 细胞培养方法
- [0004] <130> PF0128-WO-PCT
- [0005] <160> 11
- [0006] <170> BiSSAP 1.3.6
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 10
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> 人源化的
- [0013] <400> 1
- [0014] Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val
- [0015] 1 5 10
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 17
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 人工序列
- [0020] <220>
- [0021] <223> 人源化的
- [0022] <400> 2
- [0023] Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
- [0024] 1 5 10 15
- [0025] Gly
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 8
- [0028] <212> PRT
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <220>
- [0031] <223> 人源化的
- [0032] <400> 3
- [0033] Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr
- [0034] 1 5
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 16
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 人工序列

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0039] | <220>                                                           |
| [0040] | <223> 人源化的                                                      |
| [0041] | <400> 4                                                         |
| [0042] | Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr |
| [0043] | 1 5 10 15                                                       |
| [0044] | <210> 5                                                         |
| [0045] | <211> 7                                                         |
| [0046] | <212> PRT                                                       |
| [0047] | <213> 人工序列                                                      |
| [0048] | <220>                                                           |
| [0049] | <223> 人源化的                                                      |
| [0050] | <400> 5                                                         |
| [0051] | Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser                                     |
| [0052] | 1 5                                                             |
| [0053] | <210> 6                                                         |
| [0054] | <211> 9                                                         |
| [0055] | <212> PRT                                                       |
| [0056] | <213> 人工序列                                                      |
| [0057] | <220>                                                           |
| [0058] | <223> 人源化的                                                      |
| [0059] | <400> 6                                                         |
| [0060] | Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr                             |
| [0061] | 1 5                                                             |
| [0062] | <210> 7                                                         |
| [0063] | <211> 112                                                       |
| [0064] | <212> PRT                                                       |
| [0065] | <213> 人工序列                                                      |
| [0066] | <220>                                                           |
| [0067] | <223> 人源化的                                                      |
| [0068] | <400> 7                                                         |
| [0069] | Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |
| [0070] | 1 5 10 15                                                       |
| [0071] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala |
| [0072] | 20 25 30                                                        |
| [0073] | Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala |
| [0074] | 35 40 45                                                        |
| [0075] | Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro |
| [0076] | 50 55 60                                                        |
| [0077] | Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile |

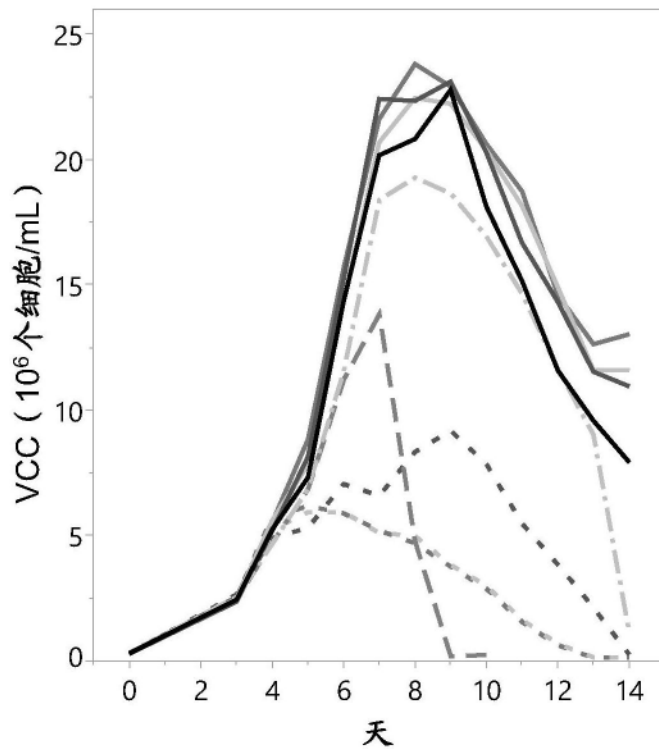
|        |                                                                 |     |     |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| [0078] | 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| [0079] | Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly |     |     |     |
| [0080] |                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| [0081] | Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys |     |     |     |
| [0082] |                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| [0083] | <210> 8                                                         |     |     |     |
| [0084] | <211> 116                                                       |     |     |     |
| [0085] | <212> PRT                                                       |     |     |     |
| [0086] | <213> 人工序列                                                      |     |     |     |
| [0087] | <220>                                                           |     |     |     |
| [0088] | <223> 人源化的                                                      |     |     |     |
| [0089] | <400> 8                                                         |     |     |     |
| [0090] | Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |     |     |
| [0091] | 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| [0092] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |     |     |     |
| [0093] |                                                                 | 20  | 25  | 30  |
| [0094] | Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |     |     |
| [0095] |                                                                 | 35  | 40  | 45  |
| [0096] | Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val |     |     |     |
| [0097] |                                                                 | 50  | 55  | 60  |
| [0098] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr |     |     |     |
| [0099] | 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| [0100] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |     |     |
| [0101] |                                                                 | 85  | 90  | 95  |
| [0102] | Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu |     |     |     |
| [0103] |                                                                 | 100 | 105 | 110 |
| [0104] | Val Thr Val Ser                                                 |     |     |     |
| [0105] |                                                                 | 115 |     |     |
| [0106] | <210> 9                                                         |     |     |     |
| [0107] | <211> 219                                                       |     |     |     |
| [0108] | <212> PRT                                                       |     |     |     |
| [0109] | <213> 人工序列                                                      |     |     |     |
| [0110] | <220>                                                           |     |     |     |
| [0111] | <223> 人源化的                                                      |     |     |     |
| [0112] | <400> 9                                                         |     |     |     |
| [0113] | Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly |     |     |     |
| [0114] | 1                                                               | 5   | 10  | 15  |
| [0115] | Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala |     |     |     |
| [0116] |                                                                 | 20  | 25  | 30  |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0117] | Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala |
| [0118] | 35 40 45                                                        |
| [0119] | Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro |
| [0120] | 50 55 60                                                        |
| [0121] | Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile |
| [0122] | 65 70 75 80                                                     |
| [0123] | Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly |
| [0124] | 85 90 95                                                        |
| [0125] | Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys |
| [0126] | 100 105 110                                                     |
| [0127] | Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu |
| [0128] | 115 120 125                                                     |
| [0129] | Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe |
| [0130] | 130 135 140                                                     |
| [0131] | Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln |
| [0132] | 145 150 155 160                                                 |
| [0133] | Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser |
| [0134] | 165 170 175                                                     |
| [0135] | Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu |
| [0136] | 180 185 190                                                     |
| [0137] | Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser |
| [0138] | 195 200 205                                                     |
| [0139] | Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys                     |
| [0140] | 210 215                                                         |
| [0141] | <210> 10                                                        |
| [0142] | <211> 444                                                       |
| [0143] | <212> PRT                                                       |
| [0144] | <213> 人工序列                                                      |
| [0145] | <220>                                                           |
| [0146] | <223> 人源化的                                                      |
| [0147] | <400> 10                                                        |
| [0148] | Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |
| [0149] | 1 5 10 15                                                       |
| [0150] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |
| [0151] | 20 25 30                                                        |
| [0152] | Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |
| [0153] | 35 40 45                                                        |
| [0154] | Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val |
| [0155] | 50 55 60                                                        |

|        |                                                                 |
|--------|-----------------------------------------------------------------|
| [0156] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr |
| [0157] | 65 70 75 80                                                     |
| [0158] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| [0159] | 85 90 95                                                        |
| [0160] | Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu |
| [0161] | 100 105 110                                                     |
| [0162] | Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu |
| [0163] | 115 120 125                                                     |
| [0164] | Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys |
| [0165] | 130 135 140                                                     |
| [0166] | Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser |
| [0167] | 145 150 155 160                                                 |
| [0168] | Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser |
| [0169] | 165 170 175                                                     |
| [0170] | Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser |
| [0171] | 180 185 190                                                     |
| [0172] | Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn |
| [0173] | 195 200 205                                                     |
| [0174] | Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro |
| [0175] | 210 215 220                                                     |
| [0176] | Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe |
| [0177] | 225 230 235 240                                                 |
| [0178] | Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val |
| [0179] | 245 250 255                                                     |
| [0180] | Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe |
| [0181] | 260 265 270                                                     |
| [0182] | Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro |
| [0183] | 275 280 285                                                     |
| [0184] | Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr |
| [0185] | 290 295 300                                                     |
| [0186] | Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val |
| [0187] | 305 310 315 320                                                 |
| [0188] | Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala |
| [0189] | 325 330 335                                                     |
| [0190] | Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln |
| [0191] | 340 345 350                                                     |
| [0192] | Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly |
| [0193] | 355 360 365                                                     |
| [0194] | Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro |

|        |                                                                 |     |         |
|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| [0195] | 370                                                             | 375 | 380     |
| [0196] | Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser |     |         |
| [0197] | 385                                                             | 390 | 395 400 |
| [0198] | Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu |     |         |
| [0199] | 405                                                             | 410 | 415     |
| [0200] | Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His |     |         |
| [0201] | 420                                                             | 425 | 430     |
| [0202] | Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys                 |     |         |
| [0203] | 435                                                             | 440 |         |
| [0204] | <210> 11                                                        |     |         |
| [0205] | <211> 220                                                       |     |         |
| [0206] | <212> PRT                                                       |     |         |
| [0207] | <213> 人工序列                                                      |     |         |
| [0208] | <220>                                                           |     |         |
| [0209] | <223> 人源化的                                                      |     |         |
| [0210] | <400> 11                                                        |     |         |
| [0211] | Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly |     |         |
| [0212] | 1 5 10 15                                                       |     |         |
| [0213] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr |     |         |
| [0214] | 20 25 30                                                        |     |         |
| [0215] | Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val |     |         |
| [0216] | 35 40 45                                                        |     |         |
| [0217] | Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val |     |         |
| [0218] | 50 55 60                                                        |     |         |
| [0219] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr |     |         |
| [0220] | 65 70 75 80                                                     |     |         |
| [0221] | Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |     |         |
| [0222] | 85 90 95                                                        |     |         |
| [0223] | Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu |     |         |
| [0224] | 100 105 110                                                     |     |         |
| [0225] | Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu |     |         |
| [0226] | 115 120 125                                                     |     |         |
| [0227] | Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys |     |         |
| [0228] | 130 135 140                                                     |     |         |
| [0229] | Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser |     |         |
| [0230] | 145 150 155 160                                                 |     |         |
| [0231] | Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser |     |         |
| [0232] | 165 170 175                                                     |     |         |
| [0233] | Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser |     |         |

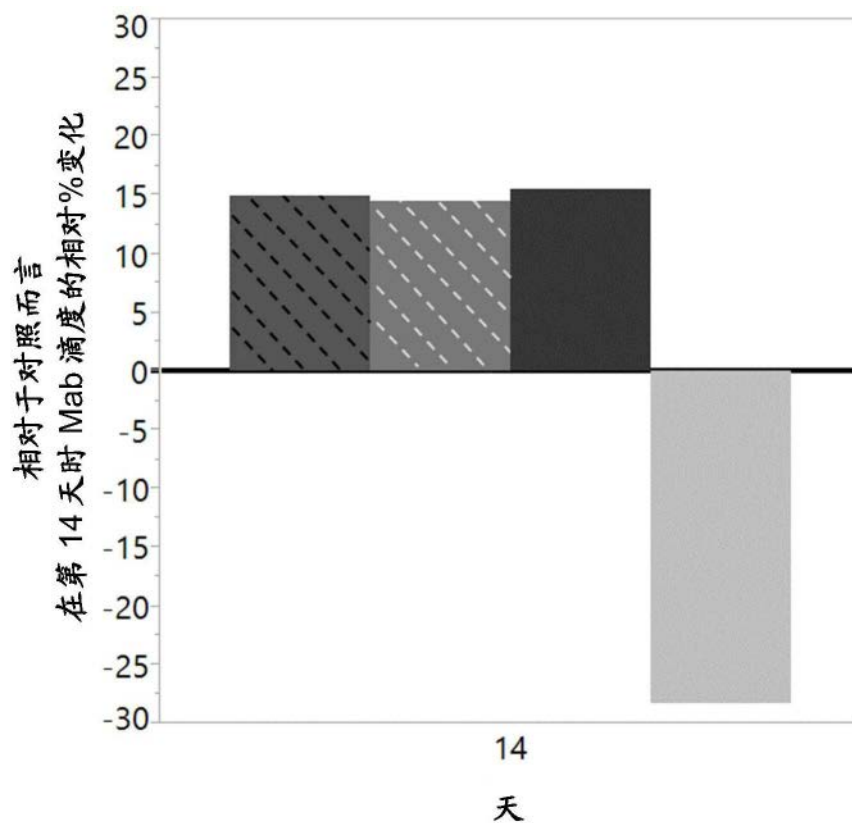
|        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0234] | 180 |     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |
| [0235] | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |
| [0236] | 195 |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| [0237] | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys |     |     |     |     |
| [0238] | 210 |     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |



### 标贴

- 对照 100%半胱氨酸补料
- ..... 100% N-乙酰基-半胱氨酸补料
- ..... 100% N,N'-二乙酰基-胱氨酸补料
- ..... 100% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯补料
- 100% S-磺基半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

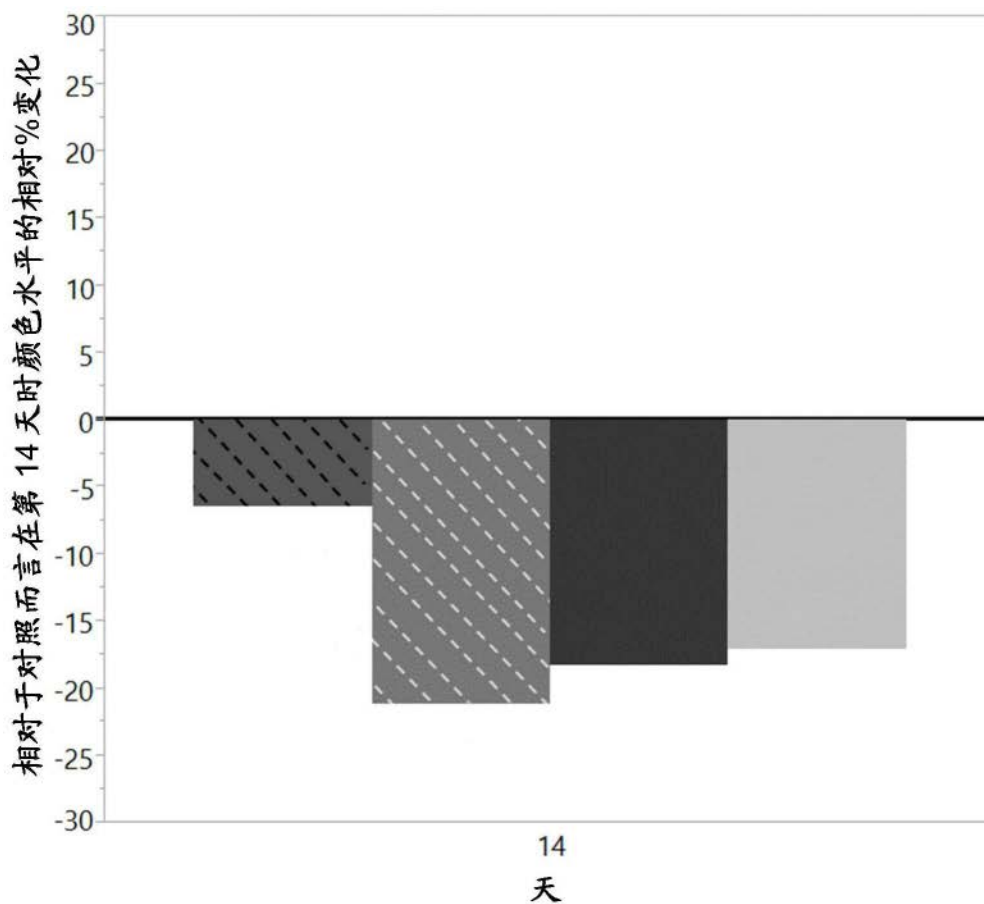
图1:活细胞浓度



#### 标贴

- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

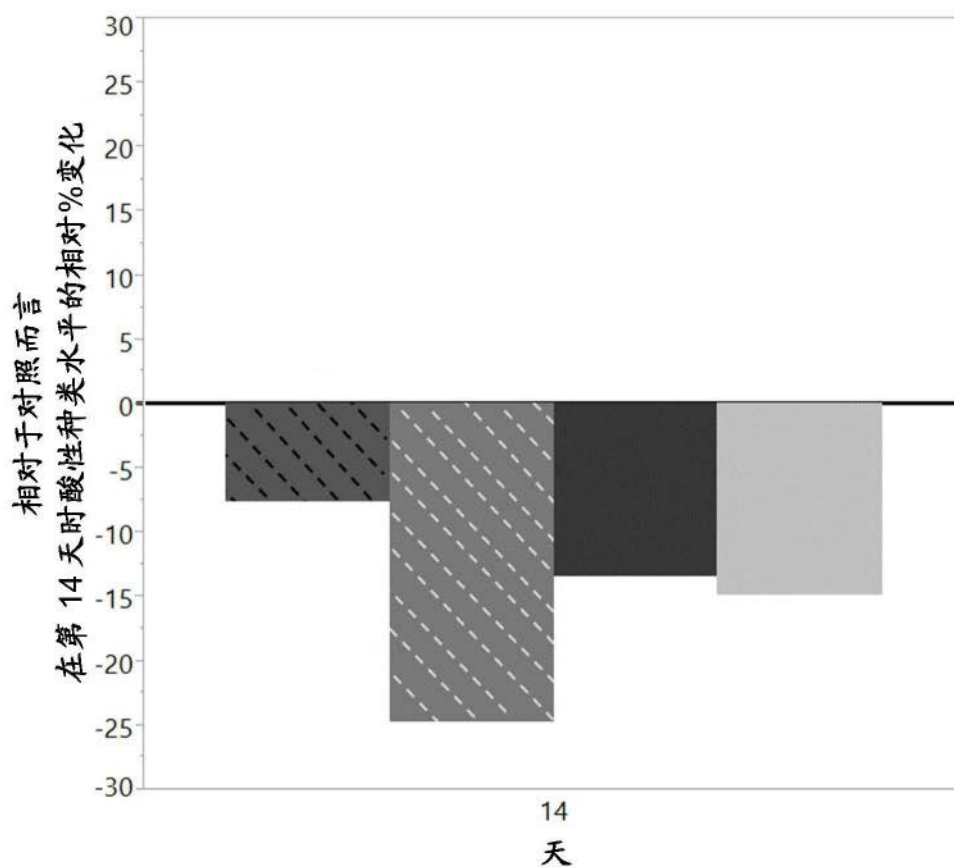
图2:相对于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时Mab滴度的相对%变化



#### 标贴

- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

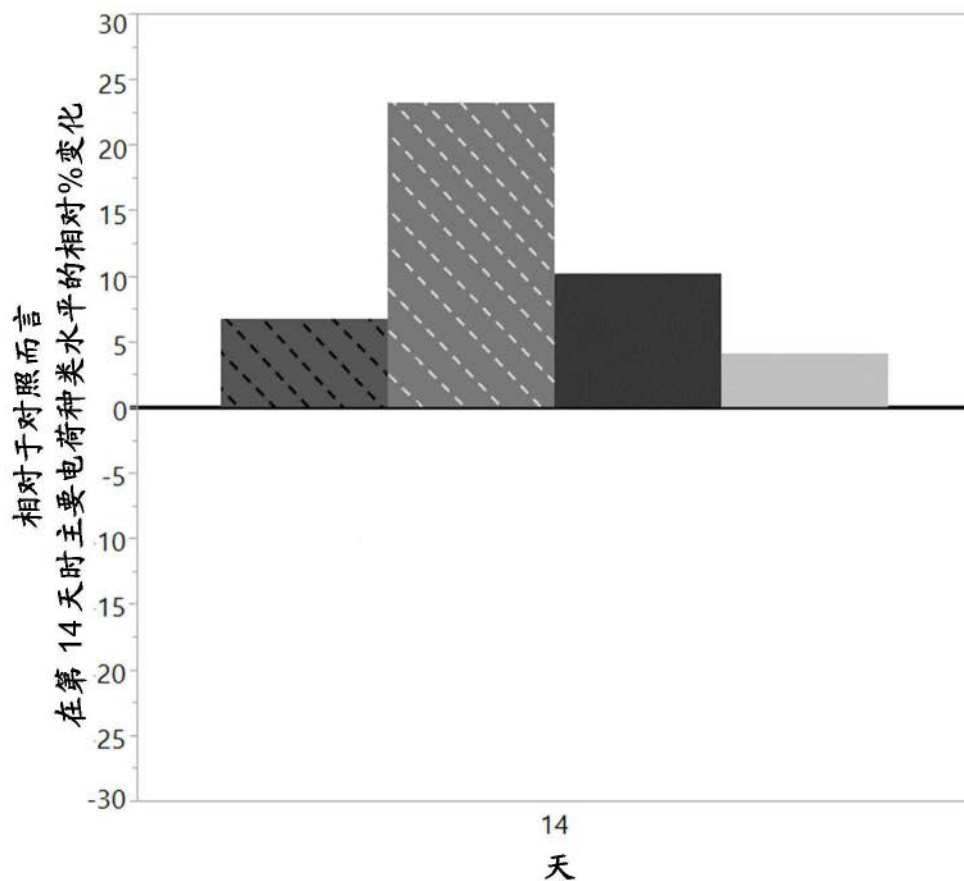
图3:相对于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时颜色强度( $b^*$ 值)水平的相对%变化



#### 标贴

- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

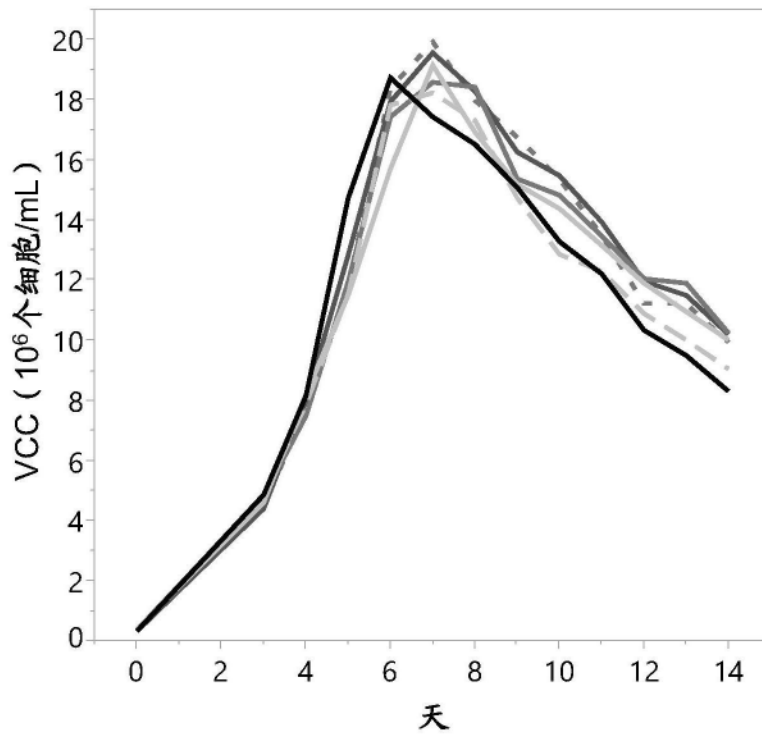
图4: 相对于对照 (100%半胱氨酸补料) 而言在第14天时酸性种类水平的相对%变化



### 标贴

- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

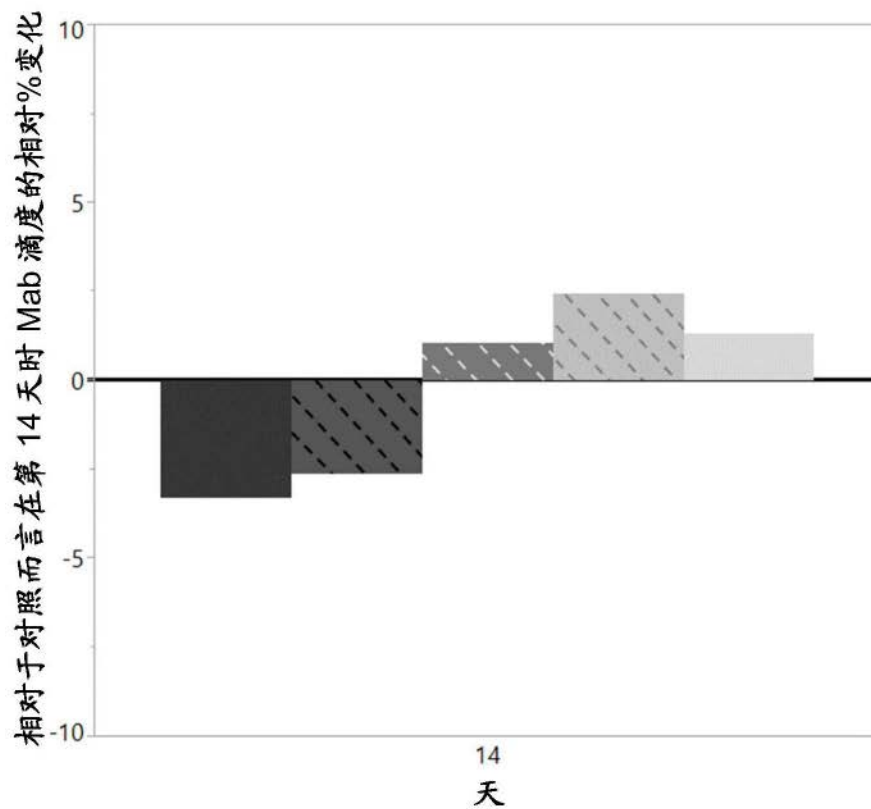
图5:在第14天时的主要电荷种类水平



### 标贴

- 对照 100%半胱氨酸补料 n=2
- ..... 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

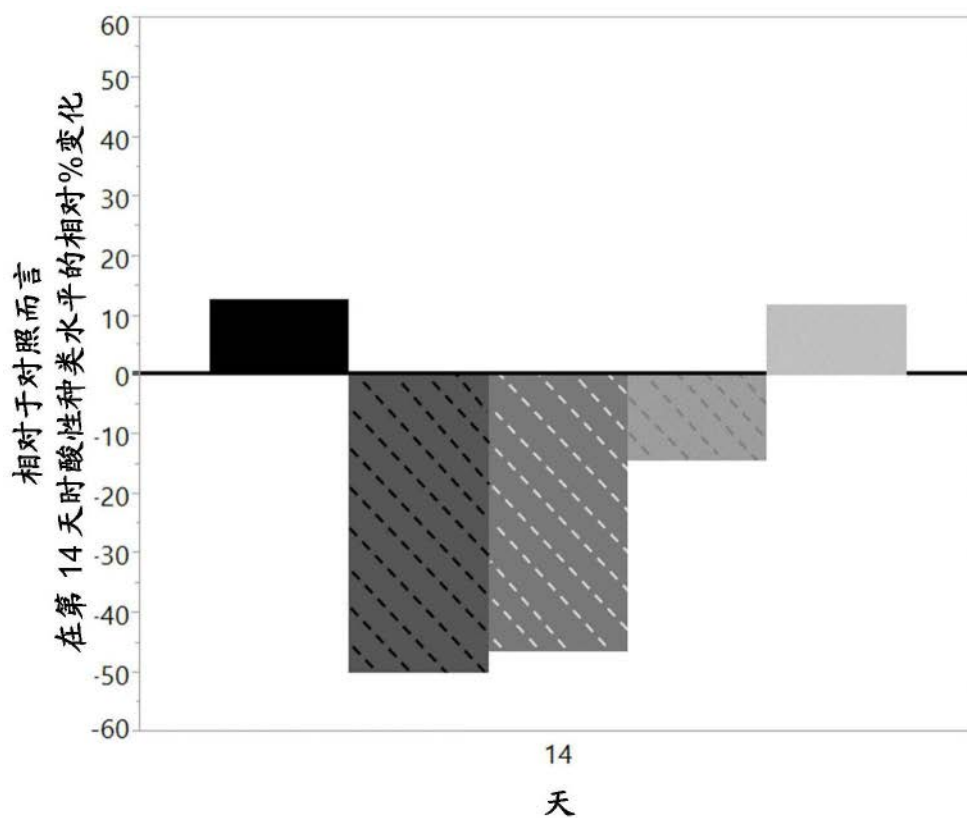
图6:活细胞浓度



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

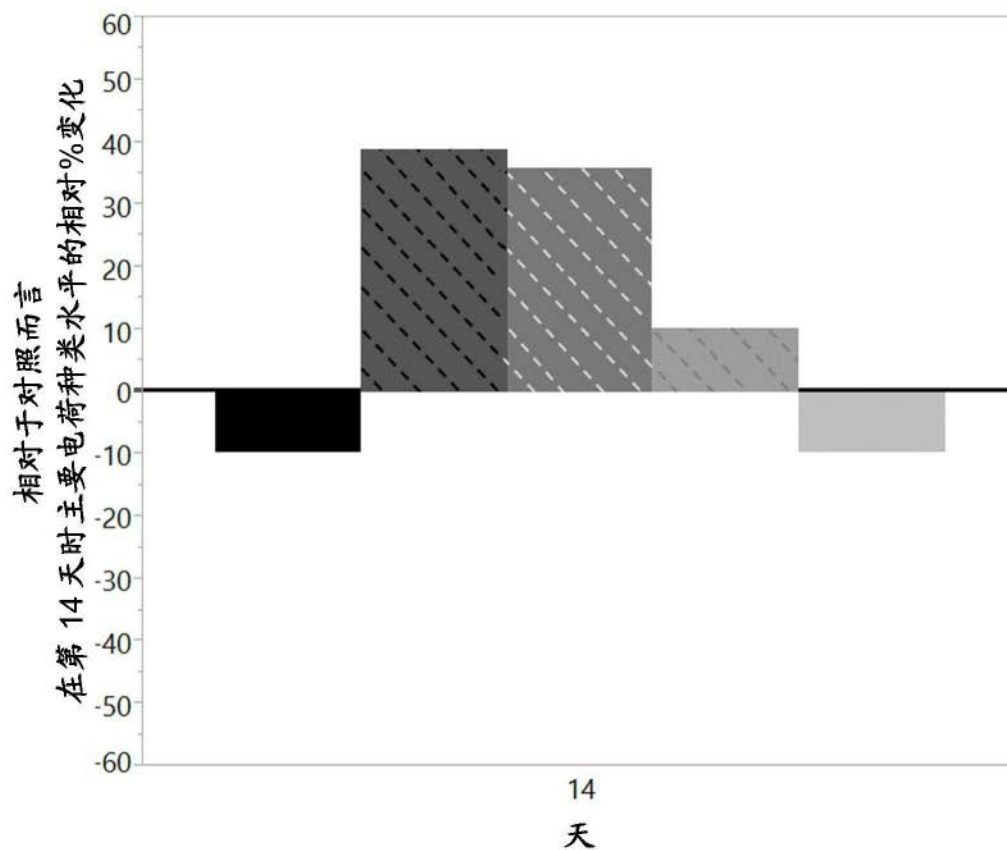
图7:相对于对照(100%半胱氨酸补料)而言在第14天时Mab滴度的相对%变化



#### 标贴

- 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

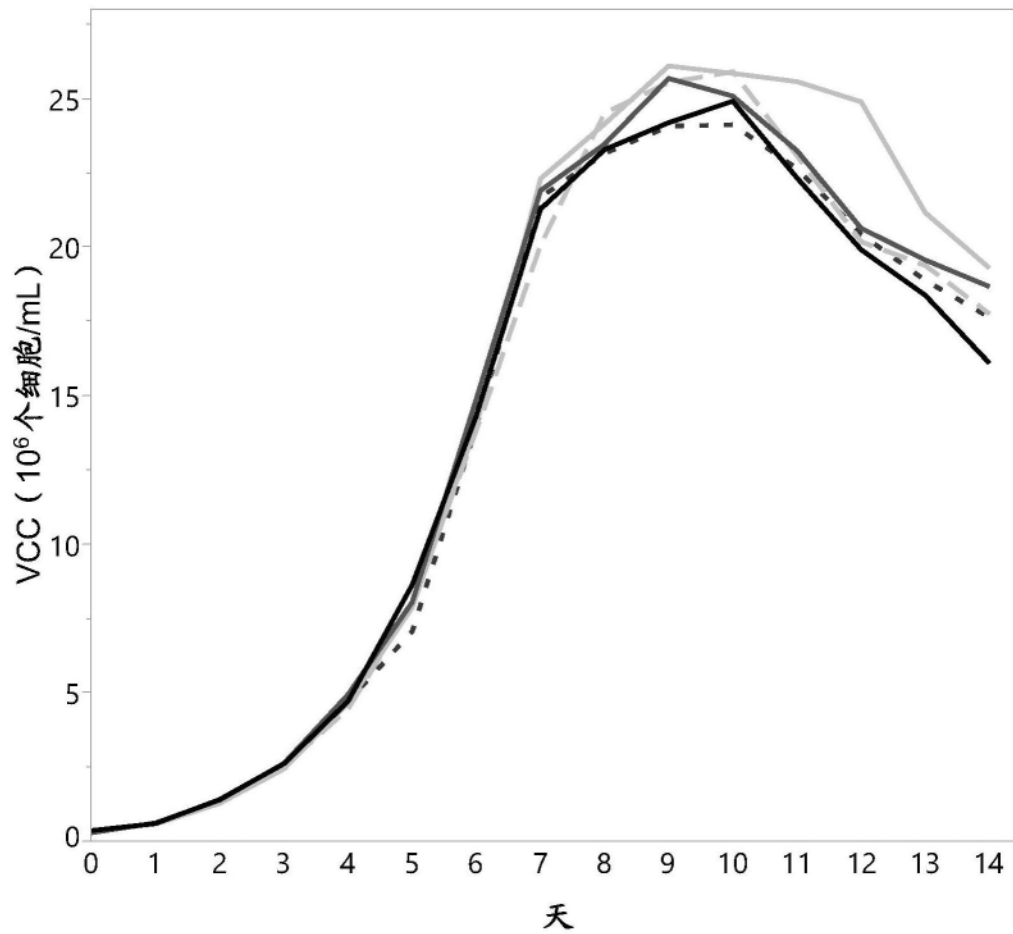
图8:相对于对照 (100%半胱氨酸补料) 而言在第14天时酸性种类水平的相对%变化



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

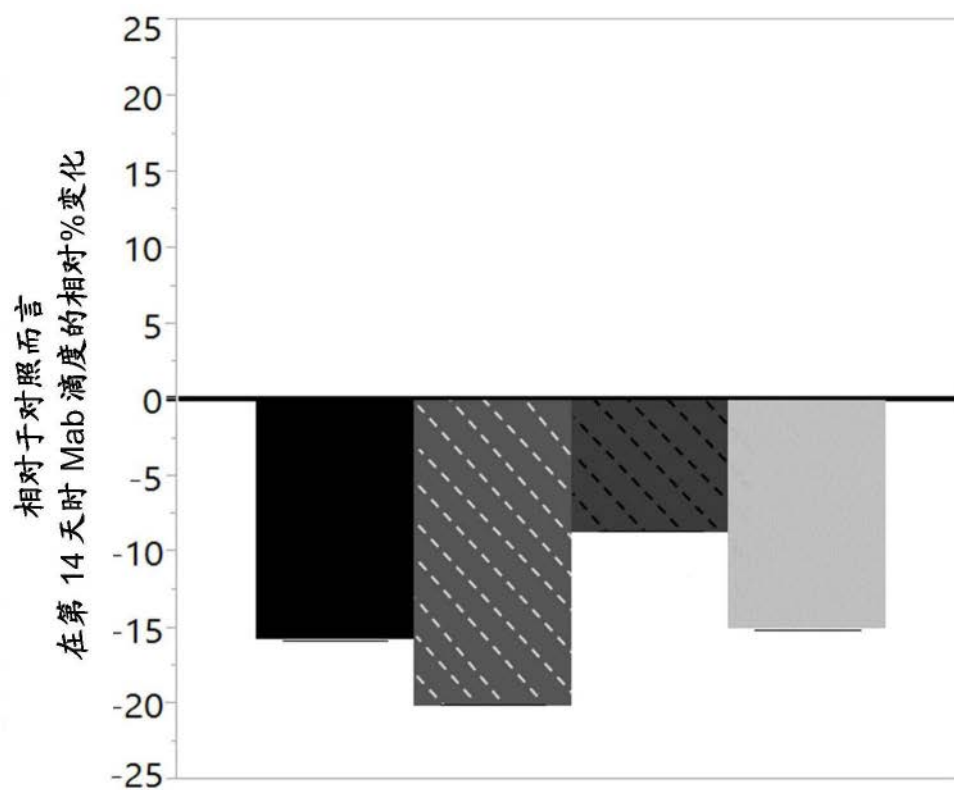
图9: 相对于对照 (100%半胱氨酸补料) 而言在第14天时主要电荷种类水平的相对%变化



### 标贴

- 对照 100%半胱氨酸补料
- ..... 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- - - 50% N,N'-二乙酰基-L-半胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料

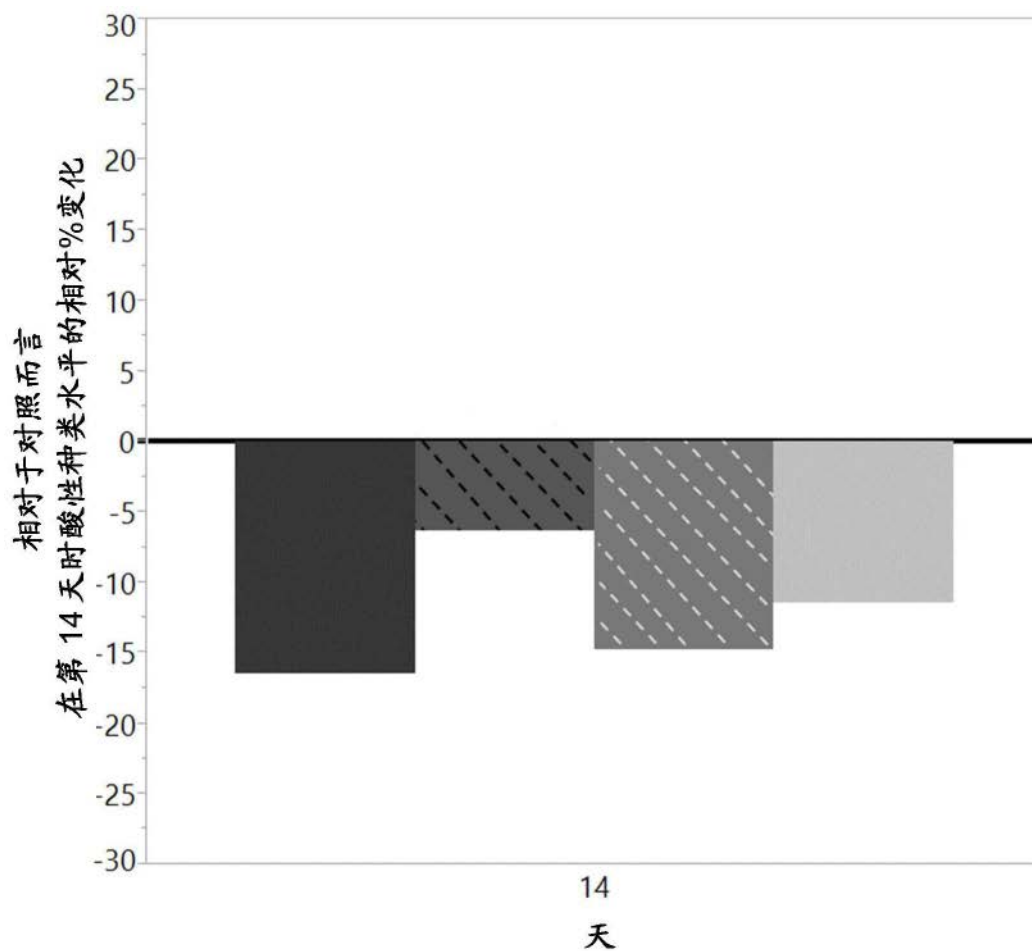
图10:在2L生物反应器中关于细胞系1的细胞生长特性曲线



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

图11:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相对于对照而言Mab滴度的相对%变化

**标贴**

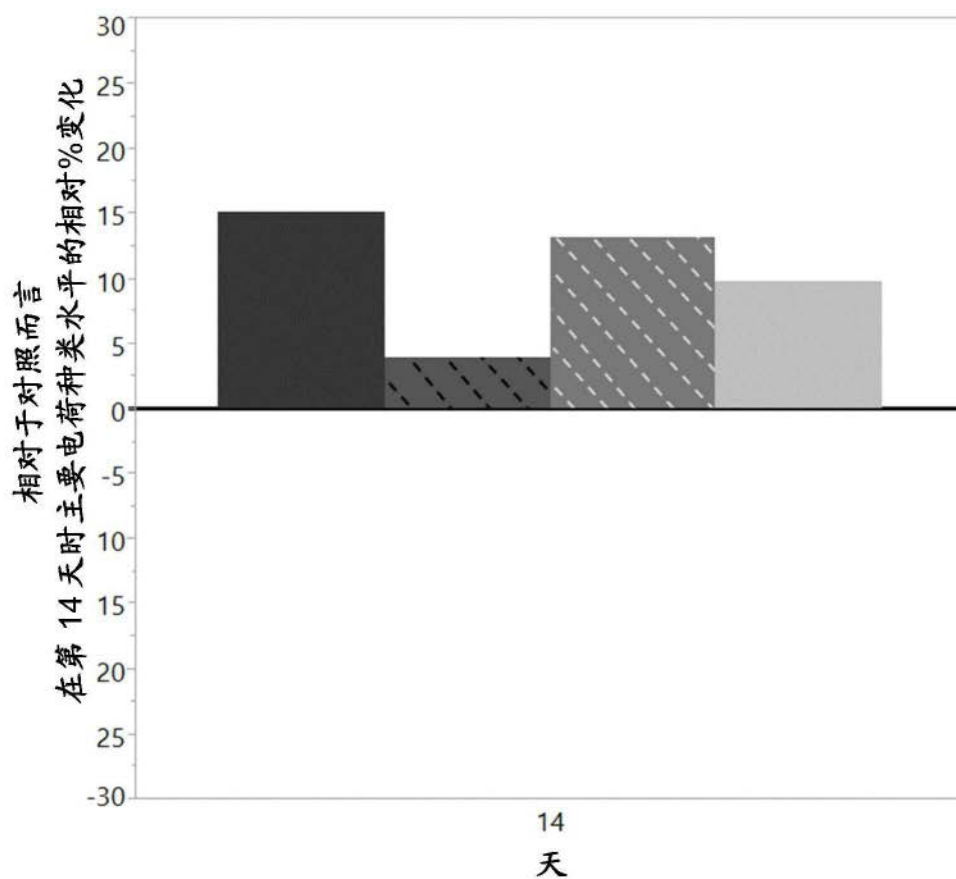
■ 50% 半胱氨酸补料

▨ 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50% 半胱氨酸补料

▩ 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50% 半胱氨酸补料

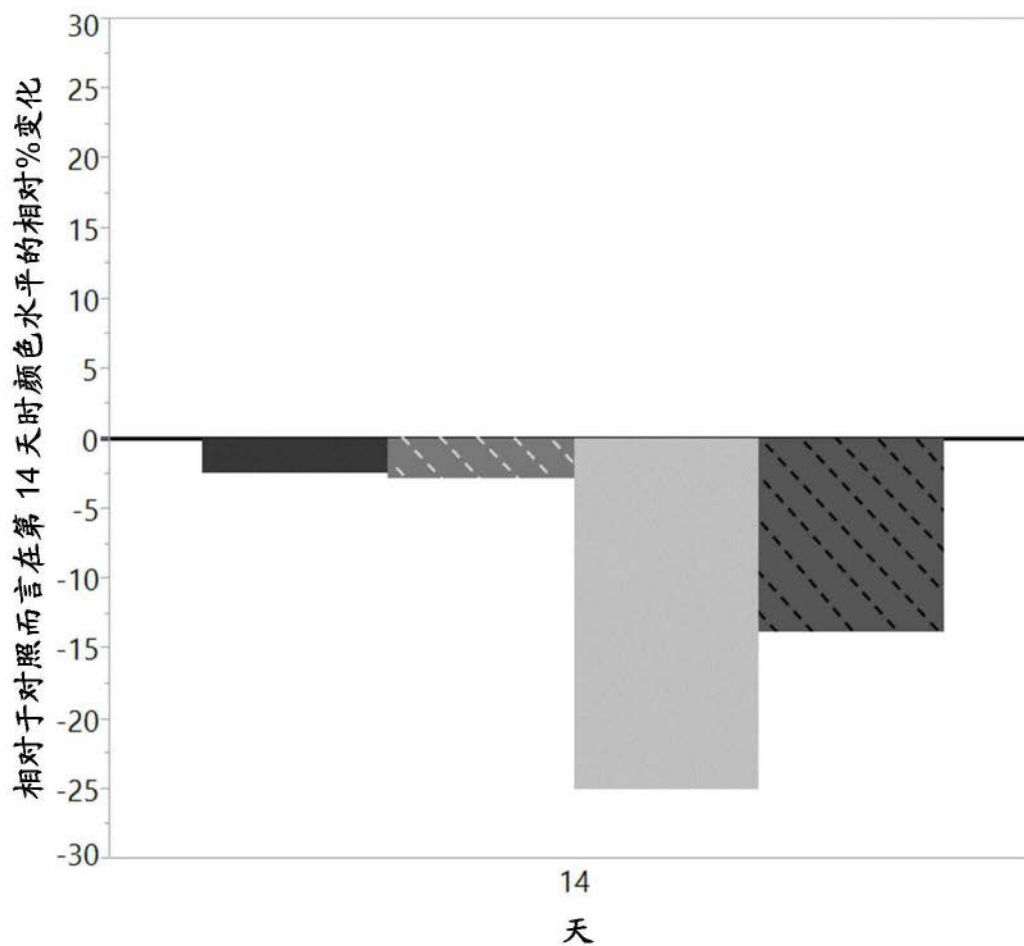
■ 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料

图12:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相对于对照而言酸性种类水平的相对%变化

**标贴**

- 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50% 半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料

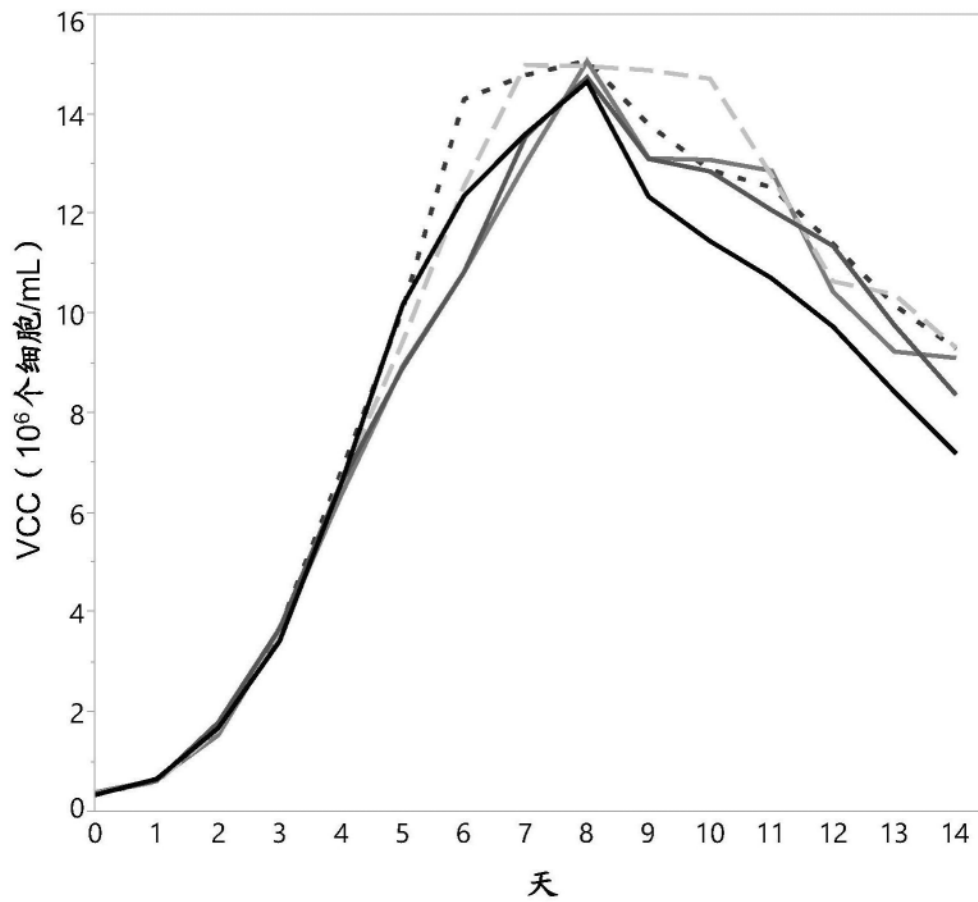
图13: 在2L生物反应器中, 对于细胞系1, 相对于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化



### 标贴

- 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50% 半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料

图14:在2L生物反应器中,对于细胞系1,相对于对照而言颜色强度 (b\* 值) 的相对%变化



标贴

— 对照 100%半胱氨酸补料

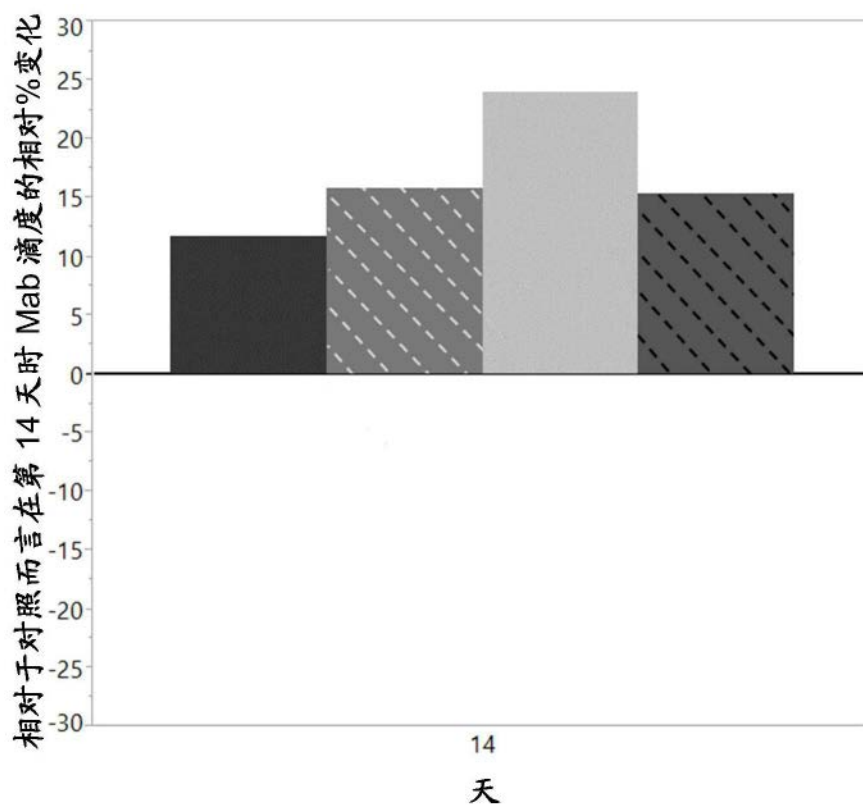
..... 50%半胱氨酸补料

— 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料

--- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料

— 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

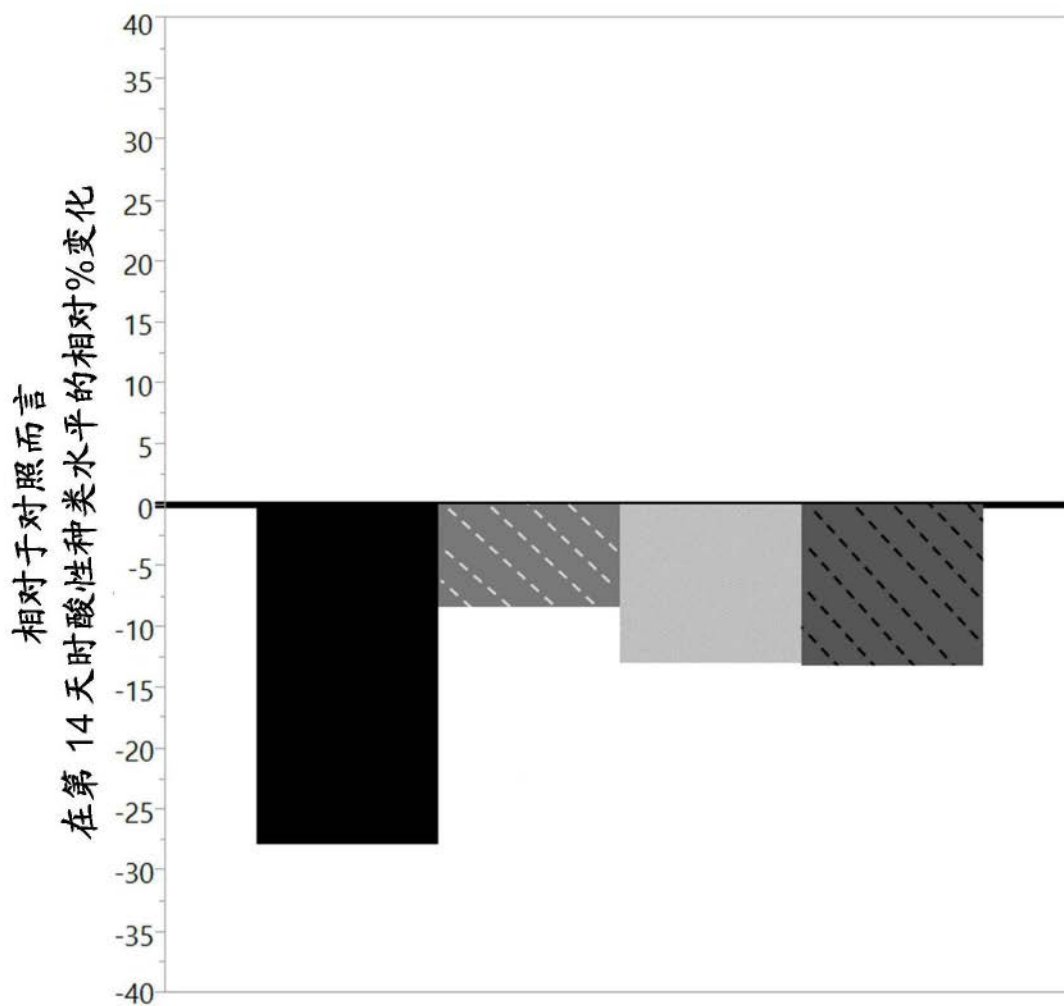
图15:在2L生物反应器中关于细胞系2的细胞生长特性曲线



### 标贴

- 50% 半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50% 半胱氨酸补料

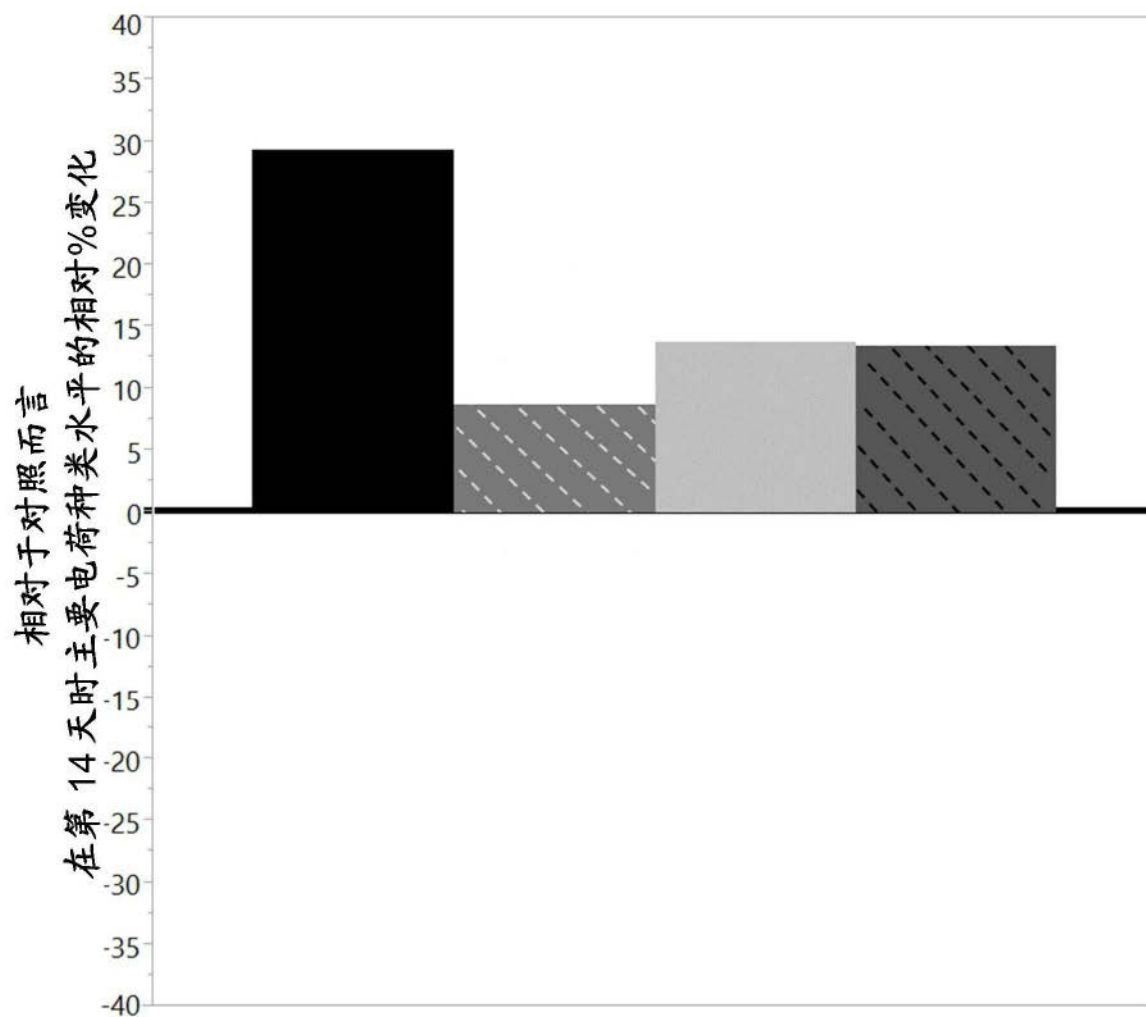
图16: 在2L生物反应器中, 对于细胞系2, 相对于对照而言Mab滴度的相对%变化



### 标贴

- 50% 半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50% 半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50% 半胱氨酸补料

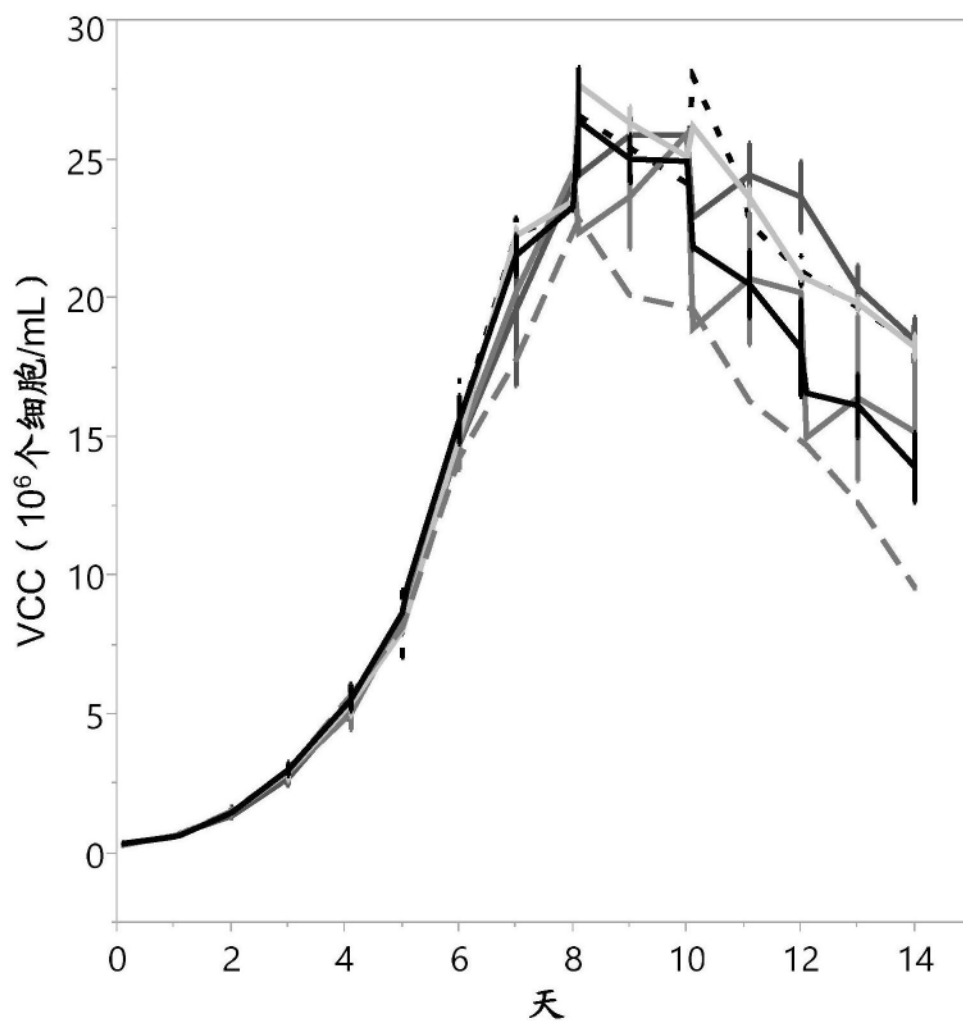
图17:在2L生物反应器中,对于细胞系2,相对于对照而言酸性种类水平的相对%变化



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料

图18: 在2L生物反应器中, 对于细胞系2, 相对于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化



### 标贴

..... 50%半胱氨酸补料 n=2

—— 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2

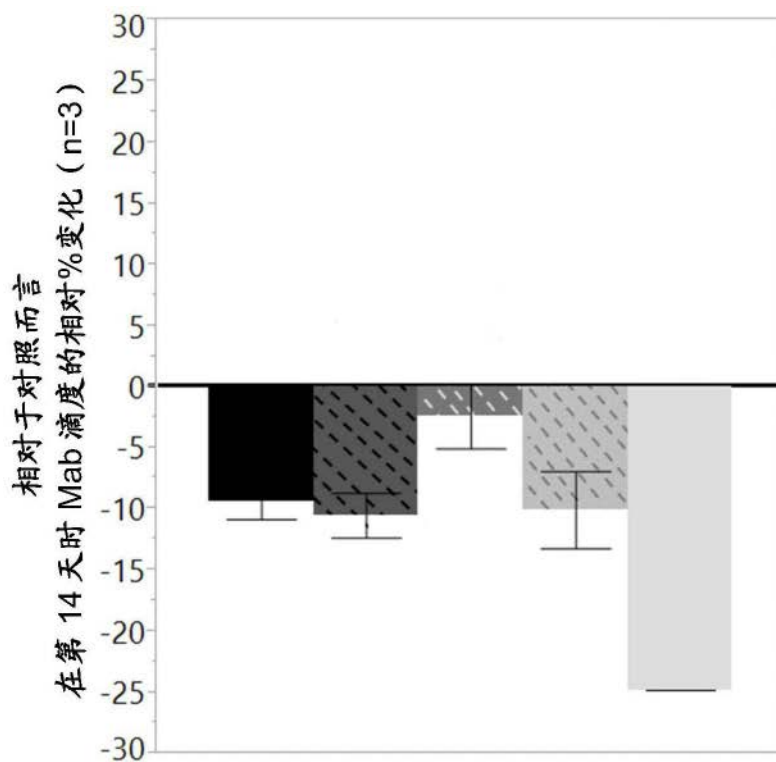
—— 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料 n=2

—— 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2

--- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

—— 对照 100%半胱氨酸补料

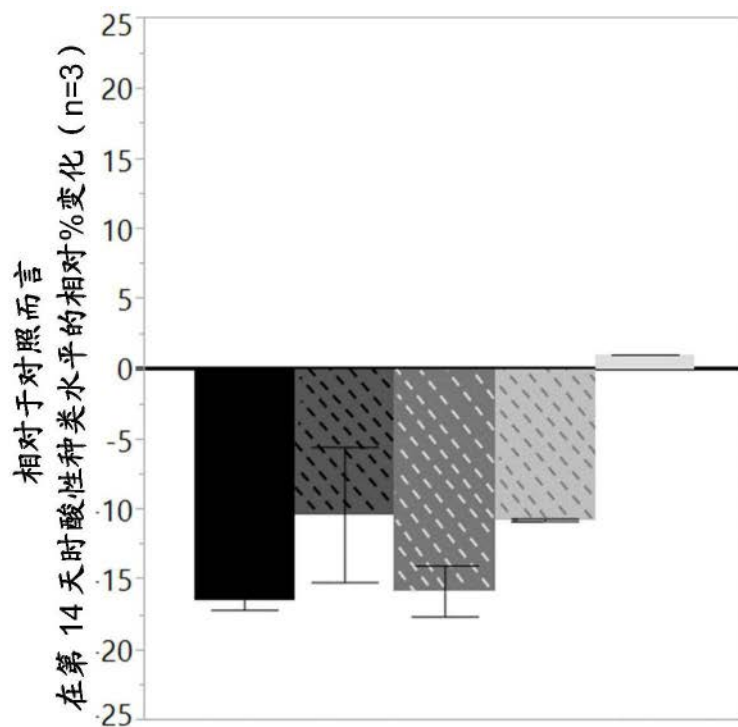
图19:在2L生物反应器中来自数据组1和2的平均细胞生长特性曲线 (误差条=1SD)



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

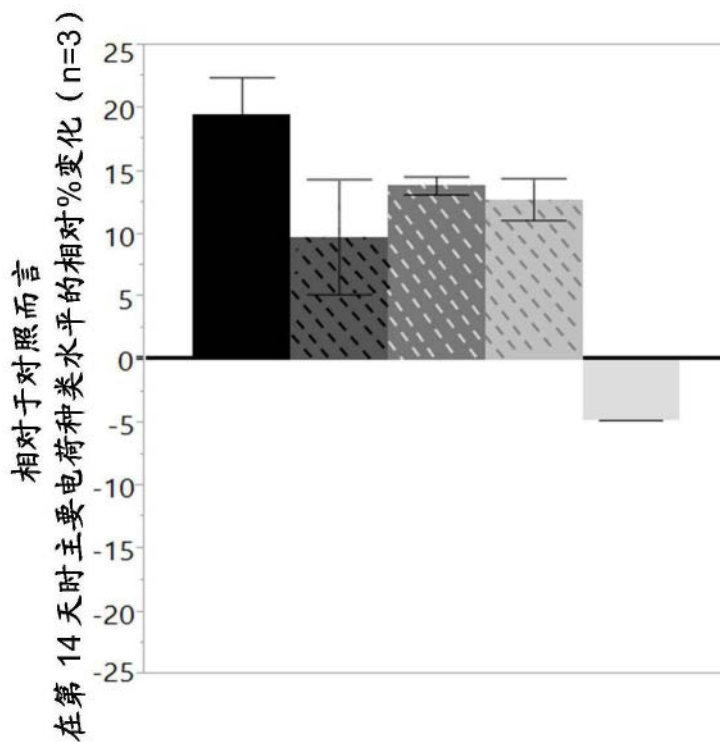
图20: 相对于对照而言Mab滴度的相对%变化。数据组1和2平均值 (误差条=1SD)



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料 n=2
- ▨ 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2
- ▩ 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料 n=2
- ▧ 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

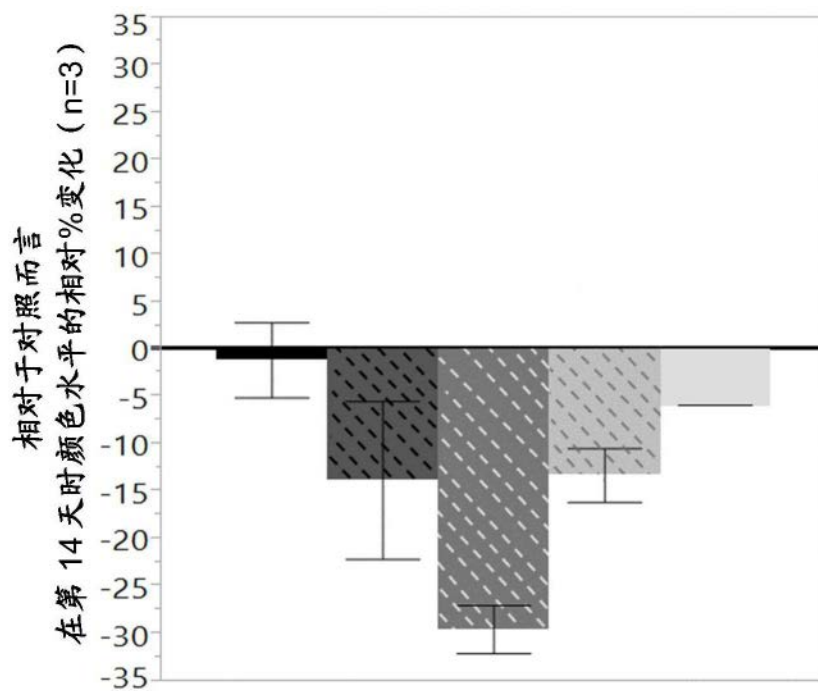
图21:相对于对照而言酸性种类水平的相对%变化。数据组1和2平均值(误差条=1SD)



### 标贴

- 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50%半胱氨酸补料 n=2
- 50% S-磺基半胱氨酸 50%半胱氨酸补料

图22: 相对于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化。数据组1和2平均值 (误差条=1SD)



#### 标贴

- 50% 半胱氨酸补料 n=2
- 50% N,N'-二乙酰基-胱氨酸 50% 半胱氨酸补料 n=2
- 50% N,N'-二乙酰基-L-胱氨酸-二甲基酯 50% 半胱氨酸补料 n=2
- 50% N-乙酰基-半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料 n=2
- 50% S-磺基半胱氨酸 50% 半胱氨酸补料

图23: 相对于对照而言颜色强度 (b\* 值) 的相对%变化。数据组1和2平均值 (误差条=1SD)

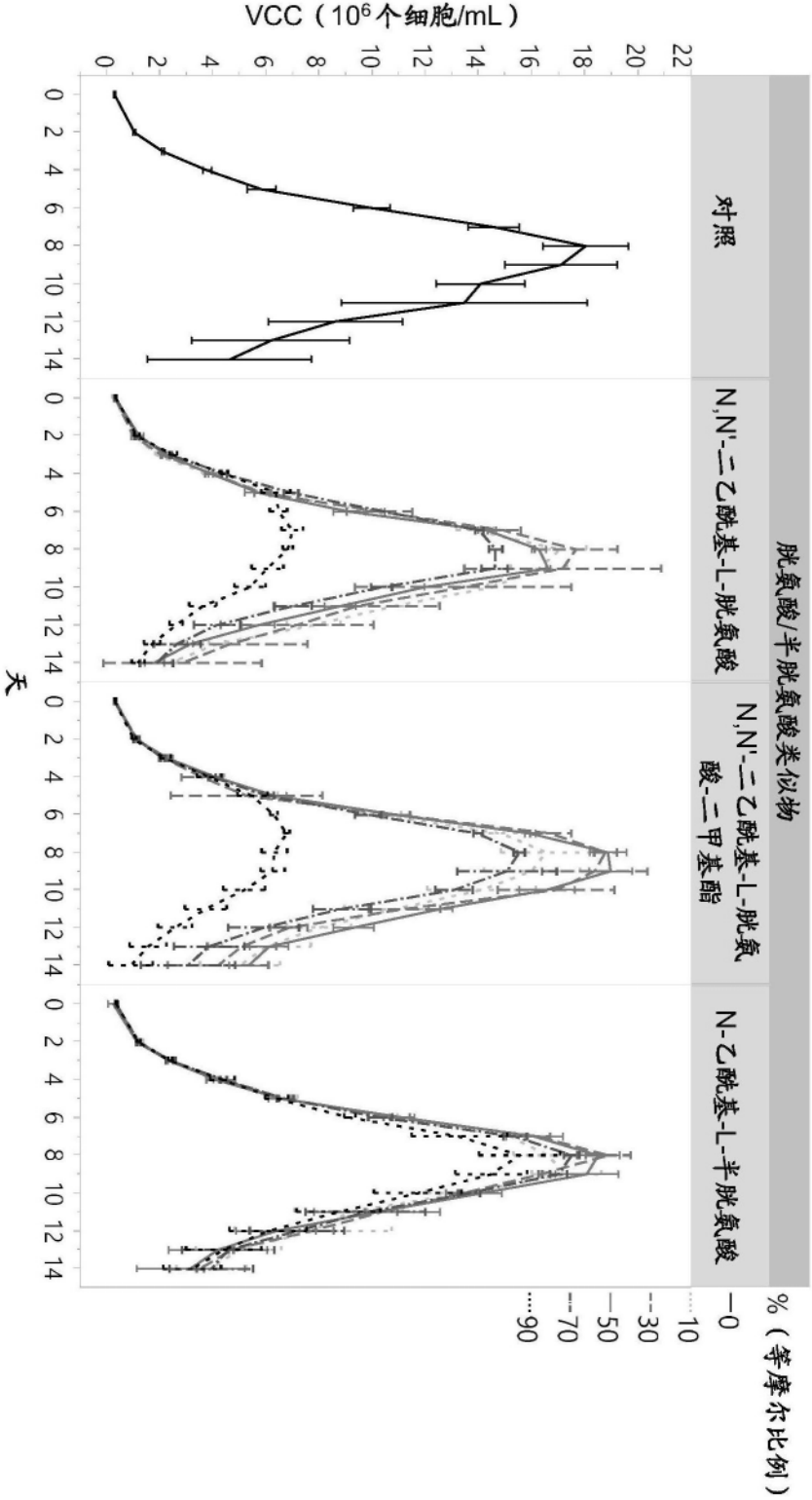


图24: 在15mL生物反应器中关于细胞系1的细胞生长特性曲线

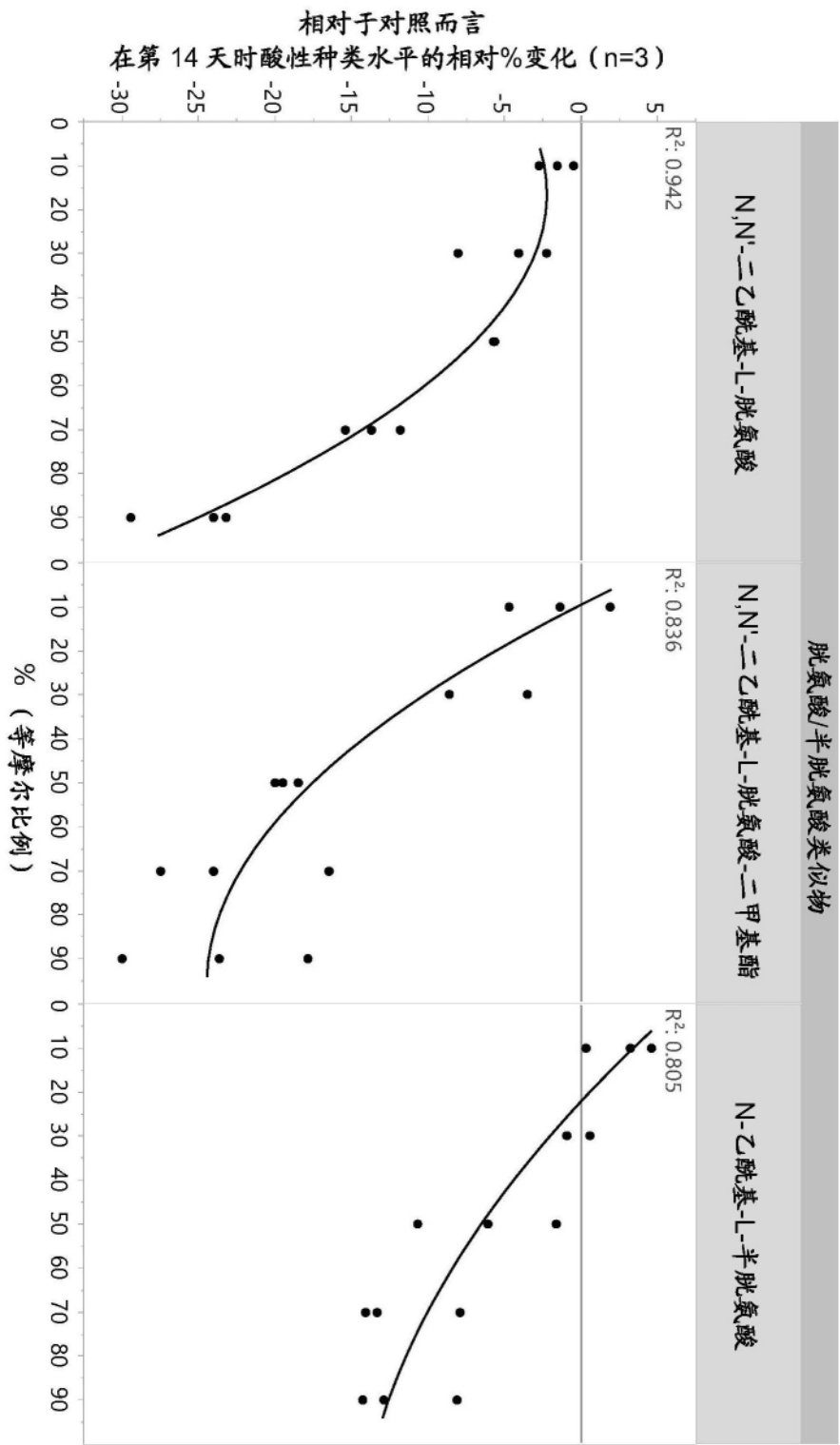


图25:响应于不同的半脱氨酸/脱氨酸类似物水平,相对于对照而言酸性种类水平的相对%变化

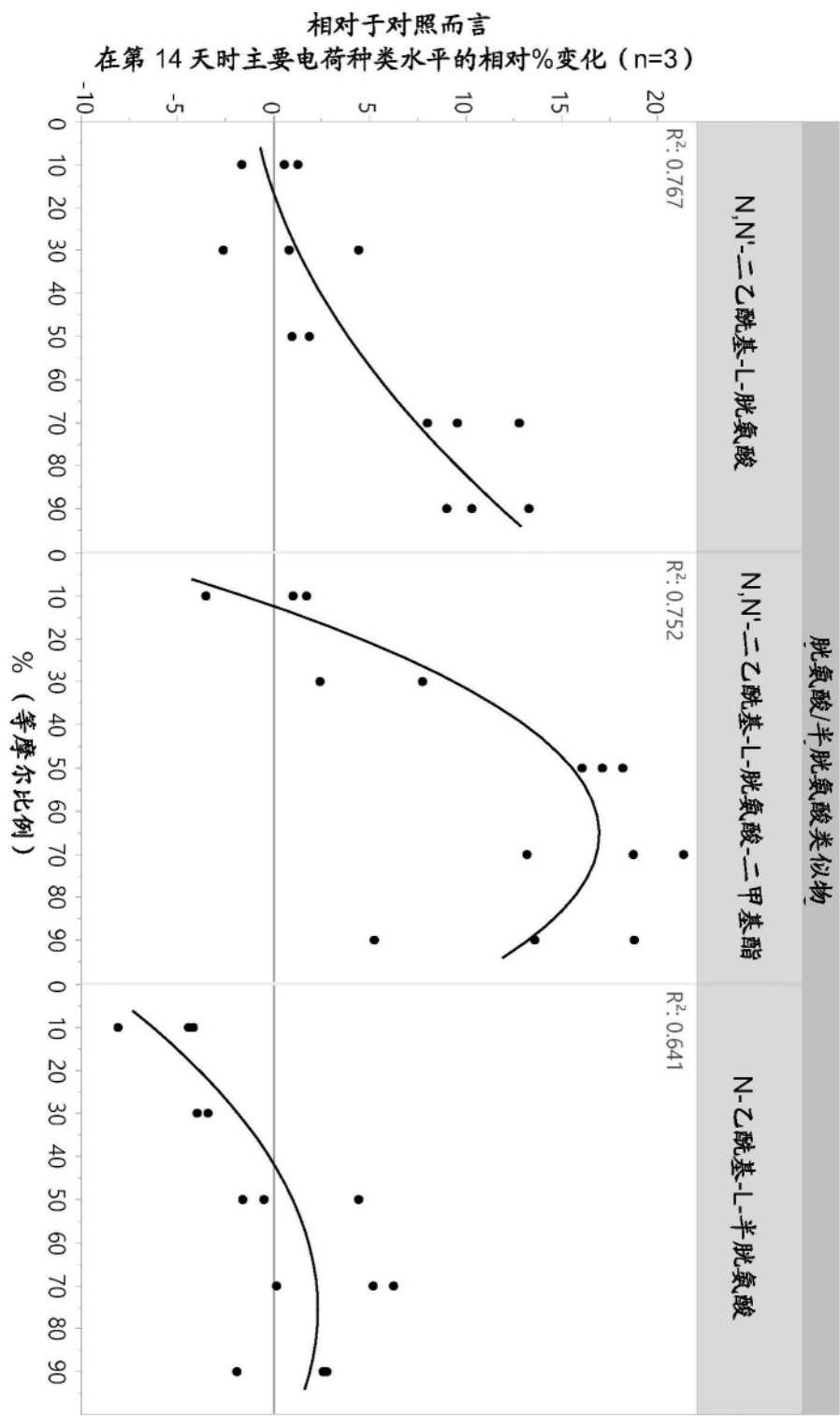


图26: 响应于不同的半胱氨酸/胱氨酸类似物水平, 相对于对照而言主要电荷种类水平的相对%变化