



(21)申請案號：111102192

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 01 月 19 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/07 (2010.01)

C12N15/13 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2021/01/20 美國 63/139,494

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：史密斯 雷吉諾 SMITH, REGINALD (US)；尼科萊蒂 莎拉 NICOLETTI, SARAH (US)；沙士洛夫 維克托 SHASHILOV, VICTOR (US)；王紅霞 WANG, HONGXIA (CN)；吳驥康 WU, JIKANG (CN)；薩瑪米瑞 阿德爾卡德 ZAMAMIRI, ABDELQADER (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：80 項 圖式數：7 共 68 頁

(54)名稱
改良細胞培養中蛋白質效價的方法

(57)摘要

本發明提供使用具有減少之雜質的細胞培養基改良細胞培養中之重組蛋白效價及細胞效價的方法，以及可用於生產具有改良效價之重組蛋白及細胞的具有減少之雜質的細胞培養基。具有減少之雜質的該細胞培養基包含 HEPES 緩衝液，且該等減少之雜質為 HEPES 相關雜質。在某些範疇內，方法及培養基改良蛋白質效價、細胞生長及/或活細胞密度。

Methods of improving recombinant protein titer and cell titer in cell culture using cell culture media having reduced impurities are provided, and well as cell culture media having reduced impurities that can be used for the production of a recombinant protein and cells with improved titer. The cell culture media having reduced impurities comprises a HEPES buffer, and the reduced impurities are HEPES related impurities. In certain aspects, methods and media improve protein titer, cell growth, and/or viable cell density.

指定代表圖：

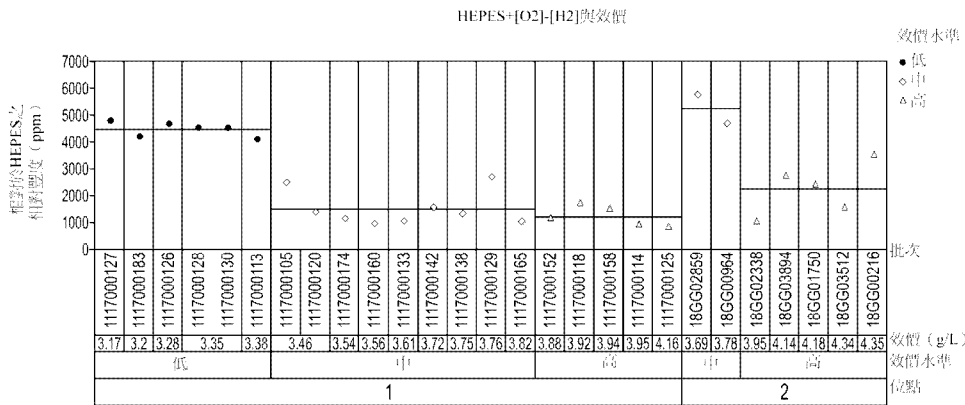


圖1

【發明摘要】

【中文發明名稱】改良細胞培養中蛋白質效價的方法

【英文發明名稱】METHODS OF IMPROVING PROTEIN TITER IN CELL CULTURE

【中文】

本發明提供使用具有減少之雜質的細胞培養基改良細胞培養中之重組蛋白效價及細胞效價的方法，以及可用於生產具有改良效價之重組蛋白及細胞的具有減少之雜質的細胞培養基。具有減少之雜質的該細胞培養基包含 HEPES 緩衝液，且該等減少之雜質為 HEPES 相關雜質。在某些範疇內，方法及培養基改良蛋白質效價、細胞生長及/或活細胞密度。

【英文】

Methods of improving recombinant protein titer and cell titer in cell culture using cell culture media having reduced impurities are provided, and well as cell culture media having reduced impurities that can used for the production of a recombinant protein and cells with improved titer. The cell culture media having reduced impurities comprises a HEPES buffer, and the reduced impurities are HEPES related impurities. In certain aspects, methods and media improve protein titer, cell growth, and/or viable cell density.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】改良細胞培養中蛋白質效價的方法

【英文發明名稱】METHODS OF IMPROVING PROTEIN TITER IN CELL CULTURE

【技術領域】

【0001】本發明係關於用於培養細胞以改良效價及用於生產重組蛋白之方法。本發明具體而言係關於用於使用具有減少之雜質的培養基培養細胞以改良效價及用於生產蛋白質生物醫藥的方法，以及根據該等方法生長之細胞及細胞培養物及由該等細胞及細胞培養物產生之蛋白質。

【先前技術】

【0002】生物藥劑，尤其蛋白質及多肽通常經開發作為新穎生物醫藥產品。產生高含量之特定所關注蛋白質的工程改造細胞對於此等生物醫藥產品之成功商業生產已變得至關重要。細胞培養條件之控制及最佳化各不相同，且對細胞培養中產生之治療蛋白質的含量及品質具有很大影響。

【0003】經由批式或饋料批式製程中之細胞培養來製造蛋白質為習用的。在小瓶解凍之後的接種體生長之早期階段包括在種子培養物（seed culture）中培養細胞。典型地，細胞諸如在種子擴大（seed train）生物反應器中以指數生長速率生長，以便逐漸增加細胞群之大小及/或體積。在細胞塊經由若干生物反應器階段按比例擴大之後，隨後將細胞轉移至饋料批式生產生物反應器中，同時細胞仍處於指數生長（對數期）（Gambhir, A.等人, 2003, *J Bioscience Bioeng* 95(4):317-327）。

【0004】在轉移至饋料批式培養物之後，將細胞培養一段時間，而監測且控制培養基之組成以允許產生所關注蛋白質或多肽。在達至特定產率或細胞存活率之後，廢物累積或營養素耗乏決定應終止培養，分離所產生之蛋白質或多肽。

在過去十年間已在意欲改良重組蛋白產量方面取得諸多顯著進展，當前該產量達至若干公克/公升之效價。蛋白質製造製程，以及細胞株工程改造及細胞培養基以及饋料開發之進展已促成蛋白質產量之增加。舉例而言，最佳化細胞培養基及饋料之方案包括營養素補充及設計化學成分確定的無血清培養基以支持連續細胞生長及最佳產物分泌。

【0005】然而，此項技術中仍需要用於培養細胞之培養基及方法，其中該培養基允許健康且穩健的細胞生長及維持，以及重組蛋白之高效價產生。

【發明內容】

【0006】在一個範疇內，提供一種藉由培養重組真核細胞來改良重組蛋白產生中重組蛋白效價之方法。在某些實施例中，該方法包含（a）提供具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基包含 4-羥乙基哌啶乙磺酸（HEPES）緩衝液，且相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 4000 ppm 之具有分子量（MW）為 267.07 的 HEPES 相關雜質（4000 μ mol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES），且相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 400 ppm 之具有分子量（MW）為 221.06 的 HEPES 相關雜質（400 μ mol HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES）；（b）在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中培養該等重組真核細胞；（c）由該等重組真核細胞表現所關注重組蛋白；及（d）相對於在非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中產生較高效價之該重組蛋白。

【0007】在某些實施例中，相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，重組蛋白之較高效價增加至少約 5%。

【0008】在某些實施例中，真核細胞可為哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞或酵母細胞。在特定實施例中，真核生物細胞可為 CHO 細胞。在其他實施例中，重組蛋白可選擇 Fc 融合蛋白、受體-Fc 融合蛋白、陷阱型蛋白（諸如陷阱

蛋白或微陷阱蛋白)、抗體、抗體片段或 ScFv-Fc 融合蛋白或任何其他重組蛋白，包括本申請案中所揭示之彼等。

【0009】在某些實施例中，所關注重組蛋白之表現可發生在生產期、生長期或兩者期間。在其他實施例中，重組真核細胞在具有減少之雜質的確定細胞培養基中之培養發生在生產期、生長期或兩者期間。

【0010】在又其他實施例中，該等方法改良細胞培養效能，包括改良細胞生長，其中重組真核細胞之培養期間的細胞生長高於非雜質減少之培養基中相似或相同重組真核細胞的細胞生長。

【0011】在本發明之其他範疇內，提供具有減少之雜質的確定細胞培養基。在某些實施例中，培養基包含具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基包含 4-羥乙基哌啶乙磺酸 (HEPES) 緩衝液，且相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 800 ppm 之具有分子量 (MW) 為 267.07 的 HEPES 相關雜質 (800 μmol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES)，且相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 80 ppm 之具有分子量 (MW) 為 221.06 的 HEPES 相關雜質 (80 μmol HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES)。

【0012】在本發明之又其他範疇內，提供一種用於選擇用於細胞培養之確定細胞培養基以改良細胞培養效能的方法。在某些實施例中，該方法一般包含：
(a) 提供包含 4-羥乙基哌啶乙磺酸 (HEPES) 緩衝液之確定細胞培養基；
(b) 分析包含 HEPES 緩衝液之確定細胞培養基，以確定該確定細胞培養基中存在的具有分子量 (MW) 為 267.07 之 HEPES 相關雜質之量及具有分子量 (MW) 為 221.06 之 HEPES 相關雜質之量；
(c) 若確定包含 HEPES 緩衝液之確定細胞培養基相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 4000 ppm 之具有分子量 (MW) 為 267.07 的 HEPES 相關雜質 (4000 μmol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES)，且相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 400 ppm 之具有分子量 (MW) 為 221.06 的 HEPES 相關雜質 (400 μmol

HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES)，則選擇包含 HEPES 緩衝液之確定細胞培養基用於細胞培養；其中相比於非 HEPES 相關雜質減少之培養基中的細胞培養效能，包含相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 4000 ppm 之具有分子量（MW）為 267.07 的 HEPES 相關雜質（4000 μ mol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES），且相對於培養基中 HEPES 緩衝液之總量，具有小於約 400 ppm 之具有分子量（MW）為 221.06 的 HEPES 相關雜質（400 μ mol HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES）之 HEPES 緩衝液之確定細胞培養基之使用改良細胞培養效能。在某些實施例中，改良之細胞培養效能包括改良之細胞培養效價及/或細胞生長。

【0013】在本發明之又其他範疇內，提供一種用於選擇用於細胞培養之 HEPES 緩衝液以改良細胞培養效能的方法。在某些實施例中，該方法一般包含：（a）提供 4-羥乙基哌啶乙磺酸（HEPES）緩衝液；（b）分析 HEPES 緩衝液以確定 HEPES 緩衝液中存在的具有分子量（MW）為 267.07 之 HEPES 相關雜質之量及具有分子量（MW）為 221.06 之 HEPES 相關雜質之量；（c）若確定 HEPES 緩衝液相對於待與細胞培養結合使用之 HEPES 緩衝液的總量，具有小於約 4000 ppm 之具有分子量（MW）為 267.07 的 HEPES 相關雜質（4000 μ mol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES），且相對於待與細胞培養結合使用之 HEPES 緩衝液的總量，具有小於約 400 ppm 之具有分子量（MW）為 221.06 的 HEPES 相關雜質，則選擇該 HEPES 緩衝液用於細胞培養；其中相比於在具有較高量之該等雜質的 HEPES 緩衝液存在下之細胞培養效能，相對於待與細胞培養結合使用之 HEPES 緩衝液的總量，具有小於約 4000 ppm 之具有分子量（MW）為 267.07 的 HEPES 相關雜質（4000 μ mol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES），且相對於待與細胞培養結合使用之 HEPES 緩衝液的總量，具有小於約 400 ppm 之具有分子量（MW）為 221.06 的 HEPES 相關雜質（400 μ mol HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES）的 HEPES 緩衝液之使用改良細胞培養效能。在某些實施例中，改良之細胞培養效能包括改良之細胞

培養效價及/或細胞生長。

【0014】 本發明之其他範疇提供細胞培養物，其包含 (i) 至少一種可表現重組蛋白之重組真核細胞及 (ii) 細胞培養基，其中細胞培養物係藉由包含以下步驟之方法產生：(a) 提供具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES；(b) 在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中培養該等重組真核細胞；(c) 由該等重組真核細胞表現所關注重組蛋白；及 (d) 相對於在非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中產生較高效價之該重組蛋白。

【0015】 真核細胞可選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞及酵母細胞，可選自由以下組成之群：CHO、COS、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞 (Vero)、CV1、腎臟、海拉細胞 (HeLa)、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞的細胞株。舉例而言，真核細胞可為 CHO 細胞。

【0016】 所關注重組蛋白之表現可發生在生產期、生長期或兩者期間。重組真核細胞在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中之培養可發生在生產期、生長期或兩者期間。重組真核細胞之該培養期間的細胞生長可高於相似或相同重組真核細胞在非雜質減少之培養基中的細胞生長。相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，重組蛋白之較高效價可增加至少約 5%。

【0017】 重組蛋白可包含 Fc 域。重組蛋白可為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗體片段、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體(diabody)、三功能抗體(triabody)或四功能抗體(tetrabody)、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG

抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。重組蛋白選自由以下組成之群：抗 PD1 抗體、抗 PDL-1 抗體、抗 Dll4 抗體、抗 ANG2 抗體、抗 AngPt13 抗體、抗 PDGFR 抗體、抗 Erb3 抗體、抗 PRLR 抗體、抗 TNF 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 PCSK9 抗體、抗 GDF8 抗體、抗 GCGR 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、抗 IL4R 抗體、抗 IL6R 抗體、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗 RSV 抗體、抗 NGF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗 CD48 抗體、抗 CD3/抗 CD20 雙特異性抗體、抗 CD3/抗 MUC16 雙特異性抗體及抗 CD3/抗 PSMA 雙特異性抗體。舉例而言，重組蛋白可選自由以下組成之群：阿利庫單抗（alirocumab）、阿替韋單抗（atoltivimab）、瑪替韋單抗（maftivimab）、奧西韋單抗（odesivimab）、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗（casirivimab）、依德單抗（imdevimab）、賽咪單抗（cemiplimab）、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗（dupilumab）、恩維納單抗（evinacumab）、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗（fasimumab）、內斯瓦庫單抗（nesvacumab）、特里沃單抗（trevogrumab）、利努蘇單抗（rinucumab）及賽瑞單抗（sarilumab）。

【0018】重組蛋白亦可選自由以下組成之群：Fc 融合蛋白、受體-Fc 融合蛋白（TRAP）、微陷阱蛋白及 ScFv-Fc 融合蛋白或任何其他重組蛋白。

【0019】本發明之其他範疇提供細胞培養物中產生之重組蛋白，該細胞培養物包含（i）至少一種可表現該重組蛋白之重組真核細胞及（ii）細胞培養基，其中重組蛋白係藉由包含以下步驟之方法產生：（a）提供具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES；（b）在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中培養該等重組真核細胞；（c）由該等重組真核細胞表現所關注重組蛋白；及（d）相對於在非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中產生較高效價之該

重組蛋白。

【0020】真核細胞可選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞及酵母細胞，可選自由以下組成之群：CHO、COS、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞、CV1、腎臟、海拉細胞、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞的細胞株。舉例而言，真核細胞可為 CHO 細胞。

【0021】所關注重組蛋白之表現可發生在生產期、生長期或兩者期間。重組真核細胞在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中之培養可發生在生產期、生長期或兩者期間。重組真核細胞之該培養期間的細胞生長可高於相似或相同重組真核細胞在非雜質減少之培養基中的細胞生長。相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，重組蛋白之較高效價可增加至少約 5%。

【0022】重組蛋白可包含 Fc 域。重組蛋白可為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗體片段、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。重組蛋白選自由以下組成之群：抗 PD1 抗體、抗 PDL-1 抗體、抗 Dll4 抗體、抗 ANG2 抗體、抗 AngPt13 抗體、抗 PDGFR 抗體、抗 Erb3 抗體、抗 PRLR 抗體、抗 TNF 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 PCSK9 抗體、抗 GDF8 抗體、抗 GCGR 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、抗 IL4R 抗體、抗 IL6R 抗體、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗 RSV 抗體、抗 NGF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗 CD48 抗體、抗 CD3/抗 CD20 雙特異性抗體、抗 CD3/抗 MUC16 雙特異性抗體及抗 CD3/抗 PSMA 雙特異性抗體。舉例而言，重組蛋白可選自由以下組成之群：阿利庫單抗、阿替韋

單抗、瑪替韋單抗、奧西韋單抗、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗、依德單抗、賽咪單抗、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗、恩維納單抗、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗、內斯瓦庫單抗、特里沃單抗、利努蘇單抗及賽瑞單抗。

【0023】重組蛋白亦可選自由以下組成之群：Fc 融合蛋白、受體-Fc 融合蛋白（TRAP）、微陷阱蛋白及 ScFv-Fc 融合蛋白或任何其他重組蛋白。

【0024】提供根據本發明之細胞、細胞培養物、重組蛋白及方法。

【0025】雖然本申請案通篇揭示多個實施例，但對熟習此項技術者而言，本發明之再其他實施例將自展示且描述本發明之說明性實施例的以下詳細描述變得顯而易見。如將認識到，本發明能夠在各個範疇內進行修改，所有修改均不背離本發明之精神及範圍。因此，詳細描述應被視為本質上說明性而非限制性的。

【圖式簡單說明】

【0026】圖 1 說明根據本發明之一個實施例，HEPES 相關雜質與蛋白質效價之間的關係。

【0027】圖 2A-2B 說明根據本發明之一個實施例，HEPES 相關雜質與蛋白質效價之間的負相關。圖 2A 係基於來自位點 1 之資料。圖 2B 係基於來自位點 2 之資料。圖 2A 具有一個接近右側之資料點重疊，其亦描繪於圖 1 中批次 1117000128 及批次 1117000130 處。

【0028】圖 3 說明根據本發明之一個實施例，在位點 1 及 2 處 HEPES 相關雜質與蛋白質效價之間的關係。

【0029】圖 4A-4B 說明根據本發明之一個實施例，HEPES 相關雜質與蛋白質效價之間的負相關。圖 4A 係基於來自位點 1 之資料。圖 4B 係基於來自位點 2 之資料。圖 4A 具有兩個資料點重疊。第一個重疊接近於中間，其亦描繪於圖 3 中批次 1117000129 及批次 1117000138 處。第二個重疊接近右側，其亦描繪於圖 3 中批次 1117000128 及批次 1117000130 處。

- 【0030】圖 5A 說明 HEPES 雜質之 HILIC 分離。
- 【0031】圖 5B 說明藉由混合模式管柱分離對 HEPES 雜質進行之分離。
- 【0032】圖 6A 為來自 HEPES 原料之 HEPES-[CH4]（亦稱為「221」）的 RP-LCMS 圖。
- 【0033】圖 6B 為來自 HEPES 原料之 HEPES-[CH4]的 HILIC-LCMS 圖。
- 【0034】圖 7 展示來自 HEPES 原料之 HEPES-[CH4]（亦稱為「221」）的 MS/MS 碎裂。
- 【0035】以下實例僅出於說明性目的而提供，且不意欲限制本發明之範圍。

【實施方式】

【0036】本申請案主張 2021 年 1 月 20 日申請之美國申請案第 63/139,494 號之優先權，且其以引用之方式併入。

【0037】根據本發明之範疇，已出乎意料地發現相對於不具有減少之雜質的細胞培養基，使用具有此類減少之雜質的細胞培養基改良細胞培養效能，包括細胞培養物中細胞之細胞生長及蛋白質產生的改良。

【0038】更特定言之，出乎意料地發現包含 4-羥乙基哌啶乙磺酸（HEPES）緩衝液之細胞培養基中之雜質影響細胞培養效能。根據本發明，已鑑別出影響細胞培養效能（例如蛋白質效價），亦即展現與之強負相關的 HEPES 相關雜質。在一個實施例中，HEPES 相關雜質包含具有分子量（MW）為 267.07 之 HEPES 相關雜質、具有分子量（MW）為 221.06 之 HEPES 相關雜質及其組合。在某些實施例中，發現使用具有減少量之此等 HEPES 相關雜質的細胞培養基相比於不具有此類減少量之 HEPES 相關雜質的細胞培養基，改良細胞培養效能。

【0039】本文所用之章節標題僅用於組織目的而不應理解為限制所描述之主題。除非另外指明，否則本文所描述之方法及技術一般根據此項技術中已知之習知方法且如本說明書通篇所引用及討論之各種一般及更特定文獻中所描述來

進行。參見例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) 及 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), Harlow 及 Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 及 Julio E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 第 2 版, Academic Press, New York, N.Y. (1998), 以及 Dieffenbach 及 Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995)。

定義

【0040】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。儘管類似或等效於本文所描述之方法及材料的任何方法及材料可用於本發明之實踐，但現在描述特定方法及材料。

【0041】 在數值及範圍之情形下，術語「約」係指近似或接近所述值或範圍之值或範圍，使得本發明可按預期執行，諸如具有所需速率、量、程度、增加、減少或表現程度、濃度或時間，如自本文所含之教示內容顯而易見。因此，此術語涵蓋之值超出僅由系統誤差引起之值。

【0042】 術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」始終互換使用，且係指包含藉由肽鍵彼此接合之兩個或更多個胺基酸殘基的分子。肽、多肽及蛋白質亦可包括修飾，諸如醮基化、脂質附著、硫酸化、麩胺酸殘基之 γ -羧化、烷基化、羥基化及 ADP 核糖基化。肽、多肽及蛋白質可具有科學或商業利益，包括蛋白質類藥物。肽、多肽及蛋白質尤其包括抗體及嵌合或融合蛋白。使用細胞培養方法藉由重組動物細胞株來產生肽、多肽及蛋白質。

【0043】 如本文所用，術語「異源多核苷酸序列」係指編碼所關注蛋白質之核酸聚合物，該等所關注蛋白質諸如以生物醫藥原料藥形式產生之嵌合蛋白（如陷阱分子）、抗體或抗體部分（例如 VH、VL、CDR3）。異源多核苷酸序列

可藉由基因工程技術（例如，諸如編碼嵌合蛋白之序列，或密碼子最佳化序列、無內含子序列等）來製造且引入至細胞中，其中異源多核苷酸序列可以游離基因體形式駐存或整合至細胞之基因體中。異源多核苷酸序列可為引入至產生細胞基因體內之異位位點中之天然存在的序列。異源多肽序列可為來自另一生物體之天然存在的序列，諸如編碼人類異種同源物之序列。

【0044】「抗體」係指由四條多肽鏈，亦即藉由二硫鍵互連之兩條重（H）鏈及兩條輕（L）鏈組成的免疫球蛋白分子。各重鏈具有重鏈可變區（HCVR 或 VH）及重鏈恆定區。重鏈恆定區含有三個域，CH1、CH2 及 CH3。各輕鏈具有輕鏈可變區及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區由一個域（CL）組成。VH 及 VL 區可進一步細分成被稱為互補決定區（CDR）之高變區，穿插有被稱為架構區（FR）之較保守區。各 VH 及 VL 由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個 CDR 及四個 FR 構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。術語「抗體」包括對屬於任何同型或子類之醮基化及非醮基化免疫球蛋白兩者的參考。術語「抗體」包括藉由重組手段製備、表現、產生或分離之抗體分子，諸如自經轉染以表現抗體之宿主細胞中分離的抗體。術語抗體亦包括雙特異性抗體，其包括可結合至超過一個不同抗原決定基之異源四聚體免疫球蛋白。雙特異性抗體一般描述於美國專利申請公開案第 2010/0331527 號中。

【0045】術語抗體之「抗原結合部分」（或「抗體片段」）係指抗體保留特異性結合至抗原之能力的一個或多個片段。涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內之結合片段的實例包括（i）Fab 片段，由 VL、VH、CL 及 CH1 域組成之單價片段；（ii）F(ab')₂ 片段，包含在鉸鏈區處藉由二硫橋鍵連接之兩個 Fab 片段的二價片段；（iii）Fd 片段，其由 VH 及 CH1 域組成；（iv）Fv 片段，其由抗體之單臂的 VL 及 VH 域組成；（v）dAb 片段（Ward 等人(1989) *Nature* 241:544-546），其由 VH 域組成；（vi）分離 CDR；及（vii）scFv，其由 Fv 片段之兩個域 VL 及 VH 組成，該等域藉由合成連接子連接以形成單一蛋白質鏈，其中 VL 及 VH 區配對以形成單價分子。諸如雙功能抗體之其他形式的單

鏈抗體亦涵蓋於術語「抗體」下（參見例如 Holliger 等人(1993) *PNAS USA* 90:6444-6448；Poljak 等人(1994) *Structure* 2:1121-1123）。

【0046】又另外，抗體或其抗原結合部分可以作為藉由抗體或抗體部分與一種或多種其他蛋白質或肽共價或非共價締合而形成的較大免疫黏附分子之一部分。此類免疫黏附分子之實例包括使用鏈黴抗生物素蛋白核心區以製備四聚 scFv 分子（Kipriyanov 等人（1995）*Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101）及使用半胱胺酸殘基、標記肽及 C 端聚組胺酸標籤以製備二價且生物素化之 scFv 分子（Kipriyanov 等人（1994）*Mol. Immunol.* 31:1047-1058）。可使用習知技術，諸如經由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化整個抗體而由整個抗體製備抗體部分，諸如 Fab 及 F(ab')₂ 片段。此外，抗體、抗體部分及免疫黏附分子可使用此項技術中通常已知的標準重組 DNA 技術（參見 Sambrook 等人, 1989）而獲得。

【0047】術語「人類抗體」意欲包括具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體。本發明之人類抗體可包括並非由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基（例如藉由活體外無規或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變），例如在 CDR 且尤其 CDR3 中。然而，如本文所用，術語「人類抗體」並不意欲包括其中衍生自另一哺乳動物物種（諸如小鼠）之生殖系的 CDR 序列已移植至人類架構序列上之抗體。

【0048】如本文所用，術語「重組人類抗體」意欲包括藉由重組手段製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體；自重組組合人類抗體庫分離之抗體；自人類免疫球蛋白基因轉殖基因之動物（例如小鼠）分離之抗體（參見例如 Taylor, L. D.等人, (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295）；或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列之任何其他手段製備、表現、產生或分離之抗體。此類重組人類抗體具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區。然而，在某些實施例中，此類重組人類抗體經受活體外突變誘發（或當使用人類 Ig 序列轉殖基因

動物時，為活體內體細胞突變誘發），且因此重組抗體之 VH 及 VL 區之胺基酸序列為雖然衍生自人類生殖系 VH 及 VL 序列且與其相關，但可能不天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系內的序列。

【0049】「Fc 融合蛋白」包含不另外在自然界中發現在一起之兩種或更多種蛋白質的部分或全部，該等蛋白質中之一者為免疫球蛋白分子之 Fc 部分。包含與抗體衍生之多肽之各種部分（包括 Fc 域）融合的某些異源多肽之融合蛋白的製備已例如由 Ashkenazi 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535, 1991；Byrn 等人, *Nature* 344:677, 1990；及 Hollenbaugh 等人, 「免疫球蛋白融合蛋白之構築（Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins）」，在 *Current Protocols in Immunology*, 增刊 4, 第 10.19.1-10.19.11 頁, 1992 中描述。「受體 Fc 融合蛋白」包含與 Fc 部分偶合之受體的一個或多個細胞外域，Fc 部分在一些實施例中包含鉸鏈區，隨後為免疫球蛋白之 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，Fc 融合蛋白含有結合至一個或多個配位體之兩條或更多條相異受體鏈。舉例而言，Fc 融合蛋白為包含 Fc 之陷阱，諸如 IL-1 陷阱（例如利納西普（riloncept），其含有 IL-1RAcP 配位體結合區與 IL-1R1 細胞外區與 hIgG1 之 Fc 的融合體；參見美國專利第 6,927,044 號）或 VEGF 陷阱（例如阿柏西普（aflibercept），其含有 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 域 2 與 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 域 3 與 hIgG1 之 Fc 的融合體；參見美國專利第 7,087,411 號及第 7,279,159 號）。

【0050】另外，包括微陷阱，其為使用多聚化組分（MC）而非 Fc 部分之陷阱蛋白，且揭示於美國專利第 7,279,159 號及第 7,087,411 號中。

【0051】亦包括以上之衍生物、組分、域、鏈及片段。

【0052】本文所闡述之所有數值限制及範圍包括範圍或限制之數值周圍或其間的所有數值或值。本文所描述之範圍及限制明確地命名且闡述了由範圍或限制定義且涵蓋之所有整數、小數及分數值。因此，除非本文另外指出，否則本文對值範圍之敘述僅意欲用作個別地提及屬於該範圍內之各個別值的簡寫方法，且各個別值係併入本說明書中，如同其在本文中個別地敘述一般。

酸)、微量元素、能量來源、脂質、維生素等。細胞培養基可含有萃取物，例如血清或蛋白腴（水解產物），其供應支持細胞生長之原料。培養基可含有酵母衍生或大豆萃取物，而非動物衍生萃取物。化學成分確定的培養基係指其中所有化學組分已知（亦即具有已知化學結構）的細胞培養基。化學成分確定的培養基完全不含動物衍生組分，諸如血清或動物衍生蛋白腴。在一個實施例中，培養基為化學成分確定的培養基。

【0057】培養基亦可含有增強生長及/或存活高於最小速率及/或比率之組分，包括激素及生長因子。培養基較佳調配至對於細胞存活及增殖最佳之 pH 及鹽濃度。

【0058】在某些範疇內，細胞培養基可為無血清的。「無血清」適用於不含有動物血清（諸如胎牛血清）之細胞培養基。無血清培養基可含有 ≤ 16 g/L 之水解產物，諸如大豆水解產物。本發明亦提供具有減少之雜質的化學成分確定的培養基，其不僅無血清，而且無水解產物。「無水解產物」適用於不含有外源蛋白質水解產物之細胞培養基，該等外源蛋白質水解產物諸如動物或植物蛋白質水解產物，例如蛋白腴、胰腴及其類似物。

【0059】「基礎培養基」為細胞繁殖之初始培養基（例如存在於種子擴大中及/或細胞培養物產生之第 0 天時），且含有所有必需營養素，其包括胺基酸之基礎混合物。基礎培養基之各種配方（亦即調配物）可以可商購批料形式製造或購買。同樣，「基礎饋料培養基」含有通常在生產培養期間消耗且用於饋料策略（針對所謂「饋料批式」培養）中之補充營養素的混合物。各種各樣之基礎饋料培養基為可商購的。「饋料」包括排程添加或以規則時間間隔添加至培養基中，諸如根據包括連續饋料培養系統之方案，如在恆化器中（參見 C. Altamirano 等人, *Biotechnol Prog.* 2001 年 11 月-12 月; 17(6):1032-41），或根據饋料批式製程（Y. M. Huang 等人, *Biotechnol Prog.* 2010 年 9 月-10 月; 26(5): 1400-10）。舉例而言，培養物可每天一次、每隔一天、每三天饋料，或可在所監測之特定培養基組分的濃度落在所需範圍外時進行饋料。

【0060】在不意欲受限制之情況下，本發明可使用多種基礎培養基中之任一者或多者或其組合來實踐。基礎培養基一般為此項技術中已知的且尤其包括伊格爾氏（Eagle's）最低必需培養基（minimal essential media；MEME）（Eagle, *Science*, 1955, 112(3168):501-504）、哈姆氏（Ham's）F12（Ham, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1965, 53:288-293）、F-12 K 培養基、達爾伯克氏（Dulbecco's）培養基、達爾伯克氏改良伊格爾培養基（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1952 年 8 月; 38(8): 747-752）、DMEM/哈姆氏 F12 1:1、特羅韋爾氏（Trowell's）T8、A2 培養基（Holmes 及 Wolf, *Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, 10:389-401）、威茅斯氏（Waymouth）培養基（Davidson 及 Waymouth, *Biochem. J.*, 1945, 39(2):188-199）、威廉斯氏（Williams）E 培養基（William's 等人, *Exp. Cell Res.*, 1971, 69:105 及以下）、RPMI 1640（Moore 等人, *J. Amer. Med. Assoc.*, 1967, 199:519-524）、MCDB 104/110 培養基（Bettger 等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1981, 78(9):5588-5592）、Ventrex HL-1 培養基、白蛋白-球蛋白培養基（Orr 等人, *Appl. Microbiol.*, 1973, 25(1):49-54）、RPMI-1640 培養基、RPMI-1641 培養基、伊斯寇氏（Iscoe's）改良達爾伯克氏培養基、麥考伊氏（McCoy's）5 A 培養基、萊波維茨氏（Leibovitz's）L-15 培養基，及無血清培養基，諸如 EX-CELL™ 300 系列（JRH Biosciences, Lenexa, Kans.）、魚精蛋白-鋅-胰島素培養基（Weiss 等人, 1974, 美國專利第 4,072,565 號）、生物素-葉酸培養基（Cartaya, 1978, US Re30,985）、運鐵蛋白-脂肪酸培養基（Baker, 1982, 美國專利第 4,560,655 號）、運鐵蛋白-EGF 培養基（Hasegawa, 1982, 美國專利號 4,615,977 號；Chessebeuf, 1984, 美國專利第 4,786,599 號）及其他培養基置換（參見 Inlow, 美國專利第 6,048,728 號；Drapeau, 美國專利第 7,294,484 號；Mather, 美國專利第 5,122,469 號；Furukawa, 美國專利第 5,976,833 號；Chen, 美國專利第 6,180,401 號；Chen, 美國專利第 5,856,179 號；Etcheverry, 美國專利第 5,705,364 號；Etcheverry, 美國專利第 7,666,416 號；Ryll, 美國專利第 6,528,286 號；Singh, 美國專利第 6,924,124 號；Luan, 美國專利第 7,429,491 號；及其類似

者)。

【0061】在某些實施例中，本發明之具有減少之雜質的細胞培養基包含含有活細胞培養物之所有必需營養素及 HEPES 緩衝液的基礎培養基。HEPES 緩衝液可為基礎培養基之組分，或其可添加至細胞培養基中。根據本發明之範疇，具有減少之雜質的細胞培養基包括相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於約 4000 ppm 之具有分子量 (MW) 為 267.07 的 HEPES 相關雜質 (4000 μmol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES)，以及相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於 400 ppm 之具有分子量 (MW) 為 221.06 的 HEPES 相關雜質 (400 μmol HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES)。

【0062】舉例而言，相對於存在的 HEPES 緩衝液之量的 HEPES 相關雜質之量一般與相對於培養基中之 HEPES 標準化之雜質豐度相關。舉例而言，可使用標準分析技術，諸如 HPLC、LC-MS 等確定相對量，其中相對量 (雜質，ppm) = 峰面積 (雜質) / 峰面積 (HEPES+HEPES 二聚體+HEPES 加合物) $\times$ 1,000,000。

【0063】在某些實施例中，相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，培養基包括小於約 4000 ppm、小於約 3500 ppm、小於約 3200 ppm、小於約 3000 ppm、小於約 2900 ppm、小於約 2500 ppm、小於約 2200 ppm、小於約 2000 ppm、小於約 1800 ppm、小於約 1500 ppm、小於約 1200 ppm、小於約 1000 ppm、小於約 800 ppm 等之具有分子量 (MW) 為 267.07 之 HEPES 相關雜質。換言之，每莫耳總 HEPES 中有小於約 4000 μmol 、小於約 3500 μmol 、小於約 3200 μmol 、小於約 3000 μmol 、小於約 2900 μmol 、小於約 2500 μmol 、小於約 2200 μmol 、小於約 2000 μmol 、小於約 1800 μmol 、小於約 1500 μmol 、小於約 1200 μmol 、小於約 1000 μmol 、小於約 800 μmol 等之具有 MW 為 267.07 之 HEPES 雜質。在某些實施例中，相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，培養基包括小於約 500 ppm、小於約 450 ppm、小於約 400 ppm、小於約 390 ppm、小於約 370 ppm、小於約 350 ppm、小於約 320

ppm、小於約 300 ppm、小於約 250 ppm、小於約 200 ppm、小於約 150 ppm、小於約 100 ppm、小於約 80 ppm、小於約 75 ppm、小於約 70 ppm 等之具有分子量 (MW) 為 221.06 之 HEPES 相關雜質。換言之，每莫耳總 HEPES 中有小於約 500 μmol 、小於約 450 μmol 、小於約 400 μmol 、小於約 390 μmol 、小於約 370 μmol 、小於約 350 μmol 、小於約 320 μmol 、小於約 300 μmol 、小於約 250 μmol 、小於約 200 μmol 、小於約 150 μmol 、小於約 100 μmol 、小於約 80 μmol 、小於約 75 μmol 、小於約 70 μmol 等之具有 MW 為 221.06 之 HEPES 雜質。

【0064】在某些實施例中，培養基包括相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於約 4000 ppm 之具有分子量 (MW) 為 267.07 的 HEPES 相關雜質 (4000 μmol HEPES 雜質 MW 267.07/莫耳總 HEPES)，以及相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於 400 ppm 之具有分子量 (MW) 為 221.06 的 HEPES 相關雜質 (400 μmol HEPES 雜質 MW 221.06/莫耳總 HEPES)。在其他實施例中，培養基包括相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於約 3900 ppm 之具有分子量 (MW) 為 267.07 的 HEPES 相關雜質，以及相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於 390 ppm 之具有分子量 (MW) 為 221.06 的 HEPES 相關雜質。在其他實施例中，培養基包括相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於約 800 ppm 之具有分子量 (MW) 為 267.07 的 HEPES 相關雜質，以及相對於細胞培養基中存在的 HEPES 緩衝液之量，小於 80 ppm 之具有分子量 (MW) 為 221.06 的 HEPES 相關雜質。如本文所用，1 ppm HEPES 雜質=1 μmol HEPES 雜質/莫耳總 HEPES。

【0065】在其他實施例中，HEPES 緩衝液本身具有減少之 HEPES 相關雜質，如本文所描述。舉例而言，相對於待與細胞培養 (例如在培養基中) 結合使用的 HEPES 緩衝液之總量，HEPES 緩衝液可包括小於約 4000 ppm、小於約 3500 ppm、小於約 3200 ppm、小於約 3000 ppm、小於約 2900 ppm、小於約 2500

ppm、小於約 2200 ppm、小於約 2000 ppm、小於約 1800 ppm、小於約 1500 ppm、小於約 1200 ppm、小於約 1000 ppm、小於約 800 ppm 等之具有分子量 (MW) 為 267.07 之 HEPES 相關雜質。換言之，每莫耳總 HEPES 中有小於約 4000 μmol、小於約 3500 μmol、小於約 3200 μmol、小於約 3000 μmol、小於約 2900 μmol、小於約 2500 μmol、小於約 2200 μmol、小於約 2000 μmol、小於約 1800 μmol、小於約 1500 μmol、小於約 1200 μmol、小於約 1000 μmol、小於約 800 μmol 等之具有 MW 為 267.07 之 HEPES 雜質。在某些實施例中，相對於待與細胞培養（例如在培養基中）結合使用的 HEPES 緩衝液之總量，培養基包括小於約 500 ppm、小於約 450 ppm、小於約 400 ppm、小於約 390 ppm、小於約 370 ppm、小於約 350 ppm、小於約 320 ppm、小於約 300 ppm、小於約 250 ppm、小於約 200 ppm、小於約 150 ppm、小於約 100 ppm、小於約 80 ppm、小於約 75 ppm、小於約 70 ppm 等之具有分子量 (MW) 為 221.06 之 HEPES 相關雜質。換言之，每莫耳總 HEPES 中有小於約 500 μmol、小於約 450 μmol、小於約 400 μmol、小於約 390 μmol、小於約 370 μmol、小於約 350 μmol、小於約 320 μmol、小於約 300 μmol、小於約 250 μmol、小於約 200 μmol、小於約 150 μmol、小於約 100 μmol、小於約 80 μmol、小於約 75 μmol、小於約 70 μmol 等之具有 MW 為 221.06 之 HEPES 雜質。

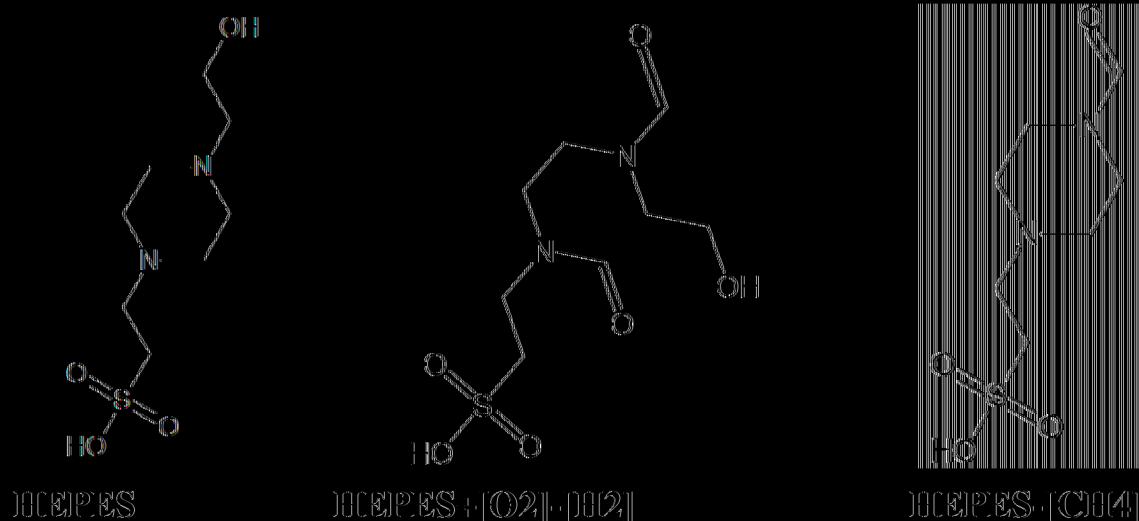
【0066】更特定言之，根據本發明之範疇，HEPES 相關雜質具有表 1 中所呈現之化學式及分子量 (MW)。

表 1

推定 ID	化學式	<i>m/z</i> (負)
HEPES+[O2]-[H2]	C8 H16 N2 O6 S	267.07
HEPES-[CH4]	C7 H14 N2 O4 S	221.06

【0067】儘管不意欲受理論限制，但基於化學式及分子量 (MW)，提出 HEPES 相關雜質之以下化學結構。然而，本發明不限於此等所提出之化學結構的呈現，且對應於 HEPES 相關雜質之化學式及分子量 (MW) 的其他化學結構

設想為在本發明之範圍內。



[(0068)] 細胞培養基亦可定期饋料（如在所謂「饋料批式」培養中），具有或不具有諸如多胺之額外成分或增加濃度的組分，如胺基酸、鹽、糖、維生素、激素、生長因子、緩衝液、抗生素、脂質、微量元素及其類似物，視待培養細胞之需求或所需細胞培養參數而定。

[(0069)] 在某些範疇內，細胞培養基可在重組蛋白產生過程中耗乏胺基酸，其中不提供額外胺基酸補充，或細胞培養基可為「非耗乏」的，其中為耗乏胺基酸提供胺基酸補充（如下文所描述）。

[(0070)] 在一個實施例中，培養基另外含有 100 μM :15 μM 鳥胺酸，或 300 μM :45 μM 鳥胺酸，或 600 μM :90 μM 鳥胺酸，或甚至 900 μM :135 μM 鳥胺酸。在另一實施例中，培養基含有至少約 5 mg/L:1 mg/L 鳥胺酸鹽酸鹽，或至少約 10 mg/L:2 mg/L 鳥胺酸鹽酸鹽、15 mg/L:2.25 mg/L 鳥胺酸鹽酸鹽，或至少約 50 mg/L:7.5 mg/L 鳥胺酸鹽酸鹽，或至少約 100 mg/L:15 mg/L 鳥胺酸鹽酸鹽，或至少約 150 mg/L:22.5 mg/L 鳥胺酸鹽酸鹽。

[(0071)] 可視情況將腐胺添加至補充培養基中。腐胺已以極低濃度作為組分包括於一些細胞培養基調配物中；參見例如 WO 2005/028626，其描述 0.02-0.08 mg/L 腐胺；美國專利第 5,426,699 號（0.08 mg/L）；美國專利第 RE30,985 號（0.16 mg/L）；美國專利第 5,811,299 號（0.27 mg/L）；美國專利第 5,122,469 號（0.5635 mg/L）；美國專利第 5,063,157 號（1 mg/L）；WO 2008/154014

(約 100 至 1000 μM)；美國專利申請案第 2007/0212770 號 (0.5-30 mg/L 多胺；2 mg/L 腐胺；2 mg/L 腐胺+2 mg/L 鳥胺酸；2 mg/L 腐胺+10 mg/L 鳥胺酸)。

【0072】 在一些實施例中，細胞培養基進一步補充有鳥胺酸與腐胺之組合，其中腐胺可呈至少約 150 至 720 μM 之濃度。在一些實施例中，培養基進一步補充有呈約 170 至 230 μM 之濃度的腐胺。在一個實施例中，除 $\geq 90 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ 鳥胺酸以外，培養基亦含有 $200 \mu\text{M} \pm 30 \mu\text{M}$ 腐胺。在一個實施例中，除 $\leq 15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$ 鳥胺酸以外，培養基亦含有 $\leq 30 \text{ mg/L} \pm 4.5 \text{ mg/L}$ 腐胺二鹽酸鹽。在另一實施例中，除 $\geq 15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$ 鳥胺酸鹽酸鹽外，培養基亦含有 $\geq 30 \text{ mg/L} \pm 4.5 \text{ mg/L}$ 腐胺二鹽酸鹽 (參見 2014 年 9 月 18 日公開之國際公開案第 WO2014/144198A1 號)。

【0073】 在再其他實施例中，鳥胺酸以 $0.09 \pm 0.014 \text{ mM}$ 至 $0.9 \pm 0.14 \text{ mM}$ 範圍內，諸如 $0.09 \pm 0.014 \text{ mM}$ 、 $0.3 \pm 0.05 \text{ mM}$ 、 $0.6 \pm 0.09 \text{ mM}$ 或 $0.9 \pm 0.14 \text{ mM}$ 鳥胺酸之濃度存在於培養基中。在一些實施例中，培養基亦含有至少 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 腐胺。在一些實施例中，額外腐胺之濃度在 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 至 $0.714 \pm 0.11 \text{ mM}$ 範圍內，諸如 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 、 0.35 ± 0.06 或 $0.714 \pm 0.11 \text{ mM}$ 腐胺。

【0074】 再其他實施例，培養基可補充有濃度 (以毫莫耳/公升表示) 為至少約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 mM 之牛磺酸。

【0075】 各種其他補充劑可添加至培養基中，且在熟習此項技術者之技能內確定另外適當的條件。在一些實施例中，培養基補充有選自由以下組成之群的胺基酸之混合物：天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、精胺酸、組胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、酪胺酸及色胺酸，以便為非耗乏的或如補充營養素所需。

【0076】 在一個實施例中，培養基進一步補充有約 170 μM 至 175 μM 核苷。

在一個實施例中，培養基含有呈至少 40 μM 、至少 45 μM 、至少 50 μM 、至少 55 μM 、至少 60 μM 、至少 65 μM 、至少 70 μM 、至少 75 μM 、至少 80 μM 、至少 85 μM 、至少 90 μM 、至少 95 μM 、至少 100 μM 或至少 105 μM 之累積濃度的嘌呤衍生物。在一個實施例中，培養基含有約 100 μM 至 110 μM 之嘌呤衍生物。嘌呤衍生物包括次黃嘌呤以及核苷腺苷及鳥苷。在一個實施例中，培養基含有呈至少 30 μM 、至少 35 μM 、至少 40 μM 、至少 45 μM 、至少 50 μM 、至少 55 μM 、至少 60 μM 或至少 65 μM 之累積濃度的嘧啶衍生物。在一個實施例中，培養基含有約 65 μM 至 75 μM 之嘧啶衍生物。嘧啶衍生物包含核苷胸苷、尿苷及胞苷。在一個特定實施例中，培養基含有腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、胸苷及次黃嘌呤。

【0077】 除包含上述添加劑中之任一者以外，在一個實施例中，培養基進一步補充有微莫耳量之脂肪酸（或脂肪酸衍生物）及生育酚。在一個實施例中，脂肪酸包含以下中之任一者或多者：亞麻油酸、次亞麻油酸、硫辛酸、油酸、棕櫚酸、硬脂酸、花生酸、花生四烯酸、月桂酸、二十二烷酸、癸酸、十二烷酸、己酸、二十四烷酸、肉豆蔻酸及辛酸。在一個實施例中，培養基含有生育酚、亞麻油酸及硫辛酸。

【0078】 在一個實施例中，培養基亦可進一步補充有維生素之混合物，其以至少約 700 μM 或至少約 2 mM 之累積濃度包括其他營養素及必需營養素。在一個實施例中，維生素之混合物含有以下中之一者或多者：D-生物素、氯化膽鹼、葉酸、肌醇、菸鹼醯胺、鹽酸吡哆醇、D-泛酸（半鈣）、核黃素、鹽酸硫胺素、維生素 B12 及其類似物。在一個實施例中，維生素之混合物包括 D-生物素、氯化膽鹼、葉酸、肌醇、菸鹼醯胺、鹽酸吡哆醇、D-泛酸（半鈣）、核黃素、鹽酸硫胺素及維生素 B12 中之全部。

【0079】 具有減少之雜質的本發明之培養基的各種實施例包括上述實施例之組合中之任一者，包括化學成分確定之培養基、HEPES 緩衝液，外加尤其（a）胺基酸；（b）視情況選用之核苷；（c）二價陽離子之鹽；（d）脂肪酸及生

育酚；及(e)維生素。

【0080】 在一特定實施例中，具有減少之雜質的細胞培養基可為化學成分確定的，且可包含：HEPES 緩衝液、如本文所論述之胺基酸混合物、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ； KCl ； MgSO_4 ； NaCl ； Na_2HPO_4 或其他磷酸鹽；丙酮酸鹽；D-生物素；氯化膽鹼；葉酸；肌醇；菸鹼醯胺；鹽酸吡哆醇；D-泛酸；核黃素；鹽酸硫胺素；維生素 B12；對胺基苯甲酸；乙醇胺鹽酸鹽；泊洛沙姆 (poloxamer) 188；DL-a-生育酚磷酸酯；亞麻油酸； Na_2SeO_3 ；硫辛酸；及葡萄糖；及視情況選用之腺苷；鳥苷；胞苷；尿苷；胸苷；及次黃嘌呤二鈉。

【0081】 在一個實施例中，本發明之培養基的起始容積滲透濃度為 200-500、250-400、275-350 或約 300 mOsm。在本發明之培養基中之細胞的生長期間，且特定言之，在根據饋料批式方案之任何饋料之後，培養物之容積滲透濃度可增加至多約 350、400、450、500 或至多約 550 mOsm。

【0082】 在其中培養基之容積滲透濃度小於約 300 之一些實施例中，可藉由添加超過所指定量之一種或多種鹽而將容積滲透濃度調整至約 300。在一個實施例中，藉由添加選自以下之一種或多種滲透劑而將容積滲透濃度增加至所需水準：氯化鈉、氯化鉀、鎂鹽、鈣鹽、胺基酸鹽、脂肪酸鹽、碳酸氫鈉、碳酸鈉、碳酸鉀、作為鹽之螯合劑、糖（例如半乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、海藻糖等）及其組合。在一個實施例中，滲透劑經添加至超過且高於其在已存在於確定培養基中之組分中的濃度（例如糖經添加至超過且高於針對糖組分所指定之濃度）。

【0083】 上文所描述之培養基的每一個實施例，以及包括減少量之如本文所描述之 HEPES 相關雜質的任何其他培養基被稱為具有減少之雜質的培養基或具有減少之 HEPES 相關雜質的培養基。相反，包括高於本文所論述之 HEPES 相關雜質含量之量的 HEPES 相關雜質的培養基在下文中稱為非雜質減少之培養基或非 HEPES 相關雜質減少之培養基。在一些實施例中，除存在本文所論述之雜質以外，非雜質減少之培養基包含與具有減少之雜質的培養基相同的基礎

培養基及補充劑。

細胞培養物

【0084】本發明之一個範疇提供一種細胞培養物，其包含在如本文所描述之具有減少之雜質的培養基中表現所關注重組蛋白之細胞株。常規用於產生重組蛋白之細胞株的實例尤其包括初代細胞、BSC 細胞、海拉細胞、HepG2 細胞、LLC-MK 細胞、CV-1 細胞、COS 細胞、非洲綠猴腎細胞、MDBK 細胞、MDCK 細胞、CRFK 細胞、RAF 細胞、RK 細胞、TCMK-1 細胞、LLCPK 細胞、PK15 細胞、LLC-RK 細胞、MDOK 細胞、BHK 細胞、BHK-21 細胞、CHO 細胞、CHO-K1 細胞、NS-1 細胞、MRC-5 細胞、WI-38 細胞、3T3 細胞、293 細胞、Per.C6 細胞及雞胚胎細胞。在一個實施例中，細胞株為 CHO 細胞株，或經最佳化用於大規模蛋白質生產之若干特定 CHO 細胞變異體中的一者或多者，例如 CHO-K1。

【0085】本發明之另一範疇係關於一種使用如本文所描述之具有減少之雜質的培養基培養細胞的方法，其中相比於在非雜質減少之培養基中培養此類細胞，使用此類培養基增強重組真核細胞之生長，同時改良此類細胞之一種或多種所關注重組蛋白的效價且維持細胞存活率，尤其藉由在生產培養及/或種子擴大培養中使用。

【0086】在一些範疇內，相對於在非雜質減少之培養基中生長的細胞，重組蛋白效價得到改良。在一些實施例中，與來自在非雜質減少之培養基中培養的細胞之蛋白質效價（產量）相比，在本發明之具有減少之雜質的培養基中由細胞培養產生之蛋白質效價大至少約 4%、至少約 5%、至少約 6%、至少約 7%、至少約 8%、至少約 9%、至少約 10%、至少約 11%、至少約 12%、至少約 13%、至少約 14%、至少約 15%、至少約 16%、至少約 17%、至少約 18%、至少約 19%、至少約 20%、至少約 21%、至少約 22%、至少約 23%、至少約 24%、至少約 25%、至少約 26%、至少約 27%、至少約 28%、至少約 29%、至少約 30%、至少約 35%、至少約 40%或至少約 50%。在一些實施例中，在本發

明之具有減少之雜質的培養基中由細胞培養產生之蛋白質效價大於在非雜質減少之培養基中培養的相似或相同細胞。

【0087】 在一些範疇內，相對於在非雜質減少之培養基中生長的細胞，細胞生長（例如倍增速率）、活細胞密度、細胞存活率及其組合得到改良。

【0088】 在一些實施例中，與在非雜質減少之培養基中培養的細胞之倍增速率相比，本發明之具有減少之雜質的培養基中之活細胞的倍增速率大至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%、至少 11%、至少 12%、至少 13%、至少 14%、至少 15%、至少 16%、至少 17%、至少 18%、至少 19%、至少 20%、至少 21%、至少 22%、至少 23%、至少 24%、至少 25%、至少 26%、至少 27%、至少 28%、至少 29%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 100%或至少 3 倍。在一些實施例中，與非雜質減少之培養基中之活細胞的倍增速率相比，本發明之具有減少之雜質的培養基中之活細胞的倍增速率大約 10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%或 30%。

【0089】 在一些實施例中，在具有減少之雜質的培養基中，活躍循環哺乳動物細胞之倍增時間小於 30 小時、小於 29 小時、小於 28 小時、小於 27 小時、小於 26 小時、小於 25 小時、小於 24 小時、小於 23 小時、小於 22 小時、小於 21 小時、小於 20 小時、小於 19 小時或小於 18 小時。在一些實施例中，在具有減少之雜質的培養基中，活躍生長哺乳動物細胞之倍增時間小於 28 小時。在一些實施例中，在具有減少之雜質的培養基中，哺乳動物細胞之倍增時間為約 27 ± 1 小時、約 26 ± 1 小時、約 25 ± 1 小時、約 24 ± 1 小時、約 23 ± 1 小時、約 22 ± 1 小時或約 21 ± 1 小時。在一些實施例中，在具有減少之雜質的培養基中，活躍循環哺乳動物細胞之倍增時間為約 24 ± 1 小時。在一些實施例中，與在非減少雜質之培養基中培養的活躍循環細胞之倍增時間相比，在具有減少之雜質的培養基中培養的活躍分裂細胞之倍增時間短至少 15%、至少 16%、至少

17%、至少 18%、至少 19%、至少 20%或至少 25%。

【0090】關於細胞存活率，與在非雜質減少之培養基中生長之細胞的存活率相比，在具有減少之雜質的培養基中生長的細胞展示大至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99%、至少 100%或至少 3 倍的存活率。

【0091】在生產培養容器或生物反應器中，在種子培養或生長期之後，將基礎培養基及細胞供應至培養容器。在某些實施例中，在生產培養之後收集細胞上清液或細胞裂解物。在其他實施例中，使用此項技術中熟知的技術自培養基或細胞裂解物回收所關注多肽或蛋白質，或無論情況可能如何，視所關注蛋白質之位置而定。

【0092】「細胞株」係指經由細胞之連續傳代或繼代培養而衍生自特定譜系的一種或多種細胞。術語「細胞」可與「細胞群」互換使用。

【0093】術語「細胞」包括適合於表現重組核酸序列之任何細胞。細胞包括真核生物之細胞，諸如非人類動物細胞、哺乳動物細胞、人類細胞、禽類細胞、昆蟲細胞、酵母細胞或細胞融合體，諸如融合瘤或四源融合瘤（quadroma）。在某些實施例中，細胞為人類、猴、猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在其他實施例中，細胞選自以下細胞：CHO（例如 CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO）、COS（例如 COS-7）、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞、CV1、腎臟（例如 HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK21）、海拉細胞、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴細胞（例如 Jurkat（T 淋巴球）或 Daudi（B 淋巴球））、A431（表皮）、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞之細胞株。在一些實施例中，細胞包含一個或多個病毒基因，例如表現病毒基因之視網膜細胞（例如 PER.C6®細胞）。在一些實施例中，細胞為 CHO 細胞。在其他實施例中，細胞為 CHO K1 細胞。

【0094】在重組蛋白生產期中，「饋料批式(fed-batch)細胞培養」或「饋料批式培養」係指批式培養，其中最初將動物細胞及培養基供應至培養容器，且在培養期間將額外培養營養素連續或以離散增量緩慢饋入培養物中，其中在培養終止之前進行或不進行定期細胞及/或產物收集。饋料批式培養包括「半連續饋料批式培養」，其中定期將整個培養物（其可包括細胞及培養基）移除且由新鮮培養基替換。饋料批式培養區別於單純「批式培養」，而用於細胞培養之所有組分（包括動物細胞及所有培養營養素）在批式培養中之培養製程開始時供應至培養容器。就在製程期間並不自培養容器移除上清液而言，饋料批式培養可進一步區別於灌注培養，而在灌注培養中，藉由例如過濾而將細胞約束於培養物中，且將培養基連續或間歇地引入培養容器及自培養容器移除。然而，涵蓋在饋料批式細胞培養期間出於測試目的而移除樣品。饋料批式製程持續，直至確定達至最大工作體積及/或蛋白質產生為止。

【0095】當在本文中使用时，片語「連續細胞培養」係關於一種用以使細胞通常在特定生長期中連續生長之技術。舉例而言，若需要恆定供應細胞，或需要產生特定所關注多肽或蛋白質，則細胞培養物可能需要維持於特定生長期中。因此，必須持續監測且相應地調整條件，以便將細胞維持於該特定期中。

【0096】本發明之一個範疇係關於一種種子培養物，其中細胞群經擴增，隨後在生產培養物中進行蛋白質產生及收集。在某些實施例中，具有減少之雜質的細胞培養基可與種子細胞培養物一起使用，如本文進一步描述。

【0097】本發明之另一範疇係關於一種生產培養物，其中產生且收集蛋白質。在生產期之前，典型地存在生長期（亦稱為種子擴大或種子培養），其中在培養製程開始時將用於細胞培養之所有組分供應至培養容器，隨後使細胞群擴增直至準備好用於生產規模為止。如此，視起始細胞株而定，以適合於初始細胞生長期之接種密度用細胞接種培養容器。在一些範疇內，具有減少之雜質的細胞培養基可與種子細胞培養物一起使用，以進一步改良或增強細胞在後續生產期中的生產力。在其他實施例中，具有減少之雜質的細胞培養基可與生產細胞

培養物一起使用，如本文進一步描述。

【0098】 培養容器包括但不限於孔培養盤、方瓶、搖瓶、攪拌容器、旋轉瓶、中空纖維、氣舉式生物反應器及其類似者。適合之細胞培養容器為生物反應器。生物反應器係指經製造或工程改造以操縱或控制環境條件之任何培養容器。此類培養容器為此項技術中熟知的。

【0099】 已開發出生物反應器製程及系統以最佳化氣體交換，以供應充足氧氣來維持細胞生長及生產力，且移除 CO₂。維持氣體交換之效率為確保成功按比例擴大細胞培養及蛋白質產生之重要準則。此類系統為熟習此項技術者所熟知。

【0100】 在一個實施例中，在細胞培養期間根據饋料批式製程按時間間隔補充培養基。饋料批式培養一般為此項技術中已知且用於最佳化蛋白質產生（參見 Y. M. Huang 等人, *Biotechnol Prog.* 2010 年 9 月-10 月; 26(5): 1400-10）。饋料批式製程典型地在生產期期間使用。

【0101】 在生產培養之持續時間，可按時間間隔以每天或每 2-3 天之頻率進行補充饋料以包括額外營養素，諸如維生素、胺基酸及如上文所描述之其他營養素。在 2 週或更久的培養之生產培養的整個持續時間中，可進行補充饋料（添加含有營養素之補充培養基）至少 2 次或至少 8 次。在另一實施例中，可在培養持續時間每天進行補充饋料。亦設想替代培養饋料排程。

【0102】 亦可進行額外胺基酸補充以提供非耗乏培養基，其中耗乏胺基酸係根據此項技術中已知且在本文中所描述的方法來確定。當採用此方案時，視對胺基酸耗乏之確定而定，在生產培養之持續時間，按時間間隔，較佳地以每天或每 2-3 天之頻率補充或添加額外胺基酸。在一個實施例中，對於 2 週或更久的培養，在第 1 天或約第 1 天、在第 2 天或約第 2 天、在第 3 天或約第 3 天、在第 4 天或約第 4 天、在第 5 天或約第 5 天、在第 6 天或約第 6 天、在第 7 天或約第 7 天、在第 8 天或約第 8 天、在第 9 天或約第 9 天、在第 10 天或約第 10 天、在第 11 天或約第 11 天、在第 12 天或約第 12 天、在第 13 天或約第 13 天

及在第 14 天或約第 14 天，將用以維持非耗乏細胞培養基之額外胺基酸的混合物添加至培養物中。亦設想替代培養饋料排程。

【0103】真核細胞，諸如 CHO 細胞可在小規模培養物中培養，諸如在具有約 25 mL 培養基之 125 mL 容器、具有約 50 至 100 mL 培養基之 250 mL 容器、具有約 100 至 200 mL 培養基之 500 mL 容器中培養。或者，培養物可為大規模的，諸如具有約 300 至 1000 mL 培養基之 1000 mL 容器、具有約 500 mL 至 3000 mL 培養基之 3000 mL 容器、具有約 2000 mL 至 8000 mL 培養基之 8000 mL 容器及具有約 4000 mL 至 15000 mL 培養基之 15000 mL 容器。用於製造之培養物可含有 10,000 L 之培養基或更多。諸如用於蛋白質治療劑之臨床製造的大規模細胞培養物典型地維持數天或甚至數週，同時細胞產生所需蛋白質。在此時間期間，培養物可補充有濃縮饋料培養基，該濃縮饋料培養基含有在培養過程期間消耗的組分，諸如營養素及胺基酸。濃縮饋料培養基可基於任何細胞培養基調配物。此種濃縮饋料培養基之大部分細胞培養基組分之含量可為其正常適用量的例如約 5x、6x、7x、8x、9x、10x、12x、14x、16x、20x、30x、50x、100x、200x、400x、600x、800x 或甚至約 1000x。濃縮饋料培養基通常用於饋料批式培養製程中。

【0104】在一些實施例中，在細胞生長或蛋白質產生之過程期間，細胞培養物可進一步補充有「使用點添加物」，亦稱為添加物、使用點成分或使用點化學品。使用點添加物包括以下中之任一者或多者：生長因子或其他蛋白質、緩衝液、能量來源、鹽、胺基酸、金屬及螯合劑。其他蛋白質包括運鐵蛋白及白蛋白。包括細胞介素及趨化介素之生長因子一般為此項技術中已知的，且已知刺激細胞生長，或在一些情況下刺激細胞分化。生長因子通常為蛋白質（例如胰島素）、小肽或類固醇激素，諸如雌激素、DHEA、睪固酮及其類似物。在一些情況下，生長因子可為促進細胞增殖或蛋白質產生之非天然化學物質，諸如四氫葉酸（THF）、甲胺喋呤及其類似物。蛋白質及肽生長因子之非限制性實例包括血管生成素、骨形態發生蛋白（BMP）、大腦衍生神經滋養因子

(BDNF)、表皮生長因子(EGF)、紅血球生成素(EPO)、纖維母細胞生長因子(FGF)、神經膠細胞株衍生神經滋養因子(GDNF)、顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、生長分化因子-9(GDF9)、肝細胞生長因子(HGF)、肝癌衍生生長因子(HDGF)、胰島素、類胰島素生長因子(IGF)、遷移刺激因子、肌肉抑制素(GDF-8)、神經生長因子(NGF)及其他神經滋養素、血小板衍生生長因子(PDGF)、血小板生成素(TPO)、轉形生長因子 α (TGF- α)、轉形生長因子 β (TGF- β)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、血管內皮生長因子(VEGF)、wnt 信號傳導路徑促效劑、胎盤生長因子(PIGF)、胎牛血清生長激素(FBS)、介白素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7 及其類似物。在一個實施例中，細胞培養基經補充有使用點添加物生長因子胰島素。在一個實施例中，在添加之後，培養基中之胰島素的濃度(亦即細胞培養基中之胰島素的量)為約 0.1 μ M 至 10 μ M。

【0105】緩衝液一般為此項技術中已知的。本發明並不限於任一或任何特定緩衝液，且任何一般熟習此項技術者可選擇供與產生特定蛋白質之特定細胞株一起使用的適當緩衝液或緩衝系統。在一個實施例中，使用點添加物緩衝液為 NaHCO₃。在另一實施例中，緩衝液為 HEPES。在其他實施例中，使用點添加物緩衝液包含 NaHCO₃ 及 HEPES 兩者。在其中緩衝液包含 HEPES 之實施例中，HEPES 緩衝液包含減少量之 HEPES 相關雜質，如本文所描述。

【0106】用作細胞培養中之使用點添加物的能源來源亦為此項技術中熟知的。非限制性地，在一個實施例中，使用點添加物能量來源為葡萄糖。鑒於特定細胞株及待產生之蛋白質的特定及特殊要求，在一個實施例中，可在培養基中將葡萄糖添加至約 1 至 20 mM 之濃度。在一些情況下，可以 20 g/L 或更高之高含量添加葡萄糖。

【0107】螯合劑同樣為細胞培養及蛋白質產生之技術中熟知的。EDTA 四鈉脫水物及檸檬酸鹽為此項技術中使用之兩種常用螯合劑，但其他螯合劑可用於本

發明之實踐中。在一個實施例中，使用點添加物螯合劑為 EDTA 四鈉二水合物。在一個實施例中，使用點添加物螯合劑為檸檬酸鹽，諸如 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 。

【0108】 在一個實施例中，細胞培養基可另外補充有一種或多種使用點添加物胺基酸作為能量來源，諸如麩醯胺酸。在一個實施例中，細胞培養基以約 1 mM 至 13 mM 之最終濃度補充有使用點添加物麩醯胺酸。

【0109】 其他使用點添加物包括各種金屬鹽中之一者或多者，諸如鐵鹽、鎳鹽、鋅鹽及銅鹽。在一個實施例中，細胞培養基補充有硫酸銅、硫酸鋅、氯化鐵及硫酸鎳中之任一者或多者。

蛋白質生產

【0110】 除具有減少之雜質的培養基及在此類培養基中培養細胞之方法以外，本發明亦提供用於改良細胞培養效能之方法，包括藉由培養重組真核細胞來改良重組蛋白產生中之重組蛋白效價。在一些實施例中，重組真核細胞包含編碼重組蛋白之穩定整合之核酸。在其他實施例中，本發明之方法提供經改良之細胞生長（例如倍增速率）、活細胞密度、細胞存活率及其組合。

【0111】 在一些實施例中，本發明之方法包括提供本發明之具有減少之雜質的細胞培養基，在培養基中培養重組真核細胞；由重組真核細胞表現所關注重組蛋白，以及相對於在非雜質減少之培養基中培養的相似或相同重組真核細胞，由在具有減少之雜質的培養基中培養的重組真核細胞產生較高效價之重組蛋白。

【0112】 在一些實施例中，來自在具有減少之雜質的培養基中培養之細胞的蛋白質產生量或效價（其可以每公升培養基之蛋白質產物的公克數表示）為至少 100 mg/L、至少 1 g/L、至少 1.2 g/L、至少 1.4 g/L、至少 1.6 g/L、至少 1.8 g/L、至少 2 g/L、至少 2.5 g/L、至少 3 g/L、至少 3.5 g/L、至少 4 g/L、至少 4.5 g/L、至少 5 g/L、至少 5.5 g/L、至少 6 g/L、至少 6.5 g/L、至少 7 g/L、至少 7.5 g/L、至少 8 g/L、至少 8.5 g/L、至少 9 g/L、至少 9.5 g/L、至少 10 g/L、至少 15 g/L 或至少 20 g/L。

【0113】 在一些實施例中，與來自在非雜質減少之培養基中培養的相似或相同細胞之蛋白質效價（產量）相比，來自在具有減少之雜質的培養基中培養之細胞產生的蛋白質效價大至少約 2%、至少約 3%、至少約 4%、至少約 5%、至少約 6%、至少約 7%、至少約 8%、至少約 9%、至少約 10%、至少約 11%、至少約 12%、至少約 13%、至少約 14%、至少約 15%、至少約 16%、至少約 17%、至少約 18%、至少約 19%、至少約 20%、至少約 21%、至少約 22%、至少約 23%、至少約 24%、至少約 25%、至少約 26%、至少約 27%、至少約 28%或至少約 29%。

【0114】 在一些實施例中，與由在非雜質減少之培養基中培養的相似或相同細胞之蛋白質效價相比，在本文所描述之具有減少之雜質的培養基中培養之哺乳動物細胞的蛋白質效價（產量）大至少 100 mg/L、至少 0.5 g/L、至少 1 g/L、至少 1.2 g/L、至少 1.4 g/L、至少 1.6 g/L、至少 1.8 g/L、至少 2 g/L、至少 2.5 g/L。

【0115】 本發明之方法適用於經由細胞培養製程來改良蛋白質產生。本發明中所使用之細胞株可經基因工程改造以表現具有商業或科學利益之重組蛋白。基因工程改造細胞株涉及用重組多核苷酸分子轉染、轉形或轉導細胞或以其他方式進行改變（例如藉由同源重組及基因活化或重組細胞與非重組細胞融合）以使宿主細胞表現所需重組多肽。用於基因工程改造細胞或細胞株以表現所關注多肽之方法及載體為熟習此項技術者所熟知；例如各種技術在 *Molecular Biology*. Ausubel 等人編（Wiley & Sons, New York, 1988，及季度更新）；Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*（Cold Spring Laboratory Press, 1989）；Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, 第 15-69 頁中說明。適合於在培養中生長之廣泛多種細胞株可獲自美國菌種保存中心（American Type Culture Collection）（Manassas, Va.）及商業供應商。

【0116】 在一些實施例中，蛋白質產物（所關注蛋白質）為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合

抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG2 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG1/IgG4 抗體。

【0117】 在一些實施例中，抗體選自由以下組成之群：抗計劃性細胞死亡 1 抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0203579A1 號中所描述之抗 PD1 抗體）、抗計劃性細胞死亡配位體-1（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0203580A1 號中所描述之抗 PD-L1 抗體）、抗 DII4 抗體、抗血管生成素-2 抗體（例如如美國專利第 9,402,898 號中所描述之抗 ANG2 抗體）、抗類血管生成素 3 抗體（例如如美國專利第 9,018,356 號中所描述之抗 AngPt13 抗體）、抗血小板衍生長因子受體抗體（例如如美國專利第 9,265,827 號中所描述之抗 PDGFR 抗體）、抗 Erb3 抗體、抗泌乳素受體抗體（例如如美國專利第 9,302,015 號中所描述之抗 PRLR 抗體）、抗補體 5 抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0313194A1 號中所描述之抗 C5 抗體）、抗 TNF 抗體、抗表皮生長因子受體抗體（例如如美國專利第 9,132,192 號中所描述之抗 EGFR 抗體或如美國專利申請公開案第 US2015/0259423A1 號中所描述之抗 EGFRvIII 抗體）、抗前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶 Kexin-9 抗體（例如如美國專利第 8,062,640 號或如美國專利申請公開案第 US2014/0044730A1 號中所描述之抗 PCSK9 抗體）、抗生長及分化因子-8 抗體（例如抗 GDF8 抗體，亦稱為抗肌肉抑制素抗體，如美國專利第 8,871,209 號或第 9,260,515 號中所描述）、抗升糖素受體（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0337045A1 號或第 US2016/0075778A1 號中所描述之抗 GCGR 抗體）、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、介白素 4 受體抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0271681A1 號或美國專利第 8,735,095 號或第 8,945,559 號中所描述之抗 IL4R 抗體）、抗介

白素 6 受體抗體（例如如美國專利第 7,582,298 號、第 8,043,617 號或第 9,173,880 號中所描述之抗 IL6R 抗體）、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗介白素 33（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0271658A1 號或第 US2014/0271642A1 號中所描述之抗 IL33 抗體）、抗呼吸道融合病毒抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0271653A1 號中所描述之抗 RSV 抗體）、抗分化簇 3（例如抗 CD3 抗體，如美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號及美國申請案第 62/222,605 號中所描述）、抗分化簇 20（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號及美國專利第 7,879,984 號中所描述之抗 CD20 抗體）、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗分化簇-48（例如如美國專利第 9,228,014 號中所描述之抗 CD48 抗體）、抗 Fel d1 抗體（例如如美國專利第 9,079,948 號中所描述）、抗中東呼吸道症候群病毒（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0337029A1 號中所描述之抗 MERS 抗體）、抗伊波拉病毒（Ebola virus）抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2016/0215040 號中所描述）、抗茲卡病毒（Zika virus）抗體、抗淋巴球活化基因 3 抗體（例如抗 LAG3 抗體或抗 CD223 抗體）、抗神經生長因子抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2016/0017029 號及美國專利第 8,309,088 號及第 9,353,176 號中所描述之抗 NGF 抗體）以及抗活化素 A 抗體。在一些實施例中，雙特異性抗體選自由以下組成之群：抗 CD3×抗 CD20 雙特異性抗體（如美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號中所描述）、抗 CD3×抗黏蛋白 16 雙特異性抗體（例如抗 CD3×抗 Muc16 雙特異性抗體）及抗 CD3×抗前列腺特異性膜抗原雙特異性抗體（例如抗 CD3×抗 PSMA 雙特異性抗體）。

【0118】 在一些實施例中，所關注蛋白質選自由以下組成之群：阿利庫單抗、阿替韋單抗、瑪替韋單抗、奧西韋單抗、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗、依德單抗、賽咪單抗、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗、恩維納單抗、恩維納單抗-

dgmb、法斯單抗、內斯瓦庫單抗、特里沃單抗、利努蘇單抗及賽瑞單抗。

【0119】 在一些實施例中，所關注蛋白質為含有 Fc 部分及另一域之重組蛋白（例如 Fc 融合蛋白）。在一些實施例中，Fc 融合蛋白為受體 Fc 融合蛋白，其含有與 Fc 部分偶合之受體的一個或多個細胞外域。在一些實施例中，Fc 部分包含鉸鏈區，隨後為 IgG 之 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，受體 Fc 融合蛋白含有結合至單一配位體或多個配位體之兩條或更多條相異受體鏈。舉例而言，Fc 融合蛋白為 TRAP 蛋白，諸如 IL-1 陷阱（例如利納西普，其含有 IL-1RAcP 配位體結合區與 IL-1R1 細胞外區與 hIgG1 之 Fc 的融合體；參見美國專利第 6,927,044 號）或 VEGF 陷阱（例如阿柏西普或 ziv-阿柏西普，其含有 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 域 2 與 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 域 3 與 hIgG1 之 Fc 的融合體；參見美國專利第 7,087,411 號及第 7,279,159 號）。在其他實施例中，Fc 融合蛋白為 ScFv-Fc 融合蛋白，其含有與 Fc 部分偶合之抗體的一個或多個抗原結合域中之一者或多者，諸如可變重鏈片段及可變輕鏈片段。

【0120】 另外，包括微陷阱，其為使用多聚化組分（MC）而非 Fc 部分之陷阱蛋白，且揭示於美國專利第 7,279,159 號及第 7,087,411 號中。

【0121】 亦包括以上之衍生物、組分、域、鏈及片段。

【0122】 本發明不限於用於重組蛋白產生之任何特定類型的細胞。適用於重組蛋白產生之細胞類型的實例包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、禽類細胞、細菌細胞及酵母細胞。細胞可為經用於重組基因表現之載體轉形的幹細胞或重組細胞，或經用於產生病毒產物之病毒轉染的細胞。細胞可含有編碼所關注蛋白質之重組異源多核苷酸構築體。構築體可為游離基因體，或其可為實體上整合至細胞之基因體中的元件。細胞亦可產生所關注蛋白質，而不需要在異源多肽構築體上編碼該蛋白質。換言之，細胞可天然編碼所關注蛋白質，諸如產生抗體之 B 細胞。細胞亦可為諸如雞胚胎細胞之初代細胞，或初代細胞株。

【0123】 適用細胞之實例包括 CHO、COS、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞、CV1、腎臟、海拉細胞、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、

淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞的細胞株。在各種實施例中，細胞株為 CHO 細胞衍生物，諸如 CHO-K1、CHO DUX B-11、CHO DG-44、Veggie-CHO、GS-CHO、S-CHO 或 CHO Iec 突變株。

【0124】生產期可在任何培養規模下進行，自搖瓶或波袋（wave bag），至一公升生物反應器，及至大規模工業生物反應器。同樣，種子擴大擴增期可在任何培養規模下進行，自及搖瓶或波袋，至一公升或更大的生物反應器。大規模製程可在約 100 公升至 20,000 公升或更大的體積中進行。若干手段中之一者或多者可用以控制蛋白質產生，諸如溫度變化或化學誘導。生長期可在比生產期更高的溫度下發生。舉例而言，生長期可在約 35°C 至 38°C 之第一溫度下發生，且生產期可在約 29°C 至 37°C，視情況約 30°C 至 36°C 或約 30°C 至 34°C 之第二溫度下發生。另外，蛋白質產生之化學誘導劑，諸如咖啡鹼、丁酸根、他莫昔芬（tamoxifen）、雌激素、四環素、多西環素及六亞甲基雙乙醯胺（HMBA）可在溫度變化的同時、之前或之後添加。若在溫度變化之後添加誘導劑，則可在溫度變化之後的一小時至五天，諸如在溫度變化之後的一天至兩天添加該等誘導劑。生產細胞培養物可操作為連續饋料培養系統，如在恆化器中（參見 C. Altamirano 等人, 2001 前述），或根據饋料批式製程（Huang, 2010 前述）。

培養基及緩衝液選擇

【0125】本發明之及其他範疇係關於用於篩選供選擇用於細胞培養之細胞培養基或 HEPES 緩衝液，從而改良細胞培養效能，例如改良之蛋白質效價、改良之細胞生長、改良之活細胞密度等的方法。此類方法可用於選擇根據本發明之具有減少之雜質的培養基用於細胞培養，或選擇具有減少之雜質的 HEPES 緩衝液用於細胞培養。

【0126】在一些實施例中，提供一種用於選擇用於細胞培養之細胞培養基以改良細胞培養效能的方法。該方法一般可包括：提供包含 HEPES 緩衝液之細胞

培養基；分析包含 HEPES 緩衝液之細胞培養基以確定細胞培養基中存在的分子量（MW）為 267.07 的 HEPES 相關雜質之量及分子量（MW）為 221.06 的 HEPES 相關雜質之量；及若確定包含 HEPES 緩衝液之細胞培養基具有本文所論述之減少之 HEPES 相關雜質，則選擇包含 HEPES 緩衝液之細胞培養基用於細胞培養。根據本發明，相對於非 HEPES 雜質減少之細胞培養基中的細胞培養效能，使用根據此類方法選擇之細胞培養基改良細胞培養效能。

【0127】 在其他實施例中，提供一種用於選擇用於細胞培養之 HEPES 緩衝液以改良細胞培養效能的方法。該方法一般可包括：提供 HEPES 緩衝液；分析 HEPES 緩衝液以確定 HEPES 緩衝液中存在的分子量（MW）為 267.07 之 HEPES 相關雜質之量及分子量（MW）為 221.06 之 HEPES 相關雜質之量；及若確定 HEPES 緩衝液具有本文所論述之減少之 HEPES 相關雜質，則選擇 HEPES 緩衝液用於細胞培養。根據本發明，相對於在非雜質減少之 HEPES 緩衝液之情況下的細胞培養效能，使用根據此類方法選擇之 HEPES 緩衝液改良細胞培養效能。

【0128】 用於分析培養基或 HEPES 緩衝液以定量確定 HEPES 相關雜質之存在的任何適合方法可與本文所揭示之方法結合使用。根據本發明使用之分析方法包括 HPLC、LC-MS 及其他方法，包括本文所揭示之所有分析、分離及純化方法。

【0129】 本發明之範圍不受本文所描述之特定實施例限制，該等特定實施例意欲作為本發明之個別範疇或實施例之說明。功能上等效的方法及組分在本發明之範圍內。根據前述描述及附圖，除本文所描述之修改以外，本發明之各種修改對熟習此項技術者而言顯而易見。此類修改屬於本發明之範圍內。

實例

【0130】 以下實例僅出於說明性目的而提供，且不意欲限制本發明之範圍。

實例 1-HEPES 相關雜質之鑑別

【0131】 在「高效價」表現細胞培養運作及在「低效價」表現細胞培養運作中

所利用的批次之間，對化學成分確定之培養基的 53 種不同組分之批次譜系學進行變異數分析（ANOVA analysis）。HEPES 酸及鹽鑑別為「高風險」組分，展示與最終效價之最強相關性（相關性強於效價與整個培養基之間的相關性）。HEPES 亦在考慮培養基調配物中組分之重量分率、組分之 COA 純度及其製造方法之獨立的基於風險之分析中鑑別為「高風險組分」。

【0132】作為後續，對培養基批次進行 FTIR 及拉曼（Raman）光譜法分析。在培養基之 FTIR 光譜之某些區中的吸收與最終效價之間發現強相關性，此指派給 HEPES（基於 HEPES 光譜之已知特徵）且之後藉由與來自 HEPES 保留物之 FTIR 光譜的比較證實。「低效價」與「高效價」表現批次之間的光譜差異與觀測到之效價結果一致。自額外培養基批次獲取資料且將其用於建構即將進入之培養基批次之效價效能的預測模型。

【0133】亦發現 CDM1B 之拉曼光譜中的若干帶與最終效價具有強相關性。類似於 FTIR 分析，藉由將培養基之拉曼光譜與 HEPES 保留樣品之光譜匹配，將此等帶指派給 HEPES。

【0134】在將 HEPES 鑑別為與最終效價具有強相關性之「高風險」組分之後，進行 HEPES 緩衝液批次之化學組成之分析，包括 LC-MS 及效價相關性評估。基於此等研究，鑑別出兩種 HEPES 相關雜質，對於所分析之所有生產運作，其展示與效價之負相關。

【0135】兩種經鑑別之 HEPES 相關雜質經確定具有下表 2 中所呈現之化學式及分子量（MW）。

表 2

推定 ID	化學式	<i>m/z</i> (負)
HEPES+[O2]-[H2]	C8 H16 N2 O6 S	267.07
HEPES-[CH4]	C7 H14 N2 O4 S	221.06

【0136】下表 3 展示所鑑別之所有雜質，包括 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]。

表 3

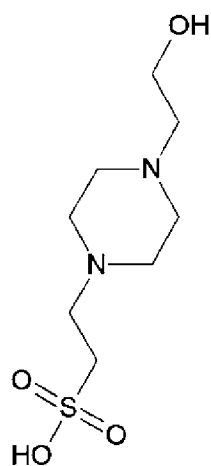
推定 ID	化學式	m/z (負)	皮爾森 (Pearson) 相關係數		
			5 個 HEPES 鹽批次	20 個 CDM1B 批次 (Rens)	7 個 CDM1B 批次 (Geel)
乙烯磺酸	C2 H4 O3 S	106.98	-0.60	0.16	0.41
HEPES+[O2]-[H2]	C8 H16 N2 O6 S	267.07	-0.82	-0.77	-0.68
HEPES+[O]-[H2]	C8 H16 N2 O5 S	251.07	-0.80	0.17	-0.22
HEPES-[CH4]	C7 H14 N2 O4 S	221.06	-0.85	-0.68	-0.83
乙醯胺基甲磺酸	C3 H7 N O4 S	152.00	-0.81	-0.78	-0.34
HEPES+[O]	C8 H18 N2 O5 S	253.09	-0.95	-0.20	-0.03
2,2-二羥基乙磺酸	C2 H6 O5 S	140.99	-0.85	NA	NA
HEPES-[C2H6]+[O] [含 SO3]物種	C6 H12 N2 O5 S	223.04	-0.74	NA	NA

【0137】 出人意料地，下表 4 中所鑑別之雜質（表 4 化合物）對細胞效價無不良影響，儘管許多雜質之存在量大於 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]。表 4 化合物中之一者或多者可存在於培養基中而對細胞無過度不良影響。

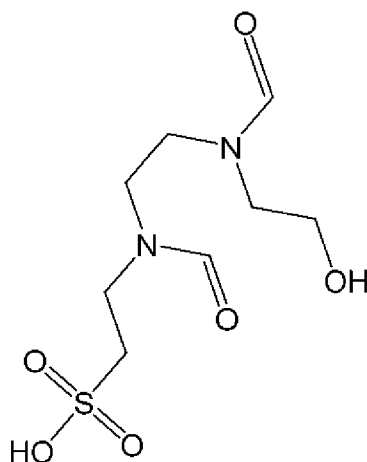
表 4

推定 ID
乙烯磺酸
HEPES+[O]-[H2]
乙醯胺基甲磺酸
HEPES+[O]
2,2-二羥基乙磺酸
HEPES-[C2H6]+[O] [含 SO3]物種

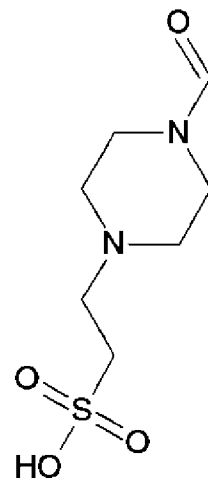
【0138】 儘管不意欲受理論限制，但基於化學式及分子量（MW），提出 HEPES 相關雜質之以下化學結構。然而，本發明不限於此等所提出之化學結構的呈現，且對應於 HEPES 相關雜質之化學式及分子量的其他化學結構設想為在本發明之範圍內。



HEPES



HEPES+[O2]-[H2]



HEPES-[CH4]

實例 2-與效價負相關之 HEPES 相關雜質

【0139】 在多個位點進行大規模生產運作以產生度匹魯單抗。根據本發明，發現如本文所論述之 HEPES 相關雜質之量影響蛋白質效價。基於發現且根據本發明，可藉由使用根據本發明之具有減少之 HEPES 相關雜質的培養基來獲得改良之蛋白質效價。

【0140】 圖 1 說明 HEPES+[O2]-[H2]之相對量與蛋白質效價之間的關係。圖 2A 及 2B 展現兩個不同位點處度匹魯單抗之多次生產運作的效價與 HEPES+[O2]-[H2]之間的負相關（圖 2A，位點 1 處之 20 次生產運作；圖 2B，位點 2 處之 7 次生產運作）。擬合資料之概述展示於圖 2A 及 2B 之各圖的下方。

【0141】 圖 3 說明 HEPES-[CH4]之相對量與蛋白質效價之間的關係。圖 4A 及 4B 展現兩個不同位點處度匹魯單抗之多次生產運作的效價與 HEPES-[CH4]之間的負相關（圖 4A，位點 1 處之 20 次生產運作；圖 4B，位點 2 處之 7 次生產運作）。擬合資料之概述展示於圖 4A 及 4B 之各圖的下方。

【0142】 如圖式中所示，在位點 1 及位點 2 兩者處，HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]兩者在較低效價生產運作中展示較高豐度，且展現與效價之負相關。在不同生產位點處發現之相似結果提高了確定較大豐度之 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]與效價具有負相關的信賴度。

實例 3-HEPES 緩衝液中雜質之結構闡明

【0143】 使用親水相互作用液相層析（HILIC）管柱使 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]與 HEPES 分離（圖 5A 展示目標）。混合模式管柱用於進一步將 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]與其他 HEPES 雜質分離，該等雜質在來自 HILIC 分離之部分中收集（圖 5B 展示目標）。兩個管柱之組合可用於進一步純化 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]。

【0144】 使用反相液相層析質譜法（RP-LCMS）、親水相互作用液相層析質譜法（HILIC-LCMS）及 MS/MS 碎裂確認 HEPES+[O2]-[H2]及 HEPES-[CH4]之結構。圖 6A 為源自 HEPES 原料之 HEPES-[CH4]（亦稱為「221」）的 RP-LCMS 圖。圖 6B 為源自 HEPES 原料之 HEPES-[CH4]的 HILIC-LCMS 圖。圖 7 展示源自 HEPES 原料之 HEPES-[CH4]的 MS/MS 碎裂。

實例 4-蛋白質

【0145】 本發明可用於生產生物及醫藥產品，且適合於繁殖包含編碼所關注蛋白質之基因的細胞，且本申請案中所揭示之各實施例及實例可與以下鑑別之物質一起在生物及醫藥產品之生產中使用。此類蛋白質可包括但不限於抗體、受體、融合蛋白、拮抗物、抑制子、酶（諸如酶替代療法中所用之酶）、因子及輔因子、細胞介素、趨化介素、阻遏子、活化子、配位體、報導蛋白、選擇蛋白、蛋白質激素、蛋白質毒素、結構蛋白、貯藏蛋白、運輸蛋白、神經傳遞質及收縮性蛋白。可根據本發明產生之特定類型的蛋白質更詳細地論述於下文中。

【0146】 抗體（亦稱為「免疫球蛋白」）為具有多條多肽鏈及大量轉譯後修飾之蛋白質的實例。典型免疫球蛋白蛋白質（例如 IgG）包含四條多肽鏈-兩條輕鏈及兩條重鏈。各輕鏈經由半胱胺酸二硫鍵連接至一條重鏈，且兩條重鏈經由兩個半胱胺酸二硫鍵彼此結合。哺乳動物系統中產生之免疫球蛋白亦在各種殘基處（例如在天冬醯胺殘基處）經各種多醣醣基化，且可在物種間不同，此可影響治療性抗體之抗原性。Butler 及 Spearman, 「哺乳動物細胞宿主之選擇及

醣基化工程之可能性 (The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering) 」, Curr. Opin. Biotech. 30:107-112 (2014)。

【0147】 抗體重鏈恆定區包含三個域 CH1、CH2 及 CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區 (在本文中縮寫為 LCVR 或 VL) 及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域 CL。VH 及 VL 區可進一步細分成被稱為互補決定區 (CDR) 之高變區，穿插有被稱為架構區 (FR) 之較保守區。各 VH 及 VL 由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個 CDR 及四個 FR 構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (重鏈 CDR 可縮寫為 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3；輕鏈 CDR 可縮寫為 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。術語「高親和力」抗體係指如藉由表面電漿共振，例如 BIACORE™或溶液親和 ELISA 所量測，與其目標之結合親和力為至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M；至少 10^{-11} M；或至少 10^{-12} M 之抗體。

【0148】 抗體輕鏈包括來自任何生物體之免疫球蛋白輕鏈恆定區序列，且除非另外說明，否則包括人類 κ 及 λ 輕鏈。除非另外說明，否則輕鏈可變 (VL) 域典型地包括三個輕鏈 CDR 及四個架構 (FR) 區。一般而言，全長輕鏈自胺基端至羧基端包括 VL 域，其包括 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4；及輕鏈恆定域。可與此等發明一起使用之輕鏈包括不選擇性結合由抗原結合蛋白選擇性結合之第一或第二抗原的輕鏈。適合之輕鏈包括可藉由篩選現有抗體庫 (濕庫或電腦模擬) 中最常用之輕鏈來鑑別的輕鏈，其中該等輕鏈實質上不干擾抗原結合蛋白之抗原結合域的親和力及/或選擇性。適合之輕鏈包括可結合由抗原結合蛋白之抗原結合區結合之一個或兩個抗原決定基的輕鏈。

【0149】 抗體可變域包括免疫球蛋白輕鏈或重鏈 (視需要經修飾) 之胺基酸序列，該輕鏈或重鏈以自 N 端至 C 端之順序包含以下胺基酸區 (除非另外指示)：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。「可變域」包括能夠摺疊成具有雙 β 褶板結構之典型域 (VH 或 VL) 的胺基酸序列，其中 β 褶板經第一 β 褶板之殘基與第二 β 褶板之殘基之間的二硫鍵連接。

【0150】 抗體互補決定區 (「CDR」) 包括由生物體免疫球蛋白基因之核酸序

列編碼的胺基酸序列，其通常（亦即，在野生型動物中）出現在免疫球蛋白分子（例如抗體或 T 細胞受體）輕鏈或重鏈之可變區中的兩個架構區之間。CDR 可由例如生殖系序列或經重排或未經重排序列編碼，且例如藉由原始或成熟 B 細胞或 T 細胞編碼。在某些情況下（例如對於 CDR3），CDR 可由兩個或更多個不連續（例如在尚未經重排之核酸序列中）但在 B 細胞核酸序列中連續的序列（例如生殖系序列）編碼，例如由於剪接或連接該等序列（例如 V-D-J 重組以形成重鏈 CDR3）。抗體之以上組分中之各者可根據本發明產生。

【0151】 雙特異性抗體包括能夠選擇性結合兩個或更多個抗原決定基之抗體。雙特異性抗體一般包含兩條不同重鏈，其中各重鏈特異性結合不同抗原決定基——在兩種不同分子（例如抗原）上或在同一分子上（例如在同一抗原上）。若雙特異性抗體能夠選擇性結合兩種不同抗原決定基（第一抗原決定基及第二抗原決定基），則第一重鏈對第一抗原決定基之親和力一般將比第一重鏈對第二抗原決定基之親和力低至少一個至兩個、三個或四個數量級，且反之亦然。由雙特異性抗體識別之抗原決定基可在相同或不同目標上（例如在相同或不同蛋白質上）。雙特異性抗體可例如藉由組合識別相同抗原之不同抗原決定基的重鏈來製得。舉例而言，編碼識別相同抗原之不同抗原決定基之重鏈可變序列的核酸序列可與編碼不同重鏈恆定區之核酸序列融合，且此類序列可在表現免疫球蛋白輕鏈之細胞中表現。典型雙特異性抗體具有兩條重鏈，其各自具有三個重鏈 CDR，隨後為（N 端至 C 端）CH1 域、鉸鏈、CH2 域及 CH3 域；及免疫球蛋白輕鏈，其不賦予抗原結合特異性但可與各重鏈締合，或可與各重鏈締合且可結合一個或多個由重鏈抗原結合區結合之抗原決定基，或可與各重鏈締合且使得一條或兩條重鏈能夠與一個或兩個抗原決定基結合，且可根據本發明產生。

【0152】 舉例而言，對於抗體實施例，本發明適合於基於所有主要抗體類別，亦即 IgG、IgA、IgM、IgD 及 IgE 之診斷學及治療學的研究及生產用途。IgG 為較佳類別，諸如 IgG1（包括 IgG1 λ 及 IgG1 κ ）、IgG2 及 IgG4。待根據本發

明產生之例示性抗體包括阿利庫單抗、阿替韋單抗、瑪替韋單抗、奧西韋單抗、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗、依德單抗、賽咪單抗、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗、恩維納單抗、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗、內斯瓦庫單抗、特里沃單抗、利努蘇單抗及賽瑞單抗。其他抗體實施例包括人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG2 抗體。在一個實施例中，抗體為 IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG4 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG1 抗體。在一個實施例中，抗體為嵌合 IgG2/IgG1/IgG4 抗體。

【0153】 在額外實施例中，抗體選自由以下組成之群：抗計劃性細胞死亡 1 抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0203579A1 號中所描述之抗 PD1 抗體）、抗計劃性細胞死亡配位體-1（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0203580A1 號中所描述之抗 PD-L1 抗體）、抗 Dll4 抗體、抗血管生成素-2 抗體（例如如美國專利第 9,402,898 號中所描述之抗 ANG2 抗體）、抗類血管生成素 3 抗體（例如如美國專利第 9,018,356 號中所描述之抗 AngPt13 抗體）、抗血小板衍生生長因子受體抗體（例如如美國專利第 9,265,827 號中所描述之抗 PDGFR 抗體）、抗 Erb3 抗體、抗泌乳素受體抗體（例如如美國專利第 9,302,015 號中所描述之抗 PRLR 抗體）、抗補體 5 抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0313194A1 號中所描述之 25 抗 C5 抗體）、抗 TNF 抗體、抗表皮生長因子受體抗體（例如如美國專利第 9,132,192 號中所描述之抗 EGFR 抗體或如美國專利申請公開案第 US2015/0259423A1 號中所描述之抗 EGFRvIII 抗體）、抗前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶 Kexin-9 抗體（例如如美國專利第 8,062,640 號或如美國專利申請公開案第 US2014/0044730A1 號中所描述之抗 PCSK9 抗體）、抗生長及分化因子-8 抗體（例如抗 GDF8 抗體，亦稱為抗肌肉

抑制素抗體，如美國專利第 8,871,209 號或第 9,260,515 號中所描述）、抗升糖素受體（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0337045A1 號或第 US2016/0075778A1 號中所描述之抗 GCGR 抗體）、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、介白素 4 受體抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0271681A1 號或美國專利第 8,735,095 號或第 8,945,559 號中所描述之抗 IL4R 抗體）、抗介白素 6 受體抗體（例如如美國專利第 7,582,298 號、第 8,043,617 號或第 9,173,880 號中所描述之抗 IL6R 抗體）、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗介白素 33（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0271658A1 號或第 US2014/0271642A1 號中所描述之抗 IL33 抗體）、抗呼吸道融合病毒抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0271653A1 號中所描述之抗 RSV 抗體）、抗分化簇 3（例如抗 CD3 抗體，如美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號及美國申請案第 62/222,605 號中所描述）、抗分化簇 20（例如如美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號及美國專利第 7,879,984 號中所描述之抗 CD20 抗體）、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗分化簇 48（例如如美國專利第 9,228,014 號中所描述之抗 CD48 抗體）、抗 Fel d1 抗體（例如如美國專利第 9,079,948 號中所描述）、SARS-CoV-2 治療（包含卡西瑞單抗及依德單抗之 REGN-COV™）、抗中東呼吸道症候群病毒（例如如美國專利申請公開案第 US2015/0337029A1 號中所描述之抗 MERS 抗體）、針對伊波拉之抗體混合物（（包含阿替韋單抗、瑪替韋單抗及奧西韋單抗-ebgn 之 REGN-EB3（INMAZEB®））、抗伊波拉病毒抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2016/0215040 號中所描述）、抗茲卡病毒抗體、抗淋巴球活化基因 3 抗體（例如抗 LAG3 抗體或抗 CD223 抗體）、抗神經生長因子抗體（例如如美國專利申請公開案第 US2016/0017029 號及美國專利第 8,309,088 號及第 9,353,176 號中所描述之抗 NGF 抗體）以及抗活化素 A 抗體。在一些實施例中，雙特異性抗體選自由以下組成之群：抗 CD3×抗 CD20 雙特異性抗體（如

美國專利申請公開案第 US2014/0088295A1 號及第 US20150266966A1 號中所描述)、抗 CD3×抗黏蛋白 16 雙特異性抗體(例如抗 CD3×抗 Muc16 雙特異性抗體)及抗 CD3×抗前列腺特異性膜抗原雙特異性抗體(例如抗 CD3×抗 PSMA 雙特異性抗體)。亦參見美國專利公開案第 US 2019/0285580 A1 號。

【0154】抗體衍生物及片段適合於根據本發明產生，且包括但不限於：抗體片段(例如 ScFv-Fc、dAB-Fc、半抗體)、多特異性體(例如 IgG-ScFv、IgG-dab、ScFV-Fc-ScFV、三特異性體)及 Fc 融合蛋白(例如 Fc 融合體(N 端)、Fc 融合體(C 端)、單 Fc 融合體、雙特異性 Fc 融合體)。片語「含 Fc 蛋白」包括抗體、雙特異性抗體、含有 Fc 之抗體衍生物、含有 Fc 之抗體片段、Fc 融合蛋白、免疫黏附素及包含免疫球蛋白 CH2 及 CH3 區之至少功能部分的其他結合蛋白。「功能部分」係指可結合 Fc 受體(例如 FcγR；或 FcRn(新生兒 Fc 受體)及/或可參與補體活化之 CH2 及 CH3 區。若 CH2 及 CH3 區含有缺失、取代及/或插入或使其無法結合任何 Fc 受體且亦無法活化補體之其他修飾，則 CH2 及 CH3 區不具功能性。

【0155】具有非天然形式之抗原結合分子(ABM)及 ABM 結合物，諸如呈非天然組態之 Fab 域可根據本發明表現，且揭示於 WO 2021/026409 A1 中。多特異性結合分子(MBM)及 MBM 結合物可根據本發明產生，且揭示於 WO 2021/091953A1 及 WO 2021/030680 A1 中。

【0156】含 Fc 蛋白可包含免疫球蛋白域中之修飾，包括其中修飾影響結合蛋白之一種或多種效應功能(例如影響 FcγR 結合、FcRn 結合及因此半衰期及/或 CDC 活性之修飾)。此類修飾包括但不限於以下修飾及其組合，參考免疫球蛋白恆定區之 EU 編號：238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、

358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438及439。

【0157】舉例而言，而非作為限制，結合蛋白為含 Fc 蛋白且展現增強之血清半衰期（與不具有所述修飾之相同含 Fc 蛋白相比）且具有位置 250（例如 E 或 Q）；250 及 428（例如 L 或 F）；252（例如 L/Y/F/W 或 T）、254（例如 S 或 T）及 256（例如 S/R/Q/E/D 或 T）處之修飾；或 428 及/或 433（例如 L/R/SI/P/Q 或 K）及/或 434（例如 H/F 或 Y）處之修飾；或 250 及/或 428 處之修飾；或 307 或 308（例如 308F、V308F）及 434 處之修飾。在另一實例中，修飾可包含 428L（例如 M428L）及 434S（例如 N434S）修飾；428L、259I（例如 V259I）及 308F（例如 V308F）修飾；433K（例如 H433K）及 434（例如 434Y）修飾；252、254 及 256（例如 252Y、254T 及 256E）修飾；250Q 及 428L 修飾（例如 T250Q 及 M428L）；307 及/或 308 修飾（例如 308F 或 308P）。

【0158】如上文所陳述，本發明亦適合於產生其他分子，包括融合蛋白。此等蛋白質可包含兩種或更多種蛋白質之部分或全部，蛋白質之一為免疫球蛋白分子之 Fc 部分，該等蛋白質在其天然狀態下未融合。Fc 融合蛋白包括 Fc 融合體（N 端）、Fc 融合體（C 端）、單 Fc 融合體及雙特異性 Fc 融合體。包含與抗體衍生之多肽之各種部分（包括 Fc 域）融合的某些異源多肽之融合蛋白的製備已例如由 Ashkenazi 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 10535-39 (1991)；Byrn 等人, *Nature* 344:677-70, 1990；及 Hollenbaugh 等人, 「免疫球蛋白融合蛋白之構築」, 在 *Current Protocols in Immunology*, 增刊 4, 第 10.19.1 至 10.19.11 頁 (1992) 中描述。含受體 Fc 蛋白亦描述於 C. Huang, 「受體 Fc 融合治療劑、陷阱及 MFMETIBODY 技術 (Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MFMETIBODY technology) 」, 20(6) *Curr. Opin. Biotechnol.* 692-9 (2009) 中。

【0159】受體 Fc 融合蛋白包含與 Fc 部分偶合之受體的一個或多個細胞外域中

之一者或多者，其在一些實施例中包含鉸鏈區，隨後為免疫球蛋白之 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，Fc 融合蛋白含有結合至單一或超過一個配位體之兩條或更多條相異受體鏈。一些受體 Fc 融合蛋白可含有多個不同受體之配位體結合域。

【0160】 在一些實施例中，Fc 融合蛋白為受體 Fc 融合蛋白，其含有與 Fc 部分偶合之受體的一個或多個細胞外域。在一些實施例中，Fc 部分包含鉸鏈區，隨後為 IgG 之 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，受體 Fc 融合蛋白含有結合至單一配位體或多個配位體之兩條或更多條相異受體鏈。舉例而言，Fc 融合蛋白為 TRAP 蛋白，諸如 IL-1 陷阱（例如利納西普，其含有 IL-1RAcP 配位體結合區與 IL-1R1 細胞外區與 hIgG1 之 Fc 的融合體；參見美國專利第 6,927,044 號）或 VEGF 陷阱（例如阿柏西普或 ziv-阿柏西普，其含有 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 域 2 與 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 域 3 與 hIgG1 之 Fc 的融合體；參見美國專利第 7,087,411 號及第 7,279,159 號）。在其他實施例中，Fc 融合蛋白為 ScFv-Fc 融合蛋白，其含有與 Fc 部分偶合之抗體的一個或多個抗原結合域中之一者或多者，諸如可變重鏈片段及可變輕鏈片段。

【0161】 微陷阱蛋白為使用多聚化組分（MC）而非 Fc 部分之陷阱蛋白，且揭示於美國專利第 7,279,159 號及第 7,087,411 號中，且可根據本發明產生。

【0162】 雖然已參考例示性實施例描述本發明，但熟習此項技術者應理解，在不背離本發明之範圍的情況下，可作出各種變化且等效物可取代其要素。另外，可在不背離其基本範圍之情況下作出諸多修改以使特定情形或材料適應於教示內容。因此，不希望本發明限於作為經考慮用於執行此等發明之最佳模式而揭示的特定實施例，但本發明將包括屬於所附申請專利範圍之範圍內的所有實施例。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種藉由培養重組真核細胞來改良重組蛋白生產中重組蛋白效價之方法，該方法包含：

(a) 提供具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES；

(b) 在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中培養該等重組真核細胞；

(c) 由該等重組真核細胞表現所關注的重組蛋白；及

(d) 相對於在非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中產生較高效價之該重組蛋白。

【請求項2】 如請求項 1 之方法，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞及酵母細胞。

【請求項3】 如請求項 1 之方法，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：CHO、COS、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞（Vero）、CV1、腎臟、海拉細胞（HeLa）、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞的細胞株。

【請求項4】 如請求項 3 之方法，其中該真核細胞為 CHO 細胞。

【請求項5】 如請求項 1 之方法，其中該表現所關注重組蛋白發生在生產期、生長期或兩者期間。

【請求項6】 如請求項 1 之方法，其中該等重組真核細胞在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中之該培養發生在生產期、生長期或兩者期間。

【請求項7】 如請求項 1 之方法，其中該等重組真核細胞之該培養期間的細胞生長高於相似或相同重組真核細胞在非雜質減少之培養基中的細胞生長。

【請求項8】 如請求項 1 之方法，其中相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，該重組蛋白之該較高效價增加至少約 5%。

【請求項9】如請求項 1 之方法，其中該重組蛋白為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體(diabody)、三功能抗體(triabody)或四功能抗體(tetrabody)、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。

【請求項10】如請求項 1 之方法，其中該重組蛋白包含 Fc 域。

【請求項11】如請求項 10 之方法，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：Fc 融合蛋白、受體-Fc 融合蛋白（TRAP）、抗體、抗體片段及 ScFv-Fc 融合蛋白。

【請求項12】如請求項 11 之方法，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：抗 PD1 抗體、抗 PDL-1 抗體、抗 Dll4 抗體、抗 ANG2 抗體、抗 AngPt13 抗體、抗 PDGFR 抗體、抗 Erb3 抗體、抗 PRLR 抗體、抗 TNF 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 PCSK9 抗體、抗 GDF8 抗體、抗 GCGR 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、抗 IL4R 抗體、抗 IL6R 抗體、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗 RSV 抗體、抗 NGF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗 CD48 抗體、抗 CD3/抗 CD20 雙特異性抗體、抗 CD3/抗 MUC16 雙特異性抗體及抗 CD3/抗 PSMA 雙特異性抗體。

【請求項13】如請求項 11 之方法，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：阿利庫單抗（alirocumab）、阿替韋單抗（atoltivimab）、瑪替韋單抗（maftivimab）、奧西韋單抗（odesivimab）、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗（casirivimab）、依德單抗（imdevimab）、賽咪單抗（cemiplimab）、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗（dupilumab）、恩維納單抗（evinacumab）、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗（fasimumab）、內斯瓦庫單抗（nesvacumab）、特里沃單抗（trevogrumab）、利努蘇單抗（rinucumab）及賽瑞單抗（sarilumab）。

【請求項14】如請求項 13 之方法，其中該重組蛋白為度匹魯單抗。

【請求項15】 一種具有減少之雜質的細胞培養基，該培養基包含具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基包含 4-羥乙基哌啶乙磺酸（HEPES）緩衝液，且具有小於約 800 μmol 之具有分子量為 267.07 的 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 80 μmol 之具有分子量為 221.06 的 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES。

【請求項16】 如請求項 15 之細胞培養基，其中該培養基係無水解產物的。

【請求項17】 如請求項 15 之細胞培養基，其中該培養基係化學成分確定的。

【請求項18】 如請求項 15 之細胞培養基，其進一步包含胰島素。

【請求項19】 如請求項 15 之細胞培養基，其進一步包含 $\geq 0.09 \text{ mM} \pm 0.014 \text{ mM}$ 鳥胺酸、 $\geq 0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 腐胺或其組合。

【請求項20】 如請求項 15 之細胞培養基，其進一步包含 $\geq 40 \pm 6 \text{ mM}$ 之胺基酸或其鹽之混合物。

【請求項21】 如請求項 20 之細胞培養基，其中該胺基酸之混合物由丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸組成。

【請求項22】 如請求項 15 之細胞培養基，其進一步包含一種或多種脂肪酸及生育酚。

【請求項23】 如請求項 22 之細胞培養基，其中該一種或多種脂肪酸係選自由以下組成之群：亞麻油酸、次亞麻油酸、硫辛酸、油酸、棕櫚酸、硬脂酸、花生酸、花生四烯酸、月桂酸、二十二烷酸、癸酸、十二烷酸、己酸、二十四烷酸、肉豆蔻酸及辛酸。

【請求項24】 如請求項 15 之細胞培養基，其進一步包含核苷之混合物。

【請求項25】 如請求項 24 之細胞培養基，其中該核苷之混合物包含腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、胸苷及次黃嘌呤中之一者或多者。

【請求項26】 如請求項 25 之細胞培養基，其包含腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、

胸苷及次黃嘌呤。

【請求項27】 如請求項 15 之細胞培養基，其進一步包含一種或多種二價陽離子之鹽。

【請求項28】 如請求項 27 之細胞培養基，其中該二價陽離子為鎂離子、鈣離子或兩者。

【請求項29】 如請求項 28 之細胞培養基，其包含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 。

【請求項30】 如請求項 15 之細胞培養基，其中該培養基為化學成分確定的培養基且包含：HEPES 緩衝液；胺基酸之混合物；視情況之核苷之混合物；一種或多種脂肪酸及生育酚；一種或多種二價陽離子之鹽；及一種或多種維生素。

【請求項31】 如請求項 30 之細胞培養基，其進一步包含胰島素。

【請求項32】 一種用於選擇用於細胞培養之確定細胞培養基以改良細胞培養效能的方法，該方法包含：

(a) 提供包含 4-羥乙基哌啶乙磺酸 (HEPES) 緩衝液之確定細胞培養基；

(b) 分析包含該 HEPES 緩衝液之該確定細胞培養基，以測定該確定細胞培養基中存在的具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質之量及具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質之量；

(c) 若測定包含該 HEPES 緩衝液之該確定細胞培養基具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，則選擇包含該 HEPES 緩衝液之該確定細胞培養基用於細胞培養；

其中相比於非 HEPES 相關雜質減少之培養基中的細胞培養效能，包含具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES 之該 HEPES 緩衝液的該確定細胞培養基之使用係改良細胞培養效能。

【請求項33】 如請求項 32 之方法，其中該改良之細胞培養效能包括改良之細胞培養效價及/或細胞生長。

【請求項34】一種用於選擇用於細胞培養之 HEPES 緩衝液以改良細胞培養效能的方法，該方法包含：

(a) 提供 4-羥乙基哌吡乙磺酸 (HEPES) 緩衝液；

(b) 分析該 HEPES 緩衝液以確定該 HEPES 緩衝液中存在的具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質之量及具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質之量；

(c) 若確定該 HEPES 緩衝液具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，則選擇該 HEPES 緩衝液用於細胞培養；

其中相比於在具有較高量之該等雜質的 HEPES 緩衝液存在下之細胞培養效能，待與該細胞培養結合使用的具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES 的該 HEPES 緩衝液之使用係改良細胞培養效能。

【請求項35】如請求項 34 之方法，其中該改良之細胞培養效能包括改良之細胞培養效價及/或細胞生長。

【請求項36】一種細胞培養物，其包含細胞及如請求項 15 至 31 中任一項之細胞培養基。

【請求項37】如請求項 36 之細胞培養物，其中該細胞為真核細胞。

【請求項38】如請求項 37 之細胞培養物，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞及酵母細胞。

【請求項39】如請求項 36 之細胞培養物，當該細胞可表現選自由以下組成之群的抗體時：阿利庫單抗、阿替韋單抗、瑪替韋單抗、奧西韋單抗、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗、依德單抗、賽咪單抗、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗、恩維納單抗、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗、內斯瓦庫單抗、特里沃單抗、利努蘇

單抗及賽瑞單抗。

【請求項40】 如請求項 39 之細胞培養物，當該細胞可表現度匹魯單抗時。

【請求項41】 如請求項 8 之方法，其中相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，該重組蛋白之該較高效價增加至少約 10%。

【請求項42】 如請求項 8 之方法，其中相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，該重組蛋白之該較高效價增加至少約 15%。

【請求項43】 如請求項 8 之方法，其中相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，該重組蛋白之該較高效價增加至少約 25%。

【請求項44】 如請求項 1 之方法，其中具有減少之雜質的培養基中活細胞之倍增速率比非雜質減少之培養基中培養之細胞的倍增速率大至少 5%。

【請求項45】 如請求項 44 之方法，其中具有減少之雜質的培養基中活細胞之倍增速率比非雜質減少之培養基中培養之細胞的倍增速率大至少 10%。

【請求項46】 如請求項 44 之方法，其中具有減少之雜質的培養基中活細胞之倍增速率比非雜質減少之培養基中培養之細胞的倍增速率大至少 15%。

【請求項47】 如請求項 44 之方法，其中具有減少之雜質的培養基中活細胞之倍增速率比非雜質減少之培養基中培養之細胞的倍增速率大至少 25%。

【請求項48】 如請求項 15 之細胞培養基，其中該細胞培養基包含至少一種選自由以下組成之群的化合物：乙烯磺酸、HEPES+[O]-[H₂]、乙醯胺基甲磺酸、HEPES+[O]、2,2-二羥基乙磺酸、HEPES-[C₂H₆]+[O] [含 SO₃]物種。

【請求項49】 一種細胞培養物，其包含 (i) 至少一種可表現重組蛋白之重組真核細胞及 (ii) 細胞培養基，其中該細胞培養物係藉由包含以下步驟之方法產生：

(a) 提供具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES；

(b) 在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中培養該等重組真核細胞；

(c) 由該等重組真核細胞表現所關注重組蛋白；及

(d) 相對於在非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中產生較高效價之該重組蛋白。

【請求項50】 如請求項 49 之細胞培養物，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞及酵母細胞。

【請求項51】 如請求項 50 之細胞培養物，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：CHO、COS、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞、CV1、腎臟、海拉細胞、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞的細胞株。

【請求項52】 如請求項 51 之細胞培養物，其中該真核細胞為 CHO 細胞。

【請求項53】 如請求項 49 之細胞培養物，其中該表現所關注重組蛋白發生在生產期、生長期或兩者期間。

【請求項54】 如請求項 49 之細胞培養物，其中該等重組真核細胞在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中之該培養發生在生產期、生長期或兩者期間。

【請求項55】 如請求項 49 之細胞培養物，其中該等重組真核細胞之該培養期間的細胞生長高於相似或相同重組真核細胞在非雜質減少之培養基中的細胞生長。

【請求項56】 如請求項 49 之細胞培養物，其中相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，該重組蛋白之該較高效價增加至少約 5%。

【請求項57】 如請求項 49 之細胞培養物，其中該重組蛋白為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。

【請求項58】 如請求項 49 之細胞培養物，其中該重組蛋白包含 Fc 域。

【請求項59】 如請求項 58 之細胞培養物，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：Fc 融合蛋白、受體-Fc 融合蛋白（TRAP）、抗體、抗體片段及 ScFv-Fc 融合蛋白。

【請求項60】 如請求項 59 之細胞培養物，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：抗 PD1 抗體、抗 PDL-1 抗體、抗 Dll4 抗體、抗 ANG2 抗體、抗 AngPt13 抗體、抗 PDGFR 抗體、抗 Erb3 抗體、抗 PRLR 抗體、抗 TNF 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 PCSK9 抗體、抗 GDF8 抗體、抗 GCGR 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、抗 IL4R 抗體、抗 IL6R 抗體、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗 RSV 抗體、抗 NGF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗 CD48 抗體、抗 CD3/抗 CD20 雙特異性抗體、抗 CD3/抗 MUC16 雙特異性抗體及抗 CD3/抗 PSMA 雙特異性抗體。

【請求項61】 如請求項 59 之細胞培養物，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：阿利庫單抗、阿替韋單抗、瑪替韋單抗、奧西韋單抗、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗、依德單抗、賽咪單抗、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗、恩維納單抗、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗、內斯瓦庫單抗、特里沃單抗、利努蘇單抗及賽瑞單抗。

【請求項62】 如請求項 61 之細胞培養物，其中該重組蛋白為度匹魯單抗。

【請求項63】 一種在細胞培養物中產生之重組蛋白，該細胞培養物包含（i）至少一種可表現該重組蛋白之重組真核細胞及（ii）細胞培養基，其中該重組蛋白係藉由包含以下步驟之方法產生：

（a）提供具有減少之雜質的確定細胞培養基，該確定細胞培養基具有小於約 4000 μmol 之具有分子量為 267.07 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES，及小於約 400 μmol 之具有分子量為 221.06 之 HEPES 相關雜質/莫耳總 HEPES；

（b）在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中培養該等重組真核細胞；

(c) 由該等重組真核細胞表現所關注重組蛋白；及

(d) 相對於在非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中產生較高效價之該重組蛋白。

【請求項64】 如請求項 63 之重組蛋白，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、禽類細胞、昆蟲細胞及酵母細胞。

【請求項65】 如請求項 64 之重組蛋白，其中該真核細胞係選自由以下組成之群：CHO、COS、視網膜細胞、非洲綠猴腎細胞、CV1、腎臟、海拉細胞、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60、淋巴球、A431、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞的細胞株。

【請求項66】 如請求項 65 之重組蛋白，其中該真核細胞為 CHO 細胞。

【請求項67】 如請求項 63 之重組蛋白，其中該表現所關注重組蛋白發生在生產期、生長期或兩者期間。

【請求項68】 如請求項 63 之重組蛋白，其中該等重組真核細胞在具有減少之雜質的該確定細胞培養基中之該培養發生在生產期、生長期或兩者期間。

【請求項69】 如請求項 63 之重組蛋白，其中該等重組真核細胞之該培養期間的細胞生長高於相似或相同重組真核細胞在非雜質減少之培養基中的細胞生長。

【請求項70】 如請求項 63 之重組蛋白，其中相比於非減少雜質之培養基中培養的相似或相同細胞之重組蛋白的效價，該重組蛋白之該較高效價增加至少約 5%。

【請求項71】 如請求項 63 之重組蛋白，其中該重組蛋白為抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多特異性抗體、雙特異性抗體、抗原結合抗體片段、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。

【請求項72】 如請求項 63 之重組蛋白，其中該重組蛋白包含 Fc 域。

【請求項73】 如請求項 72 之重組蛋白，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：Fc 融合蛋白、受體-Fc 融合蛋白（TRAP）、抗體、抗體片段及 ScFv-Fc 融合蛋白。

【請求項74】 如請求項 73 之重組蛋白，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：抗 PD1 抗體、抗 PDL-1 抗體、抗 Dll4 抗體、抗 ANG2 抗體、抗 AngPt13 抗體、抗 PDGFR 抗體、抗 Erb3 抗體、抗 PRLR 抗體、抗 TNF 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 PCSK9 抗體、抗 GDF8 抗體、抗 GCGR 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 IL1R 抗體、抗 IL4R 抗體、抗 IL6R 抗體、抗 IL1 抗體、抗 IL2 抗體、抗 IL3 抗體、抗 IL4 抗體、抗 IL5 抗體、抗 IL6 抗體、抗 IL7 抗體、抗 RSV 抗體、抗 NGF 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD19 抗體、抗 CD28 抗體、抗 CD48 抗體、抗 CD3/抗 CD20 雙特異性抗體、抗 CD3/抗 MUC16 雙特異性抗體及抗 CD3/抗 PSMA 雙特異性抗體。

【請求項75】 如請求項 73 之重組蛋白，其中該重組蛋白係選自由以下組成之群：阿利庫單抗、阿替韋單抗、瑪替韋單抗、奧西韋單抗、奧西韋單抗-ebgn、卡西瑞單抗、依德單抗、賽咪單抗、賽咪單抗-rwlc、度匹魯單抗、恩維納單抗、恩維納單抗-dgnb、法斯單抗、內斯瓦庫單抗、特里沃單抗、利努蘇單抗及賽瑞單抗。

【請求項76】 如請求項 75 之重組蛋白，其中該重組蛋白為度匹魯單抗。

【請求項77】 如上述請求項中任一項之細胞。

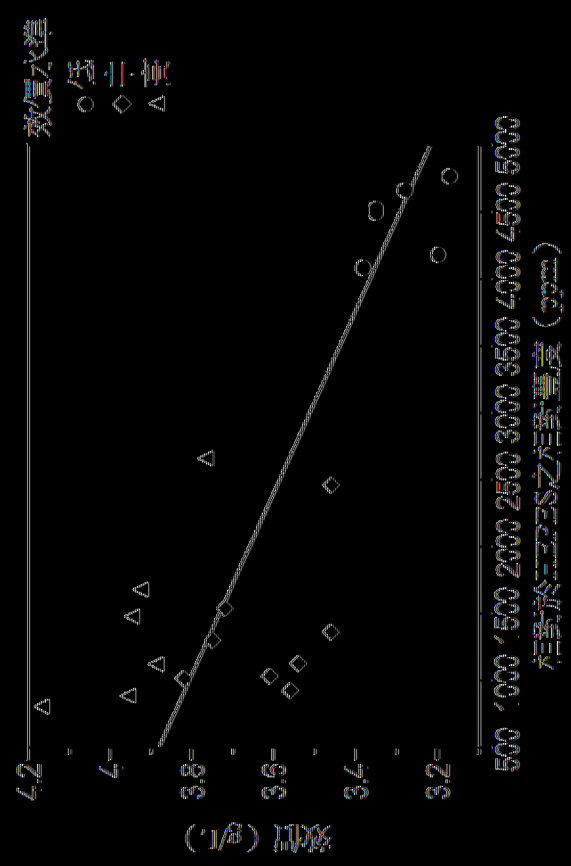
【請求項78】 如上述請求項中任一項之細胞培養物。

【請求項79】 如上述請求項中任一項之方法。

【請求項80】 如上述請求項中任一項之重組蛋白。

圖 2A

20 個批次，位置 2



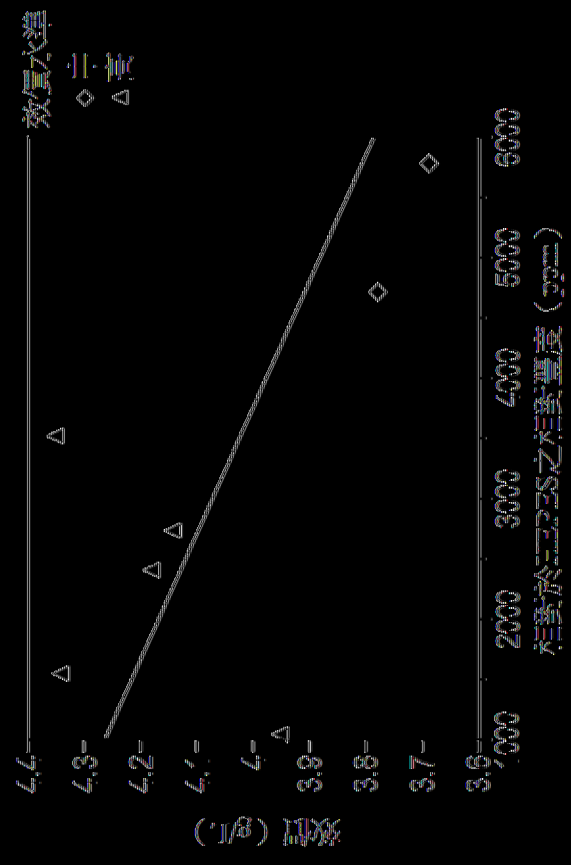
聚合描述	
R平方	0.629054
調整後的R平方	0.608446
均方根誤差	0.176124
反應均值	3.613
偏差 (或權重總和)	20

皮爾森相關係數：-0.79

圖 2A

圖 2B

7 個批次，位置 2



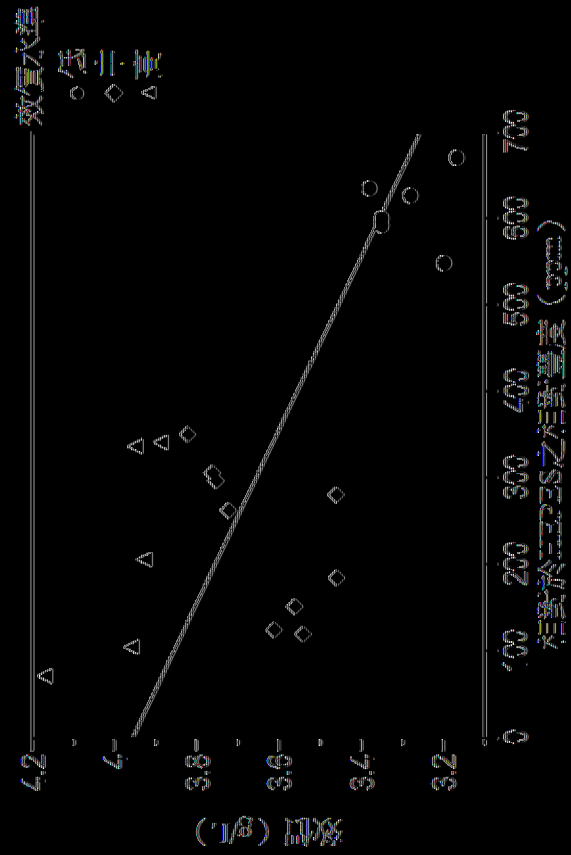
聚合描述	
R平方	0.381483
調整後的R平方	0.257779
均方根誤差	0.225396
反應均值	4.061429
偏差 (或權重總和)	7

皮爾森相關係數：-0.62

圖 2B

REFS-044

20個批次，位置3

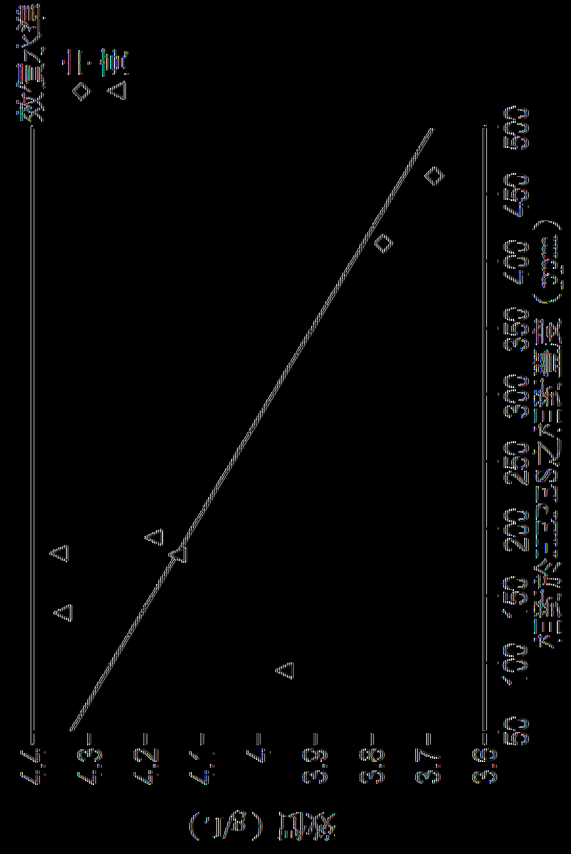


聚合概述	
R平方	0.497884
調整後的R平方	0.469989
均方根誤差	0.204911
反應均值	3.613
觀察 (或潛重總和)	20

皮爾森相關係數：-0.71

圖4.4

7個批次，位置2



聚合概述	
R平方	0.589469
調整後的R平方	0.507363
均方根誤差	0.18363
反應均值	4.06429
觀察 (或潛重總和)	7

皮爾森相關係數：-0.77

圖4.3

5A



乙種炭素，環境

卷之二



總編輯

