



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I636136 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：103109931

(51)Int. Cl. : **C12P21/08 (2006.01)**
C12N1/16 (2006.01)(30)優先權：2013/03/15 美國
2013/03/15 美國(71)申請人：艾爾德生物製藥股份有限公司 (美國) ALDER BIOPHARMACEUTICALS, INC.
(US)
美國(72)發明人：蘭斯尼基 蓋瑞 LESNICKI, GARY (CA)；麥克尼爾 派翠西亞 D MCNEILL,
PATRICIA DIANNE (US)；哈特納 法蘭茲 HARTNER, FRANZ (AT)；楊格 馬
克 YOUNG, MARK (US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

US 6221630B1

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：2 項 圖式數：52 共 173 頁

(54)名稱

在酵母菌及其它轉型細胞中多肽高產量表現用之溫度變動技術

TEMPERATURE SHIFT FOR HIGH YIELD EXPRESSION OF POLYPEPTIDES IN YEAST AND
OTHER TRANSFORMED CELLS

(57)摘要

揭示用於生產異源性蛋白質之方法。尤其，本揭示提供生產所欲的蛋白質，包括多次級單元型蛋白質，例如抗體的改進方法，且該方法具有較高的產量及改進的純度。於例示性具體例中，該經轉型的細胞係酵母菌，例如親甲基醇酵母菌，如巴斯德畢赤酵母菌。

Methods for producing heterologous proteins are disclosed. In particular, the present disclosure provides improved methods of producing desired proteins, including multi-subunit proteins such as antibodies, with a higher yield and improved purity. In exemplary embodiments, the transformed cells are a yeast, e.g., methylotrophic yeast such as *Pichia pastoris*.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

在酵母菌及其它轉型細胞中多肽高產量表現用之溫度變動技術 / TEMPERATURE SHIFT FOR HIGH YIELD EXPRESSION OF POLYPEPTIDES IN YEAST AND OTHER TRANSFORMED CELLS

【技術領域】

相關申請案之交叉引述

[0001]本申請案主張於2013年3月15日提申的美國臨時專利申請案案號61/791,471，標題為“TEMPERATURE SHIFT FOR HIGH YIELD EXPRESSION OF POLYPEPTIDES IN YEAST AND OTHER TRANSFORMED CELLS”的利益，以及也主張於2013年3月15日提申的美國臨時專利申請案案號61/790,613的利益，其中各者皆在此以其之全體併入本文中以作為參考資料。

[0002]本申請案包括一生物序列表作為其揭示的一部份，其係於2014年3月13日建立，包含於檔案名稱“43257o3413.txt”內且檔案名稱為“67858o730201.txt”及大小為14,286位元，其在此以其之全體併入本案以作為參考資料。

發明領域

[0003]本揭示大體而言係有關於在酵母菌及其他細胞中生產所欲的蛋白質之方法。本揭示包括用來表現單一和多次級單元型蛋白質，包括抗體之方法。於例示性具體例

中，該細胞係一種酵母菌，例如巴斯德畢赤酵母菌。與慣用的方法相比，標題方法之具體例能生產增高產量的抗體或其他所欲的蛋白質。此外，本發明係有關於發酵方面。尤其，本發明係有關於重組型酵母菌細胞的發酵。

【先前技術】

發明背景

[0004]許多重組生產的蛋白質已經在管制許可下用於人類治療的用途。越來越多的此等治療性蛋白質於微生物表現系統內生產。甚至，根據近來的回顧，直至2009年一月，美國食品暨藥物管理局或歐盟藥物管理機構所許可的151種蛋白質為基的重組型藥物中，接近一半使用微生物表現系統來生產(Ferrer-Miralles等人，*Microbial Cell Factories* 2009，8:17)。

[0005]在此等重組生產的蛋白質之中為抗體，抗體照慣例為二個相同輕鏈與二個相同重鏈所組成的四聚體蛋白質。目前已上市或是正在發展數百種治療性單株抗體(mAbs)。功能性抗體的生產作用一般涉及二種多肽鏈的合成作用，以及涉及數個轉譯後事件，包括N端分泌訊息序列的蛋白質分解性處理；將多肽適當摺疊與組裝成為四聚體；形成雙硫鍵；以及典型包括一種專一性N-鍵結型糖化作用。

[0006]先前已經使用巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)作為製造治療用的重組型蛋白質之生產宿主。實例包括生產人類血清白蛋白及血管舒緩素(Kallikrein)抑制劑、艾卡拉肽(Ecallantide) (Reichert, J. mAbs 4:3 1-3, 2012)。已經使

用巴斯德畢赤酵母菌來生產正確組裝的重鏈與輕鏈之重組型單株抗體(U.S.專利第7,927,863號，其在此完整地併入本案以作為參考資料)。甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAP)啓動子能驅動缺少N-糖化作用之抗體表現於酵母菌內(U.S.專利第7,927,863號)。

[0007] Baumann等人近來的工作(BMC Genomics 2011, 12:218)使用GAP系統來生產重組型抗體Fab片段，已經顯示出先前以為會是持續型的此系統，在使用葡萄糖作為碳源與能源、於缺氧的條件下展現出增高的表現。缺氧的條件為允許發酵作用中溶氧的位準降到非常低的位準，而同時仍然經由通氣作用和攪拌來供應氧至培養物的該等條件。此會導致混合的需氧性的代謝及發酵性的代謝。於發酵槽內使用缺氧的條件會導致乙醇毒性的累積，以及必須小心運用以控制該方法，以使毒性的位準不會累積。Baumann透過測量發酵槽內乙醇的位準以及調整葡萄糖進料速率來降低其之累積。然而，此方法不太可擴充，因為可靠地測量大規模發酵槽內之乙醇的技術不是可廣泛可用的。

[0008] 真菌宿主，諸如親甲基醇(methyotrophic)酵母菌巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)，於治療性蛋白質表現方面具有難得的優點，包括其等不會分泌高量的內源性蛋白質、具有強的可誘導性啓動子可用於生產異源性蛋白質、能於合成的化學培養基及沒有使用動物血清之培養基中生長，以及能生產高效價的重組型蛋白質(Cregg等人，FEMS Microbiol. Rev. 24: 45-66 (2000))。先前的研究工作，包括

本發明人進行的工作，已有助於確認巴斯德畢赤酵母菌(*P. pastoris*)係用於生產功能性抗體之具成本效益的平臺，該功能性抗體具有適用於研究、診斷及治療的用途。參見專利權共有的美國專利第7,927,863號與第7,935,340號，其中各者在此完整地併入本案以作為參考資料。文獻中亦已知用於供表現重組型蛋白質的巴斯德畢赤酵母菌發酵作用之設計方法，包括最佳化細胞密度、肉汁(broth)體積、pH、基質進料速率及各反應階段的長度。參見美國紐澤西州托托瓦(Totowa)的胡馬納出版社(Humana Press)出版及由Cregg,J.M.所編輯之2007，“分子生物學方法(Methods in Molecular Biology)”乙書第389期的畢赤酵母菌屬操作程序(Pichia Protocols)”(第二版)，第43-63頁之Zhang等人所著“Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations”乙文，其在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0009]此外，本申請人和其餘人先前的研究工作已經說明增加酵母菌內蛋白質生產之方法，其係經由包括在生產階段開始時或者接近生產階段開始時，添加乙醇推注(addition of a bolus of ethanol)至培養物，以及在多次級單元型蛋白質方面，例如抗體，變化基因複製體數目及次級單元基因之間的複製體數目比率。見US 20130045888，標題為，Multi-Copy Strategy For High-Titer And High-Purity Production Of Multi-Subunit Proteins Such As Antibodies In Transformed Microbes Such As *Pichia pastoris*；以及

US20120277408，標題爲，High-Purity Production Of Multi-Subunit Proteins Such As Antibodies In Transformed Microbes Such As *Pichia Pastoris*，其中各者在此完整地併入本案以作爲參考資料。

[0010]雖然前述之Zhang等人的文章做了一些努力要說明一種系統性的方法來最佳化前述的參數，並且提供理論性的方法來瞭解一些此等參數的相互影響，但是表現之最佳化主要仍是經驗過程。因爲此種相互影響，大體而言不足以最佳化各個參數，同時使所有其餘者保持固定。舉例來說，最佳的培養基組成可以隨著培養密度、菌株背景(strain background)、進料速率、攪拌、加氣作用等等而變化。因爲此種複雜的相互影響，可以測試之參數組合的數量可能是無限大的，且即使已經廣泛地最佳化表現系統，還是仍有大量未經測試、對產量及/或純度有益的條件。

【發明內容】

發明概要

[0011]如同以下進一步所述，申請人已經識別出大幅增加真核細胞，諸如酵母菌，內所欲的蛋白質之產量的方法。即使對於已經高度最佳化的表現系統，此方法也會增加所欲的蛋白質之產量高達大約30%。

[0012]於一態樣中，本揭示提供一種生產所欲的蛋白質之方法，其包含：(a)於第一個溫度下培養包含一個或多個基因的真核細胞，該一個或多個基因提供該所欲的蛋白質之表現；以及(b)於第二個溫度下培養該真核細胞，且允許

該真核細胞生產該所欲的蛋白質；其中該第二個溫度與該第一個溫度不同。選擇性地，該培養可以包含以下步驟：
(a)於分批補料發酵條件下培養酵母菌細胞族群於培養基內，其中各個酵母菌細胞包含編碼一多肽的DNA區段，其中該DNA區段係操作地連結至甘油醛-3-磷酸(GAP)轉錄啓動子和轉錄終止子，其中該蛋白質不是甘油醛-3-磷酸，其中該發酵包含第一進料速率之可發酵糖進料，以及其中該發酵係以第一氣輸送速率予以攪拌；(b)測量該族群在分批發酵的期間的呼吸商(RQ)，及判定是否該呼吸商落在所欲的預定範圍內，其中於該培養起始之後大約20-40小時之該RQ所欲的預定範圍係介於大約1.08和大約1.35之間；(c)當該RQ在所欲的預定範圍之外時，調整該可發酵糖進料速率至第二進料速率或是調整該氣輸送速率至第二氣輸送速率中之一者或二者；(d)在整個培養步驟重複步驟(b)和(c)一或多次；(e)從該培養基收穫該酵母菌細胞；以及(f)從該細胞及/或該培養基回收該多肽。

[0013]該第一個溫度可以介於大約20度C和大約32度C之間。

[0014]該第一個溫度可以介於大約24度C和大約31.5度C之間。

[0015]該第一個溫度可以介於大約27度C和大約31度C之間。

[0016]該第一個溫度可以介於大約27.5度C和大約30度C之間。

[0017]該第一個溫度可以介於大約20度C和大約29.5度C之間。

[0018]該第一個溫度可以介於大約24度C和大約29度C之間。

[0019]該第一個溫度可以介於大約27度C和大約28.5度C之間。

[0020]該第一個溫度可以介於大約27.5度C和大約28.5度C之間。

[0021]該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約1度C和大約6度C之間。

[0022]該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約1度C和大約3度C之間。

[0023]該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約2度C和大約4度C之間。

[0024]該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約2度C和大約3度C之間。

[0025]該第二個溫度可以介於大約30度C和大約34度C之間。

[0026]該第二個溫度可以介於大約30度C和大約32度C之間。

[0027]該第二個溫度可以介於大約30度C和大約31.5度C之間。

[0028]該第二個溫度可以為大約30度C或大約31度C。

[0029]該第二個溫度可以比該第一個溫度高。

[0030]該所欲的蛋白質包含一種多次級單元型複合體。

[0031]該多次級單元型複合體可包含一種抗體。

[0032]該抗體可以為人類的或人類化的(humanized)。

[0033]該抗體可以為對IL-6、TNF- α 、CGRP、PCSK9、HGF或NGF專一的。

[0034]該方法可以增加該所欲的蛋白質之產量。

[0035]相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法可以減少一個或多個產物相關變異體的相對豐度。

[0036]相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法可以減少產物相關變異體的相對豐度，該產物相關變異體具有高於或低於該所欲的多次級單元型複合體之表觀分子量，表觀分子量係如藉由粒徑篩析層析法或凝膠電泳檢測。

[0037]相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法可以減少具有異常的雙硫鍵之複合體的相對豐度。

[0038]相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的該相同方法，該方法可以減少具有減少的半胱胺酸之複合體的相對豐度。

[0039]相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法可以減少具有異常的醣化作用之複合體的相對豐度。

[0040]相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法可以減少一或多個產物相關變異體的相對豐度。

[0041]該真核細胞可包含酵母菌細胞。

[0042]該酵母菌細胞可包含親甲基醇(methylotrophic)酵母菌。

[0043]該親甲基醇酵母菌可以為畢赤酵母菌(*Pichia*)屬。

[0044]該畢赤酵母菌屬之親甲基醇酵母菌可以為巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)。

[0045]該畢赤酵母菌屬之親甲基醇酵母菌可以選自於以下所構成的群組：安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*)、季也蒙畢赤酵母菌(*Pichia guillermordii*)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)，以及因諾托畢赤酵母菌(*Pichia inositovera*)。

[0046]可將用於表現該所欲的蛋白質之基因嵌入一個或多個基因座中。

[0047]該等基因座中之至少一者可選自於以下所組成之群組：pGAP基因座、3' AOX TT基因座；PpURA5；OCH1；AOX1；HIS4；GAP；pGAP；3' AOX TT；ARG；以及HIS4 TT基因座。

[0048]編碼該所欲的蛋白質之次級單元之基因中的至少一者，可以在可誘導性或構成性(consitutive)啓動子之控制下表現。

[0049]該可誘導性啓動子可以選自於以下所組成之群組：AOX1、CUP1、四環黴素可誘導性啓動子、硫胺素可誘導性啓動子，以及FLD1啓動子。

[0050]步驟(a)可以包含培養該真核細胞於含有甘油作為碳源之培養基內，直到該甘油耗盡為止。

[0051]該所欲的蛋白質可以在選自於以下所組成之群組的啓動子之控制下表現：CUP1、AOX1、ICL1、甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAP)、FLD1、ADH1、醇去氫酶II、GAL4、PHO3、PHO5與Pyk啓動子、四環黴素可誘導性啓動子、硫胺素可誘導性啓動子、由其所衍生的嵌合啓動子、酵母菌啓動子、哺乳類動物啓動子、昆蟲啓動子、植物啓動子、爬蟲類啓動子、兩棲動物啓動子、病毒啓動子，以及禽類啓動子。

[0052]該真核細胞可為二倍體、四倍體細胞，或是多倍體。

[0053]該方法可進一步包括從該真核細胞或從該培養基純化該所欲的蛋白質。

[0054]該所欲的蛋白質可從該真核細胞之細胞內組分、細胞質、核質，或是膜予以純化。

[0055]該真核細胞可將該所欲的蛋白質分泌至培養基中。

[0056]步驟(a)可以包含分批階段(batch phase)。

[0057]該分批階段可以包含培養該真核細胞於含有碳源之培養基內。

[0058]該分批階段的終止可以藉由該培養基內該碳源之耗盡來判定。

[0059]步驟(b)可以包含分批補料階段(fed batch phase)。

[0060]該呼吸商(RQ)於步驟(b)期間可以維持在規定值或在規定範圍內。

[0061]該規定的RQ值可以為大約1.12。

[0062]該規定的RQ範圍可以為大約1.0至1.24，或大約1.06至1.18，或大約1.09至1.15。

[0063]該RQ值可以或是該RQ範圍可以藉由調變以下之一者或多或少而維持：進料速率、進料組成、供應氣流率、攪拌速率，及/或供應氣之氧濃度。

[0064]該方法可以包含分批階段及分批補料階段。

[0065]該分批階段可以包含以碳源來培養該真核細胞，直到該碳源耗盡為止。該碳源可以包含以下之一者或多或少：甘油、葡萄糖、乙醇、檸檬酸鹽、山梨糖醇、木糖、海藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖、蜜二糖、乳糖、麥芽糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、甘露糖醇及棉子糖，以及較佳為包含甘油。

[0066]該分批補料階段可以在該分批階段之後起始。

[0067]可以在該分批階段的終止或接近該分批階段的終止，在該分批補料階段的開始或是接近該分批補料階段的開始，在該分批階段和該分批補料階段之間，進行溫度變動。

[0068] 舉例來說，可以在碳源耗盡之後，或者在開始進料添加之前，或者在開始進料添加之後，進行溫度變動。

[0069] 較佳在開始進料添加之後不超過5小時，例如不超過4小時，不超過3小時，不超過2小時，不超過1小時，不超過30分鐘，不超過20分鐘，不超過5分鐘，進行溫度變動。然而，可以在更早或是在更晚的時間進行溫度變動。

[0070] 該方法可以包括添加乙醇推注(*addition of an ethanol bolus*)至培養物。添加乙醇推注可以與添加至起始培養物的碳源之耗盡同時發生，起始培養物的碳源之耗盡可以藉由溶氧濃度的快速增加(溶氧尖波(*spike*))或是其他方式而偵測到。

[0071] 乙醇推注可以造成培養物內介於大約0.01%至大約4%之間的乙醇濃度，介於大約0.02%至大約3.75%之間，介於大約0.04%至大約3.5%之間，介於大約0.08%至大約3.25%之間，介於大約0.1%至大約3%之間，介於大約0.2%至大約2.75%之間，介於大約0.3%至大約2.5%之間，介於大約0.4%至大約2.25%之間，介於大約0.5%至大約1.5%之間，介於大約0.5%至大約2%之間，介於大約0.6%至大約1.75%之間，介於大約0.7%至大約1.5%之間，或者介於大約0.8%至大約1.25%之間的乙醇濃度。

[0072] 乙醇推注可以造成培養物內的乙醇濃度可為至少大約0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.10%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%或者0.9% (w/v)。

[0073]乙醇推注可以造成培養物內的乙醇濃度可以為至多大約4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.8%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.35%、0.3%、0.25%、0.2%，或者0.15% (w/v)。

[0074]添加乙醇推注的步驟可包含添加乙醇至該培養物、添加含有乙醇之載劑至該培養物、添加該細胞至含有乙醇之培養基或載劑，或者替換部分的培養基。

[0075]該所欲的蛋白質可包含一種或多種多肽，其含有至少一個雙硫鍵。

[0076]該所欲的蛋白質可以包含一種多次級單元型複合體。

[0077]該多次級單元型複合體可包含一種抗體。

[0078]相對於在沒有溫度變動下所進行的相同方法，該方法可以減少一個或多個產物相關變異體的相對豐度。

[0079]相對於在沒有溫度變動下所進行的相同方法，該方法可以減少產物相關變異體的相對豐度，該產物相關變異體具有高於或低於該所欲的多次級單元型複合體之表觀分子量，表觀分子量係如藉由粒徑篩析層析法或凝膠電泳檢測。

[0080]相對於在沒有溫度變動下所進行的相同方法，該方法可以減少具有異常的化學計量之複合體的相對豐度。

[0081]相對於在沒有溫度變動下所進行的相同方法，該方法可以減少具有異常的雙硫鍵之複合體的相對豐度。

[0082]該方法可以包含添加一種進料至該真核細胞。

[0083]該呼吸商(RQ)值可以維持在規定值或是在規定的範圍之內。該規定的RQ值可以為1.12。該規定的RQ範圍可以為，舉例來說，1.0至1.24，或1.06至1.18，或是1.09至1.15。

[0084]該規定的RQ值或範圍可以藉由調變(增加或減少)以下之一者或更多者而維持：葡萄糖濃度、氧的可用性、攪拌強度、氣體壓力、供應的空氣或其他氣體混合物之流率、培養物的黏度、培養物密度、供應的空氣或其他氣體混合物內之氧濃度，以及溫度。舉例來說，可以調變(增加或減少)進料添加速率(進料速率)俾以控制呼吸商(RQ)，諸如維持在規定的RQ值或是範圍。

[0085]該進料可以包含至少一種可發酵的碳源。

[0086]該碳源可以包含以下之一者或更多者：甘油、葡萄糖、乙醇、檸檬酸鹽、山梨糖醇、木糖、海藻糖、阿拉伯糖、半乳糖、果糖、蜜二糖、乳糖、麥芽糖、鼠李糖、核糖、甘露糖、甘露糖醇及棉子糖。

[0087]可將用於表現該所欲的蛋白質之基因嵌入一個或多個基因座中。

[0088]該等基因座中之至少一者可選自於以下所組成之群組：pGAP基因座、3' AOX TT基因座；PpURA5；OCH1；AOX1；HIS4；GAP；pGAP；3' AOX TT；ARG；以及HIS4 TT基因座。

[0089]編碼該多次級單元型複合體的次級單元之基因中的至少一者，可以在可誘導性或構成性(constitutive)啓動

子之控制下表現。

[0090]該可誘導性啓動子可以選自於以下所組成之群組：AOX1、CUP1、四環黴素可誘導性啓動子、硫胺素可誘導性啓動子，以及FLD1啓動子。

[0091]編碼該多次級單元型複合體的次級單元之基因中的至少一者，可以在選自於以下所組成之群組的啓動子之控制下表現：CUP1、AOX1、ICL1、甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAP)、FLD1、ADH1、醇去氫酶II、GAL4、PHO3、PHO5與Pyk啓動子、四環黴素可誘導性啓動子、硫胺素可誘導性啓動子、由其所衍生的嵌合啓動子、酵母菌啓動子、哺乳類動物啓動子、昆蟲啓動子、植物啓動子、爬蟲類啓動子、兩棲動物啓動子、病毒啓動子，以及禽類啓動子。

[0092]該真核細胞可為二倍體、四倍體細胞，或是為多倍體。

[0093]該方法可進一步包括從該真核細胞或從該培養基純化該多次級單元型複合體。

[0094]該多次級單元型複合體可從該真核細胞之細胞內組分、細胞質、核質，或是膜予以純化。

[0095]該真核細胞將該所欲的蛋白質分泌至培養基中。

[0096]該所欲的蛋白質可從該培養基予以純化。

[0097]該所欲的蛋白質可包含一種單專一性或雙專一性抗體。

[0098]該所欲的蛋白質可包含一種人類抗體或一種人

類化抗體或其片段。

[0099]該人類化抗體可源自小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊，或是牛。

[0100]該人類化抗體可源自兔。

[0101]該所欲的蛋白質可包含單價、二價或是多價抗體。

[0102]該抗體可藉由蛋白A及/或蛋白G親和性，而從該培養物中純化。

[0103]在供表現該所欲的蛋白質之該等基因中的至少一者，可以針對在該真核細胞中的表現作用進行最佳化的作用。

[0104]該所欲的蛋白質可包含一種抗體，以及可藉由測量由該真核細胞所產生及可能包含在具有預期表觀流體力學半徑之抗體複合體中、可能包含在具有預期分子量之抗體複合體中，及/或與該抗體的一標的專一性結合之抗體部分，而評估該抗體的純度。

[0105]該所欲的蛋白質可包含一種抗體，以及可藉由測定由該真核細胞所產生的抗體量且扣除可能經異常糖化、包含在具有預期表觀流體力學半徑之複合體以外的抗體複合體中、包含在具有預期分子量之抗體複合體中，及/或未能與該抗體的標的專一性結合的任一產物相關變異體，而評估該抗體產量。

[0106]該抗體複合體的分子量可以藉由非還原性SDS-PAGE來測定。

[0107]該所欲的蛋白質可包含一種抗體，該方法可進一步包括純化該抗體。

[0108]該培養物細胞所產生的上清液抗體效價可為至少100毫克/公升、至少150毫克/公升、至少200毫克/公升、至少250毫克/公升、至少300毫克/公升、介於100與300毫克/公升之間、介於100與500毫克/公升之間、介於100與1000毫克/公升之間、至少1000毫克/公升、至少1250毫克/公升、至少1500毫克/公升、至少約1750毫克/公升、至少約2000毫克/公升、至少約10000毫克/公升或是更高。

[0109]該所欲的蛋白質可包含一種多次級單元型複合體，以及該多次級單元型複合體的一個或多個次級單元可由一個複製體以上的基因來表現。

[0110]該所欲的蛋白質可包一種抗體，該抗體可由介於1至10個複製體之間之編碼該抗體輕鏈的基因表現，及由介於1至10個複製體之間之編碼該抗體重鏈的基因表現。

[0111]供表現該所欲的蛋白質之該等基因可以嵌入該等細胞的基因體中。

[0112]供表現該所欲的蛋白質之該等基因可以包含在一染色體外因子、質體，或人工染色體上。

[0113]該等細胞所包含之供表現該抗體輕鏈之基因的複製體數目，可以多於供表現該抗體重鏈之基因的複製體數目。

[0114]在該等細胞中，編碼該抗體重鏈之基因的複製體數目與編碼該抗體輕鏈之基因的複製體數目可分別為：2與

2、2與3、3與3、3與4、3與5、4與3、4與4，4與5、4與6、5與4、5與5、5與6，或是5與7。

[0115]在該等細胞中，編碼該抗體重鏈之基因的複製體數目與編碼該抗體輕鏈之基因的複製體數目可分別為：2與1、3與1、4與1、5與1、6與1、7與1、8與1、9與1、10與1、1與2、2與2、3與2、4與2、5與2、6與2、7與2、8與2、9與2、10與2、1與3、2與3、3與3、4與3、5與3、6與3、7與3、8與3、9與3、10與3、1與4、2與4、3與4、4與4、5與4、6與4、7與4、8與4、9與4、10與4、1與5、2與5、3與5、4與5、5與5、6與5、7與5、8與5、9與5、10與5、1與6、2與6、3與6、4與6、5與6、6與6、7與6、8與6、9與6、10與6、1與7、2與7、3與7、4與7、5與7、6與7、7與7、8與7、9與7、10與7、1與8、2與8、3與8、4與8、5與8、6與8、7與8、8與8、9與8、10與8、1與9、2與9、3與9、4與9、5與9、6與9、7與9、8與9、9與9、10與9、1與10、2與10、3與10、4與10、5與10、6與10、7與10、8與10、9與10、10與10。

[0116]相較於初始的豐度位準，使用本揭示的方法，相對於習用方法而言，非所欲的副產物之相對豐度可以減少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%，或是降至檢測不出的位準。相對豐度可能被降低之例示性非所欲的副產物，可包括其表觀分子量係不同於所欲的多次級單元型複合體之一種或是多種物種。舉例而言，表觀分子量可能因化學

計量、摺疊、複合體的組裝，及/或醣化作用方面之差異而受到影響。舉例而言，可使用粒徑篩析層析法及/或凝膠電泳來檢測此等非所欲的副產物，以及其等的表觀分子量可高於或低於所欲的多次級單元型複合體。在例示性具體例中，可在還原條件下檢測非所欲的副產物。在其他的例示性具體例中，可在非還原條件下檢測非所欲的副產物。

[0117]在例示性具體例中，本揭示亦提供用於抗體與其他多次級單元型複合體的重組生產作用之改進方法與物質組成物，該方法具有較高的產量。在例示性具體例中，使用本揭示的方法之產量可增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少100%或更多(相對於習用方法而言)。

[0118]在例示性具體例中，可產生所欲的蛋白質之真核細胞可以是，舉例而言一種畢赤酵母菌(*Pichia*)屬物種之酵母菌，如巴斯德畢赤酵母菌(*P. pastoris*)，或是另一種親甲基醇菌酵母菌，或是酵母菌(*Saccharomyces*)屬物種之酵母菌，如啤酒酵母菌(*S. cerevisiae*)，或是另一種酵母菌，如裂殖酵母菌屬(*Schizosaccharomyces*) (諸如粟酒裂殖酵母菌(*S. pombe*))。可用於本發明中之親甲基醇酵母菌的其他實例包括安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*)(本技藝中亦稱為多形漢遜酵母菌(*Hansenula polymorpha*))、季也蒙畢赤酵母菌(*Pichia guillermordii*)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)、因諾托畢赤酵母菌(*Pichia inositovera*)、緒方奈川氏酵母菌(*Ogataea nitrataversa*)，以及波伊德氏假絲酵

母菌(*Candida boidnii*)。

[0119]真核細胞可以是一種酵母菌細胞，諸如親甲基醇(methylotrophic)酵母菌，如畢赤酵母菌(*Pichia*)屬酵母菌。例示性畢赤酵母菌屬之親甲基醇酵母菌包括巴斯德畢赤酵母菌(*P. pastoris*)、安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*)、季也蒙畢赤酵母菌(*Pichia guillermordii*)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)，以及因諾托畢赤酵母菌(*Pichia inositovera*)。宿主細胞可藉由配對作用產生，如藉由配對二種單倍體酵母菌細胞，而該單倍體酵母菌細胞各含有一個複製體或多個複製體之至少一基因，該基因編碼該多次級單元型複合體的一個次級單元。

[0120]在一較佳具體例中，畢赤酵母菌屬之親甲基醇酵母菌為巴斯德畢赤酵母菌。真核細胞可以是單倍體、二倍體或四倍體細胞。

[0121]編碼該所欲的蛋白質之基因中的至少一者，可以在可誘導性或構成性(constitutive)啓動子之控制下表現，例如CUP1(由培養基中的銅位準所誘導；參見Koller等人，Yeast 2000；16: 651-656.)、四環黴素可誘導性啓動子(參見如Staib等人，Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Jan. 2008, p. 146-156)、硫胺素可誘導性啓動子、AOX1、ICL1、甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAP)、FLD1、ADH1、醇去氫酶II、GAL4、PHO3、PHO5與Pyk啓動子、由其所衍生的嵌合啓動子、酵母菌啓動子、哺乳類動物啓動子、昆蟲啓動子、植物啓動子、爬蟲類啓動子、兩棲動物啓動子、病毒啓動

子及禽類啓動子。

[0122]真核細胞可將該所欲的蛋白質分泌至培養基中。舉例而言，該所欲的蛋白質可包含一種分泌訊息勝肽。任擇地或者另外地，可將該所欲的多次級單元型複合體留置在該宿主細胞中，而可自宿主細胞中分離出來。

[0123]所欲的蛋白質可包含一種抗體，諸如一種單專一性或雙專一性抗體。該抗體可為以專一性方式與任一抗原結合之抗體。

[0124]該所欲的蛋白質可包含任何類型的抗體。例示性抗體類型包括任何哺乳類動物物種的抗體，諸如人類、小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊，牛等等。較佳地，該抗體為一種人類或一種源自兔的人類化抗體。該抗體可為單價、二價或多價抗體。

[0125]在供該所欲的蛋白質表現於該真核細胞中之該等基因中的至少一者，例如所欲的抗體之輕鏈及/或重鏈，可以針對在該宿主細胞中的表現作用進行最佳化作用(如藉由選擇較佳的密碼子及/或經由密碼子選擇而改變AT百分比)。

[0126]可藉由測量該宿主細胞所產生之所欲的蛋白質之餾份之非醣化、包含在具有預期的表觀流體力學半徑及/或表觀分子量(如藉由粒徑篩析層析法測量)之複合體中、具有預期的電泳遷移率(如藉由凝膠電泳，諸如SDS-PAGE及選擇性地藉由西方墨點法檢測)，及/或藉由測量該多次級單元型複合體的專一性活性(如所欲的抗體與標的之專一性

結合作用)，而評估該所欲的蛋白質之純度，諸如所欲的抗體之純度。

[0127]所欲的蛋白質可以為一種抗體，以及可藉由測定由該宿主細胞所產生之所欲抗體的量，及扣除任何醣化、包含在具有預期的表觀分子量或流體力學半徑之複合體以外的抗體複合體中，及/或未能與該所欲抗體之標的專一性結合之產物相關變異體，而評估該抗體的產量。

[0128]依據本發明的另一個具體例，提供一種在酵母菌細胞中生產所欲的蛋白質，諸如一種抗體或抗體的抗原結合片段之方法。酵母菌細胞族群係於分批補料發酵條件下培養於培養基內。各個酵母菌細胞包含編碼一所欲的蛋白質，例如重鏈多肽之DNA區段，及選擇性地編碼第二所欲的蛋白質，例如輕鏈多肽之DNA區段。該一個或多個DNA區段係操作地連結至甘油醛-3-磷酸(GAP)轉錄啓動子和轉錄終止子。該發酵包含以第一進料速率之可發酵糖進料，以及該發酵係以第一氧輸送速率予以氧化。在分批發酵的進料階段期間測量該族群的呼吸商(RQ)，以及與所欲的預定範圍比較。當該RQ在所欲的預定範圍之外時，將該可發酵糖進料速率及該氧輸送速率中之一者或二者調整至第二速率。在整個培養期間或部分培養期間執行測量和調整步驟。從該培養基收穫該酵母菌細胞。從該酵母菌細胞去除的(yeast cell-depleted)培養基或是從該酵母菌細胞回收該酵母菌細胞生產之所欲的蛋白質，例如重鏈多肽以及輕鏈多肽。

[0129] 依據本發明的另一個具體例，提供一種在畢赤酵母菌細胞中生產包含二個重鏈及二個輕鏈的抗體之方法。畢赤酵母菌細胞族群係於缺氧、分批補料發酵條件下培養於培養基內。各個酵母菌細胞包含編碼一抗體的重鏈多肽之DNA區段，及編碼一抗體的輕鏈多肽之DNA區段。DNA區段係操作地連結至甘油醛-3-磷酸(GAP)轉錄啓動子和轉錄終止子。從該培養基收穫該酵母菌細胞。從該酵母菌細胞或從該酵母菌細胞去除的培養基回收該酵母菌細胞生產的抗體。

[0130] 本揭示亦提供用於酵母菌細胞發酵作用之回饋控制機轉，以製造所欲的蛋白質，其使用呼吸商測量法，其調整加氧作用及/或可發酵糖進料的位準。該回饋控制機轉允許良好地控制培養物，以生產充分量的產物同時避免乙醇毒性的累積。此外，如此生產之所欲的蛋白質有優良的定性性質，例如優良的同質性(homogeneity)及適當的次級單元內組裝。舉例來說，本揭示提供於酵母菌細胞內生產所欲的蛋白質之方法，其包含以下步驟：(a) 於分批補料發酵條件下培養酵母菌細胞族群於培養基內，其中各個酵母菌細胞包含編碼一多肽的DNA區段，其中該DNA區段係操作地連結至甘油醛-3-磷酸(GAP)轉錄啓動子和轉錄終止子，其中該蛋白質不是甘油醛-3-磷酸，其中該發酵包含第一進料速率之可發酵糖進料，以及其中該發酵係以第一氧輸送速率予以攪拌；(b)測量該族群在分批發酵期間的呼吸商(RQ)，及判定是否該呼吸商落在所欲的預定範圍內，其

中於該培養起始之後大約20-40小時之該RQ所欲的預定範圍係介於大約1.08和大約1.35之間；(c)當該RQ在所欲的預定範圍之外時，調整該可發酵糖進料速率至第二進料速率或是調整該氧輸送速率至第二氧輸送速率中之一者或二者；(d)在整個培養步驟重複步驟(b)和(c)一或多次；(e)從該培養基收穫該酵母菌細胞；以及(f)從該細胞及/或該培養基回收該多肽。選擇性地，該方法可以包括：(a)於第一個溫度下培養包含一個或多個基因的真核細胞，該一個或多個基因提供該所欲的蛋白質之表現；以及(b)於第二個溫度下培養該真核細胞，且允許該真核細胞生產該所欲的蛋白質；其中該第二個溫度與該第一個溫度不同；舉例來說，該第一個溫度可以介於大約20度C和大約32度C之間，介於大約24度C和大約31.5度C之間，介於大約27度C和大約31度C之間，介於大約27.5度C和大約30度C之間，介於大約20度C和大約29.5度C之間，介於大約24度C和大約29度C之間，介於大約27度C和大約28.5度C之間，或是介於大約27.5度C和大約28.5度C之間；及/或選擇性地，該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約1度C和大約6度C之間，比該第一個溫度高大約1度C和大約3度C之間，比該第一個溫度高大約2度C和大約4度C之間，或是比該第一個溫度高大約2度C和大約3度C之間；及/或選擇性地，該第二個溫度可以介於大約30度C和大約34度C之間，介於大約30度C和大約32度C之間，或是介於大約30度C和大約31.5度C之間；舉例來說，該第一個溫度可以為大約28度C且該第二個溫度可以為大約30度

C或大約31度C；或是該第一個溫度可以介於大約27.5度C和大約28.5度C之間且該第二個溫度可以介於大約30度C和大約31度C之間；其中選擇性地第一個溫度比該第二個溫度為高。

[0131]該步驟(d)可以以介於大約1和5分鐘之間的間隔執行，例如於大約3分鐘的間隔執行。

[0132]該步驟(d)可以持續地執行。

[0133]於步驟(c)可以進行對進料速率的至少一個調整。

[0134]可以使用連結至測量RQ的裝置之回饋控制機轉，來自動執行步驟(c)。

[0135]該酵母菌細胞可以為選自於以下所構成的群組之一物種：巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)、安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*)、熱嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia thermomethanolica*)，以及啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0136]該方法可進一步包含於培養大約10至14小時時，遞送乙醇至酵母菌細胞，以於發酵中達到大約8.0至12.0 g/l乙醇的位準。

[0137]於該培養起始之後大約20-40小時之該RQ所欲的預定範圍可介於大約1.09和大約1.25之間。

[0138]可以在該培養起始之後大約80-110小時時，執行該收穫步驟。

[0139]可以在該培養步驟期間測量乙醇的濃度，及可以

進行調整來穩定乙醇的濃度高於大約5 g/l且低於大約25 g/l，其中該調整可藉由調整可發酵糖進料速率至第三進料速率或是調整該氧輸送速率至第三氧輸送速率中之一者或二者來做到。舉例來說，可以進行該調整來穩定乙醇的濃度高於大約5 g/l且低於大約17 g/l。

[0140]於該發酵的20-110小時之時，該RQ所欲的預定範圍可選自於以下所構成的群組：大約1.08-1.1；大約1.08-1.15；大約1.08-1.2；大約1.08-1.25；大約1.08-1.3；以及大約1.08-1.35。

[0141]步驟(b)的測量可以藉由取樣該發酵的排氣來執行。

[0142]步驟(b)的測量可使用質譜儀、紅外線分析儀，或是順磁分析儀來執行。

[0143]於步驟(c)中，可以藉由在RQ可能太高時增加氧輸送速率，或是在RQ可能太低時減少氧輸送速率，來調整氧輸送速率。

[0144]於步驟(c)中，可以藉由在RQ可能太低時增加可發酵糖進料速率，或是在RQ可能太高時減少可發酵糖進料速率，來調整可發酵糖進料速率。

[0145]於步驟(c)中，亦可以藉由在RQ可能太低時增加可發酵糖進料速率，以及在RQ可能太高時減少可發酵糖進料速率，來調整可發酵糖進料速率。

[0146]步驟(c)可以藉由調變該培養物的攪拌速率予以執行。

[0147]該DNA區段可以編碼一種抗體的重鏈或一種抗體的輕鏈，或是一種抗體的片段。

[0148]可以從該培養基收穫該多肽。

[0149]各個酵母菌細胞可以包含編碼一種抗體的重鏈多肽之DNA區段，以及編碼一種抗體的輕鏈多肽之DNA區段。

[0150]於另一個態樣中，本揭示提供一種在畢赤酵母菌細胞中生產包含二個重鏈以及二個輕鏈的抗體或抗體片段之方法，其包含以下步驟：(a)於缺氧、分批補料發酵條件下培養畢赤酵母菌細胞族群於培養基內，其中各個酵母菌細胞包含編碼一抗體的重鏈多肽之DNA區段，及編碼一抗體的輕鏈多肽之DNA區段，其中該DNA區段可以操作地連結至甘油醛-3-磷酸(GAP)轉錄啓動子和轉錄終止子；(b)從該培養基收穫該酵母菌細胞；以及(c)從該酵母菌細胞去除的培養基回收該酵母菌細胞生產的抗體。選擇性地，該方法可以包括：(a)於第一個溫度下培養包含一個或多個基因的真核細胞，該一個或多個基因提供該所欲的蛋白質之表現；以及(b)於第二個溫度下培養該真核細胞，且允許該真核細胞生產該所欲的蛋白質；其中該第二個溫度與該第一個溫度不同；舉例來說，該第一個溫度可以介於大約20度C和大約32度C之間，介於大約24度C和大約31.5度C之間，介於大約27度C和大約31度C之間，介於大約27.5度C和大約30度C之間，介於大約20度C和大約29.5度C之間，介於大約24度C和大約29度C之間，介於大約27度C和大約28.5度C之間，

或是介於大約27.5度C和大約28.5度C之間；及/或選擇性地，該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約1度C和大約6度C之間，比該第一個溫度高大約1度C和大約3度C之間，比該第一個溫度高大約2度C和大約4度C之間，或是比該第一個溫度高大約2度C和大約3度C之間；及/或選擇性地，該第二個溫度可以介於大約30度C和大約34度C之間，介於大約30度C和大約32度C之間，或是介於大約30度C和大約31.5度C之間；舉例來說，該第一個溫度可以為大約28度C以及該第二個溫度可以為大約30度C或大約31度C；或是該第一個溫度可以介於大約27.5度C和大約28.5度C之間且該第二個溫度可以介於大約30度C和大約31度C之間；其中選擇性地第一個溫度比該第二個溫度為高。

[0151]該畢赤酵母菌屬酵母菌細胞可以選自於以下所構成的群組：巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)、安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*)，以及熱嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia thermomethanolica*)。舉例而言，該畢赤酵母菌屬酵母菌細胞可以為巴斯德畢赤酵母菌。

[0152]於另一個態樣中，本揭示提供一種大規模發酵之方法，其包含以下步驟：(i)於大規模、分批補料發酵條件下培養酵母菌細胞，其中該酵母菌細胞可予以工程設計來表現所欲的蛋白質；(ii)在分批補料發酵的期間週期性地或連續不斷地監測RQ值；及判定是否該RQ值落在規定的範圍內；(iii)在分批補料發酵的期間調整至少一個培養參數至少

一次，以便調整或維持該分批補料酵母菌培養物之RQ值，藉以使其落在該規定的範圍內；以及(iv)收穫該酵母菌細胞或該培養基，及從步驟(iii)之該收穫的細胞或該培養基回收該所欲的蛋白質。選擇性地，該方法可以包括：(a)於第一個溫度下培養包含一個或多個基因的真核細胞，該一個或多個基因提供該所欲的蛋白質之表現；以及(b)於第二個溫度下培養該真核細胞，且允許該真核細胞生產該所欲的蛋白質；其中該第二個溫度與該第一個溫度不同；舉例來說，該第一個溫度可以介於大約20度C和大約32度C之間，介於大約24度C和大約31.5度C之間，介於大約27度C和大約31度C之間，介於大約27.5度C和大約30度C之間，介於大約20度C和大約29.5度C之間，介於大約24度C和大約29度C之間，介於大約27度C和大約28.5度C之間，或是介於大約27.5度C和大約28.5度C之間；及/或選擇性地，該第二個溫度可以比該第一個溫度高大約1度C和大約6度C之間，比該第一個溫度高大約1度C和大約3度C之間，比該第一個溫度高大約2度C和大約4度C之間，或是比該第一個溫度高大約2度C和大約3度C之間；及/或選擇性地，該第二個溫度可以介於大約30度C和大約34度C之間，介於大約30度C和大約32度C之間，或是介於大約30度C和大約31.5度C之間；舉例來說，該第一個溫度可以為大約28度C且該第二個溫度可以為大約30度C或大約31度C；或是該第一個溫度可以介於大約27.5度C和大約28.5度C之間且該第二個溫度可以介於大約30度C和大約31度C之間；其中選擇性地第一個溫度比該第

二個溫度為高。

[0153]該蛋白質可以為一種抗體或抗體片段。

[0154]該蛋白質(諸如，抗體或抗體片段)可以由該酵母菌分泌。

[0155]調整的培養參數可以包括以下之一者或更多者：(a)氣流率，b)氧濃度，(c)進料組成，(d)進料速率，(e)細胞密度，及(f)攪拌。

[0156]調整的培養參數可以包含以下之一者或更多者：(a)進料組成，(b)進料速率及(c)氧輸送速率；以及其中在該方法分批補料發酵的期間該培養參數可以調整至少一次，以便調整或維持該分批補料酵母菌培養物之RQ值，以使其可以落在該規定的範圍內。

[0157]該方法可進一步包括在分批補料發酵之前的分批發酵。

[0158]該分批補料發酵可以進行歷時至少50小時，或歷時至少70小時。

[0159]該酵母菌細胞可以為巴斯德畢赤酵母菌，諸如多倍體、單倍體，或二倍體巴斯德畢赤酵母菌。

[0160]該分批補料培養之細胞密度可以包含1至700 g/l濕細胞重量(wet cell weight)。

[0161]於步驟(iii)中，進料速率可以增加或減少，以便調整該RQ值以落在該規定的範圍內。

[0162]於步驟(iii)中，可以藉由改變至少一種可發酵糖或其他糖的量，而改變進料組成，以便調整該RQ值以落在

該規定的範圍內。

[0163]於步驟(iii)中，在分批補料發酵的期間可以增加或減少分批補料發酵中氧的量，以便調整該RQ值以落在該規定的範圍內。

[0164]於步驟(iii)中，其中可以增加或減少至少一種可發酵糖或其他可發酵烴的量，以便調整該RQ值以落在該規定的範圍內。

[0165]於步驟(iii)中，在分批補料發酵的期間可以增加或是減少進料速率，以便調整該RQ值以落在該規定的範圍之內。

[0166]相對於不包括步驟(iii)之分批補料方法，該方法可導致選自於抗體純度和抗體生產之中的性質之改進。

[0167]步驟(iii)中，該RQ值之規定的範圍可以介於大約1.08-1.35，或是介於大約1.08-1.2。

[0168]此等及其他具體例，對於熟悉此藝者在閱讀本說明書之後會是顯而易見的，提供本技藝具有改進的可靠性、可預測性、效率及品質之方法和產物。

【圖式簡單說明】

[0169]圖1顯示3種不同的Mab1菌株A、B，及C之RQ剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0170]圖2顯示3種不同的Mab1菌株A、B，及C之攪拌剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0171]圖3：顯示3種不同的Mab1菌株A、B，及C之乙醇剖面圖。

[0172] 圖4：顯示3種不同的Mab1菌株A、B，及C之生長剖面圖。

[0173] 圖5：顯示3種不同的Mab1菌株A、B，及C之全肉汁(Whole Broth)效價的剖面圖。

[0174] 圖6：顯示Mab1菌株A於3個不同的RQ設定點RQ 1.09-1.15，1.19-1.25，1.29-1.35之RQ的剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0175] 圖7：顯示Mab1菌株A於3個不同的RQ設定點RQ 1.09-1.15，1.19-1.25，1.29-1.35之攪拌剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0176] 圖8：顯示Mab1菌株A於3個不同的RQ設定點RQ 1.09-1.15，1.19-1.25，1.29-1.35之乙醇剖面圖。

[0177] 圖9：顯示Mab1菌株A於3個不同的RQ設定點RQ 1.09-1.15，1.19-1.25，1.29-1.35之生長剖面圖。

[0178] 圖10：顯示Mab1菌株A於3個不同的RQ設定點RQ 1.09-1.15，1.19-1.25，1.29-1.35之全肉汁效價的剖面圖。

[0179] 圖11：顯示於需氧的以及缺氧的條件下生長之Mab1菌株A的RQ剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0180] 圖12：顯示於需氧的及缺氧的條件下生長之Mab1菌株A的攪拌剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0181] 圖13：顯示於需氧的及缺氧的條件下生長之Mab1菌株A的乙醇剖面圖。

[0182] 圖 14：顯示於需氧的及缺氧的條件下生長之 Mab1 菌株 A 的生長剖面圖。

[0183] 圖 15：顯示於需氧的及缺氧的條件下生長之 Mab1 菌株 A 的 %DO 剖面圖。

[0184] 圖 16：顯示於需氧的及缺氧的條件下生長之 Mab1 菌株 A 的全肉汁效價的剖面圖。

[0185] 圖 17：顯示 4 種不同的 Mab2 菌株 A、B，C 及 D 之 RQ 剖面圖。垂直線表示 RQ 對照起始的時間。

[0186] 圖 18：顯示 4 種不同的 Mab2 菌株 A、B，C 及 D 菌株之攪拌剖面圖。垂直線表示 RQ 對照起始的時間。

[0187] 圖 19：顯示 4 種不同的 Mab2 菌株 A、B，C 及 D 菌株之乙醇剖面圖。

[0188] 圖 20：顯示 4 種不同的 Mab2 菌株 A、B，C 及 D 菌株之生長剖面圖。

[0189] 圖 21：顯示 4 種不同的菌株 A、B，C 及 D 菌株之全肉汁效價的剖面圖。

[0190] 圖 22：顯示 3 種不同的 Mab3 菌株 A、B，及 C 之 RQ 剖面圖。垂直線表示 RQ 對照起始的時間。

[0191] 圖 23：顯示 3 種不同的 Mab3 菌株 A、B，及 C 之攪拌剖面圖。垂直線表示 RQ 對照起始的時間。

[0192] 圖 24：顯示 3 種不同的 Mab3 菌株 A、B，及 C 之乙醇剖面圖。

[0193] 圖 25：顯示 3 種不同的 Mab3 菌株 A、B，及 C 之生長剖面圖。

[0194] 圖26：顯示3種不同的Mab3菌株A、B，及C之全肉汁效價的剖面圖。

[0195] 圖27：顯示Mab3菌株B以不同的進料速率之RQ剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0196] 圖28：顯示Mab3菌株B以不同的進料速率之攪拌剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0197] 圖29：顯示Mab3菌株B以不同的進料速率之乙醇剖面圖。

[0198] 圖30：顯示Mab3菌株B以不同的進料速率之生長剖面圖。

[0199] 圖31：顯示Mab3菌株B以不同的進料速率之全肉汁效價的剖面圖。

[0200] 圖32：顯示Mab4菌株A以不同的進料速率之RQ剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0201] 圖33：顯示Mab4菌株A以不同的進料速率之攪拌剖面圖。垂直線表示RQ對照起始的時間。

[0202] 圖34：顯示Mab4菌株A菌株以不同的進料速率之乙醇剖面圖。

[0203] 圖35：顯示Mab4菌株A菌株以不同的進料速率之生長剖面圖。

[0204] 圖36：顯示Mab4菌株A菌株以不同的進料速率之全肉汁效價的剖面圖。

[0205] 圖37：顯示大規模發酵的需氧(B1)及缺氧(B2)的方法中，Mab2菌株A之全肉汁剖面圖。

[0206] 圖38：顯示對於需氧的及缺氧的方法條件、於發酵時間62、70及86小時，Mab1菌株A之SDS-PAGE非還原及還原凝膠。

[0207] 圖39：顯示於發酵時間62、69及85小時，Mab1菌株A之SDS-PAGE非還原及還原凝膠。

[0208] 圖40闡示培養溫度變動對於重組型抗體生產的有益效用。發酵從頭到尾的五個不同的溫度變動及一個未變動的對照(維持在28°C)之全肉汁(“WB”)抗體效價(任意單位)，係對照時間點予以繪圖。變動前的溫度為28°C，且變動後的溫度如指出的為25°C、29.5°C、31°C、32.5°C，或是34°C。向上的1.5°C和3°C之間的溫度變動(最後溫度分別為29.5°C和31°C)造成增高的最終效價。此等實驗生產的抗體為Ab-A。在培養變動至31°C方面，與未變動的對照培養物(維持在28°C)相比，最終效價增加大約30%。

[0209] 圖41A-B總結以圖40之培養溫度變動所生產的重組型抗體之純度。藉由在抗體生產終止時收獲之蛋白A純化的抗體之粒徑篩析層析法來評估純度。A組顯示非還原條件下評估的純度。在對應於全抗體(“主峰IgG”)以及二個異常的抗體複合體(“前峰(Prepeak)HHL”及“75kD HL”)處偵測到波峰。顯示的數字為各峰內包含的總偵測蛋白質的百分比。未變動的培養物(即，維持在28°C)以及變動到29.5°C和31°C之培養物的主抗體峰含有相似比例的總蛋白質。B組顯示還原條件下偵測的純度。顯示各個溫度條件之重鏈(“HC”)、輕鏈(“LC”)以及總重鏈與輕鏈蛋白質(“總HC+LC”)

內包含的總偵測蛋白質的百分比，加上三個其他的峰(“RT 9.80”、“RT 10.16”以及“RT 10.80”)內包含的百分比。當與維持在28°C之未變動的對照培養物相比，變動到29.5°C之培養物的重鏈峰內與輕鏈峰內包含的蛋白質百分比仍然是相似的，而更高的溫度變動增加了大約4%的蛋白質百分比。

[0210]圖42A-C詳細說明就培養向下變動到25°C而言，如圖40中顯示所生產的重組型抗體之純度。A組，非還原樣本之粒徑篩析層析法的記錄曲線及表列的結果。B組，非還原(第1道)及還原(第3道)樣本之考馬斯染色的凝膠電泳結果。第2道及第4道顯示尺寸標識。第3組，還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。層析法結果係表列且總結於圖41內。

[0211]圖43A-C詳細說明就沒有溫度變動且維持在28°C之對照培養物而言，如圖40中顯示所生產的重組型抗體之純度。A組，非還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。B組，非還原(第1道)及還原(第3道)樣本之考馬斯染色的凝膠電泳結果。第2道及第4道顯示尺寸標識。第3組，還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。層析法結果係表列且總結於圖41內。

[0212]圖44A-C詳細說明就溫度向上變動1.5°C而達29.5°C之培養物而言，如圖40顯示所生產的重組型抗體之純度。A組，非還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。B組，非還原(第1道)及還原(第3道)樣本之考馬斯染色的凝膠電泳結果。第2道及第4道顯示尺寸標識。第3組，

還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。層析法結果係表列且總結於圖41內。

[0213]圖45A-C詳細說明就溫度向上變動3°C而達31°C之培養物而言，如圖40顯示所生產的重組型抗體之純度。A組，非還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。B組，非還原(第1道)及還原(第3道)樣本之考馬斯染色的凝膠電泳結果。第2道及第4道顯示尺寸標識。第3組，還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。層析法結果係表列且總結於圖41內。

[0214]圖46A-C詳細說明就溫度向上變動4.5°C而達32.5°C之培養物而言，如圖40顯示所生產的重組型抗體之純度。A組，非還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。B組，非還原(第1道)及還原(第3道)樣本之考馬斯染色的凝膠電泳結果。第2道及第4道顯示尺寸標識。第3組，還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。層析法結果係表列且總結於圖41內。

[0215]圖47A-C詳細說明就溫度向上變動6°C而達34°C之培養物而言，如圖40顯示所生產的重組型抗體之純度。A組，非還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。B組，非還原(第1道)及還原(第3道)樣本之考馬斯染色的凝膠電泳結果。第2道及第4道顯示尺寸標識。第3組，還原樣本之粒徑篩析層析法記錄曲線及表列的結果。層析法結果係表列且總結於圖41內。

[0216]圖48A-B顯示培養期間的溫度變動所產生的

Ab-B效價的改進。A組：通過圖顯示含有4個複製體的Ab-B重鏈基因及3個複製體的Ab-B輕鏈基因(“H4/L3”)之高表現菌株的培養物內，全肉汁抗體效價(任意單位)相對時間。溫度變動的培養物(“H4/L3 30C”)於所有的時間點，均展現出比二個無變動的培養物(“H4/L3 28C”)更大的效價。平均的最終效價增加大約28%。B組：通過圖顯示含有3個複製體的Ab-B重鏈基因及3個複製體的Ab-B輕鏈基因(“H3/L3”)之低表現菌株的培養物內，全肉汁抗體效價(任意單位)相對時間。溫度變動的培養物(“H3/L3 30C”)展現出比二個無變動的培養物(“H3/L3 28C”)之平均值更大的效價。

[0217]圖49總結如圖48顯示之培養溫度變動所生產的重組型抗體之純度。藉由在抗體生產終止時收獲之蛋白A純化的抗體之粒徑篩析層析法來評估純度。標記係如圖41所述。

[0218]圖50顯示培養期間的溫度變動之Ab-A所產生的效價的改進。於培養期間接受溫度變動之培養物或是未執行溫度變動之對照培養物方面，全肉汁抗體效價(任意單位)相對時間係予以繪圖。四個培養物在起始進料添加之後從28°C 變動至30°C (標示“30C”)，以及五個對照培養物未變動且於培養始終維持在28°C 。各個變動的培養物展現出比無變動的培養物更大的效價。源於溫度變動之效價平均增加了大約47%。

[0219]圖51總結如圖50顯示之培養溫度變動所生產的重組型抗體之純度。藉由在抗體生產終止時收獲之蛋白A

純化的抗體之粒徑篩析層析法來評估純度。標記係如圖41所述。

[0220]圖52顯示實施例13內之各個培養物的溫度相對培養的時間予以繪圖。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

[0221]本揭示說明改進重組表現的蛋白質之產量及/或純度之方法，包括抗體及其他多次級單元型蛋白質。所提供的溫度變動方法於細胞培養的整個期間達到目的。與缺少變動之表現相比，以下展現出包括溫度變動會改進重組表現的抗體之產量及純度。

[0222]雖然無意受限於理論，假定溫度變動能造成基因表現持續的變化，其賦予持久的改進重組型蛋白質。該改進可能由蛋白質表現、穩定性、折疊、轉譯後加工，以及(於抗體及其他多次級單元型複合體的情況下)適當的組裝，例如由於熱休克蛋白表現持續的增加。

[0223]較佳的宿主細胞包括酵母菌，以及特佳的酵母菌包括親甲基醇(methylotrophic)酵母菌菌株，諸如巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)、多形漢遜酵母菌(*Hansenula polymorpha*) (安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*))、季也蒙畢赤酵母菌(*Pichia guillermordii*)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)、因諾托畢赤酵母菌(*Pichia inositovera*)，以及其他者(參見諸如，U.S.專利第4,812,405號、第4,818,700號、第4,929,555號、第5,736,383號、第

5,955,349號、第5,888,768號，及第6,258,559號，其中各者完整地併入本案以作為參考資料)。宿主細胞可以經由本技藝中所知的方法來生產，諸如轉型、配對、孢子形成等等。

[0224]在例示性具體例中，本揭示提供減少一種或多種非所欲的副產物的產生方法。相對於所欲的蛋白質，非所欲的副產物可展現以下之一者或多者：改變的化學計量(於多次級單元型複合體的情況下)、異常的糖化作用、表觀分子量之差異、雙硫鍵之差異、流體力學半徑之差異、片段，及/或截斷。非所欲的副產物也可展現一種或多種額外的差異。偵測非所欲的副產物也可以透過其等對於製備物之作用，諸如專一性活性位準之改變、免疫原性，或是其他對於所欲的多次級單元型複合體之物質組成及/或功能的作用。

[0225]舉例來說，當所欲的蛋白質為一種抗體時，非所欲的副產物可以包括一種H1L1或“半抗體”物種(即，含有一個重鏈與一個輕鏈，其中該重鏈未經由雙硫鍵連結至另一個重鏈)，及/或一種H2L1物種(即，含有二個重鏈與一個輕鏈，但缺少第二個輕鏈)。

[0226]在一較佳具體例中，宿主細胞可包含一個複製體以上之編碼該所欲的蛋白質的一或多個基因，或是編碼其次級單元的一或多個基因。舉例來說，可將多個複製體的次級單元基因縱排嵌入一或多個染色體基因座中。在用於生產該多次級單元型複合體的培養期間，所縱排嵌入的多個複製體的基因較佳保有穩定的複製體數目。舉例來說，

公開為US 2013/0045888之專利權共有的申請案敘述以下實驗：在含有3或4個複製體縱排嵌入的輕鏈與重鏈抗體基因之巴斯德畢赤酵母菌菌株中，基因複製體數目大致維持穩定。

[0227]可將編碼該所欲的蛋白質之一個或多個基因嵌入宿主細胞的一個或多個染色體基因座中。可使用適合嵌入的任一染色體基因座，包括基因間序列、啓動子序列、編碼序列、終止序列、調控序列等等。在巴斯德畢赤酵母菌 (*P. pastoris*) 可供使用的例示性染色體基因座包括 *PpURA5*；*OCH1*；*AOX1*；*HIS4*；及 *GAP*。亦可將編碼基因嵌入一或多個隨機染色體基因座中，而非所標定的基因座。在例示性具體例中，染色體基因座係選自於 *pGAP* 基因座、3' *AOX* TT 基因座，及 *HIS4* TT 基因座所組成之群組。在額外的例示性具體例中，編碼異源性蛋白質次級單元的基因可包含在一種或多種染色體外因子中，例如在一種或多種質體或人工染色體中。

[0228]在例示性具體例中，該所欲的蛋白質可以為一種多次級單元型複合體，其包含二、三、四、五、六個或更多個同一或非同一的次級單元。此外，各個次級單元可在各個多次級單元型蛋白質中出現一次或多次。舉例來說，該所欲的蛋白質可以包含一種多重專一性抗體，諸如一種包含二個非同一的輕鏈與二個非同一的重鏈之雙特異性抗體。如另外的實例，該所欲的蛋白質可以包含一種抗體，其包含二個同一的輕鏈與二個同一的重鏈。

[0229]該等次級單元可以由單順反子基因、多順反子基因，或其任一組合來表現。各多順反子基因可以包含多個複製體的相同次級單元，或是可包含一個複製體或多個複製體各不同的次級單元。

[0230]可用於操作巴斯德畢赤酵母菌之例示性方法(包括培養、轉型，及配對方法)，係揭露於公開申請案中，包括U.S.20080003643、U.S.20070298500及U.S.20060270045在內的，以及揭露於美國紐澤西州托托瓦(Totowa)的胡馬納出版社(Humana Press)於1998年出版及由Higgins,D.R.與Cregg,J.M.所編輯之“分子生物學方法(Methods in Molecular Biology)”乙書之“畢赤酵母菌屬操作程序(Pichia Protocols)”及美國紐澤西州托托瓦的胡馬納出版社於2007年出版及由Cregg,J.M.所編輯之“分子生物學方法”乙書之“畢赤酵母菌屬操作程序”(第二版)，其中各者在此完整地併入本案以爲參考資料。

[0231]一種可使用的例示性表現卡匣係由以下所組成：與編碼一分泌訊息的序列融合之甘油醛去氫酶基因(GAP基因)啓動子、接著是待表現基因的序列、接著是編碼來自巴斯德畢赤酵母菌的醇氧化酶I基因(AOX1)的一種巴斯德畢赤酵母菌轉錄終止訊息之序列。藉由篩選抵抗更高位準的吉歐黴素(Zeocin)之轉型體，吉歐黴素抗性標記基因可提供富集菌株的方式，而富集的菌株係在一菌株中含有所嵌入的多個複製體之表現載體。同樣地，藉由篩選對於更高位準的建那黴素(Genticin)或卡那黴素(Kanamycin)具有抗

性之轉型體，G418或卡那黴素抗性標記基因可提供富集菌株之一方式，而所富集的菌株係在一菌株中含有所嵌入的多個複製體的表現載體。

[0232]可使用的宿主菌株包括營養缺陷型巴斯德畢赤酵母菌或其他畢赤酵母菌屬菌株，例如具有met1、lys3、ura3及ade1或其他營養缺陷性相關基因的突變作用之菌株。突變作用較佳無法以明顯的頻率產生逆突變體(*revertant*)，及較佳為部分刪除型或甚至更佳為全刪除型突變體。舉例來說，藉由將互補的營養缺陷型菌株配對，而產生原始營養型二倍體菌株或是四倍體菌株。該菌株具有能夠於基礎培養基內的生長的優點，以及額外地該培養基傾向篩選以可能經由孢子形成而出現單倍體細胞的生長。

[0233]可如上文之“畢赤酵母菌屬操作程序(*Pichia Protocols*)”(1998，2007)所述，進行單倍體和二倍體巴斯德畢赤酵母菌菌株的轉型作用，以及巴斯德畢赤酵母菌生殖週期的基因操作。

[0234]在轉型之前，可在與標的基因座(如，GAP啓動子序列)同源的一區域內，藉由限制酶剪切作用而將各表現載體直線化，以引導載體嵌入宿主細胞中的標的基因座。然後可藉由電穿孔或是其他方法，將各載體樣本個別轉型至所欲菌株的培養物體中，以及可藉由可篩選標記，如抗生素抗性或是營養缺陷性之互補，來篩選成功的轉型體。可以挑選單離株，在篩選條件下劃接種成單一菌落，然後在從各菌株萃取的基因體DNA上，藉由南方墨點法或PCR

分析法，檢視以確認編碼所欲的蛋白質或多次級單元型複合體(如一種所欲的抗體)的次級單元之基因的複製體數目。選擇性地，可藉由例如FACS、西方墨點法、菌落轉印法與免疫墨點法，以及本技藝所知的其他方式，確認所預期的次級單元基因產物之表現作用。選擇性地，對於單離株進行額外多次的轉型作用，以導入額外的異源性基因，例如編碼所欲的蛋白質之額外複製體的基因，或是多次級單元型蛋白質的情況為編碼相同次級單元的基因，可以嵌入不同基因座之額外複製體的相同次級單元，及/或可嵌入多個複製體的不同次級單元。可以生產單倍體、二倍體或是其他倍體(包括四倍體及更高倍體)的菌株。可以生產及配對單倍體菌株，俾以快速測試不同基因複製體的數目之組合，例如編碼所欲的蛋白質之單一基因的複製體數目，或是編碼多次級單元型蛋白質之次級單元的不同基因之複製體數目。可藉由南方墨點法、PCR，以及本技藝所知的其他檢測方式，來確認所欲的蛋白質基因或所預期的各次級單元基因是否存在。此外，一種抗體或是其他所欲的蛋白質可藉由菌落轉印法/免疫墨點法(Wung等人於期刊“Biotechniques”第21期第808-812頁(1996年)及/或藉由FACS確認。

[0235]選擇性地重複轉型作用，以將一異源性基因標定嵌入第二基因座，該異源性基因可與標定嵌入第一基因座的基因相同或不同。當待嵌入第二基因座的建構物所編碼的一蛋白係與第一基因座所編碼的序列相同或高度相似時，

可變化其序列，以降低非所欲地嵌入第一基因座之可能性。此等基因差異亦可以透過降低後續重組事件之可能性，而促進基因穩定性。舉例來說，相對於嵌入第一基因座之序列而言，待嵌入的第二基因座之序列可在啓動子序列、終止序列、密碼子之使用方面有所差異，及/或具有其他可容許的序列差異。

[0236]為進行巴斯德畢赤酵母菌單倍體菌株之配對，可在配對平盤上將待雜交的各菌株貼印在一起。舉例來說，可藉由將待配對的各菌株畫線接種在適合其生長的平盤上，以及可將配對夥伴畫線接種在第二平盤(該等平盤較佳為豐富培養基，諸如YPD)上，而方便在相同時間進行多重配對。通常在30°C 孵育一或二天後，可將來自二個平盤的細胞以縱橫交錯方式複印接種至一配對平盤上，產生十字交叉格圖案，而各對菌株係共接種及有機會在一對原始接種線條的相交處配對。配對平盤然後進行孵育(例如，在30°C)，以刺激引發菌株之間的配對作用。在約二天後，可將配對平盤上的細胞畫線接種、片狀接種或複印接種至供篩選所欲的二倍體菌株之培養基上(例如，當經配對的菌株具有互補式自營作用時，可使用撤除成分型或基本培養基平盤)。此等平盤可孵育(例如在30°C)一段適宜時間(例如約三天)，以容許所欲的二倍體菌株之選擇性生長。可挑選所長出的菌落及畫線接種成為單一菌落，以分離與純化各二倍體菌株。

[0237]供用於本發明的方法之表現載體可以進一步包

括酵母菌的特定序列，包括用於辨識經轉型的酵母菌菌株之可選擇的營養缺陷型或藥物標記。一藥物標記可以進一步用來選擇擴增一酵母菌宿主細胞內的載體之複製體的數目，譬如藉由在升高的藥物濃度培養一細胞族群，從而篩選出表現較高的抗性基因位準之轉型體。

[0238]於一個例示性具體例中，編碼該異源性蛋白質次級單元的一個或多個基因係與可誘導性啟動子偶合。例示性的適宜啟動子包括醇氧化酶1基因啟動子、甲醛去氫酶基因(FLD；參見美國公開案第2007/0298500號)及本技藝中所知的其他可誘導性啟動子。當酵母菌在最常見的碳源，諸如葡萄糖、甘油或乙醇中生長時，醇氧化酶1基因啟動子係受到緊密抑制，但是當在甲醇中生長時則被高度誘導(Tschopp等人，1987；頒證Stroman, D. W. 等人之U.S. Pat.第4,855,231號)。為了生產外來的蛋白質，菌株最初可在一抑制性碳源中生長，以產生生質，然後轉換使用甲醇作為唯一(或主要)的碳與能量來源，而誘導該外來的基因之表現。此調控系統的優點在於以外來的基因轉型之巴斯德畢赤酵母菌菌株，該外來的基因表現產物具有細胞毒性，可以在抑制性條件下生長而獲得維持。

[0239]在另一例示性具體例中，異源性基因中之一者或多者可與一個受調控型啟動子偶合，其表現位準可在適當條件下向上調控。例示性的受調控型啟動子包括CUP1啟動子(由培養基中的銅位準所誘導)、四環黴素可誘導性啟動子、硫胺素可誘導性啟動子、AOX1啟動子及FLD1啟動子。

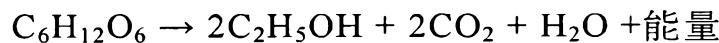
[0240]於另一個態樣中，本揭示提供一種在酵母菌中製造所欲的蛋白質之方法，其可以使用特定類型的回饋控制機轉來增加發酵的生產力。該回饋控制機轉允許穩健且精確的控制混合型需氧性的代謝及發酵性的代謝，其刺激該所欲的蛋白質之最佳生產。此能使用來有效的作用以在酵母菌，特別是在巴斯德畢赤酵母菌中生產重組型蛋白質，例如單株抗體，以及更特別地使用甘油醛-3-磷酸(GAP)啓動子。

[0241]該使用回饋控制機轉的方法可適用於生產全長、正確組裝的重組型單株抗體，以及抗體片段和其他的重組型蛋白質，即不是甘油醛-3-磷酸。吾人使用之控制機轉很容易機械化及執行自動化，因而消除許多監測及調整發酵條件的勞力。該方法可適用於生產各種抗體和其他所欲的蛋白質，以及容易擴充以適應商業上，例如大規模生產需要。

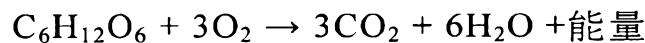
[0242]該生產方法可使用呼吸商(RQ)作為回饋控制的變數。可使用RQ來平衡質量轉移參數及/或可發酵糖進料速率，俾以維持培養物的缺氧狀態，同時避免發酵性代謝的副產品，乙醇毒性的累積。RQ定義為培養物內生產的二氧化碳莫耳比率(molar rate)除以消耗的氧之莫耳比率。其可以藉由分析來自發酵槽的排氣之二氧化碳和氧的含量來測量。可以在所欲的生長階段使用容易買到的工具連續不斷地或間歇地測量此代謝參數。適當的間隔之實例為每小時、每半小時、每四分之一小時、十分鐘、五分鐘、四分鐘、

三分鐘、二分鐘、一分鐘。從起始培養一直到收穫的測量期間之時間週期可以隨著生長條件而變化。例示性的發酵槽內的培養起始後之測量及對照週期為介於20和40小時之間，介於10和60小時之間，介於5和70小時之間，以及介於20和110小時之間。

[0243] 當酵母菌細胞於完全厭氧的狀態，不存在氧的情況中生長時，認為其等使用發酵性的代謝來生產其等生長需要的能量。在此情況下，應用下列化學計量方程式來將葡萄糖轉化成乙醇：



當酵母菌細胞僅僅從葡萄糖需氧性的代謝來獲得其等的能量時，那麼會消耗氧，且只生產二氧化碳和水：



存在氧的情況下，酵母菌細胞會利用需氧性的代謝，需氧性的代謝更有效率，亦即，一莫耳的葡萄糖於需氧性的代謝下會比發酵性的代謝下獲得更多的能量。

[0244] 只從葡萄糖生產乙醇之培養物的RQ接近無限大(因為沒有消耗氧，RQ的分母為零)，而就葡萄糖完全需氧性的代謝而言，RQ的值接近1.0(消耗三莫耳的氧來生產三莫耳的二氧化碳)。因而，高於1的值指示出混合型代謝條件，需氧性的代謝及發酵性的代謝二者均同時發生於混合型代謝條件。典型地，可以使用RQ作為作為回饋控制的變數來調整氧輸送速率及/或可發酵糖進料速率以完成此種混合型代謝。使用此種混合型代謝，可以維持缺氧的條件。

當有藉由平衡氧輸送速率及可發酵糖進料速率所控制之低位準的發酵性代謝時，會存在缺氧的狀態。缺氧的條件可以以RQ高於1.0且溶氧低於大約5%來定義。

[0245]可以從發酵槽的排氣流來測量RQ。可以使用任何已知且適合用於確定消耗的氧及產生的二氧化碳之莫耳濃度之方法。可以使用之例示性技術為質譜儀、紅外線分析儀，以及順磁分析儀。

[0246]缺氧性生長對於在畢赤酵母菌中生產全長、正確組裝的蛋白質，例如抗體，具有有利的效用。吾人嘗試僅僅透過降低發酵的整個期間之攪拌器速度來降低溶氧的濃度。然而，不可能以此方式獲得可靠的控制，因為攪拌速率或可發酵糖進料速率的微小差異會快速導致乙醇毒性位準的累積。

[0247]經由調變可發酵糖進料速率及/或氧輸送速率，例如藉由攪拌器速度，亦可以使用回饋控制機轉來測量及控制乙醇位準。控制乙醇的累積應該會准許更穩定的方法。為了監測乙醇位準，可以使用插入發酵槽內的探針。探針可以連續不斷地監測發酵肉湯內的乙醇位準。然而，在優良製造方法(Good Manufacturing Processes)下、於商業製造分子中使用此一探針是不可行的，因為無法得到能充分校正的輸出。

[0248]當RQ維持在大概1.1至大概2之狹小的範圍內時，乙醇的累積穩定在非毒性的位準。較佳地，乙醇的濃度維持於大約5 g/l和17 g/l之間。再者，此等同樣的條件會刺激

GAP啓動子，導致生產超過需氧性發酵的條件，顯著增加量之所欲的蛋白質，例如抗體。所欲的RQ範圍可以包括大約1.08-2.0；大約1.08-1.85；大約1.08-1.65；大約1.08-1.45；大約1.08-1.35；大約1.08-1.25；大約1.08-1.2；以及大約1.08-1.15。除了葡萄糖，供選擇的碳源能達到小於1的RQ。此等碳源包括醋酸鹽和甘油。其他合適的RQ範圍包括1.08至1.35，以及1.15至1.25。可以監測及控制在發酵的任何所欲部分期間的RQ，舉例來說，從0至110小時，從20-40小時，從20-70小時，從20-90小時，從20-110小時，或是任何其他所欲的時間週期。

[0249]因此，可以藉著添加各種各樣的碳源、藉著添加各種量的碳源，以及藉著操控氧位準而隨著時間操控及改變RQ。在一個具體例中，藉著增加或減少攪拌而操控氧位準。於另一個具體例中，控制氣體進料內氧對氮氣的比率。可以調整氧輸送速率的方式包括改變氣流率、氧濃度、細胞密度、溫度，以及攪拌。於另一個具體例中，調變葡萄糖或其他的可發酵糖進料來影響RQ。進料可以使用之其他的可發酵糖，在無限制的情況下包括果糖、蔗糖、麥芽糖，以及麥芽三糖。可以調變進料速率或組成來影響RQ。RQ的控制可以為手動或自動的。

[0250]編碼核酸的蛋白質，例如，編碼抗體，可以位於為重組型建構物上的單一或多個連續的或不連續的區段上。抗體可以為任何類型的片段或建構物或全長。此等可以為舉例來說， Fab 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 Fc ，以及 ScFv 。在一些具體例中，

鏈或鏈的片段於活體內會適當地組裝。設若未適當地組裝，可能需要活體外組裝。其他可能希望製造的蛋白質為具有一個或多個次級單元的該等，不管是同聚合型或是異聚合型。該蛋白質典型有用於診斷或是治療目的。該蛋白質可以為一種生長因子、細胞介素、凝血因子、治療性毒素、有用於重建之結構蛋白質、酵素等等。

[0251]像抗體之類的蛋白質可以透過本技藝中所知的技術而從細胞去除的培養基或是從細胞予以回收。典型會使用結合步驟來減少製備物的體積。當方便時，結合可以於濾器或管柱或其他的撐體上進行。在一些具體例中，可以使用蛋白A作為抗體捕捉劑。蛋白A可以與聚合型基質結合。

[0252]可以使用任何類型的酵母菌細胞，包括酵母菌(*Saccharomyces*)屬、漢遜酵母菌(*Hansenula*)，以及畢赤酵母菌屬物種。可以使用之例示但非限制性的物種為巴斯德畢赤酵母菌、嗜甲醇畢赤酵母菌、安格斯畢赤酵母菌、熱嗜甲醇畢赤酵母菌、多形漢遜酵母菌(*Hansenula polymorpha*)，以及啤酒酵母菌(*S. cerevisiae*)。酵母菌細胞可以為單倍體或二倍體。

[0253]其他像GAP的啓動子可以同樣地使用。此等為用於在像畢赤酵母菌之類的酵母菌細胞中，於缺氧、葡萄糖限制性生長的情況下向上調節的基因之啓動子。此等可以使用的啓動子包括，在無限制的情況下，用於以下基因之啓動子：YHR140W、YNL040W、NTA1、SGT1、URK1、PGI1、YHR112C、CPS1、PET18、TPA1、PFK1、SCS7、

YIL166C、PFK2、HSP12、ERO1、ERG11、ENO1、SSP120、BNA1、DUG3、CYS4、YEL047C、CDC19、BNA2、TDH3、ERG28、TSA1、LCB5、PLB3、MUP3、ERV14、PDX3、NCP1、TPO4、CUS1、COX15、YBR096W、DOG1、YDL124W、YMR244W、YNL134C、YEL023C、PIC2、GLK1、ALD5、YPR098C、ERG1、HEM13、YNL200C、DBP3、HAC1、UGA2、PGK1、YBR056W、GEF1、MTD1、PDR16、HXT6、AQR1、YPL225W、CYS3、GPM1、THI11、UBA4、EXG1、DGK1、HEM14、SCO1、MAK3、ZRT1、YPL260W、RSB1、AIM19、YET3、YCR061W、EHT1、BAT1、YLR126C、MAE1、PGC1、YHL008C、NCE103、MIH1、ROD1、FBA1、SSA4、PIL1、PDC1-3、THI3、SAM2、EFT2，以及INO1。

[0254]大規模發酵方法為典型使用於商業的方法來生產有用的產物之該等方法。典型地此等體積為大於100公升。分批補料發酵為在發酵的整個期間添加營養素的一種方法來影響細胞密度與產物的累積。

[0255]先前公開的專利申請案以及專利U.S. 7927863，U.S. 8268582，U.S. App 2012/0277408之揭示係明確地併入本文。

[0256]雖然本揭示大部分係說明抗體之生產作用，但是本文中所述之方法立即可適用於其他所欲的蛋白質，包括單一次級單元型及多次級單元型蛋白質。此外，本發明的方法並非受限於生產多蛋白複合體，其亦可適用於核糖核蛋白(RNP)複合體，包括端粒酶、hnRNP、核糖體、snRNP、

訊息辨識粒子、原核與真核生物RNase P複合體，以及含有
多個截然不同的蛋白及/或RNA次級單元之其他任何複合
體。表現多次級單元型複合體之宿主細胞可以經由本技藝
中所知的方法來生產。舉例而言，含有不同的基因複製體
的數目組合之一組二倍體或四倍體酵母菌細胞，可藉由將
所含有之個別次級單元基因的複製體數目不同之細胞配對
(較佳在配對之前得知複製體的數目)而產生。

[0257] 定義

[0258]要瞭解到本發明不限於所說明之特定的方法學、
操作程序、細胞株、動物物種或屬，以及試劑，因這些可
以變化。也要瞭解到本文中所使用的術語僅僅爲了說明特
定的實施例之目的，以及不欲限制本發明的範疇，其僅由
附隨的申請專利範圍所限定。

[0259]當使用於本文中，單數形式“一”、“和”，以及“該”
係包括複數的所指對象，除非上下文顯然另有規定。因此，
舉例而言凡提及“一細胞”時，係包括數個此等細胞，以及
提及"該蛋白質"時，係包括提及一或多個蛋白質和本技藝
中具有技術的那些人所知道其之均等物，及依此類推。本文
中所使用的所有的技術和科學術語，係與具有本發明所
屬之技藝中具有通常技術的一般技能者所通常瞭解的意義
相同，除非顯然另有規定。

[0260] *推注添加(Bolus addition)*：在本示中，“推注添
加”一般係指快速改變與所培養的細胞接觸(例如，在一培
養基中)之一物質(諸如乙醇)的濃度。舉例而言，該物質可

藉由單次添加、一次以上的連續添加，及/或在一段時間內(如大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、90或是120分鐘)輸注，而添加至所培養的細胞。亦可藉由置換部分或全部的培養基而添加該物質，舉例而言藉由將細胞濃縮(使用離心作用、過濾作用、沉澱作用或其他方法)，除去部分或所有的培養基，及添加該物質；或是藉由在含有該物質的培養基中添加細胞。該物質可與一種載劑(如，培養基、水、鹽水等等)摻合。舉例而言，乙醇的推注添加作用可包括在培養基中添加純或濃縮的乙醇(如，100%、95%、70%、50%、60%、40%、30%、20%等等)，所添加的乙醇量係足以產生所欲濃度。在另一實例中，可將細胞添加至含有乙醇的培養基中，例如藉由將含有細胞的接種物添加至含有乙醇的培養基中。

[0261] 推注濃度：在本揭示中，“推注濃度”一般係指因爲推注添加一種物質(如乙醇)所產生的濃度。

[0262] 配對的勝任酵母菌物種：於本發明中，此係意欲廣泛地包含任何能於培養物內生長的二倍體或四倍體酵母菌。此等酵母菌的物種可以以一個單倍體、二倍體，或是其他多倍體形式存在。於適當的條件之下，特定的多倍體之細胞可以以該形式增殖無限數目的世代。二倍體細胞也能形成孢子以形成單倍體細胞。相繼的配對能經由進一步二倍體菌株的配對或融合而產生四倍體菌株。本發明設想單倍體酵母菌之用途，以及例如藉由配對或融合(如球形質體融合)所產生的二倍體或其他多倍體酵母菌細胞之用

途。

[0263]於本發明的一個實施例中，配對的勝任酵母菌是酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)家族的一成員，其包括：阿席歐酵母菌(*Arxiozyma*)屬；糞盤菌(*Ascobotryozyma*)屬；固囊酵母菌(*Citeromyces*)屬；得巴利酵母菌(*Debaryomyces*)屬；德克酵母菌(*Dekkera*)屬；假囊酵母菌(*Eremothecium*)屬；伊薩酵母菌(*Issatchenka*)屬；哈薩克酵母菌(*Kazachstania*)屬；克魯維酵母菌(*Kluyveromyces*)屬；柯達菌(*Kodamaea*)屬；路德酵母菌(*Lodderomyces*)屬；管囊酵母菌(*Pachysolen*)屬；畢赤酵母菌(*Pichia*)屬；酵母菌(*Saccharomyces*)屬；木黴菌屬(*Saturnispora*)；四重孢酵母菌屬(*Tetrapisispora*)；有孢圓酵母菌(*Torulaspora*)屬；擬威爾酵母菌(*Williopsis*)屬；以及結合酵母菌(*Zygosaccharomyces*)屬。本發明中可能有用的其他類的酵母菌包括：耶羅威亞(*Yarrowia*)；紅冬孢酵母菌(*Rhodosporidium*)；念珠菌(*Candida*)；漢遜酵母菌(*Hansenula*)；擔子菌(*Filobasium*)；鎖擲酵母菌(*Sporidiobolus*)；布勒擲孢酵母菌(*Bullera*)；白冬孢酵母菌(*Leucosporidium*)以及線擔菌(*Filobasidella*)。

[0264]在本發明的一個較佳具體例中，配對的勝任酵母菌是畢赤酵母菌(*Pichia*)屬或另一種親甲基醇菌(*methylotroph*)的一成員。在本發明的另一較佳具體例中，畢赤酵母菌(*Pichia*)屬之配對的勝任酵母菌係下列物種之一：巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)、甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)，以及多形漢遜酵母菌(*Hansenula*

polymorpha) (安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*))。在本發明的一個特佳具體例中，畢赤酵母菌屬之配對的勝任酵母菌係巴斯德畢赤酵母菌(*Pichia pastoris*)物種。

[0265] 單倍體酵母菌細胞：一細胞，其之正常的基因體(染色體)組的各基因具有一單一複製體。

[0266] 多倍體酵母菌細胞：一細胞，其之正常的基因體(染色體)組具有多於一個複製體。

[0267] 二倍體酵母菌細胞：一細胞，其之正常的基因體組之實質上每個基因具有2個複製體(對偶基因)，典型地係藉由2個單倍體細胞的融合的過程(配對)而形成。

[0268] 四倍體酵母菌細胞：一細胞，其之正常的基因體組之實質上每個基因具有4個複製體(對偶基因)，典型地係藉由2個二倍體細胞的融合的過程(配對)而形成。四倍體可以帶有2、3、4，或是更多不同的表現卡匣。此等四倍體可以藉由以下方式獲得：於啤酒酵母菌內選擇性配對同型接合的異宗配合的(heterothallic) a/a和脉/脉二倍體，以及於畢赤酵母菌內藉由相繼的單倍體配對以獲得營養缺陷型的二倍體。舉例而言：一個[met his]單倍體可以配對以[ade his]單倍體以獲得二倍體[his]；以及一個[met arg]單倍體可以配對以[ade arg]單倍體以獲得二倍體[arg]；接而該二倍體[his]可以配對以二倍體[arg]以獲得一個四倍體原質營養生物。本技藝中具有技術的那些人會瞭解到提及二倍體細胞的優勢與用途也可以應用至四倍體細胞。

[0269] 酵母菌配對：二個酵母菌細胞融合以形成一個單

一酵母菌細胞之過程。所融合的細胞可為單倍體細胞或更高倍體的細胞(例如，將二個二倍體細胞配對而產生一個四倍體細胞)。

[0270] 減數分裂:一個二倍體酵母菌細胞經歷減少性分裂以形成四個單倍體孢子產物之過程。各孢子接而可以生長且形成一個單倍體有生長力的成長細胞株。

[0271] 可篩選標記:一可篩選標記是一基因或基因片段，其舉例而言經由一轉型事件，會賦予接受那個基因的一細胞一種生長表現型(生理生長特徵)。可篩選標記允許那個細胞在未接受那個可篩選標記基因之細胞無法生長的條件下，可於一選擇性生長培養基中存活和生長。可篩選標記基因通常屬於數個類型，包括：正向可篩選標記基因，如：賦予一細胞對一抗生素或其他藥物之抗性的基因，或是當雜交2個溫度敏感(“ts”)突變型或是轉型1個ts突變型時，賦予一細胞對於溫度抗性之一基因；負向可篩選標記基因，如生合成的基因，其賦予一細胞在缺乏一特定的營養素之培養基內生長的能力，該營養素係不具有那個生合成的基因之所有細胞所需者，或是致突變的生合成的基因，其賦予細胞因沒有該野生型基因的細胞而無法生長；以及類似物。合適的標記包括但不限於：ZEO；NEO (G418)；LYS3；MET1；MET3a；ADE1；ADE3；URA3；和類似物。

[0272] 嵌入：一遺傳元件(典型為一異源性遺傳元件)以共價方式與一生物體的染色體連接。

[0273] 縱排嵌入(*Tandemly integrated*)：二個複製體或更

多個複製體的遺傳元件複製體嵌入一染色體中的鄰近位置。該二或更多個複製體不一定具有定向；例如，就所轉錄的基因而言，一些複製體之轉錄可能從華生股(Watson)股開始，而其他可能從克里克(Crick)股開始。

[0274] **宿主細胞**：在本揭露內容的內文中，宿主細胞一詞係指含有一異源基因之一細胞(如一真核細胞，諸如一種畢赤酵母菌屬細胞)。舉例來說，該異源基因可用於表現作用所欲的多次級單元型複合體之一個次級單元；可為涉及蛋白質摺疊(如伴護蛋白)、表現作用或分泌作用之一基因；及/或為另一種所欲基因。可將異源基因嵌入真核細胞的基因體中，或將異源基因包含在染色體外元素諸如質體或人工染色體中。

[0275] **呼吸商(RQ)**，定義為生產的CO₂莫耳數除以消耗的氧之莫耳數。就碳水化合物完全氧化而言，RQ值為1.0。RQ值大於1指示為發酵作用，以及沒有使用O₂或O₂使用很低(例如，於缺少分子氧的情況下代謝)RQ可能達到非常大或理論上無限大的值。

[0276] **表現載體**：此等DNA載體含有幫助操作一外來蛋白質於標的宿主細胞內表現之元素。方便地，首先於一細菌宿主，例如大腸桿菌內執行序列的操作和供轉型之DNA的生產，以及載體通常會包括促進此等操作的序列，包括複製之細菌來源及適當的細菌篩選標記。篩選標記係編碼經轉型的宿主細胞於一選擇性培養基中存活或是生長必須的蛋白質。宿主細胞若未經含有篩選基因的載體轉型，則

無法在該培養基中存活。典型的篩選基因所編碼的蛋白質係(a)賦予對於抗生素或其他毒素之抗性，(b)補充營養缺陷型的缺陷(complement auxotrophic deficiencies)，或(c)供應無法從複合培養基取得的關鍵性營養素。例示性載體以及用於轉型酵母菌的方法係說明，舉例而言：於Burke, D., Dawson, D., & Stearns, T. (2000). *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press中，其在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0277]供用於本發明的方法之表現載體可以進一步包括酵母菌的特異性序列，包括一用於辨識經轉型的酵母菌菌株之可選擇的營養缺陷型或藥物標記。一藥物標記可以進一步用來選擇擴增一酵母菌宿主細胞內的載體之複製體的數目。

[0278]編碼有興趣的序列之多肽典型係操作地連結至轉錄和轉譯調控序列，該轉錄調控序列和轉譯調控序列提供用於酵母菌細胞內之多肽的表現。此等載體組份可以包括，但不限於下列的一者或多者：一增強子元素、一啓動子，以及一轉錄終止序列。也可以包括關於該多肽的分泌之序列，例如一訊息序列，和類似物。一酵母菌的複製的原點是選擇性的，因表現載體往往被併入至酵母菌的基因體之內。

[0279]雖然是選擇性的，但是在本發明的一具體例中，該所欲的蛋白質或所欲的多次級單元型複合體的一個次級

單元係操作地連結至一分泌序列連接或與一分泌序列融合，該分泌序列係用於將所表現的多肽分泌至培養基中，其可促進該所欲的蛋白質或複合體的收獲與純化作用。甚至更佳地，該分泌序列將宿主細胞(如，酵母菌二倍體細胞)的多肽分泌作用最佳化，諸如經由選擇較佳的密碼子及/或經由密碼子選擇而改變AT的百分比。本技藝中已知分泌效率及/或穩定性可受到所選擇的分泌序列影響，以及不同蛋白質之間的最佳分泌序列也可能不同(參見，譬如Koganesawa等人，Protein Eng. 2001 Sep;14(9):705-10乙文，其在此完整地併入本案以作為參考資料)。本技藝中已知許多可能適宜的分泌訊息，以及可很容易試驗其等對於之一特定所欲的蛋白質或複合體的產量及/或純度之效應。可能使用任一分泌序列，包括酵母菌與其他物種所分泌的蛋白質中所存在者，以及工程化的基因工程分泌序列。可使用的例示性分泌序列包括：雞溶菌酶(CLY)訊息勝肽(MRSLLILVLCFLPLAALG(序列辨識編號：5))，CLY-L8(MRLLLLLLLLPLAALG(序列辨識編號：6))，啤酒酵母菌(*S. cerevisiae*)轉化酶(SUC2)訊息勝肽(MLLQAFLFLLAGFAAKISA(序列辨識編號：7))，MF-脉(Prepro)(MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-EGVSLEKR(序列辨識編號：8))，MF-脉(Pre)-apv(MRFPSIFTAVLFAASSALA-APV(序列辨識編號：9))，MF-脉(Pre)-apv-SLEKR(MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVSLEKR(序列辨識編號：10))，MF-脉(Prepro)-(EA)3(MRFP

SIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-EGVSLEKR-EAEAEA(序列辨識編號：11))， α F 訊息勝肽(MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-DETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIASIAAKE-EGVSLEKR(序列辨識編號：12))，KILM1 訊息勝肽(MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHLVVALNDVAGPAETAPVSLLPR(序列辨識編號：13))，可阻抑型酸性磷酸酯酶(PHO1)訊息勝肽(MFSPILSLEIILALATLQSVFA(序列辨識編號：14))，黑麴菌(*A.niger*)GOX訊息勝肽(MQTLLVSSLVVSLAAALPHYIR(序列辨識編號：15))，西方許旺酵母菌(*Schwanniomyces occidentalis*)葡萄糖澱粉酶基因(GAM1)訊息勝肽(MIFLKLKSIVIGLGLVSAIQA(序列辨識編號：16))，具有原-序列(pro-sequence)之人類血清白蛋白(HSA)訊息勝肽(MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR(序列辨識編號：17))，不具有原-序列之人類血清白蛋白(HSA)訊息勝肽(MKWVTFISLLFLFSSAYS(序列辨識編號：18))，ISN訊息勝肽(MALWMRLLPALLALWGPDPAAA(序列辨識編號：19))，IFN訊息勝肽(MKYTSYILAFQLCIVL GSLGCDLP(序列辨識編號：20))，HGH 訊息勝肽(MAA DSQTPWLLTFSLCLLWPQEPGA(序列辨識編號：21))，植物血球凝集素(phytohaemagglutinin)(PHA) (MKKNRM MMMIWSVGVVWMLLLVGGSYG(序列辨識編號：22))，蠶溶菌酶(MQKLIIFALVVLCVGSEA(序列辨識編號：23))，人類溶菌酶(LYZ1)(MKALIVLGLVLLSFTVQG(序列辨識編

號：24))，第I型活化素(activin)受體(MVDGVM ILPVLIMIALPSPS(序列辨識編號：25))，第II型活化素受體(MGAAAKLAFAVFLISCSSG(序列辨識編號：26))，巴斯德畢赤酵母菌免疫球蛋白結合蛋白(PpBiP)(MLS LKPSWLTAAALMYAMLLVVVPFAKPVRA(序列辨識編號：27))，以及人類抗體3D6輕鏈引導序列(MDMRVP AQLLGLLLWLPGAKC(序列辨識編號：28))。參見Hashimoto等人，Protein Engineering vol. 11 no. 2 pp.75-77, 1998；Oka等人，Biosci Biotechnol Biochem. 1999 Nov; 63(11):1977-83；Gellissen等人，FEMS Yeast Research 5 (2005) 1079-1096；Ma等人，Hepatology. 2005 Dec;42(6):1355-63；Raemaekers等人，Eur J Biochem. 1999 Oct 1;265(1):394-403；Koganesawa等人，Protein Eng. (2001) 14 (9): 705-710；Daly等人，Protein Expr Purif. 2006 Apr;46(2):456-67；Damasceno等人，Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:381-389；以及Felgenhauer等人，Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25;18(16):4927，其中各者在此完整地併入本案以作為參考資料)。

[0280]在未操作地連結至一分泌訊息或與一分泌訊息融合之情況下，亦可將該所欲的蛋白質或複合體分泌至培養基中。舉例而言，已證實當一些異源性多肽在巴斯德畢赤酵母菌中表現時，即使未與一分泌訊息連接或融合，亦被分泌至培養基中。此外，可使用本技藝中所知的方法，從宿主細胞中純化該所欲的蛋白質或多次級單元型複合體

(例如，當複合體的分泌作用不良時，這可能是較佳的方式)。

[0281]可從培養中回收含有所欲的蛋白質或多次級單元型複合體之培養基或細胞。選擇性地，可純化所分泌出的蛋白質。舉例而言，可使用機械、化學、酵素及/或滲透方法(如用液態氮冷凍、使用均質機、去細胞壁作用、音波振動處理、與玻璃珠共同攪拌作用、使用清潔劑等)，將含有所欲的蛋白質或多次級單元型複合體之細胞溶解。可使用本技藝中所知的方法，將所欲的蛋白質或多次級單元型複合體濃縮、過濾、透析等。所欲的蛋白質或多次級單元型複合體可基於，例如其分子質量(如粒徑篩析層析法(如 size exclusion chromatography))、等電點(如等電聚焦作用)、電泳遷移率(如凝膠電泳)、疏水性交互作用層析法(如 HPLC)、電荷(如離子交換層析法)、親和性(如在一抗體的情況下與蛋白A、蛋白G及/或該所欲抗體與其結合的一抗原決定位之結合作用)，及/或醣化狀態(如藉由凝集素結合親和性檢測)，而予以純化。可進行多個純化步驟，以獲得所欲的純度位準。在一例示性具體例中，所欲的蛋白質或多次級單元型複合體可包含一個免疫球蛋白恆定領域，及可使用蛋白A或蛋白G親和性、粒徑篩析層析法及缺乏與凝集素的結合作用(用以移除醣化形式)進行純化。選擇性地可添加蛋白酶抑制劑，諸如苯甲基磺醯化氟(PMSF)，以抑制純化期間的蛋白分解性降解作用。

[0282]當核酸與另一個核酸序列置於一功能關係時，則

該核酸係“操作地連結”。舉例而言，設若一訊息序列的DNA係表現為參與一多肽的分泌之前蛋白，則該訊息序列的DNA係操作地連結至該多肽的DNA；設若一啓動子或增強子影響一序列的轉錄，則該啓動子或增強子係操作地連結至該編碼序列。一般而言，“操作地連結”係指連接的DNA序列係相鄰的，及在分泌前導的情況係相鄰及位於同一讀框中。然而，增強子不一定要相鄰。連結作用可以在合宜的限制位址藉由連接作用而完成，或是任擇地透過本技藝中具有技術的那些人所熟悉的PCR/重組方法(Gateway® Technology；Invitrogen, Carlsbad Calif.)予以完成。設若此等位址不存在，可以依照慣用的慣例使用合成的寡核苷酸接合體或連結子。亦可藉由化學合成作用產生所欲的核酸(包括含有操作地連結的序列之核酸)。

[0283] 啓動子是座落於一結構基因的起始密碼子之上游(5') (通常在大約100至1000 bp的範圍內)的未轉譯的序列，其控制其等操作地連結的特定核酸序列之轉錄和轉譯。此等啓動子屬於數個種類：可誘導性、構成性的(constitutive)，以及可抑制的啓動子(其等對缺乏一抑制子反應而增加轉錄的位準)。可誘導性啓動子可以對培養條件的一些變化作出反應，例如，存在或缺少一營養素或溫度的變化，而在其等的控制之下起始來自DNA之增加的轉錄的位準。

[0284] 酵母菌的啓動子片段也可以作用為同源重組的位址，以及表現載體併入至酵母菌的基因體之內的相同位址；任擇地，使用一可選擇的標記作為同源重組的位址。

畢赤酵母菌的轉型係於Cregg等人(1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385乙文中說明，其在此完整地併入本案以作爲參考資料。

[0285]來自畢赤酵母菌的適宜啓動子之實例包括CUP1(由培養基中的銅位準所誘導)、四環黴素可誘導性啓動子、硫胺素可誘導性啓動子、AOX1啓動子(Cregg等人(1989) Mol. Cell. Biol. 9:1316-1323); ICL1啓動子(Menendez等人(2003) Yeast 20(13):1097-108)；甘油醛-3-磷酸去氫酶啓動子(GAP)(Waterham等人(1997) Gene 186(1):37-44)；以及FLD1啓動子(Shen等人(1998) Gene 216(1):93-102)。GAP啓動子係一強力的構成性啓動子，而CUP1、AOX及FLD1啓動子係可誘導性啓動子。前述各參考文獻在此完整地併入本案以爲參考資料。

[0286]其他的酵母菌啓動子包括：ADH1、乙醇去氫酶II、GAL4、PHO3、PHO5、Pyk，以及自其衍生的嵌合啓動子。此外，可以使用於本發明中之非酵母菌的啓動子，如：哺乳動物、昆蟲、植物、爬蟲類、兩棲動物、病毒，以及鳥類的啓動子。最典型地，啓動子會包含一種哺乳動物的啓動子(可能對表現的基因是內源的)，或是會包含一種於酵母菌系統提供有效的轉錄之酵母菌的或是病毒的啓動子。

[0287]有興趣的多肽不僅可以直接重組生產，而且也可以爲帶有一種異源多肽的融合多肽，異源多肽例如爲訊息序列或在成熟蛋白或多肽的N端具有特定的分裂的位址之其他多肽。一般而言，訊息序列可以是載體的一組份，或

是其可以是插入至載體內的多肽編碼序列的一部分。選擇的異源訊息序列較佳係經由真菌細胞內的標準途徑之一者所辨識且處理者。啤酒酵母菌脉因子原前訊息已經被證實可有效分泌來自巴斯德畢赤酵母菌之各種重組型蛋白。其他的酵母菌訊息序列包括脉配對因子訊息序列、轉化酶訊息序列，以及衍生自其他分泌的酵母菌多肽之訊息序列。此外，此等訊息勝肽序列可以是經工程化的，來用於提高於二倍體酵母菌表現系統內的分泌。其他有興趣的分泌訊息也包括哺乳動物的訊息序列，其等對於待分泌的蛋白可以是異源的，或是可以是待分泌的蛋白之天然序列。訊息序列包括：前勝肽序列(*pre-peptide sequences*)，以及於一些實例中，可以包括原勝肽序列。許多此等訊息序列係本技藝中所知道的，包括免疫球蛋白鏈上發現的訊息序列，例如K28原前毒素序列、PHA-E、FACE、人類MCP-1、人類血清白蛋白訊息序列、人類Ig重鏈、人類Ig 輕鏈，和類似物。舉例而言：參見 Hashimoto 等人，*Protein Eng* 11(2)75(1998)；以及 Kobayashi 等人 *Therapeutic Apheresis* 2(4) 257 (1998)，其中各者在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0288]轉錄作用可以藉由插入一轉錄活化子序列至載體之內而增加。此等活化子係DNA的順式作用元素，通常大約自10至300 bp，其等作用於一啓動子上以增加其之轉錄。轉錄增強子係相對地定位且位置獨立的，已經發現轉錄增強子位於轉錄單元的5'和3'，在一插入子之內，以及在

編碼序列本身之內。增強子可以予以剪接至表現載體中位於編碼序列的5'或3'的一位置，但是較佳地係座落於啓動子的5'的位址。

[0289]真核宿主細胞中使用的表現載體也可以含有轉錄的終止以及穩定mRNA必須的序列。此等序列通常可得自於真核的或是病毒DNA或cDNA之未轉譯區之轉譯終止密碼的3'。此等區域含有的核苷酸區段係轉錄為mRNA的未轉譯部分內聚腺苷酸化的片段。

[0290]使用標準的連接技術或PCR/重組方法來建構含有一個或多個以上列出的組份之合適的載體。將經單離的質體或DNA片段按產生所需質體所欲之形式切開、修改，以及再連接，或透過重組方法產生。為了分析以確認於建構的質體內之正確的序列，連接的混合物係使用來轉型宿主細胞，以及成功的轉型體係酌情藉由適當的抗生素抗性(例如：氨比西林(ampicillin)或吉歐黴素(Zeocin))予以選擇。製備來自該等轉型體的質體，藉由限制核酸內切酶消化及/或定序予以分析。

[0291]以att位址為基礎的重組方法和重組酵素可以用來插入DNA序列至一載體之內，以作為片段的限制和連接的另一選擇。此等方法係說明於，舉例而言Landy(1989) Ann. Rev. Biochem. 58:913-949乙文；以及是熟悉此藝者所知道的。此等方法利用分子內DNA重組，係藉由λ(lambda)和大腸桿菌-編碼的重組型蛋白的混合物所媒介。重組發生於交互作用的DNA分子之特定的連接(att)位址之間。關於att位

址的說明，參見 Weisberg 和 Landy(1983) *Site-Specific Recombination in Phage Lambda*，於 *Lambda II*，Weisberg, ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press)，pp. 211-250。將位於重組位址的側邊之DNA區段交換，以致於在重組之後，att位址係由各親代載體所捐贈的序列所組成之雜種序列。重組能發生於任何拓撲的DNA之間。前述各參考文獻在此完整地併入本案以爲參考資料。

[0292] Att位址可以藉由以下方式予以引導至有興趣的一序列之內：連接有興趣的序列至一適當的載體之內；經由使用專一的引子而產生一含有att B位址之PCR產物；產生經選殖至一含有att位址的適當的載體之內的cDNA存庫；和類似物。

[0293] **單順反子** (*Monocistronic*) 與 **多順反子** (*polycistronic*) 基因。單順反子基因係編碼一RNA，該RNA所含有的遺傳訊息僅轉譯成單一蛋白。多順反子基因係編碼一mRNA，而該mRNA所含有的遺傳訊息轉譯成超過一種的蛋白。多順反子基因所編碼的蛋白可具有相同或不同的序列或其組合。二順反子或是雙順反子係指編碼二種蛋白之多順反子基因。多順反子基因選擇性地包括用於促進與端冠無關的(*cap-independent*)轉譯起始作用之一或多個內部核糖體進入位點(IRES)元素，其所在的位置可驅動與mRNA分子5'端所結合的5'-端冠結構無關之下游蛋白質編碼區的轉譯作用。可使用任何已知的IRES序列(如病毒、真核或人工來源)。例如，可使用位於基因間區段(IGR)中的蟋

蟋麻痺病毒IRES序列，如Thompson等人(2001年)PNAS 98:12972-12977乙文中所述。選擇性地，藉由基因改變可以增強IRES功能，例如藉由使得eIF2激酶GCN2持續表現，或是中斷二個被中斷的起始子tRNA基因(met)(同上)。

[0294]當使用於本文中，折疊係提及多肽與蛋白之三維結構，其中介於胺基酸殘基之間的交互作用係發揮功用而穩定該結構。雖然非共價的交互作用在決定結構上是重要的，但是通常有興趣的蛋白會具有由2個半胱胺酸殘基形成的分子內的及/或分子間的共價雙硫鍵。關於天然存在的蛋白與多肽或是衍生物以及其等之變異型，適當的折疊典型地導致最理想的生物活性之配置，以及可以方便地藉由活性的分析予以監測，例如配體的結合、酵素活性，等等。

[0295]於一些實例中，舉例而言，所欲的產物係合成的來源製成時，以生物活性為基礎的分析法會是較無意義的。此等分子之適當的折疊可以基於生理性質、積極的考量、模式研究，和類似物來決定。

[0296]可以藉由引進編碼提高折疊和雙硫鍵的形成的一個或多個酶，也就是折疊酶、伴護蛋白(chaperonin)、PDI、BIP、環胞菌素(cyclophilin)，等等的序列而進一步修飾表現宿主。此等序列可以利用本技藝中所知道的載體、標記等等，而構成地或可誘導地表現於酵母菌宿主細胞內。該序列所包括的轉錄調控元素係足以促成所欲的表現模式，及該序列較佳經由一種標定方法而穩定地併入至酵母菌的基因體之內。

[0297]舉例而言，真核的蛋白質雙硫鍵異構酶(PDI)不僅是半胱胺酸氧化和雙硫鍵同分異構作用之一有效的催化劑蛋白，而且也顯現出伴護蛋白(chaperone)的活性。PDI的共表現能幫助具有多重的雙硫鍵之活性蛋白的生產。BIP(免疫球蛋白重鏈結合蛋白)；環胞菌素(cyclophilin)；和類似物的表現也是有興趣的。於本發明的一個具體例中，多次級單元型複合體可由配對作用而由酵母菌菌株產生，其中單倍體的親代菌株中之各者表現不同的折疊酶，例如，一菌株可以表現BIP，以及另一個菌株可以表現PDI或是其等之組合。

[0298]術語“所欲的蛋白”或是“標的蛋白”係可交換地使用，以及一般係指本文中說明的一種異源性多次級單元型蛋白質，諸如抗體(如人類化抗體)或其之結合部分。

[0299]術語“抗體”係包括具有適合且辨識一抗原決定位，具特定的形狀之任何含有多肽鏈的分子結構，其中一個或多個非共價的結合交互作用係穩定分子結構和抗原決定位之間的複合體。原始型抗體分子係免疫球蛋白，以及來自所有的來源之所有種類的免疫球蛋白、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD等等均被認為是“抗體”，例如來自人類、齧齒動物、兔、乳牛、綿羊、豬、狗、其他的哺乳動物、雞、其他的鳥類等等。依據本發明，適用作為生產抗體之起始材料之較佳的來源是兔子。許多的抗體編碼序列已經被描述過；以及其他者可以藉由本技藝中所熟知的方法予以培育出。其等之實例包括嵌合抗體、人類抗體與其他非人類的

哺乳動物抗體、人類化抗體、單鏈抗體如scFvs、駱駝抗體(camelbodies)、奈米抗體(nanobodies)、IgNAR (衍生自鯊魚的單鏈抗體)、小分子免疫藥物 (small-modular immunopharmaceuticals) (SMIPs)，以及抗體片段，如Fab、Fab'、F(ab')₂和類似物。參見Streltsov V A等人，Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype, *Protein Sci.* 2005 November ; 14(11):2901-9. Epub 2005 Sep. 30 ; Greenberg A S等人，A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks, *Nature.* 1995 Mar. 9 ; 374(6518):168-73 ; Nuttall S D等人，Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries, *Mol Immunol.* 2001 August ; 38(4):313-26 ; Hamers-Casterman C等人，Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature.* 1993 Jun. 3 ; 363(6428):446-8 ; Gill D S等人，Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds, *Curr Opin Biotechnol.* 2006 December ; 17(6):653-8. Epub 2006 Oct. 19。前述各參考文獻在此完整地併入本案以爲參考資料。

[0300]舉例而言，抗體或抗原結合片段可以藉由基因工程予以生產。於此種技術中，如同用其他的方法，生產抗體的細胞係對所欲的抗原或免疫原致敏化。使用自抗體生產細胞單離的信使RNA作爲利用PCR擴增的一模板以製造

cDNA。藉由在表現載體中插入經擴增的免疫球蛋白cDNA之適當的區段而產生一個載體存庫，其中各載體含有保留起始的抗原專一性之一個重鏈基因和一個輕鏈基因。藉由將重鏈基因庫與輕鏈基因庫組合而建構一個組合存庫。此導致共表現一個重鏈與輕鏈(類似一抗體分子的Fab片段或是抗原結合片段)的純株的存庫。將攜帶此等基因之載體共轉染至一種宿主細胞內。當誘導抗體基因於經轉染的宿主內合成時，重鏈與輕鏈蛋白自行組裝以產生活性抗體，其等能藉由用抗原或是免疫原篩選予以偵測。

[0301]有興趣的抗體編碼序列包括由天然序列所編碼的該等，以及由於遺傳密碼的簡併而與揭示的核酸在序列上不相同的核酸，以及其等之變異型。變異型多肽能包括胺基酸(aa)取代、加入或是刪除。胺基酸取代可以是守恆性胺基酸取代或是消除非必須胺基酸之取代，如改變一醣化作用作用的位址，或是藉由取代或刪除非功能所必需的一個或多個半胱胺酸殘基以使不當折疊最小化。可設計變異型以便保留或是提高蛋白的一特定區域(例如，一功能領域、催化作用的胺基酸殘基等等)之生物活性。變異型也包括本文中所揭示的多肽之片段，尤其生物活性片段及/或對應於功能領域的片段。選殖的基因之活體外的致突變的技術為已知的。本發明也包括已經使用普通的分子生物技術予以修飾的多肽，從而改善其等對蛋白水解性降解之抗性，或是使溶解度性質最佳化或是使其等成為更合適作為一治療劑。

[0302]可以藉由將獲得自一物種的抗體生產細胞之變異輕鏈區與重鏈區(V_L 和 V_H)，以及帶有來自另一者的守恆輕鏈區與重鏈區組合之重組方法，來製造嵌合抗體。嵌合抗體典型係使用齧齒動物或兔的變異區以及人類的守恆區，俾以生產主要是人類領域之抗體。此等嵌合抗體的生產係本技藝中所熟知的，以及可以藉由標準的方法予以達成(如同例如於美國專利案號5,624,659中說明的，其係以其之全體併入本文中以作為參考資料)。進一步預期到的是本發明的嵌合抗體之人類守恆區可以選自於IgG1、IgG2、IgG3或是IgG4守恆區。

[0303]人類化抗體係予以工程化以包含甚至更多的類人類的免疫球蛋白領域，以及僅併入動物衍生的抗體之互補決定區。此係透過小心地檢查單株抗體的變異區之高度變異環的序列，以及使其等適合於人類抗體鏈的結構而完成。縱然表面錯綜複雜，在實施上方法是直接明確的。參見，例如美國專利案號6,187,287，其係完全併入本文中以作為參考資料。人類化抗體之方法先前曾述於所頒證之美國專利第7935340號，其揭露內容在此完整地併入本案以作為參考資料。在一些情況下，需判定活性之維持是否需要額外的兔架構殘基。在一些情況下，人類化抗體仍需要保留一些關鍵性兔架構殘基，以將親和性或活性之損失降至最低。在此等情況下，需要將人類胚系序列的一或多個架構胺基酸改回原有的兔胺基酸，方能具有所欲的活性。該等改變係由實驗方式測定，而識別出哪些兔殘基係保留親

和性與活性所需。

[0304]除了整個免疫球蛋白(或其等之重組對應體)之外，還可以合成包含抗原決定位結合位址的免疫球蛋白片段(例如， Fab' 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ ，或是其他的片段)。“片段”，或是最小的免疫球蛋白可以使用重組免疫球蛋白的技術予以設計。例如，供用於本發明中的“ Fv ”免疫球蛋白可以藉由合成一個融合的變異輕鏈區與一變異重鏈區而生產。抗體的組合也是感興趣的，例如，二聚抗體(**diabodies**)，其等包含二個不同的 Fv 的專一性。於本發明的另一個具體例中，免疫球蛋白片段包含SMIPs(小分子免疫藥物)、駱駝抗體(**camelbodies**)、奈米抗體(**nanobodies**)，以及IgNAR。

[0305]免疫球蛋白以及其等之片段可以是，例如經轉譯後修飾的，以提供可以使用於本發明的方法和組成物內之效應部分，如化學連接子，可偵測的部分，如螢光染料、酶、毒素、受質、生物發光材料、放射材料、化學發光部分和類似物，或是專一的結合部分，如鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)、抗生物素蛋白(avidin)，或是生物素和類似物。以下提供額外的效應分子之實例。

[0306]產物相關變異體：係存在於所欲產物的製備物及與所欲產物相關之所欲產物(如所欲的多次級單元型複合體)以外的一產物。例示性的產物相關變異體包括截斷型或延伸型肽；其醣化作用不同於所欲醣化作用之產物(例如，設若所欲者係一種無醣化(aglycosylated)產物，則任何醣化產物將被視為產物相關變異體)；具有異常的化學計量、不當組

裝、異常的雙硫鍵、異常或不完整的摺疊作用、聚集作用、蛋白酶剪切作用或其他異常狀況之複合體。例示性產物相關變異體可能展現下列一或多項之改變：分子質量(如藉由粒徑篩析層析法檢測)、等電點(如藉由等電聚焦作用檢測)、電泳遷移率(如藉由凝膠電泳檢測)、磷酸化狀態(如藉由質譜法檢測)、荷質比(如藉由質譜法檢測)、蛋白分解片段之質量或一致性(如藉由質譜法或凝膠電泳檢測)、疏水性(如藉由HPLC檢測)、電荷(如藉由離子交換層析法檢測)、親和性(如在一抗體的情況下，與蛋白A、蛋白G，及/或該所欲抗體與所結合的一抗原決定位之結合作用)，以及醣化狀態(如藉由凝集素結合親和性檢測)。當所欲的蛋白質係一抗體時，產物相關變異體一詞可包括一種醣化重鏈型變異體及/或半抗體物種(如下文所述)。

[0307]例示性產物相關變異體包括含有異常的雙硫鍵之變異體形式。例如，大部分的IgG1抗體分子係藉由總共16個鏈內與鏈間雙硫橋鍵穩定，其等使得重鏈與輕鏈中的IgG領域之摺疊作用穩定，而鏈間的雙硫橋鍵使得重鏈與輕鏈之間的締合作用穩定。其他的抗體類型同樣含有特徵性的穩定化鏈內與鏈間雙硫鍵。此外，一些抗體(包括在本文中所揭露的Ab-A與Ab-B)含有額外的雙硫鍵，稱為非典型雙硫鍵。因此，由於穩定化的共價鍵結不存在，及/或與附加的次級單元之雙硫鍵，所以異常的鏈間雙硫鍵可能造成異常複合體化學計量。此外，異常的雙硫鍵(不論是鏈間或鏈內)可能減少抗體的結構穩定性，其可能造成活性降低、

穩定性降低、形成聚集體的傾向增加，及/或免疫原性增加。可按多種方式檢測出含有異常雙硫鍵之產物相關變異體，包括非還原變性SDS-PAGE、毛細管電泳、cIEX、質譜法(選擇性地用化學修飾作用而在游離半胱胺酸中產生質量偏移)、粒徑篩析層析法、HPLC、光散射的變化及技藝中所知的其他任何適宜方法。如參見，Protein Protocols Handbook 2002，第五部，581-583，DOI: 10.1385/1-59259-169-8:581。

[0308] 半抗體 (*Half antibody*)、半抗體物種 (*half-antibody species*)或H1L1係指一種蛋白複合體，其包括單一抗體重鏈與單一抗體輕鏈，但缺少與第二抗體重鏈與抗體輕鏈的共價鍵結。在一些條件下，二個半抗體可能保持非共價方式的連結，但是可以於適當的條件下分開(如清潔劑、鹽或溫度)以幫助區分其等與全H2L2抗體之偵測。同樣地，H2L1係指一種蛋白複合體，其包括二個抗體重鏈與單一抗體輕鏈，但缺少與第二抗體輕鏈的共價鍵結；此等複合體亦可能以非共價方式與另一抗體輕鏈連結(及同樣地產生與全抗體類似的行為)。如同全抗體，半抗體物種與H2L1物種可在還原條件下解離成為個別的重鏈與輕鏈。可在非還原SDS-PAGE凝膠上檢測半抗體物種與H2L1物種，因該物種係在比全抗體更低的表觀分子量遷移，例如H1L1係在約全抗體表觀分子量的一半(如約75 kDa)處遷移。

[0309] 醣化重鏈型變異體 (*Glyco-heavy variant*)係指有時存在於抗體製備物中，且含有至少部分的Fc序列之醣化

型產物相關變異體。醣化重鏈型變異體的特徵在於由SDS-PAGE觀察所得之電泳遷移率降低(相對於一正常重鏈而言)、凝集素的結合親和性、與一抗Fc抗體的結合作用，以及如藉由粒徑篩析層析法測定之含有醣化重鏈型變異體的抗體複合體之分子量顯然較高。參見於2011年8月31日提出申請之美國臨時申請案序號第61/525,307號(代理人案號67858.730200)，其在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0310]術語“長時間穩定表現或表現一種所欲的分泌型異源性多肽之多倍體酵母菌”係提及一種酵母菌的培養物，其以闡的表現位準分泌該多肽歷時至少數天至1週，更佳地至少1個月，還更佳地至少1-6個月，以及甚至還更佳地歷時多於一年，所分泌的多肽典型至少50至500 mg/公升(在培養約90小時後)及較佳實質上更高。

[0311]術語“分泌所欲量的重組型多肽之多倍體酵母菌培養物”係提及培養物，其穩定或長時間分泌至少50-500 mg/公升，以及最佳地500-1000 mg/升或更多。

[0312]設若依照遺傳密碼，轉譯多核苷酸序列會產出多肽序列(也就是，該多核苷酸序列"編碼"該多肽序列)，那麼一多核苷酸序列"對應"於一多肽序列，設若二序列編碼相同的多肽序列，那麼一多核苷酸序列"對應"於另一個多核苷酸序列。

[0313]一DNA建構物之"異源性"區域或領域是於一個更大的DNA分子內的DNA之可辨識的區段，該區段未發現與自然存在之該更大的分子有所關連。因此，當該異源性

區域編碼一哺乳動物的基因時，該基因兩側的DNA在來源生物體的基因體中，通常並非側臨該哺乳類動物基因體DNA。另一個異源性區域的實例是一建構物，該編碼序列本身在自然界中不存在(例如，一cDNA，其基因體編碼序列含有插入子，或是具有不同於天然的基因之密碼子的合成序列)。對偶基因的變異體或是天然發生的突變事件並不產生如本文中所界定的DNA之異源性區域。

[0314]一個“編碼序列”是一種在架構上(in-frame)的密碼子序列，其(考慮到遺傳密碼)係對應於或是編碼一蛋白或胜肽序列。設若該等序列或是其等之互補序列編碼相同的胺基酸序列，那麼2個編碼序列係互相對應的。一個編碼序列連同適當的調控序列可以予以轉錄和轉譯成一多肽。一聚腺苷酸化的訊息和轉錄終止序列通常會座落於該編碼序列的3'。一個“啓動子序列”是一DNA調控區域，其能夠結合細胞內的RNA聚合酶以及起始下游(3'方向)的編碼序列之轉錄。啓動子序列典型地含有供影響編碼序列的轉錄之調控分子(例如，轉錄因子)結合的額外位址。當RNA聚合酶結合細胞內的啓動子序列且轉錄該編碼序列成為mRNA時，一編碼序列係在該啓動子序列的"的控制之下“或是”操作地連結"至該啓動子，該mRNA接而依序轉譯成該編碼序列所編碼的蛋白。

[0315]載體係用來引導一外來物質，如DNA、RNA或蛋白質，進入一有機體或宿主細胞內。典型的載體包括重組型病毒(用於多核苷酸)和脂質體(用於多肽)。一“DNA載

體”是一複製子，如質體、噬菌體或是黏接質體，另一個多核苷酸區段可以連接至其上，而導致連接的區段之複製作。 “表現載體”是含有調節序列之一DNA載體，該調節序列引導一適當的宿主細胞之多肽合成作用。此通常意指一啓動子與RNA聚合酶結合且起始mRNA的轉錄，以及核酸體結合位址和起始訊息以指示mRNA轉譯成多肽。在恰當的位址和於正確的閱讀架構上併入一多核苷酸序列至一表現載體內，接著由載體轉型一適當的宿主細胞，使得能夠生產由該多核苷酸序列所編碼的一多肽。

[0316]多核苷酸序列的“擴增”是一特定的核酸序列之多複製體的活體外生產。經擴增的序列通常有DNA的形式。進行此擴增的各種技術係說明於下列回顧文章中：Van Brunt 1990, Bio/Technol., 8(4):291-294；及Gill and Ghaemi, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008 Mar;27 (3):224-43。聚合酶連鎖反應或是PCR是核酸擴增的原型，以及本文中的PCR之使用應該視為其他合適的擴增技術之例示。

[0317]現在相當地瞭解多數脊椎動物(包括哺乳類動物)體內的抗體之一般結構(Edelman, G. M., Ann. N.Y. Acad. Sci., 190: 5 (1971))。傳統的抗體係由分子量大概23,000道爾頓之2個相同的輕多肽鏈(“輕鏈”)，以及分子量53,000-70,000的2個相同的重鏈(“重鏈”)所構成。4條鏈係藉由雙硫鍵予以結合成“Y”構型，其中重鏈係從“Y”構型的口部開始托住輕鏈。“Y”構型的“分支”部分係稱為F_{ab}區域；“Y”

構型的柄部分係稱爲F_c區域。胺基酸序列定位係自“Y”構型頂部的N端末端進行至各鏈底部的C端末端。N端末端擁有變異區，變異區對於引出(elicted)其之抗原具有專一性，及在長度上大概是100個胺基酸，於輕與重鏈之間以及抗體至抗體之間有輕微的變異。

[0318]各鏈內的變異區係連結至一守恆區，其係延伸該鏈剩下的長度，以及在一特定種類的抗體中其不隨著抗體的專一性(也就是，引出其之抗原)而變化。有五種已知的主要種類的守恆區，其等決定免疫球蛋白分子的種類(IgG、IgM、IgA、IgD，以及IgE，對應於 γ 、 μ 、 α 、 δ ，和 ϵ 重鏈守恆區)。守恆區或種類會決定抗體隨後的效應功能，包括補體的活化(Kabat, E. A., *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*, 2nd Ed., p. 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976))，以及其他細胞反應(Andrews, D. W.，等人，*Clinical Immunobiology*, pp 1-18, W. B. Sanders (1980)；Kohl, S.，等人，*Immunology*, 48: 187 (1983))；同時變異區決定其所反應的抗原。輕鏈分類爲 κ (kappa)或是 λ (lambda)。各重鏈種類能與 κ 或是 λ 輕鏈配對。當由融合瘤或是由B細胞產生免疫球蛋白時，輕鏈與重鏈係互相共價鍵結，以及2個重鏈的“尾”部係藉由共價的雙硫連結而互相鍵結。

[0319]措辭“變異區”或“VR”係提及一抗體內各對的輕鏈與重鏈內之領域，其等直接涉及抗體與抗原的結合。各重鏈在一端有一變異領域(V_H)接著一些恆定領域。各輕鏈在一端有一變異領域(V_L)以及在其之另一端有一恆定領域；

輕鏈的恆定領域係與重鏈的第一恆定領域一起排列，以及輕鏈變異領域係與重鏈變異領域一起排列。

[0320]措辭“互補決定區”、“高度變異區”，或是“CDR”係提及一抗體的輕鏈或重鏈之變異區內存在的一或多個高度變異或互補決定區(CDRs) (參見 Kabat, E. A. 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987))。此等措辭包括像是由 Kabat 等人所定義的高度變異區(“Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat E. , 等人, US Dept. of Health and Human Services, 1983)或是抗體的3維結構中的高度變異環(Chothia和Lesk, J Mol. Biol. 196 901-917 (1987))。各鏈內的CDRs係藉由架構區而保持很靠近以及，與另一個鏈的CDRs一起促成抗原結合位址的形成。在CDRs之內，有已經被說明為選擇性決定區(SDRs)之選出的胺基酸，其等代表於抗體-抗原交互作用中CDR所使用的關鍵接觸殘基(Kashmiri, S., Methods, 36:25-34(2005))。

[0321]措辭“架構區”或“FR”係提及在一抗體的輕鏈與重鏈之變異區內的一個或多個架構區(參見 Kabat, E. A. 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987))。此等措辭包括插入於一抗體的輕與重鏈之變異區內的CDRs之間的胺基酸序列區域。

[0322]措辭“穩定的複製體數目”係指一宿主細胞在一段較長的時間(諸如至少一天、至少一個星期或至少一個月

或更長)或在較多的增殖世代數目(如至少30、40、50、75、100、200、500或1000世代或更多)實質上維持一基因(諸如一抗體鏈基因)的複製體數目。舉例來說，在一特定的時間點或世代數目，培養物中的至少50%，及較佳地至少70%、75%、85%、90%、95%或更多的細胞可維持與起始細胞相同的基因的複製體數目。在一較佳具體例中，該宿主細胞含有穩定複製體數目的基因，該基因編碼所欲的蛋白質或是編碼所欲的多次級單元型複合體(例如抗體)的各次級單元。

[0323]措辭“穩定表現”係指一宿主細胞在一段較長的時間(諸如至少一天、至少一個星期或至少一個月或更長)或在較多的增殖世代數目(如至少30、40、50、75、100、200、500或1000世代或更多)維持一基因或蛋白質(諸如一抗體)相近的表現位準。舉例來說，在一特定的時間點或世代數目，該基因或蛋白質的生產速率或產量可為初始生產速率之至少50%，及較佳至少70%、75%、85%、90%、95%或更高。在一較佳具體例中，該宿主細胞係穩定表現所欲的蛋白質或多次級單元型複合體(如抗體)。

實施例

[0324]提出下列的實施例以便於提供本技藝中具有通常技術的那些人如何做及如何使用本發明之完全的揭示和說明，以及不意欲限制視為本發明的範疇。已經努力確保有關於使用的數目(例如數量、溫度、濃度等等)之正確性，但應允許一些的實驗錯誤和誤差。除非用別的方法指出，

部分是以重量計的部分，分子量是平均分子量，溫度是攝氏度數；以及壓力是大氣壓力或是接近大氣壓力。

[0325]以上的揭示大體而言說明本發明。本文中所揭示的所有參考資料係明確地併入本文以作為參考。參考下列特定的實施例可獲得更完整的瞭解，本文提供該特定的實施例僅用於闡釋的目的，以及不打算限制本發明的範疇。

[0326] 實施例1

[0327]實施例1至10顯示該方法對於生產四種不同的人類化單株抗體之應用性。在巴斯德畢赤酵母菌中使用甘油醛-3-磷酸(GAP)啓動子系統生產各個抗體。

[0328]吾人發現抗體Mab2之需氧性和缺氧培養物之間的效價之差異。藉由降低發酵槽內的攪拌速率來限制培養物之氧的可用性會導致顯著增加的產物形成。此為吾人第一個確證，當應用缺氧的條件來生產全長抗體時，會導致完全組裝的、適當雙硫鍵結的人類化單株抗體之產物形成顯著增加。參見圖37。

[0329] 實施例2

[0330]抗體Mab1之各具有不同複製體數目的三種不同菌株生長於20公升發酵槽內，其使用RQ控制策略(使用回饋控制來調變攪拌作用，其調變攪拌器速度以維持RQ在所欲的位準(在此情況下，1.12的值)以經控制的方式來促進缺氧的條件之混合型代謝，以便於確保乙醇的濃度不會達到毒性的位準。在各個情況中，回饋控制機轉的穩健本質允許進行混合型代謝而沒有乙醇毒性位準的累積(典型大於20

g/L)。(參見圖1-5)

[0331] 實施例3

[0332]於缺氧的條件下使用RQ控制策略，以三個不同的RQ控制設定點來培養Mab1。在此情況下，增加的RQ設定點會增加乙醇位準的累積，減少細胞累積，但是對於所有的產物累積不會有顯著的影響。此顯示出設定點範圍從1.09至1.35之RQ方法的效用。(參見圖6-10)。

[0333] 實施例4

[0334]吾人比較關於Mab1在用RQ控制來達到的缺氧生長之功效，對比於需氧性的條件下相同的方法之功效。需氧性的方法導致較低的乙醇的生產(如預期的)，以及顯著較低的產物形成。(參見圖11-16)。

[0335] 實施例5

[0336]RQ控制策略是在Mab2的發酵上進行，該發酵具有在各個重鏈與輕鏈之複製體數目上為不同之生產菌株。此研究顯示於控制乙醇的累積同時提供混合型代謝之缺氧環境下的RQ策略穩健本質。(參見圖17-21)。

[0337] 實施例6

[0338]RQ控制策略是在Mab3的發酵上進行，該發酵具有在各個重鏈與輕鏈之複製體數目上為不同之生產菌株。此研究顯示於控制乙醇的累積同時提供混合型代謝之缺氧環境下的RQ策略穩健本質。(參見圖22-26)

[0339] 實施例7

[0340]含有不同的重鏈與輕鏈的複製體數目之Mab3菌

株係使用RQ控制策略來生長，但是加上不同的葡萄糖進料速率。再次，RQ策略允許有效的控制乙醇位準，導致非常相似的產物累積速率。此提供RQ策略對於各種各樣的發酵條件進一步的穩健性證據。(參見圖27-31)。

[0341] 實施例8

[0342] MAb4證實了RQ策略，MAb4跟MAb1一樣結合至相同的標的，但是其CDR有比MAb1不同的序列。吾人比較二個不同的葡萄糖進料速率。該策略再一次允許穩定的乙醇的濃度以及相似的抗體累積速率。(參見圖32-36)。

[0343] 實施例9

[0344] 此實施例敘述生產抗體的發酵方法或是抗原結合發酵培養基。

[0345] 以下的表1中說明接種物培養基。

[0346] 表1. 接種物培養基

組分*	最終濃度
酵母菌萃取物	30 g/l
KH ₂ PO ₄	27.2 g/l
甘油或葡萄糖	20 g/l
酵母菌氮鹼無胺氨基酸	13.4 g/l
生物素	0.4 mg/l

[0347] *保持相同的莫耳濃度，任一種化學品($X \text{ nH}_2\text{O}$; $n \geq 0$)可以用另一種含有相同的活性成分但含有不同量的水($X \text{ kH}_2\text{O}$; $k \neq n$)之化學品取代。

[0348] 種菌發酵培養基

[0349] 以下的表2中說明培養基。

[0350] 組成種菌發酵培養基

組分*	最終濃度
檸檬酸鈉二水合物	10.0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 g/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	36.4 g/l
K ₂ HPO ₄	12.8 g/l
K ₂ SO ₄	18.2 g/l
無水的甘油	40.0 g/l
酵母菌萃取物	30.0 g/l
防沫劑204	0.5 ml/l
微量礦物質溶液(PTM1)	4.35 ml/l

[0351] *保持相同的莫耳濃度，任一種化學品($X \text{ nH}_2\text{O}$; $n \geq 0$)可以用另一種含有相同的活性成分但含有不同量的水($X \text{ kH}_2\text{O}$; $k \neq n$)之化學品取代。

[0352] 以下的表3中說明微量礦物質溶液。

[0353] 表3. 微量礦物質溶液(PTM1)

組分*	最終濃度
ZnCl ₂ 或硫酸鋅七水合物2	20 g/l或35g/l2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	65 g/l
95-98% H ₂ SO ₄	5 ml/l
NaI	0.08 g/l
MnSO ₄ ·2H ₂ O	3 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.2 g/l
H ₃ BO ₃	0.02 g/l
CoCl ₂	0.5 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	6 g/l
生物素	0.2 g/l

[0354] *保持相同的莫耳濃度，任一種化學品($X \text{ nH}_2\text{O}$; $n \geq 0$)可以用另一種含有相同的活性成分但含有不同量的水($X \text{ kH}_2\text{O}$; $k \neq n$)之化學品取代。

[0355] 當全部的組分完全地溶解於DI水內時，濾器無菌(filter sterilize)通過無菌的0.2 μm 濾器。

[0356] 以下的表4中說明生產培養分批培養基

[0357] 表4.生產培養分批培養基

組分*	最終濃度
檸檬酸鈉二水合物	10.0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 g/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	35.6 g/l
K ₂ HPO ₄	12.8 g/l
K ₂ SO ₄	18.2 g/l
無水的甘油	40.0 g/l
酵母菌萃取物	30.0 g/l
防沫劑204	1.6 ml/l

[0358] *保持相同的莫耳濃度，任一種化學品($X \text{ nH}_2\text{O}$; $n \geq 0$)可以用另一種含有相同的活性成分但含有不同量的水($X \text{ kH}_2\text{O}$; $k \neq n$)之化學品取代。

[0359] 上述係經由121°C高壓蒸氣滅菌最小20分鐘予以無菌化。在滅菌及使冷卻之後，將4.35 ml/l的微量礦物質溶液(PTM1)添加至生產培養分批培養基。在發酵槽接種之前，含有4.35 ml/l的PTM1之生產培養分批培養基應該用24-30% NH₄OH調整至pH 6.0。上文的值應該以包括培養基及接種物培養物兩者之總發酵開始體積為基準。

[0360] 以下的表5中說明葡萄糖/酵母菌萃取物進料溶液。

組分*	最終濃度
無水的右旋葡萄糖	500 g/l
酵母菌萃取物	50 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g/l
防沫劑204	0.1 ml/l
檸檬酸鈉二水合物	1.66 g/l
PTM1	12 ml/l

[0361] *保持相同的莫耳濃度，任一種化學品($X \text{ nH}_2\text{O}$; $n \geq 0$)可以用另一種含有相同的活性成分但含有不同量的水($X \text{ kH}_2\text{O}$; $k \neq n$)之化學品取代。

[0362] 以下的表6中說明乙醇的推注組成。

組分*	最終濃度
乙醇，200酒度(Proof)	11 g/l

[0363] *可以選擇性地使用更稀釋的乙醇溶液來達到相同的最終濃度。

[0364] 發酵方法

[0365] 由酵母菌，例如巴斯德畢赤酵母菌，來完成用於生產抗體或抗原結合片段之發酵方法。發酵作用起始於解凍冰凍的生產細胞庫(working cell bank)小瓶。解凍的細胞接而於震盪燒瓶內增殖。來自震盪燒瓶的培養物接而使用於接種物步驟，然後用於生產抗體之分批補料的方法。選擇性地，可以使用接種物來增殖細胞於種菌分批(seed batch)發酵內，然後其可以使用來接種生產發酵槽。

[0366] 1. 接種物步驟

[0367] 將解凍的生產細胞庫之細胞轉移至一擋板震盪燒瓶(1至4個擋板)，燒瓶含有8-20%工作體積容量的燒瓶接種物培養基。以0.1-1.0%體積的接種物培養基添加解凍的生產細胞庫至震盪燒瓶。以220-260 rpm的攪拌速度、於29-31 °C 孵育接種物培養物。一旦細胞密度達到相關於600 nm (OD₆₀₀)為15-30(最理想為20-30)的吸光度，便收穫種菌培養物。培養的時間通常為20-26小時(最理想為23-25小時)。

[0368] 2. 種菌發酵分批發酵(選擇性)

[0369] 用來自“接種物步驟”的接種物來接種發酵槽

[0370] 接種物=0.3%的種菌發酵槽培養基體積

[0371] Temp : 30°C

[0372] % DO : 30%

[0373] pH : 6.0

[0374] 攪拌作用：由100-490 RPM之串級(Cascade)策略

[0375] 氣流：1 vvm ((空氣體積/發酵槽開始的培養基體積)/分鐘)

[0376] 壓力：0.2巴

[0377] 達到最大的攪拌作用加上維持固定的vvm之氣流對應的減少時，會發生補充氧以維持所欲的%DO設定點30%。

[0378] DO尖波的繼續監測。

[0379] 當攪拌作用減少及DO增加時指示的DO的尖波已發生時，表示碳源(甘油或葡萄糖)已經完全利用，以及測量的光密度，OD₆₀₀大於20，轉移一體積的種菌分批發酵或是等於生產發酵槽開始批次體積的1.0-10%之接種物培養物。

[0380] 3.分批的培養階段

[0381] 分批的培養起始於種菌培養物接種發酵槽，以及終止於甘油的耗盡。發酵槽含有最大的工作體積之30-40%之製備的生產培養分批培養基。使用種菌培養物來製造1-10%的接種物於發酵槽內。最初的工程參數設定如下：

[0382] 溫度：27-29°C；

[0383] 攪拌作用(P/V)：2-16 KW/m³

[0384] 頂部空間壓力：0.7-0.9巴

[0385] 氣流：0.9-1.4 VVM (每分鐘每體積培養物之空氣體積，以開始的體積為基準)

[0386] DO：無控制

[0387] pH：5.9至6.1，以24-30% NH₄OH控制

[0388] 開始的攪拌速度及氣流在分批培養階段的整個期間保持固定，俾以滿足最初的每體積的動力(P/V)以及每分鐘每體積的體積(VVM)要求。在甘油耗盡、開始進料時，為分批的培養階段的終止。甘油的耗盡指示出溶氧(DO)值的尖波。當幾分鐘之內DO的值增加超過30%時，定義為DO的尖波。分批的培養階段通常持續10-15小時(最理想為11-13小時)。

[0389] 4. 乙醇推注添加(選擇性)

[0390] 在觀察到如上文所提及的DO的尖波後，立即將作為推注之200酒度的8-16 g/l的乙醇添加至發酵槽內。此通常發生在分批的培養階段12-14小時之內。

[0391] 5. 分批補料的培養階段

[0392] 在DO的尖波之後以及在乙醇的推注添加之後，在分批的培養階段大約12-14小時之內，開始進料葡萄糖/酵母菌萃取物進料溶液至發酵槽且持續至發酵作用終止。葡萄糖/酵母菌萃取物進料溶液進料的速率設定成允許每小時6-11 g的葡萄糖/公升開始體積。開始葡萄糖/酵母菌萃取物進料溶液啓動了分批補料的培養階段。

[0393] 6. RQ控制開始

[0394] 呼吸商(RQ)控制在分批補料的培養階段開始8小

時之後啓動。最初的RQ設定點的範圍在1.09至1.35。使用攪拌來控制RQ。攪拌為RQ控制設定點的串級關閉(cascaded off)。從分批培養階段的開始大概20-22小時啓動RQ控制且持續至發酵作用終止。RQ控制的持續期間維持大概60至90小時。

[0395]調整攪拌俾以維持RQ的設定位準。RQ控制策略詳細說明如下：

[0396]RQ高(Hi)控制設定點：1.35

[0397]RQ低控制設定點：1.08

[0398]最大攪拌器設定點：255 - 950 rpm

[0399]最小攪拌器設定點：150 - 300 rpm

[0400]攪拌器步驟變更(各等待時間間隔之變化)：3-25 rpm

[0401]等待時間(介於評估間的時間)：3-10分鐘

[0402]乙醇/RQ控制策略

[0403]已經併入此策略以確保乙醇的濃度不會超過對細胞可能有毒的最大值，以及不會超過減少產物表現之最小值。

[0404]實施例10

[0405]圖38顯示於缺氧及需氧性的條件下兩者生產的Mab1之SDS-PAGE凝膠。在非還原凝膠方面，除了在150 kD處的主帶之外，在主帶下方額外的(additonal)帶指示出有關於鏈間的雙硫橋鍵的位準之產物異質性。此等凝膠顯示使用缺氧的條件減少了異質性的位準。全長、完全地交聯的

產物增加的同質性指示出增加的純度，亦即，增加的所欲的產物，相對於存在的其他蛋白質而言。

[0406] 圖38亦顯示相同的樣本之還原SDS-PAGE凝膠。在此情況下，在25 kD以及50 kD處之預期的帶代表抗體的重鏈與輕鏈。額外的帶，特別是在重鏈上方大概55 kD處之帶代表存在抗體的變異體物種。此等凝膠顯示與需氧性的培養物相比，當細胞於缺氧的條件下生長時，此變異體的存在戲劇性地減少。

[0407] 實施例11

[0408] 此實施例測試溫度變動對於由巴斯德畢赤酵母菌表現的抗體的產量及純度之功效。在培養的整個期間向上的溫度變動造成抗體產量增加高達大約30%。此外，溫度變動增加純度，如同由減少的產物相關變異體及異常的複合體的豐度指示出的。

[0409] 方法

[0410] 由含有4個嵌入的重鏈基因複製體及3個嵌入的輕鏈基因複製體之巴斯德畢赤酵母菌菌株來表現Ab-A(分別為序列辨識編號：1及2)。使用包含下列營養素的培養基(%w/v)來擴充接種物：酵母菌萃取物3%，甘油2%，YNB 1.34%，生物素0.004%及27.2 g/l磷酸二氫鉀。使細胞於30 °C及300 rpm的搖動孵育器內生長大概24-28小時，以產生用於發酵槽之接種物。

[0411] Ab-A序列如下：

[0412] Ab-A重鏈多核苷酸序列：

gagggtcagcttgtggagtcgtggggaggctgtccagccctgggggtccctgaga
ctctccgtcagtcgtggatcgacctcagtggtactacatgaactgggtccgtca
ggctccagggaaggggctggagtggtcgagtcattggtattatggtgcacata
ctacgcgagctggcgaaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaccac
ggtgtatcttcaaatacgtggactcgtggatcgacactgtgttctgtgttag
aggggacatctggggccaagggaccctcgaccgtctcgagcgcctccaccaagg
gcccattcggtcttccccctggcaccctccatccaaagagcacctctggggcacagcgg
ccctggctgcctggtaaggactacttccccgaaccggtagcgggtcgtggaaactc
aggcgcctgaccagcggcgtgcacaccctccggctgtcctacagtccctcaggact
ctactccctcagcagcgtggtagccgtgcagcgttggcacccagaccta
catctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtagggacgcgagagttgagc
ccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactctgg
gggaccgtcagtctccttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctccgg
accctgaggtcacatgcgtggtaggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaa
gttcaactggtagtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcggg
aggagcagtacgccagcacgtaccgtgtggtagcgtccctcaccgtcaccagg
actggctgaatggcaaggagtacaagtgcaggtctccaaacaaagccctccagccc
ccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtac
accctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttatccagcgcacatgcgtggagtggtggagacatggcagc
cggagaacaactacaagaccacgcgcctccgtgtggactccgacggctcccttct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggaaacgtttctcatg
ctccgtatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtct
ccgggtaaatga (序列辨識編號：1)

[0413] Ab-A輕鏈多核苷酸序列：

caagtgcgtgacccagtcgtccatcctccctgtctgcacatctgttaggagacagagtcaccat
 caattgccaggccagtcagagtgtttatcataacacacctacgtggcctggtatcagcaga
 aaccaggaaagttcctaagcaactgatctatgatgcattccactctggcatctgggtc
 ccatctcgttcagtggtggatctggacagatttcacttcaccatcagcagcct
 gcagcctgaagatgttgcacttattactgtctggcagttatgattgtactaatggtgat
 tgtttgcggcggaggaaccaagggtggaaatcaaacgtacggcgtgcaccatc
 tgtcttcatctccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgc
 ctgctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgcc
 tccaatcggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagt
 ctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttcaa
 cagggagagtgtag (序列辨識編號：2)

[0414] 將10%接種物加至含有6 L無菌的生長培養基之Applikon 17L工作空間容器中。生長培養基含有下列營養素：硫酸鉀18.2 g/L，磷酸二氫銨35.6 g/L，磷酸二氫鉀12.8 g/L，硫酸鎂七水合物3.72 g/L，檸檬酸鈉二水合物10 g/L，甘油40 g/L，酵母菌萃取物30 g/L，PTM1微量金屬4.35 mL/L，以及防沫劑204 1.67 mL/L。PTM1微量金屬溶液含有下列組分：五水合硫酸銅6 g/L，碘化鈉 0.08 g/L，硫酸錳水合物3 g/L，二水合鉬酸鈉0.2 g/L，硼酸0.02 g/L，氯化鈷0.5 g/L，氯化鋅20 g/L，七水合硫酸亞鐵65 g/L，生物素0.2 g/L，以及硫酸5 mL/L。生物反應器的製程控制參數之設定如下：攪拌作用為950 rpm，氣流為每分鐘1.35標準公升，溫度為

28°C 及使用氫氧化銨控制pH值(在6)。並未提供氧氣之補充。

[0415]讓發酵培養物於28°C下生長大概12至16小時，直至起始的甘油消耗為止，其係藉由偵測到溶氧濃度激增，稱之為DO的尖波。在偵測到DO的尖波之後，每公升培養物立即添加11克的100%乙醇推注至反應器中，以獲得大約1.1%乙醇(w/v)的最終濃度。讓發酵培養物達到平衡達20分鐘。然後在發酵持續期間以11 g葡萄糖/L/hr的恆定速率開始進料。在進料添加起始大概8 hrs之後，使用攪拌回饋控制、以最小攪拌速度500 rpm和最大攪拌速度950 rpm開始進行RQ控制，藉此在剩餘的發酵期間將RQ設定點維持在1.12。進料含有下列組分：酵母菌萃取物50 g/L，無水的右旋葡萄糖500 g/L，硫酸鎂七水合物3 g/L，以及PTM1微量金屬12 mL/L。選擇性地，亦添加檸檬酸鈉二水合物(1.66 g/L)至進料。進料pH為6.0。

[0416]在進料起始之後五分鐘，培養的溫度迅速地變動為五個不同的溫度中之一者s (25°C，29.5°C，31°C，32.5°C，以及34°C)。此外，對照培養物維持在28°C，亦即，沒有溫度變動。總發酵時間為大概86-87小時。

[0417]於發酵期間從各個培養物收集樣本及判定全肉汁效價，以及以本申請案的圖示中前後一致的任意單位來繪圖。此外，在運轉終止時，藉由對還原和非還原樣本執行粒徑篩析層析法(SE-HPLC)來判定抗體純度(蛋白A純化之後)，其係使用具有紫外線檢測儀器的安捷倫(Agilent)(聖

塔克卡拉(Santa Clara), CA)1200系列HPLC。就樣本分離作用而言，使用Tosoh Bioscience(普魯士王市(King of Prussia), PA)的TSKgel Guard SW x 16 x 40 mm連接之GS3000SWx1 7.8x300 mm管柱。使用pH 6.5的100 mM磷酸鈉、200 mM氯化鈉作為移動相，而等度模式中的流速為0.5 mL/min，以及監測UV 215nm的吸光度。在注入樣本之前，該管柱進行平衡，直到達到穩定的基線為止。使用移動相將樣本濃度稀釋為1 mg/mL，及注入體積為30 μ L。為了監測管柱性能，使用BioRad(赫丘里斯(Hercules), CA)凝膠過濾標準品。

[0418] 結果

[0419] 經工程化來表現Ab-A之巴斯德畢赤酵母菌生長於培養物內，該培養物於起始的生長階段期間維持在28°C且以甘油作為碳源。在甘油耗盡之後，起始連續的葡萄糖進料，以及培養的溫度迅速地向上或向下變動至介於25°C及34°C之間新的設定點的溫度且於培養的持續期間維持於該溫度。一者維持在28°C培養物作為對照。

[0420] 為了監測抗體生產，週期性地取樣培養基(由於含括分泌訊息，抗體會分泌至培養基之內)到最終的86-87小時時間點。判定全肉汁抗體效價(任意單位)以及通過圖顯示各培養溫度於圖40內。如同描繪的，維持在31°C的培養物達到最高的最終效價。維持在32.5°C的培養物最初獲得稍微較高的效價，然而，全肉汁效價於65-70小時之間呈平穩狀態且開始減少，以及最終效價低於無變動的培養物觀察到的最終效價。維持在29.5°C的培養物觀察到第二高的

最終效價。變動高達34°C的培養物以及變動向下至25°C的培養物兩者都產生比維持在28°C培養物更低的效價。

[0421]此外，在培養終止時((亦即，在86-87小時)，判定抗體純度。明確地，源自各培養物之蛋白A純化的抗體係藉由篩析層析法(SEC)及藉由考馬斯(Coomassie)藍染色(圖42-47)之凝膠電泳來評估，還原和非還原樣本二者均進行。非還原樣本之SEC分析檢測具有異常的化學計量之複合體的相對豐度，包括一種含有單一個重鏈與單一個輕鏈之75kDA“半抗體”物種，以及一種含有二個重鏈與單一個輕鏈之“HHL”複合體。還原樣本之SEC分析檢測完整的重鏈與輕鏈之相對豐度，以及檢測具有大概9.8、10.15，及10.8分鐘的沖提時間之異常的次級單元(認為其對應於抗體重鏈的糖化形式)之相對豐度。

[0422]圖41A-B總結SEC的結果。非還原的SEC分析展現出，未變動的培養物(即，維持在28°C)以及變動到29.5°C和31°C之培養物的主抗體峰含有相似比例的總蛋白質，且所有三個條件均於全抗體峰內維持88-89%的總蛋白質(圖41A)。因此，有關於不當組裝的複合體，向上變動到29.5°C和31°C並未不利地影響純度。另外，還原的SEC分析展現出，當與未變動的培養物相比，變動到29.5°C之培養物的重鏈與輕鏈峰內包含的總蛋白質比例仍是相似的，且更高的溫度變動增加了大約4%的總蛋白質比例。

[0423]根據其上，推斷出向上溫度變動至29.5°C或31°C(亦即，達1.5°C至3°C)會增加最終的抗體產量。此外，變動

至31°C的培養物之純度增加，而變動至29.5°C的培養物沒有不利地影響純度。

[0424] 實施例12

[0425]此實施例測試溫度變動對於由巴斯德畢赤酵母菌表現的抗體的產量及純度之功效。測試二種不同的菌株，低生產的及高生產的菌株。於高生產的菌株方面，在培養的整個期間向上的溫度變動造成抗體產量增加高達大約28%。根據其上，推斷出溫度變動對已經高度最佳化的菌株之生產作用為實質有益的。此外，於多數情況中溫度變動會增加純度，如同減少的產物相關變異體的豐度所指示出的。

[0426] 方法

[0427]由含有3或4個嵌入的重鏈基因複製體及3個嵌入的輕鏈基因複製體之巴斯德畢赤酵母菌菌株來表現Ab-B(分別為序列辨識編號：3及4)。使用包含下列營養素的培養基(%w/v)來擴充接種物：酵母菌萃取物3%，甘油2%，YNB 1.34%，生物素0.004%及27.2 g/l磷酸二氫鉀。使細胞於30°C及300 rpm的搖動孵育器內生長大概24-28小時，以產生用於發酵槽之接種物。

[0428] Ab-B序列如下：

[0429] Ab-B重鏈多核苷酸序列：

```

gaggtgcagctggtagtctggggaggcttggccagcctgggggtccctgag
acttcctgtgcagcctctggattctccctcagtaactactacgtgacctgggtccgtca
ggctccagggaaaggggctggagtggtcgcatcatctatggtagtgatgaaaccgc

```

ctacgctacccgctataggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacc
 ctgtatcttcaaataaatgaacacgcctgagagactgaggacactgctgtgtattactgtgctaga
 gatgatagtagttagtactgggatgcaaagtcaacttggggccaagggaccctcgta
 ccgtctcgagcgcctccaccaaggccatcggtttccccctggcaccctcccaa
 gagcacctctggggcacagcggccctggctgcctggtaaggactacttccccga
 accgggtgacgggtgtcgtaactcaggccctgaccagcggcgtgcacacccccc
 ggctgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctcc
 agcagcttggcaccacagacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacc
 aaggtggacaagagaggttgagccaaatcttgtgacaaaactcacatgcccaccgt
 gcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagttccctttcccccaaaacccaa
 ggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtgacgtgag
 ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtaactggacggcgtggaggtgcataa
 tgccaagacaagccgcgggaggagcagtacgccagcacgtaccgtgtggcagc
 gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaactgcaaggc
 tccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggca
 gccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgggaggagatgaccaaga
 accaggtcagcctgacccctgctggtaaaggcttatcccagcgcacatgcccgtgga
 gtgggagagcaatggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccgtgtgg
 actccgacggcttcccttccctcagcaagctaccgtggacaagagcaggtggca
 gcaggggaacgtttctcatgcctccgtatgcacggctctgcacaaccactacacg
 cagaagagccctccctgtctccggtaaa (序列辨識編號：3)

[0430] Ab-B輕鏈多核苷酸序列：

gctatccagatgacccagtctccttcctccctgtctgcacatctgttaggagacagagtcac
 catcacttgcaggccagtcagagcattaacaatgagttatcctggatcagcagaac

cagggaaagccctaagctcctgatctatagggcatccactctggcatctgggtccc
 atcaagggttcagcggcagtggatctggacagacttcactctcaccatcagcagcctg
 cagcctgatgatttgcaacttattactgccaacagggttatagtcgtgaggaacattgata
 atgccttcggcggagggaccaagggtggaaatcaaacgtacggctgcaccatctgt
 cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcctg
 ctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaggtggataacgcctcc
 aatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctac
 agcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtcta
 cgccctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgcctgcacaaagagcttcaacag
 gggagagtgt (序列辨識編號：4)

[0431] 將10%接種物加至含有6 L無菌的生長培養基之 Applikon 17L工作體積容器中。生長培養基含有下列營養素：硫酸鉀18.2 g/L，磷酸二氫銨35.6 g/L，磷酸二氫鉀12.8 g/L，硫酸鎂七水合物3.72 g/L，檸檬酸鈉二水合物10 g/L，甘油40 g/L，酵母菌萃取物30 g/L，PTM1微量金屬4.35 mL/L，以及防沫劑204 1.67 mL/L。PTM1微量金屬溶液含有下列組分：五水合硫酸銅6 g/L，碘化鈉0.08 g/L，硫酸錳水合物3 g/L，二水合鋅酸鈉0.2 g/L，硼酸0.02 g/L，氯化鈷0.5 g/L，氯化鋅20 g/L，七水合硫酸亞鐵65 g/L，生物素0.2 g/L，以及硫酸5 mL/L。生物反應器的製程控制參數之設定如下：攪拌作用為950 rpm，氣流為每分鐘1.35標準公升，溫度為28°C 及使用氫氧化銨控制pH值(在6)。並未提供氧氣之補充。

[0432] 讓發酵培養物於28°C下生長大概12至16小時，直至起始的甘油消耗為止，其係藉由偵測到溶氧濃度激增，

稱之為DO的尖波。然後以15 g葡萄糖/l/hr的速率開始進料添加歷時8小時。在進料添加起始大概8 hrs之後，在發酵持續期間將進料添加速率減低至13g葡萄糖/l/hr。並且，於此時開始使用攪拌回饋控制、以最小攪拌速度500 rpm和最大攪拌速度950 rpm進行RQ控制，以將RQ設定點維持在1.12。進料含有下列組分：酵母菌萃取物50 g/L，無水的右旋葡萄糖500 g/L，硫酸鎂七水合物3 g/L，以及PTM1微量金屬12 mL/L。選擇性地，亦添加檸檬酸鈉二水合物(1.66 g/L)至進料。

[0433]在進料起始之後，二個表現菌株的各者之一個培養物的培養溫度迅速地變動為30°C。此外，二個菌株的各者之二個培養物，對照培養物維持在28°C，亦即，沒有溫度變動。總發酵時間為大概86小時。

[0434]於發酵期間從各個培養物收集樣本及判定全肉汁效價，以及以本申請案的圖示中前後一致的任意單位來繪圖。此外，在運轉終止時，抗體純度係使用實施例11中所述的方法、藉由粒徑篩析層析法(SE-HPLC)來判定(蛋白A純化之後)。

[0435] 結果

[0436]含有編碼輕鏈基因複製體的3個複製體及編碼重鏈基因的3個複製體(H3/L3)，或是含有編碼輕鏈基因的3個複製體及編碼重鏈基因的4個複製體(H4/L3)之工程化的巴斯德畢赤酵母菌菌株表現Ab-B。培養物最初生長於28°C且以甘油作為碳源。在甘油耗盡之後，起始連續的葡萄糖進

料以及培養溫度迅速地向上變動成30°C，且於培養的持續期間維持於該溫度，或是維持在28°C作為對照。

[0437]於基線，H4/L3菌株(圖48A)表現比H3/L3菌株(圖48B)更高的抗體效價，且未變動的培養物(亦即，維持在28°C)之平均最終全肉汁效價比H4/L3菌株更高12%。

[0438]變動成30°C的H4/L3培養物於最終效價顯現出進一步28%的增加(相對於維持在28°C，亦即沒有變動，的二個H4/L3培養物的平均效價而言)。在H3/L3菌株方面，終產量上觀察到的增加有點較不明顯，不過，相對於維持在28°C(亦即，沒有變動)的二個H3/L3培養物之平均終產量而言，變動至30°C的H3/L3菌株之產量增加達大約5%。

[0439]圖52顯示各個培養物的溫度相對培養的時間予以繪圖。如預期的，一旦溫度變動，細胞迅速達到新的設定點溫度30°C，以及變動的及未變動的培養物兩者於培養期間都維持其等的設定點溫度。

[0440]亦使用SE-HPLC來評估各培養物的抗體純度。如實施例11中所述，容許檢測非還原樣本異常的複合體(含有一個重鏈與一個輕鏈之75 kDa“半抗體”以及含有二個重鏈但只有一個輕鏈之HHL複合體)之相對豐度。與其等各自未變動的對照之平均相比，變動至30°C的二個樣本之全抗體(“主峰IgG”)內含的蛋白質餾份是增加的，此係起因於相對於未變動的樣本之平均而言，變動的樣本內75 kDA HL物種和前峰HHL物種兩者的減少。明確地，在未變動的H4/L3樣本方面，全抗體峰內含的平均蛋白質餾份為74.39%，前

峰HHL內為4.26%，以及75 kD HL為12.65%，與變動的H4/L3樣本相比，分別為83.44%，4.75%，和6.15%。同樣地，在未變動的H3/L3樣本方面，全抗體峰內含有的平均蛋白質餾份為82.80%，前峰HHL內為5.31%，以及75 kD HL為4.76%，與分別為91.63%，2.94%，和1.44%相比較。總之，非還原的SEC分析展現出，溫度變動(1)會增加全抗體峰內含有的抗體平均量，以及(2)會減少四個例子中的三個例子之異常的複合體平均量。

[0441]同樣如實施例11中所述，容許檢測還原樣本全長重鏈與輕鏈內含有之蛋白質的相對豐度，以及於三個分離的沖提峰觀察到的產物相關變異體的相對豐度。和觀察非還原分析所觀察到減少的異常的複合體不同，還原樣本於全長重鏈與輕鏈內含有的抗體量方面，沒有顯示出前後一致的改進。大體說來，與未變動的培養物的平均相比，二個菌株之變動的培養物內重鏈的平均相對豐度增加達大約1-3%，以及二個菌株之輕鏈的平均相對豐度沒有變化或減少達大約0.9%。

[0442] 實施例13

[0443]此實施例測試溫度變動對於由巴斯德畢赤酵母菌表現的抗體的產量及純度之功效。在培養的整個期間向上的溫度變動造成抗體產量增加高達平均大約47%。

[0444] 方法

[0445]如實施例11中所述，由含有4個嵌入的重鏈基因複製體及3個嵌入的輕鏈基因複製體之巴斯德畢赤酵母菌

菌株來表現Ab-A，除了五個培養物維持在28°C(亦即，未變動)且四個培養物變動至30°C之外。如同於實施例11中，如果真的有溫度變動的話，在進料起始之後五分鐘時達到溫度變動，總發酵時間為大概87小時。

[0446]使用實施例11中所述的方法，於發酵期間從各個培養物收集樣本及判定全肉汁效價，以及以本申請案的圖示中前後一致的任意單位來繪圖，且在最終的時間點(蛋白A純化之後)，藉由對還原和非還原樣本執行粒徑篩析層析法(SE-HPLC)來判定各培養物的抗體純度。

[0447] 結果

[0448]經工程化來表現Ab-A之巴斯德畢赤酵母菌生長於培養物內，該培養物於起始的生長階段期間維持在28°C且以甘油作為碳源。在甘油耗盡之後，起始連續的葡萄糖進料，以及培養的溫度迅速地向上變動至新的設定點28°C，於培養的持續期間維持於該溫度(N=4)。五個對照培養物維持在28°C(亦即，無變動的)。

[0449]藉由週期性地取樣來判定全肉汁抗體效價，以及通過圖顯示於圖50(任意單位)內。如同描繪的，變動至30°C之四個培養物之各者產生比全部維持在28°C無變動的培養物之最終效價更高的最終效價。平均而言，變動的培養物比無變動的培養物之最終效價更高47%。

[0450]此外，藉由SE-HPLC評估純度且比較變動的培養物及無變動的培養物。非還原樣本顯示主抗體峰含有的蛋白質的相對量平均增加大概2%，並且前峰HHL平均減少達

大約21%及75kDa HL峰增加達57%。還原樣本顯示純度上全面的改進，以及全部的三個雜質峰的平均相對豐度均減少。明確地，相對於無變動樣本而言，變動的樣本於RT 9.80峰顯現出26%的減少，RT 10.16峰顯現出74%，以及RT 10.80峰顯現出70%的減少。總之，非還原的SEC分析展現出，溫度變動(1)會增加全抗體峰內含有的抗體平均量，以及(2)會減少三種異常的複合體中二者的平均量。還原SEC分析顯示三個偵測的雜質峰各者的相對豐度大大地減少。

[0451]根據其上，推斷出溫度從28°C向上變動至或30°C(亦即，達2°C)可再現地增加最終的抗體產量達平均25-30%。而且當與相比未變動的培養物時，毛細管電泳分析所反映之抗體的純度亦表現出溫度變動的培養物增加的純度，還原的比較更為顯著。

[0452]本發明所述各種具體例之上述說明，並非意欲窮舉或將本發明侷限於所揭露的確切形式。在此係為了說明之目的而陳述本發明的特定具體例及用於本發明的實施例，嫻熟相關技藝者所認出之各種等效修飾，在本發明的範圍內皆屬可能。本文所提供之關於本發明的教示可應用在上述實施例以外的其他目的。

[0453]可用特別述於前述說明與實例中的該等方式以外之其他方式，來實施本發明。鑑於上述教導，可能進行本發明的眾多修飾與變化，及因此其等係落於所附申請專利範圍的範疇之內。

[0454]鑑於上述詳細說明，可在本發明進行該等與其他

改變。一般而言，在下列申請專利範圍中，所用術語不應被解釋將本發明侷限於說明書與申請專利範圍中所揭露的特定具體例。因此，本發明並非受限於揭露內容，本發明的範圍完全由下列申請專利範圍所決定。

[0455]與用於獲得抗原專一性B細胞殖株種群的方法相關之特定教導，係揭露於2006年5月19日提出申請之美國臨時專利申請案第60/801,412號，以及美國專利申請案第2012/0141982號中，其揭露內容在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0456]與兔衍生型單株抗體的人類化作用及用以維持抗原結合親和性之較佳的序列修飾作用相關之特定教導，係揭露於國際申請案第PCT/US2008/064421號中，其係對應於2008年5月21日提出申請之國際公開案第WO/2008/144757號，及標題為“Novel Rabbit Antibody Humanization Methods and Humanized Rabbit Antibodies”，其揭露內容在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0457]與使用配對的勝任酵母菌來生產抗體或其片段相關之特定教導及對應的方法，係揭露於2006年5月8日提出申請之美國專利申請案第11/429,053號(美國專利申請公開案US 2006/0270045)中，其之揭露內容在此完整地併入本案以作為參考資料。

[0458]在本發明背景、概要、詳細說明及實施例中所引述各文獻的完整揭露內容(包括專利、專利申請案、期刊文章、摘要、手冊、書籍或其他揭露內容)，係在此完整地併

入本案以作爲參考資料。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 艾爾德生物製藥股份有限公司
 <120> 在酵母菌及其它轉型細胞中多肽高產量表現用之溫度變動技術
 <130> 43257. 3013
 <141> 2014-03-17
 <150> 61/791471
 <151> 2013-03-15
 <150> 61/790, 613
 <151> 2013-03-15
 <160> 28
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 1326
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 工程化的抗體序列
 <400> 1
 gaggtgcagc ttgtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag tctctggaat cgacacctcgt ggctactaca tgaactgggt ccgtcaggct 120
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtcggagtc attggtattt atggtgccac atactacgct 180
 agctggcga aaggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaccac ggtgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacact gctgtgtatt tctgtgctag agggacatc 300
 tggggccaag ggaccctcgt caccgtctcg agcgcctcca ccaagggccc atcggtcttc 360
 cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggc ctgcctggc 420
 aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc 480
 gtgcacacct tcccgctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggc 540
 accgtgcctt ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 600
 agcaacacca aggtggacgc gagagttag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 660
 ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctt ccccccaaaa 720
 cccaaaggaca ccctcatgat ctccggacc cctgaggtca catgcgtgg ggtggacgtc 780
 agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcggtt ggtgcataat 840
 gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac gccagcacgt accgtgtggt cagcgtcc 900
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcacgtt ctccaaacaaa 960
 gcccctccag ccccaatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1020
 caggtgtaca ccctgcccc atccgggag gagatgacca agaaccaggc cagcctgacc 1080
 tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgcac atgcgcgtgg agtggagag caatggcag 1140
 ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggcgc cttttcc 1200

tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	1260
gtgatgcatt	aggctctgca	caaccactac	acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	1320
aaatga						1326

<210> 2
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 工程化的抗體序列

<400> 2						
caagtgcgtga	cccagtctcc	atcctccctg	tctgcattctg	taggagacag	agtaccatc	60
aattgccagg	ccagtcagag	tgtttatcat	aacacctacc	tggcctggta	tcagcagaaa	120
ccagggaaag	ttcctaagca	actgatctat	gatgcatcca	ctctggcattc	tggggtccca	180
tctcggttca	gtggcagttgg	atctggacaa	gatttcactc	tcaccatcag	caggctgcag	240
cctgaagatg	ttgcaactta	ttactgtctg	ggcagttatg	attgtactaa	tggtgattgt	300
tttgggttcc	gcccatttcc	tgagcatttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	360
ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtgaa	aggtgatcaa	cgcctccaa	420
tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagccctc	480
agcagcaccc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtctt	cgcctgcgaa	540
gtcaccatc	agggcctgag	ctcgccgc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgttag	600
						660

<210> 3
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 工程化的抗體序列

<400> 3						
gagggtgcagc	tggtgagtc	tgggggaggc	ttggtccagc	ctggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	ctccctcagt	aactactacg	tgacctgggt	ccgtcaggct	120
ccagggaaagg	ggctggagtg	gtcggcattc	atctatggta	gtgatgaaac	cgcctacgct	180
acctccgc	taggcccatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	cctgtatctt	240
caaataaca	gcctgagagc	tgaggacact	gctgtgtatt	actgtgttag	agatgatagt	300
agtgactggg	atgcaaagg	caacttgtgg	ggccaaggga	ccctcgac	cgtctcgagc	360
gcctccacca	aggcccattc	gtcttcccc	ctggcaccc	cctccaagag	cacctctggg	420
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctggtaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	480
tggaacttag	gcccctgac	cagcggcgtg	cacaccccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtccctcca	cgagcttggg	cacccagacc	600
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagccc	660
aaatcttgg	acaaaactca	cacatgccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	720
ccgtcagtct	tccttctcc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccctt	780
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	840

tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacgcc	900
agcacgtacc	gtgtggtcag	cgtcctcacc	gtccctgcacc	aggactggct	aatggcaag	960
gagtacaagt	gcaaggctctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	1020
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccattc	ccgggaggag	1080
atgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtaaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	1140
gccgtggagt	gggagagcaa	tggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctccgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttcctctac	agcaagctca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	1260
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	1320
cagaagagcc	tctccctgtc	tccggtaaa				1350

<210> 4
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 工程化的抗体序列

<400> 4	gctatccaga	tgacccagtc	tccttcctcc	cgtctgtcat	ctgtaggaga	cagagtccacc	60
	atcaacttgcc	aggccagtca	gagcattaac	aatgagttat	cctggtatca	gcagaaacca	120
	gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatagg	gcatccactc	tggcatctgg	ggtcccatca	180
	aggttcagcg	gcagtggatc	tggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
	gatgattttg	caacttatta	ctgccaacag	ggttatagtc	tgaggaacat	tgataatgct	300
	ttcggcggag	ggaccaaggt	gaaatcaaa	cgtacggtgg	ctgcaccatc	tgtcttcattc	360
	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgcattct	ggaactgcct	ctgttgtgtg	cctgctgaat	420
	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	tggagggtgg	ataacgcctt	ccaatcggtt	480
	aactccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	540
	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	600
	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	t	651

<210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 分泌胜肽

<400> 5

Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Ile	Leu	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Pro	Leu	Ala	Ala	
1																15

Leu Gly

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 6

Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 7

Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ile Ser Ala

<210> 8
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 8

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Glu Gly Val Ser Leu
20 25 30

Glu Lys Arg
35

<210> 9
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 9

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val
20

<210> 10
<211> 27
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 分泌胜肽

<400> 10

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Ser Leu Glu Lys Arg
20 25

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 分泌胜肽

<400> 11

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Glu Gly Val Ser Leu
20 25 30

Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Ala
35 40

<210> 12

<211> 85

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 分泌胜肽

<400> 12

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg
85

<210> 13

<211> 44
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 分泌胜肽

<400> 13

Met Thr Lys Pro Thr Gln Val Leu Val Arg Ser Val Ser Ile Leu Phe
 1 5 10 15

Phe Ile Thr Leu Leu His Leu Val Val Ala Leu Asn Asp Val Ala Gly
 20 25 30

Pro Ala Glu Thr Ala Pro Val Ser Leu Leu Pro Arg
 35 40

<210> 14
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 分泌胜肽

<400> 14

Met Phe Ser Pro Ile Leu Ser Leu Glu Ile Ile Leu Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Gln Ser Val Phe Ala
 20

<210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 分泌胜肽

<400> 15

Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg
 20

<210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 分泌胜肽

<400> 16

Met Ile Phe Leu Lys Leu Ile Lys Ser Ile Val Ile Gly Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Val Ser Ala Ile Gln Ala
20

<210> 17
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 17

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 18

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 19
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 19

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala
20

<210> 20
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 20

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro
20

<210> 21
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 21

Met Ala Ala Asp Ser Gln Thr Pro Trp Leu Leu Thr Phe Ser Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Leu Trp Pro Gln Glu Pro Gly Ala
20 25

<210> 22
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 分泌胜肽

<400> 22

Met Lys Lys Asn Arg Met Met Met Ile Trp Ser Val Gly Val Val
1 5 10 15

Trp Met Leu Leu Val Gly Gly Ser Tyr Gly
20 25

<210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 分泌胜肽

<400> 23

Met Gln Lys Leu Ile Ile Phe Ala Leu Val Val Leu Cys Val Gly Ser
1 5 10 15

Glu Ala

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 分泌胜肽

<400> 24

Met Lys Ala Leu Ile Val Leu Gly Leu Val Leu Leu Ser Val Thr Val
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 25
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 25

Met Val Asp Gly Val Met Ile Leu Pro Val Leu Ile Met Ile Ala Leu
1 5 10 15

Pro Ser Pro Ser
20

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 26

Met Gly Ala Ala Ala Lys Leu Ala Phe Ala Val Phe Leu Ile Ser Cys
1 5 10 15

Ser Ser Gly

<210> 27
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 27

Met Leu Ser Leu Lys Pro Ser Trp Leu Thr Leu Ala Ala Leu Met Tyr
1 5 10 15

Ala Met Leu Leu Val Val Val Pro Phe Ala Lys Pro Val Arg Ala
20 25 30

<210> 28
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 分泌胜肽

<400> 28

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

I636136

1

5

10

15

Leu Pro Gly Ala Lys Cys
20

10

I636136

發明摘要

※ 申請案號：103109931

※ 申請日：103/03/17

※ I P C 分類：

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

在酵母菌及其它轉型細胞中多肽高產量表現用之溫度變動技術

TEMPERATURE SHIFT FOR HIGH YIELD EXPRESSION OF

POLYPEPTIDES IN YEAST AND OTHER TRANSFORMED CELLS

【中文】

揭示用於生產異源性蛋白質之方法。尤其，本揭示提供生產所欲的蛋白質，包括多次級單元型蛋白質，例如抗體的改進方法，且該方法具有較高的產量及改進的純度。於例示性具體例中，該經轉型的細胞係酵母菌，例如親甲基醇酵母菌，如巴斯德畢赤酵母菌。

【英文】

Methods for producing heterologous proteins are disclosed. In particular, the present disclosure provides improved methods of producing desired proteins, including multi-subunit proteins such as antibodies, with a higher yield and improved purity. In exemplary embodiments, the transformed cells are a yeast, e.g., methylotrophic yeast such as *Pichia pastoris*.

圖式

mAb1

3種菌株

A312 = mAb1菌株A進料速率=11 g/l/hr, 11 g/l 推注, RQ = 1.09 - 1.15

A326 = mAb1菌株B進料速率=11 g/l/hr, 11 g/l 推注, RQ = 1.09 - 1.15

A343 = mAb1菌株C進料速率=11 g/l/hr, 11 g/l 推注, RQ = 1.09 - 1.15

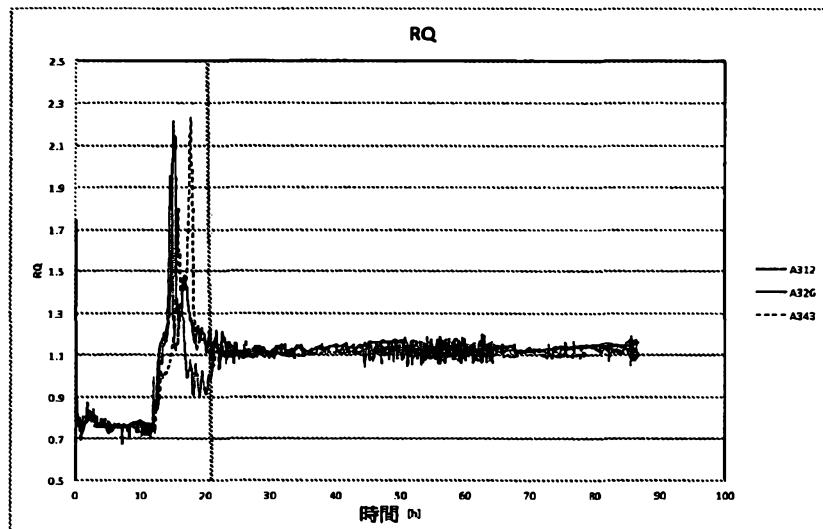


圖1：3種不同的mAb1抗體菌株A、B & C於20L發酵槽內之RQ控制剖面圖

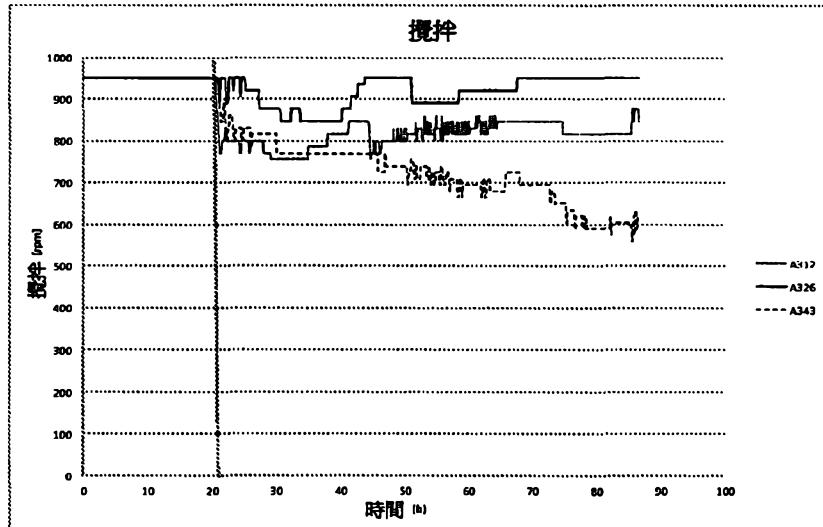


圖2：攪拌剖面圖，該剖面圖表示維持20L發酵槽內之3種不同的mAb1抗體菌株A、B & C所欲的RQ之攪拌反應

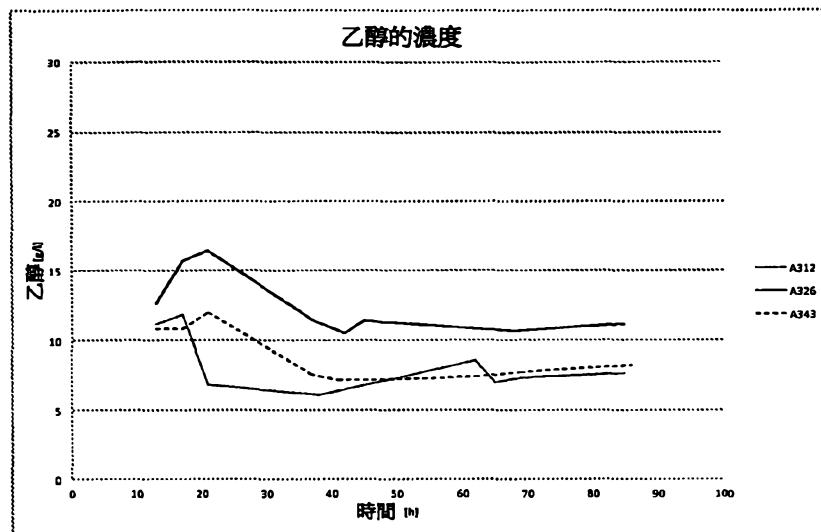


圖3：乙醇濃度剖面圖，該剖面圖表示RQ控制對於維持20L發酵槽內之3種不同的mAb1抗體菌株A、B & C於非毒性乙醇位準的效用

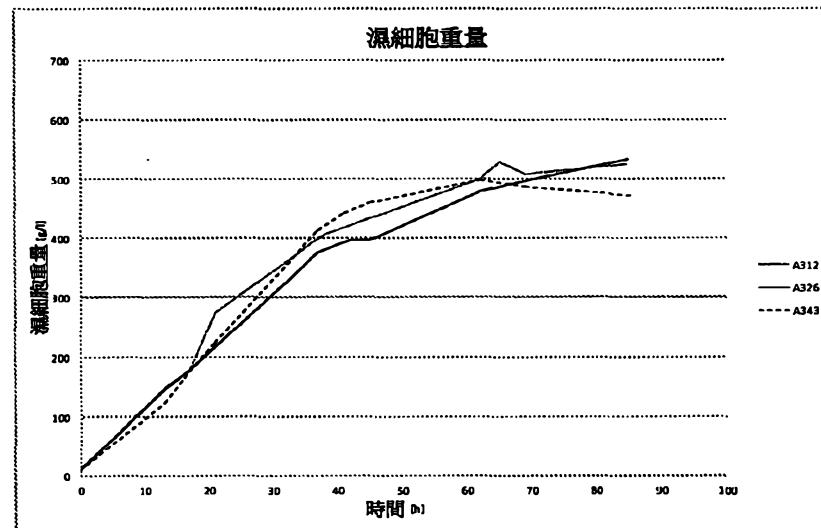


圖4：細胞生長剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之3種不同的mAb1抗體菌株A、B & C於細胞生長的相似性

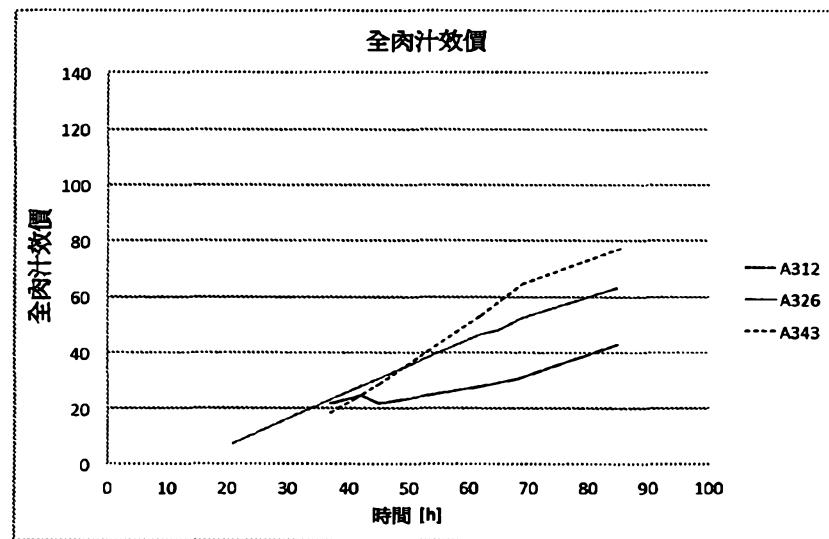


圖5：全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之
3種不同的抗mAb1抗體菌株A、B & C的產物表現

3個RQ設定點

A277 : mAb1菌株A進料速率 = 11 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.19 - 1.25
 A278 : mAb1菌株A進料速率 = 11 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.29 - 1.35
 A296 : mAb1菌株A進料速率 = 11 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15

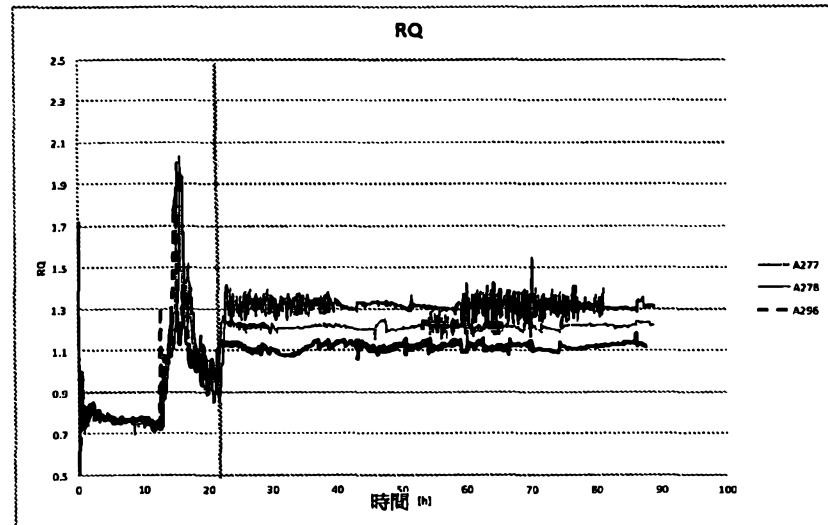


圖6：20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A的3個RQ控制設定點之RQ控制剖面圖

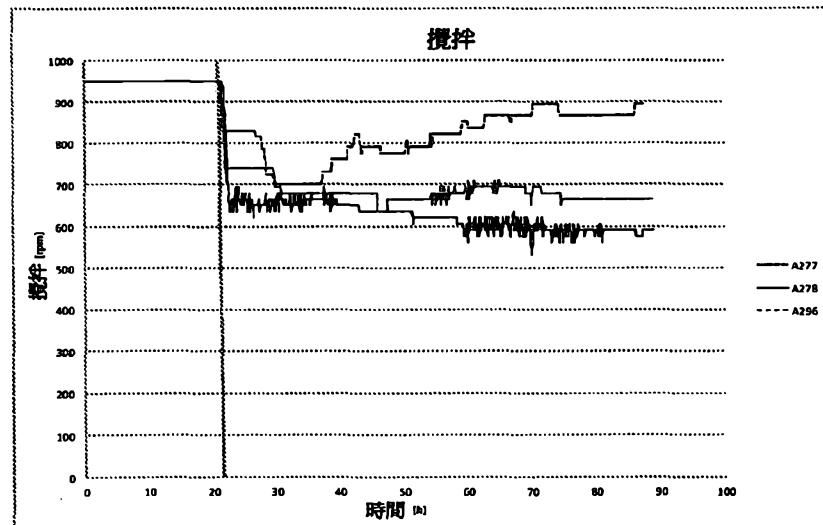


圖7：3個RQ控制設定點之攪拌剖面圖，該剖面圖表示維持20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A所欲的RQ之攪拌反應

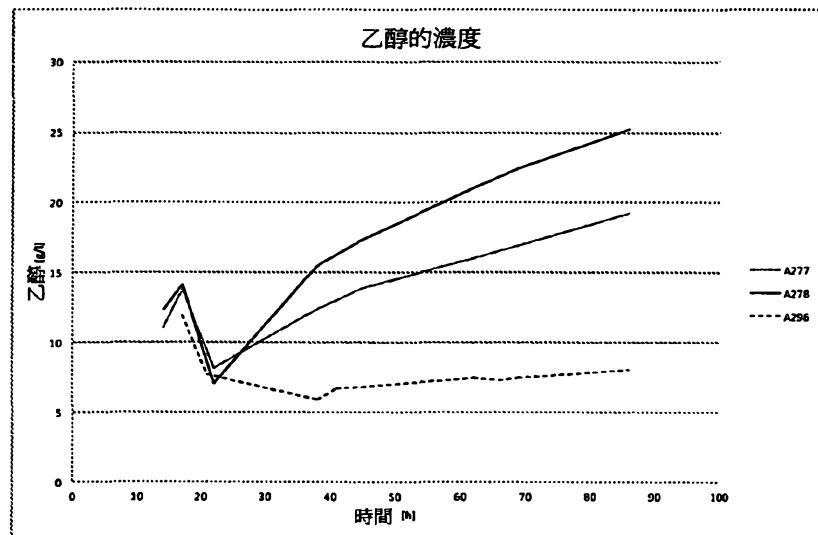


圖8：3個RQ控制設定點之乙醇濃度剖面圖，該剖面圖表示RQ控制對於維持20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A於非毒性乙醇位準的效用

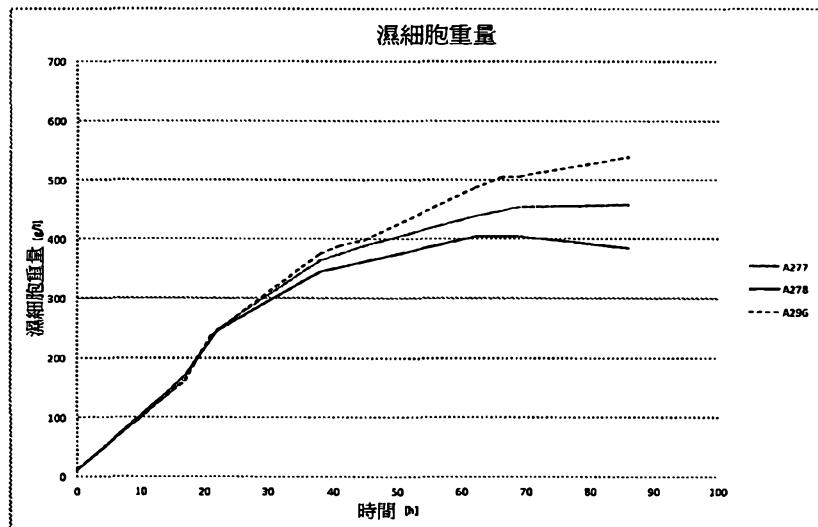


圖9：3個RQ控制設定點之細胞生長剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A之細胞生長

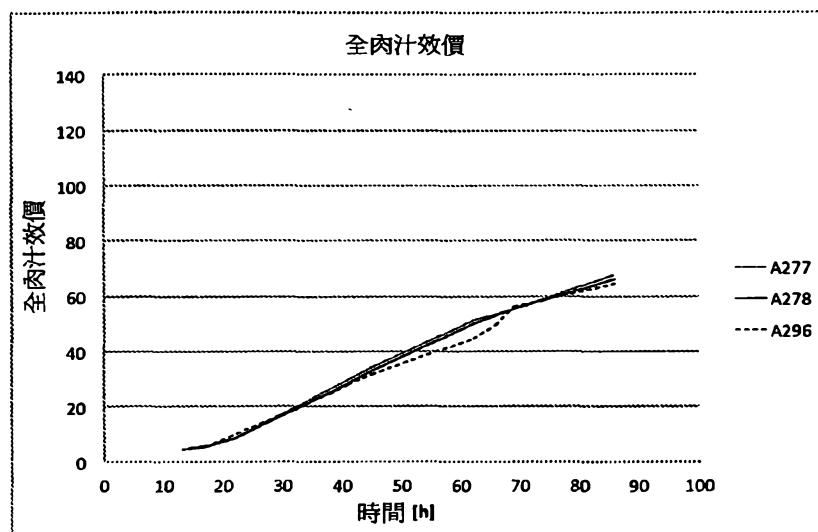


圖10：3個RQ控制設定點之全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示
20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A的產物表現

需氧的vs缺氧的

A291 = mAb1菌株A需氧的

A296 = mAb1菌株A缺氧的

進料速率 = 11 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注,

RQ = 1.09 - 1.15

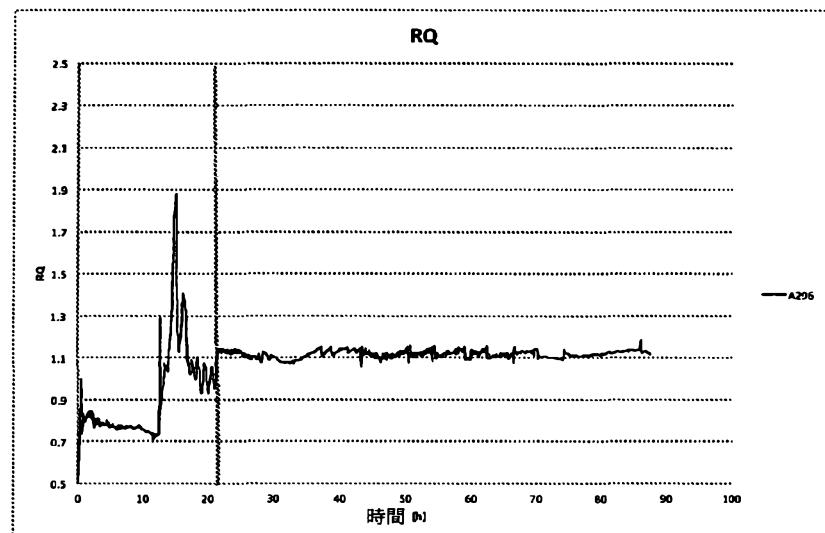


圖11：比較20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A的需氧及缺氧狀態的氧化作用之RQ控制剖面圖。二者之發酵作用都以相同的進料速率進行。RQ剖面圖沒有顯示需氧狀態

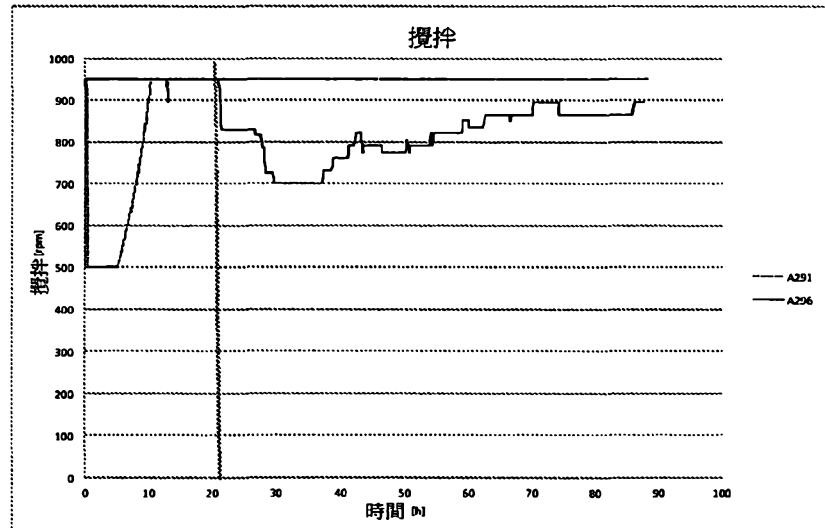


圖12：20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A之攪拌剖面圖，其表示維持缺氧發酵作用所欲的RQ之攪拌反應及需氧發酵作用之固定的攪拌作用

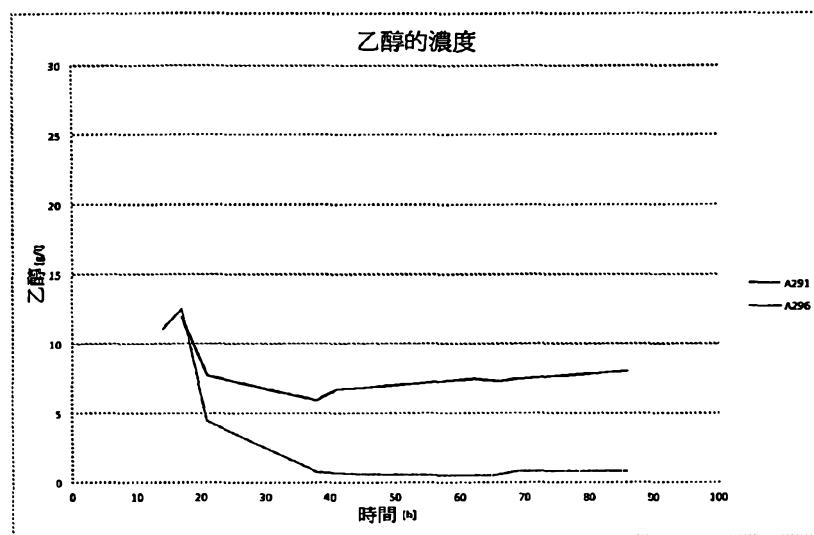


圖13：20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A之乙醇濃度剖面圖，其表示RQ控制對於維持缺氧發酵作用及需氧發酵作用的非發酵狀態之非毒性乙醇位準的效用

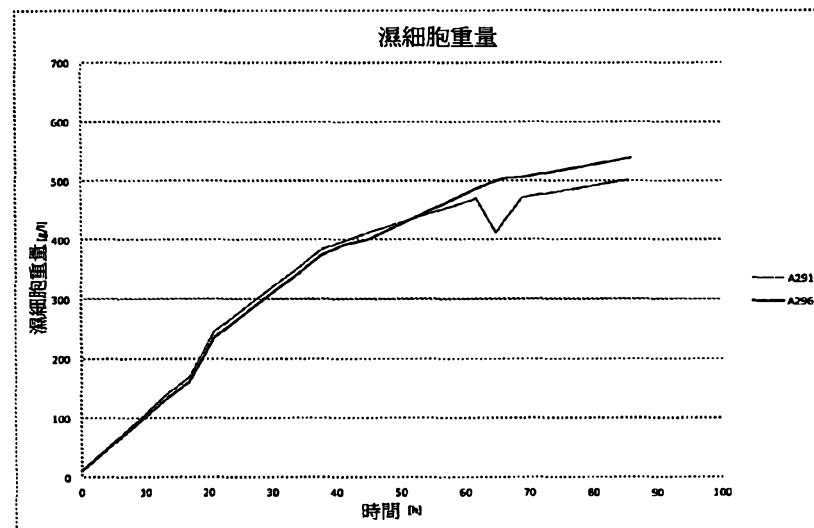


圖14：20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A之細胞生長剖面圖，其表示缺氧發酵作用及需氧發酵作用之細胞生長的相似性

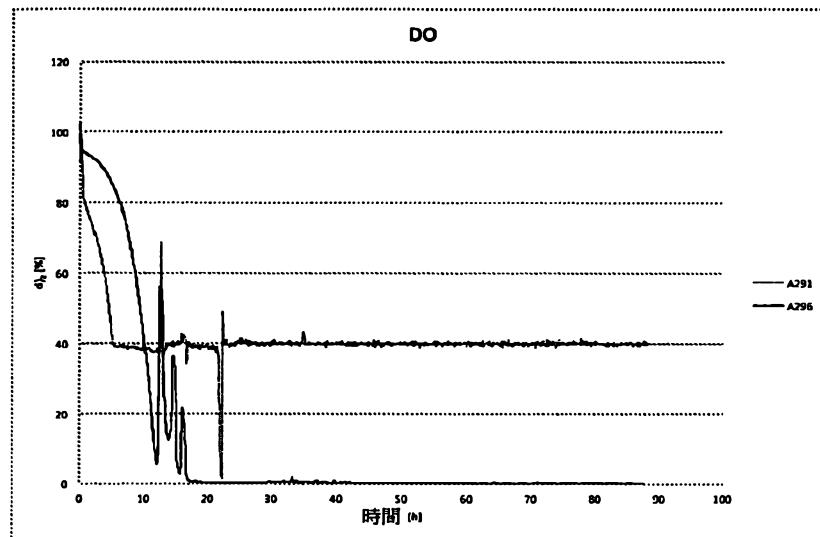


圖15：20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A的% DO (空氣飽和度)剖面圖，其表示需氧發酵作用之經控制的40% DO (空氣飽和度)及在缺氧發酵作用17小時之後不可測量的% DO (空氣飽和度)

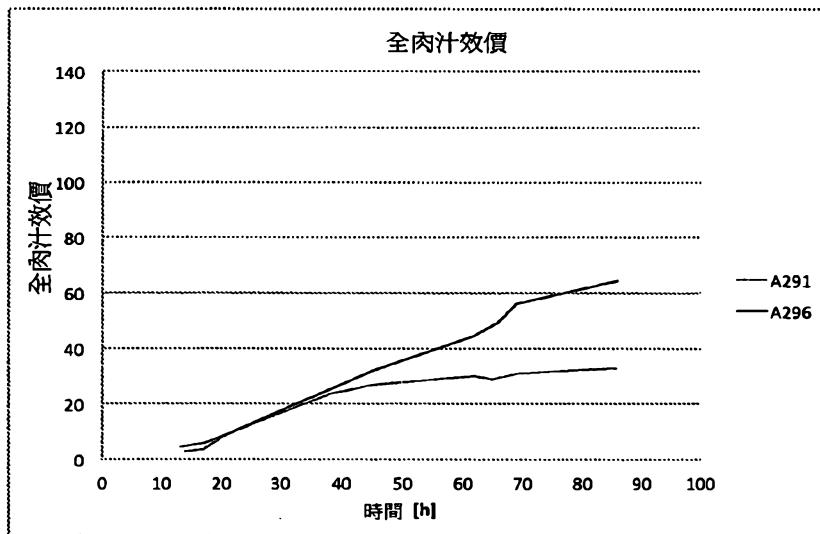


圖16：20L發酵槽內之mAb1抗體菌株A之全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示缺氧及需氧發酵作用的產物表現

mAb2**4種菌株**

A158 = mAb2菌株A進料速率 = 18/15 步進, RQ = 1.09-1.15, 無Etoh推注

A162 = mAb2菌株B進料速率 = 18/15 步進, RQ = 1.09-1.15, 無Etoh推注

A163 = mAb2菌株C進料速率 = 18/15 步進, RQ = 1.09-1.15, 無Etoh推注

A173 = mAb2菌株D進料速率 = 18/15 步進, RQ = 1.09-1.15, 無Etoh推注

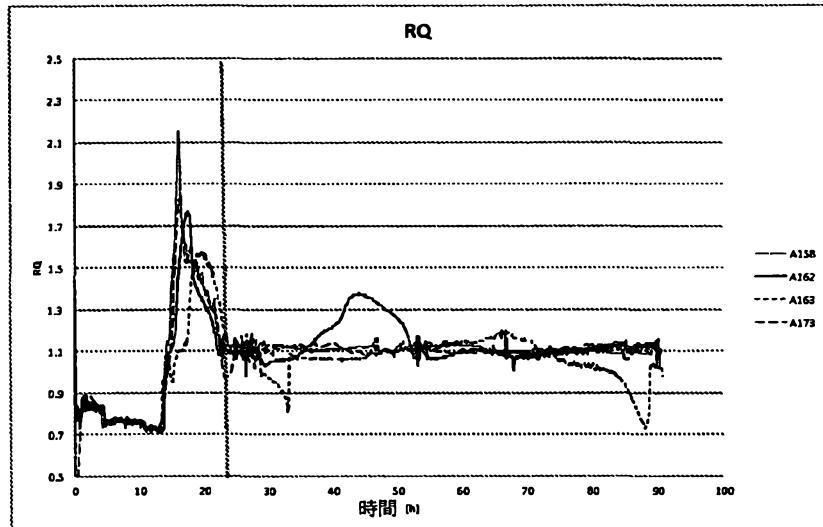


圖17：4種不同的mAb2抗體菌株A、B、C & D於20L發酵槽內之RQ控制剖面圖

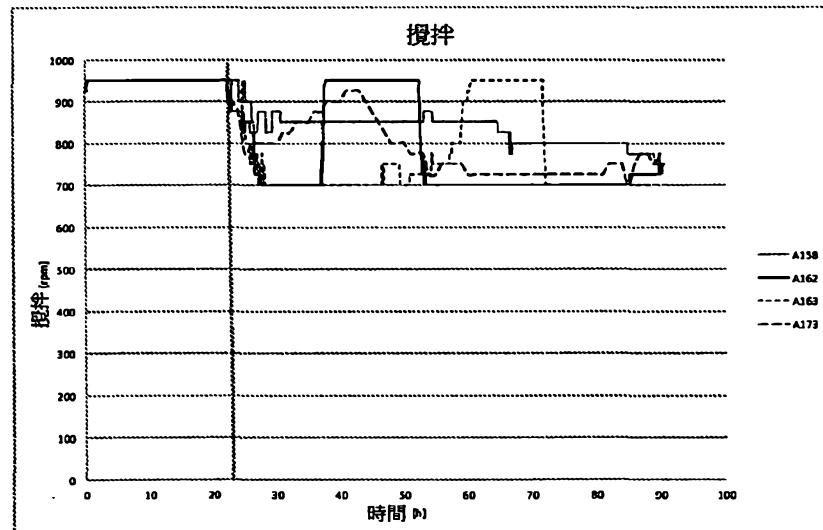


圖18：攪拌剖面圖，該剖面圖表示維持20L發酵槽內4種不同的mAb2抗體菌株A、B、C & D所欲的RQ之攪拌反應

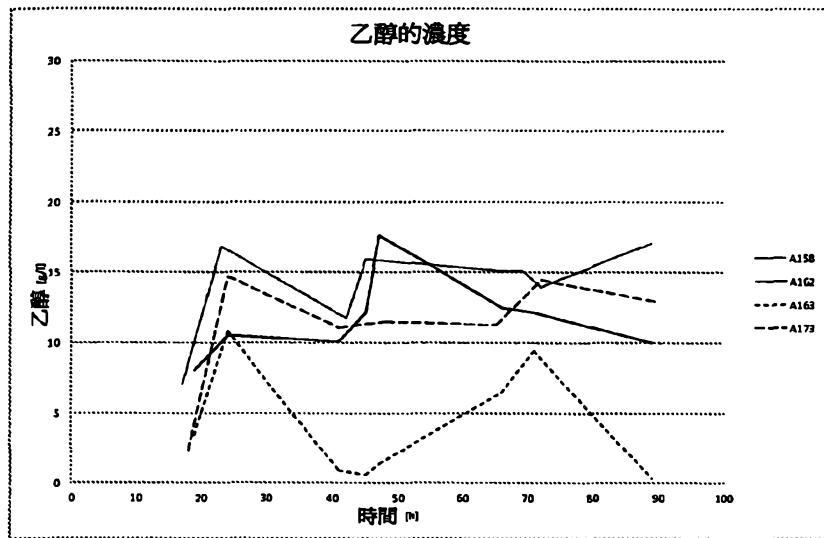


圖19：乙醇濃度剖面圖，該剖面圖表示RQ控制對於維持20L發酵槽內之4種不同的mAb2抗體菌株A、B、C & D於非毒性乙醇位準的效用

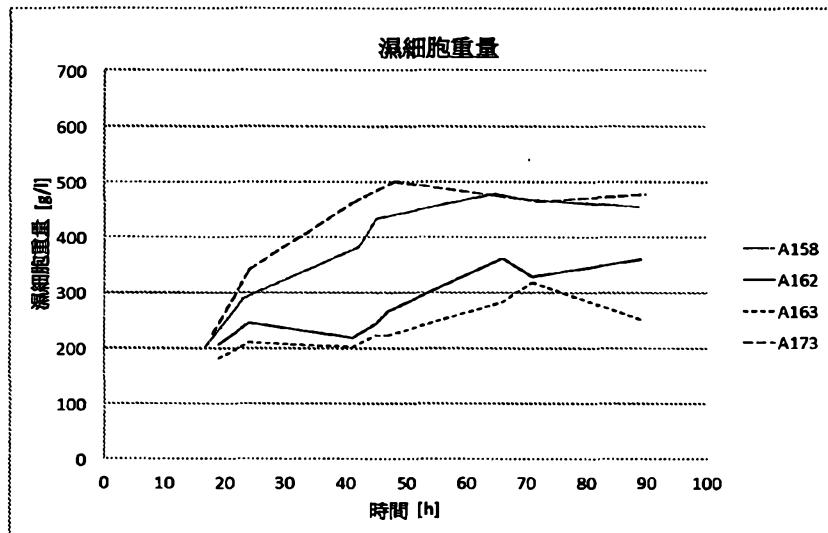


圖20：細胞生長剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之4種不同的mAb2抗體菌株A、B、C & D於細胞生長的差異

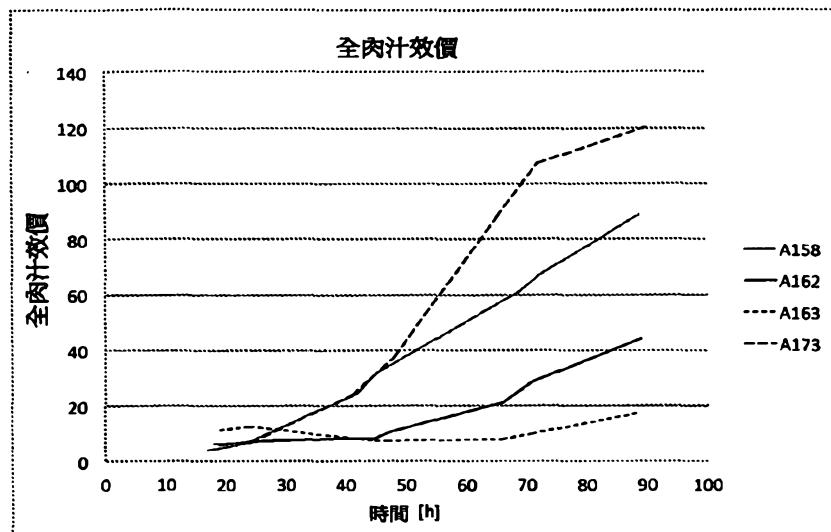


圖21：全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之4種不同的mAb2抗體菌株A、B、C & D的產物表現

mAb3**3種菌株**

A225 = mAb3菌株A進料速率 = 9g/l/hr, 11g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15

A227 = mAb3菌株B進料速率 = 9g/l/hr, 11g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15

A234 = mAb3菌株C進料速率 = 9g/l/hr, 11g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15

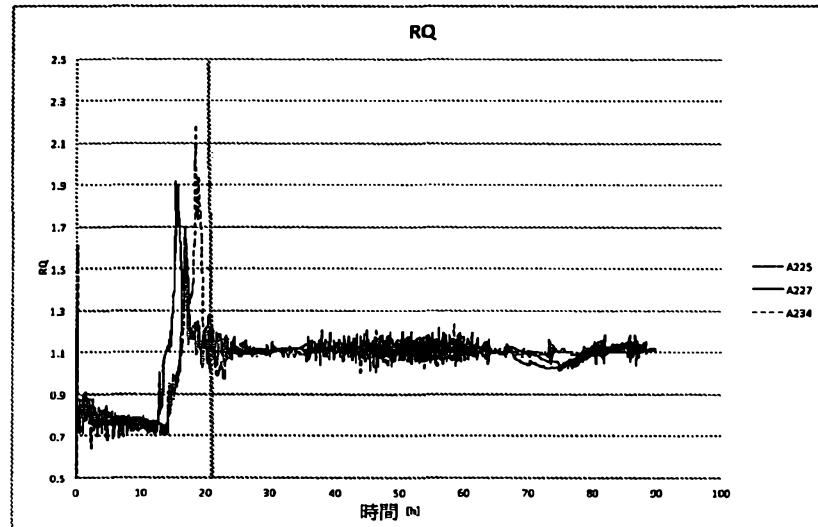


圖22：20L發酵槽內之3種不同的mAb3抗體菌株A、B & C之RQ控制剖面圖

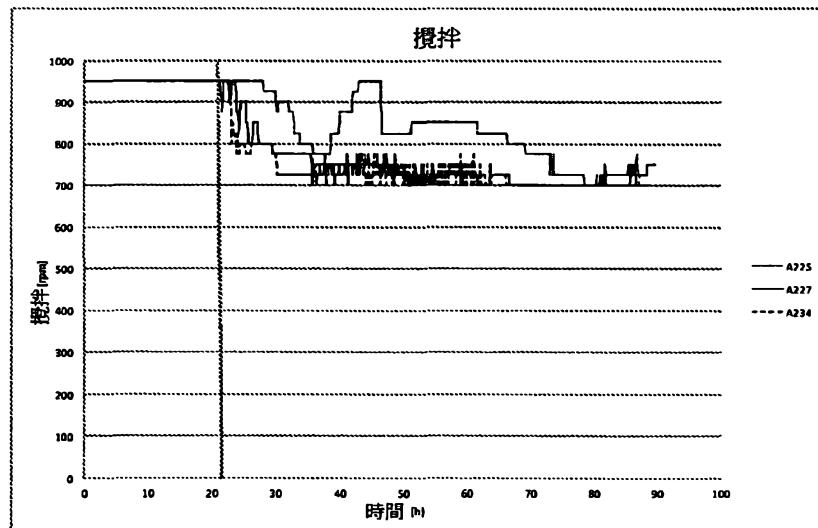


圖23：攪拌剖面圖，該剖面圖表示維持20L發酵槽內之3種不同的mAb3抗體菌株A、B & C所欲的RQ之攪拌反應

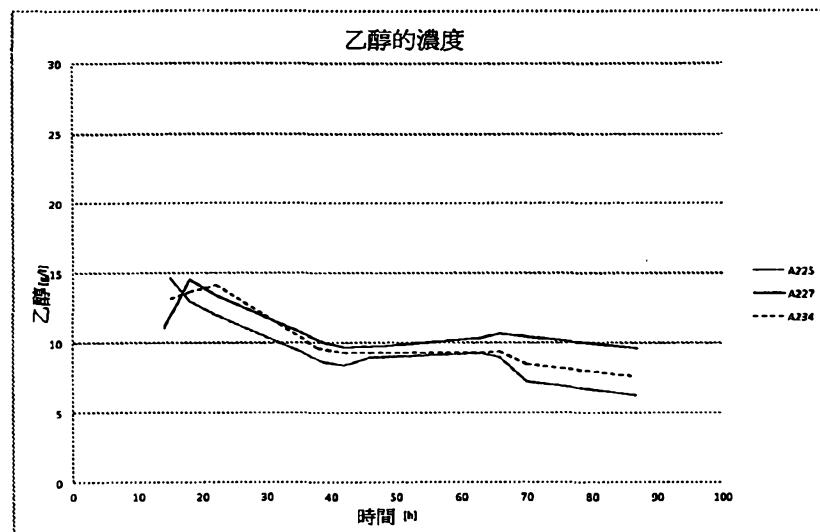


圖24：乙醇濃度剖面圖，該剖面圖表示RQ對於20L發酵槽內之3種不同的mAb3抗體菌株A、B & C之效用

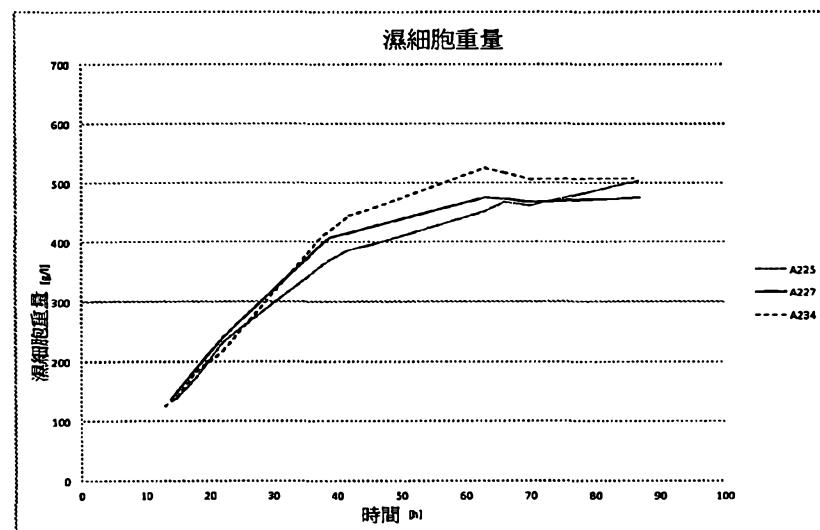


圖25：細胞生長剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之3種不同的mAb3抗體菌株A、B & C於細胞生長的相似性

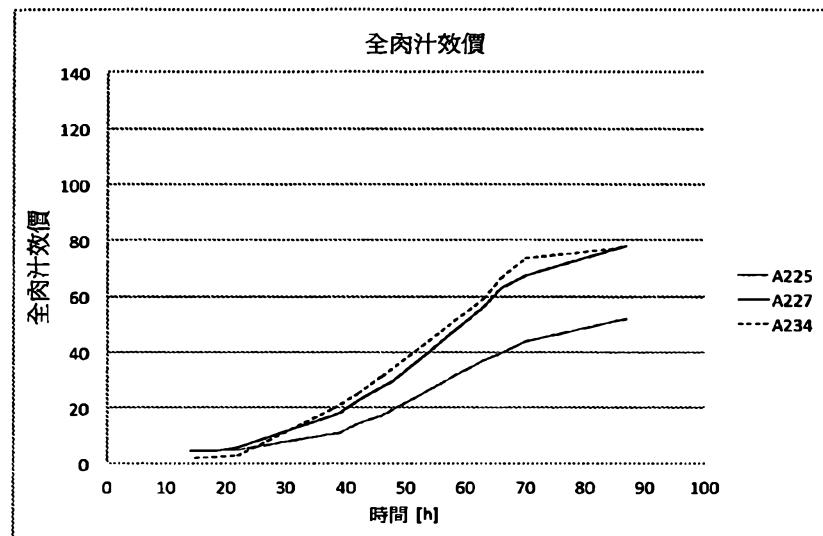


圖26：全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之3種不同的抗mAb3抗體菌株A、B & C的產物表現

mAb3**4種進料速率**

A226 = mAb3菌株B進料速率 = 9 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15
 A230 = mAb3菌株B進料速率 = 11 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15
 A235 = mAb3菌株B進料速率 = 6 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15
 A238 = mAb3菌株B進料速率 = 7 g/l/hr, 11 g/l Etoh推注, RQ = 1.09 - 1.15

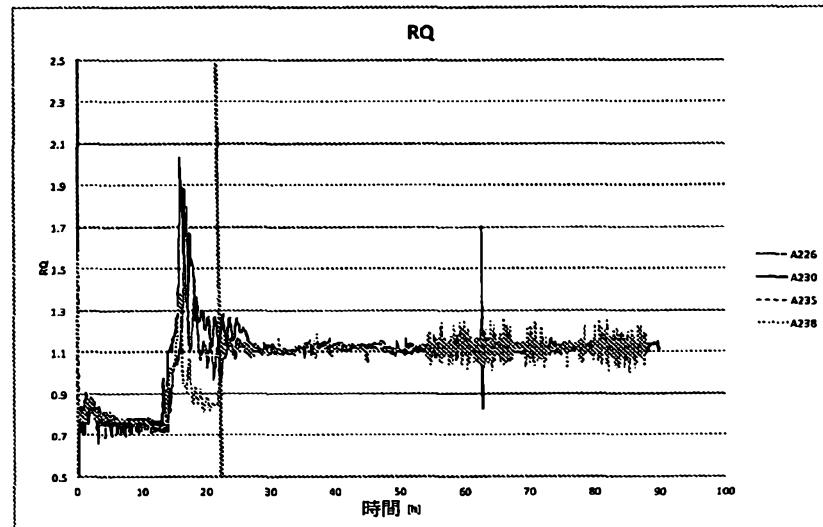


圖27：20L發酵槽內之4種不同的進料速率之mAb3抗體菌株B之RQ控制剖面圖

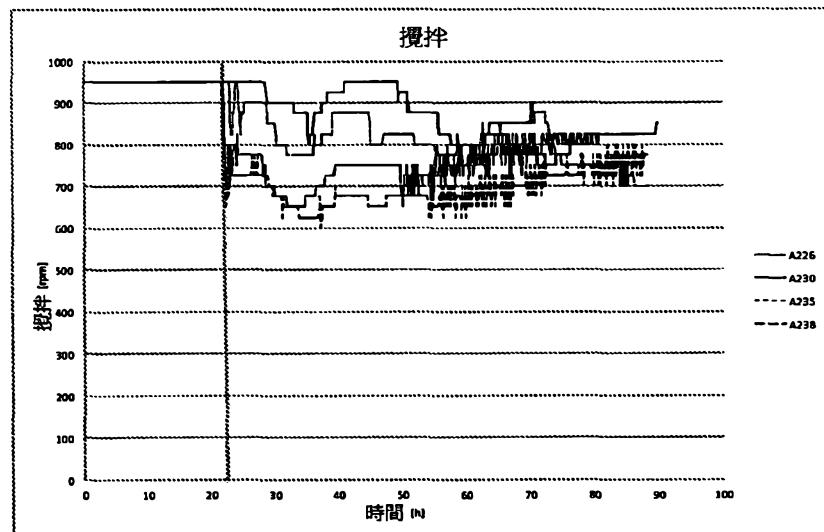


圖28：4種不同的進料速率之攪拌剖面圖，該剖面圖表示維持mAb3抗體菌株B所欲的RQ之攪拌反應

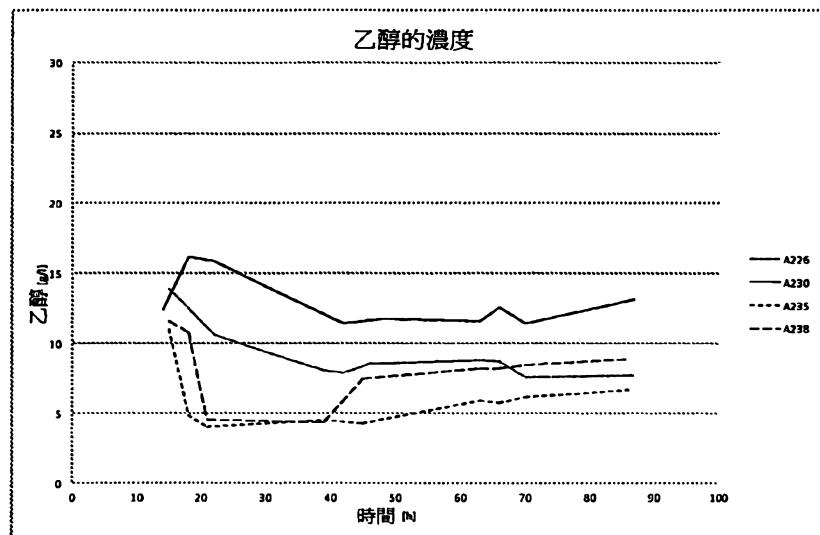


圖29：4種不同的進料速率之乙醇濃度剖面圖，該剖面圖表示RQ對於20L發酵槽內之mAb3抗體菌株B的效用

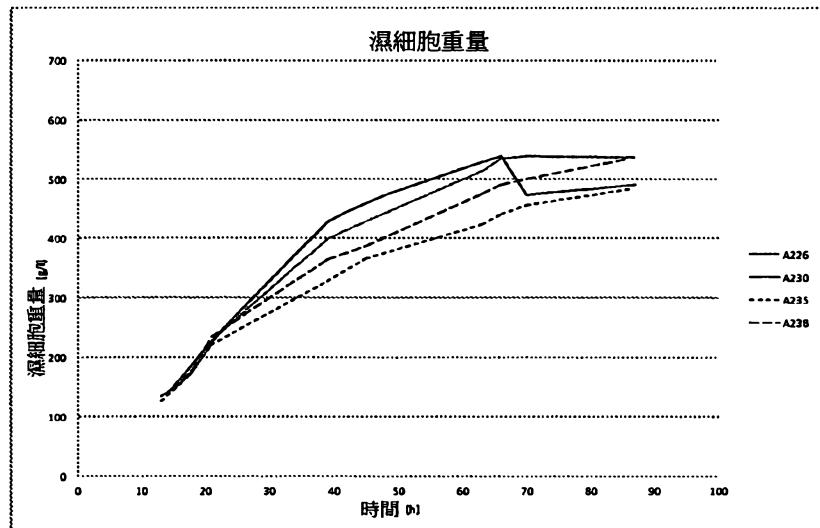


圖30：4種不同的進料速率之細胞生長剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之mAb3抗體菌株B的細胞生長

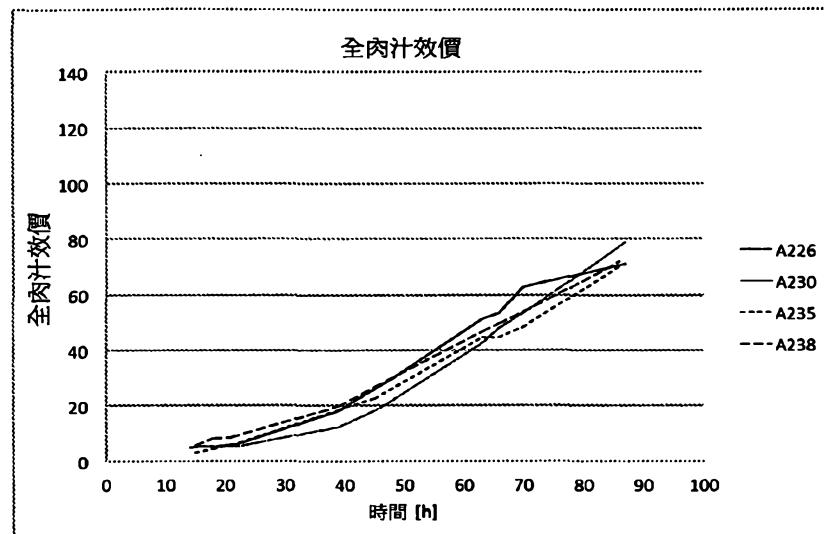


圖31：4種不同的進料速率之全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示20L發酵槽內之mAb3抗體菌株B的產物表現

mAb4**2種進料速率**

A197 = mAb4菌株A進料速率 = 13 g/l/hr, RQ = 1.09 - 1.15, 無Etoh推注

A198 = mAb4菌株A進料速率 = 11 g/l/hr, RQ = 1.09 - 1.15, 無Etoh推注

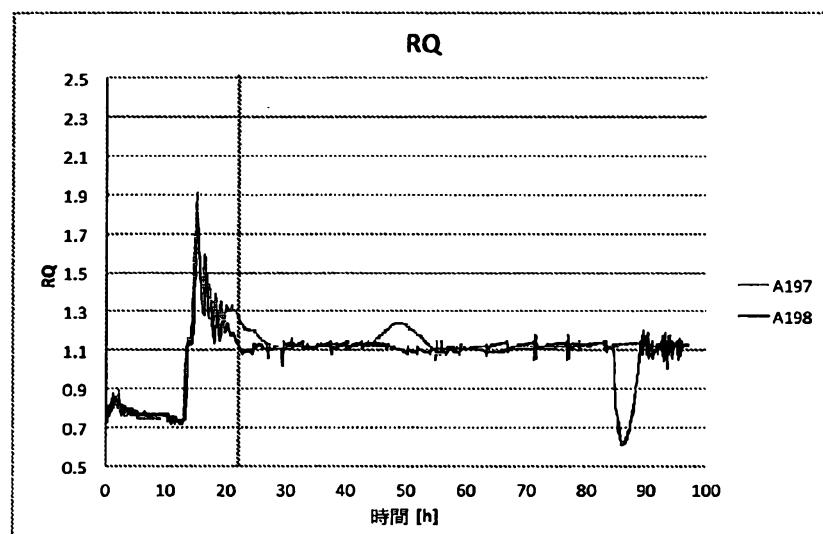


圖32：於CDR區域具有不同的序列之mAb4抗體菌株A、以不同的進料速率於20L發酵槽內之RQ控制剖面圖

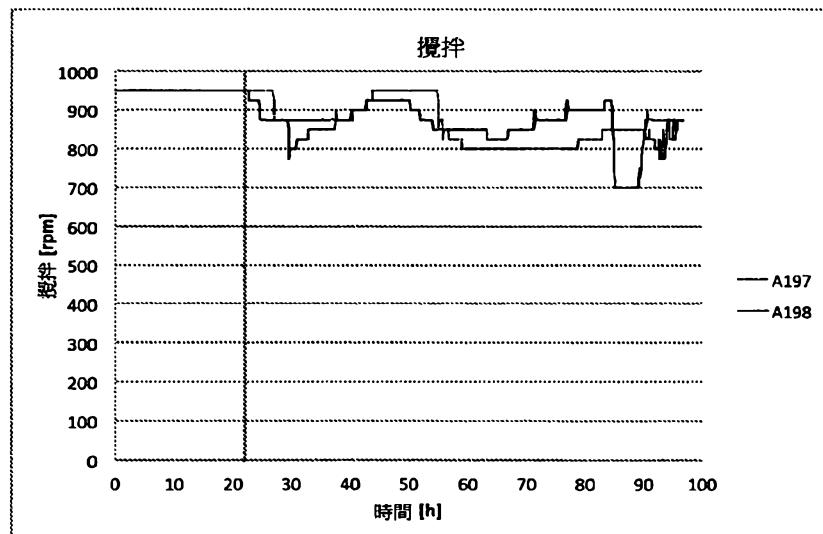


圖33：攪拌剖面圖，該剖面圖表示不同的進料速率、對於CDR區域具有不同的序列之mAb4抗體菌株A、於20L發酵槽內維持所欲的RQ之攪拌反應

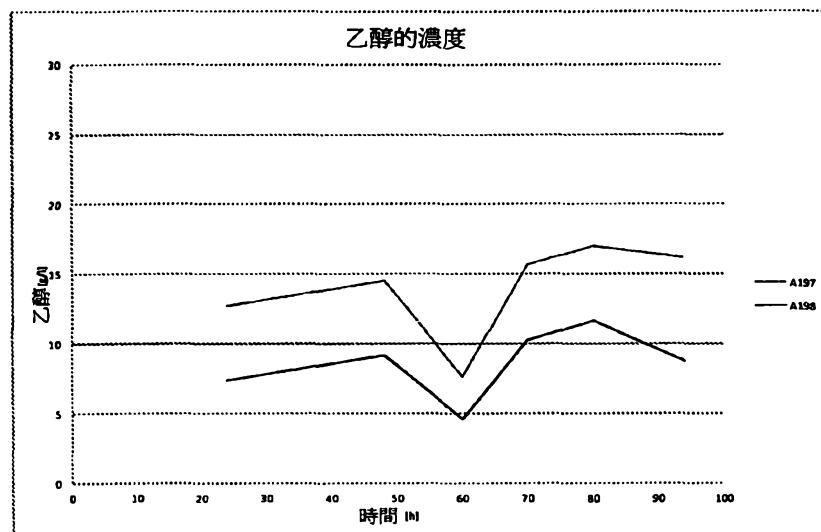


圖34：乙醇濃度剖面圖，該剖面圖表示不同的進料速率對於20L發酵槽內、CDR區域具有不同的序列之mAb4抗體菌株A之效用

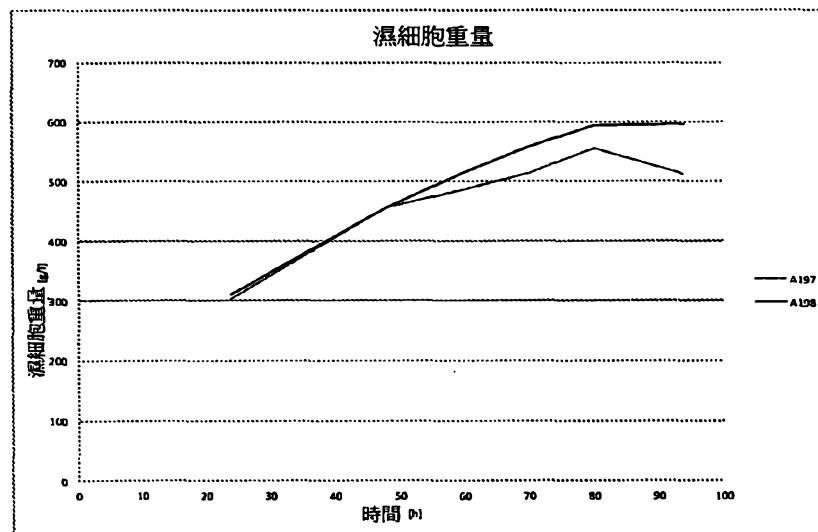


圖35：細胞生長剖面圖，該剖面圖表示不同的進料速率對於20L發酵槽內、CDR區域具有不同的序列之mAb4抗體菌株A的細胞生長

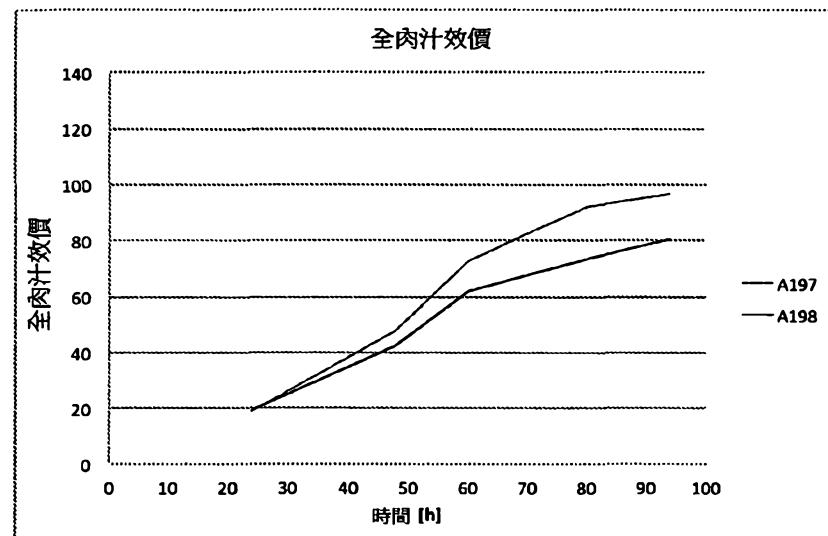


圖36：全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示不同的進料速率對於20L發酵槽內、CDR區域具有不同的序列之mAb4抗體菌株A的產物表現

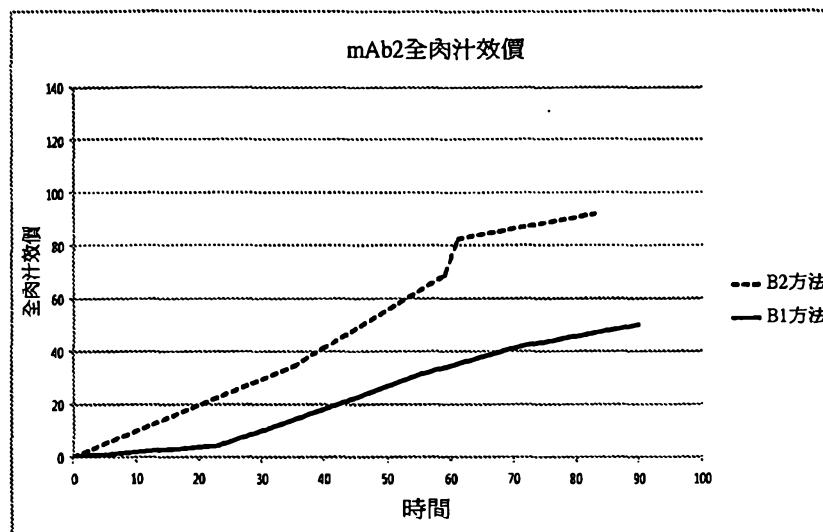
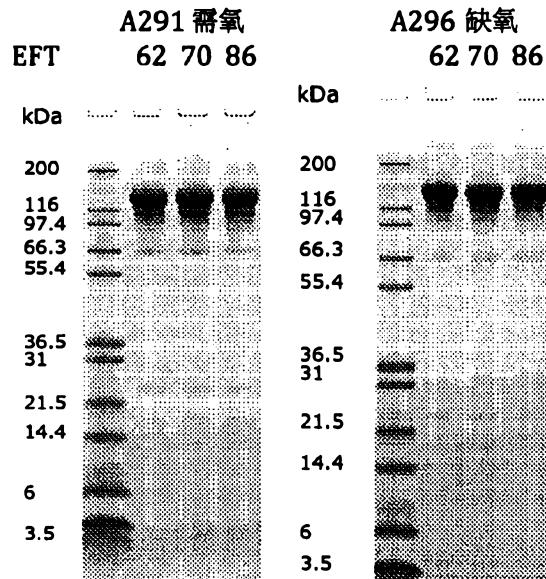


圖37：全肉汁效價剖面圖，該剖面圖表示大規模發酵槽內、
mAb2抗體菌株A需氧發酵的產物表現

於EFT 62、70及86小時時，mAb1菌株A A291 & A296
之非還原及還原SDS-PAGE

需氧vs缺氧

非還原



還原

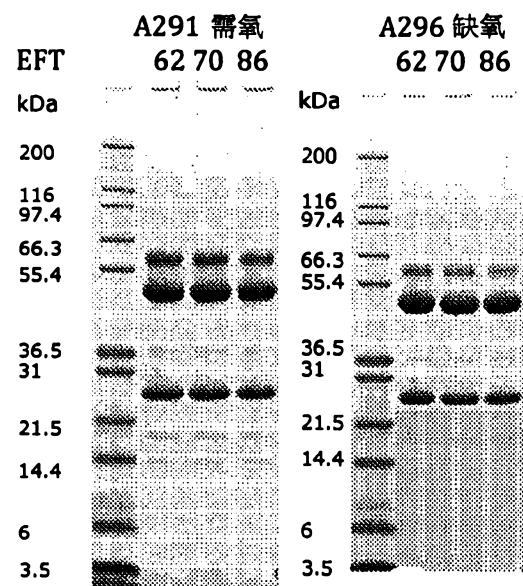


圖38：顯示20L發酵槽內、於3個不同的發酵時間、Mab1抗體菌株A
需氧發酵及缺氧發酵之SDS-PAGE非還原及還原凝膠

於EFT 62、69及85小時時，mAb1菌株A A312
之非還原及還原SDS-PAGE
缺氧

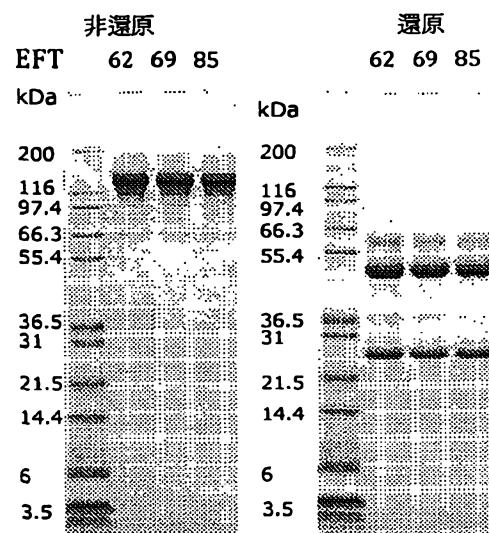
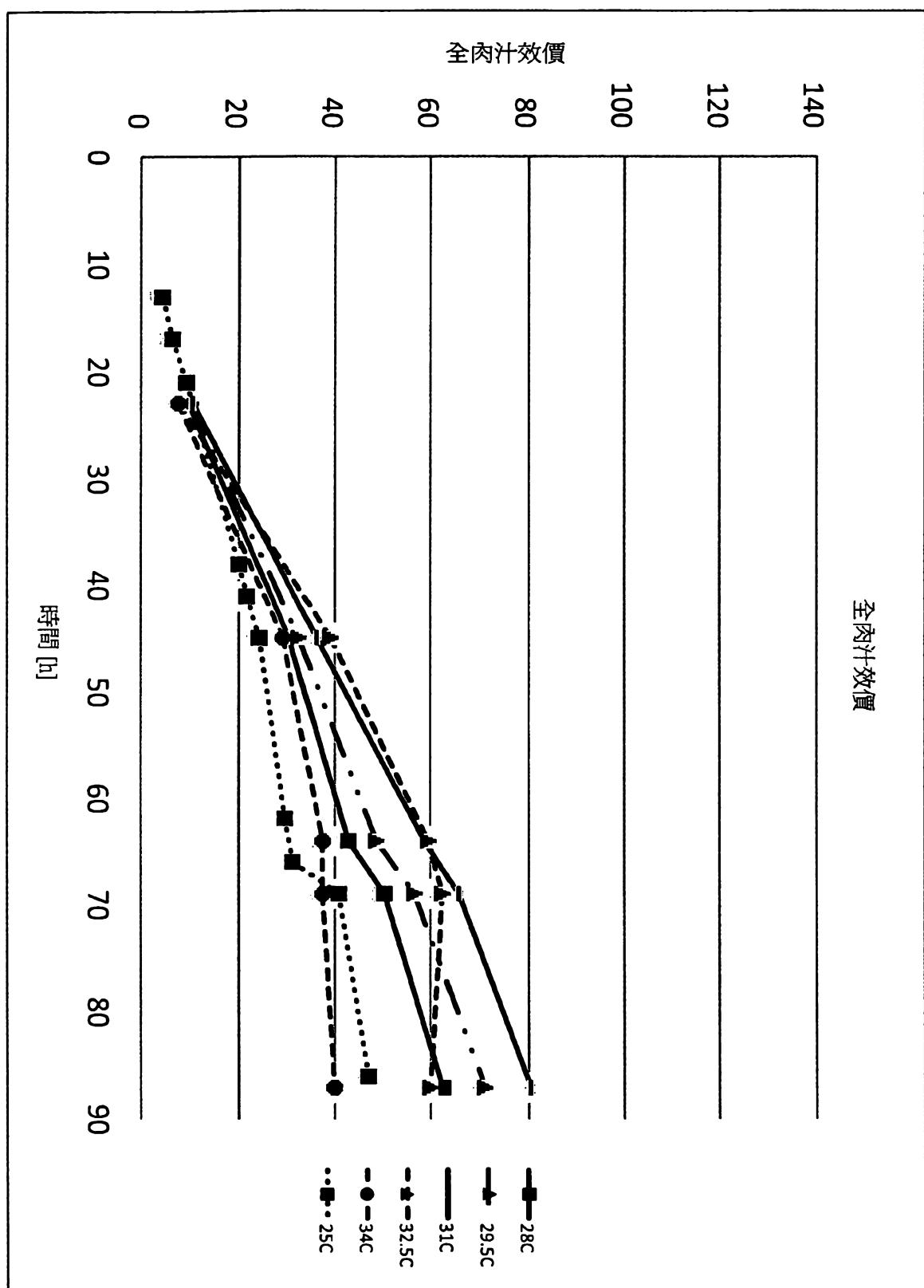


圖39：顯示20L發酵槽內、於3個不同的發酵時間、
Mab1菌株A缺氧發酵之非還原及還原凝膠

圖40：Ab效價由於溫度變動而增加

49



A. 非還原

Temp C	主峰IC	前峰HHL	75kD HL	總計
25	86.3	7.1	1.7	95.1
28	89.0	6.8	1.7	97.5
29.5	88.7	6.8	1.8	97.3
31	88.0	7.5	1.6	97.1
32.5	70.4	7.3	16.3	94.0
34	73.8	7.1	15.0	95.9

B. 還原

Temp C	HC	LC	RT 9.80	RT 10.16	RT 10.80	總計 HC+LC
25	58.2	31.4	1.22	1.08	6.82	89.6
28	59.1	33.0	1.33	1.62	4.30	92.1
29.5	58.2	33.6	1.41	1.45	4.12	91.8
31	62.5	33.3	0.92	0.72	1.95	95.8
32.5	64.0	31.6	0.50	0.23	2.15	95.6
34	64.3	31.8	0.42	0.11	2.07	96.1

圖41：抗體純度 (Ab-A)

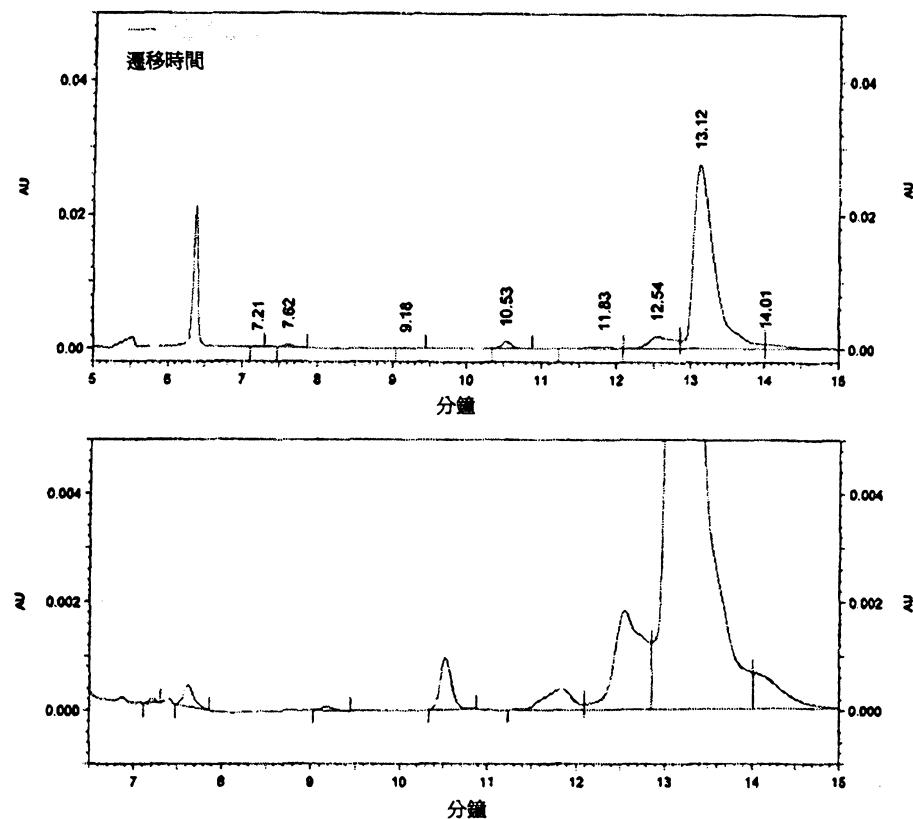


圖42A : Ab-A溫度變動到25°C

PCA - 220nm 結果					
遷移時間	高度	Corr.面積	MW	Corr.面積	%
7.21	75.00	17.11	13.8690	0.11	
7.62	388.00	140.70	22.8300	0.87	
9.18	63.00	22.42	57.0290	0.14	
10.53	962.00	272.18	86.6560	1.69	
11.83	387.00	244.51	115.3690	1.52	
12.54	1831.00	1142.67	130.9140	7.09	
13.12	27504.00	13912.96	143.5330	86.32	
14.01	677.00	364.54	163.1010	2.26	
總數		16117.09		100.00	

圖42B : Ab-A溫度變動到25°C

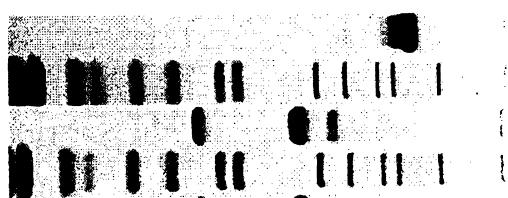
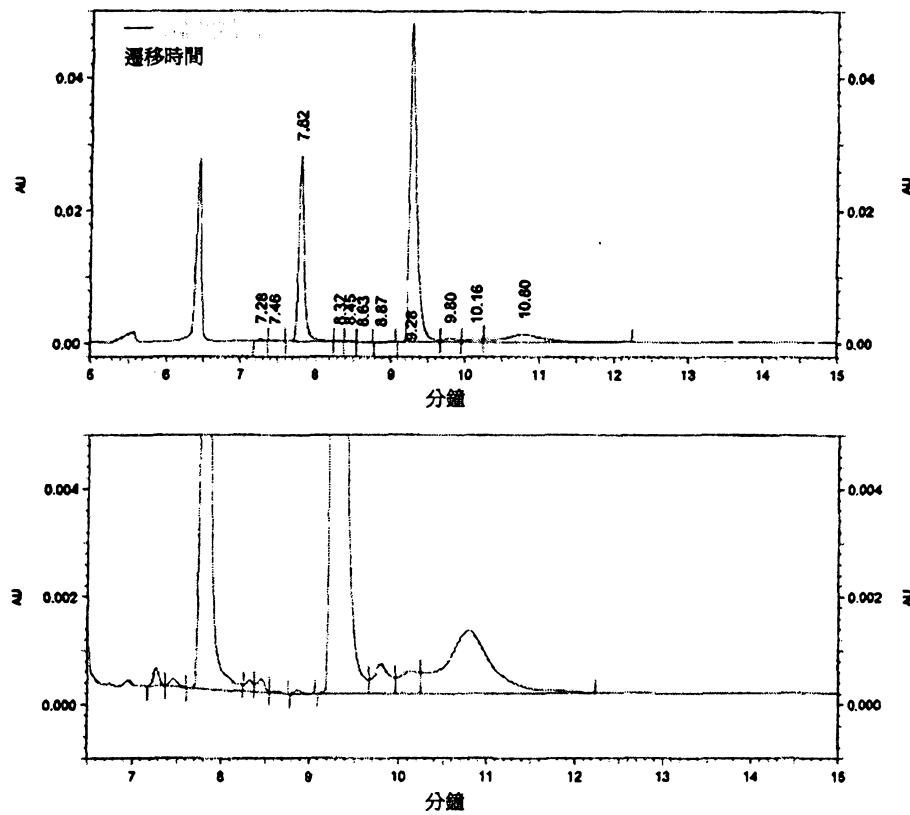


圖42C : Ab-A溫度變動到25°C



PDA - 220nm結果 遷移時間	高度	Corr.面積	MM	Corr.面積 %
7.28	336.00	66.16	15.3320	0.34
7.46	149.00	39.69	19.3550	0.20
7.82	27960.00	6196.46	27.2190	31.39
8.32	214.00	51.05	38.3750	0.26
8.45	246.00	60.55	41.1180	0.31
8.63	43.00	12.87	44.9590	0.07
8.87	68.00	15.98	50.2620	0.08
9.28	47929.00	11494.23	59.2240	58.23
9.80	562.00	241.12	70.7450	1.22
10.16	411.00	213.81	78.6090	1.08
10.80	1168.00	1346.39	92.6910	6.82

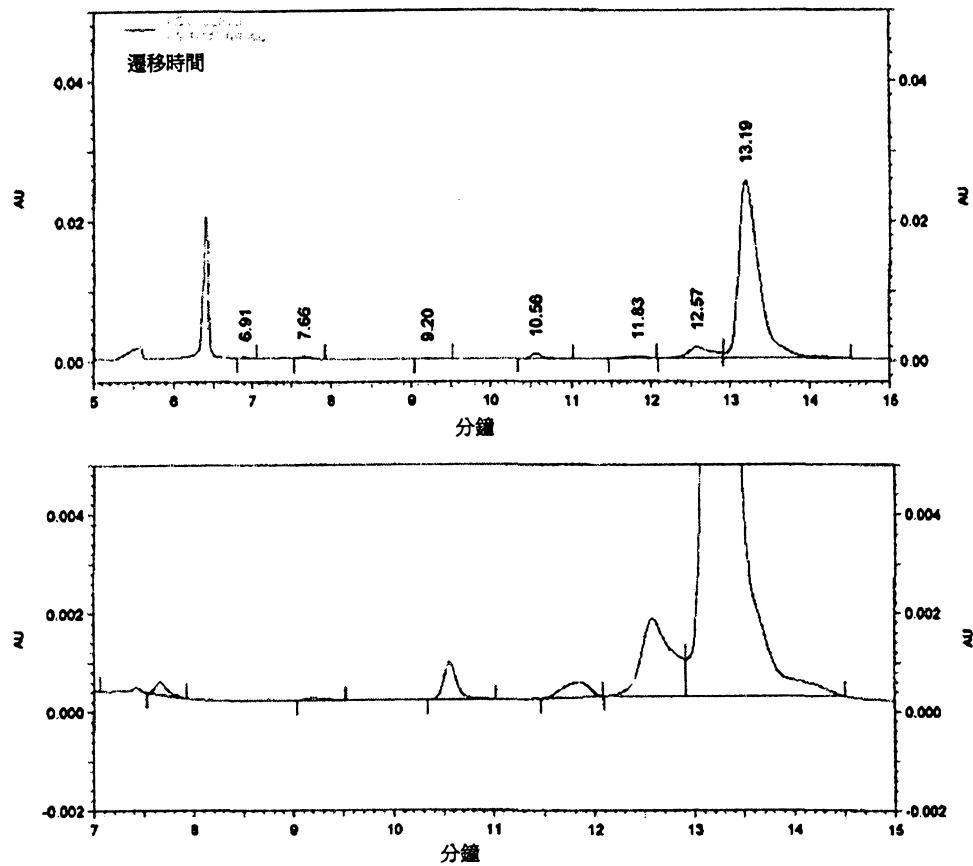


圖43A : Ab-A維持在28°C(沒有變動)

PDA - 220nm 結果					
遷移時間	高度	Corr. 面積	MW	Corr. 面積 %	
6.91	102.00	25.33	6.2750	0.20	
7.66	256.00	91.58	22.9190	0.71	
9.20	55.00	28.66	57.1340	0.22	
10.56	756.00	223.99	87.2790	1.74	
11.83	302.00	159.75	115.5750	1.24	
12.57	1567.00	883.18	132.0350	6.85	
13.19	25371.00	11475.35	145.7210	89.04	
總數		12887.84		100.00	

圖43B : Ab-A維持在28°C(沒有變動)

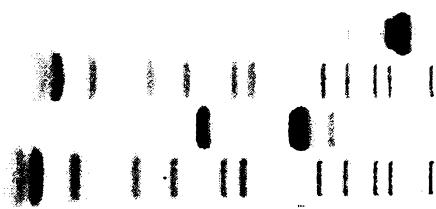
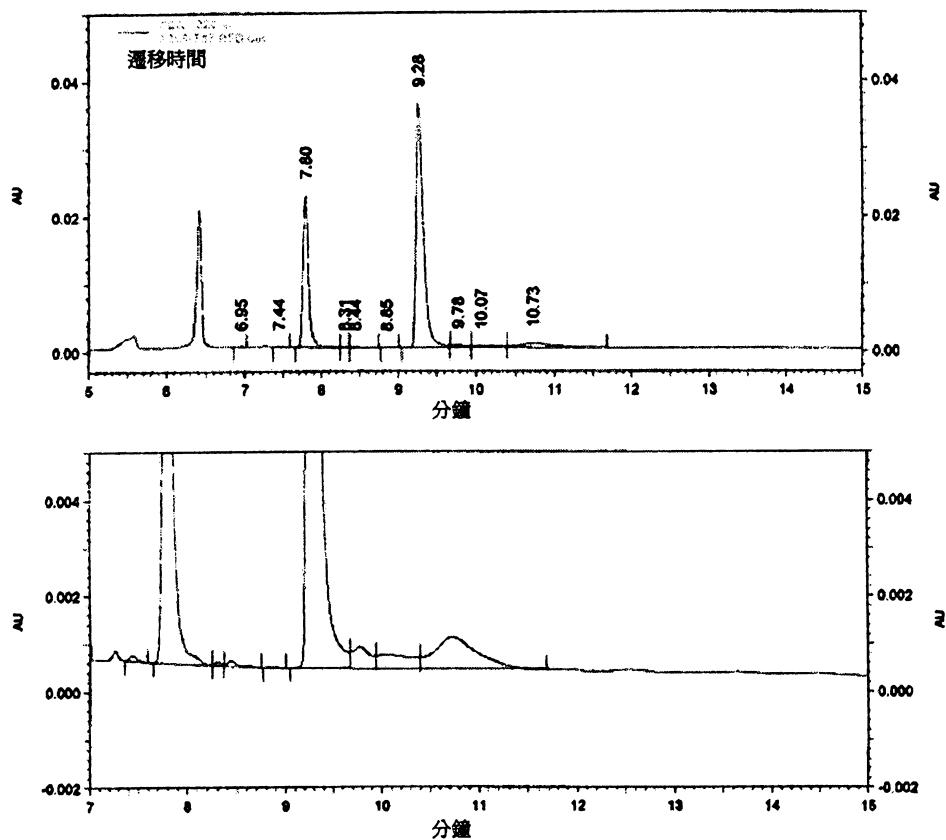


圖43C : Ab-A維持在28°C (沒有變動)



PDA - 220nm 結果 遷移時間	高度	Corr. 面積	MW	Corr 面積 %
6.95	91.00	18.37	7.1990	0.13
7.44	119.00	31.22	18.1110	0.21
7.80	22575.00	4793.29	26.0630	32.96
8.31	76.00	15.37	37.3450	0.13
8.44	107.00	30.92	40.3040	0.21
8.85	29.00	6.78	49.3660	0.05
9.28	36114.00	8590.87	58.7980	59.08
9.78	452.00	193.38	69.8950	1.33
10.07	292.00	236.23	76.3680	1.62
10.73	657.00	624.96	90.9780	4.30

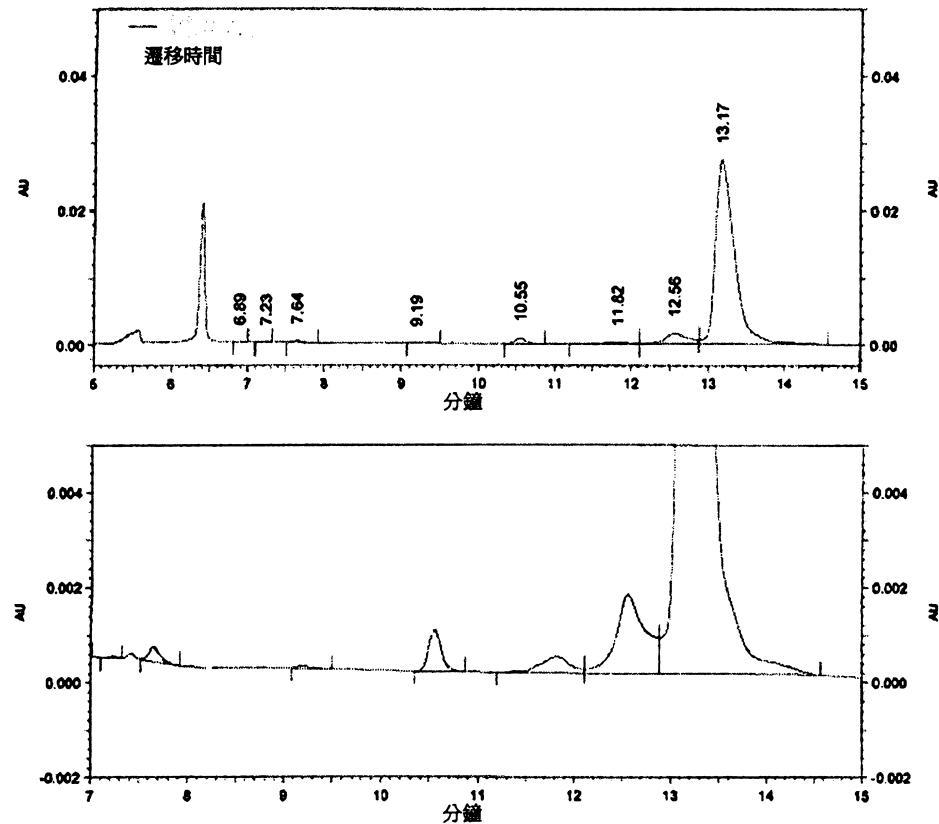
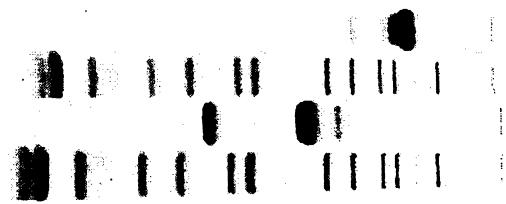


圖44A : Ab-A溫度變動到29.5°C

PDA - 220nm 結果		高度	Corr.面積	MW	Corr.面積 %
遷移時間					
6.89	71.00	17.70	5.9050	0.13	
7.23	33.00	7.79	13.4870	0.06	
7.64	298.00	104.78	22.5500	0.76	
9.19	54.00	21.25	56.9490	0.15	
10.55	878.00	242.53	87.0940	1.76	
11.82	341.00	215.35	115.2060	1.56	
12.56	1666.00	946.94	131.6650	6.85	
13.17	27470.00	12259.04	145.1660	88.73	
總數		13815.37		100.00	

圖44B : Ab-A溫度變動到29.5°C



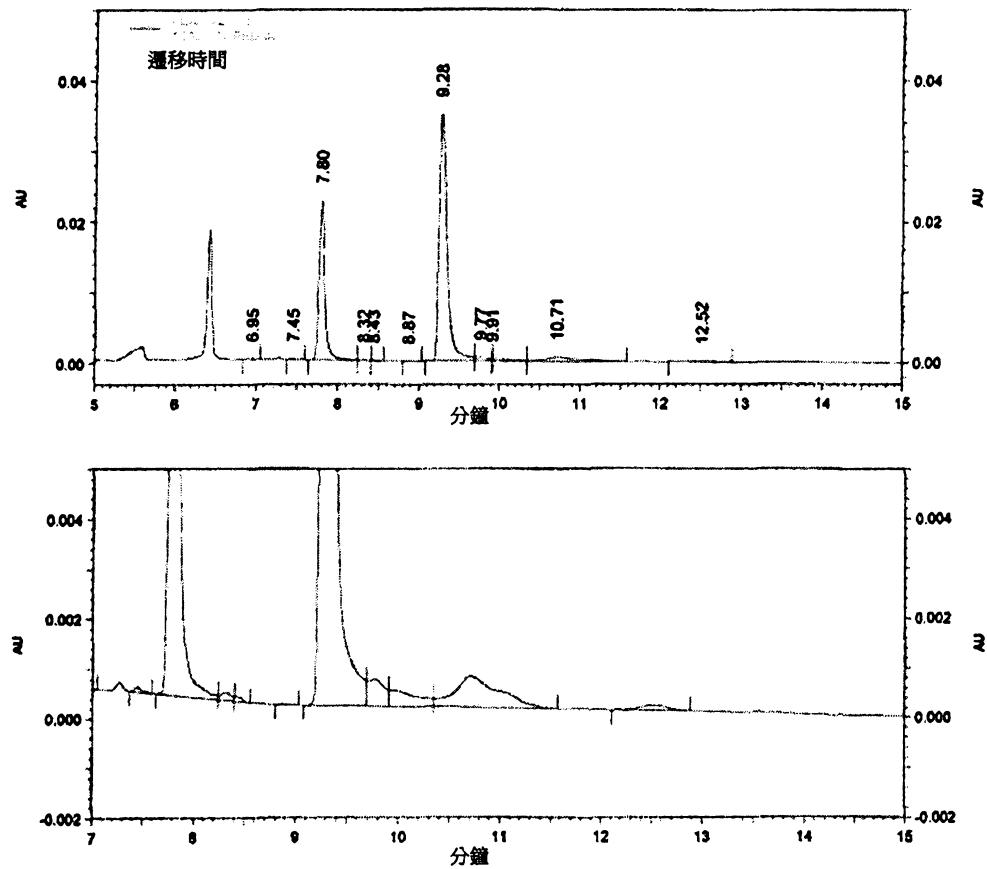


圖44C : Ab-A溫度變動到29.5°C

PDA - 220nm結果 遷移時間	高度	Corr.面積	MM	Corr.面積 %
6.95	95.00	22.73	7.1990	0.16
7.45	98.00	25.32	18.2960	0.17
7.80	22573.00	4874.79	26.0630	33.60
8.32	166.00	45.73	37.5300	0.32
8.43	102.00	18.54	40.1190	0.13
8.87	24.00	6.24	49.7360	0.04
9.28	34967.00	8446.43	58.7980	58.22
9.77	539.00	205.26	69.7100	1.41
9.91	324.00	209.69	72.8540	1.45
10.71	614.00	598.26	90.6080	4.12
12.52	96.00	55.29	130.7410	0.38

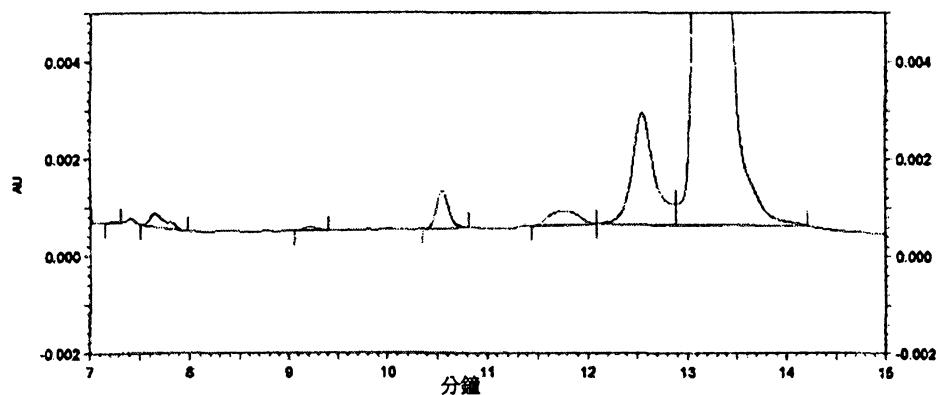
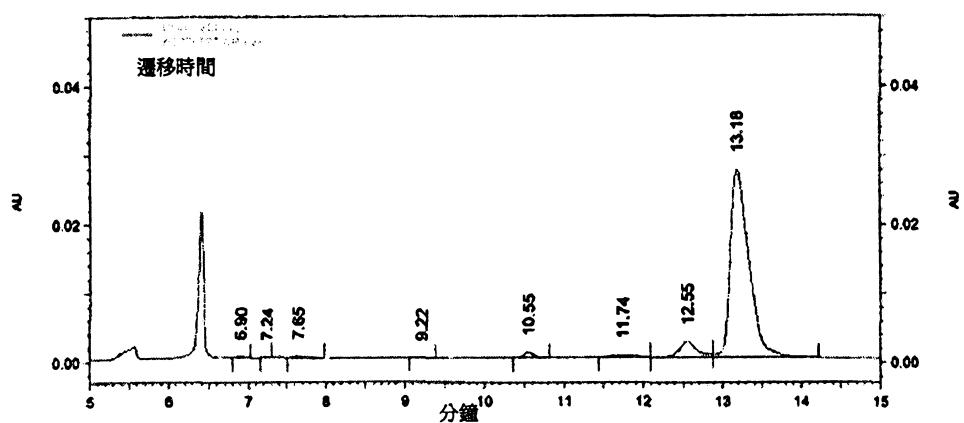
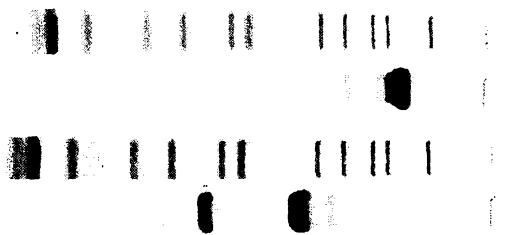


圖45A : Ab-A溫度變動到31°C

PDA - 220nm 結果 遷移時間	高度	Corr. 面積	MW	Corr. 面積 %
6.90	187.00	41.64	6.0900	0.32
7.24	41.00	8.29	13.6720	0.06
7.65	272.00	133.81	22.7350	1.04
9.22	73.00	22.86	57.5040	0.18
10.55	775.00	209.42	87.0940	1.63
11.74	281.00	168.03	113.5410	1.31
12.55	2291.00	957.95	131.4800	7.47
13.18	27176.00	11284.35	145.5360	87.98
總數		12826.35		100.00

圖45B : Ab-A溫度變動到31°C



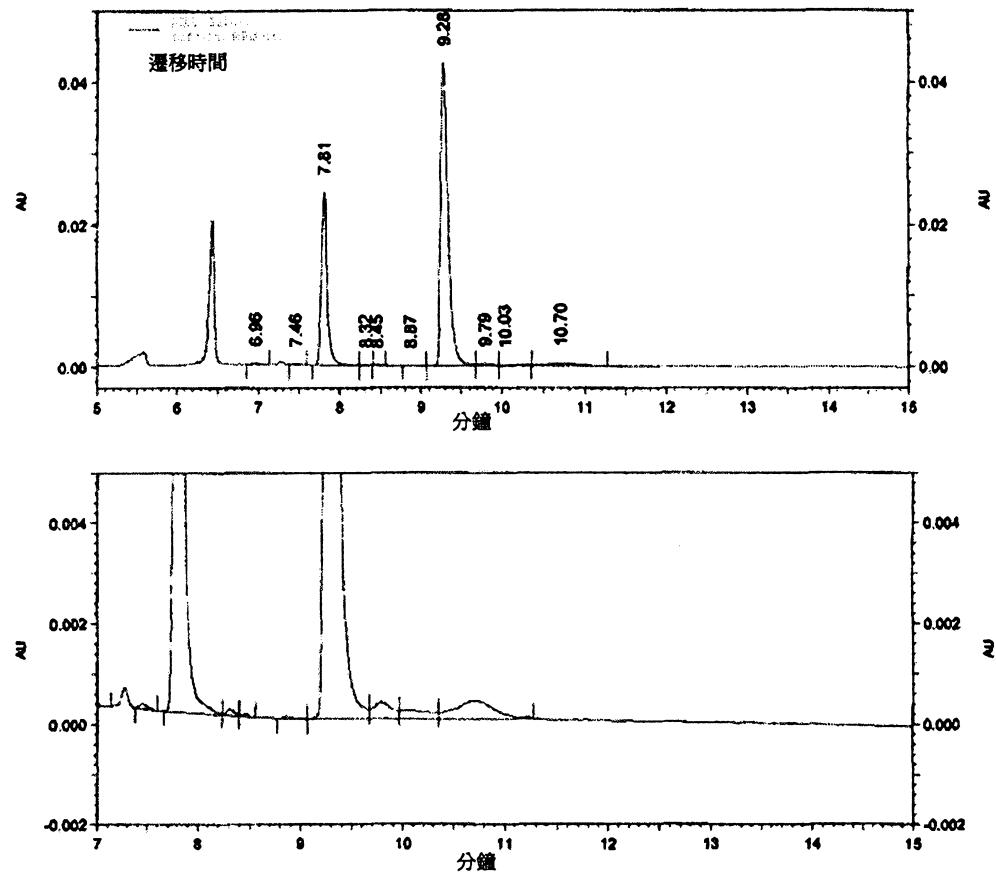


圖45C : Ab-A溫度變動到31°C

PDA - 220nm 結果		高度	Corr. 面積	MW	Corr. 面積 %
遷移時間	6.96	200.00	45.17	7.3840	0.28
	7.46	105.00	27.89	18.4810	0.17
	7.81	24321.00	5280.68	26.2480	33.12
	8.32	132.00	30.02	37.5300	0.19
	8.45	61.00	12.23	40.4890	0.08
	8.87	43.00	11.13	49.7360	0.07
	9.28	42518.00	9966.57	58.9830	62.50
	9.79	336.00	146.35	70.2650	0.92
	10.03	176.00	115.28	75.6280	0.72
	10.70	360.00	310.84	90.4230	1.95

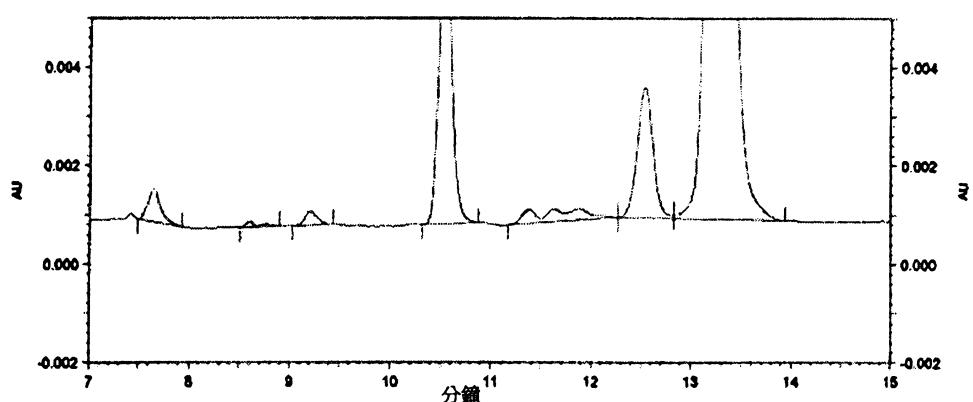
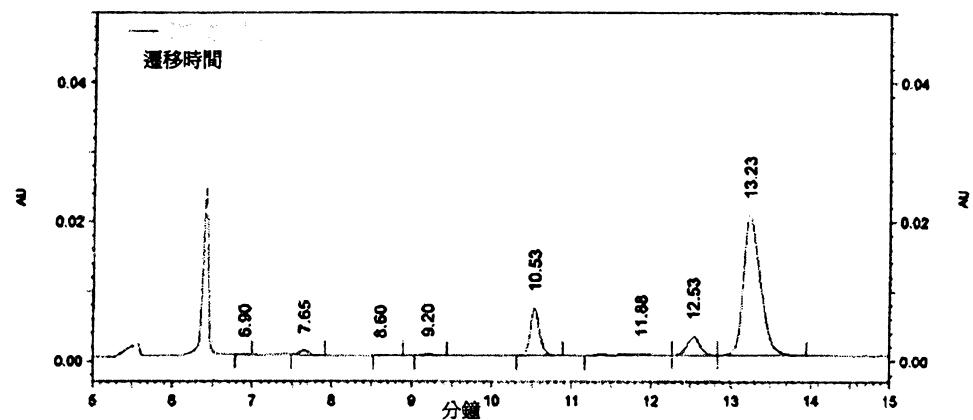
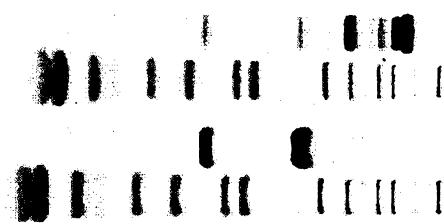


圖46A : Ab-A溫度變動到32.5°C

PDA - 220nm 結果 遷移時間	高度	Corr. 面積	MM	Corr 面積 %
6.90	110.00	27.10	6.0900	0.25
7.65	687.00	255.34	22.7350	2.37
8.60	111.00	31.86	43.8180	0.30
9.20	280.00	90.07	57.1340	0.83
10.53	6788.00	1759.15	86.7240	16.30
11.88	223.00	245.22	116.5000	2.27
12.53	2665.00	785.45	131.1110	7.28
13.23	20119.00	7600.18	146.6460	70.41
總數		10794.37		100.00

圖46B：Ab-A溫度變動到32.5°C



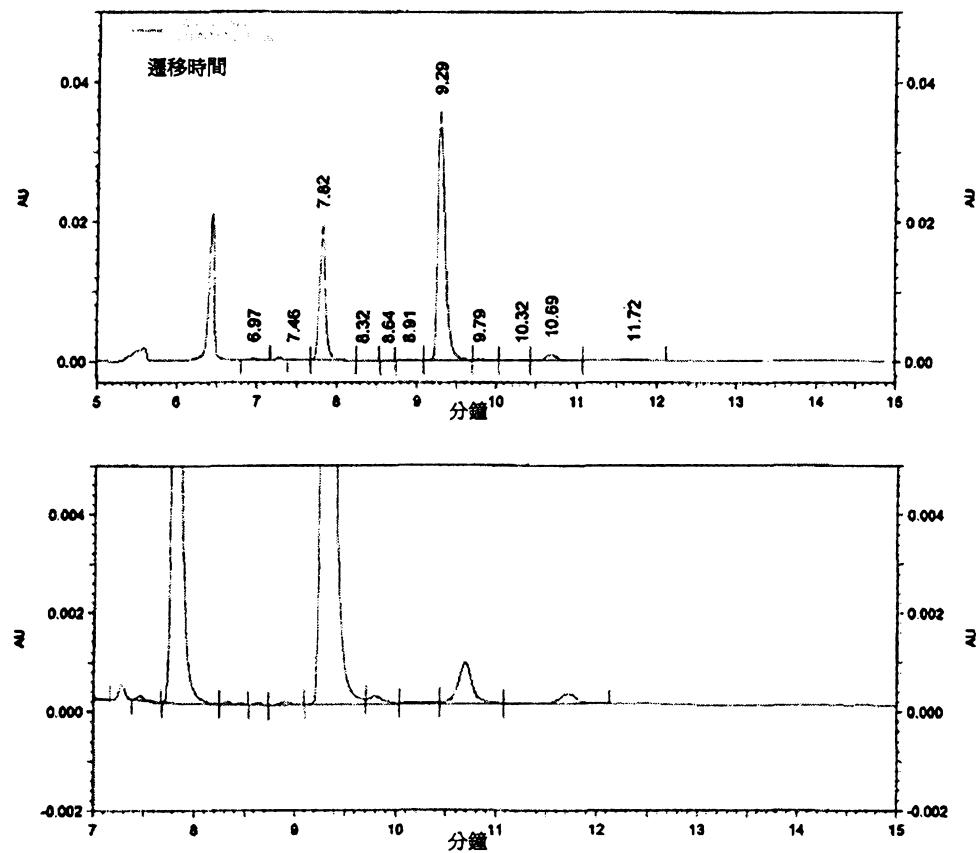


圖46C : Ab-A溫度變動到32.5°C

PDA - 220nm 結果 遷移時間	高度	Corr. 面積	MW	Corr 面積
6.97	151.00	48.28	7.5690	0.38
7.46	95.00	24.09	18.4810	0.19
7.82	19330.00	4068.27	26.4330	31.61
8.32	48.00	16.26	37.7150	0.13
8.64	53.00	9.10	44.7430	0.07
8.91	64.00	20.21	50.6610	0.16
9.29	35646.00	8229.99	59.1680	63.95
9.79	173.00	64.37	70.2650	0.50
10.32	49.00	29.73	82.1010	0.23
10.69	841.00	276.54	90.2380	2.15
11.72	204.00	83.02	112.9860	0.65

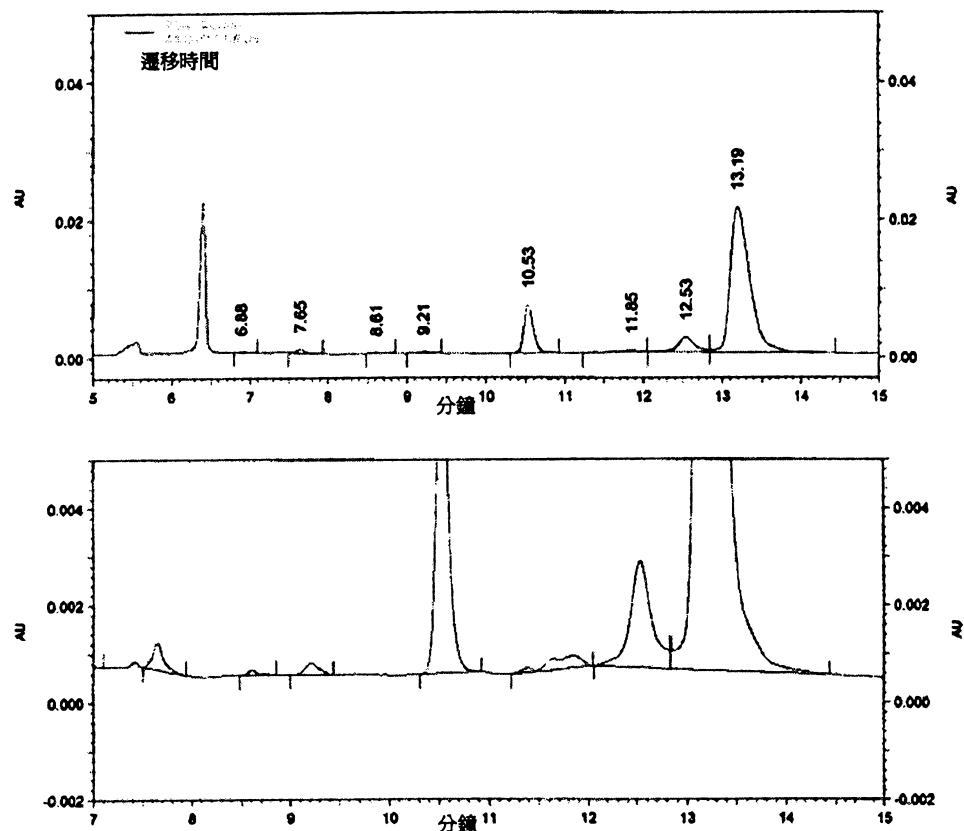
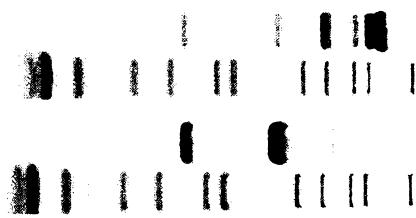


圖47A : Ab-A溫度變動到34°C

PDA · 220nm 結果		高度	Corr. 面積	MW	Corr 面積 %
遷移時間					
6.88	76.00	26.34	5.7200	0.21	
7.65	552.00	191.20	22.7350	1.53	
8.61	103.00	27.69	44.0030	0.22	
9.21	246.00	88.69	57.3190	0.71	
10.53	7037.00	1883.73	86.7240	15.04	
11.85	246.00	173.19	115.9450	1.38	
12.53	2185.00	894.52	131.1110	7.14	
13.19	21120.00	9238.84	145.7210	73.77	
總數		12524.20			100.00

圖47B : Ab-A溫度變動到34°C



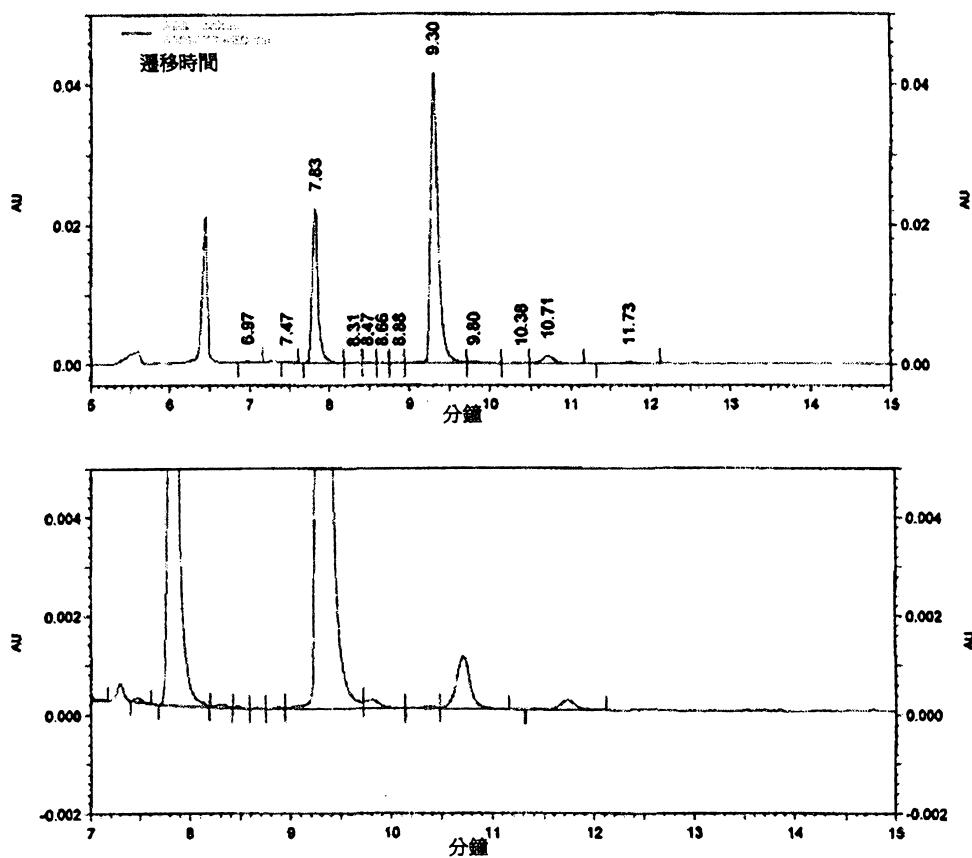
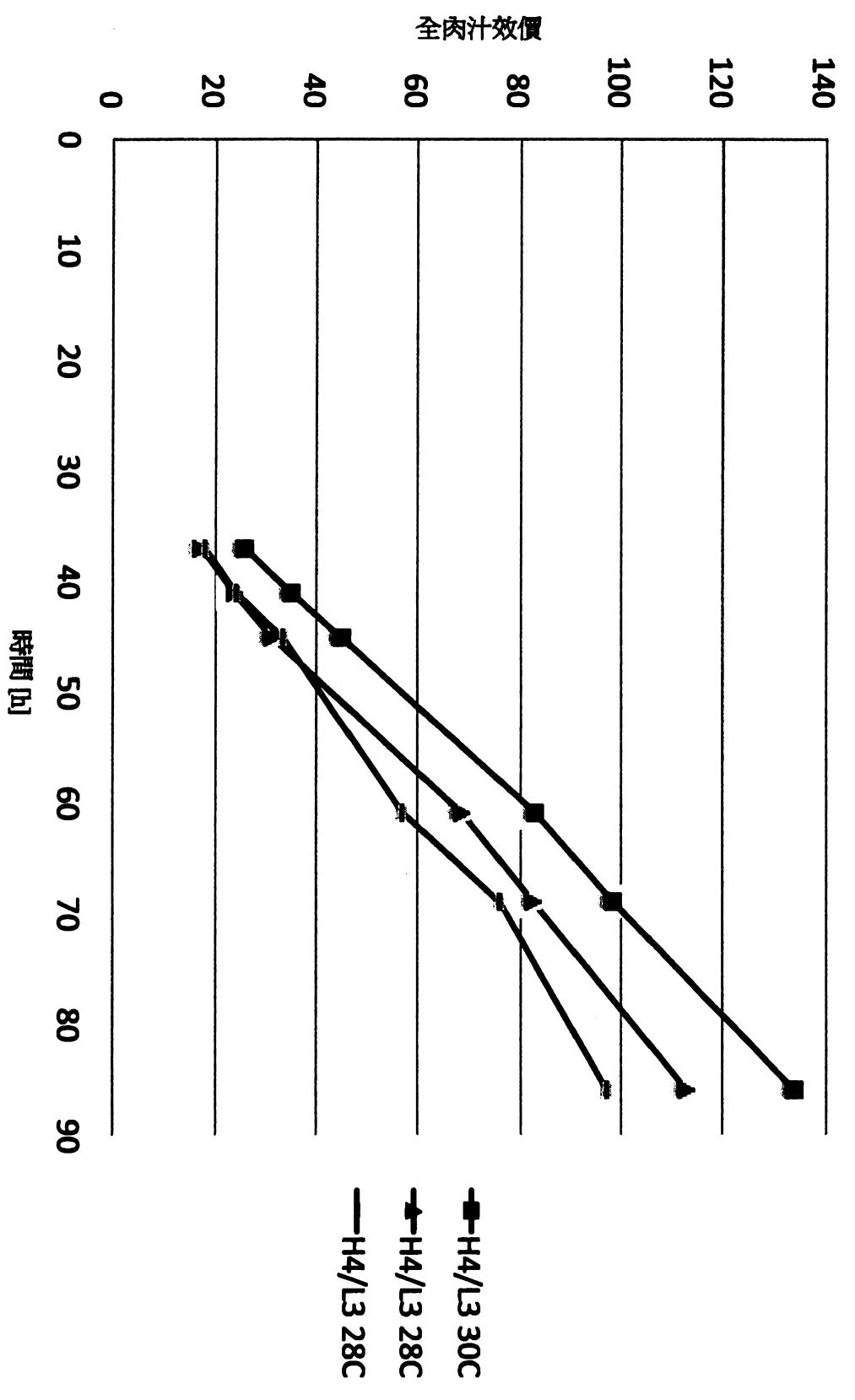


圖47C : Ab-A溫度變動到34°C

PDA - 220nm 結果 遷移時間	高度	Corr. 面積	MW	Corr. 面積
6.97	190.00	54.67	7.7540	0.35
7.47	83.00	21.34	18.6660	0.14
7.83	22192.00	4911.69	26.6180	31.88
8.31	67.00	22.11	37.3450	0.14
8.47	45.00	8.30	41.0440	0.05
8.66	35.00	6.28	45.1130	0.04
8.88	49.00	11.38	49.9210	0.07
9.30	41596.00	9900.22	59.3530	64.26
9.80	183.00	65.37	70.4500	0.42
10.38	51.00	17.24	83.3950	0.11
10.71	1072.00	318.88	90.6080	2.07

圖48：Ab效價由於溫度變動而增加

A. 高表現菌株 (H4/L3)



B. 低表現菌株 (H3/L3)

圖48：Ab效價由於溫度變動而增加

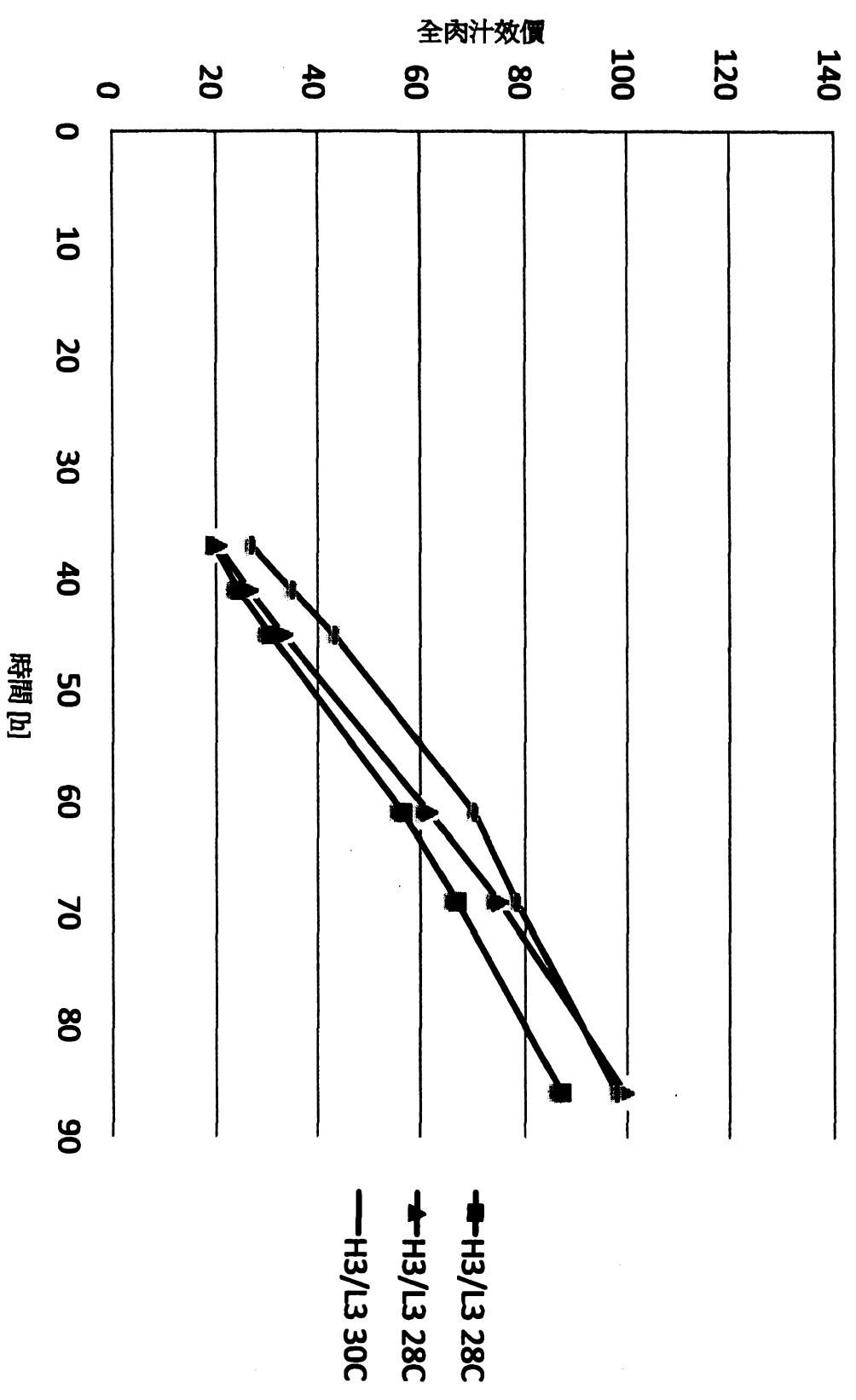


圖49：抗體純度(Ab-B)

67

非還原 TempC	主峰UG	前峰HHL	75kD HL	總計†
28	89.34	3.27	1.52	94.13
28	76.25	7.35	8.00	91.60
30	91.63	2.94	1.44	96.01
30	83.44	4.75	6.15	94.34
28	87.72	3.60	2.15	93.47
28	61.05	4.92	23.14	89.11

還原 TempC	HC	LC	RT 10.15	RT 10.60	RT 11.08	總計†
28	67.67	29.58	0.90	0.00	0.55	97.25
28	63.75	30.62	0.69	0.00	0.53	94.37
30	67.91	29.83	0.82	0.00	0.42	97.74
30	67.20	29.55	1.04	0.00	0.57	96.75
28	67.66	29.50	0.85	0.00	0.71	97.16
28	65.42	29.64	0.89	0.00	0.89	95.06

圖50：Ab效價由於溫度變動而增加

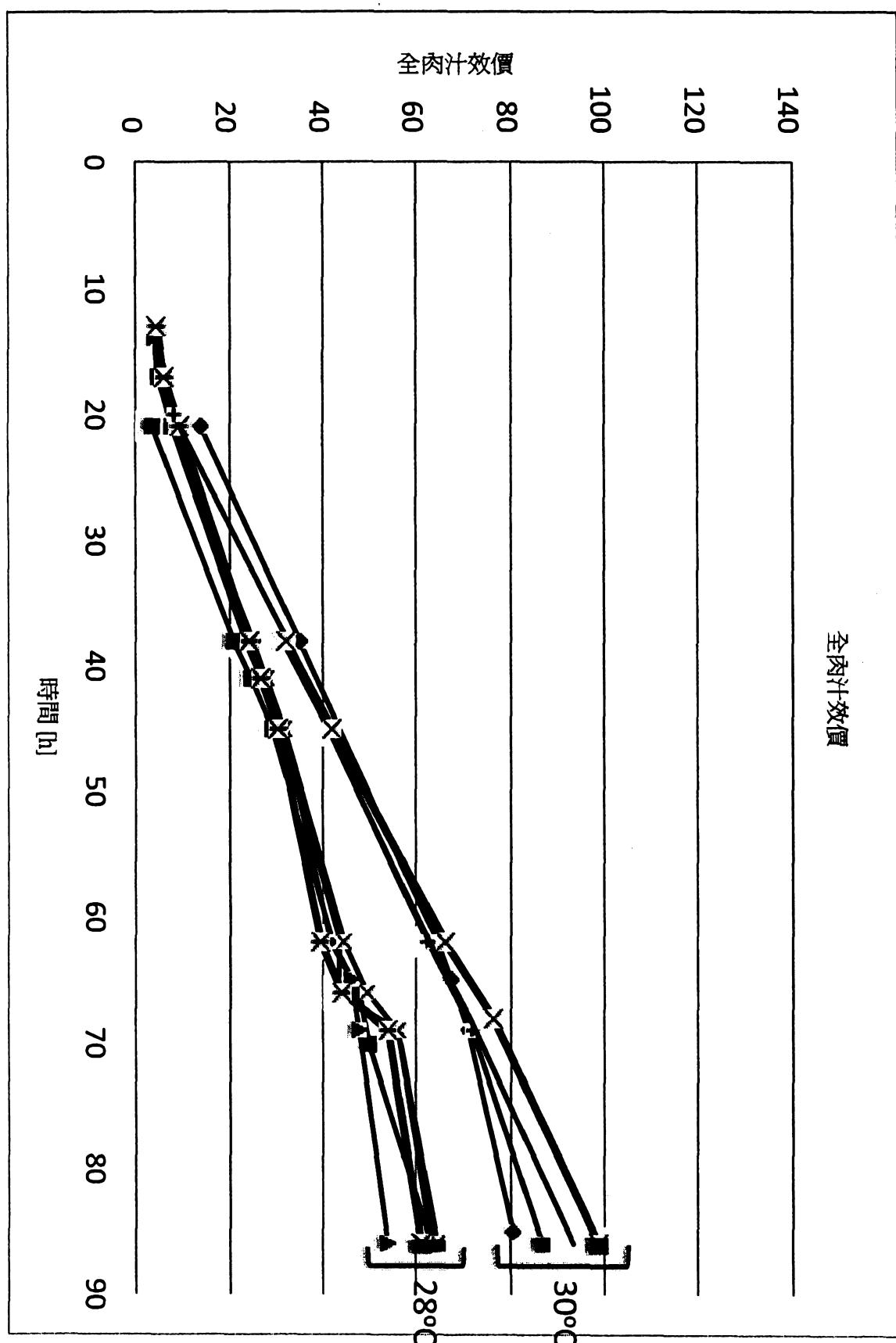
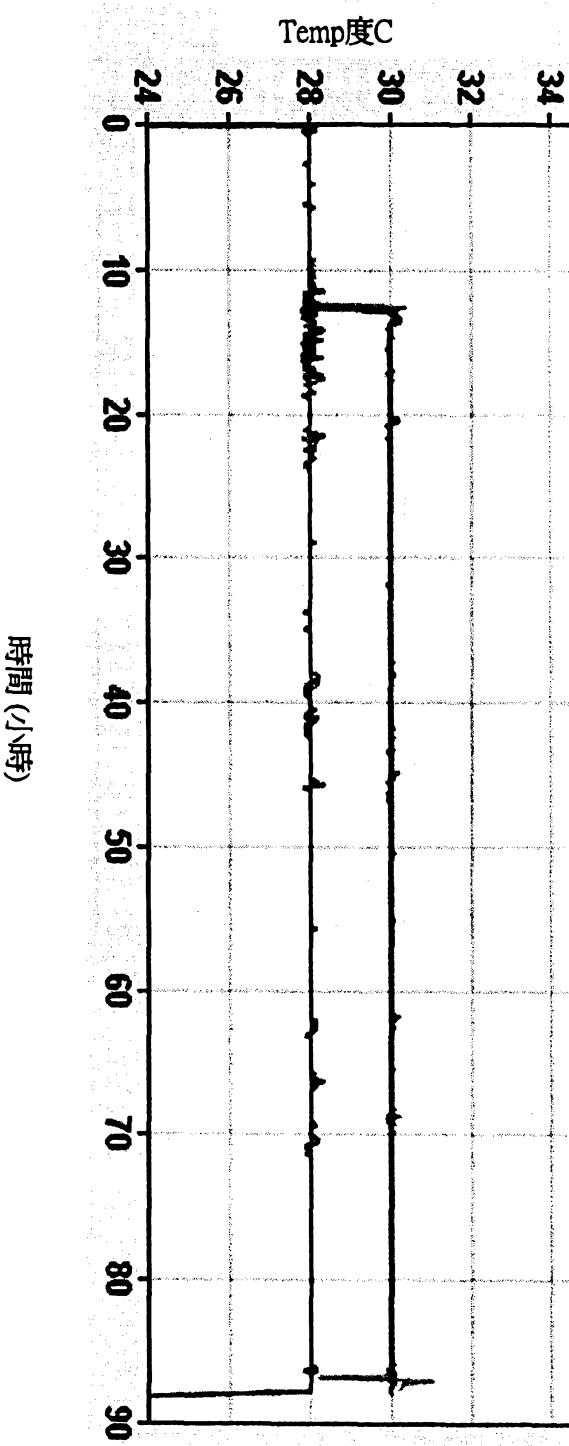


圖51：Ab-A純度

47

非還原					
Temp C	主峰IgG	前峰HHL	75KD HL	總計	
28	85.64	8.23	1.54	95.41	
28	84.97	7.9	1.55	94.42	
28	85.87	7.63	1.63	95.13	
28	85.75	7.96	1.5	95.21	
28	85.96	7.52	1.84	95.32	
30	87.88	6.71	1.69	96.28	
30	86.64	7.07	1.79	95.5	
30	89.54	5.12	2.55	97.21	
30	86.56	6.02	4.1	96.68	

還原							
Temp C	HC	LC	RT 9.80	RT 10.16	RT 10.80	總計 HC/LC	
28	60.88	32.23	0.96	1.02	2.69	93.11	
28	60.31	32.21	1.06	1.26	3.78	92.52	
28	59.24	31.53	1.21	1.57	5.18	90.77	
28	59.47	32.05	1.11	1.37	4.79	91.52	
28	60.05	31.69	1.16	1.27	4.5	91.74	
30	63.8	31.75	0.84	0.76	1.97	95.55	
30	64.47	32.04	0.8	0.61	0.89	96.51	
30	66.52	31.26	0.79	0	0.97	97.78	
30	66.33	31.09	0.83	0	1.24	97.42	



【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

申請專利範圍

1. 一種在酵母菌細胞中生產所欲的抗體之方法，其包含：

(a)於第一個溫度下培養包含一個或多個基因的酵母菌細胞，該一個或多個基因編碼該所欲的抗體；以及

(b)於第二個溫度下培養該酵母菌細胞，且允許該酵母菌細胞生產該所欲的抗體；

其中該第一個溫度係介於27.5度C和28.5度C之間，且該第二個溫度係介於30度C和31度C之間；以及

其中調節編碼該所欲的抗體之該一個或多個基因之轉錄作用的該啟動子或該等啟動子不是溫度可誘導性的。

2. 如請求項1之方法，其包含以下之一或多者：

(i) 該第一個溫度係28度C；

(ii) 該第二個溫度係30.5度C；

(iii) 該第二個溫度係31度C；

(iv) 該第一個溫度係28度C，且該第二個溫度係介於30度C及31度C之間；

(v) 該第一個溫度係28度C，且該第二個溫度係31度C；

(vi) 該所欲的抗體包含一人類抗體、一經人類化(humanized)抗體，或是一對IL-6、TNF- α 、CGRP、PCSK9、

HGF或NGF專一的選擇性人類化或選擇性人類抗體；

(vii) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法增加該所欲的抗體之

產量；

(viii) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法減少一個或多個產物相關變異體的相對豐度。

(ix) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法減少產物相關變異體的相對豐度，該產物相關變異體當藉由粒徑篩析層析法或凝膠電泳來檢測時，具有比該所欲的抗體較高或較低的表觀分子量；

(x) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法減少具有異常雙硫鍵之抗體的相對豐度；

(xi) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的該相同方法，該方法減少具有降低的半胱胺酸之抗體的相對豐度；

(xii) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法減少具有異常醣化作用之抗體的相對豐度；

(xiii) 相對於在該第一個溫度和該第二個溫度之間沒有差異下所進行的相同方法，該方法減少一個或多個產物相關變異體的相對豐度；

(xiv) 該酵母菌細胞係畢赤酵母菌細胞(*Pichia* yeast cells)，其選擇性地選自於由以下所構成的群組：安格斯畢赤酵母菌(*Pichia angusta*)、季也蒙畢赤酵母菌(*Pichia*

guillermordii)、嗜甲醇畢赤酵母菌(*Pichia methanolica*)，

以及因諾托畢赤酵母菌(*Pichia inositovera*)；

(xv) 該酵母菌細胞係巴斯德畢赤酵母菌細胞(*Pichia pastoris* yeast cells)；

(xvi) 供用於表現該所欲的抗體之基因是被嵌入於一個或多個基因座中，其中選擇性地該等基因座中之至少一者係選自於由以下所組成之群組：pGAP基因座、3' AOX TT基因座；PpURA5；OCH1；AOX1；HIS4；GAP；pGAP；3' AOX TT；ARG；以及HIS4 TT基因座；

(xvii) 編碼該所欲的抗體之次級單元的基因中之至少一者，係在可誘導性或構成性(constitutive)啟動子之控制下被表現，其中選擇性地該可誘導性啟動子係選自於由以下所組成之群組：AOX1、CUP1、四環黴素可誘導性啟動子、硫胺素可誘導性啟動子，以及FLD1啟動子；

(xviii) 該步驟(a)包含培養該酵母菌細胞於含有甘油作為碳源之培養基內，直到該甘油耗盡為止；

(xix) 該所欲的抗體係在選自於由以下所組成之群組的啟動子之控制下被表現：CUP1、AOX1、ICL1、甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAP)、FLD1、ADH1、醇去氫酶II、GAL4、PHO3、PHO5與Pyk啟動子、四環黴素可誘導性啟動子、硫胺素可誘導性啟動子、由其所衍生的嵌合啟動子、酵母菌啟動子、哺乳類動物啟動子、昆蟲啟動子、植物啟動子、爬蟲類啟動子、兩棲動物啟動子、病毒啟動子，以及禽類啟動子；

- (xx) 該酵母菌細胞為單倍體、二倍體、四倍體細胞，或是多倍體細胞；
- (xxi) 該方法進一步包含從該酵母菌細胞或從該培養基純化該所欲的抗體；或
- (xxii) 該方法進一步包含從該酵母菌細胞的細胞內組分、細胞質、核質，或是膜純化該所欲的抗體；
- (xxiii) 該酵母菌細胞將該所欲的抗體分泌至該培養基內；
- (xxiv) 該步驟(a)包含一分批階段(batch phase)，其中選擇性地該分批階段包含培養該酵母菌細胞於含有一碳源之培養基內，其中選擇性地該分批階段的終止係藉由在該培養基內的該碳源之耗盡來判定；或
- (xxv) 該步驟(b)包含分批補料階段(fed batch phase)。