



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101663390 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 23

(21) 申请号 200780041909. X

(22) 申请日 2007. 09. 13

(30) 优先权数据

60/845, 158 2006. 09. 13 US

60/876, 374 2006. 12. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 05. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/020027 2007. 09. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02008/033517 EN 2008. 03. 20

(73) 专利权人 ABBVIE 公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 I·A·布拉 J·C·马杜克 J·C·范

C·史丘兹 N·A·洛依

D·F·布鲁顿 J·麦因泰尔

张幼翔 T·希沃斯特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 梁谋 李连涛

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006. 01)

C12N 5/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 0003000 A2, 2000. 01. 20, 摘要、权利要求 1-20.

WO 99/57246 A1, 1999. 11. 11, 全文.

胡雪梅等. 氨基酸对中华仓鼠卵巢(CHO)细胞在无血清培养基中的作用. 《华东理工大学学报》. 1996, 第 22 卷(第 3 期), 283-288.

Sung YH 等. Yeast hydrolysate as a low-cost additive to serum-free medium for the production of human thrombopoietin in suspension cultures of chinese hamster ovary cells. 《Appl Microbiol Biotechnol》. 2004, 第 63 卷(第 5 期), 527 - 536.

审查员 赵硕

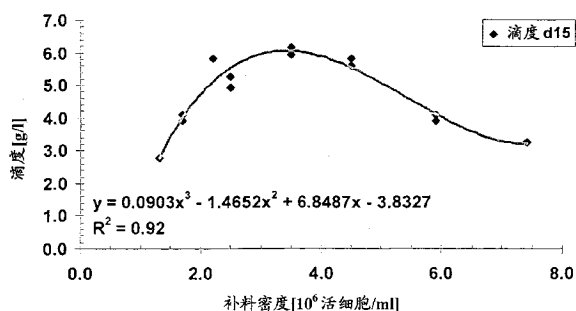
权利要求书3页 说明书76页 附图1页

(54) 发明名称

使用非动物源水解产物的分批补料细胞培养方法

(57) 摘要

本发明描述在哺乳动物细胞培养物中生产重组蛋白例如抗体的改进方法和组合物。此外, 本发明提供改良细胞培养基, 包括改良生产培养基、补料溶液和组合补料, 其可用于提高哺乳动物细胞培养物中的蛋白生产率。



1. 一种用于生产抗体的分批补料方法,其包含:
 - a) 在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码所述抗体的核酸的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞;及
 - b) 通过在一时段内向所述细胞培养物中添加水解产物富集溶液和包含基础培养基的基础富集溶液对 CHO 细胞补料,
其中所述水解产物富集溶液包含植物源水解产物和 75-300g/L 酵母源水解产物,以产生所述抗体。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述基础富集溶液包含浓缩的基础培养基,或所述基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述基础培养基为 PF CHO。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述植物源水解产物为大豆源水解产物。
5. 一种用于生产抗 -TNF α 抗体的分批补料方法,其包含:
 - a) 在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码该抗 -TNF α 抗体的核酸的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞;及
 - b) 通过在一时段内向所述细胞培养物中添加水解产物富集溶液和基础富集溶液对 CHO 细胞补料,
其中所述基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖,且
其中所述水解产物富集溶液包含植物源水解产物和 75-300g/L 酵母源水解产物,以产生该抗 -TNF α 抗体。
6. 权利要求 5 的分批补料方法,其中步骤 a) 中的所述细胞培养生产培养基包含至少 2.0g/L 葡萄糖,且需要通过向所述细胞培养生产培养基中添加葡萄糖以维持至少 2.0g/L 的葡萄糖浓度来控制所述步骤中的葡萄糖浓度。
7. 权利要求 5 或 6 的方法,其中所述方法
 - 进一步包含回收所述抗 -TNF α 抗体;或
 - 在 32 至 38°C 范围内的温度培养所述细胞培养物;或
 - 所述细胞培养生产培养基的溶氧维持在 20 至 65% 之间;或
 - 在整个培养期间维持所述细胞培养生产培养基的渗透压不超过 500mOsm;或
 - 所述基础培养基为 PF CHO;或
 - 所述基础富集溶液具有 9.0 至 10.5 的 pH。
8. 权利要求 5 或 6 的方法,其中所述水解产物富集溶液基本由下列物质组成:50 至 280g/kg 大豆源水解产物;和 75 至 300g/L 酵母源水解产物。
9. 权利要求 7 的方法,其中在 32 至 38°C 范围内的温度培养所述细胞培养物,且所述培养温度为 35°C。
10. 权利要求 7 的方法,其中所述细胞培养生产培养基的溶氧维持在 20 至 65% 之间,且所述细胞培养生产培养基的溶氧维持在 30%。
11. 权利要求 5、6 或 7 的方法,其中所述植物源水解产物为大豆源水解产物。
12. 权利要求 5 或 6 的方法,其中
 - 所述时段在 9 至 15 天之间;或
 - 在所述时段以下各日的至少一日将所述基础富集溶液添加至该细胞培养生产培养基

中：第4日、第6日、第9日和第11日；且在所述时段的第4日、第7日或第4日和第7日将所述水解产物富集溶液添加至该细胞培养生产培养基中；或

- 所述方法进一步包含根据 pH 线性斜坡调节细胞培养生产培养基的 pH，其中所述 pH 线性斜坡包含自 7.1 至 7.2 的 pH 起始并产生 6.9 的终 pH。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述方法进一步包含根据 pH 线性斜坡调节细胞培养生产培养基的 pH，其中所述 pH 线性斜坡包含自 7.1 至 7.2 的 pH 起始并产生 6.9 的终 pH，且在至少 24 小时的时段中调节所述 pH 线性斜坡。

14. 权利要求 13 的方法，其中在至少 48 小时的时段中调节所述 pH 线性斜坡。

15. 权利要求 13 的方法，其中在 72 小时中调节所述 pH 线性斜坡。

16. 权利要求 5 或 6 的方法，其中所述细胞培养生产培养基包含：

a) 排除下列组份的经修饰基础培养基：碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和葡萄糖；

b) 110 至 130mg/L 柠檬酸铁；

c) 10 至 14mg/kg 重组人胰岛素；

d) 5 至 9g/kg 无水葡萄糖；

e) 0.1 至 1g/kgL- 谷氨酰胺；

f) 1 至 3g/kg 碳酸氢钠；

g) 1 至 3g/kg HEPES；

h) 2 至 3g/kgNaCl；

i) 0.1 至 2g/kgPluronic F-68；

j) 0.01 至 0.1g/kgNaH₂PO₄ · H₂O；

k) 0.1 至 0.1g/kg Na₂HPO₄ · 7H₂O；

l) 8 至 12g/kg 酵母源水解产物；及

m) 6 至 8g/kg 植物源水解产物。

17. 权利要求 5 或 6 的方法，其中所述细胞培养为大规模细胞培养。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述大规模细胞培养大于 10L。

19. 一种用于生产抗 IL12 抗体的分批补料方法，其包含：

a) 在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码该抗体的核酸的 CHO 细胞，

b) 通过在一时段内向该细胞培养物中添加水解产物富集溶液和基础富集溶液对 CHO 细胞补料，

其中所述基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖，且

其中所述水解产物富集溶液包含植物源水解产物和 75-300g/L 酵母源水解产物，以产生该抗-IL12 抗体。

20. 权利要求 19 的方法，其中：

- 所述水解产物富集溶液进一步包含葡萄糖；或

- 所述方法进一步包含回收该抗-IL12 抗体；或

- 在介于 32 至 38℃ 范围内的温度培养所述细胞培养物；或

- 所述细胞培养生产培养基的溶氧维持在 20-65% 之间；或

- 所述细胞培养生产培养基具有 6.7 至 7.2 的 pH ;或
- 所述基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述培养温度为 33℃。

22. 权利要求 20 的方法,其中所述水解产物富集溶液基本上由下列物质组成:50 至 225g/kg 大豆源水解产物、75 至 300g/L 酵母源水解产物和 2 至 3g/L 葡萄糖。

23. 权利要求 20 的方法,其中所述细胞培养生产培养基的溶氧维持在 20-65%之间,且所述溶氧维持在 40%。

24. 权利要求 20 的方法,其中所述植物源水解产物为大豆源水解产物。

25. 权利要求 20 的方法,其中所述基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖,且所述基础富集溶液具有:

- 9.7 的 pH 及 1400 至 1500mOsm 的渗透压 ;或
- 所述基础富集溶液中的基础培养基为 PF CHO。

26. 权利要求 19-25 中任一项的方法,其中

- 所述时段在 14-15 天之间 ;或

- 自所述时段中的第 5 日起始,每隔一天将所述基础富集溶液添加至所述细胞培养生产培养基中 ;且自所述时段中的第 6 日起始,每天将所述水解产物富集溶液添加至所述细胞培养生产培养基中 ;或

- 自所述时段中的第 5 日起始,每天将所述基础富集溶液及所述水解产物富集溶液添加至所述细胞培养生产培养基中。

27. 权利要求 19-25 中任一项的方法,其中所述细胞培养生产培养基包含:

a) 排除下列组份的经修饰基础培养基:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和葡萄糖;

b) 110 至 130mg/L 柠檬酸铁;

c) 11 至 15mg/kg 重组人胰岛素;

d) 5 至 9g/kg 无水葡萄糖;

e) 0.1 至 1g/kgL- 谷氨酰胺;

f) 1 至 2g/kg 碳酸氢钠;

g) 1 至 2g/kg HEPES;

h) 2 至 3g/kg NaCl;

i) 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68;

j) 0.01 至 0.1g/kgNaH₂PO₄ • H₂O;

k) 0.1 至 1g/kg Na₂HPO₄ • 7H₂O;

l) 6 至 12g/kg 酵母源水解产物 ;及

m) 6 至 8g/kg 植物源水解产物。

28. 权利要求 19-25 中任一项的方法,其中所述细胞培养为大规模细胞培养,且所述大规模细胞培养大于 10L。

使用非动物源水解产物的分批补料细胞培养方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2006 年 9 月 13 日申请的美国临时申请 60/845158、2006 年 12 月 21 日申请的美国临时申请 60/876374 的优先权。上述各优先权文件的内容以参考形式并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 重组 DNA 技术已提供了使得能够用于包括治疗、诊断、农业及研究目的各种应用的量的蛋白质生产方法。

[0005] 重组蛋白生产的目标之一是优化细胞培养基和条件以获得最大量的蛋白及最有效的生产方式。任何改良（包括增量改良）均可具有庞大的经济效益。在医药工业中，优化用于疾病治疗的生物制品的蛋白质生产是有利的，因为在大规模生产生物制品时任何改良均可具有显著影响。因此，仍需要最大化来自表达医药用生物蛋白的细胞培养的蛋白质生产。

[0006] 通常，哺乳动物细胞培养基基于市售培养基配方，包括，例如，DMEM 或 Ham 氏 F12。通常，培养基配方并未充分富集 (enriched) 以支持细胞生长及生物蛋白表达的增加。仍需要改良细胞培养基、添加剂及用于改良蛋白生产的细胞培养方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供用于改良细胞培养尤其哺乳动物细胞培养中的蛋白表达的方法及组合物。本发明涉及改良细胞培养基，包括用于蛋白表达和细胞生长的培养基和经优化用于蛋白表达的细胞培养生产培养基。

[0009] 本发明也包括用于在哺乳动物细胞培养中高蛋白表达的最佳化方法和培养基。具体而言，最优化细胞培养基用于在哺乳动物细胞培养物（例如 CHO 细胞）中表达抗体。也提供通过添加补充溶液（例如含有水解产物的溶液及浓缩基础培养基溶液）促进蛋白生产的改良补料分批方法及组合物。

[0010] 本发明提供用于哺乳动物细胞培养中的不含盐的改良基础生长培养基。本发明包括包含 A 部分、B 部分及 C 部分的无血清细胞培养基，其中 A 部分基本上由排除下列组份的经修饰基础培养基组成：碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖；B 部分基本上由无机铁来源组成；且 C 部分包含重组生长因子、缓冲剂、渗透压调节剂、能量来源及至少两种不同的非动物水解产物。

[0011] 在一个实施方案中，A 部分进一步包含非铁金属离子、维生素或二者组合。在一个实施方案中，B 部分的无机铁来源为柠檬酸铁，例如约 100-150mg/L 或 0.1-1mM 终溶液浓度的柠檬酸铁。在另一个实施方案中，B 部分的无机铁来源为柠檬酸铁，例如约 122.5mg/L 或 0.5mM 终溶液浓度的柠檬酸铁。

[0012] 在一个实施方案中，C 部分的重组生长因子选自胰岛素或重组类似物、IGF-1 及胰岛素与 IGF-1 的组合，例如约 4mg/L 至 13mg/L 胰岛素或其重组类似物。

[0013] 在一个实施方案中，排除于经修饰的基础培养基之外的缓冲剂为 HEPES 缓冲剂。

[0014] 在一个实施方案中，C 部分的缓冲剂包含磷酸盐缓冲剂、HEPES 及碳酸氢钠，例如

约 0.1 至 3g/L 碳酸氢钠、约 0.1 至 3g/L HEPES。在一个实施方案中，C 部分的缓冲剂包含 1.6g/L 碳酸氢钠和 / 或约 1.8g/L HEPES。在一个实施方案中，磷酸盐缓冲剂包含约 0.01 至 0.5g/L 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠。

[0015] 在另一个实施方案中，C 部分进一步包含天冬酰胺、谷氨酰胺或谷氨酰胺和天冬酰胺。

[0016] 在一个实施方案中，C 部分的渗透压调节剂为 NaCl，例如约 1.0 至 6.5g/L NaCl。

[0017] 在一个实施方案中，C 部分的能量来源为单糖，例如葡萄糖（如 D- 葡萄糖）、麦芽糖、甘露糖、半乳糖和果糖。在一个实施方案中，本发明的细胞培养基包含至多约 7.0g/L 的葡萄糖。

[0018] 在另一个实施方案中，本发明的细胞培养基包含 C 部分的至少两种不同的非动物源水解产物，该类水解产物为植物源水解产物和既非动物源也非植物源的水解产物。可用于本发明的植物源水解产物的实例为大豆源水解产物。既非动物源也非植物源的水解产物的实例为酵母源水解产物。

[0019] 在一个实施方案中，本发明的细胞培养基进一步包含甲氨喋呤。在一个实施方案中，细胞培养基进一步包含约 100nM 至 5000nM 的甲氨喋呤。

[0020] 在另一个实施方案中，细胞培养基进一步包含细胞保护剂或表面活性剂。可用于本发明细胞培养基的表面活性剂的实例为甲基纤维素或 pluronic 多元醇，例如 Pluronic F-68。在一个实施方案中，细胞培养基包含约 0.1-5g/L Pluronic F-68。在一个实施方案中，细胞培养基包含约 1.0g/L Pluronic F-68。

[0021] 在本发明的另一个实施方案中，细胞培养基进一步包含 L- 谷氨酰胺。

[0022] 在一个实施方案中，细胞培养基的 pH 值范围为 7.1 至 7.3。

[0023] 在另一个实施方案中，本发明的细胞培养基的渗透压在约 320 至 450mOsm/kg 范围内。

[0024] 本发明包括无血清细胞培养基，该培养基包含下列各物质：基础培养基；约 8-12ml/kg 或 116-126mg/L 柠檬酸铁；约 2-6mg/kg 重组人胰岛素；约 2-5g/kg 无水葡萄糖；约 0.1-0.5g/kg L- 谷氨酰胺；约 1-3g/kg 碳酸氢钠；约 0.01-0.05g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；约 0.4-0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及约 1.0-3.0g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中，细胞培养基包含：基础培养基；约 10.0ml/kg 或 122mg/L 柠檬酸铁；约 4.0mg/kg 重组人胰岛素；约 3.5g/kg 无水葡萄糖；约 0.29g/kg L- 谷氨酰胺；约 1.6g/kg 碳酸氢钠；约 0.03g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；约 0.43-0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及约 2.0g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中，细胞培养基基本上由下列物质组成：基础培养基；约 10.0ml/kg 或 122mg/L 柠檬酸铁；约 4.0mg/kg 重组人胰岛素；约 3.5g/kg 无水葡萄糖；约 0.29g/kg L- 谷氨酰胺；约 1.6g/kg 碳酸氢钠；约 0.03g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；约 0.43-0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及约 2.0g/kg 酵母源水解产物。

[0025] 本发明进一步提供基本由下列各物质组成的无血清细胞培养基：基础培养基；约 8-12ml/kg 或 116-126mg/L 柠檬酸铁；约 2-6mg/kg 重组人胰岛素；约 2-5g/kg 无水葡萄糖；约 0.1-0.5g/kg L- 谷氨酰胺；约 1-3g/kg 碳酸氢钠；约 0.01-0.05g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；约 0.4-0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及约 1.0-3.0g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中，细胞培养基基本上由下列各物质组成：基础培养基；约 8-12ml/kg 或 116-126mg/L 柠檬酸铁；约

2-6mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 2-5g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.1-0.5g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1-3g/kg 碳酸氢钠 ; 约 0.01-0.05g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.4-0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 及约 1.0-3.0g/kg 酵母源水解产物。

[0026] 在一个实施方案中, 细胞培养基进一步包含约 2.50mL/kg 的甲氨喋呤。

[0027] 本发明也包括一种用于生产蛋白的方法, 其包含在本发明的培养基中培养包含编码蛋白的核酸的哺乳动物细胞 ; 并且将培养物转移至细胞培养生产培养基中, 这样可生产蛋白。

[0028] 在一个实施方案中, 该蛋白为抗体, 包括 (例如) D2E7 (阿达木单抗)。

[0029] 本发明进一步提供包含下列各物质的无血清细胞生产培养基 : 排除下列组份的经修饰的基础培养基 ; 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ; 约 8 至 12 ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ; 约 4 至 8mL/kg 或 10 至 14mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.5 至 0.7g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1 至 2g/kg HEPES ; 约 2 至 3g/kg NaCl ; 约 0.5 至 2g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.4 至 0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 8 至 12g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 60 至 70g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中, 细胞培养生产培养基基本由排除下列组份的经修饰基础培养基组成 : 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖 ; 约 8 至 12ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ; 约 4 至 8mL/kg 或 10 至 14mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.5 至 0.7g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1 至 2g/kg HEPES ; 约 2 至 3g/kg NaCl ; 约 0.5 至 2g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.4 至 0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 8 至 12g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 60 至 70g/kg 植物源水解产物。在另一个实施方案中, 细胞培养生产培养基包含 : 基础培养基 ; 约 10.0mL/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ; 约 6.0mL/kg 或 12mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 7.0g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.58 至 0.59g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1.8g/kg HEPES ; 约 2.4 至 2.5g/kg NaCl ; 约 1.0g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 10.7g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 6.9 至 7.0g/kg 植物源水解产物。

[0030] 本发明进一步提供包含下列各物质的无血清细胞生产培养基 : 排除下列组份的经修饰的基础培养基 ; 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ; 约 8 至 12ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ; 约 3 至 5mL/kg 或 6 至 8mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.1 至 2g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1 至 2g/kg HEPES ; 约 2 至 3g/kg NaCl ; 约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.4 至 0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 0.4 至 0.5g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ; 约 2 至 6g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 2 至 4g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中, 细胞培养基基本由下列各物质组成 : 排除下列组份的经修饰基础培养基 : 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ; 约 8 至 12ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ; 约 3 至 5mL/kg 或 6 至 8mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.1 至 2g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1 至 2g/kg HEPES ; 约 2 至 3g/kg NaCl ; 约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.4 至 0.5g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 0.4 至 0.5g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ; 约 2 至 6g/kg 酵母源

水解产物 ; 及约 2 至 4g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中, 细胞培养基包含 : 经修饰的基础培养基 ; 约 10.0ml/kg 或 122.45mg/kg 柠檬酸铁 ; 约 3.8 至 3.9mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人类胰岛素 ; 约 7.0g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.8 至 0.9g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1.8g/kg HEPES ; 约 2.6 至 2.7g/kg NaCl ; 约 1.0g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 0.45g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ; 约 4.0g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 2.6g/kg 植物源水解产物。

[0031] 本发明也包括包含下列各物质的无血清细胞培养基 : 排除下列组份的经修饰基础培养基 : 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ; 约 8 至 10ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ; 约 3 至 5mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.8 至 0.9g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 0.3 至 0.5g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1 至 2g/kg HEPES ; 约 2 至 3g/kg NaCl ; 约 0.5 至 2g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.1 至 1.0g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 2 至 6g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 2 至 4g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中, 细胞培养基基本由下列各物质组成 : 排除下列组份的经修饰基础培养基 : 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ; 约 8 至 10ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ; 约 3 至 5mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.8 至 0.9g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 0.3 至 0.5g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1 至 2g/kg HEPES ; 约 2 至 3g/kg NaCl ; 约 0.5 至 2g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.1 至 1.0g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 2 至 6g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 2 至 4g/kg 植物源水解产物。在另一个实施方案中, 细胞培养基包含 : 经修饰的基础培养基 ; 约 10ml/kg 或 122mg/L 柠檬酸铁 ; 约 3.8 至 3.9mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 7.0g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.87 至 0.88g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 0.45g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ; 约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ; 约 1.8g/kg HEPES ; 约 2.67 至 2.68g/kg NaCl ; 约 1.0g/kg Pluronic F-68 ; 约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 约 4.0g/kg 酵母源水解产物 ; 及约 2.6g/kg 植物源水解产物。

[0032] 本发明包括包含下列各物质的无血清细胞培养基 : 基础细胞生长培养基 ; 约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ; 约 2 至 6mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 150 至 250g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.1 至 0.5g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 及约 5 至 15g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中, 细胞培养基基本由下列各物质组成 : 基础细胞生长培养基 ; 约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ; 约 2 至 6mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 150 至 250g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.1 至 0.5g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 及约 5 至 15g/kg 酵母源水解产物。在另一个实施方案中, 细胞培养基包含 : 基础细胞生长培养基 ; 约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ; 约 4mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 200g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.29 至 0.30g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ; 及约 11g/kg 酵母源水解产物。在另一个实施方案中, 蛋白为抗体, 包括 (例如) 完全人抗体、抗 IL-12 抗体, 例如 ABT-874。

[0033] 本发明也包括包含下列各物质的无血清细胞培养基 : 基础细胞生长培养基 ; 约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ; 约 2 至 6mg/kg 重组人胰岛素 ; 约 1 至 3g/kg 无水葡萄糖 ; 约 0.1 至 1g/kg L- 谷氨酰胺 ; 约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ; 及约 1 至 4g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中, 细胞培养基基本由下列各物质组成 : 基础细胞生长培养基 ; 约

8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 2 至 6mg/kg 重组人胰岛素 ;约 1 至 3g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.1 至 1g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;及约 1 至 4g/kg 酵母源水解产物。在另一个实施方案中,细胞培养基包含 :基础细胞生长培养基 ;约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ;约 4mg/kg 重组人胰岛素 ;约 1.5g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.29 至 0.30g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ;及约 2g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中,细胞培养基的 pH 值为约 7.10 至 7.30,渗透压在约 300 至 340mOsm/kg 的范围内。在另一个实施方案中,细胞培养基包含至少 8g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中,使用细胞培养在哺乳动物细胞 (例如 CHO 细胞) 中生产的蛋白为抗体,包括,例如,抗 IL-12 抗体或抗 EPO-R 抗体,例如 ABT-874。

[0034] 本发明进一步提供包含下列各物质的细胞培养基 :排除下列组份的经修饰基础培养基 :碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ;约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 2.5 至 4.5mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.5 至 1g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 0.1 至 1g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;约 1 至 2g/kg HEPES ;约 1 至 4g/kg NaCl ;约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68 ;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 2 至 6g/kg 酵母源水解产物 ;及约 2 至 6g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中,本发明细胞培养基基本由下列各物质组成 :排除下列组份的经修饰基础培养基 :碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ;约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 2.5 至 4.5mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.5 至 1g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 0.1 至 1g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;约 1 至 2g/kg HEPES ;约 1 至 4g/kg NaCl ;约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68 ;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 2 至 6g/kg 酵母源水解产物 ;及约 2 至 6g/kg 植物源水解产物。在另一个实施方案中,细胞培养基包含 :经修饰的基础培养基 ;约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ;约 3.8 至 3.9mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ;约 7.0g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.87 至 0.88g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 0.45g/kg L- 天冬酰胺一水合物 ;约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ;约 1.8g/kg HEPES ;约 2.67g/kg NaCl ;约 1.0g/kg Pluronic F-68 ;约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 4.0g/kg 酵母源水解产物 ;及约 2.6g/kg 植物源水解产物。

[0035] 本发明也包括包含下列各物质的细胞培养生产培养基 :经修饰以去除下列组份的经修饰基础培养基 :碳酸氢钠、HEPES 缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ;约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 4 至 8mL/kg 或 10 至 14mg/kg 重组人胰岛素 ;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.1 至 1g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;约 1 至 2g/kg HEPES ;约 1 至 3g/kg NaCl ;约 0.5 至 2g/kg Pluronic F-68 ;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 8 至 12g/kg 酵母源水解产物 ;及约 6 至 8g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中,本发明细胞培养生产培养基基本由下列各物质组成 :经修饰以去除下列组份的经修饰基础培养基 :碳酸氢钠、HEPES 缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ;约 8 至 12ml/kg 或 120 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 4 至 8mL/kg 或 10 至 14mg/kg 重组人胰岛素 ;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.1 至 1g/kg L- 谷氨酰胺 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;约 1 至 2g/kg HEPES ;

约 1 至 3 g/kg NaCl ;约 0.5 至 2g/kg Pluronic F-68 ;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 8 至 12g/kg 酵母源水解产物 ;及约 6 至 8g/kg 植物源水解产物。在另一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含经修饰的基础培养基 ;约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ;约 6.0mL/kg 或 12mg/kg 重组人胰岛素 ;约 7.0g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.58 至 0.59g/kg L-谷氨酰胺 ;约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ;约 1.8g/kg HEPES ;约 2.45g/kg NaCl ;约 1.0g/kg Pluronic F-68 ;约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 10.7g/kg 酵母源水解产物 ;及约 6.9 至 7.0g/kg 植物源水解产物。

[0036] 本发明另一方面为包含下列各物质的细胞培养生产培养基 :排除下列组份的经修饰基础培养基 :碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ;约 8 至 12ml/kg 或 110 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 4 至 8mL/kg 或 11 至 15mg/kg 重组人胰岛素 ;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.1 至 1g/kg L-谷氨酰胺 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;约 1 至 2g/kg HEPES ;约 1 至 3g/kg NaCl ;约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68 ;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 12 至 16g/kg 酵母源水解产物 ;及约 8 至 10g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基基本由下列各物质组成 :排除下列组份的经修饰基础培养基 :碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖 ;约 8 至 12ml/kg 或 110 至 130mg/L 柠檬酸铁 ;约 4 至 8mL/kg 或 11 至 15mg/kg 重组人胰岛素 ;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.1 至 1g/kg L-谷氨酰胺 ;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠 ;约 1 至 2g/kg HEPES ;约 1 至 3g/kg NaCl ;约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68 ;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 12 至 16g/kg 酵母源水解产物 ;及约 8 至 10g/kg 植物源水解产物。在另一个实施方案中,本发明细胞培养生产培养基包含 :经修饰的基础培养基 ;约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁 ;约 6.5mL/kg 或 13 mg/kg 重组人胰岛素 ;约 7.0g/kg 无水葡萄糖 ;约 0.58 至 0.59g/kg L-谷氨酰胺 ;约 1.6g/kg 碳酸氢钠 ;约 1.8g/kg HEPES ;约 2.45g/kg NaCl ;约 1.0g/kg Pluronic F-68 ;约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 14.2 至 14.3g/kg 酵母源水解产物 ;及约 9.2 至 9.3g/kg 植物源水解产物。

[0037] 在一个实施方案中,细胞培养基的 pH 为约 6 至 8。在另一个实施方案中,细胞培养基的 pH 约 7.10 至 7.20。

[0038] 在一个实施方案中,细胞培养基的渗透压约 350 至 450mOsm/kg。在另一个实施方案中,细胞培养基的渗透压约 373 至 403mOsm/kg。

[0039] 本发明的细胞培养基可进一步包含甲氨喋呤。在一个实施方案中,细胞培养基进一步包含例如约 1-10mL/kg 甲氨喋呤。在另一个实施方案中,细胞培养基进一步包含例如约 2.50mL/kg 甲氨喋呤。

[0040] 在一个实施方案中,在细胞培养物中表达的蛋白为抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段为抗-TNF α 抗体或抗-EP0-R 抗体。在另一个实施方案中,抗-TNF α 抗体或其抗原结合片段为完全人类抗 TNF α 抗体,包括,例如,完全人类抗-TNF α 抗体 D2E7(阿达木单抗)。在又另一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段为抗-IL-12 或抗-IL-18 抗体,包括完全人类抗-IL-12 或抗-IL-18 抗体。

[0041] 本发明也包括一种用于生产蛋白(例如抗体或其抗原结合部分)的方法,其包含在本文所呈现的细胞培养基中培养包含编码蛋白(例如抗体)的核酸的哺乳动物细胞。在

一个实施方案中,细胞培养基为细胞培养生产培养基。可使用本发明方法及组合物生产的抗体或其抗原结合片段的实例包括抗 IL-18 抗体、抗 -TNF α 抗体、抗 -IL-12 抗体及抗 EPO 受体 (EPO-R) 抗体。

[0042] 在一个实施方案中,本发明进一步包含从本文所述细胞培养生产培养基中分离蛋白。

[0043] 在一个实施方案中,本发明的细胞培养基及方法用于培养哺乳动物细胞,包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0044] 本发明也包括本文所述任何细胞培养基中的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0045] 本发明亦提供用于在哺乳动物细胞培养物 (例如 CHO 细胞) 中生产蛋白的改良补料分批方法和相关细胞培养基。本发明一方面为生产蛋白的补料分批方法,其包含在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码蛋白的核酸的哺乳动物细胞;及通过在一时段内向细胞培养物中添加水解产物富集 (enrichment) 溶液和基础富集溶液而向哺乳动物细胞饲料,其中水解产物富集溶液包含至少两种不同的非动物源水解产物;这样可生产蛋白。

[0046] 在一个实施方案中,基础富集溶液包含浓缩基础培养基。在另一个实施方案中,基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖。在另一个实施方案中,基础培养基为 PF CHO。

[0047] 在一个实施方案中,水解产物富集溶液包含非衍生自植物或动物的第一水解产物和第二植物源水解产物。在一个实施方案中,非衍生自植物或动物和植物源的水解产物为酵母源水解产物。在一个实施方案中,植物源水解产物为大豆源水解产物。

[0048] 在一个实施方案中,所生产的蛋白为抗体或其抗原结合部分。可用于本发明的分批补料方法的抗体或其抗原结合部分的实例包括抗 -TNF α 抗体、抗 -IL-12 抗体、抗 -IL-18 抗体及抗 EPO 受体 (EPO-R) 抗体。

[0049] 本发明包括产生抗 TNF α 抗体 (包括,例如完全人类抗 TNF α 抗体,如阿达木单抗) 的分批补料方法,其包含在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码抗 -TNF α 抗体的核酸的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞;并通过在一时段内向细胞培养物中添加水解产物富集溶液和基础富集溶液而向 CHO 细胞补料,其中基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖,且其中水解产物富集溶液包含至少两种不同的非动物源水解产物;这样可生产抗 -TNF α 抗体。

[0050] 本发明包括生产抗 -TNF α 抗体的分批补料方法,其包含在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码抗 -TNF α 抗体的核酸的 CHO 细胞,该细胞培养生产培养基包含至少 1-5g/L 例如 2.0g/L 的葡萄糖,其中通过按需要向细胞培养生产培养基中添加葡萄糖以维持至少 1-5g/L 例如 2.0g/L 的葡萄糖浓度来控制葡萄糖浓度;并且通过在一时段内向细胞培养物中添加水解产物富集溶液和基础富集溶液而向 CHO 细胞补料,其中基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖,且其中水解产物富集溶液包含至少两种不同的非动物源水解产物;这样可生产抗 -TNF α 抗体。

[0051] 在一个实施方案中,本发明包括进一步回收抗 -TNF α 抗体。

[0052] 在又一个实施方案中,在约 32 至 38°C 范围内 (例如 35°C) 的温度下培养细胞培养物。

[0053] 在一个实施方案中,使细胞培养生产培养基的溶氧维持在 20-65%之间,例如约 30%溶氧。

[0054] 在一个实施方案中,在整个培养过程中维持细胞培养生产培养基的渗透压不超过 500mOsm。

[0055] 在一个实施方案中,水解产物富集溶液包含非衍生自植物或动物的第一水解产物及第二植物源水解产物。在另一个实施方案中,非衍生自植物或动物和植物源水解产物的水解产物为酵母源水解产物。在另一个实施方案中,植物源水解产物为大豆源水解产物。在一个实施方案中,水解产物富集溶液基本由下列各物质组成:约 50 至 280g/kg,例如 250 至 280g/kg 大豆源水解产物及约 75 至 300g/kg,例如 150 至 180g/kg 酵母源水解产物。在一个实施方案中,水解产物富集溶液包含约 50 至 280g/kg,例如 250 至 280g/kg 大豆源水解产物及约 75 至 300g/kg,例如 150 至 180g/kg 酵母源水解产物。

[0056] 在一个实施方案中,基础培养基为 PF CHO。

[0057] 在一个实施方案中,基础富集溶液的 pH 值约 9.0 至 10.5。

[0058] 在另一个实施方案中,分批补料方法的时段在约 9 至 15 天之间 或为约 12 天。

[0059] 在另一个实施方案中,于该时段中以下各日中至少一日将基础富集溶液添加至细胞培养生产培养基中:第 4 日、第 6 日、第 9 日及第 11 日。在一个实施方案中,于该时段中第 4 日、第 7 日或第 4 日和第 7 日将水解产物富集溶液添加至细胞培养生产培养基中。

[0060] 在另一个实施方案中,分批补料方法进一步包含根据 pH 值线性斜坡 (linear ramp) 调节细胞培养生产培养基的 pH 值,其中该 pH 值线性斜坡包含自约 6.5-8 (例如,7.1 至 7.2 之间) 的 pH 值起始且产生约 6.5-7.0 (例如 6.9) 的最终 pH 值。在一个实施方案中,至少在约 24 小时的时间段内调节 pH 值线性斜坡。在另一个实施方案中,至少在约 48 小时的时间段内调节 pH 值线性斜坡。在另一个实施方案中,在约 72 小时的时间段内调节 pH 值线性斜坡。

[0061] 本发明也包括在分批补料方法中使用本文所述的细胞培养基,例如包含下列各物质的细胞培养生产培养基:排除下列组份的经修饰基础培养基;碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖;约 8 至 10ml/kg 或 110 至 130mg/L 柠檬酸铁;约 4 至 8mL/kg 或 10 至 14mg/kg 重组人胰岛素;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖;约 0.1 至 1g/kg L-谷氨酰胺;约 1 至 3g/kg 碳酸氢钠;约 1 至 3g/kg HEPES;约 2 至 3g/kg NaCl;约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 0.1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 8 至 12g/kg 酵母源水解产物;及约 6 至 8g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含经修饰的基础培养基;约 10.0ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁;约 6.0mL/kg 或 12mg/kg 重组人胰岛素;约 7.0g/kg 无水葡萄糖;约 0.58 至 0.59g/kg L-谷氨酰胺;约 1.6g/kg 碳酸氢钠;约 1.8g/kg HEPES;约 2.45g/kg NaCl;约 1.0g/kg Pluronic F-68;约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 10.7g/kg 酵母源水解产物;及约 6.9 至 7.0g/kg 植物源水解产物。

[0062] 本发明也提供生产抗-IL12 抗体 (例如完全人类抗-IL12 抗体 (如 ABT-874)) 的分批补料方法,其包含在包含细胞培养生产培养基的细胞培养物中培养包含编码抗体的核酸的 CHO 细胞;通过在一时段内向细胞培养物中添加水解产物富集溶液和基础富集溶液向 CHO 细胞补料,其中基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖,且其中水解产物富

集溶液包含至少两种不同的非动物源水解产物;这样可产生抗-IL12 抗体。

[0063] 在一个实施方案中,水解产物富集溶液进一步包含葡萄糖。

[0064] 在一个实施方案中,本发明也包括回收抗-IL12 抗体。

[0065] 在一个实施方案中,在约 32 至 38℃ 范围内(例如约 33℃)的温度下培养细胞培养物。

[0066] 在本发明的一个实施方案中,将细胞培养生产培养基的溶氧维持在 20-65%之间,例如约 40%溶氧。

[0067] 在另一个实施方案中,细胞培养生产培养基的 pH 值约 6.7 至 7.2。

[0068] 在本发明的另一个实施方案中,水解产物富集溶液包含非衍生自植物或动物的水解产物和植物源水解产物。在一个实施方案中,非衍生自植物或动物的水解产物为酵母源水解产物。在另一个实施方案中,植物源水解产物为大豆源水解产物。在另一个实施方案中,水解产物富集溶液基本由下列各物质组成:约 50 至 225g/kg,例如 150 至 180g/kg 大豆源水解产物、约 75 至 300g/kg,例如 250 至 280g/kg 酵母源水解产物及约 1 至 5g/L,例如 2 至 3g/L 葡萄糖。在另一个实施方案中,水解产物富集溶液包含约 50 至 225g/kg,例如 150 至 180g/kg 大豆源水解产物、约 75 至 300g/kg,例如 250 至 280g/kg 酵母源水解产物及约 1 至 5g/L,例如 2 至 3g/L 葡萄糖。在一个实施方案中,基础富集溶液包含基础培养基、天冬酰胺和葡萄糖。

[0069] 在另一个实施方案中,基础富集溶液的 pH 值约 9.7,渗透压约 1400 至 1500mOsm。在另一个实施方案中,基础富集溶液中的基础培养基为 PF CHO。

[0070] 在一个实施方案中,分批补料方法的时段在 14-15 天之间。

[0071] 在一个实施方案中,自该时段的第 5 日起,每隔一天将基础富集溶液添加至细胞培养生产培养基中。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,自该时段的第 6 日起始,每天将基础富集溶液添加至细胞培养生产培养基中。在另一个实施方案中,自该时段的第 5 日起始,每天将基础富集溶液及水解产物富集溶液添加至细胞培养生产培养基中。

[0073] 本发明也包括在分批补料方法中使用本文所述的细胞培养基,例如包含下列各物质的细胞培养生产培养基:排除下列组份的经修饰基础培养基;碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖;约 8 至 12mL/kg 或 110 至 130mg/L 柠檬酸铁;约 5 至 8mL/kg 或 11 至 15mg/kg 重组人胰岛素;约 5 至 9g/kg 无水葡萄糖;约 0.1 至 1g/kg L-谷氨酰胺;约 1 至 2g/kg 碳酸氢钠;约 1 至 2g/kg HEPES;约 2 至 3g/kg NaCl;约 0.1 至 2g/kg Pluronic F-68;约 0.01 至 0.1g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.1 至 1g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 6 至 12g/kg 酵母源水解产物;及约 6 至 8g/kg 植物源水解产物。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含:约 10mL/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁;约 6.5mL/kg 或 13mg/kg 重组人胰岛素;约 7.0g/kg 无水葡萄糖;约 0.58 至 0.59g/kg L-谷氨酰胺;约 1.6g/kg 碳酸氢钠;约 1.8g/kg HEPES;约 2.45g/kg NaCl;约 1.0g/kg Pluronic F-68;约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;约 10.7g/kg 酵母源水解产物;及约 6.9 至 7.0g/kg 植物源水解产物。

[0074] 在一个实施方案中,本发明以大规模培养细胞方法为特点。在一个实施方案中,大规模细胞培养大于约 10L。在另一个实施方案中,大规模细胞培养为约 13L。

[0075] 本发明也提供组合补料溶液,因为这些溶液可在一种溶液中提供养分组合所以是有利的。本发明包括包含下列各物质的组合补料溶液:葡萄糖;基础培养基;除谷氨酰胺以外的氨基酸;及至少两种不同的非动物源水解产物。本发明也包括基本由下列各物质组成的组合补料溶液:葡萄糖;基础培养基;除谷氨酰胺以外的氨基酸;及至少两种不同的非动物源水解产物。

[0076] 在一个实施方案中,补料溶液的 pH 值约 6.0 至 8.0。

[0077] 在一个实施方案中,组合补料溶液包含约 100 至 250g/kg 葡萄糖。在一个实施方案中,组合补料溶液包含氨基酸天冬酰胺,例如约 1.0 至 15.0g 天冬酰胺;或约 3.0 至 5.0g/kg 天冬酰胺。

[0078] 在一个实施方案中,组合补料溶液中的至少两种不同的非动物源水解产物为植物源水解产物和既非动物源也非植物源的水解产物。在一个实施方案中,非动物源或植物源水解产物为酵母源水解产物。在一个实施方案中,植物源水解产物为大豆源水解产物。

[0079] 在一个实施方案中,组合补料溶液包含为 PF-CHO 或 DMEM/F12 培养基的基础培养基。在一个实施方案中,基础细胞培养基为经修饰的基础培养基且排除以下组份:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂、谷氨酰胺和葡萄糖。

[0080] 在另一个实施方案中,组合补料溶液进一步具有小于约 15NTU 的浊度。

[0081] 本发明以维持细胞培养生产培养基的稳定葡萄糖含量的方法为特点,其包含添加本文所述的组合补料溶液。

[0082] 本发明的另一方面为制造包含下列各物质的组合补料溶液的方法:基础培养基、葡萄糖及至少两种不同的非动物源水解产物,其包含将葡萄糖与基础细胞培养基组合至溶液中;将 a) 溶液的 pH 值调节至约 9.5 至 10.5;将至少两种不同的非动物源水解产物添加至 b) 溶液中;并调节 c) 溶液的 pH 值,这样组合补料溶液的 pH 值约 6.5 至 7.5。在一个实施方案中,步骤 c) 包含添加既非以动物源也非植物源的第一水解产物和第二植物源水解产物。在一个实施方案中,非动物源或植物源水解产物为酵母源水解产物。在另一个实施方案中,植物源水解产物为大豆源水解产物。

[0083] 本发明进一步提供增加由哺乳动物细胞培养物生产的蛋白(例如抗体或其抗原结合部分)的方法。本发明提供由哺乳动物细胞培养物生产至少约 1.5g/L 抗体的方法,其包含在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞;及向细胞培养生产培养基中添加 pH 值约 6.7 至 7.2 的组合补料溶液,其中该组合补料溶液包含葡萄糖、基础细胞培养基、除谷氨酰胺以外的氨基酸及至少两种不同的非动物源水解产物,这样可生产至少约 1.5g/L 抗体。在一个实施方案中,生产至少 2g/L 抗体。在另一个实施方案中,生产至少 4g/L 抗体。在另一个实施方案中,生产至少 5g/L 抗体。在另一个实施方案中,本发明提供用于产生约 6g/L 抗体的方法。

[0084] 在一个实施方案中,组合补料溶液包含约 100 至 250g/kg 葡萄糖。

[0085] 本发明也提供用于增加哺乳动物细胞培养物所生产抗体的滴度的方法,其包含在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞;及向细胞培养生产培养基中添加 pH 值约 6.7 至 7.2 的组合补料溶液,其中该组合补料溶液包含葡萄糖、基础细胞培养基、除谷氨酰胺以外的氨基酸及至少两种不同的非动物源水解产物;这样所产生抗体的滴度比根据步骤 a) 且排除步骤 b) 培养的对照哺乳动物细胞培养物高至少 50%。在一个

实施方案中,所生产的抗体滴度比对照物高至少 100%。在另一个实施方案中,所生产的抗体滴度比对照物高至少 150%。

[0086] 在一个实施方案中,当细胞密度达到每毫升至少 2.0×10^6 个细胞时添加组合补料溶液。在一个实施方案中,当细胞密度达到每毫升约 3.5×10^6 个细胞时添加组合补料溶液。

[0087] 本发明进一步提供在哺乳动物细胞培养物中生产蛋白(例如抗体或其抗原结合部分)的方法,其包含在细胞培养生产培养基中培养包含编码蛋白的核酸的哺乳动物细胞;及使用反馈控制系统来监控细胞培养生产培养基中的代谢指示剂水平,藉此将组合补料溶液添加至细胞培养生产培养基中,其中在该反馈控制系统所测定的时间点将组合补料溶液添加至细胞培养生产培养基中,这样以生产抗体。在一个实施方案中,代谢指示剂为葡萄糖或谷氨酰胺。在另一个实施方案中,补料溶液为包含下列各物质的组合补料溶液:葡萄糖;基础细胞培养基;除谷氨酰胺以外的氨基酸;及至少两种不同的非动物源水解产物。在一个实施方案中,抗体为抗-TNF α 抗体、抗-IL-12 抗体、抗-IL-18 抗体及抗-EPO 受体(EPO-R) 抗体。

[0088] 在一个实施方案中,使用本发明方法生产至少 1.5g/L 滴度的抗体。在另一个实施方案中,生产至少 2g/L 的滴度。

[0089] 在本发明的一个实施方案中,组合补料溶液包含约 3.0 至 12.5g/kg 天冬酰胺。

[0090] 在本发明的一个实施方案中,组合补料溶液包含约 100 至 200g/kg 葡萄糖。

[0091] 在另一个实施方案中,本发明进一步包含监控细胞培养基中的葡萄糖含量,使得葡萄糖水平维持于约 0.25 与 20.0g/L 之间。在一个实施方案中,使用自动取样装置监控葡萄糖水平。

[0092] 在一个实施方案中,使用本文公开的方法和组合物生产的抗体或其抗原结合部分选自:抗-TNF α 抗体、抗-IL-18 抗体、抗-EPO-R 抗体及抗 IL-12 抗体。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合部分为完全人类抗体。在一个实施方案中,抗-TNF α 抗体为 D2E7(阿达木单抗)。在一个实施方案中,抗 IL-18 抗体为 ABT-325。在一个实施方案中,抗 IL-12 抗体为 ABT-874。

[0093] 本发明也提供测定在哺乳动物细胞培养物中生产蛋白的补料曲线的方法,其包含在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞;及使用反馈控制系统监控细胞培养生产培养基中的代谢指示剂,藉此将组合补料溶液添加至细胞培养生产培养基中,其中将组合补料溶液添加至细胞培养生产培养基中以达到目标代谢指示剂设定点;及测定每天添加至细胞培养生产培养基中的组合补料溶液的量,这样以测定补料曲线。

[0094] 在一个实施方案中,代谢指示剂为葡萄糖或谷氨酰胺。

[0095] 本发明也包括在哺乳动物细胞培养物中生产蛋白的分批补料方法,其包含根据使用本发明方法测定的补料曲线将组合补料溶液添加至哺乳动物细胞培养物中。

[0096] 本发明的另一方面为包括丁酸钠和/或 N-乙酰半胱氨酸的改良细胞培养基。本发明以在哺乳动物细胞培养物中生产抗体使得抗体滴度为至少 300mg/L 的方法为特点,该方法包含在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞;向细胞培养基中添加丁酸钠、N-乙酰半胱氨酸或其组合,其中添加丁酸钠至终浓度约 0.1mM 至 10mM 且添加 N-半胱氨酸至终浓度约 1mM 至 80mM;这样以生产至少 300mg/L 滴度的抗体。在一个实施方案中,抗体滴度至少为约 100mg/L。在一个实施方案中,抗体滴度至少为约 200mg/

L。在一个实施方案中,抗体滴度至少为约 250mg/L。在一个实施方案中,抗体滴度至少为约 300mg/L。在一个实施方案中,抗体滴度至少为约 400mg/L。

[0097] 本发明也提供在哺乳动物细胞培养物中生产抗体,使得抗体滴度至少比对照哺乳动物细胞培养物高 10% 的方法,该方法包含 a) 在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞;及 b) 向细胞培养基中添加丁酸钠、N- 乙酰半胱氨酸或其组合,其中添加丁酸钠至终浓度约 0.1mM 至 10mM 且添加 N- 乙酰半胱氨酸终浓度至约 1mM 至 80mM,使得抗体滴度至少比对照物高 10%,其中对照哺乳动物细胞培养包含步骤 a) 且排除步骤 b)。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的抗体滴度比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 29%。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的抗体滴度比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 40%。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的抗体滴度比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 70%。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的抗体滴度比对照哺乳动物细胞培养物高至少 90%。

[0098] 在一个实施方案中,在哺乳动物细胞培养物的生长期向哺乳动物细胞培养物中添加丁酸钠、N- 乙酰半胱氨酸或其组合。

[0099] 在一个实施方案中,在培养时间的第 4 天与第 7 天之间向哺乳动物细胞培养物中添加丁酸钠、N- 乙酰半胱氨酸或其组合。

[0100] 在一个实施方案中,在培养时间的第 0 天向哺乳动物细胞培养物中添加丁酸钠、N- 乙酰半胱氨酸或其组合。

[0101] 在另一个实施方案中,丁酸钠的终浓度为约 0.1mM 至 10mM。在一个实施方案中,丁酸钠的终浓度为约 0.1mM 至 8.0mM。在一个实施方案中,丁酸钠的终浓度为约 0.1mM 至 3.0mM 丁酸钠。

[0102] 在一个实施方案中,N- 乙酰半胱氨酸的终浓度为约 20mM 至 60mM。在一个实施方案中,N- 乙酰半胱氨酸的终浓度为约 10mM。在一个实施方案中,N- 乙酰半胱氨酸的终浓度为约 8mM。

[0103] 本发明进一步提供与对照哺乳动物细胞培养物相比使哺乳动物细胞培养物的寿命延长至少 35% 的方法,该方法包含 a) 在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞;及 b) 将约 1mM 至 80mM N- 乙酰半胱氨酸添加至细胞培养基中,使得哺乳动物细胞培养物的寿命与对照哺乳动物细胞培养物相比延长至少 35%,其中对照哺乳动物细胞培养包含步骤 a) 且排除步骤 b)。

[0104] 在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的寿命与对照哺乳动物细胞培养物相比延长至少约 45%。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的寿命与对照哺乳动物细胞培养物相比延长至少约 55%。

[0105] 在一个实施方案中,本发明方法包含将终浓度为约 8mM 的 N- 乙酰半胱氨酸添加至细胞培养生产培养基中。

[0106] 在一个实施方案中,抗体或其抗原结合部分选自抗 -TNF α 抗体、抗 -IL-18 抗体(例如 ABT-325) 及抗 IL-12 抗体。

[0107] 本发明提供包含 A 部分、B 部分及 C 部分的无血清细胞培养基,其中 A 部分基本由排除下列组份的经修饰基础培养基组成:碳酸氢 钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖;B 部分基本由无机铁来源组成;且 C 部分包含重组

生长因子、缓冲剂、渗透压调节剂、能量来源及至少两种不同的非动物水解产物。在一个实施方案中，C 部分基本由下列各物质组成：重组生长因子；缓冲剂；渗透压调节剂；能量来源；及至少两种不同的非动物水解产物。

[0108] 本发明也提供包含下列各物质的无血清细胞培养生产培养基：维生素含量降低且排除下列组份的经修饰基础培养基：碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖；约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁；约 6.5mL/kg 或 13mg/kg 重组人胰岛素；约 7.0g/kg 无水葡萄糖；约 0.58 至 0.59g/kg L-谷氨酰胺；约 1.6g/kg 碳酸氢钠；约 1.8g/kg HEPES；约 2.45g/kg NaCl；约 1.0g/kg Pluronic F-68；约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；约 10.7g/kg 酵母源水解产物；及约 6.9 至 7.0g/kg 植物源水解产物。

[0109] 本发明也提供包含下列各物质的无血清细胞培养基：维生素含量降低且排除下列组份的经修饰基础培养基：碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖；约 150g/kg 无水葡萄糖；约 5.0g/kg L-天冬酰胺一水合物；约 1.6g/kg 碳酸氢钠；约 65g/kg 酵母源水解产物；及约 41g/kg 植物源水解产物。

[0110] 本发明进一步提供包含下列各物质的无血清细胞培养基：维生素含量降低且排除下列组份的经修饰基础培养基：碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂及单糖葡萄糖；约 10ml/kg 或 122.45mg/L 柠檬酸铁；约 6.5mL/kg 或 13mg/kg 重组人胰岛素；约 200g/kg 无水葡萄糖；约 0.58 至 0.59g/kg L-谷氨酰胺；约 1.6g/kg 碳酸氢钠；约 1.8g/kg HEPES；约 2.45g/kg NaCl；约 1.0g/kg Pluronic F-68；约 0.03 至 0.04g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；约 0.43 至 0.44g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；约 10.7g/kg 酵母源水解产物；及约 6.9 至 7.0g/kg 植物源水解产物。

[0111] 本发明也提供改良培养基的以下实施方案。本发明包括用于培养 CHO 细胞以表达重组生物制品的改良培养基，其包含 A、B 和 C 部分，其中：A 部分包含水、氨基酸、维生素及其他辅因子；B 部分包含无机铁来源；且 C 部分包含重组生长因子、缓冲剂、渗透压调节剂、能量来源、非铁金属离子、水解产物及附加试剂。

[0112] 在一个实施方案中，C 部分包含碳酸氢钠、HEPES、磷酸二氢钠及磷酸氢二钠、氯化钠、Pluronic F-68 及葡萄糖。在另一个实施方案中，添加 1.5g/L 碳酸氢钠。在另一个实施方案中，添加 1.8g/L HEPES。在另一个实施方案中，添加 0.1-0.5g/L 磷酸二氢钠及磷酸氢二钠。在另一个实施方案中，添加 1g/L 至 6.5g/L 氯化钠。在另一个实施方案中，添加 1.0g/L Pluronic F-68。在一个实施方案中，添加 1g/L 至 7g/L 葡萄糖。在一个实施方案中，维生素选自 PABA（对氨基苯甲酸）、生物素、D-Ca 泛酸盐（维生素 B5）、叶酸、内消旋肌醇、烟酰胺、Pyridoxine（维生素 B6）、核黄素（维生素 B2）、硫胺素（维生素 B1）和氰钴胺（Cyanocobalamin）（维生素 B12）。在另一个实施方案中，其他辅因子选自脂因子、醇胺、氨基酸和肽。在另一个实施方案中，脂因子选自氯化胆碱及磷脂酰胆碱。在另一个实施方案中，醇胺为乙醇胺。在一个实施方案中，氨基酸选自天冬酰胺、谷氨酰胺及腐胺。

[0113] 在一个实施方案中，肽为谷胱甘肽。在一个实施方案中，添加 0.4mg/L 至 1.65mg/L 谷胱甘肽。

[0114] 在另一个实施方案中，B 部分的无机铁来源为柠檬酸铁。在一个实施方案中，添加 10mL/L 或 122mg/L 柠檬酸铁。在另一个实施方案中，使柠檬酸铁保持 122mg/L 的浓度。在

一个实施方案中,重组生长因子为胰岛素或重组类似物、IGF-1 或胰岛素与 IGF-1 的组合。在一个实施方案中,添加 4mg/L 至 13mg/L 胰岛素或重组类似物。在另一个实施方案中,添加 25ng/L 至 150ng/L IGF-1。在另一个实施方案中,添加 50ng/L 至 100ng/L IGF-1。在另一个实施方案中,将 25ng/L 至 150ng/L IGF-1 添加至胰岛素中。在一个实施方案中,将 50ng/L 至 100ng/L IGF-1 添加至胰岛素中。

[0115] 在另一个实施方案中,渗透压调节剂选自 NaCl、KCl、KNO₃。在一个实施方案中,添加 0g/L 至 10g/L 渗透压调节剂。在另一个实施方案中,添加 0g/L 至 6.5g/L 渗透压调节剂。

[0116] 在另一个实施方案中,能量来源为单糖,例如葡萄糖(例如 D-葡萄糖)、麦芽糖、甘露糖、半乳糖及果糖。在一个实施方案中,添加 1.0g/L 至 7.0g/L 葡萄糖。在另一个实施方案中,添加 1.5g/L 至 5.0g/L 葡萄糖。

[0117] 在另一个实施方案中,以氯化物和硫酸盐的形式添加非铁金属离子。在一个实施方案中,非铁金属离子选自钾、镁、铜、硒、锌、镍、锰、锡、镉、钼酸盐、钒酸盐及硅酸盐。在一个实施方案中,缓冲剂选自碳酸盐、氯化物、硫酸盐和磷酸盐。在一个实施方案中,缓冲剂选自 NaHCO₃、CaCl₂、MgSO₄、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、C₃H₃O₃Na 和称作 HEPES 的 N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]。

[0118] 在本发明的一个实施方案中,添加至培养基中的附加试剂之一为甲氨喋呤。在一个实施方案中,甲氨喋呤用于使表达抗-IL-18、抗-IL-12、抗-TNF α (例如完全人类抗-TNF α)或抗EPO-R抗体的CHO细胞的生长。在一个实施方案中,添加100mM至5000nM。在一个实施方案中,向培养基中添加500nM甲氨喋呤。在一个实施方案中,添加100nM甲氨喋呤。在一个实施方案中,添加5000nM甲氨喋呤。

[0119] 在本发明的另一个实施方案中,附加试剂之一为细胞保护剂,例如甲基纤维素或 pluronic 多元醇(例如 Pluronic F-68)。在一个实施方案中,添加 0.5g/L 至 1.0g/L 甲基纤维素。在一个实施方案中,添加 0.5g/L 至 1.0g/L Pluronic F-68。在一个实施方案中,添加 0.7g/L 至 1.2g/L Pluronic F-68。

[0120] 在另一个实施方案中,将 A 部分的 pH 增加至最大 pH 值 10。在一个实施方案中,在添加水解产物之后将 A 部分的 pH 降低至最小值 7.0。

[0121] 本发明也提供用于表达完全人类抗-TNF α 抗体的CHO细胞的改良培养基,其包含:10.0ml/kg或122mg/kg柠檬酸铁;2mL/kg或4.0mg/kg重组人胰岛素;3.5g/kg无水葡萄糖;0.292g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg碳酸氢钠;0.031g/kg NaH₂PO₄·H₂O;0.436g/kg Na₂HPO₄·7H₂O;2.0g/kg水解产物;及2.50mL/kg甲氨喋呤。

[0122] 本发明也提供用于表达完全人类抗-TNF- α 抗体的CHO细胞的改良培养基,其包含:10.0ml/kg或122mg/kg柠檬酸铁;6.0mL/kg或12mg/kg重组人胰岛素;7.0g/kg无水葡萄糖;0.584g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg碳酸氢钠;1.8g/kg HEPES;2.45g/kg NaCl;1.0g/kg PluronicF-68;0.031g/kg NaH₂PO₄·H₂O;0.436g/kg Na₂HPO₄·7H₂O;10.7g/kg水解产物;6.92g/kg植物蛋白胨(Phytone peptone);及2.50mL/kg甲氨喋呤。

[0123] 本发明也包括用于表达完全人类抗-TNF- α 抗体的CHO细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg或122mg/L柠檬酸铁;3.88mL/kg或7.8mg/kg重组人胰岛素;7.0g/kg无水葡萄糖;0.876g/kg L-谷氨酰胺;0.45g/kg L-天冬酰胺一水合物;1.6g/kg碳酸氢钠;1.8g/

kgHEPES ;2.67g/kg NaCl ;1.0g/kg Pluronic F-68 ;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;10.7g/kg 水解产物 ;6.92g/kg 植物蛋白胨 ;及 2.50mL/kg 甲氨喋呤。

[0124] 本发明进一步提供用于表达完全人类抗-TNF- α 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/L 柠檬酸铁 ;3.88mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ;7.0g/kg 无水葡萄糖 ;0.876g/kg L-谷氨酰胺 ;0.45g/kg L-天冬酰胺一水合物 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;1g/kgHEPES ;2.67g/kg NaCl ;1.0g/kg Pluronic F-68 ;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;4.0g/kg 水解产物 ;2.6g/kg 植物蛋白胨 ;及 2.50mL/kg 甲氨喋呤。

[0125] 本发明的另一方面为用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/L 柠檬酸铁 ;3.88mL/kg 或 7.8mg/kg 重组人胰岛素 ;7.0g/kg 无水葡萄糖 ;0.876g/kg L-谷氨酰胺 ;0.45g/kg L-天冬酰胺一水合物 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;1.8g/kg HEPES ;2.675g/kg NaCl ;1.0g/kg Pluronic F-68 ;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;4.0g/kg 酵母源水解产物 ;2.579g/kg 植物蛋白胨 ;及 2.50mL/kg 甲氨喋呤。

[0126] 本发明提供用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/L 柠檬酸铁 ;6.5mL/kg 或 13mg/kg 重组人胰岛素 ;7.0g/kg 无水葡萄糖 ;0.584g/kg L-谷氨酰胺 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;1.8g/kg HEPES ;2.45g/kg NaCl ;1.0g/kg Pluronic F-68 ;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;10.7g/kg 酵母水解产物 ;及 6.92g/kg 植物蛋白胨。

[0127] 本发明提供用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :150.0g/kg 无水葡萄糖 ;5.0g/kg L-天冬酰胺一水合物 ;65.0g/kg 酵母水解产物 ;及 41.0g/kg 植物蛋白胨。

[0128] 本发明也提供用于表达抗-IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁 ;6.5mL/kg 或 13mg/kg 重组人胰岛素 ;200.0g/kg 无水葡萄糖 ;0.584g/kg L-谷氨酰胺 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;1.8g/kg HEPES ;2.45g/kg NaCl ;1.0mL/kg Pluronic F-68 ;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;10.7g/kg 酵母水解产物 ;及 6.92g/kg 植物蛋白胨。

[0129] 本发明包括用于表达抗-IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁 ;2mL/kg 或 4mg/kg 重组人胰岛素 ;3.5+1.5g/kg 无水葡萄糖 ;0.292g/kg L-谷氨酰胺 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;2g/kg 酵母水解产物 ;及 0.25mL/kg 甲氨喋呤。

[0130] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁 ;2mL/kg 或 4mg/kg 重组人胰岛素 ;3.5+1.5g/kg 无水葡萄糖 ;0.292g/kg L-谷氨酰胺 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;11g/kg 酵母水解产物 ;及 0.250mL/kg 甲氨喋呤。

[0131] 本发明包括用于表达抗-IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁 ;2mL/kg 或 4mg/kg 重组人胰岛素 ;200g/L 无水葡萄糖 ;0.292g/kg L-谷氨酰胺 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;8g/kg 酵母水解产物 ;及 0.250mL/kg 甲氨喋呤。

[0132] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含 :10mL/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁 ;3.88mL/kg 或 7.76mg/L 重组人胰岛素 ;7.0g/L 无水右旋糖 ;0.876g/L L-谷氨酰胺 ;1.6g/kg 碳酸氢钠 ;1.8g/L HEPES ;2.67g/L NaCl ;1.0g/L Pluronic ;0.031g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;4.0g/L 酵母粉 (yeastolate) ;2.579g/L 植物蛋白胨 ;0.05mL/kg 甲氨喋呤 ;3.5mL/L 2N NaOH ;及 2.91g/L 2N HCl ;其产生 7.10 至 7.20 的终

pH 值及 373 至 403mOsmo/kg 的终渗透压。

[0133] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁;13mg/L 重组人胰岛素;7.0g/L 无水右旋糖;0.584g/L L-谷氨酰胺;1.6g/kg 碳酸氢钠;1.8g/L HEPES;2.45g/L NaCl;1.0g/L Pluronic;0.031g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;10.7g/L 酵母粉;6.92g/L 植物蛋白胨;0.05mL/kg 甲氨喋呤;5.67mL/L 2N NaOH;及 2.5g/L 2N HCl;其产生 7.10 至 7.20 的终 pH 值和 373 至 403mOsmo/kg 的终渗透压。

[0134] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁;4mg/kg 重组人胰岛素;1.5g/kg 无水右旋糖;0.292g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg 碳酸氢钠;2.0g/L 酵母粉;及 0.25mL/kg 甲氨喋呤;其产生 7.10 至 7.30 的终 pH 值和 300 至 340mOsmo/kg 的终渗透压。

[0135] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁;13mg/kg 重组人胰岛素;7.0g/kg 无水右旋糖;0.584g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg 碳酸氢钠;1.8 g/kg HEPES;2.45g/kg NaCl;1.0g/kg Pluronic F-68;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;10.7g/L 酵母粉;及 6.92g/kg 植物蛋白胨;5.67mL/kg NaOH;及 2.5mL/kg HCl;其产生 7.10 至 7.20 的终 pH 值和 373 至 403mOsmo/kg 的终渗透压。

[0136] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁;7.76mg/kg 重组人胰岛素;7.0g/L 无水右旋糖;0.876g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg 碳酸氢钠;1.8g/kg HEPES;2.67g/kg NaCl;1.0g/kg Pluronic F-68;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;4.0g/L 酵母粉;及 2.579g/L 植物蛋白胨;0.05mL/L 甲氨喋呤;3.5mL/kg NaOH;及 2.91mL/kg HCl;其产生 7.10 至 7.20 的终 pH 值和 373 至 403mOsmo/kg 的终渗透压。

[0137] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁;13mg/kg 重组人胰岛素;7.0g/L 无水右旋糖;0.584g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg 碳酸氢钠;1.8g/kg HEPES;2.45g/kg NaCl;1.0g/kg Pluronic F-68;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;10.7g/L 酵母粉;及 6.92g/L 植物蛋白胨;0.05mL/L 甲氨喋呤;5.67mL/kg NaOH;及 2.5mL/kg HCl;其产生 7.10 至 7.20 的终 pH 值和 373 至 403mOsmo/kg 的终渗透压。

[0138] 本发明包括用于表达抗 IL-18 抗体的 CHO 细胞的改良培养基,其包含:10ml/kg 或 122mg/kg 柠檬酸铁;13mg/kg 重组人胰岛素;7.0g/L 无水右旋糖;0.584g/kg L-谷氨酰胺;1.6g/kg 碳酸氢钠;1.8g/kg HEPES;1.0g/kg Pluronic F-68;0.031g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;0.436g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;14.27g/L 酵母粉;9.23g/L 植物蛋白胨;0.05mL/L 甲氨喋呤;8.95mL/kg NaOH;及 4.1mL/kg HCl;其产生 7.10 至 7.20 的终 pH 值及 373 至 403mOsmo/kg 的终渗透压。

[0139] 本发明也提供通过增加终滴度增加 CHO 细胞系生产 IgG1 抗体的生产率的方法,其包含:添加丁酸钠;及添加 N-乙酰半胱氨酸。在一个实施方案中,IgG1 抗体为抗 -IL-18。在一个实施方案中,通过终滴度的增加测量生产率的增加。在一个实施方案中,通过添加 0.1mM 至 10mM 浓度的丁酸钠达到终滴度的增加。在一个实施方案中,丁酸钠的浓度为 0.1mM

至 8.0mM。在一个实施方案中,丁酸钠的浓度为 0.1mM 至 3.0mM。在一个实施方案中,丁酸钠的浓度为 0.125mM 至 2.0mM。在一个实施方案中,丁酸钠的浓度为 0.125mM。在一个实施方案中,终滴度增加 10-80%。在一个实施方案中,终滴度增加 20-60%。在一个实施方案中,终滴度增加 35-55%。在一个实施方案中,终滴度增加 40%。在一个实施方案中,通过添加 0.1mM 至 10mM 浓度的 N-乙酰半胱氨酸达到改良的细胞培养物寿命。在一个实施方案中,细胞培养物寿命增加 5-50%。

[0140] 本发明也提供通过增加终滴度增加 CHO 细胞系生产 IgG1 抗体的生产率的细胞培养基,其包含:SR-371;和丁酸钠。在一个实施方案中,IgG1 抗体为抗 -IL-18。在一个实施方案中,通过增加 10-80%的终抗 -IL-18 滴度测量生产率增加。在一个实施方案中,通过增加 20-60%的终抗 -IL-18 滴度测量生产率增加。在一个实施方案中,通过增加 35-55%的终抗 -IL-18 滴度测量生产率增加。在一个实施方案中,通过增加 40%的最终抗 -IL-18 滴度测量生产率增加。在一个实施方案中,所添加的丁酸钠浓度为 0.125mM 至 8.0mM。在一个实施方案中,所添加丁酸钠的浓度为 0.2mM 至 3.0mM。在一个实施方案中,所添加丁酸钠的浓度为 0.3mM 至 2.0mM。在一个实施方案中,所添加丁酸钠的浓度为 0.125mM。在一个实施方案中,所添加 N-乙酰半胱氨酸的浓度为 0mM 至 10mM。在一个实施方案中,所添加 N-乙酰半胱氨酸的浓度为 5mM 至 10mM。在一个实施方案中,平均终滴度增加 5-50%。在一个实施方案中,平均终滴度增加 15-35%。在一个实施方案中,平均终滴度增加 25-35%。

[0141] 附图简述

[0142] 图 1 图解描述了作为接种活细胞密度的函数的 ABT-874 生长滴度。第 15 日的滴度结果与补料活细胞密度强烈相关。对以上数据的多项式拟合 (polynomial fit) 表明最佳补料密度约为每毫升 3.5×10^6 个细胞。过程参数为 pH = 6.9 ; T = 35°C ; DO = 40% ; 4X 培养基中的接种比率为 1 : 5 或 1 : 4 ; 在特定密度下以初始体积 1% 开始补料历时 10 天。

[0143] 发明详述

[0144] I. 定义

[0145] 尽管本申请案中所使用的术语为本领域的标准术语,但本文中提供某些术语的定义以确保申请专利范围含义的清晰性和确定性。

[0146] 如本文所使用,术语“抗体”意指包含由四条多肽链组成的免疫球蛋白分子,其中两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链以双硫键互联。各重链由重链可变区 (本文中缩写为 HCVR 或 VH) 和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域组成,CH1、CH2 和 CH3。各轻链由轻链可变区 (本文中缩写为 LCVR 或 VL) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。可将 VH 及 VL 区进一步细分为高变区 (称作互补决定区 (CDR)), 其与称作骨架区 (FR) 的更保守区域散布。各 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成,其按照以下次序自氨基端至羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。可使用本发明方法及组合物生产的抗体实例包括肿瘤坏死因子 (TNF)- α 抗体 (也称作抗 -TNF α 抗体)、白介素 (IL)-12 抗体 (也称作抗 -IL-12 抗体)、白介素 (IL)-18 抗体 (也称作抗 -IL 18 抗体) 和 EP0/R 抗体 (本文中一称作抗 -EP0/R 抗体)。可使用本发明生产 TNF α 抗体更详细地描述于美国专利第 6090382 号、第 6258562 号和第 6509015 号中,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0147] 本发明也可用于生产抗体片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段” (或简单地“抗体部分”) 指保留了与抗原 (例如 hTNF α) 结合的能力和特

异性的抗体的一个或多个片段。已显示 全长抗体片段可执行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合部分”涵盖的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 由 VL、VH、CL 及 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 包含在铰链区由双硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) 由 VH 及 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段; (v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) *Nature* 341 :544-546), 其由 VH 或 VL 结构域组成; (vi) 分离的互补决定区 (CDR); 及 (vii) 双重可变结构域 (DVD) 抗体。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 (VL 和 VH) 由分离基因编码, 但可使用重组方法通过合成接头使它们接合, 该合成接头使其能够成为单一蛋白链, 其中 VL 与 VH 区配对以形成单价分子 (称作单链 Fv (scFv); 参见, 例如 Bird 等, (1988) *Science* 242 :423-426; 及 Huston 等, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879-5883)。该等单链抗体也涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”中。也涵盖其他形式的单链抗体, 例如双功能抗体。双功能抗体为二价双特异性抗体, 其中 VH 及 VL 结构域表达于单一多肽链上, 但使用因过短而不允许两个结构域在同一个链上配对的接头, 藉此迫使该等结构域与另一条链的互补结构域配对且产生两个抗原结合位点 (参见例如 Holliger 等, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :6444-6448; Poljak 等, (1994) *Structure* 2 :1121-1123)。可通过本发明方法生产的抗体部分的实例更详细地描述于美国专利第 6090382 号、第 6258562 号、第 6509015 号, 其各自以全文引用的方式并入本文。使用本发明方法及组合物生产的抗体片段或部分也包括于本发明范畴内。

[0148] 如本文所用, 术语“重组人抗体”意欲包括通过重组方式制备、表述、生产或分离的所有人抗体, 例如使用转染至宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体; 自重组、组合人类抗体库 (下文进一步描述) 分离的抗体; 自转移了人类免疫球蛋白基因的动物 (例如小鼠) 分离的抗体 (参见例如 Taylor 等, (1992) *Nucl. Acids Res.* 20 :6287); 或通过涉及将人类免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列的任何其他方式制备、表达、生产或分离的抗体。该等重组人类抗体具有衍生自人类生殖系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。然而, 在某些实施方案中, 体外诱变该等重组人类抗体 (或当使用转移了人类 Ig 序列的动物时, 体内体细胞诱变) 且因此, 重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列为尽管衍生自人类生殖系 VH 和 VL 序列且与其相关, 但可能并非天然存在于体内人类抗体生殖系谱系中的序列。

[0149] 如本文所用, “经分离抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体 (例如特异性结合至 hTNF α 的经分离抗体基本上不含特异性结合除 hTNF α 以外的抗原的抗体)。然而, 特异性结合 hTNF α 的经分离抗体可与其他抗原 (例如来自其他物种的 TNF α 分子) 具有交叉反应性。此外, 经分离抗体可基本上不含其他细胞材料和 / 或化学物质。

[0150] 术语“基础培养基”指能够支撑细胞生长的任何培养基。基础培养基供应标准无机盐, 例如锌、铁、镁、钙和钾, 以及微量元素、维生素、能量来源、缓冲剂系统和必需氨基酸。基础培养基的实例包括但不限于达氏经修饰伊氏培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM)、DME/F12、极限必需培养基 (MEM)、基础培养基 Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -极限必需培养基 (α -MEM)、Glasgow 氏极限必需培养基 (G-MEM)、PF CHO (SAFC Biosciences) 和 Iscove 氏经修饰杜氏培养基。

[0151] 如本文所使用, 术语“经修饰基础培养基”指排除、减低或增加至少一种标准成份、组份或养分 (即本领域已知的经典配方基础培养基中发现的至少一种成份、组份或养

分)的基础培养基。如“经修饰基础培养基”的上下文中所用的术语“经修饰”也可指基础培养基内个别组份之间比例的变化。在本发明的优选实施方案中,经修饰基础培养基排除至少一种以下组份:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸钠(磷酸二氢钠及/或磷酸氢二钠)、渗透压调节剂、表面活性剂和葡萄糖,例如单糖葡萄糖。

[0152] 如本文所使用,术语“细胞培养基”、“培养基”和“培养基配方”指使细胞在多细胞生物体或组织外部的人造体外环境中维持、生长、繁殖或扩增的营养溶液。可优化细胞培养基以用于特定细胞培养用途,该细胞培养基包括,例如,经配制以促进细胞生长的细胞培养生长培养基或经配制以促进重组蛋白生产的细胞培养生产培养基。术语养分、成份和组份可于本文中互换使用,指构成细胞培养基的组成成分。

[0153] 如本文所使用,术语“细胞培养生产培养基”或“生产培养基”指经设计用于细胞培养物生产期的细胞培养基。在优选的实施方案中,生产培养基经设计用于生产期中的重组蛋白表达。本文(包括实施例部分的表 2-7)提供生产培养基的实例。

[0154] 如本文所使用,术语“分批补料细胞培养”和“分批补料培养”指起初向培养容器中供应细胞(优选哺乳动物细胞)和培养基并在培养期间连续或以离散增量向培养物中补入附加培养养分,在培养终止前具有或不具有周期细胞和/或产物收集的细胞培养。

[0155] “分批补料方法”指向分批补料细胞培养物中供应附加养分的方法。举例而言,分批补料方法可包含根据预定补料程序在给定时段内添加补充培养基。

[0156] 如本文所使用,术语“补料”指接种后向培养物中进行的任何物质的任何添加。补料可为一或多次添加。

[0157] 如本文所使用,术语“补料溶液”、“补料培养基”和“补入培养基”指含有在接种后某时起始向培养物中添加的一种或多种养分的培养基。在一个实施方案中,补料溶液为包含下列各物质的组合补料:基础培养基和至少一种水解产物,例如大豆源水解产物、酵母源水解产物或两种类型水解产物的组合。在本发明的另一个实施方案中,补料溶液可仅包括基础培养基,例如浓缩基础培养基,或可仅包括水解产物或浓缩水解产物。

[0158] 如本文所使用,术语“反馈控制系统”指监控给定参数的方法,藉此添加附加试剂或进行细胞培养物的环境修饰以满足所需参数设定点。在一个实施方案中,所给定参数为哺乳动物细胞培养物的葡萄糖含量,藉此使用葡萄糖含量来确定应于何时将补料溶液(例如组合补料溶液)添加至细胞培养物中。可使用反馈控制系统维持使哺乳动物细胞培养物中蛋白生产最佳化所需要的营养组份。

[0159] 如本文所使用,术语“补料曲线”指以补料溶液(例如组合补料溶液)补充哺乳动物细胞培养物的时间表。优选使用反馈控制系统产生补料曲线。

[0160] 可使用“基因工程”方法(例如用重组病毒进行病毒感染、转染、转化或电穿孔)使细胞经“基因工程设计”以在将允许表达多肽的重组核酸序列导入细胞时表达特定多肽或蛋白。参见,例如 Kaufman 等,(1990),Meth.Enzymol. 185:487-511;Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等编辑(Wiley & Sons, New York, 1988,且每季更新)。用于表达相关蛋白的基因工程细胞和/或细胞系的方法和载体为本领域技术人员熟知。基因工程技术包括但不限于表达载体、靶向同源重组和基因活化(参见,例如 Chappel,美国专利第 5272071 号)以及通过基因工程转录因子进行的转录活化(参见,例如 Segal 等,1999,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(6):2758-63)。多肽任选在异源控制元件

(例如天然状态不引导该多肽生产的启动子)控制下表达。举例而言,启动子可为引导哺乳动物多肽表达的强病毒启动子(例如 CMV,SV40)。宿主细胞可或不可正常生产该多肽。举例而言,宿主细胞可为经基因工程设计以生产人类多肽的 CHO 细胞,意指已将编码人类多肽的核酸导入 CHO 细胞中。

[0161] 或者,宿主细胞可为经基因工程设计以生产水平增加的通常仅以极低含量存在的人类多肽(例如通过用强病毒启动子替代内源性启动子)的人类细胞。

[0162] 如本文所使用,“生长期”指经培养细胞快速分裂并且数量增加的时段。在生长期中,一般可在培养基中和经设计以使细胞增殖最大化的条件下培养细胞。

[0163] 术语“水解产物”包括任何酶消化物,尤其是通过用至少一种能够使物质组份分解为简单形式(例如分解为包含单糖或双糖和/或单肽、二肽或三肽的制剂)的酶处理待萃取物质(例如植物组份或酵母细胞)而制备的特定类型的萃取物。“水解产物”可进一步被酶消化,例如木瓜酶,和/或由自体分解、热解和/或胞浆溶解形成。在本发明的优选实施方案中,水解产物并非由动物来源制备,即非动物源。优选的非动物源水解产物实例包括植物源水解产物,例如大豆源水解产物,及既非衍生自植物也非衍生自动物来源的水解产物,例如酵母源水解产物。

[0164] 术语“水解产物富集溶液”和“水解产物富集培养基”指含有水解产物或水解产物组合(即自不同来源萃取的水解产物)作为添加至细胞培养物中的主要成份的培养基。例如,可将水解产物富集溶液添加至细胞培养物中以增强蛋白生产。类似地,术语“基础富集溶液”和“基础富集培养基”指含有基础培养基(或基础培养基组合)作为主要成份的培养基。在一个实施方案中,将水解产物富集溶液或基础富集溶液或两种富集溶液的组合添加至细胞培养物中以增加细胞培养物在蛋白生产中的生产率。

[0165] 如果在含有附加试剂或改变的蛋白生产工艺参数的培养物中生产的多肽量超过在不含有附加试剂或改变的蛋白生产工艺参数的相同培养物中生产的多肽量,则通过添加附加试剂或改变蛋白生产工艺的参数“增加”了蛋白生产。改变蛋白生产工艺的实例包括但不限于添加培养基添加剂,增加补充培养基的量,变化培养温度及细胞培养的氧浓度。可使用补充溶液(例如补料溶液)向细胞培养物提供附加试剂。

[0166] 术语“成份”指任何可用于细胞培养基中以维持或促进细胞增殖增长的化合物(无论其为化学来源或生物来源)。术语“组份”、“养分”及“成份”可交替使用且均意指该类化合物。用于细胞培养基的典型成份包括氨基酸、盐、金属、糖、脂质、核酸、激素、维生素、脂肪酸、蛋白及其类似物。促进或维持细胞离体培养的其他成份可由本领域技术人员在本发明范畴内根据特定需要加以选择。

[0167] 如本文所使用,术语“接种”指向培养基中添加细胞以起始培养。

[0168] “生产期”指细胞生产最大量的重组多肽或蛋白的时段。生产期的特征在于细胞分裂少于生长期中的细胞分裂,且也包括使用经设计以使多肽生产最大化的培养基和培养条件。

[0169] “重组多肽”或“重组蛋白”为由基因工程方法生产的多肽或蛋白。在优选的实施方案中,通过在细胞培养物中培养表达该类蛋白的细胞获得重组蛋白。

[0170] “过渡期”意指“生长期”与“生产期”之间的细胞培养时段。在过渡期中,可将培养基和环境条件由经设计以使增殖最大化的培养基和条件转变为经设计以使多肽生

产最大化的培养基和条件。

[0171] 本发明提供通过哺乳动物（例如中国仓鼠卵巢（CHO））细胞培养物生产蛋白（优选重组蛋白，例如抗体）的新颖组合物和方法。本文所述的细胞培养基及方法已用于重组蛋白生产，尤其是重组（完全人类、人源化或嵌合）单克隆抗体的生产。培养基和方法已经多种抗体产品修饰以并入可增加哺乳动物（例如 CHO）细胞的生长和生产率的各种改良和进步。下文详细提供本发明的改良组合物和方法的各方面。

[0172] II. 所关注蛋白

[0173] 一般而言，本发明方法和组合物适用于生产重组蛋白。重组蛋白为通过基因工程方法生产的蛋白。根据本发明方法和组合物生产的尤其优选蛋白为以蛋白为主的治疗剂，也称作生物制品。优选地，该蛋白作为细胞外产物分泌。

[0174] 可使用本发明方法和组合物生产的蛋白包括但不限于抗体或其片段。可通过本领域中已知的许多技术来操做编码免疫球蛋白分子的 DNA 以产生能够编码重组蛋白（例如单链抗体、亲和力增强的抗体或其他以抗体为主的多肽）的 DNA（参见，例如 Larrick 等，1989, *Biotechnology* 7:934-938; Reichmann 等，1988, *Nature* 332:323-327; Roberts 等，1987, *Nature* 328:731-734; Verhoeyen 等，1988, *Science* 239:1534-1536; Chaudhary 等，1989, *Nature* 339:394-397，均以参考形式并于本文）。生产完全人类抗体（例如使用转殖基因动物制备，且任选在活体外进一步修饰者）以及人源化抗体的重组细胞也可用于本发明。术语人源化抗体也涵盖单链抗体。参见，例如 Cabilly 等，美国专利第 4816567 号；Cabilly 等，欧洲专利第 0125023 B1 号；Boss 等，美国专利第 4816397 号；Boss 等，欧洲专利第 0120694B1 号；Neuberger, M. S. 等，WO 86/01533；Neuberger, M. S. 等，欧洲专利第 0194276B1 号；Winter, 美国专利第 5225539 号；Winter, 欧洲专利第 0239400B1 号；Queen 等，欧洲专利第 0451216B1 号；及 Padlan, E. A. 等，EP0519596A1，均以参考形式并于本文。举例而言，本发明可用于生产免疫特异性辨识特异细胞靶标的人类和 / 或人源化抗体，该类特异细胞靶标例如任一上述蛋白、人类 EGF 受体、her-2/neu 抗原、CEA 抗原、前列腺特异性膜抗原（PSMA）、CD5、CD11a、CD18、NGF、CD20、CD45、CD52、Ep-cam、其他癌细胞表面分子、TNF α 、TGF- β 1、VEGF、其他细胞因子、 α 4 β 7 整合素（integrin）、IgE、病毒蛋白（例如巨细胞病毒）。可使用本发明组合物和方法生产的抗体的实例包括但不限于抗 -TNF α 抗体、抗 -IL-12 抗体、抗 -IL-18 抗体和抗 -EPO 受体（EPO-R）抗体。在一个实施方案中，抗 -TNF α 抗体为完全人类抗 -TNF α 抗体，例如阿达木单抗 /D2E7（参见美国专利第 6090382 号，其以参考的方式并于本文；**Humira®**；Abbott Laboratories）。在一个实施方案中，抗 -IL-12 抗体为完全人类抗 -IL-12 抗体，例如 ABT-874（Abbott Laboratories；参见美国专利第 6914128 号，其以参考方式并于本文）。在一个实施方案中，抗 -IL-18 抗体为完全人类 -IL-18 抗体（例如 ABT-325），例如也可参见 US 20050147610A1 中描述的抗体。在一个实施方案中，抗 -EPO/R（亦称作 ABT-007）抗体为完全人类抗体，如以引用的方式并入本文的美国专利公开案第 US 20060018902A1 号中所描述者。

[0175] 可使用本发明方法和组合物生产的蛋白类型的另一实例包括融合蛋白。融合蛋白为融合至异源蛋白或肽的蛋白或结构域或蛋白（例如可溶性胞外结构域）。该类融合蛋白的实例包括以含有免疫球蛋白分子部分的融合物表达的蛋白；以含有拉链部分的融合蛋白表达的蛋白；及新颖多功能蛋白，例如细胞因子和生长因子融合蛋白（即 GM-CSF 及

IL-3、MGF 及 IL-3)。WO 93/08207 及 WO 96/40918 描述了被称作 CD40L 的分子各种可溶性寡聚物形式的制备,分别包括免疫球蛋白融合蛋白和拉链融合蛋白;其中所论述的技术可应用于其他蛋白。另一种融合蛋白为重组 TNFR:Fc,也称作依那西普(entanercept)。依那西普(或 **Enbrel®**; Amgen/Wyeth)为 p75 TNF α 受体胞外部分的两个分子的二聚体,各分子由融合至人类 IgG1 的 232 氨基酸 Fc 部分的 235 氨基酸 TNFR 衍生的多肽组成。实际上,任何分子均可表现为融合蛋白,包括但不限于细胞受体分子的胞外结构域、酶、激素、细胞激素、免疫球蛋白分子部分、拉链结构域和表位。

[0176] III. 本发明的细胞培养基

[0177] 本发明提供用于生产或表达重组蛋白(例如抗体)的哺乳动物细胞培养的细胞培养基。本文所述各种细胞培养基可独立或共同地用于改良细胞培养,包括增加蛋白生产和延长细胞寿命。

[0178] 在优选的实施方案中,本发明的细胞培养基为无血清的,意指培养基不含血清(例如胎牛血清(FBS)、马血清、山羊血清或本领域技术人员已知的其它衍生自动物的血清)。

[0179] 在第一方面,本发明提供包括全部或部分经修饰基础培养基的哺乳动物细胞培养基。经修饰基本细胞培养基可衍生自本领域已知的标准基础细胞培养基。适当的基础培养基包括但不限于杜氏经修饰伊氏培养基(DMEM)、DME/F12、极限必需培养基(MEM)、基础培养基 Eagle(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -极限必需培养基(α -MEM)、Glasgow 氏极限必需培养基(G-MEM)、PF CHO 及 Iscove 氏经修饰杜氏培养基。可用于本发明的基础培养基的其他实例包括 BME 基础培养基(Gibco-Invitrogen;也可参见 Eagle, H(1965)Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89,36);杜氏经修饰 Eagle 培养基(DMEM,粉末)(Gibco-Invitrogen(#31600);也可参见 Dulbecco and Freeman(1959)Virology 8,396; Smith 等(1960)Virology 12,185. Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6:2, 93);CMRL 1066 培养基(Gibco-Invitrogen(#11530);也可参见 Parker R. C. 等(1957)Special Publications, N.Y. Academy of Sciences, 5,303)。

[0180] 可修饰基础培养基以移除存在于标准基础培养基中的特定非营养组份,例如各种无机和有机缓冲剂、表面活性剂和氯化钠。如本文所述,从基础细胞培养基移除该类组份可使剩余营养组份的浓度增加并改良总细胞生长和蛋白表达。此外,根据细胞培养条件的要求可将省略的组份添加回含有经修饰基础细胞培养基的细胞培养基中。如下所述,已发现从基础细胞培养基分离特定成份(即添加经修饰基础细胞培养基作为细胞培养基中的成份),且随后将成份添加回细胞培养基中作为分离成份会提供对细胞培养物生长和蛋白生产有利的特性。

[0181] 本发明的经修饰基础培养基排除任何(或所有)以下成份:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖。这些成份常见于市售基础细胞培养基中。

[0182] 可通过市售培养基服务(例如 SAFC Pharma™)完成组份(例如碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和/或单糖葡萄糖)的排除。本领域技术人员将了解在一个实施方案中可使用市售细胞培养基服务(即定制培养基服务)获得经修饰基础培养基。定制培养基服务的实例可由以下公司提供:例如,SAFC(原 JRH

Bioscience)、Invitrogen®、Atlanta Biologicals®及 Lonza。

[0183] 或者,本领域普通技术人员可根据制造基础细胞培养基的标准方法制备本发明经修饰基础细胞培养基,其中省略了本文所述的特定成份(参见例如 Freshney (2005) Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique;BD Bionutrients Technical Manual, (2006), 第三版;Jenkins 编辑 (1999), Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Humana Press;Doyle and Griffiths 编辑, (1997) Essential Techniques: Mammalian Cell Culture, John Wiley and Sons;Butler 编辑 (1991) Mammalian Cell Biotechnology:A Practical Approach Oxford University Press;Darling 及 Morgan (1994) Animal Cells: Culture and Media, John Wiley and Sons;Freshney 编辑 (1992), Animal Cell Culture:A Practical Approach (第 2 版), Oxford University Press;Pollard 及 Walker (1997), Basic Cell Culture Protocols (第 2 版), Humana Press, (Part of the Methods in Molecular Biology series, 第 75 卷), 其各以参考形式并于本文)。

[0184] 在一个实施方案中,本发明的细胞培养基含有经修饰的基础细胞培养基;铁来源(优选为无机的,例如柠檬酸铁);重组生长因子;缓冲剂;表面活性剂;渗透压调节剂;能量来源;及至少两种不同的非动物水解产物。此外,经修饰的基础细胞培养基任选可含有氨基酸、维生素或氨基酸与维生素的组合。

[0185] 如本文所使用,术语“铁”意指用以补充培养基的衍生自非动物的铁来源。细胞培养基中的铁来源优选为无机的。铁来源优选为无机的且包括(例如)铁盐和亚铁盐,例如柠檬酸铁或硫酸亚铁。优选螯合盐,例如柠檬酸铁和柠檬酸铁铵。然而,也可使用并非自动物来源分离的其他铁来源,例如提供等量铁的化学铁螯合剂或重组蛋白铁载剂。可使用的铁螯合化合物包括但不限于铁螯合剂乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-双(β-氨基乙醚)-N,N',N'-四乙酸(EGTA)、甲磺酸去铁胺、二巯基丙醇、二乙撑三胺五乙酸(DPTA)和反-1,2-二氨基环己烷-N,N',N'-四乙酸(CDTA)以及柠檬酸铁螯合剂和硫酸亚铁螯合剂。尤其优选的铁来源为柠檬酸铁,其优选以 0.1-1mM 浓度存在于终体积细胞培养基中。在另一个实施方案中,柠檬酸铁的浓度为 100-150mg/L,例如 122mg/L。上述 mM (例如 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0) 和 mg/L (例如 100、110、120、130、140 和 150) 的中间数也可为本发明的一部分。

[0186] 可包括于细胞培养基中的生长因子的非限制性实例为胰岛素或其重组类似物、IGF-1 及胰岛素与 IGF-1 的组合。尤其优选的重组生长因子为胰岛素或其重组类似物,其优选以约 4mg/L 至 13mg/L 的浓度存在于终体积细胞培养基中。上述胰岛素浓度的中间数也可为本发明的一部分,例如 4.4、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5、12.5 和 13。

[0187] 细胞培养基也可包括缓冲剂。在一个优选的实施方案中,缓冲剂自经修饰的基本细胞培养基中排除而作为分离组份添加至细胞培养基中(也向其中添加经修饰的基础细胞培养基)。用于细胞培养基中的缓冲剂为本领域已知。细胞培养基中可包括的缓冲剂的非限制性实例为磷酸盐缓冲剂、HEPES 和碳酸氢钠。在一个实施方案中,碳酸氢钠作为缓冲剂添加至细胞培养基中,终浓度约 0.1-3g/L。在一个实施方案中,碳酸氢钠作为缓冲剂添加至细胞培养基中,终浓度约 1.6g/L。在一个实施方案中,HEPES 作为缓冲剂添加至细胞培养

基中,终浓度 0.1-3g/L。在另一个实施方案中,HEPES 作为缓冲剂添加至细胞培养基中,终浓度 1.8g/L。在一个实施方案中,将磷酸盐缓冲剂(例如磷酸二氢钠及磷酸氢二钠)添加至细胞培养基中,其终浓度介于 0.01 与 0.5g/L 之间。上述浓度的中间数也为本发明的一部分,例如碳酸氢钠或 HEPES 的浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、2.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 和 3.0 或磷酸盐缓冲剂的浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.12、0.14、0.16、0.18、0.2、0.22、0.24、0.26、0.28、0.3、0.32、0.36、0.38、0.4、0.42、0.44、0.46、0.48 和 0.5g/L。

[0188] 包括缓冲剂以帮助将细胞培养基维持在期望的 pH。在一个实施方案中,细胞培养基的 pH 在 6.0 至 8.0、6.5 至 7.5、及 7.1 至 7.2 之范围内。这些 pH 值中间数(例如 6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9 及 8.0) 以及本文所述的所有其他数值也为本发明的一部分。使用任何上述值的组合作为上限和 / 或下限值的范围也包括于本发明范畴内。

[0189] 细胞培养基也可包括渗透压调节剂,例如 NaCl。在一个实施方案中,将 NaCl 添加至细胞培养基中,终浓度在约 1.0 至 6.5g/L 之间。在一个实施方案中,细胞培养基的渗透压在 260 至 450mOsmo/kg 的范围内。在一个实施方案中,细胞培养基的渗透压在 320 至 450mOsmo/kg 的范围内。所述 NaCl 浓度和 mOsmo/kg 值的中间数(例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6 和 6.5 的 NaCl 浓度和 260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450 的 mOsmo/kg 范围)以及本文所述所有其他数值也为本发明的一部分。使用任何上述值的组合作为上限和 / 或下限值的范围也包括于本发明范畴内。

[0190] 本发明的细胞培养基中也可添加能量来源。优选地,能量来源为单糖。可用于细胞培养基中的单糖实例包括葡萄糖(例如 D-葡萄糖)、麦芽糖、甘露糖、半乳糖和果糖。在一个实施方案中,将葡萄糖添加至细胞培养基中,最终浓度约 3.5-7.0g/L。在一个实施方案中,将葡萄糖添加至细胞培养基中,终浓度不大于 7.0g/L。在一个实施方案中,将葡萄糖添加至细胞培养基中,终浓度约 7.0g/L。上述葡萄糖浓度的中间数(例如 3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.2、5.8、6、6.2、6.4、6.6、6.8 和 7)以及本文所述所有其他数值也为本发明的一部分。使用任何上述值的组合作为上限和 / 或下限值的范围也包括于本发明范畴内。

[0191] 本发明细胞培养基的一个重要成份为添加的水解产物。本发明的细胞培养基可包括源自单一来源(例如酵母或大豆)的水解产物,或可包括水解产物的组合(例如酵母与和豆源水解产物)。优选地,用于本发明细胞培养基的水解产物为非动物源的。非动物源水解产物的实例包括植物源水解产物和非植物源水解产物,例如酵母源水解产物、Tryprone、酪蛋白水解产物、酵母萃取物、或经木瓜酶消化的大豆蛋白胨。用于本发明培养基的水解产物可商业购买,包括例如来自例如 Quest International, Norwich, N. Y., OrganoTechnie, S. A. France, Deutsche Hefewerke GmbH, Germany, 或 DMV Intl. Delhi, N. Y. 来源的 HyPep 1510. RTM.、Hy-Soy. RTM.、Hy-Yeast 412. RTM. 和 Hi-Yeast444. RTM.。酵母萃取物和大豆水解产物的来源公开于 WO 98/15614、WO 00/03000、WO 01/23527 和美国专利第 5741705 号中。也可用于本发明的酵母源水解产物的实例包括 TC 酵母粉(BD

Diagnostic) 和酵母粉 UF(SAFC Biosciences), 而植物源水解产物的实例包括大豆水解产物 UF(SAFC Biosciences) 和 **HyQ®**大豆水解产物 (HyClone Media)。

[0192] 在一个实施方案中, 本发明的细胞培养基进一步包括谷氨酰胺, 例如 L- 谷氨酰胺。L- 谷氨酰胺的适当来源可为各种商业来源, 例如 Gibco(目录号 25030-081)。

[0193] 本发明的细胞培养基(包括下文实例部分描述的细胞培养基) 可任选包括甲氨喋呤。在用于培养 CHO 细胞的细胞培养基中, 甲氨喋呤用量的实例包括约 100nM 至 5000nM 甲氨喋呤。上述甲氨喋呤摩尔浓度的中间数(例如 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800 和 500nM) 以及其他中间数也为本发明的一部分。使用任何上述值的组合作为上限和 / 或下限值的范围也包括于本发明范畴内。

[0194] 在大规模生物反应器中, CHO 细胞特别易受容器内气体喷射和叶轮混合所产生的剪切力的影响。因此, 本发明的细胞培养基也可任选包括细胞保护剂。如本文所使用, 术语“细胞保护剂”意指保护真核细胞免受损害的物质。例如, 该损害可由剪切力或生物反应容器中的气泡喷射效应引起。为使细胞损害的发生降至最低, 培养基最好含有细胞保护剂, 例如甲基纤维素、聚乙二醇、聚乙烯醇或 pluronic 多元醇。其中, 优选 Pluronic. RTM. (多元醇, BASF Wyandotte Corp.) 多元醇 F68, 因为其不像聚乙烯醇, 其为无毒物质且不像聚乙二醇, 其并不干扰下游纯化。

[0195] 本发明的细胞培养基也可包括非铁金属离子。非铁金属离子的实例包括但不限于氯化物和硫酸盐、钾、镁、铜、硒、锌、镍、锰、锡、镉、钼酸盐、钒酸盐和硅酸盐。

[0196] 本发明的细胞培养基也可包括维生素和酶辅因子。该类维生素和酶辅因子的实例包括但不限于 PABA(对氨基苯甲酸)、维生素 K(生物素)、维生素 B5(D- 泛酸钙)、叶酸、内消旋肌醇、烟酰胺(菸酸酰胺)、维生素 B6(盐酸吡多辛 (PyridoxineHCl))(及盐酸吡哆醛 (PyridoxalHCl))、维生素 B2(核黄素)、维生素 B1(硫胺素) 和维生素 B12(氰钴胺素 (cyanocobalamin))。或者, 可向培养基中添加维生素 C(L- 抗坏血酸)。也可添加氯化胆碱, 通常认为其为维生素但也可作为脂质因子。

[0197] 此外, 本发明的细胞培养基也可包括脂质样因子。脂质因子的实例包括氯化胆碱和磷脂酰胆碱。也可包括脂质生产助剂, 例如醇胺(例如乙醇胺)。

[0198] 在本发明的方法和组合物中, 优选在无血清培养基中培养细胞。应用于培养基的术语“无血清”包括不含有血清(例如胎牛血清) 的任何哺乳动物细胞培养基。

[0199] 本发明范畴内也包括本文所述的任何改良细胞培养基中的哺乳动物细胞, 例如 CHO 细胞。

[0200] 在本发明的一方面提供为生产特定抗体而优化的细胞培养基配方。优选配方的实例包括用于表达下列抗体的 CHO 细胞生长或蛋白生产的细胞培养基: 抗-TNF α 抗体、抗-IL-12 抗体、抗-IL-18 抗体和抗-EPO 受体 (EPO-R) 抗体。

[0201] 本发明中包括表达抗-TNF α 抗体(包括完全人类抗-TNF α 抗体) 的哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞) 的细胞培养基。在优选的实施方案中, 完全人类抗-TNF α 抗体为阿达木单抗(也称作 D2E7 及 **Humira®**: Abbott Laboratories)。阿达木单抗(包括核酸和氨基酸序列) 的特征描述于美国专利第 6090382 中, 其以参考形式并入本文。可通过在细胞培养生长培养基中培养包含编码蛋白(例如阿达木单抗) 的核酸的哺乳动物细胞(例如 CHO

细胞),将细胞培养物转移至细胞培养生产培养基中且将蛋白从细胞培养生产培养基中分离生产阿达木单抗。

[0202] 在一个实施方案中,本发明提供为包含编码阿达木单抗的核酸的 CHO 细胞而优化的细胞培养生长培养基。为表达阿达木单抗的 CHO 细胞而优化的无血清细胞培养生长培养基的配方包括:基础培养基;柠檬酸铁(例如约 8–12ml/kg,约 10.0ml/kg 或 122mg/L);重组人胰岛素(例如约 2–6mg/kg,约 4.0mg/kg);无水葡萄糖(例如约 2–5mg/kg,约 3.5g/kg);L-谷氨酰胺(例如约 0.29g/kg);碳酸氢钠(例如约 1.6g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.03g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.43 至 0.44g/kg);及酵母源水解产物(例如约 2.0g/kg)。为表达阿达木单抗的 CHO 细胞而优化的无血清细胞培养生长培养基的另一实例包括以下成份:排除下列组份的经修饰基础培养基:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖;柠檬酸铁(例如约 10.0ml/kg 或 122.45mg/kg);重组人胰岛素(例如约 3.8 至 3.9mL/kg 或 7.8mg/kg);无水葡萄糖(例如约 7.0g/kg);L-谷氨酰胺(例如约 0.8 至 0.9g/kg);碳酸氢钠(例如约 1.6g/kg);HEPES(例如约 1.8g/kg);NaCl(例如约 2.6 至 2.7g/kg);Pluronic F-68(例如约 1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.03 至 0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.43 至 0.44g/kg);L-天冬酰胺一水合物(例如约 0.45g/kg);酵母源水解产物(例如约 4.0g/kg);及植物源水解产物(例如约 2.6g/kg)。表达阿达木单抗的细胞培养生长培养基可进一步包括甲氨喋呤,例如约 2.50mL/kg。

[0203] 在一个实施方案中,本发明提供为表达抗体(包括,例如,人类抗-TNF α 抗体(例如阿达木单抗)或红细胞生成素受体(EPO/R)抗体)的 CHO 细胞而优化的细胞培养生产培养基。抗-EPO/R 抗体的实例描述于美国专利公开案第 20040071694 号中,其以参考形式并于本文。为表达抗体(例如阿达木单抗或抗-EPO/R 抗体)的 CHO 细胞而优化的无血清细胞培养生产培养基配方包括:排除下列组份的经修饰基础培养基:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖;柠檬酸铁(例如约 10.0ml/kg 或 122.45mg/L);重组人胰岛素(例如约 6.0mL/kg 或 12mg/kg);无水葡萄糖(例如约 7.0g/kg);L-谷氨酰胺(例如约 0.58 至 0.59g/kg);碳酸氢钠(例如约 1.6g/kg);HEPES(例如约 1.8g/kg);NaCl(例如约 2.4 至 2.5g/kg);Pluronic F-68(例如约 1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.03 至 0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.43 至 0.44g/kg);酵母源水解产物(例如约 10.7g/kg);及植物源水解产物(例如约 6.9 至 7.0g/kg)。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基具有介于约 7.1 至 7.2 范围内的 pH 值及介于 373 至 403mOsm/kg 范围内的渗透压。

[0204] 本发明的另一方面涉及使由 CHO 细胞生产的抗-白介素-12(IL-12)抗体(例如完全人类 IL-12 抗体)的生产最优化的细胞培养基。在优选的实施方案中,完全人类抗-IL12 抗体为 ABT-874。ABT-874(包括核酸和氨基酸序列)的特点描述于美国专利第 6914128 号中,其以参考文献的形式并于本文。

[0205] 在一个实施方案中,为表达 ABT-874 的 CHO 细胞生长而优化的无血清细胞培养生长培养基包括下列各物质:排除下列组份的经修饰基础培养基:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖;柠檬酸铁(例如约 10ml/kg 或 122.45mg/L);重组人胰岛素(例如约 3.8 至 3.9mL/kg 或 7.8mg/kg);无水葡萄糖(例如约 7.0g/kg);L-谷氨酰胺(例如约 0.87 至 0.88g/kg);L-天冬酰胺一水合物(例如约

0.45g/kg);碳酸氢钠(例如约1.6g/kg);HEPES(例如约1.8g/kg);NaCl(例如约2.67至2.68g/kg);约PluronicF-68(例如1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约0.03至0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约0.43至0.44g/kg);酵母源水解产物(例如约4.0g/kg);及植物源水解产物(例如约2.6g/kg)。

[0206] 在一个实施方案中,用于表达ABT-874的无血清细胞培养生产培养基包括下列各物:维生素含量降低且排除下列组份的经修饰基础培养基:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖;柠檬酸铁(例如约10ml/kg或122.45mg/L);重组人胰岛素(例如约6.5mL/kg或13mg/kg);无水葡萄糖(例如约7.0g/kg);L-谷氨酰胺(例如约0.58至0.59g/kg);碳酸氢钠(例如约1.6g/kg);HEPES(例如约1.8g/kg);NaCl(例如约2.45g/kg);PluronicF-68(例如约1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约0.03至0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约0.43至0.44g/kg);酵母源水解产物(例如约10.7g/kg);及植物源水解产物(例如约6.9至7.0g/kg)。

[0207] 在一个实施方案中,本发明提供表达抗体(例如抗-IL12及抗-EP0/R抗体)的CHO细胞的无血清细胞培养生长培养基,其包含下列各物质:基础培养基;柠檬酸铁(例如约10ml/kg或122.45mg/L);重组人胰岛素(例如约4mg/kg);无水葡萄糖(例如约1.5g/kg);L-谷氨酰胺(例如约0.29至0.30g/kg);碳酸氢钠(例如约1.6g/kg);及酵母源水解产物(例如至少约2g/kg)。在一个实施方案中,表达抗体(例如抗-IL-12及抗-EP0/R抗体)的CHO细胞的细胞培养生长培养基具有约7.10至7.30的pH值及约300至340mOsm/kg的渗透压。细胞培养基也可含有酵母源水解产物(例如至少约8g/kg)。

[0208] 本发明的另一方面涉及为由CHO细胞生产抗白介素18(IL-18)抗体(例如完全人类IL-18抗体)的生产而优化的细胞培养基。可使用本发明方法和组合物生产的完全人类IL-18抗体的实例描述于PCT公开案WO 01/058956中,其以参考形式并于本文。

[0209] 在一个实施方案中,为CHO细胞中IL-18抗体生产而优化的细胞培养生长培养基包括下列成份:排除下列组份的经修饰基础培养基:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂的单糖葡萄糖;柠檬酸铁(例如约10ml/kg或122.45mg/L);重组人胰岛素(例如约3.8至3.9mL/kg或7.8mg/kg);无水葡萄糖(例如约7.0g/kg);L-谷氨酰胺(例如约0.87至0.88g/kg);L-天冬酰胺一水合物(例如约0.45g/kg);碳酸氢钠(例如约1.6g/kg);HEPES(例如约1.8g/kg);NaCl(例如约2.67g/kg);Pluronic F-68(例如约1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约0.03至0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约0.43至0.44g/kg);酵母源水解产物(例如约4.0g/kg);及植物源水解产物(例如约2.6g/kg)。用于表达完全人类IL-18抗体的细胞生长的细胞培养基可具有7.10至7.20的pH值及373至403mOsm/kg的渗透压。上述数值(例如所述胰岛素、pH或渗透压值)的中间数也为本发明的一部分。

[0210] 为CHO细胞中IL-18抗体生产而优化的细胞培养生产培养基实例包括下列成份:经修饰的基础培养基,其经修饰以去除下列组份:碳酸氢钠、HEPES缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖;柠檬酸铁(例如约10ml/kg或122.45mg/L);重组人胰岛素(例如约6.0mL/kg或12mg/kg);无水葡萄糖(例如约7.0g/kg);L-谷氨酰胺(例如约0.58至0.59g/kg);碳酸氢钠(例如约1.6g/kg);HEPES(例如约1.8g/kg);NaCl(例如约2.45g/kg);PluronicF-68(例如约1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例

如约 0.03 至 0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.43 至 0.44g/kg); 酵母源水解产物 (例如约 10.7g/kg); 及植物源水解产物 (例如约 6.9 至 7.0g/kg)。用于生产完全人类抗 -IL-18 抗体的细胞培养生产培养基的另一实例包括: 排除下列组份的经修饰基础培养基: 碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖; 柠檬酸铁 (例如约 10ml/kg 或 122.45mg/L); 重组人胰岛素 (例如约 6.5mL/kg 或 13mg/kg); 无水葡萄糖 (例如约 7.0g/kg); L- 谷氨酰胺 (例如约 0.58 至 0.59g/kg); 碳酸氢钠 (例如约 1.6g/kg); HEPES (例如约 1.8g/kg); NaCl (例如约 2.45g/kg); Pluronic F-68 (例如约 1.0g/kg); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.03 至 0.04g/kg); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如约 0.43 至 0.44g/kg); 酵母源水解产物 (例如约 14.2 至 14.3g/kg); 及植物源水解产物 (例如约 9.2 至 9.3g/kg)。生产完全人类 IL-18 抗体的 CHO 细胞的细胞培养基可具有 7.10 至 7.20 的 pH 值及 373 至 403mOsm/kg 的渗透压。上述数值 (例如所述胰岛素、pH 或渗透压值) 的中间数也为本发明的一部分。

[0211] 除实施例部分所述的示例性培养基以外, 下文也描述了与改良抗体生产分批补料方法和补充培养基相关的本发明范畴内的培养基的其它实例。

[0212] 本发明培养基可用于通过使培养基或其组份与所有或部分细胞群接触来实现适当细胞培养。可通过混合、添加、组合、接种或搅拌一或多种细胞与一或多种化合物、溶液、培养基等而使培养基与细胞接触。亦可通过 (例如) “补料” 以替代或补充下文更详细描述的培养细胞的培养基而使培养基与细胞一次性、以增量形式或以逐步方式接触。

[0213] IV. 用于改良蛋白生产的方法和组合物

[0214] 本发明方法或组合物涉及哺乳动物细胞培养。在一个实施方案中, 所使用的哺乳动物细胞为 CHO 细胞。

[0215] 已描述将 DNA 导入哺乳动物细胞中的既定方法。Kaufman, R. J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, 第 15-69 页。使用市售试剂 (例如阳离子脂质试剂 Lipofectamine™、lipofectamine™-2000 或 lipofectamine™-plus (可购自 Invitrogen)) 的附加方案可用以转染细胞。Feigner 等人 (1987)., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 7413-7417。此外, 用涂渍了核酸的颗粒进行电穿孔或轰击可用以使用程序转染哺乳动物细胞, 例如下列文献中的程序: A Laboratory Manual, 第 2 版, 第 1-3 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 和 Fitzpatrick-McElligott (1992), Biotechnology (NY) 10 (9) : 1036-40。可使用本领域已知方法 (例如对细胞毒性药物的抗性) 进行稳定转化子的选择。Kaufman 等人 ((1990), Meth. Enzymology 185 : 487-511) 描述了若干选择机制, 例如二氢叶酸还原酶 (DHFR) 抗性。DHFR 选择的适当宿主菌株可为缺失 DHFR 的 CHO 菌株 DX-B11。Urlaub 及 Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4216-4220。可将表达 DHFR cDNA 的质粒导入菌株 DX-B11 中且只有含有质粒的细胞可于适当选择培养基中生长。可并入表达载体中的可选择标记的其他实例包括赋予抗生素 (例如 G418 及匀霉素 B) 抗性的 cDNA。可基于对这些化合物的抗性选择含有载体的细胞。

[0216] 已显示可改良哺乳动物表达载体的异源基因表达的附加控制序列包括下列元件: 衍生自 CHO 细胞的表达加强序列元件 (EASE) (Morris 等, Animal Cell Technology, 第 529-534 页 (1997); 美国专利第 6312951B1 号、第 6027915 号和第 6309841B1 号) 及来自腺病毒 2 的三联前导序列 (TPL) 和 VA 基因 RNA (Gingeras 等 (1982), J. Biol. Chem. 257 :

13475-13491)。病毒来源的内部核糖体进入位点(IRES)序列使得双顺反子 mRNA 有效翻译(Oh 和 Sarnow(1993), *Current Opinion in Genetics and Development* 3:295-300; Ramesh 等人(1996), *Nucleic Acids Research* 24:2697-2700)。异源 cDNA 以双顺反子 mRNA 部分(后面为筛选标记的基因(例如 DHFR))表达的部分已显示可改良宿主的转染能力和异种 cDNA 的表达(Kaufman 等人(1990), *Methods in Enzymol.* 185:487-511)。采用双顺反子 mRNA 的示例性表达载体为 Mosser 等, *Biotechniques* 22:150-161(1997) 描述的 pTR-DC/GFP 及 Morris 等, *Animal Cell Technology*, 第 529-534 页(1997) 描述的 p2A5I。

[0217] Mosley 等人已描述了一种可用的高表达载体 pCAVNOT((1989), *Cell* 59:335-348)。可如 Okayama 及 Berg 所公开经((1983), *Mol. Cell. Biol.* 3:280) 构建用于哺乳动物宿主细胞中的其他表达载体。适用在 C127 鼠类乳腺上皮细胞中哺乳动物 cDNA 的稳定高水平表达的系统可大体上如 Cosman 等人所述构建((1986), *Mol. Immunol.* 23:935)。Cosman 等人描述的可用高表达载体 PMLSV N1/N4((1984), *Nature* 312:768) 已保藏为 ATCC 39890。其它可用的哺乳动物表达载体描述于 EP 专利第 -A-0367566 号和 WO 01/27299A1。载体可衍生自反转录病毒。可添加异源信号序列替代天然信号序列, 该类异源信号序列例如以下序列之一: 美国专利第 4965195 号中描述的 IL-7 信号序列; Cosman 等人描述的 IL-2 受体信号序列(*Nature* 312:768(1984)); EP 专利第 0367566 号描述的 IL-4 信号肽序列; 美国专利第 4968607 号中描述的 IL-1 受体型信号肽; 及 EP 专利第 0460846 号中描述的 II 型 IL-1 受体信号肽。

[0218] 可在真核细胞中重组生产多肽且优选由适合于细胞培养物中生长的宿主细胞分泌。用于本发明的宿主细胞优选为哺乳动物细胞。该类细胞也可经基因工程改造表达所关注基因, 可为适合于细胞培养物中生长的哺乳动物生产细胞和/或可为同源细胞株。常用于工业中的该类细胞的实例为 VERO、BHK、HeLa、CV1(包括 Cos)、MDCK、293、3T3、骨髓瘤细胞株(例如 NS0、NS1)、PC12、WI38 细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 该类细胞广泛地用于生产数种复合重组多肽, 例如细胞激素、凝血因子和抗体(Brasel 等(1996), *Blood* 88:2004-2012; Kaufman 等(1988), *J. Biol. Chem.* 263:6352-6362; McKinnon 等(1991), *J. Mol. Endocrinol.* 6:231-239; Wood 等(1990), *J. Immunol.* 145:3011-3016)。缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR)的突变细胞株(Urlaub 等(1980), *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216-4220, 其以参考形式并于本文)DXB11 和 DG-44 为合乎需要的 CHO 宿主细胞株, 因为有效 DHFR 可选择和可扩增基因表达系统使得该类细胞中高水平表达重组多肽(Kaufman R. J. (1990), *Meth Enzymol.* 185:537-566, 其以参考形式并于本文)。此外, 这些细胞易于作为粘附或混悬培养物操纵且显示相对优良的遗传稳定性。CHO 细胞和其中表达的重组多肽已被广泛地特性研究且已经管理机构许可用于临床商业制造。也可使用生产抗体的杂交瘤细胞株实践本发明方法。制造杂交瘤的方法为本领域熟知。参见例如 Berzofsky 等, Paul 编辑, *Fundamental Immunology*, 第 2 版, 第 315-356 页, 347-350, Raven Press Ltd., New York(1989)。衍生自上述细胞系的细胞株也适用于实践本发明。

[0219] 用编码重组蛋白的多聚核苷酸序列转化适当的哺乳动物宿主细胞(例如 CHO 细胞)后, 鉴定并分离显示稳定表达重组蛋白的细胞。可根据本领域的已知方法, 通过将适当 DNA 载体转染至二氢叶酸还原酶缺乏(DHFR-)的中国仓鼠卵巢细胞(CHO AM-1/D, 美国专利第 6210924 号)中, 随后分离且检测显示最高重组蛋白表达的个别纯系而完成重组蛋白的

稳定表达。基于小规模旋转器和较大规模生物反应器中的生长和生产,选择特定细胞株作为生产重组蛋白的细胞株。

[0220] 可通过本领域熟知的方法(例如,通过在不含血清的条件下于96和/或24孔板中进行多轮限制性稀释),使用本发明细胞培养基克隆生产最高含量重组蛋白的细胞。基于各种悬浮容器中的生产和生长特征来选择克隆。可进行酶免疫测定法(EIA)选择生产最高水平重组蛋白的克隆。可通过使克隆在介于100ml至高达3L范围内的各种振荡器或旋转烧瓶及生物反应器中的生长来测量生长特征(包括倍增时间和密度)。选择最佳克隆(例如可在培养物中达到最高密度的最快倍增时间的克隆)且选择其作为用于重组蛋白生产的细胞系。在一个实施方案中,重组蛋白生产用于商业目的且使用大规模生物反应器进行。

[0221] 通常,在组织培养板(例如10cm培养板、96孔培养板等)或其他粘附培养(例如微载体珠)和悬浮培养(例如滚瓶中),在无菌、温度受控和大气条件下进行细胞培养。培养物可在摇瓶、小规模生物反应器和/或大规模生物反应器中生长。生物反应器为用以培养细胞的装置,在生物反应器中可监测、调节并控制环境条件,例如温度、空气、搅拌和/或pH值。本发明方法(包括分批补料方法)和组合物可用于大规模哺乳动物细胞培养,例如10L、11L、12L、13L、14L等。在一个实施方案中,本发明的大规模细胞培养方法和组合物适用于CHO细胞培养和抗体生产。

[0222] 根据本发明,在促进所关注多肽(可为抗体或重组多肽)生产的条件下培养哺乳动物宿主细胞。本领域技术人员可选择使用本文所述的一或多种经研发以使特定培养宿主细胞中的细胞生长、细胞活力和/或重组多肽生产最大化的细胞培养基。或者,本发明方法和组合物可与市售细胞培养基组合使用。

[0223] 哺乳动物细胞的适当培养条件为本领域已知(参见例如Animalcell culture :A Practical Approach, D. Rickwood 编, Oxford university press, New York(1992))且可与本发明的改良方法组合。可以悬浮状态或附著至固体基质上培养哺乳动物细胞。此外,也可(例如)在具有或不具有微载体的流体化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶、摇瓶或搅拌槽生物反应器中培养哺乳动物细胞且以分批、分批补料、连续、半连续或灌注模式进行。

[0224] 根据本发明的方法可用以改良单一阶段和多阶段培养过程中的重组多肽生产。在单一阶段过程中,将细胞接种至培养环境中且在单一生产期间采用所公开的方法。在多阶段过程中,在两个或两个以上不同阶段中培养细胞。举例而言,首先可在生长期,在使细胞增殖和活力最大化的环境条件下培养细胞,接着在使多肽生产最大化的条件下将其转移至生产期。生长期和生产期可在一或多个过渡期之后或被一或多个过渡期所分离。在多阶段过程中,至少可在生产期中采用本发明方法。

[0225] 为达成理解而非限制目的,本领域技术人员应理解蛋白生产的细胞培养和培养周期可包括三种通用类型:即,连续培养、分批培养和分批补料培养。在连续培养中,例如,在培养期间向细胞提供新鲜培养基补充物(即补入培养基),同时每日移除旧培养基且(例如)每日或连续收集产物。在连续培养中,可每日添加并可连续(即点滴或灌注)添加补入培养基。对于连续培养而言,可如需要将细胞保持于培养物,只要细胞保持存活并且维持环境和培养条件即可。

[0226] 在分批培养中,最初在培养基中培养细胞且在培养周期中或在培养周期结束前不移除、替代也不补充该培养基,即不用新鲜培养基向细胞“补料”。在培养周期结束时,收集所需产物。

[0227] 对于分批补料培养而言,通过在培养周期中每日(或连续地)一或多次用营养溶液补充培养基,即在培养期间用补入培养基对细胞“补料”,延长培养周期时间。分批补料培养可包括如下所述的各种补料方案和次数,例如每日、每隔一日、每两日等、每日一次以上或每日少于一次等。此外,可用补入培养基对分批补料培养物连续补料。接着,在培养/生产周期结束时收集所需产物。本发明优选涵盖分批补料细胞培养物,其中使用可增加蛋白生产并可延长蛋白生产期的优化补料溶液进行补料。

[0228] 改良分批补料培养物:水解产物和基础富集溶液

[0229] 本发明的一方面为使用改良分批补料方法和补充基础溶液及水解产物溶液组合增加蛋白生产的方法和组合物。改良分批补料方法部分基于添加两种富集溶液(即水解产物富集溶液和基础富集溶液),该类富集溶液在蛋白生产时段中添加至细胞培养基中。用于本发明的分批补料方法的水解产物富集溶液包含并非衍生自植物或动物的第一水解产物和第二植物源水解产物。并非衍生自植物或动物且并为植物源水解产物的水解产物的实例为酵母源水解产物。可用于水解产物富集溶液中的植物源水解产物的实例为大豆源水解产物。基础富集溶液包括基础培养基,例如 PF CHO、天冬酰胺和葡萄糖,且水解产物富集溶液包括至少两个不同的非动物源水解产物。在一定时段中以一定时间间隔(例如在 11-15 天的时段中以每日时间间隔)将水解产物和基础富集溶液添加至细胞培养物中,且可于同一日或不同日添加。

[0230] 本发明表征了一种生产抗-TNF α 抗体(例如阿达木单抗/D2E7)的分批补料方法,其包含在介于 32 至 38°C 范围内的培养温度下在细胞培养物中培养包含编码抗-TNF α 抗体的核酸的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在一个实施方案中,培养温度为 35°C。向 CHO 细胞补入水解产物富集溶液和基础富集溶液以处理(例如解决或校正)营养缺乏以使生产率最大化。将水解产物和基础富集溶液添加至细胞培养物中。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含介于 20 与 65%之间的溶氧,例如约 30%溶氧。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基含有蛋白生产所需的葡萄糖含量,例如至少约 1-5g/L 葡萄糖。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含约 1.5-2.5g/L 葡萄糖。在另一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含约 2g/L 葡萄糖。在整个蛋白生产培养过程中,可通过按需要向细胞培养生产培养基中添加葡萄糖以维持所给定浓度(例如至少约 2.0g/L 葡萄糖)来控制葡萄糖浓度。在一个实施方案中,用于抗-TNF α 抗体的分批补料方法的水解产物富集溶液基本由下列各物组成:约 50-280g/L 大豆源水解产物(包括其间的范围和数值,例如,100-225, 50-225, 225-275 和 265g/L)和约 75-300g/L 酵母源水解产物(包括其间的范围和数值,例如,100-250, 150-200, 145-175 和 165g/L)。

[0231] 为用于在 CHO 细胞中生产抗-TNF α 抗体(例如阿达木单抗/D2E7)的分批补料方法而优化的基础富集溶液具有约 9.0 至 10.5 的 pH 值(包括其间的范围和数值,例如,9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5)。添加水解产物富集溶液和基础富集溶液的时段在 9 至 15 天之间,例如 12 天。在一个实施方案中,在该时段以下各日的至少一日将基础富集溶液添加至细胞培养基中:第 4 日、第 6 日、第 9 日和第 11

日,且在该时段的第4日、第7日或第4日和第7日将水解产物富集溶液添加至细胞培养基中。

[0232] 在另一备选实施例中,用于生产抗-TNF α 抗体(例如阿达木单抗/D2E7)的分批补料方法可包括根据pH值线性斜坡(包含自约6.5-8(例如,7.1至7.2)的pH值起始且产生最终约6.9的pH值)调节细胞培养基的pH值。在一个实施方案中,在至少约24小时、48小时或72小时的时段内调节pH值线性斜坡。

[0233] 本发明也涉及生产抗-IL12抗体(例如ABT-874)的分批补料方法,其包含在介于32至38 $^{\circ}\text{C}$ (例如33 $^{\circ}\text{C}$)范围内的培养温度下在细胞培养物中培养包含编码抗-IL12抗体的核酸的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。用于IL-12抗体生产的水解产物富集溶液也可含有葡萄糖。在一个实施方案中,在约6.9的pH值下培养CHO细胞。向CHO细胞补入水解产物富集溶液和基础富集溶液以维持营养缺乏,以使生产率最大化。将水解产物和基础富集溶液添加至细胞培养物中。在一个实施方案中,细胞培养生产培养基包含介于20与65%之间的溶氧,例如约40%溶氧。在一个实施方案中,用于抗-IL12抗体的分批补料方法的水解产物富集溶液基本由下列各物组成:约50-280g/L大豆源水解产物(包括其间的范围和数值,例如,100-225、50-225、255-275和165g/L)、约75-300g/L酵母源水解产物(包括其间的范围和数值,例如,100-250、150-200、145-175和165g/L)和约2.4g/L葡萄糖。为用于在CHO细胞中表达抗-IL12抗体(例如ABT-874)的分批补料方法而优化的基础富集溶液具有约9.7的pH值及约1480mOsm的渗透压。添加水解产物富集溶液和基础富集溶液的时段在14至15天之间,例如12天。在一个实施方案中,在该时段的第5日起每隔一天将基础富集溶液添加至细胞培养生产培养基中,且在该时段的第6日起每天将水解产物富集溶液添加至细胞培养生产培养基中。或者,可在该时段的第5日起每天将基础富集溶液和水解产物富集溶液添加至细胞培养生产培养基中。

[0234] 稳定、高浓度补料溶液

[0235] 本发明一方面涉及与用于改良蛋白生产率的改良、稳定高浓度补料溶液相关的方法和组合物。改良补料溶液可用于在抗体生产中补充细胞培养生产培养基。补料溶液包括葡萄糖(例如100至250g/kg);基础培养基;除谷氨酰胺以外的氨基酸,例如天冬酰胺(例如1.0至15.0g/kg;3-12.5g/kg);以及至少两种不同的非动物源水解产物。此外,补料溶液具有约6.0至7.5的pH值。两种不同的非动物源水解产物可包括植物源水解产物,例如大豆源水解产物,和并非动物源或植物源的水解产物,例如酵母源水解产物。本领域中已知的任何基础培养基均可用于改良补料溶液,包括但不限于PF CHO或DMEM/F12培养基。也可使用经修饰的基础培养基。在一个实施方案中,基础细胞培养基排除以下组份:碳酸氢钠、缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂、谷氨酰胺和葡萄糖。改良补料溶液为稳定的,具有小于约15NTU的浊度。本发明也包括通过添加补料溶液维持细胞培养生产培养基的稳定葡萄糖含量。上述范围值的中间数也为本发明的一部分,例如,3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8和5g/kg天冬酰胺。

[0236] 本发明也包括一种用于制造包含葡萄糖和至少两种不同非动物源水解产物的补料溶液的方法。制造补料溶液的方法包括将葡萄糖与基础细胞培养基组合为组合溶液并将组合溶液的pH值调节至约9.5至10.5。接着,将至少两种不同的非动物源水解产物添加至溶液中并再次调节pH值,使得所得补料溶液具有约6.5至7.5的pH值。上述范围值的中

间数也为本发明的一部分,例如,6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5 的 pH。

[0237] 本发明的补料溶液可用以完成自哺乳动物细胞培养物生产高含量重组蛋白,例如生产抗体。在一个实施方案中,本发明涉及由哺乳动物细胞培养物生产至少约 4g/L 抗体的方法,其包含在细胞培养生产培养基中培养包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞。接着,将 pH 值约 6.7 至 7.0 的补料溶液添加至细胞培养生产培养基中。补料溶液包括葡萄糖(例如约 100 至 200g/kg);基础细胞培养基;除谷氨酰胺以外的氨基酸;及至少两种不同的非动物源水解产物。在一个实施方案中,该方法可生产至少约 4g/L 抗体,至少约 5g/L 抗体;至少约 6g/L 抗体。上述范围值的中间数也为本发明的一部分,例如,1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.55g/L 抗体。

[0238] 通过使用 pH 值约 6.7 至 7.0 并包括下列组份的补料溶液:葡萄糖;基础细胞培养基;约除谷氨酰胺以外的氨基酸;及至少两种不同的非动物源水解产物,可增加自哺乳动物细胞培养物生产的抗体滴度。在一个实施方案中,将补料溶液添加至包含编码抗体的核酸的哺乳动物细胞的细胞培养生产培养基中,致使比不添加补料溶液培养的对照哺乳动物细胞培养物增加至少 50%。在一个实施方案中,添加补料溶液会生产比对照物增加至少 100% 的滴度。在一个实施方案中,添加补料溶液会产生比对照物增加至少 150% 的滴度。可将补充补料溶液在特定细胞浓度下添加至细胞培养物中,例如当细胞密度达到每毫升 2.0×10^6 个细胞或当细胞密度达到每毫升约 3.5×10^6 个细胞时。以上范围的中间数以及本文中所引用的所有其他数均为本发明的一部分。使用上述值的任何组合作为上限和/或下限的数值范围包括于本发明范畴内。

[0239] 由于本发明的分批补料方法用以处理(例如解决或校正)生产蛋白(例如抗体)的特定细胞培养物的营养要求,因此监控特定成份是有利的。可监控的成份包括任何代谢指示剂,即细胞代谢指示剂。在一个实施方案中,本发明的分批补料方法包含监控细胞培养基中的葡萄糖水平,包括监控葡萄糖水平以使其维持于 0.25-20g/L 之间。在一个实施方案中,葡萄糖水平维持在 0.5 至 5.5g/L 之间,或 4.0-5.5g/L。通过监控葡萄糖水平,可间接监控细胞代谢。如以下实例 3 中所述,可将葡萄糖用作代谢指示剂。在一个实施方案中,可基于葡萄糖水平以营养组份(例如水解产物)补充细胞培养物。监控葡萄糖含量的方法为本领域已知并可包括使用自动取样装置进行监控。可使用的代谢指示剂的另一实例为谷氨酰胺。以上范围的中间数以及本文中所引用的所有其他数均为本发明的一部分。使用上述值的任何组合作为上限和/或下限的数值范围包括于本发明范畴内。

[0240] 反馈控制系统可用以监控细胞培养生产培养基中的代谢指示剂水平。在一个实施方案中,为了满足所需参数设定点(例如预定葡萄糖水平),如反馈控制系统所测定将组合补料溶液添加至细胞培养生产培养基中。

[0241] 反馈控制系统也可用以测定给定哺乳动物细胞培养物和所关注蛋白生产的补入曲线。在一个实施方案中,确定用于在哺乳动物细胞培养物中生产蛋白的补入曲线的方法包含:在细胞培养生产培养基中培养包含编码蛋白的核酸的哺乳动物细胞;使用反馈控制系统监控细胞培养生产培养基中的代谢指示剂,藉此将补料溶液(例如组合补料溶液)添加至细胞培养生产培养基中。将补料溶液添加至细胞培养生产培养基中以达到目标代谢指示剂设定点,例如葡萄糖水平。根据细胞培养结论,测定每天添加至细胞培养生产培养基中的补料溶液的量并提供应于何时将补料溶液添加至细胞培养物中的补入曲线。一旦确立

补入曲线,则不再需要监控生产所关注蛋白的给定哺乳动物细胞培养物的代谢指示剂。

[0242] N-乙酰半胱氨酸和丁酸钠方法及组合物

[0243] 如上所述,本发明的细胞培养方法可有利达到增加抗体滴度。用于达到在哺乳动物细胞培养物中的蛋白生产率的本发明另一方面为通过向细胞培养基中添加丁酸钠、N-乙酰半胱氨酸或其组合。在一个实施方案中,本发明涉及通过向细胞培养基中添加丁酸钠(例如 0.1mM 至 10mM)、N-乙酰半胱氨酸(例如 1mM 至 80mM)或其组合而生产抗体的方法。在一个实施方案中,抗体滴度至少约 100mg/L;至少约 150mg/L;或至少约 200mg/L;至少约 250mg/L;至少约 300mg/L;至少约 350mg/L;或至少约 400mg/L。

[0244] 本发明也涉及通过向细胞培养基中添加丁酸钠(例如终浓度 0.1mM 至 10mM)、N-乙酰半胱氨酸(例如终浓度 1mM 至 80mM)或其组合(对照物相应地缺乏丁酸钠、N-乙酰半胱氨酸或其组合)而在哺乳动物细胞培养物中生产抗体,从而使得抗体滴度比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 10%的方法。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的抗体滴度比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 29%;比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 40%;比对照哺乳动物细胞培养物改良至少 70%;或比对照哺乳动物细胞培养物高至少 90%。可在哺乳动物细胞培养物的生长期中向哺乳动物细胞培养物中添加丁酸钠、N-乙酰半胱氨酸或其组合。在一个实施方案中,在培养时间的第 4 日与第 7 日之间向哺乳动物细胞培养物中添加丁酸钠、N-乙酰半胱氨酸或其组合。在一个实施方案中,以介于 5mM 至 80mM 的终浓度(例如 20-60mM 或约 10mM)单独添加 N-乙酰半胱氨酸或与丁酸钠组合。

[0245] 本发明也涉及通过向细胞培养基中添加约 0.1mM 至 10mM N-乙酰半胱氨酸(对照物缺少此添加)使得哺乳动物细胞培养物的寿命与对照哺乳动物细胞培养物相比延长至少约 45%的方法。在一个实施方案中,哺乳动物细胞培养物的寿命与对照哺乳动物细胞培养物相比延长至少约 35%;或与对照哺乳动物细胞培养物相比延长至少约 55%。

[0246] 应注意,本文所描述的细胞培养基和改良培养方法可独立或彼此组合使用。

[0247] 在使用本发明方法和组合物进行培养后,接着可回收或收集所得表达蛋白。此外,可使用已知方法将自该培养物或组份(例如自培养基或细胞萃取物或体液)纯化或部分纯化蛋白。分级分离程序包括但不限于过滤、离心、沉淀、相分离、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换层析、疏水相互作用层析(HIC,使用例如苯基醚、丁醚或丙醚的树脂)、HPLC 或上述步骤的一些组合。

[0248] 举例而言,多肽纯化可包括含有将结合至多肽的试剂的亲柱;在该类亲和树脂(例如刀豆球蛋白 A 琼脂糖、HEPARIN-TOYOPEARL(层析介质)或 Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE(琼脂糖颗粒))上进行的一个或多个柱层析步骤;包括洗脱的一个或多个步骤;和/或免疫亲和层析。可以促进纯化的形式表达多肽。举例而言,其可表达为融合多肽,例如麦芽糖结合多肽(MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或硫氧还蛋白(TRX)的融合多肽。表达且纯化该类融合多肽的试剂盒可分别购自 New England BioLab(Beverly, Mass.)、Pharmacia(Piscataway, N. J.) 和 Invitrogen。可用表位标记多肽且随后使用针对该表位的特定抗体纯化。一种该表位 FLAG(表位标记)购自 Kodak(New Haven, Conn.)。也可能将包含多肽结合多肽(例如结合至重组蛋白的单克隆抗体)的亲和柱用于亲和力纯化所表达多肽。其他类型的亲和纯化步骤可为蛋白 A 或蛋白 G 柱,其中亲和试剂结合至含有 Fc 结构域的蛋白。可使用常规技术将多肽自亲和柱移除,例如在高盐洗脱缓冲剂中并接着在低

盐缓冲剂中透析以供使用或根据所使用的亲和基质改变 pH 值或其他组份 ;或可使用亲和部分的天然底物竞争性移除。在一个实施方案中,根据 US 申请案第 11/732918 号(以参考形式并于本文)所述方法纯化使用本发明方法和组合物生产的抗体。

[0249] 所需的最终纯度取决于多肽的预期用途。本发明方法和组合物适用于所关注蛋白的治疗用途。因此,当预期在活体内给予多肽时,需要相对较高的纯度。在该情况下,将多肽纯化,使得在通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析时不能检测到对应于其他多肽的多肽条带。相关领域技术人员应理解,由于差异糖基化、差异翻译后加工及其类似技术,通过 SDS-PAGE 可观测到多个对应于多肽的条带。最优选地,将本发明多肽纯化至大体均质,如通过 SDS-PAGE 进行分析时的单一多肽条带所指示。可通过银染、考马斯蓝染色或(如果多肽经放射性标记)通过放射自显影目测多肽条带。

[0250] 本发明也任选涵盖进一步配制蛋白。术语“配制”意指蛋白可经缓冲液交换、杀菌、大体积包装和/或包装以用于最后使用者。该类组合物可包含与其他组份(例如生理学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂)组合的有效量蛋白。术语“生理学上可接受”意指不干扰活性成份的生物活性有效性的无毒材料。

[0251] 应注意,关于本文所引用的数值,以上范围的中间数以及本文所引用的所有其他数值为本发明的一部分。使用上述数值的任何组合作为上限和/或下限的数值范围包括于本发明范畴内。

[0252] 实施例

[0253] 以下实施例举例说明用于培养哺乳动物细胞的改良方法和组合物,包括用于在哺乳动物细胞中表达生物制品的改良方法和组合物。下文揭示用以培养中国仓鼠卵巢(CHO)细胞以表达各种重组生物制品的改良生化成分确定的培养基。此外,也举例说明在以各种形式和规模运作的生物反应器中,含有相同组份但具有不同组份平衡且经富集以使更多细胞生长和产物表达增加的大规模培养细胞的培养基。

[0254] 实施例 1:培养哺乳动物细胞的改良培养基

[0255] 通常,哺乳动物(例如中国仓鼠卵巢(CHO))细胞培养基基于市售培养基配方,例如 DMEM、Ham 氏 F12 或这些类型培养基的组合。为了在哺乳动物细胞中生产蛋白,细胞培养基必须充分富集以支持细胞生长和生物制品产品表达的增加。以下实施例描述用于培养哺乳动物细胞(即中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)以表达包括抗体的各种重组生物制品的改良生化成分确定的培养基。

[0256] 缺乏二氢叶酸还原酶[dhfr(-)]的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞适合在不存在血清或任何其他衍生自动物来源的材料下以悬浮状态生长。细胞在不存在次黄嘌呤和胸苷下,在从商业来源 JRH PF-CHO(目录号 67147)获得的成分确定细胞培养基中生长。尽管细胞系并不缺乏谷氨酰胺合酶,但仍向培养基中添加额外的谷氨酰胺。

[0257] 使用本领域熟知的分子生物技术生成表达生物制品(例如给定标靶的抗体)的 CHO 细胞系。简而言之,使用本领域熟知的方法将能够表达所关注抗体并能够表达 dhfr 酶基因的表达载体导入 CHO 细胞中。通过在次黄嘌呤和胸苷存在下筛选细胞获得所关注的经转染细胞。在浓度不断增加的甲氨嘌呤中进一步培养所筛选的转化子以扩增经转染基因并增加所表达蛋白的产率。下文描述用以培养 CHO 细胞的改良细胞培养基。

[0258] 实施例 1.1:中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养的培养基

[0259] 一般而言,用于培养 CHO 细胞的培养基配方由命名为 A 部分、B 部分及 C 部分的三个部分组成。A 部分为基础培养基并包含水、氨基酸、维生素、无机金属盐、微量元素、乙醇胺、腐胺、表面活性剂、丙酮酸钠、谷胱甘肽和 2- 巯基乙醇。B 部分包含无机铁来源 ;且 C 部分包含重组生长因子、缓冲剂、渗透压调节剂、能量来源、各种非铁金属离子、表面活性剂和水解产物。培养基组份大部分为无机的或来自重组来源并且经高度纯化。培养基不含有来自动物来源的蛋白、脂质和碳水化合物。复合水解产物从经高度加工的酵母和植物来源获得。

[0260] 培养基的 A 部分包括不含蛋白的 CHO(PF CHO) 培养基(JRH-SAFC Biosciences ; JRH 目录号 67147- 也称作原始 A 部分)。因此,A 部分包括基础培养基,该基础培养基包括水、氨基酸和维生素。选择基础培养基 (PF CHO) 将其修饰并再调配以支持细胞生长和所表达蛋白生产率的进一步增加。修饰 PF CHO 以去除特定组份,包括碳酸氢钠、HEPES 缓冲剂、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、渗透压调节剂、表面活性剂和单糖葡萄糖(经修饰 PF CHO 在本文中称作经修饰 A 部分(也称作 JRH 目录号 67411))。也进行这些修饰以促进大规模生物反应器中细胞培养过程条件的改良。

[0261] B 部分组份(JRH) 由独立添加的浓缩柠檬酸铁溶液组成。B 部分组份的浓度在所有 CHO 细胞培养方案中均保持恒定。

[0262] C 部分组份包括生长因子(例如胰岛素)、氨基酸谷氨酰胺、TC 酵母粉和大豆水解产物植物蛋白胨、保持选择压力必需的甲氨嘌呤及在制备期间用于在培养基水合后调节 pH 值的碱 NaOH 和酸 HCl。

[0263] 改良细胞培养基配方由如下制成。首先,最初使 CHO 细胞在从 JRH 获得的 PF-CHO 培养基(SAFC-JRH 目录号 67147) 中生长。如下所述,将 PF-CHO 培养基(目录号 67147) 进一步修饰以与 CHO 细胞株一起使用。该经修饰培养基由 JRH 以新目录号 67411 命名。修饰的目标是使细胞培养基的 A 部分浓度增加,以致渗透压和 pH 值不受影响。制造商(JRH) 也声明原始 A 部分(目录号 67147) 不具有碳酸氢钠、谷氨酰胺并不含蛋白质(不添加胰岛素或其他蛋白或肽生长因子)。当证明有效时,将这些省略的组份独立添加至 67147 和 67411A 部分配方中,特别用于 CHO 细胞系。这些成为下文如 C 部分更详细描述组份中的一些。

[0264] 表 1 :原始细胞培养基配方(A 部分 67147) 和经修饰细胞培养基配方(经修饰的 A 部分 67411) 的比较

[0265]

组份	含有 67147(RM-003) 的 细胞培养基(原始 A 部分)	含有 1X、2X、3X 和 4X g/L 经修饰的 67411(RM-230) 细胞培养基(经修饰的 A 部分)
A 部分		
A 部分原始粉末: JRH 来 源 仅 1X 浓度	16.45 g/L	NA
经修饰的 A 部分: 特定 JRH 来源 选择的无钠组份	NA	2.63、5.26、7.89 及 10.52 g/L
碳酸氢钠、HEPES 及磷酸 二氢钠和磷酸氢二钠、渗 透压调节剂氯化钠、表面 活性剂 Pluronic F-68 和单 糖葡萄糖		
B 部分		
B 部分: 柠檬酸铁 JRH 储 备溶液	10 mL/L(0.5 mM)	10 mL/L (0.5 mM)
C 部分:		
生长因子、单糖、能量来 源-氨基酸: 多个水平		
重组 hu 胰岛素	2-4 mg/L	4-13 mg/L
葡萄糖	1.5-3.5 g/L	最高至 7.0 g/L
L-谷氨酰胺	0.292 g/L	0.584 g/L
缓冲剂: 保持单一浓度		

[0266]

组份	含有 67147(RM-003) 的 细胞培养基(原始 A 部分)	含有 1X、2X、3X 和 4X g/L 经修饰的 67411(RM-230) 细胞培养基(经修饰的 A 部分)
碳酸氢钠	1.6 g/L	1.6 g/L
HEPES	NA	1.8 g/L
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	NA	0.031 g/L
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	NA	0.436 g/L
渗透压调节剂: 每条产品 线多个水平		
NaCl	NA	0-6.5 g/L
水解产物: 每条产品线多 个含量		
细菌培养用 TC 酵母粉 (yeastolate)	NA	2.0-10.7 g/L
BD 植物蛋白胨(大豆)	NA	0-6.92 g/L
Primatone	NA	2-8 g/L
其他/额外试剂		
选择压力(dhfr 系统): 每 条产品线多个水平		
甲氨喋呤	至所需扩增水平	至所需扩增水平
表面活性剂-剪切力保护 剂: 单一水平		
Pleuonic F-68	1.0 g/L	1.0 g/L
用于 pH 值调节的酸-碱		
NaOH	按需要	按需要
HCl	按需要	按需要

[0267]

组份	含有 67147(RM-003) 的 细胞培养基(原始 A 部分)	含有 1X、2X、3X 和 4X g/L 经修饰的 67411(RM-230) 细胞培养基(经修饰的 A 部分)
溶液目标		
终 pH 值	7.2-7.4	7.1-7.3
终渗透压	280-320	320-450

[0268] CHO 细胞培养的细胞培养基 A 部分

[0269] 如上所述,改良细胞培养基的 A 部分含有修饰型基础培养基,即 PF-CHO 培养基。获自 JRH 的 PF-CHO 培养基(目录号 67147)为通过从 A 部分去除缓冲剂碳酸氢钠、HEPES 及磷酸二氢钠和磷酸氢二钠、渗透压调节剂氯化钠、表面活性剂 Pluronic F-68 以及单糖葡萄糖而加以修饰。取决于特定细胞培养方案的需要,将这些组份以各种浓度添加回 A 部分中。这使得缓冲剂浓度保持稳定,并使表面活性剂浓度保持低于对细胞造成毒性的水平,同时使得可操纵渗透压和碳底物水平用于增加细胞生长和增加的抗体生产。一旦将这些组份从原始 JRH A 部分配方分离,则如经修饰细胞培养基(经修饰 PF CHO- 在表 1 中称作 #67411)所示,可促进 JRH A 部分中剩余组份浓度的增加,从而使细胞生长和由抗体滴度所测定的抗体表达有所增加。不需改变培养基体积,即可使经修饰 A 部分粉末(67411)配方的单个组份(包括氨基酸、维生素、微量元素和其他各种组份)比例增加至原始调配方浓度的四倍。上文表 1 描述了使用 67147 的原始 A 部分配方与使用 67411 的修饰配方的比较。

[0270] 就定义而言,原始 JRH PF CHO 基础培养基(目录号 67147)为不含有谷氨酰胺且不含有碳酸氢钠的 PF CHO 基础培养基。1 部分中葡萄糖的原始浓度为 1.5mg/L。

[0271] CHO 细胞培养的细胞培养基的 B 部分

[0272] 细胞培养基的 B 部分组份包含浓缩柠檬酸铁溶液,其与获自 JRH 的 PF-CHO 培养基的 B 部分相同(目录号 67147)并独立添加。

[0273] 将无机铁来源(例如铁盐和亚铁盐,尤其是柠檬酸铁和硫酸亚铁)添加至基础培养基(即 A 部分或经修饰 A 部分)中。尽管添加了少量硫酸亚铁(0.2-0.8mg/L)和无水硝酸铁(0.025-0.11mg/L),但优选螯合盐(例如柠檬酸铁)。柠檬酸铁作为液体补充物以较大浓度添加并作为 PF-CHO B 部分包括于细胞培养基中。尽管可改变其他培养基组份的浓度并具有更大的浓度范围,但保持 122mg/L 单一浓度的柠檬酸铁。这是由于引起细胞损害的超氧化物和自由基的形成以及基础培养基中不期望化合物的形成。

[0274] CHO 细胞培养的细胞培养基的 C 部分

[0275] 细胞培养基 C 部分主要由下列各物质组成:重组生长因子、缓冲剂、渗透压调节剂、能量来源和水解产物。在研发过程中添加至细胞培养基中且不包括于氨基酸、维生素和辅因子、无机盐及缓冲剂、微量元素或矿物质的通常分组中的额外化合物在上表 1 中描述为“C 部分”。关于下表 1 中所提及的 C 部分,应注意可独立或组合添加 C 部分中所鉴别

的成份。

[0276] 重组生长因子

[0277] 以介于 4-13mg/L 浓度范围内的肽激素胰岛素或重组类似物添加至细胞培养基中。IGF-1 也可以 50-100ng/L 的浓度替代或补充添加至细胞培养基中的胰岛素。

[0278] 渗透压调节剂

[0279] 各种细胞培养基的渗透压在 260mOsm 至 460mOsm 的范围内。使用盐尤其是 NaCl、KCl 和 KNO₃ 调节渗透压 ; 尽管所有氨基酸和水解产物有助于大幅改变渗透压。

[0280] 能量来源

[0281] 培养基中最多的单糖为葡萄糖 (D- 葡萄糖) 并按需要补充。细胞培养基中的起始浓度在 3.5 至 7.0g/L 的范围内。亦可补充其他糖作为代谢物或作为剪切力保护剂, 其可包括麦芽糖、甘露糖、半乳糖或果糖。

[0282] 水解产物

[0283] 认为水解产物为游离氨基酸以及二肽和三肽的额外来源。

[0284] pH 值维持 (缓冲剂)

[0285] 使用各种缓冲剂将细胞培养基的 pH 值维持于 6.5 至 7.5 的范围内。用于培养基中的无机缓冲剂 (或缓冲系统) 包括碳酸盐 (NaHCO₃)、氯化物 (CaCl₂)、硫酸盐 (MgSO₄) 和磷酸盐 (NaH₂PO₄ 及 Na₂HPO₄)。有机缓冲剂也包括丙酮酸钠 (C₃H₃O₃Na) 和也称作 HEPES 的 N-[2- 羟乙基] 哌嗪 -N'-[2- 乙烷磺酸]。

[0286] 谷氨酰胺

[0287] 谷氨酰胺也包括于 C 部分中, 因为原始 A 部分和经修饰 A 部分均将其省略。谷氨酰胺包括于 C 部分中, 例如在含有原始 A 部分的细胞培养基中为 0.2 至 0.4 (0.29) g/L ; 在含有经修饰 A 部分的细胞培养基中为 0.3 至 0.7, 例如 0.58 (参见上表 1)。

[0288] CHO 细胞培养的细胞培养基的其他组份

[0289] 以下提供可添加至细胞培养基中的额外组份。应注意, 可添加的额外组份不限于以下提供的实施例。

[0290] 额外肽

[0291] 将 0.4 至 1.65mg/L 有助于维持内质网结构和 CHO 细胞系特异性生长的腐胺 HCl 盐添加至基础培养基中。

[0292] 以 0.5 至 2.0mg/L 添加谷胱甘肽 (三肽)。添加 2- 巯基乙醇至 3.6mg/L, 作为维持巯基的还原剂并结合、传送各种金属如铜。其还原脱氢抗坏血酸和胱氨酸并再生抗坏血酸和半胱氨酸。

[0293] 甲氨喋呤 :

[0294] 产品线之间的甲氨喋呤浓度有所不同, 取决于预期达到的最终扩增水平。使用 2mM 浓度的储备溶液, 添加体积和终浓度为 : 对于抗 -IL-12 和抗 -EP0-R, 0.250mL/kg 导致最终为 500nM ; 对于抗 -IL-18, 0.5mL/kg 导致最终为 100nM, 最后对于抗 -TNF α , 2.5mL/kg 导致最终为 5000nM。

[0295] 细胞保护剂 / 表面活性剂

[0296] 该实施例中描述的培养基用于在所有规模的反应器、烧瓶和旋转烧瓶中, 在产生较大剪切力的搅拌及喷射下使 CHO 细胞以悬浮状态生长。为使细胞损害降至最低, 添加浓

度为每升培养基大约 1g 的细胞保护剂（如 pluronic 多元醇，尤其为 Pluronic F-68）。也使用小于和等于 1g/L 的其他剪切力缓和剂（包括甲基纤维素）和高达每升克量的不同浓度的特定水解产物和植物萃取物。

[0297] 氨基酸

[0298] 细胞培养基具有如本文所述的氨基酸含量范围。以高于其他氨基酸的起始浓度添加两种氨基酸（天冬酰胺和谷氨酰胺），因为它们在 CHO 细胞培养过程中快速变为限制养分。具体而言，天冬酰胺在基础培养基中约 0.4-0.5g/kg。

[0299] 尽管天冬酰胺为 A 部分的组份（包括原始和经修饰 PF CHO），但通过将其补充至细胞培养基中增加天冬酰胺的浓度。

[0300] 细胞培养基能够支持极低初始密度的 CHO 历时数天生长至超过每毫升 1.0×10^7 个细胞，取决于目标组份浓度及所需培养基的细胞效应。CHO 过程额外包括稍后部分所述的生长期和生产期，以及所需不同范围的组份。然而，细胞培养基配方比例和一致性保持相同。

[0301] CHO 细胞培养基的最终制备

[0302] 制备改良细胞培养基需要以特定次序添加各种组份，同时在特定时间使用碱或酸调节 pH 值。随着 A 部分基本浓度的增加，添加 NaOH 形式的碱以辅助配方中氨基酸溶解至最大 pH 值 10。随着水解产物的添加，使用 HCl 形式的酸使 pH 值下降至最小值 7.0。若需要，使用 NaOH 或 HCl 溶液完成至特定 pH 值的进一步调节。

[0303] 以下实施例描述了基于上文用于各种特定抗体表达的细胞培养基。

[0304] 实施例 1.2：用于培养表达抗 -TNF α 抗体的 CHO 细胞的细胞培养基

[0305] 在表 2 所述的细胞培养基中培养表达抗 TNF α 的完全人类抗体（即阿达木单抗；D2E7）的 CHO 细胞株。

[0306] 表 2：用于培养表达完全人抗 -TNF α 抗体的 CHO 细胞的细胞培养基

[0307]

培养基组份	原材料	AF-D2E7-1XP	AF-D2E7-1XP	AF 及 AY-D2E7	AY-D2E7-2XP	AY-D2E7-2XP
组份列表: JRH A 部分及 B 部分	规格#	SR-248 生长	SR-250 生长+ MTX	SR-286 生产 prod 3XP	SR-332 生长 1	SR-333 生长 2
所添加 ABC 组份	终 pH 值:	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1
	终渗透压:	280-320	280-320	370-390	320-360	320-360
A 部分: 未经修饰-原始-市售	RM-003	16.45	16.45	NA	NA	NA
特定(经修饰)A 部分: 不含盐	RM-230	NA	NA	7.89 g/kg	5.26 g/kg	5.26 g/kg
B 部分: 柠檬酸铁: 螯合铁来源	RM-004	10 ml/kg	10 ml/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
C 部分:						
rHu 胰岛素: 重组蛋白葡萄糖调节剂	SR-055	2.0 mL/kg(4 mg/kg)	2.0 mL/kg(4 mg/kg)	6.0 mL/kg(12 mg/kg)	3.88 mL/kg(8 mg/kg)	3.88 mL/kg(8 mg/kg)
葡萄糖, 无水: 碳源	RM-011	3.5 g/kg	3.5 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg
L-谷氨酰胺: 氨基酸和能量来源	RM-071	0.292 g/kg	0.292 g/kg	0.584 g/kg	0.876 g/kg	0.876 g/kg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O: 磷酸盐缓冲剂	RM-200	A 部分: 0.031 g/kg	A 部分: 0.031 g/kg	0.031 g/kg	0.031 g/kg	0.031 g/kg
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O: 磷酸盐缓冲剂	RM-233	A 部分: 0.436 g/kg	A 部分: 0.436 g/kg	0.436 g/kg	0.436 g/kg	0.436 g/kg
细菌培养用 TC 酵母粉: 酵母源 水解产物	RM-216	2.0 g/kg	2.0 g/kg	10.7 g/kg	4.0 g/kg	4.0 g/kg
植物蛋白肽: 植物-大豆源水解产 物	RM-238	NA	NA	6.92 g/kg	2.6 g/kg	2.6 g/kg
碳酸氢钠: 缓冲剂: CO ₂ -pH 值 调节剂	RM-077	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES: 有机缓冲剂	RM-090	NA	NA	1.8 g/kg	1.8 g/kg	1.8 g/kg
NaCl(盐): 渗透压调节剂	RM-174	A 部分 6.5 g/kg	A 部分 6.5 g/kg	2.45 g/kg	2.67 g/kg	2.67 g/kg
其他组份						
L-天冬酰胺-水合物: 氨基酸	RM-284	NA	NA	NA	0.45 g/kg	0.45 g/kg
Pluronic F-68(泊洛沙姆 188, NF): 表面活性剂、载体	RM-188	NA	NA	1.0 g/kg	1.0 g/kg	1.0 g/kg
甲氧喋呤: 在 CHO 扩增 DHFR 系统中为选择性的	SR-133	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg	2.50 mL/kg
NaOH, 2 N: 碱	SR-288	按需要	按需要	5.67 mL/kg	3.5 mL/kg	3.5 mL/kg
HCl, 2 N: 酸	SR-287	按需要	按需要	2.5 mL/kg	2.91 mL/kg	2.91 mL/kg

[0308] 实施例 1.3 :用于培养表达 IL-12 抗体的 CHO 细胞的培养基组合物

[0309] 在表 3 所述的生长培养基中培养表达完全人类抗 -IL-12 抗体的 CHO 细胞系。

[0310] 表 3 :用于培养表达完全人类抗 -IL12 抗体 (ABT-874) 的 CHO 细胞培养基

[0311]

培养基名称	原材料 规格#	ABT-874 SR-383 生长	ABT-874 SR-352 产生	ABT-874 SR-468 补料	ABT-874 SR-351 Glu 补料	ABT-874 SR	ABT-874 274 SR	ABT-874 273 SR
最终 pH 值:						6.5-6.9	6.5-6.9	6.5-6.9
最终渗透压:						265-282	265-282	265-282
A 部分: 未经修 饰-原始-市售	RM-003	NA	NA	NA	NA	16.45 g/kg	16.45 g/kg	16.45 g/kg
A 部分(经修 饰): 不含盐	RM-230	5.26 g/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A 部分(经修 饰): 不含盐且	RM-322	NA	7.89 g/kg	21.0 g/kg	7.89 g/kg	NA	NA	NA

[0312]

维生素减少								
B 部分: 柠檬酸铁: 螯合铁来源	RM-004	10 mL/kg	10 mL/kg	NA	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
C 部分:								
牛运铁蛋白: 动物来源 Fe 载体	SR-057	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rHu 胰岛素: 重组蛋白葡萄糖调节剂	SR-055	3.88 mL/kg	6.5 mL/kg	NA	6.5 mL/kg(13 mg/kg)	2 mL/kg(4 mg/L)	2 mL/kg(4 mg/L)	2 mL/kg(4 mg/L)
葡萄糖, 无水: 碳源	RM-011	7.0 g/kg	7.0 g/kg	150 g/kg	200 g/kg	3.5+1.5 g/kg	3.5+1.5 g/kg	200 g/L
L-谷氨酰胺: 氨基酸和能量来源	RM-071	0.876 g/kg	0.584 g/kg	NA	0.584 g/kg	0.292 g/kg	0.292 g/kg	0.292 g/kg
碳酸氢钠: 缓冲剂: CO ₂ -pH 值调节剂	RM-077	1.60 g/kg	1.60 g/kg	NA	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES: 有机缓冲剂	RM-090	1.80 g/kg	1.80 g/kg	NA	1.8 g/kg	NA	NA	NA
NaCl(盐): 渗透压调节剂	RM-174	2.675 g/kg	2.45 g/kg	NA	2.45 g/kg	NA	NA	NA
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O: 磷酸盐缓冲剂	RM-200	0.031 g/kg	0.031 g/kg	NA	0.031 g/kg	NA	NA	NA
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O: 磷酸盐缓冲剂	RM-233	0.436 g/kg	0.436 g/kg	NA	0.436 g/kg	NA	NA	NA
细菌培养用 TC 酵母粉: 酵母源水解产物	RM-216	4.0 g/kg	10.7 g/kg	65.0 g/kg	10.7 g/kg	2 g/kg	11 g/kg	8 g/kg
植物蛋白胨: 植物-大豆源水解产物	RM-238	2.579 g/kg	6.92 g/kg	41.0 g/kg	6.92 g/kg	NA	NA	NA
其他组份								
Pluronic F-68(泊洛沙姆 188, NF): 表面活性剂、载体	RM-188	1.00 g/kg	1.00 g/kg	NA	1.0 mL/kg	NA	NA	NA
L-天冬酰胺一水合物: 氨基酸	RM-284	0.450 g/kg	NA	5.0 g/kg	NA	NA	NA	NA
Primatone: 牛-动物源解产物	RM-149	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
甲氨喋呤: 在 CHO 扩增 DHFR 系统中为选择性的	SR-133	0.250 mL/kg	NA	NA	NA	0.250 mL/kg	0.250 mL/kg	0.250 mL/kg
NaOH, 2 N: 碱	SR-288	3.50 mL/kg	5.67 mL/kg	按需要	5.67 mL/kg	按需要	按需要	按需要
HCl, 2 N: 酸	SR-287	2.91 mL/kg	2.5 mL/kg	按需要	2.5 mL/kg	按需要	按需要	按需要

[0313] 参考上文,关于不含盐并维生素减少的经修饰基础培养基,维生素量相对于以上描述为 RM-003 的未经修饰基础培养基,或相对于以上描述为 RM-230 的经修饰不含盐基础培养基减少了三分之一。因此,如上所述,维生素减少的基础培养基具有 RM-003 和 RM-230 的三分之一的维生素量。当使用上表中所给出量时,培养基中维生素的终浓度与使用 RM-003 或 RM-230 相比降低至三分之一。然而,应注意如果需要的话则使用了 RM-230 的生产和补料培养基也可使用。

[0314] 实施例 1.4 :用于培养表达 IL-18 和 EPO/R 抗体的 CHO 细胞培养基组合物

[0315] 表 4 提供了用以表达抗 -IL-18 和抗 -EPO/R 抗体的生长和生产培养基的概述。关于表达该类抗体的培养基的额外详述可见于表 5(抗 -IL-18)和表 6(抗 -EPO/R)。

[0316] 表 4 :用于培养表达完全人类抗 -IL-18 和抗 -EPO/R 抗体的 CHO 细胞培养基

[0317]

培养基组份	原材料	抗-IL18-2XP	抗-IL18-3xP	抗-IL18-4XP	抗-EPO/R-1XP	抗-EPO/R-3xP
组份列表: JRH A 部分及 B 部分	规格#	SR-371 生长	SR-372 生产	SR-382 生产	SR-274 生长	SR-286 生产
所添加 ABC 组份	终 pH 值:	7.0±0.1	6.9±0.05	7.0±1.0	7.2±0.1	7.2±0.1
	终渗透压:	280-300	373-403	360-400	280-320	370-390
A 部分: 未经修饰-原始-市售	RM-003	NA	NA	NA	16.45	NA
特定(经修饰)A 部分: 不含盐	RM-230	5.26 g/kg	7.89 g/kg	10.52 g/kg	NA	7.89 g/kg
B 部分: 柠檬酸铁: 螯合铁来源	RM-004	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
C 部分:						
rHu 胰岛素: 重组蛋白葡萄糖调节剂	SR-055	3.88 mL/kg (8 mg/kg)	6.0 mL/kg (12 mg/kg)	6.5 mL/kg (12 mg/kg)	2.0 mL/kg (4 mg/kg)	6.0 mL/kg (12 mg/kg)
葡萄糖, 无水: 碳源	RM-011	7.0 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg	1.5 g/kg	7.0 g/kg
L-谷氨酰胺: 氨基酸和能量来源	RM-071	0.876 g/kg	0.584 g/kg	0.584 g/kg	0.292 g/kg	0.584 g/kg
碳酸氢钠: 缓冲剂: CO ₂ -pH 值调节剂	RM-077	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES: 有机缓冲剂	RM-090	1.8 g/kg	1.8 g/kg	1.8 g/kg	NA	1.8 g/kg
NaCl(盐): 渗透压调节剂	RM-174	2.67 g/kg	2.45 g/kg	2.45 g/kg	A 部分: 6.5 g/kg	2.45 g/kg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O: 磷酸盐缓冲剂	RM-200	0.031 g/kg	0.031 g/kg	0.031 g/kg	A 部分: 0.031 g/kg	0.031 g/kg
NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O: 磷酸盐缓冲剂	RM-233	0.436 g/kg	0.436 g/kg	0.436 g/kg	A 部分: 0.436 g/kg	0.436 g/kg
细菌培养用 TC 酵母粉: 酵母源水解产物	RM-216	4.0 g/kg	10.7 g/kg	14.27 g/kg	2.0 g/kg	10.7 g/kg
植物蛋白胨: 植物-大豆源水解产物	RM-238	2.6 g/kg	6.92 g/kg	9.23 g/kg	NA	6.92 g/kg
其他:						
L-天冬酰胺-一水合物: 氨基酸	RM-284	0.45 g/kg	NA	NA	NA	NA
Pluronic F-68(泊洛沙姆 188, NF): 表面活性剂、载体	RM-188	1.0 g/kg	1.0 g/kg	1.0 g/kg	NA	1.0 g/kg
甲氨喋呤: 在 CHO 扩增 DHFR 系统中为选择性的	SR-133	0.05 mL/kg	0.05 mL/kg	0.05mL/kg	0.25 mL/kg	2.50 mL/kg
NaOH, 2 N: 碱	SR-288	按需要	按需要	按需要	按需要	5.67 mL/kg
HCl, 2 N: 酸	SR-287	按需要	按需要	按需要	按需要	2.5 mL/kg

[0318] 在生长培养基 2xP(SR-371) 中培养表达 IL-18 的 CHO 细胞系, 且稍后在生产培养基 3xP(SR-372) 中生产抗体, 最终滴度为大约 1g/L。高滴度过程使用 4xP(SR-382) 作为生产培养基以达到约 2g/L 的终滴度。用于抗-EPO/R 生产的生产培养基与 SR-286 相同, 但将 1xP 培养基(SR-274) 用于细胞生长。所有培养基均描述于表 4 和 5 中。

[0319] 实施例 1.5 : 用于在哺乳动物细胞中生产抗体的细胞培养过程

[0320] 将以上公开的培养基开发为两个用于两个培养哺乳动物(即 CHO) 细胞计划的生产平台。使用与如上表 2-4 中所述经修饰的生产培养基相似的(仅用于细胞培养的温度有所不同) 培养基组合物开发第一平台。此平台用于生产抗-IL-18 抗体以及生产抗红细胞生成素受体(抗 EPO/R)。进一步强化营养组份的第二培养基平台用于生产高滴度抗-IL-18, 以达到更高的体积抗体生产率。

[0321] 如先前所述,所有抗体(包括抗-IL-12、抗-IL-18和抗-EPO/R抗体)均为由经转染 dhfr(-)CHO 细胞系表达的完全人类 IgG1 抗体。这些细胞系以悬浮状态培养且不需牛来源血清或其他动物来源材料的帮助。

[0322] 为生产抗-IL-18抗体,在生长培养基(本文中称作 SR-371)中培养表达抗-IL-18的 CHO 细胞系。培养基 SR-371 用于支持具有中等细胞生长的较高细胞生产率。一旦细胞密度达到转移标准,则将细胞转移至生产培养基(SR-372)中以起始生产阶段。

[0323] 表 5:抗-IL18 过程 A 中培养基组成

[0324] 生长培养基 SR-371 用于种子驯养(seed train)和种子反应器中。生产培养基 SR-372 用于 3000 升的生产生物反应器中。

[0325]

组份	生长培养基 SR-371	生产培养基 SR-372
PFCHO A 部分,特定无盐配方	5.26g/L	7.89g/L
PFCHO B 部分(柠檬酸铁储备溶液)	10mL/L	10mL/L
重组人类胰岛素	7.76mg/L	13mg/L
右旋糖,无水	7.0g/L	7.0g/L
L-谷氨酰胺	0.876g/L	0.584g/L
碳酸氢钠	1.6g/L	1.6g/L
HEPES	1.8g/L	1.8g/L
NaCl	2.67g/L	2.45g/L
Pluronic F-68(泊洛沙姆 188, NF)	1.0g/L	1.0g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.031g/L	0.031g/L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.436g/L	0.436g/L
细菌培养用 TC 酵母粉	4.0g/L	10.7g/L
植物蛋白胨	2.579g/L	6.92g/L
甲氨喋呤,2mM	0.05mL/L	0.05mL/L
NaOH,2N	3.5mL/L	5.67mL/L
HCl,2N	2.91g/L	2.5mL/L
终 pH 值	7.10-7.20	7.10-7.20
终渗透压(mOsmo/kg)	373-403	373-403

[0326] 在整个培养中将温度维持在 35℃。当细胞培养物葡萄糖水平低于 2g/L 时,添加额外 4g/L 的葡萄糖。

[0327] 将类似过程用于抗-EPO/R 抗体生产。然而,将贫养培养基(leanermedium)(SR-274)用于种子驯养中的细胞生长。将培养基 SR-286(用于 Humira 生产的相同培养基)用于抗-EPO/R 抗体的生产阶段(表 6)。生长培养基 SR-274 用于种子驯养和种子反应器中。生产培养基 SR-286 用于 3000 升的生产生物反应器中。

[0328] 表 6:抗-EPO/R 过程中培养基的组成

[0329]

组份	生长培养基 SR-274	生产培养基 SR-286
PFCHO A 部分, RM-003	16.45g/Kg	N/A
PFCHO A 部分, RM-230(不含盐)	N/A	7.89g/Kg
PFCHO B 部分(柠檬酸铁储备溶液)	10mL/Kg	10mL/Kg
重组人类胰岛素	4mg/Kg	13mg/Kg
右旋糖,无水	1.5g/Kg	7.0g/Kg
L-谷氨酰胺	0.292g/Kg	0.584g/Kg
碳酸氢钠	1.6g/Kg	1.6g/Kg
HEPES	N/A	1.8g/Kg

NaCl	N/A	2.45g/Kg
Pluronic F-68(泊洛沙姆 188, NF)	N/A	1.0g/Kg
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	N/A	0.031g/Kg
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	N/A	0.436g/Kg
细菌培养用 TC 酵母粉	2.0g/Kg	10.7g/Kg
植物蛋白胨	N/A	6.92g/Kg
甲氨喋呤, 2mM	0.25mL/Kg	N/A
NaOH, 2N	按需要	5.67mL/Kg
HCl, 2N	按需要	2.5mL/Kg
最终 pH 值	7.20±0.10	7.15±0.05
最终渗透压 (mOsmo/kg)	320±20	388±15

[0330] 生长培养基 SR-274 用于旋转烧瓶、Wave 袋、100L 种子生物反应器 Z-4605 和在 3000L 生产生物反应器 Z-3600 中初始阶段的 575L 培养中。生产培养基 SR-286 仅用于 3000L 生产生物反应器 Z-3600 中。

[0331] 生产培养基 SR-286 和 SR-372 由表 5 和 6 所列出的类似培养基组份组成,但含有不同水平的 MTX(SR-286 为 0nM 且 SR-372 为 100nM)。

[0332] 研发抗-IL18 生产的改良过程以获得较高生产率。这一新过程(过程 B)引入延长细胞培养寿命并增加抗体体积生产率的新培养基。生产培养基(SR-382)在生产阶段中使用的养分量不同于先前的生产培养基。SR-382 的完全组成描述于表 7 中。在抗-IL18 生产的新过程中,尽管在种子驯养期间仍在培养基 SR-371 中培养细胞,但培养基 SR-372 用于生产阶段前一个步骤的种子生物反应器中。接着,在生产阶段在培养基 SR-382 中培养细胞,将温度从 35℃ 转变至 33℃ 以延长细胞培养寿命,从而延长培养基 SR-382 对细胞的作用。

[0333] 生长培养基 SR-371 用于旋转烧瓶、Wave 袋好 100 升种子生物反应器中。短程填充培养基(Short-fill medium)SR-372 用于 3000 升生产生物反应器中的初始阶段的 575 升培养中。生产培养基 SR-382 仅用于 3000 升生产生物反应器中。

[0334] 表 7:抗-IL18 过程 B 的培养基组成

[0335]

组份	生长 培养基 SR-371	短程填充 培养基 SR-372	生产 培养基 SR-382
PFCHO A 部分,特定不含盐配方	5.26g/L	7.89g/L	10.52g/L
PFCHO B 部分 (柠檬酸铁储备溶液)	10mL/L	10mL/L	10mL/L
重组人胰岛素	7.76mg/L	13mg/L	13mL/L
右旋糖,无水	7.0g/L	7.0g/L	7.0g/L
L- 谷氨酰胺	0.876g/L	0.584g/L	0.584g/L
碳酸氢钠	1.6g/L	1.6g/L	1.6g/L
HEPES	1.8g/L	1.8g/L	1.8g/L

[0336]

NaCl	2.67g/L	2.45g/L	0g/L
Pluronic F-68(泊洛沙姆 188, NF)	1.0g/L	1.0g/L	1.0g/L
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	0.031g/L	0.031g/L	0.031g/L
Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	0.436g/L	0.436g/L	0.436g/L
细菌培养用 TC 酵母粉	4.0g/L	10.7g/L	14.27g/L

植物蛋白胨	2.579g/L	6.92g/L	9.23g/L
甲氨嘌呤, 2mM	0.05mL/L	0.05mL/L	0.05mL/L
NaOH, 2N	3.5mL/L	5.67mL/L	8.95mL/L
HCl, 2N	2.91g/L	2.5mL/L	4.1mL/kg
终 pH 值	7.1-7.2	7.1-7.2	7.1-7.2
终渗透压 (mOsm/kg)	373-403	373-403	373-403

[0337] 富集该培养基中的养分以进一步提供 CHO 细胞生长和抗体生产的能量来源及构建组份。在过程 B 中, 尽管在种子驯养期间仍在培养基 SR-371 中培养细胞, 但培养基 SR-372 用于在生产阶段前一个步骤的种子生物反应器中。接着, 在生产阶段于培养基 SR-382 中培养细胞, 将温度从 35°C 转变至 32°C 以延长细胞培养寿命, 从而延长培养基 SR-382 对细胞的作用。

[0338] 过程 A : 抗 -IL18 细胞和抗 -EPO/R 细胞在培养基 SR-372 和培养基 SR-286 中的性能

[0339] 在培养基 SR-371 中培养表达抗 -IL18 的细胞, 该培养基具有 100nM MTX 以累积用于生产阶段的细胞质量。培养基 SR-371 用于支持具有中等细胞生长的较高细胞生产率。表 8 展示生产抗 -IL18 的 CHO 细胞在 3000L 生产生物反应器中的代表性生产生长概况。以培养基 SR-372 使用此过程 (过程 A), 可获得高达 1g/L 的终滴度。

[0340] 表 8 : 在培养基 372 中生产抗 -IL18 抗体 (过程 A)

[0341]

可量测结果	实验室规模过程 (n = 5) 温度 = 35°C	3000L 过程 (n = 6) 温度 = 35°C
最大细胞密度 [10 ⁶ 个活细胞 /ml]	8.68	9.2
50%活力的持续时间 [天]	11	11
细胞单位生产率 [pg/细胞 - 天]	20.5	17.6

[0342]

在 50%存活时收集的体 积生产率 [mg/L- 天]	98.8	81.8
50%存活时的滴度 [mg/L]	1004	900

[0343] 将除 MTX 水平以外与培养基 372 共有相同配方的培养基 286 用于抗 -EPO/R 生产。尽管较低细胞密度通常在生产阶段获得, 但通过使用培养基 SR-286 作为生产培养基来达到较高生产率使得细胞能够以 3000L 规模生产高达 1.8g/L 的抗体。如表 9 所概述, 观测到合理细胞生长。实验室规模结果和 3000L 运行结果证实该培养基可增加细胞单位生产率并观测到高达 1.9g/L 的终滴度。这些结果表明具有类似配方的培养基 (表 1 和 2 中的 SR-372 和 SR-286) 支持大规模 CHO 细胞培养中的优良细胞生长和高抗体生产率。

[0344] 表 9 : 于培养基 286 中产生抗 EPO/R 抗体

[0345]

可量测结果	实验室规模过程 (n = 2) 温度 = 35°C	3000L 过程 (n = 1) 温度 = 35°C
最大细胞密度 [10 ⁶ 个活细胞 /ml]	4.5	4.80
50%活力的持续时间 [天]	13	13
细胞单位生产率 [pg/ 细胞 - 天]	38.0	53.2
在 50%存活时收集的体 积生产率 [mg/L- 天]	114.4	146.1
50%存活时的滴度 [mg/L]	1487	1900

[0346] 过程 B :用培养基 SR-382 的过程 B 中抗 -IL 18 细胞的性能

[0347] 培养基 SR-382 是用于抗 -IL-18 抗体生产的延长分批过程中的最富集培养基。过程 B 包括在生产阶段或短程填充阶段之前在种子驯养中使用培养基 SR-371 并在种子生物

反应器中使用 SR-372。细胞生长与生产阶段培养基 SR-372 中的细胞生长相比为中等的。然而,由于 温度转变,使用培养基 SR-382 获得高达 2.5g/L 的终滴度。

[0348] 基于表明表达抗 -IL18 细胞的细胞单位生产率随着生产培养基中养分增加而按比例增加的研究来研发培养基 SR-382。培养基 SR-382 为提供细胞生长与终滴度增加之间平衡的最佳培养基。尽管最大细胞密度仅达到每毫升 5.9×10^6 个细胞,但细胞单位生产率增加两倍。与温度转变组合来延长细胞培养持续时间,如表 10 所示达到高达 2.2g/L 的终滴度。

[0349] 表 10 :在培养基 SR-382 中生产抗 -IL18 抗体 (过程 B)

[0350]

可量测结果	实验室规模过程 (n = 1) 温度 = 35-33℃	3000L 过程 (n = 1) 温度 = 35-33℃
最大细胞密度 [10 ⁶ 个活细胞 /ml]	7.85	5.90
50% 活力的持续时间 [天]	12	12
细胞单位生产率 [pg/ 细胞 - 天]	32.0	42.1
在 50% 存活时收集的体 积生产率 [mg/L- 天]	181.1	191.8
50% 存活时的滴度 [mg/L]	2173	2110

[0351] 实施例 2 :用于表达抗体的改良分批补料方法和补料溶液

[0352] 以分批模式运行的生物反应器的废培养基分析表明特定氨基酸的耗竭。即使未经量测,但此发现也暗示其他培养基组份的耗竭,其可导致额外营养缺乏。为补偿这些可能的缺乏,添加养分溶液。在工程设计领域中,该方法一般称作分批补料。

[0353] 就操作观点而言,使用浓缩补料溶液是便利的。以下实施例描述添加化学成分确定的基础培养基 (PF CHO, 目录号 67411-50L) 和复合水解产物 (例如酵母粉和植物蛋白胨) 的高度浓缩溶液。经测定该对水解产物展现与其浓度比率相关的生产率增加协同效应。

[0354] 实施例 2.1 :阿达木单抗分批补料方法

[0355] 初始阿达木单抗 (Humira/D2E7) 过程由 3 天过程组成,其中去除培养基并连续补充八次。通过用水解产物酵母粉替代培养基中的水解产物 Primatone 并通过使用新反应器参数来研发改良分批补料方法。改良分批补料方法持续大约 12 天。

[0356] 通过再调配基础培养基 (PFCHO) 并添加新水解产物 (即植物蛋白胨) 进一步改良初始分批过程的生产率。将含有培养基调配物的该水解产物用于以上称作 SR-286 的方法中 (参见表 2)。也研究反应器操作参数,使可以鉴别运行整个阿达木单抗生产过程的最佳温度。

[0357] 每日从反应器实验获得的样本分析突显一些潜在的营养缺乏。对于阿达木单抗分批过程的情况而言,通过补入 25x 浓缩 PFCHO 溶液和水解产物酵母粉 (yeastolate) 及植物蛋白胨的 33x 溶液处理潜在的营养缺乏。水解产物为复合组份,其表现出与浓度比率相关的协同效应。将该比率维持在高度浓缩 33x 型中。

[0358] 实验计划

[0359] 实验目标为比较新分批补料方法与两种分批对照方法 (温度转变 37 → 33°C 相对于恒定温度 35°C)。

[0360] 分批补料修饰为:

[0361] 1. 基于氨基酸缺乏补入 25x 基础培养基富集 (PFCHO 溶液)。

[0362] 2. 以一定时间间隔补入 33x 水解产物富集溶液使得培养基渗透压决不超过 440mOsm (可引起细胞生长和生存力降低的条件)。

[0363] 3. 反应器温度设定点始终为 35°C。

[0364] 此实验的对照为:

[0365] a) 相同反应器以当前培养基 (SR-286) 并在对照分批方法参数 (对照条件包括反应器以温度转变和线性 pH 斜坡运行 SR-286 培养基) 下操作,命名为对照 #1;及

[0366] b) 相同反应器以当前培养基 (SR-286) 并在除操作温度始终为 35°C 以外的所有当前分批方法参数下操作,命名为对照 #2。

[0367] 材料

[0368] 工作体积为 13L 的 Braun ED 反应器;

[0369] 使用 Working Cell Bank WCB970513-6 的中试工厂接种物 (Pilot Plant Inoculum) AFI915A;

[0370] 3XP11Y7P 基础培养基溶液 (SR-286);

[0371] 基础培养基富集溶液 (25x) (PF CHO 溶液);

[0372] 水解产物富集溶液 (33x);

[0373] 葡萄糖补料注射 (feed shot) (200g/L) (葡萄糖溶液);

- [0374] 用于控制 pH 的 0.5N 氢氧化钠溶液。
- [0375] 溶液制备：
- [0376] 1. 生产培养基（参见上文表 2 中所述的 SR-286 溶液记录）
- [0377] 2. 2kg PFCHO 富集溶液 (25x)（基本富集溶液）：
- [0378] 按照以下次序在恒定搅拌下并在各添加步骤后混合 10 分钟制备：
- [0379]

组份	质量[g]	注解
MilliQ H ₂ O	1500	
PFCHO	131.5	
10 N NaOH	49 mL	直至 pH 10
天冬酰胺	15	pH 值将降至约 9.73
葡萄糖	100	pH 值将降至约 9.71
MilliQ H ₂ O	按需要	使重量为 2000 g, pH 值约 9.70, 渗透压约 1480 mOsm
以 0.2 μ PES 过滤膜过滤，在 4℃ 下储存		
每次添加 1% 初始体积的上述溶液将增加：		
a) 与原始 3x 浓度相比，PFCHO 浓度增加 0.25x		
b) 天冬酰胺增加 75 mg·L ⁻¹		
c) 葡萄糖浓度增加 0.5 g·L ⁻¹		
d) 渗透压增加 10 mOsm		
e) pH 值增加约 0.10 个 pH 单位		

- [0380] 3. 1Kg 水解产物富集溶液 (33x)：
- [0381] 按照以下次序在恒定搅拌下并在各添加步骤后混合 10 分钟制备：
- [0382]

组份	质量[g]	注解
MilliQ H ₂ O	500	
TC 酵母粉	265	
植物蛋白胨	165	
MilliQ H ₂ O	按需要	使重量为 1000 g
以 0.2 μ PES 过滤膜过滤，在 4℃ 下储存		
注意：每次添加 1% 初始体积的上述溶液将增加：		
a) 与原始分批浓度相比，TC 酵母粉浓度增加 2.65 g/L(0.33x)。		
b) 与原始分批浓度相比，植物蛋白胨浓度增加 1.65 g/L(0.33x)。		

[0383] 方法：

[0384] 反应器操作：

[0385] 为接种反应器，根据 Humira 种子驯养方法的描述使小瓶解冻并扩增。在反应器中生长后，抽排反应器至 3.62L 以刺激短程填充阶段。接着，用生产培养基 (SR-286) 将反应器注满至 13L 水平。

[0386] 以下列参数操作反应器：

[0387] a) 搅拌 70RPM；

[0388] b) 温度 35℃；

[0389] c) pH 值线性斜坡自 pH 7.16 起始，经 72 小时至 pH 6.90；

[0390] d) 溶氧 30%；

[0391] e) 当葡萄糖含量低于 $2.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，向反应器中补入 195g 200g/L 的葡萄糖溶液。

[0392] 补入时间表

[0393] 以下描述表示用于向阿达木单抗批料中添加额外养分（即补充基础培养基）和水解产物的补入时间表

[0394] 表 11：阿达木单抗分批补料方法的补入时间表

[0395]

天	补入量[g]	
	25x PFCHO	33x 水解产物
0-3		
4	130	130
5		
6	260	
7		130, 葡萄糖
8		
9	260, 葡萄糖	
10		
11	130	
12-13		

[0396] 结果：

[0397] 比较对照方法 #1 和 #2 与改良分批补料方法的结果（以及预期改良）描述于表 12 和 13 中。如表 12 所示，在恒定温度下使用改良分批补料方法，添加增强的富集基础培养基和水解产物富集溶液增加阿达木单抗生产率。

[0398] 表 12：比较阿达木单抗分批补料方法

[0399]

可量测结果	对照物 #1 (3000L 过程) 温度 = 37°C ↓ 33°C	对照物 #2 (3000L 过程) 温度 = 35°C	分批补料实验 温度 = 35°C
最大细胞密度 [10 ⁶ 个活细胞 /ml]	3.63	4.45	4.41
50% 活力的持续时间 [天]	13	10	12
细胞单位生产率 [pg/ 细胞 - 天]	42.5	46.7	61.4

[0400]

在 50% 活力时收集的体积生产率 [mg/L- 天]	98	114	163
50% 存活时的滴度 [mg/L]	1322	1178	1979

[0401] 表 13：使用阿达木单抗分批补料方法预期结果的比较

[0402]

预期结果	对照物 #1 (3000L 过程) 温度 = 37°C ↓ 33°C	对照物 #2 (3000L 过程) 温度 = 35°C	分批补料实验 温度 = 35°C
每年收集物 [允许 3 天进行周转]	22	28	24
每年产物产量 (基于 2600L 收集物) [Kg/ 年]	75.6	85.7	123.4
每年增加的产量 (对照物 = 100%)	100%	114%	163%

[0403] 实施例 2.2：ABT-874 分批补料方法

[0404] 关于以上提及的阿达木单抗改良分批补料方法，每日从以分批模式运行 ABT-874 的反应器获得的样本的分析突出了氨基酸耗竭。同样，通过使用 25x PFCHO 溶液和浓缩 33x 水解产物溶液解决该缺乏。

[0405] 最初通过替代培养基中的水解产物并导入新的反应器参数为 D2E7 (阿达木单抗) 研发 ABT-874 分批过程。此外，如 D2E7 (阿达木单抗) 的情况，再调配基础培养基并添加新

的水解产物。将该培养基配方作为 SR-286 用于当前的 D2E7 方法中（参见上表 2）。

[0406] 实验计划：

[0407] 实验目标为比较对照分批过程和以下分批补料条件，二者均从先前鉴别出氨基酸耗竭时起始：

[0408] a) 交替补入基础培养基富集 25x PFCHO 和 33x 水解产物富集溶液；

[0409] b) 每日补入基础培养基富集 25x PFCHO 和 33x 水解产物富集溶液。

[0410] 该实验的对照包括以当前培养基（SR-286）并在对照分批过程参数（SR-286 培养基，具有温度转变和线性 pH 值斜坡）下操作的相同反应器。

[0411] 材料：

[0412] 工作体积为 13L 的 Braun ED 反应器；

[0413] Working Cell Bank W990107-J695；

[0414] 3XP11Y7P 基础培养基溶液（SR-286-111899-1）；

[0415] PFCHO-0-500-HG2Y 生长培养基；

[0416] 基础培养基富集溶液（25x）；

[0417] 水解产物富集溶液（33x）；

[0418] 0.5N 氢氧化钠溶液。

[0419] 溶液制备：

[0420] 1. 生产培养基（参见 SR-286 溶液记录）

[0421] 2. 25x PFCHO 溶液（基础富集溶液：描述于先前实施例中；但使用 462g 葡萄糖溶液替代葡萄糖粉末，因此最终重量为 2170g）。

[0422] 注意：每次添加 1% 初始体积的以上溶液将增加：

[0423] a) 与原始 3x 浓度相比，PFCHO 浓度增加 0.25x；

[0424] b) 天冬酰胺增加 $75\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；

[0425] c) 葡萄糖浓度增加 $2.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ；

[0426] • pH 值增加约 0.10 个 pH 单位。

[0427] 3. 33x 水解产物溶液（描述于先前实施例中，添加 $2.40\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖）

[0428] 注意：添加 1% 初始体积的以上溶液将增加：

[0429] a) 与原始分批浓度相比，TC 酵母粉浓度增加 2.65g/L (0.33x)。

[0430] b) 与原始分批浓度相比，植物蛋白胨浓度增加 1.65g/L (0.33x)。

[0431] 方法：

[0432] 为接种反应器，根据 ABT-874 种子驯养方法的描述使小瓶解冻并扩增。在反应器中生长后，将反应器抽排至 4.06 升（如表 13 所述，运行名称为 B9013-ED2 和 B9014-ED3）以刺激短程填充。接着，用常规生产培养基（SR-286）将反应器注满至 13L 水平。

[0433] 根据以下参数操作反应器：

[0434] a) 搅拌 70RPM；

[0435] b) 温度 33°C ；

[0436] c) pH 6.90；

[0437] d) 溶氧 40%。

[0438] 表 13 :ABT-874 的补入时间表

[0439]

	补入量[g]			
	交替补入时间表		每日补入时间表	
	运行名称 B9013-ED2		运行名称 B9014-ED3	
	25x PFCHO	33x 水解产物	25x PFCHO	33x 水解产物
0-4				
5	130		65	65
6		130	65	65
7	130		65	65
8		130	65	65
9	130		65	65
10		130	65	65
11	130		65	65
12		130	65	65
13	130		65	65
14-15				

[0440] 结果

[0441] 比较改良分批补料方法的结果描述于下文表 14 和 15 中。

[0442] 表 14 :分批补料方法结果

[0443]

可量测结果	对照物 #1 (3000L 过程) 温度 = 33℃	交替分批补料实验 温度 = 33℃	每日分批补料 实验 温度 = 33℃
最大细胞密度 [10 ⁶ 个活细胞 /ml]	3.79	5.39	4.15
50%活力的持续时间 [天]	13 至 76%	15	15
细胞单位生产率 [pg/细胞-天]	71	83	82
在 50%活力时收集的体积生产率 [mg/L-天]	188	281	212
50%存活时的滴度 [mg/L]	2025@76%	3995	3033

[0444] 表 15 :分批补料方法结果

[0445]

预计结果	对照物 (1000L 过程) 温度 = 33℃	交替分批补料实验 温度 = 33℃	每日分批补料实验 温度 = 33℃
每年收集物 (允许 3 天进行周转)	21	20	20
每年产物产量 (基于 2600L 收集物) [Kg/年]	137	208	158
每年增加的产量 (对照物 = 100%)	100%	152%	115%

[0446] [0449] 实施例 3 :用于增加分批补料培养物的体积生产率的稳定组合补料溶液

[0447] 以下实施例描述调配稳定高浓度补料溶液的新颖方法,该补料溶液包括两种水解产物、至少一种除谷氨酰胺以外的氨基酸、糖和化学成分确定的培养基。所得补料溶液能够增加生产重组蛋白的哺乳动物细胞系的体积生产。最后,提出基于葡萄糖浓度的反馈控制

而研发的分批补料方法的加速方法。

[0448] 材料和方法

[0449] 组合补料含有水解产物细菌培养用 TC 酵母粉 (RM-216) (BDDifco 255771) 和植物蛋白胨 (BD Difco 2922450) 加葡萄糖、L- 天冬酰胺一水合物 (Sigma-Aldrich)、还原形式的 DMEM/F12 (去除 NaCl、磷酸盐、pH 值指示剂和其他非必需组份; Invitrogen 12500) 或 Ex-Cell PFCHO(A)-S1 (经修饰的缺乏) w/o 谷氨酰胺、w/o NaHCO₃ (JRH Biosciences 67411-500L35470)。

[0450] 为制备溶液, 使用具有 PMQ004D2 过滤包的 Millipore Milli-Q 过滤水。使用实验室电磁搅拌器将材料溶解在特定质量的水中。在添加各组份后, 在并入下一组份前视觉验证完全溶解。

[0451] 当适用时, 则使用 HACH 2100P 携带型浊度计 (Hach Co. Loveland, CO) 定量浊度。人眼侦测浊度的阈值约为 15 NTU (散射浊度单位)。

[0452] 在 1.5L 的操作体积于 3L Applikon 生物反应器中进行生物反应器实验, 通过经由级联空气和氧气流控制 pH 值、温度、搅拌和氧。用 Cedex (Innovatis AG, Bielefeld, Germany) 进行细胞计数。使用 YSI2700 (YSI Inc., Yellow Springs, OH) 测定葡萄糖、乳酸盐并在一些情况下也用 Nova Bioprofile 400 (Nova Biomedical Corp., Waltham, MA) 测定额外代谢物。使用 ABL 5 血液气体分析仪 (Radiometer A/S, Copenhagen, Brønshøj, Denmark) 验证氧 (pO₂)、二氧化碳 (pCO₂) 的平衡分压及 pH 值。

[0453] 实施例 3.1 : 使用 PFCHO 作为基础培养基制备稳定组合补料

[0454] 单一高浓度补料可促进细胞培养分批补料生产, 因为其降低所需添加物的体积和数量。然而, 这是比较复杂的, 因为 PFCHO 粉末必须在 pH 值大于 9.00 时溶解。此外, 水解产物在中性 pH 值条件下为可溶的。因此, 尝试将两种组份在中性或高 pH 值下简单混合将会导致 (非溶解) 粉末混悬液。如文献中所报导, “完全优化的补料通常以支持一种以上导入速率和补料 pH 值 (例如由于溶解度的原因) 的两种或两种以上分离溶液存在” [1]。

[0455] 组合补料稳定性实验

[0456] 如下表所述, 已确定添加水解产物可使 PFCHO 浓度在较长时间段保持稳定。依次向约 700g 水中添加组份, 量为 20g Kg⁻¹ PFCHO、7.5g Kg⁻¹ 天冬酰胺、21g Kg⁻¹ 葡萄糖、22g Kg⁻¹ 酵母粉和 14g Kg⁻¹ 植物蛋白胨, 且最后添加水以达到 1Kg 的最终重量。将溶液混合并接着用 HCl 2.0N 将其 pH 值降至目标 pH 值。在下表中, 通过肉眼视觉观测来测定浊度。

[0457] 表 16 : 终 pH 值对不同组合补料配方的

[0458]

	配方	终溶液 pH				
		6.75	7.00	7.25	7.50	7.75
1	将 PFCHO、天冬酰胺和葡萄糖于 pH 值 10.0 时溶解	N/A	N/A	N/A	在 4 小时前完全沉淀	
2	与以上(1)相同至 pH 值为 7.75, 接着添加植物蛋白胨和酵母粉	N/A	N/A	最终 pH 值为 7.3	N/A	N/A
3	与以上(2)相同, 接着 pH 值为 6.75、7.00、7.25、7.50、7.75	30-60 min 内轻度混浊; 但所得溶液保持稳定				

[0459] 由表 16 可知, 最小浊度为 2) 和 3) pH 6.75 和 7.25。注意, 2) 及 3) 即使在接近 24 小时后也不变混浊。基于这些结果, 显然由于达到低浊度, 水解产物使溶液中的 PFCHO 稳定。

[0460] 只要水解产物使所得混合物稳定, 则可将植物蛋白胨和酵母粉于 pH 值 10.0 添加至 PFCHO 溶液中; 接着使整个混合物降至目标 pH 值。此添加次序将去除尤其在混合较大体积时不稳定的使 PFCHO 溶液保持 pH 值 8.0 下的不稳定步骤。

[0461] 为测试先前假设, 我们用分别含有 20 和 $7.5\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ PFCHO 和天冬酰胺配方测试该新的添加次序。将所得溶液 X-1 分开, 且使其降至 pH 7.0、6.75、6.5 和 6.25。如可从下图中观测, 证明这些溶液是稳定的:

[0462] 表 17. 不同 pH 值时配方 X-1 的浊度概况 (NTU)

[0463]

	pH			
时间[小时]	6.25	6.50	6.75	7.00
2.25	n/a	8.44	9.86	11.32
4.00	8.77	7.8	9.25	10.70
6.00	7.02	5.71	6.28	4.25

[0464] 三小时后, 最少混浊溶液 pH 值为 6.5。浊度明显减少 (尤其对于 pH 值 7.0 而言) 是由于一些微粒沉降。

[0465] 葡萄糖作为稳定剂

[0466] 测试添加 $200\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ 葡萄糖作为稳定剂的配方 (参见表 18)。

[0467] 表 18. 经稀释的 D2E7 补料溶液

[0468]

	MilliQ H ₂ O	750.0	$\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$	-水过量
	葡萄糖	200.0		-作为可能的稳定剂
	PFCHO	20.0		
+	NaOH 10 N		→	pH 10.00
	天冬酰胺	2.29		
	酵母粉	15.7		
	植物蛋白胨	10.0		
+	HCl	5 N	→	pH 6.75-7.50

[0469] 依次称重并添加组份。应降低水的初始质量以达到 1Kg 最终质量。

[0470] 如可从下表中观测,证明该溶液在一定 pH 值范围内稳定数小时:

[0471] 表 19. 组合补料浊度读数 (NTU) 对时间和 pH 值的函数

[0472]

	pH			
时间[小时]	6.72	7.00	7.22	7.50
0.25	3.48	3.75	3.95	5.83
2.50	3.07	3.13	3.42	3.74
8.50	2.98	2.95	2.99	3.15

[0473] 使用包含葡萄糖的经修饰组合补料溶液表达两种不同抗体,即阿达木单抗 (D2E7) 和抗 -IL-18 抗体 ABT-325。

[0474] 稳定 D2E7 产生的组合补料溶液

[0475] 如果添加至生物反应器中的调配物体积是以最低浓度组份 (即 PFCHO) 计算,则需要添加极大量补料来匹配已个别评估的量。因此,较高浓度为研发有效补料配方的下一步骤。该溶液称作 D2E7 组合补料溶液并描述于下表中。

[0476] 表 20. D2E7 组合补料溶液

[0477]

	MilliQ H ₂ O	750.0	g•Kg ⁻¹ →pH 10.00
	葡萄糖	150.0	
	PFCHO	27.0	
+	NaOH 10 N		
	天冬酰胺	3.1	
	酵母粉	21.2	

[0478]

	植物蛋白胨	13.5	→pH 6.75
+	HCl 5 N		

[0479] 依次称重并添加组份。应降低水的初始质量以达到 1Kg 最终质量。

[0480] 测试含有 200、150 和 100g Kg⁻¹ 葡萄糖的配方。如下表可见,这些溶液也具有数个小时内的稳定浊度。表 21 显示添加葡萄糖会降低溶液浊度。

[0481] 表 21. 作为葡萄糖浓度函数的 D2E7 组合补料溶液浊度时间曲线

[0482]

	葡萄糖 [g/Kg 组合补料]		
	100	150	200
时间[小时]			
0	n/a	9.23	7.31
1	13.80	8.77	n/a
2	13.20	9.33	n/a
3	12.80	10.30	n/a
4	12.80	10.70	5.98
7	n/a	n/a	6.80

[0483] 如表 21 所示,提高葡萄糖水平会减低溶液浊度。基于浊度水平认为这些不同配方可为过滤实验所接受。

[0484] 稳定 ABT-325 生产的组合补料溶液

[0485] 为获得稳定 ABT-325 组合补料,根据用于 D2E7 组合补料的方法制备 50L 当前配方,如表 22 所示。

[0486] 表 22. ABT-325 组合补料溶液

[0487]

	MilliQ H ₂ O	750.0	g•Kg ⁻¹
	葡萄糖	150.0	
	PFCHO	21.0	
-	NaOH 10 N		→pH 10.00
	天冬酰胺	5.0	
	酵母粉	65.0	
	植物蛋白胨	40.0	
+	HCl 5 N		→pH 6.75

[0488] 依次称重并添加组份。应降低水的初始质量以达到 1Kg 最终质量。

[0489] 如可从下表中观测,在制备时,溶液维持大约 20-30NTU 的浊度水平:

[0490] 表 23. ABT-325 组合补料的浊度

[0491]

	浊度
时间[小时]	[NTU]
0.00	41.8
1.00	28.7
1.50	19.8
2.00	20.0
3.50	14.5

[0492] 根据 D2E7 方法制备 50L ABT-325 配方组合补料溶液以测试制备方法的可扩展性和适用性。如上所示,溶液保持稳定四小时。

[0493] 应注意,以上实施例中所提及的 PF CHO 培养基对应于实施例 1 的细胞培养基中所提及的经修饰 PF CHO(经修饰 A 部分)。

[0494] 实施例 3.2:使用 DMEM-F12 作为基础培养基制备稳定组合补料

[0495] 如先前实施例中所描述,可制造含有 PFCHO 和两种水解产物以及葡萄糖的稳定组合补料溶液。以下实施例证实此方法可应用于任何 基础补料配方并产生稳定的组合补料溶液。

[0496] 修饰 DMEM-F12(一种可公开获得的培养基配方)使其与组合补料制剂相容,此处命名为 DMEM-F12m。去除以下组份:NaCl、NaHCO₃、NaH₂PO₄•H₂O、Na₂HPO₄、D-葡萄糖、HEPES、Na•次黄嘌呤、酚红、L-谷氨酰胺和胸苷。根据实施例 3.0 和 3.1 中所述方法制备与 D2E7

和 ABT-325 补料配方匹配的组合补料。最终组份和配方次序见下表：

[0497] 表 24. DMEM-F12 组合补料

[0498]

	补料 I	补料 II	
MilliQ H ₂ O	600.0	600.0	$\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$
葡萄糖	150.0	150.0	
DMEM-F12m	27.0	21.0	
+ NaOH 10 N			→pH 10.00
天冬酰胺	3.1	5.0	
酵母粉	21.2	65.0	
植物蛋白胨	13.5	40.0	
+ HCl 5 N			→pH 6.75
MilliQ H ₂ O	至 1000 g		

[0499] 依次称重并添加组份以达到 1Kg 最终质量。

[0500] 补料 I 及 II 在制备后可维持 12NTU 或更小的浊度 4 小时以上。

[0501] 实施例 3.3 : 归因于组合补料添加的细胞生长和生产率增强

[0502] 为评估以上组合补料的生长和滴度促进特征, 使用 ABT-874 细胞 (表达抗 -IL-12 完全人类 IgG1 抗体)。该 CHO 细胞系通常在细胞培养基 SR-383 (2X, 具有 500nM mtX) 中培养。

[0503] 对于这些实验而言, 将细胞传代至 DMEM/F12 至少 5 代, 直至经恒定生长速率观测到适应。在 35°C 和 5% CO₂ 的恒温箱中, 在 Thermolyne 搅拌盘上以 70rpm 搅拌旋转培养物。在接种之前即刻从 维持培养物中获取所需量的细胞悬浮液。将细胞离心, 丢弃上清液并将沉淀重悬于新鲜、预温的培养基中以获得 $4 \times 10^5/\text{mL}$ 的接种密度。

[0504] 将细胞培养物于旋转器中扩增直至生成足以用于生物反应器接种的体积, 以在 1.5L Applikon 生物反应器中达到 1 : 5 的分流比。反应器运行条件为 pH 6.9、35°C、150rpm 且溶氧水平为 40% 饱和。所有生物反应器实验均一式两份。在运行过程中, 每隔一天给予细胞三次初始反应器体积 1% 的组合补料快速注射。

[0505] 使用两种组合补料可极大地增强细胞培养物的生长。在 CF I 情况下, 与对照物的 13 天相比, 尽管培养仅持续 10 天, 但达到双倍峰值细胞密度。对于 CF II 情况, 与对照物相比, 峰值细胞密度几乎为三倍, 而培养的持续时间类似。就终滴度而言, 观测到更显著的效应。DMEM/F12 培养基的滴度大约为 41mg/L, 相比之下, CF I 的为 188, CF II 的为 434。不同补料溶液对最大细胞密度、培养时间、滴度和单位生产率的影响概述于下表中：

[0506] 表 25. DMEM-F12m 组合补料的性能

[0507]

	参数				
描述	细胞密度峰值 [10 ⁶ 个活 细胞/mL]	终 IVC[×10 ⁶ 个 细 胞 -d/mL]	培养时间[d]	终 滴 度 [mg/L]	qp [pg/ 细胞-d]
对照物(n=2)	1.07+/-0.018	9.53+/-0.005	13	41+/-1.9	4.7+/-0.29
CfI(n=2)	1.92+/-0.031	11.27+/-0.004	10	188+/-0.1	16.4+/-12.03
CfII(n=2)	2.72+/-0.009	20.74+/-0.177	13	434+/-16.5	25.1+/-1.17

[0508] 实施例 3.4 :经由添加组合补料的高滴度细胞培养过程

[0509] 较高滴度使得需要较少生产运行即可满足给定总产量。以下实施例描述在分批补料方法中生产平均约 4g/L 滴度的 ABT-874 分批补料大规模过程。此外,培养基和组合补料的进一步改良使可达到超过 6 g/L 的滴度水平。

[0510] 材料和方法

[0511] 使用 ABT-874 抗体产品线作为模型系统。

[0512] 补料溶液制备

[0513] 根据先前所述方法制备补料溶液。使用两种天冬酰胺浓度,即 5.0 或 7.5g • Kg⁻¹。制备方法见下表:

[0514] 表 26. ABT-874 组合补料制备

[0515]

	MilliQ H ₂ O	600.0	g•Kg ⁻¹
	葡萄糖	150.0	
	PFCHO	21.0	
+	NaOH 10 N		→pH 10.00
	天冬酰胺	5.0 或 7.5	
	酵母粉	65.0	
	植物蛋白胨	40.0	
+	HCl 5 N		→pH 6.75

[0516] 称重并添加组份以达到 1Kg 最终质量。

[0517] 使用实验室电磁搅拌器在强烈涡旋下将材料溶解于特定质量的水中。在添加各组份后,在并入下一组份之前视觉验证完全溶解直至步骤 5。然而,这对于步骤 6 和 7 是不可能的。对于这两个步骤,认为将粉末并入溶液中足以进行至最终 HCl 添加。

[0518] 过程培养基筛检

[0519] 为获得基线性能资料,进行以 3X 分批补料 (FB) 3000L 作为对照物,以原型 4X FB 方法和非补入 (扩展分批:EB) 3X 和 4X 条件为特征的实验。具体而言,已提出较高培养基浓度会在培养物生长过程中产生初始停滞;然而,扩展分批 (EB) 3X 或 4X 方法未观测到显著停滞。

[0520] 如预期,对于 3X 及 4X 方法而言,补料补充可产生较高滴度。然而,如果补料 (即分批补料),则观测到 4X 方法的显著生长抑制。小规模实验的氨基酸分析显示,即使在补料后仍存在氨基酸天冬酰胺和谷氨酰胺的完全耗竭。为此,增加总补料时间和组合补料中的天冬酰胺的量。总之,确定 4X FB 方法可能达到比 EB 方法或 3X FB 对照物更高的终滴度。因此,将其选为起始点以供进一步研发。

[0521] 3X 分批补料方法 (对照物) 与 4X 分批补料方法之间的差异描述于表 27 中并在下文中更详细描述。

[0522] 补入起始时的活细胞密度

[0523] 已观测到在极低细胞密度下起始补料倾向于抑制细胞生长并最终抑制终滴度。因此,预期由于细胞饥饿,过度延迟补料将引起体积生产率的损失。

[0524] 为研究以上假设,进行若干实验以确定于不同活细胞密度下补料的重要性。将这些实验的组合结果绘于图 1 描述的图中。如图 1 所见,第 15 日的滴度显示出对补料起始日活细胞密度的强依赖性。对数据点的三级多项式拟合显示在 3.5×10^6 个细胞 $\cdot \text{ml}^{-1}$ 的补入密度下可预期第 15 日达到最大滴度。

[0525] 重现性

[0526] $6\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 方法的过程条件描述于下表 27 中并定义为从 SR-383 短程填充运行 (pH 7.0, $\text{D}_0 = 30\%$, 37°C) 1 : 4 分流直至 5.0×10^6 个活细胞 /ml 细胞密度的接种。反应器运行条件为 pH 6.9、 $T = 35^\circ\text{C}$ 、 $\text{D}_0 = 40\%$ 。当细胞达到 3.5×10^6 个细胞 /ml 的活细胞密度时起始补料,持续 10 天,每天快速推注添加由初始反应器重量 1% 组成的组合补料,。

[0527] $4\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 方法的过程条件描述于下表 27 中。

[0528] 表 27.4 和 6gL-1ABT-874 细胞培养方法的要点

[0529]

	方法	
参数	3X FB	4X FB
培养基	SR -286(3XPFCHO)	SR-382(4XPFCHO)
分流比	1:5	1:4

[0530]

接种密度[10^6 个活细胞 • ml^{-1}]	0.5-1.0	1.0-1.25
补入起始标准	第 3 天	3.5×10^6 个细胞• ml^{-1}
补入量[%]	1	1
补入时间[天]	7	10
补料中的天冬酰胺[$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	5.0	7.5
温度转变	$33^\circ\text{C} @ 3.5 \times 10^6$ 个细胞 • ml^{-1}	无
终滴度	$4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \pm 0.24 (n=9)$

[0531] 实施例 3.5 :经由葡萄糖反馈控制使用组合补料的分批补料

[0532] 反馈控制允许在对系统本质行为的理解非常有限的情况下靶向给定参数的设定点。以此方式,可维持标靶的设定点与系统可能经受的任何干扰或改变均无关。由于哺乳动物细胞培养物代谢的复杂性,产生可允许预测培养给定轨迹的综合模型需要大量工作。然而,需要研发能够供应葡萄糖以维持目标葡萄糖水平的取样方法(例如通过使用自动取样)。这使得可以去偶化给定葡萄糖浓度(或其他代谢物)的效应并提供研究组合补料中不同比率葡萄糖对不同培养物的影响的方式。效应去偶化指维持所给定葡萄糖水平的效应,与之相对的是在组合补料中使用不同量葡萄糖的效应。

[0533] 材料和方法

[0534] 使用两种不同抗 IL-12 抗体 (ABT-874 和 1D4.7) 的产品线作为模型系统。

[0535] 选择自动取样(即 YSI 2700 Bioprocess Analyzer)作为监控细胞培养基中葡萄糖含量的方式。通过将 YSI 2730 监控器和控制附件附连接至 YSI 2700 Bioprocess Analyzer(参见 YSI Life Sciences;YellowSprings,OH)上建立在线自动取样装置。该取样装置由固持两个管的泵组成。第一个管具有两条分支,一条收集来自生物反应器的样本且第二条泵出消毒剂以维持无菌。样本一经获得,则将其泵入外室中,吸管(sipper)自外室中获取样本以供实际分析。使用纵穿泵的第二个管来收集进入废料容器中的排出物。控制在线取样附件的若干参数,例如取样时间间隔和 TPU(每单位误差的时间,其对应于基于所测量的相对于设定点偏移的补入泵运行时间)。

[0536] 使用 15 针连接器将泵连接至 YSI。将对应于 YSI 中的葡萄糖探针(白色 -7,黑色 -11)的针连接至泵中的 TTL 开/关针(8),并将来自 YSI(1-5)之一接地针之一连接至泵的 15 针连接器的底盘。通过由 YSI 设定菜单将泵打开和关闭来测试连接。所使用的泵管为 MasterflexCFLEX 082。

[0537] 表 28 :反馈初始实验设定

[0538]

细胞	ABT-874
培养基	3XPFCHO(SR-286)

葡萄糖补料	400g/L
YSI TPU	16
所测试的反应器体积	1.5L
YSI 净化时间	60 秒
泵速度	50(一半,约 16RPM)
YSI 取样时间间隔	4 小时 /2 小时(下文中解释)
YSI 输出信号	X2(对 YSI1-A25 而言)
消毒剂	0.1N NaOH

[0539] 将 YSI1-A25 反应器控制于 4.9g/L 葡萄糖。4.9g/L 的葡萄糖控制起始于第 2 日,使用 4 小时的取样时间间隔直至第 8 日。在第 8 日,将取样时间间隔降低至 2 小时,并再次设置 YSI 自动装置设定点以抹去 PID 记忆。由相对于设定点的突增引起的波动在第 8 日显著降低。因此,确定 2 小时的取样时间间隔对于这些条件而言为最佳的。第 2 日至第 8 日的平均突增为 0.43g/L 且平均负向尖峰为 0.31g/L,其中相对于设定点的波动误差为约 8%。另一方面,第 8 日至第 13 日的平均突增为 0.08g/L 且平均负向尖峰为 0.09g/L,其中波动误差为约 2%。

[0540] 使用组合补料控制葡萄糖浓度

[0541] 经由经验方法定义向生物反应器中的培养物中补入组合补料溶液的时间表。测试不同补入量以及不同补入时间,直至发现可行的分批补料方案。理想地,组合补料的补入时间表应满足给定培养物的特定要求。

[0542] 鉴于以上考虑,基于细胞培养物需要,例如通过使用葡萄糖作为营养要求指示剂来提供组合补料是有利的。以此方式,反馈控制系统可用以 1) 测试具不同葡萄糖浓度的不同补料;和 2) 使用所生成的补料概况在较大规模培养中进行人工补料。

[0543] 下表概述了使用生产 1D4.7mAb 的细胞系的两种不同的反应器操作模式。参考实验(表 29 中称作基线)说明在 1.5L Applikon 生物反应器中在 pH 6.9、T = 35℃、DO = 40%下运行的 SR-372 培养基中的扩展分批过程的典型滴度性能。在相同条件加上反馈控制下运行 YSI 实验以供应含有 100、150 或 200g · L⁻¹ 葡萄糖的组合补料。

[0544] 表 29. 使用组合补料的反馈控制性能

[0545]

实验	最终滴度 [mg/L]
基线 (n = 2)	1312+/-33
YSI 100 (n = 1)	1974
YSI 150 (n = 2)	2044+/-164
YSI 200 (n = 2)	1837+/-163

[0546] 表 29 中可见,使用各种组合补料的反馈系统极大地改良了抗体的终滴度。

[0547] 通过称重每天供应的组合补料的量获得来自实验(如先前实验)的补料概况。典型补料概况见下表:

[0548] 表 30. 由反馈控制生成的典型补料曲线(1D4.7 抗体的曲线)

[0549]

天	补料 [%]
1	0.00
2	0.00
3	0.00
4	0.00
5	1.12

6	1.56
7	1.79
8	1.23
9	0.89
10	0.75
11	0.46
12	0.32

[0550] 即使在无反馈控制系统的情况下也可手动进行以上流程以向反应器补料。通过这一方式可成比例增加补料时程。

[0551] 结果概述

[0552] 已显示利用水解产物和化学成分确定的基础培养基的混合物的分批补料方法可增加哺乳动物细胞培养物中所分泌的 mAb 的最终滴度。

[0553] 此外,也证实了能够生产以下稳定组合补料的方法:

[0554] 表 31. 稳定组合补料

[0555]

	X-1	经稀 释 D2E7	D2E7	ABT-325, ABT-874	补料 I	补料 II	
葡萄糖	21	200	100, 150, 250	150	150	150	$\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$
PFCHO(p)	20(p)	20 (p)	27(p)	21(d)	27	21	
DMEM-F12m(d)					(d)	(d)	
+ NaOH 10 N							$\rightarrow \text{pH} 10.00$
天冬酰胺	7.5	2.29	3.1	5, 7.5	3.1	5	
酵母粉	22	15.7	21.2	65.0	21.2	65.0	
植物蛋白胨	14	10.0	13.5	40.0	13.5	40.0	
+ HCl 5 N							$\rightarrow \text{pH} 6.75$
MilliQ H ₂ O	至 1000 g						

[0556] 描述于表 31 中的组合补料用 MilliQ H₂O 起始 (高达 750g) 制成。如上所述,将成份添加至水中至 1000g 的最终重量 (组合补料的总重量)。此外,也显示组合补料溶液可增加细胞培养物寿命、活细胞密度峰值和单位生产率。证实使用组合补料的细胞培养物分批补料方法能够达到所分泌单克隆抗体的高达 $6 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的滴度水平。也显示以上组合补料可增加细胞培养物的细胞密度。

[0557] 最后,也显示了采用反馈控制系统和不同组合补料的方法能够增加滴度水平。该方法可用以通过快速生成补料时间表而加速细胞培养方法的进展。

[0558] 参考文献

[0559] 1. Whitford, W.G, Fed-Batch Mammalian Cell Culture in Bioproduction. BioProcess International, 2006. 30-40.

[0560] 2. YSI Incorporated. (1998) YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer User's Manual.

[0561] 3. YSI Incorporated. (1998) YSI 2730 Monitor and Control Accessory User's Manual.

[0562] 4. Watson Marlow Pumps. 101F, 101U User's Manual.

[0563] 实施例 4:应用丁酸钠和 N-乙酰半胱氨酸以增加生产抗 IL-18 的 CHO 细胞系的生产率

[0564] 本发明涵盖一种增加生产抗体（例如抗 IL-18）的 CHO 细胞系的生产率的新颖方法。更具体而言，以下实施例涉及通过向细胞培养基中添加化学物质来增加最终抗体（例如抗 IL-18）滴度。下文使用示例性抗体即 IL-18 抗体描述细胞活力和抗体滴度的改良。

[0565] 细胞系和培养基

[0566] 用于以下实施例的抗 IL-18 抗体为 IL-18 的完全人类 IgG1 抗体 (Ab)。在以上实施例 1 的表 4 中所述的生长培养基 SR-371 中培养表达抗 IL-18 的 CHO 细胞系。细胞系的生产培养基也描述于以上实施例 1 中，即 SR-372（用于旋转烧瓶中的培养）和 SR-382（用于生物反应器中的培养）。

[0567] 在旋转烧瓶中进行的实验的培养条件

[0568] 所有旋转烧瓶实验均执行一式两份。在 35°C 和 5% CO₂ 的恒温箱中，在 Thermolyne 搅拌盘上以 80rpm 搅拌旋转培养物。在接种之前即刻从维持培养物中获取所需量的细胞混悬液。将细胞离心，丢弃上清液并将沉淀重悬于新鲜、预温的培养基中以获得 4×10^5 /mL 的接种密度。

[0569] 实施例 4.1：丁酸钠对在生长培养基中培养的生产抗 IL-18 的 CHO 细胞系的生长和生产率的影响

[0570] 为测定丁酸钠的浓度范围，在含有各种浓度丁酸钠的 SR-371 中进行第一实验。实验在具有 70mL 工作体积的 100mL 旋转烧瓶中进行。从通过将 1.101g 丁酸钠溶解于 10mL MilliQ 水中并经 0.2 μ m 过滤器过滤灭菌而制备的 1M 储备溶液添加丁酸钠。将溶液储存在 -20°C 下。

[0571] 在培养开始时（第 0 天），以 0mM、0.125mM、0.5mM 和 1mM 的浓度添加丁酸钠。在该实施例及以下所有实施例中，用自动细胞计数器（Cedex, Innovatis, Germany）测定细胞密度和活力。表 32 显示了培养期间的活细胞密度，表 33 描述了培养期间的活力。实验进行 12 天。

[0572] 表 32：培养期间的活细胞密度

[0573] 活细胞密度 [10^5 /ml]

[0574]

天	烧瓶 1：0mM 丁酸盐	烧瓶 2：0mM 丁酸盐	烧瓶 3：0.125mM 丁酸盐	烧瓶 4：0.125mM 丁酸盐	烧瓶 5：0.5mM 丁酸盐	烧瓶 6：0.5mM 丁酸盐	烧瓶 7：1mM 丁酸盐	烧瓶 8：1mM 丁酸盐
0	3.2	3.85	4.46	3.01	3.66	3.98	3.83	4.07
3	36.38	33.18	27.12	29.96	16.97	11.71	7.68	5.74
5	84.48	70.37	62.56	66.1	21.79	9.77	3.25	2.35
7	65.98	64.19	59.15	68.65	17.72	5.41	1.04	0.7
10	7.83	11.17	8.63	11.85	4.53	6.93	0.8	0.61
12	1.36	2.28	3.68	3.81	2.08	1.89	0.22	0.41

[0575] 表 33：培养期间的活力

[0576] 活力 [%]

[0577]

天	烧瓶 1：0mM 丁酸盐	烧瓶 2：0mM 丁酸盐	烧瓶 3：0.125mM 丁酸盐	烧瓶 4：0.125mM 丁酸盐	烧瓶 5：0.5mM 丁酸盐	烧瓶 6：0.5mM 丁酸盐	烧瓶 7：1mM 丁酸盐	烧瓶 8：1mM 丁酸盐
0	98.5	97.5	98.9	100	97.4	98.2	98.8	98.8
3	98.3	98.1	97.3	97.9	95.4	92.2	88.3	73.8
5	96.7	96.7	96	96.7	88.8	72.9	54	40.1
7	73.4	75.5	78.1	83.3	69	43.1	24.2	16.4
10	7.9	13.1	13.1	14.3	21	25.9	11.3	14.5
12	1.4	2.8	5.9	4.9	7.6	14.9	3.2	8.9

[0578] 显而易见,丁酸钠影响细胞生长和活力。尽管在 0.125mM 的丁酸盐浓度时对细胞生长和生存力并无明显影响,但 0.5mM 丁酸盐对细胞生长存在明显影响,导致较低的最大细胞密度。0.5mM 丁酸钠在 5 天培养时间后影响活力。1mM 浓度的丁酸钠完全抑制细胞生长,且活力自第 0 天起持续降低。

[0579] 表 34 显示了培养期间的抗 IL-18 滴度。在该实施例及以下所有 实施例中,通过 Poros A HPLC 测定法来测定抗 IL-18 浓度。

[0580] 滴度 [mg/L]

[0581]

天	烧瓶 1: 0mM 丁酸盐	烧瓶 2: 0mM 丁酸盐	烧瓶 3: 0.125mM 丁酸盐	烧瓶 4: 0.125mM 丁酸盐	烧瓶 5: 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 6: 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 7: 1mM 丁酸盐	烧瓶 8: 1mM 丁酸盐
0	5.4	2.4	1.8	1.6	1.3	1.3	1.1	1.3
3	68.9	58.1	67.7	65.7	52.1	41.9	36.3	26.2
5	173.2	150.4	169.4	174.3	132.6	84.2	68.6	46.4
7	235.5	211.9	253.6	278.5	217.7	110.7	85	60.9
10	265.5	241.8	304.3	365.9	278.2	163.3	91.8	70.3
12	269.7	244.4	318.7	385.8	282.7	175.9	94	75.4

[0582] 表 34(上表):培养期间的抗 IL-18 滴度

[0583] 含有 0.125mM 丁酸盐的培养物的平均最终滴度为 352mg/L,未经处理对照物的平均最终滴度为 257mg/L。在该浓度经丁酸盐处理可使最终滴度增加 40%。

[0584] 实施例 4.2:丁酸钠对在 SR-372 中培养的生产抗 IL-18 的 CHO 细胞系的生长和生产率的影响

[0585] 表达抗 IL-18 的 CHO 细胞系适合在 SR-372 中生长以排除培养物从 SR-371 分流至 SR-372 的任何可能效应。用适合在 SR-372 中生长的细胞进行的所有实验均在具有 180mL 工作体积的 250mL 旋转烧瓶中进行。应用上述在标题为“在旋转烧瓶中进行的实验的培养条件”的章节列出的条件进行培养。

[0586] 设计实验以在细胞处于对数生长期的中期和后期添加丁酸盐。因为每个细胞的丁酸盐浓度较低,所以稍后添加丁酸盐与在第 0 日添加相比可能引起对细胞的较低应力并产生改良的细胞生长和较高的 IVC(IVC(活细胞积分)定义为相对于培养时间的活细胞密度的积分)。在第 4 日和第 5 日添加 0.5mM 和 2mM 浓度的丁酸盐。将实验进行 12 天。表 4 显示了培养期间的活细胞密度,表 5 为培养期间的活力。第 4 日仅添加 2mM 丁酸钠会导致活力与对照物相比有所降低,其他条件不影响活力。

[0587] 表 35:培养期间的活细胞密度

[0588] 活细胞密度 [10^5 /mL]

[0589]

天	烧瓶 1: 0mM 丁酸盐	烧瓶 2: 0mM 丁酸盐	烧瓶 3: 第 4 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 4: 第 4 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 5: 第 4 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 6: 第 4 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 7: 第 5 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 8: 第 5 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 9: 第 5 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 10: 第 5 日, 2mM 丁酸盐
0	2.35	3.37	3.08	2.61	2.27	2.41	3.2	2.27	2.49	2.2
3	14.51	15.79	12.79	13.69	14.04	9.42	11.41	11.36	10.42	10.93
4	28.88	20.91	18.88	26.11	25.48	16.09	18.78	23.15	16.57	22.16
5	28.58	32.17	36.01	33.03	27.82	21.98	30.76	35.8	28.38	30.71
6	61.91	54.31	45.2	43.08	37.02	34.28	47.82	55.66	46.26	49.27
7	56.23	51.59	40.09	36.19	33.34	27.21	42.97	52.08	41.45	48.75
10	43.06	51.89	29.2	23.33	14.07	13.05	29.58	28.61	25.07	26.62
12	24.8	33.38	19.38	14.32	9.66	8.22	18.25	16.18	16.01	16.93

[0590] 表 36:培养期间的活力

[0591] 活力 [%]

[0592]

天	烧瓶 1: 0mM 丁酸盐	烧瓶 2: 0mM 丁酸盐	烧瓶 3: 第 4 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 4: 第 4 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 5: 第 4 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 6: 第 4 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 7: 第 5 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 8: 第 5 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 9: 第 5 日, 2mM 丁酸盐
0	98.4	94.6	92.7	99	95.2	94.9	98.8	97.7	96.5
3	96.6	97.2	98.8	99	97.2	98	97.8	97.8	96.8
4	97	98.5	99	98.6	98.5	98	98.9	97.8	98.7

[0593]

5	96.6	97.7	97.5	97.3	96.6	97.29	98	97.2	98.1
6	96.5	96.4	96.2	96	93.6	92.4	96.3	96	95.9
7	95.6	957	93.8	92.9	87.8	87.5	94.2	94	92.6
10	62.6	69.4	61.9	53.9	40.8	39.2	63.7	56.9	57.7
12	38.3	46.2	40.4	33.6	24.5	25.2	36.7	32.7	34.1

[0594] 表 37 揭示了培养期间的抗 IL-18 滴度。在第 5 日添加 2mM 丁酸钠导致与对照相比增加 29% (分别为 317mg/L 对 245mg/L)。细胞生长在这些条件下并未受到显著抑制 (参见表 35)。

[0595] 滴度 [mg/L]

[0596]

天	烧瓶 1: 0mM 丁酸盐	烧瓶 2: 0mM 丁酸盐	烧瓶 3: 第 4 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 4: 第 4 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 5: 第 4 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 6: 第 4 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 7: 第 5 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 8: 第 5 日, 0.5mM 丁酸盐	烧瓶 9: 第 5 日, 2mM 丁酸盐	烧瓶 10: 第 5 日, 2mM 丁酸盐
7	138.5	141.1	147.7	139.2	183.4	182	129.5	137.5	152.8	149.5
10	192.2	208.7	226.9	203.3	269.6	259.5	202.5	205.4	266.1	260.6
12	232.2	258.7	269.4	235.3	307.8	286.2	237.4	236.9	319.3	315

[0597] 表 37 (上表): 培养期间的抗 IL-18 滴度

[0598] 实施例 4.3: 丁酸钠对在 3L 生物反应器中的 SR-382 中培养的生产抗 IL-18 的 CHO 细胞系的生长和生产率的影响

[0599] 以下实施例证实通过将丁酸钠应用于大规模 (即 3L 生物反应器) 抗 IL-18 过程 B (参见章节 1.5) 会导致最终抗 IL-18 滴度增加。此过程在 3L Applikon 生物反应器中进行。种子驯养在 SR-371 中进行直至短程填充阶段 (SR-372)。在具有 10L 工作体积的 20L Biowave 袋中刺激短程填充阶段。研究丁酸钠对抗 IL-18 过程 B 的生长和生产率的影响的实验在具有 1.5L 工作体积的 3L Applikon 生物反应器中进行。以 1125mL SR-382 填充各生物反应器并通过添加 375mL 来自含有 SR-372 中的抗 IL-18 细胞的 Biowave 袋的细胞悬浮液而接种。

[0600] 在实施例 4.2 中, 通过在细胞处于中间至后对数生长期时 (其为旋转烧瓶中的第 5 日) 添加丁酸盐来达到滴度增加。之前, 3L 生物反应器中抗 IL-18 产生过程的中间至后对数生长期为培养时间的第 7 日。在该实施例中, 选择第 7 日向培养物中添加丁酸钠, 以确保在中间至后对数生长期中添加丁酸盐。

[0601] 在第 7 日在添加至培养物中之前即刻通过将 4.404g 丁酸钠溶解于 200mL MilliQ 水中而制备 200mM 浓度的丁酸钠储备溶液。经由 0.22 μ m 过滤器过滤对该溶液进行灭菌。

[0602] 用 5 个生物反应器进行实验。在各自活力低于 50% 时终止各生物反应器运行。将两个生物反应器用作对照 (抗 IL-18 过程 B)。在培养时间的第 7 日将浓度分别为 0.3mM、1mM 和 3mM 的丁酸钠添加至其他 3 个生物反应器中。表 38 显示了培养期间的活细胞浓度, 表 39 显示了培养期间的活力。

[0603] 活细胞密度 [10^5 /ml]

[0604]

天	反应器 1: 1mM 丁酸盐	反应器 2: 无丁酸盐	反应器 3: 0.3mM 丁酸盐	反应器 4: 3mM 丁酸盐	反应器 5: 无丁酸盐
0	5.53	5.22	4.89	5.28	5.41
1	8.21	7.68	7.66	9.66	6.81
2	11.35	13.53	10.39	11.12	10.07
3	15.62	17.37	12.58	14.3	13.07
4	20.69	22.4	18.39	22.46	16.49
5	29.58	31.55	31.15	34.03	23.43
6	41.27	44.42	43.32	46.81	32.3

[0605]

7	59.07	62.09	56.91	60.46	33.95
8	67.07	76.26	51.82	76.4	45.43
9	68.68	73.23	63.11	61.52	57.6
10	65.55	70.17	64.53	55.52	62.45
11	66.55	72.98	66.23	47.27	63.42
12	60.98	56.33	45.87	30.99	44.65
13	49.67	52.03	40.39	21.34	39.1
14	38.46	30.51	21.93		18.38
15	33.23	38.37	41.34		35.97
16	27.97	29.31	33.89		24.58
17			30.13		17.51
18			20.98		

[0606] 表 38(上表):培养期间的活细胞密度

[0607] 活力 [%]

[0608]

天	反应器 1: 1mM 丁酸盐	反应器 2: 无丁酸盐	反应器 3: 0.3mM 丁酸盐	反应器 4: 3mM 丁酸盐	反应器 5: 无丁酸盐
0	95.3	96	92.9	94.3	96.4
1	96.4	95.4	96.4	96.3	95.9
2	96.3	95.9	95.9	96.1	96.7
3	96.6	95.6	97.7	96.6	95.3
4	97.3	97.2	96.4	95.8	95.2
5	97.1	96.4	96.2	96.4	95.3
6	96.4	96.5	96.2	96.8	95.9
7	96.3	95.2	95.8	94.3	95.1
8	96.2	95.2	94.2	95.1	94.8
9	95.6	95.2	95.4	93.6	94.2

[0609]

10	94.3	94.5	94.6	87.4	93.4
11	92.2	93.9	93.8	78.9	93
12	88.1	91.7	92.4	51.9	92
13	80.6	86.9	90.2	33.7	89.2
14	66.7	76.2	88.9		84.1
15	57	60.7	85.2		73.4
16	45.9	42.7	69.5		50.7
17			58.1		34.2
18			41		

[0610] 表 39(上表):培养期间的活力

[0611] 由于反应器 5 中的高初始 CO₂ 浓度,对照培养物在反应器 5 中的生长慢于复制物(反应器 2)中的生长。在培养时间的第 16 日终止反应器 2(先前在抗 IL-18 生产过程中所观测),在第 17 日终止反应器 5。3mM 浓度的丁酸钠(反应器 4)影响细胞生长和活力。丁酸盐添加后两天细胞开始死亡。1mM 丁酸盐不影响细胞生长和活力(反应器 1),第 16 日终止反应器运行。细胞生长与反应器 2 中的对照物相比非常类似。0.3mM 的丁酸盐使培养时间延长 2 天(反应器 3)。表 40 显示了培养期间的抗 IL-18 滴度。

[0612] 滴度 [mg/L]

[0613]

天	反应器 1: 1mM 丁酸盐	反应器 2: 无丁酸盐	反应器 3: 0.3mM 丁酸盐	反应器 4: 3mM 丁酸盐	反应器 5: 无丁酸盐
9	1033	1074.2	905.8	966.9	747.4
10	1218.4	1223.9	1096.4	1184.9	877.5
11	1410.4	1460	1261.1	1242.9	1053.5

12	1663.5	1538.1	1485.1	1269.5	1216.7
----	--------	--------	--------	--------	--------

[0614]

13	1700.2	1912.5	1750.9	1304.6	1303
14	1852.7	2136.9	1923.4		1429.3
15	1909.4	2223.2	2280.4		1672.3
16	1933.7	2324.7	2108.6		1540.5
17			2561.3		1589.4
18			2448.6		

[0615] 表 40(上表):培养期间的抗 IL-18 滴度

[0616] 反应器 2(代表抗 IL-18 过程 B)中培养物的最终滴度(第 16 日)为 2325g/L。反应器 5 中的最终滴度为 1589g/L。该较低的滴度可能是由于培养基中的高初始 CO₂ 浓度引起的较差细胞生长。在第 7 日添加 1mM 和 3mM 丁酸盐产生比对照物(反应器 2)低的最终滴度。在第 7 日添加 0.3mM 丁酸盐会在第 17 日产生 2561g/L 的滴度,其与对照物相比增加 10%。该滴度为在抗 IL-18 过程中达到的最高滴度。

[0617] 实施例 4.4:N-乙酰半胱氨酸(10mM、20mM、40mM、80mM)对在 SR-372 中培养的生产抗 IL-18 的 CHO 细胞系的生长和生产率的影响

[0618] N-乙酰半胱氨酸可保护哺乳动物细胞免于细胞死亡。作为抗氧化剂,其可直接还原活性氧中间体。通过去乙酰基作用,可将其转化为半胱氨酸并增加细胞内谷胱甘肽水平。谷胱甘肽可清除活性氧中间体并在将过氧化氢还原为水时充当底物。

[0619] 该实施例证实 N-乙酰半胱氨酸的抗 IL-18 滴度增加效应。实验在具有 180mL 工作体积的 250mL 旋转烧瓶中进行。培养基为 SR-372。在实验之前,如实施例 4.2 中所述使细胞预适应在 SR-372 中生长。如以上“在旋转烧瓶中进行的实验的培养条件”中所述应用旋转培养条件。

[0620] 通过在加热搅拌盘上将 16.32g N-乙酰半胱氨酸溶解于 100mLMilliQ 水中来制备 1M N-乙酰半胱氨酸储备溶液。藉由经 0.22 μm 过滤器过滤对储备溶液进行灭菌。在实验开始前一天,将 N-乙酰半胱氨酸添加至 SR-372 中以获得 0mM、10mM、20mM、40mM 及 80mM 的浓度。如以上“在旋转烧瓶中进行的实验的培养条件”所述,通过将细胞自 CHO 抗 IL-18 维持培养物中离心起始实验。当各自活力低于 50%时终止各旋转培养。

[0621] N-乙酰半胱氨酸浓度为 20mM、40mM 和 80mM 时细胞不可能生长。表 41 和表 42 分别显示了在 0mM N-乙酰半胱氨酸及 10mM N-半胱氨酸中细胞生长的培养期间活细胞密度和活力的比较。

[0622] 活细胞密度 [10⁵/mL]

[0623]

天	烧瓶 1: 无 N-乙酰半胱氨酸	烧瓶 2: 无 N-乙酰半胱氨酸	烧瓶 3: 10mM N-乙酰半胱氨酸	烧瓶 4: 10mM N-乙酰半胱氨酸
0	3.60	3.44	2.73	2.73
3	18.34	17.72	3.58	3.02
4	29.39	29.71	4.47	4.24
5	33.54	31.05	6.46	6.40
6	37.38	32.92	9.84	7.27
7	34.26	31.00	12.36	12.00
8	17.49	17.68	24.20	22.42
9	25.34	21.54	20.14	19.48
10	17.49	17.68	24.20	22.42
11	10.75	13.84	25.02	26.00
			27.44	27.56
			25.77	27.86
			22.77	24.17

			18.40	19.22
			14.60	16.30

[0624] 表 41(上表):培养期间的活细胞密度

[0625] 活力 [%]

[0626]

天	烧瓶 1: 无 N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 2: 无 N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 3: 10mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 4: 10mM N- 乙酰半胱氨酸
0	97.4	96.9	96.2	95.3
3	98.8	98.6	57.2	52.1
4	99.0	98.8	61.9	62.2
5	98.7	98.5	69.5	72.1
6	95.4	92.8	76.0	73.5
7	87.8	84.0	81.5	80.9
8	73.3	69.6	85.5	82.7
9	64.9	60.8	82.7	86.5
10	52.5	49.0	82.5	86.9
11	38.6	38.1	81.7	87.2
12			79.2	83.1
13			74.8	78.9
14			67.2	68.7
15			56.7	56.9
16			49.3	47.2

[0627] 表 42(上表):培养期间的活力

[0628] 在培养时间的第 11 日终止对照培养(无 N- 乙酰半胱氨酸),而以 10mM N- 乙酰半胱氨酸进行的培养可延长直至第 16 日。最初,10mM N- 乙酰半胱氨酸会影响细胞生长和活力并且导致活力降低直至第 3 日。接着,活力开始增加。在 10mM N- 乙酰半胱氨酸中生长的培养物的最大细胞密度与对照物相比较低。表 43 证实最终抗-IL-18 滴度藉由 N- 乙酰半胱氨酸而增加。

[0629] 滴度 [mg/L]

[0630]

天	烧瓶 1: 无 N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 2: 无 N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 3: 10mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 4: 10mM N- 乙酰半胱氨酸
4	102.0	94.9	23.9	21.9
5	130.5	122.4	35.3	32.5
6	168.5	154.3	60.6	55.9
7	190.4	171.8	84.2	78.0
8	216.4	194.3	125.3	119.3
9	233.0	206.9	156.6	153.1
10	243.2	216.4	185.9	187.7
11	258.6	227.8	224.1	230.9
12			264.1	272.6
13			300.2	311.2
14			334.0	314.6
15			393.0	384.4
16			414.6	421.4

[0631] 表 43(上表):培养期间的抗 IL-18 滴度

[0632] 对照培养物的平均最终滴度为 243.2mg/L,在 10mM N- 乙酰半胱氨酸中生长的培养物的平均最终滴度为 418mg/L。其与对照物相比增加 72%。

[0633] 实施例 4.5:N- 乙酰半胱氨酸(1mM、2mM、4mM、8mM)对在 SR-372 中培养的生产抗-IL-18 的 CHO 细胞系的生长和生产率的影响

[0634] 如实施例 4.4 中所述,在第 0 日添加浓度为 10mM 的 N- 乙酰半胱氨酸可延长培养时间并使最滴度增加。然而,在该浓度下,细胞活力最初会降低。基于实施例 4.4 的结果,使用实施例 4.4 中所测试的 N- 乙酰半胱氨酸浓度的十分之一设计实验。该旋转烧瓶实验的条件与实施例 4.4 中相同。添加 0mM(对照物)、1mM、2mM、4mM 和 8mM 浓度的 N- 乙酰半胱氨酸。

[0635] 表 44 显示培养期间的活细胞密度,表 45 显示培养期间的活力。

[0636]

天	烧瓶 1 :0mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 2 :0mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 3 :1mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 4 :1mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 5 : 2mM N- 乙酰半胱氨酸
0	2.75	3.45	3.64	3.22	4.10
3	25.05	22.42	19.25	19.32	17.42
4	35.98	31.42	25.45	24.56	24.96
5	45.43	37.56	31.16	29.23	27.28
6	40.04	39.41	29.67	28.35	28.45
7	35.55	33.25	27.71	27.03	26.65
8	31.56	26.22	24.63	22.33	22.49
9	27.15	23.04	22.23	20.23	19.11
10	23.26	19.88	21.06	17.74	18.07
11					15.48
12					
13					
14					

[0637]

天	烧瓶 6 : 2mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 7 :4mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 8 : 4mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 9 : 8mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 10 : 8mM N- 乙酰半胱氨酸
0	2.96	3.13	2.80	2.97	3.54

[0638]

3	19.03	17.39	16.39	11.24	10.17
4	28.40	24.80	23.71	14.47	13.88
5	34.21	28.06	26.92	20.68	18.64
6	37.05	30.62	29.54	25.59	23.13
7	32.55	30.66	26.94	28.22	26.12
8	28.99	24.75	23.84	30.00	30.77
9	27.75	22.25	21.71	27.45	28.63
10	23.05	20.06	19.67	27.14	27.90
11	20.75	16.79	16.70	26.42	29.60
12				26.39	25.62
13				21.46	22.29
14				30.47	32.41

[0639] 表 44(上表):培养期间的活细胞密度

[0640]

	0mM N- 乙酰半胱氨酸	0mM N- 乙酰半胱氨酸	1mM N- 乙酰半胱氨酸	1mM N- 乙酰半胱氨酸	2mM N- 乙酰半胱氨酸
0	94.6	97.6	96.2	93.3	94.9
3	98.3	97.6	99.1	98.1	98.6
4	98.0	96.8	98.2	97.6	97.2
5	97.1	96.0	96.3	95.0	96.1
6	90.2	89.6	89.3	89.3	89.9
7	79.0	80.1	79.8	77.3	79.6
8	60.6	62.2	64.8	62.2	62.2
9	52.7	53.4	56.9	52.6	54.8
10	46.2	45.5	51.3	45.9	50.2
11					40.3
12					

[0641]

13					
14					

[0642]

天	烧瓶 6 :2mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 7 :4mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 8 : 4mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 9 :8mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 10 : 8mM N- 乙酰半胱氨酸
0	93.8	94.9	91.7	92.1	93.6
3	97.5	97.1	98.4	96.4	94.3
4	98.2	97.4	97.6	96.4	94.4
5	97.1	97.1	96.9	96.5	94.4
6	93.0	92.4	93.1	95.8	92.0
7	86.1	84.5	85.0	93.4	89.6
8	71.9	68.4	70.6	85.6	84.7
9	65.2	58.5	60.3	79.7	79.5
10	54.9	52.0	55.0	76.3	75.0
11	45.1	42.5	45.7	68.4	69.0
12				61.3	61.2
13				51.1	52.2
14				39.4	42.6

[0643] 表 45(上表):培养期间的活力

[0644] 在 10 天培养时间后终止对照培养 (0mM N- 乙酰半胱氨酸)。N- 乙酰半胱氨酸可延长培养物的寿命。在 14 天培养后终止在 8mM N- 乙酰半胱氨酸中生长的培养物。在 N- 乙酰半胱氨酸中生长的培养物与对照物相比具有较低的最大细胞密度。

[0645] 表 46 显示 N- 乙酰半胱氨酸对最终抗 -IL-18 滴度的影响。

[0646] 滴度 [mg/L]

[0647]

天	烧瓶 1 :0mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 2 :0mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 3 :1mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 4 :1mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 5 : 2mM N- 乙酰半胱氨酸
7	193.1	168.3	210.1	202.5	198.0
8	230.3	199.9	241.6	232.2	227.5
9	244.7	216.2	256.6	245.4	242.0
10	262.7	227.2	268.9	258.3	253.2
11					268.3
12					
13					
14					

[0648]

天	烧瓶 6 :2mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 7 :4mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 8 :4mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 9 :8mM N- 乙酰半胱氨酸	烧瓶 10 :8mM N- 乙酰半胱氨酸
7	274.0	210.9	202.0	181.9	175.1
8	323.9	251.6	240.2	237.6	232.2
9	374.7	271.7	259.3	267.7	263.9
10	428.8	288.9	276.3	295.3	292.2
11	444.1	315.5	304.3	349.1	367.9
12				369.5	401.4
13				429.5	432.0
14				477.6	484.4

[0649] 表 46(上表):培养期间的抗 -IL-18 滴度

[0650] 对照培养物的平均最终抗 -IL-18 滴度为 245mg/L(与实施例 4.4 中的 243mg/L 非常类似)。在 8mM N- 乙酰半胱氨酸中生长的培养物的最终抗 -IL-18 滴度为 481mg/L。其与对照物相比增加了 96%。

[0651] 等效物

[0652] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来辨识本文所述本发明特定实施方案的许多等效物。该类等效物意欲涵盖于以下权利要求中。本申请案全文中所引用的所有参考文献、专利和公开专利申请案的内容以引用的方式并入本文。

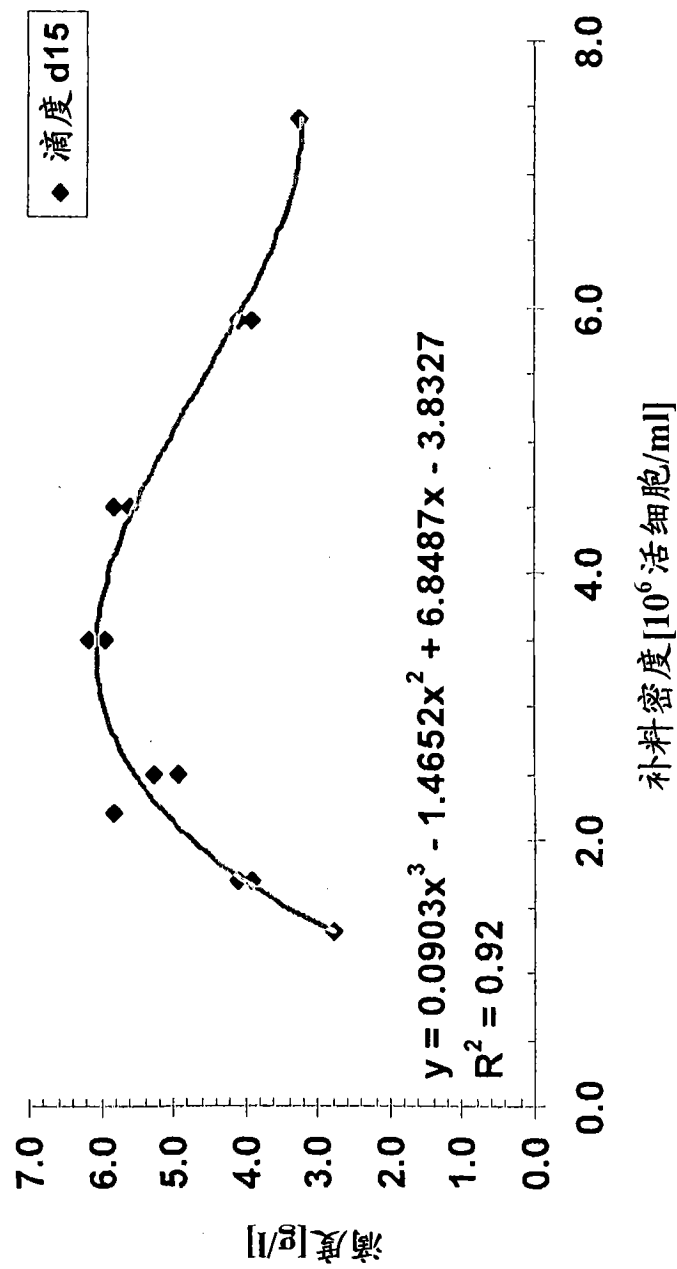


图 1