



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I870789 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：112107035

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 02 日

(51)Int. Cl. : C12N5/00 (2006.01)

C07K16/00 (2006.01)

C07K16/22 (2006.01)

C12N15/12 (2006.01)

(30)優先權：2015/08/04 美國

62/200,689

(71)申請人：美商再生元醫藥公司 (美國) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國(72)發明人：喬生 愛美 JOHNSON, AMY S. (US)；凱薩 麥格漢 CASEY, MEGHAN E.
(US)；歐席迪 沙迪亞 OSHODI, SHADIA (US)；勞倫斯 西恩 LAWRENCE,
SHAWN (US)

(74)代理人：何愛文；王仁君

(56)參考文獻：

WO 99/35255A2

WO 2014145098A1

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：1 共 47 頁

(54)名稱

補充牛磺酸之細胞培養基及用法

(57)摘要

本說明書係描述包含一改良的真核細胞培養基之組成物，其可用於製造感興趣蛋白。牛磺酸可加入無血清的培養基或化學成份確定的培養基中用以增加感興趣蛋白之產量。亦包括使用此培養基組成物來重組表現高量蛋白之方法。

The specification describes a composition comprising an improved eukaryotic cell culture medium, which can be used for the production of a protein of interest. Taurine can be added to serum-free media or chemically-defined media to increase the production of a protein of interest. Methods for recombinantly expressing high levels of protein using the media compositions are included.

指定代表圖：

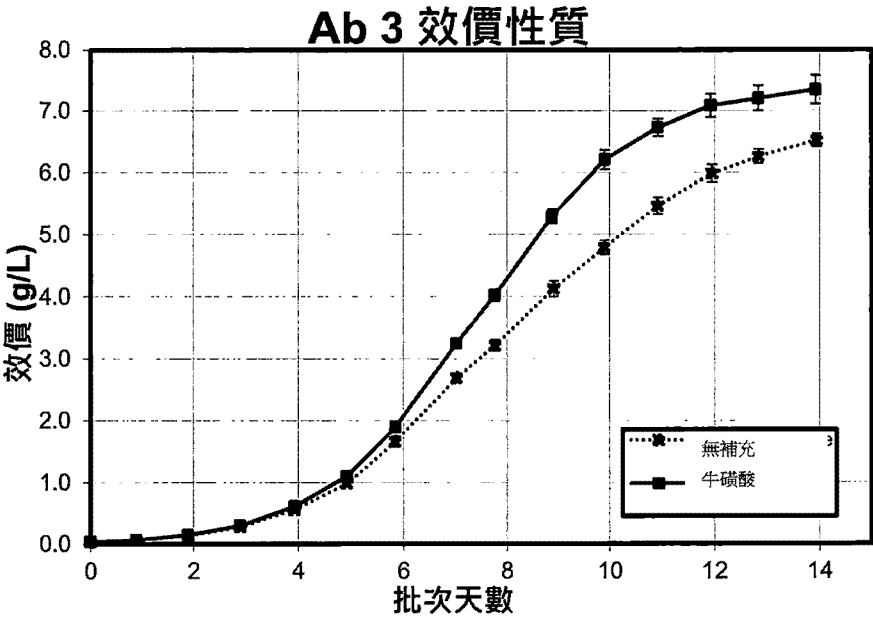


圖 1

發明摘要

【發明名稱】(中文/英文)

補充牛磺酸之細胞培養基及用法

TAURINE SUPPLEMENTED CELL CULTURE MEDIUM AND
METHODS OF USE

【中文】

本說明書係描述包含一改良的真核細胞培養基之組成物，其可用於製造感興趣蛋白。牛磺酸可加入無血清的培養基或化學成份確定的培養基中用以增加感興趣蛋白之產量。亦包括使用此培養基組成物來重組表現高量蛋白之方法。

【英文】

The specification describes a composition comprising an improved eukaryotic cell culture medium, which can be used for the production of a protein of interest. Taurine can be added to serum-free media or chemically-defined media to increase the production of a protein of interest. Methods for recombinantly expressing high levels of protein using the media compositions are included.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖1

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

補充牛磺酸之細胞培養基及用法

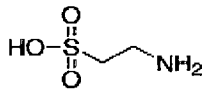
TAURINE SUPPLEMENTED CELL CULTURE MEDIUM AND
METHODS OF USE

【技術領域】

【0001】 本發明係關於培養細胞和用於製造重組蛋白之培養基和方法。本發明特言之係關於用於培養重組真核細胞供製造蛋白生物治療劑之添加牛磺酸的培養基及其方法。

【先前技術】

【0002】 有機酸牛磺酸，通常稱為 β -胺基酸，係在大多數的組織有高濃度的分布且為一胺基酸半胱胺酸之衍生物(Huxtable, RJ., 1992, *Physiol Rev*, 72:101-163)。



牛磺酸結構

【0003】 牛磺酸係存在許多人類和其他哺乳動物種類之組織中，例如腦、視網膜、心肌、骨骼和平滑肌、血小板和嗜中性粒細胞。牛磺酸已知係用來幫助滲透壓調節、膜穩定和抗發炎，以及經由防護超氧化產生之增進的電子傳遞鏈活性來調節粒線體蛋白合成(Jong 等人, 2010, *Journal of Biomedical Science* 17(Suppl 1): S25; Jong 等人, 2012, *Amino Acids* 42:2223-2232sw)。在初代神經元培養中，牛磺酸，由於其抑制麩胺酸-引發的毒性，經定性為細胞保護劑。已開發出各種包含牛磺酸用於胚胎培養之培養基。

【0004】 包含胺基酸饋料之細胞培養技術用於從培養細胞製造重組蛋白已有悠久歷史。胺基酸為生物合成前驅物、能量來源、滲透物質等等，且其於生產培養中的用途與連續細胞生長和生產力係強烈相關。

【0005】 然而，有助於生產力和高產率蛋白表現之生理事件不計其數，且競爭代謝活性和運送機制使得培養策略之設計變成一種挑戰。胺基酸補充的類型和添加的時機亦可能對培養中所產生的蛋白之品質具有影響(Altamirano, et al., 2006, *Electron. J. Biotechnol.* 9:61-67)。副產物的累積通常成為生產細胞培養的問題，且被視為細胞培養中營養素不均衡的後果，最後抑制細胞生長(Fan, Y.等人 *Biotechnol Bioeng.* 2015 Mar; 112(3):521-35)。在細胞培養中係建議亞牛磺酸或其類似物或前驅物，以便達到降低包含重組產生的多肽之組成物顏色濃度之所欲結果(WO2014145098A1, 2014 年 9 月 18 日公開)。促進未成熟的視網膜色素上皮細胞成熟化為成熟的視網膜色素上皮細胞之包含牛磺酸的細胞培養基已有描述(WO2013184809A1, published 12 December 2013)。然而，在補充牛磺酸的培養中最佳化重組蛋白生產力，在本項技術中尚未辨識出。增加重組表現蛋白之生產力，同時將可能的有毒細胞代謝副產物，例如氨減至最小的細胞培養方法為極其所欲的。任何恆定收獲的生產力可能等同明顯較高的商業規模之生物治療產品的供應。

【0006】 因此，本項技術對於培養哺乳動物細胞之培養基和方法有其需求，其中該培養能讓健康和強健的細胞生長和維持，及高效價製造生物醫藥物質。

【發明內容】

【0007】 發明人已有驚人的發現，培養基中包含牛磺酸增加了細胞單位生產力並使這些細胞有較低的氨副產物。各種包含牛磺酸的培養策略使得蛋白製造效價增加。再者，加入牛磺酸對於培養效能或所產生的抗體品質並無負面影響。

【0008】 本發明係提供用於製造高產率之治療蛋白的方法，其包含於含有牛磺酸之培養基中培養一重組細胞，其中該細胞株係包含一編碼該治療蛋白之穩定整併的核酸。

【0009】 本發明係關於一細胞培養基，其為無血清的並包含約 0.1 mM 至約 10 mM 牛磺酸。本發明係關於一細胞培養基，其為無血清的並包含約 0.1 mM 至約 1 mM 牛磺酸，約 0.2 至約 1 mM 牛磺酸，約 0.3 至約 1 mM 牛磺酸，約 0.4 至約 1 mM 牛磺酸，或約 0.5 至約 1 mM 牛磺酸。本發明係關於一細胞培養基，其為無血清的並包含約 1 mM 至約 10 mM 牛磺酸。本發明係關於一細胞培養基，其為無血清的並包含約 1 mM 至約 5 mM 牛磺酸，約 1 mM 至約 6 mM 牛磺酸，約 1 mM 至約 7 mM 牛磺酸，約 1 mM 至約 8 mM 牛磺酸，或約 1 mM 至約 9 mM 牛磺酸。

【0010】 在某些實施例中，培養基進一步係包含由下列組成之群中選出的另外胺基酸：精胺酸、組胺酸、離胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸。

【0011】 在某些實施例中，培養基係含有 ≤ 16 g/L 水解產物。在某些實施例中，此培養基並無任何水解產物。

【0012】 在一實施例中，培養基含有化學成份確定的基礎培養基，例如習用調配物或市售基礎培養基。在一實施例中，此完全培養基為化學成份確定的、無血清及無水解產物。

【0013】 在某些實施例中，整個過程，包含基礎培養基和饋料，係含有總計至少 115 mM 的胺基酸或胺基酸鹽類之混合物。在一實施例中，此胺基酸的混合物係包含由下列組成之群中選出的胺基酸：精胺酸、組胺酸、離胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸，其量係由表 1 中選出。

【0014】 在某些實施例中，此培養基係含有一或多種脂肪酸。在一特別的實施例中，此培養基係含有脂肪酸(或脂肪酸衍生物)和 α 生育醇之混合物。脂肪酸或脂肪酸衍生物係由下列組成之群中選出：亞麻油酸、次亞麻油酸、硫辛酸、油酸、棕櫚酸、硬脂酸、花生酸、花生四烯酸、月桂酸、山嶺酸、癸酸、十二酸、己酸、掬焦油酸(lignoceric acid)、肉豆蔻酸和辛酸。

【0015】 在某些實施例中，培養基係含有核苷的混合物。在一實施例中，培養基係含有腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、胸苷和次黃嘌呤。

【0016】 在某些實施例中，培養基係含有鹽類的混合物。鹽類係包含二價陽離子，例如鈣和鎂。在一實施例中，培養基係含有氯化鈣和硫酸鎂。其他的鹽類可包括磷酸鹽。

【0017】 在一實施例中，培養基(1)含有 0.1 ± 0.015 mM、 1 ± 0.015 mM、 3 ± 0.05 mM、 5 ± 0.10 mM、 7 ± 0.15 mM 或 10 ± 0.2 mM 牛磺酸，(2)含有 ≤ 16 g/L 的水解產物，(3)為無血清的，(4)視需要另外含有胺基酸之混合物，(5)含有脂肪酸之混合物，(6)含有核苷之混合物，包括腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、胸苷和次黃嘌呤，及(7)含有鈣、鎂之鹽類和磷酸鹽。

【0018】 本發明係提供製造高產率之感興趣蛋白的方法，其包含於含有至少約 0.1 mM 至約 10 mM 牛磺酸之細胞培養基中培養重組細胞株，其中該細胞株係包含編碼該蛋白之穩定整併的核酸。在其他的實施例中，此培養基之實施例為任何前述本發明之方面。

【0019】 在另外方面，本發明係提供培養真核細胞供增進重蛋白產量之方法，其包含下列步驟：(a)在生長階段期間於一成份確定的細胞培養基中增殖或維養細胞，(b)以約 0.1 mM 至約 10 mM L-牛磺酸補充此基礎細胞培養基並於生產階段期間表現重組的感興趣蛋白，及(c)藉由添加牛磺酸來增加感興趣蛋白之效價。在某些實施例中，此牛磺酸補充係在生產階段期間至少提供一次，或二次、三次、四次或五次，或在生產階段期間每天提供。在其他的實施例中，此

方法進一步包含在生產階段期間以約 0.1 mM 至約 10 mM L-牛磺酸補充此培養基。在某些實施例中，相較於缺乏牛磺酸補充物或含有低於 0.1 mM 牛磺酸補充物或在另外相同的條件下之真核細胞，此方法係提供提升產量之重組蛋白。

【0020】 在另外方面，本發明係提供以一細胞培養基，例如任何前述方面所述之培養基的實施例，培養細胞之方法。在一實施例中，此方法係應用在一(1)含有至少 0.1 mM $\pm$ 0.015 mM 濃度之牛磺酸，(2)含有 $\leq$ 16 g/L 水解產物或無水解產物，(3)為無血清的，(4)及視需要選自表 1 之胺基酸混合物組成之群的胺基酸之培養基中增殖或維養細胞。

【0021】 在一實施例中，此視需要的胺基酸補充物混合物係由表 1 的胺基酸組成之群中選出：

表 1

胺基酸	範圍 mM (mmol/L)	範圍(g/L)
丙胺酸	0-11.2	0-1
精胺酸	2.4-11.9	0.5-2.5
天門冬醯胺酸	1.3-33.3	0.2-5
天門冬胺酸	1.5-93.9	0.2-12.5
半胱胺酸	1.1-19.9	0.2-3.5
麩胺酸	1.4-47.6	0.2-7
麩醯胺酸	0-23.9	0-3.5
甘胺酸	0-16.7	0-1.25
組胺酸	1-9.5	0.2-2
異白胺酸	1.5-22.9	0.2-3
白胺酸	1.5-38.1	0.2-5
離胺酸	2.7-24.6	0.5-4.5
甲硫胺酸	1.3-13.4	0.2-2
苯丙胺酸	1.2-18.2	0.2-3
脯胺酸	1.7-26.1	0.2-3
絲胺酸	1.9-57.1	0.2-6

蘇胺酸	1.7-33.6	0.2-4
色胺酸	0.5-14.7	0.1-3
酪胺酸	0.9-22.2	0.2-5
纈胺酸	1.7-34.1	0.2-4

【0022】 在某些實施例中，此細胞或此等細胞為哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆蟲細胞、酵母菌細胞或細菌細胞。在一實施例中，此等細胞為可用於製造重組蛋白之哺乳動物細胞，例如 CHO 細胞或衍生物 CHO-K1。在某些實施例中，此等細胞係表現一感興趣蛋白，例如生物治療蛋白。此生物治療蛋白可為抗原結合蛋白，其可含有一 Fc 區。在某些實施例中，此感興趣蛋白為一 Fc-融合蛋白，例如 ScFv 分子或捕捉阱分子(trap molecule)。捕捉阱分子包括(但不限於)VEGF 阱和 IL-1 阱蛋白。在某些實施例中，此感興趣蛋白為一抗體，例如人類單株抗體、人源化單株抗體、雙專一性抗體或抗體片段。

【0023】 若藉由於各種形式的無血清培養基中包括牛磺酸而對蛋白製造產生正面效應，則該根據此方法所培養的細胞使得平均的蛋白效價增加。在一實施例中，當相較於未補充牛磺酸之培養基的蛋白效價時，生長於根據此方法之補充牛磺酸培養中的細胞，產生具有大於比較對照培養(亦即無補充牛磺酸之培養)至少 8%之蛋白效價。在一實施例中，生長於補充牛磺酸培養中的細胞，當與未補充牛磺酸之培養基中的蛋白效價相比較時，產生大於比較物對照培養之效價至少 9%，至少 10%，至少 11%，至少 12%，至少 13%，至少 14%，至少 15%，至少 16%，至少 17%，至少 18%，至少 19%，至少 20%，至少 21%，至少 22%，至少 23%，至少 24%，至少 25%，至少 26%，至少 27%，至少 28%，或至少 29%的蛋白效價。

【0024】 同樣的，在無血清培養基中單獨包括牛磺酸可讓培養細胞得到比無包括牛磺酸更低的氮副產物。在一無血清和無水解產物之補充牛磺酸的培養基之實施例中，此細胞培養能得到比不含有

補充物(亦即低於 0.1 mM 牛磺酸或無牛磺酸補充物)之類似細胞培養中降低至少 4%，至高降低 32%之氨副產物量(mM NH₃)。

【0025】在另外的實施例中，此方法係包括於細胞培養基中加入一或多個使用點添加物之步驟。在某些實施例中，此使用點添加物為任何一或多種的 NaHCO₃、麩醯胺酸、胰島素、葡萄糖、CuSO₄、ZnSO₄、FeCl₃、NiSO₄、Na₄EDTA 和檸檬酸鈉。在一實施例中，此方法係應用將各下列使用點化學物加到細胞培養基的步驟：NaHCO₃、麩醯胺酸、胰島素、葡萄糖、CuSO₄、ZnSO₄、FeCl₃、NiSO₄、Na₄EDTA 和檸檬酸鈉。在某些實施例中，使用點添加物可在一開始時包括在培養基中。

【0026】在一特定的實施例中，此方面係提供一於無血清培養基中培養細胞的方法，此培養基基本上係由(1)濃度至少 0.1 mM 之牛磺酸；(2)含有≤ 16 g/L 的水解產物，(3)為無血清的，及(4)視需要另外含有至少約 20 mM，或至少約 25 mM，或至少約 30 mM，或至少約 40 mM，或至少約 50 mM，或至少約 60 mM，或至少約 70 mM 由下列組成之群中選出的總胺基酸混合物所組成：丙胺酸、精胺酸、天門冬醯胺酸、天門冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸和纈胺酸。

【0027】在另外方面，本發明係藉由應用下列步驟提供製造感興趣蛋白之方法：(1)於細胞中導入編碼感興趣蛋白之核酸序列；(2)選擇表現此感興趣蛋白之一或多個細胞；(3)於一任何前述方面所述之無血清細胞培養基的實施例中或根據文中所述的方法之實施例中培養此選擇的細胞；及(4)於細胞中表現此感興趣蛋白，其中此感興趣蛋白係分泌至培養基。在某些實施例中，用於製造蛋白的細胞為能製造生物治療劑之哺乳動物細胞，例如 CHO、293 和 BHK 細胞，或其任何衍生物。在一實施例中，此細胞為 CHO 細胞，例如 CHO-K1 細胞。

【0028】在某些實施例中，此感興趣蛋白為一原結合蛋白。在某些實施例中，此感興趣蛋白為具有 Fc 區之蛋白。在某些案例中，二種感興趣蛋白可能重疊，例如受體-Fc-融合蛋白之情況，例如抗體及 ScFv 蛋白。因此，在某些實施例中，此感興趣蛋白為一抗體，例如人類抗體或人源化抗體，抗體片段，例如 Fab 或 F(ab')₂，雙專一性抗體，捕捉阱分子，例如 VEGF-阱或 IL-1-阱，ScFv 分子、可溶性 TCR-Fc 融合蛋白等等。

【0029】在一實施例中，此感興趣蛋白能以平均 14、15、16 或 17 天效價製造出，其比類似細胞於含有低於 0.1 mM 或無補充牛磺酸之無血清細胞培養基所製造的平均 14、15、16 或 17 天效價高至少 8%。在一實施例中，此感興趣蛋白能以平均 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 天效價製造出，其比類似細胞於含有低於 0.1 mM 或無補充牛磺酸之無血清細胞培養基所製造的平均 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 天效價高至少 9%，至少 10%，至少 11%，至少 12%，至少 13%，至少 14%，至少 15%，至少 16%，至少 17%，至少 18%，至少 19%，至少 20%，至少 21%，至少 22%，至少 23%，至少 24%，至少 25%，至少 26%，至少 27%，至少 28%，或至少 29%。

【0030】在另外的實施例中，此感興趣蛋白係藉由(1)於一 CHO 細胞中導入一編碼感興趣蛋白(例如抗體或其他抗原結合蛋白)之核酸序列；(2)選擇一穩定表現此感興趣蛋白之細胞；(3)於一包括約 0.1 mM 至約 10 mM 牛磺酸的無血清細胞培養基中培養此選擇的細胞，所製造。

【圖式簡單說明】

【0031】圖1係顯示從每天製造Ab3的細胞培養中之生產培養所回收的樣本蛋白效價(產率)，其中係提供牛磺酸-補充(以實線所連接的實心正方形)，與無牛磺酸補充相比(以虛線所連接的x)。補充牛磺酸培養對蛋白產率之利益可在早期如生產培養的第6天看出。

【實施方式】

【0032】應了解本發明不限於特定的方法及所述的實驗條件，因為此等方法和條件可能改變。亦應了解，文中所用的術語僅作為描述特定實施例之目的，且不希望受限，因為本發明之範圍係以申請專利範圍來定義。

【0033】除非內文中另有清楚指出，否則如本說明和所附的申請專利範圍中所用，單數型「一」和「此」係包括多數型的參照物。因此，例如，有關「一方法」係包括一或多種方法，及/或文中所述的類型之步驟，及/或在閱讀本揭示文後，其對於熟習本項技術者將變得顯而易見。

【0034】除非另有定義或另有說明，否則文中所用的所有的技術和科學術語係具有與本發明所屬的技術中之一般技術者一般理解之意義。雖然任何類似或等同文中所述之方法和物質可用於施行本發明，但特別的物質和方法係為目前所述。文中所提及的所有出版品係以全文引用的方式併入本文中。

【0035】發明人等已有驚人的發現，相對於含有非常少量或無牛磺酸之細胞培養基，細胞培養基中添加牛磺酸增進了細胞培養中重組細胞之蛋白製造。

【0036】在描述本細胞培養和方法之前，應了解本發明不限於特定的方法及所述的實驗條件，因為此等方法和條件可能改變。亦應了解，文中所用的術語僅作為描述特定實施例之目的，且不希望受限。

【0037】文中所用的段落標題僅作為組織目的且不應視為限制所述的題材。除非另有指出，否則文中所述的方法和技術一般係根據本項技術中已知的習用方法及如整個說明書中所引述和討論的各種通用和更特定參考文獻中所述來進行。參見，例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)和

Ausubel 等人, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), 及 Julio E. Celis, Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd ed., Academic Press, New York, N.Y. (1998), 及 Dieffenbach 和 Dveksler, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1995)。整個揭示文中提及的所有出版品係以全文引用的方式併入本文中。

定義

【0038】 「牛磺酸」亦稱為 2-胺基乙磺酸(IUPAC 命名法; CAS 登錄號 107-35-7)。「牛磺酸」和「L-牛磺酸」可交換使用係指相同的有機化合物。牛磺酸為含有一胺基基團的有機酸，然而並不視為本項技術中習知的胺基酸，而胺基酸係含有胺基基團和羧基基團二者。當亞牛磺酸(一種半胱胺酸的衍生物)藉由氧化轉變成牛磺酸時，則發生牛磺酸之生合成。

【0039】 術語「補充」及類似術語係指加入一成份、組份、分子等，其可用於培養基供細胞培養以維持及/或促進細胞的生長及/或分化，延長或強化培養或細胞整體之屬性，或補其不足。就此目的，補充牛磺酸包括加入一特定濃度的牛磺酸溶液於培養基中。

【0040】 如文中所用「胜肽」、「多肽」和「蛋白」全部可交換使用並係指包括二或多個胺基酸殘基彼此藉由胜肽鍵相連接之分子。胜肽、多肽和蛋白亦可包括修飾，例如糖基化、脂質連接、硫化、麩胺酸殘基之 γ -羧基化、烷化、羥化和 ADP-核糖基化。胜肽、多肽和蛋白可具有科學或商業利益，包括蛋白藥物。胜肽、多肽和蛋白包括，尤其是，抗體及嵌合或融合蛋白。胜肽、多肽和蛋白可藉由重組的動物細胞株使用細胞培養法來製造。

【0041】 術語「異源性聚核苷酸序列」，如文中所用係指編碼感興趣蛋白之核酸聚合物，例如經製造為一生物醫藥物質之嵌合蛋白(如捕捉阱分子)、抗體或抗體部份(例如 VH、VL、CDR3)。異源

性聚核苷酸序列可藉由基因工程技術來製造(例如，如編碼一輕核蛋白之序列，或密碼子最適化序列，無內含子序列等)並導入細胞中，其中其可駐留作為游離基因(episome)或可整併至細胞的基因體中。異源性聚核苷酸序列可為導入生產細胞基因體內之異位位置的天然生成序列。此異源性聚核苷酸序列可為來自其他生物體之天然生成序列，例如編碼人類異種同源物之序列。

【0042】 「抗體」係指藉由雙硫鍵相連接的四條多肽鏈(二條重(H)鏈和二條輕(L)鏈)所組成的免疫球蛋白分子。各重鏈具有一重鏈可變區(HCVR 或 V_H)及一重鏈恆定區。重鏈恆定區係含有三個區CH1、CH2 和 CH3 區。各輕鏈具有一輕鏈可變區及一輕鏈恆定區。輕鏈恆定區由一個區(CL)所組成。 V_H 和 V_L 區可進一步細分為高變區，稱為互補決定區(CDR)，其間散佈著較保守性區域，稱為框架區(FR)。各 V_H 和 V_L 係由三個 CDR 和四個 FR 所組成，以下列順序由胺基端排列至羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。術語「抗體」包括提到的糖基化和非糖基化免疫球蛋白之任何同型或亞類。術語「抗體」包括藉由重組方法製備、表現、創製或分離的抗體分子，例如由轉染表現此抗體之宿主細胞所分離的抗體。術語抗體亦包括雙專一性抗體，其係包括可與一個以上的不同表位結合之異四聚化免疫球蛋白。雙專一性抗體係一般性描述於美國專利申請公開案第 2010/0331527 號，其係以引用的方式併入本申請文中。

【0043】 術語抗體之「抗原結合部份」(或「抗體片段」)係指一或多種保留與抗原專一結合之能力的抗體片段。涵蓋在術語抗體之「抗原結合部份」內的結合片段之實例包括(i)Fab 片段，一種由 V_L 、 V_H 、CL 和 CH1 區所組成的單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，一種包括二個 Fab 片段藉由雙硫橋在絞鏈區相連結之二價片段；(iii)Fd 片段，係由 V_H 和 CH1 區所組成；(iv) F_v 片段，係由抗體單臂之 V_L 和 V_H 區所組成，(v)dAb 片段(Ward *et al.* (1989) Nature 241:544-546)，其係由 V_H 區所組成，(vi)分離的 CDR，及(vii)scFv，其係由 F_v 片

段的二個區 VL 和 VH，藉由合成的連接子相連接形成單一蛋白鏈所組成，其中 VL 和 VH 區域對係形成單價分子。其他單鏈抗體的形式，例如雙抗體亦涵蓋在術語「抗體」下(參見，例如 Holliger *et al.* (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123)。

【0044】 更進一步，抗體或其抗原結合部份可為較大免疫黏附分子之部份，其係藉由抗體或抗體部分與一或多種其他蛋白或多肽共價或非共價結合所形成。此等免疫黏附分子之實例包括使用鏈黴親和素核心區來製造四聚化 scFv 分子(Kipriyanov *et al.* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101)及使用半胱胺酸殘基、標記蛋白和 C-端聚組胺酸標籤來製造二價及生物素化的 scFv 分子(Kipriyanov *et al.* (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)。抗體部份，例如 Fab 和 F(ab')₂ 片段可從完整的抗體使用習知的技術，例如藉由完整抗體之木瓜酶(papain)或胃蛋白酶(pepsin)消化來製備。再者，抗體、抗體部份和免疫黏附分子可使用本項技術習知的標準重組 DNA 技術來取得(參見 Sambrook *et al.*, 1989)。

【0045】 術語「人類抗體」意欲包括具有衍生自人類生殖系列免疫球蛋白序列之可變區和恆定區的抗體。本發明之人類抗體亦可包括並非由人類生殖系列免疫球蛋白序列所編碼的胺基酸殘基(例如藉由隨機或定點突變於活體外導入突變或藉由活體內之體細胞突變)，例如在 CDR 中及特別是 CDR3。然而，術語「人類抗體」如文中所用，不包括其中衍生自另外的哺乳動物物種，例如小鼠之生殖系列的 CDR 序列已嫁接至人類框架序列上的抗體。

【0046】 術語「重組的人類抗體」如文中所用，意欲包括所有藉由重組方法製備、表現、創製或分離的人類抗體，例如使用轉染至宿主細胞之重組表現載體所表現的抗體、分離自重組物之抗體、組合的人類抗體庫、分離自人類免疫球蛋白基因之基因轉殖動物(例如小鼠)之抗體(參見，例如 Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)，或藉由任何其他涉及剪接人類免疫球蛋白基因序列

至其他 DNA 序列之方法所製備、表現、創製或分離的抗體。此等重組的人類抗體具有衍生自人類生殖系列免疫球蛋白序列之可變區和恆定區。在特定的實施例中，然而，此等重組的人類抗體係於活體外進行突變(或當使用人類 Ig 序列之基因轉殖動物時為活體內體細胞突變)且因此該重組抗體的 VH 和 VL 區之胺基酸序列，當衍生自人類生殖系列 VH 和 VL 序列或與其相關時，可能為並非於活體內天然存在人類抗體生殖系列儲庫之序列。

【0047】 「Fc 融合蛋白」係包括部份或全部二或多個蛋白，其中之一為免疫球蛋白分子之 Fc 部份，其並非在自然界中一起發現的。包括特定異源性多肽與不同部份的抗體衍生多肽(包括 Fc 區)融合的融合蛋白之製備已有描述，例如 Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991；Byrn et al., Nature 344:677, 1990；及 Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11, 1992。「受體 Fc-融合蛋白」係包括一或多個與 Fc 基團結合之受體胞外區，其在某些實施例中係包括一絞鏈區接著免疫球蛋白之 CH2 和 CH3 區。在某些實施例中，此 Fc-融合蛋白係含有二或多個與一或多個配體結合之不同受體鏈。例如，此 Fc-融合蛋白為一補捉阱(trap)，例如 IL-1 阱(例如列洛西普(rilonacept)，其含有與 IL-1R1 胞外區融合之 IL-1RAcP 配體-結合區，而該 IL-1R1 胞外區係與 hIgG1 之 Fc 區融合；參見美國專利第 6,927,004 號)，或 VEGF 捕捉阱(例如阿柏西普(aflibercept)，其係含有與 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 3 區融合的 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 2 區，而該 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 3 區係與 hIgG1 之 Fc 區融合；參見美國專利第 7,087,411 和 7,279,159 號)。

細胞培養

【0048】 術語「細胞培養基」和「培養基」係指用於生長哺乳動物細胞之營養素溶液，其典型地係提供必須營養素來促進細胞生長，例如碳水化合物能量來源、必須胺基酸(例如苯丙胺酸、纈胺酸、

蘇胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、白胺酸、異白胺酸、離胺酸和組胺酸) 和非必需胺基酸(例如丙胺酸、天門冬醯胺酸、天門冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸和酪胺酸)、微量元素、能量來源、脂質、維生素等。細胞培養基可含有萃取物，例如血清或蛋白腴(水解產物)，其係供應支持細胞生長的原料。培養基可含有酵母菌-衍生的或大豆萃取物取代動物-衍生的萃取物。化學成份確定的培養基係指一細胞培養基其中所有的化學組份為已知的(亦即具有已知的化學物結構)。化學成份確定的培養基為完全無動物-衍生的組份，例如血清或動物-衍生的蛋白腴。在一實施例中，此培養基為一化學成份確定的培養基。

【0049】 此溶液亦可含有促進生長及/或最小存活率以上的組份，包括荷爾蒙和生長因子。此溶液較佳地係調配至適合細胞存活和增生之 pH 和鹽濃度。

【0050】 「細胞株」係指經由細胞的連續傳代或次代培養衍生自特定品系之一或多種細胞。術語「細胞」可與「細胞群體」交換使用。

【0051】 術語「細胞」係包括適用於表現一重組核酸序列之任何細胞。細胞包括該等真核細胞，例如非人類動物細胞、哺乳動物細胞、人類細胞、鳥類細胞、昆蟲細胞、酵母菌細胞或細胞融合物，例如雜交瘤或四重雜交瘤。在特定的實施例中，此細胞為人類、猴子、人猿、倉鼠、大鼠或小鼠細胞。在特定的實施例中，此細胞為選自下列細胞之細胞：CHO (例如 CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS (例如 COS-7)、視網膜細胞、Vero、CV1、腎(例如 HEK293、293 EBNA、MSR 293、MDCK、HaK、BHK21)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo25、HB 8065、HL-60，淋巴細胞，例如 Jurkat(T 淋巴細胞)或 Daudi(B 淋巴細胞)、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L 細胞、C127 細胞、SP2/0、NS-0、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞及衍生自前述細胞之細胞株。在某些實施例中，此細胞係包括一或多個病毒基因，例如表現病毒基因之視網膜細胞(例如

PER.C6®細胞)。在某些實施例中，此細胞為為 CHO 細胞。在其他的實施例中，此細胞為 CHO K1 細胞。

【0052】 本發明一方面係關於種菌培養，其中一細胞群體係在蛋白生產前擴增並於生產培養中收取。根據如文中所述之本發明，牛磺酸可以種菌培養調配物加到基礎培養基中。

【0053】 本發明另一方面係關於一生產培養，蛋白係於其中生產並收取。在生產階段之前，典型地有一生長階段(亦稱為菌種或菌種培養)其中用於細胞培養的所有組份係在培養程序開始時供應至培養容器中，然後擴增細胞群體直到準備好生產規模。就此而言，依照開始的細胞株將培養容器以適合的落種密度接種細胞，進行起初的細胞生長階段。在某些方面，根據如文中所述之本發明，牛磺酸可以種菌培養調配物加到基礎培養基以進一步提升或促進在後續生產階段中細胞的生產力。菌種培養可用約 0.8×10^6 個細胞/毫升至約 5×10^6 個細胞/毫升之細胞密度接種細胞。在其他的實施例中，在轉移到生產階段之前，菌種培養可達到指定的存活細胞濃度(亦即轉移 VCC，例如介於約 3×10^6 個細胞/毫升至約 2×10^7 個細胞/毫升之間)。

【0054】 本發明一方面係關於生產培養，其中細胞培養條件係經修改以增進重組原核細胞之生長，同時提升此等細胞之一或多種感興趣重組蛋白的之生產及維持細胞生存力，特言之藉由加入牛磺酸至生產細胞培養基及/或菌種培養中。在生產培養容器或生物反應器中，基礎培養基和細胞係在菌種培養或生長階段之後供應至培養容器中。在特定的實施例中，係在生產培養後收取細胞上清液或細胞溶離物。在特定的實施例中，係在或大約高峰細胞密度時收取細胞上清液或細胞溶離物。在某些實施例中，生產細胞培養高峰細胞密度係發生在約 15 至約 45×10^6 個細胞/毫升。在其他的實施例中，感興趣多肽或蛋白係從細胞培養基或細胞溶離物中回收，或無論情況如何，依照感興趣蛋白之位置，使用本項技術熟知的技術回收。

【0055】 培養容器包括(但不限於)多孔盤、T-燒瓶、震盪燒瓶、攪拌容器、旋轉燒瓶中空纖維、氣升式生物反應器等等。適合的細胞培養容器為生物反應器。生物反應器係指經製造或改造用以操作或控制環境條件之任何培養容器。此等培養容器已為本項技術所熟知。

【0056】 生物反應器程序和系統係經發展使氣體交換最佳化，以供應足夠的氧氣來維持細胞生長及生產力，並移除 CO_2 。維持氣體交換功效為確保成功擴大細胞培養和蛋白生產之重要準則。此等系統已為本項技術者所熟知。

【0057】 在多肽生產階段中，「饋料式批次細胞培養」或「饋料式批次培養」係指其中動物細胞和培養基係在開始時供應至培養容器，及在培養期間以持續或以離散擴增將另外的培養營養素緩慢注入至培養中，無論在培養終止前有或無定期的細胞及/或產物收取。饋料式批次培養包括「半連續饋料式批次培養」，其中係定期地移除整個培養(其可包括細胞和培養基)並以新鮮的培養基置換。饋料式批次培養係不同於簡單的「批次培養」，而所有細胞培養的組份(包括動物細胞和所有的培養營養素)係在批式培養之培養程序開始時供應至培養容器中。只要是在進行期間並未從培養容器移除上清液，饋料式批次培養可進一步與灌注培養區分，而在灌注培養中，細胞係局限在培養中，藉由例如過濾，及培養基係持續或間接地導入和從培養容器中移除。然而，要考慮在饋料式批次培養期間就檢測目的移出樣本。此饋料式批次程序係持續直到測定出達到最大工作容積及/或蛋白生產量。

【0058】 「連續細胞培養」一詞當用於文中係關於用於連續培養細胞之技術，通常係在一特別的生長階段。例如，若需要恆定供應細胞，或需要製造特定的感性趣多肽或蛋白，則細胞培養可能需要維持在一特別的生長階段。因此，必須持續監測條件並據此調整以便將細胞維持在特定的時期。

培養基

【0059】 本發明係提供一包括約 0.1 mM 至 10 mM 牛磺酸之細胞培養基，其為無血清的。「無血清的」係適用不含有動物血清，例如胎牛血清之細胞培養基。無血清培養基可能含有 ≤ 16 g/L 的水解產物，例如大豆水解產物。本發明亦提供化學成份確定的培養基，其不僅為無血清的，同時亦為無水解產物。「無水解產物」係適用於不含有外源性蛋白水解產物，例如動物或植物蛋白水解產物，例如蛋白腴、胰腴等等之細胞培養基。「基礎培養基」為起初的培養基(存在菌種及/或在第 0 天的細胞培養生產中)，細胞係在其中增殖並含有所有必須的營養素，其包括一胺基酸之基底混合物。各種用於基礎培養基之配方(亦即調配物)可以市售量來製造或購買。同樣的，「基礎饋料培養基」係含有在生產培養期間正常消耗的補充營養素混合物並係以進料策略來利用(用於所謂的「饋料式批次」培養)。各式各樣的基礎培養基可從市面上購得。「饋料」包括定期的添加或以規律的間隔添加至培養基，例如根據計畫，包括持續饋料培養系統，如恆化器中(chemostat)(參見 C. Altamirano *et al.*, *Biotechnol Prog.* 2001 Nov-Dec; 17(6):1032-41)，或根據饋料式批次程序(Y.M. Huang *et al.*, *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct;26(5): 1400-10)。例如，培養可為每天、每隔一天、每三天饋料一次，或可在監控下當特定培養基組份的濃度落在所欲的範圍以外時饋料。

【0060】 從細胞培養基中消除血清和降低或消除水解產物，同時降低每批次間的變異性及提升下游處理步驟，不幸地減低了細胞生長、生存力和蛋白表現。因此，化學成份確定的無血清和低至無水產物之培養基需要另外的成份以增進細胞生長和蛋白產量。

【0061】 因此，本發明之細胞培養基係包括一基礎培養基，其含有存活細胞培養所有必須的營養素。根據如文中所述之本發明，牛磺酸可以菌種培養調配物加到基礎培養基中。再者，牛磺酸可以生產培養調配物加到基礎培養基中，其然後依照所培養的細胞之需求或所欲的細胞培養參數，可在有或無另外的成份，例如聚胺下定期饋料(如於所謂的「饋料式批次」培養中)，或增加組份如胺基酸、

鹽類、糖類、維生素、荷爾蒙、生長因子、緩衝劑、抗生素、脂質、微量元素等等之濃度。

【0062】 本發明係提供補充牛磺酸的細胞培養基在蛋白生產培養期間胺基酸可能耗盡，其中並無提供另外的胺基酸補充，或此補充牛磺酸的細胞培養基可能為「非耗盡的」，其中胺基酸補充係供應耗盡的胺基酸(如下述)。本發明者們已觀察到，在生產階段期間以補充牛磺酸培養，在各種如前面所述的培養條件下，提升了重組蛋白產量。

【0063】 本發明係提供補充牛磺酸的培養基，其係含有至少約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 mM 濃度(以每公升毫莫耳表示)的牛磺酸。

【0064】 在一實施例中，培養基另外係含有 $100\ \mu\text{M} \pm 15\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或 $300\ \mu\text{M} \pm 45\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或 $600\ \mu\text{M} \pm 90\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸，或甚至 $900\ \mu\text{M} \pm 135\ \mu\text{M}$ 鳥胺酸。在另外的實施例中，此培養基係含有至少約 $5\ \text{mg/L} \pm 1\ \text{mg/L}$ 鳥胺酸·HCl，或至少約 $10\ \text{mg/L} \pm 2\ \text{mg/L}$ 鳥胺酸·HCl， $15\ \text{mg/L} \pm 2.25\ \text{mg/L}$ 鳥胺酸·HCl，或至少約 $50\ \text{mg/L} \pm 7.5\ \text{mg/L}$ 鳥胺酸·HCl，或至少約 $100\ \text{mg/L} \pm 15\ \text{mg/L}$ 鳥胺酸·HCl，或至少約 $150\ \text{mg/L} \pm 22.5\ \text{mg/L}$ 鳥胺酸·HCl。

【0065】 腐胺(putrescine)可視需要加到補充的培養基中。在某些細胞培養基調配物中以包括非常低濃度的腐胺作為組份；參見例如 WO 2005/028626，其描述了 0.02-0.08 mg/L 腐胺；美國專利第 5,426,699 號(0.08 mg/L)；美國專利第 RE30,985 號(0.16 mg/L)；美國專利第 5,811,299 號(0.27 mg/L)；美國專利第 5,122,469 號(0.5635 mg/L)；美國專利第 5,063,157 號(1 mg/L)；WO 2008/154014($\sim 100\ \mu\text{M}$ ~ $1000\ \mu\text{M}$)；美國專利申請案第 2007/0212770 號(0.5–30 mg/L 多胺；2 mg/L 腐胺；2 mg/L 腐胺+2 mg/L 鳥胺酸；2 mg/L 腐胺+10 mg/L 鳥胺酸)。

【0066】 在某些實施例中，此培養基進一步係補充鳥胺酸和腐胺之組合物，其中腐胺可為至少約 150 至 720 μM 之濃度。在某些

實施例中，此培養基進一步係補充至少約 170 至 230 μM 濃度之腐胺。在一實施例中，此培養基除了 $\geq 90 \mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$ 鳥胺酸之外，係含有 $200 \mu\text{M} \pm 30 \mu\text{M}$ 腐胺。在一實施例中，此培養基除了 $15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$ 鳥胺酸之外，係含有 $\leq 30 \text{ mg/L} \pm 4.5 \text{ mg/L}$ 腐胺 $\cdot 2\text{HCl}$ 。在另外的實施例中，此培養基除了 $15 \text{ mg/L} \pm 2.25 \text{ mg/L}$ 鳥胺酸 $\cdot \text{HCl}$ 之外，係含有 $\geq 30 \text{ mg/L} \pm 4.5 \text{ mg/L}$ 腐胺 $\cdot 2\text{HCl}$ (參見 2014 年 9 月 14 日公開的國際公開案第 WO2014/144198A1 號，其係以全文引用之方式併入本文中)。

【0067】 又在其他的實施例中，鳥胺酸係以範圍從 $0.09 \pm 0.014 \text{ mM}$ 至 $0.9 \pm 0.14 \text{ mM}$ ，例如 $0.09 \pm 0.014 \text{ mM}$ ， $0.3 \pm 0.05 \text{ mM}$ ， $0.6 \pm 0.09 \text{ mM}$ ，或 $0.9 \pm 0.14 \text{ mM}$ 鳥胺酸之濃度存在培養基中。在某些實施例中，此培養基亦含有至少 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 腐胺。在某些實施例中，此另外的腐胺濃度範圍係從 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ 至 $0.714 \pm 0.11 \text{ mM}$ ，例如 $0.20 \pm 0.03 \text{ mM}$ ， 0.35 ± 0.06 ，或 $0.714 \pm 0.11 \text{ mM}$ 腐胺。

【0068】 各種其他的補充物可加到培養基中，且係在本項技術者之技術內用以決定另外適合的條件。在某些實施例中，此培養基係補充了由下列組成之群中選出的胺基酸之混合物：天門冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、甘胺酸、離胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、精胺酸、組胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、丙胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、酪胺酸和色胺酸，以便於為非耗盡的或當需要補充的營養素時。

【0069】 在一實施例中，此培養基進一步係補充約 170 μM 至 175 μM 核苷。在一實施例中，此培養基係含有至少 40 μM ，至少 45 μM ，至少 50 μM ，至少 55 μM ，至少 60 μM ，至少 65 μM ，至少 70 μM ，至少 75 μM ，至少 80 μM ，至少 85 μM ，至少 90 μM ，至少 95 μM ，至少 100 μM ，或至少 105 μM 累積濃度之嘌呤衍生物。在一實施例中，此培養基係含有約 100 μM 至 110 μM 的嘌呤衍生物。嘌呤衍生物包括次黃嘌呤及核苷腺苷和鳥苷。在一實施例中，此培養基係含有至少 30 μM ，至少 35 μM ，至少 40 μM ，至少 45 μM ，

至少 50 μM ，至少 55 μM ，至少 60 μM ，或至少 65 μM 累積濃度之嘧啶衍生物。在一實施例中，此培養基係含有約 65 μM 至 75 μM 的嘧啶衍生物。嘧啶衍生物包括核苷胸苷、尿苷和胞苷。在一特別的實施例中，此培養基係含有腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、胸苷和次黃嘌呤。

【0070】 除了包括任何上述添加物之外，在一實施例中，此培養基進一步係補充微莫耳量的脂肪酸(或脂肪酸衍生物)和生育醇。在一實施例中，此脂肪酸係包括任何一或多項的亞麻油酸、次亞麻油酸、硫辛酸、油酸、棕櫚酸、硬脂酸、花生酸、花生四烯酸、月桂酸、山嵎酸、癸酸、十二酸、己酸、掬焦油酸、肉豆蔻酸和辛酸。在一實施例中，此培養基係含有生育醇、亞麻油酸和硫辛酸。

【0071】 在一實施例中，此培養基亦可進一步補充維生素與輔因子之混合物，其包括至少約 700 μM 或至少約 2 mM 累積濃度之其他的營養素和必須營養素。在一實施例中，維生素與輔因子的混合物係含有一或多種的 D-生物素、氯化膽鹼、葉酸、肌醇、菸鹼醯胺、吡哆醇 HCl、D-泛酸(hemiCa)、核黃素、硫胺素 HCl、維生素 B12 等等。在一實施例中，維生素與輔因子的混合物係包括所有的 D-生物素、氯化膽鹼、葉酸、肌醇、菸鹼醯胺、吡哆醇 HCl、D-泛酸(hemiCa)、核黃素、硫胺素 HCl 和維生素 B12。

【0072】 本發明培養基之各種實施例包括任何的上述實施例之組合，包括化學成份確定的、無水解產物、無血清培養基，其係含指定量之牛磺酸，加上(尤其是)(a)胺基酸；(b)視需要核苷；(c)二價陽離子的鹽類；(d)脂肪酸和生育醇；及(e)維生素。在某些實施例中，所有小量的水解產物可加到補充牛磺酸的培養基中。

【0073】 申請人設想，在施行本發明中一或多種的各式基礎培養基或其組合可使用牛磺酸。基礎培養基一般已為本項技術所知並包括(尤其是)Eagle's MEME(最小必須培養基)(Eagle, Science, 1955, 112(3168):501-504)、Ham's F12 (Ham, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1965, 53:288-293)、F-12 K 培養基、杜氏(Dulbecco's)培養基、杜氏

修改伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1952 August; 38(8): 747-752)、DMEM/ Ham's F12 1:1、Trowell's T8、A2 培養基 Holmes and Wolf, Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 10:389-401)、Waymouth 培養基 (Davidson and Waymouth, Biochem. J., 1945, 39(2):188-199)、Williams E 培養基 (William's et al., Exp. Cell Res., 1971, 69:105 *et seq.*)、RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc., 1967, 199:519-524)、MCDB 104/110 培養基(Bettger et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 1981, 78(9):5588-5592)、Ventrex HL-1 培養基、白蛋白-球蛋白培養基(Orr et al., Appl. Microbiol., 1973, 25(1):49-54)、RPMI- 1640 培養基、RPMI- 1641 培養基、Iscoe's 修改杜氏培養基、McCoy's 5 A 培養基、Leibovitz's L- 15 培養基，以及無血清培養基，例如 EX-CELL™ 300 Series (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas)、魚精蛋白(protamine)-鋅-胰島素培養基(Weiss et al., 1974, US 4,072,565)、生物素-葉酸培養基(Cartaya, 1978, US Re30,985)、運鐵蛋白-脂肪酸培養基(Baker, 1982, US 4,560,655)、運體蛋白-EGF 培養基(Hasegawa, 1982, US 4,615,977; Chessebeuf, 1984, US 4,786,599)及其他培養基置換(參見 Inlow, US 6,048,728 ; Drapeau, US 7,294,484 ; Mather, US 5,122,469 ; Furukawa, US 5,976,833 ; Chen, US 6,180,401 ; Chen, US 5,856,179 ; Etcheverry, US 5,705,364 ; Etcheverry, US 7,666,416 ; Ryll, US 6,528,286 ; Singh, US 6,924,124 ; Luan, US 7,429,491 ; 等等)。

【0074】 在一特別的實施例中，此培養基為化學成份確定的且除了牛磺酸之外係含有：如文所定義之胺基酸混合物、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；HEPES 緩衝劑、KCl； MgSO_4 ；NaCl； Na_2HPO_4 或其他磷酸鹽；丙酮酸；D-生物素；氯化膽鹼；葉酸；肌醇；菸鹼鹽胺；吡哆醇 HCl；D-泛酸；核黃素；硫胺素 HCl；維生素 B12；p-胺基苯甲酸；乙醇胺 HCl；泊洛沙姆 188；DL-a-生育醇磷酸鹽；亞麻油酸； Na_2SeO_3 ；硫辛酸；和葡萄糖；以及視需要腺苷；鳥苷；胞苷；尿苷；胸苷和次黃嘌呤 2Na。

【0075】 在一實施例中，本發明培養基之開始的滲透壓為 200-500、250-400、275-350 或約 300 mOsm。在細胞於本發明培養基中的生長階段期間，及特別是在任何根據饋料批次法饋料後，培養的滲透壓可增加至高約 350、400、450、500 或至高約 550 mOsm。

【0076】 在某些實施例中，其中成份確定的培養基之滲透壓係低於約 300，此滲透壓係以添加一或多種指定過量的鹽類而達到約 300。在一實施例中，係藉由加入一或多種選自下列之滲透物，將滲透壓增加至所欲的程度：氯化鈉、氯化鉀、鎂鹽、鈣鹽、胺基酸鹽、脂肪酸鹽、碳酸氫鈉、碳酸鈉、碳酸鉀、鹽之螯合劑、糖(例如半乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、岩藻糖等)，及其組合。在一實施例中，除了已存在成份確定培養基中之組份的濃度以外，又再加入滲透物(例如除了指定的糖組份之外，又再加入糖)。

【0077】 上述培養基之各個實施例，以及含有至少約 0.1 mM 牛磺酸之任何其他無血清培養基係稱為補充牛磺酸的培養基。相反地，不含有牛磺酸的培養基，或含有低於 0.1 mM 牛磺酸之培養基在下文係稱為非補充牛磺酸培養基或無補充物。

饋料式批次培養

【0078】 細胞培養之饋料策略係以確保細胞在多細胞生物體或組織外最佳生長和增殖為目標。適合哺乳動物細胞的培養條件已為本項技術所知。參見，例如 *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992)。哺乳動物細胞可在懸浮液中培養或同時黏附一固體物質。流化床生物反應器、中空纖維生物反應器、旋轉瓶、震盪燒瓶或攪拌式生物反應器，在有或無微載體下，及以批次、饋料批次、連續、半連續、或灌注模式操作，可利用於哺乳動物細胞培養。細胞培養基或濃縮饋料培養基可連續或在培養期間相隔一段時間加到培養中。例如，培養可每天、每隔一天、每三天饋料一次，或可在監控下當特定培養基組份的濃度落在所欲的範圍以外時饋料。

【0079】 除了包括牛磺酸之外，在一實施例中，培養基可進一步補充至少 20 mM 累積濃度的胺基酸。在一實施例中，包括在開始細胞培養基之最初的胺基酸濃度並不包括此補充的胺基酸累積(總)濃度。在一細胞培養基的實施例中，或在培養細胞的方法或製造感興趣蛋白之方法中，此培養基可補充大於約 20 mM，大於約 25 mM，大於約 30 mM，大於約 40 mM，大於約 50 mM，或大於約 60 mM，大於約 70 mM，大於約 100 mM，大於約 200 mM，大於約 300 mM，大於約 400 mM，或大於約 500 mM 之量。亦參見文中之表 1。在一實施例中加至培養基中的胺基酸量為約 30 mM $\pm$ 10 mM 或更多。

【0080】 補充饋料攝食法可由熟習本項技術者最適化以於生產階段期間支持細胞生長，將細胞壓力最小化，或提供「非-耗盡培養基(non-depleted medium)」。

【0081】 「非-耗盡培養基」包括經測定具有營養素，特別是製造重組感興趣蛋白所需之胺基酸的細胞培養基。胺基酸饋料典型地係補充細胞培養中製造重組蛋白之構件所需的胺基酸。然而，依照培養中細胞所製造的特定蛋白之需求，某些胺基酸消耗可能比其他胺基酸更快。在一非耗盡培養基中，已決定饋料攝食法因此必須胺基酸係在其消耗時再補充。因此，可藉由下步驟來測定耗盡和隨後的最佳消耗率(pg/細胞-天)：於一細胞培養基中培養表現感興趣蛋白之真核細胞；在時間點測量培養基中各胺基酸濃度用以建立一消耗量；鑑定出胺基酸濃度落在消耗量以下之消耗時間點；計算各胺基酸的消耗率；並決定最佳消耗率為就在耗盡時間點之前的時間點之消耗率。然後以適當濃度的特定胺基酸補充此細胞培養以維持此決定的最佳消耗率，以使用作非耗盡之培養基。

【0082】 請了解，本發明係提供於一耗盡以及非耗盡培養中增進蛋白效價之補充牛磺酸的細胞培養基。

【0083】 本發明係提供於一上述的補充牛磺酸之細胞培養基中包括表現感興趣蛋白之細胞株的細胞培養。習用於製造蛋白生物治療劑之細胞株的實例包括(尤其是)初代細胞、BSC 細胞、HeLa 細

胞、HepG2 細胞、LLC-MK 細胞、CV-1 細胞、COS 細胞、VERO 細胞、MDBK 細胞、MDCK 細胞、CRFK 細胞、RAF 細胞、RK 細胞、TCMK-1 細胞、LLCPK 細胞、PK15 細胞、LLC-RK 細胞、MDOK 細胞、BHK 細胞、BHK-21 細胞、CHO 細胞、CHO-K1 細胞、NS-1 細胞、MRC-5 細胞、WI-38 細胞、3T3 細胞、293 細胞、Per.C6 細胞和雞胚胎細胞。在一實施例中，此細胞株為 CHO 細胞株或一或多種經最適化用於大規模蛋白製造之數種特定 CHO 細胞變體，例如 CHO-K1。

【0084】 在一實施例中，補充牛磺酸的細胞培養係含有胰島素，其可加入培養基中作為使用點成份，或可包括在培養基調配物中。在一實施例中，此細胞株係包括能製造生物治療蛋白之細胞。

【0085】 在一實施例中，此培養基係在培養期間根據饋料批次法間隔一段時間補充。饋料批次培養一般已為本項技術所知並應用於最佳化蛋白產量(參見 Y.M. Huang *et al.*, *Biotechnol Prog.* 2010 Sep-Oct;26(5): 1400-10)。

【0086】 細胞生長階段或菌種培養(亦即最初細胞培養)其中並無提供培養基交換，典型地係接著一不同的第二培養，稱為多肽生產階段。在生產階段期間，典型地係使用饋料批次法。

【0087】 本發明係提供在生產細胞培養開始時(第 0 天)包括約 0.1 mM 至約 10 mM 牛磺酸之細胞培養基。另一種選擇，包括約 0.1 mM 至約 10 mM 牛磺酸之細胞培養基可在生產細胞培養的第 1 天，第 2 天，第 3 天，第 4 天，第 5 天，第 6 天，第 7 天，第 8 天，第 9 天及/或第 10 天補充。在多日加到生產培養的細胞培養基係包括總量介約 0.1 mM 至約 10 mM 之牛磺酸。包括總量介約 0.1 mM 至約 10 mM 之牛磺酸的細胞培養基可以任何順序方式加入。

【0088】 牛磺酸亦可在菌種擴增期補充到基礎培養基中。

【0089】 在生產培養期間，間隔一段時間以每天、每 2-3 天的頻率可進行補充饋料以包括另外的營養素，例如維生素、胺氨酸和其他上述之營養素。在整個 2 週或更長培養之生產培養期間，可進

行補充饋料(加入含有營養素的補充培養基)至少 2 次,或至少 8 次。在另外的實施例中,可在培養期間每天進行補充饋料。亦可預想替代的培養饋料時程。

【0090】 亦可進行另外的胺基酸補充以提供非耗盡培養基,其中係根據本項技術中已知的和文中所述的方法來測定耗盡的胺基酸。當應用此攝食法時,依照測定的胺基酸消耗,係間隔一段時間補充或加入額外的胺基酸,較佳地在生產培養期間以每天或每 2-3 天的頻率。在一實施例中,維持非耗盡細胞培養基之額外的胺基酸混合物係在或約第 1 天,在或約第 2 天,在或約第 3 天,在或約第 4 天,在或約第 5 天,在或約第 6 天,在或約第 7 天,在或約第 8 天,在或約第 9 天,在或約第 10 天,在或約第 11 天,在或約第 12 天,在或約第 13 天,在或約第 14 天,加到培養中,進行 2 週或更長的培養。亦可預想替代的培養饋料時程。

【0091】 動物細胞,例如 CHO 細胞,可以小規培養來培養,例如於具有約 25 mL 培養基之 125 mL 容器中,具有約 50 至 100 mL 培養基之 250 mL 容器中,具有約 100 至 200 mL 培養基之 500 mL 容器中。另一種選擇,此培養亦可為大規模的,例如具有約 300 至 1000 mL 培養基之 1000 mL 容器,具有約 500 mL 至 3000 mL 培養基之 3000 mL 容器,具有約 2000 mL 至 8000 mL 培養基之 8000 mL 容器,具有約 4000 mL 至 15000 mL 培養基之 15000 mL 容器。用於製造的培養可含有 10,000 L 的培養基或更多。大規模細胞培養,例如臨床製造蛋白治療劑,典型地係在細胞製造所欲的蛋白同時,維持數天或甚至數週。在此期間,此培養可補充含有例如營養素和胺基酸組份之濃縮的餵料培養基,其係在培養期間消耗。濃縮的餵料培養基可以任何細胞培養基調配物為基礎。此一濃縮的餵料培養基可含有大部份的細胞培養基之組份,例如約 5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100X、200X、400X、600X、800X 或甚至約 1000X 其正常可使用量。濃縮的餵料培養基通常係用於饋料批次培養法中。

【0092】 在某些實施例中，含有牛磺酸的細胞培養在細胞生長或蛋白生產期間係進一步補充「使用點添加物」，亦稱為添加物、使用點成份或使用點化學物。使用點添加物包括任何一或多種生長因子或其他蛋白、緩衝劑、能量來源、鹽、胺基酸、金屬和螯合劑。其他的蛋白包括運鐵蛋白和白蛋白。生長因子，包括細胞激素和趨化激素，一般已為本項技術所知且已知係刺激細胞生長，或在某些情況下為細胞分化。生長因子通常為一蛋白(例如胰島素)、小分子胜肽或類固醇荷爾蒙，例如雌激素、DHEA、睪固酮等等。在某些情況下，生長激素可為促進細胞增生或蛋白生產之非天然化學物，例如四氫葉酸(THF)、胺甲喋呤(methotrexate)等等。蛋白和胜肽生長因子之非限定實例包括血管生成素、骨塑型蛋白(BMP)、腦衍生神經營養因子(BDNF)、表皮生長因子(EGF)、紅血球生成素(EPO)、纖維母細胞生長因子(FGF)、膠質細胞株衍生的神經營養因子(GDNF)、粒細胞集落刺激因子(G-CSF)、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子(GM-CSF)、生長分化因子-9 (GDF9)、肝細胞生長因(HGF)、肝癌衍生的生長因子(HDGF)、胰島素、類胰島素生長因子(IGF)、促移行因子、肌骨素(myostatin)(GDF-8)、神經生長因子(NGF)和其他神經營養蛋白、血小板衍生的生長因子(PDGF)、促血小板生成素(TPO)、轉形生長因子 α (TGF- α)、轉形生長因子 β (TGF- β)、腫瘤凋亡因子- α (TNF- α)、血管內皮生長因子(VEGF)、wnt 訊號傳遞路徑促效劑、胎盤生長因子(PlGF)、胎牛促體素(FBS)、介白素-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7 等等。在一實施例中，此細胞培養基係補充使用點添加物生長因子胰島素。在一實施例中，培養基中胰島素的濃度，亦即添加後細胞培養基中胰島素的量為約 0.1 μ M 至 10 μ M。

【0093】 緩衝劑一般已為本項技術所知。本發明不限於任何特定的緩衝劑，及任何本項技術之一般技術者可就用於生產特定蛋白的特定細胞株選擇適合的緩衝劑。在一實施例中，使用點添加物緩衝劑為 NaHCO_3 。在另外的實施例中，此緩衝劑為 HEPES。在其他的實施例中，此使用點添加緩衝劑係包括 NaHCO_3 和 HEPES 二者。

【0094】 於細胞培養中用作為使用點添加的能量來源亦為本項技術所熟知。不受限制，在一實施例中，使用點添加的能量來源為葡萄糖。若給予特定細胞株和生產蛋白之特定及指定的需求，在一實施例中此葡萄糖在培養基中可以約 1 至 20 mM 之濃度加入。在某些情況下，可以 20 g/L 之高量或更高量加入。

【0095】 螯合劑同樣地已為細胞培養和蛋白製造技術所熟知。雖然施行本發明可應用其他螯合劑，但 EDTA 四鈉二水合物和檸檬酸鹽為二種用於本項技術之常見的螯合劑。在一實施例中，使用點添加螯合劑為 EDTA 四鈉二水合物。在一實施例中，使用點添加螯合劑為檸檬酸鹽，例如 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 。

【0096】 在一實施例中，此細胞培養基可另外補充一或多種使用點添加物胺基酸作為能量來源，例如麩醯胺酸。在一實施例中，此細胞培養基係補充最終濃度約 1 mM 至 13 mM 之使用點添加物麩醯胺酸。

【0097】 其他的使用點添加物包括一或多種各式的金屬鹽類，例如鐵鹽、鎳鹽、鋅鹽和銅鹽。在一實施例中，此細胞培養基係補充任何一或多種的硫酸銅、硫酸鋅、氯化鐵和硫酸鎳。

【0098】 在某些實施例中，由補充牛磺酸培養基之細胞培養所產生的蛋白效價係比無補充牛磺酸之細胞培養所產生的蛋白效價大至少 4%，至少 5%，至少 6%，至少 7%，至少 8%，至少 9%，至少 10%，至少 11%，至少 12%，至少 13%，至少 14%，至少 15%，至少 16%，至少 17%，至少 18%，至少 19%，至少 20%，至少 21%，至少 22%，至少 23%，至少 24%，至少 25%，至少 26%，至少 27%，至少 28%或至少 29%。在某些實施例中，由補充牛磺酸培養基之細胞培養所產生的蛋白效價係比無補充牛磺酸之類似或相同細胞培養所產生的蛋白效價大至少 2%，至少 3%，至少 4%，或至少 5%。

【0099】 在某些實施例中，相較於無補充牛磺酸之培養基的細胞培養，在補充牛磺酸之培養基中細胞培養的氨濃度係降低大於 4%，

大於 5%，大於 6%，大於 7%，大於 8%，大於 9%，大於 10%，大於 15%，或大於 20%。

蛋白生產

【0100】 除了補充牛磺酸的培養基和於補充牛磺酸的培養基中培養細胞的方法之外，本發明係提供於一補充牛磺酸的培養基之細胞培養中增進生產蛋白，例如治療上有效的抗體或其他生物醫藥物質之方法。本發明係提供製造高產率之治療性蛋白的方法，其包括於含有牛磺酸的培養基中培養一重組的細胞株，其中該細胞株係包括一編碼該治療性蛋白之穩定整併的核酸。

【0101】 在某些實施例中，含有牛磺酸培養基中培養的哺乳動物細胞之蛋白效價(產率)比無補充牛磺酸培養基中所培養的相同哺乳動物細胞之蛋白效價大至少 100 mg/L，至少 0.5 g/L，至少 1 g/L，至少 1.2 g/L，至少 1.4 g/L，至少 1.6 g/L，至少 1.8 g/L，至少 2 g/L，至少 2.5 g/L。

【0102】 在某些實施例中，來自補充牛磺酸培養基的細胞培養之蛋白產率或效價，其可用每公升培養基之蛋白克數來表示，為至少 100 mg/L，至少 1 g/L，至少 1.2 g/L，至少 1.4 g/L，至少 1.6 g/L，至少 1.8 g/L，至少 2 g/L，至少 2.5 g/L，至少 3 g/L，至少 3.5 g/L，至少 4 g/L，至少 4.5 g/L，至少 5 g/L，至少 5.5 g/L，至少 6 g/L，至少 6.5 g/L，至少 7 g/L，至少 7.5 g/L，至少 8 g/L，至少 8.5 g/L，至少 9 g/L，至少 9.5 g/L，至少 10 g/L，至少 15 g/L，或至少 20 g/L。

【0103】 在某些實施例中，由補充牛磺酸培養基的細胞所產生之蛋白效價比無補充牛磺酸培養基所培養之類似或相同細胞的蛋白效價(產率)大至少 2%，至少 3%，至少 4%，至少 5%，至少 6%，至少 7%，至少 8%，至少 9%，至少 10%，至少 11%，至少 12%，至少 13%，至少 14%，至少 15%，至少 16%，至少 17%，至少 18%，至少 19%，至少 20%，至少 21%，至少 22%，至少 23%，至少 24%，至少 25%，至少 26%，至少 27%，至少 28%或至少 29%。

【0104】 在某些實施例中，此蛋白產物(感興趣蛋白)為抗體、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多專一性抗體、雙專一性抗體、抗原結合的抗體片段、單鏈抗體、雙抗體、三抗體或四抗體、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段、IgD 抗體、IgE 抗體、IgM 抗體、IgG 抗體、IgG1 抗體、IgG2 抗體、IgG3 抗體或 IgG4 抗體。在一實施例中，此抗體為 IgG1 抗體。在一實施例中，此抗體為 IgG2 抗體。在一實施例中，此抗體為 IgG4 抗體。在一實施例中，此抗體為嵌合的 IgG2/IgG4 抗體。在一實施例中，此抗體為嵌合的 IgG2/IgG1 抗體。在一實施例中，此抗體為嵌合的 IgG2/IgG1/IgG4 抗體。

【0105】 在某些實施例中，此抗體係由下列組成之群中選出：抗計畫性細胞死亡抗體(例如，如美國專利申請公開案第 US2015/0203579A1 號所述之抗-PD1 抗體)、抗計畫性細胞死亡配體-1(例如，如美國專利申請公開案第 US2015/0203580A1 號所述之抗-PD-L1 抗體)、抗-Dll4 抗體、抗-血管生成素-2 抗體(例如，如美國專利第 9,402,898 號所述之抗-ANG2 抗體)、類抗-血管生成素-3 抗體(例如，如美國專利第 9,018,356 號所述之抗-AngPt13 抗體)、抗-血小板衍生生長因子受體抗體(例如，抗-PDGFR 抗體美國專利第 9,265,827 號)、抗-Erb3 抗體、抗-泌乳素受體抗體(例如，如美國專利第 9,302,015 號所述之抗-PRLR 抗體)、抗-補體 5 抗體(例如，如美國專利申請公開案第 US2015/0313194A 1 號所述之抗-C5 抗體)、抗-TNF 抗體、抗-表皮生長因子受體抗體(例如，如美國專利第 9,132,192 號所述之抗-EGFR 抗體或如美國專利申請公開案第 US2015/0259423A1 號所述之抗-EGFRvIII 抗體)、抗-前蛋白轉化酶枯草溶菌素-9 抗體(例如，如美國專利第 8,062,640 號或美國專利申請公開案第 US2014/0044730A1 號所述之抗-PCSK9 抗體)、抗-生長及分化因子-8 抗體(例如，如美國專利第 8,871,209 號或第 9,260,515 號所述之抗-GDF8 抗體，亦稱為抗-肌骨素抗體)、抗-升糖素受體(例如，如美國專利申請公開案第 US2015/0337045A1 號或第 US2016/0075778A1 號所述之抗-GCGR 抗體)、抗-VEGF 抗體、抗

-IL1R 抗體、介白素 4 受體抗體(例如，如美國專利申請公開案第 US2014/0271681A1 號或美國專利第 8,735,095 號或第 8,945,559 號所述之抗-IL4R 抗體)、抗-介白素 6 受體抗體(例如，如抗體美國專利案號 7,582,298、8,043,617 或 9,173,880 所述之抗-IL6R)、抗-IL1 抗體、抗-IL2 抗體、抗-IL3 抗體、抗-IL4 抗體、抗-IL5 抗體、抗-IL6 抗體、抗-IL7 抗體、抗-介白素 33 (例如，如美國專利申請公開案號 US2014/0271658A1 或 US2014/0271642A1 所述之抗-IL33 抗體)、抗-呼吸道融合病毒抗體(例如，如美國專利申請公開案第 US2014/0271653A1 號所述之抗-RSV 抗體)、抗-分化群 3(例如，如美國專利申請公開案號 US2014/0088295A1 和 US20150266966A1 以及美國申請案第 62/222,605 號所述之抗-CD3 抗體)、抗-分化群 20 (例如，如美國專利申請公開案號 US2014/0088295A1 和 US20150266966A1 以及美國專利第 7,879,984 號所述之抗-CD20 抗體)、抗-CD19 抗體、抗-CD28 抗體、抗-分化群-48 (例如，如美國專利第 9,228,014 號所述之抗-CD48 抗體)、抗-Fel d1 抗體(例如，描述於美國專利第 9,079,948 號)、抗-中東呼吸症候群病毒(例如，如美國專利申請公開案第 US2015/0337029A1 號所述之抗-MERS 抗體)、抗-伊波拉病毒抗體(例如，描述於美國專利申請公開案第 US2016/0215040 號)、抗-Zika 病毒抗體、抗-淋巴細胞活化基因 3(例如，抗-LAG3 抗體或抗-CD223 抗體)及抗-活化素 A 抗體。在某些實施例中，此雙專一性抗體係由下列組成之群中選出：抗-CD3 x 抗-CD20 雙專一性抗體(如描述於美國專利申請公開案號 US2014/0088295A1 和 US20150266966A1)、抗-CD3 x 抗-黏蛋白 16 雙專一性抗體(例如，抗-CD3 x 抗-Muc16 雙專一性抗體)及抗-CD3 x 抗-前列腺-專一性膜抗原雙專一性抗體(例如，抗-CD3 x anti-PSMA 雙專一性抗體)。在某些實施例中，此感興趣蛋白係由下列組成之群中選出：alirocumab、sarilumab、fasinumab、nesvacumab、dupilumab、trevogrumab、evinacumab 和 rinucumab。整個揭示文中所提及的所有出版品係以全文引用的方式併入本文中。

【0106】 在某些實施例中，感興趣蛋白為含有一 Fc 基團和另外區域的重組蛋白(例如 Fc-融合蛋白)。在某些實施例中，Fc-融合蛋白為一受體 Fc-融合蛋白，其含有結合一 Fc 基團的一或多個受體之胞外區。在某些實施例中，此 Fc 基團係包括一絞鏈區接著一 IgG 之 CH2 和 CH3 區。在某些實施例中，此受體 Fc-融合蛋白係含有二或多個與單一配體或多配體結合的不同受體鏈。例如，此 Fc-融合蛋白為一捕捉阱(TRAP)蛋白，例如 IL-1 阱(例如列洛西普(rilonacept)，其含有與 IL-1R1 胞外區融合之 IL-1RAcP 配體-結合區，而該 IL-1R1 胞外區係與 hIgG1 之 Fc 區融合；參見美國專利第 6,927,004 號，其係以全文引用的方式併入本文中)，或 VEGF 捕捉阱(例如阿柏西普(aflibercept)，其係含有與 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 3 區融合的 VEGF 受體 Flt1 之 Ig 2 區，而該 VEGF 受體 Flk1 之 Ig 3 區係與 hIgG1 之 Fc 區融合；參見美國專利第 7,087,411 和 7,279,159 號)。在其他的實施例中，Fc-融合蛋白為一 ScFv-Fc-融合蛋白，其含有一或多個抗原結合區，例如與 Fc 部份結合之抗體的可變重鏈片段和可變輕鏈片段。

【0107】 就蛋白製造，本發明不限於任何特定類型的細胞。適合蛋白製造之細胞類型的實例包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、鳥類細胞、細菌細胞和酵母菌細胞。此細胞可為幹細胞或以重組基因表現的載體所轉化之重組細胞，或以製造病毒產物之病毒轉染的細胞。此細胞可含有一編碼感興趣蛋白之重組的異源性聚核苷酸結構。此結構可為游離基因組(episome)或其可為體質上整併至此細胞基因體的元件。此細胞亦可在不具有於異源多肽結構上所編碼的蛋白下，製造感興趣蛋白。換言之，此細胞可本質上編碼此感興趣蛋白，例如 B-細胞製造抗體。此細胞亦可為初級細胞例如雞胚胎細胞，或初級細胞株。可用的細胞實例包括 BSC 細胞、LLC-MK 細胞、CV-1 細胞、COS 細胞、VERO 細胞、MDBK 細胞、MDCK 細胞、CRFK 細胞、RAF 細胞、RK 細胞、TCMK-1 細胞、LLCPK 細胞、PK15 細胞、LLC-RK 細胞、MDOK 細胞、BHK-21 細胞、雞胚胎細胞、

NS-1 細胞、MRC-5 細胞、WI-38 細胞、BHK 細胞、293 細胞、RK 細胞、Per.C6 細胞和 CHO 細胞。在各種實施例中，此細胞株為 CHO 細胞衍生物，例如 CHO-K1、CHO DUX B-11、CHO DG-44、Veggie-CHO、GS-CHO、S-CHO 或 CHO lec 突變株。

【0108】 在一實施例中，此細胞為異位表現一蛋白之 CHO 細胞。在一實施例中，此蛋白係包括一免疫球蛋白重鏈區，例如 CH1、CH2 或 CH3 區。在一實施例中，此蛋白係包括一人類或噬齒類免疫球蛋白 CH2 和 CH3 區。在一實施例中，此蛋白係包括一類或噬齒類免疫球蛋白 CH1、CH2 和 CH3 區。在一實施例中，此蛋白係包括一絞鏈區及一 CH1、CH2 和 CH3 區。在一實施例中，此蛋白係包括一免疫球蛋白重鏈可變區。在一實施例中，此蛋白係包括一免疫球蛋白輕鏈可變區。在一實施例中，此蛋白係包括一免疫球蛋白重鏈可變區及一免疫球蛋白輕鏈可變區。在一實施例中，此蛋白為一抗體，例如人類抗體、噬齒類抗體或嵌合的人類/噬齒類抗體(例如人類/小鼠、人類/大鼠或人類/倉鼠)。

【0109】 生產階段可以任何的培養規模來進行，從震盪器燒瓶或搖動包袋，至 1 公升生物反應器以及大規模工業生物反應器。同樣地，菌種擴增期可以任何的培養規模來進行，從震盪器燒瓶或搖動包袋，至 1 公升或大型生物反應器。大規模處理可以約 100 公升至 20,000 公升或更大之容量來進行。可使用一或數種方法來控制蛋白生產，例如溫度變換或化學誘發。生長階段可發生在比生產階段更高的溫度。例如，生長階段可發生在約 35°C 至 38°C 的第一溫度，而生產階段可發生在約 29°C 至 37°C 之第二溫度，視需要從約 30°C 至 36°C 或從約 30°C 至 34°C。此外，蛋白生產之化學誘發物，例如咖啡因、丁酸鹽、泰莫西芬(tamoxifen)、雌激素、四環黴素、多西環素、六亞甲基雙乙醯胺(HMBA)可在溫度變換的同時、之前或之後加入。若誘發物係在溫度變換之後加入，則其可在溫度變換後的 1 小時至 5 天加入，例如溫度變換後的 1 至 2 天。生產細胞培養可

如連續饋料培養系統來運作，如於恆化器中(參見 C. Altamirano et al., 2001 上文)或根據饋料批次法(Huang, 2010 上文)來運作。

【0110】 本發明可經由細胞培養程序用於增進細胞產量。用於本發明的細胞株可經基因工程化用以表現商業或科學上感興趣的多肽。基因工程化細胞涉及以重組的聚合核苷酸分子轉染、轉化或轉換細胞，或另外改變(例如藉由同源性重組和基因活化或重組細胞與非重組細胞融合)使得宿主細胞表現一所欲的重組多肽。用於基因工程化細胞或細胞株來表現一感興趣多肽的方法和載體已為熟習本項技術者所熟知；例如分子生物學實驗手冊中所示的各種技術。Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, and quarterly updates)；Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989)；Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, pp. 15-69。適用於培養中生長各種廣泛細胞株可得自美國菌種中心(Manassas, Va.)及市面供應商。常用於工業上的細胞株之實例包括 VERO、BHK、HeLa、CV1 (包括 Cos)、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株(例如 NSO、NSI)、PC12、WI38 細胞和中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。CHO 細胞係廣泛地用於製造複雜的重組蛋白，例如細胞激素、凝結因子和抗體(Brasel et al. (1996), *Blood* 88:2004-2012；Kaufman et al. (1988), *J. Biol. Chem.* 263:6352-6362；McKinnon et al. (1991), *J. Mol. Endocrinol.* 6:231-239；Wood et al. (1990), *J. Immunol.* 145:3011-3016)。二氫葉酸還原酶(DHFR)-缺陷的突變細胞株(Urlaub et al. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220)、DXB1 1 和 DG-44 和所欲的 CHO 宿主細胞因為此缺陷的 DHFR 可選擇和可增幅基因表現而讓高量的重組蛋白表現在這些細胞中(Kaufman R.J. (1990), *Meth. Enzymol.* 185:537-566)。此外，這些細胞容易操作為黏附或懸浮液培養並展現相當良好的基因穩定性。CHO 細胞和由其所重組表現的蛋白已被廣泛定性且管理當局已核准用於臨床和商業製造。在某些實施例中，此 CHO 細胞株為如描述於美國專利申請公開案號 2010/0304436 A1、2009/0162901

A1 和 2009/0137416 A1，以及美國專利案號 7,455,988 B2、7,435,553 B2 和 7,105,348 B2 之細胞株。

【0111】 本發明不限於文中所述的特定實施例之範圍，其係希望作為本發明之個別方面或實施力之說明。功能上相等的方法和組份係在本發明之範圍內。本發明之各種修改，除了文中所述的之外，由前述說明和伴隨的圖式對於熟習本項技術者為顯而易見的。此等修改係落在本發明之範圍內。

實例

實例 1：由於牛磺酸補充增進了抗體效價

【0112】 實例 1A-高通量震盪燒瓶培養：從一衍生自 CHO-K1 之單株抗體(Ab1)製造細胞的菌種培養接種 250mL 震盪燒瓶。讓接種的細胞於 35.5°C 生長 17 天並於需要時給予葡萄糖和其他補充的營養素。細胞係生長於化學成份確定的(無水解產物及無血清)基礎培養基中。

【0113】 各培養燒瓶在第 0 天為無補充的(燒瓶 1a)，或補充 1 mM 牛磺酸(燒瓶 1b)。

表 2：平均 17-天抗體效價(g/L)和相對於基線之大約效價增加量(%)

燒瓶	培養基 補充物	Ab1 效價	
1a	無補充*	7.3 g/L	
1b	牛磺酸	7.9 g/L^	8%

*效價增加%之基線對照；燒瓶 1b 與無補充培養基之效價(燒瓶 1a)相比。

^無補充和補充培養之間的最終效價差異為統計上顯著的(p < 0.05)。

【0114】 從第 17 天收取的蛋白計算效價值，且相較於基線為統計上顯著的($p < 0.05$)。補充牛磺酸的培養在最終的蛋白效價上展現整體優於未補充培養 8%增加。

【0115】 **實例 1B-桌上型生物反應器**：在一類似的實例中，又在一較大規模的生產中，從一衍生自 CHO-K1 之單株抗體(Ab2、Ab3 或 Ab4)製造細胞的菌種培養接種 2L 生物反應器。讓接種的細胞於 35.5°C 生長， 40.4%的設定和 22 ccm 之空氣注入進行 14 天。Ab2 和 Ab3 處理係具有 7.0 ± 0.15 之 pH 設定點，而 Ab4 處理具有 7.13 ± 0.27 之 pH 設定點。當需要時供應葡萄糖、消泡劑和基礎饋料至生物反應器中。培養物係在無補充培養基(生物反應器 2a、3a、4a)下生長或補充約 1 mM 牛磺酸的培養基(Ab2 和 Ab3)或補充約 3 mM 牛磺酸的培養基(Ab4)中生長，其係在生產的第 0 天添加(分別為生物反應器 2b、3b 和 4b)。

【0116】 就 Ab2-生產細胞，抗體產率(效價)為 6.4 g/L，而以牛磺酸生長的細胞則產生 8 g/L 蛋白。相較於生長在無牛磺酸補充物的細胞，24%增加為統計上顯著的($p < 0.05$)。在 14 天後(分別為 11%和 20%)，相較於無補充牛磺酸的培養，Ab3-生產培養和 Ab4-生產培養之所產生的最終效價亦顯著較高($p < 0.05$)。參見表 3。

表 3：平均 14-天抗體效價(g/L)和相對於基線之大約的效價增加(%)

培養基 補充物	生 物 反 應 器#	Ab2 效價		生 物 反 應 器#	Ab3 效價		生 物 反 應 器#	Ab4 效價	
無補充 物*	2a	6.4 g/L		3a	6.6 g/L		4a	4.4 g/L	
牛磺酸	2b	8 g/L^	24%	3b	7.3 g/L^	11%	4b	5.3 g/L^	20%

*無補充培養基為效價增加%-之基線對照，其中相較於無補充培養基(分別為生物反應器 2a、3a 或 4a)之效價，生物反應器 2b、3b 或 4b 效價%增加。

^補充和無補充培養之間的最終效價差異為統計上顯著的($p < 0.05$)。

【0117】 就 Ab3-生產細胞培養，對有關蛋白效價之時程作圖，且由於補充牛磺酸，從第 6 天開始在蛋白效價上於培養的每日觀察到有顯著提升。

表 4：在個別時間點由於補充牛磺酸之抗體效價(g/L)提升

生物反應器	培養基補充物	Ab3 效價 在第 6 天		Ab3 效價 在第 9 天		Ab3 效價 在第 14 天	
3a	無補充*	1.7 g/L		4.1 g/L		6.6 g/L	
3b	牛磺酸	1.9 g/L	12%	5.3 g/L^	29%	7.3 g/L^	11%

*相較於同一天所收集的無補充培養基之大約的增加(%)

^相較於無補充的培養基，具有牛磺酸補充之效價增加為統計上顯著的(p<0.05)。

【0118】 早在第 6 天於生產培養中可看到效價顯著的提升(相較於無牛磺酸補充之相同培養，增加 12%)。亦參見圖 1。在此時程中係在第 9 天看到最大的差異(顯著的(p < 0.05)，相較於 3a)，生物反應器 3b 增加 29%及在培養的最後一天(14)觀察到顯著的(p<0.05)效價增加 11%。

【0119】 經由不同規模(實例 1A 和 1B)和不同細胞株(實例 1B)觀察到補充牛磺酸之蛋白生產利益。

實例 2：高通量震盪燒瓶培養中各種牛磺酸濃度之恆定生產力

【0120】 藉由在生產第 0 天加到培養中之不同量的牛磺酸來試驗蛋白效價之恆定性。從一衍生自 CHO-K1 之單株抗體(Ab1)製造細胞的菌種培養接種 250 mL 震盪燒瓶。讓接種的細胞於 35.5°C 生長 14 天並於需要時給予葡萄糖和其他補充的營養素。細胞係生長於化學成份確定的(無水解產物及無血清)基礎培養基中。

【0121】 各培養係不含有牛磺酸(無補充)或含有 0.1 mM、0.3 mM、0.5 mM、0.7 mM、1 mM、3 mM、5 mM、7.5 mM 或 10 mM 濃度的牛磺酸。

表 5: 補充 0.1 至 10 mM 牛磺酸之培養中平均 14-天的抗體效價(g/L)

震盪燒瓶	培養基補充物	Ab1 效價	
5a	無補充*	6.5 g/L	
5b	0.1 mM 牛磺酸 [#]	6.7 g/L	3%
5c	0.3 mM 牛磺酸 [^]	6.8 g/L	5%
5d	0.5 mM 牛磺酸 [^]	6.9 g/L	6%
5e	0.7 mM 牛磺酸 [^]	7.0 g/L	8%
5f	1 mM 牛磺酸 [^]	7.0 g/L	8%
5g	5 mM 牛磺酸 [^]	7.1 g/L	9%
5h	7.5 mM 牛磺酸 [^]	7.1 g/L	9%
5i	10 mM 牛磺酸 [^]	7.1 g/L	9%

*無補充培養基為效價增加%之基線對照。

[#]相較於無補充對照組，最終效價之差異為統計上顯著的(p < 0.1)。

[^]相較於無補充對照組，最終效價之差異為統計上顯著的(p < 0.05)。

【0122】 其顯示，當牛磺酸補充係在至少 0.1 mM 至 10 mM 之範圍時，不同的牛磺酸-補充量一致地產生高效價。補充牛磺酸條件之最終效價與無補充條件在統計上為不同的。就 0.1 mM 牛磺酸為 p < 0.1，而就 0.3 mM 至 10 mM 牛磺酸為 p < 0.05。

實例 3：以高通量震盪燒瓶培養試驗各種牛磺酸給藥時程

【0123】 實例 3A：於菌種擴增期期間添加牛磺酸：

【0124】 以高通量震盪燒瓶模型評估在擴增菌種期期間將牛磺酸加到培養中的利益。在燒瓶 6a 中(表 6)，將製造 Ab1 的 CHO 細胞溶於化學成份確定的(無水解產物及無血清)補充 1 mM 牛磺酸

之基礎培養基。在整個擴增期中，基礎培養基的牛磺酸濃度係維持在 1 mM。在生產期間，培養基礎培養基係在第 0 天補充 1 mM 牛磺酸。在 17 天的生產期間，如需要則供應葡萄糖和營養素基本養料。

【0125】 在整個菌種擴增期期間，燒瓶 6b 細胞係生長於無牛磺酸的(無補充)化學成份確定(無水解產物及無血清)基礎培養基中。在生產的第 0 天，培養基礎培養基補充 1 mM 牛磺酸。就 17 天的生產，如需要則供應葡萄糖和營養素基本養料。

表 6：在不同處理期期間補充 1 mM 牛磺酸之培養的平均 17-天抗體效價

震盪燒瓶	添加 1 mM 牛磺酸	Ab1 效價
6a	菌種和生產階段	7.7 g/L
6b	僅生產階段	7.8 g/L

最終效價(第 17 天)之差異並非統計上顯著的($p > 0.1$)。

【0126】 就二種條件(僅在生產時或菌種及生產聯合補充牛磺酸)最終(第 17 天)效價值為類似的。所產生的效價並非統計上顯著的($p > 0.1$)。於菌種擴增期中添加牛磺酸的利益與生產階段中補充牛磺酸為相類似的。

【0127】 **實例 3B：生產階段期間各種牛磺酸饋料時程：**為了測定不同標準饋料時程對於補充牛磺酸的培養基之蛋白效價是否有任何影響，則以類似的振盪燒瓶培養生長製造 Ab1 的 CHO 細胞，進行另外的實驗。類似實例 2 將細胞進行不同的培養條件，其中饋料時程係與之前相同，如需要則加入葡萄糖/營養素基本養料。

【0128】 Ab1-生產培養係補充總計 5 mM 牛磺酸。在不同的牛磺酸饋料時程觀察到類似的生產力(7.1 g/L、6.8 g/L 和 7.0 g/L)。本實驗中比較的效價值並非統計上有差異的($p > 0.1$) (參見表 7)。

表 7: 以不同時程補充 5mM 牛磺酸之培養的平均 14-天抗體效價(g/L)

牛磺酸時程	Ab1 第 14 天效價
5 mM 第 0 天	7.1 g/L
1 mM 第 0、3、5、7、10 天 (總計 5 mM)	6.8 g/L
1 mM 第 0 天； 2 mM 第 7、10 天 (總計 5 mM)	7.0 g/L

第 14 天間效價值之差異並非統計上顯著的($p > 0.1$)。

【0129】 牛磺酸的饋料時程並不具有任何的負面效應，亦不會改變其中補充牛磺酸對產物產率為有利的結果。因此，補充牛磺酸可在第 0 添加一次，或在後續的生產階段天數中添加，或可在生產階段期間以多個時間間隔添加。

實例 4：測量高通量震盪燒瓶培養中的氨副產物

【0130】 在以類似實例 2 之方法進行 14-天的培養後，就補充牛磺酸的製造 Ab1-CHO 細胞之培養，測量氨副產物。讓細胞經歷類似上述的各種培養條件，其中如需要則添加葡萄糖/營養素基本養料。

表 8：平均 17-天的氨(mM)和下降量(%)

培養基補充物	Ab1 氨	
無補充*	2.56 mM	
牛磺酸	1.73 mM^	-32%

*作為氨下降量%之對照：補充牛磺酸的條件與無補充培養中的氨相比較。

^氨濃度的下降量為統計上顯著的($p < 0.1$)。

【0131】 在製造 Ab1 的細胞中，培養基中補充的牛磺酸係支持一健康的永續培養，其中氨副產物已下降 32%。補充牛磺酸之氨濃度的下降量為統計上顯著的($p < 0.1$)。

【0132】 本發明可以其他特定實施例具體化。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

無

申請專利範圍

1. 一種培養表現阿柏西普(aflibercept)的真核細胞之方法，其包括：
 - (a) 提供補充有 0.1 mM 至 10 mM L-牛磺酸的基礎細胞培養基；
 - (b) 在該基礎細胞培養基中增殖或維養該真核細胞以形成細胞培養物；及
 - (c) 從該細胞培養物中產生阿柏西普；

其中相較來自於增殖或維養於在含有低於 0.1 mM L-牛磺酸之細胞培養基中的細胞之阿柏西普的效價，以 L-牛磺酸補充該基礎細胞培養基係增加阿柏西普的效價至少 3%。

2. 如請求項 1 之方法，其中該基礎細胞培養基係化學成分確定的。
3. 如請求項 2 之方法，其中該基礎細胞培養基係不含血清及水解產物。
4. 如請求項 1 之方法，其中在(b)中該基礎細胞培養基係補充有鳥胺酸、腐胺，或其組合。
5. 如請求項 1 之方法，在步驟(b)之前進一步包含生長階段，其中該生長階段包含在沒有補充有 L-牛磺酸的基礎細胞培養基中增殖或維養該真核細胞。
6. 如請求項 1 之方法，在步驟(b)之前進一步包含生長階段，其中該生長階段包含在補充有 0.1 mM 至約 10 mM L-牛磺酸的基礎細胞培養基中增殖或維養該真核細胞。
7. 如請求項 1 之方法，其中(b)之該牛磺酸係在步驟(b)期間提供至少一次、至少兩次、至少三次、至少四次，或至少五次。

8. 如請求項 1 之方法，其中(b)之該牛磺酸係每天提供。
9. 如請求項 1 之方法，其中該基礎細胞培養基係包含由下列組成之群中選出的胺基酸混合物：精胺酸、組胺酸、離胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸。
10. 如請求項 1 之方法，其中該基礎細胞培養基係包含一或多種脂肪酸。
11. 如請求項 10 之方法，其中該一或多種脂肪酸係選自由下列組成之群組：亞麻油酸、次亞麻油酸、硫辛酸、油酸、棕櫚酸、硬脂酸、花生酸、花生四烯酸、月桂酸、山嵎酸、癸酸、十二酸、己酸、掬焦油酸、肉豆蔻酸和辛酸。
12. 如請求項 1 之方法，其中該基礎細胞培養基包含選自由下列組成之群的維生素和輔因子：生物素、D-泛酸鈣、氯化膽鹼、葉酸、I-肌醇、菸鹼醯胺、吡哆醇 HCl、核黃素、硫胺素 HCl 和維生素 B12。
13. 如請求項 1 之方法，其中該基礎細胞培養基包含核苷混合物。
14. 如請求項 13 之方法，其中該核苷混合物包含一或多種腺苷、鳥苷、胞苷、尿苷、胸苷和次黃嘌呤。
15. 如請求項 1 之方法，其中該基礎細胞培養基包含一或多種二價陽離子。
16. 如請求項 15 之方法，其中該二價陽離子包含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，或兩者。
17. 如請求項 1 之方法，其中該真核細胞係由下列組成之群中選出：哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆蟲細胞和酵母菌細胞。

18. 如請求項 17 之方法，其中該哺乳動物細胞係由下列組成之群中選出：CHO 細胞、COS 細胞、視網膜細胞、綠猴腎細胞（Vero cell）、CV-1 細胞、腎細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞、WI38 細胞、MRC 5 細胞、Colo25 細胞、HB 8065 細胞、HL-60 細胞、淋巴細胞、A431 細胞、U937 細胞、3T3 細胞、L 細胞、C127 細胞、SP2/0 細胞、NS-0 細胞、MMT 細胞、幹細胞、腫瘤細胞，及其衍生細胞。
19. 如請求項 17 之方法，其中該哺乳動物細胞係 CHO 細胞、HEK293 細胞，或 BHK 細胞。
20. 一種生產阿柏西普(aflibercept)的方法，其包括下列步驟：
- (a) 於一細胞中導入一包括編碼阿柏西普的核苷酸序列之核酸；
 - (b) 分離表現該阿柏西普之細胞；
 - (c) 於一細胞培養基中培養該經分離的細胞，該細胞培養基包含 0.1 mM 至 10 mM 的 L-牛磺酸，藉此生產細胞群體；
 - (d) 從該細胞群體表現阿柏西普，其中該阿柏西普係分泌至培養基中；
 - (e) 收取阿柏西普；
- 其中相較來自於培養於在含有低於 0.1 mM L-牛磺酸之細胞培養基中的細胞之阿柏西普的效價，添加 0.1 mM 至 10 mM 的 L-牛磺酸至該細胞培養基係增加阿柏西普的效價至少 3%。
21. 如請求項 20 之方法，其中相較於培養於在含有低於 0.1 mM L-牛磺酸之細胞培養基中的細胞，該阿柏西普的效價係提高至少 8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或 20%。
22. 如請求項 20 之方法，其中相較於培養於在含有低於 0.1 mM L-牛磺酸之細胞培養基中的細胞，該細胞群體係能夠增加至少 8%之阿柏西普的蛋白產率。

23. 如請求項 20 之方法，其中相較於將該細胞群體培養於含有低於 0.1 mM 牛磺酸之類似細胞培養基，藉由將該細胞群組培養於帶有 L-牛磺酸的細胞培養基中能增加阿柏西普產率至少 0.1 g/L，至少 0.5 g/L，至少 1 g/L，至少 1.2 g/L，至少 1.4 g/L，至少 1.6 g/L，至少 1.8 g/L，至少 2 g/L，至少 2.2 g/L，至少 2.4 g/L，或至少 2.5 g/L。
24. 如請求項 20 之方法，其中該細胞係 CHO 細胞、HEK293 細胞，或 BHK 細胞。
25. 如請求項 20 之方法，包含在(c)中將該細胞群體培養於包含 0.1 mM 至 10 mM 的 L-牛磺酸的細胞培養基中至少 6 天。
26. 如請求項 20 之方法，其中編碼阿柏西普之該核酸係穩定地整合於細胞中。
27. 如請求項 20 之方法，其中相較於含有低於 0.1 mM 牛磺酸之類似細胞培養基，包含 L-牛磺酸之該細胞培養基能降低氨堆積至少 3%或至少 8%。
28. 如請求項 20 之方法，包含於細胞培養基中加入一或多種使用點添加物之步驟。

圖式

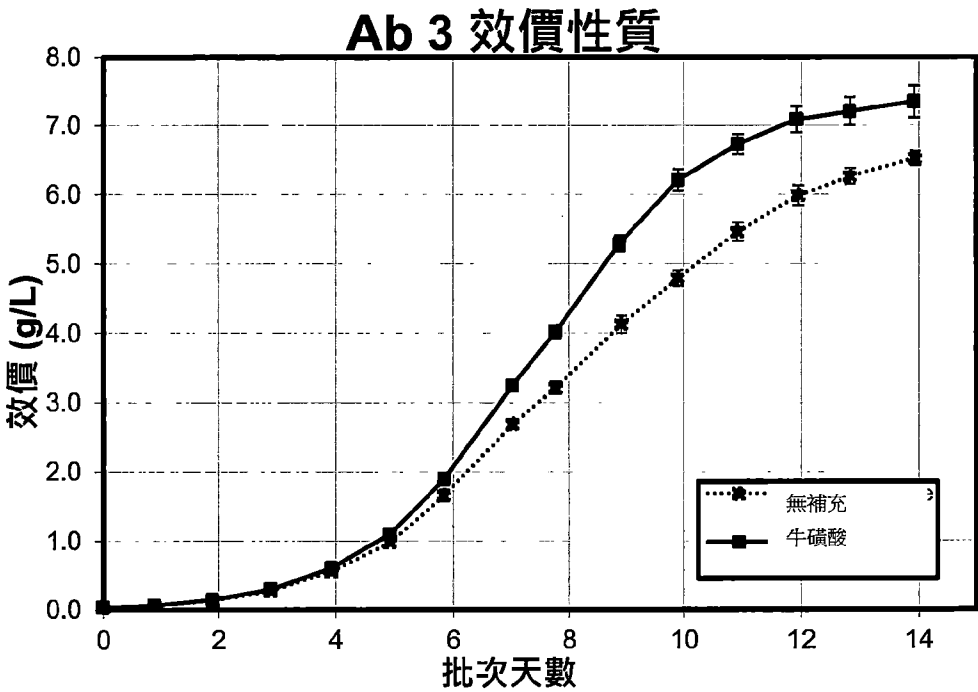


圖 1