



(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 I548747 B

(45) 公告日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 11 日

- (21) 申請案號：102127154 (22) 申請日：中華民國 96 (2007) 年 09 月 13 日
- (51) Int. Cl. : C12N5/071 (2010.01) C07K14/525 (2006.01)
C07K14/54 (2006.01)
- (30) 優先權：2006/09/13 美國 60/845,158
2006/12/21 美國 60/876,374
- (71) 申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)
美國
- (72) 發明人：布拉 伊茲考特 A PLA, ITZCOATL A. (MX)；馬杜克 約瑟夫 C MATUCK, JOSEPH C. (US)；范 約翰 C FANN, JOHN C. (CA)；史丘茲 克里斯多夫 SCHULZ, CHRISTOF (DE)；洛依 尼可 A ROY, NICHOLE A. (US)；布魯頓 大衛 F BRUTON, DAVID F. (US)；麥因泰爾 詹姆士 MCINTIRE, JAMES (US)；張育祥 CHANG, YU-HSIANG DAVID (US)；希沃斯特 湯瑪士 SEEWOESTER, THOMAS (DE)
- (74) 代理人：陳長文
- (56) 參考文獻：
CN 1557948A US 2004171152A1
WO 2004058944A2
- 審查人員：林奕萍
- 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：1 共 124 頁

(54) 名稱

細胞培養改良

CELL CULTURE IMPROVEMENTS

(57) 摘要

本發明描述用於在哺乳動物細胞培養物中產生重組蛋白(例如抗體)之改良方法及組合物。此外，本發明亦提供改良之細胞培養基，包括改良之產生培養基、饋料溶液及組合饋料，其可用於改良哺乳動物細胞培養物之蛋白產生率。

The invention describes improved methods and compositions for producing a recombinant protein, e.g., an antibody, in mammalian cell culture. In addition, the invention provides improved cell culture media, including improved production media, feed solutions, and combination feeds, which may be used to improve protein productivity in mammalian cell culture.

指定代表圖：

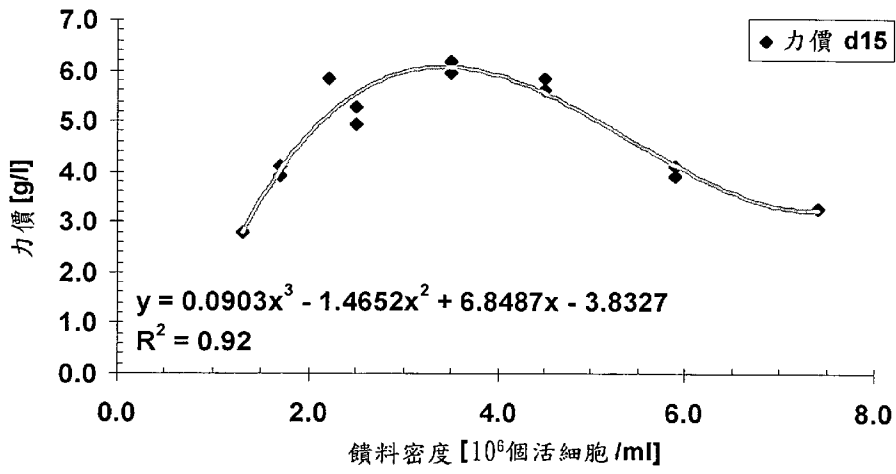


圖 1

發明摘要

※ 申請案號：102127154 (由 96134338 分割)

※ 申請日：96.9.13

※ IPC 分類：C12N 5/071 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

【發明名稱】

細胞培養改良

CELL CULTURE IMPROVEMENTS

【中文】

本發明描述用於在哺乳動物細胞培養物中產生重組蛋白(例如抗體)之改良方法及組合物。此外，本發明亦提供改良之細胞培養基，包括改良之產生培養基、饋料溶液及組合饋料，其可用於改良哺乳動物細胞培養物之蛋白產生率。

【英文】

The invention describes improved methods and compositions for producing a recombinant protein, *e.g.*, an antibody, in mammalian cell culture. In addition, the invention provides improved cell culture media, including improved production media, feed solutions, and combination feeds, which may be used to improve protein productivity in mammalian cell culture.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無元件符號說明)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

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】

細胞培養改良

CELL CULTURE IMPROVEMENTS

【技術領域】

本發明係關於細胞培養改良。

【先前技術】

● 重組DNA技術已提供以用於包括治療、診斷、農業及研究目的之應用範圍之量產生蛋白之方式。

重組蛋白產生之一目標係使細胞培養基及條件最佳化以獲得最大量之蛋白及最有效之產生率方式。任何改良(包括增量改良)均可具有許多經濟效益。在醫藥工業中，對於用於治療疾病之療法之生物物質而言，使蛋白產生最佳化為有利的，因為在生物物質係以大規模製造時任何改良均可具有顯著影響。據此，仍需要使來自表現用於醫藥之生物蛋白之細胞培養物的蛋白產生最大化。

● 通常，哺乳動物細胞培養基係以市售培養基調配物為主，包括(例如)DMEM或Ham氏F12。通常，培養基調配物並未充分強化(enriched)以支持細胞生長及生物蛋白表現之增加。仍需要改良細胞培養基、補充物及用於改良蛋白產生之細胞培養方法。

【發明內容】

本發明提供用於改良細胞培養物、尤其哺乳動物細胞培養物中之蛋白表現之方法及組合物。本發明係關於改良細胞培養基，包括使用於蛋白表現之細胞生長的培養基及用於蛋白表現之最佳化細胞培養產生培養基。

本發明亦包括用於哺乳動物細胞培養物中之高蛋白表現之最佳方法及培養基。詳言之，使細胞培養基最佳化以於哺乳動物細胞培養物(例如CHO細胞)中表現抗體。亦提供藉由添加補充溶液(例如含有溶液及濃縮基本培養基溶液之水解產物)促進蛋白產生之改良分批饋料方法及組合物。

本發明提供用於哺乳動物細胞培養物中之不含鹽的改良基本生長培養基。本發明包括包含A部分、B部分及C部分之不含血清細胞培養基，其中A部分基本上由排除下列組份之經修飾之基本培養基組成：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓(osmolarity)調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；B部分基本上由無機鐵來源組成；且C部分包含重組生長因子、緩衝液、滲透壓調節劑、能量來源及至少兩種不同的非動物水解產物。

在一實施例中，A部分進一步包含非鐵金屬離子、維生素或兩者之組合。在一實施例中，B部分之無機鐵來源為檸檬酸鐵，例如約122.5 mg/L或0.5 mM最終溶液濃度之檸檬酸鐵。

在一實施例中，C部分之重組生長因子係選自由下列各物組成之群：胰島素或重組類似物、IGF-1及胰島素與IGF-1之組合，例如約4 mg/L至13 mg/L胰島素或其重組類似物。

在一實施例中，自經修飾之基本培養基中排除之緩衝液為HEPES緩衝液。

在一實施例中，C部分之緩衝液包含磷酸鹽緩衝液、HEPES及碳酸氫鈉，例如約0.1至3 g/L碳酸氫鈉、約0.1至3 g/L HEPES。在一實施例中，C部分之緩衝液包含1.6 g/L碳酸氫鈉及/或約1.8 g/L HEPES。在一實施例中，磷酸鹽緩衝液包含約0.01至0.5 g/L磷酸二氫鈉及磷酸二鈉。

在另一實施例中，C部分進一步包含天冬醯胺酸、麩醯胺酸或麩

醯胺酸及天冬醯胺酸。

在一實施例中，C部分之滲透壓調節劑為NaCl，例如約1.0至6.5 g/L NaCl。

在一實施例中，C部分之能量來源為單醣，例如葡萄糖(諸如D葡萄糖)、麥芽糖、甘露糖、半乳糖及果糖。在一實施例中，本發明之細胞培養基包含至多約7.0 g/L之葡萄糖。

在另一實施例中，本發明之細胞培養基包含C部分之至少兩種不同的以非動物為主之水解產物，該等水解產物為以植物為主之水解產物及既非以動物為主亦非以植物為主之水解產物。可用於本發明之以植物為主之水解產物的實例為以大豆為主之水解產物。既非以動物為主亦非以植物為主之水解產物之實例為以酵母為主之水解產物。

在一實施例中，本發明之細胞培養基進一步包含甲胺喋呤。在一實施例中，細胞培養基進一步包含約100 nM至5000 nM之甲胺喋呤。

在另一實施例中，細胞培養基進一步包含細胞保護劑或界面活性劑。可用於本發明之細胞培養基之界面活性劑的實例為甲基纖維素或pluronic多元醇，例如Pluronic F-68。

在一實施例中，細胞培養基包含約1.0 g/L Pluronic F-68。

在本發明之另一實施例中，細胞培養基進一步包含L-麩醯胺酸。

在一實施例中，細胞培養基具有7.1至7.3之pH值範圍。

在另一實施例中，本發明之細胞培養基具有介於約320至450 mOsm/kg範圍內之滲透壓。

本發明包括不含血清之細胞培養基，該培養基包含下列各物：基本培養基；約8-12 ml/kg或116-126 mg/L檸檬酸鐵；約2-6 mg/kg重組人類胰島素；約2-5 g/kg無水葡萄糖；約0.1-0.5 g/kg L-麩醯胺酸；約1-3 g/kg碳酸氫鈉；約0.01-0.05 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4-0.5 g/kg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及約1.0-3.0 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養基包含：基本培養基；約10.0 ml/kg或122 mg/L檸檬酸鐵；約4.0 mg/kg重組人類胰島素；約3.5 g/kg無水葡萄糖；約0.29 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約0.03 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43-0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及約2.0 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養基基本上由下列各物組成：基本培養基；約10.0 ml/kg或122 mg/L檸檬酸鐵；約4.0 mg/kg重組人類胰島素；約3.5 g/kg無水葡萄糖；約0.29 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約0.03 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43-0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及約2.0 g/kg以酵母爲主之水解產物。

本發明進一步提供基本上由下列各物組成之不含血清之細胞培養基：基本培養基；約8-12 ml/kg或116-126 mg/L檸檬酸鐵；約2-6 mg/kg重組人類胰島素；約2-5 g/kg無水葡萄糖；約0.1-0.5 g/kg L-麩醯胺酸；約1-3 g/kg碳酸氫鈉；約0.01-0.05 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4-0.5 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及約1.0-3.0 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養物基本上由下列各物組成：基本培養基；約8-12 ml/kg或116-126 mg/L檸檬酸鐵；約2-6 mg/kg重組人類胰島素；約2-5 g/kg無水葡萄糖；約0.1-0.5 g/kg L-麩醯胺酸；約1-3 g/kg碳酸氫鈉；約0.01-0.05 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4-0.5 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；及約1.0-3.0 g/kg以酵母爲主之水解產物。

在一實施例中，細胞培養基進一步包含約2.50 mL/kg之甲胺喋呤。

本發明亦包括一種用於產生蛋白之方法，其包含於本發明之培養基中培養包含編碼蛋白之核酸的哺乳動物細胞；及將培養物轉移至細胞培養產生培養基中，以致產生蛋白。

在一實施例中，蛋白爲抗體，包括(例如)D2E7(阿達木單抗

(adalimumab))。

本發明進一步提供包含下列各物之不含血清之細胞培養產生培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或10至14 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.5至0.7 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.5至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4至0.5 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約8至12 g/kg以酵母為主之水解產物；及約60至70 g/kg以植物為主之水解產物。在一實施例中，細胞培養產生培養基基本上由下列各物組成：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或10至14 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.5至0.7 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.5至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4至0.5 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約8至12 g/kg以酵母為主之水解產物；及約60至70 g/kg以植物為主之水解產物。在另一實施例中，細胞培養產生培養基包含：基本培養基；約10.0 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.0 mL/kg或12 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.4至2.5 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約10.7 g/kg以酵母為主之水解產物；及約6.9至7.0 g/kg以植物為主之水解產物。

在一實施例中，細胞培養基具有約7.10至7.20之pH值。

在一實施例中，細胞培養基具有約373至403 mOsm/kg之滲透壓。

本發明亦提供包含下列各物之不含血清之細胞培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約3至5 mL/kg或6至8 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至2 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4至0.5 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約0.4至0.5 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約2至6 g/kg以酵母為主之水解產物；及約2至4 g/kg以植物為主之水解產物。

在一實施例中，細胞培養基基本上由下列各物組成：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約3至5 mL/kg或6至8 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至2 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.4至0.5 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約0.4至0.5 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約2至6 g/kg以酵母為主之水解產物；及約2至4 g/kg以植物為主之水解產物。

在一實施例中，細胞培養基包含：經修飾之基本培養基；約10.0 ml/kg或122.45 mg/kg檸檬酸鐵；約3.8至3.9 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.8至0.9 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.6至2.7 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約0.45 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約4.0 g/kg

以酵母爲主之水解產物；及約2.6 g/kg以植物爲主之水解產物。

在一實施例中，細胞培養基進一步包含(例如)約2.50 mL/kg之甲胺喋呤。

在一實施例中，細胞培養物中所表現之蛋白爲抗體或其抗原結合片段。在一實施例中，抗體爲抗TNF α 抗體或抗EPO-R抗體。在另一實施例中，抗TNF α 抗體爲完全人類抗TNF α 抗體，包括(例如)完全人類抗TNF α 抗體D2E7(阿達木單抗)。

本發明亦包括包含下列各物之不含血清之細胞培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至10 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約3至5 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.8至0.9 g/kg L-麩醯胺酸；約0.3至0.5 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.5至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg NaH₂PO₄·H₂O；約0.1至1.0 g/kg Na₂HPO₄·7H₂O；約2至6 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約2至4 g/kg以植物爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養基基本上由下列各物組成：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至10 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約3至5 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.8至0.9 g/kg L-麩醯胺酸；約0.3至0.5 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.5至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg NaH₂PO₄·H₂O；約0.1至1.0 g/kg Na₂HPO₄·7H₂O；約2至6 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約2至4 g/kg以植物爲主之水解產物。在另一實施例中，細胞培養基包含：經修飾之基本培養基；約10 ml/kg或122

mg/L檸檬酸鐵；約3.8至3.9 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.87至0.88 g/kg L-麩醯胺酸；約0.45 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.67至2.68 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約4.0 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約2.6 g/kg以植物爲主之水解產物。

本發明包括包含下列各物之不含血清之細胞培養基：基本細胞生長培養基；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約2至6 mg/kg重組人類胰島素；約150至250 g/kg無水葡萄糖；約0.1至0.5 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；及約5至15 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養基基本上由下列各物組成：基本細胞生長培養基；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約2至6 mg/kg重組人類胰島素；約150至250 g/kg無水葡萄糖；約0.1至0.5 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；及約5至15 g/kg以酵母爲主之水解產物。在另一實施例中，細胞培養基包含：基本細胞生長培養基；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約4 mg/kg重組人類胰島素；約200 g/kg無水葡萄糖；約0.29至0.30 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；及約11 g/kg以酵母爲主之水解產物。在另一實施例中，蛋白爲抗體，包括(例如)完全人類抗IL-12抗體，例如ABT-874。

本發明亦包括包含下列各物之不含血清之細胞培養基：基本細胞生長培養基；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約2至6 mg/kg重組人類胰島素；約1至3 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；及約1至4 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養基基本上由下列各物組成：基本細胞生長培養基；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約2至6 mg/kg重組人類胰島素；約1至3 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺

酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；及約1至4 g/kg以酵母爲主之水解產物。在另一實施例中，細胞培養基包含：基本細胞生長培養基；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約4 mg/kg重組人類胰島素；約1.5 g/kg無水葡萄糖；約0.29至0.30 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；及約2 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，細胞培養基之pH值爲約7.10至7.30且滲透壓在約300至340 mOSm/kg之範圍內。在另一實施例中，細胞培養基包含至少8 g/kg以酵母爲主之水解產物。在一實施例中，使用細胞培養基於哺乳動物細胞(例如CHO細胞)中產生之蛋白爲抗體，包括(例如)抗IL-12抗體或抗EPO-R抗體，例如ABT-874。

本發明進一步提供包含下列各物之細胞培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約2.5至4.5 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.5至1 g/kg L-麩醯胺酸；約0.1至1 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約1至4 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約2至6 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約2至6 g/kg以植物爲主之水解產物。在一實施例中，本發明之細胞培養基基本上由下列各物組成：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約2.5至4.5 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.5至1 g/kg L-麩醯胺酸；約0.1至1 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約1至4 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至

0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 約2至6 g/kg以酵母爲主之水解產物 ; 及約2至6 g/kg以植物爲主之水解產物。在另一實施例中，細胞培養基包含：經修飾之基本培養基；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約3.8至3.9 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.87至0.88 g/kg L-麩醯胺酸；約0.45 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.67 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約4.0 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約2.6 g/kg以植物爲主之水解產物。

本發明亦包括包含下列各物之細胞培養產生培養基：經修飾以移除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、HEPES緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或10至14 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約1至3 g/kg NaCl；約0.5至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約8至12 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約6至8 g/kg以植物爲主之水解產物。在一實施例中，本發明之細胞培養產生培養基基本上由下列各物組成：經修飾以移除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、HEPES緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或120至130 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或10至14 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約1至3 g/kg NaCl；約0.5至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約8至12 g/kg以酵母爲

主之水解產物；及約6至8 g/kg以植物為主之水解產物。在另一實施例中，細胞培養產生培養基包含經修飾之基本培養基；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.0 mL/kg或12 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.45 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約10.7 g/kg以酵母為主之水解產物；及約6.9至7.0 g/kg以植物為主之水解產物。

在一實施例中，細胞培養基具有約7.10至7.20之pH值及/或約373至403 mOsm/kg之滲透壓。

本發明之另一態樣為包含下列各物之細胞培養產生培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或110至130 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或11至15 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約1至3 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約12至16 g/kg以酵母為主之水解產物；及約8至10 g/kg以植物為主之水解產物。在一實施例中，細胞培養產生培養基基本上由下列各物組成：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或110至130 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或11至15 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約1至3 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約12至16

g/kg以酵母爲主之水解產物；及約8至10 g/kg以植物爲主之水解產物。在另一實施例中，本發明之細胞培養產生培養基包含：經修飾之基本培養基；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.5 mL/kg或13 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.45 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約14.2至14.3 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約9.2至9.3 g/kg以植物爲主之水解產物。

本發明之細胞培養基可進一步包含甲胺喋呤。

本發明亦包括一種用於產生蛋白(例如抗體或其抗原結合部分)之方法，其包含於本文中所呈現之細胞培養基中培養包含編碼蛋白(例如抗體)之核酸之哺乳動物細胞。在一實施例中，細胞培養基爲細胞培養產生培養基。可使用本發明方法及組合物產生之抗體或其抗原結合片段之實例包括抗IL-18抗體、抗TNF α 抗體、抗IL-12抗體及抗EPO受體(EPO-R)抗體。

在一實施例中，本發明進一步包含自本文所述之細胞培養產生培養基中分離蛋白。

在一實施例中，本發明之細胞培養基及方法係用於培養哺乳動物細胞，包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

本發明亦包括本文所述之任何細胞培養基中之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

本發明亦提供用於在哺乳動物細胞培養物(例如CHO細胞)中產生蛋白之改良分批饋料方法及相關細胞培養基。本發明之一態樣爲產生蛋白之分批饋料方法，其包含在包含細胞培養產生培養基之細胞培養物中培養包含編碼蛋白之核酸的哺乳動物細胞；及藉由在一時段內向細胞培養物中添加水解產物強化(enrichment)溶液及基本強化溶液而

向哺乳動物細胞饋料，其中水解產物強化溶液包含至少兩種不同的以非動物為主之水解產物；以致產生蛋白。

在一實施例中，基本強化溶液包含經濃縮基本培養基。在另一實施例中，基本強化溶液包含基本培養基、天冬醯胺酸及葡萄糖。在另一實施例中，基本培養基為PF CHO。

在一實施例中，水解產物強化溶液包含並非源自植物或動物之第一水解產物及以植物為主之第二水解產物。在另一實施例中，並非源自植物或動物且並非為以植物為主之水解產物之水解產物為以酵母為主之水解產物。在另一實施例中，以植物為主之水解產物為以大豆為主之水解產物。

在一實施例中，所產生之蛋白為抗體或其抗原結合蛋白。可用於本發明之分批饋料方法之抗體或其抗原結合部分的實例包括抗TNF α 抗體、抗IL-12抗體、抗IL-18抗體及抗EPO受體(EPO-R)抗體。

本發明包括產生抗TNF α 抗體(例如，包括完全人類抗TNF α 抗體，諸如阿達木單抗)之分批饋料方法，其包含在包含細胞培養產生培養基之細胞培養物中培養包含編碼抗TNF α 抗體之核酸的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞；及藉由在一時段內向細胞培養物中添加水解產物強化溶液及基本強化溶液而向CHO細胞饋料，其中基本強化溶液包含基本培養基、天冬醯胺酸及葡萄糖，且其中水解產物強化溶液包含至少兩種不同的以非動物為主之水解產物；以致產生抗TNF α 抗體。

本發明亦係關於一種產生抗TNF α 抗體之分批饋料方法，其包含在包含細胞培養產生培養基之細胞培養物中培養包含編碼抗TNF α 抗體之核酸的CHO細胞，該細胞培養產生培養基包含至少2.0 g/L葡萄糖，其中葡萄糖濃度係如所需藉由向細胞培養產生培養基中添加葡萄糖以維持至少2.0 g/L之葡萄糖濃度來控制的；及藉由在一時段內向細胞培養物中添加水解產物強化溶液及基本強化溶液而向CHO細胞饋

料，其中基本強化溶液包含基本培養基、天冬醯胺酸及葡萄糖，且其中水解產物強化溶液包含至少兩種不同的以非動物為主之水解產物；以致產生抗TNF α 抗體。

在一實施例中，本發明包括進一步回收抗TNF α 抗體。

在另一實施例中，在介於約32至38°C範圍內(例如35°C)之溫度下培養細胞培養物。

在一實施例中，使細胞培養產生培養基維持20與65%之間之溶氧，例如約30%溶氧。

在一實施例中，在整個培養過程中使細胞培養產生培養基之滲透壓維持不超過500 mOsm。

在另一實施例中。

在一實施例中，水解產物強化溶液包含並非源自植物或動物之第一水解產物及以植物為主之第二水解產物。在另一實施例中，並非源自植物或動物且並非為以植物為主之水解產物之水解產物為以酵母為主之水解產物。在另一實施例中，以植物為主之水解產物為以大豆為主之水解產物。在一實施例中，水解產物強化溶液基本上由下列各物組成：約250至280 g/kg以大豆為主之水解產物及約150至180 g/kg以酵母為主之水解產物。在一實施例中，水解產物強化溶液包含約250至280 g/kg以大豆為主之水解產物及約150至180 g/kg以酵母為主之水解產物。

在一實施例中，基本培養基為PF CHO。

在一實施例中，基本強化溶液具有約9.0至10.5之pH值。

在另一實施例中，分批饋料方法之時段在約9至15天之間或為約12天。

在另一實施例中，於該時段中以下各日中之至少一日將基本強化溶液添加至細胞培養產生培養基中：第4日、第6日、第9日及第11

日。在一實施例中，於該時段中第4日、第7日或第4日及第7日將水解產物強化溶液添加至細胞培養產生培養基中。

在另一實施例中，分批饋料方法進一步包含根據pH值線性斜坡(ramp)調節細胞培養產生培養基之pH值，其中該pH值線性斜坡包含自約7.1至7.2之pH值起始且產生約6.9之最終pH值。在一實施例中，經至少約24小時之時段調節pH值線性斜坡。在另一實施例中，經至少約48小時之時段調節pH值線性斜坡。在另一實施例中，經約72小時之時段調節pH值線性斜坡。

本發明亦包括於分批饋料方法中使用本文所述之細胞培養基，例如包含下列各物之細胞培養產生培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至10 ml/kg或110至130 mg/L檸檬酸鐵；約4至8 mL/kg或10至14 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至3 g/kg碳酸氫鈉；約1至3 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至0.1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約8至12 g/kg以酵母為主之水解產物；及約6至8 g/kg以植物為主之水解產物。在一實施例中，細胞培養產生培養基包含經修飾之基本培養基；約10.0 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.0 mL/kg或12 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.45 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約10.7 g/kg以酵母為主之水解產物；及約6.9至7.0 g/kg以植物為主之水解產物。

本發明亦提供一種產生抗IL12抗體(諸如完全人類抗IL12抗體(例如ABT-874))之分批饋料方法，其包含在包含細胞培養產生培養基之

細胞培養物中培養包含編碼抗體之核酸的CHO細胞；藉由在一時段內向細胞培養物中添加水解產物強化溶液及基本強化溶液而向CHO細胞饋料，其中基本強化溶液包含基本培養基、天冬醯胺酸及葡萄糖，且其中水解產物強化溶液包含至少兩種不同的以非動物為主之水解產物；以致產生抗IL12抗體。

在一實施例中，水解產物強化溶液進一步包含葡萄糖。

在一實施例中，本發明亦包括回收抗IL12抗體。

在一實施例中，在介於約32至38°C範圍內(例如約33°C)之溫度下培養細胞培養物。

在本發明之一實施例中，使細胞培養產生培養基維持20-65%之間之溶氧，例如約40%溶氧。

在另一實施例中，細胞培養產生培養基具有約6.7至7.2之pH值。

在本發明之另一實施例中，水解產物強化溶液包含並非源自植物或動物之水解產物及以植物為主之水解產物。在一實施例中，並非源自植物或動物之水解產物為以酵母為主之水解產物。在另一實施例中，以植物為主之水解產物為以大豆為主之水解產物。在另一實施例中，水解產物強化溶液基本上由下列各物組成：約150至180 g/kg以大豆為主之水解產物、約250至280 g/kg以酵母為主之水解產物及約2至3 g/L之葡萄糖。在另一實施例中，水解產物強化溶液包含約150至180 g/kg以大豆為主之水解產物、約250至280 g/kg以酵母為主之水解產物及約2至3 g/L之葡萄糖。

在一實施例中，基本強化溶液包含基本培養基、天冬醯胺酸及葡萄糖。

在另一實施例中，基本強化溶液具有約9.7之pH值及約1400至1500 mOsm之滲透壓。在另一實施例中，基本強化溶液中之基本培養基為PF CHO。

在一實施例中，分批饋料方法之時段在14-15天之間。

在一實施例中，自該時段中第5日起始，每隔一天將基本強化溶液添加至細胞培養產生培養基中。

在本發明之一實施例中，自該時段中第6日起始，每天將基本強化溶液添加至細胞培養產生培養基中。在另一實施例中，自該時段中第5日起始，每天將基本強化溶液及水解產物強化溶液添加至細胞培養產生培養基中。

本發明亦包括於分批饋料方法中使用本文所述之細胞培養基，例如包含下列各物之細胞培養產生培養基：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約8至12 ml/kg或110至130 mg/L檸檬酸鐵；約5至8 mL/kg或11至15 mg/kg重組人類胰島素；約5至9 g/kg無水葡萄糖；約0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；約1至2 g/kg碳酸氫鈉；約1至2 g/kg HEPES；約2至3 g/kg NaCl；約0.1至2 g/kg Pluronic F-68；約0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.1至1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約6至12 g/kg以酵母為主之水解產物；及約6至8 g/kg以植物為主之水解產物。在一實施例中，細胞培養產生培養基包含：約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.5 mL/kg或13 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.45 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約10.7 g/kg以酵母為主之水解產物；及約6.9至7.0 g/kg以植物為主之水解產物。

在一實施例中，本發明係關於大規模培養細胞之方法。在一實施例中，大規模細胞培養大於約10 L。在另一實施例中，大規模細胞培養為約13 L。

本發明亦提供組合饋料溶液，此等溶液因為在一種溶液中提供養分組合而為有利的。本發明包括包含下列各物之組合饋料溶液：葡萄糖；基本培養基；除麩醯胺酸以外之胺基酸；及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物。本發明亦包括基本上由下列各物組成之組合饋料溶液：葡萄糖；基本培養基；除麩醯胺酸以外之胺基酸；及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物。

在一實施例中，饋料溶液具有約6.0至8.0之pH值。

在一實施例中，組合饋料溶液包含約100至250 g/kg葡萄糖。在一實施例中，組合饋料溶液包含胺基酸天冬醯胺酸，例如約1.0至15.0 g天冬醯胺酸或約3.0至5.0 g/kg天冬醯胺酸。

在一實施例中，組合饋料溶液中至少兩種不同的以非動物為主之水解產物為以植物為主之水解產物及既非以動物為主亦非以植物為主之水解產物。在一實施例中，並非以動物為主或以植物為主之水解產物為以酵母為主之水解產物。在一實施例中，以植物為主之水解產物為以大豆為主之水解產物。

在一實施例中，組合饋料溶液包含為PF-CHO或DMEM/F12培養基之基本培養基。在一實施例中，基本細胞培養基為經修飾之基本培養基且排除以下組份：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑、麩醯胺酸及葡萄糖。

在另一實施例中，組合饋料溶液進一步具有小於約15 NTU之濁度。

本發明係關於一種用於維持細胞培養產生培養基之穩定葡萄糖含量之方法，其包含添加本文所述之組合饋料溶液。

本發明之另一態樣為一種用於製造包含下列各物之組合饋料溶液的方法：基本培養基、葡萄糖及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物，其包含將葡萄糖與基本細胞培養基組合至溶液中；將a)之溶

液之pH值調節至約9.5至10.5；將至少兩種不同的以非動物為主之水解產物添加至b)之溶液中；及調節c)之溶液之pH值，以致組合饋料溶液具有約6.5至7.5之pH值。在一實施例中，步驟c)包含添加並非以動物為主或以植物為主之第一水解產物及以植物為主之第二水解產物。在一實施例中，並非以動物為主或以植物為主之水解產物為以酵母為主之水解產物。在另一實施例中，以植物為主之水解產物為以大豆為主之水解產物。

本發明進一步提供由哺乳動物細胞培養物產生增加之蛋白(例如抗體或其抗原結合部分)之方法。本發明提供由哺乳動物細胞培養物產生至少約1.5 g/L抗體之方法，其包含在細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞；及向細胞培養產生培養基中添加具有約6.7至7.2之pH值之組合饋料溶液，其中該組合饋料溶液包含葡萄糖、基本細胞培養基、除麩醯胺酸以外之胺基酸及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物，以致產生至少約1.5 g/L抗體。在一實施例中，產生至少2 g/L之抗體。在另一實施例中，產生至少4 g/L之抗體。在另一實施例中，產生至少5 g/L之抗體。在另一實施例中，本發明提供一種用於產生約6 g/L抗體之方法。

在一實施例中，組合饋料溶液包含約100至250 g/kg葡萄糖。

本發明亦提供一種用於增加由哺乳動物細胞培養物產生之抗體力價之方法，其包含在細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞；及向細胞培養產生培養基中添加具有約6.7至7.2之pH值之組合饋料溶液，其中該組合饋料溶液包含葡萄糖、基本細胞培養基、除麩醯胺酸以外之胺基酸及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物；以致所產生之抗體力價比根據步驟a)且排除步驟b)所培養之對照哺乳動物細胞培養物高至少50%。在一實施例中，所產生之抗體力價比對照物高至少100%。在另一實施例中，所產生之抗體力

價比對照物高至少150%。

在一實施例中，當細胞密度達到每毫升至少 2.0×10^6 個細胞時添加組合饋料溶液。在一實施例中，當細胞密度達到每毫升約 3.5×10^6 個細胞時添加組合饋料溶液。

本發明進一步提供一種用於在哺乳動物細胞培養物中產生蛋白(例如抗體或其抗原結合部分)之方法，其包含在細胞培養產生培養基中培養包含編碼蛋白之核酸的哺乳動物細胞；及使用反饋控制系統來監控細胞培養產生培養基中之代謝指示劑含量，藉此將組合饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中，其中於該反饋控制系統所測定之時間點將組合饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中，以致產生抗體。在一實施例中，代謝指示劑為葡萄糖或麩醯胺酸。在另一實施例中，饋料溶液為包含下列各物之組合饋料溶液：葡萄糖；基本細胞培養基；除麩醯胺酸以外之胺基酸；及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物。在一實施例中，抗體為抗TNF α 抗體、抗IL-12抗體、抗IL-18抗體及抗EPO受體(EPO-R)抗體。

在一實施例中，使用本發明方法產生至少1.5 g/L力價之抗體。在另一實施例中，產生至少2 g/L之力價。

在本發明之一實施例中，組合饋料溶液包含約3.0至12.5 g/kg天冬醯胺酸。

在本發明之一實施例中，組合饋料溶液包含約100至200 g/kg葡萄糖。

在另一實施例中，本發明進一步包含監控細胞培養基中之葡萄糖含量，使得葡萄糖含量維持於約0.25與20.0 g/L之間。在一實施例中，使用自動取樣裝置監控葡萄糖含量。

在一實施例中，所產生之抗體係選自由下列各物組成之群：抗TNF α 抗體、抗IL-18抗體及抗IL-12抗體。在一實施例中，抗TNF α 抗

體為D2E7(阿達木單抗)。在一實施例中，抗IL-18抗體為ABT-325。在一實施例中，抗IL-12抗體為ABT-874。

本發明亦提供一種確定用於在哺乳動物細胞培養物中產生蛋白之饋入概況之方法，其包含在細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞；及使用反饋控制系統來監控細胞培養產生培養基中之代謝指示劑，藉此將組合饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中，其中將組合饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中以符合目標代謝指示劑設定點；及測定每天添加至細胞培養產生培養基中之組合饋料溶液的量，以致確定饋入概況。在一實施例中，代謝指示劑為葡萄糖或麩醯胺酸。

本發明亦包括一種用於在哺乳動物細胞培養物中產生蛋白之分批饋料方法，其包含根據使用本發明方法確定之饋入概況將組合饋料溶液添加至哺乳動物細胞培養物中。

本發明之另一態樣為包括丁酸鈉及/或N-乙醯基半胱胺酸之改良細胞培養基。本發明係關於一種用於在哺乳動物細胞培養物中產生抗體，使得抗體力價為至少300 mg/L之方法，該方法包含於細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞；向細胞培養基中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合，其中添加丁酸鈉至約0.1 mM至10 mM之最終濃度且添加N-半胱胺酸至約1 mM至80 mM之最終濃度；以致產生至少300 mg/L力價之抗體。在一實施例中，抗體力價至少為約100 mg/L。在一實施例中，抗體力價至少為約200 mg/L。在一實施例中，抗體力價至少為約250 mg/L。在一實施例中，抗體力價至少為約300 mg/L。在一實施例中，抗體力價至少為約400 mg/L。

本發明亦提供一種用於在哺乳動物細胞培養物中產生抗體，使得抗體力價至少比對照哺乳動物細胞培養物高10%之方法，該方法包

含a)於細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞；及b)向細胞培養基中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合，其中添加丁酸鈉至約0.1 mM至10 mM之最終濃度且添加N-乙醯基半胱胺酸至約1 mM至80 mM之最終濃度，使得抗體力價至少比對照物高10%，其中對照哺乳動物細胞培養物包含步驟a)且排除步驟b)。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之抗體力價比對照哺乳動物細胞培養物改良至少29%。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之抗體力價比對照哺乳動物細胞培養物改良至少40%。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之抗體力價比對照哺乳動物細胞培養物改良至少70%。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之抗體力價比對照哺乳動物細胞培養物高至少90%。

在一實施例中，在哺乳動物細胞培養物之生長期中向哺乳動物細胞培養物中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合。

在一實施例中，在培養時間之第4天與第7天之間向哺乳動物細胞培養物中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合。

在一實施例中，在培養時間之第0天向哺乳動物細胞培養物中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合。

在另一實施例中，丁酸鈉之最終濃度為約0.1 mM至10 mM。在一實施例中，丁酸鈉之最終濃度為約0.1 mM至8.0 mM。在一實施例中，丁酸鈉之最終濃度為約0.1 mM至3.0 mM丁酸鈉。

在一實施例中，N-乙醯基半胱胺酸之最終濃度為約20 mM至60 mM。在一實施例中，N-乙醯基半胱胺酸之最終濃度為約10 mM。在一實施例中，N-乙醯基半胱胺酸之最終濃度為約8 mM。

本發明進一步提供一種與對照哺乳動物細胞培養物相比使哺乳動物細胞培養物之壽命延長至少35%之方法，該方法包含a)於細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞；及b)將約

1 mM至80 mM N-乙醯基半胱胺酸添加至細胞培養基中，使得哺乳動物細胞培養物之壽命與對照哺乳動物細胞培養物相比延長至少35%，其中對照哺乳動物細胞培養物包含步驟a)且排除步驟b)。

在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之壽命與對照哺乳動物細胞培養物相比延長至少約45%。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之壽命與對照哺乳動物細胞培養物相比延長至少約55%。

在一實施例中，本發明方法包含將最終濃度為約8 mM之N-乙醯基半胱胺酸添加至細胞培養產生培養基中。

在一實施例中，抗體或其抗原結合部分係選自由下列各物組成之群：抗TNF α 抗體、抗IL-18抗體(例如ABT-325)及抗IL-12抗體。

本發明提供包含A部分、B部分及C部分之不含血清之細胞培養基，其中A部分基本上由排除下列組份之經修飾之基本培養基組成：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；B部分基本上由無機鐵來源組成；且C部分包含重組生長因子、緩衝液、滲透壓調節劑、能量來源及至少兩種不同的非動物水解產物。在一實施例中，C部分基本上由下列各物組成：重組生長因子；緩衝液；滲透壓調節劑；能量來源；及至少兩種不同的非動物水解產物。

本發明亦提供包含下列各物之不含血清之細胞培養產生培養基：具有降低之維生素含量且排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.5 mL/kg或13 mg/kg重組人類胰島素；約7.0 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.45 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg NaH₂PO₄·H₂O；約0.43至0.44 g/kg Na₂HPO₄·7H₂O；約10.7 g/kg以酵母

爲主之水解產物；及約6.9至7.0 g/kg以植物爲主之水解產物。

本發明亦提供包含下列各物之不含血清之細胞培養基：具有降低之維生素含量且排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約150 g/kg無水葡萄糖；約5.0 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約65 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約41 g/kg以植物爲主之水解產物。

本發明進一步提供包含下列各物之不含血清之細胞培養基：具有降低之維生素含量且排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；約10 ml/kg或122.45 mg/L檸檬酸鐵；約6.5 mL/kg或13 mg/kg重組人類胰島素；約200 g/kg無水葡萄糖；約0.58至0.59 g/kg L-麩醯胺酸；約1.6 g/kg碳酸氫鈉；約1.8 g/kg HEPES；約2.45 g/kg NaCl；約1.0 g/kg Pluronic F-68；約0.03至0.04 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；約0.43至0.44 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；約10.7 g/kg以酵母爲主之水解產物；及約6.9至7.0 g/kg以植物爲主之水解產物。

本發明亦提供改良培養基之以下實施例。本發明包括用於培養CHO細胞以表現重組生物物質之改良培養基，其包含A、B及C部分，其中：A部分包含水、胺基酸、維生素及其他輔因子；B部分包含無機鐵來源；且C部分包含重組生長因子、緩衝液、滲透壓調節劑、能量來源、非鐵金屬離子、水解產物及額外試劑。

在一實施例中，C部分包含碳酸氫鈉、HEPES、磷酸二氫鈉及磷酸二鈉、氯化鈉、Pluronic F-68及葡萄糖。在另一實施例中，添加1.5 g/L碳酸氫鈉。在另一實施例中，添加1.8 g/L HEPES。在另一實施例中，添加0.1-0.5 g/L磷酸二氫鈉及磷酸二鈉。在另一實施例中，添加1 g/L至6.5 g/L氯化鈉。在另一實施例中，添加1.0 g/L Pluronic F-68。

在一實施例中，添加1 g/L至7 g/L葡萄糖。在一實施例中，維生素係選自由下列各物組成之群：PABA(對胺基苯甲酸)、生物素、D-Ca泛酸鹽(維生素B5)、葉酸、異肌醇、菸鹼醯胺、Pyrodoxine(維生素B6)、核黃素(Riboflavin)(維生素B2)、噻胺(Thiamine)(維生素B1)及氰基鈷胺素(Cyanocobalamin)(維生素B12)。在另一實施例中，其他輔因子係選自由下列各物組成之群：脂質因子、醇胺、胺基酸及肽。在另一實施例中，脂質因子係選自由氯化膽鹼及磷脂醯膽鹼組成之群。在另一實施例中，醇胺為乙醇胺。在一實施例中，胺基酸係選自由下列各物組成之群：天冬醯胺酸、麩醯胺酸及丁二胺。

在一實施例中，肽為麩胱甘肽。在一實施例中，添加0.4 mg/L至1.65 mg/L麩胱甘肽。

在另一實施例中，B部分中之無機鐵來源為檸檬酸鐵。在一實施例中，添加10 mg/L或122 mg/L檸檬酸鐵。在另一實施例中，使檸檬酸鐵保持122 mg/L之濃度。在一實施例中，重組生長因子為胰島素或重組類似物、IGF-1或胰島素與IGF-1之組合。在一實施例中，添加4 mg/L至13 mg/L胰島素或重組類似物。在另一實施例中，添加25 ng/L至150 ng/L IGF-1。在另一實施例中，添加50 ng/L至100 ng/L IGF-1。在另一實施例中，將25 ng/L至150 ng/L IGF-1補充至胰島素中。在一實施例中，將50 ng/L至100 ng/L IGF-1補充至胰島素中。

在另一實施例中，滲透壓調節劑係選自由NaCl、KCl、KNO₃組成之群。在一實施例中，添加0 g/L至10 g/L滲透壓調節劑。在另一實施例中，添加0 g/L至6.5 g/L滲透壓調節劑。

在另一實施例中，能量來源為單醣，例如葡萄糖(例如D-葡萄糖)、麥芽糖、甘露糖、半乳糖及果糖。在一實施例中，添加1.0 g/L至7.0 g/L葡萄糖。在另一實施例中，添加1.5 g/L至5.0 g/L葡萄糖。

在另一實施例中，添加氯化物及硫酸鹽形式之非鐵金屬離子。

在一實施例中，非鐵金屬離子係選自由下列各物組成之群：鉀、鎂、銅、硒、鋅、鎳、錳、錫、鎘、鉬酸鹽、釩酸鹽及矽酸鹽。在一實施例中，緩衝液係選自由下列各物組成之群：碳酸鹽、氯化物、硫酸鹽及磷酸鹽。在一實施例中，緩衝液係選自由下列各物組成之群：NaHCO₃、CaCl₂、MgSO₄、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、C₃H₃O₃Na及稱作HEPES之N-[2-羥乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]。

在本發明之一實施例中，添加至培養基中之額外試劑之一為甲胺喋呤。在一實施例中，甲胺喋呤係用於使表現抗IL-18、抗IL-12、抗TNF α (例如完全人類抗TNF α)或抗EPO-R抗體之CHO細胞生長。在一實施例中，添加100 mM至5000 nM。在一實施例中，向培養基中添加500 nM甲胺喋呤。在一實施例中，添加100 nM甲胺喋呤。在一實施例中，添加5000 nM甲胺喋呤。

在本發明之另一實施例中，額外試劑之一為細胞保護劑，例如甲基纖維素或pluronic多元醇(例如Pluronic F-68)。在一實施例中，添加0.5 g/L至1.0 g/L甲基纖維素。在一實施例中，添加0.5 g/L至1.0 g/L Pluronic F-68。在一實施例中，添加0.7 g/L至1.2 g/L Pluronic F-68。

在另一實施例中，使A部分之pH值增加至最大pH值10。在一實施例中，在添加水解產物之後，接著使A部分之pH值降低至最小值7.0。

本發明亦提供用於表現完全人類抗TNF α 抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10.0 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；2 mL/kg或4.0 mg/kg重組人類胰島素；3.5 g/kg無水葡萄糖；0.292 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；0.031 g/kg NaH₂PO₄•H₂O；0.436 g/kg Na₂HPO₄•7H₂O；2.0 g/kg水解產物；及2.50 mL/kg甲胺喋呤。

本發明亦提供用於表現完全人類抗TNF α 抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10.0 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；6.0 mL/kg或12

mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/kg無水葡萄糖；0.584 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.45 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/kg水解產物；6.92 g/kg植物蛋白腴(Phytone peptone)；及2.50 mL/kg甲胺喋呤。

本發明亦包括用於表現完全人類抗TNF α 抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/L檸檬酸鐵；3.88 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/kg無水葡萄糖；0.876 g/kg L-麩醯胺酸；0.45 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；~~2.67 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg~~ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/kg水解產物；6.92 g/kg植物蛋白腴；及2.50 mL/kg甲胺喋呤。

本發明進一步提供用於表現完全人類抗TNF α 抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/L檸檬酸鐵；3.88 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/kg無水葡萄糖；0.876 g/kg L-麩醯胺酸；0.45 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1 g/kg HEPES；2.67 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；4.0 g/kg水解產物；2.6 g/kg植物蛋白腴；及2.50 mL/kg甲胺喋呤。

本發明之另一態樣為用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/L檸檬酸鐵；3.88 mL/kg或7.8 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/kg無水葡萄糖；0.876 g/kg L-麩醯胺酸；0.45 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.675 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；4.0 g/kg酵母來源水解產物；2.579 g/kg植物蛋白腴；及2.50 mL/kg甲胺喋呤。

本發明提供用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/L檸檬酸鐵；6.5 mL/kg或13 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/kg無水葡萄糖；0.584 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.45 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/kg酵母水解產物；及6.92 g/kg植物蛋白脛。

本發明提供用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：150.0 g/kg無水葡萄糖；5.0 g/kg L-天冬醯胺酸單水合物；65.0 g/kg酵母水解產物；及41.0 g/kg植物蛋白脛。

本發明亦提供用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；6.5 mL/kg或13 mg/kg重組人類胰島素；200.0 g/kg無水葡萄糖；0.584 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.45 g/kg NaCl；1.0 ml/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/kg酵母水解產物；及6.92 g/kg植物蛋白脛。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；2 mL/kg或4 mg/kg重組人類胰島素；3.5+1.5 g/kg無水葡萄糖；0.292 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；2 g/kg酵母水解產物；及0.25 mL/kg甲胺喋呤。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；2 mL/kg或4 mg/kg重組人類胰島素；3.5+1.5 g/kg無水葡萄糖；0.292 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；11 g/kg酵母水解產物；及0.250 mL/kg甲胺喋呤。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；2 mL/kg或4 mg/kg重組人類胰島素；200 g/l無水葡萄糖；0.292 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫

鈉；8 g/kg酵母水解產物；及0.250 mL/kg甲胺喋呤。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；3.88 mL/kg或7.76 mg/L重組人類胰島素；7.0 g/l無水右旋糖；0.876 g/L L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/L HEPES；2.67 g/L NaCl；1.0 g/L Pluronic；0.031 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；4.0 g/L 酵母粉 (yeastolate)；2.579 g/L植物蛋白脛；0.05 mL/kg甲胺喋呤；3.5 mL/L 2 N NaOH；及2.91 g/L 2 N HCl；其產生7.10至7.20之最終pH值及373至403 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；13 mg/L重組人類胰島素；7.0 g/l無水右旋糖；0.584 g/L L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/L HEPES；2.45 g/L NaCl；1.0 g/L Pluronic；0.031 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/L酵母粉；6.92 g/L植物蛋白脛；0.05 mL/kg甲胺喋呤；5.67 mL/L 2 N NaOH；及2.5 g/L 2 N HCl；其產生7.10至7.20之最終pH值及373至403 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；4 mg/kg重組人類胰島素；1.5 g/kg無水右旋糖；0.292 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；2.0 g/L 酵母粉；及0.25 mL/kg甲胺喋呤；其產生7.10至7.30之最終pH值及300至340 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；13 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/kg無水右旋糖；0.584 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.45 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/L酵母粉；及6.92

g/kg植物蛋白胨；5.67 mL/kg NaOH；及2.5 mL/kg HCl；其產生7.10至7.20之最終pH值及373至403 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；7.76 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/l無水右旋糖；0.876 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.67 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；4.0 g/L酵母粉；及2.579 g/L植物蛋白胨；0.05 mL/L甲胺喋呤；3.5 mL/kg NaOH；及2.91 mL/kg HCl；其產生7.10至7.20之最終pH值及373至403 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；13 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/l無水右旋糖；0.584 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；2.45 g/kg NaCl；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；10.7 g/L酵母粉；及6.92 g/L植物蛋白胨；0.05 mL/L甲胺喋呤；5.67 mL/kg NaOH；及2.5 mL/kg HCl；其產生7.10至7.20之最終pH值及373至403 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明包括用於表現抗IL-18抗體之CHO細胞之改良培養基，其包含：10 ml/kg或122 mg/kg檸檬酸鐵；13 mg/kg重組人類胰島素；7.0 g/l無水右旋糖；0.584 g/kg L-麩醯胺酸；1.6 g/kg碳酸氫鈉；1.8 g/kg HEPES；1.0 g/kg Pluronic F-68；0.031 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；0.436 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；14.27 g/L酵母粉；9.23 g/L植物蛋白胨；0.05 mL/L甲胺喋呤；8.95 mL/kg NaOH；及4.1 mL/kg HCl；其產生7.10至7.20之最終pH值及373至403 mOsmo/kg之最終滲透壓。

本發明亦提供一種藉由增加最終力價來增加CHO細胞株產生

IgG1抗體之產生率之方法，其包含：添加丁酸鈉；及添加N-乙醯基半胱胺酸。在一實施例中，IgG1抗體為抗IL-18。在一實施例中，藉由最終力價之增加來量測產生率之增加。在一實施例中，藉由添加0.1 mM至10 mM濃度之丁酸鈉來達成最終力價之增加。在一實施例中，丁酸鈉之濃度為0.1 mM至8.0 mM。在一實施例中，丁酸鈉之濃度為0.1 mM至3.0 mM。在一實施例中，丁酸鈉之濃度為0.125 mM至2.0 mM。在一實施例中，丁酸鈉之濃度為0.125 mM。在一實施例中，最終力價之增加為10-80%。在一實施例中，最終力價之增加為20-60%。在一實施例中，最終力價之增加為35-55%。在一實施例中，最終力價之增加為40%。在一實施例中，藉由添加0.1 mM至10 mM濃度之N-乙醯基半胱胺酸來達成改良之細胞培養物壽命。在一實施例中，細胞培養物壽命之增加為5-50%。

本發明亦提供藉由增加最終力價來增加CHO細胞株產生IgG1抗體之產生率之細胞培養基，其包含：SR-371；及丁酸鈉。在一實施例中，IgG1抗體為抗IL-18。在一實施例中，藉由增加10-80%之最終抗IL-18力價來量測產生率增加。在一實施例中，藉由增加20-60%之最終抗IL-18力價來量測產生率增加。在一實施例中，藉由增加35-55%之最終抗IL-18力價來量測產生率增加。在一實施例中，藉由增加40%之最終抗IL-18力價來量測產生率增加。在一實施例中，所添加之丁酸鈉之濃度為0.125 mM至8.0 mM。在一實施例中，所添加之丁酸鈉之濃度為0.2 mM至3.0 mM。在一實施例中，所添加之丁酸鈉之濃度為0.3 mM至2.0 mM。在一實施例中，所添加之丁酸鈉之濃度為0.125 mM。在一實施例中，所添加之N-乙醯基半胱胺酸之濃度為0 mM至10 mM。在一實施例中，所添加之N-乙醯基半胱胺酸之濃度為5 mM至10 mM。在一實施例中，平均最終力價增加5-50%。在一實施例中，平均最終力價增加15-35%。在一實施例中，平均最終力價增加25-

35%。

【圖式簡單說明】

圖1圖解地描述隨所接種之活細胞密度變化之ABT-874生長力價。第15日之力價結果與饋料中之活細胞密度強烈相關。對以上資料之多項式擬合暗示所產生之最佳饋料密度約為每毫升 3.5×10^6 個細胞。過程參數為pH=6.9；T=35°C；DO=40%；4X培養基中之接種比率為1:5或1:4；在特定密度下，以初始體積之1%開始饋料歷時10天。

【實施方式】

I. 定義

儘管本申請案中所使用之術語為此項技術中之標準術語，但本文中提供某些術語之定義以確保申請專利範圍含義之清晰性及確定性。

如本文所用之術語"抗體"意指包含以雙硫鍵互聯之四條多肽鏈(兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈)之免疫球蛋白分子。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域，CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域，CL。可將VH及VL區進一步再分為與稱作構架區(FR)之更保守區域交替之高變區(稱作互補判定區(CDR))。各VH及VL包含三個CDR及四個FR，其係以以下次序自胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。可使用本發明方法及組合物產生之抗體實例包括腫瘤壞死因子(TNF)- α 抗體(亦稱作抗TNF α 抗體)、介白素(IL)-12抗體(亦稱作抗IL-12抗體)、介白素(IL)-18抗體(亦稱作抗IL18抗體)及EPO/R抗體(本文中亦稱作抗EPO/R抗體)。可使用本發明產生之抗體更詳細地描述於美國專利第6,090,382號、第6,258,562號及第6,509,015號中，其各自係以全文引用的方式併入本文中。

本發明亦可用以產生抗體片段。如本文所用之術語抗體之"抗原結合部分"(或簡單地"抗體部分")係指保持特異性結合至抗原(例如hTNF α)之能力的抗體之一或多個片段。已展示全長抗體片段可執行抗體之抗原結合功能。術語抗體之"抗原結合部分"內涵蓋之結合片段的實例包括(i) Fab片段，由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；(ii) F(ab')₂片段，包含於鉸鏈區藉由雙硫橋連接之兩個Fab片段之二價片段；(iii)由VH及CH1域組成之Fd片段；(iv)由抗體單臂之VL及VH域組成之Fv片段；(v) dAb片段(Ward等人(1989) *Nature* **341**:544-546)，其由VH或VL域組成；(vi)分離互補判定區(CDR)；及(vii)雙重可變域(DVD)抗體。此外，儘管Fv片段之兩個結構域(VL及VH)係藉由分離基因編碼，但可使用重組方法藉由合成連接子使其接合，該合成連接子使得其能夠成為單一蛋白鏈，其中VL與VH區配對以形成單價分子(稱作單鏈Fv(scFv)；參見，例如Bird等人(1988) *Science* **242**:423-426；及Huston等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5879-5883)。該等單鏈抗體亦涵蓋於術語抗體之"抗原結合部分"中。亦涵蓋其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為二價雙特異性抗體，其中VH及VL域係於單一多肽鏈上表現，但使用因過短而無法於同一鏈上兩個結構域之間配對之連接子，藉此迫使該等結構域與另一條鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點(參見例如Holliger等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6444-6448；Poljak等人(1994) *Structure* **2**:1121-1123)。可藉由本發明方法產生之抗體部分之實例係更詳細地描述於美國專利第6,090,382號、第6,258,562號、第6,509,015號中，其各自係以全文引用的方式併入本文中。使用本發明方法及組合物產生之抗體片段或部分亦包括於本發明範疇內。

如本文所用之術語"重組人類抗體"意欲包括藉由重組方式製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重

組表現載體表現之抗體；自重組、組合人類抗體庫(下文進一步描述)分離之抗體；自人類免疫球蛋白基因之轉殖基因動物(例如小鼠)分離之抗體(參見例如Taylor等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287)；或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列之任何其他方式製備、表現、產生或分離之抗體。該等重組人類抗體具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變及恆定區。然而，在某些實施例中，使該等重組人類抗體經受活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時，活體內體細胞突變誘發)且因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為儘管源自人類生殖系VH及VL序列且與其相關，但可能並非天然存在於活體內人類抗體生殖系譜系中之序列。

如本文所用之"經分離抗體"意指大體上不含具有不同抗原特異性的其他抗體之抗體(例如特異性結合至hTNF α 之經分離抗體大體上不含特異性結合除hTNF α 以外之抗原之抗體)。然而，特異性結合hTNF α 之經分離抗體可與其他抗原(諸如來自其他物種之TNF α 分子)具有交叉反應性。此外，經分離抗體可大體上不含其他細胞材料及/或化學物質。

術語"基本培養基"係指能夠支撐細胞生長之任何培養基。基本培養基供應標準無機鹽，諸如鋅、鐵、鎂、鈣及鉀，以及痕量元素、維生素、能量來源、緩衝液系統及必需胺基酸。基本培養基之實例包括(但不限於)杜貝科氏經修飾之伊革氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM)、DME/F12、最小必需培養基(MEM)、基本培養基伊革(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -最小必需培養基(α -MEM)、Glasgow氏最小必需培養基(G-MEM)、PF CHO(SAFC Biosciences)及Iscove氏經修飾之杜貝科氏培養基。

如本文所用之術語"經修飾之基本培養基"係指排除、減低或增加至少一種標準成份、組份或養分(亦即於此項技術中已知之經典調配

基本培養基中發現之至少一種成份、組份或養分)之基本培養基。如"經修飾之基本培養基"之上下文中所用之術語"經修飾"亦可指基本培養基內個別組份之間比例之變化。在本發明之較佳實施例中，經修飾之基本培養基排除以下組份中之至少一種：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸鈉(磷酸二氫鈉及/或磷酸二鈉)、滲透壓調節劑、界面活性劑及葡萄糖，例如單醣葡萄糖。

如本文所用之術語"細胞培養基"、"培養基"及"培養基調配物"係指使細胞於多細胞生物體或組織外部之人造活體外環境中維持、生長、繁殖或膨脹之營養溶液。可使細胞培養基最佳化以用於特定細胞培養用途，該細胞培養基包括(例如)經調配以促進細胞生長之細胞培養生長培養基或經調配以促進重組蛋白產生之細胞培養產生培養基。可於本文中交替使用之術語養分、成份及組份係指構成細胞培養基之組成。

如本文所用之術語"細胞培養產生培養基"或"產生培養基"係指經設計以用於細胞培養物之產生期中之細胞培養基。在較佳實施例中，產生培養基係經設計以用於產生期中之重組蛋白表現。本文(包括實例部分之表2-7)提供產生培養基之實例。

如本文所用之術語"分批饋料細胞培養"及"分批饋料培養"係指起初向培養容器中供應細胞(較佳哺乳動物)及培養基且於培養期間連續或以離散增量向培養物中饋入額外培養養分，在培養終止前具有或不具有週期細胞及/或產物收集之細胞培養。

"分批饋料方法"係指向分批饋料細胞培養物中供應額外養分之方法。舉例而言，分批饋料方法可包含根據預定饋料時程在給定時段內添加補充培養基。

如本文所用之術語"饋入"係指接種後進行之培養物中任何物質的任何添加。饋入可為一或多次添加。

如本文所用之術語"饋料溶液"、"饋料培養基"及"饋入培養基"係指含有於接種後某時起始向培養物中添加之一或多種養分之培養基。在一實施例中，饋料溶液為包含下列各物之組合饋料：基本培養基及至少一種水解產物，例如以大豆為主之水解產物、以酵母為主之水解產物或兩種類型水解產物之組合。在本發明之另一實施例中，饋料溶液可僅包括基本培養基，諸如濃縮基本培養基，或可僅包括水解產物或濃縮水解產物。

如本文所用之術語"反饋控制系統"係指監控給定參數之方法，藉此添加額外試劑或執行細胞培養物之環境修飾以滿足所需參數設定點。在一實施例中，所給定參數為哺乳動物細胞培養物之葡萄糖含量，藉此使用葡萄糖含量來確定應於何時將饋料溶液(例如組合饋料溶液)添加至細胞培養物中。可使用反饋控制系統以維持使哺乳動物細胞培養物中之蛋白產生最佳化所需之營養組份。

如本文所用之術語"饋入概況"係指以饋料溶液(例如組合饋料溶液)補充哺乳動物細胞培養物之時程。饋入概況較佳係使用反饋控制系統而產生的。

可使用"遺傳工程設計"方法(諸如以重組病毒造成之病毒感染、轉染、轉化或電穿孔)使細胞經"遺傳工程設計"以在將允許表現多肽之重組核酸序列引入細胞中時表現特定多肽或蛋白。參見，例如Kaufman等人(1990), *Meth. Enzymol.* 185: 487-511；*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等人編(Wiley & Sons, New York, 1988, 且每季更新)。遺傳工程設計表現所關注蛋白之細胞及/或細胞株之方法及載體為熟習此項技術者所熟知。遺傳工程設計技術包括(但不限於)表現載體、標靶同源重組及基因活化(參見，例如Chappel之美國專利第5,272,071號)以及藉由經工程設計轉錄因子進行之轉錄活化(參見，例如Segal等人，1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(6):2758-

63)。多肽視情況在異種控制元件(諸如實質上不引導此多肽產生之啓動子)控制下表現。舉例而言，啓動子可爲引導哺乳動物多肽表現之強病毒啓動子(例如CMV，SV40)。宿主細胞可或不可正常產生多肽。舉例而言，宿主細胞可爲經遺傳工程設計以產生人類多肽之CHO細胞，意謂已將編碼人類多肽之核酸引入CHO細胞中。或者，宿主細胞可爲已經遺傳工程設計以產生增加含量之通常僅以極低含量存在的人類多肽(例如藉由以強病毒啓動子替代內因性啓動子)之人類細胞。

如本文所用之"生長期"係指經培養細胞快速分裂且數量增加之時段。在生長期中，一般可在經設計以使細胞增殖最大化之培養基中及條件下培養細胞。

術語"水解產物"包括任何酶消化物，尤其爲藉由以至少一種能夠使物質組份分解爲簡單形式(例如分解爲包含單醣或雙醣及/或單肽、二肽或三肽之製劑)之酶處理待萃取物質(例如植物組份或酵母細胞)而製備之指定類型的萃取物。"水解產物"可進一步(例如)藉由木瓜酶而經酶消化，及/或藉由自體分解、熱解及/或胞漿溶解形成。在本發明之較佳實施例中，水解產物並非由動物來源製備，亦即以非動物爲主。較佳的以非動物爲主之水解產物之實例包括以植物爲主之水解產物，例如以大豆爲主之水解產物，及既非源自植物亦非源自動物來源之水解產物，例如以酵母爲主之水解產物。

術語"水解產物強化溶液"及"水解產物強化培養基"係指含有水解產物或水解產物組合(亦即自不同來源萃取之水解產物)作爲添加至細胞培養物中之主要成份之培養基。例如，可將水解產物強化溶液添加至細胞培養物中以增強蛋白產生。類似地，術語"基本強化溶液"及"基本強化培養基"係指含有基本培養基(或基本培養基組合)作爲主要成份之培養基。在一實施例中，將水解產物強化溶液或基本強化溶液或兩種強化溶液之組合添加至細胞培養物中以增加細胞培養物在蛋白

產生中之產生率。

若在含有額外試劑或改變之蛋白產生製程參數之培養物中產生的多肽量超過在不含有額外試劑或改變之蛋白產生製程參數之相同培養物中產生的多肽量，則藉由添加額外試劑或改變蛋白產生製程之參數來"增加"蛋白產生。改變蛋白產生製程之實例包括(但不限於)添加培養基補充物，增加補充培養基之量，變化培養溫度及培養細胞之氧濃度。可使用補充溶液(諸如饋料溶液)向細胞培養物提供額外試劑。

術語"成份"係指任何可用於細胞培養基中以維持或促進細胞增殖增長之化合物(無論其為化學來源或生物來源)。術語"組份"、"養分"及"成份"可交替使用且均意指該等化合物。用於細胞培養基之典型成份包括胺基酸、鹽、金屬、糖、脂質、核酸、激素、維生素、脂肪酸、蛋白及其類似物。促進或維持細胞離體培養之其他成份可由熟習此項技術者在本發明範疇內根據特定需要加以選擇。

如本文所用之術語"接種"係指向培養基中添加細胞以起始培養。

"產生期"係指細胞產生最大量之重組多肽或蛋白之時段。產生期之特徵在於細胞分裂少於生長期中之細胞分裂，且亦可包括使用經設計以使多肽產生最大化之培養基及培養條件。

"重組多肽"或"重組蛋白"係由遺傳工程設計之方法產生之多肽或蛋白。在較佳實施例中，重組蛋白係藉由在細胞培養物中培養表現該等蛋白之細胞而獲得。

"過渡期"意謂"生長期"與"產生期"之間之細胞培養時段。在過渡期中，可將培養基及環境條件由經設計以使增殖最大化之彼等培養基及條件轉變為經設計以使多肽產生最大化之彼等培養基及條件。

本發明提供藉由哺乳動物(例如中國倉鼠卵巢(CHO))細胞培養物產生蛋白(較佳重組蛋白，例如抗體)之新穎組合物及方法。本文所述之細胞培養基及方法已用於重組蛋白產生，尤其重組(完全人類、人

化或嵌合)單株抗體產生。培養基及方法已經多種抗體產品線修飾以併入增加哺乳動物(例如CHO)細胞之生長及產生率之各種改良及進步。下文詳細提供本發明之改良組合物及方法之態樣。

II. 所關注蛋白

一般而言，本發明方法及組合物適用於產生重組蛋白。重組蛋白為藉由遺傳工程設計方法產生之蛋白。根據本發明方法及組合物產生之尤其較佳蛋白為以蛋白為主之治療劑，亦稱作生物物質。蛋白較佳地作為細胞外產物分泌。可使用本發明產生之蛋白包括(但不限於)抗體或其片段。可藉由此項技術中已知之多種技術來操縱編碼免疫球蛋白分子之DNA以產生能夠編碼重組蛋白(諸如單鏈抗體、具有增強親和力之抗體或其他以抗體為主之多肽)之DNA(參見，例如Larrick等人，1989, *Biotechnology* 7:934-938；Reichmann等人，1988, *Nature* 332:323-327；Roberts等人，1987, *Nature* 328:731-734；Verhoeyen等人，1988, *Science* 239:1534-1536；Chaudhary等人，1989, *Nature* 339:394-397)。亦可於本發明中使用產生完全人類抗體(諸如使用轉殖基因動物所製備，且視情況於活體外經進一步修飾者)以及人化抗體之重組細胞。術語人化抗體亦涵蓋單鏈抗體。參見，例如Cabilly等人，美國專利第4,816,567號；Cabilly等人，歐洲專利第0,125,023 B1號；Boss等人，美國專利第4,816,397號；Boss等人，歐洲專利第0,120,694 B1號；Neuberger, M. S.等人，WO 86/01533；Neuberger, M. S.等人，歐洲專利第0,194,276 B1號；Winter，美國專利第5,225,539號；Winter，歐洲專利第0,239,400 B1號；Queen等人，歐洲專利第0 451 216 B1號；及Padlan, E. A.等人，EP 0 519 596 A1。舉例而言，本發明可用於產生免疫特異性辨識特定細胞標靶之人類及/或人化抗體，該等特定細胞標靶例如上述蛋白中之任一者、人類EGF受體、her-2/neu抗原、CEA抗原、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、CD5、

CD11a、CD18、NGF、CD20、CD45、CD52、Ep-cam、其他癌細胞表面分子、TNF α 、TGF- β 1、VEGF、其他細胞激素、 α 4 β 7整合素、IgE、病毒蛋白(例如細胞巨大病毒)。可使用本發明組合物及方法產生之抗體之實例包括(但不限於)抗TNF α 抗體、抗IL-12抗體、抗IL-18抗體及抗EPO受體(EPO-R)抗體。在一實施例中，抗TNF α 抗體為完全人類抗TNF α 抗體，例如阿達木單抗/D2E7(參見美國專利第6,090,382號，其係以引用的方式併入本文；Humira[®]；Abbott Laboratories)。在一實施例中，抗IL-12抗體為完全人類抗IL-12抗體，例如ABT-874(Abbott Laboratories；參見美國專利第6,914,128號，其係以引用方式併入本文中)。在一實施例中，抗IL-18抗體為完全人類IL-18抗體(例如ABT-325)，例如亦參見描述於US 20050147610 A1中之抗體。在一實施例中，抗EPO/R(亦稱作ABT-007)抗體為完全人類抗體，如描述於以引用的方式併入本文之美國專利公開案第US 20060018902 A1號中所描述者。

可使用本發明方法及組合物產生之蛋白類型之另一實例包括融合蛋白。融合蛋白為融合至異種蛋白或肽之蛋白或結構域或蛋白(例如可溶性細胞外域)。該等融合蛋白之實例包括表現為與免疫球蛋白分子部分之融合物之蛋白；表現為與拉鏈部分之融合蛋白之蛋白；及新穎多功能蛋白，諸如細胞激素及生長因子之融合蛋白(亦即GM-CSF及IL-3、MGF及IL-3)。WO 93/08207及WO 96/40918描述製備稱作CD40L之各種可溶性寡聚物形式分子，分別包括免疫球蛋白融合蛋白及拉鏈融合蛋白；其中所論述之技術可應用於其他蛋白。另一種融合蛋白為重組TNFR:Fc，亦稱作依那西普(entanercept)。依那西普(或Enbrel[®]；Amgen/Wyeth)為p75 TNF α 受體細胞外部分之兩個分子的二聚體，各分子由融合至人類IgG1之232胺基酸Fc部分的235胺基酸TNFR衍生之多肽組成。實際上，任何分子均可表現為融合蛋白，包

括(但不限於)細胞受體分子之細胞外域、酶、激素、細胞激素、免疫球蛋白分子部分、拉鏈域及抗原決定基。

III. 本發明之細胞培養基

本發明提供用於產生或表現重組蛋白(例如抗體)之哺乳動物細胞培養之細胞培養基。本文所述之各種細胞培養基可獨立或共同地用於改良之細胞培養，包括增加之蛋白產生及延長之細胞壽命。

在較佳實施例中，本發明之細胞培養基為不含血清的，意謂培養基不含血清(例如胎牛血清(FBS)、馬血清、山羊血清或熟習此項技術者已知之源自任何其他動物之血清)。

在第一態樣中，本發明提供包括全部或部分經修飾之基本培養基之哺乳動物細胞培養基。經修飾之基本細胞培養基可源自此項技術中已知之標準基本細胞培養基。合適之基本培養基包括(但不限於)杜貝科氏經修飾之伊革氏培養基(DMEM)、DME/F12、最小必需培養基(MEM)、基本培養基伊革(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -最小必需培養基(α -MEM)、Glasgow氏最小必需培養基(G-MEM)、PF CHO及Iscove氏經修飾之杜貝科氏培養基。可用於本發明之基本培養基之其他實例包括BME基本培養基(Gibco-Invitrogen；亦參見Eagle, H (1965) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 36)；杜貝科氏經修飾之伊革培養基(DMEM，粉末)(Gibco-Invitrogen (#31600)；亦參見Dulbecco and Freeman (1959) Virology 8, 396；Smith等人(1960) Virology 12, 185. Tissue Culture Standards Committee, In Vitro 6:2, 93)；CMRL 1066培養基(Gibco-Invitrogen (#11530)；亦參見Parker R.C.等人(1957) Special Publications, N.Y. Academy of Sciences, 5, 303)。

基本培養基可經修飾以移除見於標準基本培養基中之特定非營養組份，諸如各種無機及有機緩衝液、界面活性劑及氯化鈉。如本文所述，自基本細胞培養基移除該等組份使得剩餘營養組份之濃度增加

且改良總細胞生長及蛋白表現。此外，根據細胞培養條件之要求可將遺漏之組份添加回含有經修飾之基本細胞培養基之細胞培養基中。如下所述，已發現自基本細胞培養基分離特定成份(亦即添加經修飾之基本細胞培養基，作為細胞培養基中之成份)，且隨後將成份添加回細胞培養基中作為分離成份會提供對細胞培養物生長及蛋白產生有利之特性。

本發明之經修飾之基本培養基排除任何(或所有)以下成份：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖。此等成份常見於市售基本細胞培養基中。

可藉由市售培養基服務(例如SAFC Pharma™)完成組份(例如碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及/或單醣葡萄糖)之排除。熟習此項技術者將瞭解，在一實施例中可使用市售細胞培養基服務(亦即定製培養基服務)獲得經修飾之基本培養基。定製培養基服務之實例係由以下公司提供：例如，SAFC(原JRH Bioscience)、Invitrogen®、Atlanta Biologicals®及Lonza。或者，一般技術者可根據製造基本細胞培養基之標準方法製備本發明之經修飾之基本細胞培養基，其中遺漏本文所述之特定成份(參見例如Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*；BD Bionutrients Technical Manual, (2006)，第三版；Jenkins編(1999), *Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols*, Humana Press；Doyle and Griffiths編，(1997) *Essential Techniques: Mammalian Cell Culture*, John Wiley and Sons；Butler編(1991) *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach* Oxford University Press；Darling及Morgan (1994) *Animal Cells: Culture and Media*, John Wiley and Sons；Freshney編(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), 其各自係以引用的方式併入本文中)。

在一實施例中, 本發明之細胞培養基含有經修飾之基本細胞培養基; 鐵來源(較佳為無機的, 例如檸檬酸鐵); 重組生長因子; 緩衝液; 界面活性劑; 滲透壓調節劑; 能量來源; 及至少兩種不同的非動物水解產物。此外, 經修飾之基本細胞培養基視情況可含有胺基酸、維生素或胺基酸與維生素之組合。

如本文所用之術語"鐵"意謂用以補充培養基之源自非動物之鐵來源。細胞培養基中之鐵來源較佳為無機的。鐵來源較佳為無機的且包括(例如)鐵鹽及亞鐵鹽, 諸如檸檬酸鐵或硫酸亞鐵。螯合鹽(諸如檸檬酸鐵及檸檬酸鐵銨)為較佳的。然而, 亦可使用並非自動物來源分離之其他鐵來源, 例如提供等量鐵之化學鐵螯合劑或重組蛋白鐵載劑。可使用之鐵螯合化合物包括(但不限於)鐵螯合劑乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇-雙(β -胺基乙醚)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、甲磺酸去鐵銨、二巰基丙醇、二伸乙基三胺五乙酸(DPTA)及反-1,2-二胺基環己烷-N,N,N',N'-四乙酸(CDTA)以及檸檬酸鐵螯合劑及硫酸亞鐵螯合劑。尤其較佳之鐵來源為檸檬酸鐵, 其較佳以0.5 mM濃度存在於最終體積之細胞培養基中。

可包括於細胞培養基中之生長因子之非限制性實例為胰島素或其重組類似物、IGF-1及胰島素與IGF-1之組合。尤其較佳之重組生長因子為胰島素或其重組類似物, 其較佳以約4 mg/L至13 mg/L之濃度存在於最終體積之細胞培養基中。

細胞培養基亦可包括緩衝液。在一個較佳實施例中, 緩衝液自經修飾之基本細胞培養基中排除而作為分離組份添加至細胞培養基中(亦向其中添加經修飾之基本細胞培養基)。用於細胞培養基中之緩衝

液在此項技術中已知。細胞培養基中可包括之緩衝液之非限制性實例為磷酸鹽緩衝液、HEPES及碳酸氫鈉。在一個實施例中，碳酸氫鈉作為緩衝液添加至細胞培養基中，最終濃度約1.6 g/L。在另一個實施例中，HEPES作為緩衝液添加至細胞培養基中，最終濃度1.8 g/L。在一個實施例中，磷酸鹽緩衝液(例如磷酸二氫鈉及磷酸二鈉)添加至細胞培養基中，最終濃度介於0.01與0.5 g/L之間。包括緩衝液以幫助細胞培養基維持在所需之pH。在一個實施例中，細胞培養基之pH在6.0至8.0、6.5至7.5、及7.1至7.2之範圍內。此等pH值之中間數(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)以及本文所述之所有其他數值亦欲為本發明之一部分。使用任何上述值之組合作為上限及/或下限值之範圍亦欲包括於本發明範疇內。

細胞培養基亦可包括滲透壓調節劑，諸如NaCl。在一個實施例中，NaCl添加至細胞培養基中，最終濃度在約1.0至6.5 g/L之間。在一個實施例中，細胞培養基之滲透壓在320至450 mOsmo/kg之範圍內。所述NaCl濃度及mOsmo/kg值之中間數以及本文所述之所有其他數值亦欲為本發明一部分。使用任何上述值之組合作為上限及/或下限值之範圍亦欲包括於本發明範疇內。

本發明之細胞培養基中亦可添加能量來源。較佳地，能量來源為單醣。可用於細胞培養基中之單醣之實例包括葡萄糖(例如D-葡萄糖)、麥芽糖、甘露糖、半乳糖及果糖。在一個實施例中，葡萄糖添加至細胞培養基中，最終濃度約7.0 g/L。

本發明細胞培養基之一個重要成份為添加之水解產物。本發明之細胞培養基可包括源自單一來源(例如酵母或大豆)之水解產物，或可包括水解產物之組合(例如基於酵母與大豆之水解產物)。較佳地，用於本發明細胞培養基之水解產物為基於非動物的。基於非動物之水

解產物之實例包括基於植物之水解產物及基於非植物之水解產物，例如基於酵母之水解產物、Tryprone、酪蛋白水解產物、酵母萃取物、或經木瓜酶消化之大豆蛋白腴。用於本發明培養基之水解產物為市售可得的，包括例如來自諸如 Quest International, Norwich, N.Y., OrganoTechnie, S.A. France, Deutsche Hefewerke GmbH, Germany, 或 DMV Intl. Delhi, N.Y.來源之 HyPep 1510.RTM., Hy-Soy.RTM., Hy-Yeast 412. RTM., 及 Hi-Yeast 444.RTM.。酵母萃取物及大豆水解產物之來源亦揭示於 WO 98/15614, WO 00/03000, WO 01/23527 及美國專利第 5,741,705 號中。亦可用於本發明之以酵母為主之水解產物的實例包括 TC 酵母粉 (BD Diagnostic) 及 酵母粉 UF (SAFC Biosciences)，而以植物為主之水解產物之實例包括大豆水解產物 UF (SAFC Biosciences) 及 HyQ[®] 大豆水解產物 (HyClone Media)。

在一實施例中，本發明之細胞培養基進一步包括麩醯胺酸，例如 L-麩醯胺酸。L-麩醯胺酸之合適來源可自各種商業來源 (諸如 Gibco (目錄號 25030-081)) 獲得。

本發明之細胞培養基 (包括下文於實例部分描述之彼等細胞培養基) 可視情況包括甲胺喋呤。在用於培養 CHO 細胞之細胞培養基中，甲胺喋呤用量之實例包括約 100 nM 至 5000 nM 甲胺喋呤。

在大規模生物反應器中，CHO 細胞特別易受容器內氣體噴射及以葉輪混合所產生之剪應力影響。因此，本發明之細胞培養基亦可視情況包括細胞保護劑。如本文所用之術語 "細胞保護劑" 意謂保護真核細胞免受損害之物質。例如，該損害可由剪應力或生物反應容器中之氣泡噴射效應引起。為使細胞損害之發生降至最低，培養基最好含有細胞保護劑，諸如甲基纖維素、聚乙二醇、聚乙烯醇或 pluronic 多元醇。其中，Pluronic.RTM. (多元醇，BASF Wyandotte Corp.) 多元醇 F68 為較佳的，因為其不像聚乙烯醇，其為無毒物質且不像聚乙二醇，其

並不干擾下游純化。

本發明之細胞培養基亦可包括非鐵金屬離子。非鐵金屬離子之實例包括(但不限於)氯化物及硫酸鹽、鉀、鎂、銅、硒、鋅、鎳、錳、錫、鎘、鉬酸鹽、釩酸鹽及矽酸鹽。

本發明之細胞培養基亦可包括維生素及輔酶因子。該等維生素及輔酶因子之實例包括(但不限於)PABA(對氨基苯甲酸)、維生素K(生物素)、維生素B5(D-泛酸鈣)、葉酸、異肌醇、菸鹼醯胺(菸鹼酸醯胺)、維生素B6(鹽酸吡多辛(PyridoxineHCl))(及鹽酸吡哆醛(Pyridoxal HCl))、維生素B2(核黃素)、維生素B1(噻胺)及維生素B12(氰基鈷胺素)。或者，可將維生素C(L-抗壞血酸)添加至培養基中。亦可添加氯化膽鹼，通常認為其為維生素且亦可認為其為脂質因子。

此外，本發明之細胞培養基亦可包括脂質樣因子。脂質因子之實例包括氯化膽鹼及磷脂醯膽鹼。亦可包括脂質產生助劑，例如醇胺(例如乙醇胺)。

在本發明之方法及組合物中，較佳在不含血清之培養基中培養細胞。應用於培養基之術語"不含血清"包括不含有血清(諸如胎牛血清)之任何哺乳動物細胞培養基。

本發明範疇內亦包括本文所述之任何改良細胞培養基中之哺乳動物細胞，例如CHO細胞。

在本發明之一態樣中，提供為產生特定抗體而最佳化之細胞培養基調配物。最佳調配物之實例包括用於表現下列抗體之CHO細胞生長或蛋白產生之細胞培養基：抗TNF α 抗體、抗IL-12抗體、抗IL-18抗體及抗EPO受體(EPO-R)抗體。

本發明中包括表現抗TNF α 抗體(包括完全人類抗TNF α 抗體)之哺乳動物細胞(例如CHO細胞)之細胞培養基。在較佳實施例中，完全人類抗TNF α 抗體為阿達木單抗(亦稱作D2E7及Humira[®]: Abbott

Laboratories)。阿達木單抗(包括核酸及胺基酸序列)之特徵係描述於美國專利第6,090,382號中，其係以引用的方式併入本文中。阿達木單抗可藉由在細胞培養生長培養基中培養包含編碼蛋白(例如阿達木單抗)之核酸的哺乳動物細胞(例如CHO細胞)，將細胞培養物轉移至細胞培養產生培養基中且將蛋白自細胞培養產生培養基中分離而產生。

在一實施例中，本發明提供為包含編碼阿達木單抗之核酸之CHO細胞而最佳化的細胞培養生長培養基。為表現阿達木單抗之CHO細胞而最佳化之不含血清的細胞培養生長培養基之調配物包括：基本培養基；檸檬酸鐵(例如約10.0 ml/kg或122 mg/L)；重組人類胰島素(例如約4.0 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約3.5 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.29 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；及以酵母為主之水解產物(例如約2.0 g/kg)。為表現阿達木單抗之CHO細胞而最佳化之不含血清的細胞培養生長培養基之另一實例包括以下成份：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10.0 ml/kg或122.45 mg/kg)；重組人類胰島素(例如約3.8至3.9 mL/kg或7.8 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.8至0.9 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.6至2.7 g/kg)；Pluronic F-68(例如約1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；L-天冬醯胺酸單水合物(例如約0.45 g/kg)；以酵母為主之水解產物(例如約4.0 g/kg)；及以植物為主之水解產物(例如約2.6 g/kg)。表現阿達木單抗之細胞培養生長培養基可進一步包括甲胺喋呤，例如約2.50 mL/kg。

在一實施例中，本發明提供為表現抗體(包括(例如)人類抗 $\text{TNF}\alpha$

抗體(例如阿達木單抗)或紅血球生成素受體(EPO/R)抗體)之CHO細胞而最佳化之細胞培養產生培養基。抗EPO/R抗體之實例係描述於美國專利公開案第20040071694號中，其係以引用的方式併入本文。為表現抗體(諸如阿達木單抗或抗EPO/R抗體)之CHO細胞而最佳化之不含血清的細胞培養產生培養基調配物包括：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10.0 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約6.0 mL/kg或12 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.58至0.59 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.4至2.5 g/kg)；Pluronic F-68(例如約1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；以酵母為主之水解產物(例如約10.7 g/kg)；及以植物為主之水解產物(例如約6.9至7.0 g/kg)。在一實施例中，細胞培養產生培養基具有介於約7.1至7.2範圍內之pH值及介於373至403 mOSm/kg範圍內之滲透壓。

本發明之另一態樣係關於使由CHO細胞產生之抗介白素12(IL12)抗體(例如完全人類IL-12抗體)產生最佳化之細胞培養基。在較佳實施例中，完全人類抗IL12抗體為ABT-874。ABT-874(包括核酸及胺基酸序列)之特徵係描述於美國專利第6,914,128號中，其係以引用的方式併入本文中。

在一實施例中，為表現ABT-874之CHO細胞生長而最佳化之不含血清的細胞培養生長培養基包括下列各物：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約3.8至3.9 mL/kg或7.8 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.87至0.88 g/kg)；L-天冬

醯胺酸單水合物(例如約0.45 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.67至2.68 g/kg)；約Pluronic F-68(例如1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；以酵母爲主之水解產物(例如約4.0 g/kg)；及以植物爲主之水解產物(例如約2.6 g/kg)。

在一實施例中，用於表現ABT-874之不含血清的細胞培養產生培養基包括下列各物：具有降低之維生素含量且排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約6.5 mL/kg或13 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.58至0.59 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.45 g/kg)；Pluronic F-68(例如約1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；以酵母爲主之水解產物(例如約10.7 g/kg)；及以植物爲主之水解產物(例如約6.9至7.0 g/kg)。

在一實施例中，本發明提供表現抗體(例如抗IL12及抗EPO/R抗體)之CHO細胞之不含血清的細胞培養生長培養基，其包含下列各物：基本培養基；檸檬酸鐵(例如約10 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約4 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約1.5 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.29至0.30 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；及以酵母爲主之水解產物(例如至少約2 g/kg)。在一實施例中，表現抗體(例如抗IL-12及抗EPO/R抗體)之CHO細胞之細胞培養生長培養基具有約7.10至7.30之pH值及約300至340 mOsmo/kg之滲透壓。細胞培養基亦可含有以酵母爲主之水解產物(例如至少約8 g/kg)。

本發明之另一態樣係關於爲由CHO細胞產生之抗介白素18(IL-

18)抗體(例如完全人類IL-18抗體)的產生而最佳化之細胞培養基。可使用本發明方法及組合物產生之完全人類IL-18抗體之實例係描述於以引用的方式併入本文中之PCT公開案WO 01/058956中。

在一實施例中，為CHO細胞中之IL-18抗體產生而最佳化之細胞培養生長培養基包括下列成份：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約3.8至3.9 mL/kg或7.8 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.87至0.88 g/kg)；L-天冬醯胺酸單水合物(例如約0.45 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.67 g/kg)；Pluronic F-68(例如約1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；以酵母為主之水解產物(例如約4.0 g/kg)；及以植物為主之水解產物(例如約2.6 g/kg)。用於表現完全人類IL-18抗體之細胞生長之細胞培養基可具有7.10至7.20之pH值及373至403 mOsmo/kg之滲透壓。

為CHO細胞中之IL-18抗體產生而最佳化之細胞培養產生培養基之實例包括下列成份：經修飾之基本培養基，其經修飾以移除下列組份：碳酸氫鈉、HEPES緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約6.0 mL/kg或12 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.58至0.59 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.45 g/kg)；Pluronic F-68(例如約1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；以酵母為主之水解產物(例如約10.7 g/kg)；及以植物為主之水解產物(例如約6.9至7.0

201346032

g/kg)。用於產生完全人類抗IL-18抗體之細胞培養產生培養基之另一實例包括：排除下列組份之經修飾之基本培養基：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單糖葡萄糖；檸檬酸鐵(例如約10 ml/kg或122.45 mg/L)；重組人類胰島素(例如約6.5 mL/kg或13 mg/kg)；無水葡萄糖(例如約7.0 g/kg)；L-麩醯胺酸(例如約0.58至0.59 g/kg)；碳酸氫鈉(例如約1.6 g/kg)；HEPES(例如約1.8 g/kg)；NaCl(例如約2.45 g/kg)；Pluronic F-68(例如約1.0 g/kg)； $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (例如約0.03至0.04 g/kg)； $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (例如約0.43至0.44 g/kg)；以酵母為主之水解產物(例如約14.2至14.3 g/kg)；及以植物為主之水解產物(例如約9.2至9.3 g/kg)。產生完全人類IL-18抗體之CHO細胞之細胞培養基可具有7.10至7.20之pH值及373至403 mOsmo/kg之滲透壓。

除實例部分所述之例示性培養基以外，下文亦關於改良抗體產生之分批饋料方法及補充培養基描述本發明範疇內之培養基的另一實例。

本發明之培養基可用於藉由使培養基或其組份與所有或部分細胞群體接觸來實現適當細胞培養。可藉由混合、添加、組合、接種或攪拌一或多種細胞與一或多種化合物、溶液、培養基等而使培養基與細胞接觸。亦可藉由(例如)"饋入"以替代或補充下文更詳細描述之培養細胞之培養基而使培養基與細胞一次性、以增量形式或以逐步方式接觸。

IV.用於改良蛋白產生之方法及組合物

本發明之方法或組合物係關於哺乳動物細胞培養。在一實施例中，所使用之哺乳動物細胞為CHO細胞。

已描述將DNA引入哺乳動物細胞中之既定方法。Kaufman, R. J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, 1990, 第15-69頁。使用市售試

劑(諸如陽離子脂質試劑Lipofectamine™、lipofectamine™-2000或lipofectamine™-plus(可自Invitrogen購得))之額外方案可用以轉染細胞。Feigner等人(1987)., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417。此外,以塗覆有核酸之微彈進行電穿孔或轟擊可用以使用程序轉染哺乳動物細胞,諸如下列文獻中之彼等程序:A Laboratory Manual, 第2版,第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) and Fitzpatrick-McElligott (1992), Biotechnology (NY) 10(9): 1036-40。可使用此項技術中已知之方法(諸如對細胞毒性藥物之抗性)進行穩定轉化子之選擇。Kaufman等人((1990), Meth. in Enzymology 185:487-511)描述若干選擇機制,諸如二氫葉酸還原酶(DHFR)抗性。DHFR選擇之合適宿主菌株可為缺失DHFR之CHO菌株DX-B11。Urlaub及Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220。可將表現DHFR cDNA之質體引入菌株DX-B11中且僅含有質體之細胞可於適當選擇培養基中生長。可併入表現載體中之可選擇標記之其他實例包括賦予抗生素(諸如G418及勻黴素B)抗性之cDNA。可基於對此等化合物之抗性選擇具有載體之細胞。

展示改良哺乳動物表現載體之異種基因表現之額外對照序列包括以下元件:源自CHO細胞之表現加強序列元件(EASE)(Morris等人, Animal Cell Technology, 第529-534頁(1997);美國專利第6,312,951 B1號、第6,027,915號及第6,309,841 B1號)及來自腺病毒2之三連前導子(TPL)及VA基因RNA(Gingeras等人(1982), J. Biol. Chem. 257:13475-13491)。病毒來源之內部核糖體入口位點(IRES)序列使得雙順反子mRNA有效轉譯(Oh及Sarnow (1993), Current Opinion in Genetics and Development 3:295-300; Ramesh等人(1996), Nucleic Acids Research 24:2697-2700)。已展示異種cDNA表現為雙順反子mRNA之部分,隨後表現為可選擇標記基因(例如DHFR)會改良宿主之

201346032

轉染能力及異種 cDNA 之表現 (Kaufman 等人 (1990), *Methods in Enzymol.* 185:487-511)。採用雙順反子 mRNA 之例示性表現載體為 Mosser 等人, *Biotechniques* 22:150-161 (1997) 所述之 pTR-DC/GFP 及 Morris 等人, *Animal Cell Technology*, 第 529-534 頁 (1997) 所述之 p2A5I。

Mosley 等人已描述一種適用之高度表現載體 pCAVNOT ((1989), *Cell* 59:335-348)。用於哺乳動物宿主細胞中之其他表現載體可如 Okayama 及 Berg 所揭示經建構 ((1983), *Mol. Cell. Biol.* 3:280)。適用於 C127 鼠類乳腺上皮細胞中哺乳動物 cDNA 之穩定高水平表現之系統可大體上如 Cosman 等人所述經建構 ((1986), *Mol. Immunol.* 23:935)。Cosman 等人所述之適用高度表現載體 PMLSV N1/N4 ((1984), *Nature* 312:768) 已寄存為 ATCC 39890。額外之適用哺乳動物表現載體係描述於 EP 專利第 -A-0 367 566 號及 WO 01/27299 A1 中。載體可源自反轉錄病毒。可添加異種信號序列替代原生信號序列, 該等異種信號序列諸如以下序列中之一者: 美國專利第 4,965,195 號中所述之 IL-7 信號序列; Cosman 等人所述之 IL-2 受體信號序列 (*Nature* 312:768 (1984)); EP 專利第 0 367 566 號所述之 IL-4 信號肽序列; 美國專利第 4,968,607 號中所述之 IL-1 受體型信號肽; 及 EP 專利第 0 460 846 號中所述之 II 型 IL-1 受體信號肽。

多肽可於真核細胞中重組產生且較佳地係由適合於細胞培養物中生長之宿主細胞分泌。用於本發明之宿主細胞較佳為哺乳動物細胞。該等細胞亦可經遺傳工程設計以表現所關注基因, 可為適合於細胞培養物中生長之哺乳動物產生細胞及/或可為同源細胞株。常用於工業中之該等細胞之實例為 VERO、BHK、HeLa、CV1 (包括 Cos)、MDCK、293、3T3、骨髓瘤細胞株 (例如 NSO、NS1)、PC12、WI38 細胞及中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞, 該等細胞廣泛地用於產生若干複合重

201346032

組多肽，例如細胞激素、凝血因子及抗體(Brasel等人(1996), Blood 88:2004-2012 ; Kaufman等人(1988), J.Biol Chem 263:6352-6362 ; McKinnon等人(1991), J Mol Endocrinol 6:231-239 ; Wood等人(1990), J. Immunol. 145:3011-3016)。缺乏二氫葉酸還原酶(DHFR)之突變細胞株(Urlaub等人(1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220，其係以引用的方式併入)(DXB11及DG-44)為合乎需要的CHO宿主細胞株，因為有效DHFR可選擇及可擴增基因表現系統使得此等細胞中高水平表現重組多肽(Kaufman R. J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566，其係以引用的方式併入)。此外，此等細胞易於作為黏著或懸浮培養物操縱且展現相對優良之遺傳穩定性。其中表現之CHO細胞及重組多肽已經廣泛表徵且已經管理機構許可用於臨床商業製造。亦可使用產生抗體之融合瘤細胞株來實踐本發明方法。此項技術中熟知製造融合瘤細胞株之方法。參見例如 Berzofsky 等人，Paul 編，Fundamental Immunology，第2版，第315-356頁，347-350, Raven Press Ltd., New York (1989)。源自上述細胞株之細胞株亦適用於實踐本發明。

以編碼重組蛋白之聚核苷酸序列轉化合適之哺乳動物宿主細胞(例如CHO細胞)後，識別且分離證實穩定重組蛋白表現之細胞。重組蛋白之穩定表現係根據此項技術中已知之方法，藉由將適當DNA載體轉染至二氫葉酸還原酶缺乏(DHFR-)之中國倉鼠卵巢細胞(CHO AM-1/D，美國專利第6,210,924號)中，隨後分離且測試證實最高重組蛋白表現之個別純系而達成的。基於小規模旋轉器及較大規模生物反應器中之生長及產生，選擇特定細胞株作為製造重組蛋白之細胞株。

可藉由此項技術中熟知之方法(例如，藉由在不含血清之條件下於96及/或24孔培養盤中進行多輪限制性稀釋)，使用本發明細胞培養基來選殖產生最高含量重組蛋白之細胞。基於各種懸浮容器中之產生及生長特徵來選擇純系。可進行酶免疫檢定(EIA)以選擇產生最高含

201346032

量重組蛋白之純系。可藉由使純系在介於100 ml至高達3 L範圍內之各種震盪器或旋轉燒瓶及生物反應器中生長來量測生長特徵(包括雙倍時間及密度)。選擇最佳純系(例如具有於培養物中達到最高密度之最快雙倍時間之純系)且選擇其作為用於重組蛋白產生之細胞株。在一實施例中，重組蛋白產生係用於商業目的且係使用大規模生物反應器進行。

通常，在組織培養盤(例如10 cm培養盤、96孔培養盤等)或其他黏著培養物(例如微載劑珠粒)及懸浮培養物(諸如滾瓶中)，在無菌、受控溫度及大氣條件下進行細胞培養。培養物可於震盪燒瓶、小規模生物反應器及/或大規模生物反應器中生長。生物反應器為用以培養細胞之裝置，在生物反應器中可監控、調節且控制環境條件，諸如溫度、氣氛、攪拌及/或pH值。本發明之方法(包括分批饋料方法)及組合物可用於大規模哺乳動物細胞培養，例如10 L、11 L、12 L、13 L、14 L等。在一實施例中，本發明之大規模細胞培養方法及組合物適用於CHO細胞培養及抗體產生。

根據本發明，在促進所關注多肽(可為抗體或重組多肽)產生之條件下培養哺乳動物宿主細胞。熟習此項技術者可選擇使用經研發以使特定培養宿主細胞中之細胞生長、細胞生存力及/或重組多肽產生最大化之本文所述之一或多種細胞培養基。或者，本發明之方法及組合物可與市售細胞培養基組合使用。

適用於哺乳動物細胞之培養條件於此項技術中已知(參見例如 *Animal cell culture: A Practical Approach*, D. Rickwood編, Oxford university press, New York (1992))且可與改良之本發明方法組合。可以懸浮狀態或在附著至固體基質上時培養哺乳動物細胞。此外，亦可(例如)於具有或不具有微載劑之流體化床生物反應器、中空纖維生物反應器、滾瓶、震盪燒瓶或攪拌槽生物反應器中培養哺乳動物細胞且

201346032

以分批、分批饋料、連續、半連續或灌注模式進行。

本發明方法可用以改良單一階段及多階段培養過程中之重組多肽產生。在單一階段過程中，將細胞接種至培養環境中且於單一產生期期間採用所揭示之方法。在多級過程中，在兩個或兩個以上不同階段中培養細胞。舉例而言，首先可在生長期，在使細胞增殖及生存力最大化之環境條件下培養細胞，接著將其轉移至使多肽產生最大化之條件下之產生期。生長期及產生期可在一或多個過渡期之後或由一或多個過渡期所分離。在多階段過程中，至少可在產生期中採用本發明方法。

為達成理解而非限制目的，熟練從業者應瞭解，蛋白產生之細胞培養物及培養運作可包括三種通用類型：亦即，連續培養、分批培養及分批饋料培養。在連續培養中(例如)，在培養期間向細胞提供新鮮培養基補充物(亦即饋入培養基)，同時每日移除舊培養基且(例如)每日或連續收集產物。在連續培養中，可每日添加且可連續(亦即點滴或灌注)添加饋入培養基。對於連續培養而言，可將細胞保持於培養物中歷時所需之久，只要細胞保持存活且維持環境及培養條件即可。

在分批培養中，最初在培養基中培養細胞且在培養運作中或在培養運作結束之前並不移除、替代且亦不補充此培養基，亦即不以新培養基向細胞"饋料"。在培養運作結束時，收集所需產物。

對於分批饋料培養而言，藉由在運作期間每日(或連續地)以營養溶液補充培養基一或多次，亦即在培養期間以饋入培養基對細胞"饋料"，來增加培養運作時間。分批饋料培養可包括如下所述之各種饋入方案及次數，例如每日、每隔一日、每兩日等、每日一次以上或每日少於一次等。此外，可以饋入培養基對分批饋料培養物連續饋料。接著，在培養/產生運作結束時收集所需產物。本發明較佳涵蓋分批

201346032

饋料細胞培養物，其中饋入使用增加蛋白產生且可延長蛋白產生期之最佳饋料溶液。

改良分批饋料培養物：水解產物及基本強化溶液

本發明之一態樣係關於使用改良分批饋料方法與補充基本及水解產物溶液組合來增加蛋白產生之方法及組合物。改良分批饋料方法部分地基於添加兩種強化溶液(亦即水解產物強化溶液及基本強化溶液)，該等強化溶液係於蛋白產生時段中添加至細胞培養基中。用於本發明之分批饋料方法之水解產物強化溶液包含並非源自植物或動物之第一水解產物及以植物為主之第二水解產物。並非源自植物或動物且並非為以植物為主之水解產物之水解產物的實例為以酵母為主之水解產物。可用於水解產物強化溶液中之以植物為主之水解產物的實例為以大豆為主之水解產物。基本強化溶液包括基本培養基，例如PF CHO、天冬醯胺酸及葡萄糖，且水解產物強化溶液包括至少兩個不同的以非動物為主之水解產物。水解產物及基本強化溶液係在一定時段中以一定時間間隔(例如在11-15天之時段中以每日之時間間隔)添加至細胞培養物中，且可於同一日或不同日添加。

本發明係關於一種產生抗TNF α 抗體(例如阿達木單抗/D2E7)之分批饋料方法，其包含在介於32至38°C範圍內之培養溫度下於細胞培養物中培養包含編碼抗TNF α 抗體之核酸的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。在一實施例中，培養溫度為35°C。向CHO細胞饋入水解產物強化溶液及基本強化溶液以處理(例如解決或校正)營養缺乏以使產生率最大化。將水解產物及基本強化溶液添加至細胞培養物中。在一實施例中，細胞培養產生培養基包含介於20與65%之間之溶氧，例如約30%溶氧。在一實施例中，細胞培養產生培養基含有蛋白產生所需之葡萄糖含量，例如至少約2.0 g/L葡萄糖。在整個蛋白產生培養過程中，可藉由如所需向細胞培養產生培養基中添加葡萄糖以維持所給定濃度(例如

201346032

至少約2.0 g/L葡萄糖)來控制葡萄糖濃度。在一實施例中，用於抗TNF α 抗體之分批饋料方法之水解產物強化溶液基本上由下列各物組成：約0.5至2.5 g/L以大豆為主之水解產物及約2至5 g/L以酵母為主之水解產物。為用於在CHO細胞中產生抗TNF α 抗體(例如阿達木單抗/D2E7)之分批饋料方法而最佳化之基本強化溶液具有約9.0至10.5之pH值。添加水解產物強化溶液及基本強化溶液之時段在9至15天之間，例如12天。在一實施例中，基本強化溶液係於該時段中以下各日中之至少一日添加至細胞培養基中：第4日、第6日、第9日及第11日，且水解產物強化溶液係於該時段之第4日、第7日或第4日及第7日添加至細胞培養基中。

在另一替代實施例中，用於產生抗TNF α 抗體(例如阿達木單抗/D2E7)之分批饋料方法可包括根據pH值線性斜坡(包含自約7.1至7.2之pH值起始且產生最終約6.9之pH值)調節細胞培養基之pH值。在一實施例中，經至少約24小時、48小時或72小時之時段調節pH值線性斜坡。

本發明亦係關於產生抗IL12抗體(例如ABT-874)之分批饋料方法，其包含在介於32至38°C(例如33°C)範圍內之培養溫度下於細胞培養物中培養包含編碼抗IL12抗體之核酸的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。用於IL-12抗體產生之水解產物強化溶液亦可含有葡萄糖。在一實施例中，在約6.9之pH值培養CHO細胞。向CHO細胞饋入水解產物強化溶液及基本強化溶液以維持營養缺乏，以使產生率最大化。將水解產物及基本強化溶液添加至細胞培養物中。在一實施例中，細胞培養產生培養基包含介於20與65%之間之溶氧，例如約40%溶氧。在一實施例中，用於抗IL12抗體之分批饋料方法之水解產物強化溶液基本上由下列各物組成：約1.6至1.7 g/L以大豆為主之水解產物、約2.6至2.7 g/L以酵母為主之水解產物及約2.4 g/L葡萄糖。為用於在CHO細胞中

201346032

表現抗IL12抗體(例如ABT-874)之分批饋料方法而最佳化之基本強化溶液具有約9.7之pH值及約1480 mOsm之滲透壓。添加水解產物強化溶液及基本強化溶液之時段在14至15天之間，例如12天。在一實施例中，基本強化溶液係於該時段之第5日起始每隔一天添加至細胞培養產生培養基中，且水解產物強化溶液係於該時段之第6日起始每天添加至細胞培養產生培養基中。或者，可於該時段中第5日起始每天將基本強化溶液及水解產物強化溶液添加至細胞培養產生培養基中。

穩定、高濃度饋料溶液

本發明之一態樣係關於與用於改良蛋白產生率之改良、穩定高濃度饋料溶液相關之方法及組合物。改良之饋料溶液可用以在抗體產生中補充細胞培養產生培養基。饋料溶液包括葡萄糖(例如100至250 g/kg)；基本培養基；除麩醯胺酸以外之胺基酸，例如天冬醯胺酸(例如1.0至15.0 g)；及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物。此外，饋料溶液具有約6.0至7.5之pH值。兩種不同的以非動物為主之水解產物可包括以植物為主之水解產物，例如以大豆為主之水解產物，及並非以動物為主或以植物為主之水解產物，例如以酵母為主之水解產物。此項技術中已知之任何基本培養基均可用於改良饋料溶液，包括(但不限於)PF CHO或DMEM/F12培養基。亦可使用經修飾之基本培養基。在一實施例中，基本細胞培養基排除以下組份：碳酸氫鈉、緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑、麩醯胺酸及葡萄糖。改良饋料溶液為穩定的，具有小於約15 NTU之濁度。本發明亦包括藉由添加饋料溶液而維持細胞培養產生培養基之穩定葡萄糖含量。

本發明亦包括一種製造包含葡萄糖及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物之饋料溶液的方法。製造饋料溶液之方法包括將葡萄糖與基本細胞培養基組合為組合溶液且將組合溶液之pH值調節至約

201346032

9.5至10.5。接著，將至少兩種不同的以非動物為主之水解產物添加至溶液中且再次調節pH值，使得所得饋料溶液具有約6.5至7.5之pH值。

本發明之饋料溶液可用以達成自哺乳動物細胞培養物產生高含量重組蛋白，例如產生抗體。在一實施例中，本發明係關於由哺乳動物細胞培養物產生至少約4 g/L抗體之方法，其包含於細胞培養產生培養基中培養包含編碼抗體之核酸的哺乳動物細胞。接著，將具有約6.7至7.0之pH值之饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中。饋料溶液包括葡萄糖(例如約100至200 g/kg)；基本細胞培養基；除麩醯胺酸以外之胺基酸；及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物。在一實施例中，該方法致使產生至少約4 g/L抗體，較佳5 g/L抗體且最佳約6 g/L抗體。

藉由使用具有約6.7至7.0之pH值且包括下列組份之饋料溶液：葡萄糖；基本細胞培養基；約除麩醯胺酸以外之胺基酸；及至少兩種不同的以非動物為主之水解產物，可增加自哺乳動物細胞培養物產生之抗體力價。在一實施例中，將饋料溶液添加至包含編碼抗體之核酸之哺乳動物細胞的細胞培養產生培養基中，致使比不添加饋料溶液而培養之對照哺乳動物細胞培養物多至少50%之增加。在一實施例中，添加饋料溶液會產生比對照物多至少100%之力價增加。在一實施例中，添加饋料溶液會產生比對照物多至少150%之力價增加。可將補充饋料溶液於特定細胞濃度下添加至細胞培養物中，諸如當細胞密度達到每毫升 2.0×10^6 個細胞或當細胞密度達到每毫升約 3.5×10^6 個細胞時。

由於本發明之分批饋料方法用以處理(例如解決或校正)產生蛋白(例如抗體)之特定細胞培養物營養要求，故監控特定成份可為有利的。可監控之成份包括任何代謝指示劑，亦即細胞代謝指示劑。在一實施例中，本發明之分批饋料方法包含監控細胞培養基中之葡萄糖含

201346032

量，包括監控葡萄糖含量以使得其維持於0.5至5.5 g/L之間，例如4.0及5.5 g/L。藉由監控葡萄糖含量，可間接監控細胞代謝。如以下實例3中所述，可將葡萄糖用作代謝指示劑。在一實施例中，可基於葡萄糖含量以營養組份(例如水解產物)補充細胞培養物。監控葡萄糖含量之方法於此項技術中已知且可包括使用自動取樣裝置進行監控。可使用之代謝指示劑之另一實例為麩醯胺酸。亦期望以上範圍之中間數以及本文中所引用之所有其他數均為本發明之部分。期望使用上述值之任何組合作為上限及/或下限之值之範圍包括於本發明範疇內。

反饋控制系統可用以監控細胞培養產生培養基中之代謝指示劑含量。在一實施例中，一旦滿足所需參數或要求(例如預定葡萄糖含量)，即於反饋控制系統所測定之時間點將組合饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中。

反饋控制系統亦可用以判定給定哺乳動物細胞培養物及所關注蛋白產生之饋入概況。在一實施例中，確定用於在哺乳動物細胞培養物中產生蛋白之饋入概況的方法包含：於細胞培養產生培養基中培養包含編碼蛋白之核酸的哺乳動物細胞；及使用反饋控制系統監控細胞培養產生培養基中之代謝指示劑，藉此將饋料溶液(例如組合饋料溶液)添加至細胞培養產生培養基中。將饋料溶液添加至細胞培養產生培養基中以符合目標代謝指示劑設定點，例如葡萄糖含量。根據細胞培養結論，測定每天添加至細胞培養產生培養基中之饋料溶液量的且提供應於何時將饋料溶液添加至細胞培養物中之饋入概況。一旦確立饋入概況，則不再需要監控產生所關注蛋白之給定哺乳動物細胞培養物之代謝指示劑。

N-乙醯基半胱胺酸及丁酸鈉方法及組合物

如上所述，本發明之細胞培養方法有利地達成增加之抗體力價。用於達成哺乳動物細胞培養物中之蛋白產生率之本發明另一態樣

係藉由向細胞培養基中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合。在一實施例中，本發明係關於藉由向細胞培養基中添加丁酸鈉(例如0.1 mM至10 mM)、N-乙醯基半胱胺酸(例如5 mM至80 mM)或其組合而產生抗體之方法。在一實施例中，抗體力價為至少約100 mg/L；至少約200 mg/L；或至少約250 mg/L。本發明亦係關於藉由向細胞培養基中添加丁酸鈉(例如0.1 mM至10 mM)、N-乙醯基半胱胺酸(例如0.1 mM至10 mM)或其組合(對照物相應地缺乏丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合)而於哺乳動物細胞培養物中產生抗體，從而使得抗體力價比對照哺乳動物細胞培養物改良至少10%之方法。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之抗體力價比對照哺乳動物細胞培養物改良至少29%；比對照哺乳動物細胞培養物改良至少40%；比對照哺乳動物細胞培養物改良至少70%；或比對照哺乳動物細胞培養物高至少90%。可在哺乳動物細胞培養物之生長期中向哺乳動物細胞培養物中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合。在一實施例中，在培養時間之第4日與第7日之間向哺乳動物細胞培養物中添加丁酸鈉、N-乙醯基半胱胺酸或其組合。在一實施例中，以介於5 mM至80 mM範圍內且較佳約10 mM之量添加單獨或與丁酸鈉組合之N-乙醯基半胱胺酸。

本發明亦係關於藉由向細胞培養基中添加約0.1 mM至10 mM N-乙醯基半胱胺酸(對照物缺少此添加)而使得哺乳動物細胞培養物之壽命與對照哺乳動物細胞培養物相比延長至少約45%之方法。在一實施例中，哺乳動物細胞培養物之壽命與對照哺乳動物細胞培養物相比延長至少約35%；或與對照哺乳動物細胞培養物相比延長至少約55%。

應注意，本文所描述之細胞培養基及改良培養方法可獨立或彼此組合使用。

在使用本發明方法及組合物進行培養後，接著可回收或收集所得表現蛋白。此外，可使用已知方法將自該培養物或組份(例如自培

養基或細胞萃取物或體液)純化或部分純化蛋白。分餾程序可包括(但不限於)過濾、離心、沈澱、相分離、親和力純化、凝膠過濾、離子交換層析、疏水性相互作用層析(HIC, 使用諸如苯基醚、丁醚或丙醚之樹脂)、HPLC或上述步驟之某一組合中之一或多個步驟。

舉例而言, 多肽純化可包括含有將結合至多肽之試劑之親和力管柱; 親和力樹脂(諸如刀豆球蛋白A瓊脂糖、HEPARIN-TOYOPEARL(層析介質)或Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE(瓊脂糖珠粒))之一或多個管柱步驟; 包括溶離之一或多個步驟; 及/或免疫親和層析。可以促進純化之形式表現多肽。舉例而言, 其可表現為融合多肽, 諸如麥芽糖結合多肽(MBP)、麩胱甘肽-S轉移酶(GST)或硫氧化還原蛋白(TRX)之彼等融合多肽。表現且純化該等融合多肽之套組可分別自New England BioLab(Beverly, Mass.)、Pharmacia(Piscataway, N.J.)及InVitrogen購得。多肽可以抗原決定基標記且隨後藉由使用針對該抗原決定基之特定抗體純化。一種該抗原決定基FLAG(抗原決定基標記)可自Kodak(New Haven, Conn.)購得。亦可能將包含結合多肽之多肽(諸如結合至重組蛋白之單株抗體)之親和力管柱用於親和力純化表現多肽。其他類型之親和力純化步驟可為蛋白A或蛋白G管柱, 其中親和力試劑結合至含有Fc域之蛋白。可使用習知技術將多肽自親和力管柱移除, 例如於高鹽溶離緩衝液中且接著使其透析至低鹽緩衝液中以供使用或藉由視所利用之親和力基質改變pH值或其他組份; 或可使用天然產生之親和力部分之基質競爭性移除。在一實施例中, 使用本發明方法及組合物產生之抗體係根據以引用的方式併入本文中之US申請案第11/732918號所述之方法純化。

所需之最終純度視所欲之多肽用途而定。本發明方法及組合物適用於所關注蛋白之治療用途。因此, 當欲在活體內投與多肽時, 需要相對較高之純度。在該情況下, 將多肽純化, 以致在藉由SDS-聚

丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)進行分析時不能偵測到對應於其他多肽之多肽帶。熟習相關領域者應瞭解，由於差異糖基化、差異轉譯後加工及其類似技術，藉由SDS-PAGE可觀測到多個對應於多肽之帶。最佳地，如藉由SDS-PAGE進行分析時之單一多肽帶所指示，將本發明多肽純化至大體均質。可藉由銀染色、庫馬斯藍染色(Coomassie blue staining)或(若多肽經放射性標記)藉由自動放射攝影術目測多肽帶。

本發明亦視情況涵蓋進一步調配蛋白。術語"調配"意謂蛋白可經緩衝液交換、殺菌、塊體包裝及/或包裝以用於最後使用者。該等組合物可包含與其他組份(諸如生理學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑)組合之有效量之蛋白。術語"生理學上可接受"意謂不干擾活性成份之生物活性有效性之無毒材料。

應注意，關於本文所引用之數，亦期望以上範圍之中間數以及本文所引用之所有其他數為本發明之部分。期望使用上述值之任何組合作為上限及/或下限之值之範圍包括於本發明範疇內。

實例

以下實例例示說明用於培養哺乳動物細胞之改良方法及組合物，包括用於在哺乳動物細胞中表現生物物質之改良方法及組合物。下文揭示用以表現各種重組生物物質之培養中國倉鼠卵巢(CHO)細胞之改良的經生物化學定義之培養基。此外，亦例示說明在以各種組態及規模運作之生物反應器中，含有相同組份但具有不同組份平衡且經強化以使得更多細胞生長及產物表現增加之大規模培養細胞的培養基。

實例1：培養哺乳動物細胞之改良培養基

通常，哺乳動物(例如中國倉鼠卵巢(CHO))細胞培養基係基於市售之培養基調配物，諸如DMEM、Ham氏F12或此等類型培養基之組

合。為於哺乳動物細胞中產生蛋白，細胞培養基必須充分強化以支持細胞生長及生物物質產物表現之增加。以下實例描述用於培養哺乳動物細胞(亦即中國倉鼠卵巢(CHO)細胞)以表現包括抗體之各種重組生物物質之改良的經生物化學定義之培養基。

缺乏二氫葉酸還原酶[dhfr(-)]之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞適合在不存在血清或任何其他源自動物來源之材料下以懸浮狀態生長。細胞係在不存在次黃嘌呤及胸苷下，在獲自商業來源JRH PF-CHO(目錄號67147)之指定細胞培養基中生長。儘管細胞株並不缺乏麩醯胺酸合成酶，但亦向培養基中添加額外麩醯胺酸。

● 使用此項技術中熟知之分子生物技術產生表現生物物質(諸如給定標靶之抗體)之CHO細胞株。簡言之，使用此項技術中熟知之CHO細胞將能夠表現所關注抗體及能夠表現dhfr酶基因之表現載體引入CHO細胞中。所關注之經轉染細胞係藉由在次黃嘌呤及胸苷存在下選擇細胞而獲得。在增加濃度之甲胺喋呤中進一步培養所選擇之轉化子以擴增經轉染基因且增加所表現蛋白之產率。下文描述用以培養CHO細胞之改良細胞培養基。

實例1.1：中國倉鼠卵巢(CHO)細胞培養之培養基

● 一般而言，用於培養CHO細胞之培養基調配物係由命名為A部分、B部分及C部分之三個部分組成。A部分為基本培養基且包含水、胺基酸、維生素、無機金屬鹽、痕量元素、乙醇胺、丁二胺、界面活性劑、丙酮酸鈉、麩胱甘肽及2-巰基乙醇。B部分包含無機鐵來源；且C部分包含重組生長因子、緩衝液、滲透壓調節劑、能量來源、各種非鐵金屬離子、界面活性劑及水解產物。培養基組份大部分為無機的或來自重組來源且經高度純化。培養基不含有來自動物來源之蛋白、脂質及碳水化合物。複合水解產物係獲自經高度加工之酵母及植物來源。

培養基之A部分包括不含蛋白之CHO(PF CHO)培養基(JRH-SAFC Biosciences ; JRH目錄號67147-亦稱作原始A部分)。因此，A部分包括基本培養基，該基本培養基包括水、胺基酸及維生素。選擇用於修飾且再調配之基本培養基(PF CHO)以支持細胞生長及所表現蛋白產生率之進一步增加。使PF CHO經修飾以移除特定組份，包括碳酸氫鈉、HEPES緩衝液、磷酸二氫鈉、磷酸二鈉、滲透壓調節劑、界面活性劑及單醣葡萄糖(經修飾之PF CHO於本文中稱作經修飾之A部分(亦稱作JRH目錄號67411))。亦進行此等修飾以促進大規模生物反應器中細胞培養過程條件之改良。

B部分組份(JRH)係由獨立添加之濃縮檸檬酸鐵溶液組成。B部分組份之濃度在所有CHO細胞培養計劃中均保持恆定。

C部分組份包括生長因子(例如胰島素)、胺基酸麩醯胺酸、TC酵母粉及大豆水解產物植物蛋白腴、保持選擇壓力必需之甲胺喋呤及在製備期間用於在培養基水合後調節pH值之鹼NaOH及酸HCl。

改良之細胞培養基調配物係如下製成。首先，最初使CHO細胞在獲自JRH之PF-CHO培養基(SAFC-JRH目錄號67147)中生長。如下所述，將PF-CHO培養基(目錄號67147)進一步修飾以與CHO細胞株一起使用。此修飾之培養基係由JRH以新目錄號67411命名。修飾之目標係使得細胞培養基之A部分濃度增加，以致滲透壓及pH值不受影響。製造商(JRH)亦聲明原始A部分(目錄號67147)不具有碳酸氫鈉、麩醯胺酸且不含蛋白質(不添加胰島素或其他蛋白或肽生長因子)。接著，當證明有效時，將此等遺漏之組份獨立添加至67147及67411 A部分調配物中，特別用於CHO細胞株。其為下文以C部分更詳細描述之組份中之一些。

表 1：比較原始細胞培養基調配物(A部分 67147)與經修飾之細胞培養基調配物(經修飾之 A 部分 67411)

組份	含有67147(RM-003) (原始A部分)之細胞培養基	含有1X、2X、3X及4X g/L 經修飾之67411(RM-230)(經修飾之A部分)之細胞培養基
A部分		
A部分原始粉末：JRH來源 僅1X濃度	16.45 g/L	NA
經修飾之A部分：特定JRH來源 所選擇之組份不具有碳酸氫 鈉、HEPES及磷酸二氫鈉及磷 酸二鈉、滲透壓調節劑氯化 鈉、界面活性劑Pluronic F-68及 單醣葡萄糖	NA	2.63、5.26、7.89及10.52 g/L
B部分		
B部分：檸檬酸鐵JRH儲備溶液	10 mL/L(0.5 mM)	10 mL/L (0.5 mM)
C部分：		
生長因子、單醣、能量來源-胺 基酸：多種含量		
重組hu胰島素	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-麩醯胺酸	0.292 g/L	0.584 g/L
緩衝液：保持單一濃度		
碳酸氫鈉	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
滲透壓調節劑：每條產品線多 種含量		
NaCl	NA	0-6.5 g/L
水解產物：每條產品線多種含 量		
Bacto TC酵母粉	NA	2.0-10.7 g/L
BD植物蛋白朮(大豆)	NA	0-6.92 g/L
Primatone	NA	2-8 g/L
其他/額外試劑		
選擇壓力(dhfr系統)：每條產品 線多種含量		
甲胺喋呤	至所需擴增含量	至所需擴增含量
界面活性劑-剪應力保護劑：單 一含量		
Pleuronic F-68	1.0 g/L	1.0 g/L
用於pH值調節之酸-鹼		

組份	含有67147(RM-003) (原始A部分)之細胞培養基	含有1X、2X、3X及4X g/L 經修飾之67411(RM-230)(經 修飾之A部分)之細胞培養基
NaOH	如所需	如所需
HCl	如所需	如所需
溶液目標		
最終pH值	7.2-7.4	7.1-7.3
最終滲透壓	280-320	320-450

CHO細胞培養之細胞培養基之A部分

如上所述，改良細胞培養基之A部分含有修飾型基本培養基，亦即PF-CHO培養基。獲自JRH之PF-CHO培養基(目錄號67147)係藉由自A部分中移除緩衝液碳酸氫鈉、HEPES及磷酸二氫鈉及磷酸二鈉、滲透壓調節氯化鈉、界面活性劑Pluronic F-68及單糖葡萄糖而經修飾。以取決於特定細胞培養計劃需要之各種濃度，將此等組份添加回A部分中。此舉使得緩衝液濃度保持穩定，且使界面活性劑濃度保持低於對細胞造成毒性之含量，同時使得為增加之細胞生長及增加之抗體產生而操縱滲透壓及碳基質含量。一旦將此等組份自原始JRH A部分調配物分離，則如經修飾之細胞培養基(經修飾之PF CHO-於表1中稱作#67411)所見，促進JRH A部分中剩餘組份之濃度增加，從而使得細胞生長及抗體表現如藉由抗體力價所測定有所增加。不需要改變培養基體積，使經修飾之A部分粉末(67411)調配物之個別組份(包括胺基酸、維生素、痕量元素及其他各種組份部分)增加至高達原始調配物濃度之四倍。上文於表1中描述使用67147之原始A部分調配物與使用67411之修飾之調配物之比較。

就定義而言，原始JRH PF CHO基本培養基(目錄號67147)為不具有麩醯胺酸且不具有碳酸氫鈉之PF CHO基本培養基。1部分中葡萄糖之原始濃度為1.5 mg/L。

CHO細胞培養之細胞培養基之B部分

細胞培養基之B部分組份包含濃縮檸檬酸鐵溶液，其與獲自JRH

之PF-CHO培養基之B部分相同(目錄號67147)，且係獨立添加。

將無機鐵來源(諸如鐵鹽及亞鐵鹽，尤其為檸檬酸鐵及硫酸亞鐵)添加至基本培養基(亦即A部分或經修飾之A部分)中。儘管添加了少量硫酸亞鐵(0.2-0.8 mg/L)及非水合硝酸鐵(0.025-0.11 mg/L)，但螯合鹽(諸如檸檬酸鐵)為較佳的。檸檬酸鐵係作為液體補充物以較大濃度添加且作為PF-CHO B部分包括於細胞培養基中。儘管其他培養基組份之濃度可改變且具有更大之濃度範圍，但使檸檬酸鐵保持122 mg/L之單一濃度。此係由於超氧化物及游離基之形成引起細胞損害且於基本培養基中形成不合乎需要的化合物。

● *CHO細胞培養之細胞培養基之C部分*

細胞培養基之C部分起初由下列各物組成：重組生長因子、緩衝液、滲透壓調節劑、能量來源及水解產物。在研發過程中添加至細胞培養基中且不包括於胺基酸、維生素及輔因子、無機鹽及緩衝液、痕量元素或礦物之通常分組中之額外化合物於上表1中描述為"C部分"。關於下表1中所提及之C部分，應注意C部分中所識別之成份可獨立或組合添加。

重組生長因子

● 將介於4-13 mg/L濃度範圍內之肽激素胰島素或重組類似物添加至細胞培養基中。IGF-1亦可以50-100 ng/L之濃度替代或補充添加至細胞培養基中之胰島素。

滲透壓調節劑

各種細胞培養基中之滲透壓在260 mOsm至460 mOsm之範圍內。滲透壓之調節係經由鹽，尤其NaCl、KCl及KNO₃；經由有助於大幅改變滲透壓之所有胺基酸及水解產物。

能量來源

培養基中最多之單醣為葡萄糖(D葡萄糖)且係如所需經補充。細

胞培養基之起始濃度在3.5至7.0 g/L之範圍內。亦可補充其他糖作為代謝物或作為剪應力保護劑，其可包括麥芽糖、甘露糖、半乳糖或果糖。

水解產物

認為水解產物為游離胺基酸以及二肽及三肽之額外來源。

pH值維持(緩衝液)

使用各種緩衝液以將細胞培養基中之pH值維持於6.5至7.5之範圍內。用於培養基中之無機緩衝液(或緩衝系統)包括碳酸鹽(NaHCO_3)、氯化物(CaCl_2)、硫酸鹽(MgSO_4)及磷酸鹽(NaH_2PO_4 及 Na_2HPO_4)。有機緩衝液亦包括丙酮酸鈉($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$)及亦稱作HEPES之N-[2-羥乙基]哌嗪-N'-[2-乙烷磺酸]。

麩醯胺酸

麩醯胺酸亦包括於C部分中，儘管其自原始A部分及經修飾之A部分中遺漏。麩醯胺酸包括於C部分中，例如在含有原始A部分之細胞培養基中為0.2至0.4(0.29)g/L且在含有經修飾之A部分之細胞培養基中為0.3至0.7，例如0.58(參見上表1)。

CHO細胞培養之細胞培養基之其他組份

以下提供可添加至細胞培養基中之額外組份。應注意，可添加之額外組份不限於以下所提供之實例。

額外肽

將0.4至1.65 mg/L有助於維持內質網結構及CHO細胞株之特異性生長之丁二胺HCl鹽添加至基本培養基中。

添加麩胱甘肽(三肽)，其量介於0.5至2.0 mg/L範圍內。添加2-巰基乙醇至3.6 mg/L，用作維持硫氫基及結合之還原劑且傳送類似銅之各種金屬。其還原脫氫抗壞血酸及胱胺酸且再生抗壞血酸及半胱胺酸。

甲胺喋呤：

甲胺喋呤濃度視待達成之最終擴增含量而於產品線之間有所不同。使用2 mM濃度之儲備溶液，添加體積及最終濃度為：關於抗IL-12及抗EPO-R，0.250 mL/kg導致最終為500 nM；關於抗IL-18，0.5 mL/kg導致最終為100 nM且最後關於抗TNF α ，2.5 mL/kg導致最終為5000 nM。

細胞保護劑/界面活性劑

此實例中所述之培養基係用以在所有規模之反應器、燒瓶及旋轉燒瓶中，在產生較大剪應力之攪拌及噴射下使CHO細胞以懸浮狀態生長。為使細胞損害降至最低，添加濃度為每升培養基大約1 g之細胞保護劑(例如pluronic多元醇，尤其為Pluronic F-68)。亦使用小於及等於1 g/L之其他剪應力緩和劑(包括甲基纖維素)及高達每公升公克量之不同濃度之特定水解產物及植物萃取物。

胺基酸

細胞培養基具有如本文所述之胺基酸之量範圍。兩種胺基酸(天冬醯胺酸及麩醯胺酸)係以高於其他胺基酸之起始濃度添加，因為其於CHO細胞培養過程中快速變為有限養分。詳言之，天冬醯胺酸在基本培養基中為約0.4-0.5 g/kg。

儘管天冬醯胺酸為A部分之組份(包括原始及經修飾之PF CHO)，但天冬醯胺酸之濃度係藉由將其補充至細胞培養基中而增加。

視目標組份濃度及所需培養基之細胞效應而定，細胞培養基能夠支持極低初始密度至超過每毫升 1.0×10^7 個細胞之CHO生長歷時數天。CHO過程額外包括稍後部分所述之生長期及產生期及所需不同範圍之組份。然而，細胞培養基調配物比例及一致性保持相同。

CHO細胞培養基之最終製備

製備改良細胞培養基需要以特定次序添加各種組份，同時於特

定時間使用鹼或酸進行pH值調節。隨著A部分基本濃度之增加，添加NaOH形式之鹼以幫助調配物中之胺基酸溶解至10之最大pH值。隨著水解產物之添加，使用HCl形式之酸使pH值下降至7.0之最小值。若需要，則使用NaOH或HCl溶液達成直至特定pH值之進一步調節。

以下實例基於上文各種特定抗體之表現描述細胞培養基。

實例1.2：用於培養表現抗TNF α 抗體之CHO細胞之細胞培養基

在表2所述之細胞培養基中培養表現TNF α 之完全人類抗體(亦即阿達木單抗；D2E7)之CHO細胞株。

表2：用於培養表現完全人類抗TNF α 抗體之CHO細胞之細胞培養基

培養基組份	原材料	AF-D2E7-1XP	AF-D2E7-1XP	AF及AY-D2E7	AY-D2E7-2XP	AY-D2E7-2XP
組份清單：JRH A部分及B部分	規格#	SR-248 生長	SR-250 生長+ MTX	SR-286 產生 prod 3XP	SR-332 生長1	SR-333 生長2
添加ABC組份	最終pH值：	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1
	最終滲透壓：	280-320	280-320	370-390	320-360	320-360
A部分：未經修飾之-原始-市售	RM-003	16.45	16.45	NA	NA	NA
特定(經修飾之)A部分：不含鹽	RM-230	NA	NA	7.89 g/kg	5.26 g/kg	5.26 g/kg
B部分：檸檬酸鐵：螯合鐵來源	RM-004	10 ml/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
C部分：						
rHu胰島素：重組蛋白葡萄糖調節劑	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，無水：碳來源	RM-011	3.5 g/kg	3.5 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg
L-麩醯胺酸：胺基酸及能量來源	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：磷酸鹽緩衝液	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：磷酸鹽緩衝液	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
Bacto TC酵母粉：	RM-216	2.0 g/kg	2.0 g/kg	10.7 g/kg	4.0 g/kg	4.0 g/kg

酵母來源之水解產物							
植物蛋白胨：植物-大豆來源之水解產物	RM-238	NA	NA	6.92 g/kg	2.6 g/kg	2.6 g/kg	
碳酸氫鈉：緩衝液：CO ₂ -pH值調節劑	RM-077	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	
HEPES：有機緩衝液	RM-090	NA	NA	1.8 g/kg	1.8 g/kg	1.8 g/kg	
NaCl(鹽)：滲透壓調節劑	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	
其他組份							
L-天冬醯胺酸單水合物：胺基酸	RM-284	NA	NA	NA	0.45 g/kg	0.45 g/kg	
Pluronic F-68(泊洛沙姆188(Poloxamer 188)·NF)：界面活性劑、載劑	RM-188	NA	NA	1.0 g/kg	1.0 g/kg	1.0 g/kg	
甲胺喋呤：在CHO擴增DHFR系統中為選擇性的	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：鹼	SR-288	如所需	如所需	5.67 mL/kg	3.5 mL/kg	3.5 mL/kg	
HCl, 2 N：酸	SR-287	如所需	如所需	2.5 mL/kg	2.91 mL/kg	2.91 mL/kg	

實例1.3：用於培養表現IL-12抗體之CHO細胞之培養基組合物

在表3所述之生長培養基中培養表現完全人類抗IL-12抗體之CHO細胞株。

表3：用於培養表現完全人類抗IL12抗體(ABT-874)之CHO細胞之培養基

培養基名稱	原材料規格#	ABT-874 SR-383 生長	ABT-874 SR-352 產生	ABT-874 SR-468 饋料	ABT-874 SR-351 Glu 饋料	ABT-874 SR-274	ABT-874 SR-273	ABT-874 SR-272
最終pH值：						6.5-6.9	6.5-6.9	6.5-6.9
最終滲透壓：						265-282	265-282	265-282
A部分：未經修飾之-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(經修飾)：不含鹽	RM-230	5.26 g/kg	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A部分(經修飾)：不含鹽且維生素減少	RM-322	NA	7.89 g/kg	21.0 g/kg	7.89 g/kg	NA	NA	NA
B部分：檸檬酸鐵：螯合鐵來源	RM-004	10 mL/kg	10 mL/kg	NA	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg

	原材料	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874	ABT-874
C部分：								
牛運鐵蛋白：動物來源Fe載劑	SR-057	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rHu胰島素：重組蛋白葡萄糖調節劑	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，無水：碳來源	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-麩醯胺酸：胺基酸及能量來源	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
碳酸氫鈉：緩衝液：CO ₂ -pH值調節劑	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：有機緩衝液	RM-090	1.80 g/kg	1.80 g/kg	NA	1.8 g/kg	NA	NA	NA
NaCl(鹽)：滲透壓調節劑	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：磷酸鹽緩衝液	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：磷酸鹽緩衝液	RM-233	0.436 g/kg	0.436 g/kg	NA	0.436 g/kg	NA	NA	NA
Bacto TC酵母粉：酵母來源之水解產物	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-大豆來源之水解產物	RM-238	2.579 g/kg	6.92 g/kg	41.0 g/kg	6.92 g/kg	NA	NA	NA
其他組份								
Pluronic F-68(泊洛沙姆188，NF)：界面活性劑、載劑	RM-188	1.00 g/kg	1.00 g/kg	NA	1.0 mL/kg	NA	NA	NA
L-天冬醯胺酸單水合物：胺基酸	RM-284	0.450 g/kg	NA	5.0 g/kg	NA	NA	NA	NA
Primatone：牛-動物來源水解產物	RM-149	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
甲胺喋呤：在CHO擴增DHFR系統中為選擇性的	SR-133	0.250 mL/kg	NA	NA	NA	0.250 mL/kg	0.250 mL/kg	0.250 mL/kg
NaOH, 2 N：鹼	SR-288	3.50 mL/kg	5.67 mL/kg	如所需	5.67 mL/kg	如所需	如所需	如所需
HCl, 2 N：酸	SR-287	2.91 mL/kg	2.5 mL/kg	如所需	2.5 mL/kg	如所需	如所需	如所需

參考上文，關於不含鹽且具有減少的維生素之經修飾之基本培養基，維生素之量相對於以上描述為RM-003之未經修飾之基本培養基，或相對於以上描述為RM-230之經修飾之不含鹽基本培養基減少了三分之一。因此，如上所述，維生素減少之基本培養基具有RM-003及RM-230的三分之一之維生素量。當使用上表中所給出之量時，培養基中維生素之最終濃度與使用RM-003或RM-230相比降低至三分之一。然而，應注意若需要，則使用RM-230之產生及饋入培養基亦

可使用。

實例1.4：用於培養表現IL-18及EPO/R抗體之CHO細胞之培養基組合物

表4提供用以表現抗IL-18及抗EPO/R抗體之生長及產生培養基之概述。關於表現此等抗體之培養基之額外詳述可見於表5(抗IL-18)及表6(抗EPO/R)。

表4：用於培養表現完全人類抗IL-18及抗EPO/R抗體之CHO細胞之培養基

培養基組份	原材料	抗IL18 2XP	抗IL18 3xP	抗IL18 4XP	抗EPO/R 1XP	抗EPO/R 3xP
組份清單：JRH A部分及B部分	規格#	SR-371 生長	SR-372 產生	SR-382產生	SR-274 生長	SR-286 產生
添加ABC組份	最終pH值：	7.0±0.1	6.9±0.05	7.0±1.0	7.2±0.1	7.2±0.1
	最終 滲透壓：	280-300	373-403	360-400	280-320	370-390
A部分：未經修飾之-原始-市售	RM-003	NA	NA	NA	16.45	NA
特定(經修飾之)A部分：不含鹽	RM-230	5.26 g/kg	7.89 g/kg	10.52 g/kg	NA	7.89 g/kg
B部分：檸檬酸鐵：螯合鐵來源	RM-004	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg	10 mL/kg
C部分：						
rHu胰島素：重組蛋白葡萄糖調節劑	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，無水：碳來源	RM-011	7.0 g/kg	7.0 g/kg	7.0 g/kg	1.5 g/kg	7.0 g/kg
L-麩醯胺酸：胺基酸及能量來源	RM-071	0.876 g/kg	0.584 g/kg	0.584 g/kg	0.292 g/kg	0.584 g/kg
碳酸氫鈉：緩衝液：CO ₂ -pH值調節劑	RM-077	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg	1.6 g/kg
HEPES：有機緩衝液	RM-090	1.8 g/kg	1.8 g/kg	1.8 g/kg	NA	1.8 g/kg
NaCl(鹽)：滲透壓調節劑	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：磷酸鹽緩衝液	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

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O ：磷酸鹽緩衝液	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
Bacto TC酵母 粉：酵母來源之 水解產物	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-大豆來源之 水解產物	RM-238	2.6 g/kg	6.92 g/kg	9.23 g/kg	NA	6.92 g/kg
其他：						
L-天冬醯胺酸單 水合物：胺基酸	RM-284	0.45 g/kg	NA	NA	NA	NA
Pluronic F-68(泊 洛沙姆188， NF)：界面活性 劑、載劑	RM-188	1.0 g/kg	1.0 g/kg	1.0 g/kg	NA	1.0 g/kg
甲胺喋呤：在 CHO擴增DHFR 系統中為選擇性 的	SR-133	0.05 mL/kg	0.05 mL/kg	0.05 mL/kg	0.25 mL/kg	2.50 mL/kg
NaOH, 2 N：鹼	SR-288	如所需	如所需	如所需	如所需	5.67 mL/kg
HCl, 2 N：酸	SR-287	如所需	如所需	如所需	如所需	2.5 mL/kg

在生長培養基2xP(SR-371)中培養表現CHO細胞株之IL-18，且稍後在產生培養基3xP(SR-372)中產生抗體，最終力價為大約1 g/L。高力價過程使用4xP(SR-382)作為產生培養基以達到大約2 g/L之最終力價。用於抗EPO/R產生之產生培養基與SR-286相同，但1xP培養基(SR-274)係用於細胞生長。所有培養基均描述於表4及5中。

實例1.5：用於在哺乳動物細胞中產生抗體之細胞培養過程

以上所揭示之培養基亦發展為兩個用於兩個培養哺乳動物(亦即CHO)細胞之計劃之產生平臺。第一個平臺係使用與如上表2-4中所述之經修飾之產生培養基所述相類似，僅用於細胞培養之溫度有所不同的培養基組合物發展的。此平臺係用於產生抗IL-18抗體以及產生抗紅血球生成素受體(抗EPO/R)。進一步強化營養組份之第二培養基平臺係用於高力價抗IL-18產生，以達成以體積計之較高抗體產生率。

如先前所述，所有抗體(包括抗IL-12、抗IL-18及抗EPO/R抗體)

均為藉由經轉染dhfr(-) CHO細胞株表現之完全人類IgG1抗體。此等細胞株係以懸浮狀態培養且無需牛來源血清或其他動物來源材料之幫助。

為產生抗IL-18抗體，在生長培養基(本文中稱作SR-371)中培養表現CHO細胞株之抗IL-18。培養基SR-371係用於以中等細胞生長支持較高細胞產生率。一旦細胞密度達到轉移標準，則將細胞轉移至產生培養基(SR-372)中以起始產生階段。

表5：抗IL18過程A中培養基之組成

生長培養基SR-371係用於接種箱(seed train)及接種反應器中。產生培養基SR-372係用於3000公升之產生生物反應器中。

組份	生長培養基SR-371	產生培養基SR-372
PFCHO A部分，特定不含鹽之調配物	5.26 g/L	7.89 g/L
PFCHO B部分(檸檬酸鐵儲備溶液)	10 mL/L	10 mL/L
重組人類胰島素	7.76 mg/L	13 mg/L
右旋糖，無水	7.0 g/L	7.0 g/L
L-麩醯胺酸	0.876 g/L	0.584 g/L
碳酸氫鈉	1.6 g/L	1.6 g/L
HEPES	1.8 g/L	1.8 g/L
NaCl	2.67 g/L	2.45 g/L
Pluronic F-68(泊洛沙姆188，NF)	1.0 g/L	1.0 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.031 g/L	0.031 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.436 g/L	0.436 g/L
Bacto TC酵母粉	4.0 g/L	10.7 g/L
植物蛋白胨	2.579 g/L	6.92 g/L
甲胺喋呤, 2 mM	0.05 mL/L	0.05 mL/L
NaOH, 2 N	3.5 mL/L	5.67 mL/L
HCl, 2 N	2.91 g/L	2.5 mL/L
最終pH值	7.10-7.20	7.10-7.20
最終滲透壓(mOsmo/kg)	373-403	373-403

在整個培養中將溫度維持在35°C。當細胞培養物葡萄糖含量低於2 g/L時，添加額外4 g/L之葡萄糖。

亦將類似過程用於抗EPO/R抗體產生。然而，將清潔培養基(leaner medium)(SR-274)用於接種箱中之細胞生長。將培養基SR-286(用於Humira產生之相同培養基)用於抗EPO/R抗體之產生階段(表6)。生長培養基SR-274係用於接種箱及接種反應器中。產生培養基SR-286係用於3000公升之產生生物反應器中。

表6：抗EPO/R過程中培養基之組成

組份	生長培養基 SR-274	產生培養基 SR-286
PFCHO A部分, RM-003	16.45 g/Kg	N/A
PFCHO A部分, RM-230(不含鹽)	N/A	7.89 g/Kg
PFCHO B部分(檸檬酸鐵儲備溶液)	10 mL/Kg	10 mL/Kg
重組人類胰島素	4 mg/Kg	13 mg/Kg
右旋糖, 無水	1.5 g/Kg	7.0 g/Kg
L-麩醯胺酸	0.292 g/Kg	0.584 g/Kg
碳酸氫鈉	1.6 g/Kg	1.6 g/Kg
HEPES	N/A	1.8 g/Kg
NaCl	N/A	2.45 g/Kg
Pluronic F-68(泊洛沙姆188, NF)	N/A	1.0 g/Kg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	N/A	0.031 g/Kg
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	N/A	0.436 g/Kg
Bacto TC酵母粉	2.0 g/Kg	10.7 g/Kg
植物蛋白腴	N/A	6.92 g/Kg
甲胺喋呤, 2 mM	0.25 mL/Kg	N/A
NaOH, 2 N	如所需	5.67 mL/Kg
HCl, 2 N	如所需	2.5 mL/Kg
最終pH值	7.20±0.10	7.15±0.05
最終滲透壓(mOsmo/kg)	320±20	388±15

生長培養基SR-274係用於旋轉燒瓶、Wave袋、100 L接種生物反應器Z-4605及在3000 L產生生物反應器Z-3600中初始階段之575 L培養中。產生培養基SR-286僅用於3000 L產生生物反應器Z-3600中。

產生培養基SR-286及SR-372係由表5及6中所列出之類似培養基組份組成，但其中MTX含量不同(SR-286為0 nM且SR-372為100

nM)。

研發抗IL18產生之改良過程以獲得較高產生率。此新過程(過程B)引入延長細胞培養壽命且增加抗體以體積計之產生率之新培養基。產生培養基(SR-382)於產生階段中使用之養分的量不同於先前之產生培養基。SR-382之完全組成係描述於表7中。在抗IL18產生之新過程中，儘管在接種箱期間仍在培養基SR-371中培養細胞，但培養基SR-372係在產生階段前一個步驟用於接種生物反應器中。接著，在產生階段於培養基SR-382中培養細胞，其中使溫度自35°C轉變至33°C以延長細胞培養壽命，從而使培養基SR-382之效應擴展至細胞。

生長培養基SR-371係用於旋轉燒瓶、Wave袋及100公升接種生物反應器中。短程填充培養基(Short-fill medium)SR-372係用於3000公升產生生物反應器中之初始階段的575公升培養中。產生培養基SR-382僅用於3000公升產生生物反應器中。

表7：抗IL18過程B中培養基之組成

組份	生長培養基SR-371	短程填充培養基SR-372	產生培養基SR-382
PFCHO A部分，特定不含鹽之調配物	5.26 g/L	7.89 g/L	10.52 g/L
PFCHO B部分(檸檬酸鐵儲備溶液)	10 mL/L	10 mL/L	10 mL/L
重組人類胰島素	7.76 mg/L	13 mg/L	13 mL/L
右旋糖，無水	7.0 g/L	7.0 g/L	7.0 g/L
L-麩醯胺酸	0.876 g/L	0.584 g/L	0.584 g/L
碳酸氫鈉	1.6 g/L	1.6 g/L	1.6 g/L
HEPES	1.8 g/L	1.8 g/L	1.8 g/L
NaCl	2.67 g/L	2.45 g/L	0 g/L
Pluronic F-68(泊洛沙姆188，NF)	1.0 g/L	1.0 g/L	1.0 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.031 g/L	0.031 g/L	0.031 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.436 g/L	0.436 g/L	0.436 g/L
Bacto TC酵母粉	4.0 g/L	10.7 g/L	14.27 g/L
植物蛋白腴	2.579 g/L	6.92 g/L	9.23 g/L
甲胺喋呤, 2 mM	0.05 mL/L	0.05 mL/L	0.05 mL/L

組份	生長培養 基SR-371	短程填充培 養基SR-372	產生培養 基SR-382
NaOH, 2 N	3.5 mL/L	5.67 mL/L	8.95 mL/L
HCl, 2 N	2.91 g/L	2.5 mL/L	4.1 mL/kg
最終pH值	7.1-7.2	7.1-7.2	7.1-7.2
最終滲透壓(mOsm/kg)	373-403	373-403	373-403

使養分於此培養基中強化以進一步提供CHO細胞生長及抗體產生之能量來源及建構組份。在過程B中，儘管在接種箱期間仍在培養基SR-371中培養細胞，但培養基SR-372在產生階段前一個步驟用於接種生物反應器中。接著，在產生階段於培養基SR-382中培養細胞，其中使溫度自35°C轉變至32°C以延長細胞培養壽命，從而使培養基SR-382之效應擴展至細胞。

過程A：抗IL18細胞及抗EPO/R細胞於培養基SR-372及培養基SR-286中之效能

在培養基SR-371中培養表現抗IL18之細胞，該培養基具有100 nM MTX以累積用於產生階段之細胞質量。培養基SR-371係用於以中等細胞生長支持較高細胞產生率。表8展示產生抗IL18之CHO細胞於3000 L產生生物反應器中之代表性產生生長概況。以培養基SR-372使用此過程(過程A)，可獲得高達1 g/L之最終力價。

表8：於培養基372中產生抗IL18抗體(過程A)

可量測結果	實驗室規模過程(n=5) 溫度=35°C	3000 L過程(n=6) 溫度=35°C
最大細胞密度 [10 ⁶ 個活細胞/ml]	8.68	9.2
50%生存力之持續時間[天]	11	11
細胞單位產生率 [pg/細胞-天]	20.5	17.6
於50%存活時收集之以體積計產生率[mg/L-天]	98.8	81.8
50%存活時之力價 [mg/L]	1004	900

將除MTX含量以外與培養基372共有相同配方之培養基286用於抗EPO/R產生。儘管較低細胞密度通常係於產生階段獲得，但藉由使用培養基SR-286作為產生培養基來達成較高產生率以使得細胞能夠以3000 L規模產生高達1.8 g/L之抗體。如表9所概述，觀測合理細胞生長。實驗室規模結果以及3000 L運作之結果證實此培養基增加細胞單位產生率且觀測到高達1.9 g/L之最終力價。此等結果展示具有類似配方之培養基(表1及2中之SR-372及SR-286)支持大規模CHO細胞培養中之優良細胞生長及高抗體產生率。

表9：於培養基286中產生抗EPO/R抗體

可量測結果	實驗室規模過程(n=2) 溫度=35°C	3000 L過程(n=1) 溫度=35°C
最大細胞密度 [10 ⁶ 個活細胞/ml]	4.50	4.80
50%生存力之持續時間 [天]	13	13
細胞單位產生率 [pg/細胞-天]	38.0	53.2
於50%存活時收集之以體積計 產生率 [mg/L-天]	114.4	146.1
50%存活時之力價 [mg/L]	1487	1900

過程B：具有培養基SR-382之過程B中抗IL 18細胞之效能

培養基SR-382為用於抗IL-18抗體產生之擴展分批過程中的最強化培養基。過程B包括在產生階段或短程填充階段之前於接種箱中使用培養基SR-371且於接種生物反應器中使用SR-372。細胞生長與產生階段之培養基SR-372中之細胞生長相比為中等的。然而，由於溫度轉變，使用培養基SR-382獲得高達2.5 g/L之最終力價。

基於展示表現抗IL18之細胞之細胞單位產生率隨著產生培養基中

養分增加而成比例增加的研究來研發培養基SR-382。培養基SR-382為提供細胞生長與最終力價增加之間之平衡的最佳培養基。儘管最大細胞密度僅達到每毫升 5.9×10^6 個細胞，但細胞單位產生率增加兩倍。與溫度轉變組合來延長細胞培養持續時間，如表10所示達成高達2.2 g/L之最終力價。

表10：於培養基SR-382中產生抗IL18抗體(過程B)

可量測結果	實驗室規模過程(n=1) 溫度=35-33°C	3000 L過程(n=1) 溫度=35-33°C
最大細胞密度 [10^6 個活細胞/ml]	7.85	5.90
50%生存力之持續時間 [天]	12	13
細胞單位產生率 [pg/細胞-天]	32.0	42.1
於50%存活時收集之以 體積計產生率[mg/L- 天]	181.1	191.8
50%存活時之力價 [mg/L]	2173	2110

實例2：用於表現抗體之改良分批饋料方法及饋料溶液

以分批模式運作之生物反應器之廢培養基分析展示耗盡特定胺基酸。即使未經量測，但此發現亦暗示耗盡了其他培養基組份，其可導致額外營養缺乏。為補償此等可能之缺乏，添加養分溶液。在工程設計領域中，此方法一般稱作分批饋料。

就操作觀點而言，便利地使用濃縮饋料溶液。以下實例描述添加經化學定義之基本培養基(PF CHO，目錄號67411-50L)及複合水解產物(例如酵母粉及植物蛋白朊)之高度濃縮溶液。判定此對水解產物展現與其濃度比率相關之產生率增加協同效應。

實例2.1：阿達木單抗分批饋料方法

初始阿達木單抗(Humira/D2E7)過程係由移除且補充培養基連續八次之3天過程組成。藉由以水解產物酵母粉替代培養基中之水解產物Primatone且藉由使用新反應器參數來研發改良分批饋料方法。改良分批饋料方法持續大約12天。

藉由再調配基本培養基(PFCHO)且添加新水解產物(亦即植物蛋白腴)進一步改良初始分批過程之產生率。將含有培養基調配物之此水解產物用於以上稱作SR-286之方法中(參見表2)。亦研究反應器操作參數，致使運作整個阿達木單抗產生過程之最佳溫度得以識別。

每日自反應器實驗獲得之樣本分析突顯一些可能之營養缺乏。

● 對於阿達木單抗分批過程之情況而言，藉由饋入25x濃縮PFCHO溶液及水解產物酵母粉(yeastolate)及植物蛋白腴之33x溶液來處理可能之營養缺乏。水解產物為複合組份，其展現與濃度比率相關之協同效應。將此比率維持在高度濃縮之33x型。

實驗計劃

實驗之目標為比較新分批饋料方法與兩種分批對照方法(溫度轉變 $37 \rightarrow 33^\circ\text{C}$ 相對於恆定溫度 35°C)。

分批饋料修飾為：

- 1. 基於胺基酸缺乏而饋入25x基本培養基強化(PFCHO溶液)。
- 2. 以一定時間間隔饋入33x水解產物強化溶液而使得培養基之滲透壓決不超過440 mOsm(產生降低細胞生長及生存力之條件)。
- 3. 反應器溫度設定點始終為 35°C 。

此實驗之對照為：

- a) 相同反應器以當前培養基(SR-286)且在對照分批方法參數(對照條件包括反應器以溫度轉變及線性pH斜坡運作SR-286培養基)下操作，命名為對照#1；及
- b) 相同反應器以當前培養基(SR-286)且在除操作溫度始終為 35°C 以

外之所有當前分批方法參數下操作，命名為對照#2。

材料

具有13 L工作體積之Braun ED反應器；

使用Working Cell Bank WCB970513-6之領試工廠接種物(Pilot Plant Inoculum) AFI915A；

3XP11Y7P基本培養基溶液(SR-286)；

基本培養基強化溶液(25x)(PF CHO溶液)；

水解產物強化溶液(33x)；

葡萄糖饋入器(feed shot)(200 g/L)(葡萄糖溶液)；

用於pH控制之0.5 N氫氧化鈉溶液。

溶液製備：

1. 產生培養基(參見上文於表2中所述之SR-286溶液記錄)

2. 2 kg PFCHO強化溶液(25x)(基本強化溶液)：

在恆定攪拌下且使得於各添加步驟後混合10分鐘，以以下次序製備：

組份	質量[g]	註解
MilliQ H ₂ O	1500	
PFCHO	131.5	
10 N NaOH	49 mL	直至pH 10
天冬醯胺酸	15	pH值將降至約9.73
葡萄糖	100	pH值將降至約9.71
MilliQ H ₂ O	如所需	使重量為2000 g，pH值為約9.70，滲透壓為約1480 mOsm

以0.2 μ PES過濾膜過濾在4°C下儲存

每次添加初始體積的1%之以上溶液將增加：

a)與原始3x濃度相比，PFCHO濃度增加0.25x

b)天冬醯胺酸增加75 mg·L⁻¹

c)葡萄糖濃度增加0.5 g·L⁻¹

d)滲透壓增加10 mOsm

e)pH值增加約0.10個pH單位

3.1 Kg水解產物強化溶液(33x)：

在恆定攪拌下且使得於各添加步驟後混合10分鐘，以以下次序製備：

組份	質量[g]	註解
MilliQ H ₂ O	500	
TC酵母粉	265	
植物蛋白朊	165	
MilliQ H ₂ O	如所需	使重量為1000 g
以0.2 μ PES過濾膜過濾在4°C下儲存		
注意：每次添加初始體積的1%之以上溶液將增加：		
a)與原始分批濃度相比，TC酵母粉濃度增加2.65 g/L(0.33x)。		
b)與原始分批濃度相比，植物蛋白朊濃度增加1.65 g/L(0.33x)。		

方法：

反應器操作：

為接種反應器，根據Humira接種箱方法之描述使小瓶解凍且膨脹。在反應器中生長後，抽汲反應器至3.62 L以刺激短程填充階段。接著，以產生培養基(SR-286)將反應器注滿至13 L含量。

以下列參數操作反應器：

- a) 攪拌70 RPM；
- b) 溫度35°C；
- c) pH值線性斜坡自pH 7.16起始，經72小時時期至pH 6.90；
- d) 溶氧30%；
- e) 當葡萄糖含量低於2.0 g·L⁻¹時，向反應器中饋入195 g 200 g/L之葡萄糖溶液。

饋入時程

以下描述表示用於向阿達木單抗批料中添加額外養分(亦即補充基本培養基)及水解產物之饋入時程。

表11：阿達木單抗分批饋料方法之饋入時程

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

結果：

比較對照方法#1及#2與改良分批饋料方法之結果(以及預計之改良)係描述於表12及13中。如表12所示，在恆定溫度下使用改良分批饋料方法，藉由添加增強之強化基本培養基及水解產物強化溶液而增加阿達木單抗產生率。

表12：比較阿達木單抗分批饋料方法

可量測結果	對照物#1 (3000 L過程)溫 度=37°C↓33°C	對照物#2 (3000 L過程) 溫度=35°C	分批饋料實驗 溫度=35°C
最大細胞密度 [10 ⁶ 個活細胞/ml]	3.63	4.45	4.41
50%生存力之持續 時間 [天]	13	10	12
細胞單位產生率 [pg/細胞-天]	42.5	46.7	61.4
於50%存活時收集 之以體積計產生率 [mg/L-天]	98	114	163
50%存活時之力價 [mg/L]	1322	1178	1979

表 13：使用阿達木單抗分批饋料方法比較預計結果

預計結果	對照物#1 (3000 L過程) 溫度=37°C↓33°C	對照物#2 (3000 L過程) 溫度=35°C	分批饋料實驗 溫度=35°C
每年之收集物 [使得以3天進行 周轉]	22	28	24
每年之產物產量 (基於2600 L收集物) [Kg/年]	75.6	85.7	123.4
每年增加之產量 (對照物=100%)	100%	114%	163%

● 實例 2.2：ABT-874 分批饋料方法

關於以上所提及之阿達木單抗之改良分批饋料方法的情況，每日自以分批模式運作ABT-874之反應器獲得之樣本的分析突出了胺基酸耗盡。此外，藉由使用25x PFCHO溶液及濃縮33x水解產物溶液來解決此缺乏。

關於D2E7，最初藉由替代培養基中之水解產物且引入新的反應器參數來研發ABT-874之分批過程。此外，如D2E7(阿達木單抗)之情況，再調配基本培養基且添加新的水解產物。將此培養基調配物作為SR-286用於當前之D2E7方法中(參見上表2)。

實驗計劃：

實驗之目標係比較皆於先前識別出胺基酸耗盡時起始之對照分批過程與以下分批饋料條件：

- 替代地饋入基本培養基強化25x PFCHO及33x水解產物強化溶液；
- 每日饋入基本培養基強化25x PFCHO及33x水解產物強化溶液。

此實驗之對照物包括以當前培養基(SR-286)且在對照分批過程參數(SR-286培養基，具有溫度轉變及線性pH值斜坡)下操作之相同反

應器。

材料：

- 具有13 L工作體積之Braun ED反應器；
- Working Cell Bank W990107-J695；
- 3XP11Y7P基本培養基溶液(SR-286-111899-1)；
- PFCHO-0-500-HG2Y生長培養基；
- 基本培養基強化溶液(25x)；
- 水解產物強化溶液(33x)；
- 0.5 N氫氧化鈉溶液。

溶液製備：

1. 產生培養基(參見SR-286溶液記錄)
2. 25x PFCHO溶液(基本強化溶液：描述於先前實例中；但使用462 g葡萄糖溶液替代葡萄糖粉末，因此最終重量為2170 g)。
 - 注意：每次添加初始體積的1%之以上溶液將增加：
 - a) 與原始3x濃度相比，PFCHO濃度增加0.25x；
 - b) 天冬醯胺酸增加75 mg·L⁻¹；
 - c) 葡萄糖濃度增加2.1 g·L⁻¹；
 - pH值增加約0.10個pH單位。
3. 33x水解產物溶液(描述於先前實例中，添加2.40 g·L⁻¹葡萄糖)

注意：添加初始體積的1%之以上溶液將增加：

- a) 與原始分批濃度相比，TC酵母粉濃度增加2.65 g/L(0.33x)。
- b) 與原始分批濃度相比，植物蛋白朊濃度增加1.65 g/L(0.33x)。

方法：

為接種反應器，根據ABT-874接種箱方法之描述使小瓶解凍且膨脹。在反應器中生長後，將反應器抽汲至4.06公升(如表13所述，運作名稱為B9013-ED2及B9014-ED3)以刺激短程填充。接著，以常規產

生培養基(SR-286)將反應器注滿至13 L含量。

根據以下參數操作反應器：

- a) 攪拌70 RPM；
- b) 溫度33°C；
- c) pH 6.90；
- d) 溶氧40%。

表13：ABT-874之饋入時程

天	饋入量[g]			
	交替饋入時程運作名稱 B9013-ED2		每日饋入時程運作名稱B9014-ED3	
	25x PFCHO	33x水解產物	25x PFCHO	33x水解產物
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				

結果

下文在表14及15中描述比較改良分批饋料方法之結果。

表14：分批饋料方法結果

參數	對照物 (1000 L過程) 溫度=33°C	交替分批饋 料實驗 溫度=33°C	每日分批饋料 實驗 溫度=33°C
最大細胞密度 [10 ⁶ 個細胞/ml]	3.79	5.39	4.15
50%生存力之持續時 間 [天]	14至76%	15	15
細胞單位產生率 [pg/細胞-天]	71	83	82
於50%存活時收集之 以體積計產生率 [mg/L-天]	188	281	212
50%存活時之力價 [mg/L]	76%時2505	3995	3033

表15：分批饋料方法結果

預計結果	對照物 (1000 L過程) 溫度=33°C	交替分批饋 料實驗 溫度=33°C	每日分批饋料實 驗 溫度=33°C
每年之收集物 (允許以3天進行周 轉)	21	20	20
每年之產物產量 (基於2600 L收集物) [Kg/年]	137	208	158
每年增加之產量 (對照物=100%)	100%	152%	115%

實例3：用於增加分批饋料培養物之以體積計之產生率的穩定組合饋料溶液

以下實例描述調配穩定高濃度饋料溶液之新穎方法，該等饋料溶液包括兩種水解產物、至少一種除麩醯胺酸以外之胺基酸、糖及經化學定義之培養基。所得饋料溶液能夠增加產生重組蛋白之哺乳動物

201346032

細胞株的以體積計之產生。最後，提出基於葡萄糖濃度之反饋控制而研發之分批饋料方法之加速方法。

材料及方法

組合饋料含有水解產物 Bacto TC 酵母粉 (RM-216)(BD Difco 255771)及植物蛋白朊(BD Difco 2922450)加上葡萄糖、L-天冬醯胺酸單水合物(Sigma-Aldrich)、還原形式之DMEM/F12(移除NaCl、磷酸鹽、pH值指示劑及其他非必需組份；Invitrogen 12500)或Ex-Cell PFCHO(A)-S1(經修飾之缺乏)w/o 麩醯胺酸、w/o NaHCO(JRH Biosciences 67411-500L35470)。

為製備溶液，使用具有PMQ004D2過濾包裝之Millipore Milli-Q過濾水。使用臺式電磁攪拌器將材料溶解於特定質量之水中。在添加各組份後，在併入下一組份前視覺驗證完全溶解。

若適用，則使用HACH 2100P攜帶型濁度計(Hach Co. Loveland, CO)對濁度定量。人眼偵測濁度之臨限值約為15 NTU(散射濁度單位)。

藉由經由級聯空氣及氧流動控制pH值、溫度、攪拌及氧，以1.5 L之操作體積於3 L Applikon生物反應器中進行生物反應器實驗。以Cedex(Innovatis AG, Bielefeld, Germany)進行細胞計數。使用YSI 2700(YSI Inc., Yellow Springs, OH)測定葡萄糖、乳酸鹽且在一些情況下亦以Nova Bioprofile 400(Nova Biomedical Corp., Waltham, MA)測定額外代謝物。使用ABL 5血氣分析儀(Radiometer A/S, Copenhagen, Brønshøj, Denmark)驗證氧(pO_2)、二氧化碳(pCO_2)之平衡分壓及pH值。

實例3.1：使用PFCHO作為基本培養基製備穩定組合饋料

單一高濃度饋料會促進細胞培養物分批饋料之製造，因為其降低所需添加物之體積及數量。然而，其係複雜的，因為PFCHO粉末

201346032

必須於pH值大於9.00時溶解。此外，水解產物在中性pH值條件下為可溶的。因此，嘗試將兩種組份於中性或高pH值下簡單混合將會導致(非溶解)粉末懸浮液。如文獻中所報導，"完全最佳化飼料通常以支持一種以上引入速率及飼料pH值(例如由於溶解度之原因)之兩種或兩種以上分離溶液存在"[1]。

組合飼料穩定性實驗

如下表所述，確定添加水解產物會使得PFCHO濃度保持穩定歷時較長時段。依次向約700 g水中添加組份量為20 g Kg⁻¹ PFCHO、7.5 g Kg⁻¹天冬醯胺酸、21 g Kg⁻¹葡萄糖、22 g Kg⁻¹酵母粉及14 g Kg⁻¹植物蛋白脛且最後添加水以達成1 Kg之最終重量。將溶液混合且接著以HCl 2.0 N使其pH值降至目標pH值。在下表中，藉由以肉眼視覺觀測來測定濁度。

表 16：最終 pH 值對不同組合飼料調配物之影響

	調配物	最終溶液pH值				
		6.75	7.00	7.25	7.50	7.75
1	使PFCHO、天冬醯胺酸及葡萄糖於pH值為10.0時溶解	N/A	N/A	N/A	在4小時前完全沈澱	
2	與以上(1)相同至pH值為7.75，接著添加植物蛋白脛及酵母粉	N/A	N/A	最終pH值為7.3	N/A	N/A
3	與以上(2)相同，接著pH值為6.75、7.00、7.25、7.50、7.75	30-60 min內輕微濁度；但所得溶液保持穩定				

由表16可知，最小濁度為2)及3)之pH 6.75及7.25。注意，2)及3)即使在接近24小時後亦不變混濁。基於此等結果，顯然由於達成低濁度，水解產物使溶液中之PFCHO穩定。

只要水解產物使所得混合物穩定，則可將植物蛋白脛及酵母粉於pH值為10.0時添加至PFCHO溶液中；接著使整個混合物降至目標pH值。此添加次序將去除尤其在混合較大體積時不穩定之使PFCHO溶液保持低於8.0之pH值的不穩定步驟。

為測試先前假設，吾人以分別含有20及7.5 g·Kg⁻¹ PFCHO及天冬醯胺酸之調配物測試此新的添加次序。將所得溶液X-1分開，且使其降至pH 7.0、6.75、6.5及6.25。如可於下圖中觀測，證明此等溶液為穩定的：

表 17. 不同 pH 值時調配物 X-1 之濁度概況 (NTU)

時間[小時]	pH值			
	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

三小時後，最少混濁溶液之pH值為6.5。濁度之明顯減少(尤其對於pH值為7.0而言)係由於一些微粒沈降。

葡萄糖作為穩定劑

測試添加200 g Kg⁻¹葡萄糖作為穩定劑之調配物(參見表18)。

表 18. 經稀釋 D2E7 饋料溶液

MilliQ H ₂ O	750.0	g·Kg ⁻¹ 水過量
葡萄糖	200.0	
PFCHO	20.0	
NaOH 10 N		→ pH 10.00
+		
天冬醯胺酸	2.29	
酵母粉	15.7	
植物蛋白朊	10.0	
+		
HCl 5 N		→ pH 6.75-7.50

依次稱重且添加組份。應降低水之初始質量以達成1 Kg最終質量。

如可於下表中觀測，證明此溶液在一定pH值範圍內穩定若干小時：

表19. 隨時間及 pH 值變化之組合饋料之濁度讀數 (NTU)

時間[小時]	pH 值			
	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

使用包含葡萄糖之經修飾之組合饋料溶液來表現兩種不同抗體，亦即阿達木單抗(D2E7)及抗IL-18抗體ABT-325。

穩定D2E7產生之組合饋料溶液

若添加至生物反應器中之調配物體積係以最低濃度之組份(亦即PFCHO)計，則需要添加極大量饋料來匹配已個別評估之量。因此，較高濃度為產生有效饋料調配物之下一步驟。此溶液係稱作D2E7組合饋料溶液且描述於下表中。

表20. D2E7組合饋料溶液

	MilliQH ₂ O	750.0	g·Kg ⁻¹	
	葡萄糖	150.0		
	PFCHO	27.0		
	NaOH 10 N			→ pH 10.00
+	天冬醯胺酸	3.1		
	酵母粉	21.2		
	植物蛋白腓	13.5		
+	HCl 5 N			→ pH 6.75

依次稱重且添加組份。應降低水之初始質量以達成1 Kg最終質量。

測試具有200、150及100 g Kg⁻¹葡萄糖之調配物。如下表可見，此等溶液亦具有穩定濁度歷時若干小時。表21展示添加葡萄糖會降低溶液濁度。

表21. 隨葡萄糖濃度變化之D2E7組合饋料溶液之濁度時間概況

時間[小時]	葡萄糖[g/Kg組合饋料]		
	100	150	200
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

如表21所示，增加葡萄糖含量會減低溶液濁度。基於濁度水平認為，此等不同調配物可為過濾實驗所接受。

穩定ABT-325產生之組合饋料溶液

如表22所示，為獲得穩定ABT-325組合饋料，根據用於D2E7組合饋料之方法製備50 L之當前調配物。

表22. ABT-325組合饋料溶液

	MilliQH ₂ O	750.0	g·Kg ⁻¹	→	pH 10.00
	葡萄糖	150.0			
	PFCHO	21.0			
	NaOH 10 N				
+	天冬醯胺酸	5.0			
	酵母粉	65.0			
	植物蛋白腓	40.0			
+	HCl 5 N				

依次稱重且添加組份。應降低水之初始質量以達成1 Kg最終質量。

如可於下表中觀測，在製備期間，溶液維持大約20-30 NTU之濁度水平：

表23. ABT-325組合饋料之濁度

時間[小時]	濁度[NTU]
0.00	41.8
1.00	28.7
1.50	19.8
2.00	20.0
3.50	14.5

根據D2E7方法製備50 L ABT-325調配物組合饋料溶液以測試製備方法之可調能力及適用性。如上所示，溶液保持穩定歷時四小時。

應注意，以上實例中所提及之PF CHO培養基對應於實例1之細胞培養基中所提及之經修飾之PF CHO(經修飾之A部分)。

實例3.2：使用DMEM-F12作為基本培養基製備穩定組合饋料

如先前實例中所描述，可能製造具有PFCHO及兩種水解產物以及葡萄糖之穩定組合饋料溶液。以下實例證實此方法可應用於任何基本饋料調配物且產生穩定組合饋料溶液。

將DMEM-F12(一種可公開獲得之培養基調配物)修飾以使其與組合饋料製劑可相容，此處命名為DMEM-F12m。移除以下組份：NaCl、NaHCO₃、NaH₂PO₄·H₂O、Na₂HPO₄、D-葡萄糖、HEPES、Na·次黃嘌呤、酚紅、L-麩醯胺酸及胸苷。根據實例3.0及3.1中所述之方法製備與D2E7及ABT-325饋料調配物匹配之組合饋料。最終組份及調配物次序係展示於下表中：

表 24. DMEM-F12組合饋料

	饋料I	饋料II	
MilliQH ₂ O	600.0	600.0	g·Kg ⁻¹
葡萄糖	150.0	150.0	
DMEM-F12m	27.0	21.0	
+			→ pH 10.00
NaOH 10 N			
天冬醯胺酸	3.1	5.0	
酵母粉	21.2	65.0	
植物蛋白腓	13.5	40.0	
+			→ pH 6.75
HCl 5 N			
MilliQH ₂ O	至1000 g		

依次稱重且添加組份以達成1 Kg之最終質量。

饋料I及II在製備之後維持12 NTU或更小之濁度歷時4小時以上。

實例3.3：歸因於組合饋料添加之細胞生長及產生率增強

為評估以上組合饋料之生長及力價促進特徵，使用ABT-874細胞(表現抗IL-12完全人類IgG1抗體)。此CHO細胞株通常係於細胞培養基SR-383(2X，具有500 nM mtx)中培養。

對於此等實驗而言，使細胞繼代為DMEM/F12歷經至少5代，直至觀測到適應恆定生長速率。在35°C及5% CO₂下之恆溫箱中，於Thermolyne攪拌盤上以70 rpm攪拌旋轉培養物。在接種之前即刻自維持培養物中獲取所需量之細胞懸浮液。將細胞離心，丟棄上清液且將離心塊再懸浮於新製預溫之培養基中以獲得4×10⁵/mL之接種密度。

使細胞培養物於旋轉器中膨脹直至產生足以用於生物反應器接種之體積，以在1.5 L Applikon生物反應器中達成1:5之分流比。反應

器運作條件為pH 6.9、35°C、150 rpm且溶氧含量為40%飽和。所有生物反應器實驗均雙重複執行。在運作過程中，每隔一天給予細胞三次初始反應器體積的1%之組合饋料快速注射。

使用兩種組合饋料會極大地增強細胞培養物生長。對於CF I之情況，與對照物之13天相比，儘管培養僅持續10天，但達成雙倍峰值細胞密度。對於CF II之情況，與對照物及持續類似時間之培養相比，峰值細胞密度幾乎為三倍。就最終力價而言，觀測到更顯著之效應。DMEM/F12培養基之力價大約為41 mg/L，相對CF I之188及CF II之434。不同饋料溶液對最大細胞密度、培養長度、力價及單位產生率之影響係概述於下表中：

表 25. DMEM-F12m 組合饋料之效能

描述	參數				
	峰值細胞密度[10 ⁶ 個活細胞/mL]	最終 IVC[×10 ⁶ 個細胞-d/mL]	培養長度[d]	最終力價 [mg/L]	qp [pg/細胞-d]
對照物(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

實例 3.4：經由添加組合饋料之高力價細胞培養過程

較高力價使得需要較少製造運作來滿足給定總產量。以下實例描述於分批饋料方法中產生平均約4 g/L力價之ABT-874之分批饋料大規模過程。此外，培養基及組合饋料之進一步改良使得達成超過6 g/L之力價水平。

材料及方法

使用ABT-874抗體產品線作為模型系統。

饋料溶液製備

饋料溶液係根據先前所述之程序製成。使用兩種天冬醯胺酸濃度，亦即5.0或7.5 g·Kg⁻¹。製備方法係展示於下表中：

表 26. ABT-874 組合飼料製備

1	MilliQ H ₂ O	600.0	g·Kg ⁻¹
2	葡萄糖	150.0	
3	PFCHO	21.0	
+	4	NaOH 10 N	→ pH 10.00
	5	天冬醯胺酸	5.0或7.5
	6	酵母粉	65.0
	7	植物蛋白朮	40.0
+	8	HCl 5 N	→ pH 6.75

依次稱重且添加組份以達成 1 Kg 之最終質量。

使用臺式電磁攪拌器，在強烈渦旋下將材料溶解於特定質量之水中。在添加各組份後，在併入下一組份之前視覺驗證完全溶解直至步驟 5。然而，其對於步驟 6 及 7 為不可能的。對於此兩個步驟，認為併入溶液中之粉末足以進入最終 HCl 添加。

過程培養基篩檢

為獲得基線效能資料，進行以 3X 分批飼料 (FB) 3000 L 作為對照物，以原型 4X FB 方法及非饋入 (擴展分批：EB) 3X 及 4X 條件為特徵之實驗。詳言之，已提出較高培養基濃度會於培養物生長概況中產生初始停滯；然而，對於擴展分批 (EB) 3X 或 4X 方法，未觀測到顯著停滯。

如所期望，對於 3X 及 4X 方法而言，飼料補充會產生較高力價。然而，若饋入 (亦即分批飼料)，則觀測到 4X 方法之顯著生長抑制。小規模實驗之胺基酸分析展示，即使在饋入後，仍存在胺基酸天冬醯胺酸及麩醯胺酸之完全耗盡。為此，總饋入時間及組合飼料中之天冬醯胺酸的量皆增加。總之，確定 4X FB 方法可能達到比 EB 方法或 3X FB 對照物高之最終力價。因此，將其選為起始點以供進一步研發。

3X 分批飼料方法 (對照物) 與 4X 分批飼料方法之間之不同係描述

於表27中且於下文中更詳細描述。

饋入起始時之活細胞密度

觀測到，於極低細胞密度下起始饋入傾向於抑制細胞生長且最終抑制最終力價。因此，預期由於細胞饑餓，過度延遲之饋入將引起以體積計之產生率損失。

為研究以上假設，進行若干實驗以確定於不同活細胞密度下饋入之顯著性。將彼等實驗之組合結果繪於圖1描述之圖中。如圖1中可見，第15日之力價展示與饋入起始日活細胞密度具有強相關性。由資料點擬合之三級多項式展示，在 3.5×10^6 個細胞·ml⁻¹之饋入密度下可預期第15日之最大力價。

再現性

6 g·L⁻¹方法之過程條件係描述於下表27中且定義為自SR-383短程填充運作(pH 7.0, DO=30%, 37°C) 1:4分流，直至 5.0×10^6 個活細胞/ml之細胞密度之接種。反應器運作條件為pH 6.9、T=35°C、DO=40%。饋入係經由每天快速添加由初始反應器重量的1%組成之組合饋料，於細胞達到 3.5×10^6 個細胞/ml之活細胞密度時起始，持續10天。

4 g·L⁻¹方法之過程條件係描述於以下表27中。

表27. 4及6 g L⁻¹ ABT-874細胞培養方法之重要部分

參數	方法	
	3X FB	4X FB
培養基	SR-286(3XPFCCHO)	SR-382(4XPFCCHO)
分流比	1:5	1:4
接種密度[10 ⁶ 個活細胞·ml ⁻¹]	0.5-1.0	1.0-1.25
饋入起始標準	第3天	3.5×10^6 個細胞·ml ⁻¹
饋入量[%]	1	1
饋入長度[天]	7	10
饋料中之天冬醯胺酸 [g·l ⁻¹]	5.0	7.5
溫度轉變	3.5×10^6 個細胞·ml ⁻¹ 時，33°C	無
最終力價	4 g·L ⁻¹	6 g·L ⁻¹ ±0.24(n=9)

實例3.5：經由葡萄糖反饋控制使用組合饋料之分批饋料

反饋控制使得對系統本質行為之極有限理解靶向給定參數之設定點。以此方式，可維持標靶之設定點與系統可能經受之任何干擾或改變均無關。由於哺乳動物細胞培養物代謝之複雜性，故產生可允許預測培養給定軌跡之綜合模型需要大量工作。然而，可需要研發能夠供應葡萄糖以維持目標葡萄糖含量之取樣方法(例如藉由使用自動取樣)。其使得給定葡萄糖濃度(或其他代謝物)之效應減弱且亦提供研究組合饋料中不同比率之葡萄糖對不同培養物之影響的方式。效應減弱係指維持所給定葡萄糖含量之效應，相對在組合饋料中使用不同量葡萄糖之效應。

材料及方法

使用兩種不同抗IL-12抗體(ABT-874及1D4.7)之產品線作為模型系統。

選擇自動取樣(亦即YSI 2700 Bioprocess Analyzer)作為監控細胞培養基中葡萄糖含量之方式。線上自動取樣裝置係藉由將YSI 2730監控器及控制附件附接至YSI 2700 Bioprocess Analyzer(參見YSI Life Sciences ; Yellow Springs, OH)上而建立的。此取樣裝置由固持兩個管之泵組成。第一個管具有兩條分支，一條收集來自生物反應器之樣本且第二條抽汲消毒劑以維持無菌。樣本一經獲得，則將其泵入外腔室中，吸管(sipper)自外腔室中獲取樣本以供實際分析。使用縱穿泵之第二個管來收集進入廢料容器中之排出物。控制線上取樣附件之若干參數，諸如取樣時間間隔及TPU(每單位誤差時間，其對應於基於所量測之相對於設定點之偏移的饋入泵運作時間)。

使用15針腳連接器將泵連接至YSI。將對應於YSI中之葡萄糖探針(白色-7，黑色-11)之針腳連接至泵中之TTL開/關針腳(8)，且將來自YSI(1-5)之一接地針腳連接至泵之15針腳連接器的底盤。藉由將泵

由YSI配置選單打開及關閉來測試連接。所使用之泵管為Masterflex CFLEX 082。

表 28：反饋初始實驗配置

細胞	ABT-874
培養基	3XPFCCHO(SR-286)
葡萄糖饋料	400 g/L
YSI TPU	16
所測試之反應器體積	1.5 L
YSI淨化時間	60 sec
泵速度	50(一半，約16 RPM)
YSI取樣時間間隔	4小時/2小時(以下解釋)
YSI輸出信號	X2(對於YSI1-A25而言)
消毒劑	0.1 N NaOH

將YSI1-A25反應器控制於4.9 g/L葡萄糖。將葡萄糖控制於4.9 g/L係於約第2日起始使用4小時之取樣時間間隔直至第8日。於第8日，使取樣時間間隔降低至2小時，且再設定YSI自動裝置之設定點以抹去PID記憶。歸因於相對於設定點的突增之波動於第8日顯著降低。因此，確定2小時之取樣時間間隔對於此等條件而言為最佳的。第2日至第8日之平均突增為0.43 g/L且平均負向尖峰為0.31 g/L，其中相對於設定點之波動誤差為約8%。另一方面，第8日至第13日之平均突增為0.08 g/L且平均負向尖峰為0.09 g/L，其中波動誤差為約2%。

使用組合饋料控制葡萄糖濃度

經由經驗方法定義向生物反應器中之培養物中饋入組合饋料溶液之時程。測試不同饋入量以及不同饋入時間，直至發現活細胞分批饋料時程。理想地，組合饋料之饋入時程應滿足給定培養物之特定要求。

鑒於以上考慮，基於細胞培養物需要，(例如)藉由使用葡萄糖作為營養要求指示劑來提供組合饋料為有利的。以此方式，反饋控制系

統可用以1)測試具有不同葡萄糖濃度之不同饋料；及2)使用所產生之饋入概況於較大規模培養中進行人工饋入。

下表概述使用產生1D4.7 mAb之細胞株之兩種不同反應器操作模式。參考實驗(表29中稱作基線)說明在1.5 L Applikon生物反應器中於pH 6.9、T=35°C、DO=40%下運作之SR-372培養基中之擴展分批過程的典型力價效能。YSI實驗係在相同條件加上反饋控制下運作，以供應含有100、150或200 g·L⁻¹葡萄糖之組合饋料。

表29.使用組合饋料之反饋控制效能

實驗	最終力價 [mg/L]
基線(n=2)	1312+/-33
YSI 100 (n=1)	1974
YSI 150 (n=2)	2044+/-164
YSI 200 (n=2)	1837+/-163

如表29中可見，使用各種組合饋料之反饋系統極大地改良了抗體之最終力價。

藉由稱重每天供應之組合饋料的量獲得來自實驗(如先前實驗)之饋入概況。典型饋入概況係呈現於下表中：

表30.經由反饋控制產生之典型饋入概況(1D4.7抗體之概況)

天	饋料[%]
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

即使在無反饋控制系統之情況下，亦可手動進行以上流程以向反應器饋料。以此方式，饋入時程可成比例增加。

結果之概述

展示利用水解產物與經化學定義之基本培養基之混合物的分批饋料方法會增加哺乳動物細胞培養物中所分泌之mAb之最終力價。

此外，亦證實能夠產生以下穩定組合饋料之方法：

表 31. 穩定組合饋料

	X-1	經稀釋 D2E7	D2E7	ABT-325、 ABT-874	饋料I	饋料II	
葡萄糖	21	200	100, 150, 250	150	150	150	g·Kg ⁻¹
PFCHO (p) DMEM- F12m(d)	20(p)	20 (p)	27(p)	21(d)	27 (d)	21 (d)	
+ NaOH 10 N							→ pH 10.00
天冬醯胺酸	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	
植物蛋白腴	14	10.0	13.5	40.0	13.5	40.0	
+ HCl 5 N							→ pH 6.75
MilliQ H ₂ O	至1000 g						

描述於表31中之組合饋料係以MilliQH₂O起始(高達750 g)製成。如上所述，將成份添加至水中至1000 g之最終重量(組合饋料之總重量)。此外，亦展示組合饋料溶液會增加細胞培養物壽命、峰值活細胞密度及單位產生率。證實使用組合饋料之細胞培養物分批饋料方法能夠達到高達6 g·L⁻¹之所分泌單株抗體之力價水平。亦展示以上組合饋料增加細胞培養物之細胞密度。

最後，亦展示採用反饋控制系統及不同組合饋料之方法能夠增加力價水平。此方法可用以藉由快速產生饋入時程而加速細胞培養方

法之進展。

參考文獻

1. Whitford, W.G., Fed-Batch Mammalian Cell Culture in Bioproduction. BioProcess International, 2006. 30-40。
2. YSI Incorporated. (1998) YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer User's Manual。
3. YSI Incorporated. (1998) YSI 2730 Monitor and Control Accessory User's Manual。
4. Watson Marlow Pumps. 101F, 101U User's Manual。

● 實例4：應用丁酸鈉及N-乙酰基半胱胺酸以增加產生抗IL-18之CHO細胞株之產生率

本發明涵蓋一種增加抗體(例如產生抗IL-18之CHO細胞株)產生率之新穎方法。更特定言之，以下實例係關於經由向細胞培養基中添加化學物質來增加最終抗體(例如抗IL-18)力價。下文使用例示性抗體，亦即IL-18抗體描述細胞生存力及抗體力價之改良。

細胞株及培養基

用於以下實例之抗IL-18抗體為IL-18之完全人類IgG1抗體(Ab)。

● 表現抗IL-18之CHO細胞株係於以上實例1之表4中所述之生長培養基SR-371中培養。細胞株之產生培養基亦係描述於以上實例1中，即SR-372(用於旋轉燒瓶中之培養)及SR-382(用於生物反應器中之培養)。

於旋轉燒瓶中進行之實驗之培養條件

所有旋轉燒瓶實驗均雙重複執行。在35°C及5% CO₂下之恆溫箱中，於Thermolyne攪拌盤上以80 rpm攪拌旋轉培養物。在接種之前即刻自維持培養物中獲取所需量之細胞懸浮液。將細胞離心，丟棄上清液且將離心塊再懸浮於新製預溫之培養基中以獲得4×10⁵/mL之接種密度。

實例4.1：丁酸鈉對於在生長培養基中培養之產生抗IL-18之CHO細胞株的生長及產生率之影響

為測定丁酸鈉之濃度範圍，於含有各種濃度丁酸鈉之SR-371中進行第一實驗。實驗係於具有70 mL工作體積之100 mL旋轉燒瓶中進行。自藉由將1.101 g丁酸鈉溶解於10 mL MilliQ水中而製備且藉由經由0.2 μm 過濾器過濾而殺菌之1 M儲備溶液添加丁酸鈉。將溶液儲存在-20°C下。

於培養開始時(第0天)，以0 mM、0.125 mM、0.5 mM及1 mM之濃度添加丁酸鈉。於此實例及以下所有實例中，以自動細胞計數器(Cedex, Innovatis, Germany)測定細胞密度及生存力。表32展示培養時間中之活細胞密度，且表33描述培養時間中之生存力。將實驗進行12天。

表 32：培養時間中之活細胞密度

活細胞密度[10⁵/ml]

天	燒瓶1: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶2: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶3: 0.125 mM 丁酸鹽	燒瓶4: 0.125 mM 丁酸鹽	燒瓶5: 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶6: 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶7: 1 mM 丁酸鹽	燒瓶8: 1 mM 丁酸鹽
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

表 33：培養時間中之生存力

生存力[%]

天	燒瓶1: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶2: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶3: 0.125 mM 丁酸鹽	燒瓶4: 0.125 mM 丁酸鹽	燒瓶5: 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶6: 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶7: 1 mM 丁酸鹽	燒瓶8: 1 mM 丁酸鹽
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

顯而易見，丁酸鈉影響細胞生長及生存力。儘管在0.125 mM之丁酸鹽濃度時對細胞生長及生存力並無明顯影響，但0.5 mM丁酸鹽對細胞生長存在明顯影響，導致較低之最大細胞密度。0.5 mM丁酸鈉在5天培養時間後影響生存力。1 mM濃度之丁酸鈉完全抑制細胞生長，且生存力自第0天起持續減低。

表34展示培養時間中之抗IL-18力價。在此實例及以下所有實例中，抗IL-18濃度係藉由Poros A HPLC檢定來測定。

力價[mg/L]

天	燒瓶1: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶2: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶3: 0.125 mM 丁酸鹽	燒瓶4: 0.125 mM 丁酸鹽	燒瓶5: 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶6: 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶7: 1 mM 丁酸鹽	燒瓶8: 1 mM 丁酸鹽
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

表34(上表)：培養時間中之抗IL-18力價

具有0.125 mM丁酸鹽之培養物之平均最終力價為352 mg/L，未經處理對照物之平均最終力價為257 mg/L。此濃度之丁酸鹽處理致使最終力價增加40%。

實例4.2：丁酸鈉對於在SR-372中培養之產生抗IL-18之CHO細胞株的生長及產生率之影響

表現抗IL-18之CHO細胞株適合於SR-372中生長以排除培養物自SR-371分流至SR-372之任何可能效應。以適合於SR-372中生長之細胞進行之所有實驗均在具有180 mL工作體積之250 mL旋轉燒瓶中進行。應用以上於標題為"於旋轉燒瓶中進行之實驗之培養條件"的章節中所概述之條件進行培養。

設計實驗以在細胞處於中間及後指數生長期時添加丁酸鹽。因為每個細胞之丁酸鹽濃度較低，所以稍後添加丁酸鹽與於第0日添加

相比可能引起對細胞之較低應力且產生改良之細胞生長及較高之IVC(IVC(活細胞積分)係定義為相對培養時間之活細胞密度之積分)。於第4日及第5日添加0.5 mM及2 mM濃度之丁酸鹽。將實驗進行12天。表4展示培養時間中之活細胞密度，表5為培養時間中之生存力。第4日僅添加2 mM丁酸鈉會導致生存力與對照物相比有所降低，其他條件不影響生存力。

表 35：培養時間中之活細胞密度

活細胞密度[10 ⁵ /mL]										
天	燒瓶1: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶2: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶3: 第4日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶4: 第4日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶5: 第4日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶6: 第4日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶7: 第5日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶8: 第5日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶9: 第5日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶10: 第5日, 2 mM丁 酸鹽
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

表 36：培養時間中之生存力

生存力[%]										
天	燒瓶1: 0 mM 丁酸鹽	燒瓶2: 0 mM丁 酸鹽	燒瓶3: 第4日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶4: 第4日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶5: 第4日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶6: 第4日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶7: 第5日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶8: 第5日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶9: 第5日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶10: 第5日, 2 mM丁 酸鹽
0	98.4	94.6	92.7	99	95.2	94.9	98.8	97.7	96.5	98.9
3	96.6	97.2	98.8	99	97.2	98	97.8	97.8	96.8	97.8
4	97	98.5	99	98.6	98.5	98	98.9	97.8	98.7	98.2
5	96.6	97.7	97.5	97.3	96.6	97.29	98	97.2	98.1	98.3
6	96.5	96.4	96.2	96	93.6	92.4	96.3	96	95.9	95.8
7	95.6	95.7	93.8	92.9	87.8	87.5	94.2	94	92.6	91.8
10	62.6	69.4	61.9	53.9	40.8	39.2	63.7	56.9	57.7	57.1
12	38.3	46.2	40.4	33.6	24.5	25.2	36.7	32.7	34.1	34.4

表37揭示培養時間中之抗IL-18力價。於第5日添加2 mM丁酸鈉導致與對照物相比增加29%(分別為317 mg/L對245 mg/L)。細胞生長在此等條件下並未受到顯著抑制(參見表35)。

天	燒瓶1: 0mM 丁酸鹽	燒瓶2: 0mM 丁酸鹽	燒瓶3: 第4日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶4: 第4日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶5: 第4日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶6: 第4日, 2 mM丁 酸鹽	燒瓶7: 第5日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶8: 第5日, 0.5 mM 丁酸鹽	燒瓶9: 第5日, 2 mM 丁酸鹽	燒瓶10: 第5日, 2 mM丁 酸鹽
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

表37：培養時間中之抗IL-18力價

實例4.3：丁酸鈉對於在3 L生物反應器中之SR-382中培養之產生抗IL-18之CHO細胞株的生長及產生率之影響

以下實例證實藉由將丁酸鈉應用於大規模(亦即3 L生物反應器)抗IL-18過程B(參見1.5章節)會導致最終抗IL-18力價增加。此過程係於3 L Applikon生物反應器中發展。接種箱係於SR-371中進行直至短程填充階段(SR-372)。在具有10 L工作體積之20 L Biowave袋中刺激短程填充階段。研究丁酸鈉對抗IL-18過程B之生長及產生率之影響的實驗係於具有1.5 L工作體積之3 L Applikon生物反應器中進行。以1125 mL SR-382填充各生物反應器且藉由添加375 mL來自含有SR-372中的抗IL-18細胞之Biowave袋之細胞懸浮液而接種。

在實例4.2中，藉由在細胞處於中間至後對數生長期時(其為旋轉燒瓶中之第5日)添加丁酸鹽來達成功力價增加。先前，3 L生物反應器中抗IL-18產生過程之中間至後對數生長期為培養時間之第7日。在此實例中，選擇第7日向培養物中添加丁酸鈉，以確保丁酸鹽係於中間至後對數生長期中添加。

200 mM濃度之丁酸鈉儲備溶液係在第7日於添加至培養物中之前即刻藉由將4.404 g丁酸鈉溶解於200 mL MilliQ水中而製備的。藉由經由0.22 μm過濾器過濾對此溶液進行殺菌。

以5個生物反應器進行實驗。各生物反應器運作係於各別生存力低於50%時終止。將兩個生物反應器用作對照物(抗IL-18過程B)。於培養時間之第7日將濃度分別為0.3 mM、1 mM及3 mM之丁酸鈉添加

至其他3個生物反應器中。表38展示培養時間中之活細胞濃度，且表39展示培養時間中之生存力。

活細胞密度[10⁵/ml]

天	反應器1: 1 mM丁酸鹽	反應器2: 無丁酸鹽	反應器3: 0.3 mM丁酸鹽	反應器4: 3 mM丁酸鹽	反應器5: 無丁酸鹽
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
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		

表 38. 培養時間中之活細胞密度

生存力[%]

天	反應器1: 1 mM丁酸鹽	反應器2: 無丁酸鹽	反應器3: 0.3 mM丁酸鹽	反應器4: 3 mM丁酸鹽	反應器5: 無丁酸鹽
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
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		

表39.培養時間中之生存力

由於反應器5中之高初始CO₂濃度，故對照培養物於反應器5中之生長比於複製物(反應器2)中之生長緩慢。反應器2於培養時間之第16日終止(先前，於抗IL-18產生過程中所觀測)，反應器5係於第17日終止。3 mM濃度之丁酸鈉(反應器4)影響細胞生長及生存力。丁酸鹽添加後兩天，細胞開始死亡。1 mM丁酸鹽不影響細胞生長及生存力(反應器1)，反應器運作係於第16日終止。細胞生長與反應器2中之對照物相比極為類似。0.3 mM之丁酸鹽使培養時間延長2天(反應器3)。表40展示培養時間中之抗IL-18力價。

力價[mg/L]

天	反應器1: 1 mM丁酸鹽	反應器2: 無丁酸鹽	反應器3: 0.3 mM丁酸鹽	反應器4: 3 mM丁酸鹽	反應器5: 無丁酸鹽
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
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		

表40：培養時間中之抗IL-18力價

反應器2(代表抗IL-18過程B)中培養物之最終力價(第16日)為2325 g/L。反應器5中之最終力價為1589 g/L。此較低力價可能係由於由培養基中之高初始CO₂濃度引起之較差細胞生長。於第7日添加1 mM及3 mM丁酸鹽產生比對照物(反應器2)低之最終力價。於第7日添加0.3 mM丁酸鹽會於第17日產生2561 g/L力價，其與對照物相比增加10%。此力價為在抗IL-18過程中達成之最高力價。

實例4.4： N-乙醯基半胱胺酸(10 mM、20 mM、40 mM、80 mM)對於在SR-372中培養之產生抗IL-18之CHO細胞株的生長及產生率之影響

N-乙醯基半胱胺酸可保護哺乳動物細胞免於細胞死亡。作為抗氧化劑，其可直接還原活性氧(reactive oxygen species)。藉由去乙醯基作用，可將其轉化為半胱胺酸且增加細胞內麩胱甘肽含量。麩胱甘肽可淨化活性氧且在將過氧化氫還原為水時充當基質。

此實例證實N-乙醯基半胱胺酸之抗IL-18力價增加效應。實驗係於具有180 mL工作體積之250 mL旋轉燒瓶中進行。培養基為SR-372。在實驗之前，如實例4.2中所述使細胞預適應SR-372中之生長。如以上在"於旋轉燒瓶中進行之實驗之培養條件"中所述應用旋轉培養條件。

藉由在加熱攪拌盤上將16.32 g N-乙醯基半胱胺酸溶解於100 mL MilliQ水中來製備1 M N-乙醯基半胱胺酸儲備溶液。藉由經由0.22 µm過濾器過濾對儲備溶液進行殺菌。於實驗開始前一天，將N-乙醯基半胱胺酸添加至SR-372中以獲得0 mM、10 mM、20 mM、40 mM及80 mM之濃度。如以上在"於旋轉燒瓶中進行之實驗之培養條件"所述，藉由將細胞自CHO抗IL-18維持培養物中離心開始實驗。各旋轉培養係於各別生存力低於50%時終止。

N-乙醯基半胱胺酸濃度為20 mM、40 mM及80 mM時，細胞不可能生長。表41及表42分別展示培養時間中活細胞密度及生存力與0 mM N-乙醯基半胱胺酸及10 mM N-半胱胺酸中細胞生長之比較。

活細胞密度[10⁵/mL]

天	燒瓶1: 無N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶2: 無N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶3: 10 mM N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶4: 10 mM N- 乙醯基半胱胺酸
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
12			27.44	27.56
13			25.77	27.86
14			22.77	24.17
15			18.40	19.22
16			14.60	16.30

表 41. 培養時間中之活細胞密度

存活力[%]

天	燒瓶1: 無N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶2: 無N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶3: 10 mM N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶4: 10 mM N- 乙醯基半胱胺酸
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

表 42. 培養時間中之生存力

對照培養(無N-乙醯基半胱胺酸)係於培養時間之第11日終止，而以10 mM N-乙醯基半胱胺酸進行之培養可延長直至第16日。最初，10 mM N-乙醯基半胱胺酸會影響細胞生長及生存力且導致生存力減低直至第3日。接著，生存力開始增加。於10 mM N-乙醯基半胱胺酸中生長之培養物之最大細胞密度與對照物相比較低。表43證實最終抗IL-18力價藉由N-乙醯基半胱胺酸而增加。

力價[mg/L] 天	燒瓶1: 無N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶2: 無N- 乙醯基半胱胺酸	燒瓶3: 10 mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶4: 10mM N- 乙醯基半胱胺酸
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

表 43：培養時間中之抗IL-18力價

對照培養物之平均最終力價為243.2 mg/L，於10 mM N-乙醯基半胱胺酸中生長之培養物之平均最終力價為418 mg/L。其與對照物相比增加72%。

實例4.5：N-乙醯基半胱胺酸(1 mM、2 mM、4 mM、8 mM)對於在SR-372中培養之產生抗IL-18之CHO細胞株的生長及產生率之影響

如實例4.4中所述，於第0日添加濃度為10 mM之N-乙醯基半胱胺酸可延長培養時間且致使最終力價增加。然而，在此濃度下，細胞生存力最初降低。基於實例4.4之結果，使用實例4.4中所測試之N-乙醯基半胱胺酸濃度之十分之一設計實驗。此旋轉燒瓶實驗之條件與實例4.4中相同。添加0 mM(對照物)、1 mM、2 mM、4 mM及8 mM濃度之N-乙醯基半胱胺酸。

表44展示培養時間中之活細胞密度，且表45展示培養時間中之生存力。

天	燒瓶1: 0 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶2: 0 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶3: 1 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶4: 1 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶5: 2 mM N- 乙醯基半胱 胺酸
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					

天	燒瓶6: 2mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶7: 4mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶8: 4mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶9: 8 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶10: 8mMN- 乙醯基半胱 胺酸
0	2.96	3.13	2.80	2.97	3.54
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

表 44：培養時間中之活細胞密度

	0mM N- 乙醯基半胱 胺酸	0 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	1 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	1 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	2mM N- 乙醯基半胱 胺酸
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					
13					
14					

天	燒瓶6: 2 mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶7: 4mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶8: 4mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶9: 8mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶10: 8mM N- 乙醯基半胱 胺酸
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

表 45：培養時間中之生存力

對照培養(0 mM N-乙醯基半胱胺酸)係於10天培養時間後終止。N-乙醯基半胱胺酸可延長培養物壽命。於8 mM N-乙醯基半胱胺酸中生長之培養物係於14天培養後終止。於N-乙醯基半胱胺酸中生長之培養物具有與對照物相比較低之最大細胞密度。

表 46 展示 N-乙醯基半胱胺酸對最終抗 IL-18 力價之影響。

力價[mg/L]					
天	燒瓶1: 0mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶2: 0 mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶3: 1 mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶4: 1 mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶5: 2mM N- 乙醯基半胱 胺酸
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					

天	燒瓶6: 2mM N- 乙醯基半胱 胺酸	燒瓶7: 4mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶8: 4mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶9: 8mM N- 乙醯基半胱胺 酸	燒瓶10: 8mM N- 乙醯基半胱胺 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

表 46：培養時間中之抗 IL-18 力價

對照培養物之平均最終抗 IL-18 力價為 245 mg/L(與實例 4.4 中之 243 mg/L 極類似)。於 8 mM N-乙醯基半胱胺酸中生長之培養物之最終抗 IL-18 力價為 481 mg/L。其與對照物相比增加 96%。

等效物

熟習此項技術者將瞭解或能夠僅使用常規實驗來辨識本文所述之本發明特定實施例之許多等效物。該等等效物意欲涵蓋於以下申請專利範圍中。本申請案全文中所引用之所有參考文獻、專利及公開專利申請案之內容係以引用的方式併入本文中。

申請專利範圍

公告本

1. 一種用於在哺乳動物細胞培養中產生阿達木單抗(adalimumab)之分批饋料方法，其中該哺乳動物細胞表現該阿達木單抗，該方法包含：

在細胞培養產生培養基中以起始pH大規模培養該哺乳動物細胞，而後在阿達木單抗生產期間，降低該pH至低於該起始pH的最終pH，其中該起始pH為8或更低且該最終pH為6.5至7.0，且其中該阿達木單抗係藉由包括蛋白A親和力層析之方法純化。

2. 如請求項1之分批饋料方法，其中該起始pH為6.5至8且該最終pH為6.5至7.0。
3. 如請求項2之分批饋料方法，其中該起始pH為7.1且該最終pH為6.9。
4. 如請求項2之分批饋料方法，其中該pH係在培養的前3天之內調整。
5. 如請求項1-4中任一項之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基包含至少兩種不同的非基於動物的水解產物。
6. 如請求項3之分批饋料方法，其中該非基於動物的水解產物包含基於植物之水解產物及基於酵母之水解產物。
7. 如請求項6之分批饋料方法，其中該基於植物之水解產物為基於大豆之水解產物。
8. 如請求項1-4中任一項之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基包含：
 - a) 經修飾之基本培養基；
 - b) 8至10 ml/kg或110至130 mg/L檸檬酸鐵；
 - c) 4至8 mL/kg或10至14 mg/kg重組人類胰島素；

- d) 5至9 g/kg無水葡萄糖；
 - e) 0.1至1 g/kg L-麩醯胺酸；
 - f) 1至3 g/kg碳酸氫鈉；
 - g) 1至3 g/kg HEPES；
 - h) 2至3 g/kg NaCl；
 - i) 0.1至2 g/kg Pluronic F-68；
 - j) 0.01至0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；
 - k) 0.1至0.1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；
 - l) 8至12 g/kg基於酵母之水解產物；及
 - m) 6至8 g/kg基於植物之水解產物。
9. 如請求項1-4中任一項之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基係以基本強化溶液及水解產物強化溶液補充。
 10. 如請求項9之分批饋料方法，其中該基本強化溶液包含PF-CHO基本培養基。
 11. 如請求項9之分批饋料方法，其中該水解產物強化溶液包含基於植物之水解產物及基於酵母之水解產物。
 12. 如請求項11之分批饋料方法，其中該基於植物之水解產物為基於大豆之水解產物。
 13. 如請求項12之分批饋料方法，其中該水解產物強化溶液包含50至280 g/L基於大豆之水解產物及75至300 g/L基於酵母之水解產物。
 14. 如請求項12之分批饋料方法，其中該水解產物強化溶液包含25x PF-CHO溶液及基於植物之水解產物蛋白腴(Phytone)與基於酵母之水解產物酵母粉(Yeastolate)的組合之33x溶液。
 15. 如請求項9之分批饋料方法，其中該基本強化溶液及水解產物強化溶液係在培養的至少前3天之後添加至細胞培養產生培養基。

16. 如請求項9之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基中之葡萄糖濃度係受到監控，當該培養基中之葡萄糖濃度降低至低於2 g/L時，將葡萄糖添加至該培養基，且該阿達木單抗係藉由包括蛋白A親和力層析之方法純化。
17. 如請求項16之分批饋料方法，進一步包含添加葡萄糖至細胞培養產生培養基以維持細胞培養產生培養基中之葡萄糖濃度為至少2 g/L但不高於7 g/L之濃度。
18. 如請求項17之分批饋料方法，進一步包含添加葡萄糖至細胞培養產生培養基以維持細胞培養產生培養基中之葡萄糖濃度為至少2 g/L但不高於5 g/L之濃度。
19. 如請求項17之分批饋料方法，其中該阿達木單抗在該細胞培養物中係以至少2 g/L之力價生產。
20. 如請求項17之分批饋料方法，其中該阿達木單抗在該細胞培養物中係以至少4 g/L之力價生產。
21. 如請求項17之分批饋料方法，其中該表現阿達木單抗之哺乳動物細胞係以 2.0×10^6 個細胞/mL及 5.0×10^6 個細胞/mL之間的活細胞密度培養。
22. 如請求項17之分批饋料方法，其中該表現阿達木單抗之哺乳動物細胞係以 3.5×10^6 個細胞/mL及 5.0×10^6 個細胞/mL之間的活細胞密度培養。
23. 如請求項17之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基的滲透壓為440 mOsm或更低。
24. 如請求項17之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基維持20-65%之間之溶氧。
25. 如請求項17之分批饋料方法，其中該細胞培養產生培養基維持約30%之溶氧。

26. 如請求項17之分批饋料方法，其中該大規模細胞培養大於約10 L。
27. 如請求項26之分批饋料方法，其中該大規模細胞培養為13 L。
28. 如請求項27之分批饋料方法，其中該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。
29. 如請求項17之分批饋料方法，進一步包含於第一溫度大規模培養細胞培養產生培養基中之哺乳動物細胞；且而後在阿達木單抗生產期間降低該哺乳動物細胞之培養溫度至第二較低溫度。
30. 如請求項29之分批饋料方法，其中該第一溫度為32°C、33°C、35°C、37°C或38°C。
31. 如請求項30之分批饋料方法，其中該第一溫度為37°C且該第二溫度為33°C。
32. 如請求項30之分批饋料方法，其中該第一溫度為37°C且該第二溫度為32°C。
33. 如請求項30之分批饋料方法，其中該第一溫度為35°C且該第二溫度為32°C。
34. 如請求項30之分批饋料方法，其中該溫度係在培養的至少前3天之後降低。

圖式

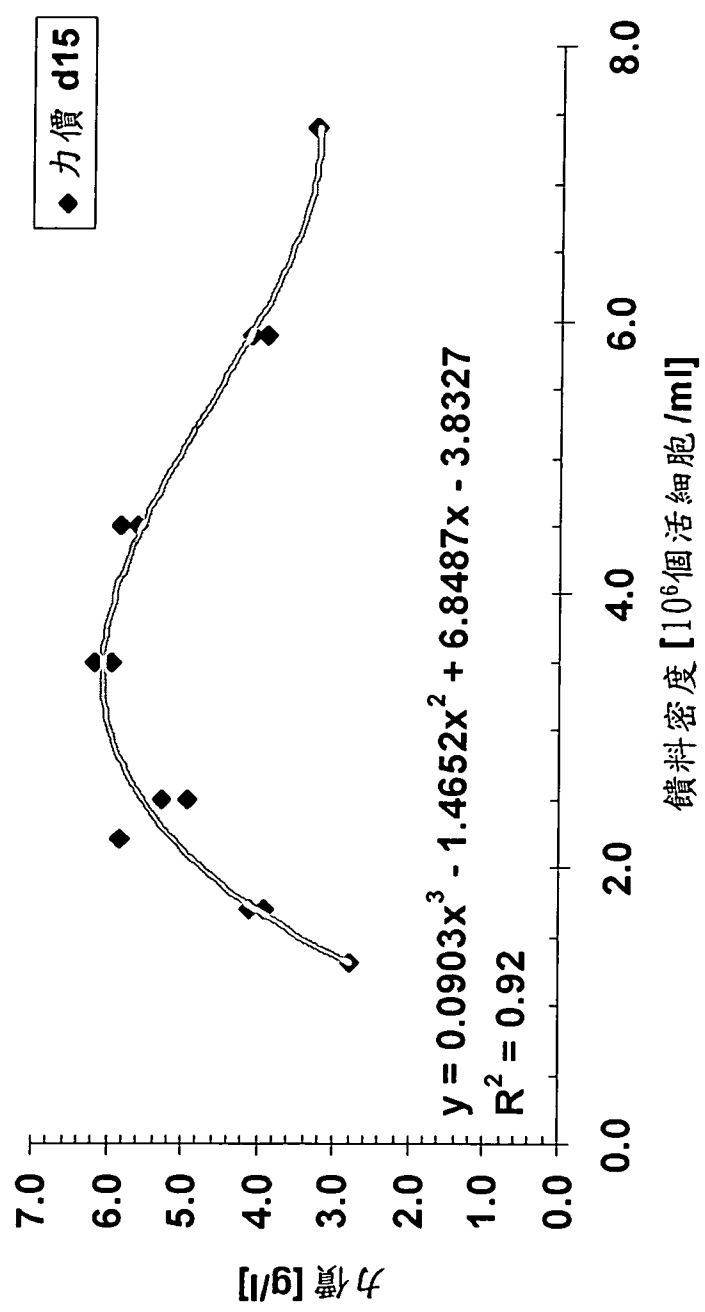


圖1