



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119326882 A

(43) 申请公布日 2025.01.21

(21) 申请号 202411456463.9

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2018.05.29

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

1708655.4 2017.05.31 GB

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880035870.9 2018.05.29

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(71) 申请人 UCB生物制药有限责任公司

C12P 21/02 (2006.01)

地址 比利时

(72) 发明人 B·本亚希亚 L·马尔代夫

N·科哈诺夫斯基 G·伦纳

S·杜兰特 A·J·耶茨

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理人 刘晓东

权利要求书3页 说明书34页 附图14页

(54) 发明名称

细胞培养方法

(57) 摘要

本发明涉及有限量的半胱氨酸和色氨酸在重组蛋白特别是抗体的生产过程中在细胞培养基中的用途。在此类受控条件下产生的蛋白质和抗体表现出降低的异质性,特别是降低的电荷变体异质性。

1. 一种包含重组蛋白的药物组合物,其中所述药物组合物是液体制剂,其中包含浓度为50mg/ml至250mg/ml的所述重组蛋白、浓度为10mM至50mM的组氨酸、浓度为100mM至500mM的脯氨酸和浓度为0.001%至0.1% (w/v) 的表面活性剂,其中所述重组蛋白是抗体或其抗原结合片段,其为:

1) 抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段:

a. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1、具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2、具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3、具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3; 或

b. 包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区; 或

c. 包含具有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中定义的序列的重链; 或者

2) 抗体,所述抗体包含具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链。

2. 一种药物组合物,其包含抗体或其抗原结合片段,其中所述药物组合物是液体制剂,所述液体制剂包含浓度为50mg/ml至250mg/ml的所述抗体或其抗体结合片段、浓度为10mM至50mM的组氨酸、浓度为100mM至500mM的脯氨酸和浓度为0.001%至0.1% (w/v) 的表面活性剂,并且其中所述抗体或其抗原性结合片段是:

1) 如下的抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1、具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2、具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3、具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3; 或

b. 包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区; 或

c. 包含具有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中定义的序列的重链; 或者

2) 抗体,其包含具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中pH为5至7.4或5至6.5或5至6。

4. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中组氨酸的浓度为30mM,脯氨酸的浓度为250mM,pH值在5.2至6.0之间。

5. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述表面活性剂是浓度为0.01%至0.05%或0.03%的聚山梨酯80。

6. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以120mg/ml至160mg/ml或140mg/ml的浓度配制。

7. 一种制备根据权利要求1-6中任一项所述的药物组合物的方法,包括以下步骤:

a. 在不含动物源性产物的培养基中培养能够产生所述抗体或其抗原结合片段的宿主

细胞,其中所述宿主细胞是CHO细胞;

b.使培养物通过生产阶段,其中所述抗体或其抗原结合片段由所述细胞生产,其中在所述生产阶段,培养物补充有:

• 半胱氨酸或胱氨酸,总量高达所生产的重组蛋白的预期总量的10wt %至30wt %,以及

• 色氨酸,总量高达所生产的重组蛋白的预期总量的8wt %至35wt %;

c.从细胞培养基中回收所述抗体或其抗原结合片段;

d.从细胞培养基中纯化所述抗体或其抗原结合片段;以及

e.配制纯化的所述抗体或其抗原结合片段,以获得所述药物组合物;

其中进行一个或多个初始实验以确定所产生的重组蛋白的预期总量。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述培养物中补充有半胱氨酸或胱氨酸,其总量高达所生产的重组蛋白的预期总量的12wt %至28wt %,例如其总量为所生产的重组蛋白的预期总量的12wt %至25wt %,例如12wt %至20wt %。

9.根据权利要求7或8所述的方法,其中所述培养物中补充有色氨酸,其总量高达所生产的重组蛋白的预期总量的8wt %至30wt %,例如其总量为所生产的重组蛋白的预期总量的8wt %至25wt %,例如8wt %到20wt %。

10.根据权利要求7或8所述的方法,其中通过在以下时间向细胞培养基中加入半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸来达到培养物中半胱氨酸或胱氨酸和/或者色氨酸的所述总量:

a.在生产阶段开始时,

b.在生产阶段期间的任何时间点进行一次或多次,

c.在生产阶段期间连续添加,或

d.a、b和c的任意组合。

11.根据权利要求7或8所述的方法,其中所述方法是分批过程,例如补料分批过程。

12.根据权利要求7或8所述的方法,其中在生产阶段期间通过每天添加来提供半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸。

13.根据权利要求7或8所述的方法,其中所述生产阶段进行至少7天,优选至少14天。

14.根据权利要求7或8所述的方法,其中在生产阶段后半段的任何时间点:

• 培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30wt %;以及

• 培养物中色氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35wt %。

15.根据权利要求7或8所述的方法,其中在生产阶段的任何时间点:

• 培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30wt %;以及

• 培养物中色氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35wt %。

16.一种药物组合物,其包含抗体或其抗原结合片段,其中所述药物组合物是液体制剂,所述液体制剂包含浓度为50mg/ml至250mg/ml的所述抗体或其抗体结合片段、浓度为10mM至50mM的组氨酸和浓度为0.001%至0.1% (w/v) 的表面活性剂,并且其中所述抗体或其抗原性结合片段是:

1)如下的抗体或其抗原结合片段,其中:

a. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1、具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2、具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3、具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3；或

b. 包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区；或

c. 包含具有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中定义的序列的重链；或者

2) 抗体，其包含具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链。

17. 一种药物组合物，其包含抗体或其抗原结合片段，其中所述药物组合物是液体制剂，所述液体制剂包含浓度为50mg/ml至250mg/ml的所述抗体或其抗体结合片段、浓度为100mM至500mM的脯氨酸和浓度为0.001%至0.1% (w/v) 的表面活性剂，并且其中所述抗体或其抗原性结合片段是：

1) 如下的抗体或其抗原结合片段，其中：

a. 包含具有SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1、具有SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2、具有SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3、具有SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1、具有SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3；或

b. 包含具有SEQ ID NO:7中所定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:8中所定义的序列的重链可变区；或

c. 包含具有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻链可变区和具有SEQ ID NO:11中定义的序列的重链；或者

2) 抗体，其包含具有SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有SEQ ID NO:10中定义的序列的重链。

## 细胞培养方法

[0001] 本申请是申请日为2018年5月29日、发明名称为“细胞培养方法”的中国发明专利申请No.201880035870.9的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明属于重组蛋白、特别是抗体的制备领域。更具体地，其涉及在商业规模的制造过程中以降低的异质性表达蛋白质的细胞培养方法。

### 发明背景

[0004] 开发重组蛋白作为治疗性蛋白(诸如治疗性抗体)需要以工业规模生产重组蛋白。为了实现这一点，可以使用不同的表达系统，原核和真核系统。然而，在过去的二十年中，大多数被批准用作治疗剂的治疗性蛋白质已经通过哺乳动物细胞培养物生产，并且这种系统仍然是用于生产大量供人使用的重组多肽的优选表达系统。

[0005] 然而，哺乳动物细胞培养呈现重大挑战。与其他真核生产系统(例如基于酵母和昆虫细胞的系统)相比，产生的重组蛋白的滴度通常非常低。

[0006] 在过去的30年中，人们一直致力于建立细胞培养和重组多肽表达的基本参数，而研究的重点在于通过改变细胞培养基的组成(参见例如Hecklau C等，J Biotech 218 (2016) 53-63; Zang Li.等Anal.Chem 83 (2011) 5422-5430)和操作条件来达到最佳细胞生长以及大型生物反应器的开发。

[0007] 尽管产量仍然是哺乳动物细胞培养的非常重要的方面，但近年来，重点已转向在开发的所有阶段和生产规模上控制产品质量和过程一致性。哺乳动物细胞培养物产生的治疗性蛋白表现出不同水平的异质性。这样的异质性包括但不限于不同的糖基化模式、由脱酰胺或氧化产生的差异、不同的电荷或大小变异。重组蛋白的异质性也可能导致产品颜色的差异，例如由相同制造工艺产生的同一蛋白质的不同批次之间的颜色差异。当以高浓度配制治疗性蛋白时，这种异质性，尤其是目标重组蛋白的颜色差异变得更加明显。近年来，一直存在向着要求以高浓度配制治疗性蛋白的皮下递送治疗性蛋白的稳定趋势。高浓度与聚集体水平升高相关(Purdie J.等，Biotechnology Progress, 2016, 32, 998-1008)。电荷变体增加，诸如酸性种类水平升高可影响蛋白质的稳定性(Banks D.D.等Journal of pharmaceutical sciences, 2009, 98, 4501-10)，而浓缩的治疗性蛋白的颜色可以更强烈。

[0008] 细胞培养条件，诸如培养基的组成(Kshirsagar R.等，Biotechnology and Bioengineering, 109:10, 2523-2532(2012); US2013/0281355; WO 2013/158275)和生长条件，包括pH和温度(US 8,765,413)已显示出会影响治疗性蛋白的质量属性。然而，仍然需要提供用于生产治疗性蛋白、特别是具有最小异质性的治疗性抗体的进一步改进的细胞培养方法。

### 发明概述

[0010] 本发明通过在重组蛋白的生产阶段中减少细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸和色

氨酸的总量来满足上述需求。

- [0011] 如下文中所编号的,描述了下面的特定实施方案:
- [0012] 实施方案1:一种产生重组蛋白的方法,其包括:
  - [0013] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;
  - [0014] b.使培养进行通过生产阶段,其中重组蛋白由细胞产生,其中在所述生产阶段中,向培养物中补充
    - [0015] ●半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的预期总量的10wt %至30wt %;和/或
    - [0016] ●色氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至35wt %,
    - [0017] c.以及任选地,从细胞培养基中回收重组蛋白。
- [0018] 实施方案2.根据实施方案1的方法,其中在所述培养物中补充半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的预期总量的12wt %至28wt %,诸如产生的重组蛋白的预期总量的12wt %至25wt %,例如12wt %至20wt %。
- [0019] 实施方案3.根据实施方案1或2的方法,其中在所述培养物中补充色氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至30wt %,诸如产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至25wt %,例如8wt %至20wt %。
- [0020] 实施方案4.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在所述方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数。
- [0021] 实施方案5.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在所述方法中提供的色氨酸的总量为2.5至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞/L),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数。
- [0022] 实施方案1a:一种产生重组蛋白的方法,其包括:
  - [0023] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;
  - [0024] b.使所述培养进行通过生产阶段,其中所述重组蛋白由所述细胞产生,其中在所述生产阶段中,在所述培养物中补充
    - [0025] ●半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的总量的10wt %至30wt %;和/或
    - [0026] ●色氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的总量的8wt %至35wt %,
    - [0027] c.以及任选地,从所述细胞培养基中回收所述重组蛋白。
- [0028] 实施方案2a.根据实施方案1所述的方法,其中在所述培养物中补充半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的总量的12wt %至28wt %,诸如产生的重组蛋白的总量的12wt %至25wt %,例如12wt %至20wt %。
- [0029] 实施方案3a:根据实施方案1或2所述的方法,其中向所述培养物中补充色氨酸,其总量达到产生的重组蛋白的总量的8wt %至30wt %,诸如产生的重组蛋白的总量的8wt %至25wt %,例如8wt %至20wt %。
- [0030] 实施方案4a.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在所述方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时的完整活细胞计数。

[0031] 实施方案5a:根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在所述方法中提供的色氨酸的总量为2.5至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞/L),其中细胞是指所述生产阶段结束时的完整活细胞计数。

[0032] 实施方案6.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中通过在以下时刻向所述细胞培养基中添加半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸来达到所述培养物中半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量:

[0033] a.在所述生产阶段开始时,

[0034] b.在生产阶段中的任何时间点一次或多次,

[0035] c.在整个生产阶段中连续添加,或

[0036] d.以a、b和c的任意组合。

[0037] 实施方案7.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述方法是分批方法,例如补料分批方法。

[0038] 实施方案8.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在生产阶段中通过每天添加来提供半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸。

[0039] 实施方案9.根据实施方案8所述的方法,其中在第二天在添加半胱氨酸或胱氨酸之前,例如通过将半胱氨酸或胱氨酸添加降低至5.6至7g/(10<sup>12</sup>个细胞)的水平来在培养物中耗尽半胱氨酸或胱氨酸,其中细胞是指在生产阶段结束时预期的完整活细胞计数。

[0040] 实施方案9a:根据实施方案8所述的方法,其中在第二天添加半胱氨酸或胱氨酸之前,例如通过将半胱氨酸或胱氨酸添加降低至5.6至7g/(10<sup>12</sup>个细胞)的水平来在培养物中耗尽半胱氨酸或胱氨酸,其中细胞是指在生产阶段结束时的完整活细胞计数。

[0041] 实施方案10,根据实施方案8或9所述的方法,其中在生产后期,即当细胞已经达到最大活细胞密度时,在第二天添加色氨酸之前在培养物中耗尽色氨酸。

[0042] 实施方案11.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在生产阶段中的任何时间点,所述细胞培养基中的所述半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.9g/L,优选在生产阶段中的任何时间点,其中所述细胞培养基中的所述半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.3g/L。

[0043] 实施方案12.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在生产阶段中的任何时间点,所述细胞培养基中的色氨酸浓度不超过0.6g/L,优选在生产阶段中的任何时间点,其中所述细胞培养基中的色氨酸浓度不得超过0.3g/L。

[0044] 实施方案13:一种方法,其中所述生产阶段进行至少7天,优选至少14天。

[0045] 实施方案14.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在生产阶段的后半段期间的任何时间点:

[0046] ●所述培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0047] ●所述培养物中色氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0048] 实施方案15,根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在所述生产阶段中的任何时间点:

[0049] ●所述培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0050] ●所述培养物中色氨酸的量为产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0051] 实施方案14a.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在生产阶段的后半段期间的任何时间点:

[0052] ●所述培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为产生的重组蛋白的量的10wt %至30% ;和/或

[0053] ●所述培养物中色氨酸的量为产生的重组蛋白的量的8wt %至35%。

[0054] 实施方案15a.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中在生产阶段的任何时间点:

[0055] ●所述培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为产生的重组蛋白的量的10wt %至30% ;和/或

[0056] ●所述培养物中色氨酸的量为产生的重组蛋白的量的8wt %至35%。

[0057] 实施方案16.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞,优选CHO细胞。

[0058] 实施方案17.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述重组蛋白是抗体或其抗原结合片段。

[0059] 实施方案18.根据实施方案17所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段为:

[0060] 1) 抗体或其抗原结合片段,其

[0061] a. 包含具有如SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有如SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有如SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有如SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有如SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有如SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或

[0062] b. 包含如具有SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:8中定义的序列的重可变区;或

[0063] c. 包含与如SEQ ID NO:7中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻可变区和与如SEQ ID NO:8中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重可变区;

[0064] d. 包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:11中定义的序列的重链;或

[0065] e. 包含与如SEQ ID NO:7中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻可变区和与如SEQ ID NO:11中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重链;或

[0066] 2) 抗体,其包含具有如SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有如SEQ ID NO:10中定义的序列的重链;或

[0067] 2) 抗体,其包含与如SEQ ID NO:9中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻链和与如SEQ ID NO:10中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重链。

[0068] 实施方案19.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述生产阶段在生物反应器中进行,优选地,其体积等于或大于50L,等于或大于100L,等于或大于500L,等于或大于1000L,等于或大于2,000L,等于或大于5,000L,等于或大于10,000L或者等于或大于20,000L.

[0069] 实施方案20.根据前述实施方案中任一项所述的方法,其中所述方法包括从所述细胞培养基中回收重组蛋白的步骤和纯化所述重组蛋白的另外步骤。

[0070] 实施方案21.根据实施方案20所述的方法,其中所述纯化包括蛋白A层析。

[0071] 实施方案22.根据实施方案20或21所述的方法,其还包括配制所述纯化的重组蛋白的步骤。

[0072] 实施方案23.根据实施方案22所述的方法,其中将所述重组蛋白配制在包含一种或多种氨基酸和表面活性剂的液体制剂中。

[0073] 实施方案24.根据实施方案23所述的方法,其中所述制剂包含组氨酸和/或脯氨酸。

[0074] 实施方案25.根据实施方案24所述的方法,其中所述制剂在5至7.4(诸如5至6.5,例如5至6)的pH下包含浓度为5mM至100mM,例如浓度为10mM至50mM的组氨酸和/或浓度为100mM至500mM的脯氨酸。

[0075] 实施方案26.根据实施方案25所述的方法,其中所述制剂在5.2至6.0的pH,优选约5.6的pH下包含浓度为30mM的组氨酸和浓度为250mM的脯氨酸。

[0076] 实施方案27.根据实施方案23至26中任一项所述的方法,其中所述表面活性剂为聚山梨酯80,优选地浓度为0.001%至0.1%(w/v),例如0.005%至0.1%(w/v),诸如0.01%至0.1%,例如0.01%至0.05%,诸如0.03%。

[0077] 实施方案28.实施方案23至27中任一项所述的方法,其中所述重组蛋白为抗体,并且以10mg/ml至250mg/ml,例如20mg/ml至250mg/ml,诸如50mg/ml至250mg/ml,例如120mg/ml至160mg/ml,诸如约140mg/ml的浓度配制所述抗体。

[0078] 实施方案29.根据前述实施方式中任一项所述的方法,其中所述方法降低了产生的所述重组蛋白的异质性,其中所述异质性的降低包括降低:

[0079] a.电荷异质性,优选酸性峰基团(acidic peak group,APG);和/或

[0080] b.氨基酸氧化、异构化、片段化、其他共价加合物的糖基化、脱酰胺基、半胱氨酸化;和/或

[0081] c.颜色或颜色强度,例如在不同批次的所述重组蛋白之间;和/或

[0082] d.高分子量种类(high molecular weight species,HMWS);和/或

[0083] e.重组蛋白不稳定性。

[0084] 实施方案30.一种生产重组蛋白的方法,其包括:

[0085] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;

[0086] b.使所述培养进行通过生产阶段,其中所述重组蛋白由所述细胞产生,并且所述细胞培养基补充有半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸,其中

[0087] ●在所述过程中提供的半胱氨酸或胱氨酸总量为2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指在生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,和/或

[0088] ●在所述方法中提供的色氨酸总量为2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指在生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,

[0089] c.以及任选地,从所述细胞培养基中回收所述重组蛋白。

[0090] 实施方案30a.一种生产重组蛋白的方法,其包括:

[0091] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;

- [0092] b. 使培养进行通过生产阶段,其中所述重组蛋白由所述细胞产生,并且所述细胞培养基补充有半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸,其中
- [0093] ●在所述方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸总量为2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指在生产阶段结束时的完整活细胞计数,和/或
- [0094] ●在所述方法中提供的色氨酸总量为2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指在生产阶段结束时的完整活细胞计数,
- [0095] c. 以及任选地,从所述细胞培养基中回收所述重组蛋白。
- [0096] 实施方案31.根据实施方案30所述的方法,其中所述方法具有实施方案2至29中任一项所述的另外的特征中的一个或多个特征。
- [0097] 实施方案32.一种用于减少由重组宿主细胞在生产阶段产生的批次中的重组蛋白群体的异质性的方法,其包括在所述重组蛋白的生产阶段中限制存在于所述细胞培养基中的以下物质的总量。
- [0098] a. 半胱氨酸或胱氨酸和/或
- [0099] b. 色氨酸。
- [0100] 实施方案33.根据实施方案32所述的方法,其中所述方法具有实施方案2至29中任一项所述的另外的特征中的一个或多个特征。
- [0101] 实施方案34.通过前述实施方案中任一项所述的方法能够获得或所获得的重组蛋白制剂。
- [0102] 实施方案35.一种包含抗体的药物组合物,其中所述组合物具有实施方案23至28中任一项所述的另外的特征中的一个或多个特征,优选地,其中所述抗体是实施方案18中所述的抗体。

## 附图简述

- [0104] 图1:测量在生物传感器中进行的整个生产阶段中添加的氨基酸半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量/所产生的重组蛋白的重量百分比的计算分析的描述。
- [0105] 图2:色氨酸和半胱氨酸或胱氨酸的总添加量占产生的总mAb1重量的wt % (g/g) 分别对针对40mg/mL标准化的b\*值 (a) 和酸性峰基团 (APG) 变体 (b) 的影响,并且最大色氨酸和半胱氨酸或胱氨酸浓度不影响b\*值 (c) 或APG% (d) 。
- [0106] 图3:色氨酸和半胱氨酸或胱氨酸的总添加量占所产生的总mAb1重量的wt % (g/g) 分别对针对40mg/mL标准化的b\*值 (a) 和酸性峰基团 (APG) 变体 (b) 的影响,半胱氨酸或胱氨酸 (c) 与色氨酸 (d) 的最大浓度对APG缺乏相关性。
- [0107] 图4:作为半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占所产生的总mAb1的wt % (g/g) 的函数的重组单克隆抗体mAb1的酸性峰基团 (APG) 变体的多元线性回归模型。
- [0108] 图5:作为半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占所产生的总重组mAb1的wt % (g/g) 的函数的重组单克隆抗体mAb1的主峰基团 (main peak group) 变体的多元线性回归模型。
- [0109] 图6:作为半胱氨酸或胱氨酸的总添加量占所产生的总的重组mAb1的wt % (g/g) 的函数的重组单克隆抗体mAb1的高分子量种类 (HMWS) 变体的多元线性回归模型。
- [0110] 图7:作为半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占所产生的总重组mAb1的wt %

(g/g) 的函数的针对 40mg/mL 的重组单克隆抗体 mAb1 的变体标准化的 b\* 值的多元线性回归模型。

[0111] 图8: 半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占所产生的总重组 mAb1 的 wt % (g/g) 对 (a) 高分子量种类 (HMWS) 和 (b) 针对 40mg/mL 标准化的 b\* 值、(c) 酸性峰基团 (APG) 和 (d) 主峰基团变体的影响的等值线图。黑色虚线正方形对应于理想的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占所产生的总重组 mAb1 的 wt % (g/g), 以减小 APG、HMWS、针对 40mg/mL 标准化的 b\* 值并增加主峰基团变体, 对于半胱氨酸或胱氨酸这对应于占所产生的总 mAb1 的 wt % (g/g) 为 12.06wt % 和 28.03wt %, 对于色氨酸, 这对应于占所产生的总 mAb1 的 wt % (g/g) 为 8.84wt % 和 32.06wt %。

[0112] 图9: 添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占细胞培养体积 (CSV) 重量的 wt % 对针对 CSV 标准化的完整活细胞计数 (IVCC) 的影响。(a) 中显示了针对 CSV 标准化的累积 IVCC 作为半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占 CSV 重量的 wt % 的函数的多元线性回归模型。(b) 中显示了半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占 CSV 重量的 wt % 对针对 CSV 标准化的累积 IVCC 的影响的等值线图。

[0113] 图10: 在生产阶段中添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占 CSV 重量的 wt % 对通过 HPLC 方法测定的最终 mAb1 滴度 (mAb HPLC) 的影响。(a) 中示出了最终 mAb1 HPLC 滴度作为半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占 CSV 重量的 wt % 的函数的多元线性回归模型。(b) 中示出了半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占 CSV 重量的 wt % 对最终 mAb HPLC 滴度的影响的等高线图。

[0114] 图11: (a) 中示出了在生产阶段中添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/生产阶段结束时的  $IVCC \times 10^{-12}$  对 14 天生产的 IVCC 影响的等值线图。(b) 中示出了显示在生产阶段中添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/生产阶段结束时的  $IVCC \times 10^{-12}$  对最终的 mAb HPLC 滴度的影响的等值线图。(c) 中示出了测量在整个于生物反应器中进行的生产阶段添加的氨基酸半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的量/生产阶段结束时的  $IVCC \times 10^{-12}$  的计算分析的描述。

[0115] 图12: 在整个生产阶段中于细胞培养基中达到的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的最大浓度对针对 CSV 标准化的 IVCC 的影响的等值线图。

[0116] 图13: 针对表6中所述条件的添加的半胱氨酸或胱氨酸总量以及添加的半胱氨酸或胱氨酸的总量/IVCC。

[0117] 图14: 半胱氨酸或胱氨酸耗尽对细胞生长和 mAb 滴度的影响。活细胞浓度 (VCC) 谱 (a)、mAb 滴度 (b) 和添加进料前的 Cys 浓度 (c) 显示为以下三个实验条件的函数: 在整个生产阶段中不耗尽半胱氨酸或胱氨酸 [无耗尽 - (进料中的 Cys 为 34.35g/L)] 和两种情况: 从第 6 天开始每日耗尽半胱氨酸或胱氨酸直至补料分批生产结束, 并且进料中 Cys 的浓度为 17.17g/L 和 6.87g/L。

[0118] 图15: 半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占按重量计的所产生的总重组抗体的 wt % 对以下方面的影响: (a) 对于 mAb2、APG 和针对 40mg/mL 变体标准化的 b\* 值; (b) 对于 mAb3、APG 变体以及 (c) 对于 mAb4、APG、BPG (Basic Peak Group, 碱性峰基团) 和主要基团变体。

[0119] 图16: 半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占所产生的总重组 mAb1、mAb2、mAb3

和mAb4重量的wt %对APG的影响。在(a)中,将mAb1、mAb2、mAb3和mAb4的APG变体相对于总半胱氨酸或胱氨酸添加量占按重量计的产生的总重组mAb1、mAb2、mAb3和mAb4的wt %作图。在(b)中,将重组单克隆抗体mAb1、mAb2和mAb3和重组多特异性抗体mAb4的APG变体的多元线性回归模型绘制为半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量占按重量计的总重组mAb的wt %的函数。

[0120] 图17:开发了一个方程以便基于表达mAb1抗体的DG44 CHO细胞系的数据预测酸性峰基团(APG)水平(表3)。

[0121] 图18:表达mAb1抗体的DG44 CHO细胞系的实验性酸性峰基团(APG)水平(APG exp)与预测的APG水平(APG pred)的比较。在2L生物反应器中使用交替切向流(ATF)技术在灌注生产方法中生成数据。APG的预测基于图17中的方程。

## 发明详述

[0123] 本发明基于以下发现:通过在生产重组蛋白的方法中在生产阶段中限制在细胞培养基中使用的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量,可降低所产生的重组蛋白的异质性。因此,本发明教导了在细胞培养基中使用有限量的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸,以减少在培养基中表达的抗体或其抗原结合片段的异质性。

[0124] 降低的异质性优选地是针对以下项而言的:

[0125] a.电荷,优选酸性峰基团(APG)异质性;和/或

[0126] b.氨基酸氧化、异构化、片段化、其他共价加合物糖基化、脱酰胺化、半胱氨酰化;和/或

[0127] c.颜色或颜色强度(针对40mg/mL标准化的b\*值);和/或

[0128] d.高分子量种类(HMWS)的形成;和/或

[0129] e.重组蛋白不稳定性和/或

[0130] F.其组合。

[0131] 如本文中所用,术语“异质性”是指由同一生产方法产生的或同一生产批次内的分子群体中各个分子例如重组蛋白之间的差异。异质性可由例如因表达蛋白的翻译后修饰而导致的重组蛋白的不完全或不均一的修饰引起。此类修饰可以是脱氨基反应和/或氧化反应和/或小分子的共价添加(诸如糖基化反应)和/或异构化反应和/或片段化反应和/或其他反应的结果,并且还包括糖基化模式的变化。这种异质性的化学物理表现导致所得重组蛋白制品中的各种特征,其包括但不限于电荷变化谱、颜色或颜色强度和分子量谱。

[0132] 根据本发明的术语“生产阶段”包括当细胞表达(即产生)重组蛋白时在制备重组蛋白的方法中细胞培养的阶段。当所需产物的滴度增加时,生产阶段开始,并随着细胞或细胞培养液或上清液的收获而结束。通常,在生产阶段开始时,将细胞培养物转移至生物反应器。收获是在此期间从例如生产容器中去除细胞培养液(以便在后续步骤中回收和纯化重组蛋白例如重组抗体)的步骤。当在本文中使用时,术语“初始细胞培养物重量”是指在生产阶段开始时培养物的重量,通常是接种生物反应器时的重量。

[0133] 在第一方面,本发明提供了用于生产重组蛋白的方法,该方法包括:

[0134] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;

[0135] b.使培养进行通过生产阶段,其中重组蛋白由细胞产生,其中在所述生产阶段中,

在培养物中补充

[0136] a. 半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的10wt %至30wt %;和/或

[0137] b. 色氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至35wt %,

[0138] 以及任选地,从细胞培养基中回收重组蛋白。

[0139] 从下文对本发明的描述将显而易见的是,在培养物中补充了半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸;这种补充可用以下物质进行:

[0140] 1. 半胱氨酸;或

[0141] 2. 胱氨酸;或

[0142] 3. 半胱氨酸和胱氨酸;或

[0143] 4. 半胱氨酸和色氨酸;或

[0144] 5. 胱氨酸和色氨酸;或者

[0145] 6. 半胱氨酸、胱氨酸和色氨酸;或

[0146] 7. 色氨酸。

[0147] 当在本文中使用时,表述“半胱氨酸或胱氨酸的总量”或“达到……总量的半胱氨酸或胱氨酸”是指:a) 如果该方法中未使用胱氨酸,则半胱氨酸单独的总量,b) 如果该方法中未使用半胱氨酸,则单独半胱氨酸的总量;或c) 如果该方法中使用两种化合物,则半胱氨酸+胱氨酸的总量。细胞培养基中的半胱氨酸和胱氨酸处于恒定平衡,其中两个半胱氨酸分子氧化成一个胱氨酸分子,以及一个胱氨酸分子还原成两个半胱氨酸分子。

[0148] 半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量在本文中可以表示为占所产生的重组蛋白的总量的百分比。如本文中所用,术语“wt %”是指重量百分比。“总的”是指在生产阶段结束时测定的总量,即在生产阶段的过程中添加的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量,以及在生产阶段的过程中产生的重组蛋白的总量,其中在生产阶段结束时测量所产生的重组蛋白的总量。

[0149] 图1显示了如何计算半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量/重组蛋白的wt %。将添加的半胱氨酸或胱氨酸或色氨酸的总量计算为进料速度(或进料体积)和该进料中半胱氨酸或胱氨酸或色氨酸的浓度以及培养基中半胱氨酸或胱氨酸或色氨酸的浓度的函数,其中按添加的进料的体积添加进料(图1,A)。将所产生的重组蛋白的量计算为细胞培养基的最终体积和最终的重组蛋白滴度的函数(图1,B)。这两个计算出的参数之比是添加的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量/所生产的重组蛋白的量(图1,C)。

[0150] 最初(在步骤a中)可将宿主细胞在可以包含或可以不包含半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的细胞培养基中生长。如果细胞培养基已包含初始量的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸,则总量将包括该初始量。

[0151] 在本发明方法的一个实施方案中,在培养物中补充半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的12.06wt %至28.03wt %,诸如总量为所产生的重组蛋白的预期总量的12wt %至28wt %,诸如12wt %至25wt %,诸如12wt %至20wt %。

[0152] 在本发明方法的另一个实施方案中,其中在所述培养物中补充色氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的8.84wt %至32.06wt %,诸如为所产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至30wt %,诸如8wt %至25wt %,诸如8wt %至20wt %。

[0153] 或者,半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量可以表示为相对于生产阶段结束时的完整活细胞计数而言在所述方法中添加的总量。在一个实施方案中,在该方法中提供的半胱氨酸和/或胱氨酸的总量为2.9至12g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数。在另一个实施方案中,在该方法中提供的色氨酸总量为2.5至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞/L),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数。

[0154] 应当理解,本领域技术人员将知道如何测量在特定阶段(诸如生产阶段)添加到和/或存在于细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量。例如,这可以如本文的实施例中所述进行。类似地,本领域技术人员将知道如何测量由细胞培养物产生的重组蛋白的总量,并因此应用本发明的教导以实现所需的技术效果。例如,这可以如本文实施例中所述进行,诸如使用aForteBio Octet模型分析仪(ForteBio, Inc., Menlo Park, CA)或蛋白A高压液相色谱(HPLC)以及在分析前储存在-80°C下的细胞培养上清液样品来进行。

[0155] 为了设计根据本发明的方法,其中将半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量/所产生的重组蛋白的预期总量保持在一定范围内,可能需要执行一个或多个初始实验来确定在特定的培养条件下由特定宿主细胞产生的重组蛋白的大致水平。一旦知道了所产生的重组蛋白的大致总水平,就可以设计根据本发明的方法,其中将半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量/产生的重组蛋白的预期总量保持在指定范围内。

[0156] 可以采用各种策略来达到生产阶段期间细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量。在一个实施方案中,可通过正好在生产阶段开始时,例如只有在被包含在生产细胞培养基中时或在已被包含在生产细胞培养基中时,添加半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸来达到总量。在另一个实施方案中,可通过对在生产阶段中的添加(例如每天添加或连续添加)求和来达到总量。在又一个实施方案中,可通过在生产阶段开始时细胞培养液中的初始半胱氨酸/半胱氨酸和/或色氨酸浓度与通过添加的组合来达到总量。

[0157] 因此,在本发明的方法的一个实施方案中,通过在以下时刻向细胞培养基中添加半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸来达到细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量:

[0158] a.在生产阶段开始时,

[0159] b.在生产阶段中的任何时间点一次或多次,

[0160] c.在生产阶段中连续添加,或

[0161] d.以a、b和c的任意组合。

[0162] 在一个优选实施方案中,半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸在生产阶段开始时添加,并在生产阶段中通过每日大剂量添加来添加。优选地,生产阶段持续至少7天,更优选超过7天,诸如10天,更优选14天或更多天。

[0163] 在一个优选实施方案中,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.9g/L,优选地,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.3g/L。

[0164] 此外,在一个优选实施方案中,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的色氨酸浓度不超过0.6g/L,优选地,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的色氨酸浓度均不超过0.3g/L。

[0165] 在一个实施方案中,每天向细胞培养基中添加半胱氨酸或胱氨酸,并且在第6天,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸增加到0.3g/L的最大浓度,并且从第7天至第14天,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸增加至0.9g/L的最大浓度。

[0166] 在一些实施方案中,半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的量不仅在生产阶段结束时按整个生产阶段计算还处于指定范围内,而且在生产阶段的一部分期间的任何时间点或甚至在整个生产阶段中的任何时间点都处于指定范围内。因此,在一个实施例中,在生产阶段的后半段(例如14天生产阶段的第7天到第14天)的任何时间点:

[0167] ●培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的10

[0168] wt %至30%;和/或

[0169] ●培养物中色氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0170] 在另一个实施方案中,在生产阶段中的任何时间点:

[0171] ●培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0172] ●培养物中色氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0173] 当通过每天添加向细胞提供半胱氨酸或胱氨酸时,可在提供下一次每天添加之前耗尽培养物中的半胱氨酸或胱氨酸。在一个实施方案中,在于第二天添加半胱氨酸或胱氨酸之前,例如通过将半胱氨酸或胱氨酸添加量降低到5.6至7g/[ $10^{12}$ 个细胞]的水平来耗尽培养物中的半胱氨酸或胱氨酸。在第二实施方案中,在生产后期的细胞培养期间,即当细胞已经达到最大活细胞密度时,耗尽培养物中的色氨酸,例如在14天的生产阶段中在第8天或以后开始耗尽。

[0174] 不希望受理论束缚,据信,尽管半胱氨酸或胱氨酸被耗尽,但生产阶段的细胞仍没有被剥夺半胱氨酸或胱氨酸,而是被认为具有一个内部机制,其将可在细胞培养基中获得的半胱氨酸或胱氨酸(通过添加)作为无活性代谢产物储存,一旦半胱氨酸或胱氨酸耗尽,所述无活性代谢产物就会转化为半胱氨酸或胱氨酸。

[0175] 在一个另外的独立方面,本发明涉及用于产生重组蛋白的方法,该方法包括:

[0176] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;

[0177] b.使培养进行通过生产阶段,其中重组蛋白由细胞产生,并且细胞培养基补充有半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸,其中

[0178] ●在所述方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸总量为2.9至7g/( $10^{12}$ 个细胞),例如从5.6到7g/( $10^{12}$ 个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,和/或

[0179] ●在所述方法中提供的色氨酸总量为2.5至3.5g/( $10^{12}$ 个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,

[0180] c.以及任选地,从细胞培养基中回收重组蛋白。

[0181] 在该方法的一个实施方案中,在细胞培养基中补充半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的12wt %至28wt %,例如为所产生的重组蛋白的预期总量的12wt %至25wt %,例如12wt %至20wt %。

[0182] 在该方法的另一个实施方案中,在细胞培养基中补充色氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至30wt %,诸如为所产生的重组蛋白的预期总量的8wt %至25wt %,例如8wt %至20wt %。

[0183] 在所述方法的另一个实施方案中,通过在以下时刻向细胞培养基中添加半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸来达到细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量:

[0184] a.在生产阶段开始时,

[0185] b.在生产阶段中的任何时间点一次或多次,

[0186] c.在生产阶段中连续添加,或

[0187] d.以a、b和c的任意组合。

[0188] 在所述方法的另一个实施方案中,所述方法是分批方法,诸如补料分批方法。在所述方法的另一个实施方案中,通过在生产阶段中每天添加来提供半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸。

[0189] 在该方法的另一个实施方案中,在于第二天添加半胱氨酸或胱氨酸之前,例如通过将半胱氨酸或胱氨酸添加量降低至5.6至7g/[ $10^{12}$ 个细胞]的水平来耗尽细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸。

[0190] 在该方法的另一个实施方案中,在生产后期,即当细胞已经达到最大活细胞密度时,在于第二天添加色氨酸之前,耗尽细胞培养基中的色氨酸。

[0191] 在该方法的另一个实施方案中,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.9g/L,优选其中在生产阶段中的任何时间点,细胞培养物中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.3g/L。

[0192] 在该方法的另一个实施方案中,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养物中的色氨酸浓度不超过0.6g/L,优选其中在生产阶段中的任何时间点,细胞培养物中的色氨酸浓度不超过0.3g/L。

[0193] 在该方法的另一个实施方案中,生产阶段进行至少7天,优选至少14天。

[0194] 在该方法的一个实施例中,在生产阶段的后半段期间的任何时间点:

[0195] a.细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0196] b.细胞培养基中色氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0197] 在该方法的另一个实施方案中,在生产阶段中的任何时间点:

[0198] a.半胱氨酸或胱氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0199] b.色氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0200] 在该方法的另一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,优选CHO细胞。

[0201] 在该方法的另一个实施方案中,重组蛋白是抗体或其抗原结合片段。

[0202] 在该方法的另一个实施方案中,生产阶段在生物反应器中进行,其体积优选等于或大于50L,等于或大于100L,等于或大于500L,等于或大于1000L,等于或大于2,000L,等于或大于5,000L,等于或大于10,000L或者等于或大于20,000L.

[0203] 在该方法的一个实施方案中,该方法包括从细胞培养基中回收重组蛋白的步骤和纯化重组蛋白的进一步步骤。

[0204] 在该方法的另外一个实施方案中,纯化包括蛋白A色谱。

[0205] 在该方法的另一个实施方案中,该方法还包括配制纯化的重组蛋白的步骤。

[0206] 在该方法的一个实施方案中,将重组蛋白配制在包含一种或多种氨基酸和表面活性剂的液体制剂中。

- [0207] 在该方法的另外一个实施方案中,制剂包含组氨酸和/或脯氨酸。
- [0208] 在该方法的另外一个实施方案中,制剂在5至7.4(诸如5至6.5,例如5至6,诸如5.5至6)的pH下包含浓度为5mM至100mM,例如浓度为10mM至50mM的组氨酸,和/或浓度为100mM至500mM的脯氨酸。
- [0209] 在该方法的另外一个实施方案中,所述制剂在5.2至6.0(诸如约5.6)的pH下包含浓度为30mM的组氨酸和浓度为250mM的脯氨酸。
- [0210] 在该方法的另外一个实施方案中,表面活性剂是聚山梨酯80,其浓度优选为0.001%至0.1%(w/v),例如0.005%至0.1%,诸如0.01%至0.1%,例如0.01%至0.05%,诸如0.03%。
- [0211] 在该方法的另外一个实施方案中,重组蛋白是抗体,并以10mg/ml至250mg/ml,例如20mg/ml至250mg/ml,诸如50mg/ml至250mg/ml,例如120mg/ml至160mg/ml,诸如约140mg/ml的浓度配制所述抗体。
- [0212] 在该方法的另一个实施方案中,该方法降低了所产生的重组蛋白的异质性,其中所述异质性的降低包括降低:
- [0213] a.电荷异质性,优选酸性峰基团(APG);和/或
  - [0214] b.氨基酸氧化、异构化、片段化、其他共价加合物的糖基化、脱酰胺化、半胱氨酸化;和/或
  - [0215] c.颜色或颜色强度,例如在不同批次的重组蛋白之间;和/或
  - [0216] d.高分子量种类(HMWS);和/或
  - [0217] e.重组蛋白不稳定性。
- [0218] 在另外一个独立方面,本发明涉及用于减少重组宿主细胞在生产阶段产生的批次中的重组蛋白群体的异质性的方法,该方法包括在重组蛋白的生产阶段中限制存在于细胞培养基中的以下物质的总量:
- [0219] a.半胱氨酸或胱氨酸和/或
  - [0220] b.色氨酸。
- [0221] 在一个实施方案中,该方法包括:
- [0222] a.在培养基中培养能够产生重组蛋白的宿主细胞;
  - [0223] b.使培养进行通过生产阶段,其中重组蛋白由细胞产生,其中在所述生产阶段中,在培养物中补充
- [0224] ●半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的10wt%至30wt%;和/或
- [0225] ●色氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的8wt%至35wt%,
- [0226] c.以及任选地,从细胞培养基中回收重组蛋白。
- [0227] 在该方法的一个实施方案中,在培养物中补充半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的12wt%至28wt%,诸如为所产生的重组蛋白的预期总量的12wt%至25wt%,例如12wt%至20wt%。
- [0228] 在该方法的另一个实施方案中,在培养物中补充色氨酸,其总量达到所产生的重组蛋白的预期总量的8wt%至30wt%,诸如为所产生的重组蛋白的预期总量的8wt%至25wt%,例如8wt%至20wt%。

[0229] 在该方法的另一个实施方案中,在所述方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指在生产阶段结束时预期的完整活细胞计数。

[0230] 在该方法的另一个实施方案中,在所述方法中提供的色氨酸总量为2.5至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞/L),其中细胞是指生产阶段结束时的预期完整活细胞计数。

[0231] 在该方法的另一个实施方案中,通过在以下时刻向细胞培养基中添加半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸来达到细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量:

[0232] a.在生产阶段开始时,

[0233] b.在生产阶段中的任何时间点一次或多次,

[0234] c.通过在生产阶段中连续添加,或

[0235] d.以a、b和c的任意组合。

[0236] 在该方法的另一个实施方案中,所述方法是分批方法,诸如补料分批法。

[0237] 在该方法的另一个实施方案中,通过在生产阶段中每天添加来提供半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸。

[0238] 在该方法的另一个实施方案中,在于第二天添加半胱氨酸或胱氨酸之前,例如通过将半胱氨酸或胱氨酸添加量降低到5.6至7g/[10<sup>12</sup>个细胞]的水平来耗尽培养物中的半胱氨酸或胱氨酸。

[0239] 在该方法的另一个实施方案中,在生产后期,即当细胞已经达到最大活细胞密度时,在第二天添加色氨酸之前,耗尽细胞培养基中的色氨酸。

[0240] 在该方法的另一个实施方案中,在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.9g/L,优选其中在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.3g/L。

[0241] 在该方法的另一个实施方案中,细胞培养基中的色氨酸浓度在生产阶段中的任何时间点不超过0.6g/L,优选其中在生产阶段中的任何时间点,细胞培养基中的色氨酸浓度不超过0.3g/L。

[0242] 在该方法的另一个实施方案中,生产阶段进行至少7天,优选至少14天。

[0243] 在该方法的另一个实施方案中,在生产阶段的后半段期间的任何时间点:

[0244] ●培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0245] ●培养物中色氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0246] 在该方法的另一个实施方案中,在生产阶段中的任何时间点:

[0247] ●培养物中半胱氨酸或胱氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的10wt %至30%;和/或

[0248] ●培养物中色氨酸的量为所产生的重组蛋白的预期量的8wt %至35%。

[0249] 在该方法的另一个实施方案中,宿主细胞是哺乳动物细胞,优选CHO细胞。

[0250] 在该方法的另一个实施方案中,重组蛋白是抗体或其抗原结合片段。

[0251] 在该方法的另一个实施方案中,生产阶段在生物反应器中进行,优选地,其体积等于或大于50L,等于或大于100L,等于或大于500L,等于或大于1000L,等于或大于2,000L,等

于或大于5,000L,等于或大于10,000L或者等于或大于20,000L。

[0252] 在该方法的一个实施方案中,该方法包括从细胞培养基中回收重组蛋白的步骤和纯化重组蛋白的进一步步骤。

[0253] 在该方法的另外一个实施方案中,纯化包括蛋白A色谱。

[0254] 在该方法的另外一个实施方案中,该方法还包括配制纯化的重组蛋白的步骤。

[0255] 在该方法的一个实施方案中,将重组蛋白配制在包含一种或多种氨基酸和表面活性剂的液体制剂中。

[0256] 在该方法的另一个实施方案中,制剂包含组氨酸和/或脯氨酸。

[0257] 在该方法的另外一个实施方案中,制剂在5至7.4(诸如5至6.5,例如5至6,诸如5.5至6)的pH下包含浓度为5mM至100mM,例如浓度为10mM至50mM的组氨酸和/或浓度为100mM至500mM的脯氨酸。

[0258] 在该方法的另外一个实施方案中,所述制剂在5.2至6.0,诸如约5.6的pH下包含浓度为30mM的组氨酸和浓度为250mM的脯氨酸。

[0259] 在该方法的另外一个实施方案中,表面活性剂是聚山梨酯80,其浓度优选为0.001%至0.1%(w/v),例如0.005%至0.1%,诸如0.01%至0.1%,例如0.01%至0.05%,诸如0.03%。

[0260] 在该方法的另外一个实施方案中,重组蛋白是抗体,并且以10mg/ml至250mg/ml,例如20mg/ml至250mg/ml,诸如50mg/ml至250mg/ml,例如120mg/ml至160mg/ml,诸如约140mg/ml的浓度配制该抗体。

[0261] 在该方法的另一个实施方案中,该方法降低了所产生的重组蛋白的异质性,其中所述异质性的降低包括降低:

[0262] a.电荷异质性,优选酸性峰基团(APG);和/或

[0263] b.氨基酸氧化、异构化、片段化、其他共价加合物的糖基化、脱酰胺化、半胱氨酸化;和/或

[0264] c.颜色或颜色强度,例如在不同批次的重组蛋白之间;和/或

[0265] d.高分子量种类(HMWS);和/或

[0266] e.重组蛋白不稳定性。

[0267] 在另外一个方面,本发明涉及通过本发明的方法能够获得或获得的重组蛋白制剂。在一个实施方案中,该制剂是散装制剂(bulk preparation)。在其他实施方案中,例如当所述方法包括配制蛋白质产物的其他步骤时,所获得的制剂是配制的蛋白质制剂,例如适用于向患者施用的制剂。

[0268] 相对于通过相同方法、但其中未如本发明中所述限制生产阶段中的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量而获得的相同重组蛋白而言,本文所获得的所述制剂中的重组蛋白(优选抗体或其抗原结合片段)表现出降低的异质性。

[0269] 在另外一个方面,本发明涉及包含抗体的药物组合物,其中所述组合物是包含一种或多种氨基酸和表面活性剂的液体制剂。

[0270] 在一个实施方案中,药物组合物包含组氨酸和/或脯氨酸。

[0271] 在另外一个实施方案中,药物组合物包含组氨酸和/或脯氨酸。

[0272] 在另外一个实施方案中,药物组合物在5至7.4(诸如5至6.5,例如5至6,诸如5.5至6)的pH下包含浓度为5mM至100mM,例如浓度为10mM至50mM的组氨酸和/或浓度为100mM至500mM的脯氨酸。

6) 的pH下包含浓度为5mM至100mM,例如浓度为10mM至50mM的组氨酸和/或浓度为100mM至500mM的脯氨酸。

[0273] 在另外一个实施方案中,药物组合物在5.2至6.0(诸如约5.6)的pH下包含浓度为30mM的组氨酸和浓度为250mM的脯氨酸。

[0274] 在药物组合物的另外一个实施方案中,表面活性剂是聚山梨酯80,优选地其浓度为0.001%至0.1%(w/v),例如0.005%至0.1%,诸如0.01%至0.1%,例如0.01%至0.05%,诸如0.03%。

[0275] 在药物组合物的另外的实施方案中,以10mg/ml至250mg/ml的浓度,例如20mg/ml至250mg/ml,诸如50mg/ml至250mg/ml,例如120mg/ml至160mg/ml,诸如约140mg/ml的浓度配制抗体。

[0276] 在药物组合物的另外一个实施方案中,抗体是

[0277] 1) 抗体或其抗原结合片段,其

[0278] a. 包含具有如SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有如SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有如SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有如SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有如SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有如SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或

[0279] b. 包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:8中定义的序列的重可变区;或

[0280] c. 包含与SEQ ID NO:7中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻可变区和与SEQ ID NO:8中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重可变区;

[0281] d. 包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:11中定义的序列的重链;或

[0282] e. 包含与SEQ ID NO:7中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻可变区和与SEQ ID NO:11中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重链;或

[0283] 2) 抗体,其包含具有如SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有如SEQ ID NO:10中定义的序列的重链;或

[0284] 3) 抗体,其包含与SEQ ID NO:9中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻链和与SEQ ID NO:10中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重链。

[0285] 宿主细胞和培养条件

[0286] 重组蛋白、抗体或其抗原结合片段可优选通过培养哺乳动物宿主细胞,最优选中国仓鼠卵巢(CHO)细胞来产生。

[0287] 术语“细胞培养物”或其语法变型包括但不限于在细胞培养基中维持或生长特定的一段时间(例如,生产阶段)的多个宿主细胞,优选哺乳动物宿主细胞,其经过适当工程改造和/或操纵以表达(即产生)一种或多种重组蛋白。

[0288] 可将哺乳动物细胞,特别是CHO细胞在支持其生长和重组蛋白表达的任何培养基中培养,优选该培养基是不含动物来源的产物(诸如动物血清和蛋白胨)的培养基。本领域

技术人员可以使用不同的细胞培养基,每种培养基包含维生素、氨基酸、激素、生长因子、离子、缓冲剂、核苷、葡萄糖或等效能源的不同组合,其以合适的浓度存在以使细胞生长和蛋白质产生。已例如在W098/08934和US2006/0148074(两者均全文并入本文)中描述了合适的培养基。可用于本发明或经修饰以满足半胱氨酸/胱氨酸和/或色氨酸要求的其他合适的市售培养基包括AmplicHO CD培养基、Dynamis<sup>TM</sup>培养基、**EX-CELL<sup>®</sup>** Advanced<sup>TM</sup> CHO补料分批系统、CD FortiCHO<sup>TM</sup> 培养基、CP OptiCHO<sup>TM</sup> 培养基、最低必需培养基(MEM)、**Bal anCD<sup>®</sup>** CHO Growth A培养基、ActiPro<sup>TM</sup> 培养基、DMEM-达尔伯克改良伊格尔培养基和RPMI-1640培养基。

[0289] 细胞培养可以在任何合适的容器(诸如摇瓶或生物反应器)中进行,其可以以或可以不以补料分批模式操作,这取决于所需的生产规模。这些生物反应器可以是搅拌釜反应器或气提反应器。可以使用容量大于1,000L至50,000L,优选介于5,000L至20,000L或至10,000L的各种大型生物反应器。或者,也可以使用较小规模的生物反应器(诸如2L至100L)生产抗体或抗体片段。

[0290] 在本发明的一个优选实施方案中,无论在哪里进行任何先前的阶段(即扩增阶段),生产阶段都在生物反应器或任何其他悬浮培养容器(诸如摇瓶或旋转瓶)中进行。生产阶段优选以补料分批模式操作,但也可以使用任何其他模式,诸如分批、灌注或化学恒定器模式。在灌注或化学恒定器的情况下,根据灌注流速对比从生产容器中产生的重组蛋白的去除率来计算所使用的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量的比率。

[0291] 在一个实施方案中,该方法包括从细胞培养基中回收重组蛋白的步骤和纯化重组蛋白的进一步步骤。

[0292] 在另外一个实施方案中,纯化包括蛋白A色谱。

[0293] 在另外一个实施方案中,该方法还包括配制纯化的重组蛋白的进一步步骤。

[0294] 在一个实施方案中,将重组蛋白配制在包含一种或多种氨基酸和表面活性剂的液体制剂中。

[0295] 在另外一个实施方案中,所述制剂包含组氨酸和/或脯氨酸。

[0296] 在另外一个实施方案中,所述制剂在5至7.4(诸如5至6.5,例如5至6,诸如5.5至6)的pH下包含浓度为5mM至100mM,诸如浓度为10mM至50mM的组氨酸,和/或浓度为100mM至500mM的脯氨酸。

[0297] 在另外一个实施方案中,该制剂在5.2至6.0(诸如约5.6)的pH下包含浓度为30mM的组氨酸和浓度为250mM的脯氨酸。

[0298] 在另外一个实施方案中,表面活性剂是聚山梨酯80,其浓度优选为0.001%至0.1%(w/v),例如0.005%至0.1%,诸如0.01%至0.1%,例如0.01%至0.05%,诸如0.03%。

[0299] 在另外一个实施方案中,重组蛋白是抗体,并且以10mg/ml至250mg/ml,例如20mg/ml至250mg/ml,诸如50mg/ml至250mg/ml,例如120mg/ml至160mg/ml,诸如约140mg/ml的浓度配制该抗体。

[0300] 重组蛋白,例如抗体或其抗原结合片段通常存在于哺乳动物细胞培养物(通常是CHO细胞培养物)的上清液中。对于CHO宿主细胞,抗体或其抗原结合片段被分泌在上清液中,并且可通过本领域已知的方法,通常通过离心来收集所述上清液。

[0301] 可以使用本发明的方法产生的重组蛋白

[0302] 本发明的方法可用于产生任何类型的重组多肽或蛋白质,包括例如肽或具有显著三级结构的更大的蛋白质以及例如糖蛋白和多聚体蛋白。然而,优选地,在根据本发明的方法中产生的重组蛋白是抗体或其抗原结合片段。如本文中所用,术语“抗体(antibody)”或“抗体(antibodies)”包括例如单克隆抗体和多克隆抗体两者以及单特异性和多特异性(诸如双特异性)抗体两者。

[0303] “抗体”包括任何物种的抗体,特别是哺乳动物物种的抗体(其通常具有两条重链和两条轻链)、任何同种型的人抗体(包括IgA<sub>1</sub>、IgA<sub>2</sub>、IgD、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> IgE和IgM及其经修饰的变体)、非人灵长类动物抗体(例如来自黑猩猩、狒狒、恒河猴或食蟹猴)、啮齿动物抗体(例如来自小鼠、大鼠或兔子);山羊或马抗体及其衍生物,或鸟类物种的抗体(诸如鸡抗体)或鱼类物种的抗体(诸如鲨鱼抗体)。术语“抗体”还指其中至少一条重和/或轻链抗体序列的第一部分来自第一物种并且所述重和/或轻链的第二部分来自第二物种的“嵌合”抗体。本文中的目标嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,其包含源自非人灵长类动物(例如,旧大陆猴,诸如狒狒、恒河猴或食蟹猴)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列。“人源化”抗体是包含源自非人抗体的序列的嵌合抗体。在大多数情况下,人源化抗体是人抗体(受体抗体),其中受者的高变区的残基被非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、兔、鸡或非人灵长类动物)的高变区或互补决定区(CDR)的残基替代,所述非人物种的高变区或互补决定区具有所需的特异性、亲和力和活性。在大多数情况下,人(受者)抗体在CDR以外的残基,即框架区(FR)中的残基,另外地被相应的非人残基代替。此外,人源化抗体可包含不存在于受者抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步精修抗体性能。人源化降低了非人抗体在人中的免疫原性,从而有利于抗体应用于人疾病的治疗。人源化抗体和产生它们的几种不同技术是本领域公知的。“抗体”还指人抗体,其可代替人源化而产生。例如,有可能产生在免疫时能够产生全套人抗体而无内源性鼠抗体产生的转基因动物(例如,小鼠)。例如,已经描述了在嵌合和种系突变型小鼠中抗体重链铰链区(JH)基因的纯合缺失导致内源性抗体产生的完全抑制。在这种种系突变型小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在用特定抗原免疫携带人种系免疫球蛋白基因的转基因动物时,产生对所述抗原具有特异性的人抗体。用于产生此类转基因动物的技术和用于从此类转基因动物分离并产生人抗体的技术是本领域已知的。或者,在转基因动物(例如小鼠)中,只有编码小鼠抗体可变区的免疫球蛋白基因被相应的人可变免疫球蛋白基因序列替代。编码抗体恒定区的小鼠种系免疫球蛋白基因保持不变。这样,抗体效应子在转基因小鼠的免疫系统中起作用,因此B细胞的发育基本不变,这可能导致在体内抗原攻击时抗体反应得到改善。一旦从此类转基因动物中分离出编码特定目标抗体的基因,就可以将编码恒定区的基因替换为人恒定区基因,以获得完全人抗体。如本文中所用,术语“抗体”还指无糖基化的抗体。

[0304] 如本文中所用,术语“其抗原结合片段”或其语法变型是指抗体片段。抗体的片段包含本领域已知的至少一个重链或轻链免疫球蛋白结构域,并与一个或多个抗原结合。根据本发明的抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>以及Fv和scFv片段;以及双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、结构域抗体(dAb),诸如sdAb、VHH或骆驼科抗体(例如来自骆驼或美洲驼,诸如Nanobodies<sup>TM</sup>)和VNAR片段、单链抗体、由抗体片段或抗体形成的双特异性抗体、三特异性抗体、四特异性抗体或多特异性抗体,包括但不限于Fab-Fv或Fab-Fv-Fv构建体。

如上定义的抗体片段是本领域已知的。

[0305] 在一个特别优选的实施方案中,通过根据本发明的方法产生的抗体或其抗原结合片段是(表1) :

[0306] 1) 这样的抗体或其抗原结合片段,其

[0307] a. 包含具有如SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有如SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有如SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有如SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有如SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有如SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或

[0308] b. 包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:8中定义的序列的重可变区;或

[0309] c. 包含与SEQ ID NO:7中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻可变区和与SEQ ID NO:8中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重可变区;

[0310] d. 包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:11中定义的序列的重链;或

[0311] e. 包含与SEQ ID NO:7中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻可变区和与SEQ ID NO:11中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重链;或

[0312] 2) 抗体,其包含具有如SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有如SEQ ID NO:10中定义的序列的重链;或

[0313] 3) 抗体,其包含与SEQ ID NO:9中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的轻链和与SEQ ID NO:10中定义的序列具有至少80%同一性或相似性,优选90%同一性或相似性的重链。

[0314] 在整个说明书中,根据Kabat定义来定义互补决定区(“CDR”)。Kabat定义是用于对抗体中残基进行编号的标准,并且其通常用于鉴定CDR区(Kabat等,(1991),第5版,NIH出版号91-3242)。

[0315] 表1

[0316]

区域和 SEQ ID 标识符	氨基酸序列
CDR-H1 SEQ ID NO: 1	GFTFSNYGMV
CDR-H2 SEQ ID NO: 2	YIDSDGDNTYYRDSVKG
CDR-H3 SEQ ID NO: 3	GIVRPFLY
CDR-L1 SEQ ID NO: 4	KSSQSLVGASGKTYLY
CDR-L2 SEQ ID NO: 5	LVSTLDS
CDR-L3	LQGTHFPHT

[0317]

SEQ ID NO: 6			
轻可变区	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKSSQSLV
SEQ ID NO: 7	GASGKYLYW	LFQKPGKAPK	RLIYLVSTLD
	SGIPSRFSGS	GSGTEFTLTI	SSLQPEDFAT
	YYCLQGTHFP	HTFGQGTKLE	IK
重可变区	EVPLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGFTFS
SEQ ID NO: 8	NYGMVWVRQA	PGKGLEWVAY	IDSDGDNTYY
	RDSVKGRFTI	SRDNAKSSLY	LQMNSLRAED
	TAVYYCTTGI	VRPFLYWGQG	TLTVTVS
轻链	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKSSQSLV
SEQ ID NO: 9	GASGKYLYW	LFQKPGKAPK	RLIYLVSTLD
	SGIPSRFSGS	GSGTEFTLTI	SSLQPEDFAT
	YYCLQGTHFP	HTFGQGTKLE	IKRTVAAPSV
	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK
	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSTYSL
	SSTLTLSKAD	YEHKHVYACE	VTHQGLSSPV
			TKSFNRGECA
重链	EVPLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGFTFS
SEQ ID NO: 10	NYGMVWVRQA	PGKGLEWVAY	IDSDGDNTYY
	RDSVKGRFTI	SRDNAKSSLY	LQMNSLRAED
	TAVYYCTTGI	VRPFLYWGQG	TLTVSSAST
	KGPSVFPLAP	CSRSTSESTA	ALGCLVKDYF
	PEPVTWSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY
	SLSSVVTVP	SSLGTTKTYTC	NVDHKPSNTK
	VDKRVESKYG	PPCPPCPAPE	FLGGPSVFLF
	PPPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSQEDPEV
	QFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQFNSTYRVV
	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKGLPSSIE
	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SQEEMTKNQV
	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NCQOPENNYKT

	<b>TPPVLDSDGS</b> <b>SCSVMHEALH</b>	<b>FFLYSRLTV</b> <b>NHYTQKSLSL</b>	<b>KSRWQEGNVF</b>
	<b>Fab 重链</b>	<b>EVPLVESGGG</b> <b>NYGMVWRQA</b>	<b>LVQPGGSLRL</b> <b>PGKGLEWVAY</b>
[0318]	<b>SEQ ID NO: 11</b>	<b>RDSVKGRFTI</b> <b>TAVYYCTTGI</b>	<b>SRDNAKSSLY</b> <b>VRPFLYWGQG</b>
		<b>KGPSVFPLAP</b> <b>PEPVTVSWNS</b>	<b>SSKSTSGGTA</b> <b>GALTSGVHTF</b>
		<b>SLSSVVTVPS</b> <b>VDKKVEPKSC</b>	<b>SSLGTQTYIC</b> <b>NVNHKPSNTK</b>

[0319] 重组蛋白或优选抗体或其抗原结合片段通常可由含有编码该蛋白或抗体核苷酸序列的载体的宿主细胞产生。

[0320] 抗体或其抗原结合片段可仅包含重链或轻链蛋白,在这种情况下,仅需使用重链或轻链蛋白编码序列来转染细胞。为了生产同时包含重链和轻链的产物,可用两种载体转染细胞,第一载体编码轻链蛋白,第二载体编码重链蛋白。或者,可使用单个载体,该载体包括编码轻链和重链蛋白的序列。

[0321] 在一个优选实施方案中,本发明提供了产生抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括:

[0322] a.在培养基中培养能够产生抗体或其抗原结合片段的CHO细胞;

[0323] b.使培养进行通过生产阶段,其中所述抗体或其抗原结合片段由细胞产生,其中在所述生产阶段中,在培养物中补充半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的抗体或其抗体结合片段的预期总量的10wt %至30wt %

[0324] c.以及任选地,从细胞培养基中回收抗体或其抗原结合片段,

[0325] 其中在该方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,以及

[0326] 其中半胱氨酸或胱氨酸通过在生产阶段中每天添加来提供,以及

[0327] 其中在生产阶段的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.9g/L,优选其中在生产阶段的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.3g/L,以及

[0328] 其中所述抗体或其抗原结合片段优选:

[0329] 1)包含具有如SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有如SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有如SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有如SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有如SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有如SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或

[0330] 2)包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:8中定义的序列的重可变区。

[0331] 在另外一个优选实施方案中,本发明提供了用于产生抗体或其抗原结合片段的方

法,该方法包括:

- [0332] a. 在培养基中培养能够产生抗体或其抗原结合片段的CHO细胞;
- [0333] b. 使培养进行通过生产阶段,其中所述抗体或其抗原结合片段由细胞产生,其中在所述生产阶段中,在培养基中补充:
  - [0334] ●半胱氨酸或胱氨酸,其总量达到所产生的抗体或其抗原结合片段的预期总量的10wt%至30wt%;和/或
  - [0335] ●色氨酸,其总量达到所产生的抗体或其抗原结合片段的预期总量的8wt%至35wt%,
  - [0336] c. 以及任选地,从细胞培养基中回收抗体或其抗原结合片段,
- [0337] 其中在该方法中提供的半胱氨酸或胱氨酸的总量为2.9至12g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.9至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),例如5.6到7g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,以及
- [0338] 其中在该方法中提供的色氨酸总量为2.5至7g/(10<sup>12</sup>个细胞),诸如2.5至3.5g/(10<sup>12</sup>个细胞),其中细胞是指生产阶段结束时预期的完整活细胞计数,以及
- [0339] 其中半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸通过在生产阶段中每天添加来提供,以及
- [0340] 其中在生产阶段的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.9g/L,优选其中在生产阶段的任何时间点,细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸浓度不超过0.3g/L,及
- [0341] 其中在生产阶段的任何时间点,细胞培养基中的色氨酸浓度不超过0.6g/L,优选其中在生产阶段的任何时间点,细胞培养基中的色氨酸浓度不超过0.3g/L,以及
- [0342] 其中所述抗体或其抗原结合片段优选:
- [0343] 1) 包含具有如SEQ ID NO:1中定义的序列的CDR-H1;具有如SEQ ID NO:2中定义的序列的CDR-H2;具有如SEQ ID NO:3中定义的序列的CDR-H3;具有如SEQ ID NO:4中定义的序列的CDR-L1;具有如SEQ ID NO:5中定义的序列的CDR-L2和具有如SEQ ID NO:6中定义的序列的CDR-L3;或
- [0344] 2) 包含具有如SEQ ID NO:7中定义的序列的轻可变区和具有如SEQ ID NO:8中定义的序列的重可变区。
- [0345] 现将参考附图中所示的实施方案通过实施例的方式进一步描述本发明。

## 实施例

- [0346] 缩写
- [0347] mAb:单克隆抗体;MFCS:多发酵控制系统;Cys:半胱氨酸或胱氨酸;Trp:色氨酸
- [0348] 材料和方法
- [0349] 细胞系、细胞培养和实验操作
- [0350] 使用了CHO-DG44细胞系。在标准操作条件(pH 7,温度36.8°C)下,在2L搅拌罐玻璃生物反应器中,在含有胱氨酸(0.05g/L)和色氨酸(0.2g/L)的化学成分确定的无动物成分的接种培养基中培养细胞,所述生物反应器具有受多发酵控制系统(Sartorius Stedim Biotech)控制的供应塔(C-DCU II,Sartorius Stedim Biotech)。使用了四种不同的生产细胞系,每种细胞系产生单克隆抗体(mAb),分别称为mAb1、mAb2、mAb3和mAb4。mAb1是抗-FcRn

抗体,其包含具有如SEQ ID NO:9中定义的序列的轻链和具有如SEQ ID NO:10中定义的序列的重链。

[0351] 所述生产以补料分批实验模式运行14天。在此阶段,单克隆抗体被分泌到培养基中。每天抽取样品以确定活细胞密度(VCD)、活力、离线pH,pCO<sub>2</sub>、重量克分子渗透压浓度、葡萄糖-乳酸盐浓度、氨基酸浓度和mAb浓度(于-80℃下储存)。每天根据需要手动添加消泡剂,以控制泡沫的形成。接种后72小时,以预定的速率开始连续营养物进料。连续营养物进料培养基不含半胱氨酸/胱氨酸或色氨酸。此时,在10天内每天添加半胱氨酸/胱氨酸和色氨酸作为具有如下文实施例中所述的量的批式进料(bolus feed)。实施例中描述的半胱氨酸/胱氨酸和色氨酸的量是考虑到已经存在于接种培养基中的这些氨基酸的初始量的接种后72小时开始的大剂量添加的总量。当葡萄糖浓度降至6g/L以下时(从第6天起),将葡萄糖大剂量进料添加到培养物中,并且每天测量葡萄糖浓度。在进料添加之前采集用于氨基酸分析的样品。根据进料组成和进料添加前测量的营养物浓度计算出进料后的浓度。

[0352] 分析方法

[0353] 通过使用**VI-CELL®** XR(Beckman-Coulter, Inc., Brea, CA)自动细胞计数装置操作对细胞进行计数,所述细胞计数装置操作基于台盼蓝拒染法来进行操作。

[0354] 使用NOVA 400 BioProfile自动分析仪(Nova Biomedical, Waltham, MA)测定培养基中的葡萄糖和乳酸盐水平。

[0355] 使用2020型冰点渗透压计(Advanced Instruments, Inc., Norwood, MA)进行渗透压测定。使用模型**BioProfile pHox®**血气分析仪(Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA)进行离线气体和pH测量。

[0356] 每天使用CedexBioHT系统(Roche)测定代谢产物浓度。

[0357] 用ForteBio Octet模型分析仪(ForteBio, Inc., Menlo Park, CA)或蛋白A高压液相色谱(HPLC)以及在分析前储存于-80℃下的细胞培养上清液样品进行产物滴度分析。

[0358] 使用Amicon Ultra-0.5mL离心过滤器(Merck Millipore, Billerica, MA)进行超滤后,通过反相UPLC(Waters AccQ • Tagultra方法)分析氨基酸。

[0359] 蛋白A纯化(**ÄKTAxpress**系统)用于纯化细胞培养上清液样品中的mAb。通过成像毛细管电泳(ProteinSimple iCE3)测定纯化的mAb的主要酸性(对于酸性峰基团为APG)和碱性(对于碱性峰基团为BPG)同种型的相对百分比。通过尺寸排阻色谱法(SE-UPLC)测定纯化的mAb的高分子量种类(HMWS)、单体和低分子量种类(LMWS)水平。

[0360] 使用透射分光光度计(UltrascanPro)在浓缩的蛋白A洗脱液中测量浓缩的mAb1和mAb2制剂的颜色强度,并将其与国际照明委员会(Commission Internationale de l'éclairage)(CIL)标度进行比较。将数值结果针对40mg/mL的浓度进行标准化。

[0361] 对纯化的mAb1进行电喷雾电离质谱(ESI-MS)。进行肽图分析以鉴定对抗体的翻译后修饰。使用SAS软件JMP 11进行统计分析。

[0362] 实施例1

[0363] 将产生mAb1的CHO细胞以 $0.35 \times 10^6$ 个细胞/mL的接种密度接种2升的生物反应器。如材料和方法部分所述,以用在整个细胞培养过程中达到的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的各种最大浓度以及半胱氨酸或胱氨酸(Cys)和色氨酸(Trp)的各种总量占所产生的总mAb1

重量的wt % (表2a) ,在补料分批方法中测试了八个实验条件。第一目标是评估半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸对重组mAb1异质性的影响。第二目标是确定所述影响是否归因于在整个细胞培养过程中达到的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的高浓度和/或是否归因于添加的总量占所产生的mAb总重量的wt %。

[0364] 表2a

生物反应器 ID	Cys 最大浓度 g/L	Cys 的总量 /mAb1 wt % (g/g)	Trp 最大浓度 g/L	Trp 的总量 /mAb1 wt % (g/g)
1	0.05 g/L	17.51	0.20 g/L	11.79
2	0.05 g/L	13.35	0.20 g/L	10.34
3	0.30 g/L	15.72	0.30 g/L	10.58
4	0.05 g/L	18.94	0.20 g/L	11.27
5	0.12 g/L	16.18	0.20 g/L	9.87
6	0.05 g/L	13.30	0.20 g/L	8.96
7	0.05 g/L	20.79	0.20 g/L	12.37
8	0.05 g/L	20.840612	0.20 g/L	8.5684363

[0365] [0366] 如材料和方法部分中所述测量重组蛋白质电荷变体和颜色强度。通过单因素Anova统计分析来分析数据以进行线性拟合,p值<0.05被认为是可以接受的。

[0367] 如图2b所示,mAb1中酸性峰基团电荷变体的增加(APG %)与添加的半胱氨酸或胱氨酸总量/所产生的总mAb1重量% (g/g)的增加之间存在相关性。

[0368] 关于mAb1的颜色强度,增加的mAb1的颜色强度(针对40mg/mL标准化的b\*值)与添加的色氨酸总量/所产生的总mAb1重量% (g/g)的增加之间存在相关性(图2a)。

[0369] 然而,当针对色氨酸或半胱氨酸或胱氨酸的最大浓度分析数据时,对颜色或APG没有影响(图2c和图2d)。

[0370] 为了确认影响mAb1异质性的是半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/所产生的总mAb1重量,而不是补料分批情形中整个生产阶段中达到的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的最大浓度,在第3天用半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的各种大剂量添加测试了8种实验条件,以达到2种氨基酸的高浓度(表2b)。为了具有相同的添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的量占所产生的总mAb1重量的wt % (g/g),调整了进料策略。如补料分批条件所示,增加的mAb1中的酸性峰基团电荷变体(APG %)与添加的半胱氨酸或胱氨酸总量/所产生的总mAb1 wt % (g/g)的增加之间(图3b)以及增加的mAb1颜色强度(针对40mg/mL标准化的b\*值)与增加的添加的色氨酸总量/所产生的总mAb1重量% (g/g)之间(图3a)存在相关性。然而,与APG电荷变体以及半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的最大浓度(g/L)没有相关性(分别为图3c和图3d)。这些结果证实,在细胞培养期间添加的半胱氨酸和色氨酸的总量/所产生的总mAb1重量的wt % (g/g)影响APG电荷变体和颜色强度。半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的最大浓度不影响APG电荷变体和颜色强度。

[0371] 表2b

生物反应器 ID	Cys 最大浓度 (g/L)	Trp 最大浓度 (g/L)	Cys 的总量 /mAb1wt % (g/g)	Trp 的总量 /mAb1 wt % (g/g)
9	0.06	0.20	13.85	9.34
10	0.06	0.60	17.31	11.71
11	0.90	0.60	16.00	10.79
12	0.48	0.38	13.60	9.17
13	0.90	0.38	13.12	8.88
14	0.90	0.20	13.10	8.84
15	0.06	0.20	14.66	9.88
16	0.48	0.38	13.85	9.37

[0373] 结论

[0374] Cys和Trp的总添加量占所产生的总重组mAb1的wt % (g/g) 对mAb1电荷变体和颜色强度具有影响。相反地,细胞培养基中半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的最大浓度不影响mAb1质量。

[0375] 实施例2

[0376] 为了进一步研究在细胞培养期间添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb的wt % (g/g)的影响,如方法部分中所述准备了2L生物反应器运行中的48个实验条件(表3)。分析了mAb1电荷变体、聚集体(HMWS)、颜色强度、滴度和活细胞生长。

[0377] 表3

生物反 应器 ID	Cys 的总量/mAb1 % (g/g)	Trp 的总量/mAb1 % (g/g)
17	10.39	26.31

[0379]

18	10.46	26.50
19	10.00	5.06
20	14.08	71.33
21	47.60	4.82
22	45.43	4.60
23	25.31	12.82
24	25.51	12.92
25	25.03	12.68
26	41.45	42.00
27	40.71	41.24
28	27.20	13.78
29	24.31	12.31
30	70.80	17.93
31	69.81	17.68
32	85.88	4.35
33	236.11	119.60
34	11.75	14.88
35	14.02	14.21
36	10.24	15.56
37	10.31	26.10
38	18.35	15.49
39	32.60	5.50
40	10.21	5.17
41	22.62	6.87
42	51.03	5.17
43	14.81	7.50
44	21.61	10.95
45	13.79	6.99
46	32.08	14.63
47	23.85	12.40
48	23.02	10.50
49	21.37	9.75
50	23.90	10.65
51	23.82	12.10
52	31.33	15.85

[0380]	<b>53</b>	<b>25.53</b>	<b>16.10</b>
	<b>54</b>	<b>24.22</b>	<b>10.41</b>
	<b>55</b>	<b>14.66</b>	<b>7.42</b>
	<b>56</b>	<b>21.63</b>	<b>10.60</b>
	<b>57</b>	<b>13.05</b>	<b>6.60</b>
	<b>58</b>	<b>16.31</b>	<b>8.28</b>
	<b>59</b>	<b>15.08</b>	<b>7.62</b>
	<b>60</b>	<b>12.82</b>	<b>6.48</b>
	<b>61</b>	<b>12.36</b>	<b>6.27</b>
	<b>62</b>	<b>12.35</b>	<b>6.24</b>
	<b>63</b>	<b>13.81</b>	<b>6.98</b>
	<b>64</b>	<b>13.05</b>	<b>6.62</b>

[0381] 如图4所示,在整个生产阶段添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb1的wt % (g/g) 影响酸性电荷变体组 (APG %)。在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸总量占所产生的总mAb1的重量百分比 (g/g) 存在约50wt %的饱和效应。半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的影响是累积性的,并无相互作用。减少整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb1的百分比wt % (g/g) 会降低所产生的mAb1上的酸性峰的百分比。

[0382] 图5显示半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量(在整个14天的细胞培养中添加的)占所产生的总mAb1重量的wt %对主峰基团的影响。如对于APG %所见,半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的影响是累积性的,并无相互作用。减少整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb1重量的wt %会增加所产生的重组mAb上的主峰的百分比。

[0383] 图6显示在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸的总量占所产生的总mAb1的wt % (g/g) 对高分子量种类 (HMWS) 的影响。在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸总量占所产生的总mAb1的重wt % (g/g) 存在约50%的饱和效应。减少半胱氨酸或胱氨酸的总量会降低所产生的重组mAb上HMWS的百分比。未观察到添加的Trp总量对HMWS的影响。

[0384] 图7中显示的结果举例说明了在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb1的wt % (g/g) 对重组mAb1的颜色强度(针对40mg/mL标准化的b值)的影响。减少整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量会降低所产生的重组mAb1的颜色强度。在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸的总量占所产生的总mAb1的wt % (g/g) 与色氨酸的总量占所产生的总mAb1的wt % (g/g) 之间存在相互作用。

[0385] 图8显示了等值线图,该图举例说明用于获得APG、HMWS、颜色强度的最低值和主峰基团的最高值的在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总mAb-1的wt % (g/g) 的百分比的最佳范围;添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量

占所产生的总mAb-1的重量百分比(g/g)对于半胱氨酸或胱氨酸为12.06至28.03wt%,对于色氨酸为8.84至32.06wt%。

[0386] 计算整个14天的生产阶段中累计完整活细胞计数(IVCC),并通过细胞培养体积(CSV)进行标准化。图9所示的结果显示添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/初始CSV重量的百分比对IVCC的影响。存在添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/CSV重量的百分比的最佳范围,对于半胱氨酸或胱氨酸为0.08%至0.24%,对于色氨酸为0.07%至0.15%。未观察到协同作用,只有累积作用(图9a和图9b)。

[0387] 图10a和10b显示添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/初始CSV重量的百分比对mAb1滴度的影响。存在添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量/CSV重量的百分比的最佳范围,对于半胱氨酸或胱氨酸为0.08%至0.24%,对于色氨酸为0.07%至0.15%。不存在相互作用。

[0388] 图11a和11b中所示的等值线图显示生产阶段结束时添加到细胞培养基中的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量/IVCC\* $10^{-12}$ 的最佳范围,对于Cys为2.9g至12g,对于Trp为2.5g至7g。

#### [0389] 实施例3

[0390] 如材料和方法中所述,利用各种添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总重组mAb1的wt%针对三种补料分批实验条件表征重组单克隆抗体(表4)。

#### [0391] 表4

生物反应器 ID	Cys 的总量/mAb1 wt% (g/g)	Trp 的总量/mAb1 wt% (g/g)
	65	11.72
	66	22.16
	67	94.20

[0393] 质谱分析显示由于半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸浓度的增加,在非变性和变性条件下对于糖基化mAb1在质谱图中观察到最强烈的峰出现了质量偏移(mass shift)。这些观察得出的结论是,修饰与糖基化模式的改变没有联系。手动解卷积后对轻链、重链和半聚体(一条重链加一条轻链)的质谱分析表明,在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总mAb1重量的wt%较高时,可能发生mAb的糖基化。可观察到更多的加合物,即在mAb1上添加小分子。当半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总添加量也增加时,轻链上的半胱氨酸加合增加。表5显示在三种测试条件下通过肽图分析获得的mAb1特征的概述。结果表明,增加在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb重量的wt%导致重链的苏氨酸19处的甲硫氨酸氧化以及重链的苏氨酸33处的脱酰胺增加。此外,mAb1的APG%和BPG%变体随着在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总mAb重量的wt%增加而急剧增加,而主峰随着在整个14天的生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总mAb重量的wt%减小而增加。

#### [0394] 表5

	生物反应器 ID		
mAb1 特征	65	66	67
Meth. Ox HC T019	10.60%	15.20%	19.70%
脱酰胺 HC T023	2.60%	2.10%	2.20%
脱酰胺 HC T033	4.80%	6.60%	7.00%
APG (%)	39.30%	49.10%	82.90%
BPG (%)	6.10%	7.30%	2.40%
主峰 (%)	54.70%	43.70%	14.80%

[0395] [0396] 实施例4

[0397] 为了鉴定半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸对表达mAb1的DG44 CHO细胞系的生长的抑制性浓度,测试了第3天半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的各种大剂量添加,目的是达到这些氨基酸的高浓度(表2b)。为了使添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的量占所产生的总mAb1重量的wt %相同,调整进料策略。图12显示,分别为0.3g/L至0.9g/L和0.6g/L的高浓度的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸显著降低细胞生长(通过CSV标准化的整个14天的生产阶段中的累计IVCC)。

[0398] [0399] 实施例5

[0399] 假设半胱氨酸或胱氨酸的耗尽可对表达mAb1的CHO细胞系的生长和生产力具有影响。分析了2L生物反应器中的9种实验条件(表6a):三种对照条件:在整个生产阶段过程中均未耗尽半胱氨酸或胱氨酸;两种实验条件:从第6天开始每天耗尽并持续进行,直至补料分批生产过程结束,其中进料中的半胱氨酸或胱氨酸浓度为6.87g/L,以及4个实验条件:在第6天耗尽半胱氨酸或胱氨酸,其中进料中的半胱氨酸或胱氨酸浓度为17.17g/L。由于每天添加半胱氨酸或胱氨酸,耗尽是周期性的。在表6b中描述了进料策略。添加的半胱氨酸或半胱氨酸的总量以及每IVCC添加的半胱氨酸或半胱氨酸的总量描述于图13中。添加进料之前的半胱氨酸浓度示于图14c。如图14a所示,如果进料中半胱氨酸或胱氨酸的浓度约为17.17g/L,则第6天半胱氨酸或胱氨酸的耗尽不会影响细胞生长。不希望受理论束缚,据信半胱氨酸或胱氨酸相关的代谢产物在细胞内积累和储存,并且当半胱氨酸或胱氨酸耗尽时可被利用。然而,mAb1的细胞系生产力受到半胱氨酸或胱氨酸的耗尽影响(图14b)。

## [0400] 表6a

生物反应器 ID	添加的进料中的 Cys 浓度 (g/L)	第 14 天添加的 Cys 的总量 /IVCC (g/10 <sup>12</sup> 个细胞)
[0401]	68	34.35
	69	34.35
	70	34.35
	71	6.87
	72	6.87
	73	17.17
	74	17.17
	75	17.17
	76	17.17

[0402] 表6b

培养日	添加的进料量 (CSV/24 小时 %)
0	0
1	0
2	0

[0403]

[0404]

3	0.2
4	0.28
5	0.36
6	0.36
7	0.68
8	0.68
9	0.84
10	0.84
11	0.72
12	0.72
13	0
14	0

[0405] 实施例6

[0406] 通过控制在整个生产阶段中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占总重组mAb的wt %引起的异质性降低的作用并不是mAb1所独有的,用另外三个也产生重组抗体的其它CHO细胞系测试了关于添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量的实验(表7)。如图15a所示,APG电荷变体和颜色强度的增加与添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占总mAb2的wt %的增加相关。当分析mAb3的APG电荷变体(15b)时,获得了相似结果。最后,APG和BPG电荷变体的增加以及主峰的减少与添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占总mAb4的wt %的增加相关(15c)。这些结果证实了针对mAb1获得的结果。

[0407] 表7

[0408]

生物反应器 ID	mAb	Cys 的总量/mAb % (g/g)	Trp 的总量/mAb % (g/g)
77	mAb2	24.02	14.89
78	mAb2	53.01	29.09

[0409]	79	<b>mAb2</b>	33. 35	21. 81
	80	<b>mAb2</b>	58. 67	32. 26
	81	<b>mAb3</b>	15. 97	17. 25
	82	<b>mAb3</b>	10. 92	16. 26
	83	<b>mAb4</b>	81. 15	57. 12
	84	<b>mAb4</b>	170. 18	62. 51
	85	<b>mAb4</b>	151. 22	55. 55
	86	<b>mAb4</b>	85. 45	60. 14

[0410] 实施例7

[0411] 基于本文测试的四种不同单克隆抗体的数据,分析了在整个14天的生产中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总重组mAb重量的wt %的影响(表3和表7)。如图16(a和b)所示,对于所分析的所有四种抗体,APG电荷变体的增加与添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总重组抗体的重量的wt %的增加相关。结果证实,添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总重组抗体的重量的wt %与抗体的异质性之间的关系不限于特定抗体,而是适用于任何抗体。

[0412] 实施例8[0413] 液体药物制剂

[0414] 在材料和方法中描述的标准操作条件下,利用表9中指定的各种半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总添加量,以补料分批方式大规模(即在2000L不锈钢生物反应器中)制备单克隆抗体mAb1的药物制剂。用透析缓冲液(33mM His和250mM Pro,pH 5.6)将抗体样品的缓冲液至少置换7次(7个透析体积),然后使用截留分子量(MWCO)为30kDa的膜进行超滤。一旦达到抗体的浓度(140mg/ml+/-14mg/ml),就以所需浓度(基于最终浓度为0.03%w/v)添加聚山梨酯80。使用UV A280测量抗体的浓度。

[0415] 表8显示了配制的mAb1的电荷变体的出现。在表8和表9中定义为“较高的Cys添加”的两个产品中,半胱氨酸或胱氨酸总添加量占所产生的总重组mAb1的wt %高于在表8和表9中定义为“较低的Cys添加”的另外三种产品。APG电荷变体的增加与添加的半胱氨酸或胱氨酸总量占所产生的总重组mAb1的wt %的增加相关。

## [0416] 表8

	较 高 的 Cys 添加 (run #1)	较 高 的 Cys 添加 (run #2)	较 低 的 Cys 添加 (run #1)	较 低 的 Cys 添加 (run #2)	较 低 的 Cys 添加 (run #3)
iCE %APG	50. 4%	45. 5%	38. 2%	36. 4%	41. 3%
iCE %主峰	40. 6%	44. 7%	54. 6%	54. 9%	48. 7%
iCE %BPG	9. 0%	9. 8%	7. 2%	8. 7%	9. 9%

[0417]

	较 高 的 Cys 添加 (run #1)	较 高 的 Cys 添加 (run #2)	较 低 的 Cys 添加 (run #1)	较 低 的 Cys 添加 (run #2)	较 低 的 Cys 添加 (run #3)
Cys 的总量/mAb1 wt% (g/g)	15. 66	14. 10	12. 20	12. 36	12. 77
Trp 的总量/mAb1 wt% (g/g)	8. 89	8. 00	8. 13	8. 22	8. 50

[0418] 实施例9

[0419] 基于表达mAb1抗体的DG44 CHO细胞系的数据(表3),开发了预测酸性峰基团(APG)水平的模型(图17)。将APG表示为使用米-门二氏动力学(MichealisMenten kinetic)的在整个14天的生产中添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸总量占所产生的总重组mAb重量的wt%的函数。

[0420] 为了将该模型应用于灌注生产,将每个灌注生产日定义为新的生产批次。因此,根据灌注流速对比所产生的重组蛋白从生产容器中的去除速率来计算所使用的半胱氨酸或胱氨酸和/或色氨酸的总量之比。使用交替切向流(ATF)技术在2L生物反应器中进行灌注生产。如图18所示,APG电荷变体预测与实验数据非常吻合。结果证实,添加的半胱氨酸或胱氨酸和色氨酸的总量占所产生的总重组抗体总重量的wt%与抗体异质性之间的关系可以扩展到其他生产模式,诸如灌注、分批或恒化器模式生产。

**A**

$$\text{添加的 Cys 的量} = C_{cys} \cdot F + C_{cys2} \cdot V$$

F=添加的进料体积 [L]

$C_{cys}$ =进料浓度 (Cys) [g/L]

V=生物反应器体积 [L]

$C_{cys2}$ =培养基浓度 (Cys) [g/L]

**B**

$$\text{产生的 RC 量} = C_{RC} \cdot V_F$$

RC=重组多肽

$V_F$ =最终生物反应器体积 [L]

$C_{RC}$ =最终 RC 滴度 [g/L]

**C**

$$\text{Cys/RC\%比例} = \frac{\text{添加的 Cys 量} \cdot 100}{\text{产生的 RC 量}}$$

图1

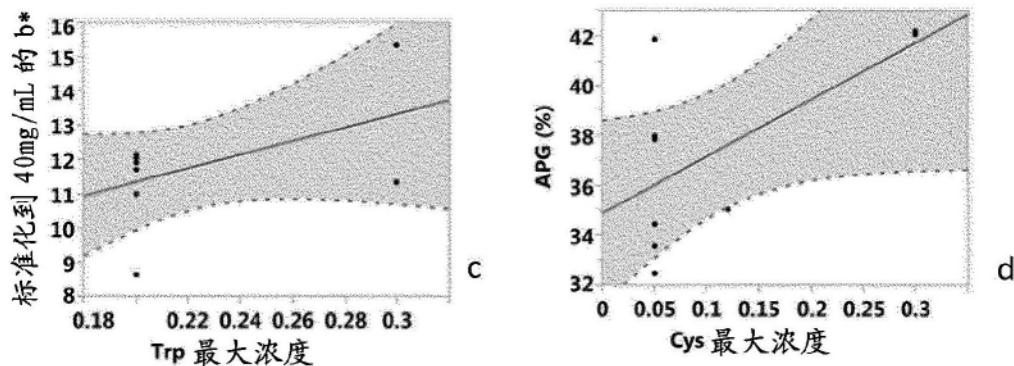
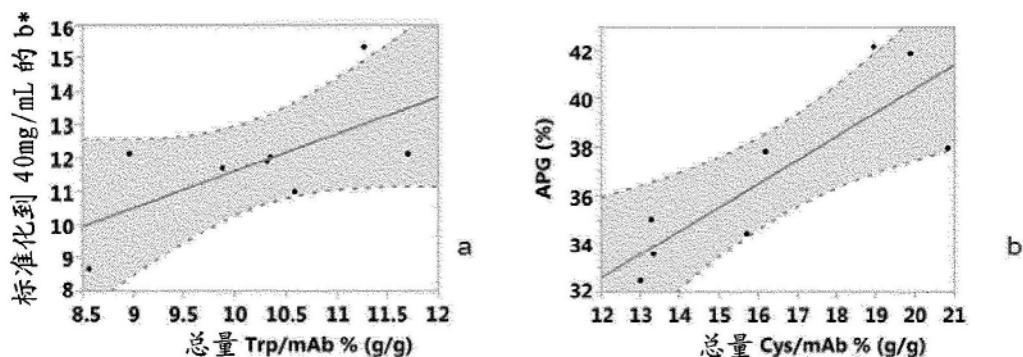


图2

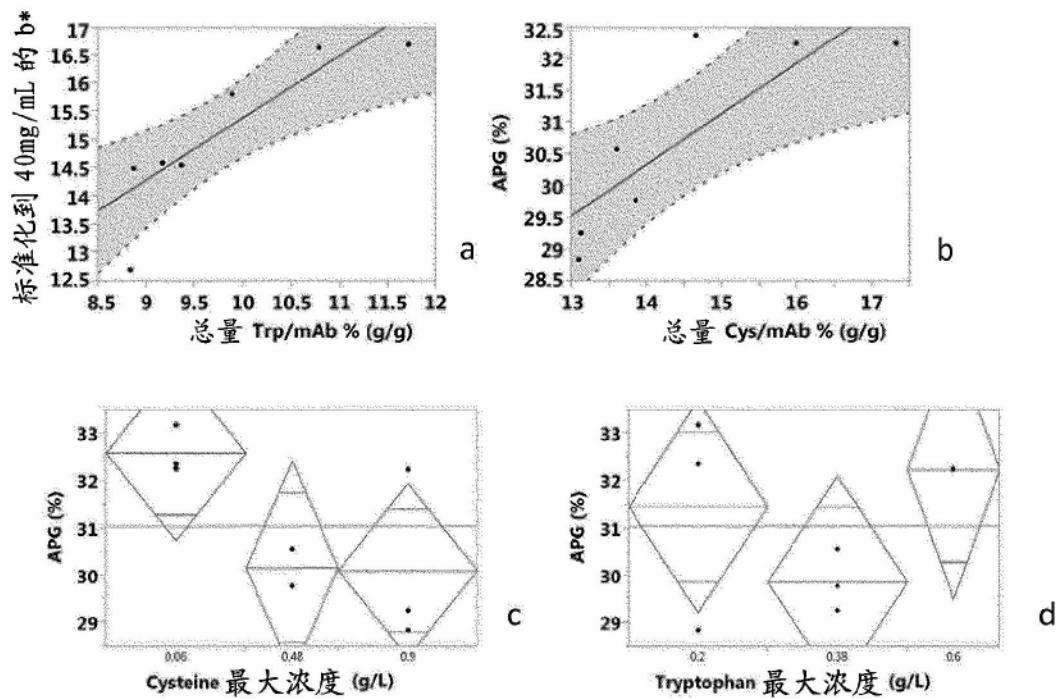


图3

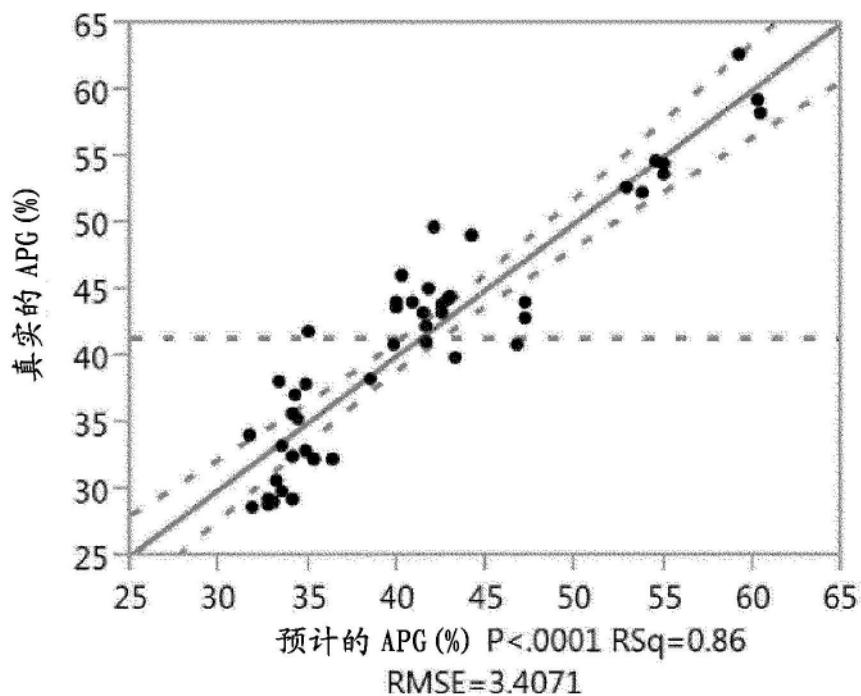


图4

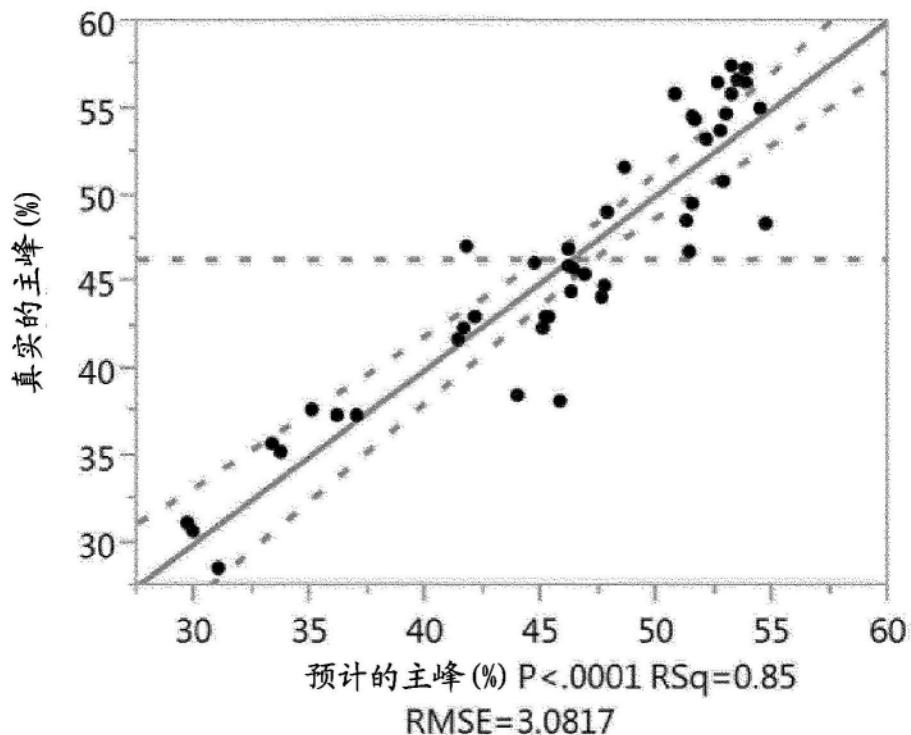


图5

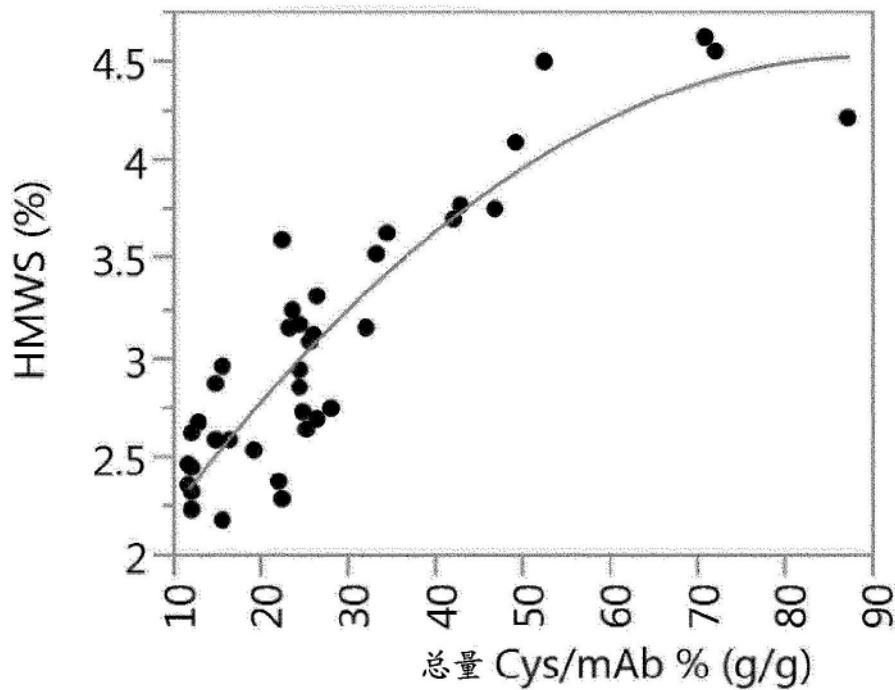


图6

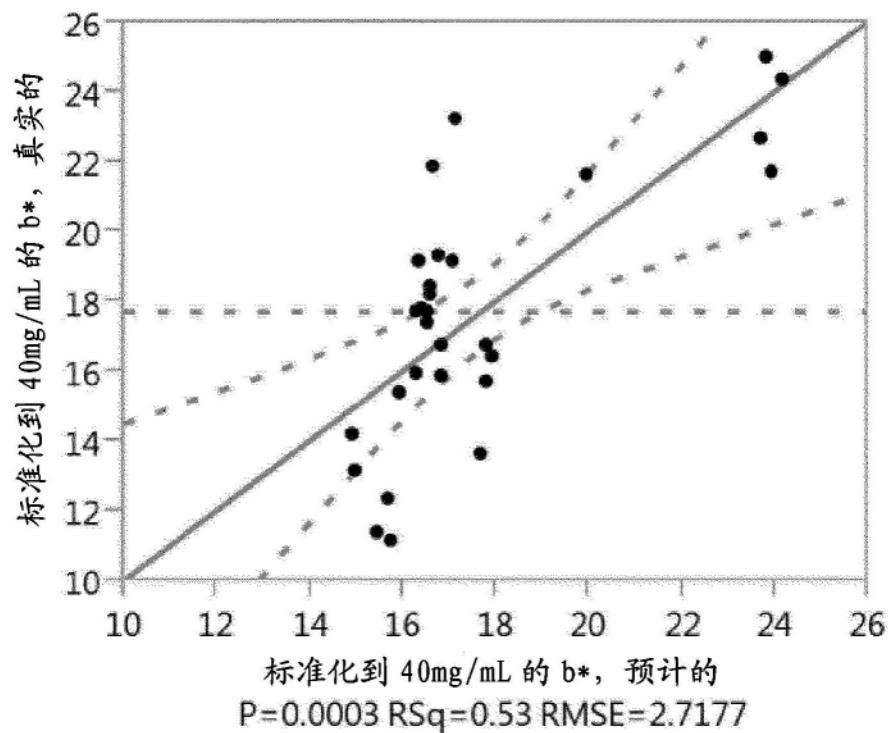
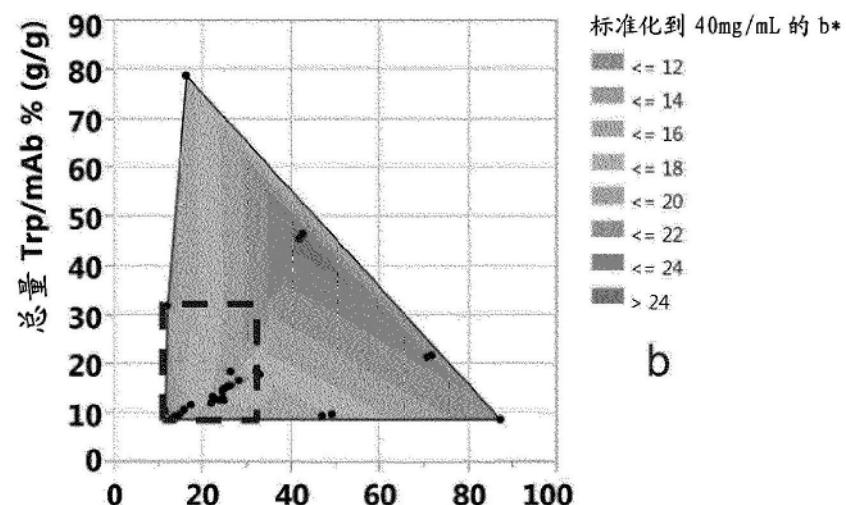
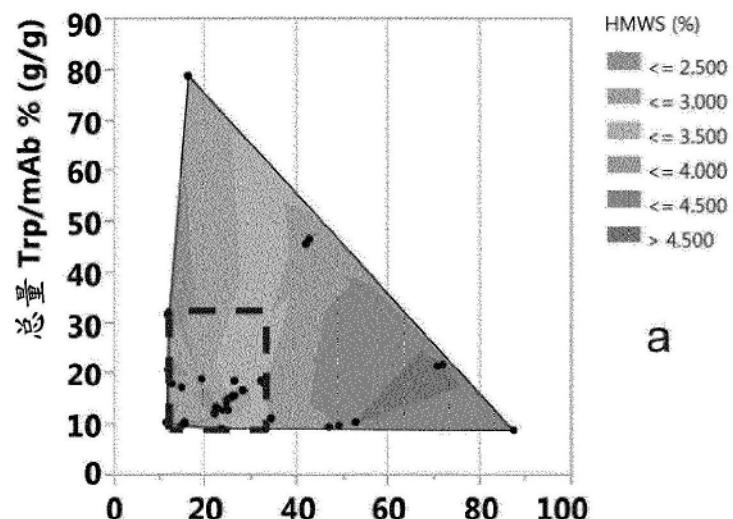


图7



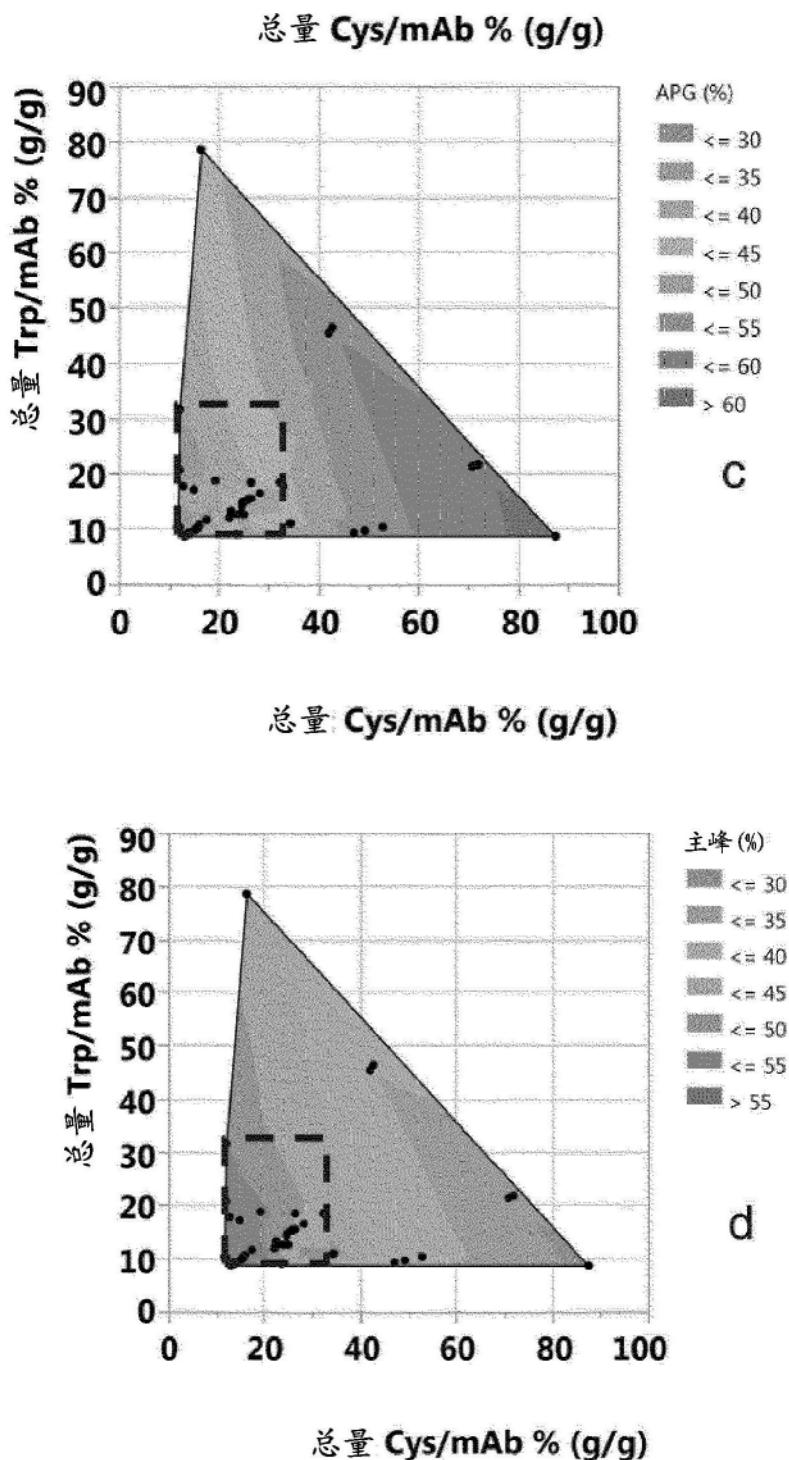


图8

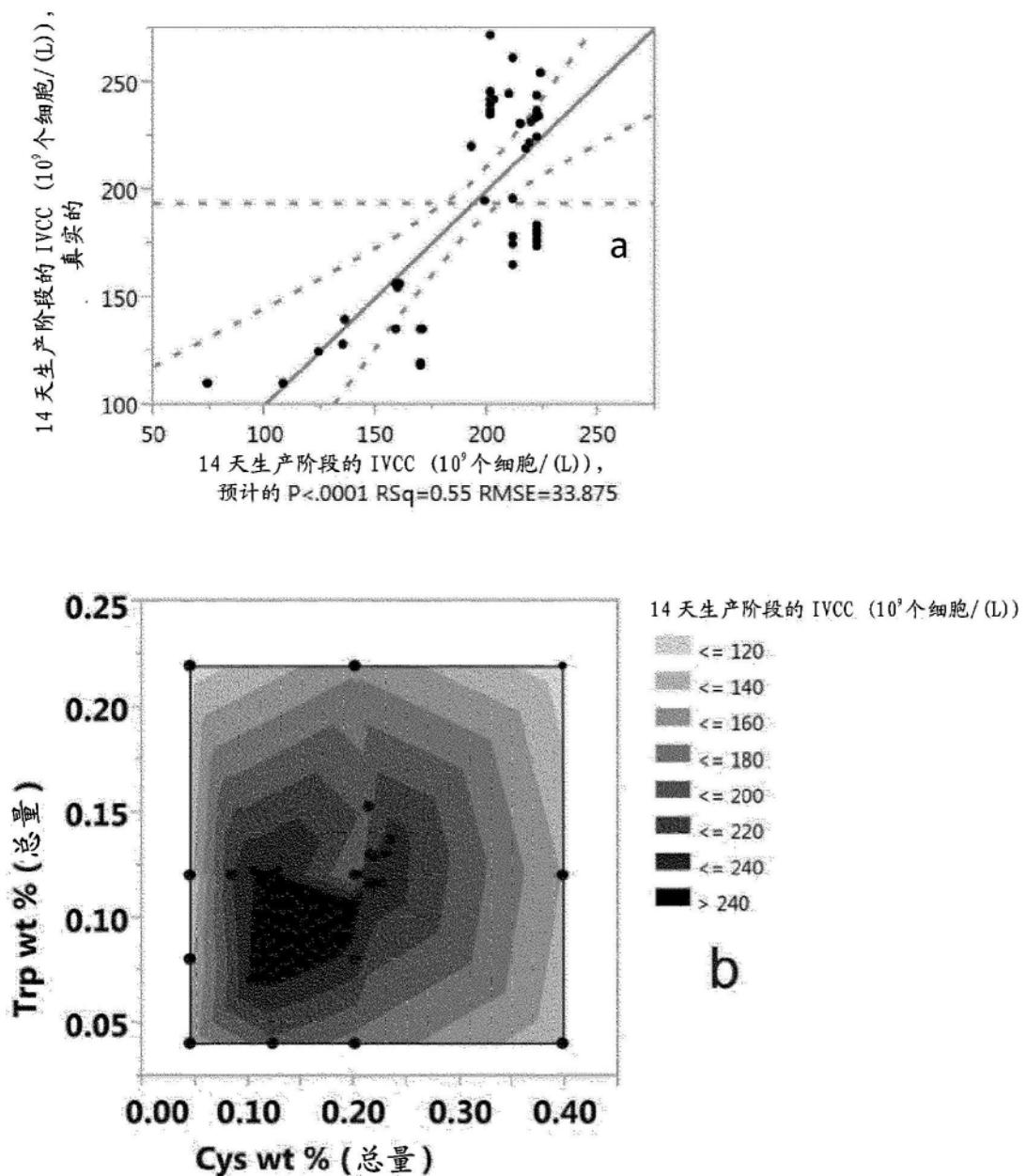


图9

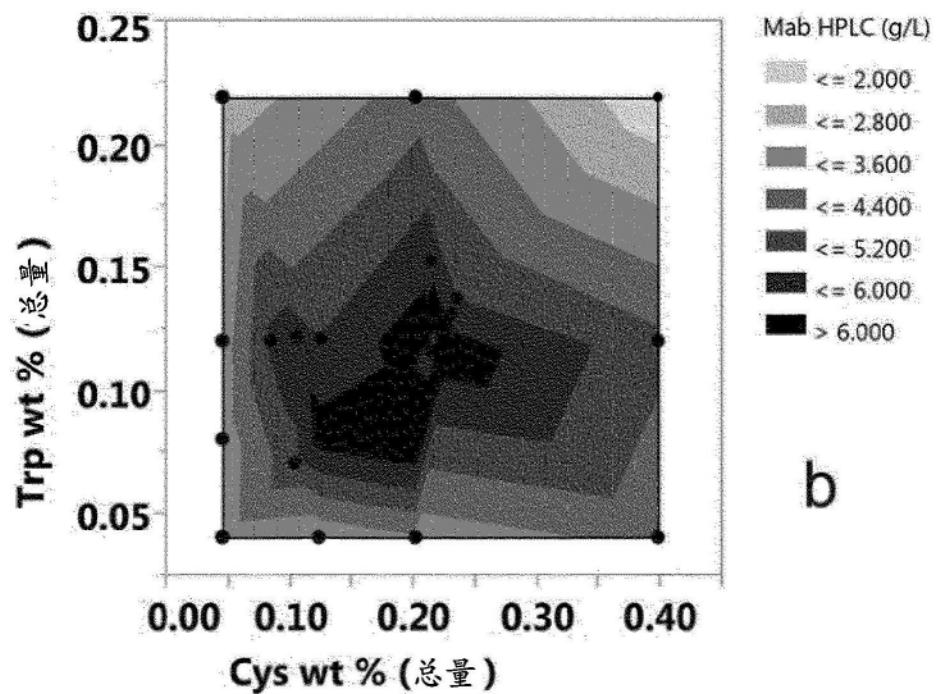
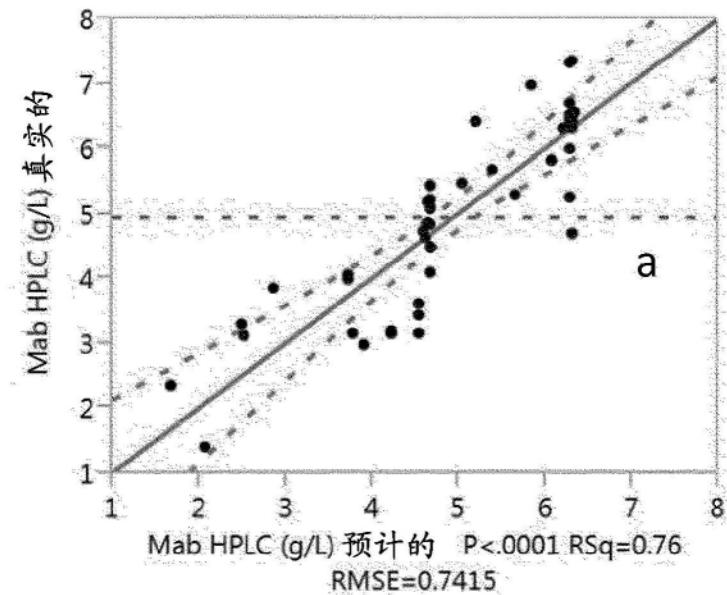


图10

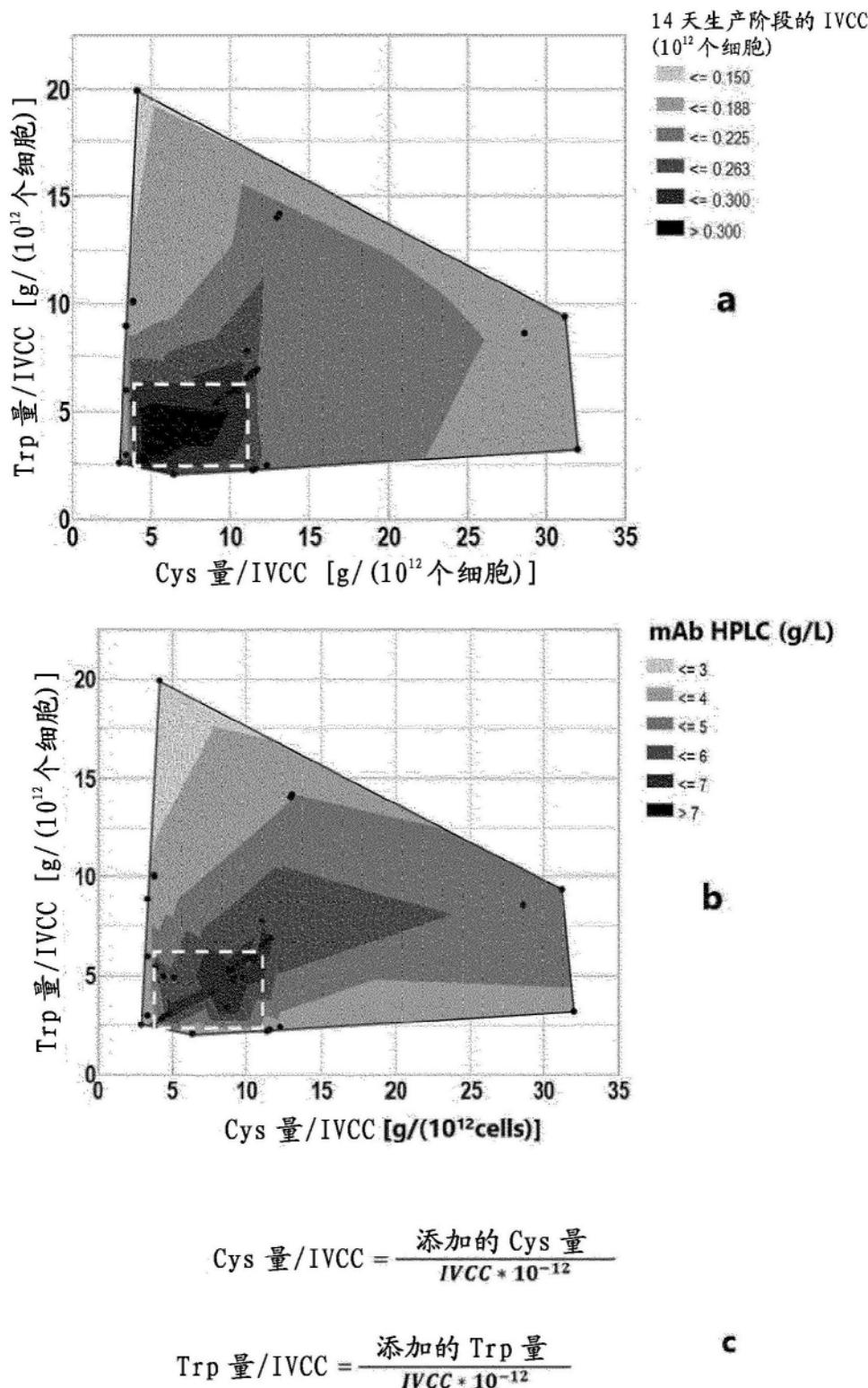


图11

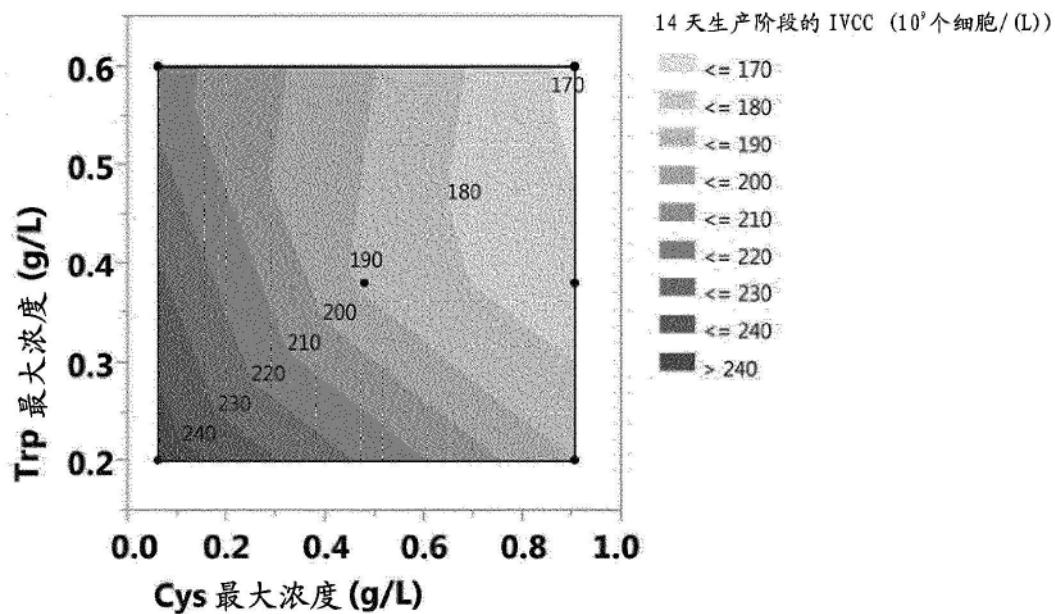


图12

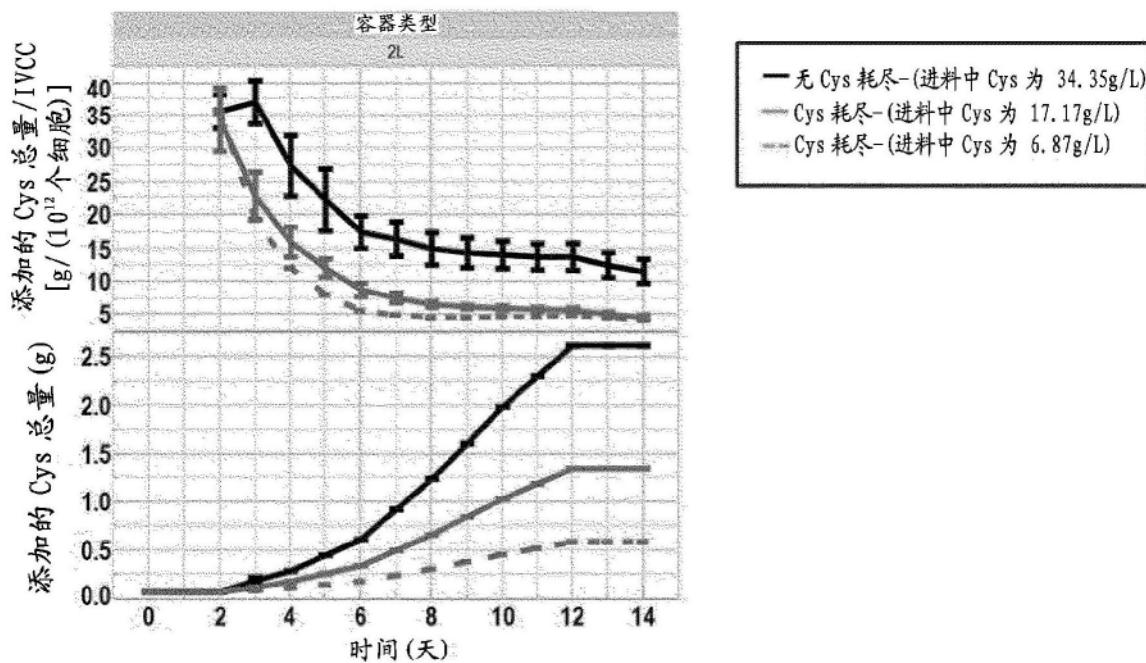


图13

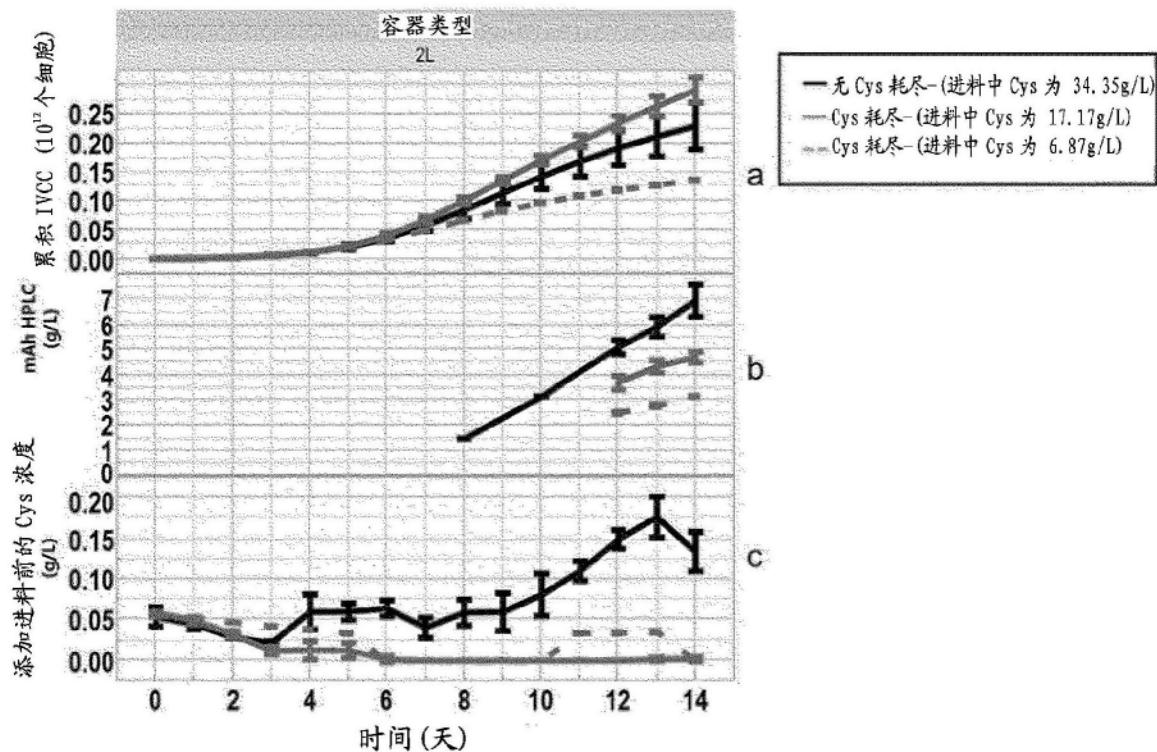


图14

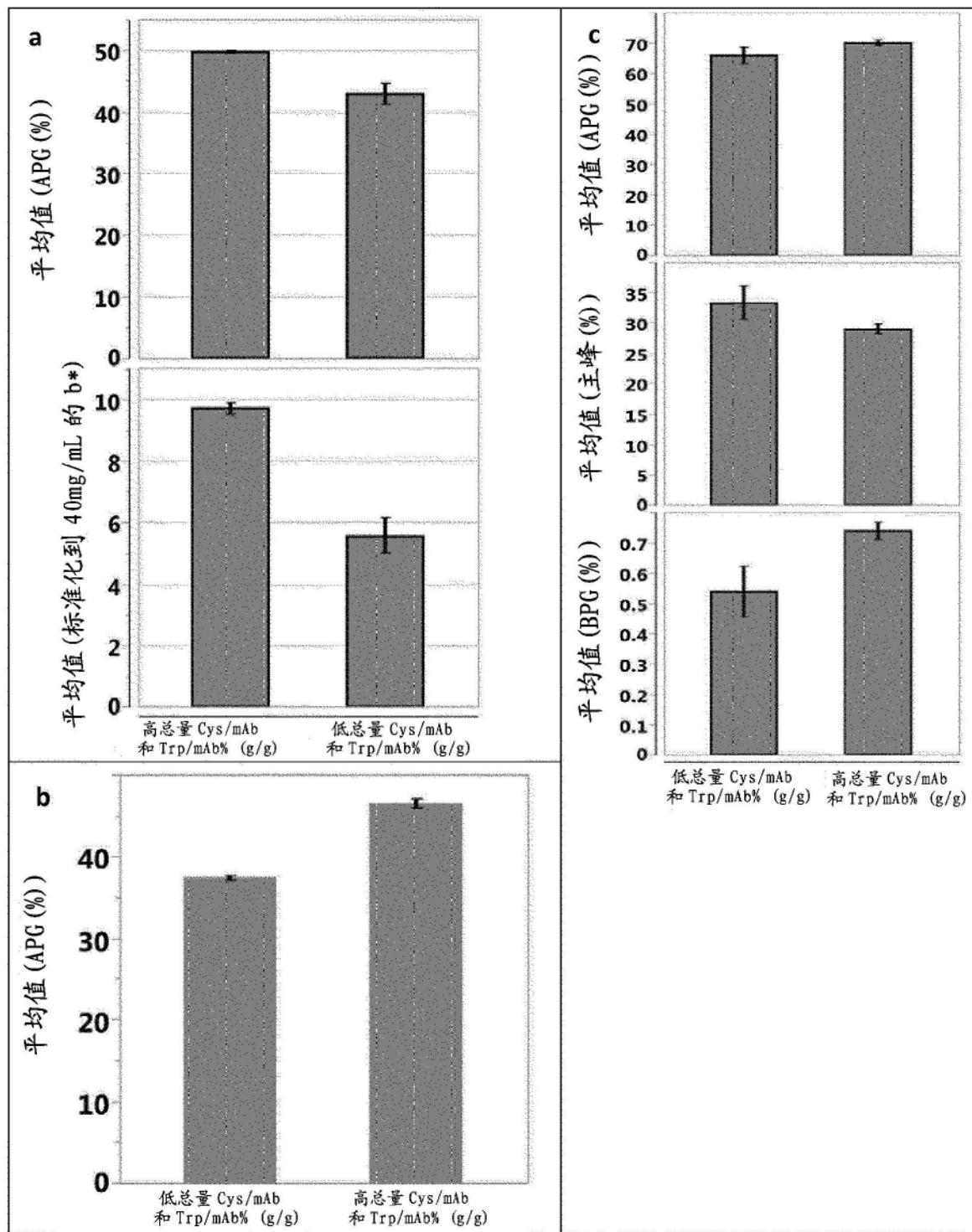


图15

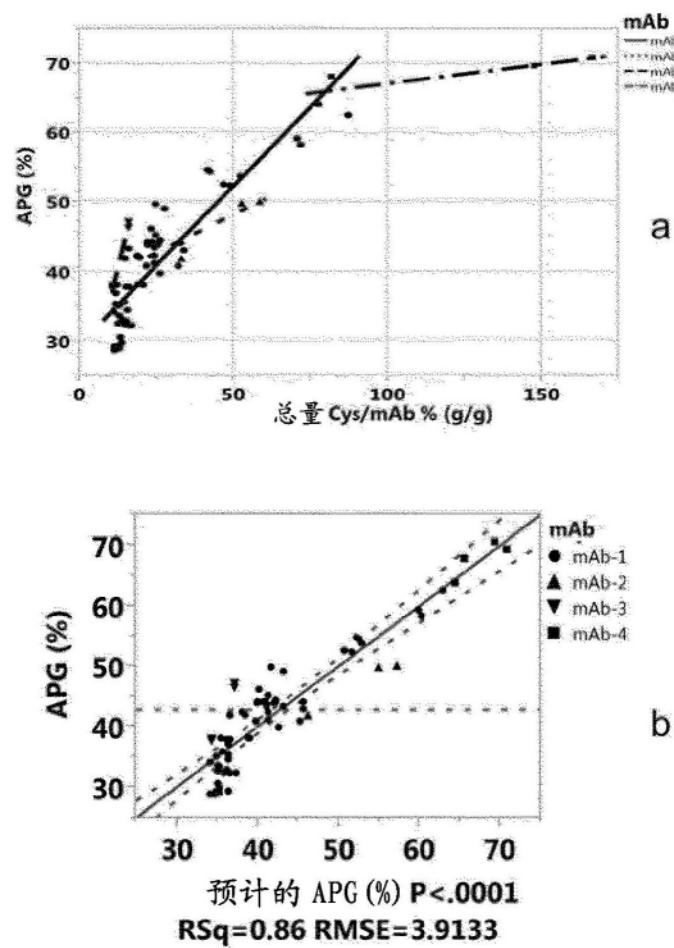


图16

$$APG (\%) = \frac{\text{比例} Cys/RC\% * 70.76}{\text{比例} Cys/RC\% + 47.53} + \frac{\text{比例} Trp/RC\% * 3}{\text{比例} Trp/RC\% + 1} + 17$$

图17

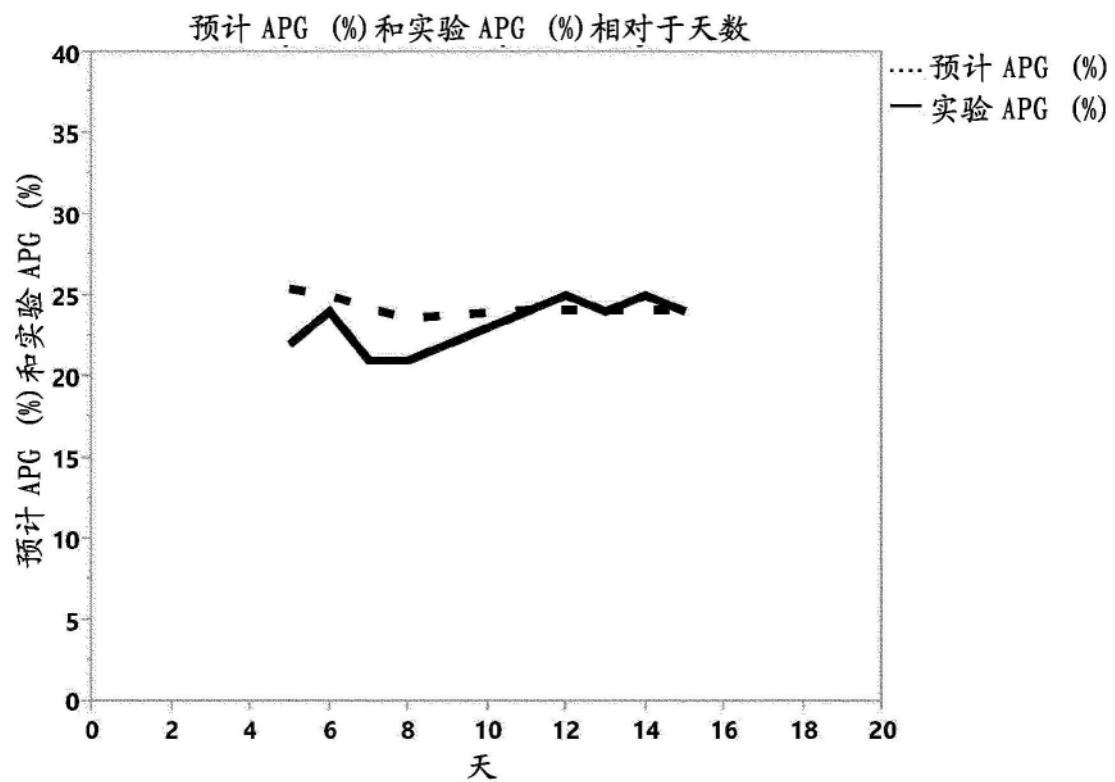


图18