

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109935.3

[51] Int. Cl.

C12Q 1/54 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月16日

[11] 公开号 CN 1820080A

[22] 申请日 2003.12.18

[21] 申请号 200380109935.3

[30] 优先权

[32] 2002.12.23 [33] US [31] 60/436,050

[86] 国际申请 PCT/US2003/040939 2003.12.18

[87] 国际公布 WO2004/058944 英 2004.7.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.23

[71] 申请人 布里斯托尔 - 迈尔斯斯奎布公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 B·M·施林 S·冈洛夫

D·科塔里 K·莱斯特

L·马特洛克 S·G·泽加雷利

C·E·约斯滕 J·D·巴施

S·萨克哈穆里 S·S·李

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 74 页 附图 19 页

[54] 发明名称

用于蛋白质生产的哺乳动物细胞培养方法中
产物质量提高

[57] 摘要

本发明描述了通过动物细胞或哺乳动物细胞，
作为例证，包括但不限于补料 - 分批细胞培养生产
蛋白质，尤其糖蛋白的方法和过程。所述方法包括
用 D - 半乳糖，优选送料培养基中的 D - 半乳糖，
优选每天喂饲细胞，以维持其持续时间内培养物中
D - 半乳糖的唾液酸化有效水平，从而增加所产生的
蛋白质的唾液酸化。本发明还包括培养期期间进行
至少两次温度转换，其中在培养期结束时温度低
于最初细胞培养时温度。包括两次或多次温度转换
的本发明的细胞培养方法维持高细胞生存力，并且
可以允许延长的蛋白质生产期。该方法还包括在接
种后的某一时间加入聚阴离子化合物。用 D - 半乳
糖，优选送料培养基中的 D - 半乳糖补加培养物以
维持半乳糖在培养物中唾液酸化有效水平上直到培

养运行结束可以逆转伴随着培养放大的唾液酸化下
降，并且对于大规模培养方法是有益的。

1. 生产蛋白质的细胞培养方法，其包括：
 - a) 在允许蛋白质产生的条件下培养在细胞培养中产生目标蛋白质的宿主细胞；和
 - 5 b) 用 D-半乳糖喂饲细胞。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中喂饲步骤 b) 基于每天发生。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中喂饲步骤 b) 连续发生。
4. 根据权利要求 3 的方法，其中每天发生一次以上的喂饲。
5. 根据权利要求 3 的方法，其中每天发生一次以下的喂饲。
- 10 6. 根据权利要求 1 的方法，其中将 D-半乳糖在送料培养基中喂饲给细胞。
7. 根据权利要求 1 的方法，其中 D-半乳糖以约 1 到 50 g/L 的量喂饲给细胞。
8. 根据权利要求 7 的方法，其中 D-半乳糖以约 3 到 25 g/L 的量
- 15 喂饲给细胞。
9. 根据权利要求 9 的方法，其中 D-半乳糖在细胞培养物中维持或保持约 0.2 到 5 g/L 的浓度。
10. 根据权利要求 1 的方法，其中细胞为哺乳动物细胞。
11. 根据权利要求 11 的方法，其中哺乳动物细胞是 CHO 细胞。
- 20 12. 根据权利要求 1 的方法，其中细胞培养为大规模细胞培养。
13. 根据权利要求 12 的方法，其中大规模细胞培养大于约 50L。
14. 根据权利要求 1 的方法，其中目标蛋白质为糖蛋白。
15. 根据权利要求 1 的方法，其中所产生的蛋白质的唾液酸化增加了。
- 25 16. 根据权利要求 1 的方法，其中目标蛋白质为可溶性 CTLA4 分子。
17. 根据权利要求 16 的方法，其中可溶性 CTLA4 分子为 CTLA4 融合蛋白。
18. 根据权利要求 17 的方法，其中可溶性 CTLA4 融合蛋白为
- 30 CTLA4Ig。
19. 根据权利要求 18 的方法，其中可溶性 CTLA4 融合蛋白为含有如图 8 中所示-1 到 357 或 +1 到 357 氨基酸的 CTLA4Ig。

20. 根据权利要求 17 的方法, 其中可溶性 CTLA4 分子为可溶性 CTLA4 突变分子。

21. 根据权利要求 20 的方法, 其中可溶性 CTLA4 突变分子为 L104EA29YIg, 其含有如图 9 中所示-1 到 357 或 +1 到 357 的氨基酸。

5 22. 生产可溶性 CTLA4 分子的细胞培养方法, 其包括:

a) 在允许蛋白质生产的条件下培养在细胞培养中产生可溶性 CTLA4 分子的 CHO 细胞; 和

b) 用 D-半乳糖喂饲细胞。

23. 根据权利要求 1 的方法, 其还包括:

10 c) 在允许细胞生长的条件下在 37°C 或接近 37°C 培养宿主细胞允许该细胞生长的时间;

d) 然后在 34°C 或接近 34°C 的第二种温度下培养细胞; 和

e) 然后在 32°C 或接近 32°C 的第三种温度下培养细胞。

24. 根据权利要求 1 的方法, 其还包括:

15 c) 在接种后某一时间向细胞培养物中加入聚阴离子化合物。

25. 根据权利要求 23 的方法, 其还包括:

f) 在接种后某一时间向细胞培养物中加入聚阴离子化合物。

26. 根据权利要求 22 的方法, 其还包括:

20 c) 在允许细胞生长的条件下在 37°C 或接近 37°C 培养 CHO 细胞允许该细胞生长的时间;

d) 从培养的约第 6 天开始在 34°C 或接近 34°C 的第二种温度下培养 CHO 细胞;

e) 从培养的约第 10 天开始在 32°C 或接近 32°C 的第三种温度下培养 CHO 细胞。

25 27. 根据权利要求 22 的方法, 其还包括:

c) 在接种后某一时间向细胞培养物中加入聚阴离子化合物。

28. 根据权利要求 26 的方法, 其还包括:

f) 在接种后某一时间向细胞培养物中加入聚阴离子化合物。

用于蛋白质生产的哺乳动物细胞培养方法中产物质量提高

5 本发明要求 2002 年 12 月 23 日提交的临时美国申请序号 60/436,050 的优先权, 这里完整引用该临时申请作为参考。

发明领域

10 本发明涉及培养哺乳动物细胞的新的方法和过程, 所述哺乳动物细胞产生蛋白质产物, 优选具有增加和增强的唾液酸含量的糖基化蛋白质产物。细胞培养方法和过程在它们的多个方面的性能导致如通过唾液酸含量测量的产物的高数量和质量。

发明背景

15 动物细胞培养, 特别是哺乳动物细胞培养优选用以表达用于治疗/或预防应用的重组产生的糖基化蛋白质。重组糖蛋白的糖基化模式是重要的, 因为糖蛋白的寡糖侧链影响蛋白质功能, 以及蛋白质的不同区域之间的分子内相互作用。这些分子内相互作用与蛋白质构象和糖蛋白的三级结构有关(见, 例如, A.Wittwer 等人, 1990, Biochemistry, 29: 4175-4180; Hart, 1992, Curr. Op. Cell Biol., 4: 1017-1023; Goochee 等人, 1991, Bio/Technol., 9: 1347-1355; 和 R. B. Parekh, 1991, Curr. Op. Struct. Biol., 1: 750-754)。
20 此外, 寡糖基于特异细胞糖受体可以将特定多肽靶定到某些结构。(M. P. Bevilacqua 等人, 1993, J. Clin. Invest., 91: 379-387; R. M. Nelson 等人, 1993, J. Clin. Invest., 91: 1157-1166; K. E. Norgard 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1068-1072; 和 Y. mai 等人, 1993, Nature, 361-555-557)。公知糖蛋白寡糖侧链的末端唾液酸成分影响糖蛋白的多种方面和性质, 包括吸收、溶解性、热稳定性、血清半寿期、从血清的清除, 以及其物理和化学结构/行为和其免疫原性(A. Varki, 1993, Glycobiology, 3: 97-100; R. B. Parekh, Id., Goochee 等人, Id., J. Paulson 等人, 1989, TIBS, 14: 272-276; 和 A. Kobata, 1992, Eur. J. Biochem., 209: 483-501; 30 E. Q. Lawson 等人, 1983, Arch. Biochem. Biophys., 220: 572-575; 和 E. Tsuda 等人, 1990, Eur. J. Biochem., 188: 405-411)。

通常基于哺乳动物细胞培养的系统蛋白质表达水平比微生物表

达系统，例如，细菌或者酵母表达系统中低得多。然而，细菌和酵母细胞在最佳地表达高分子量蛋白质产物、正确地折叠具有复杂立体结构的蛋白质，和/或提供必要的翻译后修饰使所表达的糖蛋白成熟的能力方面受到限制，从而影响产物的免疫原性和清除速度。

5 由于培养动物或哺乳动物细胞，尤其产生重组产物的动物或者哺乳动物细胞的限制，已经研究了多种参数的操作，这些参数包括使用大规模培养容器；改变基本培养条件，如孵育温度、溶解氧浓度、pH 等等；使用不同类型的培养基和向培养基加入添加剂；和增加所培养细胞的密度。此外，延长运行时间以增加终产物浓度而保持高产物质量的能力的发展将有益于哺乳动物细胞培养的方法开发。重要的产物
10 质量参数是温度和多肽产物的糖基化结构的完全性，唾液酸含量通常用于糖蛋白质量的量度。

细胞培养过程的运行时间，尤其非连续方法，通常受到细胞的剩余生存力的限制，所述剩余生存力通常随着运行过程减小。因此希望
15 最大可能地延长高细胞生存力。产物质量的考虑也促使最小化存活细胞密度的减小并且保持高细胞生存力，因为细胞死亡可以释放唾液酸酶到培养上清液中，这可以减少所表达的蛋白质的唾液酸含量。蛋白质纯化考虑进一步促使最小化存活细胞密度的减小并且保持高细胞生存力。培养物中存在细胞碎片和死亡细胞的成分可以负面地影响在培
20 养试验末端分离和/或纯化蛋白质产物的能力。通过培养中使细胞保持更长时间的存活，伴随着细胞蛋白质和酶对培养基的污染的减少，所述细胞蛋白质和酶为例如，细胞蛋白酶和唾液酸酶，它们可以导致细胞产生的所希望的糖蛋白的降解和最终质量降低。

已经研究了实现细胞培养中高细胞生存力的多种参数。一种参数
25 包括最初在 37℃ 培养后仅降低培养温度(例如，Roessler 等人，1996, *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 423-427; T. Etcheverry 等人的美国专利号 5,705,364 和 5,721,121, 1998; K. Furukawa 等人的美国专利号 5,976,833, 1999; L. Adamson 等人的美国专利号 5,851,800, Genentech, Inc. 的 WO 99/61650 和 WO 00/65070;
30 WO 00/36092 to Biogen, Inc. ;和 Girard 等人的美国专利号 4,357,422)。

所研究的其他参数包括向培养基中加入组分。证明生长因子抑制

剂苏拉明在 CHO K1 : CycE 的指数生长期间防止编程性细胞死亡 (Zhang 等人, *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 319-325)。然而, 苏拉明不在死亡期保护细胞防止编程性细胞死亡。结果, 苏拉明能够在生长期保持高生存力, 但是不允许延长培养寿命。相同的作者报导对于 CHO111-10PF 细胞系, 硫酸葡聚糖和硫酸聚乙烯类似于苏拉明可以相对于对照培养物增加第三天存活细胞密度和生存力。然而没有报导死亡期期间硫酸葡聚糖或者硫酸聚乙烯的作用。还报导苏拉明、硫酸葡聚糖和硫酸聚乙烯可以有效防止细胞聚集。

已经向动物细胞培养基中补加肝素以便使依赖锚定的细胞系适应悬浮条件(例如, McKenna 和 Granados 的美国专利号 5, 348, 877, 1994)。还公知肝素结合生长因子, 如肝素结合类 EGF 生长因子 (HB-EGF; Raab 和 Klagsbrun, *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1333, F179-F199)。报导细胞表面硫酸类肝素蛋白聚糖 (HSPG) 增强 HB-EGF 结合和某些细胞类型(包括野生型 CHO 细胞)的生物活性 (Raab 和 Klagsbrun, 1997)。[硫酸类肝素和肝素的差别仅在于硫酸类肝素具有更少的 N-和 O-硫酸基团和更多 N-乙酰基 (McKenna 和 Granados, 1994)。为了本公开的目的, 认为肝素和硫酸类肝素是等价的并且将通常称作肝素]。对于结合肝素的生长因子 EGF-2, 已经提出对 HSPG 的结合增加细胞表面上局部 FGF-2 浓度, 这又增加了 FGF-2 结合细胞的酪氨酸激酶受体的可能性 (Raab 和 Klagsbrun, 1997)。已经表明聚硫酸戊聚糖可以阻断培养的细胞上肝素结合生长因子的作用 (Zugmaier 等人, *J. Nat. Cancer Inst.* 1992, 84, 1716-1724)。

关于在动物细胞培养物中使用硫酸葡聚糖的专利文献涉及向培养基补加硫酸葡聚糖, 目的是: 1) 提高生长速度和增加人内皮细胞衰老前群体加倍的次数 (Levine 等人的美国专利号 4, 994, 387 和 5, 132, 223, 1991, 1992); 2) 增加哺乳动物细胞系中重组蛋白产率 (Israel, 1994 的美国专利号 5, 318, 898); 3) 诱导昆虫细胞系中单一细胞悬浮 (Shuler 和 Dee 的美国专利号 5, 728, 580, 1996); 4) 增加人肝细胞生长因子的生长促进活性和抑制其降解 (Naka 的美国专利号 5, 545, 722 和 5, 736, 506, 1996 和 1998); 5) 增加存活细胞密度和重组蛋白质表达 (Gorfien 等人的 WO 98/08934, 1997)。

在关于在培养基中存在或者补加硫酸葡聚糖的所有报导的情况

中，在该给定培养基中整个培养时间内都存在硫酸葡聚糖。没有报导延迟加入的益处。而且，还没有报导硫酸葡聚糖可以延迟死亡期的出现，延长生长期，或者抑制死亡期。

5 随着培养中产物浓度的增加，可以在细胞培养过程中观察到产物质量下降，这通过寡糖糖结构的所测量的唾液酸含量确定。通常存在通过药物清除研究确定的可接受的唾液酸含量的下限。培养中细胞产生的高丰度蛋白质优选伴随着高质量蛋白质，所述蛋白质最终经回收用于所计划的用途。这种高蛋白质质量与蛋白质的糖基化结构的程度和完全性有关，用唾液酸含量作为这些参数的量度。

10 已经报导向小规模细胞培养，例如 2 升 (2L) 生物反应器的基础培养基加入 D-半乳糖 (4 g/L) 增加了培养的细胞产生的单克隆抗体 (MAb) 的重链的半乳糖苷化 (S. Weikert 等人，“工程化 CHO 细胞以最大化重组蛋白质的唾液酸含量”，“蛋白质表达”大会陈述，Cambridge Healthtech Institute 主办，四月 5 日到 6 日，McLean, VA)。据报
15 导，半乳糖作为一次性添加剂加入小规模培养物，而不是作为在整个培养期间提供的送料培养基添加剂。该报导没有认识到保持大规模 (例如，大于 2L) 的培养中产生的糖蛋白的唾液酸化所涉及的障碍。

WO 01/59075 A1 (Genentech, Inc.) 公开了通过向培养的细胞中导入编码突变 UDP-GlcNac2-差向异构酶的核苷酸序列提高或者增强
20 糖蛋白的唾液酸化的方法，UDP-GlcNac2-差向异构酶是特定核苷酸糖——CMP 唾液酸的生物合成途径中的限速酶。X. Gu 和 D. Wang (1998, Biotech. Bioeng., 58 (6): 642-648) 以类似的方式描述了向培养基补加唾液酸合成的特定前体 ManNac，以增加 CMP-唾液酸的利用度并增强产物唾液酸化。

25 类似于 WO 01/59075 A1, X. Gu 和 D. I. C. Wang (1998, Biotech. Bioeng., 58 (6): 642-648) 公开向培养基补加 N-乙酰甘露糖胺 (ManNac) 增加细胞中 CMP-唾液酸池并最终增加 20 mL 规模的培养物中重组产生的人 IFN- γ 糖蛋白的唾液酸含量。ManNac 补加包括在培养 96
30 小时后分析所产生的产物的唾液酸之前向该培养物中起始加入该组分。

WO 01/59089 A2 (Genentech, Inc.) 公开了在产生糖蛋白的细胞中细胞内 CAD 活性的增强，所述细胞对 CAD 抑制剂有抗性。该公布的

国际申请公开 CAD 指多种酶多肽复合体(氨甲酰磷酸合成酶(CSP II)、天冬氨酸转氨甲酰酶, 和二氢乳糖酸酶), 其催化嘧啶, 尤其 UMP 的从头生物合成中前三种反应, UMP 被转化成 UTP。据报导 CAD-抗性细胞具有增加的 UPT 池、升高的 UDP-半乳糖水平以及蛋白质产物的增加的糖基化; UDP-半乳糖是糖基化途径中公知的底物。

正确糖基化和唾液酸化的重组产生的蛋白质在医学上和临床上变得越来越重要, 用于治疗和预防。因此, 开发经济而有效地实现增加的最终蛋白质产物浓度, 以及高水平产物质量(如通过唾液酸含量确定)的可靠的细胞培养方法实现本领域中所希望和需要的目标。

10 发明概述

本发明提供了通过动物或者哺乳动物细胞培养生产蛋白质, 优选重组蛋白质产物, 更优选糖蛋白产物的新方法。本发明的细胞培养方法通过使用包括向培养物中加入 D-半乳糖的新开发的送料策略实现了培养细胞产生的糖蛋白产物具有增加和增强的唾液酸含量。

15 本发明的一方面是提供生产蛋白质产物, 优选糖蛋白产物, 更优选重组糖蛋白产物的细胞培养方法, 其中通过培养条件和用于培养方法中的参数增加和增强了糖蛋白的唾液酸含量。根据本发明的优选方面, 通过使用送料方法增加和增强了所产生的糖蛋白的唾液酸含量, 所述送料方法中, 将饲料, 优选饲料培养基中的 D-半乳糖加入培养物
20 中。根据本发明的具体和相关方面, 在整个培养期间每天为细胞提供 D-半乳糖, 导致产物的 D-半乳糖含量增加和糖结构中加入更多唾液酸部分, 从而增加最终糖蛋白产物的质量。

本发明的另一方面是提供逆转糖蛋白唾液酸化下降的问题的有效方法, 使用更大的反应器规模, 例如细胞培养体积和反应器大小放大
25 生产蛋白质通常伴随着所述问题。用唾液酸化有效量 D-半乳糖喂饲产生糖蛋白产物的大规模培养物的方法允许逆转前面提到的“规模效应”。还实现了独立于反应器规模产生大量高度唾液酸化的糖蛋白。

本发明的另一方面是提供增加培养细胞产生的糖蛋白的唾液酸化的方法。该方法包括将作为饲料的半乳糖, 优选 D-半乳糖加入送料培
30 养基中。另一方面提供了用于蛋白质产生的细胞培养方法, 其中例如, 每天, 或者间歇地, 如每隔一天, 每三天, 每四天等等为培养物提供半乳糖。可以每天一次或者多次向培养物加入含有 D-半乳糖的送料培

培养基。优选的送料方案包括用送料培养基向培养物每天分批送料 (bolus feeding) 和通过向细胞培养物滴入或者灌输送料培养基连续送料。在其他方面, 可以以不同于送料培养基的方法以任一种前面提到的间隔向培养物中加入 D-半乳糖。作为非限制性实例, 可以将 D-半乳糖以在不同于送料培养基的培养基中加入培养物中, 或者 D-半乳糖可以在水中加入培养物。作为非限制性实例, 可以对培养物喂饲 D-半乳糖并且还喂饲送料培养基, 即可以喂饲一种以上的组合物。

另一方面, 本发明提供了增加蛋白质产量和所产生的糖蛋白的唾液酸含量的细胞培养方法。该方法还保持和维持所产生的蛋白质的高水平唾液酸化, 以及细胞生存力。本发明的该方面包括一种实施方案, 其中使用包括在细胞培养期间两次或者多次温度转换的培养方法, 以及用 D-半乳糖喂饲培养物。在该方面, 温度转换细胞培养方法维持培养运行期期间培养物的高细胞生存力。两次或者多次温度转换可以允许细胞在培养物中保持一段时间, 其可以有利地延长培养运行以实现所希望的产物的滴定度增加和高质量, 其中产物的滴定度增加和高质量以唾液酸含量为特征。包括这种延长培养运行的方法包括, 例如, 与标准的或者两周 (约 10-14 天) 培养期相比 2、3 或 4 周或者更长 (约 14 到 30 天, 或者更长) 总的细胞培养期。如通过本发明的细胞培养方法新近提供的, 温度转换和使用 D-半乳糖 (优选送料培养基中并且优选基于每天) 喂饲细胞的联合导致改良方法, 该方法用于由培养物中的细胞产生唾液酸化糖蛋白产物的数量和质量都增加和提高。

在本发明的多个方面, 使用多步温度转换, 优选包含两次或者多次向下温度转换的定时多步温度转换培养哺乳动物细胞以产生所希望的蛋白质产物, 尤其糖蛋白产物。两次或多次 (即, 至少两次) 温度转换可以在培养的生长期之后进行, 所述温度转化包括本发明的该方面的方法。使用至少两次温度转换, 优选在转换之间相隔约 4 天, 可以实现高蛋白质产率以及伴随着所希望的蛋白质产物的高唾液酸含量。包括多次温度转换的培养方法可以实现蛋白质产物的高质量 and 数量, 以及在培养期的持续时间内维持细胞生存力。与本文中描述的温度转换细胞培养方法有关的优选参数是用 D-半乳糖, 优选用补加 D-半乳糖的送料培养基喂饲培养物。最优选为每天喂饲方案。

根据本发明的温度转换细胞培养方法, 将第一次温度转换与温度

的第二次、第三次、第四次或者进一步向下转换联合使得细胞培养物维持高细胞生存力并且在本发明的实施方案中提供了更长的生产期，在该生产期期间蛋白质产物的滴定度增加了并且以唾液酸含量为特征的产物质量保持高水平直到培养运行结束。

5 本文中所述的培养运行指培养期，优选整个培养期。如本发明所提供的，在不含有温度转换，或者仅一次温度转换的运行期间使用 D-半乳糖，优选含有 D-半乳糖的送料培养基喂饲细胞培养物实现了蛋白质产物的高产量和质量，所述质量为通过所产生的产物的唾液酸化测量。对于如本发明新近提供的含有两次或多次温度转换的培养运行，
10 在生产运行期间用含有 D-半乳糖的送料培养基喂饲细胞导致所产生的糖蛋白的唾液酸含量增加(见，例如，图 1，其中使用每天分批喂饲)。整个培养运行的长度可以从短至仅第二次温度转换后(例如，约 10-14 天)到长达约 28 到 30 天，或者更长时间。对于含有三次(或者多次)温度转换的培养运行，整个运行的长度可以从短至仅第三次(或者最后一次)
15 温度转换后(例如，约 14 到 21 天)到长达约 28 到 30 天或者更长时间。从而，按照本发明的方法，可以培养细胞的总的运行期为大于 10 天，大于 14 天，或者大于 21 天。优选地，培养运行持续至少约 10 到 14 天到约 21 到 30 天，或者更长时间。

总的培养运行可以包括 2、3、4 或多步温度转换。作为非限制性
20 实例，如下实施两步温度转换：从第 0 天到约第 6 天，培养温度最初保持在 37℃，或者接近 37℃；从约第 6 天到约第 10 天，培养温度保持在 34℃，或者接近 34℃；从约第 10 天向上，例如，到约第 14 到 28 天，到约第 14 到 18 天，或者到培养运行末，培养温度保持在 32℃，或者接近 32℃。根据本发明的三步温度转换培养方法包括下面的非限
25 制性、代表性形式：从第 0 天到约第 6 天，培养温度控制 37℃，或者接近 37℃；从约第 6 天到约第 10 天，培养温度保持在 34℃，或者接近 34℃；从约第 10 天到约第 14 天，培养温度保持在 32℃，或者接近 32℃；从约第 14 天向上，例如，到约第 21 到 30 天，或者更长时间，例如到培养运行末，培养温度保持在 30℃，或者接近 30℃。

30 从而，使用本发明细胞培养方法不仅对具有“更短”，例如标准持续时间(例如，约 10 到约 14 天)的培养运行有益，而且对可以比标准培养运行耐受更长时间的培养运行有益，其中本发明细胞培养方法包

括两次或者多次温度转换，其中实现了高数量和质量的蛋白质产物。实现了这种更长的持续时间培养运行是因为本发明的方法提供了延长培养细胞产生蛋白质的最初或者标准的生产期(最初或者标准生产期通常在约第6到14天发生)。例如，与不使用温度转换或者，最多使用一次温度转换的培养物中蛋白质产生和产物质量相比，通过在根据本发明的培养运行中使用两次、三次或者多次温度转换，蛋白质产生的高质量和数量和细胞生存力可以保持和维持约10-14天的总运行时间到约21到28天或者更长时间的总运行时间。

本发明的另一方面提供了包含大于如上描述的两或三次温度转换的细胞培养方法。在这些多步温度转换运行中，基本上如对于三步培养期所描述的培养细胞，并进行额外的向下温度转换直到培养期结束。例如，可以在第三次温度转换培养期后在从培养开始后的第15-19天或约第15-19天，优选第18天实施第四次向下温度转换，即，温度降低，其中细胞培养温度进一步从约30℃转换到约28℃或29℃，优选约29℃。所述细胞培养方法中可以包括额外的温度转换，其中细胞保持在更低的温度，例如，<29℃，以进一步延长蛋白质产生直到运行结束，优选长于28-30天。在所有情况中，通常使用如本文中描述的本领域中常规实施的技术回收，例如分离和/或充分纯化(如果希望)培养期末细胞产生的蛋白质。此外，通过常规方法评估唾液酸含量。

在一个具体方面，本发明提供了一种方法，其中通过使用两步或多步温度转换方法，产物的最终滴定度得到增强，并且所产生的糖蛋白的唾液酸含量更高。根据该具体方面，两次或多次定时温度转换维持了培养物的高细胞生存力，从而使得培养期延长，在该培养期期间产物，优选重组产物的滴定度增加并且以唾液酸含量为特征的产物质量保持高水平。这种两步或多步温度转换可以使得细胞培养过程期间产物的生产中蛋白质滴定度和唾液酸含量之间的优势折衷(prevaling trade-off)最小。从而，温度转换为增强培养过程的一个重要参数，即“终(即最终)滴定度”×“终(即最终)唾液酸”的算术乘积(“终滴定度×终唾液酸”)提供了正效应。在两步或多步培养方法中，用含有D-半乳糖的培养基喂饲细胞，D-半乳糖的量允许蛋白质产物的高水平唾液酸化，甚至细胞在大培养物中保持更长的培养期，例如，大于约2周或更长时间。

因此，在如本文中描述的两步培养方法的另一具体方面，从第 0 天到第 6 天或约第 6 天，细胞保持在 37℃，或者接近 37℃ 的培养物中；在第 6 天或约第 6 天，细胞培养物的温度降低到 34℃，或者接近 34℃；在第 10 天或者约第 10 天，温度再次降低到 32℃，或者接近 32℃。在
5 这种两步温度转换方法的一方面，生产期延长到超过约 14 天并持续到培养运行结束，例如，直到约 21 天，或者约第 28 天到 30 天，在该时间内细胞保持在 32℃，或者接近 32℃ 的较低温度下培养。可以如本文中进一步描述的在延长的生产期结束时回收蛋白质产物。

本发明的再一方面是通过在培养运行期间将细胞进行两次或者
10 多次温度转换增加培养物中细胞生存力的方法。如果存在诸如温度中两次或多次转换的条件时在一段时间内培养物中细胞生存力比不存在该条件时的细胞生存力更高，那么该条件导致增加的细胞生存力。根据该方面，如所描述的两两或者多次温度转换细胞培养方法允许细胞在更长的时间内，如超过标准生产期的时间内保持存活。如本文中
15 讨论的，所培养细胞的增加的细胞生存力的有益结果可以是在诱导保持存活细胞的条件下，培养期结束时产生更大量的(高质量)产物。

本发明的另一方面是两次或多次温度转换细胞培养方法的实施导致的增加的细胞生存与培养物中细胞碎片和死亡或者将死细胞随时间释放的内容物的量降低相关。培养物中存在细胞碎片和死亡细胞内容
20 物可以负面地影响分离和/或纯化培养运行结束时蛋白质产物的能力。通过使细胞在培养中更长时间地保持存活，伴随着细胞蛋白质和酶，例如，细胞蛋白酶和唾液酸酶对培养基污染的减少，所述酶可以导致细胞产生的所希望的糖蛋白的降解和最终质量降低。

在本发明的其他方面，培养方法包括延迟加入聚阴离子化合物与
25 用 D-半乳糖喂饲培养物相联合。在本发明的一方面，包括延迟加入聚阴离子化合物的培养方法和包括两次或多次温度转换的培养方法都与喂饲培养物 D-半乳糖联合使用。

在包括延迟向细胞培养物加入聚阴离子化合物的这些方面，延迟
30 加入聚阴离子化合物实现了增加的细胞生存力。聚阴离子化合物优选为硫酸葡聚糖。在接种后某个时间向培养物加入聚阴离子化合物。

在包括延迟加入聚阴离子化合物的本发明的一个方面，在接种后
某个时间向培养物加入聚阴离子化合物，该时间在最初的死亡期开始

之前，或者最初的生长期期间，或者最初生长期的后半期期间，或者在最初生长期结束时或者约最初生长期结束时。根据本发明的该方面，生长期延长和/或死亡期来临延迟了一段时间，如数天。此外，一旦死亡期开始，死亡速度被极大地减小。

5 另一方面，在最初死亡期期间向培养物加入聚阴离子化合物。根据本发明的该方面，细胞死亡受到一段时间，如数天的抑制。

在本发明的另一个优选方面和如本文中进一步描述的，包括用含有 D-半乳糖的送料培养基喂饲的该新近开发的细胞培养方法特别适于产生可溶性 CTLA4 分子和可溶性 CTLA4 突变分子，如 CTLA4Ig 和 L104EA29YIg。在优选实施方案中，可溶性 CTLA4 分子和可溶性 CTLA4 突变分子由基因工程化以表达和产生这些蛋白质的宿主细胞高数量和高质量地产生(见实施例 1-5)。本发明的优选实施方案包括使用多次温度转换联合在培养运行期间用含有 D-半乳糖的喂饲培养基喂饲培养物培养产生 CTLA4Ig 和 L104EA29YIg 的细胞以实现大量高质量 CTLA4Ig 和 L104EA29YIg 产物，所述高质量为诸如通过终产物的唾液酸测量确定。其他优选实施方案包括多次温度转换培养方法以及用含有 D-半乳糖的送料培养基喂饲细胞培养物，D-半乳糖的量有效实现如本文中描绘的具有高唾液酸含量的 CTLA4Ig 和 L104EA29YIg 产物。其他优选实施方案包括使用延迟加入聚阴离子化合物联合用含有 D-半乳糖的送料培养基喂饲培养物培养产生可溶性 CTLA4 分子和可溶性 CTLA4 突变分子的细胞。其他优选实施方案包括使用延迟加入聚阴离子化合物和多次温度转换联合用含有 D-半乳糖的送料培养基喂饲培养物培养产生 CTLA4Ig 和 L104EA29YIg 的细胞。

25 在阅读了本发明的详细描述和考虑了附图后将理解本发明的其他方面、特征和优点。

附图描述

图 1 显示在 50L 反应器规模的细胞培养方法期间使用包括送料培养基中的 D-半乳糖的喂饲方案得到糖蛋白产物，即，CTLA4Ig 融合蛋白的结果。如从图 1 所观察到的，在 50L 反应器规模下用送料培养基中的更高浓度(12.5 g/L) D-半乳糖增加了唾液酸化的程度。此外，送料培养基中 D-半乳糖浓度进一步增加到 20.0 g/L 对蛋白质唾液酸化没有正效应。

图 2 阐明使用本发明的培养和喂饲方法，在 50-L 反应器规模运行的 21-天细胞培养中 D-半乳糖对产物滴定度的影响。如图 2 中所见，发现滴定度增加（即，细胞特定产率）没有受到加入 D-半乳糖的显著影响。

5 图 3 显示了送料培养基中 12.5 g/L D-半乳糖浓度下本发明培养物的残余 D-半乳糖浓度，发现 12.5 g/L D-半乳糖浓度在 50-L 和 5000-L 反应器规模下是最适的。在生产期当滴定度增加时（即，第 6-21 天），培养物中残余 D-半乳糖浓度优选 ≥ 0.25 g/L。

10 图 4 阐明为了生产 CTLA4Ig，细胞培养向 5000-L 的放大试验期间观察到的规模效应。发现糖蛋白的唾液酸化随着反应器规模的增加而下降。

图 5 显示使用基于每天的喂饲，向送料培养基加入 12.5 g/L D-半乳糖后规模效应的逆转。D-半乳糖喂饲技术允许大规模生产反应器中大量高度唾液酸化 CTLA4Ig 的产生。

15 图 6 显示不同的温度转换对在 5 升 (5L) 反应器规模培养的细胞生存力的影响。从本文实施例 5 中描述的实验得到这些结果。在包括无温度转换（“无 T 转换”）、一次温度转换（“一次 T 转换”）和两次向下温度转换（“双 T 转换”）的培养方法之间进行了比较。

20 图 7 显示不同的温度转换对在 50 升 (50L) 反应器规模培养的细胞生存力的影响。从本文实施例 5 中描述的实验得到这些结果。在包括三次向下温度转换（“三次 T 转换”）和两次向下温度转换（“双 T 转换”）的培养方法之间进行了比较。

25 图 8 描绘了 CTLA4Ig 的核苷酸序列 (SEQ ID NO : 1) 和所编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 2)，所述 CTLA4Ig 具有信号肽、在 +1 位甲硫氨酸开始到 +124 位天冬氨酸结束，或者在 -1 位丙氨酸开始到 +124 位天冬氨酸结束的 CTLA4 的胞外结构域的野生型氨基酸序列，和 Ig 区。

30 图 9 描绘了 CTLA4 突变分子 (L104EA29YIg) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO : 3) 和所编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO : 4)，该 CTLA4 突变分子具有信号肽、在 +1 位甲硫氨酸开始到 +124 位天冬氨酸结束，或者在 -1 位丙氨酸开始到 +124 位天冬氨酸结束的 CTLA4 的突变胞外结构域，和 Ig 区。

图 10 描绘了与制癌蛋白 M 信号肽(-26 位到-2 位)融合的人 CTLA4 受体(此处称作“野生型” CTLA4)的核酸序列 (SEQ ID NO: 5) 和所编码的完整氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6) (美国专利号 5,434,131 和 5,844,095)。

5 图 11 显示了延迟加入硫酸葡聚糖对培养物中存活细胞密度、总细胞密度, 和生存力的影响, 在所述培养基中, 硫酸葡聚糖在最初生长期结束时加入。从本文的实施例 8 中描述的实验得到这些结果。在最初生长期结束时加入硫酸葡聚糖的培养物和其中未加入硫酸葡聚糖的培养物之间进行了比较。对平均值作图; 误差线代表标准误。

10 图 12 显示了延迟加入硫酸葡聚糖对死亡率的影响。其为存活细胞密度作为时间的函数的对数表示。从本文实施例 8 中描述的实验得到这些结果。在最初生长期结束时加入硫酸葡聚糖的培养物和其中未加入硫酸葡聚糖的培养物之间进行了比较。对平均值作图; 误差线代表标准差。

15 图 13 显示了延迟加入硫酸葡聚糖对培养物中存活细胞密度、总细胞密度, 和生存力的影响, 在所述培养基中, 硫酸葡聚糖在最初死亡期期间加入。从本文实施例 9 中描述的实验得到这些结果。在最初死亡期期间加入硫酸葡聚糖的培养物和其中未加入硫酸葡聚糖的培养物之间进行了比较。

20 图 14 显示了延迟加入硫酸葡聚糖对培养物中存活细胞密度、总细胞密度, 和生存力的影响, 在所述培养基中, 硫酸葡聚糖在最初死亡期期间加入。从本文实施例 10 中描述的实验得到这些结果。在最初死亡期期间加入硫酸葡聚糖的培养物和其中未加入硫酸葡聚糖的培养物之间进行了比较。

25 图 15 显示了培养物中存活细胞密度、总细胞密度, 和生存力, 所述培养基中在培养的第 0 天加入硫酸葡聚糖。这些结果从本文实施例 11 中描述的实验得到。

30 图 16 显示了培养物中存活细胞密度和生存力, 所述培养基中在最初生长期的三个不同的时间(第三天、第四天和第五天)加入硫酸葡聚糖。这些结果从本文实施例 12 中描述的实验得到。

图 17 显示了不同温度转换对存活细胞密度的影响。这些结果从本文实施例 13 中描述的实验得到。在包括无温度转换(“无 T 转换”)、

一次温度转换(“一次 T 转换”)和两次向下温度转换(“两次 T 转换”)的培养方法之间进行了比较。

图 18 显示了不同温度转换对生存力的影响。这些结果从本文实施例 13 中描述的实验得到。在包括无温度转换(“无 T 转换”)、一次温度转换(“一次 T 转换”)和两次向下温度转换(“两次 T 转换”)的培养方法之间进行了比较。

图 19 显示了不同温度转换对滴定度的影响。这些结果从本文实施例 13 中描述的实验得到。在包括无温度转换(“无 T 转换”)、一次温度转换(“一次 T 转换”)和两次向下温度转换(“两次 T 转换”)的培养方法之间进行了比较。

发明详述

本发明描述了在哺乳动物细胞培养中产生蛋白质, 优选重组蛋白质产物, 更优选糖蛋白产物的新方法。根据本发明的细胞培养方法实现了通过培养细胞产生的糖蛋白的增强和增加的唾液酸含量, 从而提供了培养运行结束时高质量蛋白质产物。

包括用 D-半乳糖喂饲的培养方法

本发明涉及通过哺乳动物细胞培养制备糖蛋白, 尤其重组糖蛋白的改进方法, 其中通过使用新近描述的喂饲策略增加了所产生的糖蛋白的唾液酸含量, 在所述策略中用 D-半乳糖, 优选送料培养基中的 D-半乳糖喂饲培养物。为细胞培养物提供 D-半乳糖使得培养物中存在的 D-半乳糖的量可以有效达到并保持所产生的蛋白质的高唾液酸化直到培养运行结束。如本文中所描述的, 本发明包括多种喂饲方案以得到在培养运行的持续时间内培养物中存在残留的 D-半乳糖。

根据本发明, D-半乳糖向所产生的蛋白质的糖结构的加入被鉴定为产生唾液酸化的限速步骤。发现在培养过程期间存在有效量的送料培养基中的 D-半乳糖导致产物的更高的 D-半乳糖含量。这又导致向蛋白质糖结构加入更多唾液酸部分, 从而增加产物质量。为了保持和/或维持产物的更高程度的唾液酸化, 优选在整个培养运行期间保持 D-半乳糖喂饲策略。本发明的过程和方法适于小规模(例如, 50L-100L)和大规模(例如, 500L 和更大)细胞培养。此外, 本发明的方法尤其适于小规模和大规模的细胞生长并保持为如本文中进一步描述的补料分批培养。此外, 本发明的培养方法可以使用本领域中公知的多种培养基。

适宜的培养基在本文中进一步描述。

本发明的一个优点是
5 通过本文描述的培养方法实现终产物的总体质量(例如,通过唾液酸含量测量)的增加降低了蛋白质生产成本。在优选实施方案中,当在优选每天提供给细胞培养物的补料培养基中包括 D-半乳糖时,在整个培养运行中保持产物的高唾液酸含量(例如,见实施例 1 和 2)。有趣的是,在培养运行的第 10 天中断或者停止 D-半乳糖
10 5 乳糖喂饲导致高产物质量的逆转,和形成更低唾液酸化的蛋白质种类。(实施例 2)。此外,通过补料培养基向产生给定蛋白质,例如 CTLA4Ig 的细胞培养物,优选大规模培养物加入 D-半乳糖能够逆转所观察到的对产物质量造成的有害的规模效应(例如,更大的反应器大小)。当培养物的每天补料培养基中存在半乳糖时,规模效应的逆转最明显。在不向补料培养基加入 D-半乳糖时,糖蛋白的唾液酸化程度随着反应器规模增加而下降。

因此,本发明的优选实施方案包括在整个生产运行期间保持 D-半乳糖喂饲策略,优选使用每天喂饲,以允许独立于反应器规模产生大量高度唾液酸化的糖蛋白。在整个细胞培养方法期间提供含有 D-半乳糖的饲料,优选在唾液酸化有效水平上含有 D-半乳糖的补料培养基有利地导致放大试验效应的逆转并且避免了蛋白质唾液酸化的下降和形成更低的唾液酸化糖蛋白产物种类。例如,在细胞培养向数千升反应器
15 20 器体积的放大试验期间,可以观察到产物质量(如可以通过测量糖蛋白的唾液酸化程度确定)随着反应器规模的增加而下降。该观察可能是由于在更大规模上培养物经历的更高的胁迫水平的原因,所述更高的胁迫水平影响细胞的 D-半乳糖代谢。如本文中例证的,在培养运行期间通过送料培养基向培养物加入 D-半乳糖(例如,基于每天)能够独立于
25 所用的反应器逆转或者取消这种有害的放大试验效应并且允许产生具有高质量和高唾液酸化特征的糖蛋白。从而,饲料,优选送料培养基中存在 D-半乳糖的持续水平对于具有最显著的规模效应的大规模细胞培养尤其有利。

作为饲料,优选细胞培养补料培养基中的有效浓度 D-半乳糖增强、增加、保持和/或维持整个生产运行期间产物的高唾液酸含量。技术人员基于反应器大小和培养物体积可以确定用于送料培养基中的适宜的 D-半乳糖的量。本发明的方法适于发生蛋白质生产的所有反应器
30

规模，其包括，但不限于大生产规模和小生产规模，和反应器规模，例如，大规模培养或者商业规模培养，例如，50L以上，更优选500L以上。例如，半乳糖喂饲方法可应用于生产规模培养，例如，体积约50升(50L)或者更小的培养，以及反应器规模培养，其可以具有数百或者数千升体积。

根据本发明方法，所提供的送料培养基中半乳糖浓度优选为提供 5 在培养过程期间维持或者保持培养物或者反应器中D-半乳糖水平。适宜用于送料培养基的D-半乳糖的量含有约1g/L到约50g/L，优选约3g/L到约25g/L，更优选约3g/L到约20g/L。作为特定但是非限制性实例，送料培养基中12.5g/L D-半乳糖适于用于本发明的培养方 10 法，尤其例如，适于50L反应器规模。此外，优选用于培养细胞的培养基中残留半乳糖浓度(例如，反应器或者培养容器中)在整个培养运行中保持并维持在约0.1-10g/L，优选约0.1-5g/L，更优选约0.2-5g/L，更优选约0.2-2.5g/L，甚至更优选约0.5-2g/L，最优选约 15 0.5-1.0g/L的量。培养基中半乳糖的这些残留浓度适用于半乳糖通过补料培养基或者其他方法喂饲。

使用多种喂饲进度表或者方案用含有D-半乳糖的送料培养基喂饲 细胞培养物以递送并保持培养物中D-半乳糖，其中喂饲的D-半乳糖的 20 量可以维持唾液酸化有效的D-半乳糖浓度并且增强和增加糖蛋白的唾液酸化。通常，本发明的培养方法包括在培养运行期间用送料培养基中的D-半乳糖喂饲细胞培养物一次以上。可以理解在培养结束时送料培养基贡献的培养物体积通常为最初培养物体积的约30-60%。

细胞培养物可以基于每天喂饲D-半乳糖，或者不同于基于每天， 例如，小于每天一次，和在不同间隔，优选定时的间隔，包括每隔一 25 天，每三天、每四天，等等。例如，用D-半乳糖，优选含有D-半乳糖的送料培养基喂饲细胞培养物可以每天一次，每天一次以上，或者小于每天一次地进行，并且可以在总的培养运行期间发生1次、2次，或者2次以上，例如，3、4、5或多次。在一个实施方案中，用D-半乳糖喂饲细胞一次以上。

30 本发明还包括连续送料方案，例如，包括向培养物连续注入D-半乳糖，优选含有D-半乳糖的送料培养基。在这种连续送料方案中，培养物接受D-半乳糖，优选送料培养基中的D-半乳糖，其作为连续提供

的“滴液”，或者注入，或者其他向培养物的自动化添加，以定时的、受调节的，和/或程序化的方式加入，以期实现并保持培养物中适宜量的半乳糖。最优的方案包括在培养运行的每天，从培养运行开始到收获细胞的那一天用 D-半乳糖，优选含有 D-半乳糖的送料培养基每天一次大丸剂 (bolus) 喂饲。

根据本发明，D-半乳糖可以以不同于在送料培养基的方式以任一种上面提到的间隔喂饲细胞培养物。作为非限制性实例，D-半乳糖可以在不同于送料培养基的介质或者培养基中喂饲培养物，或者 D-半乳糖可以溶于水中后喂饲培养物。作为非限制性实例，培养物可以用 D-半乳糖喂饲并且还用送料培养基喂饲，即，喂饲一种以上的组合物。

本文中所用的术语“喂饲”指接种后向培养物加入任何物质。喂饲可以是一次或者多次加入。

本文中所用的术语“接种”指向起始培养基加入细胞以开始培养。

本文中所用的术语“送料培养基”指接种后某时刻开始向培养物加入的含有一种或多种营养物的培养基。

本文中所用的术语“基础培养基”指起始培养基，细胞加入该起始培养基以开始培养。

本发明的另一实施方案包括增加细胞培养物产生的糖蛋白的唾液酸化的细胞培养方法，该方法包括向培养基中加入半乳糖，例如，D-半乳糖。相关实施方案包括细胞培养方法，其中在培养运行的持续过程中向培养物提供 D-半乳糖，优选 D-半乳糖存在于送料培养基中。优选实施方案涉及培养细胞的方法，其包括用含有 D-半乳糖的培养基每天喂饲培养物。通过该方法，优选在培养运行期间提供一次以上，更优选基于每天提供的培养物中半乳糖的利用度克服了限制培养物中半乳糖的量的可能，从而允许用加入该结构的大量唾液酸部分形成糖蛋白，从而增加了终产物的唾液酸化并逆转了前述放大试验效应的问题。

根据本发明，与不存在 D-半乳糖喂饲的细胞培养物相比，或者与其中在培养运行结束之前中止或者停止加入 D-半乳糖的培养物相比，当在运行期间用 D-半乳糖喂饲细胞培养物时，蛋白质的唾液酸化平均增加了与 1.2 到 1.5 倍。

如下面进一步描述，在包括产生可溶性 CTLA4 糖蛋白分子，如

CTLA4Ig, 和可溶性 CTLA4 突变分子, 如 L104EA29YIg 的细胞的培养的优选实施方案中, 在整个培养运行期间有效保持产物的高唾液酸含量的 D-半乳糖的浓度存在于送料培养基中, 并且每天喂饲细胞培养物(实施例 2)。作为例证, 送料培养基中有效量 D-半乳糖组成了约 1g/L 到 5 约 50g/L, 优选约 3g/L 到约 25g/L, 更优选约 3g/L 到约 20g/L。根据本发明的方法, 送料培养基中约 12.5g/L 的 D-半乳糖尤其适于用于大规模培养(例如, 50L)。

确定向 CTLA4 糖结构加入 D-半乳糖是产物唾液酸化的限速步骤。D-半乳糖喂饲的中断或者停止导致逆转和形成低唾液酸化 CTLA4 糖蛋白产物。因此, 优选在整个培养运行期间保持每天送料培养基中包含 10 D-半乳糖以实现并维持高质量的完全唾液酸化产物。

发现对于产生 CTLA4Ig 的大规模培养物, 向送料培养基每天加入 D-半乳糖可以实现所观察到的对终产物质量的有害的规模效应的逆转。更具体地, 当送料培养基中不存在 D-半乳糖时, CTLA4Ig 糖蛋白 15 的唾液酸化程度随着反应器规模增加而下降。向产生 CTLA4Ig 的大规模培养物每天加入 D-半乳糖允许独立于反应器规模产生大量高度唾液酸化的糖蛋白。

包括在培养运行期间半乳糖喂饲联合温度转换的培养方法

本发明的其他实施方案涉及细胞培养方法, 其包括两次或多次温 20 度转换, 其可以实现更强的细胞生存力并且可以导致产生的更长的生产期和更多产物, 以及如通过唾液酸含量测量的产物的高质量。包括两次或多次温度转换的细胞培养方法公开在一般转让的专利申请美国序号 60/436,101(2002 年 12 月 23 日提交)和相伴提交的美国序号 10/-----, 这里引用所述专利申请作为参考, 并且下面进一步描述 25 所述细胞培养方法。这些温度转换方法可以方便地与如本文中描述的半乳糖喂饲方法联合使用, 导致高水平的终产物质量和数量。

根据本发明的温度转换培养方法, 与不包括温度转换, 或者仅一次温度转换的培养方法相比, 在细胞培养期间, 两次或多次温度转换, 优选向下温度转换的联合可允许在培养期结束时细胞产生的蛋白质产 30 物的高数量和质量。作为例证, 如实施例 5 中所示, 与没有温度转换或者仅一次温度转换相比, 不管培养运行的总长度如何, 阐明具有两次或三次温度转换的培养方法导致蛋白质数量(例如, 最终滴定度)的

增加。

除了本发明的实施方案，在哺乳动物细胞的培养中使用定时多步温度转换以产生所希望的蛋白质产物，尤其糖蛋白产物。更优选地，细胞产物是重组产生的蛋白质、多肽或者肽产物。然而，在某些情况
5 中，细胞可以积极产生，或者过量产生内源或者天然产物，所述产物可以在实施本发明方法后收获或回收。如本文描述，两次或多次温度转换，优选受控的向下温度转换(在培养期期间以适当定时间隔实施)可用于本发明的方法中以实现高蛋白质产率以及相伴的高唾液酸含量。

10 根据本发明的细胞培养方法和过程(也称作生产或者发酵运行)，在培养运行期间结合两次或多次温度转换的培养的细胞可以在运行期间产生高数量和质量的产品，所述高数量和高质量为例如通过运行结束时终点滴定度和唾液酸含量所测量。不管培养运行实施的总运行时间为约10-14天还是大于14天，相对于没有温度转换，或者最多使用
15 一次温度转换的方法，得到了与本发明方法相关的蛋白质生产的高数量和质量。此外，作为培养过程期间两次或多次温度转换的结果，细胞可以在培养物中保持一段时间，该时间段基本上延长了标准或者最初生产期。标准或者最初生产期通常为约6到14天。在包括两次或多次温度转换的本培养方法的延长的生产期期间实现了高质量蛋白质的
20 增加的产量，以及持续的细胞生存力。

还根据本培养方法，细胞可以培养的总运行期大于约10天，大于约14天，大于约21天，或者大于约28天，优选约14到30天，或者以上。例如，在包括两次或多次温度转换的本发明的培养运行中，整个培养的长度可以持续短至仅第二次(或最后)温度转换后(例如，约14
25 天)到长达约21到30天或以上，优选约28天或以上。

在本发明的实施方案中，本发明的细胞培养方法包括延长的生产期与多次温度转换结合。根据本发明的新的细胞培养方法，第二次、第三次或多次温度转换与第一次温度转换的联合不仅允许细胞培养物在整个培养运行持续时间内产生高数量和质量的产品，还允许在整个
30 运行和/或整个延长的生产期直到培养运行结束培养物都维持高细胞生存力。在包括延长的生产期的培养运行期间，蛋白质产物的滴定度增加了并且如以唾液酸含量为特征的产物质量保持高水平。

更具体地，在一个特定实施方案中，本发明包括细胞培养方法，其延长了培养细胞的蛋白质生产的最初生产期(即包括约第 6-14 天的标准生产期得到延长)。通过在根据本发明的培养运行中使用两次或多次温度转换，实现了在约第 14-21 天的延长生产期。使用培养运行中的三次(或多次)温度转换，将培养运行进一步延长到约第 21-28 天或 30 天，或者更长，并且伴随着高质量(例如，高唾液酸含量)的蛋白质产物的更高产率(例如，实施例 5)。

从而，本发明有利地联合根据本发明的两次或多次温度转换细胞培养方法和包括含有向送料培养基加入 D-半乳糖的喂食方案。通过包括 D-半乳糖作为送料培养基的组分，发现在整个细胞培养过程中产物唾液酸化的显著增加，并且在培养运行结束时产生高水平唾液酸化的蛋白质。

在本发明的特定实施方案中，细胞培养(或发酵)方法包括两步向下温度转换，其中细胞在整个培养运行期间保持在三种不同的温度下。在该实施方案中，总细胞培养期持续大于约 10 天，更具体地，约 14 到 28 天或更长，即，约 2 到 3 周或更长，之后得到最终蛋白质产物(并测量唾液酸含量)。例如，在这种两步方法中，细胞在约 36℃ 到 38℃，优选 37℃ 或者接近 37℃ 的第一种温度下保持从第 0 天到约第 6 天的最初培养期。之后，从约第 5 天到第 7 天，优选第 6 天到约第 10 天，培养温度保持在约 33℃ 到约 35℃，优选 34℃，或接近 34℃ 的第二种温度下。在 34℃ 或接近 34℃ 的细胞培养后，将温度再次转换(再次-T 转换)到约 31℃ 到 33℃，优选 32℃ 或接近 32℃ 的第三种温度。再次 T 转换发生在或约第 6 天到约第 14 天，优选从约第 10 天到约第 14 天，更优选在或者约第 10 天，所述再次 T 转换在多种实施方案中可以在标准生产期期间、生长期期间，或者死亡期期间。优选地，在第一次和第二次温度转换之间有约 4 天增量，更优选 4 天增量。细胞保持在 32℃ 或者接近 32℃ 的温度下直到总培养运行结束，例如，长于约第 10 天，更特别地，到约 12-18 天，或者到约 14-18 天，或者约 14-28 天或 30 天，或者更长时间。在培养过程结束时，通常从例如培养上清液(如果产物分泌到培养基中)分离和/或纯化蛋白质产物。

备选地，在本发明的多次温度转换培养方法中，可以首先基于培养期降低温度。第一次温度转换优选发生在死亡期开始前。在一个实

实施方案中，温度降低与细胞生长减慢相伴。例如，温度从 37℃，或者接近 37℃ 转换到 34℃ 或者接近 34℃，此时细胞不再处于它们的指数生长期并且培养物处于稳定期，例如，在或者约培养的第 6 天。此时，存活细胞浓度已经达到蛋白质生产，优选增强的蛋白质生产的适宜的细胞密度，例如，约 $2-12 \times 10^6$ 个细胞/mL，如 $2-9 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-7 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-5 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $2-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-6 \times 10^6$ 个细胞/mL， $6-8 \times 10^6$ 个细胞/mL， $8-10 \times 10^6$ 个细胞/mL，或 $10-12 \times 10^6$ 个细胞/mL。不希望被理论所束缚，可能细胞生长的减慢与细胞培养基中的营养物和/或特定组分的耗竭，例如，培养基中氮限制相关。

在另一实施方案中，第一次温度转换发生在生长期期间，例如，当存活细胞浓度为约 $2-12 \times 10^6$ 个细胞/mL，如 $2-9 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-7 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-5 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $2-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-6 \times 10^6$ 个细胞/mL， $6-8 \times 10^6$ 个细胞/mL， $8-10 \times 10^6$ 个细胞/mL，或 $10-12 \times 10^6$ 个细胞/mL 时。

在包括两步温度转换培养方法的另一特定实施方案中，细胞培养 14 天运行期，其中从第 0 到第 6 天培养温度保持在或者接近 37℃。从约第 6 天到约第 10 天，培养温度保持在或者接近 34℃；从约第 10 天到约第 14 天，培养温度保持在或者接近 32℃。作为另一实施方案，细胞培养约 21 天时期，其中从第 0 到约第 6 天培养温度保持在或者接近 37℃；从约第 6 天到约第 10 天，培养温度保持在或者接近 34℃；从约第 10 天到约第 21 天，培养温度保持在或者接近 32℃。作为再一个实施方案，细胞培养约 28 天时期，其中从第 0 到约第 6 天培养温度保持在或者接近 37℃；从约第 6 天到约第 10 天，培养温度保持在或者接近 34℃；从约第 10 天到约第 28 天，培养温度保持在或者接近 32℃。

本发明还包括实施方案，其中细胞培养方法包括三次或多次温度转换。在包括三步温度转换培养方法的一个实施方案中，细胞最初在约 36℃ 到 38℃，优选在或约 37℃ 的第一种温度下培养约 6 天；之后，转换培养温度并在约 33℃ 到 35℃，优选在或接近 34℃ 下保持给定时限；之后发生第二次转换到约 31℃ 到 33℃，优选在或接近 32℃ 的温度。在或接近 32℃ 的培养期之后，第三次温度转换到约 29℃ 到 31℃，优选在或接近 30℃ 的温度；然后温度保持在或接近 30℃ 直到运行结

束。

在其他实施方案中，在所述培养方法的第三次温度转换后可以进一步温度转换，优选向下温度转换。例如，可以在第三次转换后在或者接近培养开始后的第15-20天，优选约第18天进行第四次温度转换。第四次向下转换保持培养温度在或者接近28℃到29℃，优选约29℃，并增加培养运行到大于约28天，例如，到约28-32天或者更长，此时得到产物。

如在根据本发明的两步温度转换培养运行方法中，当细胞基本上停止生长并且变得稳定或者大约稳定时，可发生本发明的多次温度转换中的第一次温度转换。作为例证，当存活细胞浓度为约 $2-12 \times 10^6$ 个细胞/mL，如 $2-9 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-7 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-5 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $2-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-6 \times 10^6$ 个细胞/mL， $6-8 \times 10^6$ 个细胞/mL， $8-10 \times 10^6$ 个细胞/mL，或 $10-12 \times 10^6$ 个细胞/mL时进行温度转换。备选地，在生长期期间，例如，当存活细胞浓度为约 $2-12 \times 10^6$ 个细胞/mL，如 $2-9 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-7 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-5 \times 10^6$ 个细胞/mL， $3-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $2-4 \times 10^6$ 个细胞/mL， $4-6 \times 10^6$ 个细胞/mL， $6-8 \times 10^6$ 个细胞/mL， $8-10 \times 10^6$ 个细胞/mL，或 $10-12 \times 10^6$ 个细胞/mL时发生第一次温度转换。

在优选实施方案中，多步细胞培养方法包括在约3到4周，例如，21-30天或以上，优选28天或以上的培养期期间的三次定时和受控的温度转换，从而提供培养物中细胞更长时间地生产产物。为了阐明，三步温度转换方法包括从0到约第6天，优选第6天的最初培养期，在该期间细胞在37℃，或者接近37℃培养。从约第6天到约第10天，细胞在34℃，或者接近34℃培养。从约第10天到约第14天，细胞在32℃，或者接近32℃培养；从约第14天向上，即，到约第21天到第30天或以上，或者到运行结束时，培养温度保持在30℃，或者接近30℃。因此，在本发明的三步温度转换培养方法中，也可以延长生产期以产生蛋白质的更高终点滴定度和保持更高细胞生存力长于约14天的时限，相比具有仅一次或者没有温度转换的培养方法的标准生产期为约6到约14天。有利地，通过所述三步T转换方法可以将生产期和细胞生存力进一步延长，即延长到三周或者更长时间，伴随着如通过唾液酸含量所测量的产物的高质量。

在本发明的多种实施方案中，第二次温度转换到 32℃，或者接近 32℃ 允许培养运行结束时蛋白质的更高的数量和质量，并且还与运行期间更长的蛋白质生产有关，该运行可以持续约 2 周以上。温度中两次或多次转换允许培养物的细胞生存力的缓慢下降稳定下来，所述细胞生存力的缓慢下降可以在培养的前两周发生。在约两周或两周附近定时的从 32℃ 或接近 32℃ 到 30℃，或者接近 30℃ 的另一次温度转换提供了生产期的进一步延长，从而将细胞培养物的生产期延长到培养运行结束，例如，到约第 21 天到第 30 天或者以上，而保持细胞生存力并且不牺牲所产生的产物的质量(如通过唾液酸化测量)。(见实施例 5, 表 2 和 3)。额外的温度转换可以将细胞生产延长到超过两次和三次温度转换运行的细胞生产。

在其他实施方案中，本发明涉及 (i) 细胞培养方法，(ii) 增加蛋白质生产，优选与细胞生存力提高相联合的方法，(iii) 增强蛋白质产物的唾液酸化的方法，(iv) 增强细胞生存力的方法，或 (v) 延长蛋白质生产，包括两次或多次温度转换的方法，该方法包括：在 37℃ 或者接近 37℃ 的温度下允许细胞生长的条件下培养表达目标蛋白质的宿主细胞一段时间；当培养物处于稳定期时，降低细胞培养的温度并在 34℃ 或者接近 34℃ 的第二种温度下培养细胞；再次降低细胞培养的温度并在约第 6 天到第 14 天的标准生长期期间的某一时间，例如，在或者约从培养开始第 10 天，在 32℃ 或者约 32℃ 的第三种温度下培养细胞直到培养期结束。如本文中已经提到的，培养期可以包括大于 10 天、大于 14 天、大于 21 天，或者大于 28-30 天的总运行时间。细胞在 32℃ 培养后，即在培养运行结束后，得到所产生的蛋白质产物，优选糖蛋白。

在其他实施方案中，本发明涉及 (i) 细胞培养方法，(ii) 增加蛋白质生产，优选与细胞生存力提高相联合的方法，(iii) 增强蛋白质产物的唾液酸化的方法，(iv) 增强细胞生存力的方法，或 (v) 延长细胞生产，包括两次或多次温度转换的方法，该方法包括：在 37℃ 或者接近 37℃ 的温度下允许细胞生长的条件下培养表达目标蛋白质的宿主细胞一段时间；从第 5 天到第 7 天开始降低细胞培养的温度并在 34℃ 或者接近 34℃ 的第二种温度下培养细胞；再次降低细胞培养的温度并在约第 6 天到第 14 天开始，例如，在或者约从培养开始第 10 天，在 32℃ 或者约 32℃ 的第三种温度下培养细胞直到培养期结束。如本文中已经

提到的，培养期可以包括大于 10 天、大于 14 天、大于 21 天，或者大于 28-30 天的总运行时间。细胞在 32℃ 培养后，即在培养运行结束后，得到所产生的蛋白质产物，优选糖蛋白。

5 在另一实施方案中，本发明提供了培养方法，其还包括从培养开始的 14 天或约 14 天将在或者接近 32℃ 的温度向下转换到在或者接近 30℃ 直到培养过程结束，从而将培养期延长到适当地超过标准生产期。为了进一步延长培养过程期间的蛋白质生产，以及细胞生存力，该方法可以包括从培养开始的 15 天或约 15 天到 19 天，优选 18 天，将在或者接近 30℃ 的温度向下转换到在或者接近 29℃ 直到培养过程结
10 束。

本发明的温度转换通常在或者约培养期的第 6 天，其可以在培养物的生长期期间或者之后，并且之后以约 4 天增量，优选 4 天增量。在某些实施方案中，温度转换的定时可以接近标准生产期的开始（例如，在或者约第 6 天），中间（例如，在或者约第 10 天）和末尾（例如，
15 在或者约第 14 天）。在根据本发明的培养过程或者方法中，通过使用多步（例如，两步、三步或更多步）温度转换，所产生的糖蛋白的最终滴定度和唾液酸含量得到增强，至少两种定时温度转换的组合允许总培养运行实施 10 天以上、14 天以上、21 天以上，或者 28 天以上或更多天，而不牺牲产物的最终滴定度和唾液酸化。

20 根据本发明的培养方法，与进行相同时限但是不包括两次或多次温度转换的运行相比，两次或多次温度转换维持培养物的高细胞生存力并且可以允许在培养运行中产生更高滴定度和高质量的蛋白质。而且，两次或多次温度转换可以允许培养的生产期延伸超过标准生产期和/或超过没有温度转换，或者最多一次温度转换的培养的生产期。
25 这种多步温度转换，如两步或多步温度转换可以最小化细胞培养过程中蛋白质产物的生产中滴定度（“终滴定度”）和唾液酸含量之间的优势折衷。从而，温度转换为增强“终滴定度”×“终唾液酸”的算术乘积提供了正效应，其改进了蛋白质生产方法。

在具体实施方案中，本发明涉及 (i) 细胞培养方法，(ii) 增加蛋白质生产的方法，或 (iii) 增强细胞生存力，联合增加和增强给定蛋白质糖蛋白产物的唾液酸化的方法，该方法包括：如上描述的两步或多次
30 温度转换步骤，还包括喂饲细胞，优选基于每天用 D-半乳糖，优选用补

加 D-半乳糖的培养基以持续浓度喂饲细胞，其导致培养运行结束时糖蛋白产物的唾液酸化增加。

还涉及生产蛋白质的细胞培养方法，其包括：在允许蛋白质生产的条件下培养在细胞培养中产生目标蛋白质的宿主细胞；用 D-半乳糖喂饲细胞；和接种后某一时间向细胞培养物中加入聚阴离子化合物。在具体实施方案中，本发明涉及生产蛋白质的细胞培养方法，该方法包括：在允许蛋白质生产的条件下培养在细胞培养中产生目标蛋白质的宿主细胞；在允许细胞生长的条件下 37℃ 或者接近 37℃ 的温度下培养宿主细胞一段时间；在 34℃ 或者接近 34℃ 的第二种温度下培养细胞；在 32℃ 或者接近 32℃ 的第三种温度下培养细胞；和用 D-半乳糖喂饲细胞。

包括两次或多次温度转换的细胞培养方法的根据本发明的其他实施方案

在本发明的一个实施方案中，包括多次温度转换培养方法，该方法包括在允许细胞生长的条件下 37℃ 或接近 37℃ 的第一种温度下培养表达目标蛋白质的宿主细胞一段时间。细胞生长期后，当细胞生长减慢并且接近稳定时，在 34℃ 或者接近 34℃ 的第二种温度下培养细胞。之后，在培养的标准生产期期间，即在或者约第 6 天到在或者约第 14 天在 32℃ 或者接近 32℃ 的第三种温度下培养细胞。每天喂饲细胞。在培养过程结束时，可以得到所产生的蛋白质产物。

根据本发明的优选实施方案，细胞以分批补料方法培养，该分批补料方法包括几个时期，即生长期，在该期间细胞培养在 37℃ 或者接近 37℃ 的第一种温度下；最初或者标准生产期，在该期间细胞在 34℃ 或者接近 34℃ 的第二种温度下和在 32℃ 或者接近 32℃ 的温度下培养，以便提供延长的蛋白质生产期，其可以包括 30℃ 或者接近 30℃ 的第四种温度，并且任选之后，还包括额外的降低温度，如 29℃ 或者接近 29℃。对于本发明的两步或多步温度转换运行，蛋白质生产的延长与温度的两次或多次向下转换有关。优选含有 D-半乳糖的送料培养基每天或者连续喂饲培养物。如本文中描述，延长的生产期包括从 37℃ 或接近 37℃ 到 34℃ 或接近 34℃ 的第一次温度转换后将培养温度以不同的间隔连续降低两次或多次。相对于没有温度转换，或者仅一次温度转换，通过实施包括培养运行期间两次或多次向下温度转换的这

些方法，蛋白质生产增加了并且得到高产物质量(如通过终产物的唾液酸含量测量)。

在细胞培养的生长期，例如，从第 0 天到约第 6 天，由于在该指数细胞生长期或者对数期细胞通常快速分裂，培养物中的细胞密度增加。在本发明的某些方法中存在的非生长相关的细胞培养和蛋白质生产方法中，在生长期期间没有产生大量蛋白质产物，在所述生长期中细胞生长在适宜的生长条件下基本上最大化。从而，由于培养中营养限制的原因，细胞通常在约第 4 到 6 天进入稳定期，其中快速生长达到稳定状态和/或下降。在这些培养方法中，当细胞生长基本上结束(例如，在约第 6 天到约第 10 天)时，开始蛋白质生产期(实施例 4)。

根据优选实施方案的培养方法，当在约第 6 天细胞达到稳定期时，温度从 37℃ 或者接近 37℃ 向下转换到 34℃ 或者接近 34℃。之后，在接近第一次温度转换(约第 6 天)和延长的生产期开始(约第 14 天)之间中点某一时间，再次将培养温度从 34℃ 或者接近 34℃ 降低到 32℃ 或者接近 32℃。第二次温度转换允许培养稳定细胞生存力，细胞生存力通常从约第 14 天缓慢下降；之后，开始生产期的延长(在约第 14 天到约第 21 到 30 天或更长，优选到约 21 天到约 28 天或更长)。如上面描述的，在培养运行的延长的生产期期间可以使用其他温度转换，例如，第三次、第四次或更多次温度转换。

20 包括用半乳糖喂饲联合延迟加入聚阴离子化合物的培养方法

本发明的其他实施方案涉及包括延迟加入聚阴离子化合物的细胞培养方法。包括延迟加入聚阴离子化合物的细胞培养方法公开在共同转让的专利申请美国序号 60/436,101(2002 年 12 月 23 日提交)和相伴提交的美国序号 10/-----，这里引用所述专利申请作为参考，并且下面进一步描述所述细胞培养方法。这种延迟加入聚阴离子化合物可以与本文中描述的半乳糖喂饲方法联合使用。

提供了包括延迟加入聚阴离子化合物的根据本发明的实施方案，该方法包括接种后某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物。与不加入聚阴离子化合物时所观察到的相比，或者与接种时加入聚阴离子化合物所观察到的相比，聚阴离子化合物的延迟加入实现了更大的细胞生存力。

从而，在一个实施方案中，本发明涉及细胞培养方法，其包括：

培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在接种后某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物。

已经发现(实施例 8)当实施本发明时,细胞培养物的百分细胞生存力增加了。百分细胞生存力,也称作细胞生存力,是细胞总数中活细胞的百分数。如果存在某一条件时培养物中细胞生存力比不存在该条件时的更高,那么该条件(如延迟加入聚阴离子化合物)导致增加的细胞生存力。

从而,在其他实施方案中,本发明涉及(1)细胞培养方法,和(2)增加培养物中细胞生存力的方法,该方法包括:培养表达目标蛋白质的宿主细胞;和在接种后某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物;其中细胞培养物的细胞生存力增加了。

聚阴离子化合物包括,但不限于,硫酸葡聚糖(可从 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 得到)、肝素(可从 Sigma-Aldrich 得到)、硫酸乙酰肝素(可从 Sigma-Aldrich 得到)、硫酸甘露聚糖、硫酸软骨素(可从 Sigma-Aldrich 得到)、硫酸皮肤素(可从 Sigma-Aldrich 得到)、硫酸角质素(可从 Sigma-Aldrich 得到)、透明质酸盐(可从 Sigma-Aldrich 得到)、聚(乙烯基硫酸盐)(可从 Sigma-Aldrich 得到)、 κ -角叉菜胶(可从 Sigma-Aldrich 得到)、和苏拉明(可从 Sigma-Aldrich 得到)。所述化合物可以容易地从所列来源得到,或者通过本领域中技术人员公知的方法容易地得到。这些化合物通常以盐的形式(包括但不限于钠盐)得到,但是也可以以非盐形式使用。聚阴离子化合物包括其所有形式,包括但不限于盐形式,如钠盐。

优选的聚阴离子化合物为多硫酸化化合物,包括但不限于:硫酸葡聚糖、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸戊聚糖、硫酸 xylofuranan、硫酸凝胶多糖、硫酸凝胶多糖半乳糖、硫酸凝胶多糖阿拉伯糖、硫酸甘露聚糖、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、聚(乙烯基硫酸盐)、 κ -角叉菜胶、和苏拉明。最优选为硫酸葡聚糖。硫酸葡聚糖可以具有 5,000 到 500,000Da 的平均分子量。优选具有 5,000Da 分子量的硫酸葡聚糖。

根据本发明,接种后某一时间加入聚阴离子化合物,即聚阴离子化合物不存在于基础培养基中并且接种时不存在。优选地,在培养的第 1 天或者更晚加入聚阴离子化合物。在第 0 天进行接种。

根据本发明，在特定时限(例如，接种后某时)期间可以向细胞培养物加入聚阴离子化合物一次、两次、三次、或任何次数。可以联合使用一种或多种聚阴离子化合物。即，聚阴离子化合物的任何给定的单次加入可以包括加入一种或多种其他聚阴离子化合物。类似地，如果存在一次以上的聚阴离子化合物加入，可以在不同的加入时间加入不同聚阴离子化合物。额外的化合物和物质，包括聚阴离子化合物，可以在加入聚阴离子化合物之前、之时或者之后加入-在或者不在所述特定时限期间。在优选实施方案中，存在单次，即一次加入聚阴离子化合物。在优选实施方案中，加入一种聚阴离子化合物。

10 根据本发明，可通过任何方法向细胞培养物加入聚阴离子化合物。加入聚阴离子化合物的方法包括，但不限于，溶于水中、溶于培养基中，溶于送料培养基中、溶于适宜的介质中，和以其所得的形式。优选地，所加入的聚阴离子化合物溶于水中。

15 根据本发明，加入聚阴离子化合物使培养物中浓度达到适宜的水平。作为非限制性实例，加入聚阴离子化合物到浓度为 1-1000 mg/L、1-200 mg/L、1-100 mg/L、或 25-75 mg/L。优选地，加入聚阴离子化合物到浓度 25-200 mg/L 或 25-100 mg/L，更优选地约 50-100 mg/L 或 50-100 mg/L，更优选地约 50 mg/L 或约 100 mg/L，最优选地 50mg/L 或 100 mg/L。

20 根据本发明，加入聚阴离子化合物后培养物可以运行任何时间长度。本领域中技术人员基于相关因素，如可回收蛋白质的数量和质量，和细胞裂解导致的上清液中污染性细胞种类(例如，蛋白质和 DNA)的水平(其将目标蛋白质的回收复杂化)确定培养运行时间。

25 在本发明的提高细胞生存力的细胞培养过程和方法的具体实施方案中，在接种后某一时间加入聚阴离子化合物，该时间在最初死亡期开始之前。优选地，在接种后最初生长期期间的某一时间加入聚阴离子化合物。更优选地，在最初生长期的后半期期间加入聚阴离子化合物。更优选地，在最初生长期结束时或者约结束时加入聚阴离子化合物。

30 最初生长期指不存在聚阴离子化合物的特定加入时观察到的生长期。最初死亡期指不存在聚阴离子化合物的特定加入时观察到的死亡期。

当最初死亡期开始时最初生长期结束，或者在最初生长期和最初死亡期之间存在任何长度的稳定期。

在特定实施方案中，在其中最初生长期为从第 0 天到第 6 天并且最初死亡期在第 7 天开始的细胞培养中，在特定实施方案中，在接种后并且第 7 天前加入聚阴离子化合物。在特定实施方案中，在接种后并且到第 6 天时加入聚阴离子化合物。在特定实施方案中，在第 1 天和第 6 天之间加入聚阴离子化合物。在另一特定实施方案中，在第 4、5 或 6 天加入聚阴离子化合物。在其他特定实施方案中，在约第 6 天，或者在第 6 天加入聚阴离子化合物。

10 已经发现(见实施例 8 和 12)，当接种后并且在最初的死亡期开始之前的某一时间加入聚阴离子化合物时，生长期可以超过最初生长期。超过最初生长期的生长期具有比最初生长期更长的持续时间，即比不加入聚阴离子化合物时观察到的生长期更长。优选地，在延长的生长期期间，实现了比最初生长期期间实现的峰值活细胞密度更高的峰值活细胞密度。

15 从而，在其他实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)延长细胞培养物的生长期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；在接种后最初死亡期开始前的某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中生长期得到延长。在更具体的实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)延长细胞培养物的生长期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在接种后最初生长期期间的某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中生长期得到延长。在更具体的实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)延长细胞培养物的生长期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在最初生长期的后半期期间向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中生长期得到延长。在其他具体实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)延长细胞培养物的生长期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在最初生长期结束或者约结束时向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中生长期得到延长。

30 生长期可以比最初生长期的持续时间延长任何时限。仅作为实例，生长期可以延长 1-10 天、2-9 天、3-8 天、或者约 5 天。优选地，生长期延长 1 天或多天，更优选 2 天或多天，更优选 3 天或多天，最

优选4天或多天。例如，在实施例6中，生长期延长到第11天，其中最初生长期为直到第6天。从而，在实施例8中，生长期已经比最初生长期的持续时间延长5天。所延长的生长期可以接着是死亡期或者稳定期。同样，最初生长期可以接着死亡期或者稳定期。

5 已经发现(见实施例8和12)，当孵育后并且在最初的死亡期开始之前的某一时间加入聚阴离子化合物时，死亡期的出现可以比最初的死亡期延迟，即，比不加入聚阴离子化合物时观察到的死亡期的出现延迟。受到延迟的死亡期的出现在比最初死亡期更晚的时间开始。

从而，在其他实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)
10 延迟细胞培养物的死亡期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在接种后最初死亡期开始前的某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中死亡期的出现得到延迟。在更具体的实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)延迟细胞培养物的死亡期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在最初生长期的
15 后半期期间向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中最初死亡期的出现得到延迟。在其他实施方案中，本发明涉及延迟细胞培养物的死亡期的方法，该方法包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在最初生长期结束或者约结束时向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中死亡期的出现得到延迟。

20 死亡期的出现可以延迟任何时限。仅作为实例，死亡期的出现可以延迟1-10天、2-9天、3-8天、或者约5天。优选地，死亡期的出现延迟1天或多天，更优选2天或多天，更优选3天或多天，最优选4天或多天。在增加上面本发明的细胞生存力的细胞培养过程和方法的另一个具体实施方案中，在接种后最初死亡期期间加入聚阴离子化合物。
25

已经发现(见实施例9和10)，当在最初死亡期期间加入聚阴离子化合物时，死亡期可以受到抑制。阻滞死亡期指不加入聚阴离子化合物时观察到的活细胞密度下降停止一段时间。该抑制可以发生在聚阴离子化合物加入即刻后，或者可以在更晚的时间发生。当死亡期受到
30 抑制时，接下来可以是生长期或者稳定期。当然，最后培养物将再次进入死亡期。

从而，在其他实施方案中，本发明涉及(1)细胞培养方法，和(2)

抑制细胞培养物的死亡期的方法，其包括：培养表达目标蛋白质的宿主细胞；和在最初死亡期期间的某时刻向细胞培养物加入聚阴离子化合物；其中死亡期受到抑制。

死亡期可以受到抑制任何时限，之后再次进入死亡期。仅作为实例，死亡期可以受到抑制 1-20 天，例如 2-18 天，5-15 天，或者 8-13 天。优选地，死亡期受到 1 天或多天的抑制，更优选地，受到 2 天或多天的抑制，更优选地，受到 3 天或多天的抑制，最优选地，受到 4 天或多天的抑制。不一定暗含死亡抑制的连续性，即，在两段恒定或者增加的活细胞密度之间可以存在活细胞密度图中的“局部”减少。

10 细胞培养方法，尤其非连续方法的运行时间通常受到剩余的活细胞密度的限制，剩余活细胞密度在死亡期期间减小。更长的运行时间可以允许实现更高的产物滴定度。因此希望延迟死亡期，包括尽可能地延长生长期，或者抑制死亡期。产物质量的考虑也提供了延迟或者抑制死亡期的动机，因为细胞死亡可以向培养物上清液释放唾液酸酶，其可以减少所表达的蛋白质的唾液酸含量。蛋白质纯化考虑提供了延迟或者抑制死亡期的另一动机。细胞碎片的存在和培养物中死亡细胞的含量可以不利地影响分离和/或纯化培养运行结束时蛋白质产物的能力。

在特定实施方案中，本文中描述的包括两次或多次温度转换的细胞培养方法的任一种与本文中描述的包括延迟加入聚阴离子化合物的细胞培养方法的任一种一起用于细胞培养中。在特定实施方案中，本发明涉及 (i) 细胞培养方法，和 (2) 增加细胞生存力的方法，其包括：
a) 在允许细胞生长的条件下在 37°C 或者接近 37°C 培养产生目标蛋白质的宿主细胞一段时间； b) 降低细胞培养的温度并从约第 5 天到第 7 天开始在 34°C 或者接近 34°C 的第二温度下培养细胞； (c) 再次降低细胞培养的温度并从约第 6 天到第 14 天开始在 32°C 或者接近 32°C 的第三种温度下培养细胞；和 (d) 在接种后的某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物。

在特定实施方案中，本发明涉及细胞培养方法，其包括如上述的延迟加入聚阴离子化合物并且还包括用 D-半乳糖喂饲细胞。在另一特定实施方案中，本发明涉及细胞培养方法，其包括如上述的延迟加入聚阴离子化合物，如上描述的两次或多次温度转换，和用 D-半乳糖喂

饲细胞。从而，在特定实施方案中，本发明涉及生产蛋白质的细胞培养方法，其包括：在允许蛋白质生产的条件下培养产生目标蛋白质的宿主细胞；用 D-半乳糖喂饲细胞；和在接种后的某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物。在另一特定实施方案中，本发明涉及生产蛋白质的细胞培养方法，其包括：在允许蛋白质生产的条件下培养产生目标蛋白质的宿主细胞；在允许细胞生长的条件下在 37℃ 或者接近 37℃ 培养所述宿主细胞一段时间；在 34℃ 或者接近 34℃ 的第二温度下培养细胞；在 32℃ 或者接近 32℃ 的第三种温度下培养细胞；和在接种后的某一时间向细胞培养物加入聚阴离子化合物。

10 涉及糖蛋白纯化和分析的技术和方法

在本发明包括的培养方法中，通常在总细胞培养期结束时使用本领域中公知的和实践的分离和纯化方法收集、回收、分离、和/或纯化，或者基本上纯化(如希望)细胞产生的蛋白质。优选地，从培养基或者上清液分离培养细胞分泌的糖蛋白；然而，使用本领域中公知的和实践和如下文进一步描述的方法也可以从宿主细胞，例如，细胞裂解物回收蛋白质。

含有通过本发明的方法产生的糖蛋白的复杂碳水化合物可以常规地分析，如果希望，通过碳水化合物分析的常规技术进行分析。例如，本领域中熟知的技术，如凝集素印迹揭示末端甘露糖或者其他糖，如半乳糖的比例。通过使用无水肼或者酶促方法从蛋白质释放糖并通过离子交换层析、大小排阻层析，或者本领域中熟知的其他方法分级分离寡糖可以证实单-、二-、三-、或四-触角寡糖以唾液酸结束。

在神经氨酸酶处理以除去唾液酸之前和之后，还可以测量糖蛋白的 pI。神经氨酸酶处理后 pI 的增加表明该糖蛋白上存在唾液酸。碳水化合物结构通常在所表达的蛋白质上作为 N-连接或者 O-连接的碳水化合物发生。N-连接和 O-连接的碳水化合物主要在它们的核心结构中不同。N-连接的糖基化指碳水化合物部分通过 GlcNAc 附着肽链中的天冬酰胺残基。N-连接的碳水化合物都含有共同的 Man1-6 (Man1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -核心结构，其中该核心结构中的 R 代表天冬酰胺残基。所产生的蛋白质的肽序列将含有天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸、和天冬酰胺-X-半胱氨酸，其中 X 为除了脯氨酸之外的任何氨基酸。

相比，O-连接的碳水化合物的特征是共同的核心结构，其为附着到苏氨酸或丝氨酸的羟基的 GalNAc。N-连接的和 O-连接的碳水化合物中，最重要的是复杂 N-和 O-连接的碳水化合物。这些复杂碳水化合物含有数个触角结构。单-、二-、三-、和四-外部结构对于加入末端唾
5 液酸是重要的。这些外部链结构为包括所述蛋白质产物的碳水化合物的特定糖和连接提供了额外的位点。

可以通过本领域中任何公知的技术分析所得碳水化合物。一些方法在本领域中公知用于分析糖基化并且可用于本发明背景中。这些方法提供了关于连接所产生的肽的寡糖的身份和组成的信息。可用于本
10 发明的碳水化合物分析方法包括，但不限于凝集素层析；HPAEC-PAD，其使用高 pH 阴离子交换层析基于电荷分离寡糖；NMR；质谱；HPLC；GPC；单糖组成分析；和顺序酶促消化。

此外，释放寡糖的方法是本领域中公知并且实践的。这些方法包括 1) 酶促方法，其通常使用肽-N-糖苷酶 F/内-β-半乳糖苷酶；2)
15 β-消去法，使用苛刻碱性环境释放主要 O-连接的结构；和 3) 化学方法，使用无水胍释放 N-和 O-连接的寡糖。使用下面的步骤进行分析：
1. 针对去离子水透析样品以除去所有缓冲盐，然后冻干。2. 用无水胍释放完整寡糖链。3. 用无水含甲醇盐酸处理完整寡糖链以释放作为 O-甲基衍生物的单糖。4. 任何伯氨基的 N-乙酰化。5. 衍生化
20 以产生 per-O-三甲基甲硅烷基甲基糖苷。6. 通过在 CP-SIL8 柱上毛细管气相液相层析 (GLC) 分离这些衍生物。7. 通过 GLC 和质谱的存留时间与公知的标准相比鉴定各种的糖苷衍生物。8. 通过 FID 使用内标 (13-O-甲基-D-葡萄糖) 定量各种衍生物。

通过高效阴离子交换层析联合脉冲电流检测 (HPAE-PAD
25 Carbohydrate System; Dionex Corp.) 可以确定中性和氨基糖。例如，通过在 20% (v/v) 三氟乙酸中 100℃ 水解 6 小时释放糖。然后通过冻干或者使用 Speed-Vac (Savant Instruments) 干燥水解产物。将残渣溶于 1% 三水合乙酸钠溶液中并在 HPLC-AS6 柱 (如 Anumula 等人, 1991, Anal. Biochem., 195: 269-280 描述) 上分析。

30 备选地，可以实施免疫印迹碳水化合物分析。在该方法中，使用商业化聚糖检测系统 (Boehringer) 检测蛋白质结合的碳水化合物，所述系统是基于 Haselbeck 等人 (1993, Glycoconjugate J., 7: 63)

描述的氧化免疫印迹方法。按照生产商推荐的染色方案，只是将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜而不是硝酸纤维素膜，并且封闭缓冲液含有 10 mM Tris 缓冲液 (pH 7.4) 中的 5% 牛血清白蛋白，该缓冲液含有 0.9% 氯化钠。用连接碱性磷酸酶缀合物 (Boehringer) 的抗地高辛抗体实施检测，该抗体以 1:1000 在 Tris 缓冲盐溶液中稀释，使用磷酸酶底物：溶于 100mM Tris 缓冲液 (pH 9.5) 的 0.03% (w/v) 氯化 4-氨基四唑和 0.03% (w/v) 5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸，该缓冲液含有 100 mM 氯化钠和 50 mM 氯化镁。通常在约 10 到 15 分钟内显现含有碳水化合物的蛋白质带。

- 10 通过肽-N-糖苷酶 F 消化也可以分析结合蛋白质的碳水化合物。根据该方法，将残基悬浮在含有 0.18% SDS, 18mM β -巯基乙醇, 90 mM 磷酸盐, 3.6 mM EDTA 的 14 μ L 缓冲液 (pH 8.6) 中并在 100 $^{\circ}$ C 加热 3 分钟。冷却到室温后，将样品分成两个相等部分。一份不进一步处理，其作为对照。另一份调节到约 1% NP-40 去污剂，然后加入 0.2 单位肽-N-糖苷酶 F (Boehringer)。两份样品都在 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时，然后通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

此外，通过常规方法评估糖蛋白产物的唾液酸含量。例如，通过直接比色方法 (Yao 等人, 1989, *Anal. Biochem.*, 179: 332-335)，优选使用一式三份样品分别测定唾液酸。另一种唾液酸测定方法包括使用硫代巴比妥酸，如 Warren 等人, 1959, *J. Biol Chem.*, 234: 1971-1975 所描述。再一种方法包括高效层析，如 H. K. Ogawa 等人, 1993, *J. Chromatography*, 612: 145-149 描述。

作为例证，对于糖蛋白回收、分离和/或纯化，离心细胞培养基或细胞裂解物以除去颗粒细胞和细胞碎片。通过适宜的纯化技术从污染性可溶蛋白和多肽分离或纯化所希望的多肽产物。下面的方法提供了代表性但是非限制性蛋白质纯化方法：在免疫亲和或者离子交换柱上分离或者分级分离；乙醇沉淀；反相 HPLC；在树脂，如硅胶，或者阳离子交换树脂，例如，DEAE 上层析；层析聚焦；SDS-PAGE；硫酸铵沉淀；凝胶过滤，使用例如，Sephadex G-75, Sepharose；蛋白质 A sepharose 层析以除去免疫球蛋白污染物；等等。其他添加剂，如蛋白酶抑制剂 (例如，PMSF 或者蛋白酶 K) 可用于抑制纯化期间蛋白质水解性降解。技术人员将理解给定目标多肽的纯化方法可能需要修改以

容许细胞培养中重组表达的多肽中的变化。尤其优选可以选择碳水化合物并且富集唾液酸的那些纯化方法，例如，离子交换软凝胶层析，或者使用阳离子-或者阴离子-交换树脂的 HPLC，其中收集更酸性的级分。

5 细胞、蛋白质和细胞培养物

在本发明的细胞培养过程或方法中，如本领域中公知的，细胞可以保持在多种细胞培养基中，即基础培养基中。例如，这些方法可以用于将大体积细胞保持在细胞培养基中，所述培养基可以补加营养物等等。通常，“细胞培养基”（也称作“培养基”）是本领域中技术人员理解的术语并且公知表示营养溶液，其中生长细胞，优选动物或者哺乳动物细胞，并且该营养溶液通常提供下面的至少一种或多种组分：
10 能源（通常为碳水化合物，如葡萄糖的形式）；所有必需氨基酸，通常 20 种基本氨基酸，加上半胱氨酸；维生素和/或以低浓度需要的其他有机化合物；脂质或游离脂肪酸，例如亚油酸；和微量元素，例如，无机化合物或者天然发生的元素，它们通常以极低浓度需要，通常在微
15 摩尔范围内。还可以向细胞培养基补加多种任选组分，如激素和其他生长因子，例如，胰岛素、转铁蛋白、表皮生长因子、血清，等等；盐，例如，钙、镁和磷酸盐，和缓冲液，例如 HEPES；核苷和碱基，例如腺苷、胸苷、次黄嘌呤；和蛋白质和组织水解物，例如，水解的动物
20 蛋白（蛋白胨或蛋白胨混合物，其可以从动物的副产品得到；）和细胞保护基，例如，Pluronic 多元醇(Pluronic F68)。优选无血清并且没有动物来源的产物或者成分的细胞营养培养基。

如技术人员所理解的，动物或者哺乳动物细胞培养于适于特定细胞培养并且可以通过本领域技术人员不用过多实验就可以确定的培养基中。可以使用通过商业途径得到的培养基并且它们包括，例如，最
25 小基本培养基(MEM, Sigma, St. Louis, MO); Ham's F10 培养基(Sigma); Dulbecco 氏改良的 Eagle 培养基(DMEM, Sigma); RPMI-1640 培养基(Sigma); HyClone 细胞培养基(HyClone, Logan, UT); 和化学定义的(CD)培养基，它们用于特定细胞类型，例如 CD-CHO 培养基
30 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。如必需或者希望，可以向前面的代表性培养基添加适宜浓度或量的上述补充组分或成分，包括任选组分，并且所述添加将是本领域技术人员公知的并且使用常规技术可以实现

的。

此外，适于本发明方法的细胞培养条件是细胞的分批、补料分批，或者连续培养通常使用和公知的那些条件，注意 pH，例如约 6.5 到约 7.5；溶解氧 (O_2)，例如空气饱和度的约 5-90% 和二氧化碳 (CO_2)，搅拌和湿度，以及温度。作为阐明性但非限制性实例，适于本发明的补料分批方法的细胞培养基包括改良 CD-CHO 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和送料培养基，其优选含有 D-半乳糖。(例如，实施例 1 和 3)。

动物细胞、哺乳动物细胞、培养细胞、动物或哺乳动物宿主细胞、宿主细胞、重组细胞、重组宿主细胞等等都是可以根据本发明的方法培养的细胞的术语。这些细胞通常是从哺乳动物得到或来源于哺乳动物的细胞系并且当置于含有适宜营养物和/或生长因子的培养基中单层培养或者悬浮培养时能够生长和存活。特定细胞培养物的生长和保持所必需的生长因子和营养物可以容易地由相关领域中技术人员通过经验确定，如例如由 Barnes 和 Sato, (1980, Cell, 22: 649); Mammalian Cell Culture, 编者, J. P. Mather, Plenum Press, NY, 1984; 和美国专利号 5,721, 121 描述。

根据本发明方法可以培养多种细胞类型。细胞通常是动物或者哺乳动物细胞，它们可以表达和分泌，或者经分子工程化后表达和分泌大量特定蛋白质，更具体地，目标糖蛋白到培养基中。将理解宿主细胞产生的糖蛋白可以是宿主细胞内源的或者同源的。备选地，和优选地，糖蛋白是异源的，即宿主细胞外来的，例如，中国仓鼠卵巢 (CHO) 宿主细胞产生和分泌的人糖蛋白。还优选哺乳动物糖蛋白，即最初从哺乳动物生物得到和来源的那些糖蛋白可通过本发明方法得到并且优选通过细胞分泌到培养基中。

通过本发明方法可以优选产生的哺乳动物糖蛋白的实例包括，但不限于，细胞因子、细胞因子受体、生长因子 (例如，EGF、HER-2、FGF- α 、FGF- β 、TGF- α 、TGF- β 、PDGF、IGF-1、IGF-2、NGF、NGF- β)；生长因子受体，包括融合或嵌合蛋白。其他非限制性实例包括生长激素 (例如，人生长激素、牛生长激素)；胰岛素 (例如，胰岛素 A 链和胰岛素 B 链)、胰岛素原；红细胞生成素 (EPO)；集落刺激因子 (例如，G-CSF、GM-CSF、M-CSF)；白介素 (例如，IL-1 到 IL-12)；血管内皮

生长因子 (VEGF) 和其受体 (VEGF-R); 干扰素 (例如, IFN- α 、 β 、或 γ); 肿瘤坏死因子 (例如, TNF- α 和 TNF- β) 和它们的受体 TNFR-1 和 TNFR-2; 血小板生成素 (TPO); 凝血酶; 脑钠尿肽 (BNP); 凝血因子 (例如, 因子 VIII、因子 IX, 冯·维勒布兰德因子, 等等); 抗凝因子;
5 组织纤溶酶原激活物 (TPA), 例如, 尿激酶或者人尿或组织型 TPA; 促卵泡激素 (FSH); 黄体生成素 (LH); 降钙素; CD 蛋白 (例如, CD3、CD4、CD8、CD28、D19 等等); CTLA 蛋白 (例如, CTLA4); T-细胞和 B-细胞受体蛋白; 骨形态发生蛋白 (BMPs, 例如, BMP-1、BMP-2、BMP-3 等等); 神经营养因子, 例如, 骨来源的神经营养因子 (BDNF); 神经营养蛋白,
10 例如 3-6; 肾素; 类风湿因子; RANTES; 白蛋白; 松弛素; 巨噬细胞抑制蛋白 (例如, MIP-1、MIP-2); 病毒蛋白质或抗原; 表面膜蛋白; 离子通道蛋白; 酶; 调节蛋白; 抗体; 免疫调节蛋白 (例如, HLA、MHC, B7 家族); 归巢受体; 转运蛋白; 超氧化物歧化酶 (SOD); G-蛋白偶联的受体蛋白 (GPCRs); 神经调节蛋白; 阿尔茨海默氏病相关蛋白质和肽
15 (例如, A- β), 和本领域中公知的其他糖蛋白。通过本发明的方法可以产生的适宜的蛋白质、多肽和肽还包括融合蛋白和多肽、嵌合蛋白和多肽, 以及上面提到的蛋白质任一种的片段或部分, 或者突变体、变体或类似物。

适于容纳、表达和产生蛋白质以随后分离和/或纯化的动物或哺乳
20 动物宿主细胞的非限制性实例包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO), 如 CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DG44 (Chasin 等人, 1986, Som. Cell Molec. Genet., 12: 555-556; Kolkekar 等人, 1997, Biochemistry, 36: 10901-10909; 和 WO 01/92337 A2)、二氢叶酸脱氢酶阴性 CHO 细胞 (CHO/-DHFR, Urlaub 和 Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
25 77: 4216), 和 dp12. CHO 细胞 (美国专利号 5,721, 121)、SV40 转换的猴肾 CV1 细胞 (COS 细胞, COS-7, ATCC CRL-1651); 人胚胎肾细胞 (例如, 293 细胞, 或亚克隆以悬浮培养的 293 细胞, Graham 等人, 1977, J. Gen. Virol., 36: 59)、幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL-10)、猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL-70)、非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-
30 1587; VERO, ATCC CCL-81)、小鼠支持细胞 (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod., 23: 243-251)、人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL-2)、犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL-34)、人肺细胞 (wu38, ATCC CCL-75)、人肝

癌细胞 (HEP-G2, HB 8065)、小鼠乳腺肿瘤细胞 (MMT 060562, ATCC CCL-51)、水牛大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL-1442)、TRI 细胞 (Mather, 1982, *Annals NYAcad. Sci.*, 383: 44-68)、MCR 5 细胞、FS4 细胞。优选 CHO 细胞, 特别是 CHO/-DHFR 细胞。

5 适于在本发明的培养方法和过程中培养的细胞可以含有导入的 (例如, 通过转化、转染、感染, 或者注射) 的表达载体 (构建体), 如质粒等等, 其含有编码序列或者其部分, 所述编码序列或者其部分编码在培养过程中表达和生产的蛋白质。这种表达载体含有所插入的编码序列的转录和翻译必要的元件。本领域中技术人员熟知并且实践的方法可用于构建表达载体, 其含有编码所产生的蛋白质和多肽的序
10 列, 以及适宜的转录和翻译控制元件。这些方法包括体外重组 DNA 技术, 合成技术, 和体内基因重组。这些技术在 J. Sambrook 等人, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. 和 F. M. Ausubel 等人, 1989, *Current
15 Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y. 中描述。

控制元件, 或者调节序列是载体的非翻译区, 例如, 增强子、启动子、5'和 3'非翻译区, 这些非翻译区与宿主细胞蛋白质相互作用以实施转录和翻译。这些元件可以在长度和特异性方面不同。根据所用的载体系统和宿主细胞, 可以使用任何数目的适宜的转录和翻译元
20 件, 包括组成性和可诱导的启动子。在哺乳动物细胞系统中, 优选来自哺乳动物基因或者哺乳动物病毒的启动子。设计用于蛋白质表达系统的构建体以含有至少一种启动子、一种增强子序列 (任选地, 用于哺乳动物表达系统), 和基因表达的正确转录和调节所必需或者需要的其他序列 (例如, 转录起始和终止序列、复制位点的原点、多腺苷酸化序
25 列, 例如, 牛生长激素 (BGH) 多聚 A 序列)。

如本领域技术人员将理解的, 适宜的载体, 例如质粒, 和真核 (例如, 哺乳动物) 表达系统中产生的蛋白质的转录、表达和分离组分的选择是本领域中技术人员公知并且常规确定和实践的。根据本发明方法
30 培养的细胞的蛋白质表达可以置于启动子的控制下, 所述启动子为例如病毒启动子, 例如, 巨细胞病毒 (CMV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV)、磷酸甘油激酶 (PGK)、胸苷激酶 (TK), 或者 α -肌动蛋白启动子。此外, 特

定化合物或者分子可以赋予受调节启动子可诱导性，例如，小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)的糖皮质激素应答元件(GRE)受到糖皮质激素的诱导(V. Chandler 等人, 1983, Cell, 33: 489-499)。而且，如果必要或者希望，可以使用组织特异启动子或者调节元件(G. Swift 等人, 5 1984, Cell, 38: 639-646)。

通过本领域中技术人员公知的多种基因转移方法可以将表达构建体导入细胞中，所述方法为例如，常规基因转染方法，如磷酸钙共沉淀、脂质体转染、微注射、电穿孔，和感染或者病毒转导。方法的选择是本领域技术人员的能力范围之内。本领域中技术人员将明白可以10 可以将携带在细胞中表达的 DNA 序列的一种或多种构建体转染细胞，从而在所述细胞中随后产生或者从所述细胞得到表达产物。

在具体方面，含有适宜的控制和调节序列的哺乳动物表达系统优选用于本发明的表达蛋白质的哺乳动物细胞中。通常用于产生哺乳动物表达载体的真核控制序列包括与哺乳动物细胞相容的启动子和控制15 序列，例如，巨细胞病毒(CMV)启动子(CDM8 载体)和禽肉瘤病毒(ASV) π LN 载体。其他常用的启动子包括源于猿病毒 40(SV40)的早和晚启动子(Fiers 等人, 1973, Nature, 273: 113)，或者其他病毒启动子，如源于多形瘤、腺病毒 2、和牛乳头状瘤病毒的那些启动子。也可以使用可诱导的启动子，如 hMTII (Karin 等人, 1982, Nature, 299: 20 797-802)。

适于真核宿主细胞的表达载体的实例包括，但不限于，哺乳动物细胞的载体(例如，BPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2(Maniatis)、pIRES(Clontech)、pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1(LifeTechnologies)、pVPakc 载体、pCMV 载体、pSG5 载体(Stratagene)、逆转录病毒载体(例25 如，pFB 载体(Stratagene))、pcDNA-3(Invitrogen)、腺病毒载体；腺相关病毒载体、杆状病毒载体、酵母载体(例如，pESC 载体(Stratagene))、或者前面任一种载体的改良修饰。

也可以在重组载体(例如，质粒)中使用可选择标记以赋予对含有(优选已经稳定整合)该载体的细胞抗性以允许它们在适宜的选择培养基中选择。可以使用许多选择系统，它们包括但不限于，单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV TK)(Wigler 等人, 1977, Cell, 11: 223)；次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)(Szybalska 和 Szybalski, 1992, 30

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 202); 和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy 等人, 1980, Cell, 22: 817)基因, 它们分别可用于 tk-、hgprt-、或 aprt-细胞(APRT)中。

抗代谢物抗性也可用作标记基因的下面的非限制性实例的选择基础: dhfr, 其赋予氨甲蝶呤抗性(Wigler 等人, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare 等人, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, 其赋予霉酚酸抗性(Mulligan 和 Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, 其赋予氨基糖苷 G-418 抗性(Clinical Pharmacy, 12: 488-505; Wu 和 Wu, 1991, Biotherapy, 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science, 260: 926-932; Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-21; May, 1993, TIB TECH, 11 (5): 155-215); 和 hygro, 其赋予潮霉素抗性(Santerre 等人, 1984, Gene 30: 147)。本领域中公知的重组 DNA 技术的方法可常规地用于选择所希望的重组克隆, 并且这些方法在例如, Ausubel 等人(编者), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 和第 12 和 13 章, Dracopoli 等人(编者), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); ColberreGarapin 等人, 1981, J. Mol. Biol. 150: 1 中描述, 这些文献在此处被完整并入作为参考。

通过载体扩增可以提高所表达的蛋白质分子的表达水平(综述, 见 Bebbington 和 Hentschel, 使用基于基因扩增的载体在哺乳动物细胞中表达克隆的基因, DNA cloning, 卷 3(Academic Press, New York, 1987))。当表达蛋白质的载体系统中的标记物是可扩增的时候, 宿主细胞培养物中存在的抑制剂的水平的增加将增加该标记基因的拷贝数。因为扩增的区域与编码蛋白质的基因结合, 所以蛋白质的产量将伴随着增加(Crouse 等人, 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257)。

可以分别在药物甲硫氨酸 sulphoximine 或者氨甲蝶呤的存在下扩增含有作为选择标记的编码谷氨酰胺合酶(GS)或者二氢叶酸还原酶(DHFR)的核酸的载体。基于谷氨酰胺合酶的载体的优点是可以利用谷氨酰胺合酶阴性细胞系(例如, 鼠骨髓瘤细胞系, NS0)。通过提供额外

抑制剂以防止内源基因的作用，谷氨酰胺合酶表达系统也可以在表达谷氨酰胺合酶的细胞(例如，CHO 细胞)中发挥功能。

表达作为选择标记的 DHFR 的载体包括，但不限于 pSV2-dhfr 质粒(Subramani 等人, Mol. Cell. Biol. 1: 854 (1981)。表达作为选择标记的谷氨酰胺合酶的载体包括，但不限于 Stephens 和 Cockett, 1989, Nucl. Acids. Res., 17: 7110 中描述的 pEE6 表达载体。谷氨酰胺合酶表达系统和其组分在 PCT 出版物: W087/04462、W086/05807、W089/01036、W089/10404、和 W091/06657 中详述，这里完整引用这些文献作为参考。此外，可以根据本发明使用的谷氨酰胺合酶表达载体可通过商业途径从供应商(包括，例如，Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH))得到。

在特定实施方案中，可以将编码可溶性 CTLA4 分子或者可溶性 CTLA4 突变分子的核酸序列插入经设计用于在真核宿主中表达外来序列的载体中。所述载体的调节元件可以根据具体真核宿主而变。在真核宿主细胞中表达可溶 CTLA4 或者可溶 CTLA4 突变体的载体包括用于优化蛋白质表达的增强子序列。

细胞培养类型

为了理解的目的，然而不限制，技术人员将理解用于蛋白质生产的细胞培养和培养运行可以包括三种通常的类型；即连续培养、分批培养和补料-分批培养。在连续培养中，例如，在培养期间为细胞提供新鲜培养基补充(即，补料培养基)，而每天除去旧培养基，并且例如，每天或者连续收获产物。在连续培养中，送料培养基可以每天加入并且可以连续地，即作为滴液或者输注加入。对于连续培养，细胞可以在培养物中保持所希望的长时间，只要细胞保持活着并且保持环境和培养条件。

在分批培养中，细胞最初在培养基中培养，并且在培养运行期间或者结束前该培养基既不除去、替换，也不补加，即不用新鲜培养基“喂养”细胞。在培养运行末收获所希望的产物。

对于补料分批培养，通过在运行期间用新鲜培养基每天补加培养基一次或多次(或者连续)，即在培养期期间用新鲜培养基(“送料培养基”)“喂养”细胞。补料分批培养可以包括如上所述的多种喂饲方案和次数，例如，每天、每隔一天、每两天，等等，每天一次以上，或

者每天小于一次，等等。此外，可以用送料培养基连续喂饲补料分批培养物。然后在培养/生产运行结束时收获所希望的产物。本发明优选包括补料-分批细胞培养，用含有 D-半乳糖的送料培养基每天喂饲，其中培养期期间两次或多次温度转换产生更高质量的蛋白质并且可以延
5 长蛋白质生产期超过不使用温度转换，或者仅使用一次温度转换时发生的生产期。多次温度转换培养方法在共同转让的专利申请美国序号 60/436,101 (2002 年 12 月 23 日，和美国序号 10/-----，与其一起提交)，这里完整引用所述专利申请作为参考。

在包含两次或多次温度转换的本发明的方面，本发明的包含两次
10 或多次温度转换的细胞培养方法导致培养物中更多活细胞，直到该方法或者生产运行结束。存活细胞的数目越大，在蛋白质生产的非生长相关过程，如本文中例证的过程中产生的蛋白质产物的量就越大。从而，在该方法结束时得到的所希望的产物的累积量越大。培养物中单独细胞产生蛋白质或者糖蛋白的速度(即，细胞特异生产率)不受本发
15 明的温度转换培养方法的影响或增加(例如，实施例 6)。相比，在生长相关的培养过程中，主要通过培养物的生长期期间正生长的细胞产生蛋白质。

根据本发明，使用惯用于动物或者哺乳动物细胞培养的培养容器和/或培养设备，在大规模或者小规模蛋白质生产条件下，可以实施细
20 胞培养，并且可以由细胞产生糖蛋白。如本领域中技术人员将理解的，组织培养皿、T-烧瓶和旋转瓶通常用于实验室规模。对于大规模培养(例如，500L，5000L，等等)，方法包括，但不限于，可以使用流化床生物反应器、中空纤维生物反应器、滚瓶培养，或者搅拌釜生物反应器系统。微载体可以与或者不与滚瓶或者搅拌釜生物反应器系统一起
25 使用。系统可以以分批、连续、或者补料-分批模式运行。此外，培养设备或者系统可以装备或者不装备细胞分离器，该分离器使用过滤、重力、离心力，等等。

细胞培养期和相关参数

术语“接种”指向起始培养基加入细胞以开始培养。

30 培养的生长期指这样的期间，在该期间任何时间点的活细胞密度都高于任何以前的时间点的活细胞密度。

培养的稳定期指这样的期间，在该期间活细胞密度在任何长度的

时限内约恒定(即在测量误差内)。

培养的死亡期是生长期之后或者生长期和稳定期之后出现的时期,在该期间内任何时间点的活细胞密度都低于前面期内任何时间点的活细胞密度。

5 在生长相关的培养方法中,如聚阴离子化合物导致延长的生长期的情况,生产期可以在延长的生长期期间开始。

在非生长相关的培养方法中,细胞培养的生产期可以是稳定期。

10 优选地,在生产期期间补加(“喂饲”)培养基以提供持续蛋白质生产,尤其在延长的生产期中,以得到大量高质量糖蛋白产物(如通过蛋白质回收时高水平终末唾液酸含量例证和/或确定)。喂饲可以每天发生,或者根据其他方案进行以维持细胞生存力和蛋白质生产。

15 在延长的生产期期间,温度经转换而连续低于生长和标准(最初)生产期的温度,细胞得到喂饲并保持存活。这导致在比最初培养温度下,或者当温度从最初培养温度仅转换一次时发生的总时限延长的或者更长的总时限内生产所希望的蛋白质产物。根据本发明的培养方法可以导致更多活细胞存活直到培养期结束。因此,在一些实施方案中,存活的细胞越多,产生所希望的产物的细胞越多。这又导致培养方法结束时积累更大量的产物,而单个细胞生产蛋白质的速度,即细胞特异的生
20 产率保持相同(见,例如实施例4)。如本领域中公知的细胞特定的生产率或者细胞特定的速度通常指每个细胞,或者细胞质量或者体积的每一量度产生的产物的特定表达速度。例如,以所产生的蛋白质克数/细胞/天测量细胞特定的生产率,并且可以根据积分方法测量细胞特定的生产率,该积分方法包括下式:

$$dP/dt = q_p X, \text{ 或者}$$

$$P = q_p \int_0^t X dt$$

25 其中 q_p 为细胞特定的生产率常数; X 为细胞数或者细胞体积,或者细胞质量当量; dP/dt 为蛋白质生产速度。从而,可以从产物浓度对活细胞的时间积分得到 $q_p (\int_0^t X dt$ “活细胞天数”)。根据该公式,当将产生的糖蛋白产物的量对活细胞数作图时,斜率等于细胞特定的速度。可以通过几种量度确定细胞,所述量度为例如,生物量、 O_2 摄取速度、
30 乳糖脱氢酶(LDH)、压紧细胞体积或者浊度(例如, T. Etcheverry 等

人的美国专利号 5,705,364)。

通过本发明的培养方法产生可溶 CTLA4 分子和可溶 CTLA4 突变分子

在本发明包括的其他实施方案中，细胞培养方法用于产生可溶 CTLA4 分子或可溶 CTLA4 突变分子，如下述。可溶 CTLA4 分子优选为 CTLA4 融合蛋白，优选 CTLA4Ig。更优选含有如图 8 中所示的-1 到 357 或者 +1 到 357 位氨基酸的 CTLA4Ig。最优选由图 8 中所示的-1 到 357 或者+1 到 357 位氨基酸组成的 CTLA4Ig 可溶 CTLA4 突变分子优选为 L104EA29YIg，其含有如图 9 中所示的-1 到 357 或者 +1 到 357 位氨基酸。最优选由图 9 中所示的-1 到 357 或+1 到 357 位氨基酸组成。涉及蛋白质产物的延长生产期的两步或三步温度转换细胞和用含有 D-半乳糖的培养基喂饲的培养方法尤其适于通过培养物中的宿主细胞产生高质量和大量可溶性 CTLA4 分子和可溶性 CTLA4 突变分子。

在优选实施方案中，通过重组工程化宿主细胞产生 CTLA4Ig。通过用含有编码 CTLA4Ig 的 DNA 序列的载体转染的 CHO 细胞可以重组产生 CTLA4Ig 融合蛋。(见，P. S. Linsley 等人的美国专利号 5,844,095，和其中的实施例)。当在本发明的多步温度转换方法中培养时，CTLA4Ig 融合蛋白以高数量产生并且被适宜地唾液酸化。本发明提供生产高水平可回收的蛋白质产物，例如，唾液酸化 CTLA4Ig 蛋白质产物。在另一优选实施方案中，含有如图 9 中所示的-1 到 357 或 +1 到 357 氨基酸的可溶性 CTLA4 突变分子 L104EA29YIg 由本发明的细胞培养方法产生。

CTLA4 的配体是 B7 分子。如本文中所述的“配体”指特异识别并结合另一分子的分子。分子和其配体的相互作用可以受到本发明的培养方法的产物的调节。例如，通过施用 CTLA4Ig 分子可以阻断 CTLA4 与其配体 B7 的相互作用。作为其他实施例，通过施用 etanercept 或者其他 TNF/TNFR 阻断分子可以阻断肿瘤坏死因子(TNF)与其配体(TNFR)的相互作用。

野生型 CTLA4 或者“非突变的 CTLA4”具有天然发生的，全长 CTLA4 的氨基酸序列，如图 10 中所示(也在美国专利号 5,434,131、5,844,095 和 5,851,795 中描述，这里将它们完整并入作为参考)，或者识别并结合 B7 分子或者干扰 B7 分子，从而与 CD28 和/或 CTLA4(例

如,内源 CD28 和/或 CTLA4)的结合被阻断。野生型 CTLA4 含有特定部分,包括,例如,以+1 位甲硫氨酸开始并且以 +124 位天冬氨酸结束的野生型 CTLA4 的胞外结构域,或者以-1 位丙氨酸开始并且以 +124 位天冬氨酸结束的野生型 CTLA4 的胞外结构域,如图 10 中所示。

5 天然发生的野生型 CTLA4 是细胞表面蛋白质,其具有 N-末端胞外结构域、跨膜结构域,和 C-末端胞质结构域。胞外结构域结合靶分子,如 B7 分子。在细胞中,天然发生的,野生型 CTLA4 蛋白质以不成熟多肽翻译,其包括氨基端,或者 N-末端的信号肽。该不成熟多肽经历翻译后加工,其包括切割并除去信号肽以产生 CTLA4 切割产物,其具有
10 与不成熟形式中的 N-末端不同的 N-末端。本领域中技术人员将理解可以发生额外的翻译后加工,其从 CTLA4 切割产物的新产生的 N-末端除去一个或多个氨基酸。成熟 CTLA4 蛋白质可以在+1 位甲硫氨酸或者-1 位丙氨酸开始。CTLA4 分子的成熟形式包括结合 B7 的胞外结构域或者其任何部分。

15 如本文中所述的 CTLA4 突变分子指含有如图 10 中所示的野生型 CTLA4 的分子,或者其任何部分或者衍生物,所述衍生物在野生型 CTLA4 序列,优选野生型 CTLA4 的胞外结构域中具有一处突变或多处突变,并且结合 B7。CTLA4 突变分子具有与野生型 CTLA4 分子相似,但是不相同的序列,但是仍然结合 B7。所述突变可以包括将一个或多个
20 氨基酸残基用具有保守(例如,亮氨酸代替异亮氨酸)或者非保守(例如,色氨酸代替甘氨酸)结构或者化学特性的氨基酸、氨基酸缺失、加入、移码或者截断代替。

CTLA4 突变分子可以在其中包括非-CTLA4 分子或者附着非-CTLA4 分子,即,CTLA4 突变融合蛋白。所述突变分子可以是可溶的(即,循环的)或者它们可以结合到细胞表面(膜结合)。CTLA4 突变分子包括
25 L104EA29YIg 和美国专利序号 09/865,321、60/214,065 和 60/287,576; WO 01/92337 A2; 美国专利号 6,090,914、5,844,095 和 5,773,253; 和 R. J. Peach 等人 1994, J Exp Med, 180: 2049-2058 中描述的那些分子。可以合成或者重组产生 CTLA4 突变分子。

30 CTLA4Ig 是可溶性融合蛋白,其含有野生型 CTLA4 的胞外结构域,或其结合 B7 的部分,所述胞外结构域或者其部分与免疫球蛋白(Ig)分子,或者其部分结合。CTLA4 的胞外结构域或者其部分结合到 Ig 部分,

其含有免疫球蛋白全部或者一部分，优选免疫球蛋白恒定区的全部或者一部分，如 IgC γ 1 (IgCgamma1)、IgC γ 2 (IgCgamma2)、IgC γ 3 (IgCgamma3)、IgC γ 4 (IgCgamma4)、IgC μ (IgCmu)、IgC α 1 (IgCalpha1)、IgC α 2 (IgCalpha2)、IgC δ (IgCdelta) 或 IgC ϵ (IgCepsilon) 的所有或者一部分，使得该融合蛋白可溶。Ig 部分可以包括前述恒定区或者其他恒定区的铰链、CH2 和 CH3 结构域、或者 CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域。优选地，Ig 部分来源于人或者猴，并且包括铰链、CH2 和 CH3 结构域。最优选地，Ig 部分含有人 IgC γ 1 的铰链、CH2 和 CH3 结构域，或者由人 IgC γ 1 的铰链、CH2 和 CH3 结构域组成。

10 在 CTLA4Ig 的 Ig 部分中，可以突变 Ig 恒定区或者其部分，从而导致减小其效应物功能(见，例如，美国专利号 5,637,481、5,844,095 和 5,434,131)。本文中所用的术语 IgG 部分、Ig 恒定区、IgC(恒定)结构域、IgC γ 1 (IgCgamma1)、IgC γ 2 (IgCgamma2)、IgC γ 3 (IgCgamma3)、IgC γ 4 (IgCgamma4)、IgC μ (IgCmu)、IgC α 1 (IgCalpha1)、IgC α 2 (IgCalpha2)、IgC δ (IgCdelta) 或 IgC ϵ (IgCepsilon) 包括天然序列和已经突变的序列，如在恒定区中具有突变的序列，其减小效应物功能。

与 CTLA4 有关的特定实施方案包括在 +1 位甲硫氨酸开始并且在 +124 位天冬氨酸结束，或者在 -1 位丙氨酸开始到 +124 位天冬氨酸的野生型 CTLA4 的胞外结构域；+125 位的连接氨基酸残基谷氨酰胺；和免疫球蛋白部分，其包括 +126 位谷氨酸到 +357 位赖氨酸，如图 8 中所示。根据布达佩斯条约的条款，编码该 CTLA4Ig 的 DNA 在 1991 年 5 月 31 日保藏在美国典型培养物保藏中心 (ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209，并且已经给予 ATCC 25 保藏号 ATCC 68629；P. Linsley 等人，1994, *Immunity* 1: 793-80。表达 CTLA4Ig 的 CHO 细胞系于 1991 年 5 月 31 日保藏在 ATCC，保藏号为 CRL-10762。根据本文中描述的方法产生的可溶性 CTLA4Ig 分子可以或不必包括信号(前导)肽序列。图 8 和 9 包括对信号(前导)肽序列的说明。通常，分子不包括信号肽序列。

30 L104EA29YIg 是融合蛋白，其是可溶性 CTLA4 突变分子，该分子含有野生型 CTLA4 的胞外结构域，其具有氨基酸改变 A29Y(酪氨酸氨基酸残基置换 29 位的丙氨酸)和 L104E(谷氨酸氨基酸残基置换 +104

位亮氨酸), 该胞外结构域连接到 IgG 尾。备选地, L104EA29YIg 的氨基酸序列含有 +1 位氨基酸位置的甲硫氨酸到 +357 氨基酸位置的赖氨酸, 如图 9 中所示。L104EA29YIg 含有 +125 位的连接氨基酸残基谷氨酰胺和 Ig 部分, 其包括 +126 位谷氨酸到 +357 位赖氨酸。根据布达佩斯条约的条款, 编码 L104EA29YIg 的 DNA 在 2000 年 6 月 20 日保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC), 并且已经给予 ATCC 保藏号 PTA-2104。L104EA29YIg 在共同待决美国专利申请序号 09/579,927、60/287,576 和 60/214,065 和 WO/01/923337 A2 中描述, 将所述专利完整并入本文作为参考。通过本发明的培养方法产生的可溶性 L104EA29YIg 分子可以或者不必包括信号(前导)肽序列。通常, 根据本发明产生的分子不包括信号肽序列。

如本文中所述的, 术语可溶的指不结合或者附着细胞的任何分子, 或者其片段, 即循环的。例如, 通过将 Ig 部分分别附着到 CTLA4、B7 或者 CD28 的胞外结构域, 可以使 CTLA4、B7 或者 CD28 可溶。备选地, 诸如 CTLA4 的分子可以通过除去其跨膜结构域使该分子可溶。通常, 根据本发明产生的可溶分子不包括信号(或者前导)序列。

可溶性 CTLA4 分子指非细胞表面结合(即, 循环)的分子, 其含有野生型 CTLA4, 或者结合 B7 的任何部分或者衍生物, 包括, 但不限于, 可溶性 CTLA4 融合蛋白; 可溶性 CTLA4 融合蛋白, 如 CTLA4Ig 融合蛋白(例如, ATCC 68629), 其中 CTLA4 的胞外结构域融合到 Ig 部分, Ig 部分是 Ig 分子的全部或者一部分, 优选 Ig 恒定区的全部或一部分, 如 IgC γ 1(IgCgamma1)、IgC γ 2(IgCgamma2)、IgC γ 3(IgCgamma3)、IgC γ 4(IgCgamma4)、IgC μ (IgCmu)、IgC α 1(IgCalpha1)、IgC α 2(IgCalpha2)、IgC δ (IgCdelta)或 IgC ϵ (IgCepsilon)的全部或者一部分, 使得该融合分子可溶; 可溶性 CTLA4 融合蛋白, 其中胞外结构域融合到或者结合生物活性或者化学活性蛋白质的一部分, 所述蛋白质为诸如乳头瘤病毒 E7 基因产物(CTLA4-E7)、黑素瘤相关抗原 p97(CTLA4-p97) 或者 HIV env 蛋白质(CTLA4-env gp120), 如美国专利号 5,844,095 中所描述的, 这里将该专利完整并入作为参考; 如美国专利号 5,434,131 所描述的, 杂交(嵌合)融合蛋白如 CD28/CTLA4Ig, 跨膜结构域被除去而使得该蛋白质可溶的 CTLA4 分子(见, 例如, M. K. Oaks 等人, 2000, Cellular Immunology, 201:

144-153, 这里将其完整并入作为参考); 可溶性 CTLA4 突变分子 L104EA29YIg。

可溶性 CTLA4 分子也可以是可溶性 CTLA4 突变分子。根据本发明产生的可溶性 CTLA4 分子可以包括或不包括信号(前导)肽序列。信号肽序列可以是允许该分子分泌的任何序列, 包括来自制癌蛋白 M 的信号肽(Malik 等人, 1989, Molec. Cell. Biol., 9: 2847-2853), 或者 CD5(N. H. Jones 等人, 1986, Nature, 323: 346-349)的信号肽, 或者来自任何胞外蛋白质的信号肽。通过本发明的培养方法产生的可溶性 CTLA4 分子可以包括制癌蛋白 M 信号肽, 其连接在 CTLA4 的胞外结构域的 N-末端。通常, 在本发明中, 该分子不包括信号肽序列。

本文中所用的 CTLA4 融合蛋白指含有野生型 CTLA4 的胞外结构域, 或者其结合 B7 的部分的分子, 所述胞外结构域或者其部分与使得 CTLA4 分子可溶的非 CTLA4 部分, 如 Ig 部分融合。例如, CTLA4 融合蛋白可以包括与 Ig 恒定区的所有或者部分融合的 CTLA4 的胞外结构域。可与 CTLA4 融合的 Ig 恒定结构域(或者其部分)的实例包括所有, 但不限于上文中所列出的那些 Ig 恒定结构域。CTLA4 融合蛋白还可以是 CTLA4 突变分子。

本文中所用的“非 CTLA4 部分”指不结合 CD80 和/或 CD86 并且不干扰 CTLA4 与其配体结合的分子或者其部分。实例包括但不限于, Ig 部分, 其为 Ig 分子的全部或部分; 生物活性或者化学活性蛋白质的一部分, 所述蛋白质为诸如乳头瘤病毒 E7 基因产物(CTLA4-E7)、黑素瘤相关抗原 p97(CTLA4-p97) 或者 HIV env 蛋白质(CTLA4-env gp120)(如美国专利号 5,844,095 中所描述的, 这里将该专利完整并入作为参考)。Ig 部分的实例包括免疫球蛋白恒定区的全部或部分, 如 IgC γ 1(IgCgamma1)、IgC γ 2(IgCgamma2)、IgC γ 3(IgCgamma3)、IgC γ 4(IgCgamma4)、IgC μ (IgCmu)、IgC α 1(IgCalpha1)、IgC α 2(IgCalpha2)、IgC δ (IgCdelta)或 IgC ϵ (IgCepsilon)。Ig 部分可以包括前述恒定区或者其他恒定区的铰链、CH2 和 CH3 结构域、或者 CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域。优选地, Ig 部分来源于人或者猴, 并且包括铰链、CH2 和 CH3 结构域。最优选地, Ig 部分包括人 IgC γ 1 的铰链、CH2 和 CH3 结构域, 或者为人 IgC γ 1 的铰链、CH2 和 CH3 结构域。在 CTLA4Ig 的 Ig 部分中, 在 Ig 部分中, 可以突变 Ig 恒定区或者

其部分，从而导致减小其效应物功能(见，例如，美国专利号 5,637,481、5,844,095 和 5,434,131)。

CTLA4 的胞外结构域指识别并结合 B7 的野生型 CTLA4 的任何部分。例如，CTLA4 的胞外结构域含有 +1 位甲硫氨酸到 +124 位天冬氨酸(图 10)。例如，CTLA4 的胞外结构域含有 -1 位丙氨酸到 +124 位天冬氨酸(图 10)。

本文中所用术语突变指野生型分子中核苷酸或者氨基酸序列中的改变，例如，野生型 CTLA4 胞外结构域的 DNA 和/或氨基酸序列中的改变。DNA 中突变可以改变密码子，导致所编码的氨基酸序列中的改变。DNA 改变可以包括置换、缺失、插入、备选剪接，或者截断，或者蛋白质的加工或者切割错误。备选地，核苷酸序列中的突变可以导致氨基酸序列中沉默突变，如本领域中熟知的。还如所理解的，某些核苷酸密码子编码相同的氨基酸。实例包括核苷酸密码子 CGU、CGG、CGC、和 CGA，它们编码氨基酸精氨酸(R)；或者密码子 GAU 和 GAC，它们编码氨基酸天冬氨酸(D)。

从而，可以由一种或多种核酸分子编码一种蛋白质，这些核酸分子在它们的特定核苷酸序列中不同，但是仍然编码具有相同序列的蛋白质分子。突变分子可以具有一个，或者一个以上的突变。为了指导，氨基酸编码序列如下：

氨基酸	符号	单字母符号	密码子
丙氨酸	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
半胱氨酸	Cys	C	UGU, UGC
天冬氨酸	Asp	D	GAU, GAC
谷氨酸	Glu	E	GAA, GAG
苯丙氨酸	Phe	F	UUU, UUC
甘氨酸	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
组氨酸	His	H	CAU, CAC
异亮氨酸	Ile	I	AUU, AUC, AUA
赖氨酸	Lys	K	AAA, AAG
亮氨酸	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
甲硫氨酸	Met	M	AUG

天冬酰胺	Asn	N	AAU, AAC
脯氨酸	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
谷氨酰胺	Gln	Q	CAA, CAG
精氨酸	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
丝氨酸	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
苏氨酸	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
缬氨酸	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
色氨酸	Trp	W	UGG
酪氨酸	Tyr	Y	UAU, UAC

本文中所述的片段或部分为分子的任何部分或节段。对于 CTLA4 或者 CD28，片段或部分优选为 CTLA4 或者 CD28 的胞外结构域，或者其部分，其识别并结合 B7 或者干扰 B7，从而阻断其对 CD28 和/或 CTLA4 的结合。而且，如本文中所述的，“相应”指具有序列同一性。

本文中所述的 B7 指分子的 B7 家族的任何成员，包括，但不限于，B7-1 (CD80) (Freeman 等人，1989, J Immunol., 143: 2714-2722, 将其完整并入本文作为参考)、B7-2 (CD86) (Freeman 等人，1993, Science, 262: 909-911, 将其完整并入本文作为参考; Azuma 等人，1993, Nature, 366: 76-79, 将其完整并入本文作为参考)，其识别并结合 CTLA4 和/或 CD28。CD28 指识别并结合 B7 的分子，如美国序号 5,580, 756 和 5,521, 288 (将其完整并入本文作为参考) 所描述。本文中所述的 B7 阳性细胞包括在细胞表面表达一种或多种类型的 B7 分子的任何细胞。

本文中所述的“衍生物”为与其亲代分子具有序列相似性并且具有亲代分子的活性的分子。例如，CTLA4 的衍生物包括与野生型 CTLA4 的胞外结构域具有至少 70% 相似的氨基酸序列并且识别并结合 B7 的可溶性 CTLA4 分子，例如 CTLA4Ig 或者可溶性 CTLA4 突变分子 L104EA29YIg。衍生物指氨基酸序列和/或氨基酸的化学质量的任何改变，例如氨基酸类似物。

本文中所述的，调节免疫应答指激活、刺激、上调、抑制、阻断、减小、减弱、下调或者修饰免疫应答。多种疾病，例如，自身免疫疾病，可以通过调节免疫应答，例如，通过调节功能 CTLA4-和/或 CD28-

阳性细胞与 B7 阳性细胞的相互作用得到治疗。例如，调节免疫应答的方法包括将 B7 阳性细胞与可溶 CTLA4 分子，如根据本发明产生的那些分子接触，以形成可溶性 CTLA4/B7 复合体，其中可溶性 CTLA4 分子干扰内源 CTLA4 和/或 CD28 分子与 B7 分子的反应。“阻断”或“抑制”如本文中所称作的受体、信号或分子指干扰受体、信号或分子的活化，这可通过本领域中公知的试验检测。阻断或者抑制可以是部分或全部的。

本文中所用的，“阻断 B7 相互作用”指干扰 B7 与其配体，如 CD28 和/或 CTLA4 的结合，从而阻碍 T 细胞和 B7 阳性细胞相互作用。阻断 B7 相互作用的试剂的实例包括，但不限于，分子，如识别并结合 CTLA4、CD28 或 B7 分子(例如，B7-1、B7-2)任一种的抗体(或者其部分)；分子的可溶形式(或者其部分)，如可溶 CTLA4；设计通过 CTLA4/CD28/B7 介导的相互作用干扰细胞信号的肽片段或者其他小分子。在优选实施方案中，阻断剂为可溶性 CTLA4 分子，如 CTLA4Ig (ATCC 68629) 或 L104EA29YIg (ATCC PTA-2104)；可溶性 CD28 分子，如 CD28Ig (ATCC 68628)；可溶性 B7 分子，如 B7-Ig (ATCC 68627)；抗-B7 单克隆抗体(例如，ATCC HB-253、ATCC CRL-2223、ATCC CRL-2226、ATCC HB-301、ATCC HB-11341 和如美国专利号 6,113,898 或者 Yokochi 等人，1982, *J. Immunol.*, 128 (2): 823-827 中描述的单克隆抗体)；抗-CTLA4 单克隆抗体(例如，ATCC HB-304，和如在参考文献 82-83 中描述的单克隆抗体)；和/或抗-CD28 单克隆抗体(例如，ATCC HB11944 和 MAb 9.3，如在 Hansen 等人，1980, *Immunogenetics*, 10: 247-260，或 Martin 等人，1984, *J. Clin. Immunol.*, 4(1) : 18-22 中描述的)。通过本领域中公知的试验，如确定与免疫疾病(例如，风湿性疾病)相关的症状的减轻，通过确定 T 细胞/B7 细胞相互作用的减小，或者通过确定 B7 与 CTLA4/CD28 的相互作用的减小可以检测阻断 B7 相互作用。阻断可以是部分或全部的。

还如本文中所用的，分子的有效量指阻断该分子与其配体相互作用的有效量。例如，阻断 B7 与 CTLA4 和/或 CD28 相互作用的分子的有效量为当结合 B7-阳性细胞上 B7 分子时，抑制 B7 分子结合内源配体，如 CTLA4 和 CD28 的分子的有效量。备选地，阻断 B7 与 CTLA4 和/或 CD28 相互作用的分子的有效量为当结合 T 细胞上 CTLA4 和/或 CD28 分子

时，抑制 B7 分子结合内源配体，如 CTLA4 和 CD28 的分子的有效量。抑制或阻断可以是部分或全部的。

对于临床方案，优选融合蛋白，如 CTLA4Ig 或突变 CTLA4Ig 的 Ig 部分不在受试者中引起有害免疫应答。优选的部分是 Ig 恒定区域(包括人或者非人灵长类 Ig 恒定区)的所有或部分。适宜的区域的实例包括 IgC γ 1 (IgCgamma1)、IgC γ 2 (IgCgamma2)、IgC γ 3 (IgCgamma3)、IgC γ 4 (IgCgamma4)、IgC μ (IgCmu)、IgC α 1 (IgCalpha1)、IgC α 2 (IgCalpha2)、IgC δ (IgCdelta) 或 IgC ϵ (IgCepsilon)，包括铰链、CH2 和 CH3 结构域、或者 CH1、铰链、CH2 和 CH3 结构域，它们与效应物功能，如结合 Fc 受体、依赖补体的细胞毒性 (CDC)，或者依赖抗体的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 有关。Ig 部分中可以有一个或多个突变(例如，在 CH2 结构域中以减小效应物功能，如 CDC 或 ADCC)，其中所述突变通过增加或减小 Ig 结合 Fc 受体的能力调节 Ig 结合其受体的能力。例如，Ig 部分中的突变可以包括铰链结构域内任何或所有其半胱氨酸残基中的改变。例如，如图 8 中所示，在 +130、+136、和 +139 位中的半胱氨酸残基用丝氨酸置换。Ig 部分还包括 +148 位脯氨酸用丝氨酸置换，如图 8 中所示。此外，Ig 部分中的突变可以包括 +144 位亮氨酸用苯丙氨酸置换；+145 位亮氨酸用谷氨酸置换，或者 +147 位甘氨酸用丙氨酸置换。

20 实施例

下面的实施例陈述本发明的具体方面以阐明本发明并为本领域技术人员提供本发明方法的描述。不应将这些实施例理解为限制本发明，因为这些实施例仅提供具体方法学和例证，它们用于理解和实施本发明及其多个方面。

25 下面陈述的实施例 1 和 2 描述了涉及包括使用半乳糖喂饲联合多次温度转换的细胞培养方法的实验。实施例 3-6 描述了涉及包括培养运行期间多次温度转换的细胞培养方法的实验。实施例 7-13 描述涉及包括延迟加入聚阴离子化合物联合半乳糖喂饲和多次温度转换的细胞培养方法的实验。

30 实施例 1

该实施例通常描述了本发明的 D-半乳糖连续喂饲培养方法，其用于培养重组细胞，所述重组细胞产生如本文实施例 2 中描述的代表性

CTLA4Ig 融合蛋白。

细胞在含有谷氨酰胺、碳酸氢钠、胰岛素和氨甲蝶呤(表1)的改良 CD-CHO 培养基 (Invitrogen, CA) 中扩增, 使用 T-75 烧瓶, 250、500 和 1000-mL 旋转器。T-烧瓶和旋转器在 37℃ 下和 6%CO₂ 中孵育。

5 表 1

改良 CD-CHO 培养基组分	浓度
CD-CHO 25 × 酸 I (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
CD-CHO 25 × 酸 II (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
CD-CHO 25 × 盐 I (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
CD-CHO 25 × 盐 II (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
L-谷氨酰胺 (Invitrogen)	0.585 g/L
r-人胰岛素 (10 mg/mL) (Invitrogen)	0.1 ml/L
氨甲蝶呤 (20 mM 溶液) (ICN, Costa Mesa CA)	5 μl/L
碳酸氢钠 (Mallenkrodt Bake, Phillipsburg, NJ)	2.22 g/L

产生足够接种物后, 将培养物转移到 5 或 50 L 生物反应器, 其分别具有相同培养基的 3 或 30L 工作体积。最初接种密度为 200,000 活细胞/mL。5L 容器为玻璃反应器, 其装备一个海洋搅拌器 (Applikon, Foster City, CA), 50L 容器为不锈钢反应器 (Feldmeier, Syracuse, NY), 其装备两个海洋搅拌器。整个运行期间用数据获取系统, 其使用 Intellution Fix32 记录温度、pH 和 DO。通过转子流速计控制气流。

气体通过沉水 frit (5 μm 孔大小) 喷入反应器, 反应器头部空间用于 CO_2 去除。分子氧通过相同的 frit 喷射用于 DO 控制。 CO_2 通过相同 frit 喷射用于高压侧 pH 控制。低侧 pH 控制通过加入 1N NaOH 实现。

用含有葡萄糖、谷氨酰胺、胰岛素、TC Yeastolate (Becton Dickinson) 和 D-半乳糖的改良 eRDF 培养基 (Invitrogen, CA) (表 2) 以下面的方式对生物反应器中的培养物给予每天大丸 (bolus) 喂饲: 从接种后第一天开始, 加入最小 1% 培养物体积作为送料培养基; 如果葡萄糖水平降到 3g/L 以下, 加入经计算的体积使葡萄糖水平回到 3 g/L。发酵过程持续 14-21 天。每天从反应器取出样品。将用于细胞计数的样品用锥虫蓝 (Sigma, MO) 染色。通过血细胞计数器/显微镜进行细胞计数和细胞生存力测定。为了分析代谢物, 将额外的样品以 2000 转/分钟 (4 $^{\circ}\text{C}$) 离心 20 分钟以分离细胞。用上清液分析下面的参数: 滴定度、唾液酸、葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、谷氨酸、pH、 PO_2 、 CO_2 、氨, 和 LDH。

15

表 2

改良的 eRDF 培养基组分	浓度
eRDF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)	16.8 g/L
右旋糖 (VWR-Mallenkrodt Baker)	30.94 g/L
L-谷氨酰胺 (Invitrogen)	4.1 g/L
r-人胰岛素 (10 mg/mL) (Invitrogen)	1 ml/L
TC Yeastolate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)	5 g/L
D-半乳糖 (Ferro-Pfanstiehl, Waukegan, IL)	0、3.0、12.5、或 20.0 g/L

使用不锈钢反应器 (Feldmeier, NY) 在具有 4500 L 工作体积的 5000 L 反应器规模下进行大规模细胞培养, 所述反应器装配 3:1 方位定量的三个搅拌器。接种物培养从旋转器扩大到种子反应器, 5000L

规模下最初接种密度为 150-200,000 个活细胞/mL。涉及大规模培养和过程公知的实验方法与关于 5L 和 50L 方法描述的那些方法相同。

实施例 2

该实施例描述产生如图 3 中所示-1 到 357 或+1 到 357 的 CTLA4Ig(编码 DNA 保藏为 ATCC 68629)的细胞的培养,使用几组实验培养条件进行涉及蛋白质产物的终末滴定度和终末唾液酸参数的比较。从细胞培养方法得到这些结果,所述细胞培养方法包括两步温度转换方法和每天喂食方案,其中送料培养基中存在唾液酸持续有效量的 D-半乳糖。观察到提高的蛋白质质量增强。

如下控制 5、50 和 5000L 生物反应器中的培养条件: pH 7.0, 溶解氧 40-60%, 搅拌为 30-50 转/分钟, 反压为 5 psi(对于 5-L 玻璃反应器为环境压)。使用两次温度转换细胞培养方法,其包括第一种温度为 37℃, 其在第 6 天降低到第二种温度 34℃, 在第 10 天降低到第三种温度 32℃。

实验设置描述

实验设置 I: 5-L 培养物, 使用不含有 D-半乳糖的送料培养基;

实验设置 II: 5-L 培养物, 使用含有 12.5 g/L D-半乳糖的送料培养基;

实验设置 III: 50-L 培养物, 使用不含有 D-半乳糖的送料培养基;

实验设置 IV: 50-L 培养物, 使用含有 3.0 g/L D-半乳糖的送料培养基; (在实验设置 IV 中, 在第 10 天停止 D-半乳糖, 然后从第 11 天到第 16 天使用常规送料培养基(无 D-半乳糖));

实验设置 V: 50-L 培养物, 使用含有 12.5 g/L D-半乳糖的送料培养基;

实验设置 VI: 50-L 培养物, 使用含有 20.0 g/L D-半乳糖的送料培养基;

实验设置 VII: 5000-L 培养物, 使用不含有 D-半乳糖的送料培养基;

实验设置 VIII: 5000-L 培养物, 使用含有 12.5 g/L D-半乳糖的送料培养基;

如从表 3 中结果所观察的, 与送料中不含有 D-半乳糖的对照相比, 在送料培养基中使用 12.5 g/L D-半乳糖显著增加了 5、50 和 5000L

规模下唾液酸含量。此外，在 50L 规模下加入 3 g/L D-半乳糖但是在第 10 天停止，对唾液酸化程度暂时具有阳性影响(实验设置 IV; 表 3; 和图 1)，但是唾液酸水平在第 10 天后很快降低。在 50-L 规模下送料培养基含有更高浓度 D-半乳糖 (12.5 g/L) 增加了唾液酸化程度(实验设置 V; 表 3; 和图 1)。该发现支持培养基中更高的 D-半乳糖喂饲浓度和使用包含 D-半乳糖的送料培养基的每天喂饲方案。

表3

实施例#	反应器规模[L]	喂食策略	SA (NANA) [与总蛋白质的摩尔比]	半乳糖 [与总蛋白质的摩尔比]	滴定度 [g/L]
I	5	送料培养基中无D-半乳糖	7.5 (第12天)	8.8 (第12天)	1.8 (第14天)
II	5	送料培养基中12.5 g/L D-半乳糖	9.1 (第12天)	15.9 (第12天)	1.9 (第14天)
III	50	送料培养基中无D-半乳糖	6.1 (第13天)	9.2 (第13天)	1.4 (第13天)
			5.0 (第16天)	8.1 (第16天)	2.0 (第16天)
IV	50	送料培养基中3.0 g/L D-半乳糖; 在第10天停止D-半乳糖喂食	7.8 (第13天)	n/a	1.2 (第13天)
			5.5 (第16天)	n/a	1.9 (第16天)
V	50	送料培养基中12.5 g/L D-半乳糖	9.4 (第14天)	13.3 (第14天)	1.4 (第14天)
			8.2 (第20天)	14.4 (第20天)	2.4 (第20天)
VI	50	送料培养基中20.0g/L D-半乳糖	8.4 (第14天)	14.5 (第14天)	1.4 (第14天)
			6.2 (第21天)	11.2 (第21天)	2.7 (第21天)
VII	5000	送料培养基中无D-半乳糖	5.3 (第12天)	9.1 (第12天)	0.85 (第12天)
VIII	5000	送料培养基中12.5g/L D-半乳糖	9.7 (第14天)	11.5 (第14天)	0.80 (第14天)

根据这些实验,加入 D-半乳糖不显著影响细胞特定生产率(即,滴定度增加)(图 2)。送料中 D-半乳糖浓度进一步增加,即增加到 20.0g/L 没有进一步的有益效果(实验设置 VI;表 3;图 1)。图 3 显示了送料中 12.5 g/L D-半乳糖浓度下培养物中残留 D-半乳糖浓度,发现其在 50L 和 5000 L 规模下是最优的。在生产期期间,当滴定度增加时(即,第 6-21 天),培养物中残留 D-半乳糖浓度需要保持在 ≥ 0.25 g/L。图 4 阐明细胞培养方法放大到 5000L 以生产 CTLA4Ig 期间观察到规模效应。随着反应器规模的增加糖蛋白的唾液酸化下降。图 5 显示了向送料培养基加入 12.5 g/L D-半乳糖后规模效应的逆转。每天 D-半乳糖 10 喂饲技术允许在大规模,例如 ≥ 50 L,例如,5000L 生产反应器中产生大量高度唾液酸化 CTLA4Ig。

实施例 3

该实施例特别涉及如本文中实施例 4-6 中描述的温度转换细胞培养方法并提供了用于温度转换方法的材料和试剂,所述温度转换方法 15 用于培养产生 CTLA4Ig 融合蛋白的重组细胞。

1. 细胞培养基

用于细胞接种物生产的所有期和培养物的生物反应器生产,包括 5 升(5L)和 50 升(50L)生产反应器中的基础细胞培养基为改良 CD-CHO 培养基,其含有谷氨酰胺、碳酸氢钠、胰岛素和氨甲蝶呤(Invitrogen, 20 Carlsbad, CA;见表 1)。用 1N HCl 将培养基的 pH 调节到 7.0。

对于补料-分批方法中的喂饲细胞,使用改良送料培养基,即, eRDF-1 培养基(Invitrogen),其含有葡萄糖、谷氨酰胺、胰岛素和 TCYeastolate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)(表 2)。对于这些实验,送料培养基中不存在半乳糖。加入所有组分后用 1N 25 NaOH 调节送料培养基的 pH 到 7.0。

2. 生物反应器中的生产期

生产生物反应器最初以分批反应器运行,密切监视并控制温度、压力、pH 和溶解氧浓度。通过测量活细胞密度和几种关键代谢物的浓度评估培养物状况。接种后一天启动送料方法。剩下的发酵以补料-分批 30 批方式进行。

使用 5L 规模生物反应器(具有一个搅拌器的玻璃反应器)和 50L 规模生物反应器(具有两个搅拌器的不锈钢反应器)(见实施例 4)。数据获

取系统(Intellution Fix 32)在整个运行期间记录温度、pH和溶解氧(DO)。通过转子流速计控制气流。气体通过沉水 frit(5 μm 孔大小)喷入反应器,反应器头部空间用于 CO₂ 去除。分子氧通过相同的 frit 喷射用于 DO 控制。CO₂ 通过相同 frit 喷射用于 pH 控制。

5 3. 喂饲策略

接种后 24 小时,如果葡萄糖浓度 ≥ 3.0 g/L,加入最小 1%培养物体积的改良 eRDF-I 送料培养基。如果葡萄糖浓度低于 3g/L,每天加入经计算的大丸送料体积使葡萄糖浓度回到 3 g/L。在分批表格上记录每天送料量。

10 4. 取样

每天从反应器取出细胞样品。将用于细胞计数的样品用锥虫蓝(Sigma, St. Louis, MO)染色。通过血细胞计数法使用显微镜进行细胞计数和细胞生存力测量。为了分析代谢物,将额外的样品以 2000 转/分钟(4℃)离心 20 分钟以分离细胞。用上清液分析下面的参数:滴度、唾液酸、葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、谷氨酸、pH、pO₂、pCO₂、氨,和任选地,乳酸脱氢酶(LDH)。额外的备份样品在-20℃冷冻。

15 实施例 4

该实施例描述从培养的 CHO 细胞生产 CTLA4Ig,其如图 8 中-1 到 357 或+1 到 357 所示(编码 DNA 保藏为 ATCC 68629)。该实施例还描述产生高质量和高数量的 CTLA4Ig 蛋白质的本发明方法,该方法包括具有两步或三步温度转换的培养运行和 14、21 或 28-30 天的总运行时间。从 37℃到 34℃的温度转换(T-转换)发生在第 6 天(对数生长期末),从 34℃到 32℃的第二次 T-转换发生在第 10 天。该运行在第 14、21、或 28 天结束,对于两步转换,温度控制在第 10 天转换时的 32℃直到运行结束。对于三步转换,温度从转换那天控制在 30℃直到运行结束。与一次温度转换或者无温度转换的运行相比,所描述的方法导致蛋白质产物的增加的终末滴度,增加的终末细胞生存力,和容积生产力。根据本发明,第二次和第三次 T 转换将标准发酵(培养)方法的运行时间延长到 2 到 3 周(或更长),而保持高细胞生存力。在整个生产期间观察到产物滴度接近线性增加。

用于 CTLA4Ig 表达的 CHO 细胞在含有谷氨酰胺、碳酸氢钠、胰岛素,和氨甲蝶呤的改良 CD-CHO 培养基中扩大(见实施例 3),使用 T-75

烧瓶(Corning, Corning, NY)和 250 和 500 mL 旋转器(Bellco, Vineland, NJ)。T-烧瓶和旋转器在 37℃ 6%CO₂ 中孵育。产生足够接种物后, 将培养物转移到 5 L (Applikon, Foster City, CA) 或 50 L 生物反应器(Feldmeier, Syracuse, NY), 它们分别含有上述培养基的 3L 或 30L 工作体积。最初接种密度为约 2×10^5 个活细胞/mL。

5L 容器为装备一个搅拌器(Applikon, Foster City, CA)的玻璃反应器; 50L 反应器为装备两个搅拌器的不锈钢反应器(Feldmeier, Syracuse, NY)。整个运行期间用数据获取系统, 其使用 Intellution Fix32 (Intellution, Foxboro, MA) 记录温度、pH 和溶解氧(DO)。通过转子流速计(Cole Parmer, Vernon Hills, IL)控制气流。气体通过沉水 frit (5 μm 孔大小) 喷入反应器, 反应器头部空间用于 CO₂ 去除。分子氧通过相同的 frit 喷射用于 DO 控制。CO₂ 通过相同 frit 喷射用于高压侧 pH 控制。低压侧 pH 控制通过加入 1N NaOH 实现。不受限制, pH 的可接受范围为 6-9, 优选 6.8-7.2, 摩尔渗透压浓度为 200-500 mOsm, 优选 280-340 mOsm。

使用如实施例 3 中描述的含有葡萄糖、谷氨酰胺、胰岛素和 TCYeastolate (Becton Dickinson) 的改良 eRDF 培养基 (Invitrogen, CA) 如下对生物反应器中的培养物给予每天大丸喂饲: 从接种后第一天开始, 加入最小 1% 培养物体积; 或者如果葡萄糖水平降到 3g/L 以下, 加入经计算的体积使葡萄糖水平回到 3 g/L。

发酵过程在 5L 规模时持续时间为 21 天, 在 50L 规模时为 28 天。在 50L 规模下培养运行的更长持续时间与该运行所加的温度转换相关。每天从反应器采集样品用于分析。例如, 用于细胞计数的样品用锥虫蓝 (Sigma, St. Louis, MO) 染色。通过血细胞计数器进行细胞计数和细胞生存力测定, 并在显微镜下计数活的染色细胞。为了分析代谢物, 将额外的样品等分试样以 2000 转/分钟 (4℃) 离心 20 分钟以沉淀细胞。使用本领域中惯用的技术和方案, 用上清液分析蛋白质滴定度、唾液酸、葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、谷氨酸、pH、pO₂、pCO₂、氨, 和 LDH。

30 实施例 5

该实施例描述并给出评估按照本发明的方法实施的多种温度转换培养方法(包括多步培养方法)的比较性评价。如蛋白质的终末滴定唾

液酸含量一样测定糖蛋白产物的终末滴定度、运行结束时细胞生存力(终末细胞生存力)和运行结束时细胞密度(存活终末细胞密度)。

实验 I-A、I-B 和 I-C ; II-A, II-B 和 II-C ; 和 III-A, III-B 和 III-C 指在不同时间评估的具有相同温度转换的相同细胞培养运行, 即对于 I-A, II-A 和 III-A, 在第 14 天后评估产物和细胞参数, 对于 II-A, II-B 和 II-C 在 21 天后评估, 对于 III-A, III-B 和 III-C 在 28 天后评估。这些实验在 5L 反应器中进行, 其中如下控制培养条件: pH 为 7.0; 溶解氧为 40%; 搅拌为 60 转/分钟; 最初温度为 37℃。根据本发明的方法从补料-分批细胞培养发酵得到数据。

10 如下设计实验 I、II 和 III:

实验 I: 从第 0 天到第 21 天, 细胞培养温度控制在 37℃ (无温度转换)。

实验 II: 从第 0 天到第 6 天, 细胞培养温度控制在 37℃; 从第 6 天到第 21 天细胞培养温度控制在 34℃ (一次温度转换)。

15 实验 III: 从第 0 天到第 6 天, 细胞培养温度控制在 37℃; 从第 6 天到第 10 天细胞培养温度控制在 34℃; 从第 10 天到第 21 天细胞培养温度控制在 32℃ (本发明的两步温度转换方法)。

实验 IV-A 和 V-A 显示使用最初(标准)生产期, 14 天的培养运行后评估的产物滴定度、终末细胞生存力和存活终末细胞密度的结果。

20 实验 IV-B 和 V-B 显示了使用延长的生产期, 21 天的培养运行后评估的这些结果; 实验 IV-C 和 V-C 显示使用第二次延长的生产期, 28 天的培养运行后评估的结果。实验 IV 和 V 在 50L 生物反应器中进行, 其中如下控制培养条件: pH 为 7.0; 溶解氧为 40%; 搅拌为 30 转/分钟; 最初温度为 37℃。

25 如下设计实验 IV 和 V:

实验 IV: 从第 0 天到第 6 天, 细胞培养温度控制在 37℃; 从第 6 天到第 10 天细胞培养温度控制在 34℃; 从第 10 天到第 28 天细胞培养温度控制在 32℃ (本发明的两步温度转换方法)。

30 实验 V: 从第 0 天到第 6 天, 细胞培养温度控制在 37℃; 从第 6 天到第 10 天细胞培养温度控制在 34℃; 从第 10 天到第 14 天细胞培养温度控制在 32℃; 从第 14 天到第 28 天细胞培养温度控制在 30℃ (本发明的三步温度转换方法)。实验 V-A、V-B 和 V-C 指在不同时间评估的

具有相同温度转换的相同细胞培养运行，即，对于 V-A，在第 14 天后评估产物和细胞参数，对于 V-B 在 21 天后评估，对于 V-C 在 28 天后评估。

5 实验 I-V 代表如上描述的 5 种不同的培养运行。如所描述的，将 14 天的运行称作“A”，将 21 天的运行称作“B”，而将 28 天的运行称作“C”。

表 4 给出了实验结果，表明在 5L 反应器规模下不同温度转换对培养物中细胞生产 CTLA4Ig 的影响。

表4

实验 #	反应器规模 (L)	温度转换	终末滴定度 (g/L)	终末滴定度 (%) (Exp. I-A设置为100%)	终末SA (NANA*) (摩尔比)	终末滴定度 *终末SA (NANA)	终末细胞生存力 (%)	存活终末细胞密度 ($\times 10^6$ 个细胞/mL)
------	-----------	------	-------------	-----------------------------	--------------------	--------------------	-------------	----------------------------------

使用最初(标准)生产期, 14天的运行后评估产物滴定度、终末细胞生存力和存活终末细胞密度

I-A	5	37°C (0-14天) 无T-转换	0.79	100	7.3	5.3	56	0.8
II-A	5	37°C (0-6天) 34°C (6-14天) 一步T转换	1.30	178	8.1	10.5	82	1.5
III-A	5	37°C (0-6天) 34°C (6-10天) 32°C (10-14天) 两步T转换	2.30	315	7.6	17.5	81	3.1

使用延长生产期, 21天的运行后评估产物滴定度、终末细胞生存力和存活终末细胞密度

I-B	5	37°C (0-21天) 无T-转换	1.30	178	6.6	8.6	20	0.3
II-B	5	37°C (0-6天) 34°C (6-21天) 一步T转换	2.70	370	5.3	14.3	28	0.4
III-B	5	37°C (0-6天) 34°C (6-10天) 32°C (10-21天) 两步T转换	3.50	480	6.5	22.8	57	1.7

*: “NANA” (N-氨基-N-神经氨酸) 指唾液酸 (SA)。“终末 NANA” 指培养结束时产物的 NANA。

表 5 给出了实验结果, 表明在 50L 反应器规模下不同温度转换对 5 培养物中细胞生产 CTLA4Ig 的影响。

表5

实验#	反应器 规模 [L]	温度转换	终末滴定 度 (g/L)	终末细 胞生存 力 (%)	存活终末 细胞密度 ($\times 10^6$ 个 细胞/mL)
-----	------------------	------	-----------------	---------------------	---

使用最初(标准)生产期, 14天的运行后评估产物滴定度、终末细胞生存力和存活终末细胞密度

IV-A	50	37°C (0-6天); 34°C (6-10天); 32°C (10-14天) 两步T转换	1.4	95	5.5
V-A	50	37°C (0-6天); 34°C (6-10天); 32°C (10-14天); 30°C (14-21天) 三步T转换	1.4	91	5.4

使用延长生产期, 21天的运行后评估产物滴定度、终末细胞生存力和存活终末细胞密度

IV-B	50	37°C (0-6天); 34°C (6-10天); 32°C (10-21天) 两步T转换	2.5	67	2.5
V-B	50	37°C (0-6天); 34°C (6-10天); 32°C (10-14天); 30°C (14-21天) 三步T转换	2.6	82	3.2

使用延长生产期, 28天的运行后评估产物滴定度、终末细胞生存力和存活终末细胞密度

IV-C	50	37°C (0-6天); 34°C (6-10天); 32°C (10-28天) 两步T转换	2.8	47	1.1
V-C	50	37°C (0-6天); 34°C (6-10天); 32°C (10-14天); 30°C (14-28天) 三步T转换	3.1	69	1.4

如已经通过该实施例中实验阐明的，发现多步温度转换在整个培养过程中保持高细胞生存力。具体地，在表 4 中，实验 III-B 表明使用定时两步温度转化图在整个 21 天培养过程(包括延长的生产期)中保持高细胞生存力(也见图 6)，允许 6.5 [摩尔比] 的高唾液酸含量下滴定度达到 3.5 g/L。高的“终末效价 × 终末唾液酸”的算术乘积值也可以证明两步培养方法的成功。

相比，不包括温度转换(表 4，实验 I-B)的培养方法导致细胞生存力提早下降。此外，发现与根据本发明的两步温度转换和方法相比，使用一步温度转换(表 4，实验 II-B)产生较低的终末滴定度、终末唾液酸和“终末滴定度 × 终末唾液酸”数学乘积。

此外，在表 5 中给出的包括 50L 反应器规模下进行的细胞培养的结果表明了本发明的多步温度转换培养技术的优点。第三次温度转换到 30℃ 定时在第 14 天发生。具体地，三次温度转换对细胞生存力和终末滴定度(表 5，实验 V-C，和图 7)的益处可以从与两次温度转换的比较中看到。根据本发明方法，三次温度转换还相对于无转换或一次转换的方法延长了细胞生存力并从而延长了蛋白质生产，如可以从表 5，特别从例如，延长的 21 天和 28 天培养运行观察到。由于细胞培养中常见的放大试验效应，发现 50L 反应器规模下滴定度产生比 5L 规模下的低一些。然而，容易理解这种效应不会有损于如通过本发明提供的两次或多次温度转换培养运行的优势。

如通过实施例 5 中给出的结果所证明的，对于其中在第 6 天，即对数生长期结束时进行的温度转换运行，与没有温度转换的对照运行相比，在终末滴定度和细胞生存力方面得到好得多的结果。如从所述结果观察到的，通过使用一次温度转换，容积生产力增加了 2 倍。在第 10 天进行的第二次温度转换产生了更高的细胞生存力并进一步增加了容积生产力(与没有 T 转换的运行相比约 3 倍)，而保持高产物质量，如通过糖蛋白产物的唾液酸含量确定的。

实施例 6

该实验给出的数据表明包括根据本发明的两次向下温度转换的细胞培养方法对每个细胞每单位时间产生的蛋白质，例如 CTLA4Ig 的量没有统计学显著影响。根据多次温度转换细胞培养(发酵)方法，该方法中蛋白质的总产量是直到该方法结束时存活的更多活细胞的结果。

因为对于延长的生产时间更多细胞存活，更多的活细胞在产生在该方法结束时所希望的蛋白质。这又在该方法或者培养运行结束时产生大量的所希望的蛋白质产物。

5 表 6 阐明本发明所包括的方法中多种时间处细胞特定生产力。通过如上文给出的公式确定细胞特定生产率。从而为产生 CTLA4Ig、其他可溶性 CTLA4 分子，和可溶性 CTLA4 突变分子设计的培养方法是非生长相关的方法，其中蛋白质生产在第 6 天或约第 6 天开始，即，约在稳定期开始时，指数细胞生长之后。表 6 中给出的数据涉及实施例 5 中进行的实验。

10 表 6

实例/T-转换参数	细胞特定蛋白质生产(时间)	细胞特定蛋白质生产的量
I-A/无 T 转换	14 天后	44.7 pg/细胞/天
I-B/无 T 转换	21 天后	64.1pg/细胞/天
II-A/一次 T 转换	14 天后	55.5 pg/细胞/天
II-B/一次 T 转换	21 天后	60.9 pg/细胞/天
III-A/两次 T 转换	14 天后	47.5 pg/细胞/天
III-B/两次 T 转换	21 天后	51.9 pg/细胞/天

15 使用细胞密度和滴定度测量计算表 6 中细胞特定生产率，如上文所述。本领域中技术人员将明白，细胞密度测量通常具有约 10-20%标准差(SD)，即高 SD，并且是不精确的。因此，细胞特定生产率的测定具有相应 10-20%标准差。从而，考虑到与这些类型计算有关的高 SD，不同运行时间每个细胞每天产生的产物的量在没有 T 转换、有一次 T 转换、有两次 T 转换的方法之间无显著不同。通过本发明的新近提供的细胞培养方法产生的高质量蛋白质产物的高水平和蛋白质产量的总体增加归因于从包括多步向下温度转换的整个培养方法幸存下来的更

20 高数目的活细胞。

实施例 7

实施例 7A

该实施例 7A 提供了用于本发明方法中的材料和试剂，该方法用于培养重组细胞，所述细胞产生如本文实施例 7B-13 中描述的代表性 L104EA29YIg。

1. 细胞培养基

- 5 用于细胞接种物生产的基础细胞培养基为改良 CD-CHO 培养基，其含有谷氨酰胺、碳酸氢钠、胰岛素和氨甲蝶呤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)，如表 6 中例证。用 1N HCl 将培养基的 pH 调节到 7.0。用于生物反应器，包括 5 升 (5L)、10 升 (10L) 和 50 升 (50L) 生产反应器中培养物生长的基础细胞培养基也是表 6 中所示改良 CD-CHO 培养基，只是不
- 10 使用氨甲蝶呤。用 1N HCl 将培养基的 pH 调节到 7.0。

表 7

改良 CD-CHO 培养基组分	浓度
CD-CHO 25 × 酸 I (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
CD-CHO 25 × 酸 II (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
CD-CHO 25 × 盐 I (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
CD-CHO 25 × 盐 II (Invitrogen, Carlsbad, CA)	40 ml/L
L-谷氨酰胺 (Invitrogen)	0.585 g/L
r-人胰岛素 (10 mg/mL) (Invitrogen)	0.1 ml/L
氨甲蝶呤 (20 mM 溶液) (ICN, Costa Mesa CA)	5 μl/L
碳酸氢钠 (Mallenkrodt Bake, Phillipsburg, NJ)	2.22 g/L

在除了实施例 10 的所有实施例中，对于补料-分批方法中的喂饲细胞，使用改良送料培养基，即，eRDF-1 培养基 (Invitrogen)，其含有葡萄糖、谷氨酰胺、胰岛素和 TCYeastolate (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)，如表 8 所示。加入所有组分后用 1N NaOH 调节送料培养基的 pH 到 7.0。

表 8

改良的 eRDF 培养基组分	浓度
eRDF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)	16.8 g/L
右旋糖 (VWR-Mallenkrodt Baker)	30.94 g/L
L-谷氨酰胺 (Invitrogen)	4.1 g/L
r-人胰岛素 (10 mg/mL) (Invitrogen)	1 ml/L
TC Yeastolate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)	5 g/L
D-半乳糖 (Ferro-Pfanstiehl, Waukegan, IL)	12.5 g/L

对于实施例 10，送料培养基为上述送料培养基，其具有一处变动：eRDF 的浓度为 25.2 g/L。

10 2. 生物反应器中生产相

生产生物反应器最初以分批反应器运行，密切监视并控制温度、压力、pH 和溶解氧浓度。通过测量活细胞密度和几种关键代谢物的浓度评估培养物状况。接种后一天启动送料方法。剩下的发酵以补料-分批方式进行。

15 使用 5L 规模生物反应器 (具有一个海洋搅拌器的玻璃反应器)、10L 规模生物反应器 (具有两个海洋搅拌器的玻璃反应器) 和 50L 规模生物反应器 (具有两个海洋搅拌器的不锈钢反应器) (见实施例 2)。数据获取系统 (Intellution Fix 32) 在整个运行期间记录温度、pH 和溶解氧 (DO)。通过转子流速计控制气流。气体通过沉水 frit (5 μm 孔大小)
20 喷入反应器，反应器头部空间用于 CO₂ 去除。分子氧通过相同的 frit

喷射用于 DO 控制。CO₂ 通过相同 frit 喷射用于 pH 控制。

3. 喂饲策略

接种后 24 小时，如果葡萄糖浓度 $\geq 3.0\text{g/L}$ ，加入最小 1% 培养物体积的改良 eRDF-I 送料培养基。如果葡萄糖浓度低于 3g/L，每天加入经计算的大丸送料体积使葡萄糖浓度回到 3 g/L。在分批表格上记录每天送料量。

4. 取样

每天从反应器取出细胞样品。将用于细胞计数的样品用锥虫蓝 (Sigma, St. Louis, MO) 染色。通过血细胞计数法使用显微镜，或者通过 Cedex 自动细胞计数器 (Innovatis AG, Bielefeld, 德国) 进行细胞计数和细胞生存力测量。为了分析代谢物，将额外的样品以 2000 转/分钟 (4℃) 离心 20 分钟以分离细胞。用上清液分析下面的参数：滴定度、唾液酸、葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、谷氨酸、pH、pO₂、pCO₂、氨，和任选地，乳酸脱氢酶 (LDH)。额外的备份样品在 -20℃ 冷冻。

15 实施例 7B

该实施例 7B 描述从经培养的 CHO 细胞生产 L104EA29YIg，其如图 9 中 -1 到 357 或 +1 到 357 所示 (编码 DNA 保藏为 ATCC PTA- 2104)。

该实施例还描述本发明的一种方法，其包括向细胞培养物加入聚阴离子化合物，更具体地，硫酸葡聚糖。

20 用于 L104EA29YIg 表达的 CHO 细胞在含有谷氨酰胺、碳酸氢钠、胰岛素，和氨甲蝶呤的改良 CD-CHO 培养基 (Invitrogen, CA) 中扩大，使用 T-75 烧瓶和摇瓶。T-烧瓶和摇瓶在 37℃ 6%CO₂ 中孵育。产生足够接种物后，将培养物转移到 5 L 或 10 L 生物反应器，使用如上描述的经改良的 CD-CHO 培养基。最初接种密度为 200,000 个活细胞/mL 或 25 10⁶ 个细胞/mL。

5L 和 10L 容器为分别装备一个和两个海洋搅拌器 (Applikon, CA) 的玻璃反应器。通过转子流速计控制气流。气体通过沉水 frit (5 μm 孔大小) 喷入反应器，反应器头部空间用于 CO₂ 去除。分子氧通过相同的 frit 喷射用于 DO 控制。CO₂ 通过相同 frit 喷射用于高压侧 pH 控制。30 低压侧 pH 控制通过加入 1N NaOH 或 Na₂CO₃ 实现。

使用含有葡萄糖、谷氨酰胺、胰岛素和 TCYeastolate (Becton Dickinson) 的改良 eRDF 培养基 (Invitrogen, CA) 如下对生物反应器

中的培养物给予每天大丸喂饲：从接种后第一天开始，加入最小 1% 培养物体积；或者如果葡萄糖水平降到 3g/L 以下，加入经计算的体积使葡萄糖水平回到 3 g/L。

在除了实施例 13 的所有实施例中，温度控制在从第 0 到第 6 天 37
5 °C，从第 6 天到第 10 天 34°C，第 10 天开始 32°C。

发酵过程通常的持续时间为 14-19 天。每天从反应器采集样品。用于细胞计数的样品用锥虫蓝 (Sigma, St. Louis, MO) 染色。使用 Cedex 自动细胞计数器 (Innovatis AG, Bielefeld, 德国) 进行细胞计数和细胞生存力测定。用上清液分析 LEA29Y 滴定度、葡萄糖、乳酸、
10 谷氨酰胺、谷氨酸、pH、pO₂、pCO₂、氨。

将硫酸葡聚糖 (钠盐, 来自平均分子量 5000Da 的葡聚糖, Sigma, MO) 溶于水中或培养基中。将溶液无菌过滤并加入反应器中至 50 mg/L 的浓度。所加入的体积组成了加入时反应器的工作体积的至多 2%。

实施例 8

15 该实施例描述并给出了接种后某一时刻加入聚阴离子化合物，更具体地，硫酸葡聚糖的比较研究结果。

5L 和 10L 生物反应器接种 0.2×10^6 个细胞/mL 产生 L104EA29Y 的细胞。

如下设计实施例 8-a 和 8-b:

20 实施例 8-a: 培养物中不加入硫酸葡聚糖 (“对照” 培养物: 4 个 5L 生物反应器中培养, 4 个 10L 生物反应器中培养)。

实施例 8-b: 在第 6 天向培养物加入 50 mg/L 浓度的硫酸葡聚糖 (“DS 天 6 培养物: 2 个 5L 生物反应器中培养, 1 个 10L 生物反应器中培养)。

25 在图 11 中报告实施例 8-a 和 8-b 的平均生存力、活细胞密度、和总细胞密度图, 和它们的标准差。

在对照培养中, 在第 6 和 7 天之间观察到活细胞密度中的平台, 相应于稳定期。对于对照培养, 在第 7 天后观察到活细胞密度和生存力的下降, 相应于死亡期。当在第 6 天向培养物加入硫酸葡聚糖后,
30 生长期延长到第 11 天。活细胞密度达到平均 5.2×10^6 个细胞/mL, 而对照为 3.5×10^6 个细胞/mL。在该延长的生长期期间生存力保持在 90% 以上。第 11 天后, 活细胞密度和总细胞密度成比例地下降, 表明细胞

裂解，并且结果生存力指数直到第 15 天都保持高于 90%。

图 12 是活细胞密度作为加入硫酸葡聚糖的培养时间和对照运行时间的函数的对数表示。死亡率(通过图 11 中活细胞密度的斜率给出)依赖于硫酸葡聚糖的存在或不存在而不同。在硫酸葡聚糖的存在下，死亡速度在第 12 到第 19 天约为恒定，值为 0.0012h^{-1} 。相比，在第 8 天到第 12 天，对照的平均死亡速度最大值为 0.0024h^{-1} 。从而，在第 6 天加入的硫酸葡聚糖将死亡期期间细胞死亡率减慢了一半。

尽管具有上述硫酸葡聚糖的有益效果，但是加入或不加入硫酸葡聚糖，产物 L104EA29YIg 的滴定度是相似的(表 9)。

10 表 9: 第 6 天加入硫酸葡聚糖对第 14 天产物 L104EA29YIg 滴定度的影响

条件	运行数	第 14 天平均滴定度	滴定度的标准差
对照方法	8	1.60	0.18
第六天硫酸葡聚糖	3	1.57	0.13

15 在表 10 中报告了不同运行的 L104EA29YIg 唾液酸化程度。考虑相对大的运行之间的可变性，可以认为 L104EA29YIg 唾液酸化不受在第 6 天加入硫酸葡聚糖的显著影响。

表 10: 第 6 天加入硫酸葡聚糖对 L104EA29YIg 唾液酸化的影响

条件	运行 #	NANA 摩尔比
对照方法	1	6.8 (14)
对照方法	2	5.5 (14)
对照方法	3	5.7 (15)
对照方法	4	5.5 (15)
对照方法	5	5.5 (15)
对照方法	6	6.3 (16)
第六天硫酸葡聚糖	7	5.4 (14)
第六天硫酸葡聚糖	8	6.9 (14)
第六天硫酸葡聚糖	9	6.9 (16)

实施例 9

该实施例显示加入硫酸葡聚糖对死亡期中细胞培养物的影响。

以 10^6 个细胞/mL 向 5L 生物反应器接种产生 L104EA29YIg 的细胞，死亡期在第 5 天开始。在第 6 天加入硫酸葡聚糖。

在图 13 中给出生存力、活细胞密度、和总细胞密度图。在第 6 天向这种培养物中加入硫酸葡聚糖可以防止活细胞密度显著下降长达第 17 天。从而，当在死亡期期间加入硫酸葡聚糖时，可以抑制细胞死亡数天。

在该运行中，在第 14 天得到 1.9g/L 滴定度，NANA 摩尔定量为 6.6。

实施例 10

该实施例显示了向处于死亡期的细胞培养物加入硫酸葡聚糖的影响。

以 0.2×10^6 个细胞/mL 向 10L 生物反应器接种产生 L104EA29YIg 的细胞。在该特定实例中，每天补料为更浓的制剂，结果死亡期的出现延长到第 10 天(图 14)。在第 14 天之前未加入硫酸葡聚糖。

在图 14 中给出生存力、活细胞密度、和总细胞密度图。在第 14 天加入硫酸葡聚糖允许活细胞密度稳定 4 天，之后培养停止。

该实施例又阐明了当向培养物加入硫酸葡聚糖时对死亡期期间细胞死亡的抑制。

实施例 11

该实施例显示了在第 0 天加入硫酸葡聚糖的效果。通过比较该实验中看到的效果与硫酸葡聚糖的加入延迟的其他实验中看到的效果可以看到延迟加入硫酸葡聚糖的效果。

以 0.2×10^6 个细胞/mL 向两个重复的 5L 生物反应器接种产生 L104EA29YIg 的细胞，在接种当天(第 0 天)加入浓度为 50 mg/L 的硫酸葡聚糖。

在图 15 中给出生存力、活细胞密度、和总细胞密度图。两个培养物都没有实现比没有硫酸葡聚糖的培养物更高的细胞密度(比较图 11 和 15)。细胞在第 7 或 8 天进入死亡期，而当在第 6 天加入硫酸葡聚糖时，细胞在第 11 天进入死亡期(比较图 11 和 15)。在这些运行的第 14 天所得 L104EA29YIg 滴定度为 0.57 g/L(运行 # 1)和 0.86 g/L(运行 # 2)，它们显著小于对照方法或者第 6 天加入硫酸葡聚糖(见实施例 8)的方法中的滴定度。

这些结果表明硫酸葡聚糖的加入的时间选择对于加入结果的重要性。

不被理论束缚，我们认为硫酸葡聚糖的加入的所观察到的效果和它们对加入的时间选择的依赖性可以通过硫酸葡聚糖对多种自分泌因子的结合来解释，所述结合类似于多硫酸戊聚糖对肝素结合生长因子的结合 (Zugmaier 等人, 1992)。我们认为硫酸葡聚糖结合到这些因子的肝素结合结构域，其变得不能被细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖利用。结果，硫酸葡聚糖-结合因子不能在细胞表面浓缩，这极大地降低了它们结合它们的受体的可能性。净效果为这些因子不再发挥它们在细胞上的正常作用。在接种后的前几天里，细胞产生某些生长因子，它们的功能是信号细胞生长。在第 0 天加入的硫酸葡聚糖不可逆地结合所产生的那些因子。然而硫酸葡聚糖与这些因子的结合不以不利地方式显著影响细胞生长，可能是因为细胞能够通过增加生长因子产生应答。后来，在生长期，生长因子的产生停止，并且细胞开始产生不同类型的自分泌因子，它们在高浓度的效果是示意 (signal) 生长期结束和死亡期来临。这些因子从第 0 天的低浓度积累到后来的高浓度。那时，这些因子有效示意细胞停止生长并进入稳定期和死亡期。我们提出硫酸葡聚糖优先结合这些死亡示意因子，从而使它们的信号功能失效，并允许延长生长期。通过这些因子的持续诱导似乎是细胞死亡进行所需的，结果当死亡信号因子被硫酸葡聚糖失效时，进入死亡期的细胞可以重新调节进入稳定期 (实施例 9 和 10)，甚至晚至培养中的第 14 天。相反地，在第 0 天加入的已经结合到生长因子的硫酸葡聚糖在生长期结束时仍然结合这些因子，使得不能用于结合死亡信号分子。从而，对于在第 0 天加入硫酸葡聚糖的情况 (实施例 11)，不发生生长期延长和细胞死亡期延迟，同样，在生长期结束时加入硫酸葡聚糖发生生长期延长和细胞死亡期延迟。

假定在实施例 6 中在第 6 天补加硫酸葡聚糖导致培养物中细胞生长抑制和第 11 天细胞死亡发生是由不同于硫酸葡聚糖-结合的自分泌因子的诱导的机理导致。可能，11 天生长后培养基中特定营养物的耗竭是造成这些培养物中生长期结束的原因。

实施例 12

该实施例比较最初生长期期间三个不同时间加入硫酸葡聚糖的效

果。

以 10^6 个细胞/mL 向 5L 生物反应器接种产生 L104EA29YIg 的细胞的培养物。在不同时间向培养物加入浓度为 50 mg/L 的硫酸葡聚糖。在一个培养物中，在第 3 天加入硫酸葡聚糖，另一个在第 4 天，第三个在第 5 天。

在图 16 中报告生存力和活细胞密度图。在所有三种加入情况(第 3、4 或 5 天)中都实现了高活细胞密度 ($>10^7$ 个细胞/mL)，但是较早加入(第 3 或 4 天)不能防止生长期后活细胞密度的立即下降。相反，第 5 天加入使活细胞密度在生长期后稳定 4 天。在 250h 后的时间点，第 5 天硫酸葡聚糖的加入中活细胞密度总是高于或等于(测量误差内)第 4 天硫酸葡聚糖加入培养物中的，第 4 天硫酸葡聚糖的加入中活细胞密度总是高于或等于(测量误差内)第 3 天硫酸葡聚糖加入培养物中的。从而，从该实例似乎硫酸葡聚糖加入的最佳时间是在最初生长期(指缺少任何硫酸葡聚糖加入时观察到的生长期)结束时。较早加入可以延长生长期，但是将在硫酸葡聚糖诱导的延长的生长期后稳定活细胞密度不那么有效，而较晚(死亡期期间)加入将稳定活细胞密度但是不能提供活细胞密度的充分增加(见实施例 9 和 10)。因此，在第 14 天，用第 5 天硫酸葡聚糖加入得到 2.7 g/L 的滴定度，而用第 3 天或第 4 天硫酸葡聚糖加入得到 2.6 g/L 的第 14 天滴定度，用第 6 天硫酸葡聚糖加入得到 1.9 g/L 的第 14 天滴定度(实施例 9 中)。在上面提到的运行中 NANA 摩尔比分别为 6.3、6.6、6.0 和 6.6，表明用硫酸葡聚糖加入的最佳时间选择得到的更高的滴定度伴随着一致的唾液酸化水平。

实施例 13

该实施例显示了产生 L104EA29YIg 的培养中一次和两次温度转换的效果。还将培养物进行延迟加入硫酸葡聚糖。

以 200,000 个细胞/mL 接种 5L 反应器。

应用两次、一次或无 T 转换。对于一次温度转换，在第 6 天温度从 37°C 转换到 34°C。对于两次温度转换，温度在第 6 天从 37°C 转换到 34°C，并且在第 10 天从 34°C 转换到 32°C。在所有情况中，在第 6 天加入硫酸葡聚糖。两次温度转换情况是三次运行的平均值，标准差以条线显示。

分别在图 17、18 和 14 中报告活细胞密度、生存力和滴定度。

结果表明应用至少一次温度转化的益处。对于整个运行期间温度保持在 37℃ 的情况，培养物在第 10 天进入死亡期，并且活细胞密度和生存力的降低迅速。结果，培养 12 天后 L104EA29YIg 容积生产力明显下降。对于 14 天和更长的培养时间，明显具有一次或两次温度转换的
5 培养物关于滴定度优于恒定温度培养。

对于仅进行一次温度转换(在第 6 天，转换到 34℃)的情况，在第 16 天后观察到活细胞密度和生存力的迅速下降。除了第一次温度转换还进行第二次温度转换(在第 10 天，到 32℃)的培养物在第 16 天后不表现活细胞密度和生存力的那么迅速的下降。在 18 天后的培养时
10 间，一次 T 转换培养的容积生产力明显比两次 T 转换培养中的差。相反，在第 11 天到第 15 天，具有一次 T 转换的培养物中容积生产力高于两次 T 转换培养物中的容积生产力。

总之，第一次温度转换是有益的，其不依赖于所希望的收获时间，而第二次温度转换的益处依赖于计划的收获时间和有效下游处理的生存力要求。没有第二次温度转换将允许达到较高产物滴定度直到第 20
15 天，但是对于大于 20 天的运行的培养，使用两次温度转换的培养将在滴定度方面优于具有一次温度转换的运行。此外，必须考虑第 12 天后的收获物在一次 T 转换中比两次 T 转换中含有更高量的细胞裂解产物，这使得下游处理复杂化。对于一次 T 转换，第 12 天后观察到的活
20 细胞密度的急剧下降可以是产物质量的一种考虑，因为相应的细胞死亡可以向上清液释放大量唾液酸酶，其可以降低产物唾液酸化。

将本文中参考或引用的所有出版和授权的专利、专利申请、公布的 PCT 和美国申请、文章、书籍、参考文献、参考文献和指导手册，和摘要都完整并入本文作为参考以更完整地描述本发明所属的领域的
25 现状。

由于可以对上述主题进行多种改变而不背离本发明的范围和精神，所以预期上面说明书中所包含的或者所附权利要求书中定义的所有主题都解释为对本发明的描述和阐明。根据上面的教导可以对本发明进行许多修饰和更改。
30

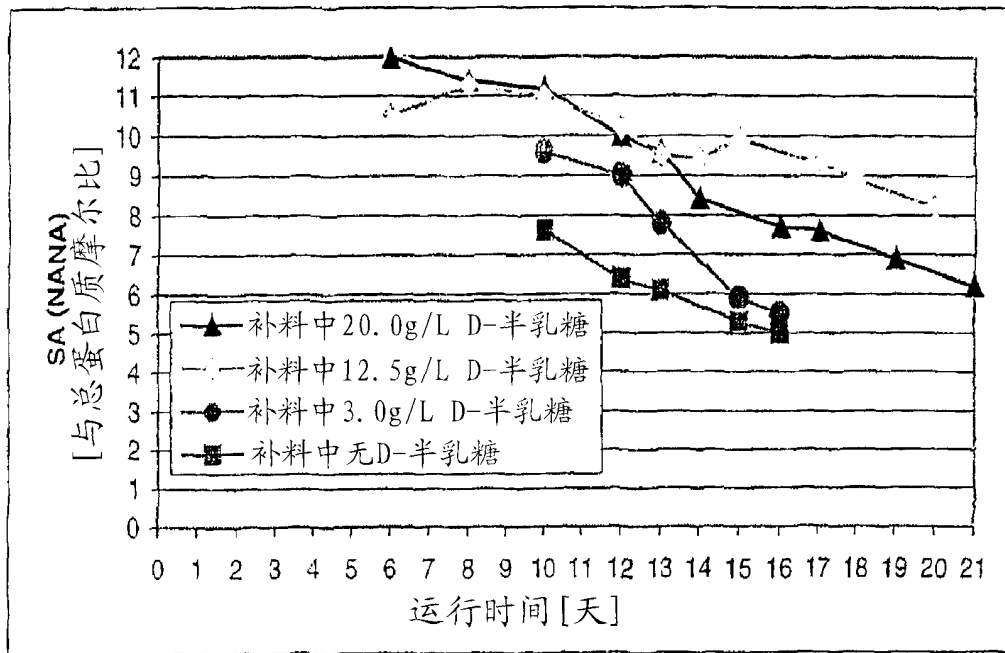


图 1

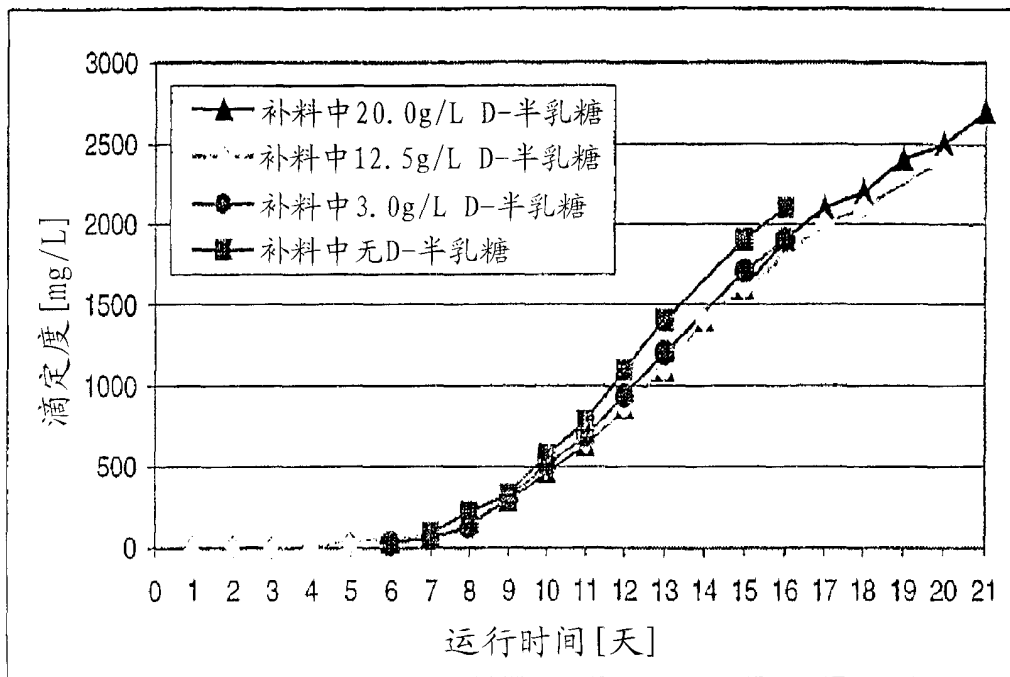


图 2

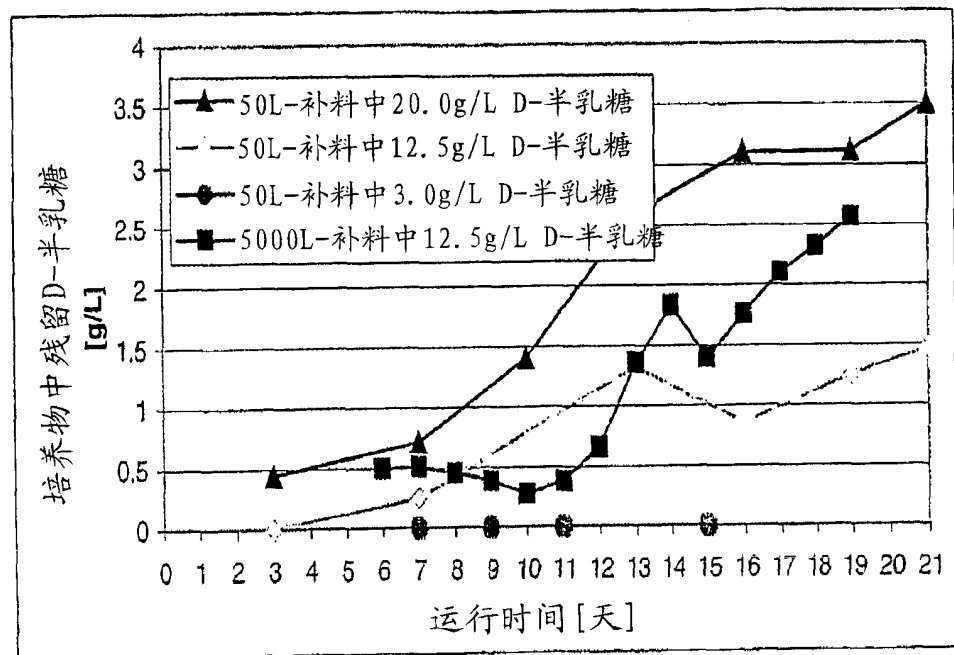


图 3

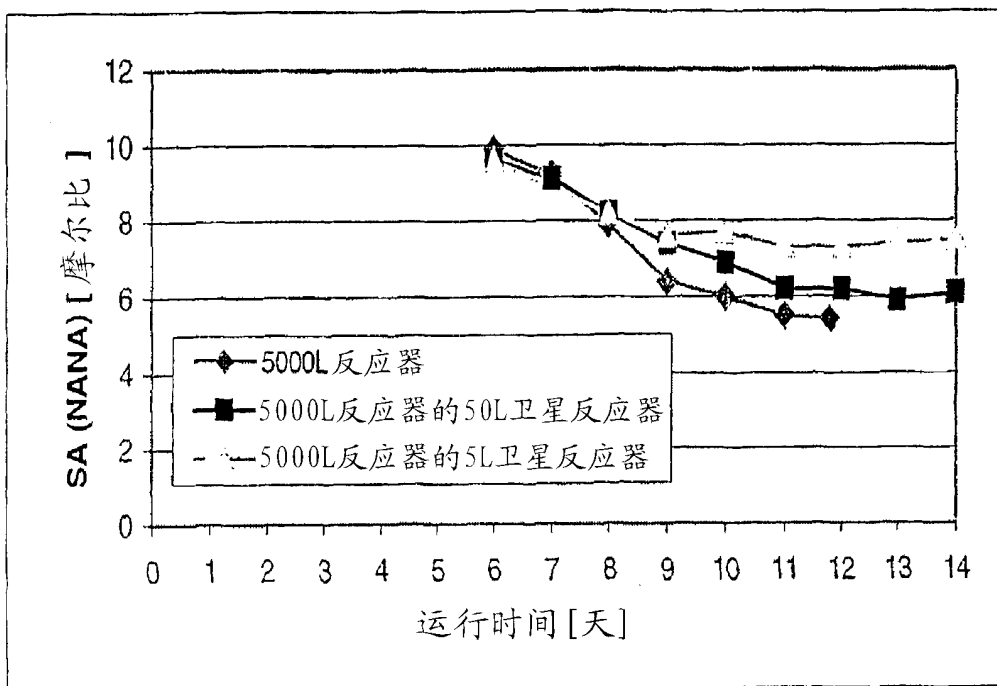


图 4

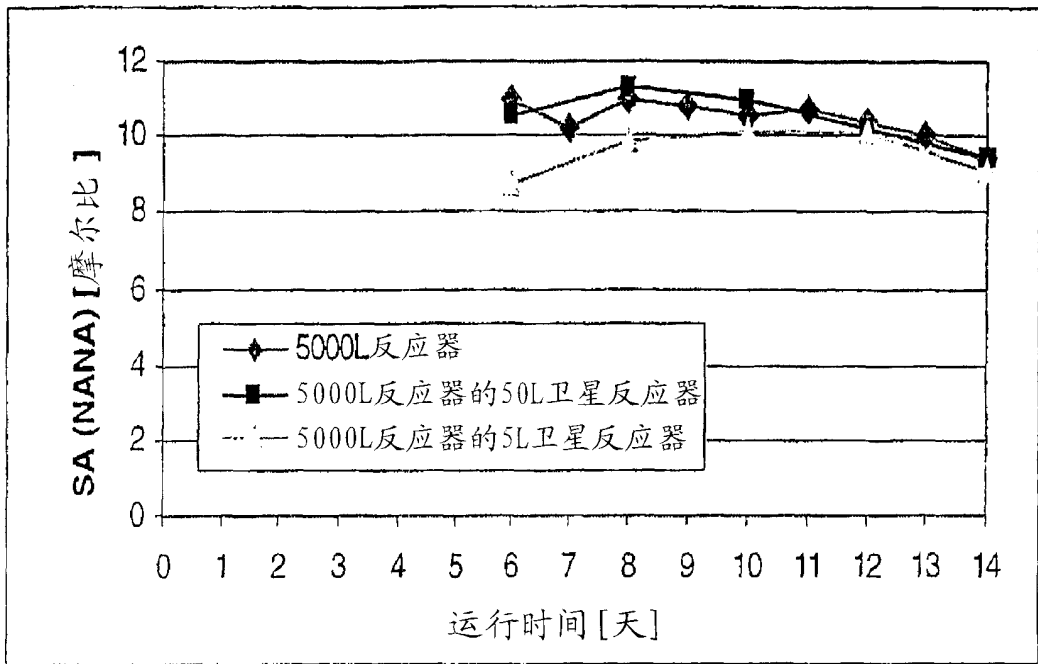


图 5

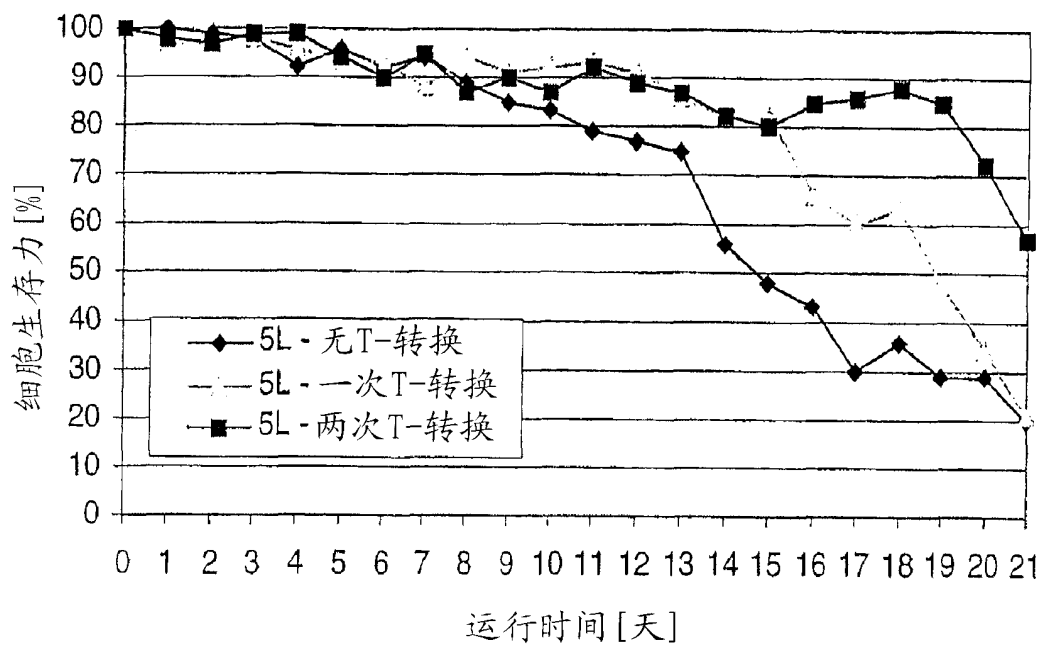


图 6

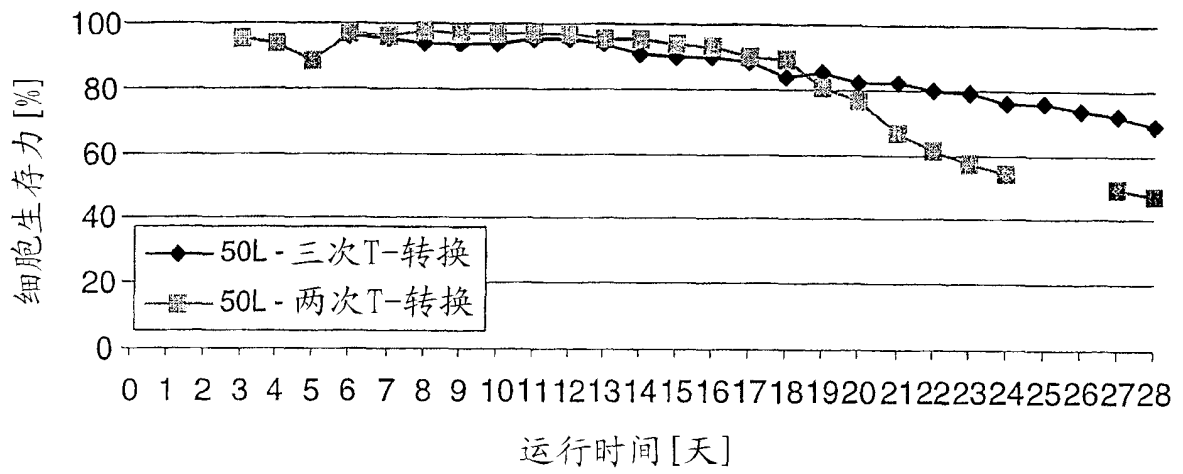


图 7

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACCGCTGCTCACTCTGGTCTTGCATCTCCTGTTTCCA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACCTGGCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAGCCACTGAGSTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGCGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCTCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA	+222
G--N--E--L--T--P--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAGGACTGAGGGCCCTGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAAACCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--E--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCACCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAATCRC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--E--	+134
ACATCCCCAOCCTGCCAGCACTGACTCCTGGGTGGATCGTCACTCTCCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCAAGSACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCAAGAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--P--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATCCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAAAGCACGTACCGGGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCCCTCACCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTCAAGTGCAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAACCTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGSTCAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--X--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGCAGCCGAGAACTACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--H--H--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	+1002
P--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACCAACCACTACACCGAGAAGAGCCTCTCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--E--N--H--Y--T--Q--K--B--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

图 8

ATGGGTGTACTGCTCACACAGGAGCGTGTCTAGTCTGGTCTTGCACCTCTCTTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCAGCCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1

GGCATGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCCAAATATACTGAGGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V-- +34

ACAGTGTCTTCGGCAGGCTGCACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74

GTGAACCTCACTATCCAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--M--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCCAACGGAAOCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114

ATTGATCCAGAACCGTGCACCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCAC +402
I--D--F--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCACTCTCTCTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--P--P-- +154

CCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--E--E--D--F--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGC +642
H--H--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214

GTCTCTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234

AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
H--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254

GAAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGTCCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274

CTGACCTGCTGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--H-- +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--E--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314

TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--E--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--E--E--A--L--H--N--N--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354

CCGGTAAATGA
P--G--K--*

图 9

制癌蛋白M信号肽

N G Y L L T Q R T L L S L V L
 ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT 45

A L L P P S M A S M A M H V A
 GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTC GCC 90

Q P A V V L A S S R G I A S F
 CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT 135

V C E Y A S P G K A T E V R V
 GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG 180

T V L R Q A D S Q V T E V C A
 ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG 225

A T Y M N G N E L T F L D D S
 GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC 270

I C T G T S S G N Q V N L T I
 ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAG CTC ACT ATC 315

Q G L R A M D T G L Y I C K V
 CAA GCA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG 360

E L M Y P P P Y Y L G I G N G
 GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA 405

T Q I Y V I D P E P C P D S D
 ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC 450

F L L W I L A A V S S G L P F
 TTC CTC CTC TCG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT 495

Y S F L L T A V S L S K M L K
 TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG 540

K R S P L T T G V Y V K M P P
 AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA 585

T E P E C E K Q F Q P Y F I P
 ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630

I N
 ATC AAT 636

糖基化位点

←

图 10

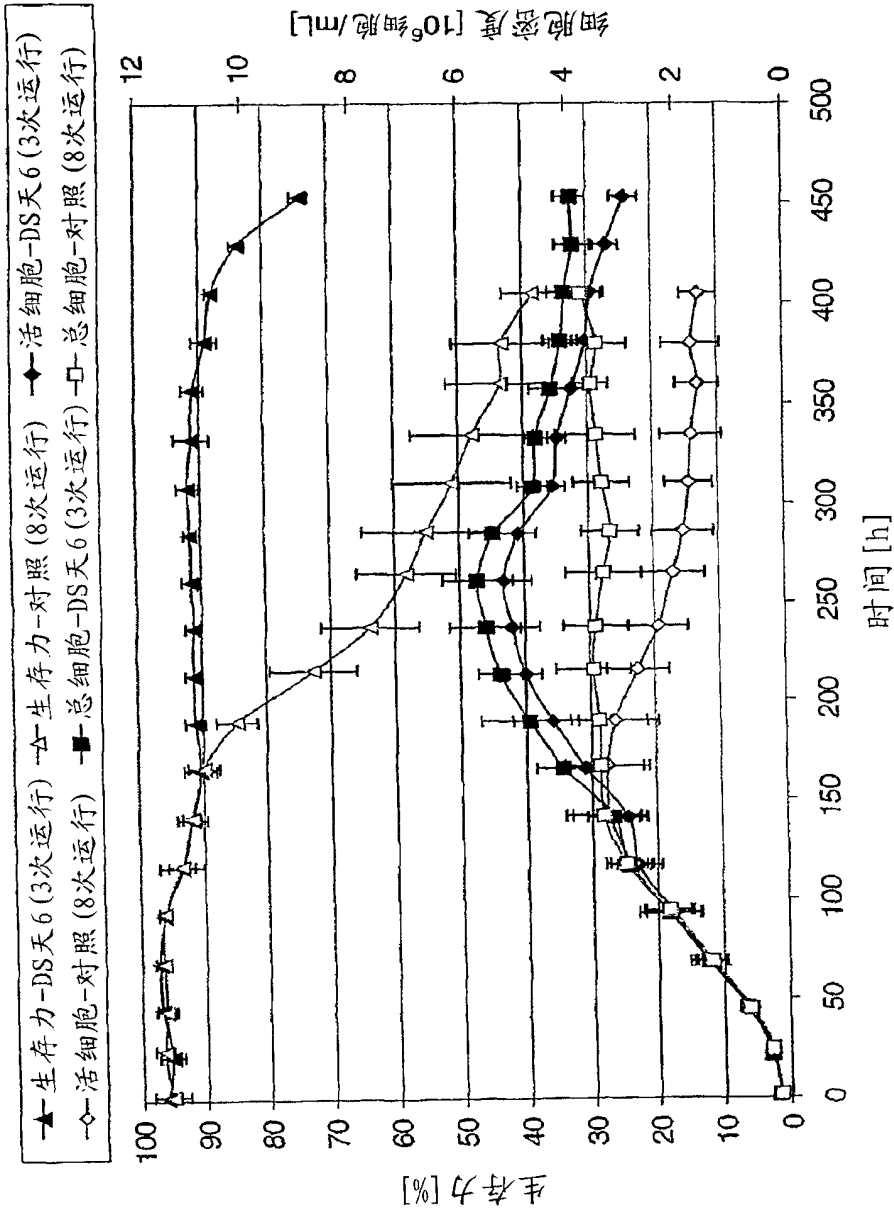


图 11

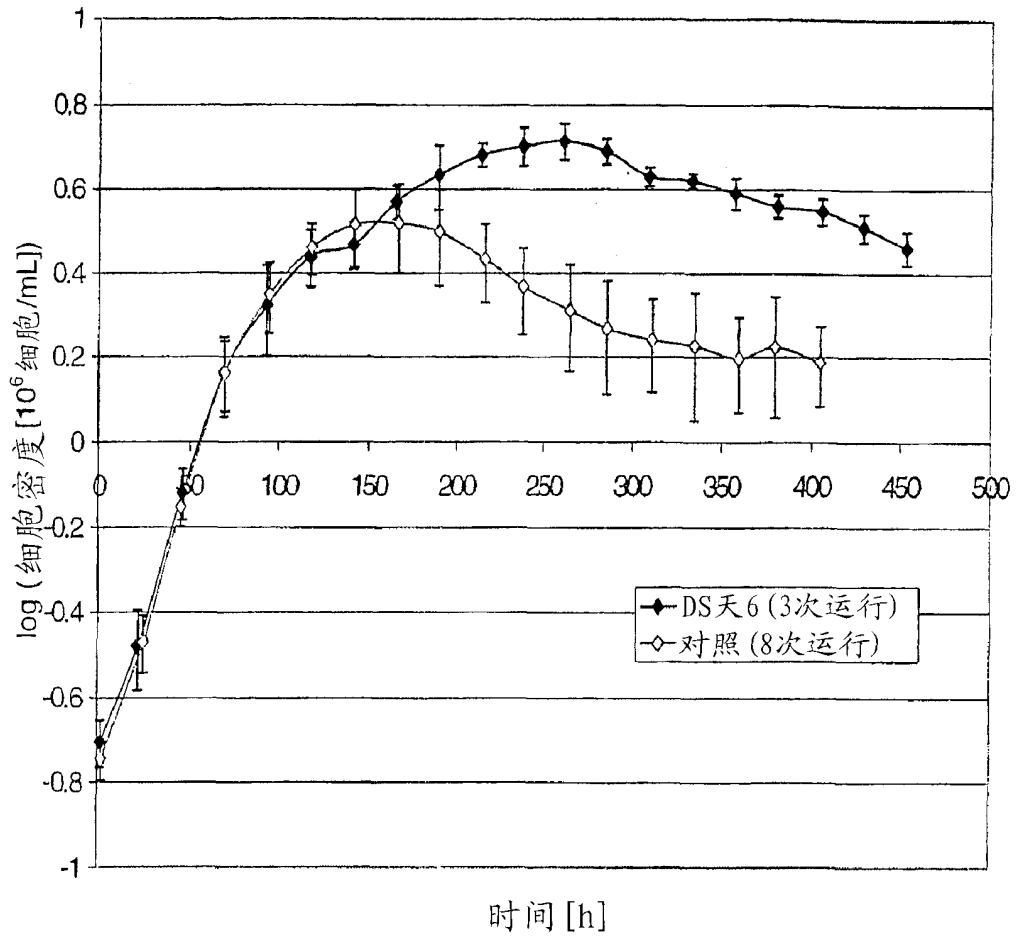


图 12

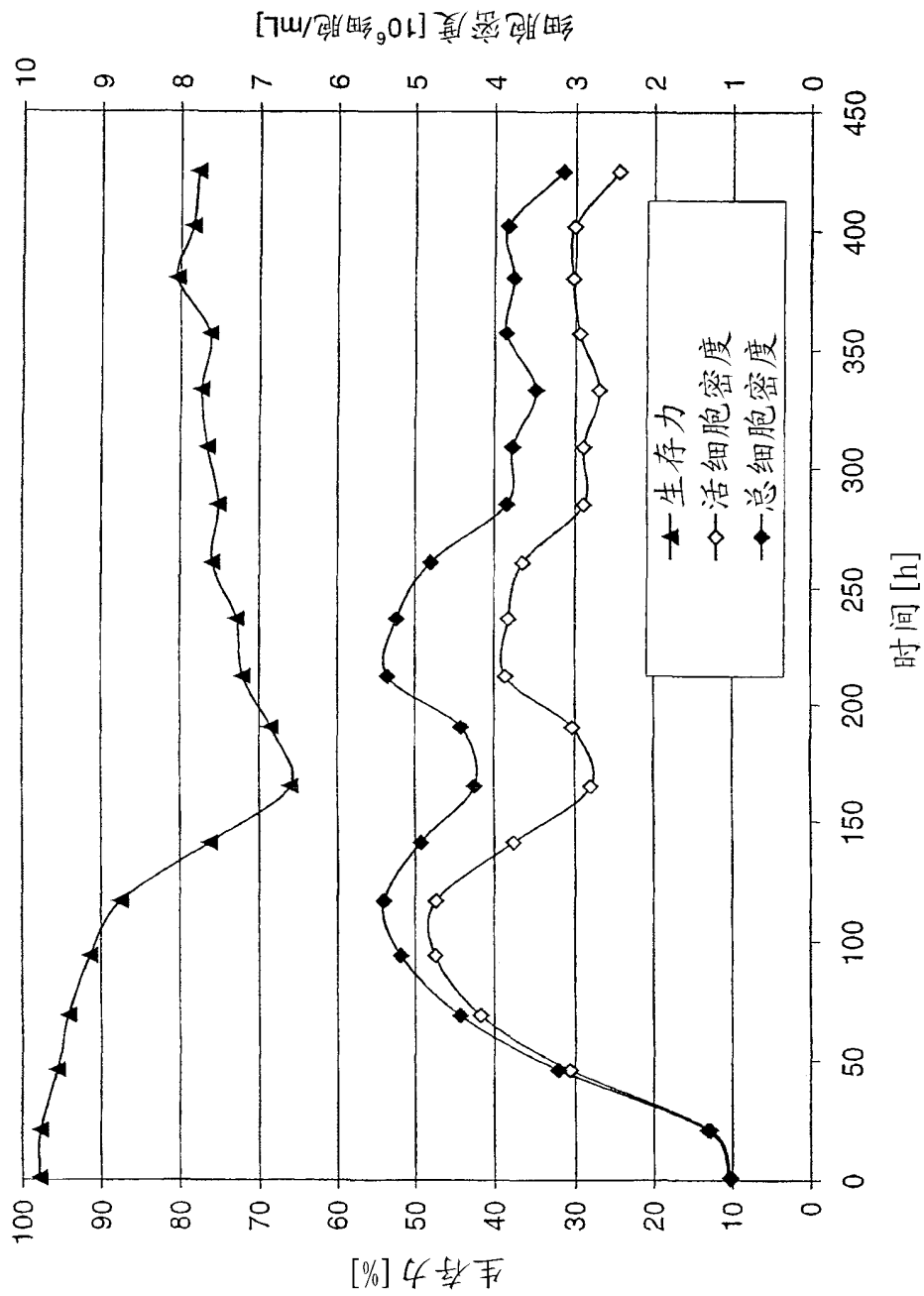


图 13

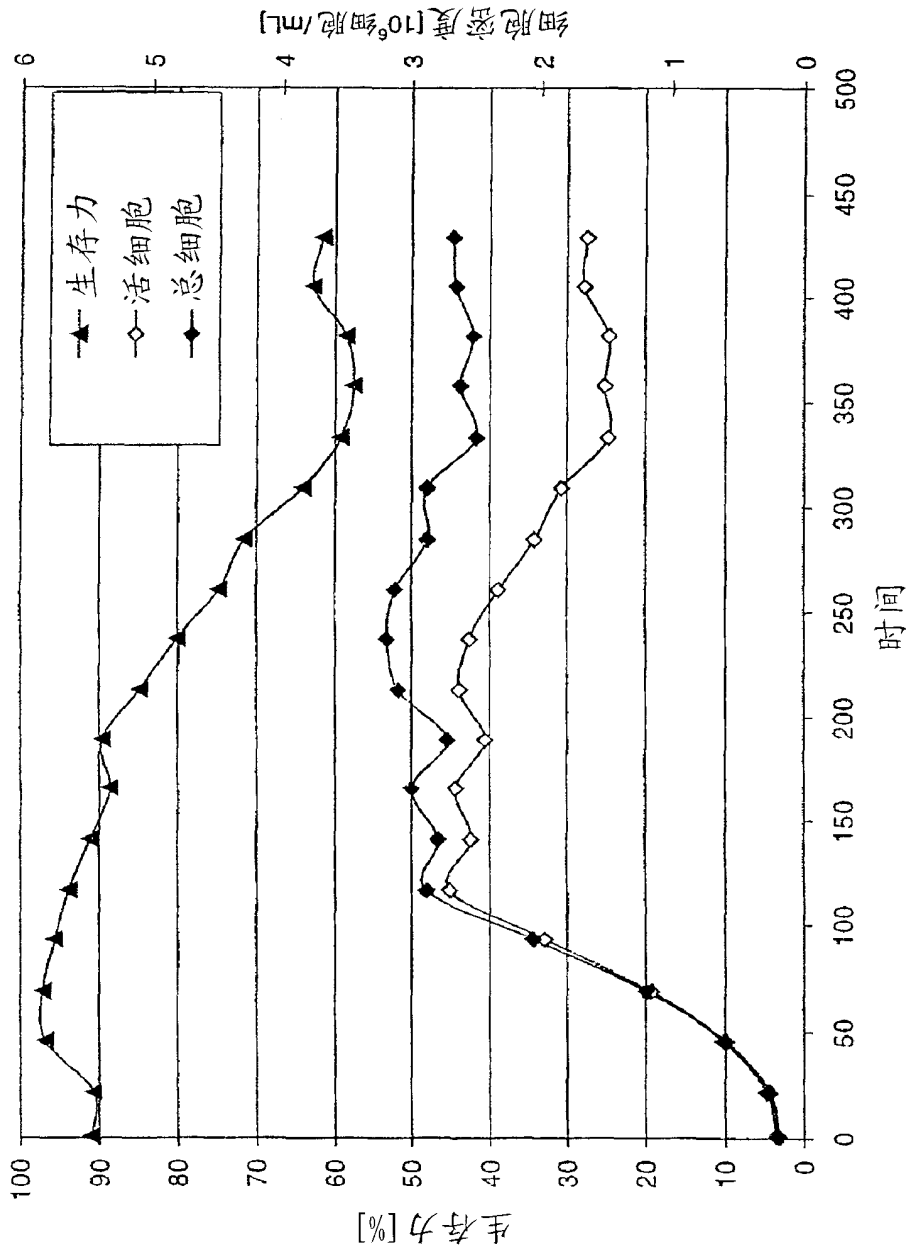


图 14

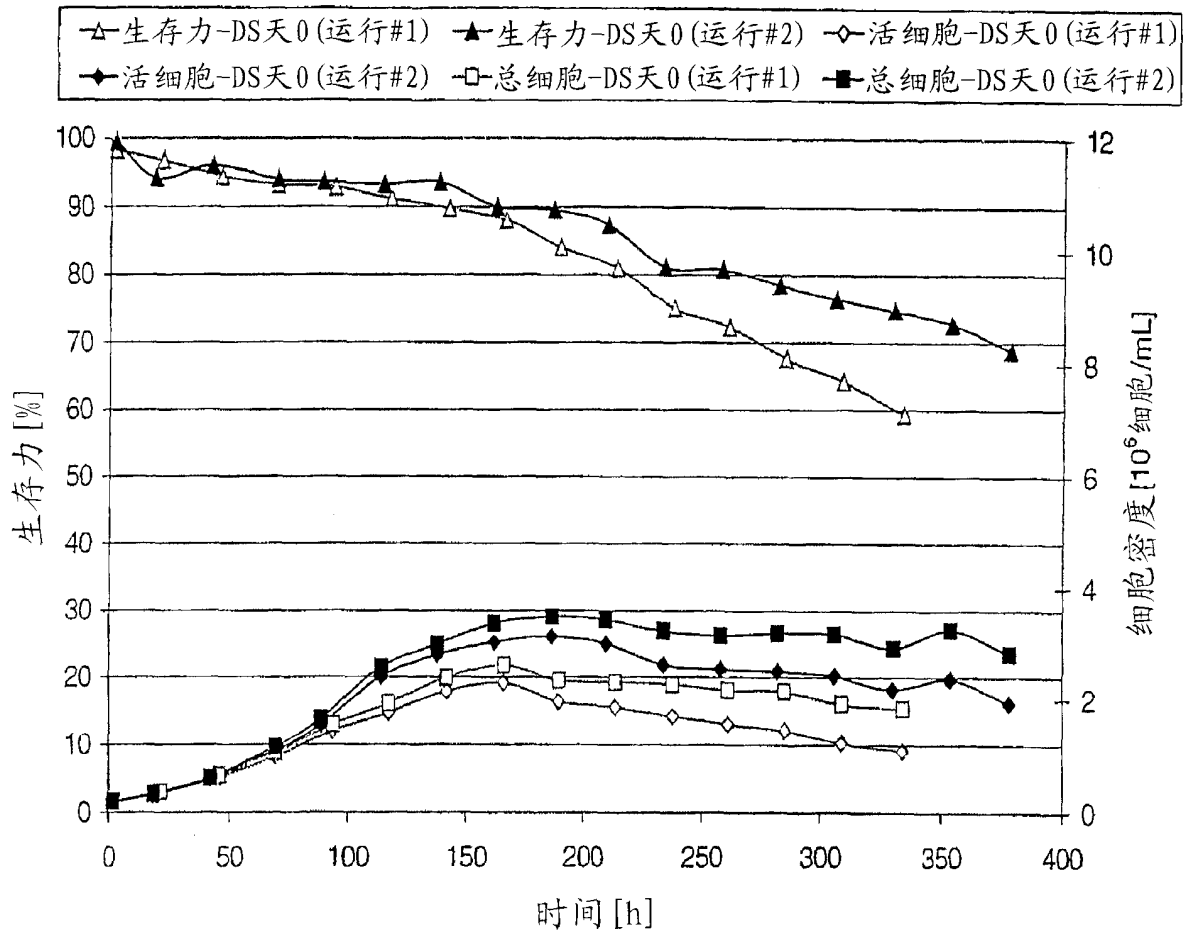


图 15

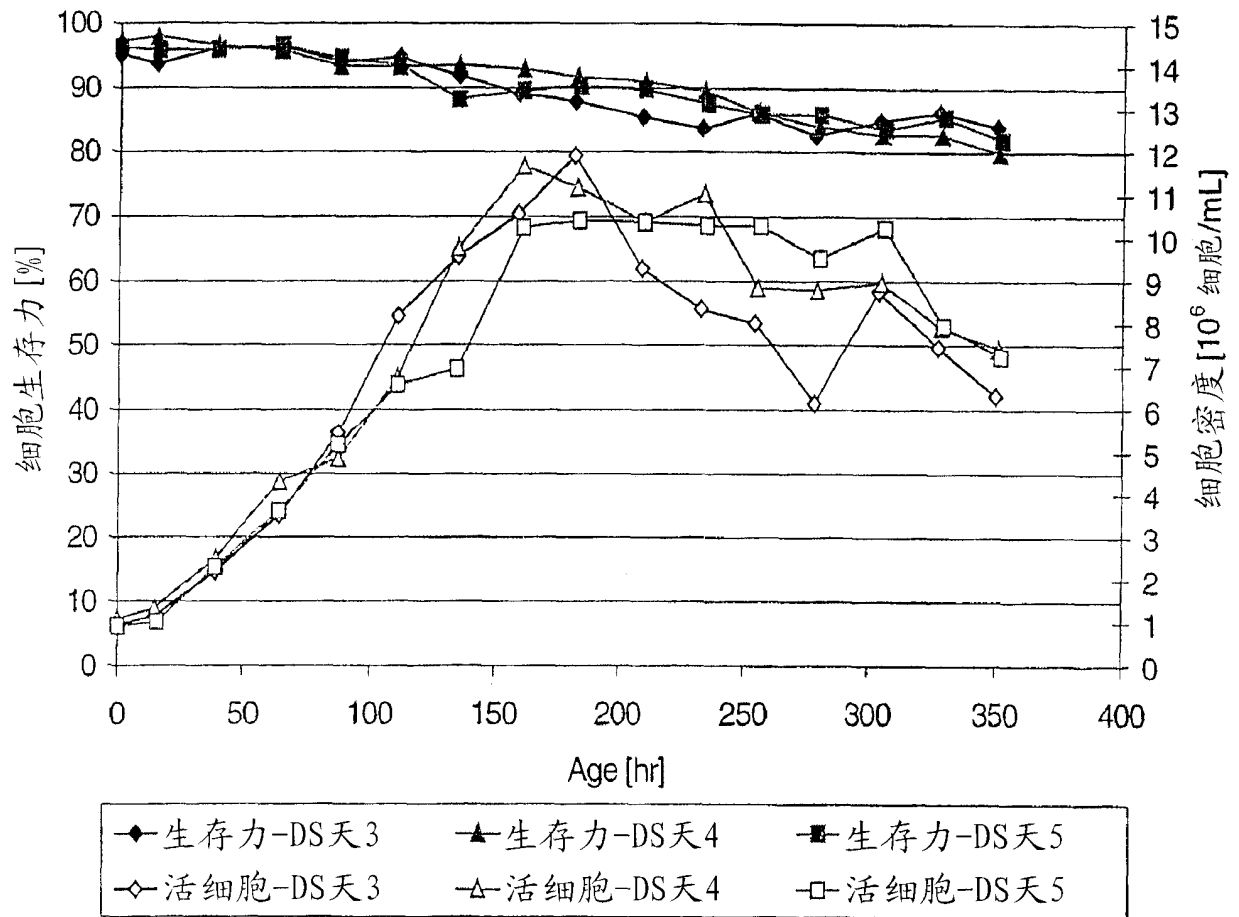


图 16

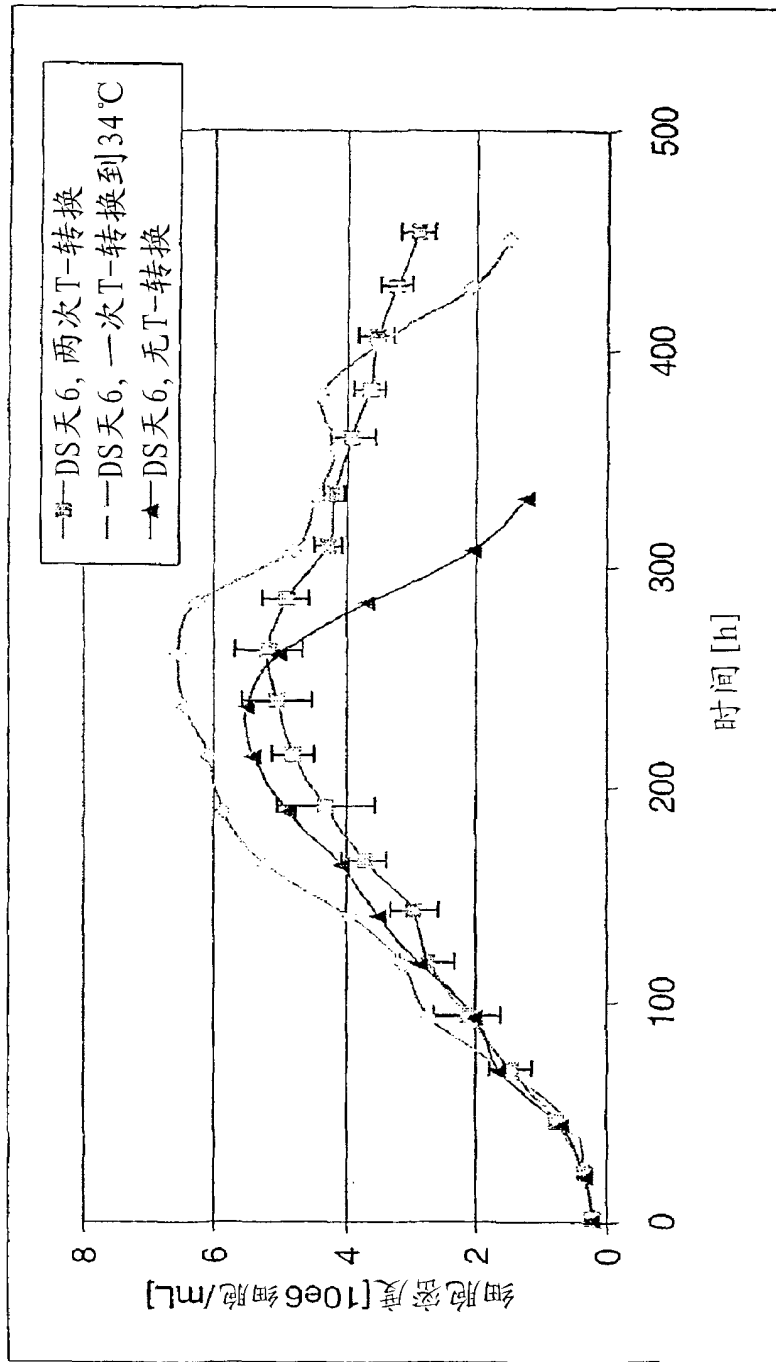


图 17

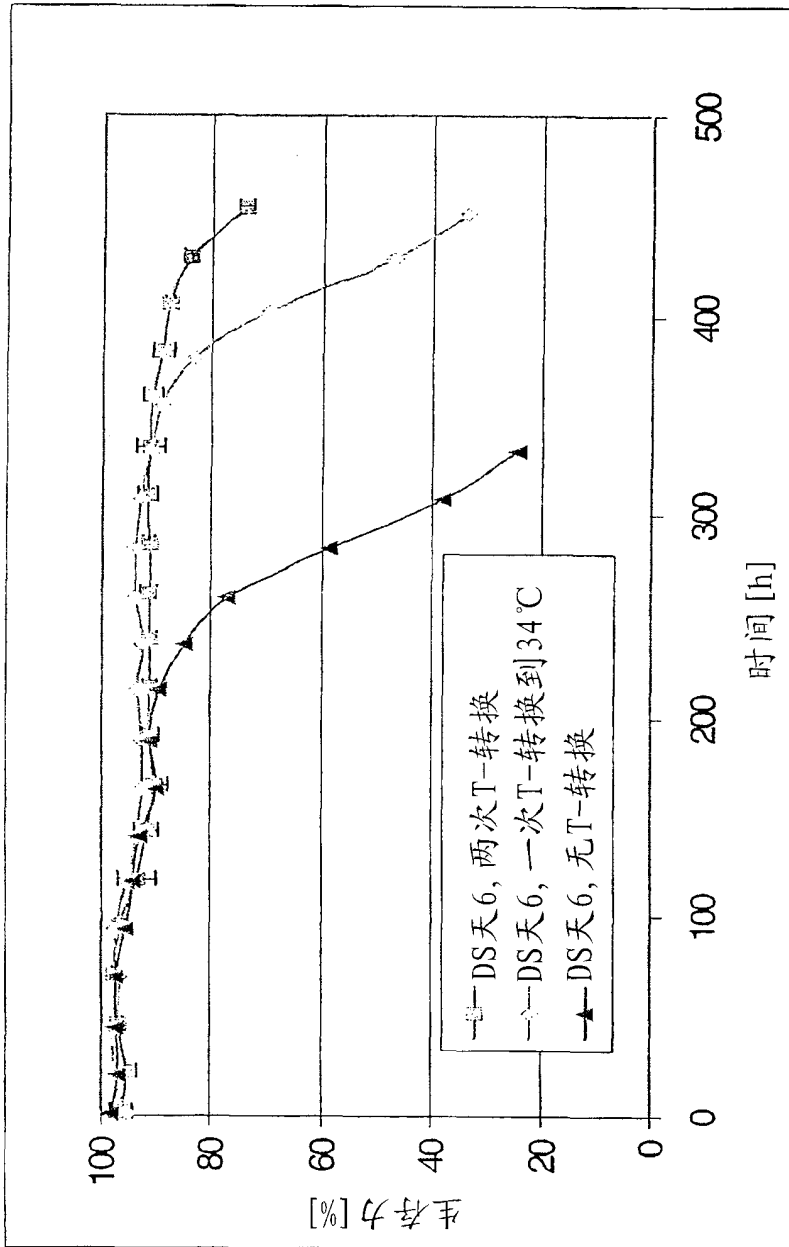


图 18

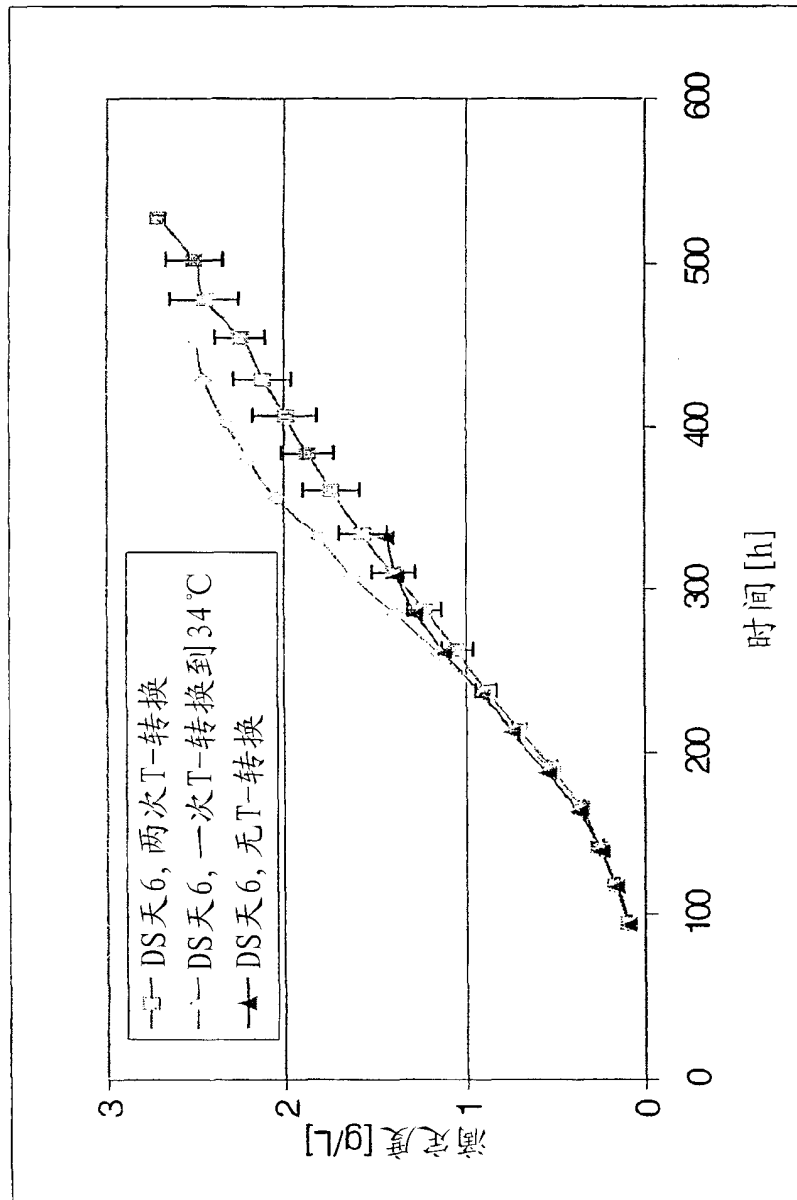


图 19