

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成22年11月4日 (2010.11.4)

【公表番号】特表2010-503397(P2010-503397A)

【公表日】平成22年2月4日 (2010.2.4)

【年通号数】公開・登録公報2010-005

【出願番号】特願2009-528309(P2009-528309)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/00 F

C 1 2 N 5/00 E

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成22年9月13日 (2010.9.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A 部、B 部、及び C 部を含み、

a) A 部は、以下の成分、すなわち炭酸水素ナトリウム、緩衝剤、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、重量オスモル濃度調節剤、界面活性剤及び単糖グルコースを含まない、改変基本培地から本質的になり、

b) B 部は、無機鉄源から本質的になり、及び

c) C 部は、組換え増殖因子、緩衝剤、重量オスモル濃度調節剤、エネルギー源、及び少なくとも 2 種類の非動物加水分解物を含む、
無血清細胞培地。

【請求項 2】

A 部が、非鉄 (I I) 金属イオン、ビタミン、又は両方の組合せを更に含む、又は

B 部の無機鉄源が、クエン酸鉄 (I I I) である、又は

C 部の組換え増殖因子が、インスリン又は組換え類似体 I G F - 1、及びインスリンと I G F - 1 の組合せからなる群から選択される、又は

改変基本培地から除外される緩衝剤が、H E P E S 緩衝剤である、又は

C 部の緩衝剤が、リン酸緩衝液、H E P E S、及び炭酸水素ナトリウムを含む、又は

C 部が、アスパラギン、グルタミン、又はグルタミンとアスパラギンを更に含む、又は

C 部の重量オスモル濃度調節剤が、N a C l である、又は

C 部のエネルギー源が、単糖である、又は

C 部の少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物、及び動物系でも植物系でもない加水分解物である、

請求項 1 に記載の細胞培地。

【請求項 3】

B部の無機鉄源がクエン酸鉄(III)であり、細胞培地が最終溶液濃度約122.5 mg/L又は0.5 mMのクエン酸鉄(III)を含む、請求項2に記載の細胞培地。

【請求項4】

C部の組換え増殖因子が、インスリン又は組換え類似体であり、細胞培地が約4 mg/Lから13 mg/Lのインスリン又はその組換え類似体を含む、請求項2に記載の細胞培地。

【請求項5】

C部の緩衝剤が、リン酸緩衝剤、HEPES及び炭酸水素ナトリウムを含み、及び細胞培地が、約1.6 g/L炭酸水素ナトリウムを含む、又は細胞培地が、約1.8 g/L HEPESを含む、又はリン酸緩衝剤が、約0.01から0.5 g/Lのリン酸ナトリウム及びリン酸水素ナトリウムを含む、請求項2に記載の細胞培地。

【請求項6】

C部の重量オスモル濃度調節剤がNaClであり、細胞培地が約1.0から6.5 g/Lを含む、請求項2に記載の細胞培地。

【請求項7】

C部のエネルギー源が単糖であり、単糖が、グルコース、マルトース、マンノース、ガラクトース及びフルクトースからなる群から選択される、請求項2に記載の細胞培地。

【請求項8】

グルコースがD-グルコースであり、約7.0 g/L以下のグルコースを含む、請求項7に記載の細胞培地。

【請求項9】

C部の少なくとも2種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物、及び動物系でも植物系でもない加水分解物であり、植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項2に記載の細胞培地。

【請求項10】

メトトレキサート、細胞保護剤、界面活性剤、又はL-グルタミンを更に含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の細胞培地。

【請求項11】

約100 nMから5000 nMのメトトレキサートを更に含む、請求項10に記載の細胞培地。

【請求項12】

界面活性剤を更に含み、界面活性剤がメチルセルロース又はPluronicポリオールである、請求項10に記載の細胞培地。

【請求項13】

PluronicポリオールがPluronic F-68である、請求項12に記載の細胞培地。

【請求項14】

pHが7.1から7.3の範囲であるか、又は重量オスモル濃度が320から450 mOsm/kgの範囲である、請求項1から9のいずれか一項に記載の細胞培地。

【請求項15】

請求項1から9のいずれか一項に記載の細胞培地中で哺乳動物細胞を培養することを含む、タンパク質を製造する方法。

【請求項16】

哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

タンパク質が抗体である、請求項15又は16に記載の方法。

【請求項18】

抗体が、抗TNF抗体、抗IL-12抗体、抗IL-18抗体、及び抗EPO受容体

(EPO-R)抗体からなる群から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

- a) 基本培地、
 - b) 約8 - 12 ml / kg 又は 116 - 126 mg / L クエン酸鉄 (III)、
 - c) 約2 - 6 mg / kg 組換えヒトインスリン、
 - d) 約2 - 5 g / kg 無水グルコース、
 - e) 約0.1 - 0.5 g / kg L - グルタミン、
 - f) 約1 - 3 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
 - g) 約0.01 - 0.05 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
 - h) 約0.4 から 0.5 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、及び
 - i) 約1.0 - 3.0 g / kg 酵母系加水分解物
- を含む、無血清細胞培地。

【請求項20】

- a) 約8 から 12 ml / kg 又は 122.45 mg / L クエン酸鉄 (III)、
 - b) 約4 から 8 mL / kg 又は 10 から 14 mg / kg 組換えヒトインスリン、
 - c) 約5 から 9 g / kg 無水グルコース、
 - d) 約0.5 から 0.7 g / kg L - グルタミン、
 - e) 約1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
 - f) 約1 から 2 g / kg HEPES、
 - g) 約2 から 3 g / kg NaCl、
 - h) 約0.5 から 2 g / kg Pluronic F - 68、
 - i) 約0.01 から 0.1 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
 - j) 約0.4 から 0.5 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
 - k) 約8 から 12 g / kg 酵母系加水分解物、及び
 - l) 約60 から 70 g / kg 植物系加水分解物
- を含む、請求項1に記載の無血清細胞培地。

【請求項21】

- a) 約8 から 12 ml / kg 又は 122.45 mg / L クエン酸鉄 (III)、
 - b) 約3 から 5 mL / kg 又は 6 から 8 mg / kg 組換えヒトインスリン、
 - c) 約5 から 9 g / kg 無水グルコース、
 - d) 約0.1 から 2 g / kg L - グルタミン、
 - e) 約1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
 - f) 約1 から 2 g / kg HEPES、
 - g) 約2 から 3 g / kg NaCl、
 - h) 約0.1 から 2 g / kg Pluronic F - 68、
 - i) 約0.01 から 0.1 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
 - j) 約0.4 から 0.5 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
 - k) 約0.4 から 0.5 g / kg L - アスパラギン-水和物、
 - l) 約2 から 6 g / kg 酵母系加水分解物、及び
 - m) 約2 から 4 g / kg 植物系加水分解物
- を含む、請求項1に記載の無血清細胞培地。

【請求項22】

約2.50 mL / kg メトトレキサートを更に含む、請求項19から21のいずれか一項に記載の細胞培地。

【請求項23】

請求項19、20又は21に記載の細胞培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養することを含む、タンパク質を製造する方法。

【請求項24】

哺乳動物細胞がCHO細胞であり、又はタンパク質が抗体である、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

- a) 約 8 から 10 ml / kg 又は 120 から 130 mg / L クエン酸鉄 (I I I)、
- b) 約 3 から 5 ml / kg 又は 7 . 8 mg / kg 組換えヒトインスリン、
- c) 約 5 から 9 g / kg 無水グルコース、
- d) 約 0 . 8 から 0 . 9 g / kg L - グルタミン、
- e) 約 0 . 3 から 0 . 5 g / kg L - アスパラギンー水和物、
- f) 約 1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
- g) 約 1 から 2 g / kg HEPES、
- h) 約 2 から 3 g / kg NaCl、
- i) 約 0 . 5 から 2 g / kg Pluronic F - 68、
- j) 約 0 . 01 から 0 . 1 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
- k) 約 0 . 1 から 1 . 0 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
- l) 約 2 から 6 g / kg 酵母系加水分解物、及び
- m) 約 2 から 4 g / kg 植物系加水分解物

を含む、請求項 1 に記載の細胞培地。

【請求項 26】

- a) 基本細胞増殖培地、
- b) 約 8 から 12 ml / kg 又は 120 から 130 mg / L クエン酸鉄 (I I I)、
- c) 約 2 から 6 mg / kg 組換えヒトインスリン、
- d) 約 150 から 250 g / kg 無水グルコース、
- e) 約 0 . 1 から 0 . 5 g / kg L - グルタミン、
- f) 約 1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、及び
- g) 約 5 から 15 g / kg 酵母系加水分解物

を含む、無血清細胞培地。

【請求項 27】

メトトレキサートを更に含む、請求項 25 又は 26 に記載の細胞培地。

【請求項 28】

請求項 25 から 27 のいずれか一項に記載の細胞培地中で、タンパク質をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養することを含む、タンパク質を製造する方法。

【請求項 29】

タンパク質が抗体である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

哺乳動物細胞が CHO 細胞である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

- a) 基本細胞増殖培地、
- b) 約 8 から 12 ml / kg 又は 120 から 130 mg / L クエン酸鉄 (I I I)、
- c) 約 2 から 6 mg / kg 組換えヒトインスリン、
- d) 約 1 から 3 g / kg 無水グルコース、
- e) 約 0 . 1 から 1 g / kg L - グルタミン、
- f) 約 1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、及び
- g) 約 1 から 4 g / kg 酵母系加水分解物

を含む、無血清細胞培地。

【請求項 32】

メトトレキサートを更に含む、又は
 約 7 . 10 から 7 . 30 の pH を有する、又は
 約 300 から 340 mosm / kg の重量オスモル濃度を有する、又は
 少なくとも 8 g / kg の酵母系加水分解物を含む、請求項 31 に記載の細胞培地。

【請求項 33】

請求項 29 又は 30 に記載の細胞培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養することを含む、タンパク質を製造する方法。

【請求項 34】

- a) 約 8 から 12 ml / kg 又は 120 から 130 mg / L クエン酸鉄 (III)、
- b) 約 2.5 から 4.5 ml / kg 又は 7.8 mg / kg 組換えヒトインスリン、
- c) 約 5 から 9 g / kg 無水グルコース、
- d) 約 0.5 から 1 g / kg L - グルタミン、
- e) 約 0.1 から 1 g / kg L - アスパラギンー水和物、
- f) 約 1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
- g) 約 1 から 2 g / kg HEPES、
- h) 約 1 から 4 g / kg NaCl、
- i) 約 0.1 から 2 g / kg Pluronic F - 68、
- j) 約 0.01 から 0.1 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
- k) 約 0.1 から 1 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
- l) 約 2 から 6 g / kg 酵母系加水分解物、及び
- m) 約 2 から 6 g / kg 植物系加水分解物

を含む、請求項 1 に記載の細胞培地。

【請求項 35】

約 7.10 から 7.20 の pH、又は約 373 から 403 mOsm / kg の重量オスモル濃度を有する、請求項 34 に記載の細胞培地。

【請求項 36】

- a) 約 8 から 12 ml / kg 又は 120 から 130 mg / L クエン酸鉄 (III)、
- b) 約 4 から 8 ml / kg 又は 10 から 14 mg / kg 組換えヒトインスリン、
- c) 約 5 から 9 g / kg 無水グルコース、
- d) 約 0.1 から 1 g / kg L - グルタミン、
- e) 約 1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
- f) 約 1 から 2 g / kg HEPES、
- g) 約 1 から 3 g / kg NaCl、
- h) 約 0.5 から 2 g / kg Pluronic F - 68、
- i) 約 0.01 から 0.1 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
- j) 約 0.1 から 1 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
- k) 約 8 から 12 g / kg 酵母系加水分解物、及び
- l) 約 6 から 8 g / kg 植物系加水分解物

を含む、請求項 1 に記載の細胞培地。

【請求項 37】

約 7.10 から 7.20 の pH、又は約 373 から 403 mOsm / kg の重量オスモル濃度を有する、請求項 35 又は 36 に記載の細胞培養産生培地。

【請求項 38】

- a) 約 8 から 12 ml / kg 又は 110 から 130 mg / L クエン酸鉄 (III)、
- b) 約 4 から 8 ml / kg 又は 11 から 15 mg / kg 組換えヒトインスリン、
- c) 約 5 から 9 g / kg 無水グルコース、
- d) 約 0.1 から 1 g / kg L - グルタミン、
- e) 約 1 から 2 g / kg 炭酸水素ナトリウム、
- f) 約 1 から 2 g / kg HEPES、
- g) 約 1 から 3 g / kg NaCl、
- h) 約 0.1 から 2 g / kg Pluronic F - 68、
- i) 約 0.01 から 0.1 g / kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、
- j) 約 0.1 から 1 g / kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、
- k) 約 12 から 16 g / kg 酵母系加水分解物、及び
- l) 約 8 から 10 g / kg 植物系加水分解物

を含む、請求項 1 に記載の細胞培地。

【請求項 39】

メトトレキサートを更に含む、請求項 36 から 38 のいずれか一項に記載の細胞培養産生培地。

【請求項 40】

請求項 36 から 38 のいずれか一項に記載の細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養することを含む、抗体を製造する方法。

【請求項 41】

植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 19、20、21、25、34、36 又は 38 のいずれか一項に記載の細胞培地。

【請求項 42】

請求項 1 から 14、19 から 22、25 から 27、31、32、及び 36 から 39 のいずれか一項に記載の細胞培地中のチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞。

【請求項 43】

タンパク質が製造されるように、

a) 細胞培養産生培地を含む細胞培養物中で、タンパク質をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b) ある期間中、加水分解物濃縮溶液及び基本濃縮溶液を細胞培養物に添加することによって、哺乳動物細胞を培養すること
を含み、

加水分解物濃縮溶液が少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む、タンパク質を製造する流加培養法。

【請求項 44】

基本濃縮溶液が高濃度基本培地を含む、又は基本濃縮溶液が基本培地、アスパラギン及びグルコースを含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

基本培地が PF CHO である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である、又は

タンパク質が抗体である、又は

加水分解物濃縮溶液が、植物由来でも動物由来でもない第 1 の加水分解物と、第 2 の植物系加水分解物とを含む、請求項 43 から 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

加水分解物濃縮溶液が、植物由来でも動物由来でもない第 1 の加水分解物と、第 2 の植物系加水分解物とを含み、植物由来でも動物由来でもない加水分解物、及び植物系加水分解物が、酵母系加水分解物である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

抗 TNF 抗体が製造されるように、

a) 細胞培養産生培地を含む細胞培養物中で、抗 TNF 抗体をコードする核酸を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を培養すること、及び

b) ある期間中、加水分解物濃縮溶液及び基本濃縮溶液を細胞培養物に添加することによって、CHO 細胞を培養すること
を含み、

基本濃縮溶液が基本培地、アスパラギン及びグルコースを含み、

加水分解物濃縮溶液が少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む、抗 TNF 抗体を製造する流加培養法。

【請求項 50】

段階 a) の細胞培養産生培地が少なくとも 2.0 g/L のグルコースを含み、前記段階においてグルコース濃度は、少なくとも 2.0 g/L のグルコース濃度を維持するのに必要なグルコースを細胞培養産生培地に添加することによって調節される、請求項 49 に記

載の流加培養法。

【請求項 5 1】

抗 T N F 抗体を回収することを更に含む、又は
細胞培養物が約 3 2 から 3 8 の温度で培養され、
細胞培養産生培地が溶存酸素 2 0 から 6 5 % で維持され、
細胞培養産生培地の重量オスモル濃度が、培養を通して 5 0 0 m O s m 以下に維持され

、
加水分解物濃縮溶液が、植物由来でも動物由来でもない第 1 の加水分解物と、第 2 の植物系加水分解物とを含み、

加水分解物濃縮溶液が、約 5 0 - 2 8 0 g / k g のダイズ系加水分解物と、約 7 5 - 3 0 0 g / k g の酵母系加水分解物とから本質的になり、

基本培地が P F C H O である、又は

基本濃縮溶液が約 9 . 0 から 1 0 . 5 の p H を有する、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

細胞培養物が約 3 2 から 3 8 の範囲の温度で培養され、培養温度が約 3 5 である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞培養産生培地が溶存酸素 2 0 - 6 5 % で維持され、溶存酸素が約 3 0 % で維持される、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

加水分解物濃縮溶液が、植物由来でも動物由来でもない第 1 の加水分解物と第 2 の植物系加水分解物とを含み、植物由来でも動物由来でもない加水分解物及び植物系加水分解物が酵母系加水分解物である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

期間が約 9 から 1 5 日間である、又は

基本濃縮溶液が、期間の以下の日、すなわち 4 日目、6 日目、9 日目及び 1 1 日目の少なくとも 1 日に細胞培養産生培地に添加される、又は

加水分解物濃縮溶液が、期間の 4 日目、7 日目、又は 4 日目と 7 日目に細胞培養産生培地に添加される、又は

方法が細胞培養産生培地の p H を p H 線形勾配に従って調節することを更に含み、p H 線形勾配が約 7 . 1 から 7 . 2 の p H から出発し、約 6 . 9 の最終 p H に帰結する、請求項 5 1 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

方法が細胞培養産生培地の p H を p H 線形勾配に従って調節することを更に含み、

p H 線形勾配が約 7 . 1 から 7 . 2 の p H から出発し、約 6 . 9 の最終 p H に帰結することを含み、

p H 線形勾配が少なくとも約 2 4 時間、少なくとも約 4 8 時間、及び約 7 2 時間からなる群から選択される時間に亘り調節される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

細胞培養産生培地が、

a) 以下の成分、すなわち炭酸水素ナトリウム、緩衝剤、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、重量オスモル濃度調節剤、界面活性剤及び単糖グルコースを含まない、改変基本培地、

b) 約 8 から 1 0 m l / k g 又は 1 1 0 から 1 3 0 m g / L クエン酸鉄 (I I I) 、

c) 約 4 から 8 m l / k g 又は 1 0 から 1 4 m g / k g 組換えヒトインスリン、

d) 約 5 から 9 g / k g 無水グルコース、

e) 約 0 . 1 から 1 g / k g L - グルタミン、

- f) 約 1 から 3 g / k g 炭酸水素ナトリウム、
- g) 約 1 から 3 g / k g H E P E S 、
- h) 約 2 から 3 g / k g N a C l 、
- i) 約 0 . 1 から 2 g / k g P l u r o n i c F - 6 8 、
- j) 約 0 . 0 1 から 0 . 1 g / k g N a H ₂ P O ₄ ・ H ₂ O 、
- k) 約 0 . 1 から 0 . 1 g / k g N a ₂ H P O ₄ ・ 7 H ₂ O 、
- l) 約 8 から 1 2 g / k g 酵母系加水分解物、及び
- m) 約 6 から 8 g / k g 植物系加水分解物

を含む、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 9】

哺乳動物細胞が C H O 細胞である、又は細胞培養物が大規模細胞培養物である、請求項 4 9 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

細胞培養物が大規模細胞培養物であり、大規模細胞培養物が約 1 0 L を超える、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

抗 I L - 1 2 抗体が製造されるように、

a) 細胞培養産生培地を含む細胞培養物中で、抗体をコードする核酸を含む C H O 細胞を培養すること、

b) ある期間中、加水分解物濃縮溶液及び基本濃縮溶液を細胞培養物に添加することによって、C H O 細胞を培養すること
を含み、

基本濃縮溶液が基本培地、アスパラギン及びグルコースを含み、

加水分解物濃縮溶液が少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む、
抗 I L - 1 2 抗体を製造する流加培養法。

【請求項 6 2】

加水分解物濃縮溶液が、グルコースを更に含む、又は

方法が、抗 I L - 1 2 抗体を回収することを更に含む、又は

細胞培養物が、約 3 2 から 3 8 の範囲の温度で培養される、又は

培養温度が約 3 3 である、又は

細胞培養産生培地が、2 0 - 6 5 % の間の溶存酸素で維持される、又は

細胞培養産生培地が、約 6 . 7 から 7 . 2 の p H を有する、又は

加水分解物濃縮溶液が、植物由来でも動物由来でもない加水分解物と植物系加水分解物とを含む、又は

加水分解物濃縮溶液が、約 5 0 - 2 2 5 g / k g のダイズ系加水分解物、約 7 5 - 3 0 0 g / k g の酵母系加水分解物、及び約 2 から 3 g / L グルコースから本質的になる、又は

基本濃縮溶液が、基本培地、アスパラギン及びグルコースを含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

細胞培養産生培地が溶存酸素 2 0 - 6 5 % で維持され、溶存酸素が約 4 0 % 溶存酸素で維持される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

加水分解物濃縮溶液が、植物由来でも動物由来でもない加水分解物と植物系加水分解物とを含み、植物由来でも動物由来でもない加水分解物が酵母系加水分解物である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

基本濃縮溶液が、基本培地、アスパラギン及びグルコースを含み、

基本濃縮溶液が、約 9.7 の pH、及び約 1400 から 1500 mOsm の重量オスモル濃度を有する、又は

基本濃縮溶液中の基本培地が PFCHO である、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 67】

期間が 14 - 15 日間である、又は

基本濃縮溶液が、期間の 5 日目から 1 日おきに細胞培養産生培地に添加される、又は

加水分解物濃縮溶液が、期間の 6 日目から毎日、細胞培養産生培地に添加される、又は

基本濃縮溶液及び加水分解物濃縮溶液が、期間の 5 日目から毎日、細胞培養産生培地に添加される、請求項 61 から 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

細胞培養産生培地が、

a) 以下の成分、すなわち炭酸水素ナトリウム、緩衝剤、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、重量オスモル濃度調節剤、界面活性剤及び単糖グルコースを含まない、改変基本培地、

b) 約 8 から 12 ml/kg 又は 110 から 130 mg/L クエン酸鉄(III)、

c) 約 5 から 8 mL/kg 又は 11 から 15 mg/kg 組換えヒトインスリン、

d) 約 5 から 9 g/kg 無水グルコース、

e) 約 0.1 から 1 g/kg L-グルタミン、

f) 約 1 から 2 g/kg 炭酸水素ナトリウム、

g) 約 1 から 2 g/kg HEPES、

h) 約 2 から 3 g/kg NaCl、

i) 約 0.1 から 2 g/kg Pluronic F-68、

j) 約 0.01 から 0.1 g/kg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、

k) 約 0.1 から 1 g/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、

l) 約 6 から 12 g/kg 酵母系加水分解物、及び

m) 約 6 から 8 g/kg 植物系加水分解物

を含む、請求項 61 から 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

細胞培養物が大規模細胞培養物であり、大規模細胞培養物が 10 L を超える、請求項 61 から 68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

a) グルコース、

b) 基本培地、

c) グルタミン以外のアミノ酸、及び

d) 少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物

を含み、

供給溶液が約 6.0 から 8.0 の pH を有する、

組合せ供給溶液。

【請求項 71】

組合せ供給溶液が約 100 から 250 g/kg グルコースを含む、又は

アミノ酸がアスパラギンである、又は

少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物、及び動物系でもない加水分解物である、又は

基本培地が PF-CHO 又は DMEM/F12 のいずれかである、又は

基本細胞培地が、改変基本培地であり、以下の成分、すなわち炭酸水素ナトリウム、緩衝剤、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、重量オスモル濃度調節剤、界面活性剤、グルタミン及びグルコースを含まない、請求項 70 に記載の組合せ供給溶液。

【請求項 72】

アミノ酸がアスパラギンであり、組合せ供給溶液が約 1.0 から 15.0 g のアスパラギンを含む、請求項 71 に記載の組合せ供給溶液。

【請求項 7 3】

アミノ酸がアスパラギンであり、組合せ供給溶液が約 3 . 0 から 5 . 0 g / k g アスパラギンを含む、請求項 7 1 に記載の組合せ供給溶液。

【請求項 7 4】

少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物及び動物系でも植物系でもない加水分解物であり、動物系でも植物系でもない加水分解物が酵母系加水分解物である、請求項 7 1 に記載の組合せ供給溶液。

【請求項 7 5】

少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物及び動物系でも植物系でもない加水分解物であり、植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 7 1 に記載の組合せ供給溶液。

【請求項 7 6】

約 1 5 N T U 未満の濁度を更に有する、請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の組合せ供給溶液。

【請求項 7 7】

請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の組合せ供給溶液を添加することを含む、細胞培養産生培地の定常グルコースレベルを維持する方法。

【請求項 7 8】

a) グルコースと基本細胞培地を組み合わせることで溶液にすること、
b) a) の溶液の pH を約 9 . 5 から 1 0 . 5 に調節すること、
c) 少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を b) の溶液に添加すること、及び
d) 組合せ供給溶液が約 6 . 5 から 7 . 5 の pH を有するように、c) の溶液の pH を調節すること

を含む、基本培地、グルコース及び少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む組合せ供給溶液を製造する方法。

【請求項 7 9】

段階 c) が、動物系でも植物系でもない第 1 の加水分解物と、第 2 の植物系加水分解物とを添加することを含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

動物系でも植物系でもない加水分解物が酵母系加水分解物であり、又は植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

少なくとも約 1 . 5 g / L の抗体が製造されるように、

a) 細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b) 約 6 . 7 から 7 . 2 の pH を有する組合せ供給溶液を細胞培養産生培地に添加すること (組合せ供給溶液は、グルコース、基本細胞培地、グルタミン以外のアミノ酸、及び少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む)

を含む、哺乳動物細胞培養物から少なくとも約 1 . 5 g / L の抗体を製造する方法。

【請求項 8 2】

組合せ供給溶液が約 1 0 0 から 2 5 0 g / k g グルコースを含む、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

抗体が、少なくとも 2 g / L、少なくとも 4 g / L、少なくとも 5 g / L、及び約 6 g / L からなる群から選択される濃度で製造される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

製造される抗体の力価が、段階 b) を含まずに段階 a) によって培養された対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 5 0 % 高く製造されるように、

a) 細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b) 約 6.7 から 7.2 の pH を有する組合せ供給溶液を細胞培養産生培地に添加すること（組合せ供給溶液は、グルコース、基本細胞培地、グルタミン以外のアミノ酸、及び少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む）

を含む、哺乳動物細胞培養物から産生される抗体の力価を増加させる方法。

【請求項 85】

製造される抗体の力価が、対照よりも少なくとも 100 % 高いこと、及び対照よりも少なくとも 150 % 高いことからなる群から選択される、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

細胞密度が、少なくとも 2.0×10^6 細胞 / mL、及び約 3.5×10^6 細胞 / mL からなる群から選択される数値に到達したときに、組合せ供給溶液が添加される、請求項 81 から 85 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 87】

抗体が製造されるように、

a) 細胞培養産生培地中で、タンパク質をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b) 細胞培養産生培地中の代謝指標レベルを監視するフィードバック制御系を用いて、組合せ供給溶液を細胞培養産生培地に添加すること（組合せ供給溶液は、フィードバック制御系によって決定される時点で細胞培養産生培地に添加される）

を含む、哺乳動物細胞培養物中でタンパク質を製造する方法。

【請求項 88】

哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

代謝指標がグルコース又はグルタミンである、請求項 87 又は 88 に記載の方法。

【請求項 90】

供給溶液が、グルコース、基本細胞培地、グルタミン以外のアミノ酸、及び少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物を含む組合せ供給溶液である、請求項 87 又は 88 に記載の方法。

【請求項 91】

タンパク質が抗体である、請求項 87 又は 88 に記載の方法。

【請求項 92】

抗体が、少なくとも 1.5 g / L、及び少なくとも 2 g / L からなる群から選択される力価で製造される、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

組合せ供給溶液が、約 3.0 から 12.5 g / kg アスパラギンを含む、又は少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物、及び動物系でも植物系でもない加水分解物を含む、又は

組合せ供給溶液が、約 100 から 200 g / kg グルコースを含む、又はグルコース濃度が約 0.25 から 20.0 g / L の間に維持されるように、方法が細胞培地中のグルコース濃度を監視することを更に含む、

請求項 81 から 86 及び 90 に記載の方法。

【請求項 94】

少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物、及び動物系でも植物系でもない加水分解物を含み、動物系でも植物系でもない加水分解物が酵母系加水分解物である、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

少なくとも 2 種類の非動物系加水分解物が、植物系加水分解物及び動物系でも植物系でもない加水分解物を含み、植物系加水分解物がダイズ系加水分解物である、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 96】

グルコース濃度が約 0.25 から 20.0 g/L の間に維持されるように細胞培地中のグルコース濃度を監視することを更に含み、グルコースレベルが自動試料採取装置を用いて監視される、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 97】

供給プロファイルが決定されるように、

a) 細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b) 細胞培養産生培地中の代謝指標を監視するフィードバック制御系を用いて、組合せ供給溶液を細胞培養産生培地に添加すること（組合せ供給溶液は、目標代謝指標設定値に適合するように細胞培養産生培地に添加される）、及び

c) 1 日あたりに細胞培養産生培地に添加される組合せ供給溶液の量を決定することを含む、哺乳動物細胞培養物中でタンパク質を産生するための供給プロファイルを決定する方法。

【請求項 98】

代謝指標がグルコース又はグルタミンである、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

請求項 97 に記載の供給プロファイルに従って、組合せ供給溶液を哺乳動物細胞培養物に添加することを含む、哺乳動物細胞培養物中でタンパク質を製造する流加培養法。

【請求項 100】

抗体が少なくとも 100 mg/L の力価で製造されるように、

a) 細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、

b) 酪酸ナトリウム、N - アセチルシステイン又はこれらの組合せを細胞培地に添加すること（酪酸ナトリウムを約 0.1 mM から 10 mM の最終濃度まで添加し、N - アセチルシステインを約 1 mM から 80 mM の最終濃度まで添加する）

を含む、抗体の力価が少なくとも 100 mg/L であるように、哺乳動物細胞培養物中で抗体を製造する方法。

【請求項 101】

抗体の力価が、少なくとも 150 mg/L、少なくとも 200 mg/L、少なくとも 250 mg/L、少なくとも 300 mg/L、及び少なくとも 400 mg/L からなる群から選択される、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

抗体の力価が対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 10 % 高くなるように（対照哺乳動物細胞培養は、段階 a）を含むが、段階 b）を含まない）、

a) 細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b) 酪酸ナトリウム、N - アセチルシステイン又はこれらの組合せを細胞培地に添加すること（酪酸ナトリウムを約 0.1 mM から 10 mM の最終濃度まで添加し、N - アセチルシステインを約 1 mM から 80 mM の最終濃度まで添加する）

を含む、抗体の力価が対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 10 % 高くなるように、哺乳動物細胞培養物中で抗体を製造する方法。

【請求項 103】

哺乳動物細胞培養物の抗体力価が、対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 29 %、対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 40 %、対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 70 %、及び対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 90 % からなる群から選択される数値で向上する、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

酪酸ナトリウム、N - アセチルシステイン又はこれらの組合せが、哺乳動物細胞培養物の増殖期中、又は培養時間の 4 日目から 7 日目、又は

培養時間の 0 日目に、哺乳動物細胞培養物に添加される、請求項 100 から 103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

酪酸ナトリウムの最終濃度が約 0.1 mM から 10 mM である、請求項 100 から 103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

N - アセチルシステインの最終濃度が約 20 mM から 60 mM である、請求項 100 から 103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

哺乳動物細胞培養物の寿命が、対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 35 % 延長されるように（対照哺乳動物細胞培養は、段階 a）を含むが、段階 b）を含まない）、

a）細胞培養産生培地中で、抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養すること、及び

b）約 1 mM から 80 mM N - アセチルシステインを細胞培地に添加することを含む、哺乳動物細胞培養物の寿命を対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも 35 % 延長する方法。

【請求項 108】

哺乳動物細胞培養物の寿命が、対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも約 45 %、及び対照哺乳動物細胞培養物よりも少なくとも約 55 % からなる群から選択される数値で延長される、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

最終濃度約 8 mM の N - アセチルシステインを細胞培養産生培地に添加することを含む、請求項 107 から 108 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 110】

抗体が、抗 TNF 抗体である、請求項 19、20、21、81、84 又は 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

抗 TNF 抗体が、完全ヒト抗 TNF 抗体である、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

完全ヒト抗 TNF 抗体が、D2E7（アダリムマブ）である、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

抗 TNF 抗体が、完全ヒト抗 TNF 抗体である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 114】

完全ヒト抗 TNF 抗体が、D2E7（アダリムマブ）である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

抗体が、抗 IL - 12 抗体である、請求項 25、26、27、81、84 又は 87 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 116】

抗 IL - 12 抗体が、完全ヒト抗 IL - 12 抗体である、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

完全ヒト抗 IL - 12 抗体が、ABT - 874 である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

抗 IL - 12 抗体が、完全ヒト抗 IL - 12 抗体である、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 119】

完全ヒト抗 IL - 12 抗体が、ABT - 874 である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 120】

抗体が、抗 IL - 18 抗体である、請求項 36、38、81、84、87 又は 109 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

抗体が、A B T - 3 2 5 である、請求項 1 2 0 に記載の方法。