

【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20年10月23日(2008.10.23)

【公表番号】特表2008-511330(P2008-511330A)

【公表日】平成20年4月17日(2008.4.17)

【年通号数】公開・登録公報2008-015

【出願番号】特願2007-530167(P2007-530167)

【国際特許分類】

C 12 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 12 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】平成20年8月26日(2008.8.26)

【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】

大規模生産細胞培養におけるTNFR- Igの製造方法であって、下記工程：

細胞培養条件下で発現し、TNFR- Igをコードする遺伝子を含有する哺乳動物細胞；および

グルタミンを含有し、(i)約70mMを超える単位体積あたりの累積アミノ酸量、(ii)約2未満の累積アスパラギンに対するモル累積グルタミン比、(iii)約0.2未満の総累積アミノ酸に対するモル累積グルタミン比、(iv)約0.4～1の総累積アミノ酸に対するモル累積無機イオン比、(v)約16mMを超える単位体積あたりのグルタミンおよびアスパラギンを合わせた累積量、およびその組合せからなる群から選択される培地特性を有する培地；

を含む細胞培養物を供給すること；

初期成長フェーズにおいて、該培養物が第1の培養条件下に維持された場合に、可能な最大生存細胞密度の約20%～80%の範囲内の生存細胞密度まで該細胞に再生産させるのに十分な第1の期間、第1の培養条件下で該培養物を維持すること；

少なくとも1つの培養条件を変更して、第2の培養条件を適用すること；

第2の条件下、第2の期間、該培養物を維持して、TNFR- Igを細胞培養物中に堆積させること；

を含む方法。

【請求項2】

大規模生産細胞培養におけるTNFR- Igの製造方法であって、下記工程：

細胞培養条件下で発現し、TNFR- Igをコードする遺伝子を含む哺乳動物細胞；および

累積アスパラギンに対する比が約2未満であるモル累積グルタミンを含有する培地；

ここに、該培地は、グルタミンを含有し；

さらに、該培地は、(i)約70mMを超える単位体積あたりの累積アミノ酸量を含有する培地、(ii)約0.2未満の総累積アミノ酸に対するモル累積グルタミン比、(iii)約0.4～1の総累積アミノ酸に対するモル累積無機イオン比、(iv)約16mMを超える単位体積あたりのグルタミンおよびアスパラギンを合わせた累積量、お

およびその組合せからなる群から選択される 2 つ の培地特性を有する ;
を含む細胞培養物を供給すること ;

初期成長フェーズにおいて、該培養物が第 1 の培養条件下に維持された場合に、可能な最大生存細胞密度の約 20 % ~ 80 % の範囲内の生存細胞密度まで該細胞に再生産させるのに十分な第 1 の期間、第 1 の培養条件下で該培養物を維持すること ;

少なくとも 1 つの培養条件を変更して、第 2 の培養条件を適用すること ;

第 2 の条件下で第 2 の期間、該培養物を維持して、TNFR - Ig を細胞培養物中に堆積させること ;
を含む方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの培養条件を変更する工程における該細胞培養条件が、(i) 温度、(ii) pH、(iii) 重量オスモル濃度、(iv) 化学誘導剤レベル、およびその組合せからなる群から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

該培地の初期グルタミン濃度が 10 mM 以下である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

該培地の初期グルタミン濃度が 4 mM 以下である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

該培地のグルタミンの単位体積あたりの総累積量が 10 mM 以下である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

該培地のグルタミンの単位体積あたりの総累積量が 4 mM 以下である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

グルタミンが、細胞培養の開始時に初期培地にのみ与えられる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

該哺乳動物細胞の初期密度が少なくとも 2×10^5 細胞 / mL である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

該哺乳動物細胞の初期密度が少なくとも 2×10^6 細胞 / mL である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

供給工程が少なくとも約 1000 L の培養物を供給することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

供給工程が少なくとも約 10,000 L の培養物を供給することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

該第 1 の条件が約 30 ~ 42 の第 1 の温度範囲を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

該第 1 の条件が約 37 の第 1 の温度範囲を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

該第 2 の条件が約 25 ~ 41 の第 2 の温度範囲を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

該第 2 の条件が約 29 ~ 35 の第 2 の温度範囲を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

該第 2 の条件が約 31 の第 2 の温度範囲を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

さらに、少なくとも 1 つの培養条件を変更する第 1 の変更に続く、少なくとも 1 つの培養条件を変更し、第 3 の条件を培養物に適用する第 2 の変更段階を含む、請求項 1 記載の

方法。

【請求項 19】

第2の変更段階が、(i)温度、(ii)pH、(iii)重量オスモル濃度、(iv)化学誘導剤レベル、およびその組合せからなる群から選択される、少なくとも1つの培養条件を変更することを含む、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

該第3の条件が約27～37の第3の温度範囲を含む、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

該第1の期間が1～7日である、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

該第1の期間が約4日である、請求項1記載の方法。

【請求項 23】

該第1の期間と第2の期間の合計が少なくとも5日である、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

第2の期間、該培養物を維持する工程において、培地における乳酸レベルが最大限のレベルに到達した後に減少する、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

第2の期間、該培養物を維持する工程において、培地におけるアンモニウムレベルが最大限のレベルに到達した後に減少する、請求項1記載の方法。

【請求項 26】

該生産されたTNFR-Igの総量が、該培地特性を欠くが他は同一の培地における他は同一の条件下で生産されたTNFR-Igの量の少なくとも1.5倍を超える、請求項1記載の方法。

【請求項 27】

該生産されたTNFR-Igの総量が、該培地特性を欠くが他は同一の培地における他は同一の条件下で生産されたTNFR-Igの量の少なくとも2倍を超える、請求項1記載の方法。

【請求項 28】

さらに、該細胞培養物に補足成分を供給する、請求項1記載の方法。

【請求項 29】

該補足成分を複数回供給する、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

該補足成分が、ホルモンおよび/または他の成長因子、特定のイオン（例えば、ナトリウムイオン、塩化物イオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンまたはリン酸イオン）、緩衝液、ビタミン、ヌクレオシドまたはヌクレオチド、微量元素（通常、非常に低い最終濃度で存在する無機化合物）、アミノ酸、脂質またはグルコースあるいは他のエネルギー源からなる群から選択される、請求項28記載の方法。

【請求項 31】

大規模生産細胞培養におけるTNFR-Igの製造方法であって、下記工程：

細胞培養条件下で発現し、TNFR-Igをコードする遺伝子を含有する哺乳動物細胞；および

グルタミンを含有し、(i)約70mMを超える出発アミノ酸濃度、(ii)約2未満のアスパラギンに対するモルグルタミン比、(iii)約0.2未満の総アミノ酸に対するモルグルタミン比、(iv)約0.4～1の総アミノ酸に対するモル無機イオン比、および(v)約16mMを超えるグルタミンとアスパラギンの組合せ濃度からなる群から選択される少なくとも2つの培地特性を有する合成培地；

を含む細胞培養物を供給すること；

初期成長フェーズにおいて、該培養物が第1の培養条件下に維持された場合に、可能な最大生存細胞密度の約20%～80%の範囲内まで該細胞に再生産させるのに十分な第1の期間、第1の培養条件下で該培養物を維持すること；

少なくとも 1 つの培養条件を変更して、第 2 の培養条件を適用すること；
第 2 の条件下、第 2 の期間、該培養物を維持して、TNFR - Ig を細胞培養物中に堆積させること；
を含む方法。

【請求項 3 2】

大規模生産細胞培養における TNFR - Ig の製造方法であって、下記工程：
細胞培養条件下で発現し、TNFR - Ig をコードする遺伝子を含有する哺乳動物細胞；および

グルタミンを含有し、i) 約 70 mM を超える出発アミノ酸濃度、ii) 約 2 未満のアスパラギンに対するモルグルタミン比、iii) 約 0.2 未満の総アミノ酸に対するモルグルタミン比、iv) 約 0.4 ~ 1 の総アミノ酸に対するモル無機イオン比、およびv) 約 16 mM を超えるグルタミンとアスパラギンの組合せ濃度により特徴付けられる合成功地；

を含む細胞培養物を供給すること；

初期成長フェーズにおいて、該培養物が第 1 の培養条件下に維持された場合に、可能な最大生存細胞密度の約 20 % ~ 80 % の範囲内まで該細胞に再生産させるのに十分な第 1 の期間、第 1 の培養条件下で該培養物を維持すること；

少なくとも 1 つの培養条件を変更して、第 2 の培養条件を適用すること；

第 2 の条件下、第 2 の期間、該培養物を維持して、TNFR - Ig を細胞培養物中に堆積させること；
を含む方法。

【請求項 3 3】

該培地が、グルタミンを含有し、(i) 約 70 mM を超える出発アミノ酸濃度、(ii) 約 2 未満の出発アスパラギンに対する出発グルタミン比、(iii) 約 0.2 未満の出発総アミノ酸に対するモル出発グルタミン比、(iv) 約 0.4 ~ 1 の出発総アミノ酸に対するモル出発無機イオン比、(v) 約 16 mM を超える出発グルタミンと出発アスパラギンの組合せ濃度、およびその組合せからなる群から選択される培地特性を有する培地を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

該乳酸レベルが、該培地特性を欠くが他は同一の培地における他は同一の条件下で観察される乳酸レベルよりも低く、

該アンモニウムレベルが、該培地特性を欠くが他は同一の培地における他は同一の条件下で観察されるアンモニウムレベルよりも低く、

生産された TNFR - Ig の総量が、該培地特性を欠くが他は同一の培地における他は同一の条件下で観察される量より少なくとも多い、

請求項 1 ~ 2 または 3 1 ~ 3 3 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 5】

該培養物に、該 TNFR - Ig の生産の間さらなる成分を補足しない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 6】

該培養物において、グルタミンの代わりにグリシルグルタミンを用いる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 7】

該培地における、単位体積あたりのヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシンおよびプロリンの総累積量が約 25 mM を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 8】

該培地における、単位体積あたりのヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシンおよびプロリンの総累積量が約 35 mM を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3 9】

該培地が：

- (i) 約 1.7 mM を超える、単位体積あたりのヒスチジンの総累積量；
- (i i) 約 3.5 mM を超える、単位体積あたりのイソロイシンの総累積量；
- (i i i) 約 5.5 mM を超える、単位体積あたりのロイシンの総累積量；
- (i v) 約 2.0 mM を超える、単位体積あたりのメチオニンの総累積量；
- (v) 約 2.5 mM を超える、単位体積あたりのフェニルアラニンの総累積量；
- (v i) 約 2.5 mM を超える、単位体積あたりのプロリンの総累積量；
- (v i i) 約 1.0 mM を超える、単位体積あたりのトリプトファンの総累積量；
- (v i i i) 約 2.0 mM を超える、単位体積あたりのチロシンの総累積量；および
- (i x) 約 2.5 mM を超える、単位体積あたりのプロリンの総累積量、

からなる群から選択される培地特性を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 0】

該培地における単位体積あたりのセリンの総累積量が約 10 mM を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 1】

該培地における単位体積あたりのアスパラギンの総累積量が約 8 mM を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 2】

該培地における単位体積あたりのアスパラギンの総累積量が約 12 mM を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

該培地における単位体積あたりのリンの総累積量が約 5 mM を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 4】

該培地における単位体積あたりのグルタミン酸塩の総累積量が約 1 mM 未満である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 5】

該培地における単位体積あたりのパントテン酸カルシウムの総累積量が約 20 mg / L を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 6】

該培地における単位体積あたりのニコチニアミドの総累積量が約 25 mg / L を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 7】

該培地における単位体積あたりのピリドキシンおよびピリドキサルの総累積量が約 35 mg / L を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 8】

該培地における単位体積あたりのリボフラビンの総累積量が約 2.0 mg / L を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4 9】

該培地における単位体積あたりのチアミン塩酸塩の総累積量が約 35 mg / L を超える、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5 0】

大規模生産細胞培養における TNFR - Fc の製造方法であって、下記工程：

細胞培養条件下で発現し、TNFR - Fc をコードする遺伝子を含有する哺乳動物細胞；および

グルタミンを含有し、(i) 約 70 mM を超える単位体積あたりの累積アミノ酸量、(i i) 約 2 未満の累積アスパラギンに対するモル累積グルタミン比、(i i i) 約 0.2 未満の総累積アミノ酸に対するモル累積グルタミン比、(i v) 約 0.4 ~ 1 の総累積アミノ酸に対するモル累積無機イオン比、(v) 約 16 mM を超える単位体積あたりの

グルタミンおよびアスパラギンを合わせた累積量、およびその組合せからなる群から選択される培地特性を有する培地；

を含む細胞培養物を供給すること；

初期成長フェーズにおいて、該培養物が第1の培養条件下に維持された場合に、可能な最大生存細胞密度の約20%～80%の範囲内の生存細胞密度まで該細胞に再生産させることに十分な第1の期間、第1の培養条件下で該培養物を維持すること；

少なくとも1つの培養条件を変更して、第2の培養条件を適用すること；

第2の条件下、第2の期間、該培養物を維持して、TNFR-Fcを細胞培養物中に堆積させること；

を含む方法。