

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7252896号

(P7252896)

(45)発行日 令和5年4月5日(2023.4.5)

(24)登録日 令和5年3月28日(2023.3.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 P

21/00

C

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P

21/00

B

C 1 2 N 5/00 (2006.01)

C 1 2 P

21/08

C 1 2 N 1/14 (2006.01)

C 1 2 N

5/00

C 1 2 N 1/16 (2006.01)

C 1 2 N

1/14

B

請求項の数 11 (全82頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-544727(P2019-544727)

(86)(22)出願日 平成30年2月16日(2018.2.16)

(65)公表番号 特表2020-507336(P2020-507336
A)

(43)公表日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/000030

(87)国際公開番号 WO2018/151819

(87)国際公開日 平成30年8月23日(2018.8.23)

審査請求日 令和3年2月12日(2021.2.12)

(31)優先権主張番号 62/460,387

(32)優先日 平成29年2月17日(2017.2.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 391003864

ロンザ リミテッド

L O N Z A L I M I T E D

スイス国、3 9 3 0 フィスブ、ロンザ

シュトラッセ(番地なし)

(74)代理人 110000855

弁理士法人浅村特許事務所

(72)発明者 ベリ、ラジェシ

スイス国、フィスブ、ロンザシュトラ

ッセ

審査官 白井 美香保

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的産物バリエントを産生する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単一の容器で、少なくともタンパク質バリエント1およびタンパク質バリエント2を含む複数のタンパク質バリエントを灌流産生培養により作製する方法であって、前記容器は、前記タンパク質バリエント1および前記タンパク質バリエント2の生産を通じて連続的に稼働し、

(a) 第1の条件下で前記容器中の培養培地中で細胞の集団を培養して、前記タンパク質バリエント1を含有する第1のタンパク質バリエント調製物を形成すること；

(b) 前記第1のタンパク質バリエント調製物を回収すること；

(c) 前記第1のタンパク質バリエント調製物から前記タンパク質バリエント1を精製すること；

(d) 産生された前記タンパク質バリエント1の量、前記第1の条件下での培養の継続期間、および培養物の生存率から選択される1つまたは複数の標的パラメータを測定すること；

(e) 前記1つまたは複数の標的パラメータが標的値に到達したら、第2の条件下で前記容器中の培養培地中で前記細胞の集団を培養して、タンパク質バリエント2を含有する第2のタンパク質バリエント調製物を形成すること；

(f) 第2のタンパク質バリエント調製物を回収すること；

(g) 前記第2のタンパク質バリエント調製物から前記タンパク質バリエント2を精製すること；

10

20

を含み、

それによって、少なくとも前記精製されたタンパク質バリエーション 1 および前記精製されたタンパク質バリエーション 2 を含む複数の精製されたタンパク質バリエーションを提供し、

前記タンパク質バリエーション 1 が、物理的特性、化学的特性、生物学的特性、または医薬特性で、前記タンパク質バリエーション 2 とは異なる、

前記方法。

【請求項 2】

(b) のステップの後、前記第 1 の条件下で前記細胞の集団を培養して、追加の前記第 1 のタンパク質バリエーション調製物を形成することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(f) のステップの後、前記第 2 の条件下で前記細胞の集団を培養して、追加の前記第 2 のタンパク質バリエーション調製物を形成することをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記培地を操作して前記第 2 の条件を達成することを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記培地の操作が、以下の 1 つまたは複数の濃縮ボアラスを培養培地へ添加することを含む、請求項 4 に記載の方法：

リジン、ガラクトース、水溶銅化合物、又は N - アセチルアルギニン。

【請求項 6】

前記培地の操作が、前記容器に入れる前記培養培地中の以下のうちの 1 つまたは複数の濃度を増加させることを含む、請求項 4 に記載の方法：

リジン、ガラクトース、水溶銅化合物、又は N - アセチルアルギニン。

【請求項 7】

前記培地の操作が、前記容器の内側の前記培地中の CuSO₄、リジン、N - アセチルアルギニンおよび / またはガラクトースの濃度を増加または低下させることを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記タンパク質バリエーション 1 が、前記タンパク質バリエーション 2 と、糖鎖付加、ガラクトシル化、シアル酸付加、荷電、pI、N 末端配列または C 末端配列、均一性、脱アミド化、グリケーション、プロリンアミド化、ジスルフィド不均一性、二量体化およびメチオニン酸化の 1 つまたは複数の点で異なる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

(g) 第 3 の条件下で前記容器中の培養培地中で細胞の集団を培養して、タンパク質バリエーション 3 を含有する馴化培養培地を形成すること；

(h) 第 3 のタンパク質バリエーション調製物を回収すること；および

(i) 前記第 3 のタンパク質バリエーション調製物から前記タンパク質バリエーション 3 を精製すること；

を更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記容器が、バイオリアクターである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記回収工程 (b) の間に取り出される量が、容器稼働日当たり容器の容量の 0.1 倍から 5 倍である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017 年 2 月 17 日に提出された米国仮特許出願第 62 / 460,387

10

20

30

40

50

号の利益を主張し、その全体は参照により本明細書に援用される。

【0002】

本開示は、複数の異なる培養条件下で操作する培養系を使用して、生物学的産物（例えばタンパク質、例えばタンパク質バリエーション）を産生するための方法、組成物およびデバイスに関する。

【背景技術】

【0003】

治療用タンパク質およびmAbを含む認可された治療用産物は、典型的には治療される集団のサブセットにおいてのみ有効である。根本原因は必ずしも良く理解されているとは限らないが、エピジェネティック、遺伝、代謝、生活習慣、および患者間の他の違いに起因し得る。したがって、疾患それ自体および患者の両方の根本原因を理解し、より詳細なテーラーメイド療法を開発する傾向が増加している。現在認識されている追加の複雑な問題は、たとえ各々の患者が同じ症状を示しても、疾患それ自体は患者間で異なり得るということである（例えば血液癌には11の異なる形態があることが現在認識されている）（E. Papaemmanuil et al., N Engl J Med 2016; 374: 2209-2221）。精密かつ個人化された治療に向けたこの傾向の増加は、産物品質の属性においてより少ない変動を備えた治療用産物に頼ることが予想される。それらの産物品質の属性において各々より低い不均一性（すなわちより少ない変動）を備えた各々の治療用産物の複数のバリエーションは、疾患不均一性および患者不均一性の両方を有効に取り扱うのに有用である可能性もある。

【0004】

生物学的産物（組み換えタンパク質およびモノクローナル抗体（mAb）等）を製造するための現行の方法は、典型的には産物品質の属性（糖鎖付加、シアル酸付加（sialylation）および荷電のバリエーション等）における高い変動を備えた産物をもたらす（Pacis et al. Biotechnol Bioeng 2011; 108: 2348-2358）。これらの方法は多くの場合、1～14日の範囲で培養された微生物細胞または動物細胞のフェドバッチ培養に頼っている。フェドバッチ培養を使用して産生された産物は典型的には不均一混合物であり、例えば哺乳動物細胞によって産生されるmAbは、培養の中間点の間（7日目）で、培養の終了時近くで（11日目～14日目）産生される同じmAbよりもより高い比率の糖鎖付加タンパク質鎖を有し得る。培養の終了まで産物の収穫はなく、したがって産物は培養終了時に産物バリエーションの不均一混合物である。現在使用される精製技法（クロマトグラフィーおよび濾過ステップ等）は、産物バリエーションを精製することおよびより均一の産物を得ることができない。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、細胞の集団を提供すること、第1の条件下で細胞の集団を培養して、第1の産物バリエーションを得ること、および第1の条件下で作製された第1の産物を回収すること、次いで第2の条件下で培養培地中の細胞の集団をさらに培養して、第2の産物バリエーションを得ること、および第2の条件下で作製された第2の産物を回収することによって、それらの産物のより多くの産物バリエーションおよびより均一な調製物のうちの1つまたは両方を得ることが可能であるという説明に、部分的に基づく。したがって、異なる産物の複数の調製物が作製され、各々の産物は均一性の増加のために至適化される。

【0006】

したがって、一態様において、本発明は、少なくとも産物の第1のバリエーションの調製物（産物バリエーション1）および産物の第2のバリエーションの調製物（産物バリエーション2）を含む複数のバリエーション調製物を作製する方法であって、

細胞培養（例えば灌流培養）を可能にするように構成された容器中に細胞の集団を提供すること；

（a-i）第1の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション1を含む馴化培養培地を形成すること；

10

20

30

40

50

(a - i i) 例えばステップ (a - i) において形成された馴化培養培地のアリコートを得ることによって、培養から産物バリエーション 1 を回収すること；

(a - i i i) 随意に、置換培地を馴化培養培地へ添加すること；

(a - i v) 随意に、第 1 の条件下で細胞の集団をさらに培養して、追加の馴化培地を産生すること；

(a - v) 随意に、例えばステップ (a - i v) において形成された馴化培養培地のアリコートを得ることによって、追加の (例えば第 2 のバッチの) 産物バリエーション 1 を回収すること；

(a - v i) 随意に、(a - i i) および (a - v) からの (例えば第 1 のバッチおよび第 2 のバッチからの) 産物バリエーション 1 を組み合わせること；

10

(b - i) 第 2 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション 2 を含有する馴化培養培地を形成すること；

(b - i i) 例えばステップ (b - i) において形成された馴化培養培地のアリコートを得ることによって、培養から産物バリエーション 2 を回収すること；

(b - i i i) 随意に、置換培地を馴化培養培地へ添加すること、

(b - i v) 随意に、第 2 の条件下で細胞の集団をさらに培養して、追加の馴化培地を産生すること、

(b - v) 随意に、例えばステップ (b - i v) において形成された馴化培養培地のアリコートを得ることによって、追加の (例えば第 2 のバッチの) 産物バリエーション 2 を回収すること；

20

(b - v i) 随意に、(b - i i) および (b - v) からの (例えば第 1 のバッチおよび第 2 のバッチからの) 産物バリエーション 2 を組み合わせること；

産物バリエーション 1 のバッチから産物バリエーション 1 を得ること (例えば精製すること) ；

産物バリエーション 2 のバッチから産物バリエーション 2 を得ること (例えば精製すること) ；

を含み、

それによって、少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 1) および産物の第 2 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 2) を含む複数のバリエーション調製物を提供し、

バリエーション 1 (またはバリエーション 1 の調製物) が、物理的特性、化学的特性、生物学的特性、または医薬特性で、例えば

30

糖鎖付加 (例えばガラクトシル化) ；

シアル酸付加；

荷電 (例えば p I) ；

配列 (例えば N 末端配列または C 末端配列) 均一性；

純度；

活性；

不活性バリエーションの量；

凝集する傾向、または凝集；

清澄性；

脱アミド化；

40

グリケーション；

プロリンアミド化；

ジスルフィド不均一性；

二量体化；

プロテアーゼ感受性またはタンパク質溶解性分解；および

メチオニン酸化

のうちの 1 つまたは複数で、バリエーション 2 (またはバリエーション 2 の調製物) とは異なる、前記方法の特徴とする。

【 0 0 0 7 】

別の態様において、本発明は、少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 1) を含む、

50

アント 1) および産物の第 2 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 2) を含む複数のバリエーション調製物を作製する方法であって、

(a) 第 1 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション 1 を含有する馴化培養培地を形成すること；

(b) 産物バリエーション 1 (例えば産物バリエーション 1 のバッチ (例えば第 1 の条件下で産生された)) を回収すること；

(c) 第 2 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション 2 を含有する馴化培養培地を形成すること；

(d) 産物バリエーション 2 (例えば産物バリエーション 2 のバッチ (例えば第 2 の条件下で産生された)) を回収すること；

を含み、

それによって、少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 1) および産物の第 2 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 2) を含む複数のバリエーション調製物を提供し、

産物バリエーション 1 (または産物バリエーション 1 の調製物) が、物理的特性、化学的特性、生物学的特性、または医薬特性で、例えば

糖鎖付加 (例えばガラクトシル化) ；

シアル酸付加；

荷電 (例えば p I) ；

配列 (例えば N 末端配列または C 末端配列) 均一性；

純度；

活性；

不活性バリエーションの量；

凝集する傾向、または凝集；

清澄性；

脱アミド化；

グリケーション；

プロリンアミド化；

ジスルフィド不均一性；

二量体化；

プロテアーゼ感受性またはタンパク質溶解性分解；および

メチオニン酸化

で、産物バリエーション 2 (または産物バリエーション 2 の調製物) とは異なる、前記方法の特徴とする。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態において、方法は、例えば馴化培養培地のアリコートを得た後に、置換培地を馴化培養培地へ添加することを含む。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態において、取り出されたアリコート、添加された置換培養培地、または両方の体積は、独立して、全体の培養の体積または反応容器の容量の体積の 5 ~ 1 0 0、1 0 ~ 1 0 0、4 0 ~ 1 0 0、6 0 ~ 1 0 0、8 0 ~ 1 0 0、5 ~ 1 0、5 ~ 2 0、5 ~ 4 0、5 ~ 6 0、5 ~ 8 0、2 0 ~ 8 0、2 0 ~ 6 0、2 0 ~ 4 0、または 2 0 ~ 8 0 % の間である。いくつかの実施形態において、取り出された量、添加された置換培養培地、または両方は、独立して、反応器操作の 1 日あたり反応器体積の 0 . 1 ~ 5、0 . 5 ~ 5、0 . 3 ~ 5、0 . 4 ~ 5、0 . 1 ~ 4、0 . 3 ~ 4、または 0 . 5 ~ 4、1 ~ 2、または 1 ~ 3 倍の間である。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態において、細胞の集団は、1 日以上 (例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、またはそれ以

10

20

30

40

50

上の日)の間第1の条件下で、培養される。

【0011】

いくつかの実施形態において、例えばパラメーターについての標的値に到達した後に、細胞集団は第2の条件下で培養される。

【0012】

いくつかの実施形態において、方法は、培地または他の条件を操作して、第2の条件を達成することを含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、方法は、pH；dO₂のレベル；かき混ぜ；温度；体積；細胞集団の密度；培養培地の構成要素の濃度；栄養素、薬物、阻害物質、もしくは他の構成要素の存在もしくは量のうちの1つまたは複数を変更することを含む。

10

【0014】

いくつかの実施形態において、培養培地、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素の構成要素は、培地化合物（例えばPBS、MEM、DMEM、血清など）、ポリペプチド、非ペプチドシグナル分子（例えばCa²⁺、cAMP、グルコース、ATPなど）、アミノ酸（例えばリジン）、糖（例えばガラクトースまたはN-アセチルマンノサミン）、および水溶性金属化合物（例えば銅化合物（例えば硫酸銅（I）または塩化銅）、マンガ化合物（例えば塩化マンガ）、亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、および鉄化合物（例えば硫酸鉄（II）））のうちの1つまたは複数を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、細胞の集団の培養は、灌流産生培養（例えば本明細書において記載されるような灌流産生培養、例えばそこで馴化培養培地は設定時間の間隔で連続的にまたは周期的に収穫される）である。

20

【0016】

いくつかの実施形態において、方法は、容器（例えば反応器、例えばバイオリアクター）中の培養培地が第2の条件へ移行する時に、灌流を中断する（例えば培養培地が第2の条件へ移行する時に灌流液は収集されず、第2の条件の達成に際して収集は再開されるだろう、例えば産物バリエーション1が産物バリエーション2によって実質的に置き換えられるまで、灌流液は収集されないだろう）こと、または培養培地が後続する条件へ移行する時に、灌流を中断することを含む。いくつかの実施形態において、方法は、培養培地が第2の条件へ移行する時に、灌流液を例えば廃液へ方向転換する（例えば培養培地が第2の条件へ移行する時に、灌流液は廃液へ方向転換され、第2の条件の達成に際して収集は再開されるだろう）ことを含む。例えば第1の条件が満たされるまで（例えば産物バリエーション1が産物バリエーション2によって実質的に置き換えられる）、または培養培地が後続する条件へ移行する時に、灌流液は第1の目的地（例えば廃液）へ方向転換されるだろう。

30

【0017】

いくつかの実施形態において、産物バリエーション1は、例えば後続する産物バリエーション（例えば産物バリエーション2）の産生の間に、または後続する産物バリエーション（例えば産物バリエーション2）の産生後に、例えば液体（例えばバッファー）によりフラッシングすることによって、下流のユニット操作から取り出される。

40

【0018】

いくつかの実施形態において、方法は、パラメーター（例えば安定的な操作に関連するパラメーター、例えば培養の継続期間、培養物の生存率、生存細胞濃度、pH、dO₂、温度、または培養の体積）についての標的値に到達するまで、細胞を培養することを含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、(a)、(c)、または(a)および(c)の両方の培養培地中の細胞の集団は、容器（例えば反応器、反応容器、または類似のもの）中に含まれる。いくつかの実施形態において、(a)の培養培地中の細胞の集団および(c)の培養培地中の細胞の集団は、同じ容器中に含まれる。いくつかの実施形態において、(a)の培養培地中の細胞の集団および(c)の培養培地中の細胞の集団は、2つ以上の異なる

50

容器中に含まれる。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、取り出されたアリコート、添加された置換培養培地、または両方の体積は、独立して、全体の培養の体積または容器（例えば反応器）の容量の体積の 5 ~ 1 0 0、1 0 ~ 1 0 0、4 0 ~ 1 0 0、6 0 ~ 1 0 0、8 0 ~ 1 0 0、5 ~ 1 0、5 ~ 2 0、5 ~ 4 0、5 ~ 6 0、5 ~ 8 0、2 0 ~ 8 0、2 0 ~ 6 0、2 0 ~ 4 0、または 2 0 ~ 8 0 % の間である。いくつかの実施形態において、取り出された量、添加された置換培養培地、または両方は、独立して、容器（例えば反応器）操作の 1 日あたり容器（例えば反応器）体積の 0 . 1 ~ 5、0 . 5 ~ 5、0 . 3 ~ 5、0 . 4 ~ 5、0 . 1 ~ 4、0 . 3 ~ 4、または 0 . 5 ~ 4、1 ~ 2、または 1 ~ 3 倍の間である。

10

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態において、置換培養培地の体積は、取り出されたアリコートの体積よりも少ないか、等しいか、または多い。

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態において、取り出されたアリコート、添加された置換培養培地、または両方の体積は、独立して、全体の培養の体積または容器（例えば反応器）の容量の体積の 5 ~ 1 0 0、1 0 ~ 1 0 0、4 0 ~ 1 0 0、6 0 ~ 1 0 0、8 0 ~ 1 0 0、5 ~ 1 0、5 ~ 2 0、5 ~ 4 0、5 ~ 6 0、5 ~ 8 0、2 0 ~ 8 0、2 0 ~ 6 0、2 0 ~ 4 0、または 2 0 ~ 8 0 % の間である。いくつかの実施形態において、取り出された量、添加された置換培養培地、または両方は、独立して、容器（例えば反応器）操作の 1 日あたり容器（例えば反応器）体積の 0 . 1 ~ 5、0 . 5 ~ 5、0 . 3 ~ 5、0 . 4 ~ 5、0 . 1 ~ 4、0 . 3 ~ 4、または 0 . 5 ~ 4、1 ~ 2、または 1 ~ 3 倍の間である。

20

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態において、細胞の集団は、1 日以上（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、またはそれ以上の日）の間第 2 の条件下で、培養される。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態において、例えばパラメーターについての標的値に到達した後に、細胞集団は第 3 の条件下で培養される。

30

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、方法は、容器（例えば反応器、例えばバイオリアクター）中の培養培地が第 3 の条件へ移行する時に、灌流を中断する（例えば培養培地が第 3 の条件へ移行する時に灌流液は収集されず、第 3 の条件の達成に際して収集は再開されるだろう、例えば産物バリエーション 2 が産物バリエーション 3 によって実質的に置き換えられるまで、灌流液は収集されないだろう）こと、または培養培地が後続する条件へ移行する時に、灌流を中断することを含む。いくつかの実施形態において、方法は、培養培地が第 3 の条件へ移行する時に、灌流液を廃液へ方向転換する（例えば培養培地が第 3 の条件へ移行する時に、灌流液は廃液へ方向転換され、第 3 の条件の達成に際して収集は再開されるだろう、例えば産物バリエーション 2 が産物バリエーション 3 によって実質的に置き換えられるまで、灌流液は廃液へ方向転換されるだろう）こと、または培養培地が後続する条件へ移行する時に、灌流液を廃液へ方向転換することを含む。

40

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、産物バリエーション 2 は、例えば後続する産物バリエーション（例えば産物バリエーション 3）の産生の際に、または後続する産物バリエーション（例えば産物バリエーション 3）の産生後に、例えば液体（例えばバッファー）によりフラッシングすることによって、下流のユニット操作から取り出される。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、複数のものは、第 3 の条件下で作製された第 3 のバリエーションの調製物（例えば第 1 のバリエーションまたは第 2 のバリエーションの調製物を作製するため

50

に本明細書において記載されるステップによって行われる第3の条件下で作製された第3のバリエーションの調製物)を含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、複数のものは、第4の条件下で作製された第4のバリエーションの調製物(例えば第1のバリエーションまたは第2のバリエーションの調製物を作製するために本明細書において記載されるステップによって行われる第4の条件下で作製された第4のバリエーションの調製物)を含む。

【0029】

いくつかの実施形態において、複数のものは、第5の条件下で作製された第5のバリエーションの調製物(例えば第1のバリエーションまたは第2のバリエーションの調製物を作製するために本明細書において記載されるステップによって行われる第5の条件下で作製された第5のバリエーションの調製物)を含む。

10

【0030】

いくつかの実施形態において、複数のものは、第Nの条件下で作製された第Nのバリエーションの調製物(例えば第1のバリエーションまたは第2のバリエーションの調製物を作製するために本明細書において記載されるステップによって行われる第Nの条件下で作製された第Nのバリエーションの調製物、そこで、Nは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30以上である)を含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、ステップ(a)およびステップ(b)は同じ容器(例えば産生培養容器)中で遂行される。

20

【0032】

いくつかの実施形態において、ステップ(a)~(d)は同じ容器(例えば産生培養容器)中で遂行される。

【0033】

いくつかの実施形態において、容器は、灌流モードでの操作を可能にするように構成される。

【0034】

いくつかの実施形態において、容器は、培養の間(例えばステップ(a)および(c)のうちの1つまたは両方の間)の培地の取り出しおよび培地の添加を可能にするように構成される。

30

【0035】

いくつかの実施形態において、方法は、産物バリエーション1を精製することを含む。

【0036】

いくつかの実施形態において、方法は、産物バリエーション2を精製することを含む。

【0037】

いくつかの実施形態において、産物バリエーションは、細胞の集団が培養される容器から下流のユニット操作において精製される。

【0038】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の調製物(例えば精製された調製物)を提供すること(例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20またはそれ以上の異なる産物バリエーションの調製物(例えば精製された調製物)を提供すること)を含む。

40

【0039】

別の態様において、本発明は、本明細書において記載されるバリエーション産物の調製物、または本明細書において記載される方法のうちの任意ものによって作製されるかもしくは作製可能なバリエーション産物の調製物を特徴とする。

【0040】

別の態様において、本発明は複数のバリエーション調製物を特色とし、前記複数のものは、

50

本明細書において記載される少なくとも産物の第1のバリエーションの調製物（産物バリエーション1）および産物の第2のバリエーションの調製物（産物バリエーション2）、または本明細書において記載される方法のうちの任意ものによって作製されるかもしくは作製可能な少なくとも産物の第1のバリエーションの調製物（産物バリエーション1）および産物の第2のバリエーションの調製物（産物バリエーション2）を含む。

【0041】

別の態様において、本発明は、本明細書において記載される細胞の混合物によりチャージされた容器（例えばバイオリアクター、例えば可変直径のバイオリアクター）を特徴とする。

【0042】

別の態様において、本発明は、

（a）第1の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、第1の産物バリエーション（産物バリエーション1）を含有する馴化培養培地を形成すること；

（b）産生される産物バリエーション1の量、第1の条件下での培養の継続期間、または培養物の生存率から選択される1つまたは複数の標的パラメーターに関して複数の産物バリエーション調製物を作製する方法の進行についての値を取得すること；

（c）値へ応答して、1つまたは複数の標的パラメーターに関して複数の産物バリエーション調製物を作製する方法の進行を決定すること；および

（d）随意に、1つまたは複数の標的パラメーターが到達された決定に応答して、培養培地または他の条件を操作して、第2の条件を達成すること、

を含み、

それによって、複数の産物バリエーションを作製する方法の進行を評価する、

複数の産物バリエーション調製物を作製する方法の進行を評価する方法を特徴とする。

【0043】

別の態様において、本発明は、

（a）第1の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション（産物バリエーション1）を含有する馴化培養培地を形成すること；

（b）産生される産物バリエーション1の量、第1の条件下での培養の継続期間、または培養物の生存率から選択される1つまたは複数の標的パラメーターに向けて産物バリエーションを産生する方法の進行を評価すること；

（c）1つまたは複数の標的パラメーターに向けた進行の評価に応答して、培養培地または他の条件を操作して、第2の条件を達成すること；

および

（d）第2の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、第2の産物バリエーション（産物バリエーション2）を含有する馴化培養培地を形成すること；

を含み、

それによって、産物バリエーションを産生する方法を修飾する、

産物バリエーションを産生する方法を修飾する方法を特徴とする。

【0044】

別の態様において、本発明は、本明細書において記載される調製物を含む医薬組成物を特徴とする。

【0045】

別の態様において、本発明は、本明細書において記載される複数のバリエーション調製物を含むキットを特徴とする。

【0046】

特別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されるものと同じ意味を有する。本発明の実践または試験において、本明細書において記載されるものに類似するかまたは等価である方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料が後述される。すべての出版物、特許出願、特許、および本明細書において言及される他の参

10

20

30

40

50

照文献は、それらの全体を参照することによって援用される。加えて、材料、方法、および例は、単に説明的なものであり、限定を意図したものではない。見出し、副見出し、または番号付けしたもしくは文字入りの要素（例えば（a）、（b）、（i）など）は、単に読み取りの容易性のために提示され、限定するものではない。本文書中の見出しまたは番号付けもしくは文字入りの要素の使用は、ステップもしくは要素がアルファベットの順序において遂行されること、またはステップもしくは要素が互いと必ず不連続であることを要求しない。本発明の他の特色、目的および利点は、記載および図面ならびに請求項から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】可変直径のバイオリアクター（VDB）の側面図である。

【図2】可変直径のバイオリアクター（VDB）の側面図である。

【図3】可変直径のバイオリアクター（VDB）の側面図である。

【図4】可変直径のバイオリアクター（VDB）の概略図である。

【図5】可変直径のバイオリアクター（VDB）の概略図である。

【図6】一様な直径を有する典型的なバイオリアクターの概略図である。

【図7】例示の可変直径のバイオリアクター（VDB）の概略図である。

【図8】例示の可変直径のバイオリアクター（VDB）の概略である。

【図9】例示の可変直径のバイオリアクター（VDB）の概略である。

【図10】例示の可変直径のバイオリアクター（VDB）の概略である。

【図11】例示の可変直径のバイオリアクター（VDB）バイオリアクターの概略である。

【図12】連続攪拌タンク反応器（CSTR）としてデザインされた例示的な灌流バイオリアクターの概略である。

【図13】図13A～13Cは、生存細胞密度によって測定されるような、変動濃度の、 CuSO_4 （A）、リジン（B）、およびN-アセチルアルギニン（C）の細胞増殖に対する効果を示すグラフである。

【図14】図14A～14Cは、産物（モノクローナル抗体）の荷電変動に対するリジン（A）、 CuSO_4 （B）、およびN-アセチルアルギニン（C）の効果を示すグラフである。

【図15】図15A～15Eは、 $2.0\mu\text{M}$ まで CuSO_4 濃度を増加させることが産物の荷電変動を調節することを示すグラフである。酸性ピーク（A）、主要ピーク（B）、および塩基性ピーク（C）についてのパーセント面積における変化に加えて、スイッチ前とスイッチ後との間の荷電変動における変化（DおよびE）を示す。 $^*、p < 0.05$ ； $^{***}、p < 0.0001$ 。

【図16】図16A～16Cは、単一の灌流反応器中で荷電変動の双方向性調節を示すグラフである。4日目と62日目との間の、酸性ピーク（A）、塩基性ピーク（B）、および主要（mean）ピーク（C）についてのパーセント面積における変化を示す。栄養インプット（ CuSO_4 、基本、またはリジン）間のスイッチのタイミングを表示する。

【図17】図17A～17Eは、 $2.0\mu\text{M}$ まで CuSO_4 濃度を増加させることが産物の荷電変動を可逆的に調節することを示すグラフである。酸性ピーク（A）、主要ピーク（B）、および塩基性ピーク（C）についてのパーセント面積における変化に加えて、最初のスイッチ前の基本インプット条件と CuSO_4 インプットの最中と基本へのスイッチバック後との間の荷電変動における変化（D）を示す。図17Eは、基本と CuSO_4 の最中との間の荷電変動における変化を示す。 $^{****}、p < 0.0001$ 。

【図18】図18A～18Eは、 10mM までリジンの濃度を増加させることが荷電変動を調節することを示すグラフである。酸性ピーク（A）、主要ピーク（B）、および塩基性ピーク（C）についてのパーセント面積における変化に加えて、基本条件 CuSO_4 インプットとリジン増加条件との間の荷電変動における変化（DおよびE）を示す。 $^{**}、p < 0.01$ ； $^{****}、p < 0.0001$ 。

【図19】図19A～19Dは、産物の荷電変動プロファイルに対する指摘された処理の

10

20

30

40

50

効果を示す代表的な電気泳動図である。最初の基本定常状態条件（８日目；図１９Ａ）、 CuSO_4 定常状態条件（２１日目；図１９Ｂ；矢印は、主要（min）ピークの塩基性側上の肩（should）を指摘する）、第２の基本定常状態条件（２８日目；図１９Ｃ）、およびリジン定常状態条件（３８日目；図１９Ｄ；矢印は、７．５の等電点またはpIでの塩基性ピークのパーセント面積における増加を指摘する）についての荷電変動プロファイルを示す。

【図２０】注釈されたピーク群（酸性ピーク、主要ピーク、または塩基性ピーク）を示す代表的な電気泳動図である。酸性ピーク、主要ピークおよび塩基性ピークの総計を計算して、これらの群の％面積を決定した。酸性ピーク対塩基性ピークの決定は、主要（最も多量、pI 7.2）ピークに対してバリエーションがどの側で分離されかに基づいた。

10

【図２１】灌流反応器中のガラクトース（galactose）濃度の段階的な操作に応答した、パーセントガラクトシル化における変化を示すグラフである。

【図２２】図２１中で示される実験において、ガラクトース濃度の段階的な操作に応答した、パーセントガラクトシル化および反応器ガラクトース濃度の両方における変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0048】

定義

「a」および「an」という冠詞は、１つまたは１を超える（すなわち少なくとも１つ）の冠詞の文法的な対象物を指すように本明細書において使用される。一例として、「細胞」は１つの細胞または１を超える細胞を意味し得る。

20

【0049】

本明細書において使用される時、「アリコート」という用語は、ある体積の溶液（例えば培養培地、馴化培養培地）を指す。一実施形態において、各々のアリコートは、体積に関して、例えば、各々のアリコートが、最小の体積（例えば事前に設定された最小値）；最小値と最大値（例えば事前に設定された最小値および／または最大値）との間の範囲内のもの；近似的に等しい値（例えば事前に設定された値）；または同じ体積（例えば事前に設定された値）を有するという条件を満たす。より多い量の液体（例えば馴化培養培地）が複数のアリコートへと分割される場合に、複数のものは、より多い量の全体に等しいか、またはより多い量全体未満であり得る。一実施形態において、アリコートが取り出され、置換培養培地が添加されるので、アリコートはバイオリアクターの体積（例えば培養体積）を超過し得る。一実施形態において、アリコートは、0.1～5、0.2～5、0.3～5、0.4～5、0.5～5、0.5～4、または0.5～3の培養体積であり、そこで、培養体積はバイオリアクター中の培養の体積に対応する（例えば40Lの培養を含有する50Lのバイオリアクターは、40Lの培養体積を有し、前記培養の0.5培養体積は20Lであるだろう）。

30

【0050】

本明細書において使用される時、「複数のアリコート」という用語は、１を超える（例えば２つ以上の）アリコートを指す。

【0051】

40

本明細書において使用される時、「内在性の」という用語は、生物体、細胞、組織もしくは系からの任意の材料、またはそれらの内部で天然に産生された任意の材料を指す。

【0052】

本明細書において使用される時、「外来性の」という用語は、生物体、細胞、組織もしくは系へ導入された任意の材料、またはそれらの外部で産生された任意の材料を指す。したがって、「外来性核酸」は、生物体、細胞、組織もしくは系へ導入された核酸、またはそれらの外部で産生された核酸を指す。一実施形態において、外来性核酸の配列は、天然に産生されないか、または外来性核酸が導入される生物体、細胞、組織もしくは系の内部で天然に見出され得ない。同様に、「外来性ポリペプチド」は、天然に産生されないか、または例えば外来性ポリペプチドが外来性核酸配列からの発現によって導入される、生物

50

体、細胞、組織もしくは系の内部で天然に見出され得ない、ポリペプチドを指す。

【0053】

本明細書において使用される時、「異種の」という用語は、異なる種から生物体、細胞、組織または系へ導入された場合の、1つの種からの任意の材料を指す。

【0054】

本明細書において使用される時、「核酸」、「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」という用語は互換的に使用され、デオキシリボ核酸(DNA)もしくはリボ核酸(RNA)、またはそのDNAもしくはRNAの組み合わせ、およびその一本鎖形態もしくは二本鎖形態のいずれかにおけるポリマーを指す。「核酸」という用語は、遺伝子、cDNAまたはmRNAを包含するがこれらに限定されない。一実施形態において、核酸分子は、合成(例えば化学合成されるかまたは人工的である)または組み換えである。具体的に限定されなければ、この用語は、参照核酸と類似する結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドまたは天然に存在しないヌクレオチドに類似する様式で代謝される、天然ヌクレオチドのアナログまたは誘導体を含む分子を網羅する。特別の指示のない限り、特定の核酸配列は、明示的に指示された配列に加えて、保存的に修飾されたそのバリエーション(例えば縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補的な配列も默示的に網羅する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された(またはすべての)コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基により置換された配列を生成することによって達成され得る(Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); および Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。

【0055】

本明細書において使用される時、「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は互換的に使用され、ペプチド結合またはペプチド結合以外の手段によって共有結合で連結されたアミノ酸残基から構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質の配列またはペプチドの配列を構成することができるアミノ酸の最大数に限定はない。一実施形態において、タンパク質は、1を超える(例えば2、3、4、5、またはそれ以上の)ポリペプチドから構成され、その中で、各々のポリペプチドは共有または非共有性の結合/相互作用のいずれかによって別のものへ結び付けられる。ポリペプチドは、ペプチド結合またはペプチド結合以外の手段によって、互いに繋がれた2つ以上のアミノ酸を含む、任意のペプチドまたはタンパク質を包含する。本明細書において使用される時、この用語は、短鎖(例えばそれは当該技術分野において通常ペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される)、およびより長い鎖(それは当該技術分野において一般的にタンパク質と称される)の両方を指し、それらについて多くのタイプがある。「ポリペプチド」は、例えばとりわけ生物学的に活性のある断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエーション、修飾されたポリペプチド、誘導体、アナログ、融合タンパク質を包含する。

【0056】

「産物」は、その用語が本明細書において使用される時に、細胞(例えば産物を産生するように修飾または操作された細胞)によって産生された(例えば発現された)分子(例えばポリペプチド(例えばタンパク質、例えば糖タンパク質)、核酸、脂質、サッカライド(saccharide)、ポリサッカライド、または任意のそのハイブリッド)を指す。一実施形態において、産物は天然に存在する産物を含む。一実施形態において、産物は天然に存在しない産物を含む。一実施形態において、産物の一部は天然に存在する一方で、産物の別の一部は天然に存在しない。一実施形態において、産物はポリペプチド(例えば組み換えポリペプチド)である。一実施形態において、産物は、診断用の使用または前臨床的な使用に好適である。別の実施形態において、産物は治療法用の使用に(例えば疾

10

20

30

40

50

患の治療に)好適である。一実施形態において、本明細書において記載される細胞(例えば修飾または操作された細胞)は、発現を制御するかまたは産物をコードする、外来性核酸を含む。他の実施形態において、本明細書において記載される細胞(例えば修飾または操作された細胞)は、例えば核酸でなく、細胞中での産物の発現または構築を制御する、他の分子を含む。

【0057】

本明細書において使用される時、「産物のバリエーション」、「バリエーション」、「産物バリエーション」または類似する用語は、参照産物とは異なる産物の種を指す。例えば第1の条件のセット下で作製された第1の産物(第2の条件のセット下で作製された第2の産物とは異なる、構造または機能的特性を有する)は、バリエーションである。典型的には、バリエーションは、同じ細胞(複数可)または同じコード配列から発現される。例えば、産物の第1のバリエーションは糖鎖付加され得るが、産物の第2のバリエーションは異なって糖鎖付加され得る(例えばより高いかもしくはより少ない程度に糖鎖付加されるか、または少なくとも1つの異なる糖部分が付加される)。産物バリエーションを識別する特性は、物理的特性、化学的特性、生物学的特性、または医薬特性を包含し、糖鎖付加(例えばガラクトシル化)、シアル酸付加、荷電(例えばpI)、配列(例えばN末端配列またはC末端配列)、治療有効性、凝集する傾向もしくは凝集の傾向、または活性を包含するがこれらに限定されない。産物バリエーションを識別する特性は、産物品質属性とも呼ばれる。特定の産物品質属性に関して参照産物とは異なる産物バリエーションは、そのようなものとして称され得る(例えば荷電(例えばpI)に関して異なる産物バリエーションは、荷電バリエーションと称され得る)。バリエーションは「調製物」またはバルク特性でも異なり、例えば、第1の産物バリエーションの調製物は、均一性、純度、凝集の量、不活性バリエーションの量、清澄性、またはシェルフライフで、第2の産物バリエーションとは異なり得る。

【0058】

本明細書において使用される時、「複数のバリエーション」、「複数のバリエーション調製物」、「複数の産物バリエーション」という用語および類似のものは、1を超える(例えば2つ以上の)バリエーション、バリエーション調製物、産物バリエーションなどを指す。

【0059】

本明細書において使用される時、「条件」は、細胞の培養における増殖および/または遺伝子発現に影響を及ぼし得る、1つまたは複数の培養または環境のパラメータの値を指す。第1の条件は、第1の産物バリエーションの発現(例えば第1の産物バリエーションを含有する馴化培養培地の形成)を促し得るが、第2の条件は、第2の産物バリエーションの発現(例えば第2の産物バリエーションを含有する馴化培養培地の形成)を促し得る。培養または環境パラメータは、培地タイプ(例えばPBS、MEM、DMEM、血清、血清を含有する培地など)、1つまたは複数のポリペプチドのレベル、化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n-アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤/酸化剤、非ペプチドシグナル分子(例えばCa²⁺、cAMP、グルコース、ATPなど)のレベル、温度、pH、培養の細胞密度、ならびに栄養利用可能性を包含するがこれらに限定されない。定常状態条件(定常状態(steady-state)または定常状態(steady state)とも称される)は、細胞密度および1つまたは複数の産物品質属性が一定で維持される条件を指す。

【0060】

生物学的生産の方法論

いくつかの実施形態において、生物学的製剤(組み換えタンパク質およびmAb等)は、微生物細胞(例えばE.coli)、動物細胞(例えば哺乳動物細胞(例えばCHOまたはNSO)、真菌細胞(例えばPichia pastoris)または昆虫細胞)、または植物細胞のバッチ培養、フェドバッチ培養または灌流培養において産生される。産物の産生に使用される細胞の集団および集団が増殖される培養培地は、産生培養物である。

【0061】

いくつかの実施形態において、産生は、制御された条件(例えば温度、pH、溶存酸素

10

20

30

40

50

、およびかき混ぜ)下で、炭水化物、アミノ酸、タンパク質、脂質、ビタミン、ヌクレオシド、および/または化学塩を含む培地中での、以前に凍結した細胞の小集団の培養によって開始される。細胞の十分な集団が生成され、治療産物タンパク質の産生が典型的には50L~20,000リットルの体積の範囲の産生培養で開始され得るまで、培養物は、漸増する体積においてこれらの条件下で拡張される。この培養の増殖相の継続期間は、動数時間(微生物培養)~約30日(物細胞培養について)で続き得る。

【0062】

現在、産物の産生への2つの主要なアプローチ(バッチ産生またはフェドバッチ産生および灌流産生)がある。バッチ産生またはフェドバッチ産生において、産生培養全体は、規定の日を開始されてから通常1日~21日のいつでも収穫される。バッチ産生において、産生のために要求されるすべての栄養素および基質は、培養の開始から培養培地中に存在するが、フェドバッチ産生において、栄養素および/または基質は培養の間に培養の中へ添加または供給される。

10

【0063】

灌流産生培養において、産生培養は、期間にわたって、連続的にまたは規定の間隔で収穫される。一実施形態において、約0.5~3の培養体積が毎日収穫される。産物バリエーションは、収穫された培養体積から精製され得る。いくつかの実施形態において、産生培養は、期間にわたって置換物(例えば新鮮な培養培地)により連続的にまたは間隔を置いて補充される。一実施形態において、培養は新鮮培地の等価な体積によって置き換えられる。いくつかの実施形態において、培養継続期間は、培養開始後30日~150日のいつでも(例えば40、50、60、70、80、90、100、110、120、130または140日)続き得る。

20

【0064】

灌流培養による均一産物バリエーションの産生

1つまたは複数の産物バリエーションを産生する培養系(例えば灌流産生培養系)の使用による1つまたは複数の産物の調製の方法が、本明細書において開示される。一実施形態において、例えばバッチ産生培養またはフェドバッチ産生培養によって産生された産物に比較して、産物バリエーションの調製物は、特性(例えば糖鎖付加、活性または均一性)に関して、至適化された均一性を有する。理論に拘束されることを望むものではないが、有意に異なる培養条件を含む期間(例えば産生培養の全体の継続期間)にわたって作製される産物バリエーションを含む調製物ゆえに、フェドバッチおよびバッチの産生培養から産生される産物の不均一性が生じると考えられる。したがって、1を超える産物の形態が最終的な収穫された培養培地中に存在する。本明細書において記載される系から収穫されたより少量の周期的なアリコートは、おそらく、灌流培養から産物バリエーションが産生されるより均一な細胞条件および環境条件の可能性に起因して、均一性の増加した産物バリエーションを含む。

30

【0065】

2つ以上の産物バリエーションの調製物を産生する本明細書において記載される培養系(例えば灌流産生培養系)の使用による2つ以上の産物の調製の方法が、本明細書において開示され、各々のものは、至適化された均一性(例えばバッチ産生培養またはフェドバッチ産生培養によって産生された産物に比較して、特性に関して均一性が増加)が有る。いくつかの実施形態において、第1の産物バリエーションは、第1の条件下で産生培養を培養することによって産生される。第1の条件下の産生培養から回収された産物のバッチ(例えば1つまたは複数のバッチ)は、第1の産物バリエーションを含む。第2の産物バリエーションは、第2の条件下で産生培養を培養することによって産生される。第2の条件下の産生培養から回収された産物のバッチ(例えば1つまたは複数のバッチ)は、第2の産物バリエーションを含むだろう。

40

【0066】

いくつかの実施形態において、条件は、培養パラメーターおよび/または環境パラメーターを含み、それらは、培地タイプ(例えばPBS、MEM、DMEM、血清、血清を含む培地など)、1つまたは複数のポリペプチドのレベル、化学塩、金属および金属イ

50

オン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n - アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤 / 酸化剤、非ペプチドシグナル分子（例えば Ca^{+2} 、cAMP、グルコース、ATP など）のレベル、温度、pH、培養の細胞密度、ならびに栄養利用可能性を包含するがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、条件は、アミノ酸（例えばリジン）、糖（例えばガラクトースまたはN - アセチルマンノサミン）、または水溶性金属化合物のうちの1つまたは複数のレベル（例えば濃度または相対的レベル、例えば以前の条件と比べて増加または減少したレベル）を含む。条件の生成または維持における使用のためのアミノ酸および糖は、多様な共有結合性修飾（例えばアセチル化）を含み得る。条件の生成または維持において有用な水溶性金属化合物は、銅化合物（例えば硫酸銅（Ⅰ）または塩化銅）、マンガン化合物（例えば塩化マンガン）、亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、および鉄化合物（例えば硫酸鉄（Ⅱ））を包含するがこれらに限定されない。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、本発明の調製の方法は、2を超える産物の調製物（例えば2を超える産物バリエーション）を産生する。いくつかの実施形態において、培養は、第3、第4、第5、またはさらなる条件下でさらに培養され得る。第3、第4、第5、またはさらなる条件下の産生培養から回収された産物のバッチ（例えば1つまたは複数のバッチ）は、第3、第4、第5またはさらなる産物バリエーションを含むだろう。

【0068】

一実施形態において、方法は、第1のバリエーションの調製物および第2のバリエーションの調製物を提供する。一実施形態において、方法は、第3のバリエーションの調製物を提供する。

20

【0069】

一実施形態において、方法は、第4のバリエーションの調製物を提供する。

【0070】

一実施形態において、方法は、第5のバリエーションの調製物を提供する。

【0071】

一実施形態において、方法は、第6のバリエーションの調製物を提供する。

【0072】

一実施形態において、方法は、第7のバリエーションの調製物を提供する。

【0073】

一実施形態において、方法は、第8のバリエーションの調製物を提供する。

30

【0074】

一実施形態において、方法は、第9のバリエーションの調製物を提供する。

【0075】

一実施形態において、方法は、第10のバリエーションの調製物を提供する。

【0076】

一実施形態において、方法は、第11のバリエーションの調製物を提供する。

【0077】

一実施形態において、方法は、第12のバリエーションの調製物を提供する。

【0078】

一実施形態において、方法は、第13のバリエーションの調製物を提供する。

40

【0079】

一実施形態において、方法は、第14のバリエーションの調製物を提供する。

【0080】

一実施形態において、方法は、第15のバリエーションの調製物を提供する。

【0081】

一実施形態において、方法は、第16のバリエーションの調製物を提供する。

【0082】

一実施形態において、方法は、第17のバリエーションの調製物を提供する。

【0083】

50

一実施形態において、方法は、第 18 のバリエーションの調製物を提供する。

【0084】

一実施形態において、方法は、第 19 のバリエーションの調製物を提供する。

【0085】

一実施形態において、方法は、第 20 のバリエーションの調製物を提供する。

【0086】

いくつかの実施形態において、産物バリエーションの所望される産生が完了した後に、産生培養は次の条件下で培養される。いくつかの実施形態において、次の条件への転換後に、バイオリアクターの構成要素またはバイオリアクターの下流の構成要素は、前の産物バリエーションが浄化される。いくつかの実施形態において、この浄化期間の間に、灌流液は収集されないか、または収集されて廃棄される。一旦バイオリアクターが安定的な操作に到達したならば、灌流液（例えば次の産物バリエーションを含む灌流液）の収集および精製が再開され得る。

10

【0087】

一実施形態において、1つまたは複数の産物バリエーションまたはその調製物は、例えばバリエーション間の異なる存在（例えばパラメーターのレベル、例えば糖鎖付加）について分析される。

【0088】

産生のための適用

本明細書において開示される、産物（例えば産物バリエーション）の調製の方法を使用して、多様な産物を産生するか、様々な細胞株を評価するか、またはバイオリアクターもしくはプロセッシング容器もしくはタンク（またはより一般的には任意の供給源と共に）における使用のための様々な細胞株の産生を評価することができる。本明細書において記載されるデバイス、設備および方法は、原核生物細胞株および/または真核生物細胞株を包含する任意の所望される細胞株の培養に好適である。さらに、複数の実施形態において、デバイス、設備および方法は、懸濁細胞または足場依存性（接着性）細胞の培養に好適であり、医薬産物および生物医薬産物（ポリペプチド産物、核酸産物（例えばDNAまたはRNA）、または細胞療法および/もしくはウイルス療法において使用されるもの等の細胞および/もしくはウイルス等）の産生のために構成された産生操作に好適である。

20

【0089】

複数の実施形態において、細胞は、産物（組み換えの治療または診断用の産物等）を発現または産生する。より詳細に以下に記載されるように、細胞によって産生される産物の例としては、抗体分子（例えばモノクローナル抗体、二重特異性抗体）、抗体模倣物（特異的に抗原へ結合するが構造的に抗体に関連しないポリペプチド分子（例えばDARPin、アフィボディ、アドネクチンまたはIgNAR等）、融合タンパク質（例えばFc融合タンパク質、キメラサイトカイン）、他の組み換えタンパク質（例えば糖鎖付加タンパク質、酵素、ホルモン）、ウイルス療法（例えば抗癌腫瘍溶解性ウイルス、遺伝子療法のためのウイルスベクター、およびウイルス免疫療法）、細胞療法（例えば多能性幹細胞、間充質幹細胞、および成体幹細胞）、ワクチンまたは脂質カプセル化粒子（例えばエキソソーム、ウイルス様粒子）、RNA（例えばsiRNA等）もしくはDNA（例えばプラスミドDNA等）、抗生物質、またはアミノ酸が挙げられるがこれらに限定されない。複数の実施形態において、デバイス、設備および方法は、バイオシミラーの産生のために使用され得る。

30

40

【0090】

前述のように、複数の実施形態において、デバイス、設備および方法は、真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞または下等真核生物細胞（例えば酵母細胞または糸状菌細胞等））、もしくは原核生物細胞（グラム陽性またはグラム陰性細胞等）、および/または真核生物細胞もしくは原核生物細胞の産物（例えば大スケール様式で真核生物細胞によって合成された、タンパク質、ペプチド、抗生物質、アミノ酸、核酸（DNAまたはRNA等））の産生を可能にする。本明細書において特別に明記されない限り、デバイス、設備および

50

方法は、任意の所望される体積または産生能力を包含し、ベンチスケール、パイロットスケール、および十分な産生スケール能力を包含するがこれらに限定されない。

【0091】

さらにそして本明細書において特別に明記されない限り、デバイス、設備および方法は、任意の好適な反応器（複数可）を包含することができ、攪拌タンク、エアリフト、ファイバー、マイクロファイバー、ホローファイバー、セラミックマトリックス、流動床、固定床、および/または噴流層バイオリアクターを包含するがこれらに限定されない。本明細書において使用される時、「反応器」は発酵槽もしくは発酵ユニットまたは他の反応容器を包含することができ、「反応器」という用語は「発酵槽」と互換的に使用される。例えば、いくつかの態様において、バイオリアクターユニットは、以下の、栄養素および/もしくは炭素源の供給、好適な気体（例えば酸素）の注入、発酵培地もしくは細胞培養培地の入口流および出口流、気体相および液体相の分離、温度の維持、酸素およびCO₂のレベルの維持、pHレベルの維持、かき混ぜ（例えば攪拌）、ならびに/または洗浄/滅菌のうち1つもしくは複数またはすべてを遂行することができる。例示的反応器ユニット（発酵ユニット等）はユニット内に複数の反応器を含有し、例えばユニットは各々のユニット中に1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90もしくは100またはそれ以上のバイオリアクターを有することができ、および/または、設備は設備内に単一もしくは複数の反応器を有する複数のユニットを含有し得る。様々な実施形態において、バイオリアクターは、バッチ、セミフェドバッチ、フェドバッチ、灌流、および/または連続発酵のプロセスに好適であり得る。任意の好適な反応器直径が使用され得る。複数の実施形態において、バイオリアクターは、約100mL~約50,000Lの間の体積を有し得る。非限定例としては、100mL、250mL、500mL、750mL、1リットル、2リットル、3リットル、4リットル、5リットル、6リットル、7リットル、8リットル、9リットル、10リットル、15リットル、20リットル、25リットル、30リットル、40リットル、50リットル、60リットル、70リットル、80リットル、90リットル、100リットル、150リットル、200リットル、250リットル、300リットル、350リットル、400リットル、450リットル、500リットル、550リットル、600リットル、650リットル、700リットル、750リットル、800リットル、850リットル、900リットル、950リットル、1000リットル、1500リットル、2000リットル、2500リットル、3000リットル、3500リットル、4000リットル、4500リットル、5000リットル、6000リットル、7000リットル、8000リットル、9000リットル、10,000リットル、15,000リットル、20,000リットル、および/または50,000リットルの体積が挙げられる。加えて、好適な反応器は、複数回使用、単回使用、使い捨て、または非使い捨てであり得、任意の好適な材料から形成され得、ステンレス鋼等の合金（例えば316Lまたは他の好適なステンレス鋼）およびインコネル、プラスチック、ならびに/またはガラスを包含する。

【0092】

複数の実施形態において、そして本明細書において特別に明記されない限り、調製物を作製する方法による使用のための、本明細書において記載されるデバイス、設備、および方法は、特別に言及されない任意の好適なユニット操作および/または機器（かかる産物の分離、精製および単離のための操作および/または機器等）も包含することができる。任意の好適な設備および環境（従来の現場組み立て設備、モジュール式設備、可動式設備および仮設設備、もしくは他の好適な構築物、設備、ならびに/またはレイアウト等）が使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、モジュール式クリーンルームが使用され得る。加えてそして特別に述べられない限り、本明細書において記載されるデバイス、系、および方法は、単一の所在位置もしくは設備において収容および/もしくは遂行され得るか、またはあるいは、分離したもしくは複数の所在位置および/もしくは設備で収容および/もしくは遂行され得る。

【0093】

10

20

30

40

50

非限定例として、および限定されずに、米国特許出願公開第2013/0280797号；同2012/0077429号；同2011/0280797号；同2009/0305626号；ならびに米国特許第8,298,054号；同第7,629,167号；および同5,656,491号（それらは全体が参照として本明細書に援用される）は、好適であり得る例示的な設備、機器、および/または系を記載する。

【0094】

本明細書において記載される調製物を作製する方法は、広範囲のスペクトルの細胞を使用することができる。複数の実施形態において、細胞は真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）である。哺乳動物細胞は、例えばヒトまたは齧歯動物またはウシの細胞株または細胞系統であり得る。かかる細胞、細胞株または細胞系統の例は、例えばマウス骨髄腫（NSO）細胞株、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、HT1080、H9、He p G 2、MCF7、MDBK Jurkat、NIH3T3、PC12、BHK（ベビーハムスター腎臓細胞）、VERO、SP2/0、YB2/0、Y0、C127、L細胞、COS（例えばCOS1およびCOS7）、QCL-3、HEK-293、VERO、PER.C6、HeLA、EB1、EB2、EB3、腫瘍溶解細胞またはハイブリドーマ細胞株である。好ましくは、哺乳動物細胞はCHO細胞株である。一実施形態において、細胞はCHO細胞である。一実施形態において、細胞は、CHO-K1細胞、CHO-K1SV細胞、DG44 CHO細胞、DUXB11 CHO細胞、CHOS、CHO GSノックアウト細胞、CHO FUT8 GSノックアウト細胞、CHOZN、またはCHO由来細胞である。CHO GSノックアウト細胞（例えばGSKO細胞）は、例えばCHO-K1 SV GSノックアウト細胞である。CHO FUT8ノックアウト細胞は、例えばPotelligent（登録商標）CHOK1 SV（Lonza Biologics, Inc.）である。真核生物細胞は、鳥類の細胞、細胞株または細胞系統（例えばEBx（登録商標）細胞、EB14、EB24、EB26、EB66またはEBv13等）でもあり得る。

【0095】

一実施形態において、真核生物細胞は幹細胞である。幹細胞は例えば多能性幹細胞であり得、胚性幹細胞（ESC）、成体幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、組織特異的幹細胞（例えば造血幹細胞）および間充織幹細胞（MSC）を包含する。

【0096】

一実施形態において、細胞は本明細書において記載される細胞のうちの任意のものの分化した形態である。一実施形態において、細胞は、培養における任意の初代細胞に由来する細胞である。

【0097】

複数の実施形態において、細胞は、肝細胞（ヒト肝細胞、動物肝細胞または非実質細胞等）である。例えば、細胞は、プレーティング可能な代謝試験済みヒト肝細胞、プレーティング可能な誘導試験済みヒト肝細胞、プレーティング可能なQualyst Transporter Certified（商標）ヒト肝細胞、懸濁試験済みヒト肝細胞（10名のドナーおよび20名のドナーをプールした肝細胞を包含する）、ヒト肝臓のクッパー細胞、ヒト肝星細胞、イヌ肝細胞（単一およびプールされたビーグル肝細胞を包含する）、マウス肝細胞（CD-1肝細胞およびC57BI/6肝細胞を包含する）、ラット肝細胞（Sprague-Dawley、Wistar HanおよびWistarの肝細胞を包含する）、サル肝細胞（カニクイザルまたはアカゲザルの肝細胞を包含する）、ネコ肝細胞（ドメスティックショートヘアの肝細胞を包含する）、およびウサギ肝細胞（ニュージーランドホワイトの肝細胞を包含する）であり得る。例示的な肝細胞は、Triangle Research Labs（LLC、6 Davis Drive Research Triangle Park、North Carolina、米国27709）から市販で入手可能である。

【0098】

一実施形態において、真核生物細胞は、下等真核生物細胞（例えば酵母細胞（例えばP

10

20

30

40

50

Pichia 属 (例えば *Pichia pastoris*、*Pichia methanolic*、*Pichia kluyveri* および *Pichia angusta*)、*Komagataella* 属 (例えば *Komagataella pastoris*、*Komagataella pseudopastoris* または *Komagataella phaffii*)、*Saccharomyces* 属 (例えば *Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces kluyveri*、*Saccharomyces uvarum*)、*Kluyveromyces* 属 (例えば *Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces marxianus*)、*Candida* 属 (例えば *Candida utilis*、*Candida cacaoi*、*Candida boidinii*)、*Geotrichum* 属 (例えば *Geotrichum fermentans*)、*Hansenula polymorpha*、*Yarrowia lipolytica*、または *Schizosaccharomyces pombe* 等) である。種 *Pichia pastoris* が好ましい。*Pichia pastoris* 株についての例は、X33、GS115、KM71、KM71H；および CBS7435 である。

【0099】

一実施形態において、真核生物細胞は、真菌細胞 (例えば *Aspergillus* (*A. niger*、*A. fumigatus*、*A. oryzae*、*A. nidula* 等)、*Acremonium* (*A. thermophilum* 等)、*Chaetomium* (*C. thermophilum* 等)、*Chrysosporium* (*C. thermophile* 等)、*Cordyceps* (*C. militaris* 等)、*Corynascus*、*Ctenomyces*、*Fusarium* (*F. oxysporum* 等)、*Glomerella* (*G. graminicola* 等)、*Hypocrea* (*H. jecorina* 等)、*Magnaporthe* (*M. oryzae* 等)、*Myceliophthora* (*M. thermophile* 等)、*Nectria* (*N. heamatococca* 等)、*Neurospora* (*N. crassa* 等)、*Penicillium*、*Sporotrichum* (*S. thermophile* 等)、*Thielavia* (*T. terrestris*、*T. heterothallica* 等)、*Trichoderma* (*T. reesei* 等)、または *Verticillium* (*V. dahlia* 等)) である。

【0100】

一実施形態において、真核生物細胞は、昆虫細胞 (例えば Sf9 または Mimic (商標) Sf9、Sf21、High Five (商標) (BT1-TN-5B1-4) または BT1-Ea88 細胞)、藻類細胞 (例えば属 *Amphora*、*Bacillariophyceae*、*Dunaliella*、*Chlorella*、*Chlamydomonas*、*Cyanophyta* (シアノバクテリア)、*Nannochloropsis*、*Spirulina* または *Ochromonas* のもの)、または植物細胞 (例えば単子葉植物 (例えばトウモロコシ、コメ、コムギまたは *Setaria*)、または双子葉植物 (例えばキャッサバ、ジャガイモ、ダイズ、トマト、タバコ、アルファルファ、*Physcomitrella patens* または *Arabidopsis*) からの細胞) である。

【0101】

一実施形態において、細胞は、細菌細胞または原核生物細胞である。

【0102】

複数の実施形態において、原核生物細胞は、グラム陽性細胞 (*Bacillus*、*Streptomyces*、*Streptococcus*、*Staphylococcus* または *Lactobacillus* 等) である。使用され得る *Bacillus* は、例えば *B. subtilis*、*B. amyloliquefaciens*、*B. licheniformis*、*B. natto* または *B. megaterium* である。複数の実施形態において、細胞は、*B. subtilis* (*B. subtilis* 3NA および *B. subtilis* 168 等) である。*Bacillus* は、例えば *Bacillus Ge*

10

20

30

40

50

netic Stock Center (Biological Sciences 556、484 West 12th Avenue、Columbus OH 43210-1214) から得ることが可能である。

【0103】

一実施形態において、原核生物細胞は、グラム陰性細胞 (*Salmonella* 属の種または *Escherichia coli* (例えば TG1、TG2、W3110、DH1、DHB4、DH5a、HMS 174、HMS 174 (DE3)、NM533、C600、HB101、JM109、MC4100、XL1-Blue および *Origami* 等) に加えて、*E. coli* B 株 (例えば BL-21 または BL21 (DE3) 等) に由来するもの、それらのすべては市販で入手可能である) 等) である。

10

【0104】

好適な宿主細胞は、例えば培養物コレクション (DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH および Braunschweig、ドイツ) または American Type Culture Collection (ATCC) 等) から市販で入手可能である。

【0105】

複数の実施形態において、培養細胞は、治療使用のためのタンパク質 (例えば抗体 (例えばモノクローナル抗体) および/または組み換え体タンパク質) を産生するために使用される。複数の実施形態において、培養細胞は、ペプチド、アミノ酸、脂肪酸、または他の有用な生化学的な中間体もしくは代謝物質を産生する。例えば、複数の実施形態において、約 4000 ダルトン ~ 約 140,000 ダルトンを超える分子量を有する分子が産生され得る。複数の実施形態において、これらの分子は広範囲にわたる複雑性を有することができ、翻訳後修飾を包含し、糖鎖付加を包含する。

20

【0106】

複数の実施形態において、ポリペプチドは、例えば BOTOX、Myobloc、Neurobloc、Dysport (またはボツリヌス神経毒素の他の血清型)、アルグルコシダーゼ、ダブトマイシン、YH-16、絨毛性性腺刺激ホルモン、フィルグラスチム、セトロレリクス、インターロイキン2、アルデスロイキン、テセロイリン (teceleulin)、デニロイキン・ディフティトックス、インターフェロン - n3 (注射剤)、インターフェロン - n1、DL-8234、インターフェロン、Suntory (-1a)、インターフェロン、チモシン 1、タソネルミン、Digifab、ViperaTAb、EchiTAb、CroFab、ネシリチド、アバタセプト、アレファセプト、Rebif、エプトテルミン、テリパラチド、カルシトニン、エタネルセプト、ヘモグロビングルタマー (ウシ)、ドロトレコジン、コラゲナーゼ、カルペリチド、組み換えヒト表皮増殖因子、DWP401、ダルベポエチン、エポエチン、エポエチン、デシルジン、レピルジン、ピバリルジン、ノナコグ 250、Mononine、エプタコグ (活性型)、組み換え第VIIII因子 + VWF、リコネイト、組み換え第VIIII因子、第VIIII因子 (組み換え体)、Alphnmate、オクトコグ、第VIIII因子、パリフェルミン、Indikinas、テネクテブラーゼ、アルテブラーゼ、パミテブラーゼ、レテブラーゼ、ナテブラーゼ、モンテブラーゼ、フォリトロピン、rFSH、hpFSH、ミカファンギン、ペグフィルグラスチム、レノグラスチム、ナルトグラスチム、セルモレリン、グルカゴン、エクセナチド、プラムリントイド、イニグルセラールゼ (inigluceras)、ガルスルファールゼ、Leucotropin、モルグラモスチム、トリプトレリン酢酸塩、ヒストレリン (Hydron)、デスロレリン、ヒストレリン、ナファレリン、ロイプロリド (ATRIGEL)、ロイプロリド (DUROS)、ゴセレリン、Eutropin、ソマトロピン、メカセルミン、enlfavirtide、Org-33408、インスリン グラリジン、インスリン グルリジン、インスリン (吸入用)、インスリン スリプロ、インスリン デテムル、インスリン (Rapid Mist)、メカセルミン リンファパート、アナキンラ、セルモロイキン、99mTc-アプシタイド、ミエロピド (myelopid)、Betas

30

40

50

eron、グラチラマー酢酸塩、Gepon、サルグラモスチム、オブレルベキン、ヒト、白血球由来の インターフェロン、Bilive、インスリン（組み換え体）、組み換えヒトインスリン、インスリンアスパルト、メカセニン（mecasenin）、ロフェロンAおよびインターフェロン 2、Alfaferone、インターフェロンアルファコン - 1、インターフェロン 、Avonex、組み換えヒト黄体化ホルモン、ドルナーゼ、トラフェルミン、ジコノチド、タルチレリン、ジボテルミン、アトシバン、ベカプレルミン、エプチフィパチド、Zemaira、CTC - 111、Shanvac - B、オクトレオチド、ランレオチド、アンセスチム、アガルシダーゼ、アガルシダーゼ、ラロニダーゼ（laronidase）、酢酸プレザチド銅、ラスブリカーゼ、ラニビズマブ、Actimmune、PEG - Intron、Tricommin、組み換えヒト副甲状腺ホルモン（PTH）1 - 84、エポエチン、遺伝子導入抗トロンピンIII、Granditropin、Vitrase、組み換えインスリン、インターフェロン、GEM - 21S、バプレオチド、イデュルスルファーゼ、オムナパトリラト（omnapatrilat）、組み換え血清アルブミン、セルトリズマブ・ペゴル、グルカルピダーゼ、ヒト組み換えC1エステラーゼインヒビター、ラノテブラーゼ、組み換えヒト成長ホルモン、エンフビルチド、VGV - 1、インターフェロン（）、ルシナクタント、アビブタジル、イカチバント、エカランチド、オミガナン、Aurograb、ベキシガナン酢酸塩、ADI - PEG - 20、LDI - 200、デガレリクス、シントレデリンベストトクス（cintredelinbesudotox）、Favld、MDX - 1379、ISAtx - 247、リラグルチド、テリパラチド、チファコギン、AA4500、T4N5リボソームローション、カツマキソマブ、DWP413、ART - 123、Chrysalin、デスモテブラーゼ、アメジブラーゼ、コリフォリトロピン、TH - 9507、テドグルチド、Diamyd、DWP - 412、成長ホルモン、組み換えG - CSF、インスリン、インスリン（Technosphere）、インスリン（AERx）、RGN - 303、DiaPep277、インターフェロン、インターフェロン - n3、ベラタセプト、経皮インスリンパッチ、AMG - 531、MBP - 8298、Xercept、オペバカン、AIDSVAX、GV - 1001、LymphoScan、ランピルナーゼ、Lipoxysan、ルスプルチド、MP52、シプリューセル - T、CTP - 37、Insegia、ピテスペン、ヒトトロンピン、トロンピン、TransMID、アルフィメブラーゼ、Puricase、テルリプレシン、EUR - 1008M、組み換えFGF - I、BDM - E、ロチガブチド、ETC - 216、P - 113、MBI - 594AN、デュラマイシン、SCV - 07、OPI - 45、エンドスタチン、アンジオスタチン、ABT - 510、ボーマン・パークインヒビター、XMP - 629、99mTc - Hynic - アネキシンV、カハラリドF、CTCE - 9908、テベレリックス（teverelix）、オザレリクス、ロミデプシン、BAY - 504798、インターロイキン4、PRX - 321、Pepscan、イボクタデキン、rhラクトフェリン、TRU - 015、IL - 21、ATN - 161、シレンギチド、Albuferon、Biphaxis、IRX - 2、インターフェロン、PCK - 3145、CAP - 232、パシレオチド、huN901 - DMI、SB - 249553、Oncovax - CL、Oncovax - P、BLP - 25、CerVax - 16、MART - 1、gp100、チロシナーゼ、ネミフィチド、rAAT、CGRP、ペグスネルセプト、チモシン 4、プリチデプシン、GTP - 200、ラモブラニン、GRASPA、OBI - 1、AC - 100、サケカルシトニン（エリゲン（eligen））、エクサモレリン（examorelin）、カプロモレリン、Cardeva、ベラフェルミン、131I - TM - 601、KK - 220、T - 10、ウロジラチン、デペレスタット、ヘマチド（hematide）、Chrysalin、rNAPc2、組み換え第VIIII因子（PEG化リボソーム）、bFGF、PEG化組み換えスタフィロキナーゼバリアント、V - 10153、SonoLysis Prolyse、NeuroVax、CZEN - 002、rGLP - 1、BIM - 51077、LY - 548806、エクセナチド（制御放出、Medisorb）、AVE - 0010、GA - GCB、アボレリン（avorelin）、AC

10

20

30

40

50

M - 9604、リナクロチド酢酸塩、CETi - 1、Hemospan、VAL、即効性インスリン（注射可能、Viadel）、インスリン（エリゲン）、組み換えメチオニルヒトレプチン、ピトラキンラ、Multikine、RG - 1068、MM - 093、NBI - 6024、AT - 001、PI - 0824、オルグ - 39141、Cpn10、タラクトフェリン、rEV - 131、rEV - 131、組み換えヒトインスリン、RPI - 78M、オブレルベキン、CYT - 99007 CTLA4 - Ig、DTY - 001、バラテグラスト、インターフェロン - n3、IRX - 3、RDP - 58、Tauferon、胆汁酸塩刺激性リパーゼ、Merispase、アラリン（alanine）ホスファターゼ、EP - 2104R、Melanotan - II、プレメラノチド、ATL - 104および組み換えヒトマイクロプラスミン、AX - 200、SEMAX、ACV - 1、Xen - 2174、CJC - 1008、ダイノルフィンA、SI - 6603、LAB GHRH、AER - 002、BGC - 728、ALTU - 135、組み換えノイラミニダーゼ、Vacc - 5q、Vacc - 4x Tatトキソイド、YSPSL、CHS - 13340、PTH（1 - 34）（Novasome）、Ostabolin - C、PTHアナログ、MBRI - 93.02、MTB72F、MVA - Ag85A、FARA04、BA - 210、組み換えペストFIV、AG - 702、OxSODrol、rBetV1、Der - p1 / Der - p2 / Der - p7、PR1ペプチド抗原、突然変異rasワクチン、HPV - 16 E7リポペプチドワクチン、ラビリンシン（labyrinthin）、WT1 - ペプチド、IDD - 5、CDX - 110、Pentrys、Norelin、CytoFab、P - 9808、VT - 111、イクロカプチド、テルベルミン、ルピントリビル、レティキュロース（reticulose）、rGRF、HA、 - ガラクトシダーゼA、ACE - 011、ALTU - 140、CGX - 1160、アンジオテンシン、D - 4F、ETC - 642、APP - 018、rhMBL、SCV - 07、DRF - 7295、ABT - 828、ErbB2特異的免疫毒素、DT3SSIL - 3、TST - 10088、PRO - 1762、Combotox、コレシストキニン - B / ガストリン受容体結合ペプチド、111In - hEGF、AE - 37、トラスニズ（trasnizumab） - DM1、アンタゴニストG、IL - 12、PM - 02734、IMP - 321、rhIGF - BP3、BLX - 883、CUV - 1647、L - 19ベースのra（L - 19 based ra）、Re - 188 - P - 2045、AMG - 386、DC / 1540 / KLH、VX - 001、AVE - 9633、AC - 9301、NY - ESO - 1（ペプチド）、NA17.A2ペプチド、CBP - 501、組み換えヒトラクトフェリン、FX - 06、AP - 214、WAP - 8294A、ACP - HIP、SUN - 11031、ペプチドYY[3 - 36]、FGLL、アタシセプト、BR3 - Fc、BN - 003、BA - 058、ヒト副甲状腺ホルモン1 - 34、F - 18 - CCR1、AT - 1100、JPD - 003、PTH（7 - 34）（Novasome）、デュラマイシン、CAB - 2、CTCE - 0214、グリコPEG化エリスロポエチン、EPO - Fc、CNTO - 528、AMG - 114、JR - 013、第XIII因子、アミノカンジン（aminocandin）、PN - 951、716155、SUN - E7001、TH - 0318、BAY - 73 - 7977、テベレリックス（teverelix）、EP - 51216、hGH、OGP - I、シフビルチド（sifuvirtide）、TV4710、ALG - 889、Org - 41259、rhCC10、F - 991、チモペンチン、r(m)CRP、肝選択的インスリン、スバリン（subalin）、L19 - IL - 2融合タンパク質、エラフィン、NMK - 150、ALTU - 139、EN - 122004、rhTPO、トロンボポイエチン受容体アゴニスト、AL - 108、AL - 208、神経増殖因子アンタゴニスト、SLV - 317、CGX - 1007、INNO - 105、テリパラチド（エリゲン）、GEM - OS1、AC - 162352、PRX - 302、LFn - p24融合、EP - 1043、gpE1、gpE2、MF - 59、hPTH（1 - 34）、768974、SYN - 101、PGN - 0052、アビスクミン（aviscumnine）、BIM - 23190、マルチエピトープチロシナーゼペプチド、エンカスチム（enkastim）、APC - 8024、GI - 5005、ACC - 001、TTS - CD

10

20

30

40

50

3、血管標的化TNF、デスモプレシン、オネルセプト、およびTP-9201である。

【0107】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、アダリムマブ（HUMIRA）、インフリキシマブ（REMICADE（商標））、リツキシマブ（RITUXAN（商標））/MAB THERA（商標））エタネルセプト（ENBREL（商標））、ペバシズマブ（AVASTIN（商標））、トラスツズマブ（HERCEPTIN（商標））、ペグリイルグラスチム（pegriलग्रास्टिम）（NEULASTA（商標））、またはバイオシミラーおよびバイオベターを包含する他の好適なポリペプチドである。

【0108】

他の好適なポリペプチドは、以下におよびUS 2016/0097074の表1中でリストされたものである。

【表1 - 1】

表1

タンパク質産物	参照のリスト薬物
インターフェロン γ -1b	Actimmune®
アルテプラゼ; 組織プラスミノゲン活性化因子	Activase®/Cathflo®
組み換え抗血友病因子	Advate
ヒトアルブミン	Albutein®
ラロニダーゼ	Aldurazyme®
インターフェロン α -N3、ヒト白血球由来	Alferon N®
ヒト抗血友病因子	Alphanate®
ウイルスを濾過したヒト凝固第IX因子	AlphaNine® SD
アレファセプト; 組み換え、二量体の融合タンパク質LFA3-Ig	Amevive®
ビバリルジン	Angiomax®
ダルベポエチン α	Aranesp™
ペバシズマブ	Avastin™
インターフェロン β -1a; 組み換え体	Avonex®
凝固第IX因子	BeneFix™
インターフェロン β -1b	Betaseron®
トシツモマブ	BEXXAR®
抗血友病因子	Bioclone™
ヒト成長ホルモン	BioTropin™
A型ボツリヌス毒素	BOTOX®
アレムツズマブ	Campath®
アクリツモマブ(acritumomab); テクネチウム99標識	CEA-Scan®
アルグルセラゼ; β -グルコセレブロンダーゼの修飾形態	Ceredase®
イミグルセラゼ; β -グルコセレブロンダーゼの組み換え形態	Cerezyme®
マムシ多価免疫Fab、ヒツジ	CroFab™

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

タンパク質産物	参照のリスト薬物
ジゴキシシ免疫fab[ヒツジ]	DigiFab™
ラスプリカーゼ	Elitek®
エタネルセプト	ENBREL®
エポイエチン(epoietin) α	Epogen®
セツキシマブ	Erbix™
アルガシダーゼ β	Fabrazyme®
ウロフォトリロビン	Fertinex™
フォトリロビン β	Follistim™
デリパラチド	FORTEO®
ヒトソマトロピン	GenoTropin®
グルカゴン	GlucaGen®
フォトリロビン α	Gonal-F®
抗血友病因子	Helixate®
抗血友病因子; 第XIII因子	HEMOFIL
アデフォビル・ジビボキシル	Hepsera™
トラスツズマブ	Herceptin®
インスリン	Humalog®
抗血友病因子フォンウィルブランド因子複合体、ヒト	Humate-P®
ソマトロピン	Humatrope®
アダリムマブ	HUMIRA™
ヒトインスリン	Humulin®
組み換えヒトヒアルロニダーゼ	Hylenex™
インターフェロンアルファコン-1	Infergen®
エプチフィバチド	Integrilin™
α-インターフェロン	Intron A®
バリフェルミン	Kepivance
アナキンラ	Kineret™
抗血友病因子	Kogenate®FS
インスリングルラルギン	Lantus®
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	Leukine®/Leukine®液
注射用ルトロビン α	Luveris
OspAリボタンパク質	LYMERix™
ラニビズマブ	LUCENTIS®
ゲムツズマブ・オゾガマイシン	Mylotarg™
ガルスルファーゼ	Naglazyme™
ネシリチド	Natreacor®
ペグフィルグラスチム	Neulasta™
オブレルベキン	Neumega®
フィルグラスチム	Neupogen®
ファノレスマブ	NeutroSpec™ (以前はLeuTech®)
ソマトロピン[rDNA]	Norditropin®/Norditropin Nordiflex®
ミトキサントロン	Novantrone®
インスリン; 亜鉛懸濁液;	Novolin L®
インスリン; イソファン懸濁液	Novolin N®
インスリン、通常;	Novolin R
インスリン	Novolin®
凝固第VIIa因子	NovoSeven®
ソマトロピン	Nutropin®
免疫グロブリン、静注用	Octagam®
PEG-L-アスパラギナーゼ	Oncaspar®
アバタセプト、完全ヒト可溶性融合タンパク質	Orencia™
ムロモマブ(muromomab)-CD3	Orthoclone OKT3®
高分子量ヒアルロナン	Orthovisc®
ヒト絨毛性腺刺激ホルモン	Ovidrel®
生弱毒化カルメット・格蘭桿菌	Pacis®

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

アバタセプト、完全ヒト可溶性融合タンパク質	Orencia™
ムロモマブ(muromomab)-CD3	Orthoclone OKT3®
高分子量ヒアルロン	Orthovisc®
ヒト絨毛性腺刺激ホルモン	Ovidrel®
生弱毒化カルメット・ゲラン桿菌	Pacis ®

タンパク質産物	参照のリスト薬物
ペグインターフェロン α -2a	Pegasys®
インターフェロン α -2bのPEG化バージョン	PEG-Intron™
アバレリクス(注射可能懸濁液); 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンアンタゴニスト	Plenaxis™
エポイエチン(epoietin) α	Procrit®
アルデスロイキン	Proleukin IL-2®
ソマトレム	Protropin®
ドルナーゼ α	Pulmozyme®
エファリズマブ; 選択的可逆的T細胞ブロッカー	RAPTIVA™
リバビリンおよび α インターフェロンの組み合わせ	Rebetron™
インターフェロン β 1a	Rebif®
抗血友病因子	Recombinate®rAHF/
抗血友病因子	ReFacto®
レビルジン	Refludan®
インフリキシマブ	REMICADE®
アブシキシマブ	ReoPro™
レテプラーゼ	Retavase™
リツキシマ(rituxima)	Rituxan™
インターフェロン α -2 ^a	Roferon-A®
ソマトロピン	Saizen®
合成ブタセクレチン	SecreFlo™
バシリキシマブ	Simulect®
エクリズマブ	SOLIRIS (R)
ペグビソマント	SOMAVERT®
パリビズマブ; 組み換えにより産生されたヒト化mAb	Synagis™
チロトロピン α	Thyrogen®
テネクテプラーゼ	TNKase™
ナタリズマブ	TYSABRI®
ヒト免疫グロブリン、静注用5%および10%溶液	Venoglobulin-S®
インターフェロン α -nl、リンパ芽球系	Wellferon®
ドロトレロジン α	Xigris™
オマリズマブ; 免疫グロブリンEを標的とする組み換えDNA由来 ヒトモノクローナル抗体	Xolair®
ダクリズマブ	Zenapax®
イブリツモマブ・チウクセタン	Zevalin™
ソマトロピン	Zorbtive™ (Serostim®)

【0109】

複数の実施形態において、ポリペプチドは、表2中で示されるような、ホルモン、凝血因子/凝固因子、サイトカイン/増殖因子、抗体分子、融合タンパク質、タンパク質ワクチン、またはペプチドである。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2。例示的な産物

治療産物 タイプ	産物	商標名
ホルモン	エリスロポエチン、エポエイン (epoein- α)	Epogen、Procrit
	ダーベポエチン- α	Aranesp
	成長ホルモン(GH)、ソマトトロピン	Genotropin、Humatrope、Norditropin、 NovIVitropin、Nutropin、Omnitrope、 Protropin、Siazen、Serostim、Valtropin
	ヒト卵胞刺激ホルモン(FSH)	Gonal-F、Follistim
	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	Ovidrel
	ルトロピン- α	Luveris
	グルカゴン	GlcaGen
	成長ホルモン放出ホルモン (GHRH)	Geref
	セクレチン	ChiRhoStim(ヒトペプチド)、SecreFlo (ブタペプチド)
	甲状腺刺激ホルモン(TSH)、 チロトロピン	Thyrogen
凝血因子/ 凝固因子	第VIIa因子	NovoSeven
	第VIII因子	Bioclata、Helixate、Kogenate、 Recombinate、ReFacto
	第IX因子	Benefix
	抗トロンビンⅢ(AT-III)	Thrombate III
	プロテインC濃縮製剤	Ceprotin

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

サイトカイン/ 増殖因子	I型 α インターフェロン	Infergen	10
	インターフェロン- α n3(IFN α n3)	Alferon N	
	インターフェロン- β 1a(rIFN- β)	Avonex、Rebif	
	インターフェロン- β 1b(rIFN- β)	Betaseron	
	インターフェロン- γ 1b(IFN γ)	Actimmune	
	アルデスロイキン(インターロイキン 2(IL2)、表皮の胸腺細胞活性化 因子(epidermal thymocyte activating factor); ETAF)	Proleukin	
	パリフェルミン(ケラチノサイト増殖 因子; KGF)	Kepivance	
	ベカプレミン(becaplemin)(血小板 由来増殖因子; PDGF)	Regranex	20
	アナキンラ(組み換えIL1アンタゴ ニスト)	Anril、Kineret	
抗体分子	ベバシズマブ(VEGFA mAb)	Avastin	30
	セツキシマブ(EGFR mAb)	Erbitux	
	パニツムマブ(EGFR mAb)	Vectibix	
	アレムツズマブ(CD52 mAb)	Campath	
	リツキシマブ(CD20キメラAb)	Rituxan	
	トラスツズマブ (HER2/ノイラミン酸mAb)	Herceptin	
	アバタセプト(CTLA Ab/Fc融合)	Orencia	

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

	アダリムマブ(TNF α mAb)	Humira	
	エタネルセプト	Enbrel	
	(TNF受容体/Fc融合)		
	インフリキシマブ	Remicade	
	(TNF α キメラmAb)		
	アレファセプト	Amevive	10
	(CD2融合タンパク質)		
	エファリズマブ(CD11a mAb)	Raptiva	
	ナタリズマブ	Tysabri	
	(インテグリン α 4サブユニットmAb)		
	エクリズマブ(C5mAb)	Soliris	
	ムロモナブ-CD3	Orthoclone、OKT3	20
他のもの:	インスリン	Humulin、Novolin	
融合	B型肝炎表面抗原(HBsAg)	Engerix、Recombivax HB	
タンパク質/	HPVワクチン	Gardasil	
タンパク質	OspA	LYMErix	
ワクチン/	抗Rhesus(Rh)免疫グロブリンG	Rhophylac	
ペプチド	エンフビルチド	Fuzeon	
	スパイダーシルク	QMONOS	30
	(例えばフィブリオン(fibrion))		

【 0 1 1 0 】

複数の実施形態において、タンパク質は、多重特異性タンパク質（例えば表 3 中で示されるような二重特異性抗体）である。

【表 3 - 1】

表3: 二重特異性フォーマット

名称 (他の名称、 スポンサー 機関)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用 メカニズム	開発 ステージ	疾患(または 健康な ボランティア)
カツマキソマブ (Removab [®] 、 Fresenius Biotech、 Trion Pharma、 Neopharm)	BsIgG: トリオマブ	CD3、 EpCAM	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること、 Fc媒介性 エフェクター機能	EU において 承認	EpCAM陽性 腫瘍における 悪性腹水
ブリナツモマブ (Neovii Biotech、 Fresenius Biotech)	BsIgG: トリオマブ	CD3、 HER2	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相/ 第II相	進行した 固形腫瘍
ブリナツモマブ (Blinicyto [®] 、 AMG 103、 MT 103、 MEDI 538、 Amgen)	BiTE	CD3、 CD19	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	米国 において 承認 第II相 および 第III相 第II相 第 I 相	前駆B細胞 急性リンパ性 白血病 急性リンパ性 白血病 びまん性 大細胞型 B細胞 リンパ腫 非ホジキン リンパ腫
REGN1979 (Regeneron)	BsAb	CD3、 CD20			
ソリトマブ (AMG 110、 MT110、 Amgen)	BiTE	CD3、 EpCAM	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相	固形腫瘍
MEDI 565 (AMG 211、 MedImmune、 Amgen)	BiTE	CD3、 CEA	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相	消化器系 腺癌
RO6958688 (Roche)	BsAb	CD3、 CEA			

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

名称 (他の名称、 スポンサー 機関)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用 メカニズム	開発 ステージ	疾患(または 健康な ボランティア)
BAY2010112 (AMG 212、 Bayer; Amgen)	BiTE	CD3、 PSMA	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相	前立腺癌
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3、 CD123	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相	急性骨髄性 白血病
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3、 gpA33	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相	結腸直腸癌
MGD011 (Macrogenics)	DART	CD19、 CD3			
SCORPION (Emergent Biosolutions、 Trubion)	BsAb	CD3、 CD19	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること		
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3、 CD19	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相	非ホジキン リンパ腫 および 急性 リンパ性 白血病
AFM12 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD19、 CD16	NK細胞を 腫瘍細胞へ 再標的化すること		
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30、 CD16A	NK細胞を 腫瘍細胞へ 再標的化すること	第II相	ホジキンリン パ腫
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAbを あらかじめ ローディング したT細胞	CD3、 GD2	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相/ 第II相	神経芽 細胞腫 および 骨肉腫
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAbを あらかじめ ローディング したT細胞	CD3、 Her2	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第II相	転移性乳癌

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

名称 (他の名称、 スポンサー 機関)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用 メカニズム	開発 ステージ	疾患(または 健康な ボランティア)
EGFRBi武装化 自己活性化 T細胞 (Roger Williams Medical Center)	BsAbを あらかじめ ローディング したT細胞	CD3、 EGFR	EGFR陽性腫瘍へ 自己活性化され T細胞	第 I 相	肺および 他の 固形腫瘍
抗EGFR武装化 活性化T細胞 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	BsAbを あらかじめ ローディング したT細胞	CD3、 EGFR	EGFR陽性腫瘍へ 自己活性化された T細胞	第 I 相	大腸癌 および 膵臓癌
rM28 (University Hospital Tübingen)	タンデム scFv	CD28、 MAPG	T細胞を腫瘍へ再 標的化すること	第II相	転移性 メラノーマ
IMCgp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3、 ペプチドMHC	T細胞を腫瘍へ 再標的化すること	第 I 相/ 第II相	転移性 メラノーマ
DT2219ARL (NCI、 University of Minnesota)	ジフテリア 毒素へ 連結された 2scFv	CD19、 CD22	腫瘍へ タンパク質毒素を 標的化すること	第 I 相	B細胞 白血病 または B細胞 リンパ腫
XmAb5871 (Xencor)	BsAb	CD19、 CD32b			
NI-1701 (NovImmune)	BsAb	CD47、 CD19			
MM-111 (Merrimack)	BsAb	ErbB2、 ErbB3			

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

名称 (他の名称、 スポンサー 機関)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用 メカニズム	開発 ステージ	疾患(または 健康な ボランティア)
MM-141 (Merrimack)	BsAb	IGF-1R、 ErbB3			
NA (Merus)	BsAb	HER2、 HER3			
NA (Merus)	BsAb	CD3、 CLEC12A			
NA (Merus)	BsAb	EGFR、 HER3			
NA (Merus)	BsAb	PD1、 開示されて いない			
NA (Merus)	BsAb	CD3、 開示されて いない			
ドゥリゴツズマブ (duligotuzumab) (MEHD7945A、 Genentech、 Roche)	DAF	EGFR、 HER3	2つの受容体の 遮断、ADCC	第 I 相 および 第II相 第II相	頭頸部癌 結腸直腸癌
LY3164530 (Eli Lilly)	開示されて いない	EGFR、 MET	2つの受容体の 遮断	第 I 相	進行癌または 転移癌
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	HSAボディ	HER2、 HER3	2つの受容体の 遮断	第II相 第 I 相	胃癌および 食道癌 乳癌
MM-141、 (Merrimack Pharmaceuticals)	IgG-scFv	IGF-1R、 HER3	2つの受容体の 遮断	第 I 相	進行性 固形腫瘍

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

名称 (他の名称、 スポンサー 機関)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用 メカニズム	開発 ステージ	疾患(または 健康な ボランティア)
RG7221 (RO5520985、 Roche)	CrossMab	Ang2、 VEGF A	2つの血管新生 促進の遮断	第 I 相	固形腫瘍
RG7716 (Roche)	CrossMab	Ang2、 VEGF A	2つの血管新生 促進の遮断	第 I 相	滲出型加齢 黄斑変性
OMP-305B83 (OncoMed)	BsAb	DLL4/ VEGF			
TF2 (Immunomedics)	Dock and lock	CEA、 HSG	PETまたは 放射性 イメージング ために腫瘍を 前標的化すること	第II相	結腸直腸癌、 乳癌および 肺癌
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1 α 、 IL-1 β	2つの炎症誘発性 サイトカインの 遮断	第II相	骨関節炎
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	TNF、 IL-17A	2つの炎症誘発性 サイトカインの 遮断	第II相	関節リウマチ
COVA322	IgG- フィノマー (fynomer)	TNF、 IL17A	2つの炎症誘発性 サイトカインの 遮断	第 I 相/ 第II相	局面型乾癬
SAR156597 (Sanofi)	四価 二重特異性 タンデムIgG	IL-13、 IL-4	2つの炎症誘発性 サイトカインの 遮断	第 I 相	特発性 肺線維症
GSK2434735 (GSK)	Dual- targeting domain	IL-13、 IL-4	2つの炎症誘発性 サイトカインの 遮断	第 I 相	(健康な ボランティア)

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

名称 (他の名称、 スポンサー 機関)	BsAb フォーマット	標的	提案された 作用 メカニズム	開発 ステージ	疾患(または 健康な ボランティア)
Ozoralizumab (ATN103、 Ablynx)	ナノボディ	TNF、 HSA	炎症性サイトカイン の遮断、HSAへ 結合して半減期を 増加させる	第II相	関節リウマチ
ALX-0761 (Merck Serono、 Ablynx)	ナノボディ	IL-17A/ F、HSA	2つの炎症誘発性 サイトカインの 遮断、HSAへ結合 して半減期を増加 させる	第 I 相	(健康な ボランティア)
ALX-0061 (AbbVie、 Ablynx;	ナノボディ	IL-6R、 HSA	炎症性サイトカイン の遮断、HSAへ 結合して半減期を 増加させる	第 I 相/ 第II相	関節リウマチ
ALX-0141 (Ablynx、 Eddingpharm)	ナノボディ	RANKL、 HSA	骨再吸収の遮断、 HSAへ結合して 半減期を増加 させる	第 I 相	閉経後の 骨損失
RG6013/ ACE910 (Chugai、 Roche)	ART-Ig	第IXa因子、 第X因子	血漿凝固	第II相	血友病

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表4

タンパク質産物

参照のリスト薬物

インターフェロン γ -1b	Actimmune®
アルテプラゼ; 組織プラスミノゲン活性化因子	Activase®/Cathflo®
組み換え抗血友病因子	Advate
ヒトアルブミン	Albutein®
ラロニダーゼ	Aldurazyme®
インターフェロン α -N3、ヒト白血球由来	Alferon N®
ヒト抗血友病因子	Alphanate®
ウイルスを濾過したヒト凝固第IX因子	AlphaNine® SD
アレファセプト; 組み換え、二量体の融合タンパク質LFA3-Ig	Amevive®
ビバリルジン	Angiomax®
ダルベポエチン α	Aranesp™
ベバシズマブ	Avastin™
インターフェロン β -1a; 組み換え体	Avonex®
凝固第IX因子	BeneFix™
インターフェロン β -1b	Betaseron®
トシツモマブ	BEXXAR®
抗血友病因子	Bioclone™
ヒト成長ホルモン	BioTropin™
A型ボツリヌス毒素	BOTOX®
アレムツズマブ	Campath®
アクリツモマブ(acritumomab); テクネチウム99標識	CEA-Scan®
アルグルセラゼ; β -グルコセレブロンダーゼの修飾形態	Ceredase®

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

表4

タンパク質産物

参照のリスト薬物

イミグルセラゼ; β -グルコセレブロンダーゼの組み換え形態	Cerezyme®
マムシ多価免疫Fab、ヒツジ	CroFab™
ジゴキシン免疫fab[ヒツジ]	DigiFab™
ラスブリカーゼ	Elitek®
エタネルセプト	ENBREL®
エポイエチン(epoietin) α	Epogen®
セツキシマブ	Erbitux™
アルガンダーゼ β	Fabrazyme®
ウロフォリトロピン	Fertinex™
フォリトロピン β	Follistim™
テリパラチド	FORTEO®
ヒトソマトロピン	GenoTropin®
グルカゴン	GlucaGen®
フォリトロピン α	Gonal-F®
抗血友病因子	Helixate®
抗血友病因子; 第XIII因子	HEMOFIL
アデフォビル・ジピボキシル	Hepsera™
トラスツズマブ	Herceptin®
インスリン	Humalog®
抗血友病因子/フォンウィルブランド因子複合体、ヒト	Humate-P®
ソマトロピン	Humatrope®

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

表4

タンパク質産物

参照のリスト薬物

アダリムマブ	HUMIRA™
ヒトインスリン	Humulin®
組み換えヒトヒアルロニダーゼ	Hylanex™
インターフェロンアルファコン-1	Infergen®
エプチフィバチド	Integrilin™
α-インターフェロン	Intron A®
パリフェルミン	Kepivance
アナキンラ	Kineret™
抗血友病因子	Kogenate® FS
インスリングルルギン	Lantus®
顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	Leukine®/Leukine®液
注射用ルトロピンα	Luveris
OspAリポタンパク質	LYMERix™
ラニビズマブ	LUCENTIS®
ゲムツズマブ・オゾガマイシン	Mylotarg™
ガルスルファーゼ	Naglazyme™
ネシリチド	Natrecor®
ペグフィルグラスチム	Neulasta™
オブレルベキン	Neumega®
フィルグラスチム	Neupogen®
ファノレソマブ	NeutroSpec™ (以前はLeuTech®)
ソマトロピン[rDNA]	Norditropin®/ Norditropin Nordiflex®

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

表4

タンパク質産物

参照のリスト薬物

ミトキサントロン	Novantrone®
インスリン; 亜鉛懸濁液;	Novolin L®
インスリン; イソファン懸濁液	Novolin N®
インスリン、通常;	Novolin R®
インスリン	Novolin®
凝固第VIIa因子	NovoSeven®
ソマトロピン	Nutropin®
免疫グロブリン、静注用	Octagam®
PEG-L-アスパラギナーゼ	Oncaspar®
アバタセプト、完全ヒト可溶性融合タンパク質	Orencia™
ムロモマブ(muromomab)-CD3	Orthoclone OKT3®
高分子量ヒアルロナン	Orthovisc®
ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	Ovidrel®
生弱毒化カルメット・ゲラン桿菌	Pacis®
ペグインターフェロン α -2a	Pegasys®
インターフェロン α -2bのPEG化バージョン	PEG-Intron™
アバレリクス(注射可能懸濁液); 生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンアンタゴニスト	Plenaxis™
エポイエチン(epoietin) α	Procrit®
アルデスロイキン	Proleukin, IL-2®
ソマトレム	Protropin®

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

表4

タンパク質産物	参照のリスト薬物
ドルナーゼ α	Pulmozyme®
エファリズマブ; 選択的可逆的T細胞ブロッカー	RAPTIVA™
リバビリンおよび α インターフェロンの組み合わせ	Rebetron™
インターフェロン β 1a	Rebif®
抗血友病因子	Recombine® rAHF/
抗血友病因子	ReFacto®
レピルジン	Refludan®
インフリキシマブ	REMICADE®
アブシキシマブ	ReoPro™
レテプララーゼ	Retavase™
リツキシマ(rituxima)	Rituxan™
インターフェロン α -2 ^a	Roferon-A®
ソマトロピン	Saizen®
合成ブタセクレチン	SecreFlo™
バシリキシマブ	Simulect®
エクリズマブ	SOLIRIS (R)
ペグビソマント	SOMAVERT®
パリビズマブ; 組み換えにより産生されたヒト化mAb	Synagis™
チロトロピン α	Thyrogen®
テネクテプララーゼ	TNKase™
ナタリズマブ	TYSABRI®
ヒト免疫グロブリン、静注用5%および10%溶液	Venoglobulin-S®

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

表4

タンパク質産物

参照のリスト薬物

インターフェロン α -nl、リンパ芽球系	Wellferon®
ドロトレコジン α	Xigris™
オマリズマブ; 免疫グロブリンEを標的とする組み換えDNA由来ヒト化モノクローナル抗体	Xolair®
ダクリズマブ	Zenapax®
イブリツモマブ・チウクセタン	Zevalin™
ソマトトロピン	Zorbitive™ (Serostim®)

10

【 0 1 1 1】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは癌細胞によって発現される抗原である。いくつかの実施形態において、組み換えポリペプチドまたは治療用ポリペプチドは腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原である。いくつかの実施形態において、組み換えポリペプチドまたは治療用ポリペプチドは、HER2、CD20、9-O-アセチル-GD3、hCG、A33抗原、CA19-9マーカー、CA-125マーカー、カルレティキュリン、カルボアンヒドラーゼIX(MN/CA IX)、CCR5、CCR8、CD19、CD22、CD25、CD27、CD30、CD33、CD38、CD44v6、CD63、CD70、CC123、CD138、癌胎児抗原(CEA; CD66e)、デスモグレイン4、E-カドヘリンネオエピトープ、エンドシアリン、エフリンA2(EphA2)、表皮増殖因子受容体(EGFR)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、Erbb2、胎児アセチルコリン受容体、線維芽細胞活性化抗原(FAP)、フコシルGM1、GD2、GD3、GM2、ガングリオシドGD3、グロboh、糖タンパク質100、HER2/neu、HER3、HER4、インスリン様増殖因子受容体1、ルイスY、LG、Ly-6、メラノーマ特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSCP)、メソテリン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、MUC16、ミュー管抑制因子(MIS)受容体II型、形質細胞抗原、ポリSA、PSCA、PSMA、ソニックヘッジホッグ(SHH)、SAS、STEAP、sTn抗原、TNF前駆体、およびその組み合わせから選択される。

20

30

【 0 1 1 2】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは活性化受容体であり、2B4(CD244)、4-1インテグリン、2インテグリン、CD2、CD16、CD27、CD38、CD96、CD100、CD160、CD137、CEACAM1(CD66)、CRTAM、CS1(CD319)、DNAM-1(CD226)およびGITR(TNFRSF18)、KIRの活性化形態、NKG2C、NKG2D、NKG2E、1つまたは複数の天然の細胞傷害性受容体、NTB-A、PEN-5、およびその組み合わせから選択され、随意に、2インテグリンはCD11a-CD18、CD11b-CD18またはCD11c-CD18を含み、随意に、KIRの活性化形態はKIR2DS1、KIR2DS4またはKIR-Sを含み、随意に、天然の細胞傷害性受容体はNkp30、Nkp44、Nkp46またはNkp80を含む。

40

【 0 1 1 3】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは阻害性受容体であり、KIR、ILT2/LIR-1/CD85j、KIRの阻害形態、KLRG1、LAIR-1、NKG2A

50

、NK R - P 1 A、シグレック - 3、シグレック - 7、シグレック - 9、およびその組み合わせから選択され、随意に、K I Rの阻害形態はK I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2、K I R 2 D L 3、K I R 3 D L 1、K I R 3 D L 2またはK I R - Lを含む。

【0114】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは活性化受容体であり、C D 3、C D 2 (L F A 2、O X 3 4)、C D 5、C D 2 7 (T N F R S F 7)、C D 2 8、C D 3 0 (T N F R S F 8)、C D 4 0 L、C D 8 4 (S L A M F 5)、C D 1 3 7 (4 - 1 B B)、C D 2 2 6、C D 2 2 9 (L y 9、S L A M F 3)、C D 2 4 4 (2 B 4、S L A M F 4)、C D 3 1 9 (C R A C C、B L A M E)、C D 3 5 2 (L y 1 0 8、N T B A、S L A M F 6)、C R T A M (C D 3 5 5)、D R 3 (T N F R S F 2 5)、G I T R (C D 3 5 7)、H V E M (C D 2 7 0)、I C O S、L I G H T、L T R (T N F R S F 3)、O X 4 0 (C D 1 3 4)、N K G 2 D、S L A M (C D 1 5 0、S L A M F 1)、T C R、T C R、T C R、T I M 1 (H A V C R、K I M 1)、およびその組み合わせから選択される。

10

【0115】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは阻害性受容体であり、P D - 1 (C D 2 7 9)、2 B 4 (C D 2 4 4、S L A M F 4)、B 7 1 (C D 8 0)、B 7 H 1 (C D 2 7 4、P D - L 1)、B T L A (C D 2 7 2)、C D 1 6 0 (B Y 5 5、N K 2 8)、C D 3 5 2 (L y 1 0 8、N T B A、S L A M F 6)、C D 3 5 8 (D R 6)、C T L A - 4 (C D 1 5 2)、L A G 3、L A I R 1、P D - 1 H (V I S T A)、T I G I T (V S I G 9、V S T M 3)、T I M 2 (T I M D 2)、T I M 3 (H A V C R 2、K I M 3)、およびその組み合わせから選択される。

20

【0116】

他の例示的なタンパク質としては、Leader et al., "Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification", Nature Reviews Drug Discovery, 2008, 7: 21 - 39 (参照により本明細書に援用される)の表1~10中で記載される任意のタンパク質;または本明細書において記載される組み換えポリペプチドの任意のコンジュゲート、バリエーション、アナログもしくは機能的断片が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0117】

他の組み換えタンパク質産物は、非抗体スキャフォールドまたは代替のタンパク質スキャフォールド (DARPin s、アフィボディおよびアドネクチン等であるがこれらに限定されない) を包含する。かかる非抗体スキャフォールドまたは代替のタンパク質スキャフォールドは、1もしくは2またはそれ以上 (例えば1、2、3、4もしくは5またはそれ以上) の異なる標的または抗原を認識するかまたは結合するように操作され得る。

【0118】

可変直径のバイオリアクター

本明細書において開示される、産物 (例えば産物バリエーション) の調製の方法は、可変直径のバイオリアクター容器 (VDB) により使用され得る。可変直径のバイオリアクター容器が本明細書において記載され、液体培地および生物学的材料を保持するように構成された第1の直径を有する、第1の容器セクション、および液体培地が容器内で第1の体積から第2の体積へ増加され得るように第1の直径よりも大きい第2の直径を有する、第2の容器セクションを含み得る。いくつかの態様において、第1の容器セクションは0.3:1より大きいアスペクト比を有することができる。いくつかの態様において、第2の容器セクションは0.3:1より大きいアスペクト比を有することができる。いくつかの態様において、液体培地は接種物を含む。第1の容器セクションは最初の接種ステージのバイオリアクターであるように構成され得る。第2の容器セクションは増殖ステージのバイオリアクターまたはシードバイオリアクターであるように構成され得る。可変直径のバイオリアクター容器は少なくとも1つのかき混ぜ機をさらに含み得る。いくつかの態様にお

40

50

いて、バイオリアクターは、かき混ぜ機シャフト、インペラー、スパージャー、プローブポート、充填ポート、コンデンサー、ベントフィルター、消泡機プレート、サンプルポート、レベルプローブ、およびロードセルのうちの少なくとも1つをさらに含み得る。

【0119】

いくつかの態様において、可変直径のバイオリアクター容器は、哺乳動物細胞、植物細胞、微生物細胞、または昆虫細胞の増殖のために構成され得る。他の態様において、本明細書において開示される、産物（例えば産物バリエーション）の調製の方法による使用のための可変直径のバイオリアクター系は、容器の直径が容器の高さに沿って変動するように第1の直径および第2の直径を有するバイオリアクター容器、かき混ぜ機がバイオリアクター容器の所与の液体高さで所望されるかき混ぜを提供するように配置されるバイオリアクター容器内のかき混ぜ機、ならびに第1の体積から第2の体積へバイオリアクター容器をスケールアップするように作動可能な制御系を含み得る。いくつかの態様において、第1の容器セクションは0.3:1より大きいアスペクト比を有し、第2の容器セクションは0.3:1より大きいアスペクト比を有する。第1の容器のセクションは、最初の接種ステージのバイオリアクターであり得る。第2の容器のセクションは、増殖ステージの容器セクションであり得る。可変直径のバイオリアクター系は、スパージャー、プローブポート、充填ポート、コンデンサー、ベントフィルター、消泡機プレート、サンプルポート、レベルプローブ、および/またはロードセルも含み得る。いくつかの態様において、可変直径のバイオリアクター系は哺乳動物細胞産生のために構成される。

10

【0120】

他の態様において、産物（例えば産物バリエーション）の調製の方法は、増殖培地および接種物を第1の体積でバイオリアクターに接種すること、ならびに接種ステージの完了に続いて、追加の増殖培地をバイオリアクターへ添加してバイオリアクター体積を第2の体積へスケールアップすることを含む。いくつかの態様において、方法は、増殖ステージの完了に続いて、追加の増殖培地をバイオリアクターへ添加してバイオリアクター体積を第3の体積へスケールアップすることをさらに含み得る。いくつかの態様において、接種物は哺乳動物細胞である。他の態様において、バイオリアクターは0.3:1の最小アスペクト比を有することができる。

20

【0121】

可変直径のバイオリアクター（VDB）（本明細書において記載されるもの等）中の生物学的材料（微生物培養物および哺乳動物培養物等）のバイオリアクタープロセスは、最小の接種物により開始する増殖条件を持続させ、増殖継続期間にわたる連続的および/またはボラスの培地および/または供給添加を利用して細胞増殖を持続させるように、デザインされる。単一のVDB中での細胞の増殖および産生の達成によって、複数のより小さな体積バイオリアクターは消失され得る。単一のVDBは、所望される産物の産生のために必要とされるバイオリアクター機器の全体的な設置面積を低減し、複数のシード反応器、複数のCIP、SIP、開始操作、ポストラン操作を消失させ、複数のシードバイオリアクターの使用により現在観察される非対数細胞増殖またはラグ相効果を最小限にし、したがって全体的な設備操作を単純化し、時間および価格削減をもたらす。

30

【0122】

例えば、単一の20,000LのVDBは、200LのN-3、1000LのN-2および5000LのN-1シードバイオリアクターを置き換えることができる。単一のVDBによって3つのシードバイオリアクターを置換することは、300平方フィートを超えるクリーンルーム空間を節約することができることも推定される。

40

【0123】

いくつかの態様において、バイオリアクターの下方向部分についての円錐状またはより小さな直径の円筒形状および上方部分についての円筒状デザインの利用は、1つのバイオリアクター内で制御可能なスケールアップを可能にし、混合および通気に関して重要なデザイン利益を提供する。例えば、可変直径の円錐状のまたはより小さな直径の円筒状の底のタンクの使用は、1:1より大きいアスペクト比（液体レベルでの液体高さ対容器幅）に

50

より、バルクの間により大きな体積培養まで酸素移動のための十分な液頭を備えた最小の接種体積を支援するように維持され得る。次いで培養体積を培地の添加を介してかさ高くして、細胞増殖を持続させることができる。代替の底部デザインは、典型的な固定直径の円筒形のタンクバイオリアクターデザインに比較して、より高いアスペクト比およびより少ない体積で操作する能力を可能にすることができる。

【0124】

本明細書において使用される時、「生物学的材料」は、生きているかもしくは死んだ細胞材料もしくはウイルス材料からすべてもしくは部分的になる粒子、ならびに/または細胞培養またはウイルス培養によって産生および発現された産物を意味することが理解される。例えば、これは、真核生物細胞または原核生物細胞（哺乳動物、細菌、植物、真菌等のもの）、ウイルス（タリモジーン・ラハーパーレブベック（T-V E C）等）、または他の所望される治療用産物もしくは生化学的産物を包含し得る。いくつかの態様において、「生物学的材料」は、細胞療法プログラムのために産生された細胞を包含する。いくつかの態様において、「生物学的材料」は、ウイルス療法（ウイルス遺伝子療法、ウイルス免疫療法または原動物ウイルス療法を包含する）のために産生されたウイルスを包含する。いくつかの態様において、「生物学的材料」は、本明細書において記載されるような産物（例えば産物バリエーション）の発酵産生のための細胞培養物またはウイルス培養物を包含する。いくつかの態様において、生物学的材料は、不活性材料（基質または固定化材料等）を包含し得る。さらに、本明細書において使用される時、「液体培地」は、典型的にはバイオリアクタープロセスにおいて使用される任意の液体（増殖培地、水、接種物および生物学的材料等）を意味することが理解される。液体培地は、液体培地中に懸濁されるか、乳化されるか、同伴されるか、またはそうでなければ存在する、固体粒子および/または気体を有し得る。

【0125】

図中で示されるように、可変直径のバイオリアクターは、単一のバイオリアクター容器内で接種物からシードおよび産生へと効率的スケールアップを可能にする複数の立体配置を有し得る。いくつかの態様において、バイオリアクター培地体積が、従来の垂直円筒の一般的な直径の反応器に比べて少ない場合に、可変直径のバイオリアクターはより好適なアスペクト比を有し得る。少ない体積接種から生産量までの培地または供給の添加は、廃液が希釈され、新鮮な栄養素が連続的に導入および混合されるので、細胞増殖のための安定化した環境も提供する。いくつかの態様において、例示的な可変直径のバイオリアクターは、発酵プロセスのために構成することができ、バッチ、フェドバッチ、または連続産生もしくは灌流産生であり得、産生の方法は、バイオリアクター容器内での培養のステージおよび体積ステージに依存して変化し得る。例えば、最初の接種ステージの間に、バッチプロセスまたはフェドバッチプロセスが使用され得る。次いで、一旦細胞増殖ステージが成熟に到達し、バイオリアクター体積がその所望される限界へスケールアップされれば、連続プロセスまたは灌流プロセスを利用され得る。本明細書において記載される可変直径のバイオリアクターは、任意の好適な材料から形成され、一回使用の使い捨ての系のために構成され得る。いくつかの態様において、反応器は、単一タイプ系または多重産物一式における使用のために構成され得る。

【0126】

さらに、可変直径のバイオリアクターは任意の所望される全体積を有するように構成され得る。より詳細に論じられるように、VDBは約20,000リットル（L）の全体積を有することができるが、例えば1,000Lの全体積または場合によっては10Lの全体積を備えたVDBをデザインすることも可能である。例えば、10Lの全体積VDBはプロセス開発またはスケールダウン研究のために使用され得るが、1000Lの体積はパイロットスケールのバイオリアクターとして供することができる。図1～3は、円錐状下方部分および円筒状上方部分を有し、それによって上部円筒状の部分の高さが変動されて様々な所望される体積を達成する、例示的な可変直径のバイオリアクターを図示する。

【0127】

10

20

30

40

50

図 1 は可変直径のバイオリアクター (V D B) 1 0 0 を図示する。可変直径のバイオリアクター 1 0 0 は、液体培地または生物学的材料の培養物 (適切な細胞等) を保持するように構成された第 1 の直径を有する、第 1 の容器セクション 1 0 2、および液体培地が容器 1 0 0 内で第 1 の体積から第 2 の体積へ増加され得るように第 1 の直径よりも大きい第 2 の直径を有する、第 2 の容器セクション 1 0 4 を含む。可変直径のバイオリアクター 1 0 0 は、少なくとも 1 つの入口 (マンウェイ 1 0 6 等) および少なくとも 1 つの出口 1 0 8 も有する。

【 0 1 2 8 】

図 2 は、図 1 中で示される可変直径のバイオリアクターの上部円筒状部分の高さと比べて、上部円筒状部分の高さが減少した、可変直径のバイオリアクター (V D B) 2 0 0 を図示する。可変直径のバイオリアクター 2 0 0 は、液体培地を保持するように構成された第 1 の直径を有する、第 1 の容器セクション 2 0 2、および第 1 の直径よりも大きい第 2 の直径を有する、第 2 の容器セクション 2 0 4 を含む。可変直径のバイオリアクター 2 0 0 は、少なくとも 1 つの入口 (マンウェイ 2 0 6 等) および少なくとも 1 つの出口 2 0 8 も有する。

10

【 0 1 2 9 】

図 3 は、図 2 中で示される可変直径のバイオリアクターの上部円筒状部分の高さと比べて、上部円筒状部分の高さが減少した、可変直径のバイオリアクター (V D B) 3 0 0 を図示する。可変直径のバイオリアクター 3 0 0 は、液体培地を保持するように構成された第 1 の直径を有する、第 1 の容器セクション 3 0 2、および第 1 の直径よりも大きい第 2 の直径を有する、第 2 の容器セクション 3 0 4 を含む。可変直径のバイオリアクター 3 0 0 は、少なくとも 1 つの入口 (マンウェイ 3 0 6 等) および少なくとも 1 つの出口 3 0 8 も有する。

20

【 0 1 3 0 】

図 4 は可変直径のバイオリアクター (V D B) 4 0 0 を図示する。可変直径のバイオリアクター 4 0 0 は、第 1 の容器セクション 4 0 2、第 2 の容器セクション 4 0 4、および第 3 の容器セクション 4 0 6 を含む。第 1 の容器セクションは、容器の高さに沿って変動する直径を有する (すなわち、第 1 の容器セクション 4 0 2 の直径および第 2 の容器セクション 4 0 4 の直径は、バイオリアクター 4 0 0 の頂部に向かって増加する)。しかしながら示されるように、第 3 のセクション 4 0 6 の直径は、セクション 4 0 6 の全体にわたって比較的一様にとどまる。

30

【 0 1 3 1 】

図 5 は可変直径のバイオリアクター (V D B) 5 0 0 を図示する。可変直径のバイオリアクター 5 0 0 は、第 1 の容器セクション 5 0 2、第 2 の容器セクション 5 0 4、および第 3 の容器セクション 5 0 6 を含む。第 1 の容器セクションは、ステップ状様式で容器の高さに沿って変動する直径を有する (すなわち、容器の上へ動くにつれて、第 3 の容器セクション 5 0 6 の直径は、第 2 の容器セクション 5 0 4 の体積より大きく、それは第 1 の容器セクション 5 0 2 の体積より大きい)。示されるように、この態様において、各々のステージの直径はステージの全体にわたって一様であり、ステップは第 1 のステージ 5 0 2 と第 2 のステージ 5 0 4 との間で増加し、別のステップは第 2 のステージ 5 0 4 と第 3 のステージ 5 0 6 との間で直径が増加する。

40

【 0 1 3 2 】

図 6 ~ 9 は、様々なバイオリアクターデザインの例示的なアスペクト比および体積を図示する。上記のように、アスペクト比は、容器の高さ対幅または直径として定義される。示されるように、図 6 ~ 9 の反応器は、約 0 リットル ~ 2 5 , 0 0 0 リットル (L) の間の範囲の体積を有し得る。

【 0 1 3 3 】

図 6 は、一様な直径を有する典型的なバイオリアクター 6 0 0 である (すなわち可変直径のバイオリアクターでない)。典型的なバイオリアクター 6 0 0 は、単一の容器セクション 6 0 8 のみを有し、バイオリアクターの高さ 6 0 2、体積 6 0 4、およびアスペクト

50

比 6 0 6 を有する。典型的なバイオリアクター 6 0 0 は、表 1 中で示されるバイオリアクターの高さ 6 0 2 およびアスペクト比 6 0 6 を有する。示されるように、少ない体積（例えば 8 0 0 L）で、典型的な一様な直径反応器のアスペクト比は 0 . 3 よりも有意に低い。さらに、一様な直径バイオリアクターは、少なくとも 0 . 6 5 以上のアスペクト比（それは図 6 中で約 1 0 , 0 0 0 L の体積を提示する）で操作される必要がある。したがって、一様な直径バイオリアクターは、至適操作のための所望される培養体積を達成するように、培養体積を漸進的に増加させる複数のシードバイオリアクターを要求する。

【表 5】

表1: 典型的なバイオリアクター600	
フィートでの高さ (602)	アスペクト比 (606)
0	0
1	0.12:1
2	0.22:1
3	0.33:1
4	0.44:1
5	0.55:1
6	0.65:1
7	0.76:1
8	0.87:1
9	0.98:1
10	1.09:1
11	1.20:1
12	1.31:1
13	1.42:1
14	1.53:1

10

20

30

【 0 1 3 4 】

図 7、8 および 9 は、それぞれ 2 0 0 L、1 0 0 0 L および 4 0 0 0 L の複数のシードバイオリアクターを消失させるのに要求される、所望される体積での操作がすべて可能な異なる立体配置の可変直径のバイオリアクターを示す。

【 0 1 3 5 】

図 7 は、バイオリアクターの高さ 7 0 2、体積 7 0 4、およびアスペクト比 7 0 6 を有する、例示的な可変直径のバイオリアクター（VDB）7 0 0 を図示する。示されるように、バイオリアクター 7 0 0 は、第 1 の容器セクション 7 0 8、第 2 の容器セクション 7 1 0、および第 3 の容器セクション 7 1 2 を有する。例示的なバイオリアクター 7 0 0 は、表 2 中で示されるバイオリアクターの高さ 7 0 2、アスペクト比 7 0 6、および体積 7 0 4 を有する。

40

50

【表 6】

表2: VDBバイオリアクター700	
フィートでの高さ (702)	アスペクト比 (706)
0	0
1	0.35:1
2	0.71:1
3	1.06:1
4	1.41:1
5	1.76:1
6	1.13:1
7	1.31:1
8	1.50:1
9	1.69:1
10	1.13:1
11	1.20:1
12	1.31:1
13	1.42:1
14	1.53:1
15	1.64:1
16	1.75:1
17	1.85:1
18	1.96:1
19	2.07:1
20	2.18:1

10

20

30

40

【 0 1 3 6 】

図 8 は、バイオリアクターの高さ 8 0 2、体積 8 0 4、およびアスペクト比 8 0 6 を有する、例示的な可変直径のバイオリアクター（VDB）8 0 0 を図示する。示されるように、バイオリアクター 8 0 0 は、第 1 の容器セクション 8 0 8、第 2 の容器セクション 8 1 0、および第 3 の容器セクション 8 1 2 を有する。

【 0 1 3 7 】

図 9 は、バイオリアクターの高さ 9 0 2、体積 9 0 4、およびアスペクト比 9 0 6 を有する、例示的な可変直径のバイオリアクター（VDB）9 0 0 を図示する。示されるように、バイオリアクター 9 0 0 は第 1 の容器セクション 9 0 8 および第 2 の容器セクション

50

910を有する。例示的な反応器800、900は、表3中で示される、バイオリアクターの高さ802、902、およびアスペクト比806、906を有する。

【表7】

表3: VDBバイオリアクター800および900		
フィートでの高さ(802、902)	バイオリアクター800アスペクト比(806)	バイオリアクター900アスペクト比(906)
0		
1	0.34:1	0.33:1
2	0.65:1	0.57:1
3	0.92:1	0.75:1
4	1.17:1	0.88:1
5	1.39:1	1:1
6	1.56:1	1.09:1
7	1.31:1	1.16:1
8	1.51:1	1.23:1
9	1.49:1	1.28:1
10	1.48:1	1.33:1
11	1.47:1	1.37:1
12	1.46:1	1.41:1
13	1.45:1	1.44:1
14	1.53:1	1.53:1
15	1.64:1	1.64:1
16	1.75:1	1.75:1
17	1.85:1	1.85:1
18	1.96:1	1.96:1
19	2.07:1	2.07:1

【0138】

図10および11は、例示的な可変直径のバイオリアクター容器1000および1100を図示する。示されるように、可変直径のバイオリアクター1000、1200は、多様なポート、プローブ、スパージャー、および他の構成要素（かき混ぜ機シャフト、インペラー、スパージャー、プローブポート、充填ポート、コンデンサー、ベントフィルター、消泡機プレート、サンプルポート、レベルプローブ、およびロードセル等のうちの少なくとも1つ）を有することができる。

【0139】

図10は、第1の容器セクション1002および第2の容器セクション1004を有するVDB1000の概略図である。いくつかの態様において、第1の容器セクション10

02は、第1の容器セクション1002が円錐形状であるように増加する直径を有する。第2の容器セクション1004は、それが円柱形状を有するように、一定の直径を有することができる。示されるように、VDB1000は、バイオリアクターの全高さAを有し得る。いくつかの態様において、バイオリアクターの全高さAは、約5フィート～約50フィートの範囲中であり得る。例えば、バイオリアクターの全高さは、約20フィートである。加えて、示されるように、バイオリアクターの上方部分は高さBを有し、下方部分は高さCを有し、バイオリアクターは液体高さEを有し得る。液体高さEは、どの生産段階が所望されるかに基づいて変動し得る。いくつかの態様において、下方部分の直径は高さCに沿って変動し得る。いくつかの態様において、上方部分の直径は高さBに沿って一定のままであり得る。

10

【0140】

本明細書において記載されるように、VDBバイオリアクターの直径は、バイオリアクターの全高さAまたは下方部分の高さCに沿って動くにつれて、変動し得る。示されるように、第1の容器セクション1002は、下方部分高さCの関数として増加する直径を有し得る。反応器高さAの上への動きは、例えば直径を第2の直径D2、第3の直径D3、および第4の直径D4に増加させる。いくつかの非限定態様において、例えばD1は約1フィート～約3フィートであり、D2は約1フィート～約5フィートであり、D3は約2フィート～約10フィートであり、D4は約3フィート～約20フィートである。1つの非限定例として、VDBバイオリアクターの高さAは約20フィート、下方部分の高さC（円錐体高さ）は約15フィート、上方部分直径（D4）は約10フィート、底部直径（D1）は約2フィート、D2は約3.25フィート、およびD3は約4.8フィートであり、約24,909リットルの（L）全体積、13,789Lの下方部分（円錐体）体積、および11,120Lの上方部分（円筒）体積をもたらす。いくつかの態様（図10中で示されるもの等）において、D4がD5に等しいように、上方部分が一樣な直径を有し得ることに注目されたい。

20

【0141】

さらに、示されるように、下方部分は、下方部分のために所望される直径および体積を提供するのに好適な任意の角度であり得る角度を有する円錐形状を有することができる。体積容量は凹んだ底部1016を有し得ることが認識され、角度のある頂点1018が単に説明の目的のために示され、反応器中に存在する必要がないことが認識される。さらに、VDB1000は、複数のかき混ぜ機インペラー1010a、1010b、1010cおよび1010dを含む。かき混ぜ機インペラーは、特定の容器セクション1002、1004（特定のかき混ぜ機インペラー1010a、1010b、1010cおよび1010dがその中に配置される）のために構成されたかき混ぜを提供するように構成され得る。示されるように、インペラー1010dは高さHでバイオリアクター内に配置され、インペラー1010cは高さIでバイオリアクター内に配置され、インペラー1010bは高さJでバイオリアクター内に配置され、インペラー1010aは高さKであり得る。例えば、高さH、I、J、Kは、約1フィート～約20フィート中の範囲であり得る。いくつかの態様において、かき混ぜ機は、VDB1000の中心1011に沿って配置される単一駆動装置（図示せず）を有し得る。いくつかの態様において、VDB1000は、バイオリアクター1000の全体にわたってバッフル1012を含み得る。示されるように、バッフル1012はバイオリアクターの高さGまたはFに沿って伸長することができる。いくつかの態様において、VDB1000は複数のポート1014を含み得る。ポート1014は、入口、出口、ブローブ（pH、温度、酸素または他の所望されるブローブまたはセンサー等）であるように構成され得る。VDB1000は単一のインペラーも含み得る。

30

40

【0142】

図11は例示的なVDBバイオリアクター1100の概略図である。VDBバイオリアクター1100は、バイオリアクター培地を添加し取り出すように構成される入口ポート1102および底部出口弁1104を有する。VDBバイオリアクター1100は、第1

50

の容器セクション 1102、第2の容器セクション 1104、および第3の容器セクション 1106を有し得る。バイオリアクターは、下部かき混ぜ機 1110、中間かき混ぜ機 1112、上部かき混ぜ機 1114、ならびにかき混ぜ機モーターおよび駆動装置 1116を含む、かき混ぜ機 1108を有する。さらに、バイオリアクターは、空気または他の栄養素がバイオリアクター液体培地を介してバブリングされることを可能にするように構成された少なくとも1つのスパージャー 1118を含み得る。加えて、バイオリアクターは、少なくとも1つのプローブまたは添加ポート 1120を含み得る。バイオリアクターは、少なくとも1つのCIPポート 1122も含み得る。示されるように、バイオリアクターは、容器セクション 1102および 1104、1106の各々中に、スパージャー 1118、プローブおよび添加ポート 1120、ならびにCIPポート 1122を有するように構成され得る。バイオリアクターはバイオリアクター系の制御のために任意の好適な制御系を包含し、スパージング、液体の培地添加および取り出し、細胞の増殖および産生、酸素レベル、体積、温度、pH、ならびに他の所望される構成要素をモニタリングおよび制御することを包含する。いくつかの態様において、制御系は、連続様式またはバッチ式様式でバイオリアクター体積をスケールアップするように構成される。加えて、バイオリアクターは、その中に配置される少なくとも1つのバッフル 1124を有し、それは、バイオリアクター接種物に対する不必要なストレス（それはアポトーシスを導き得る）を引き起こさずに、好適な混合条件を提供するように構成される。加えて、バイオリアクターは、外部断熱材を有し得る伝熱シェル 1126を含み得る。VDB 1100は単一のインペラーも含み得る。

10

20

【0143】

図12は、例えば定常状態および/または擬定常状態培養を得るための例示的な灌流バイオリアクターの概略図である（例えばその中で、細胞密度、栄養素、廃液副産物、および/または産物荷電バリエーションは、経時的に一定に保持される）。いくつかの実施形態において、灌流バイオリアクターは修飾された連続撹拌タンク反応器（CSTR）としてデザインされ得る（その中で、新鮮な栄養培地は、例えば供給ポンプを介して一定速度で主要培養タンクの中へ供給される）。いくつかの実施形態において、濃縮栄養ボラスをタンクへ添加して、例えば1つまたは複数の栄養素の濃度を例えば所望される濃度へ急速または即座に変更することができる。タンクの含有物の体積は、例えば添加されている新鮮な栄養培地のものと釣り合った速度で、例えばタンクから一定して材料を取り出すことによって、一定で保持することができる。反応器スケールは、いくつかの実施形態において、反応器タンク中の材料の量の決定に使用され得る。いくつかの実施形態において、セルブリード（cell bleed）ポンプを使用して、細胞含有反応器溶出液（セルブリード）を槽から取り出す。いくつかの実施形態において、パーミエイト（permeate）ポンプ（例えば細胞保持デバイスの後ろに）を使用して、無細胞反応器溶出液（パーミエイト）を槽から取り出す。静電容量プローブを使用して、例えば生存細胞密度をモニターすることができ、例えば1000 kHzで測定された静電容量は、生存細胞密度のオフライン測定へ直線的に相関する。

30

【0144】

使用に際して、本明細書において記載される可変直径のバイオリアクターを使用して、1つまたは複数の産物（例えば1つまたは複数の産物バリエーション、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の産物バリエーション）を産生し、トレイン内で必要な反応器を単一のバイオリアクターへ限定することによって、床面積の有効な使用を可能にすることができる。具体的には、産物（例えば産物バリエーション）の産生は、増殖培地および接種物を第1の体積でバイオリアクターに接種すること、ならびに接種ステージの完了に続いて、追加の増殖培地をバイオリアクターへ添加してバイオリアクター体積を第2の体積へスケールアップすることによって、単一のVDBバイオリアクター中で達成され得る。いくつかの態様において、バイオリアクターの使用は、増殖ステージの完了に続いて、追加の増殖培地をバイオリアクターへ添加してバイオリアクター体積を第3の体積へスケールアップすることを含み得る。

40

50

【 0 1 4 5 】

すなわち、接種バイオリアクターおよびすべての必要な後続増殖反応器またはシード反応器を単一のバイオリアクター容器の中へ圧縮することによって、特定のプラントの設置面積が最小限にされる。例えば、20,000リットル(L)の所望される産生体積のために、第1の容器セクション(すなわち接種容器セクション)、第2のシードセクションまたは増殖セクション、および第3のシードセクションまたは増殖容器セクションからなる、単一の20,000Lのバイオリアクターが使用され得る。例えば、第1の容器セクション(接種容器セクション)は、約100L~約200Lの体積および約0.3:1~約2:1の間の所望されるアスペクト比に対応する第1の直径を有し得る。次に、第2のシード容器セクションおよび第3のシード容器セクションは、所望されるアスペクト比の範囲を維持して、所望される20,000Lの量へバイオリアクター体積をスケールアップすることができる。例えば、アスペクト比は、約0.3:1~約3:1の間で維持され得る。20,000Lのバイオリアクターユニットは、以下の:栄養素および/もしくは炭素源の供給、好適な気体(例えば酸素)の注入、発酵培地もしくは細胞培養培地流、気体相および液体相の分離、増殖温度の維持、pHレベルの維持、かき混ぜ(例えば攪拌)、ならびに/または洗浄/滅菌うちの1つもしくは複数またはすべてを遂行することができる。

10

【 0 1 4 6 】

例えば、この20,000Lの例示的なバイオリアクターは、いくつかの態様において、増殖培地および接種物(哺乳動物細胞等)を第1の体積で接種され得る。この接種ステージにおいて、反応器は、反応器の体積が接種物の最初の増殖に好適であるように、第1の体積で接種され得る。所望される細胞増殖を可能にするのに好適な期間に続いて、バイオリアクターを第2の反応器体積へスケールアップして、接種物の第2の増殖ステージを達成することができる。すなわち、増殖のために要求される追加の増殖培地および任意の他の所望される構成要素をバイオリアクターへ添加して、接種ステージの完了に続いて、バイオリアクター体積を第2の体積へスケールアップすることができる。この第2の体積は、接種物のために必要とされる、所望の連続的な増殖条件に好適な任意の所望される体積であり得る。この第2の体積で、さらなる細胞増殖および分裂増殖は達成され得る。いくつかの態様において、第3、第4、または任意の増加数の体積の増殖ステージを利用して、所望される体積への反応器体積のスケールアップを継続させる。

20

30

【 0 1 4 7 】

いくつかの態様において、少なくとも産物の第1のバリエーションの調製物(産物バリエーション1)および産物の第2のバリエーションの調製物(産物バリエーション2)を含む複数のバリエーション調製物を作製する方法は、

(a i) VDB中で培養(例えば増殖)培地および接種物を備えた第1の体積の接種によって細胞の集団を生成することならびに所望される体積へ後続してスケールアップすること;

(a i i) 第1の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション1を含有する馴化培養培地を形成すること;

(b) 産物バリエーション1(例えば産物バリエーション1のバッチ(例えば第1の条件下で産生された))を回収すること;

40

(c) 第2の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション2を含有する馴化培養培地を形成すること;

(d) 産物バリエーション2(例えば産物バリエーション2のバッチ(例えば第2の条件下で産生された))を回収すること;

を含み、

それによって、複数のバリエーション調製物を提供し、前記複数のものは、少なくとも産物の第1のバリエーションの調製物(産物バリエーション1)および産物の第2のバリエーションの調製物(産物バリエーション2)を含み、

産物バリエーション1(または産物バリエーション1の調製物)は、物理的特性、化学的特性、生

50

物学的特性、または医薬特性で、産物バリエーション 2（または産物バリエーション 2 の調製物）とは異なる。

【 0 1 4 8 】

番号付けされた実施形態

1．少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物（産物バリエーション 1）および産物の第 2 のバリエーションの調製物（産物バリエーション 2）を含む複数のバリエーション調製物を作製する方法であって、

細胞培養を可能にするように構成された容器中に細胞の集団を提供すること；

（ a - i ）第 1 の条件下で培養培地中の前記細胞の集団を培養して、産物バリエーション 1 を含有する馴化培養培地を形成すること；

（ a - i i ）培養から産物バリエーション 1 を回収すること；

（ a - i i i ）随意に、置換培地を前記馴化培養培地へ添加すること；

（ a - i v ）随意に、前記第 1 の条件下で前記細胞の集団をさらに培養して、追加の馴化培地を産生すること；

（ a - v ）随意に、追加産物バリエーション 1 を回収すること；

（ a - v i ）随意に、（ a - i i ）および（ a - v ）からの産物バリエーション 1 を組み合わせること；

（ b - i ）第 2 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション 2 を含有する馴化培養培地を形成すること；

（ b - i i ）培養から産物バリエーション 2 を回収すること；

（ b - i i i ）随意に、置換培地を前記馴化培養培地へ添加すること、

（ b - i v ）随意に、前記第 2 の条件下で前記細胞の集団をさらに培養して、追加の馴化培地を産生すること、

（ b - v ）随意に、追加産物バリエーション 2 を回収すること；

（ b - v i ）随意に、（ b - i i ）および（ b - v ）からの産物バリエーション 2 を組み合わせること；

産物バリエーション 1 のバッチから産物バリエーション 1 を得ること；

産物バリエーション 2 のバッチから産物バリエーション 2 を得ること；

を含み、

それによって、少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物（産物バリエーション 1）および産物の第 2 のバリエーションの調製物（産物バリエーション 2）を含む複数のバリエーション調製物を提供し、

バリエーション 1（またはバリエーション 1 の調製物）が、物理的特性、化学的特性、生物学的特性、または医薬特性で、バリエーション 2（またはバリエーション 2 の調製物）とは異なる、前記方法。

【 0 1 4 9 】

2．前記複数のものが、第 3 のバリエーションの調製物；第 4 のバリエーションの調製物；第 5 のバリエーションの調製物；第 6 のバリエーションの調製物；第 7 のバリエーションの調製物；第 8 のバリエーションの調製物；第 9 のバリエーションの調製物；第 10 のバリエーションの調製物；第 11 のバリエーションの調製物；第 12 のバリエーションの調製物；第 13 のバリエーションの調製物；第 14 のバリエーションの調製物；第 15 のバリエーションの調製物；第 16 のバリエーションの調製物；第 17 のバリエーションの調製物；第 18 のバリエーションの調製物；第 19 のバリエーションの調製物；および／または第 20 のバリエーションの調製物を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 1 5 0 】

3．少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物（産物バリエーション 1）および産物の第 2 のバリエーションの調製物（産物バリエーション 2）を含む複数のバリエーション調製物を作製する方法であって、

（ a ）第 1 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション 1 を含有する馴化培養培地を形成すること；

（ b ）産物バリエーション 1 を回収すること；

(c) 第2の条件下で培養培地中の前記細胞の集団を培養して、産物バリエーション2を含む馴化培養培地を形成すること；

(d) 産物バリエーション2を回収すること；
を含み、

それによって、少なくとも産物の第1のバリエーションの調製物（産物バリエーション1）および産物の第2のバリエーションの調製物（産物バリエーション2）を含む複数のバリエーション調製物を提供し、

産物バリエーション1（または産物バリエーション1の調製物）が、物理的特性、化学的特性、生物学的特性、または医薬特性で、産物バリエーション2（または産物バリエーション2の調製物）とは異なる、
前記方法。

10

【0151】

4. 前記複数のものが、第3のバリエーションの調製物；第4のバリエーションの調製物；第5のバリエーションの調製物；第6のバリエーションの調製物；第7のバリエーションの調製物；第8のバリエーションの調製物；第9のバリエーションの調製物；第10のバリエーションの調製物；第11のバリエーションの調製物；第12のバリエーションの調製物；第13のバリエーションの調製物；第14のバリエーションの調製物；第15のバリエーションの調製物；第16のバリエーションの調製物；第17のバリエーションの調製物；第18のバリエーションの調製物；第19のバリエーションの調製物；および/または第20のバリエーションの調製物を含む、パラグラフ3の方法。

【0152】

5. ステップ(b)での回収は、ステップ(a)において形成された馴化培養培地のアリコートを得ることを含む、パラグラフ3または4のいずれかの方法。

20

【0153】

6. 馴化培養培地の前記アリコートから産物バリエーション1を回収することをさらに含む、パラグラフ5の方法。

【0154】

7. ステップ(b)が、前記馴化培養培地へ置換培地を添加することをさらに含む、パラグラフ5の方法。

【0155】

8. (a)における前記培養培地および前記置換培地が同じである、パラグラフ7の方法。

30

【0156】

9. (a)における前記培養培地および前記置換培地が、1つまたは複数の構成要素（化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキサミン、n-アセチルヘキサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤/酸化剤、バッファー組成物、またはホルモン等）で、互いとは異なる、パラグラフ7の方法。

【0157】

10. 前記置換培養培地の体積が、取り出された前記アリコートの体積よりも少ないか、それに等しいか、またはそれよりも大きい、パラグラフ7～9のうちの任意の方法。

【0158】

11. (a)の培養培地中前記の細胞の集団が容器中に含まれる、パラグラフ7～10のうちの任意の方法。

40

【0159】

12. 取り出された前記アリコート、添加された前記置換培養培地、または両方の体積が、独立して、全体の培養の体積または前記容器の容量の体積の5～100%の間である、パラグラフ11の方法。

【0160】

13. 取り出された前記量、添加された前記置換培養培地、または両方が、独立して、容器操作の1日あたり前記容器体積の0.1～5倍の間である、パラグラフ11の方法。

【0161】

50

14. (b) が、前記第1の条件下で前記細胞の集団をさらに培養して、追加の馴化培地を産生することをさらに含む、パラグラフ7の方法。

【0162】

15. (bii) 第2の量の産物バリエーション1を回収することを含む、パラグラフ7または14のいずれかの方法。

【0163】

16. ステップ (bii) における回収することが、さらなる馴化培養培地のアリコートを得ることを含む、パラグラフ15の方法。

【0164】

17. 前のステップの培養された培地へ置換培地を添加すること、ならびにパラグラフ14および15および随意に16のステップを反復すること (例えばパラグラフ14および15および随意に16のステップをX回 (Xは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である) 反復すること) を含む、パラグラフ15または16のいずれかの方法。

【0165】

18. (a) における前記培養培地および前記置換培地が同じである、パラグラフ17の方法。

【0166】

19. (a) における前記培養培地および前記置換培地が、1つまたは複数の構成要素 (化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n-アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤/酸化剤、バッファー組成物、またはホルモン等) で、互いとは異なる、パラグラフ17の方法。

【0167】

20. 前記置換培養培地の体積が、取り出された前記アリコートの体積よりも少ないか、それに等しいか、またはそれよりも大きい、パラグラフ17~19のうちの任意の方法。

【0168】

21. (a) の培養培地中の前記細胞の集団が容器中に含まれる、パラグラフ7~20のうちの任意の方法。

【0169】

22. 取り出された前記アリコート、添加された前記置換培養培地、または両方の体積が、独立して、全体の培養の体積または前記容器の容量の体積の5~100%の間である、パラグラフ21の方法。

【0170】

23. 取り出された前記量、添加された前記置換培養培地、または両方が、独立して、容器操作の1日あたり前記容器体積の0.1~5倍の間である、パラグラフ21の方法。

【0171】

24. 異なる時間で得られたバリエーション1を組み合わせることを含む、パラグラフ15~23のうちの任意の方法。

【0172】

25. 複数の量、アリコート、またはバッチからの産物バリエーション1を組み合わせることを含む、パラグラフ15~24のうちの任意の方法。

【0173】

26. 前記細胞の集団が、前記第1の条件下で1日以上の間培養される、パラグラフ1~25のうちの任意の方法。

【0174】

27. パラメーターについての標的値に到達した後に、前記細胞集団が、前記第2の条件下で培養される、パラグラフ1~26のうちの任意の方法。

【0175】

28. 前記パラメーターが、産生される産物バリエーション1の量、前記第1の条件下での培養の継続期間、または培養物の生存率から選択される、パラグラフ27の方法。

【0176】

10

20

30

40

50

29. 前記パラメーターがさらに生存細胞濃度から選択され得る、パラグラフ28の方法。

【0177】

30. 前記培地または他の条件の操作をして前記第2の条件を達成することを含む、パラグラフ1~29のうちの任意の方法。

【0178】

31. 前記培地または他の条件の操作が、pH; dO₂のレベル; かき混ぜ; 温度; 体積; 前記細胞集団の密度; 前記培養培地の構成要素の濃度; かき混ぜ; 栄養素、薬物、阻害物質、もしくは他の化学的構成要素(例えば化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n-アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤/酸化剤、バッファー組成物、またはホルモン)の存在もしくは量のうちの1つまたは複数を改変することを含む、パラグラフ30の方法。

10

【0179】

32. 異なる培養培地を前記細胞の集団へ添加することを含む、パラグラフ31の方法。

【0180】

33. 前記細胞の集団の培養が灌流産生培養である、パラグラフ1~32のうちの任意の方法。

【0181】

34. 第2の条件へ前記培地を移行する時に、灌流を中断することを含む、パラグラフ33の方法。

20

【0182】

35. 第2の条件へ前記培地が移行する時に、灌流液を廃液へ方向転換することを含む、パラグラフ33の方法。

【0183】

36. 産物バリエーション1が、産物バリエーション2の産生の間に、下流のユニット操作から取り出される、パラグラフ1~35のうちの任意の方法。

【0184】

37. パラメーターについての標的値に到達するまで前記細胞を培養することを含む、パラグラフ1~36のうちの任意の方法。

【0185】

38. ステップ(d)での回収は、ステップ(c)において形成された馴化培養培地のアリコートを得ることを含む、パラグラフ3~37のうちの任意の方法。

30

【0186】

39. 馴化培養培地の前記アリコートから産物バリエーション2を回収することをさらに含む、パラグラフ38の方法。

【0187】

40. ステップ(d)が、前記馴化培養培地へ置換培地を添加することをさらに含む、パラグラフ39の方法。

【0188】

41. (c)における前記培養培地および前記置換培地が同じである、パラグラフ40の方法。

40

【0189】

42. (c)における前記培養培地および前記置換培地が、1つまたは複数の構成要素(化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n-アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤/酸化剤、バッファー組成物、またはホルモン等)で、互いとは異なる、パラグラフ40の方法。

【0190】

43. 前記置換培養培地の体積が、取り出された前記アリコートの体積よりも少ないか、それに等しいか、またはそれよりも大きい、パラグラフ40~42のうちの任意の方法。

【0191】

50

44. (c) の培養培地中前記の細胞の集団が容器中に含まれる、パラグラフ 40 ~ 43 のうちの任意の方法。

【0192】

45. 取り出された前記アリコート、添加された前記置換培養培地、または両方の体積が、独立して、前記容器の容量の全体の培養の体積の 5 ~ 100 % の間である、パラグラフ 44 の方法。

【0193】

46. 取り出された前記量、添加された前記置換培養培地、または両方が、独立して、容器操作の 1 日あたり前記容器体積の 0.1 ~ 5 倍の間である、パラグラフ 44 の方法。

【0194】

47. (d) が、前記第 2 の条件下で前記細胞の集団をさらに培養して、追加の馴化培地を産生することをさらに含む、パラグラフ 40 の方法。

【0195】

48. (dii) 第 2 の量の産物バリエーション 2 を回収することを含む、パラグラフ 40 または 47 のいずれかの方法。

【0196】

49. ステップ (dii) での回収は、さらなる馴化培養培地のアリコートを得ることを含む、パラグラフ 48 の方法。

【0197】

50. 前のステップの培養された培地へ置換培地を添加すること、ならびにパラグラフ 47 および 48 および随意に 49 のステップを反復すること (例えばパラグラフ 47 および 48 および随意に 49 のステップを X 回 (X は、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 である) 反復すること) を含む、パラグラフ 48 または 49 のいずれかの方法。

【0198】

51. (c) における前記培養培地および前記置換培地が同じである、パラグラフ 50 の方法。

【0199】

52. (c) における前記培養培地および前記置換培地が、1 つまたは複数の構成要素 (化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n-アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤/酸化剤、バッファー組成物、またはホルモン等) で、互いとは異なる、パラグラフ 50 の方法。

【0200】

53. 前記置換培養培地の体積が、取り出された前記アリコートの体積よりも少ないか、それに等しいか、またはそれよりも大きい、パラグラフ 50 ~ 52 のうちの任意の方法。

【0201】

54. (c) の培養培地中前記の細胞の集団が容器中に含まれる、パラグラフ 50 ~ 53 のうちの任意の方法。

【0202】

55. 取り出された前記アリコート、添加された前記置換培養培地、または両方の体積が、独立して、全体の培養の体積または前記容器の容量の体積の 5 ~ 100 % の間である、パラグラフ 54 の方法。

【0203】

56. 取り出された前記量、添加された前記置換培養培地、または両方が、独立して、容器操作の 1 日あたり前記容器体積の 0.1 ~ 5 倍の間である、パラグラフ 50 ~ 53 のうちの任意の方法。

【0204】

57. 異なる時間で得られたバリエーション 2 (例えば産物バリエーション 2 の複数のバッチ、アリコートまたは量) を組み合わせること (例えば第 1 および第 2 の量またはバッチの産物バリエーション 2 を組み合わせること) を含む、パラグラフ 48 ~ 56 のうちの任意の方法。

【0205】

10

20

30

40

50

58．複数の量、アリコート、またはバッチからの産物バリエーション2を組み合わせることを含む、パラグラフ48～57のうちの任意の方法。

【0206】

59．前記細胞の集団が、前記第2の条件下で1日以上の間培養される、パラグラフ1～58のうちの任意の方法。

【0207】

60．パラメーターについての標的値に到達した後に、前記細胞集団が、前記第3の条件下で培養される、パラグラフ1～59のうちの任意の方法。

【0208】

61．前記パラメーターが、産生される産物バリエーション2の量、前記第2の条件下で培養の継続期間、または培養物の生存率から選択される、パラグラフ60の方法。

10

【0209】

62．前記パラメーターがさらに生存細胞濃度から選択され得る、パラグラフ61の方法。

【0210】

63．前記第3の条件を達成するための前記培地または他の条件の操作を含む、パラグラフ60～62のうちの任意の方法。

【0211】

64．前記培地または他の条件の操作が、pH；dO₂のレベル；かき混ぜ；温度；体積；前記細胞集団の密度；前記培養培地の構成要素の濃度；かき混ぜ；栄養素、薬物、阻害物質、もしくは他の化学的構成要素（例えば化学塩、金属および金属イオン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、糖組成物、ヘキソサミン、n-アセチルヘキソサミン、ビタミン、脂質、ポリアミン、還元剤／酸化剤、バッファー組成物、またはホルモン）の存在もしくは量のうちの1つまたは複数を改変することを含む、パラグラフ63の方法。

20

【0212】

65．異なる培養培地を前記細胞の集団へ添加することを含む、パラグラフ64の方法。

【0213】

66．前記細胞の集団の培養が灌流産生培養である、パラグラフ1～65のうちの任意の方法。

【0214】

30

67．第3の条件へ前記培地を移行する時に、灌流を中断することを含む、パラグラフ66の方法。

【0215】

68．第3の条件へ前記培地が移行する時に、灌流液を廃液へ方向転換することを含む、パラグラフ66の方法。

【0216】

69．産物バリエーション2が、産物バリエーション3の産生の間に、下流のユニット操作から取り出される、パラグラフ1～68のうちの任意の方法。

【0217】

70．パラメーターについての標的値に到達するまで前記細胞を培養することを含む、パラグラフ1～69のうちの任意の方法。

40

【0218】

71．前記複数のものが、第3の条件下で作製された第3のバリエーションの調製物を含む、パラグラフ1～70のうちの任意の方法。

【0219】

72．前記複数のものが、第4の条件下で作製された第4のバリエーションの調製物（例えば前記第1のバリエーションまたは第2のバリエーションの前記調製物を作製するために本明細書において記載される前記ステップによって行われる第4の条件下で作製された第4のバリエーションの調製物）を含む、パラグラフ71の方法。

【0220】

50

73．前記複数のものが、第5の条件下で作製された第5のバリエーションの調製物（例えば前記第1のバリエーションまたは第2のバリエーションの前記調製物を作製するために本明細書において記載される前記ステップによって行われる第5の条件下で作製された第5のバリエーションの調製物）を含む、パラグラフ72の方法。

【0221】

74．前記複数のものが、第Nの条件下で作製された第Nのバリエーションの調製物（例えば前記第1のバリエーションまたは第2のバリエーションの前記調製物を作製するために本明細書において記載される前記ステップによって行われる第Nの条件下で作製された第Nのバリエーションの調製物、そこで、Nは、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30以上である）を含む、パラグラフ73の方法。

10

【0222】

75．ステップ(a)およびステップ(b)が、同じ容器（例えば産生培養容器）中で遂行される、パラグラフ1または2のいずれかの方法。

【0223】

76．ステップ(a)～(d)が、同じ容器（例えば産生培養容器）中で遂行される、パラグラフ3～75のうちの任意の方法。

【0224】

77．前記容器が、灌流モードでの操作を可能にするように構成される、パラグラフ76の方法。

20

【0225】

78．前記容器が、培養の間の培地の取り出しおよび培地の添加を可能にするように構成される、パラグラフ77の方法。

【0226】

79．前記容器が、可変直径のバイオリアクターを含む、パラグラフ75または78のいずれかの方法。

【0227】

80．産物バリエーション1を精製することを含む、パラグラフ1～79のうちの任意の方法。

【0228】

81．産物バリエーション2を精製することを含む、パラグラフ1～80のうちの任意の方法。

30

【0229】

82．産物バリエーションが、前記細胞の集団が培養される前記容器から下流のユニット操作において精製される、パラグラフ80または81のいずれかの方法。

【0230】

83．第1の産物バリエーション（または第1の産物バリエーションの調製物）が、
糖鎖付加（例えばガラクトシル化）；
シアル酸付加；
荷電（例えばpI）；
配列（例えばN末端配列またはC末端配列）均一性；
純度；
活性；
不活性バリエーションの量；
凝集する傾向、または凝集；
清澄性；
脱アミド化；
グリケーション；
プロリンアミド化；
ジスルフィド不均一性；

40

50

二量体化；

プロテアーゼ感受性またはタンパク質溶解性分解；および

メチオニン酸化

のうちの1つまたは複数について、第2の産物バリエーション（または第2の産物バリエーションの調製物）とはどのように異なるか評価することをさらに含む、パラグラフ1～82のうちの任意の方法。

【0231】

84．産物バリエーション1の調製物を提供することをさらに含む、パラグラフ1～83のうちの任意の方法。

【0232】

85．産物バリエーション2の調製物を提供することをさらに含む、パラグラフ1～84のうちの任意の方法。

【0233】

86．異なる産物バリエーションの複数の調製物を提供することをさらに含む、パラグラフ1～85のうちの任意の方法。

【0234】

87．第1の産物バリエーション（または第1のバリエーションの調製物）が、

糖鎖付加（例えばガラクトシル化）；

シアル酸付加；

荷電（例えばpI）；

配列（例えばN末端配列またはC末端配列）均一性；

純度；

活性；

不活性バリエーションの量；

凝集する傾向、または凝集；

清澄性；

脱アミド化；

グリケーション；

プロリンアミド化；

ジスルフィド不均一性；

二量体化；

プロテアーゼ感受性またはタンパク質溶解性分解；および

メチオニン酸化

のうちの1つまたは複数で、第2の産物バリエーション（または第2の産物バリエーションの調製物）とは異なる、パラグラフ1～86のうちの任意の方法。

【0235】

88．複数の産物バリエーション（または産物バリエーションの調製物）を生成することを含み、前記産物バリエーション（または産物バリエーションの調製物）のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20またはそれ以上のその各々が、

糖鎖付加（例えばガラクトシル化）；

シアル酸付加；

荷電（例えばpI）；

配列（例えばN末端配列またはC末端配列）均一性；

純度；

活性；

不活性バリエーションの量；

凝集する傾向、または凝集；

清澄性；

脱アミド化；

10

20

30

40

50

グリケーション；
 プロリンアミド化；
 ジスルフィド不均一性；
 二量体化；
 プロテアーゼ感受性またはタンパク質溶解性分解；および
 メチオニン酸化

のうちの１つまたは複数で、互いに異なる、
 パラグラフ １～８７のうちの任意の方法。

【０２３６】

８９．３つの産物バリエーション（または産物バリエーションの調製物）を産生することを含み、その各々が、

糖鎖付加（例えばガラクトシル化）；
 シアル酸付加；
 荷電（例えば pI）；
 配列（例えば N 末端配列または C 末端配列）均一性；
 純度；
 活性；
 不活性バリエーションの量；
 凝集する傾向、または凝集；

清澄性；

脱アミド化；

グリケーション；

プロリンアミド化；

ジスルフィド不均一性；

二量体化；

プロテアーゼ感受性またはタンパク質溶解性分解；および
 メチオニン酸化

のうちの１つまたは複数で、互いに異なる、
 パラグラフ ８８の方法。

【０２３７】

９０．前記第 １の条件および / または第 ２の条件が、定常状態条件である、パラグラフ １～８９のうちの任意の １つの方法。

【０２３８】

９１．前記第 ３の条件が、定常状態条件である、パラグラフ ６３～６５のうちの任意の １つの方法。

【０２３９】

９２．前記培地の操作が、以下の：前記培養培地の構成要素、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素（例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶性銅化合物（例えば硫酸銅（Ⅰ）または塩化銅）、任意の水溶性マンガ化合物（例えば塩化マンガ）、任意の水溶性亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、任意の水溶性鉄化合物（例えば硫酸鉄（ⅠⅠ））、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、または L - アルギニン）のうちの １つまたは複数の濃縮ボラスを、前記培養培地へ添加することを含む、パラグラフ ３０～３２または ６３～６５のうちの任意の １つの方法。

【０２４０】

９３．前記培地の操作が、前記反応器に入れる前記培養培地（例えば置換培地）中の以下の：前記培養培地の構成要素、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素（例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶性銅化合物（例えば硫酸銅（Ⅰ）または塩化銅）、任意の水溶性マンガ化合物（例えば塩化マンガ）、任意の水溶性亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、任意の水溶性鉄化合物（例えば硫酸鉄（ⅠⅠ））、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、または L - アルギニン）のうちの １つ

10

20

30

40

50

または複数の濃度を増加させることを含む、パラグラフ 30 ~ 32 または 63 ~ 65 のうちの任意の 1 つの方法。

【0241】

94. 前記培地の操作が、

- a) 構成要素の濃縮ポーラスを前記培養培地へ添加すること、または
- b) 前記反応器に入れる前記培養培地 (例えば置換培地) 中の構成要素の濃度を増加させること、

のうちの 1 つまたは両方を含み、

前記構成要素が、前記培養培地の構成要素、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素 (例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶銅化合物 (例えば硫酸銅 (I) または塩化銅)、任意の水溶性マンガン化合物 (例えば塩化マンガン)、任意の水溶性亜鉛化合物 (例えば塩化亜鉛)、任意の水溶性鉄化合物 (例えば硫酸鉄 (II))、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、または L - アルギニン) のうちの 1 つまたは複数から選択される、

パラグラフ 30 ~ 32 または 63 ~ 65 のうちの任意の 1 つの方法。

【0242】

95. 前記培地の操作が、CuSO₄ を前記培養培地へ添加することを含む (例えば CuSO₄ の濃縮ポーラスを前記培養培地へ添加することによって、前記反応器に入れる前記培養培地 (例えば置換培地) 中の CuSO₄ の濃度を増加させることによって、または両方によって)、パラグラフ 92 ~ 94 のうちの任意の方法。

【0243】

96. 前記培地の操作が、N - アセチルアルギニンを前記培養培地へ添加することを含む (例えば N - アセチルアルギニンの濃縮ポーラスを前記培養培地へ添加することによって、前記反応器に入れる前記培養培地 (例えば置換培地) 中の N - アセチルアルギニンの濃度を増加させることによって、または両方によって)、パラグラフ 92 ~ 94 のうちの任意の方法。

【0244】

97. 前記培地の操作が、リジンを前記培養培地へ添加することを含む (例えばリジンの濃縮ポーラスを前記培養培地へ添加することによって、前記反応器に入れる前記培養培地 (例えば置換培地) 中のリジンの濃度を増加させることによって、または両方によって)、パラグラフ 92 ~ 94 のうちの任意の方法。

【0245】

98. 前記容器が、バイオリアクター (例えば灌流バイオリアクターおよび / または可変直径のバイオリアクター) である、パラグラフ 11 ~ 13、21 ~ 23、43 ~ 45、53 ~ 55、または 73 ~ 77 のうちの任意の 1 つの方法。

【0246】

99. 本明細書において記載されるバリエーションの調製物、またはパラグラフ 1 ~ 98 の方法のうちの任意のものによって作製されるかもしくは作製可能なバリエーションの調製物。

【0247】

100. 複数のバリエーション調製物であって、前記複数のものが、本明細書において記載される少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 1) および産物の第 2 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 2)、またはパラグラフ 1 ~ 98 の方法のうちの任意のものによって作製されるかもしくは作製可能な少なくとも産物の第 1 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 1) および産物の第 2 のバリエーションの調製物 (産物バリエーション 2) を含む、前記複数のバリエーション調製物。

【0248】

101. 本明細書において記載される細胞の混合物によりチャージされた容器 (例えばバイオリアクター、例えば灌流バイオリアクターおよび / または可変直径のバイオリアクター)。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 9 】

1 0 2 .

(a) 第 1 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、第 1 の産物バリエーション (産物バリエーション 1) を含有する馴化培養培地を形成すること ;

(b) 産生される産物バリエーション 1 の量、前記第 1 の条件下での培養の継続期間、または培養物の生存率から選択される 1 つまたは複数の標的パラメーターに関して複数の産物バリエーション調製物を作製する前記方法の進行についての値を取得すること ;

(c) 前記値へ応答して、前記 1 つまたは複数の標的パラメーターに関して複数の産物バリエーション調製物を作製する前記方法の進行を決定すること ; および

(d) 随意に、1 つまたは複数の標的パラメーターが到達された前記決定に応答して、前記培養培地または他の条件を操作して、第 2 の条件を達成すること、
を含み、

それによって、複数の産物バリエーションを作製する方法の進行を評価する、
複数の産物バリエーション調製物を作製する方法の進行を評価する方法。

10

【 0 2 5 0 】

1 0 3 . 複数の産物バリエーション調製物をする前記方法が、パラグラフ 1 ~ 9 8 のうちの任意の 1 つの方法である、パラグラフ 1 0 2 の方法。

【 0 2 5 1 】

1 0 4 .

(a) 第 1 の条件下で培養培地中の細胞の集団を培養して、産物バリエーション (産物バリエーション 1) を含有する馴化培養培地を形成すること ;

産生される産物バリエーション 1 の量、前記第 1 の条件下での培養の継続期間、または培養物の生存率 ;

(c) 1 つまたは複数の標的パラメーターに向けた進行の評価に応答して、前記培養培地または他の条件を操作して、第 2 の条件を達成すること ;
および

(d) 前記第 2 の条件下で培養培地中の前記細胞の集団を培養して、第 2 の産物バリエーション (産物バリエーション 2) を含有する馴化培養培地を形成すること ;
を含み、

それによって、産物バリエーションを産生する方法を修飾する、
産物バリエーションを産生する方法を修飾する方法。

20

30

【 0 2 5 2 】

1 0 5 . (b) の前記標的パラメーターが、生存細胞濃度をさらに含む、パラグラフ 1 0 2 ~ 1 0 4 のうちの任意の方法。

【 0 2 5 3 】

1 0 6 . 前記培地または他の条件の操作が、pH ; dO₂ のレベル ; かき混ぜ ; 温度 ; 体積 ; 前記細胞集団の密度 ; 前記培養培地の構成要素の濃度 ; かき混ぜ ; 栄養素、薬物、阻害物質、もしくは他の化学的構成要素 (例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶性銅化合物 (例えば硫酸銅 (I) または塩化銅)、任意の水溶性マンガン化合物 (例えば塩化マンガン)、任意の水溶性亜鉛化合物 (例えば塩化亜鉛)、任意の水溶性鉄化合物 (例えば硫酸鉄 (I I))、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、または L - アルギニン) の存在もしくは量のうちの 1 つまたは複数の改変することを含む、パラグラフ 1 0 2 ~ 1 0 5 のうちの任意の方法。

40

【 0 2 5 4 】

1 0 7 . 異なる培養培地を前記細胞の集団へ添加することを含む、パラグラフ 1 0 6 の方法。

【 0 2 5 5 】

1 0 8 . 前記培地の操作が、以下の : 前記培養培地の構成要素、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素 (例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶性銅化合物 (例えば硫酸銅 (I) または塩化銅)、任意の水溶性マンガン化合物 (例えば塩化マンガン)

50

、任意の水溶性亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、任意の水溶性鉄化合物（例えば硫酸鉄（Ⅱ））、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、またはL - アルギニン）のうちの1つまたは複数の濃縮ボラスを培養培地へ添加することを、パラグラフ102～107のうちの任意の1つの方法。

【0256】

109．前記培地の操作が、前記反応器に入れる前記培養培地（例えば置換培地）中の以下の：前記培養培地の構成要素、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素（例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶性銅化合物（例えば硫酸銅（Ⅱ）または塩化銅）、任意の水溶性マンガン化合物（例えば塩化マンガン）、任意の水溶性亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、任意の水溶性鉄化合物（例えば硫酸鉄（Ⅱ））、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、またはL - アルギニン）のうちの1つまたは複数の濃度を増加させることを含む、パラグラフ102～107のうちの任意の1つの方法。

10

【0257】

110．前記培地の操作が、

a) 構成要素の濃縮ボラスを前記培養培地へ添加すること、または

b) 前記反応器に入れる前記培養培地（例えば置換培地）中の構成要素の濃度を増加させること、

のうちの1つまたは両方を含み、

前記構成要素が、前記培養培地の構成要素、栄養素、薬物、阻害物質、または他の化学的構成要素（例えばリジン、ガラクトース、任意の水溶性銅化合物（例えば硫酸銅（Ⅱ）または塩化銅）、任意の水溶性マンガン化合物（例えば塩化マンガン）、任意の水溶性亜鉛化合物（例えば塩化亜鉛）、任意の水溶性鉄化合物（例えば硫酸鉄（Ⅱ））、N - アセチルマンノサミン、酪酸ナトリウム、N - アセチルアルギニン、またはL - アルギニン）のうちの1つまたは複数から選択される、パラグラフ102～107のうちの任意の1つの方法。

20

【0258】

111．前記回収された産物バリエーション1が、例えば回収された全産物のパーセンテージとして、少なくとも50、60、70、80、90、95、99または100%の産物バリエーション1である（例えば重量、体積、またはモル比によって）、パラグラフ1～98のうちの任意の1つの方法。

30

【0259】

112．前記回収された産物バリエーション2が、例えば回収された全産物のパーセンテージとして、少なくとも50、60、70、80、90、95、99または100%の産物バリエーション2である（例えば重量、体積、またはモル比によって）、パラグラフ1～98のうちの任意の1つの方法。

【0260】

113．前記回収された産物バリエーション1が、前記第1の条件下で培養されない細胞の集団および培養培地から産生された産物に比較して、産物バリエーション1について少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%までエンリッチされる、パラグラフ1～98のうちの任意の1つの方法。

40

【0261】

114．前記回収された産物バリエーション2が、前記第2の条件下で培養されない細胞の集団および培養培地から産生された産物に比較して、産物バリエーション2について少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%までエンリッチされる、パラグラフ1～98のうちの任意の1つの方法。

【0262】

115．産物バリエーション1の回収後に、前記回収された産物バリエーション1を評価することをさらに含む、パラグラフ1～98または111～114のうちの1つの任意の方法。

【0263】

50

116. 前記回収された産物バリエーション1を評価することが、糖鎖付加、シアル酸付加、荷電、配列（例えばN末端配列またはC末端配列）均一性、純度（例えば回収された産物が少なくとも50、60、70、80、90、95、99または100%の産物バリエーション1である（例えば重量で、体積もしくはモル比で、または回収された全産物のパーセンテージとして））、活性、不活性バリエーションの量、凝集する傾向、もしくは凝集、清澄性、脱アミド化、グリケーション、メチオニン酸化、または産生された産物バリエーション1の量から選択される産物品質属性のうちの1つまたは複数のレベルを評価することを含む、パラグラフ115の方法。

【0264】

117. 産物バリエーション2の回収後に、前記回収された産物バリエーション2を評価することをさらに含む、パラグラフ1~98または111~114のうちの1つの任意の方法。

10

【0265】

118. 前記回収された産物バリエーション2を評価することが、糖鎖付加、シアル酸付加、荷電、配列（例えばN末端配列またはC末端配列）均一性、純度（例えば回収された産物が少なくとも50、60、70、80、90、95、99または100%の産物バリエーション2である（例えば重量で、体積もしくはモル比で、または回収された全産物のパーセンテージとして））、活性、不活性バリエーションの量、凝集する傾向、もしくは凝集、清澄性、脱アミド化、グリケーション、メチオニン酸化、または産生された産物バリエーション2の量から選択される産物品質属性のうちの1つまたは複数のレベルを評価することを含む、パラグラフ117の方法。

20

【0266】

119. 前記回収された産物バリエーションの評価にตอบสนองして、置換培地を添加するか、現在の条件下で前記細胞の集団をさらに培養するか、またはさらなる条件下で前記細胞の集団を培養するかどうかを決定することをさらに含む、パラグラフ115~118のうちの任意の方法。

【0267】

120. 前記複数のバリエーション調製物が、単一の産生容器（例えばバイオリアクター、例えば灌流バイオリアクターおよび/または可変直径のバイオリアクター）から産生される、パラグラフ1~98または111~119のうちの任意の方法。

【0268】

30

121. 前記複数のバリエーション調製物が、単一の産生容器（例えばバイオリアクター、例えば灌流バイオリアクターおよび/または可変直径のバイオリアクター）から、連続的に（例えば前記細胞の集団の前記培養を中断すること（例えば前記容器を空にすることおよび/またはクリーニングすること）無しに、活性のある産生のための条件を維持して）、産生される、パラグラフ120の方法。

【0269】

122. 前記複数のバリエーション調製物が、中断（例えば空にすること、クリーニングすること、およびさらなる条件下で前記細胞の集団の培養を再開すること）有りで類似の条件下で前記複数のバリエーション調製物を連続して作製することから経過するよりも、短い時間で産生される、パラグラフ121の方法。

40

【0270】

123. 前記複数のバリエーション調製物が、中断（例えば空にすること、クリーニングすること、またはさらなる条件下で前記細胞の集団の培養を再開すること）有りで類似の条件下で前記複数のバリエーション調製物を連続して作製することから消費または占有されるよりも、少数の資源（例えば機器、培養、エネルギーまたは人員）を消費または占有して産生される、パラグラフ121の方法。

【0271】

124. 薬学的に有効な組成物として製剤化された、パラグラフ99の調製物。

【0272】

125. パラグラフ99の調製物を含む、医薬組成物。

50

【 0 2 7 3 】

1 2 6 . 薬学的に許容される希釈物質、担体または賦形剤を含む、パラグラフ 1 2 5 の医薬組成物。

【 0 2 7 4 】

1 2 7 . 1 つまたは複数の薬学的に有効な組成物として製剤化された、パラグラフ 1 0 0 の複数のバリエーション調製物。

【 0 2 7 5 】

1 2 8 . パラグラフ 1 0 0 の複数のバリエーション調製物を含む、キット。

【 0 2 7 6 】

1 2 9 . 前記複数の各々のバリエーション調製物が、容器の中へ分離してパッケージングされる、パラグラフ 1 2 8 のキット。

10

【 0 2 7 7 】

1 3 0 . 少なくとも 1 つの容器が、少なくとも 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 9 5 、 9 9 または 1 0 0 % の産物バリエーション 1 である (例えば重量、体積もしくはモル比で、または存在する全産物のパーセンテージとして)、産物バリエーション 1 を含む、パラグラフ 1 2 9 のキット。

【 0 2 7 8 】

1 3 1 . 少なくとも 1 つの容器が、少なくとも 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 9 5 、 9 9 または 1 0 0 % の産物バリエーション 2 である (例えば重量、体積もしくはモル比で、または存在する全産物のパーセンテージとして)、産物バリエーション 2 を含む、パラグラフ 1 2 9 のキット。

20

【 0 2 7 9 】

1 3 2 . 前記キットが、容器を含み ;
、少なくとも 1 つの容器が、少なくとも 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 9 5 、 9 9 もしくは 1 0 0 % の産物バリエーション 1 である (例えば、重量、体積もしくはモル比で、または存在する全産物のパーセンテージとして)、産物バリエーション 1 を含むか、または少なくとも 1 つの容器が、少なくとも 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 9 5 、 9 9 もしくは 1 0 0 % の産物バリエーション 2 である (例えば、重量、体積もしくはモル比で、または存在する全産物のパーセンテージとして)、産物バリエーション 2 を含み ;

少なくとも 1 つの容器が、産物バリエーション 1 および 2 産物バリエーションの混合物を含む、パラグラフ 1 2 8 のキット。

30

【 0 2 8 0 】

1 3 3 . 前記細胞の集団が、少なくとも 1 つの CHO - K 1 細胞、CHO - K 1 SV 細胞、DG 4 4 CHO 細胞、DUXB 1 1 CHO 細胞、CHOS、CHO GS ノックアウト細胞、CHO FUT 8 GS ノックアウト細胞、CHOZN、CHO - GSKO 細胞、CHO X c e e d 細胞、または CHO 由来細胞を含む、パラグラフ 1 ~ 9 8 または 1 1 1 ~ 1 1 9 のうちの任意の方法。

【 0 2 8 1 】

1 3 4 . 前記細胞の集団が、少なくとも 1 つの He l a、HEK 2 9 3、HT 1 0 8 0、H 9、Hep G 2、MCF 7、Jurkat、NIH 3 T 3、PC 1 2、PER . C 6、BHK (ベビーハムスター腎臓細胞)、VERO、SP 2 / 0、NS 0、YB 2 / 0、Y 0、EB 6 6、C 1 2 7、L 細胞、COS (例えば COS 1 および COS 7)、QC 1 - 3、CHOK 1、CHOK 1 SV、Potelligent CHOK 1 SV、CHO GS ノックアウト、CHOK 1 SV GS - KO、CHOS、CHO DG 4 4、CHO DUXB 1 1 もしくは CHOZN 細胞、またはそれに由来する任意の細胞を含む、パラグラフ 1 ~ 9 8 または 1 1 1 ~ 1 1 9 のうちの任意の方法。

40

【 0 2 8 2 】

1 3 5 . 前記産物バリエーションが、以下の : 抗体分子 (例えばモノクローナル抗体、二重特異性抗体)、抗体模倣物 (特異的に抗原へ結合するが構造的に抗体に関連しないポリペプチド分子 (例えば DARPin、アフィボディ、アドネクチンまたは IgNAR 等))

50

、融合タンパク質（例えばFc融合タンパク質、キメラサイトカイン）、他の組み換えタンパク質（例えば糖鎖付加タンパク質、酵素、ホルモン）、ウイルス療法（例えば抗癌腫瘍溶解性ウイルス、遺伝子療法のためのウイルスベクター、およびウイルス免疫療法）、細胞療法（例えば多能性幹細胞、間充織幹細胞、および成体幹細胞）、ワクチンまたは脂質カプセル化粒子（例えばエキソソーム、ウイルス様粒子）、RNA（例えばsiRNA等）もしくはDNA（例えばプラスミドDNA等）、抗生物質、またはアミノ酸のうちの1つまたは複数から選択される、パラグラフ1～98または111～119のうちの任意の方法。

【実施例】

【0283】

実施例1：均一なタンパク質産物の産生

バイオリアクターユニット（例えば可変直径のバイオリアクター）は、使用に適切な製造環境（例えばISOグレード7）中で本発明の方法により収容されるだろう。凍結細胞は個別に融解され、培養培地を含有する第1の一回使用の（SU）産生容器へ接続されるだろう。開始された培養は、制御された条件（例えば温度、pH、溶存酸素、かき混ぜ）下で増殖されるだろう。一旦十分な培養物が増殖された（例えば培養が閾値密度に到達した）ならば、それは培養培地を含有する産生培養容器へ移されるだろう。産生培養容器は灌流モードで操作されることが可能であろう。産生培養（温度、pH、溶存酸素、かき混ぜ、培地）のための初期条件は、産物バリエーション1を産生することが可能であろう。産物バリエーション1を含有する灌流液は、精製された産物1をもたらし下流の精製ステップのシリーズを介して精製されるだろう。精製プロセスまたは他の培養後プロセスは、後続するバリエーションの産生と同時に、または、いくつかもしくはすべての後続するバリエーションのうちのいくつかもしくはすべてが産生された後に、行うことができる。

【0284】

一旦十分な量の産物バリエーション1が産生されたならば、培養条件は操作されるだろう（例えばpHは低下もしくは上昇されるだろう、および/または異なる組成物の濃縮培地はバイオリアクターへ添加されるだろう）。灌流は中断される、および/または灌流液は廃液へ方向転換される。下流のユニット操作は、このステージの間に適切なクリーニングバッファーおよび消毒バッファーの使用を経由して産物バリエーション1をクリーニングするだろう。一旦バイオリアクターが安定的な操作に到達したならば、灌流液の収集および精製を開始して、産物バリエーション2を産生することができる。約2日が各々の産物バリエーションの産生に要求され、したがって30日の灌流培養継続期間にわたって、15の異なる産物バリエーションを産生することができるだろうことが想定される。産生される各々の産物バリエーションの量は、培養の継続期間またはスケール（例えばより多い体積の灌流）のいずれかによって調整することができる。本発明は、広範囲の培養体積での操作における追加の柔軟性のためのバイオリアクターを提供するために、図12中で示されるような従来の攪拌されるバイオリアクターまたは可変直径のバイオリアクターのいずれかにおける産生培養を用いるだろう。

【0285】

本明細書において記載される方法により、1つの灌流バイオリアクターは、類似するフェドバッチバイオリアクターまたは複数のフェドバッチ反応器よりも、はるかに短い期間で複数の産物バリエーションを並列して産生することができる。より大きなスケール（例えば2000L）では、凍結細胞の融解から産生培養の開始への継続期間は、フェドバッチ産生で30日を超えてかかり得る。本明細書において記載される方法は、2日以下へ期間を低減することができる。

【0286】

実施例2：灌流反応器中での不均一タンパク質産物の産生

産物（例えばタンパク質）は、単一のバイオリアクター中の産物（例えばタンパク質）の複数の画分またはバリエーションが得られる（例えば各々が異なる産物品質属性を備える）ように産生することができる。一実施例において、これらの画分は灌流バイオリアクター

10

20

30

40

50

装置中で産生される。

【0287】

例示的な灌流バイオリアクター装置（図12中で示されるように）は、定常状態細胞培養（それは擬似定常状態と称され得る）を得るようにデザインされ、その中で、細胞密度、栄養素、任意の化学物質、廃液副産物、または産物荷電バリエーションのうちの少なくとも1つは、経時的に一定に保持される。装置は修飾された連続攪拌タンク反応器（CSTR）としてデザインされ、そこでは、新鮮な栄養培地は供給ポンプを経由して一定速度でタンクへ供給され、タンク含有物の量はタンクにおいて液体レベルが一定体積で維持されるように一定して取り出される。スケールおよび比例積分（PI）制御装置を使用して反応器体積を一定値で保って、全溶出液速度（一般的にパーミエイトポンプ速度およびセルブリー

10

【0288】

反応器内で、細胞を懸濁培養で増殖させる。細胞を、細胞保持デバイス（タンク出口流に所在する）を経由して反応器装置中で保持する。細胞保持デバイスは反応器中で細胞を保持する一方で、任意の液体可溶性構成要素がパーミエイトポンプを経由して反応器を自由に出ることを可能にする。液体可溶性構成要素は、栄養素、廃液副産物、およびタンパク質産物を包含する。細胞は好ましい条件下で連続的に分裂するので、分離細胞を含有する反応器溶出液の流れも用いられ、それはセルブリードポンプによって制御される。

【0289】

反応器細胞密度を、セルブリードポンプ速度の制御によって一定の設定点で維持した。この実施例において、生存細胞密度を静電容量プローブを使用して測定し、そこで、1000kHzで測定される静電容量は、生存細胞密度のオフライン測定へ直線的に相関した。生存細胞密度値（静電容量測定を経由して決定される）は、PI制御装置（それはセルブリードポンプ速度を決定する）の中へ供給された。セルブリード速度は、反応器体積制御装置によって規定されるように、セルブリードに対する全溶出液流の割合を計算することによって決定された。この手法において、細胞密度は、細胞密度を測定するために静電容量を使用するフィードバック制御装置によって決定されるように、細胞増殖に等しい速度でセルブリードの流れを経由して細胞を取り出すことによって制御された。

20

【0290】

上で略述された灌流装置を使用して、異なる産物品質属性を備えた産物の複数の画分を得ることができる。これらの画分は複数の定常状態の生成によって産生され、各々は異なる品質属性（複数可）を備えた産物を産生する。これらの不連続の定常状態条件は、1つまたは複数の栄養素、または産物の品質属性（複数可）に影響を及ぼすことが公知の他の化学物質の新鮮な栄養供給中の濃度を変化させることによって生成される。一旦最初の定常状態に到達したならば（一定の細胞密度および産物品質属性レベルとして定義される）、1つまたは複数の栄養素、または産物品質属性に影響を及ぼす他の化学物質の反応器濃度は、産物品質属性に対する所望される効果に依存して、上昇または低下させられる。

30

【0291】

栄養素の反応器濃度を上昇させるために、その栄養素の濃縮ボラースは、新鮮な栄養素供給中の栄養素濃度を所望される反応器濃度へと増加させながら、反応器へ同時に添加される。濃縮栄養素ボラースは、栄養素の反応器濃度を新しい所望される定常状態濃度へと即座に上昇させるように、十分な栄養素を含有する。この手法において、反応器栄養素濃度における実質的には即時のステップ増加が得られる。栄養素ボラースは、定常状態産物の品質属性画分を達成するのには必要ではないが、それはそうするのに要求される時間を短縮する役目を果たす。栄養素の反応器濃度を低下させるために、新鮮な栄養素供給中の栄養素濃度は、所望される反応器濃度へ単純に低下される。希釈ダイナミクスに起因して栄養素の反応器濃度が新しい定常状態値に到達するようにさせなくてはならないので、この事例において追加の時間が新しい定常状態を得るのに要求される。

40

【0292】

50

荷電バリエーション

一実施例において、上で記載される灌流装置を使用して、異なる荷電バリエーションプロファイル（モノクローナル抗体（mAb）についての産物品質属性）を備えた産物の複数の画分を得る。産物の荷電バリエーションプロファイルに影響するために、荷電バリエーションに対する効果を有する任意の化学物質または栄養素を使用できる。この実施例において、硫酸銅（ CuSO_4 ）およびリジンを、荷電バリエーションプロファイルに影響するために使用した。この事例において、モノクローナル抗体を発現するGS-/CHO細胞株を使用して、産物を産生した。

【0293】

実施例3：荷電変動を調節する化学物質化合物を同定する振盪フラスコ実験

10

一実施例において、荷電変動の調節に使用することができる化学物質化合物を同定した。異なる3つの化学物質（ CuSO_4 、リジン、およびカルボキシペプチダーゼ阻害物質（N-アセチルアルギニン））を評価した。簡潔には、mAbを発現するLonza GS-/CHO細胞を、 CuSO_4 （0.4、1.2、2.0 μM ）、リジン（10、25、50 mM）、またはN-アセチルアルギニン（0.1、1、10 mM）を補足した培地中で振盪フラスコ中で5日間増殖した。5日目に、培地を収穫し、mAbをプロテインA樹脂上で精製し、精製されたmAbの荷電変動を測定した。

【0294】

CuSO_4 の試験された用量のどれも、培養の細胞増殖（図13A）または代謝プロファイルのいずれかに影響を与えなかった。追加の CuSO_4 の非存在に比較した場合に（主要： $64 \pm 0.6\%$ 、 $p < 0.01$ ；塩基性： $21 \pm 0.16\%$ 、 $p < 0.01$ ；図15A~15C）、2.0 μM の CuSO_4 は、主要ピークの存在量（ $69 \pm 1.4\%$ ）を増加させる一方で、同時に塩基性ピークの存在量（ $17 \pm 1.3\%$ ）を減少させた。

20

【0295】

生存細胞密度の低減によって明らかのように、50 mMおよび25 mMの両方の追加のリジンの添加は、細胞増殖の低減を引き起こした（図13B~13C）。追加のリジン無しに比較した場合に（塩基性： $21 \pm 0.2\%$ 、 $p < 0.001$ ；主要： $64 \pm 0.6\%$ 、 $p < 0.001$ ；図14A）、10 mMの追加のリジンは、塩基性ピークの存在量（ $25 \pm 0.7\%$ ）を増加させ、同時に主要ピークの存在量（ $61 \pm 0.6\%$ ）減少させた。リジンに類似して、N-アセチルアルギニンは、塩基性荷電バリエーションの増加を引き起こす一方で、主要ピークを減少させる（図14C）。しかしながら、N-アセチルアルギニンの効果は、リジンのものよりも着実でなく、細胞増殖（図13C）または代謝プロファイルに影響しなかった。追加の2.0 μM の CuSO_4 による補足に続いて、主要ピークの有意な増加および塩基性ピークの有意な減少が観察された（図15D）。荷電バリエーションのこれらの相対的量の変化も計算された（図15E）（実施例4を参照）。

30

【0296】

この研究から、2.0 μM の追加の CuSO_4 および10 mMの追加のリジンは各々、灌流反応器中の荷電変動を調節するための有効な化学物質化合物として同定された。

【0297】

実施例4：灌流反応器中の CuSO_4 による荷電変動調節

40

灌流反応器中での25日の増殖に続いて、中空糸フィルターの灌流液側からの30 mLの保持物を毎日取り出し、プロテインA精製および後続する荷電差異分析のために-80で保存した。基本条件下での5日間（25~29日目）の増殖に続いて、反応器中の CuSO_4 の濃度を、栄養素ボラスの添加を介して追加の2.0 μM の CuSO_4 により即時で補足した。同時に、2.0 μM の CuSO_4 の追加の濃度を含有する新しい培地バッグを、反応器を介して添付し、4日間灌流した。追加の2.0 μM の CuSO_4 を導入して1日以内に、荷電変動プロファイルは新しい定常状態へ変化した。基本条件の荷電変動プロファイルに比較した場合に（主要： $68 \pm 0.5\%$ 、 $p < 0.001$ ；塩基性： $14 \pm 0.3\%$ 、 $p < 0.05$ ）、この新しい荷電変動状態は、主要ピークのより高い存在量（ $72 \pm 0.3\%$ ）および塩基性ピークのより低い存在量（ $11 \pm 0.3\%$ ）であった

50

。これらの存在量の変化は、6 %の主要ピークの相対的存在量の増加および14 %の塩基性ピークの相対存在量の減少に匹敵する(図15E)。相対的存在量は、より高いCuSO₄濃度で観察された荷電バリエーションと基本条件での荷電バリエーションとの間の、基本条件での荷電バリエーションに比べてパーセンテージとして表現された差である。この実験は、単一のバイオリアクターから2つの異なる荷電変動プロファイルを生成する能力を実証した。

【0298】

実施例5：灌流反応器中の2つの荷電変動の調節

単一の灌流反応器中で反対方向で荷電変動プロファイルを調節する能力を示すために、4つの交互ステップ変化：(i) 2.0 μMの追加のCuSO₄への増加、(ii) 基本条件への復帰、(iii) 10 mMの追加のリジンへの増加、および(iv) 基本条件への後続する復帰を遂行した。この実験の継続期間にわたって、中空系フィルターの灌流液側からの30 mLのサンプルを毎日引き抜き、mAbを精製し、荷電変動について分析した。定常状態値(荷電変動の平均によって決定されるような)を使用して、ステップ変化間の荷電変動の差を比較する。図16A~16Cは、酸性ピーク(図16A)、塩基性ピーク(図16B)、および主要ピーク(図16C)の各々についての経時的なパーセント面積の変化を示す。観察された変化を、後続する以下のパラグラフ中で詳細に記載する。

【0299】

2.0 μMのCuSO₄を灌流反応器へ捕捉することは、スイッチ前の定常状態(71 ± 0.5 %、p < 0.0001)およびスイッチ後の定常状態(71 ± 0.2 %、p < 0.0001)に比較した場合に、主要ピークの存在量(74 ± 0.2 %)の有意な増加を引き起こした(図17B)。加えて、主要ピーク存在量のこの変化は、スイッチ前の定常状態(17 ± 0.6 %、p < 0.0001)およびスイッチ後の定常状態(17 ± 0.2 %、p < 0.0001)に比較した場合に、酸性ピークの有意な減少(15 ± 0.3 %)が付随した(図17A)。荷電変動におけるこれらの変化は、4 %の主要ピークの相対的存在量の増加および8 %の酸性ピークの相対的存在量の減少に匹敵する。塩基性ピークにおける実質的な変化は観察されなかった(図17C)。CuSO₄前とCuSO₄後の定常状態の荷電変動プロファイルとの間に有意差はなかったので、このデータは、CuSO₄が可逆的様式で荷電変動を調節する能力を示す(図17D~17E)。

【0300】

10 mMのリジンを灌流反応器へ捕捉することは、スイッチ前の定常状態(71 ± 0.2 %、p < 0.0001)およびスイッチ後の定常状態(70 ± 0.2 %、p < 0.0001)に比較した場合に、主要ピークの存在量(64 ± 0.2 %)の有意な低減を引き起こした(図18B)。加えて、10 mMリジン補足に続いて塩基性ピークの存在量(20 ± 0.1 %)は、スイッチ前の定常状態(12 ± 0.3 %、p < 0.0001)およびスイッチ後の定常状態(13 ± 0.3 %、p < 0.0001)に比較した場合に、有意に増加した(図18C)。荷電変動におけるこれらの変化は、10 %の主要ピークの相対的存在量の減少および62 %の塩基性ピークの相対的存在量の増加に匹敵する。リジン前とリジン後の定常状態の荷電変動プロファイルとの間に有意差はなかったので、これらのデータは、リジンを使用して可逆的様式で荷電変動を調節できることを示す

【0301】

荷電変動における差を提示する例示的な電気泳動図を、図19A~19Dおよび20中で示す。一般的に、CuSO₄の効果は、主要ピーク(pI 7.2)の塩基性側上の肩の発達によって明らかである(図19B)一方で、リジンの効果は、主要ピーク(pI 7.2)の低減および塩基性ピーク(特に7.5のpIのピーク)の発達により観察される(図19D)。

【0302】

総合すると、これらのデータは、反対方向でのmAb品質属性の操作(すなわち化学物質1の添加による品質属性の存在量の増加に加えて、単一のバイオリアクター中の化学物質1の取り出し後の化学物質2の添加による同じ品質属性の存在量の減少)を実証する。

【0303】

10

20

30

40

50

実施例 6 : 方法

この実施例において記載される方法を、本明細書において記載される実験（例えば実施例 2 ~ 5 における）のために使用した。

【 0 3 0 4 】

荷電変動分析のための m A b 精製

プロテイン A スピнкаラムを使用して、産生された m A b を精製した。簡潔には、スピнкаラムを、600 u L の結合バッファー（20 mM のリン酸ナトリウム、p H 7 . 0 ）により最初に 2 回洗浄した。次いで 4 . 8 ~ 6 . 0 m L の灌流液を、600 u L のアリコートで合計で 8 ~ 10 回の適用でプロテイン A スピнкаラムへ適用した。結合に続いて、m A b を 400 u L の溶出バッファー（0 . 1 M のグリシン、0 . 1 M の N a C l 、 p H 3 . 5 ）の 2 回の添加により溶出し、60 u L の 1 M トリス、p H 9 . 0 の添加により中和した。後続して、各々のサンプル中の m A b の濃度を以下の H P L C プロテイン A 方法論を用いて決定した。

【 0 3 0 5 】

H P L C プロテイン A の m A b の定量化

m A b 定量化を、プロテイン A カラム（0 . 1 m L 、 L i f e T e c h n o l o g i e s ; B e d f o r d 、 M A ）を使用して達成した。方法は 2 つの移動相：（ i ）結合バッファー（50 mM のグリシン、150 mM の N a C l 、 p H 8 . 0 ）および（ i i ）溶出バッファー（50 mM のグリシン、150 mM の N a C l 、 p H 2 . 5 ）からなっていた。すべてにサンプルを、H P L C 上への注入の前に結合バッファー中で 1 : 1 に希釈した。バッファーの流速は 2 m L / 分で一定であった。各々のサンプルについての H P L C 分析は、およそ 2 分間かかった。クロマトグラフィー法は以下の通りであった。最初の 30 秒間 100 % の結合バッファーをポンプで入れ、続いて、46 秒間 100 % の溶出バッファー、次いで 14 秒間 100 % の結合バッファーにより再平衡化した。吸光度を 280 n m の波長でダイオードアレイ検出器上で測定した。吸光度を m A b の参照スタンダード調製物のスタンダードカーブに比較し、サンプル中の m A b の量を計算した。

【 0 3 0 6 】

荷電変動の分析

150 u g の精製された m A b を、A m i c o n U l t r a 30 k D a 分子量カットオフ遠心用フィルターへ添加し（三重で）、20 分間 14 , 000 R C F での遠心分離によって体積 20 ~ 30 u L まで濃縮した。次いでこのサンプルを、175 u L のマスターミックス溶液（0 . 5 % のメチルセルロース、2 M の尿素、1 % の P h a r m a l y t e s p H 3 ~ 10、3 % の P h a r m a l y t e s p H 6 . 7 ~ 7 . 7、および 5 u L / m L の以下の p I マーカー：5 . 85、6 . 14、8 . 18）へ添加した。各々のサンプルを 30 秒間高速でボルテックスで攪拌し、続いて、3 分間 9300 R C F で遠心分離した。次いで 150 u L のサンプルを 300 u L の挿入物と共に 2 m L バイアルの中へ移し、8 で設定された i C E 3 システムのオートサンプラーの中へ置いた。次いで荷電変動を、1500 V で 1 分間の最初のフォーカスピリオド、続いて 3000 V で 11 分間最終的なフォーカスピリオドにより測定した。

【 0 3 0 7 】

データ分析および統計

電気泳動図を E m p o w e r ファイルとして i C E ソフトウェアからエクスポートし、分析のために E m p o w e r へインポートした。電気泳動図中に存在するピークを積分し、各々のピークのパーセント面積を計算する、プロセッシング方法をデザインした。これらの電気泳動図の各々について、7 つのピークが、特に 6 . 6、6 . 9、7 . 2、7 . 3、7 . 5 および 7 . 7 の p I で、共通して観察された。面積によって、p I 7 . 2 での荷電バリエーションが最も高いパーセント面積のバリエーションを提示したので、主要ピークと判断された。分析のために、p I 7 . 3、7 . 5 および 7 . 7 でのバリエーションは塩基性バリエーションと判断されたが、6 . 6 および 6 . 9 の p I のバリエーションは酸性バリエーションと判断された（例えば図 20 中で示される例示的な電気泳動図を参照）。統計解析のために、これら

10

20

30

40

50

のバリエーションのそれぞれのパーセント面積の総計を一緒に加えて、ピーク面積の合計を得て、ピーク面積の合計と比べて各々のそれぞれの群のパーセント面積を計算した。次いでパーセント面積値を定常状態にわたって平均化し、平均を一般的に二元配置ANOVA、続いてBonferroni事後解析を使用して比較した。

【0308】

実施例7：変動するガラクトシル化レベル

別の実施例において、上で記載される灌流装置を使用して、異なるガラクトシル化レベルを備えた産物の複数の画分を産生した。ガラクトシル化に対する効果を有する任意の栄養素を使用して、産物のガラクトシル化レベルに影響できることが意図される。この実施例において、ガラクトースを使用して、産物のガラクトシル化レベルに影響を及ぼした。反応器のガラクトース濃度を、不連続ステップ増加で0～10mMの範囲中で調節した。次のステップ変化へ進行する前に、反応器中の産物のガラクトシル化を定常状態値に達するようにした。反応器の中へ供給されたガラクトース濃度は0、0.01、0.086、0.79および10mMであった。46%、46%、46%、52%および58%の対応する定常状態ガラクトシル化値が達成された。図21は、ガラクトース濃度のステップ増加および灌流装置中の経時的な産物パーセントガラクトシル化の対応する変化を示す。図22は、指示されたタイムポイントで検出された反応器のガラクトース濃度をさらに重層する。例えばDowney et al., Biotechnol Prog. 2017 Nov; 33(6): 1647-1661 (その全体は参照により本明細書に援用される)を参照されたい。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

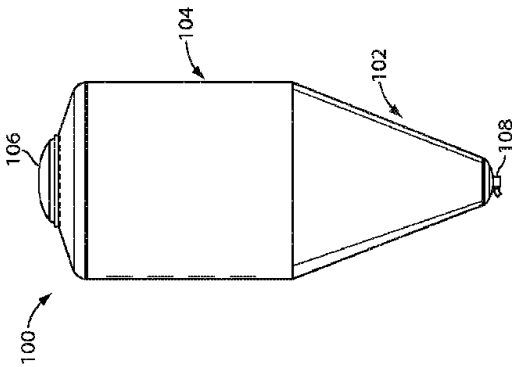


FIG. 1

【図 2】

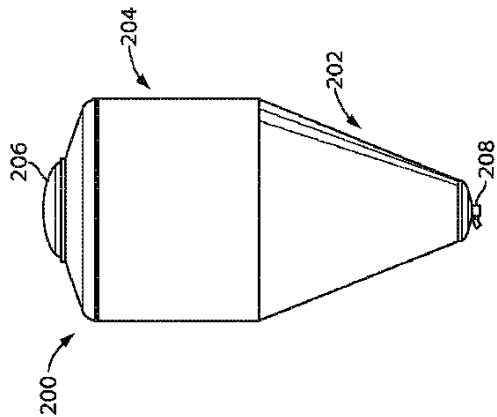


FIG. 2

【図 3】

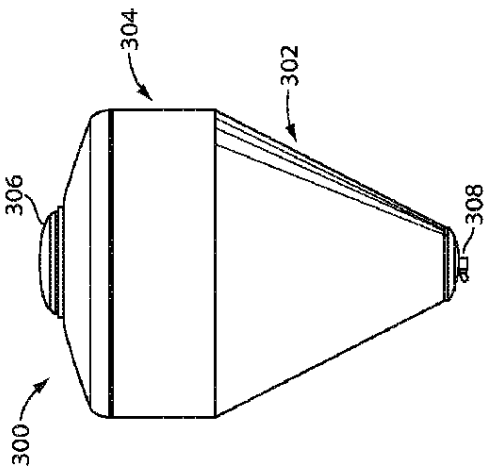


FIG. 3

【図 4】

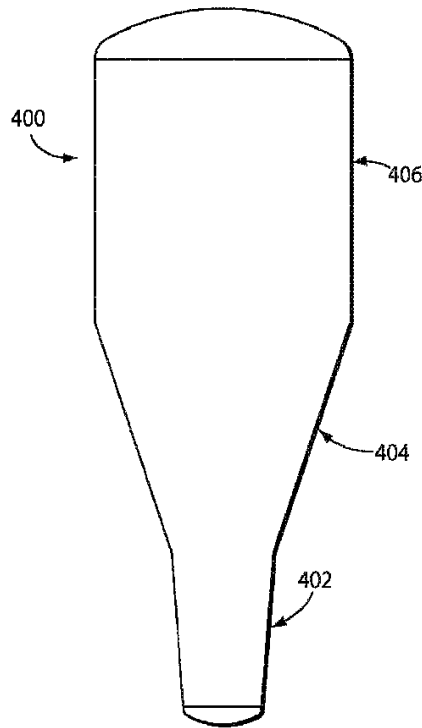


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

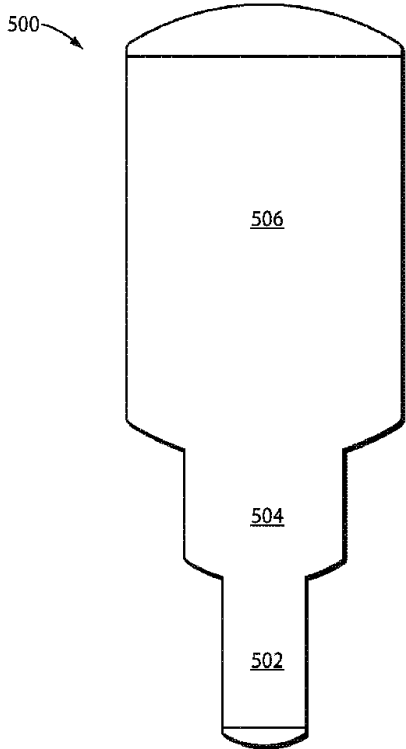


FIG. 5

【図 6】

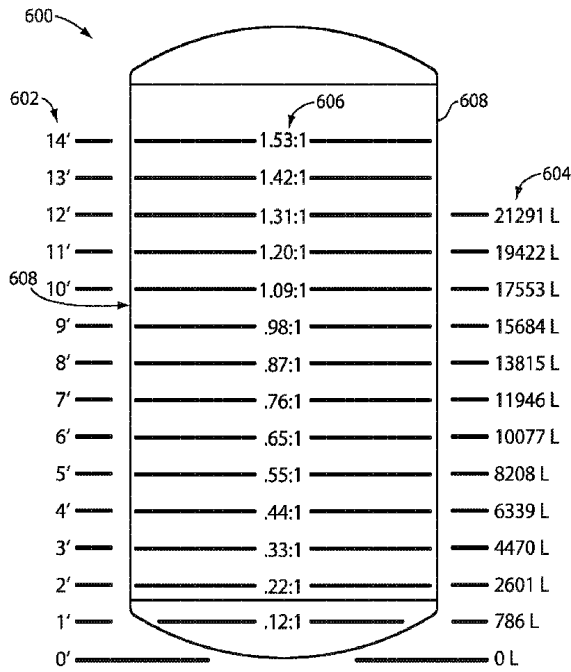


FIG. 6

【図 7】

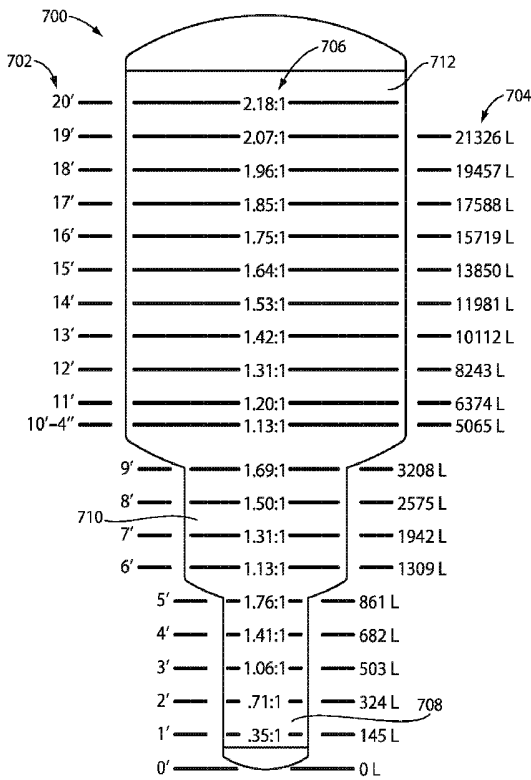


FIG. 7

【図 8】

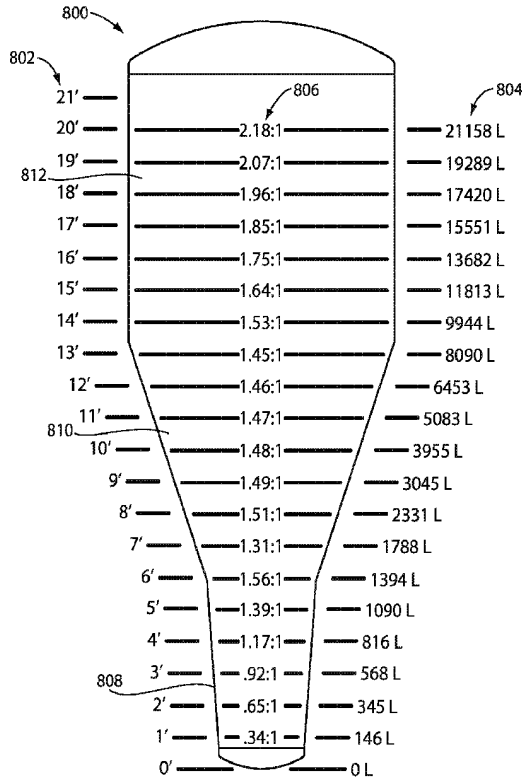


FIG. 8

10

20

30

40

50

【図 9】

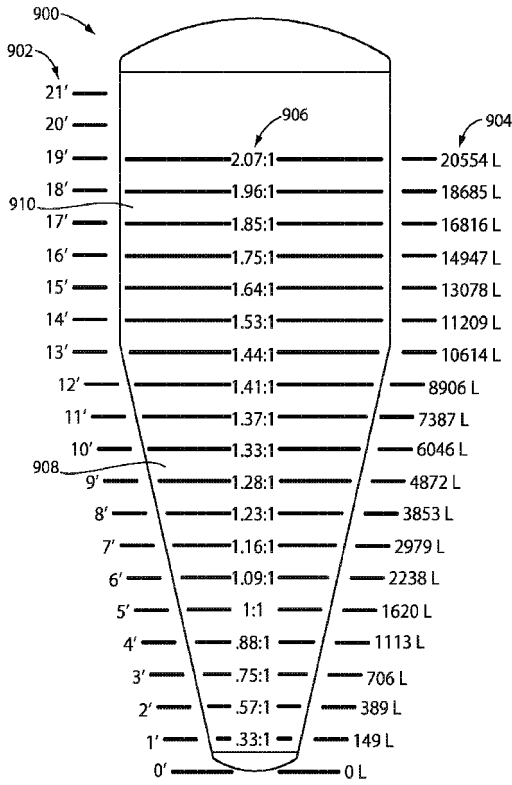


FIG. 9

【図 10】

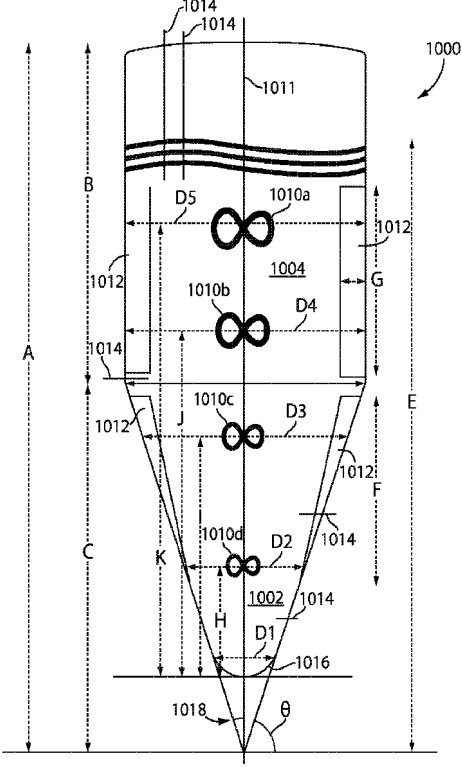
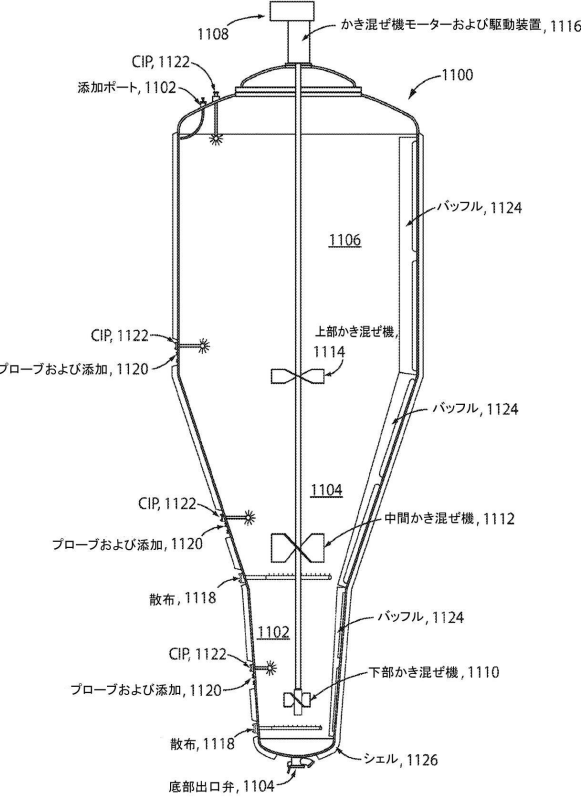
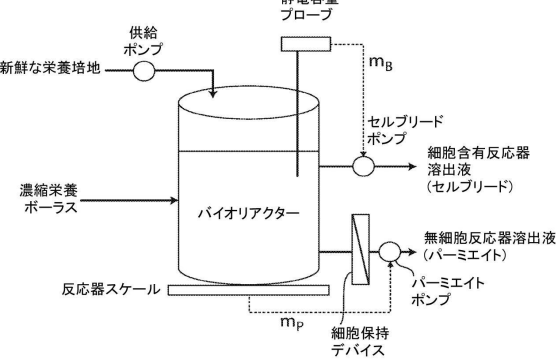


FIG. 10

【図 11】



【図 12】



10

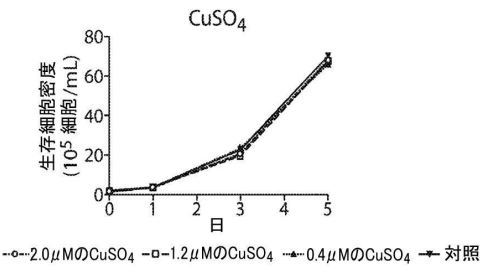
20

30

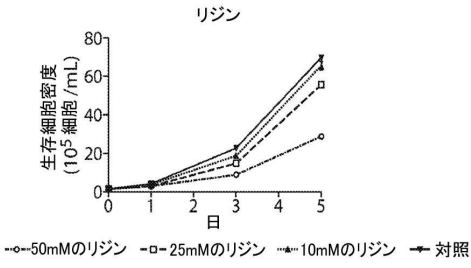
40

50

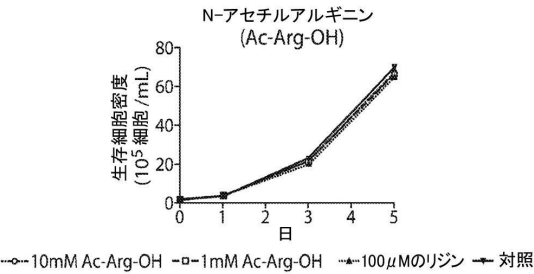
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【図 1 4】

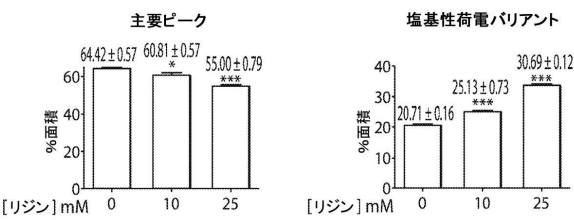


図 14A

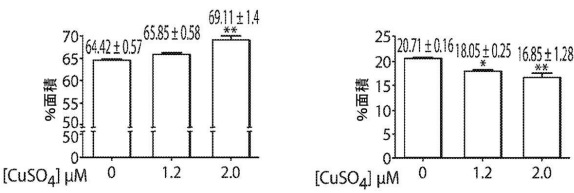


図 14B

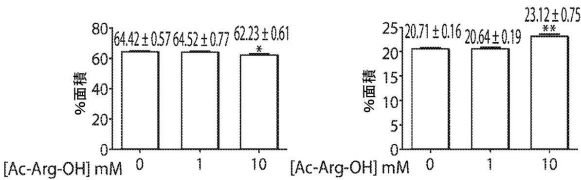


図 14C

10

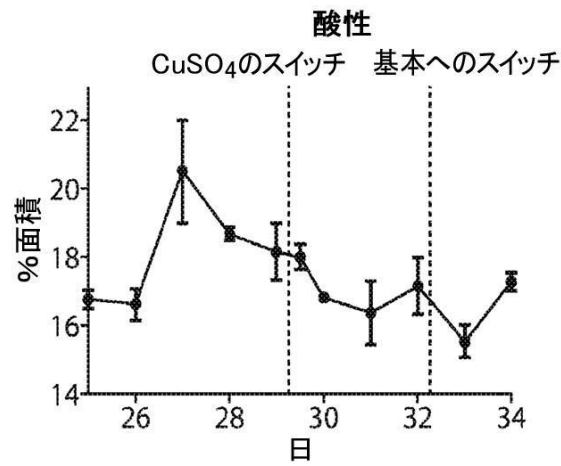
20

30

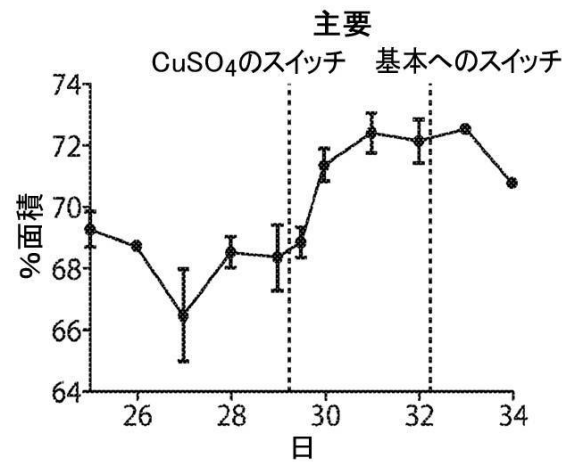
40

50

【図 1 5 A】

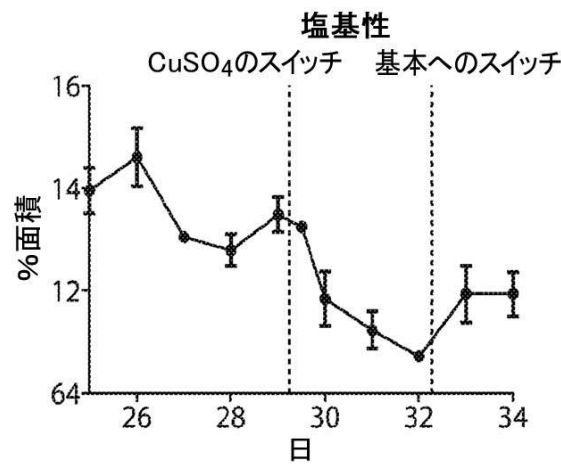


【図 1 5 B】

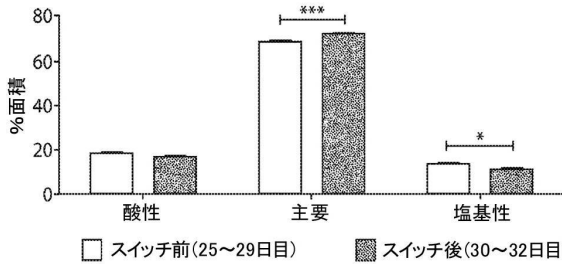


10

【図 1 5 C】



【図 1 5 D】



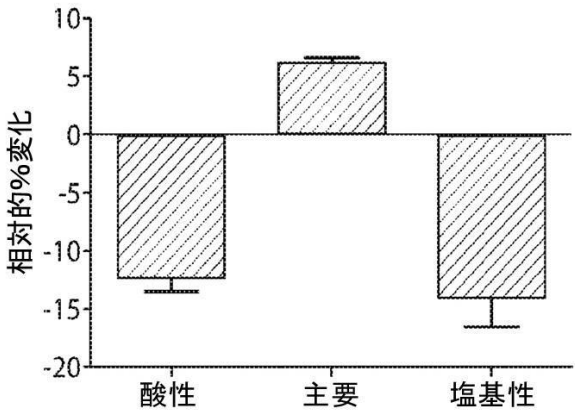
20

30

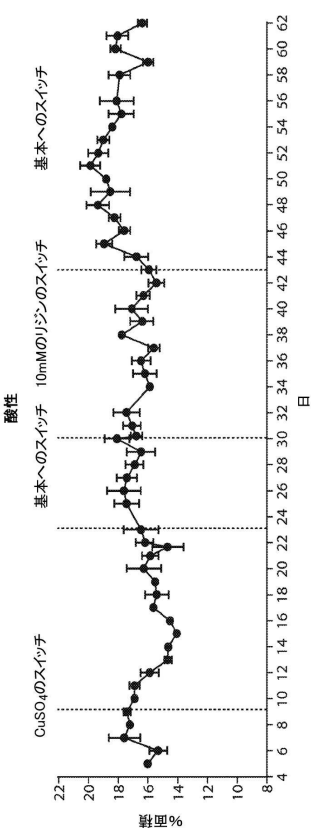
40

50

【図 15 E】



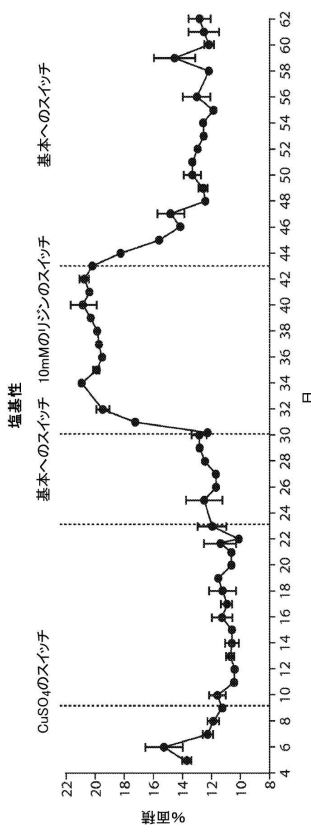
【図 16 A】



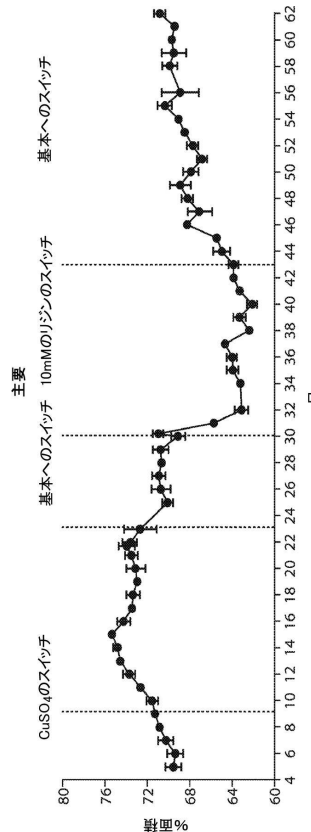
10

20

【図 16 B】



【図 16 C】

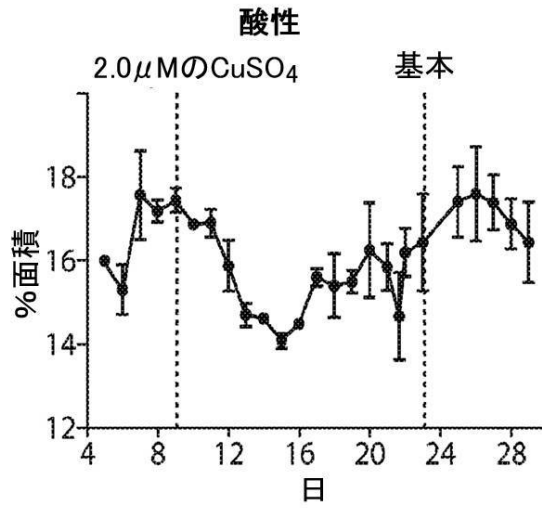


30

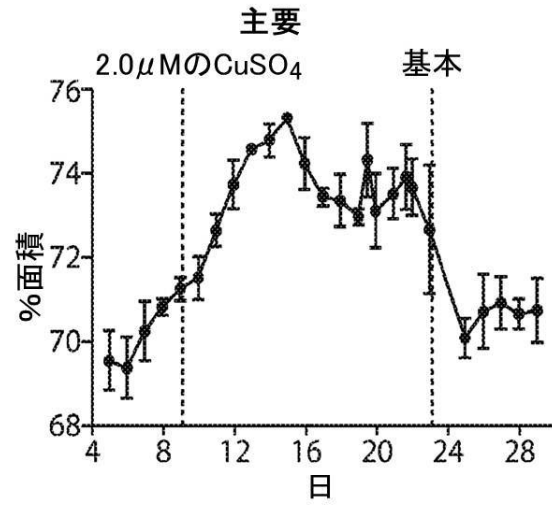
40

50

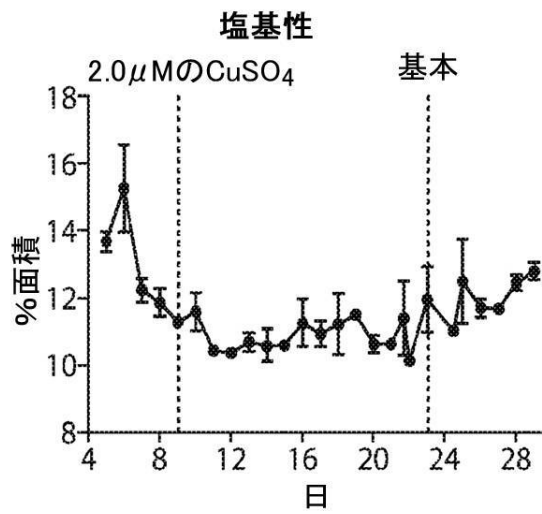
【図 17 A】



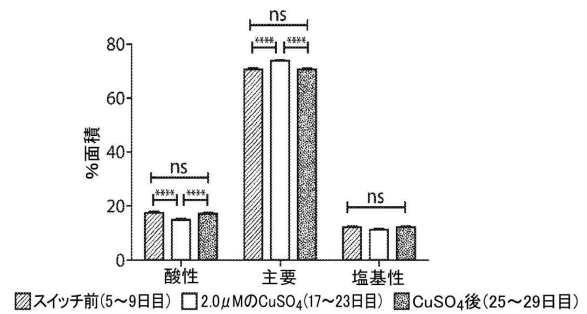
【図 17 B】



【図 17 C】



【図 17 D】



10

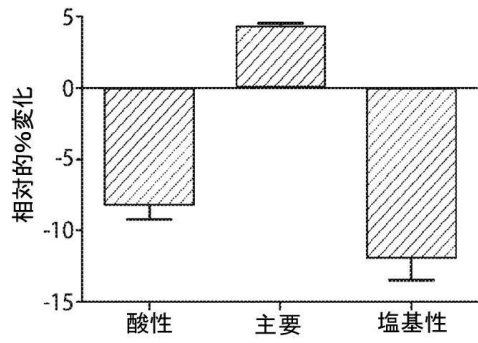
20

30

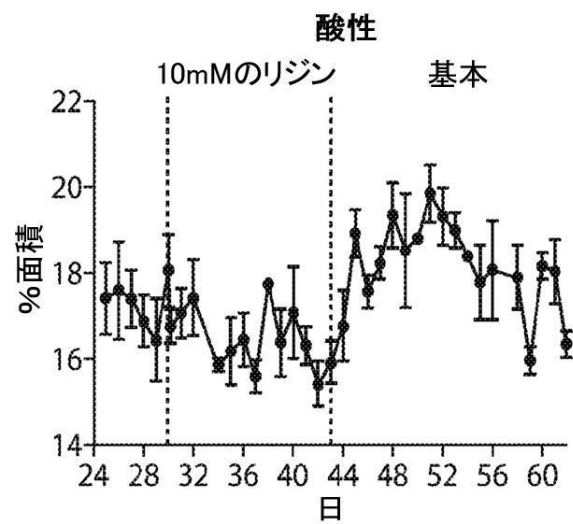
40

50

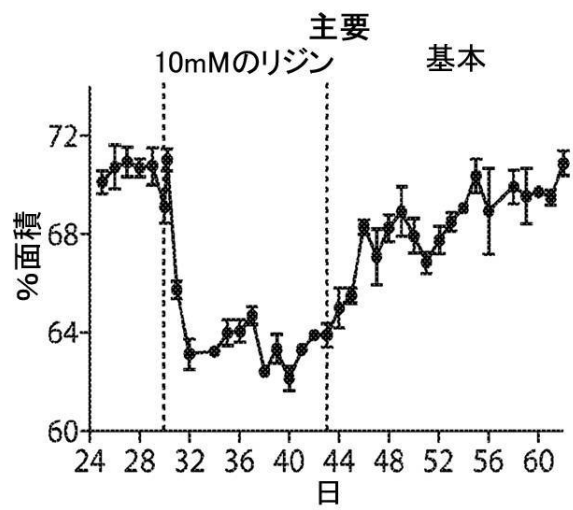
【図 1 7 E】



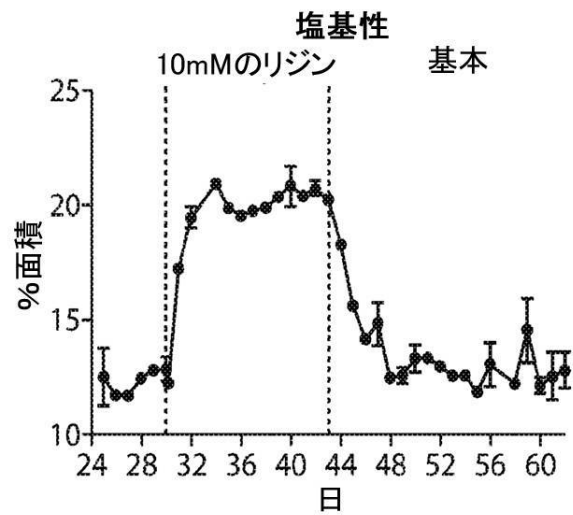
【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



【図 1 8 C】



10

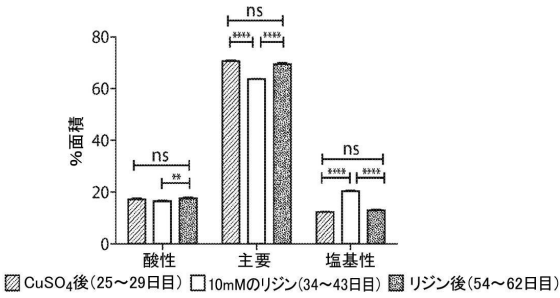
20

30

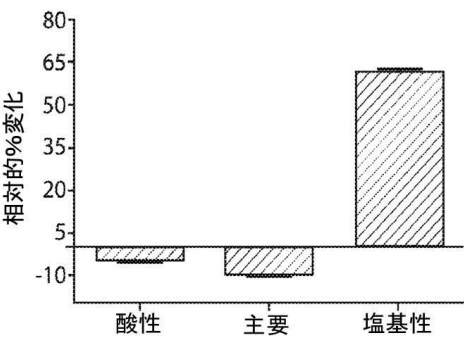
40

50

【図 1 8 D】

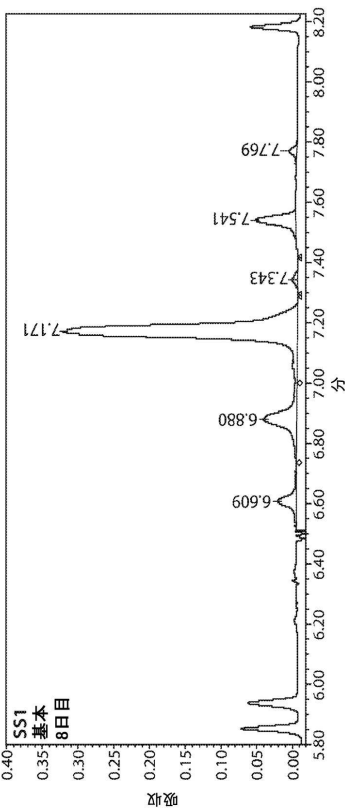


【図 1 8 E】

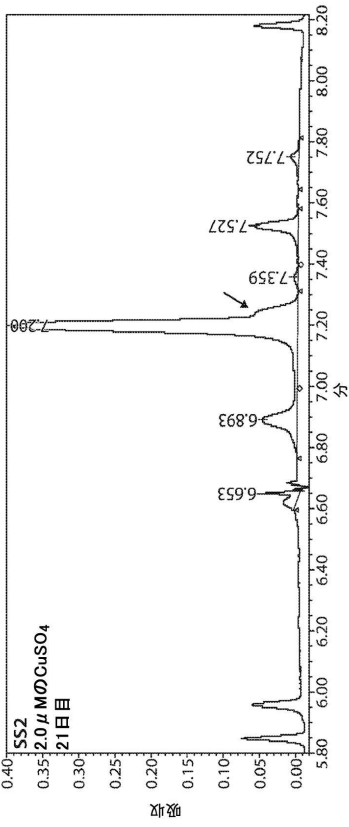


10

【図 1 9 A】



【図 1 9 B】



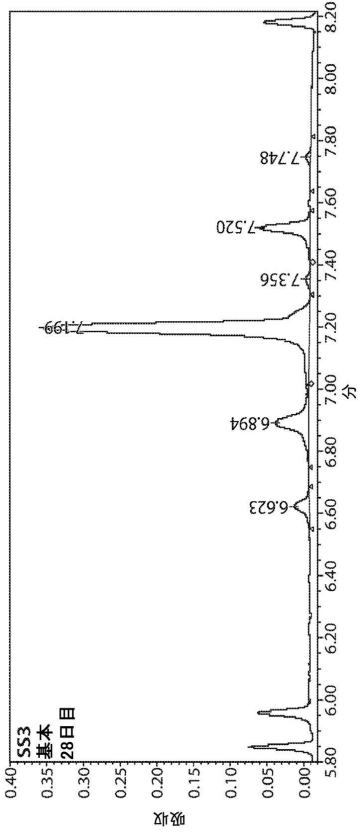
20

30

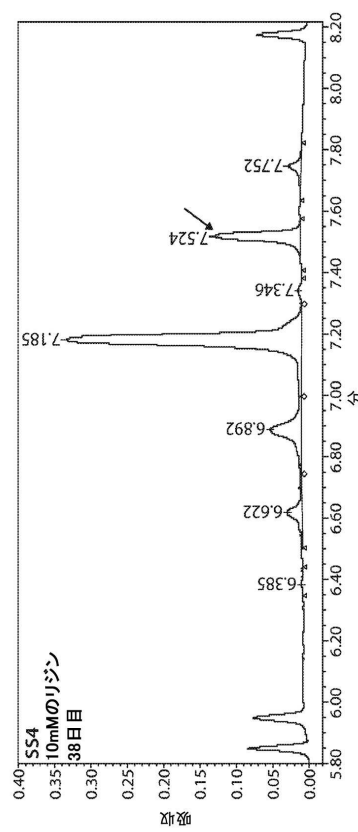
40

50

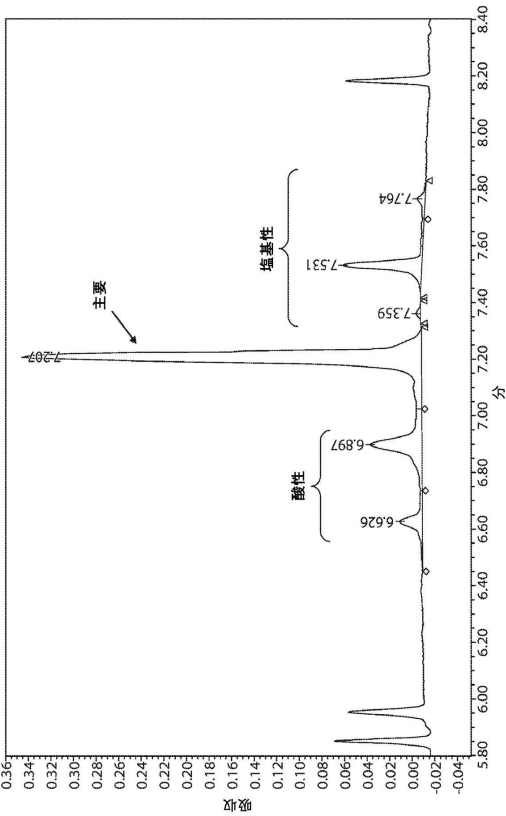
【図 19 C】



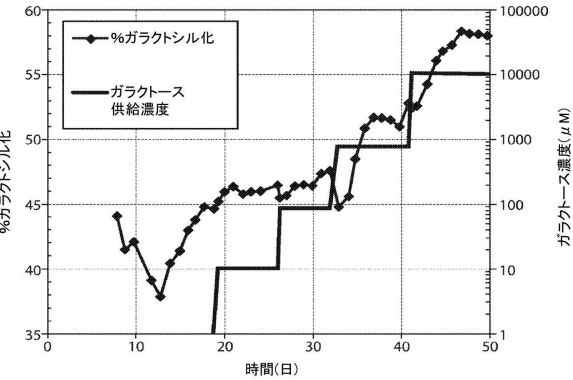
【図 19 D】



【図 20】



【図 21】



10

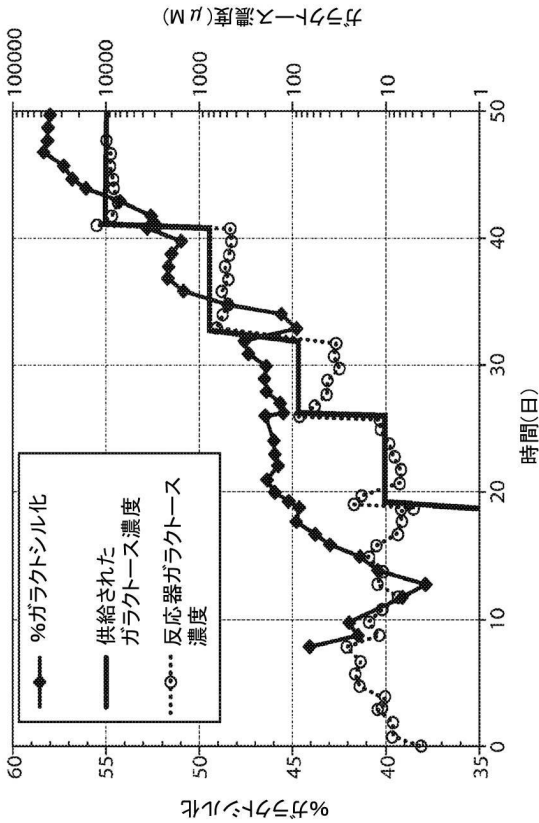
20

30

40

50

【図 2 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/14	G
C 0 7 K	1/02 (2006.01)	C 1 2 N	1/16	B
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 0 7 K	1/02	
		C 0 7 K	16/00	
		C 1 2 N	15/09	Z

(56)参考文献

特表 2 0 1 7 - 5 0 4 3 4 4 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 8 2 7 3 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 0 8 / 1 3 1 3 7 4 (W O , A 1)
 Biotechnol. Prog. , 2016年 , Vol.32, No.5 , p.1123-1134
 Biotechnology and Bioengineering , 2011年 , Vol.108, No.10 , p.2348-2358

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A P L U S / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E (S T N)