

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6732660号  
(P6732660)

(45) 発行日 令和2年7月29日(2020.7.29)

(24) 登録日 令和2年7月10日(2020.7.10)

(51) Int.Cl.

C 12 P 21/02 (2006.01)  
C 07 K 16/00 (2006.01)

F 1

C 12 P 21/02  
C 07 K 16/00

C

請求項の数 34 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2016-563876 (P2016-563876)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月9日 (2014.12.9)  
 (65) 公表番号 特表2017-501749 (P2017-501749A)  
 (43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2014/069378  
 (87) 國際公開番号 WO2015/105609  
 (87) 國際公開日 平成27年7月16日 (2015.7.16)  
 審査請求日 平成29年10月25日 (2017.10.25)  
 (31) 優先権主張番号 61/926,481  
 (32) 優先日 平成26年1月13日 (2014.1.13)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73) 特許権者 500049716  
アムジエン・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91  
320, サウザンド オークス, ワン ア  
ムジエン センター ドライブ  
(74) 代理人 110001173  
特許業務法人川口國際特許事務所  
(72) 発明者 カン, ソヘ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・930  
12、カマリロ、リバーデイル・コート・  
243・ナンバー・404  
(72) 発明者 ホワン, チュン-ジュニア  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・913  
20、ニューベリー・パーク、フォールブ  
ルック・アベニュー・556

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作するためのオルニチン代謝の調節

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を減少させるための方法であつて、アルギナーゼ阻害剤を含む細胞培養にて、組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、

ここで、組換えタンパク質を発現する宿主細胞がアルギナーゼ阻害剤を含まない細胞培養にて培養されたときと比べて、前記宿主細胞中のオルニチン産生が減少され、

前記組換えタンパク質が、アルギナーゼ阻害剤を含まない細胞培養中で発現されたときよりも、低減された高マンノースグリコフォーム含有量を有する、方法。

## 【請求項2】

宿主細胞中のオルニチン蓄積が、アルギナーゼ阻害剤を細胞培養に添加することで調節される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

アルギナーゼ阻害剤が、N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニン-酢酸塩、N-L-ヒドロキシ-nor-アルギニン二酢酸塩、BEC(S-(2-ボロノエチル)-1-システイン)及びDL-ジフルオロメチルオルニチンからなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

アルギナーゼ阻害剤が、BEC(S-(2-ボロノエチル)-1-システイン)である、請求項3に記載の方法。

10

20

## 【請求項 5】

アルギナーゼ阻害剤が、DL-α-ジフルオロメチルオルニチンである、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 6】

アルギナーゼ阻害剤が、

(a) 1 μM、10 μM又は20 μMの濃度を有するN<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニン-酢酸塩、

(b) 10 μM又は20 μMの濃度を有するN-ヒドロキシ-nor-アルギニン-酢酸塩、

(c) 1 μM、10 μM、20 μM又は0.5 mMの濃度を有するBEC(S-(2-ボロノエチル)-L-システイン)、又は

(d) 1 μM、10 μM、20 μM、1 mM又は2 mMの濃度を有するDL-α-ジフルオロメチルオルニチン

である、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 7】

アルギナーゼ阻害剤の濃度が、

(a) 少なくとも10 μM、

(b) 10 μM~2 mM、

(c) 10 μM、

(d) 0.5 mM、

(e) 1 mM、及び

(f) 2 mM

からなる群から選択される、請求項6に記載の方法。

## 【請求項 8】

組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を減少させるための方法であつて、スペルミンを含む細胞培養にて、組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、

ここで、組換えタンパク質を発現する宿主細胞が、より高濃度のスペルミンと共に細胞培養にて培養されたときと比べて、前記宿主細胞中のオルニチン産生が減少され、

前記組換えタンパク質が、より高濃度のスペルミンを有する細胞培養中で発現されたときよりも、低減された高マンノースグリコフォーム含量を有する、方法。

## 【請求項 9】

35 μM以下のスペルミンが細胞培養に加えられる、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

スペルミンの濃度が、

(a) 7 μM~35 μM、

(b) 17 μM~35 μM、

(c) 7 μM~17 μM、

(d) 35 μM、

(e) 17 μM、及び

(f) 7 μM

からなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

## 【請求項 11】

組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を増加させるための方法であつて、オルニチン、アルギニン、オルニチンアミノトランスフェラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤又はアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤からなる群から選択される一つを含む細胞培養にて、組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含む、方法。

## 【請求項 12】

宿主細胞中のオルニチン蓄積が、少なくとも0.6 mMのオルニチンを細胞培養培地に

10

20

30

40

50

添加することによって調節される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

オルニチンの濃度が、

- ( a ) 0 . 6 ~ 1 4 . 8 mM,
- ( b ) 6 ~ 1 4 . 8 mM,
- ( c ) 0 . 6 mM,
- ( d ) 6 mM、及び
- ( e ) 1 4 . 8 mM

からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

10

宿主細胞中のオルニチン蓄積が、少なくとも 8 . 7 mM のアルギニンを細胞培養培地に添加することによって調節される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

アルギニンの濃度が、

- ( a ) 8 . 7 mM ~ 1 7 . 5 mM,
- ( b ) 8 . 7 mM、及び
- ( c ) 1 7 . 5 mM

からなる群から選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

20

高マンノースグリコフォーム含有量が減少した組換えタンパク質を產生するための方法であって、アルギナーゼ阻害剤又はスペルミンを含む細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞中のオルニチン蓄積を減少させることによってオルニチン代謝が調節される、方法。

【請求項 1 7】

細胞培養が、スペルミンを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

細胞培養が、アルギナーゼ阻害剤を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

高マンノースグリコフォーム含有量が増加した組換えタンパク質を產生するための方法であって、オルニチン、アルギニン、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤又はアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤からなる群から選択される一つを含む細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞中のオルニチン蓄積を増加させることによってオルニチン代謝が調節される、方法。

30

【請求項 2 0】

組換えタンパク質を発現する前記宿主細胞が、回分培養、流加培養、灌流培養又はこれらの組み合わせで培養される、請求項 1 及び 1 6 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

培養が、灌流培養である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

40

灌流が、連続灌流を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

灌流の速度が一定である、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

灌流が、

- ( a ) 1 日当たり 1 . 0 作業容量以下の速度で実施される、又は
- ( b ) 交互接線流によって実施される、

請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

組換えタンパク質を発現する宿主細胞が、バイオリアクター内で培養される、請求項 1

50

及び 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

バイオリアクターの容量が

- (a) 少なくとも 500 L、
- (b) 少なくとも 500 L ~ 2000 L、及び
- (c) 少なくとも 1000 L ~ 2000 L

からなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

バイオリアクターは、少なくとも  $0.5 \times 10^6$  細胞 / mL で接種される、請求項 25  
又は 26 に記載の方法。

10

【請求項 28】

組換えタンパク質を発現する宿主細胞が、無血清細胞培養培地中で培養される、請求項  
1 及び 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

無血清培養培地が、灌流細胞培養培地である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

宿主細胞が、

- (a) 哺乳動物細胞、又は
- (b) チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞

である、請求項 1 及び 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 31】

組換えタンパク質が、糖タンパク質である、請求項 1 及び 16 ~ 19 のいずれか一項に  
記載の方法。

【請求項 32】

組換えタンパク質が、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え融合タンパク質又は  
サイトカインからなる群から選択される、請求項 1 及び 16 ~ 19 のいずれか一項に記載  
の方法。

【請求項 33】

宿主細胞によって產生された組換えタンパク質を回収する工程を更に含む、請求項 1 及  
び 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 34】

宿主細胞によって產生された組換えタンパク質が、精製され、薬学的に許容可能な製剤  
に製剤化される、請求項 1 及び 16 ~ 19 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】

本出願は、2014年1月13日に出願された米国特許仮出願第 61/926,481  
号の利益を主張するものであり、その全体を参照により本明細書に援用する。

【背景技術】

【0002】

高等真核細胞では、メチル化、硫酸化、リン酸化、脂質付加及びグリコシル化を含めた  
様々な翻訳後修飾が行われている。分泌タンパク質、膜タンパク質及び小胞体を標的にする  
タンパク質または特定の細胞内オルガネラの多くがグリコシル化されることが知られて  
いる。グリコシル化は、特定のアミノ酸に糖部分が共有結合することであり、組換えタン  
パク質にとって最も一般的でかつ重要な翻訳後修飾の 1 つである。タンパク質のグリコシ  
ル化は、細胞内で多数の機能を有し、タンパク質の折り畳み及び品質管理、分子の輸送及  
び選別、並びに細胞表面受容体の相互作用などの重要な役割がある。

【0003】

N-結合型グリコシル化は、タンパク質中の特定の認識配列（例えば Asn-X-Ser / Thr）を備えるアスパラギン残基へのオリゴ糖の付加によって行われる。N-結合

40

50

型糖タンパク質は、マンノース (Man)、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン及びノイラミン酸からなる標準分枝構造を含む。高マンノースオリゴ糖は、通常、複数のマンノース残基 (5つ以上) を有する2つのN-アセチルグルコサミンを含む。哺乳動物細胞培養で產生される糖タンパク質は、マンノース5 (Man5)、マンノース6 (Man6)、マンノース7 (Man7)、マンノース8 (Man8) 及びマンノース9 (Man9) などの高マンノース (HMまたはHMN) グリコフォームを様々な量で含み得る。

#### 【0004】

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 宿主細胞によって発現される組換え糖タンパク質のグリコフォームは、本来の遺伝要因によって概ね決定されるが、高マンノースグリコフォーム含有量は細胞培養条件による影響も受け得る (Pacis, et al., (2011) Biotechnol Bioeng 108, 2348-2358)。

10

#### 【0005】

グリコシル化は、組換えタンパク質薬物の治療有効性に影響することがある。グリコシル化が治療用糖タンパク質の生物活性、薬物動態、免疫原性、可溶性及び生体内クリアランスに影響を与えることから、グリコシル化の観察及び制御がバイオ医薬品製造の重要なパラメータとなっている。治療用タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量は、重要な品質属性であり、特定の治療用抗体の薬物動態特性に影響を及ぼすことがわかっている (Goetze, et al., (2011) Glycobiology 21, 949-59; Yu, et al., (2012) MAbs 4, 475-87)。したがって、治療用タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を制御するための方法は有益であり得る。

20

#### 【0006】

医薬品産業では、組換え治療用糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作し制御することが必要とされており、それを行うための方法は有用であり得る。本発明は、組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を、宿主細胞のオルニチン代謝を調節することによって操作するための方法を提供する。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0007】

【非特許文献1】Pacis, et al., (2011) Biotechnol Bioeng 108, 2348-2358

30

【非特許文献2】Goetze, et al., (2011) Glycobiology 21, 949-59

【非特許文献3】Yu, et al., (2012) MAbs 4, 475-87

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本発明は、細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を、宿主細胞のオルニチン代謝を調節する条件下で培養することを含む、組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作するための方法を提供する。

#### 【0009】

40

一実施形態において、宿主細胞のオルニチン代謝は、宿主細胞中のオルニチンの蓄積を減少させることによって調節される。関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチンの蓄積は、アルギナーゼ阻害剤またはスペルミンを含む細胞培養培地で宿主細胞を培養することによって調節される。別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチンの蓄積は、アルギナーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節される。別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、BEC (S-(2-ボロノエチル)-1-システイン) またはDL-a-ジフルオロメチルオルニチンである。別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、BEC (S-(2-ボロノエチル)-1-システイン) である。別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤はDL-a-ジフルオロメチルオルニチンである。別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、少なくとも10 μM

50

である。別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、10  $\mu$  M ~ 2 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、10  $\mu$  Mである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、0.5 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、1 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、2 mMである。

#### 【0010】

別の実施形態において、宿主細胞中のオルニチンの蓄積は、35  $\mu$  M以下のスペルミンを細胞培養培地に添加することによって調節される。関連実施形態において、スペルミンの濃度は、7  $\mu$  M ~ 35  $\mu$  Mである。別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、17  $\mu$  M ~ 35  $\mu$  Mである。別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、7  $\mu$  M ~ 17  $\mu$  Mである。別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、35  $\mu$  Mである。別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、17  $\mu$  Mである。別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、7  $\mu$  Mである。10

#### 【0011】

別の実施形態において、宿主細胞のオルニチン代謝は、宿主細胞中のオルニチンの蓄積を増加させることによって調節される。関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチンの蓄積は、オルニチン、アルギニン、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤またはアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって調節される。更に別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、少なくとも0.6 mMのオルニチンを細胞培養培地に添加することによって調節される。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、0.6 ~ 14.8 mMである。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、6 ~ 14.8 mMである。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、0.6 mMである。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、6 mMである。20

#### 【0012】

更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、14.8 mMである。別の実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、少なくとも8.7 mMのアルギニンを細胞培養培地に添加することによって調節される。更に別の関連実施形態において、アルギニンの濃度は、8.7 mM ~ 17.5 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギニンの濃度は、8.7 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギニンの濃度は、17.5 mMである。30

#### 【0013】

別の実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤またはアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節される。関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節される。更に別の関連実施形態において、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤は、-デフルオロメチルオルニチン(DMFO)である。更に別の関連実施形態において、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤は、ピペロンイルブトキシド(PBO)である。40

#### 【0014】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節される。更に別の関連実施形態において、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤は、5-フルオロメチルオルニチン(F-FMO或n)である。更に別の関連実施形態において、宿主細胞は、一酸化窒素シンターゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節される。更に別の関連実施形態において、一酸化窒素シンターゼ阻害剤は、2-エチル-2-チオブソイド尿素またはN-ニトロ-L-アルギニン及びL<sup>G</sup>-モノメチル-L-アルギニンである。更に別の関連実施形態において、一酸化窒素シンターゼ阻害剤は、N-ニトロ-L-アルギニン及びL<sup>G</sup>50

-モノメチル-L-アルギニンである。

【0015】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、アルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節される。更に別の関連実施形態において、アルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤は、非対称性ジメチル-アルギニン(ADMA)である。

【0016】

本発明は、高マンノースグリコフォーム含有量が減少した組換えタンパク質を產生するための方法であって、細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞中のオルニチンの蓄積を減少させることによってオルニチン代謝が調節される、方法を提供する。関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、アルギナーゼ阻害剤またはスペルミンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって減少させる。

10

【0017】

関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、アルギナーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することで減少させる。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、BEC(S-(2-ボロノエチル)-L-システイン)またはDL-a-ジフルオロメチルオルニチンである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、BEC(S-(2-ボロノエチル)-L-システイン)である。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、DL-a-ジフルオロメチルオルニチンである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、少なくとも10μMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、10μM~2mMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、10μM~20μMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、10μMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、0.5mMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、1mMである。更に別の関連実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、2mMである。

20

【0018】

別の実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、細胞培養培地中に35μM以下のスペルミンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって減少させる。更に別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、7μM~35μMである。更に別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、17μM~35μMである。更に別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、0.07mL/L~0.17mL/Lである。更に別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、35μMである。更に別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、17μMである。更に別の関連実施形態において、スペルミンの濃度は、7μMである。

30

【0019】

本発明は、高マンノースグリコフォーム含有量が増加した組換えタンパク質を產生するための方法であって、細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞中のオルニチン蓄積を増加させることによってオルニチン代謝が調節される、方法を提供する。関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチン、アルギニン、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤またはアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することによって増加させる。

40

【0020】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、少なくとも0.6mMのオルニチンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって増加させる。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、0.6~14.8mMである。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、6~14.8mMである。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、0.6mMである。更に別の関連実施形態におい

50

て、オルニチンの濃度は、6 mMである。更に別の関連実施形態において、オルニチンの濃度は、14.8 mMである。

【0021】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、少なくとも8.7 mMのアルギニンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって増加させる。更に別の関連実施形態において、アルギニンの濃度は、8.7 mM ~ 17.5 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギニンの濃度は、8.7 mMである。更に別の関連実施形態において、アルギニンの濃度は、17.5 mMである。

【0022】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤またはアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって増加させる。別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって、増加させる。更に別の関連実施形態において、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤は、-デフルオロメチルオルニチン(DMFO)である。更に別の関連実施形態において、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤は、ピペロニルブトキシド(PBO)である。

【0023】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって増加させる。更に別の関連実施形態において、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤は、5-フルオロメチルオルニチン(F-FMOrn)である。

【0024】

別の関連実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、一酸化窒素シンターゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって増加させる。更に別の関連実施形態において、一酸化窒素シンターゼ阻害剤は、2-エチル-2-チオブソイド尿素またはN-ニトロ-L-アルギニン及びL<sup>G</sup>-モノメチル-L-アルギニンである。

【0025】

別の実施形態において、宿主細胞中のオルニチン蓄積は、アルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって増加させる。更に別の関連実施形態において、アルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤は、非対称性ジメチル-アルギニン(ADMA)である。

【0026】

別の実施形態において、組換えタンパク質を発現する宿主細胞は、回分培養、流加培養、灌流培養またはこれらの組み合わせで培養される。更に別の関連実施形態において、培養は灌流培養である。更に別の関連実施形態において、灌流は連続灌流を含む。更に別の関連実施形態において、灌流速度は一定である。更に別の関連実施形態において、灌流は、1日当たり1.0作業容量以下の速度で実施される。更に別の関連実施形態において、灌流は、交互接線流によって実施される。

【0027】

別の実施形態において、組換えタンパク質を発現する宿主細胞は、バイオリアクター内で培養される。更に別の関連実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも500Lの容量を有する。更に別の関連実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも500L ~ 2000Lの容量を有する。更に別の関連実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも1000L ~ 2000Lの容量を有する。更に別の関連実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも0.5 × 10<sup>6</sup>細胞/mLで接種される。

【0028】

別の実施形態において、組換えタンパク質を発現する宿主細胞は、無血清細胞培養培地中で培養される。別の関連実施形態において、無血清培養培地が灌流細胞培養培地である

10

20

30

40

50

。更に別の関連実施形態において、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。更に別の関連実施形態において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。

【0029】

別の実施形態において、組換えタンパク質は、糖タンパク質である。別の実施形態において、組換えタンパク質は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え融合タンパク質またはサイトカインからなる群から選択される。

【0030】

別の実施形態において、上記の方法は、宿主細胞によって産生された組換えタンパク質を回収する工程を更に含む。

【0031】

10

別の実施形態において、宿主細胞によって産生された組換えタンパク質は、精製され、薬学的に許容可能な製剤に製剤化される。

【0032】

別の実施形態において、上述の方法のいずれかによって産生された組換えタンパク質が提供される。関連実施形態において、組換えタンパク質は精製される。別の実施形態において、組換えタンパク質は、薬学的に許容可能な製剤に製剤化される。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】オルニチン代謝の概略。ARG：アルギナーゼ、AZ：アンチザイム、AZIN：アンチザイム阻害物質、P5C：ピロリン-5-カルボキシレート、ASP：アスパラギン酸、ORNNT：オルニチントラ\_nsポーター、GATM：グリシンアミジノトランスフェラーゼ、NOS：一酸化窒素シンターゼ、OAT：オルニチニアミノトランスフェラーゼ、ODC：オルニチンデカルボキシラーゼ、OTC：オルニチントラ\_nsカルバモイラーーゼ、SMS：スペルミン合成酵素、SRS：スペルミジン合成酵素。

20

【図2】高マンノースグリカン濃度に関係する代謝マーカとしてのオルニチンの特定。培地1（A）または培地2（B）で評価した、流加プロセスの8日目（D8、白色の棒）、9日目（D9、灰色の棒）及び10日目（D10、黒色の棒）に検出された、8つの異なる細胞株（細胞株A～H）から分泌された組換えモノクローナル抗体の高マンノースグリカン濃度（%HM）。高マンノースグリカン濃度と消費培地で検出された細胞外オルニチン量との間の相関関係（C）。8つの細胞株からの9日目の平均オルニチン量と高マンノースグリカン濃度を比較した。ピアソンのR値：R = 0.83。

30

【図3】高マンノース濃度と細胞外オルニチン量との間の相関関係：A）細胞株Hを8つの異なる産生条件（#1～#8）にさらして検出した高マンノースグリコフォーム含有量。B）対応する細胞外オルニチン相対量。C）高マンノースグリコフォーム含有量（%）と細胞外オルニチン相対量との間の相関関係。ピアソンのR値：R = 0.78。

【図4】8つの異なる細胞株から3、6、8、9及び10日目に収集した細胞沈澱物のアルギナーゼ1のmRNA相対発現量。対応する高マンノースグリコフォーム含有量とともに示す。

【図5】スペルミンテトラヒドロクロリドを0、7、17、35及び100μMの濃度で含む細胞培養培地中で増殖させた細胞によって発現された組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量。モック灌流アッセイの5日目にサンプルを収集した。35μMのサンプルを対照とした。

40

【図6】0、7、17、35及び100μMの濃度のスペルミンテトラヒドロクロリドにさらした細胞培養によって内因的に産生された細胞外オルニチン量（mg/L）。モック灌流アッセイの5日目にサンプルを収集した。35μMのサンプルを対照とした。

【図7】L-オルニチン-塩酸塩を0、0.6、6及び14.8mMの濃度で含む細胞培養培地中で増殖させた細胞によって発現された組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量。モック灌流アッセイの5日目にサンプルを収集した。0mMのサンプルを対照とした。

【図8】0.1g/LのL-オルニチン-塩酸塩を含む細胞培養培地（黒色の棒）または

50

外因的に添加したオルニチンを含まない対照細胞培養培地（白色の棒）で増殖させた細胞株「I」によって発現された組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量。

6、8及び12日目にサンプルを収集した。

【図9】アルギニン-塩酸塩を2.2、4.4、6.5、8.7及び17.5 mMの濃度で含む細胞培養培地中で増殖させた細胞によって発現された組換え糖タンパク質に関する高マンノースグリコフォーム含有量。8.7 mMのサンプルを対照とした。モック灌流アッセイの4日目にサンプルを収集した。

【図10】種々のアルギナーゼ阻害剤（1、10及び20 μMの濃度のBEC塩酸塩（BEC）、DL-，ジフルオロメチルオルニチン塩酸塩（DL-a）、NG-ヒドロキシ-L-アルギニン-酢酸塩（NG）及びN-ヒドロキシ-nor-アルギニン-酢酸塩（Nw））を追加した細胞培養培地中で増殖させた細胞によって発現された組換え糖タンパク質に関する高マンノースグリコフォーム含有量。対照には阻害剤を含めなかった。モック灌流アッセイの4日目にサンプルを収集した。

【図11】アルギナーゼ阻害剤であるBEC塩酸塩（BEC）を0.0、0.01及び0.5 mMの濃度で、DL-，ジフルオロメチルオルニチン塩酸塩（DL-a）を0.0、0.01、1.0及び2.0 mMの濃度で含む細胞培養培地中で増殖させた細胞によって発現された組換え糖タンパク質に関する高マンノースグリコフォーム含有量。モック灌流アッセイの4日目にサンプルを収集した。

【発明を実施するための形態】

【0034】

発現した組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量は、宿主細胞中のオルニチン蓄積の影響を受けることから、宿主細胞中のオルニチン代謝を調節することによって、これを操作できることが見出された。

【0035】

オルニチンは、尿素回路、ポリアミン合成及びアルギニン代謝に関与する、非タンパク質性非コードアミノ酸である。オルニチンはまた、オルニチン-アミノトランスフェラーゼ（OAT）活性を介したグルタミン酸及びプロリンの前駆体である（図1参照）。ヒトにおいて、OATの欠損は、網膜変性及び血中オルニチン蓄積を特徴とする障害である、脳回転状網膜脈絡膜萎縮（GA）を招く（Takki K et al., Br J Ophthalmol. 1974; 58(11): 907-16）。OAT欠損のマウスモデルでは、アルギニンを制限した食餌により、血中オルニチン濃度が減少し、網膜変性を防ぐことが示されている（Wang T et al., PNAS 2000; 97(3): 1224-1229）。オルニチンのプロレシンへの変換を触媒するオルニチンデカルボキシラーゼ（ODC）は、ポリアミン合成経路の律速酵素である（Pegg A, JBC. 2006; 281(21): 14529-14532）。ODCの合成及び安定性は、ポリアミントランスポーター活性と同じく、環境の浸透条件による影響を受ける（Munro G et al., BBA 1975; 411(2): 263-281; Tohyama et al., Eur J Biochem. 1991; 202(3): 1327-1331; Michel J et al., 1998; 329: 453-459）。植物中のポリアミン生合成の増加は、浸透圧ストレスへの耐性の増大と関連している（Alcazar R et al., Biotechnol Lett 2006; 28: 1867-1876）。オルニチンのシトルリンへの変換は、尿素回路の一部であり、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）によって触媒される。ヒトにおけるOTC欠損は、血中アンモニアの蓄積を引き起こす（Hopkins et al., Arch. Dis. Childh., 1969; 44: 143-148）。オルニチン代謝は、サイトゾルとミトコンドリアの両方で行われ、OTC及びOATがミトコンドリア内で起こる代謝ステップを触媒する。ミトコンドリアのオルニチントランスポーターORNNT1は、オルニチンのミトコンドリアへの取り込みに必要である。ヒトにおいて、ORNNT1の変異は、オルニチンとアンモニアの高血中濃度を特徴とする、高オルニチン血症-高アンモニア血症-ホモシトルリン尿（HHH）症候群の原因となる（Camac 30

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

6610

6611

6612

6613

6614

6615

6616

6617

6618

6619

6620

6621

6622

6623

6624

6625

6626

6627

6628

6629

6630

6631

6632

6633

6634

6635

6636

6637

6638

6639

6640

6641

6642

6643

6644

6645

6646

6647

6648

6649

6650

6651

6652

6653

6654

6655

6656

6657

6658

6659

6660

6661

6662

6663

6664

6665

6666

6667

6668

6669

66610

66611

66612

66613

66614

66615

66616

66617

66618

66619

66620

66621

66622

66623

66624

66625

66626

66627

66628

66629

66630

66631

66632

66633

66634

66635

66636

66637

66638

66639

66640

66641

66642

66643

66644

66645

66646

66647

66648

66649

66650

66651

66652

66653

66654

66655

66656

66657

66658

66659

66660

66661

66662

66663

66664

66665

66666

66667

66668

66669

666610

666611

666612

666613

666614

666615

666616

666617

666618

666619

666620

666621

666622

666623

666624

666625

666626

666627

666628

666629

666630

666631

666632

666633

666634

666635

666636

666637

666638

666639

666640

666641

666642

666643

666644

666645

666646

666647

666648

666649

666650

666651

666652

666653

666654

666655

666656

666657

666658

666659

666660

666661

666662

666663

666664

666665

666666

666667

666668

666669

6666610

6666611

6666612

6666613

6666614

6666615

6666616

6666617

6666618

6666619

6666620

6666621

6666622

6666623

6666624

6666625

6666626

6666627

6666628

6666629

6666630

6666631

6666632

6666633

6666634

6666635

6666636

6666637

6666638

6666639

6666640

6666641

6666642

6666643

6666644

6666645

6666646

6666647

6666648

6666649

6666650

6666651

6666652

6666653

6666654

6666655

6666656

6666657

6666658

6666659

6666660

6666661

6666662

6666663

6666664

6666665

6666666

6666667

6666668

6666669

66666610

66666611

66666612

66666613

66666614

66666615

66666616

66666617

66666618

66666619

66666620

66666621

66666622

66666623

66666624

66666625

66666626

66666627

66666628

66666629

66666630

66666631

66666632

66666633

66666634

66666635

66666636

66666637

66666638

66666639

66666640

66666641

66666642

66666643

66666644

66666645

66666646

66666647

66666648

66666649

66666650

66666651

66666652

66666653

66666654

66666655

66666656

66666657

66666658

66666659

66666660

66666661

66666662

66666663

66666664

66666665

66666666

66666667

66666668

66666669

666666610

666666611

666666612

666666613

666666614

666666615

666666616

666666617

666666618

666666619

666666620

666666621

666666622

666666623

666666624

666666625

666666626

666666627

666666628

666666629

666666630

666666631

666666632

666666633

666666634

666666635

666666636

666666637

666666638

666666639

666666640

666666641

666666642

666666643

666666644

666666645

666666646

666666647

666666648

666666649

666666650

666666651

666666652

666666653

666666654

666666655

666666656

666666657

666666658

666666659

666666660

666666661

666666662

666666663

666666664

666666665

666666666

666666667

666666668

666666669

6666666610

6666666611

6666666612

6666666613

6666666614

6666666615

6666666616

6666666617

6666666618

6666666619

<p

h o e t a l . , N a t G e n e t ( 1 9 9 9 ) ; 2 2 : 1 5 1 - 1 5 8 ) ; ( V a l l e D e t a l , 2 0 0 1 , 1 8 5 7 - 1 8 9 6 ) 。

【 0 0 3 6 】

本明細書に記載の通り、細胞培養培地中の細胞外オルニチン量を測定すると、宿主細胞中のオルニチン蓄積の程度は、発現した組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量と相關することが見出された。宿主細胞中のオルニチン代謝を調節することによって、高マンノース含有量の操作を達成することができた。本発明は、細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を、宿主細胞のオルニチン代謝を調節する条件下で培養することを含む、組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作するための方法を提供する。オルニチン代謝は、宿主細胞中のオルニチンの蓄積を減少または増加させることによって調節することができる。高マンノースグリコフォーム含有量が減少または増加した組換えタンパク質を產生するための方法であって、細胞培養にて組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することを含み、宿主細胞中のオルニチンの蓄積が調節される、方法が本明細書にて提供される。

【 0 0 3 7 】

オルニチン代謝とは、オルニチンの生合成、輸送、異化プロセス及び代謝変換に関与する、化学的または酵素的な反応及び経路を指す。尿素回路、ポリアミン合成、クレアチニン合成及びミトコンドリアのオルニチン異化経路は、オルニチン代謝の例である。概略を図1に示す。

【 0 0 3 8 】

宿主細胞中のオルニチン蓄積は、オルニチン代謝変化の帰結である。宿主細胞中のオルニチン蓄積の程度は、オルニチン代謝を調節することによって、加減することができる。細胞内の代謝産物量は、細胞外量（すなわち、細胞培養培地中で検出される量）に反映され得る。宿主細胞中のオルニチン蓄積の蓄積指標は、細胞培養培地中に分泌されたオルニチンの量を測定することによって判断することができる。本明細書に記載の通り、オルニチン量の経時的な増加が、外因性オルニチンを欠く細胞培養培地にて認められた。

【 0 0 3 9 】

「高マンノースグリコフォーム含有量」、「高マンノースグリカン濃度」及び「高マンノース種の濃度」は、同じ意味で用いられ、「HM」、「%HM」、「HMN」または「%HMN」という略字で示され、マンノース5 (Man5)、マンノース6 (Man6)、マンノース7 (Man7)、マンノース8 (Man8) 及びマンノース9 (Man9) の各グリカン種を合わせた相対的百分率を指す。

【 0 0 4 0 】

細胞培養培地中に分泌されたオルニチンの量が、細胞培養にて宿主細胞によって発現された組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量と相關することがわかった。アルギナーゼ阻害剤またはスペルミンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって、宿主細胞中のオルニチンの蓄積を減少させると、発現される糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量が減少した。オルニチンまたはアルギニンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって、宿主細胞中のオルニチン蓄積を増加させると、発現される糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量が増加した。

【 0 0 4 1 】

本発明は、アルギナーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって、宿主細胞中のオルニチン蓄積を調節するための方法を提供する。アルギニンは、オルニチンの代謝前駆体であり、アルギナーゼは、アルギニンのオルニチンへの変換を触媒する酵素である。種々の細胞株の代謝及び発現プロファイルを比較すると、アルギナーゼ mRNA発現レベルが、オルニチン蓄積量と相關することが観察された。アルギナーゼ活性をアルギナーゼ阻害剤で遮断すれば、オルニチン産生レベルをおそらく減少させることができるであろう。しかしながら、アルギナーゼ阻害剤の有効性は、細胞培養培地中の高濃度アルギニンによって損なわれる可能性がある。加えて、オルニチン蓄積に関与し得る、オルニチンの他の代謝前駆体（すなわち、グルタミン酸及びプロリン、図1参照）がある

10

20

30

40

50

。

## 【0042】

本明細書に記載の通り、アルギナーゼ阻害剤を細胞培養培地に添加することによって、培養した宿主細胞によって発現される組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を調整できることが見出された。アルギナーゼ活性を遮断すると、宿主細胞中のオルニチン産生量が減少し、発現される組換え糖タンパク質の高マンノースグリカン濃度が低下した。

## 【0043】

アルギナーゼはまた、オルニチントランスカルバモイラーゼ(OTC)を阻害する(Vissers et al., (1982) *J. Gen. Microbiol.* 128: 1235-1247)。アルギナーゼ活性を遮断すると、アルギニンからのオルニチン産生が減少するだけでなく、オルニチンをシトルリンに変換させるOTC活性の抑制を軽減し得ることから、オルニチン蓄積の更なる減少が可能となる(図1参照)。

## 【0044】

OTC欠損の患者では、アンモニア濃度が上昇する。高マンノースグリカン濃度の高い組換えタンパク質を発現する宿主細胞株中でアルギナーゼの発現または活性の上昇がOTC阻害を誘発する場合、これもまた、アンモニア濃度の上昇を招き得る。アンモニアの細胞内濃度の上昇は、ゴルジ装置内のpH勾配を変え、グリコシルトランスフェラーゼの準最適な再局在化を誘発する可能性があり、ゴルジ複合体での不完全なグリカン分岐により、高マンノースグリカン濃度がより高くなる。(Campbell et al., (1973) *NJM* 288(1): 1-6; Hopkins et al., (1969) *Archive of Disease in Childhood* 44(234): 143-148; Muhling et al., (2001) *Amino Acids* 21(3): 303-318; Park et al., (2000) *J. Biotech* nol 81(2): 129-140; Rivinoja et al., (2009) *J. Cell Physiol.* 220(1): 144-154及びAxelsson et al., (2001) *Glycobiology* 11(8): 633-644)。

。

## 【0045】

有用なアルギナーゼ阻害剤は、当該技術分野にて知られており、市販供給源から入手可能である。こうしたアルギナーゼ阻害剤には、BEC塩酸塩、DL-a-ジフルオロメチルオルニチン塩酸塩、N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニン及びN-a-ヒドロキシ-nor-アルギニンが挙げられる。一実施形態において、アルギナーゼ阻害剤は、BEC(S-(2-ボロノエチル)-1-システイン)またはDL-a-ジフルオロメチルオルニチンである。本発明の一実施形態では、アルギナーゼ阻害剤は、BEC(S-(2-ボロノエチル)-1-システイン)である。本発明の一実施形態では、アルギナーゼ阻害剤は、DL-a-ジフルオロメチルオルニチンである。

## 【0046】

アルギナーゼ阻害剤は、生産性に著しい影響を与えることなく、発現される組換えタンパク質の高マンノースグリカン濃度を減少させるために、少なくとも10 μMの濃度で細胞培養培地に添加することができる。一実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、10 μM～2 mMである。別の実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、10 μMである。別の実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、0.5 mMである。別の実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、1 mMである。別の実施形態において、アルギナーゼ阻害剤の濃度は、2 mMである。

## 【0047】

宿主細胞中のオルニチン蓄積はまた、以下の実施例にて記載するように、スペルミンを含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによっても調節することができる。オルニチンは、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)の作用を介して、ポリアミン経路及びポリアミンであるプトレシン、スペルミジン及びスペルミンの合成の起点である。外因的

10

20

30

40

50

に添加したスペルミンは、直接的にまたはアンチザイムを介して、ODCを不活性化するために用いることができる（図1参照）。ODCを不活性化すると、以下に記載するように、オルニチンの蓄積をもたらすことができる。外因的に添加するスペルミンの量を制限することによって、ODC活性の抑制を軽減することができ、オルニチンがポリアミン経路を介して代謝され得ることから、宿主細胞中の全体的なオルニチン蓄積が減少する。

【0048】

スペルミンは、生産性に著しい影響を与えることなく、発現される組換えタンパク質の高マンノースグリカン濃度を減少させるために、35 μM以下濃度で細胞培養培地に添加することができる。一実施形態において、スペルミンの濃度は、7 μM～35 μMである。一実施形態において、スペルミンの濃度は、17 μM～35 μMである。一実施形態において、スペルミンの濃度は、7 μM～17 μMである。別の実施形態において、スペルミンの濃度は、35 μMである。別の実施形態において、スペルミンの濃度は、17 μMである。別の実施形態において、スペルミンの濃度は、7 μMである。

10

【0049】

オルニチン代謝を調節するための別の方法は、オルニチンの蓄積を増加させることである。一実施形態において、本発明は、オルニチン、アルギニン、オルニチンデカルボキシラーゼ阻害剤、オルニチニアミノトランスフェラーゼ阻害剤、一酸化窒素シンターゼ阻害剤またはアルギニンデカルボキシラーゼ阻害剤を含む細胞培養培地中で宿主細胞を培養することによって、宿主細胞中のオルニチン蓄積を調節することを提供する。

20

【0050】

本明細書に記載の通り、条件細胞培養培地中の細胞外オルニチン量は、組換え糖タンパク質の高マンノースグリカン濃度と相関することがわかった。オルニチンを含む細胞培養培地中で組換えタンパク質を発現する宿主細胞を培養することによって、高マンノースグリカン濃度が増加した組換え糖タンパク質がもたらされることが見出された。

【0051】

上述の通り、細胞培養培地中のオルニチン蓄積は、オルニチン代謝の変化をおそらく反映するものであり、オルニチン代謝の欠損遺伝子（例えば、OTC欠損またはORNNT1変異）を有する患者に類似したアンモニアの蓄積をもたらし得る。高マンノース増加を誘発するアンモニアの細胞機序は知られていないが、ゴルジ中のpH勾配の変化により、グリコシルトランスフェラーゼの準最適な再局在化がもたらされる可能性が示唆されている。これらの変化は、グリカン分岐を完全なものにするグリコシリ化酵素の利用可能性を減らすことにつながり得、これにより高マンノースグリカン濃度がより高くなる。

30

【0052】

別の可能性は、オルニチン蓄積がレドックスホメオスタシスの乱れを誘発する可能性である（Zanatta et al., (2013) Life sciences 93 (4): 161-168）。オルニチンは、高マンノースと正の相関関係にあり、これは、高マンノースグリコフォーム含有量が細胞レドックス状態によって調節される可能性を示唆している。オルニチンは、脂質酸化反応の量を増大し得る。グリコシリ化を調節する酵素の多くが脂質膜結合であることから、オルニチン蓄積によって生じる脂質酸化反応の変化は、ゴルジ中及びER中のグリコシリ化調節酵素の完全性及び活性を変える可能性があり、これに続き、高マンノースグリコフォーム含有量に影響し得る。

40

【0053】

オルニチンは、生産性に著しい影響を与えることなく、発現される組換えタンパク質の高マンノースグリカン濃度を増加させるために、少なくとも0.6 mMの濃度で細胞培養培地に添加することができる。一実施形態では、オルニチンの濃度は、0.6 mM～14.8 mMである。一実施形態では、オルニチンの濃度は、6 mM～14.8 mMである。別の実施形態において、オルニチンの濃度は0.6 mMである。別の実施形態において、オルニチンの濃度は6 mMである。別の実施形態において、オルニチンの濃度は14.8 mMである。

【0054】

50

アルギニンは、オルニチンの代謝前駆体である。外因性アルギニンを含む細胞培養培地で培養した宿主細胞中で発現された組換えタンパク質では、高マンノースグリカン濃度が増加することが見出された。外因性アルギニンの量を増やすと、オルニチン合成に利用できる代謝前駆体が増加するため、宿主細胞中のオルニチン量が増加する。

#### 【0055】

本発明は、生産性に著しい影響を与えることなく、発現される組換えタンパク質の高マンノースグリカン濃度を増加させるために、アルギニンを少なくとも8.7 mMの濃度で添加することによって、宿主細胞中のオルニチン蓄積を調節することを提供する。一実施形態では、アルギニンの濃度は、8.7~17.5 mMである。別の実施形態において、アルギニンの濃度は、8.7 mMである。別の実施形態において、アルギニンの濃度は、17.5 mMである。10

#### 【0056】

オルニチン蓄積は、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)、オルニチニアミノトランスフェラーゼ(OAT)、一酸化窒素シンターゼ(NOS)またはアルギニンデカルボキシラーゼ(ADC)の阻害剤を細胞培養培地に添加することで調節することができ、これにより、宿主細胞中のオルニチン代謝及びオルニチンの蓄積を調節し、組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作する方法が提供される。

#### 【0057】

オルニチン蓄積は、ODC及びOATなどのオルニチン代謝酵素の活性を遮断することによって増加させることができる(図1参照)。D-ジフルオロメチルオルニチン(DFM)及びピペロニルブトキシド(PBO)などのODCに特異的な小分子阻害剤が市販されている。OATは、5-フルオロメチルオルニチン(5-FMOrn)Tによって遮断される(Daune et al., 1988, Biochem J. 253: 481-488)。本発明は、これらの阻害剤を細胞培養に追加して、宿主細胞中のオルニチン蓄積を増加させ、組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作することを提供する。20

#### 【0058】

オルニチン蓄積は、アルギニン蓄積を調節する酵素の活性を遮断することによって調節することができる(図1)。2-エチル-2-チオブソイド尿素及びN-ニトロ-L-アルギニン及びL<sup>G</sup>-モノメチル-L-アルギニンなどの小分子阻害剤による一酸化窒素シンターゼの活性の遮断、並びに/または非対称性ジメチル-アルギニン(ADMA)によるアルギニンデカルボキシラーゼ活性の遮断により、アルギニンからのオルニチン変換の流れを向上させることができる。本発明は、これらの阻害剤を細胞培養に追加して、宿主細胞中のオルニチン蓄積を増加させ、組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作することを提供する。30

#### 【0059】

本発明の一実施形態では、細胞培養培地が無血清細胞培養培地であるものが提供される。一実施形態において、細胞培養培地は灌流細胞培養培地である。

#### 【0060】

本明細書で使用するとき、「細胞培養用培地」(「培養培地」、「細胞培養培地」、「組織培養培地」ともいう)という用語は、細胞、例えば、動物細胞または哺乳動物細胞を増殖させるために使用する任意の栄養素溶液を指し、通常、エネルギー供給源(通常、グルコースなどの炭水化物の形態)；全必須アミノ酸のうちの1つまたは複数、及び通常20の基本アミノ酸、加えてシスティン；ビタミン及び/または通常低濃度で必要とされる他の有機化合物；脂質または遊離脂肪酸；並びに微量元素、例えば、通常極めて低濃度(通常マイクロモル範囲)で必要とされる無機化合物または天然元素の少なくとも1つまたは複数の成分を提供する。40

#### 【0061】

栄養素溶液は、細胞の増殖を最適化するために、所望により、追加成分、例えば、ホルモン及び他の成長因子(例えば、インスリン、トランスフェリン、上皮成長因子、血清な50

ど)、塩(例えば、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩など)、並びに緩衝剤(例えば、H E P E S)、ヌクレオシド及び塩基(例えば、アデノシン、チミジン、ヒポキサンチン)、並びにタンパク質及び組織加水分解物(例えば、加水分解した動物タンパク質(動物性副産物、精製ゼラチンまたは植物性原料から得ることができるペプトンまたはペプトン混合物))、抗生物質(例えば、ゲンタマイシン)、細胞保護剤または界面活性剤(例えば、P l u r o n i c(登録商標)F 6 8)、ポリアミン(例えば、プロレシン、スペルミジンまたはスペルミン(例えば、国際公開第2008/154014号を参照))、並びにピルビン酸(例えば、米国特許第8053238号を参照)を培養する細胞の要件及び/または所望の細胞培養パラメータに応じて補充してもよい。

## 【0062】

10

細胞培養培地には、任意の細胞培養プロセス、例えば、限定するものではないが、細胞の回分培養、拡大回分培養、流加培養及び/または灌流もしくは連続培養で通常使用されるもの、及び/または使用することが知られているものが挙げられる。

## 【0063】

細胞培養培地の構成成分は、完全に粉碎して粉末培地配合物にしてもよく、必要に応じて、液体サプリメントを細胞培養培地に添加して部分的に粉碎してもよく、あるいは栄養素は、完全に液体形状で細胞培養に添加してもよい。

## 【0064】

「基礎」(またはバッチ)細胞培養培地は、通常、細胞培養を開始するために使用され、細胞培養の維持を十分に達成する細胞培養培地を指す。

20

## 【0065】

「増殖」細胞培養培地は、通常、指數関数的な増殖の期間、すなわち「増殖期」中の細胞培養に用いられ、当該期における細胞培養の維持を十分に達成する細胞培養培地を指す。増殖細胞培養培地はまた、宿主細胞株に組み込んだ選択マーカーに対する耐性または生存性を付与する選択剤を含み得る。このような選択剤には、ジェネティシン(G 4 1 1 8)、ネオマイシン、ハイグロマイシンB、ピューロマイシン、ゼオシン、メチオニンスルホキシイミン、メトトレキサート、グルタミン不含細胞培養培地、グリシン、ヒポキサンチン及びチミジンまたはチミジンのみを欠く細胞培養培地が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0066】

30

「產生」細胞培養培地は、通常、指數関数的な増殖が終了し、タンパク質產生が優勢となる移行期中及び產生期中の細胞培養に用いられ、これらの期中における所望の細胞密度、生存率及び/または生成物の力価の維持を十分に達成する細胞培養培地を指す。

## 【0067】

「灌流」細胞培養培地は、通常、灌流または連続培養法によって維持される細胞培養に使用され、本プロセス中における細胞培養の維持を十分に達成する細胞培養培地を指す。灌流細胞培養培地の配合物は、消費培地の除去に用いる方法に適するように、基礎細胞培養培地の配合物よりも、濃縮したものでも、高濃度にしたものでもよい。灌流細胞培養培地は、増殖期と產生期の両方の期間中に使用することができる。

## 【0068】

40

高濃度細胞培養培地は、細胞培養を維持するために必要な栄養素のいくつかまたは全てを含み得、特に、高濃度培地は、細胞培養の產生期の経過中に消費されることが特定されている、または消費されることが知られている栄養素を含み得る。高濃度培地は、ほぼあらゆる細胞培養培地の配合をベースにすることができる。このような高濃度フィード培地は、細胞培養培地の一部または全ての要素を、その通常量の、例えば、約2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、12倍、14倍、16倍、20倍、30倍、50倍、100倍、200倍、400倍、600倍、800倍または更に約1000倍で含み得る。

## 【0069】

細胞培養物には、細胞培養中に形成が困難であり得るまたは急速に枯渇する特定の栄養

50

素を別個の濃縮フィードで追加することができる。このような栄養素は、チロシン、システイン及び／またはシスチンなどのアミノ酸であり得る（例えば、国際公開第2012/145682号を参照）。一実施形態において、チロシンを含む細胞培養培地で増殖した細胞培養物に、細胞培養中のチロシン濃度が8mMを超えないように、チロシンの濃縮溶液を個別に供給する。別の実施形態において、チロシン、シスチンまたはシステインを欠く細胞培養培地中で増殖している細胞培養物に、チロシン及びシスチンの濃縮溶液を個別に供給する。個別フィードは、産生期の前、またはその開始時に始めることができる。個別フィードは、濃縮フィード培地として、同じ日または異なる日に、細胞培養培地への追加により実施することができる。個別フィードは、灌流培地として、同じ日または異なる日に、灌流してもよい。

10

#### 【0070】

細胞培養培地は、特定の実施形態において、無血清であるか、及び／または動物由来の生成物もしくは成分を含まない。細胞培養培地は、特定の実施形態において、化学的に既定されており、化学成分の全てがわかっているものである。

#### 【0071】

動物細胞または哺乳動物細胞は、培養する特定の細胞に適した培地中で培養され、過度な実験をすることなく、当業者によって決定され得ることは、実務者に理解される通りである。市販の培地を用いることができ、これらには、イスコフ改変ダルベッコ培地、RPMI 1640、最小必須培地-（MEM-）、ダルベッコ改変イーグル培地（DME）、DME/F12、MEM、イーグル基礎培地（アールBSS含有）、D MEM高グルコース（グルタミン含有）、D MEM高グルコース（グルタミン不含）、D MEM低グルコース（グルタミン不含）、D MEM:F12 1:1（グルタミン含有）、GMEM（グラスゴーMEM）、GMEM（グルタミン含有）、グレース完全昆虫培地、グレース昆虫培地（FBS不含）、ハムF-10（グルタミン含有）、ハムF-12（グルタミン含有）、IMDM（HEPES及びグルタミン含有）、IMDM（HEPES含有グルタミン不含）、IP41昆虫培地、15（リーボビツ）（2X）（グルタミン、フェノールレッド不含）、15（リーボビツ）（グルタミン不含）、マッコイ5A改変培地、199培地、MEMイーグル（グルタミン、フェノールレッド不含）（2X）、MEMイーグル-アールBSS（グルタミン含有）、MEMイーグル-アールBSS（グルタミン不含）、MEMイーグル-ハンクスBSS（グルタミン不含）、NCTC-109（グルタミン含有）、リヒターCM培地（グルタミン含有）、RPMI 1640（HEPES、グルタミン及び／またはペニシリン-ストレプトマイシン含有）、RPMI 1640（グルタミン含有）、RPMI 1640（グルタミン不含）、シュナイダー昆虫培地または特定の細胞種向けに配合されている当業者に知られている任意の他の培地が挙げられるが、これらに限定されない。上記の例示的な培地には、必要に応じてまたは希望に応じて、任意要素を含めた補充要素または補充成分を適切な濃度または量で添加することができ、これについては当業者に周知であり、慣用的手法によって実施される。

20

#### 【0072】

本発明の一実施形態では、宿主細胞が哺乳動物細胞であるものが提供される。一実施形態において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。

30

#### 【0073】

本明細書で使用する細胞株（「宿主細胞」ともいう）は、商業的または化学的な関心の対象となるポリペプチドを発現するように遺伝子操作される。細胞株は、通常、培養にて時間に制限なく維持することができる、一次培養から生じる系統に由来する。これらの細胞は、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染または注入を介して導入されたプラスミドなどの発現ベクター（構築物）を含み得、発現ベクターは、培養プロセスでの発現及び産生に関するタンパク質をコードするコード配列またはその一部を包含する。このような発現ベクターは、挿入されたコード配列の転写及び翻訳のために必要な要素を含んでいる。産生されるタンパク質及びポリペプチド並びに適切な転写及び翻訳制御エレメントをコードする配列を含む発現ベクターを構築するには、当業者によく知られている方法

40

50

及び当業者によって実施されている方法を用いることができる。これらの方法には、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術及びインビオでの遺伝子組換えが挙げられる。このような技術については、J. Sambrook et al., 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> edition Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (または旧版のいずれか); F.M. Ausubel et al., 2013, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y (または旧版のいずれか); Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990に記載されており、これらの全てをあらゆる目的のために本明細書に援用する。 10

#### 【0074】

動物細胞、哺乳動物細胞、培養細胞、動物または哺乳動物宿主細胞、宿主細胞、組換え細胞、組換え宿主細胞などは全て、本発明のプロセスに従って培養することができる細胞に関する用語である。このような細胞は、通常、哺乳動物から得たまたは哺乳動物に由来する細胞株であり、適切な栄養素及び／または本明細書に記載のものなどの他の要素を含有する培地中での単層培養または浮遊培養のいずれかに置いた場合、増殖し生存することができる。細胞は、通常、タンパク質を発現し分泌できる細胞、または大量の特定タンパク質、より詳細には、目的とする糖タンパク質を培養培地中に発現し分泌するように分子的に操作することができる細胞が選択される。宿主細胞によって產生されるタンパク質は、宿主細胞にとって内因性または相同であり得ることは理解される。あるいは、タンパク質は、宿主細胞にとって異種、すなわち外来であり、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）宿主細胞によって產生し分泌されるヒトタンパク質である。更に、哺乳動物タンパク質、すなわち元々は哺乳動物生物から得たまたは哺乳動物生物に由来するタンパク質が、本開示の方法によって得られ、細胞によって培養培地中に分泌され得る。 20

#### 【0075】

本発明の方法は、種々の細胞の培養に用いることができる。一実施形態において、培養細胞は、植物及び／または動物細胞などの真核細胞である。細胞は、哺乳動物細胞、魚類細胞、昆虫細胞、両生類細胞または鳥類細胞であってよい。培養での増殖に適した多種多様な哺乳動物細胞株が米国培養細胞系統保存機関（Manassas, Va.）及び他の寄託機関並びに販売業者から入手可能である。本発明のプロセスにて用いることができる細胞には、MK2.7細胞、PER-C6細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、例えばCHO-K1（ATCC CCL-61）、DG44（Chasin et al., 1986, Som. Cell Molec. Genet., 12: 555-556; Kolkekar et al., 1997, Biochemistry, 36: 10901-10909及びWO01/92337A2）、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損CHO細胞（CHO/-DHFR、Ur laub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216）及びdp12. CHO細胞（米国特許第5,721,121号）など；サル腎臓細胞（CV1、ATCCCCCL-70）；SV40で形質転換したサル腎臓CV1細胞（COS細胞、COS-7、ATCC CCL-1651）；HEK293細胞及びSp2/0細胞、5L8ハイブリドーマ細胞、Daudi細胞、EL4細胞、HeLa細胞、HL-60細胞、K562細胞、Jurkat細胞、THP-1細胞、Sp2/0細胞、初代上皮細胞（例えば、ケラチノサイト、子宮頸部上皮細胞、気管支上皮細胞、気管上皮細胞、腎臓上皮細胞及び網膜上皮細胞）並びに樹立細胞系及びそれらの細胞株（例えば、ヒト胚腎臓細胞（例えば、293細胞または浮遊培養での増殖用にサブクローニングした293細胞、Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36: 59）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCCCCL-10）；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather, 1980, Biol. Reprod., 23: 243-251）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCCCCL-2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCCCCL-34）；ヒト肺細 40 50

胞 (W138、ATCCCL-75)；ヒトヘパトーマ細胞 (HEP-G2、HB8065)；マウス乳腺癌細胞 (MMT060562、ATCCCL-51)；バッファローラット肝臓細胞 (BRL3A、ATCCCL-1442)；TRI細胞 (Mathew, 1982, Annals NY Acad. Sci., 383: 44-68)；MCR5細胞；FS4細胞；PER-C6網膜細胞、MDBK (NBL-1) 細胞、911細胞、CRFK細胞、MDCK細胞、BeWo細胞、Chang細胞、Detroit 562細胞、HeLa 229細胞、HeLa S3細胞、Hep-2細胞、KB細胞、LS180細胞、LS174T細胞、NCI-H-548細胞、RPMI 2650細胞、SW-13細胞、T24細胞、WI-28VA13、2RA細胞、WISH細胞、BS-C-I細胞、LLC-MK<sub>2</sub>細胞、Clone M-3細胞、1-10細胞、RAG細胞、TCMK-1細胞、Y-1細胞、LLC-PK<sub>1</sub>細胞、PK(15)細胞、GH<sub>1</sub>細胞、GH<sub>3</sub>細胞、L2細胞、LLC-RC256細胞、MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub>細胞、XC細胞、MDOK細胞、VSW細胞、及びTH-I、B1細胞、またはこれらの誘導体)、任意の組織または器官(限定するものではないが、心臓、肝臓、腎臓、結腸、小腸、食道、胃、神経組織(脳、脊髄)、肺、血管組織(動脈、静脈、毛細血管)、リンパ組織(リンパ腺、アデノイド、扁桃腺、骨髄及び血液)、脾臓に由来する線維芽細胞、線維芽細胞株及び線維芽細胞様細胞株(例えば、TRG-2細胞、IMR-33細胞、Don細胞、GHK-21細胞、シリルリン血症細胞、Dempsey細胞、Detroit 551細胞、Detroit 510細胞、Detroit 525細胞、Detroit 529細胞、Detroit 532細胞、Detroit 539細胞、Detroit 548細胞、Detroit 573細胞、HEL299細胞、IMR-90細胞、MRC-5細胞、WI-38細胞、WI-26細胞、MICL<sub>1</sub>細胞、CV-1細胞、COS-1細胞、COS-3細胞、COS-7細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCCCL-1587；VERO、ATCCCL-81)；DBS-FrhL-2細胞、BALB/3T3細胞、F9細胞、SV-T2細胞、M-MSV-BALB/3T3細胞、K-BALB細胞、BLO-11細胞、NOR-10細胞、C<sub>3</sub>H/IOTI/2細胞、HS DM<sub>1</sub>C<sub>3</sub>細胞、KLN205細胞、McCoy細胞、マウスL細胞、2071株(マウスL)細胞、L-M株(マウスL)細胞、L-MTK(マウスL)細胞、NCTCクローン2472及び2555、SCC-PSA1細胞、Swiss/3T3細胞、インドキヨン細胞、SIRC細胞、C<sub>1</sub>I細胞及びJensen細胞またはこれらの誘導体)または当業者に知られている任意の他の細胞種が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0076】

細胞は、付着培養、単層培養または浮遊培養、トランスフェクション及びタンパク質(例えば、抗体)の発現に適し得る。細胞は、回分培養、流加培養及び灌流培養または連続培養の各方法で用いることができる。

#### 【0077】

本発明の一実施形態では、組換えタンパク質を発現する宿主細胞は、バイオリアクター内で培養される。本発明の別の実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも500Lの容量を有する。関連実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも500L～2000Lの容量を有する。更に別の関連実施形態において、バイオリアクターは、少なくとも1000L～2000Lの容量を有する。本発明の一実施形態では、細胞培養は、バイオリアクターに無血清培養培地中少なくとも $0.5 \times 10^6$ 細胞/mLを接種することによって確立される。一実施形態において、本発明は、宿主細胞によって産生された組換えタンパク質を回収する工程を更に含む。一実施形態において、本発明は、宿主細胞によって産生された組換えタンパク質が、精製され、薬学的に許容可能な製剤に製剤化されることを提供する。

#### 【0078】

限定するものではないが、理解のために、タンパク質産生のための細胞培養及び培養工程には、3つの一般的種類、すなわち、回分培養、拡大回分・流加培養、灌流培養またはこれらの組み合わせを含み得ることは当業者であれば理解するであろう。回分培養におい

10

20

30

40

50

て、細胞は最初培地中で培養され、この培地は除去も、交換も、追加もされない。すなわち、細胞には、培養工程中または終了前に、新鮮な培地が「供給」されない。所望の生成物は、培養工程の終了時に回収される。

#### 【0079】

流加培養では、工程中に、新鮮な培地を1日に1回またはそれ以上（または連続的に）培養培地に追加することにより、培養工程時間が延長される。すなわち、細胞には、培養行程中に新しい培地が「供給（フィード）」される（「フィード培地」）。流加培養は、種々の供給計画及び上述した回数、例えば、毎日、1日おき、2日おきなど、1日に1回以上、または1日に1回未満などを伴い得る。更に、流加培養では、フィード培地を連続的に供給することができる。次いで、所望の生成物を培養／產生工程の終了時に回収する。

10

#### 【0080】

灌流培養は、細胞培養物に新鮮な灌流培地が供給され、消費培地が除去されるものである。細胞培養物への新鮮な培地の灌流及び消費培地の除去は、連続的、段階的、断続的またはこれらのうちのいずれかもしくは全ての組み合わせであってよい。灌流速度は、1日当たり1.0作業容量未満から1日当たり複数作業容量までの範囲であり得る。好ましくは、細胞は、培養物中に保持され、除去される消費培地は、細胞を実質的に含まないか、または培養物中の細胞よりもはるかに少ない細胞を含む。細胞培養によって発現された組換えタンパク質も同様に培養物中に保持され得、消費培地とともに除去されることがある。消費培地の除去は、遠心分離、沈殿または濾過を含む多数の手段によって実施することができる。例えば、Voisard et al. (2003), Biotechnology and Bioengineering 82: 751-65を参照されたい。好ましい濾過方法は、交互接線流濾過である。交互接線流は、ATF装置を用いて中空糸フィルタモジュールを介して培地を吸い上げることによって維持される。例えば、米国特許第6,544,424号; Furley (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63を参照されたい。このフィルタにより、大きさまたは分子量に基づいて粒子が分離される。フィルタは、用途に応じて、孔径または分画分子量（MWCO）値に基づいて選択することができる。フィルタには、膜フィルタ、セラミックフィルタ及び金属フィルタが挙げられ、スパイラル形もしくは管状またはシート形状を含む、任意の形状であってよい。

20

#### 【0081】

「灌流流量」という用語は、バイオリアクターを通過する（添加及び除去される）培地の量を指し、通常、所与の時間内における一部または複数の作業容量で表される。「作業容量」とは、細胞培養に使用するバイオリアクター容量の量を指す。一実施形態では、灌流流量は、1日当たり1作業容量以下である。

30

#### 【0082】

細胞培養は、動物または哺乳動物の細胞培養のために通常用いられる培養容器及び/または培養装置を使用して、組換えタンパク質の小規模產生から大規模產生までの条件下で、実施することができる。組織培養皿、Tフラスコ及びスピナーフラスコが実験室ベンチ規模で使用されるものであることは、当業者に理解される通りである。大規模装置での培養に関しては、限定するものではないが、発酵型タンク培養装置、エアリフト型培養装置、流動床バイオリアクター、中空糸バイオリアクター、ローラーボトル培養、攪拌タンクバイオリアクターシステム、充填層型培養装置及び使い捨てバッグまたは当業者に知られた任意の他の好適な装置を用いることができる。ローラーボトルまたは攪拌タンクバイオリアクターシステムとともに、マイクロキャリアを用いてもよいし、用いなくてもよい。これらのシステムは、回分、流加または灌流／連続モードで操作され得る。加えて、培養装置またはシステムは、フィルタ、重力、遠心力などを用いる細胞分離装置などの追加の装置を備えてよい。

40

#### 【0083】

組換えタンパク質の產生は、多段階培養プロセスにて行うことができる。多段階プロセ

50

スでは、2つまたはそれ以上の異なる段階で細胞を培養する。例えば、最初に、細胞増殖及び生存率を最大化する環境条件下での1つ以上の増殖期にて細胞を培養し、次いで、タンパク質産生を最大化する条件下での産生期に移行する。哺乳動物細胞による組換えタンパク質の産生ための商業的プロセスでは、最終産生培養に先立って、異なる培養容器（N - x ~ N - 1）内で生じる複数の増殖期、例えば、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の増殖期が存在する。増殖期及び産生期は、1つ以上の移行期が先行してもよいし、移行期によって分けられてもよい。産生期は、大規模に行うことができる。

#### 【0084】

細胞培養の「増殖期」という用語は、指數関数的な細胞増殖の時期（すなわち、対数期）を指し、この時期には、通常、細胞が急速に分裂する。細胞は、約1日、約2日、約3日もしくは約4日または4日より長い期間、増殖期に維持される。細胞を増殖期に維持する期間は、例えば、細胞種、細胞の増殖速度及び細胞条件に基づいて変動する。

#### 【0085】

「移行期」という用語は、増殖期と産生期との間の期間を指す。一般に、移行期は、増殖期から産生期へのシフトを助けるように培養条件が制御され得る時である。制御され得る種々の細胞培養パラメータには、温度、オスモル濃度、ビタミン、アミノ酸、糖、ペプトン、アンモニウム及び塩のうちの1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0086】

細胞培養の「産生期」という用語は、細胞増殖が横這いになる時期を指す。対数的な細胞増殖は、通常、この期の前または間に終わり、タンパク質産生が優勢になる。流加及び灌流細胞培養プロセスは、この段階における所望の細胞密度、生存率及び生成物の力価を達成し維持するために、細胞培養培地を追加するか、新鮮な培地を供給する。産生期は、大規模に行うことができる。大規模細胞培養は、少なくとも約100、500、1000、2000、3000、5000、7000、8000、10,000、15,000、20,000リットルの容量を維持することができる。好ましい実施形態において、産生期は、500L、1000L及び/または2000Lのバイオリアクターで実施される。

#### 【0087】

通常、最終産生培養の前の細胞培養物は、2つの先行期であるシードトレインと接種トレインを経る。シードトレイン期（N - X）は、小規模に生じ、細胞は数の上で急速に増大する。接種物トレイン期（N - 1）には、細胞は更に増大して、産生バイオリアクターのための接種物、例えば、少なくとも $0.5 \times 10^6$ 細胞 / mLの接種物を生成する。シード及びN - 1トレインは、任意の培養方法、通常、回分細胞培養によって生じさせることができる。 $15 \times 10^6$ 細胞 / mLを上回るN - 1細胞密度が産生バイオリアクターの播種に一般的である。N - 1細胞密度がより高いと、産生バイオリアクターで所望の細胞密度に至るのに必要な時間を減少させるか、または更に省くことができる。N - 1よりも高い細胞密度を達成する好ましい方法は、交互接線流濾過を用いる灌流培養である。交互接線流濾過を用いる灌流プロセス手段によって増殖したN - 1細胞培養物は、任意の所望の密度、例えば $90 \times 10^6$ 細胞 / mLまたはそれ以上の密度の細胞をもたらし得る。N - 1細胞培養物は、単一ボーラス接種培養株を生成するために使用してもよいし、または複数の産生バイオリアクターに接種するために維持されるローリングシード保存培養株として用いることもできる。接種密度は、産生される組換えタンパク質の量に正の影響を与える。産生量は、接種密度が増加するに伴って増加する傾向にある。力価の改善は、より高い接種密度に関係するだけでなく、産生状態に置かれる細胞の代謝状態及び細胞サイクル状態による影響を受ける可能性がある。

#### 【0088】

「細胞密度」という用語は、培養培地の所与の容積中の細胞数を指す。「生細胞密度」は、標準的な生存率アッセイ（トリパンブルー色素排除法など）によって特定される、培養培地の所与の容積中の生細胞の数を指す。「パック細胞容積」（PCV）という用語は

10

20

30

40

50

、「パーセントパック細胞容積」(% P C V)ともいい、細胞培養物の全容積に対して細胞が占める容積の比率であり、百分率で表される(Stettler, et al., (2006) Biotechnol Bioeng. Dec 20: 95 (6): 1228-33 参照)。パック細胞容積は、細胞密度と細胞直径の関数であり、パック細胞容積の増加は、細胞密度もしくは細胞直径のいずれかまたはその両方の増加から生じ得る。パック細胞容積は、細胞培養物中の固形分量の測定値である。

#### 【0089】

產生中、増殖期は、產生期よりも高い温度で生じ得る。例えば、増殖期は、約35～約38の第1の温度設定点で生じ得、產生期は、約29～約37、任意に約30～約36または約30～約34の第2の温度設定点で生じ得る。

10

#### 【0090】

加えて、カフェイン、酪酸塩及び/またはヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)などのタンパク質產生の化学誘導物質を温度変化と同時にまたはその前またはその後に添加してよい。誘導物質が温度変化の後に添加される場合、温度変化から1時間～5日後、任意に温度変化から1～2日後に添加することができる。細胞培養は、細胞が所望のタンパク質を產生する間、数日または更に数週間、維持され得る。

#### 【0091】

細胞を所望の生理学的状態に維持するための別 の方法は、細胞培養物をL-アスパラギン条件にさらすことにより細胞増殖停止を誘発することである(例えば国際公開第2013/006479号を参照)。細胞増殖停止は、限界濃度のL-アスパラギンを含む培養培地を介して、かつ細胞培養にてL-アスパラギン濃度を低く維持することで、達成及び維持され得る。L-アスパラギンの濃度を5mM以下に維持することを用いることで、細胞を増殖停止状態に維持することができ、これにより生産性が向上する。

20

#### 【0092】

細胞サイクルの進行並びに細胞サイクルに関連する転写、DNA修復、分化、老化及びアポトーシスの関連プロセスを制御することが知られているまたはそう考えられている化合物である、細胞サイクル阻害剤もまた、細胞増殖停止を誘発するのに有用である。サイクリン依存性キナーゼ(CDK)などのサイクル機構と相互作用する細胞サイクル阻害剤が有用であり、他の経路からのタンパク質(例えばAKT、mTOR)及び細胞サイクルに直接的または間接的に影響する他の経路からのタンパク質と相互作用する分子も同様である。

30

#### 【0093】

本発明の方法に適した細胞培養条件は、細胞の回分培養、流加培養もしくは灌流(連続)培養またはこれら の方法の任意の組み合わせに通常用いられる周知のものであり、pH、溶存酸素(O<sub>2</sub>)及び二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)、攪拌並びに湿度及び温度に注意を払う。

#### 【0094】

本発明の方法は、目的とする組換えタンパク質を発現する細胞を培養するために用いることができる。発現された組換えタンパク質は、培養培地中に分泌され得、そこから回収及び/または収集することができる。加えて、タンパク質は、当該培養物または成分から(例えば、培養培地から)既知のプロセス並びに当該技術分野にて知られた及び/または販売業者から入手可能な製品を用いて、精製または部分的に精製することができる。次いで、精製したタンパク質を「製剤化」することができる。これは、薬学的に許容可能な製剤へと緩衝液が交換され、滅菌され、バルク包装され、かつ/または最終ユーザ向けに包装されることを意味する。薬学的に許容可能な製剤は、希釈剤、担体、溶解剤、乳化剤、保存料及び/または補助剤を含み得る。薬学的に許容可能な製剤の調製は、当業者の技術範囲内であり、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. 1995, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載のものなどが挙げられる。

40

#### 【0095】

本発明の一実施形態では、組換えタンパク質が糖タンパク質であるものが提供される。

50

本発明の一実施形態では、組換えタンパク質がヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え融合タンパク質またはサイトカインからなる群から選択されるものが提供される。また、本発明の方法によって產生される、組換えタンパク質も提供される。一実施形態において、組換えタンパク質は、薬学的に許容可能な製剤に製剤化される。

【0096】

本明細書で使用するとき、「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書を通じて同じ意味で用いられ、ペプチド結合によって互いに連結された2つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含む分子を指す。ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質はまた、修飾を含み得、これらには、限定するものではないが、糖タンパク質をもたらすグリコシル化、脂質付加、硫酸化、グルタミン酸残基の -カルボキシル化、ヒドロキシル化及びADPリボース化が挙げられる。

10

【0097】

本明細書で使用するとき、「糖タンパク質」という用語は、抗体を含むペプチド及びタンパク質であって、少なくとも1つのオリゴ糖側鎖（マンノース残基を含む）を有するものを指す。糖タンパク質は、宿主細胞に対して相同であってもよいし、使用する宿主細胞に対して異種、すなわち外来であってもよい。例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）宿主細胞によって產生されるヒト糖タンパク質である。このような糖タンパク質は、通常、「組換え糖タンパク質」と呼ばれる。ある特定の実施形態において、宿主細胞によって発現される糖タンパク質は、直接培地中に分泌される。

【0098】

20

タンパク質は、タンパク質系薬物を含む、科学的または商業的な関心対象であり得る。タンパク質には、とりわけ、抗体、融合タンパク質及びサイトカインが挙げられる。ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質は、細胞培養法を用いて組換え動物細胞株によって產生することができ、「組換えペプチド」、「組換えポリペプチド」及び「組換えタンパク質」と呼ぶことがある。発現するタンパク質は、細胞内で產生され得るか、または培養培地中に分泌され得、そこから回収及び／または収集することができる。

【0099】

本発明の方法によって有利に產生させることができ可能な哺乳動物タンパク質の非限定的な例としては、腫瘍壞死因子（TNF）、f1t3リガンド（WO 94/28391）、エリスロポエチン、トロンボポエチン、カルシトニン、IL-2、アンジオポエチン-2（Maisonneuve et al. (1997), Science 277 (5322): 55-60）、NF-B活性化受容体リガンド（RANKL, WO 01/36637）、腫瘍壞死因子（TNF）関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL, WO 97/01633）、胸腺間質由来リンホポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、豪州特許第588819号）、マスト細胞増殖因子、幹細胞増殖因子（米国特許第6,204,363号）、上皮成長因子、ケラチノサイト成長因子、巨核球成長発達因子、RANTES、ヒトフィブリノゲン様2タンパク質（FGL2；NCBI受託番号NM\_00682；Rueegg and Pytel (1995), Gene 160: 257-62）成長ホルモン、インスリン、インスリノトロピン、インスリン様成長因子、副甲状腺ホルモン、-インターフェロン、-インターフェロン及びコンセンサスインターフェロンを含むインターフェロン（米国特許第4,695,623号及び同第4,897471号）、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、シナプトタグミン様タンパク質（SLP-1-5）、ニューロトロフィン-3、グルカゴン、インターロイキン、コロニー刺激因子、リンフォトキシン-、白血病抑制因子及びオンコスタチン-Mのタンパク質のうちの1つの全てまたは一部と同一であるか、または実質的に類似したアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。本発明の方法に従って產生することができるタンパク質の説明については、例えば、Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, all volumes (Aggarwal and Guttermann, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1

30

40

50

998) ; *Growth Factors: A Practical Approach* (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993) ; 及び *The Cytokine Handbook*, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 2003) に認められ得る。

#### 【0100】

更に、本発明の方法は、上記のタンパク質のいずれかの受容体、かかる受容体もしくは上記のタンパク質のいずれかに対する拮抗物質のアミノ酸配列の全てもしくは一部を含むタンパク質、及び／またはかかる受容体もしくは拮抗物質に実質的に類似したタンパク質を產生するのに有用であり得る。これらの受容体及び拮抗物質には、腫瘍壞死因子受容体の両形態 (TNFR、p55 及び p75 とも呼ばれる、米国特許第 5,395,760 号及び米国特許第 5,610,279 号)、インターロイキン-1 (IL-1) 受容体 (I 型及び II 型；欧州特許第 0460846 号、米国特許第 4,968,607 号及び米国特許第 5,767,064 号)、IL-1 受容体アンタゴニスト (米国特許第 6,337,072 号)、IL-1 アンタゴニストまたは抑制剤 (米国特許第 5,981,713 号、同第 6,096,728 号及び同第 5,075,222 号)、IL-2 受容体、IL-4 受容体 (欧州特許第 0367566 号及び米国特許第 5,856,296 号)、IL-15 受容体、IL-17 受容体、IL-18 受容体、Fc 受容体、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子受容体、顆粒球コロニー刺激因子受容体、オンコスタチン - M 及び白血病抑制因子の受容体、NF-B 活性化受容体 (RANK、WO 01/36637 及び米国特許第 6,271,349 号)、オステオプロテグリン (米国特許第 6,015,938 号)、TRAIL 受容体 (TRAIL 受容体 1、2、3 及び 4 を含む) 並びに Fas またはアポトーシス誘導受容体 (AIR) などの死ドメインを含む受容体が挙げられる。

#### 【0101】

本発明を用いて產生することができる他のタンパク質には、分化抗原 (CD タンパク質とも呼ばれる) もしくはこれらのリガンドのアミノ酸配列の全てもしくは一部を含むタンパク質、またはこれらのいずれかに実質的に類似したタンパク質が挙げられる。このような抗原については、*Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996)* に開示されている。類似の CD タンパク質については、後続のワークショップで開示されている。このような抗原の例には、CD22、CD27、CD30、CD39、CD40 及びこれらに対するリガンド (CD27 リガンド、CD30 リガンドなど) が挙げられる。CD 抗原のいくつかは、TNF 受容体ファミリーのメンバーであり、41BB 及び OX40 も含み得る。リガンドは、41BB リガンド及び OX40 リガンドがそうであるように、TNF ファミリーのメンバーであることが多い。

#### 【0102】

酵素活性タンパク質またはこれらのリガンドを、本発明を用いて產生することができる。例としては、TNF-α 変換酵素を含む、ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメインファミリーメンバー、種々のキナーゼ、グルコセレブロシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、第 VILI 因子、第 IX 因子、アポリポタンパク質 E、アポリポタンパク質 A-I、グロビン、IL-2 アンタゴニスト、-1 抗トリプシン、上記の酵素のうちのいずれかのリガンド、並びに多数の他の酵素及びこれらのリガンドのタンパク質もしくはこれらのリガンドのうちの 1 つの全てもしくは部分を含むタンパク質、またはこれらのうちの 1 つに実質的に類似したタンパク質が挙げられる。

#### 【0103】

「抗体」という用語は、任意のアイソタイプもしくはサブクラスのグリコシル化免疫グロブリンを指す。

10

20

30

40

50

ロブリン及び非グリコシル化免疫グロブリンの両方への言及、または特異的結合について未変性抗体に匹敵するこれらの抗原結合領域への言及を包含し、特に指定のない限り、ヒト、ヒト化、キメラ、多重特異性、モノクローナル、ポリクローナル及びオリゴマーまたはこれらの抗原結合断片を含む。抗原結合断片または領域、例えば F a b 、 F a b ' 、 F ( a b ' )<sub>2</sub> 、 F v 、二量体、 F d 、 d A b 、マキシボディ、単鎖抗体分子、相補性決定領域 ( C D R ) 断片、 s c F v 、二量体、三量体、四量体及び標的ポリペプチドに特異的抗原結合を与えるのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含むポリペプチドを有するタンパク質も挙げられる。「抗体」という用語には、組換え手段によって調製、発現、作成または単離したもの、例えば、抗体を発現するようにトランスフェクトした宿主細胞から単離した抗体を含むが、これらに限定されない。

10

## 【 0104 】

抗体の例には、タンパク質のいずれか1つまたはそれらの組み合わせを認識するものが挙げられるが、これらに限定されず、これらのタンパク質には、上記のタンパク質及び/または C D 2 、 C D 3 、 C D 4 、 C D 8 、 C D 11 a 、 C D 14 、 C D 18 、 C D 20 、 C D 22 、 C D 23 、 C D 25 、 C D 33 、 C D 40 、 C D 44 、 C D 52 、 C D 80 ( B 7 . 1 ) 、 C D 86 ( B 7 . 2 ) 、 C D 147 、 I L - 1 、 I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 3 、 I L - 7 、 I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 8 、 I L - 10 、 I L - 2 受容体、 I L - 4 受容体、 I L - 6 受容体、 I L - 13 受容体、 I L - 18 受容体サブユニット、 F G L 2 、 P D G F - 及びこれらの類似体 ( 米国特許第 5,272,064 号及び同第 5,149,792 号参照 ) 、 V E G F 、 T G F 、 T G F - 2 、 T G F - 1 、 E G F 受容体 ( 米国特許第 6,235,883 号参照 ) V E G F 受容体、肝細胞成長因子、オステオプロテゲリンリガンド、インターフェロン 、 B リンパ球刺激因子 ( B l y S ; B A F F 、 T H A N K 、 T A L L - 1 及び z T N F 4 としても知られる ; D o a n d C h e n - K i a n g ( 2002 ) , C y t o k i n e G r o w t h F a c t o r R e v . 13 ( 1 ) : 19 - 25 参照 ) 、 C 5 補体、 I g E 、腫瘍抗原 C A 125 、腫瘍抗原 M U C 1 、 P E M 抗原、 L C G ( 肺癌に関して発現される遺伝子産物 ) 、 H E R - 2 、 H E R - 3 、腫瘍関連糖タンパク質 T A G - 72 、 S K - 1 抗原、結腸癌及び/または膵臓癌を有する患者の血清中に高濃度で存在する腫瘍関連エピトープ、乳房、結腸、扁平上皮細胞、前立腺、膵臓、肺及び/もしくは腎臓の癌細胞上、並びに/または黒色腫、神経膠腫もしくは神経芽細胞腫の細胞上に発現する癌関連エピトープまたはタンパク質、腫瘍の壞死性コア、インテグリン 4 7 、インテグリン V L A - 4 、 B 2 インテグリン、 T R A I L 受容体 1 、 2 、 3 及び 4 、 R A N K 、 R A N K リガンド、 T N F - 、接着分子 V A P - 1 、上皮細胞接着分子 ( E p C A M ) 、細胞間接着分子 3 ( I C A M - 3 ) 、ロイコインテグリン付着因子、血小板糖タンパク質 g p I I b / I I I a 、心臓ミオシン重鎖、副甲状腺ホルモン、 r N A P c 2 ( 第 V I I a 因子組織因子の阻害剤 ) 、 M H C I 、癌胎児性抗原 ( C E A ) 、 - フェトプロテイン ( A F P ) 、腫瘍壞死因子 ( T N F ) 、 C T L A - 4 ( T 細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 ) 、 F c - - 1 受容体、 H L A - D R 10 、 H L A - D R 抗原、スクレロスチン、 L - セレクチン、呼吸器合胞体ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) 、 B 型肝炎ウイルス ( H B V ) 、ミュータンス菌 ( S t r e p t o c o c c u s m u t a n s ) 並びに黄色ブドウ球菌 ( S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s ) の抗原を含むがこれらに限定されない。本発明の方法を用いて產生することができる既知の抗体の具体例には、アダリムマブ、ベバシズマブ、インフリキシマブ、アブシキシマブ、アレムツズマブ、バピネオズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、セルトリズマブペゴル、セツキシマブ、コナツムマブ、デノスマブ、エクリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、ラベツズマブ、マパツムマブ、マツズマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ - C D 3 、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オファツムマブ、オマリズマブ、オレゴボマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペムツモマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、ロベリズマブ、トリリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ウステキヌマブ、ベドリズマブ、ザルツムマブ、及びザノリムマブが挙げられるが、これ

20

30

40

50

らに限定されない。

#### 【0105】

本発明は、例えば、上記のタンパク質のうちのいずれかを含む組換え融合タンパク質を产生するために用いることができる。例えば、本発明の方法を用いて、上記のタンパク質のうちの1つに加えて、多量化ドメイン、例えば、ロイシンジッパー、コイルドコイル、免疫グロブリンのFc部分または実質的に類似したタンパク質を含む組換え融合タンパク質を产生することができる。例えば、WO 94/10308; Lovejoy et al. (1993), Science 259: 1288-1293; Harbury et al. (1993), Science 262: 1401-05; Harbury et al. (1994), Nature 371: 80-83; Hakansson et al. (1999), Structure 7: 255-64を参考されたい。このような組換え融合タンパク質のなかでも、受容体の部分が抗体のFc部分に融合したタンパク質、例えば、エタネルセプト(p75 TNFR:Fc)及びベラタセプ(CTL A4:Fc)が特に挙げられる。キメラタンパク質及びポリペプチド、並びに上記のタンパク質及びポリペプチドのうちのいずれかの断片もしくは部分、または変異体、多様体もしくは類似体も同様に、本発明の方法によって产生することができる好適なタンパク質、ポリペプチド及びペプチドに含まれる。

#### 【0106】

本出願にて使用される用語は、当該技術において標準的なものであるが、ある特定の用語の定義については、特許請求の範囲の意味の明瞭性及び確定性を保証するために、本明細書中に記載している。単位、接頭辞及び記号は、SIに認められた形態で示され得る。本明細書に列挙された数値範囲は、その範囲を定義する数を含むものであり、その定義範囲内の各整数を含み、これを支持するものである。本明細書に記載の方法及び技術は、概して、特に指定のない限り、当該技術分野にて周知の従来の方法に従って、また本明細書全体を通して引用し論じる種々の一般的かつより具体的な参考文献に記載されている通りに実施される。例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)及びHarlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を参考されたい。限定するものではないが、特許、特許出願、記事、書籍及び論文を含む、本出願に引用された全ての文献または文献の一部は、参照により明示的に本明細書に援用される。本発明の実施形態にて記載することは、本発明の他の実施形態と組み合わせて用いることができる。

#### 【0107】

本発明は、本明細書に記載する、本発明の個々の態様の单なる例示であることが意図された具体的な実施形態によって範囲が限定されるものではなく、機能的に同等の方法及び構成要素は、本発明の範囲内である。実際、本明細書中に示され説明されているものに加え、本発明の種々の変更が上記の説明及び添付図面から当業者には明らかであろう。このような変更も特許請求の範囲に含まれることが意図される。

#### 【実施例】

#### 【0108】

##### 実施例1

細胞外オルニチン量が高マンノースグリコフォーム含有量と相關することが判明した。5%超~20%未満の範囲の高マンノースグリコフォーム含有量を有する組換え抗体を発現する8つのCHO細胞株を本実験に選択した(細胞株A~細胞株H)。所有者が異なる2つの細胞培養培地をそれぞれオルニチンを含めずに用いて(培地1及び培地2)、細胞

を振盪フラスコ内で 10 日の流加培養で増殖させた。消費培地のサンプルを培養の 8 日目、9 日目及び 10 日目に採取し、大規模メタボロミクス分析にかけた。%HM は、Endo-HrcE-SDS 法を用いて、その後、以下に記載の HILIC 方法に代えて、特定した。大規模メタボロミクス分析により、培地構成成分を液体クロマトグラフィーで分離し、高分解能分光測定法で検出して、消費培地中のオルニチンの相対量を特定した。構成成分については、そのフラグメンテーションスペクトルを既知の化合物のスペクトルライブラリーと照合することによって同定した。各構成成分の相対存在量を質量分析信号のピーク面積から特定した。培地 1 及び培地 2 において、8 日目、9 日目及び 10 日目に細胞株 A ~ H から分泌されたモノクローナル抗体の高マンノースグリカン濃度 (%HM) を図 2 A 及び B に示す。図 2 C は、パーセント高マンノース濃度と細胞外オルニチン量との相関関係を示す。この相関関係は、9 日目のサンプルから得たデータを用いて、8 つ全ての細胞株 (四角で表示) を比較することによって特定した。この結果により、高マンノースグリコフォーム含有量と細胞外オルニチン量との間の強い相関関係が示唆された。

#### 【0109】

次に、細胞株 H を 3 L バイオリアクター内で流加培養にて増殖させた。培養期間は 12 日であった。3 日目、5 日目、7 日目及び 9 日目に、7%、9%、9% 及び 9% の 4 つのボーラス供給を行った。加えて、50% グルコース溶液を、2 g / L を上回るグルコース濃度を維持するのに必要な場合、3 日目から開始して毎日添加した。産生バイオリアクターは、増殖 4 日後に  $15 \times 10^5$  細胞 / ml で接種した。細胞は、産生期が開始するまで増殖培地中に維持した。次いで、8 つの異なるプロセス条件を比較した。条件 1 は、対照とした。産生フィード培地には、何ら変更を加えなかった。

#### 【0110】

条件 2 は、ベタインをフィード培地に 24 mM の濃度で 0 日目に追加した。これ以上のベタインは与えなかった。3 日目、5 日目、7 日目及び 9 日目に、7%、9%、9% 及び 9% の 4 つのボーラス供給を行った。加えて、50% グルコース溶液を、2 g / L を上回るグルコース濃度を維持するのに必要な場合、3 日目から開始して毎日添加した。

#### 【0111】

条件 3 及び 4 では、硫酸銅の除去を試験した。産生基礎培地粉末から硫酸銅を除去した。条件 3 を対照とし、硫酸銅原液を基礎培地に添加した。条件 4 では、いかなる培地にも硫酸銅を添加せず、銅欠乏培養環境を作った。条件 3 と 4 の両方に関して、両方とも銅を含有する同一のボーラス「フィード」培地で処理した。

#### 【0112】

条件 5 ~ 8 では、高オスモル濃度及び低オスモル濃度を試験した。条件 5 及び 6 では、細胞に 90% 産生バッチ培地を与えた。すなわち、10% 少ない栄養素を供給した。これにより、細胞がオスモル濃度の減少を受けることになる。条件 6 では、細胞培養培地を NaCl の滴定により、約 300 mM の対照濃度に戻した。条件 7 及び 8 では、細胞に 85% フィード培地を与えた、条件 8 の培地は、NaCl の滴定により、対照濃度に戻した。

#### 【0113】

消費培地のサンプルを培養の 3 日目、6 日目、8 日目、9 日目及び 10 日目に採取し、大規模メタボロミクス分析にかけた。

#### 【0114】

再度、細胞外オルニチン含有量と高マンノースグリコフォーム含有量との間の有意な相関関係があった。図 3 A は、細胞株 H を 8 つの異なるバイオリアクター条件 (#1 ~ #8) にさらしたときに検出されたパーセント高マンノースグリカン濃度を示す。図 3 B は、対応する細胞外オルニチン量を示す。図 3 C は、パーセント高マンノース濃度と細胞外オルニチン量との相関関係を示す。この相関関係は、9 日目のサンプルから得たデータを用いて、8 つ全ての条件 (四角で表示) を比較することによって特定した。

#### 【0115】

実施例 2

10

20

30

40

50

実施例 1 に記載した 8 つの細胞株を用いて、アルギナーゼ 1 の mRNA 発現レベルを、10 日の流加產生培養中の選択した日に測定した。

#### 【 0 1 1 6 】

mRNA 発現レベルは、Quantigene Multiplex Assay キット (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) を製造者の説明書に従って用いて分析した。

#### 【 0 1 1 7 】

アルギナーゼ 1 は、アルギニンのオルニチンへの変換を触媒する酵素であり、高マンノースの濃度がより高いと、経時的に、細胞株内で上方制御されることが判明した (図 4 参照)。これは、アルギナーゼ活性を遮断し、オルニチン產生量を減少させるアルギナーゼ阻害剤による特異的ターゲティングを用いれば、高マンノースグリカン濃度が低下し得ることを示唆している。

#### 【 0 1 1 8 】

##### 実施例 3

本実施例は、組換え糖タンパク質を発現する宿主細胞中のオルニチン蓄積を調節することによって、組換え糖タンパク質の高マンノースグリコフォーム含有量を操作することに取り組むことを説明するものである。

#### 【 0 1 1 9 】

##### 細胞株、細胞培養及び培地

細胞株 H を本研究に用いた。3 L の Erlenmeyer 振盪フラスコ (Corning Life Sciences, Lowell, MA) 中に 1 L 作業容量で細胞を維持し、自動 CO<sub>2</sub> インキュベータ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 内で 36 、 5 % CO<sub>2</sub> の標準加湿条件下及び 70 rpm の振盪で培養した。4 日ごとに、500 nM 濃度のメトトレキサート (MTX) を含む選択増殖培地中で細胞を継代培養し、続けて、増殖培地に移し、接種し、4 日間培養した後、以下に記載の実験のために 24 ウェルプレートに播種した。

#### 【 0 1 2 0 】

##### 小規模モック灌流

24 ディープウェルプレート (Axygen, Union City, CA) での改変モック灌流を用いて、高マンノース (HMN) 調整に対する、スペルミン、アルギニン、オルニチン及びアルギナーゼ濃度の影響を評価した。実験計画に従って、アルギニンを含まない配合の灌流培地を小規模モック灌流実験 3 (アルギニン濃度研究) に用いた。小規模モック灌流実験 4 では、全てのアルギナーゼ阻害剤を灌流培地に添加した。BEC 塩酸塩、DL- , ジフルオロメチルオルニチン塩酸塩、N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニン一酢酸塩及び N - ヒドロキシ-nor-アルギニン二酢酸塩の 4 つのアルギナーゼ阻害剤は、EMD Millipore Corporation (Billerica, MA) より購入した。

#### 【 0 1 2 1 】

簡潔に述べれば、各ウェルについて、CHO 細胞を、作業容量 3 mL で 10 ~ 20 × 10<sup>6</sup> 細胞 / mL の範囲の設定密度にてプレートに播種した。Kuhner インキュベータ (Kuhner AG, Basel, Switzerland) で、36 、 5 % CO<sub>2</sub> 、 85 % 相対湿度及び振盪 225 rpm、軌道径 50 mm で、3 日または 4 日間、細胞を培養した。24 時間ごとに、細胞を 200 × g で 5 分間、遠心分離にかけ (Beckman Coulter, Brea, CA) 、消費培地を回収し、次いで、各ウェルに 3 mL の新鮮な培地を補充した。収集した消費培地は、力価、主な代謝産物及びパーセント高マンノース (%HMN) (必要時) について分析した。次いで、細胞を回収し、細胞数を計測し、生存率を測定した。

#### 【 0 1 2 2 】

##### 細胞増殖、代謝産物及び抗体力価の分析

生細胞密度及び生存率は、Cedex セルカウンター (Roche Innovati

10

20

30

40

50

ve, Beilefeld, Germany)を用いて特定した。グルコース、乳酸、アンモニア、グルタミン、グルタミン酸を含む代謝産物については、Nova Bioprofile Flex (Nova Biomedical, Waltham, MA) から得た。消費培地中の抗体濃度は、内径 5.0 mm × 4.6 mm の POROS A / 20 タンパク質 A カラム (Life Technologies, Carlsbad, CA) を備えた Affinity Protein A Ultra Performance 液体クロマトグラフィー (UPLC) (Waters Corporation, Milford, MA) アッセイを用いて特定した。サンプルを注入した後、カラムをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH = 7.1) で洗浄して CHO宿主細胞のタンパク質を除去した。次いで、結合した抗体を酸性 PBS 緩衝液 (pH = 1.9) で溶出し、280 nm の UV 吸光度で検出して抗体濃度を定量化した。 10

#### 【0123】

##### HILIC グリカンマップ

N-グリカンが異なる種の抗体を親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) によって分析した。精製した抗体を N-グリコシダーゼ F (New England Biolabs, Ipswich, MA) によって、37 で 2 時間、分離させ、グリカンを遊離した。遊離したグリカンを 2-アミノ安息香酸で標識し、Glycocalyx S カートリッジ (Prozyme, Heyward, CA) を用いて洗浄した。次いで、精製したグリカンを脱塩して、アッセイ用に水で再構成した。UPLC (Waters Corporation, Milford, MA) を用いて、内径 100 mm × 2.1 mm の BEH Glycan カラムで HILIC クロマトグラフィーを実施し、溶出したグリカンを蛍光検出器によって各種グリカンの異なる溶出時間に基づいて検出し、特定し、限定した。 20

#### 【0124】

##### 小規模モック灌流実験 1：スペルミン濃度研究

5 つの異なる濃度のスペルミンを本研究で試験した。0、7、17、35 及び 100 μM のスペルミンテトラヒドロクロロリド (スペルミン 4 HCl) を含む灌流細胞培養培地を試験した。35 μM のスペルミンを含む灌流培地を対照とした。5 日目のサンプルからの結果は、スペルミン濃度が減少するにつれて、% HMN が減少することを示している (図 5 参照)。力価は、スペルミンの減少 / 枯渇による影響を受けなかった。HM 濃度の減少は、培地中のスペルミンの量が減少したときに、オルニチン量が減少することによって達成された。図 6 に示す通り、オルニチンの量は、スペルミン濃度の減少に伴って減少した。 30

#### 【0125】

##### 小規模モック灌流実験 2：オルニチン濃度研究

4 つの異なる濃度の L-オルニチン-塩酸塩を試験した。14.8、6.0、0.6 及び 0 (対照) mM の L-オルニチン-塩酸塩 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含む灌流細胞培養培地を用いた。この結果により、オルニチン濃度が増加するにつれて、% HMN が増加することが示された (図 7 参照)。細胞株 I を 2 L バイオリアクター内で用いて、第 2 の実験を実施した。細胞株 I は、IgG2 抗体を発現し、流加条件下で増殖させた。1 つのバイオリアクターには、培養の 0 日目に、単一追加の 0.1 g / L の L-オルニチン-塩酸塩を入れ、第 2 のバイオリアクターは、オルニチンを含まない対照とした。ダイズ加水分解物を含む細胞培養培地で、培養物を 12 日間維持した。ダイズ加水分解物を含むボーラスフィード培地を 4 日目及び 8 日目に供給した。 40

#### 【0126】

グリカンプロファイリングは、ペプチドマッピングによって実施した。Renら (2009) Anal. Biochem. 392 12-21 が記載した方法と類似の方法を用いて、抗体をトリプシンで分解した。具体的には、各抗体約 50 ~ 70 μg を、0.2 M トリス緩衝液 (pH 7.5) 中の 7.0 M グアニジン HCl、6 mM ジチオスレイトール (DTT) を用いて 37 で 30 分間、変性し、還元した。変性 / 還元した各サンプル 50

を 14 mM のヨード酢酸により 25 ℃ で 25 分間アルキル化した後、8 mM の DTT を添加することによって反応物をクエンチした。次いで、 Pierce 界面活性剤除去スピンカラム (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) を製造者の推奨プロトコールに従って用いて、還元 / アルキル化した抗体サンプルを、0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.5) に交換した。バッファー交換したサンプルを、トリプシン 3.5 μg により 37 ℃ で 60 分間、インキュベートした。分解物を 2.2 μL の 10 % 酢酸を添加することによってクエンチした。分解された抗体約 12 ~ 17 μg を分析のために注入した。

#### 【0127】

分解された抗体について、Thermo Scientific LTQ-Orbitrap Elite 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) に直接接続した Agilent 1260 HPLC システムを用いて分析した。Waters BEH 300 C18 カラム (Waters Corporation, Milford, MA)、2.1 × 150 mm、粒子 1.7 μ を 40 ℃ で流量 0.2 mL / 分にて用いて、タンパク質分解性ペプチドを分離した。移動相 A は、水中 0.02 % TFA であり、移動相 B は、アセトニトリル中 0.018 % TFA であった。0.5 ~ 40 % B のグラジエントを用いて 90 分でペプチドを溶出し、次いで、カラムを洗浄し、平衡化した。質量分析計は、分解能 120,000 のオービトラップでのフル MS スキャン、次いで、動的除外を伴うリニアトラップでの 5 回のデータ依存的 CID MS / MS スキャンに設定した。グリカンプロファイリングに関する自動データ分析を Mass Analyzer を用いて実施した (Zhang, (2009) Analytical Chemistry 81: 8354 - 8364 参照)。

#### 【0128】

この結果は、オルニチン濃度が増加するにつれて、% HMN が増加することを再度示している (図 8 参照)。

#### 【0129】

##### 小規模モック灌流実験 3 : アルギニン濃度研究

5 つの異なる濃度のアルギニンを本研究で試験した。3.686、1.38、0.92 及び 0.46 g / L のアルギニンを含む灌流細胞培養培地を試験した。1.843 g / L のアルギニンを含む灌流培地を対照として用いた。この結果は、アルギニン濃度が増加するにつれて、% HMN が増加することを示している (図 9 参照)。

#### 【0130】

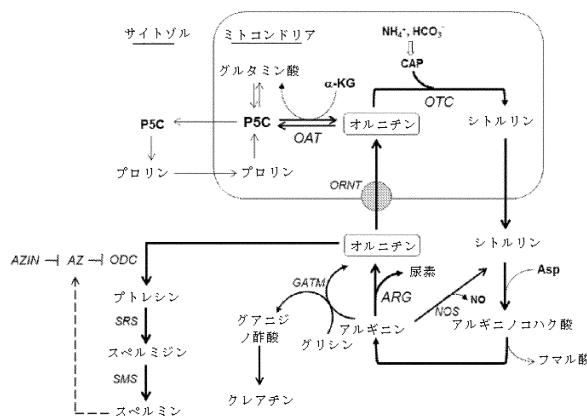
##### 小規模モック灌流実験 4 : アルギナーゼ阻害剤研究

2 系列のアルギナーゼ阻害剤実験を実施した。実験の第 1 の系列には、4 つの市販のアルギナーゼ阻害剤 (BEC 塩酸塩、DL-, ジフルオロメチルオルニチン塩酸塩、N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニン-酢酸塩及び N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-nor-アルギニン二酢酸塩) を、1、10 及び 20 μM の 3 つの異なる濃度で細胞培養に添加した。対照は、阻害剤非含有であった。本実験から、BEC 及び DL- の阻害剤が % HM の減少に最も効果的であることが結論付けられた (図 10)。

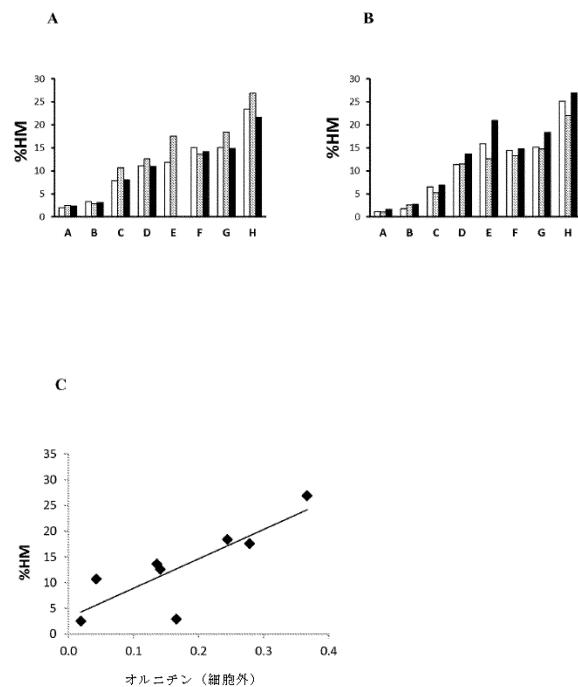
#### 【0131】

実験の第 2 の系列は、BEC 阻害剤及び DL- 阻害剤を用いて実施した。BEC 阻害剤は、0 (対照)、10 μM 及び 0.5 mM の濃度で灌流細胞培養培地にて試験した。DL- 阻害剤は、0 (対照)、10 μM、1.0 mM 及び 2.0 mM の濃度で灌流培養培地にて試験した。2 つの阻害剤の濃度が増加するにつれて、% HM が減少することが実証された (図 11 を参照)。

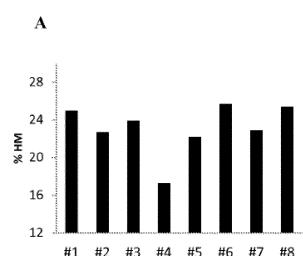
【図1】



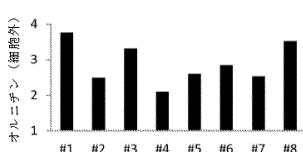
【図2】



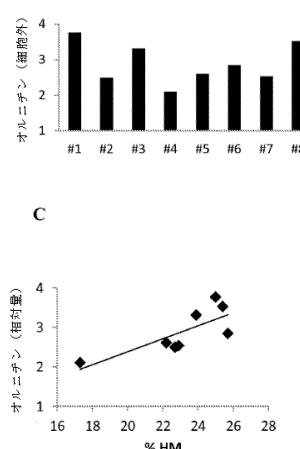
【図3】



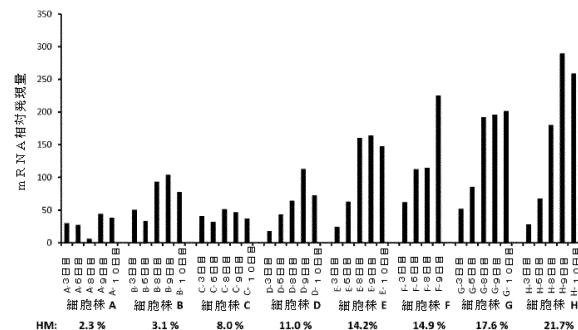
B



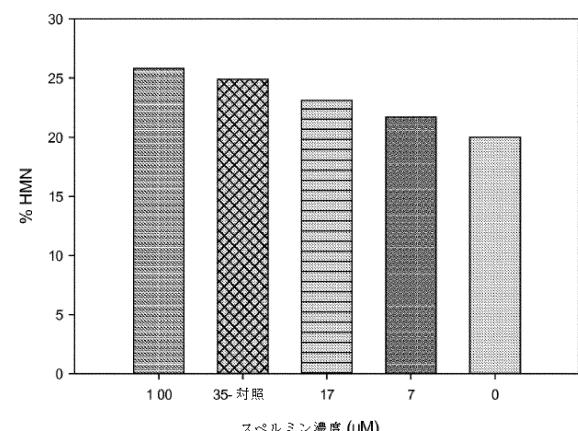
C



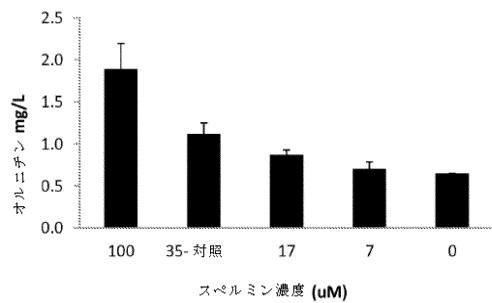
【図4】



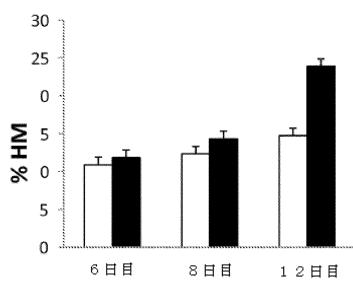
【図5】



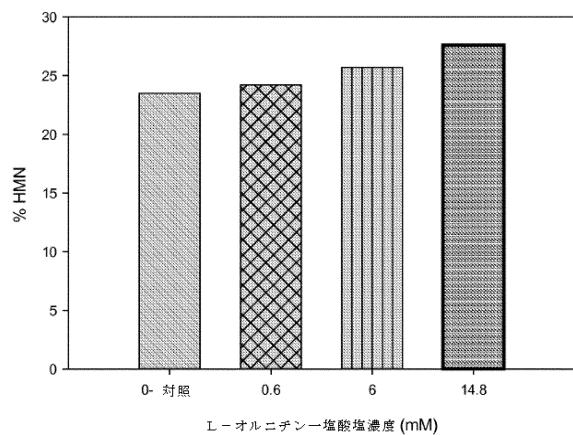
【図6】



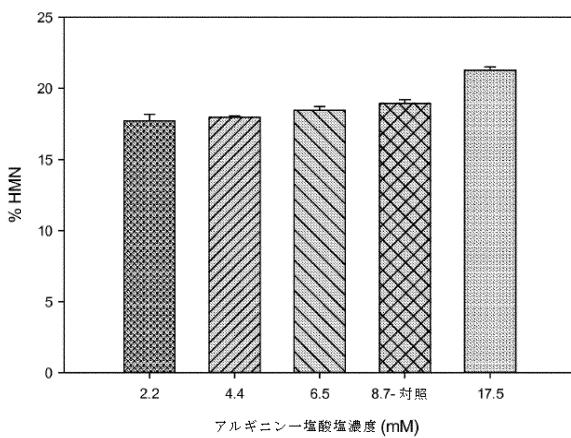
【図8】



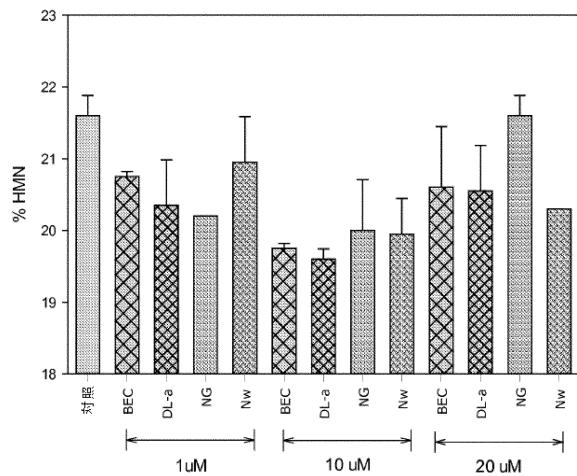
【図7】



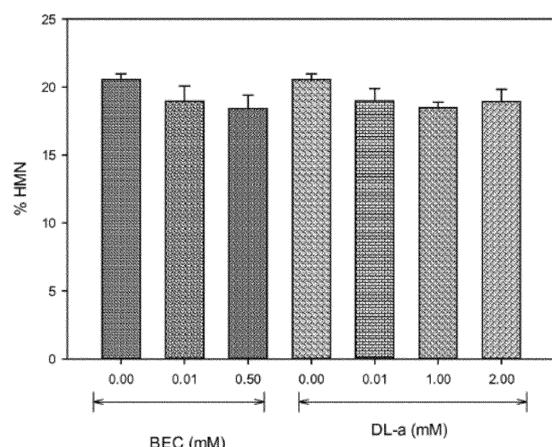
【図9】



【図10】



【図11】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 バークホーダリアン, ヘディエ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・93021、ムアパーク、ローレル・レイン・14319
- (72)発明者 ボンダレンコ, パベル  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320、サウザンド・オーツ、プロッサム・コート・1  
774
- (72)発明者 ジャン, ジヨンチイ  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91362、サウザンド・オーツ、カペラ・ウェイ・267  
6

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0221823(US, A1)  
特表2009-523450(JP, A)  
V. Hendrick, et al., Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis, Cytotechnology, 2001年, Vol.36, pp71-83  
MATSUI I, et al., Effect of sodium butyrate on induction of ornithine decarboxylase activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes, Chem Biol Interact, 1984年  
9月15日, Vol.51 No.2, Page.141-149

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/02  
C07K 16/00  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
WPI DS / WPI X (STN)