

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-526385

(P2016-526385A)

(43) 公表日 平成28年9月5日(2016.9.5)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 B O 6 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2016-522968 (P2016-522968)	(71) 出願人	304023824
(86) (22) 出願日	平成26年7月7日 (2014.7.7)		カディラ ヘルスケア リミティド
(85) 翻訳文提出日	平成28年3月4日 (2016.3.4)		インド国, グジャラート, アーメダバード
(86) 国際出願番号	PCT/IN2014/000450		380 015, サテライト クロス
(87) 国際公開番号	W02015/004679		ローズ, ザイダス タワー
(87) 国際公開日	平成27年1月15日 (2015.1.15)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	2285/MUM/2013		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成25年7月6日 (2013.7.6)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	インド (IN)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モノクローナル抗体の改良された産生方法

(57) 【要約】

本発明は、電荷変異体の所望のプロファイルを有するモノクローナル抗体の相当量を得るための、改良された方法を提供する。

本方法は、最初に適切な温度で哺乳動物細胞を培養し、その後、温度を低下させ、必要に応じて、所望の分子の産生の間、適切なアミノ酸を同時添加することを含む。

本発明はまた、上記の改良された方法で産生された、グリカンの所望のプロファイルを有する抗体を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

修正された細胞培養法を用いて、所望のグリカンおよび/または電荷変異体プロファイルを有する抗体を生産する方法であって、当該方法は以下の：

- a) 一定の間隔で適切な温度条件での細胞培養条件を維持し、
 - b) 当該方法の間において、一定の間隔で、同時にまたは連続的に、培地に特定のアミノ酸を添加する
- を含む、前記方法。

【請求項 2】

細胞培養法が、細胞培養の産生条件を適切な温度、すなわち細胞培養プロセスの間に固定された温度で又は段階的に低下された温度、で維持することにより特徴づけられる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

適切な温度条件は、第 1 の温度条件で対数期までの細胞成長、それに続き第二温度で、そして場合により当該方法の終わりまで第 3 温度条件で細胞培養条件を維持することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 の温度条件は、第 2 の温度よりも、場合により第 3 の温度条件よりも高い温度に維持される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 の温度条件は約 37 であり、第 2 の温度条件、必要に応じて第 3 の温度条件は、35 ~ 30 の範囲である、請求項 2 ~ 5 に記載の方法。

20

【請求項 6】

細胞培養法の中に、アミノ酸を、所定の濃度および所定の時間間隔で、細胞培養培地に添加する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

アミノ酸の添加は、細胞培養法の中に、少なくとも 2 つの異なる時間間隔で行われる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞培養培地へのアミノ酸の添加を、毎回 10 mM 未満の濃度で行う、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

アミノ酸は、アミド基含有および塩基性のアミノ酸、例えば、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

グルコースの濃度を 0.5 g/L ~ 8 g/L、好ましくは 2 g/L ~ 4 g/L の範囲で維持する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

重炭酸塩、炭酸ナトリウムおよび HEPES 緩衝液から選ばれる適切な緩衝剤を用いて、pH を pH 6 ~ pH 7.5 の範囲で維持する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

細胞の生産性は、0.5 g/L 以上であり、好ましくは 1 ~ 4 g/L である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

細胞生存率は少なくとも 30 % 以上、好ましくは約 80 %、より好ましくは 95 % を超えて維持される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

抗体は、抗 HER 抗体、抗 TNF 抗体、抗 VEGF 抗体および抗 CD20 抗体から選択

50

される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

抗体は、トラスツマブ、ペルツマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、ラニビズマブおよびリツキシマブから選択される、請求項 1 ~ 1 4 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】

【0 0 0 1】

本発明は、電荷変異体の所望のプロファイルを有するモノクローナル抗体の相当量を得るための、改良された方法に関する。一実施形態では、この方法はまた、グリカンの所望のプロファイルを有する抗体を提供する。本方法は、最初に適切な温度で、哺乳動物細胞を培養し、その後、温度を低下させることを含む。必要に応じて、所望の分子の産生の間に、適切なアミノ酸を同時に添加する。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

タンパク質は、大きく複雑な分子である。これらは、生物学的活性を維持するために、それらの未変性コンホメーションであることが要求される。さらに、溶液中の高濃度タンパク質分子は、保管中に経時的に凝集または分解または特定の修飾を受けやすい。一態様において、本発明は、所望の品質の生成物、好ましくは、モノクローナル抗体をより多く得るための、改良された方法を提供する。モノクローナル抗体 (m A b) は、標的抗原に結合するという高度の特異性、標的抗原に対する免疫応答を開始する能力および長い血清持続性により、治療薬として大きな注目を集めている。多くのモノクローナル抗体が腫瘍特異抗原に対して指向されている。帯電性およびグリカン構造のような、各々の免疫グロブリンのいくつかの固有の特徴は、作用機構に重要かつ特異的であることが見出されている。多くの他のタンパク質のようなモノクローナル抗体は、電荷の不均一性を有しており、この不均一性は、静電相互作用を最適化し、それらの構造、安定性、化学的および生物学的特性を調節する。産生中、分解、修飾または様々な酵素プロセスにより、さまざまな形態の微小不均一性が発生する。化学的不安定性または物理的不安定性により、タンパク質が分解する。化学的不安定性は、主に、脱アミド、ラセミ化、加水分解、酸化、ベータ脱離またはジスルフィド交換の結果、生じうる。化学的不安定性は、さまざまな電荷変異体の形成を引き起こし、そして生体分子の性質を改変する。脱アミド化およびシアリル化のような化学修飾は、それぞれ、m A b 上での正味の負電荷の増加をもたらし、p i 値の減少を引き起こす。酸性変異体の生成の他の機構が、従来技術において知られている。脱アミド化されたアイソフォームは、活性の損失とともに劣化の影響を受けやすく、したがって、それは、モノクローナル抗体タンパク質の安定性だけではなく、活性にも大きな影響を与える。

20

30

【0 0 0 3】

同様に、F c 領域における N - グリコシル化は、免疫グロブリンおよび他の F c 含有分子の抗体のエフェクター機能を調節する。F c グリカンは、抗体の機能に影響を与える末端糖のいくつかの異なるタイプを含むことができる。末端ガラクトシル化の効果は、当業者知られている。異なる免疫グロブリンのガラクトシル化パターンは、このような免疫グロブリンにおいて製品固有の多様性を示している。末端ガラクトシル化のばらつきが、抗原に結合する抗体に影響を与え、分子の C D C 活性に大きな影響を与えることに注意することが重要である。一方、アフコシル化が A D C C 活性に非常に重要であるのに対し、ガラクトシル化の様々な程度は、A D C C 活性にはあまり影響を与えないことが知られている。

40

【0 0 0 4】

モノクローナル抗体のいくつかの産生方法が従来知られている。このような方法は、温度の低下などと共に、オスモル濃度の維持、塩の添加を含む。

【0 0 0 5】

50

US5705364には、培地のオスモル濃度を約250～約600mOsmで維持し、培地の温度を約30～35の間で維持しながら、培養物に、アルカン酸またはその塩を、約0.1mM～約20mMの濃度で添加することによって、糖タンパク質のオリゴ糖側鎖上に存在するシアル酸の量を制御する、細胞培養方法が開示されている。

【0006】

US5976833は、動物細胞による有用物質の産生において生産性を向上させるための方法を提供する。これは、所望の物質を生成するための、動物細胞の培養方法を開示しており、以下のステップを含む。(1)動物細胞が成長することができる温度で、動物細胞を培養し、そして、(2)より低温で動物細胞を培養する。

【0007】

WO2014035475には、組み換え-発現タンパク質のオリゴ糖分布を制御するための方法が開示されている。この方法は、酵母加水分解物の補充や植物加水分解物の補充とともに、前記タンパク質の組換え発現に使用される細胞培養培地を補充することを含む。それはまた、細胞培養培地のアスパラギンアミノ酸の濃度を調節することにより、抗体のオリゴ糖の分布を制御する方法を開示している。これに対し、本発明では、培養培地中で、このような加水分解物の補充を必要としない。

【0008】

モノクローナル抗体の産生のための種々の方法の利用可能性があるが、それでも、モノクローナル抗体産生のための細胞培養方法を確立する必要がある。それは、有意なバッチ間の変動なしに、電荷変異体およびグリカンプロファイルの所望のレベルを一定に生成する。このような方法は、また、所望の電荷および/またはグリカンプロファイルを有するモノクローナル抗体タンパク質を得るのに役立つ。本発明は、修正された細胞培養法を用いたモノクローナル抗体の産生方法のような、改良された方法を提供する。本発明による方法では、塩の添加または適切な浸透圧濃度の維持のいずれかが含まれていない。本発明は、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有するモノクローナル抗体の産生のための新規な方法を提供する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、修正された細胞培養法を用いて、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有する、相当量のモノクローナル抗体を得るための、改良された方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一態様では、細胞培養方法は、細胞培養プロセスの間に、一度にまたは段階的のいずれかで、種々の温度での細胞培養の生産条件を維持することを特徴とする。

【0011】

他の態様において、本発明は、増殖期で初期高温とし、続いて、中期対数期から後期対数期の間または静止期の間のいずれかで、培養系の温度をより低い第2の温度まで低下させる産生工程を実施することにより、モノクローナル抗体の改良された産生方法を提供する。

【0012】

他の態様において、本発明は、中期対数期から後期対数期の間または静止期の間のいずれかで、培養系中に適切なアミノ酸を供給することにより、モノクローナル抗体の産生のための当技術分野の改良された産生方法を提供する。

【0013】

さらなる態様において、本発明のアミノ酸は、細胞培養プロセス中に、特定の濃度および特定の時間間隔で、細胞培養培地に添加される。

【0014】

好ましい実施形態において、アミノ酸は、グルタミンおよびアスパラギンまたはそれら

10

20

30

40

50

の組み合わせから選択される。

【 0 0 1 5 】

好ましい実施形態において、本発明は、増殖期の初期高温で処理を行い、その後、中期対数期から後期対数期の間または静止期の間のいずれかで、培養系の温度を、初期温度よりも低い第2の温度に低下させるとともに、培養培地にアミノ酸を同時供給することにより、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有する相当量のモノクローナル抗体を得るための、改良された上流の方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

さらなる態様において、本発明のアミノ酸は、アミド基含有および塩基性アミノ酸、例えば、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、およびこれらの組み合わせから選択される。

10

【 0 0 1 7 】

好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、抗HER抗体、抗TNF抗体、抗VEGF抗体および抗CD20抗体から選択される。

【 0 0 1 8 】

より好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、ラニビズマブおよびリツキシマブから選択される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 9 】

20

【 図 1 】 HP - IEC による、精製アダリムマブタンパク質の電荷変異体プロファイルを示す。

【 図 2 】 CE - LIF による、精製アダリムマブタンパク質のグリカンプロファイルを示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

一実施形態において、増殖期に初期高温で産生工程を行い、その後、中期対数期から後期対数期の間または静止期の間のいずれかで、一度にまたは段階的に培養系の温度を低下させることにより、本発明は、タンパク質の所望のグリカンプロファイルを維持しながら、電荷変異体の所望のプロファイルを有するモノクローナル抗体の産生方法を提供する。

30

【 0 0 2 1 】

さらなる実施形態において、細胞培養方法は、細胞培養プロセスの間に、一度にまたは段階的に、のいずれかで、種々の温度で細胞培養の生産条件を維持することの特徴とする。

【 0 0 2 2 】

他の実施形態において、好ましくは、アミド基含有アミノ酸および/または塩基性アミノ酸のような、適切なアミノ酸を培養系に供給することによって、本発明は、所望のグリカンプロファイルを有する、相当量のモノクローナル抗体の産生方法を提供する。このようなアミノ酸は、中期対数期から静止期の間、任意の段階で供給することができる。

【 0 0 2 3 】

40

さらなる実施形態において、本発明では、アミノ酸は、細胞培養プロセス中に、特定の濃度および特定の時間間隔で、細胞培養培地に添加される。

【 0 0 2 4 】

さらなる実施形態において、本発明では、アミノ酸の添加は、細胞培養プロセス中に、少なくとも2つの異なる時間間隔で行われる。

【 0 0 2 5 】

好ましい実施形態において、本発明では、細胞培養培地へのアミノ酸の添加は、各回、20 mM 未満、好ましくは10 mM 未満の濃度で行われる。

【 0 0 2 6 】

好ましい実施形態において、本発明は、増殖期に初期高温で処理を行い、その後、中期

50

対数期から後期対数期の間または静止期の間のいずれかで、培養系の温度を、初期温度よりも低い第2の温度に低下させ、同時に、培養系へのアミノ酸を供給することにより、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有する相当量のモノクローナル抗体を提供する。

【0027】

さらなる態様において、本発明のアミノ酸は、アミド基含有および塩基性アミノ酸、例えば、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、およびこれらの組み合わせから選択される。

【0028】

一般的に、培養系の初期高温は37℃に維持される。本発明の培養系の温度は、中期対数期から静止期の間のいずれかの段階で、一度に又は特定の時間間隔で段階的に30℃まで低下させることができる。本発明による方法は、グリカンと電荷変異体の所望のプロファイルを有するモノクローナル抗体の相当量を提供する。さらに、この方法では、モノクローナル抗体の所望のグリカンプロファイルを維持する。

10

【0029】

一実施形態では、本発明は、中期対数期から静止期の間に、任意の段階で、培養系にグルタミン及び/又はアスパラギンのような適切なアミノ酸を供給することにより、タンパク質、好ましくはモノクローナル抗体の所望のグリカンプロファイルを提供する。

アミノ酸の添加量は、1~4 mM、好ましくは2~3 mMの範囲である。本発明では、産生中の細胞培地へのグルタミンおよび/またはアスパラギンを供給することによって、モノクローナル抗体のタンパク質構造における製品固有の方法で、所望のグリカン部分の形成を増強することが見出された。

20

【0030】

好ましい実施形態において、本発明は、増殖期に初期高温で処理を行い、そしてその後、中期対数期から後期対数期の間または静止期に、培養系の温度をより低い第2の温度まで低下させ、そして、所望のタンパク質の産生時に、適切なアミノ酸（グルタミン及び/又はアスパラギン）を添加することにより、所望のグリカンプロファイルおよび電荷変異体を有するモノクローナル抗体の相当量の生成物を提供する。

【0031】

一実施形態では、本発明は、所望のグリカンプロファイルおよび電荷変異体を有する抗体の産生方法を提供する。ここでグルコース濃度は0.5 g/L~8 g/L、好ましくは2 g/L~4 g/Lの範囲、より好ましくは約2.5 g/Lに維持されている。

30

【0032】

他の実施形態において、本発明は、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有する抗体の産生方法を提供する。ここで、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムおよびHEPES緩衝液から選択される適切な緩衝液を用いて、産生中のpHをpH6~pH7.5の範囲内に維持する。

【0033】

さらなる実施形態において、本発明は、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有する抗体の産生方法を提供する。ここで細胞の生産性は、0.5 g/L以上、好ましくは1~4 g/Lに維持される。

40

【0034】

さらなる実施形態において、本発明は、グリカンおよび電荷変異体の所望のプロファイルを有する抗体の産生方法を提供する。ここで、細胞生存率は30%以上、好ましくは約80%、より好ましくは95%より大きく維持される。

【0035】

より好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、ラニビズマブおよびリツキシマブから選択される。

【0036】

50

定義

●グリカン - 用語グリカンは、多糖又はオリゴ糖を指す。グリカンは、単糖残基のホモまたはヘテロポリマーであってもよく、直鎖状または分枝状であってもよい。グリカンはまた、糖タンパク質、糖脂質、またはプロテオグリカンなどの複合糖質の炭水化物部分を参照するために使用されてもよい。

【0037】

●所望のグリカンプロファイル - これは、その生物学的活性に必須であるタンパク質に結合する、様々なグリカン分子の分布パターンとして定義することができる。

【0038】

●中期対数期 - これは、細胞集団が指数関数的に増加する間、培養培地中の細胞の増殖期と定義される。この期は、細胞集団の対数値を時間に対してプロットしたときに、成長曲線のうち直線部分によって表され、対数増殖期と呼ばれる。また、その中間点は、中期対数期と呼ばれている。

10

【0039】

●後期対数期 - これは、前の静止期への転移に先立ち、後期対数期における細胞の増殖期と定義される。この期は、細胞集団の対数値を時間に対してプロットしたとき、成長曲線の直線部分として表示される対数期と呼ばれ、およびその最終期は後期対数期と呼ばれている。

【0040】

●静止期 - 培養培地中の細胞の増殖対数期の後に成長曲線が安定し、その時点での細胞集団が一定のままで、静止期と呼ばれる。古い細胞が死滅するのと同じ速さで新しい細胞が産生されている。

20

【0041】

●電荷変異体 - これは、静電相互作用を最適化し、それらの構造、安定性、化学的および生物学的特性を調節するタンパク質の特異的な特性である。これは、タンパク質分子上に帯電したアミノ酸の特定の分布に起因して、タンパク質によって異なる。

【0042】

本発明で使用される分析方法：

高圧イオン交換クロマトグラフィー（HP - IEC）：

精製したモノクローナル抗体、例えばアダリムマブの異なる電荷変異体の分離は、分析HP - 弱陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて行われる。カラムは、pH 6.9（移動相A）のリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化される。前記タンパク質の電荷変異体の溶出は、0.5 mL / 分で、移動相Aにおける塩濃度（塩化ナトリウム）を増加することによって行われる。

30

【0043】

キャピラリー電気泳動 - レーザ誘起蛍光（CE - LIF）：

精製したモノクローナル抗体（例えばアダリムマブ）調製物のグリカン分析（グリコシル化変異体）は、PNGアゼ処理により前記タンパク質の炭水化物部分を単離した後に、CE - LIF法によって行われる。

酵素処理に続いて、炭水化物（グリカン）部分がAPTS（8 - アミノピレン1, 2, 6 - トリスルホネート）により標識され、そして誘導体化されたグリカンは、その後、毛细管システム（N - CHOで被覆；50 cm × 50 μm）によって、流体力学的サイズに基づいて分離される。

40

グリカンは、488 nmでの励起波長および520 nmの発光波長を有するLIF検出器により検出された標識グルコースラダー標準に対して、識別される。

【0044】

本発明のモノクローナル抗体の産生方法の好ましい方法は、以下の実施例により以下に例示されるが、決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0045】

実施例 1

50

抗 - T N F α 抗体アダリムマブを発現する哺乳動物細胞を、標準的な分子生物学技術によって生成した。均質な集団由来の単一細胞を得るために、クローンの限界希釈を行った。細胞は、細胞バンクの形で凍結保存し、さらなる成長のために使用した。細胞を復活させ、接種材料開発の一連の工程を用いて増殖し、適切な増殖培地を含む生物反応器に接種した。細胞培養は、必要に応じて、C O₂ ガスおよび / または重炭酸ナトリウムを使用して pH 7 . 2 $\pm$ 0 . 4 に維持制御された環境で行った。空気および / または酸素ガスを噴霧し、生物反応器の攪拌速度を制御することによって、溶存酸素濃度を 4 0 $\pm$ 2 0 % 飽和で維持した。温度を 3 7 に制御した。増殖培地には、次のコンポーネントが含まれている。

【 0 0 4 6 】

成分	濃度
C H O 増殖粉末培地	1 9 . 8 g / L
炭酸水素ナトリウム	2 . 2 g / L
Pluronic F-6t8	1 . 2 g / L

【 0 0 4 7 】

細胞を 2 日間、上記の条件の下で成長させた。3 日目からは、供給を開始し、バッチの終わりまで続けた。次の培地コンポーネントは、共通の供給として細胞培養培地に供給した。

【 0 0 4 8 】

成分	1 L あたりの濃度
C H O 基礎粉末培地	1 3 8 . 9 g
インスリン	5 0 m g
液体添加液	1 $\times$ 濃度
クエン酸酸化鉄	1 $\times$ 濃度
ポリエチレングリコール	2 2 0 m g
炭酸水素ナトリウム	1 0 . 8 g

【 0 0 4 9 】

培養の 1 3 及び 1 8 日目の間にバッチを採取した。細胞を浄化した後、アダリムマブを含む上澄みを、次の精製カラム平衡条件と実質的に一致するように再調整した。所望のタンパク質を十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、H P - I E C および C E - L I F により分析した。ここで例示した方法は、任意の所望の抗体のために使用することができる。

【 0 0 5 0 】

実施例 2

アダリムマブについて、3 7 から 3 5 まで温度を低下させることの効果：

実験は 3 0 L の生物反応器内で行った。成長条件は、培養系の温度条件を除いて、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。後期対数期において、培養系の温度を 3 7 から 3 5 に低下させた。アダリムマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、H P - I E C および C E - L I F により分析した。

【 0 0 5 1 】

実施例 3

アダリムマブについて、グルタミン供給の効果：

実験は 3 0 L の生物反応器内で行った。成長条件は、培養系にグルタミンアミノ酸を供給することを除いて、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。2 m M のグルタミンを、細胞増殖の中期対数期で供給を開始し、産生が終了するまで、特定の間隔で続けた。

【 0 0 5 2 】

アダリムマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、H P - I E C および C E - L I F により分析した。

【 0 0 5 3 】

実施例 4

アダリムマブについて、温度の低下およびグルタミン供給の効果：

実験は 30 L の生物反応器内で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。中期対数期の間に、培養系の温度を 37 から 35 に低下させた。その後さらに、対数期から静止期への移行中に、培養系の温度を 33 まで低下させた、3 mM グルタミンの供給は、中期対数期で開始し、所望のモノクローナル抗体の産生が終了するまで、特定の間隔で継続した。

【 0 0 5 4 】

アダリムマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP - IEC および CE - LIF により分析した。

【 0 0 5 5 】

実施例 5

トラスツズマブについて、グルタミンの供給なしで、温度 37 での培養の効果：

実験は、生物反応器中で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。培養系の温度は、バッチ全体を通して 37 に維持した。最初のバッチ培地にグルタミンを供給し、それ以外の追加供給はしなかった。

【 0 0 5 6 】

トラスツズマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP - IEC および CE - LIF により分析した。

【 0 0 5 7 】

実施例 6

トラスツズマブについて、37 から 33 まで温度を低下させることの効果：

実験は、生物反応器中で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。対数期から静止期への移行の間に、培養系の温度を 37 から 33 に低下させた。2 mM グルタミンの供給は、中期対数期で開始し、所望のモノクローナル抗体の産生が終了するまで特定の間隔で継続した。

【 0 0 5 8 】

トラスツズマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP - IEC および CE - LIF により分析した。

【 0 0 5 9 】

実施例 7

ベバシズマブについて、グルタミンを供給せずに 37 から 35 に温度を低下させることの効果：

実験は、30 L の生物反応器（培養フラスコ）中で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。対数期から静止期への移行の間に、培養系の温度を 37 から 35 に低下させた。最初のバッチ培地にグルタミンを供給し、それ以外の追加供給はしなかった。

【 0 0 6 0 】

ベバシズマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP - IEC および CE - LIF により分析した。

【 0 0 6 1 】

実施例 8

ベバシズマブについて、グルタミンを供給し、および、バッチを通して 37 での培養

10

20

30

40

50

の効果：

実験は、生物反応器中で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。培養系の温度は、バッチ全体を通して 37 に維持した。4 mM グルタミンの供給は、中期対数期で開始し、所望のモノクローナル抗体の産生が終了するまで特定の間隔で継続した。

【0062】

ベバシズマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP-IEC および CE-LIF により分析した。

【0063】

10

実施例 9

リツキシマブについて、グルタミンを供給せずに、バッチを通して 37 での培養の効果：

実験は、生物反応器中で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。培養系の温度は、バッチ全体を通して 37 に維持した。最初のバッチ培地にグルタミンを供給し、それ以外の追加供給はしなかった。

リツキシマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP-IEC および CE-LIF により分析した。

【0064】

20

実施例 10

リツキシマブについて、グルタミンを供給し、バッチを通して 37 での培養の効果：

実験は、生物反応器中で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。培養系の温度は、バッチ全体を通して 37 に維持した。4 mM グルタミンの供給は、中期対数期で開始し、所望のモノクローナル抗体の産生が終了するまで特定の間隔で継続した。

【0065】

リツキシマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP-IEC および CE-LIF により分析した。

30

【0066】

実施例 11

トラスツズマブについて、グルタミンを供給し、バッチ全体を通して 37 での培養の効果：

実験は、30 L の生物反応器（200 L の生物反応器）で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。培養系の温度は、バッチ全体を通して 37 に維持した。2 mM グルタミンの供給は、中期対数期で開始し、所望のモノクローナル抗体の産生が終了するまで特定の間隔で継続した。

【0067】

40

トラスツズマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、HP-IEC および CE-LIF により分析した。

【0068】

実施例 12

トラスツズマブについて、グルタミンを供給せずに、37 から 35 まで温度を低下させることの効果：

実験は、30 L の生物反応器（培養フラスコ）で行った。成長条件は、温度条件及びグルタミンを培養系に供給したこと以外は、共通の供給培地および他のプロセスパラメータを含んで実施例 1 と同様であった。対数期から静止期への移行の間に、培養系の温度を 3

50

7 から 35 に低下させた。最初のバッチ培地にグルタミンを供給し、それ以外の追加供給はしなかった。

【 0 0 6 9 】

トラスツズマブを十分なレベルまで精製し、それぞれ表 1 及び表 2 に示すように、電荷変異体およびグリカンプロファイルを、H P - I E C および C E - L I F により分析した。

(結 果)

【 0 0 7 0 】

【 表 1 】

10

表 1 : 様々なモノクローल抗体の電荷変異体について温度の効果

実施例 No.	温度	グルタミンの 供給	電荷変異体		
			主要変異体体 (%)	酸性 アイソフォーム (%)	塩基性 アイソフォーム (%)
実施例 1	37°C	無し	69.92	15.49	14.59
実施例 2	37→35°C	無し	75.37	5.22	19.42
実施例 3	37°C	有り	74.67	10.54	14.80
実施例 4	37°C→35°C→33°C	有り	75.31	7.48	17.16
実施例 5	37°C	無し	75.96	14.33	9.71
実施例 6	37°C→33°C	有り	77.46	11.41	11.11
実施例 7	37°C→35°C	無し	68.53	24.76	6.70
実施例 8	37°C	有り	66.34	14.55	14.35
実施例 9	37°C	無し	69.98	10.53	19.48
実施例 10	37°C	有り	62.43	5.89	31.68
実施例 11	37°C	有り	74.64	17.68	7.67
実施例 12	37°C→35°C	無し	83.79	11.29	4.93

20

30

【 0 0 7 1 】

【表 2】

表 2：様々なモノクローナル抗体のグリカンプロファイルについて、グルタミン供給の効果

実施例 No.	温度	グルタミンの 供給	グリカンプロファイル(%)	
			アガラクトース部分 (G0及びG0F)	ガラクトース部分 (G1F, G1'FおよびG2F)
実施例 1	37℃	無し	69.14	30.86
実施例 2	37℃→35℃	無し	67.36	32.64
実施例 3	37℃	有り	85.46	14.54
実施例 4	37℃→35℃→33℃	有り	75.49	24.51
実施例 5	37℃	無し	69.26	30.74
実施例 6	37℃→33℃	有り	73.76	26.24
実施例 7	37℃→35℃	無し	66.72	23.28
実施例 8	37℃	有り	81.40	18.42
実施例 9	37℃	無し	64.16	35.84
実施例10	37℃	有り	79.00	21.00
実施例11	37℃	有り	65.934	34.065
実施例12	37℃→35℃	無し	51.40	34.103

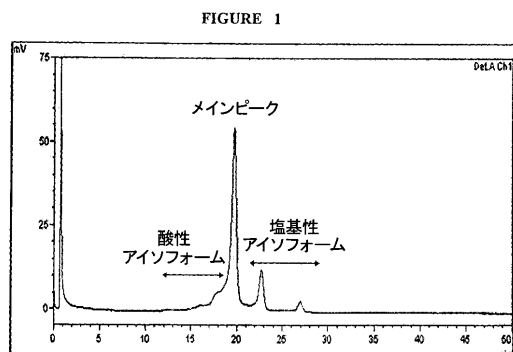
10

20

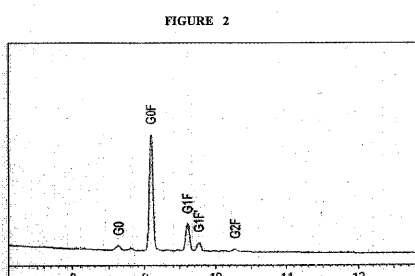
【 0 0 7 2 】

得られた生成物は、続いて精製され、当技術分野で公知の技術により適切に製剤化される。

【図 1】



【図 2】



【手続補正書】

【提出日】平成27年8月6日(2015.8.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修正された細胞培養法を用いて、生物活性に必須であるグリカンおよび/または電荷変異体プロファイルを有する抗体を生産する方法であって、当該方法は以下の：

a) 増殖フェーズから定常フェーズの間、30 ～ 37 の温度条件で、細胞培養条件を維持し、

b) 当該方法の間において、増殖フェーズから定常フェーズの間、同時にまたは連続的に、培地にアミノ酸を添加すること

を含み、ここで、抗体は、抗HER抗体、抗TNF抗体、抗VEGF抗体及び抗CD20抗体から選ばれる、前記方法。

【請求項 2】

細胞培養法が、細胞培養の産生条件を、細胞培養法の間、30 ～ 37 の間の温度で、固定された温度で又は段階的に低下された温度で、維持することにより特徴づけられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

適切な温度条件は、第 1 の温度条件で対数期までの細胞増殖、それに続き第二温度で、そして場合により当該方法の終わりまで第 3 温度条件で細胞培養条件を維持することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 の温度条件は、第 2 の温度よりも、場合により第 3 の温度条件よりも高い温度に維持される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 の温度条件は約 37 であり、第 2 の温度条件、必要に応じて第 3 の温度条件は、35 ～ 30 の範囲である、請求項 2 ～ 5 に記載の方法。

【請求項 6】

細胞培養法の中に、アミノ酸添加を、少なくとも 2 の異なる間隔で行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞培養培地へのアミノ酸の添加を、毎回 10 mM 未満の濃度で行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

アミノ酸は、アミド基含有塩基性アミノ酸、例えば、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

グルコースの濃度を 0.5 g/L ～ 8 g/L、好ましくは 2 g/L ～ 4 g/L の範囲で維持する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムおよび HEPES 緩衝液から選ばれる適切な緩衝剤を用いて、pH を pH 6 ～ pH 7.5 の範囲で維持する、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

細胞の生産性は、0.5 g/L 以上であり、好ましくは 1 ～ 4 g/L である、請求項 1

～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

細胞生存率は少なくとも 30 % 以上、好ましくは約 80 %、より好ましくは 95 % を超えて維持される、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

抗体は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、ベバシズマブ、ラニビズマブおよびリツキシマブから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IN2014/000450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/24 C07K16/22 C07K16/32 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/026445 A1 (WYETH RES IRELAND LTD [IE]; DRAPEAU DENIS [US]; LUAN YEN-TUANG [US]; M) 9 March 2006 (2006-03-09)	1-13
Y	the whole document in particular, pages 14, 32-37, 44-46. figures 15-16	14,15
X	WO 2011/079004 A1 (SCHERING CORP [US]; MERCHANT ANKIT A [US]; TSAO YUNG-SHYENG [US]) 30 June 2011 (2011-06-30)	1,2,5,6, 9-11,13
Y	the whole document in particular, pages 5, 30-22 and 39	14,15
X	WO 2011/134919 A2 (NOVARTIS AG [CH]; JOOSTEN CHRISTOPH E [CH]; LEIST CHRISTIAN [CH]; SCHM) 3 November 2011 (2011-11-03)	1,2,5,6
	the whole document in particular, pages 5-7	
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2014

Date of mailing of the international search report

08/12/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IN2014/000450

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JENG-DAR YANG ET AL: "Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 69, no. 1, 5 July 2000 (2000-07-05), pages 74-82, XP002619089, ISSN: 0006-3592 [retrieved on 2000-05-15] the whole document in particular pages 75 and 76 -----	1,2,5,6
Y	WO 2011/085095 A2 (REDDYS LAB LTD DR; REDDYS LAB INC DR; SATAKARNI MAKAPATI; VAIBHAV S N) 14 July 2011 (2011-07-14) the whole document in particular, page 6 -----	14,15
A	WO 02/076578 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; DEVRIES RUTH L [US]; VICKROY THOMAS B [U]) 3 October 2002 (2002-10-03) the whole document in particular, pages 4-6 -----	1-15
A	AU 2011 350 456 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 4 July 2013 (2013-07-04) the whole document in particular, pages 3-7. -----	1-15
A	SIMONE M SCHATZ ET AL: "Higher Expression of Fab Antibody Fragments in a CHO Cell Line at Reduced Temperature", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, WILEY & SONS, HOBOKEN, NJ, US, vol. 84, no. 4, 20 November 2003 (2003-11-20), pages 433-438, XP007912785, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.10793 [retrieved on 2003-09-11] the whole document -----	1-15
A	SATOSHI OGUCHI ET AL: "pH Condition in temperature shift cultivation enhances cell longevity and specific hMab productivity in CHO culture", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 52, no. 3, 8 March 2007 (2007-03-08), pages 199-207, XP019499827, ISSN: 1573-0778, DOI: 10.1007/S10616-007-9059-2 the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IN2014/000450

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006026445 A1	09-03-2006	AR 086932 A2 AU 2005280034 A1 BR P10514703 A CA 2578141 A1 CN 101048511 A CN 102827905 A CR 8997 A EC SP077353 A EG 26462 A EP 1789571 A1 EP 2357250 A2 JP 4864892 B2 JP 2008511329 A KR 20070085220 A KR 20110036780 A SG 158092 A1 SG 190674 A1 TW I384069 B US 2006121568 A1 WO 2006026445 A1	29-01-2014 09-03-2006 24-06-2008 09-03-2006 03-10-2007 19-12-2012 28-08-2007 30-05-2007 13-11-2013 30-05-2007 17-08-2011 01-02-2012 17-04-2008 27-08-2007 08-04-2011 29-01-2010 28-06-2013 01-02-2013 08-06-2006 09-03-2006
WO 2011079004 A1	30-06-2011	AR 079707 A1 EP 2516624 A1 US 2012264170 A1 WO 2011079004 A1	15-02-2012 31-10-2012 18-10-2012 30-06-2011
WO 2011134919 A2	03-11-2011	AU 2011246502 B2 CA 2795461 A1 CN 102858954 A EP 2563906 A2 JP 2013524824 A KR 20130094723 A RU 2012150283 A SG 185014 A1 US 2013130316 A1 WO 2011134919 A2	28-08-2014 03-11-2011 02-01-2013 06-03-2013 20-06-2013 26-08-2013 10-06-2014 29-11-2012 23-05-2013 03-11-2011
WO 2011085095 A2	14-07-2011	EP 2521787 A2 US 2013210075 A1 WO 2011085095 A2	14-11-2012 15-08-2013 14-07-2011
WO 02076578 A1	03-10-2002	AU 2002256005 A1 EP 1373547 A1 JP 2005509403 A WO 02076578 A1	08-10-2002 02-01-2004 14-04-2005 03-10-2002
AU 2011350456 A1	04-07-2013	AU 2011350456 A1 CA 2822947 A1 CN 103282509 A EP 2660328 A1 KR 20130131415 A SG 191371 A1 US 2013295613 A1 WO 2012091124 A1	04-07-2013 05-07-2012 04-09-2013 06-11-2013 03-12-2013 30-08-2013 07-11-2013 05-07-2012

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100166165
弁理士 津田 英直

(72)発明者 サンジープ クマール メンディラッタ
インド国, グジャラート, アーメダバード 380015, サテライト クロス ローズ, ザイダ
ス タワー, カディラ ヘルスケア リミティド

(72)発明者 サンジェイ バンディオパディアイ
インド国, グジャラート, アーメダバード 380015, サテライト クロス ローズ, ザイダ
ス タワー, カディラ ヘルスケア リミティド

(72)発明者 サンジェイ パテル
インド国, グジャラート, アーメダバード 380015, サテライト クロス ローズ, ザイダ
ス タワー, カディラ ヘルスケア リミティド

Fターム(参考) 4B064 AG27 BJ10 CA10 CA19 CC06 CC09 CD13 DA01
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 BC03 BD33 CA25 CA44