

(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2015-531244

(P2015-531244A)

(43) 公表日 平成27年11月2日 (2015.11.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

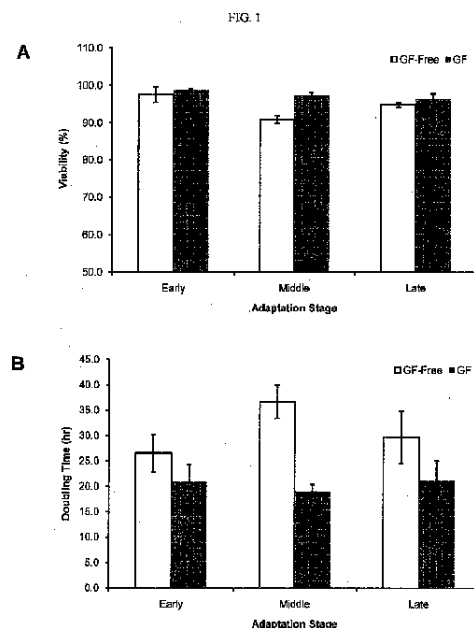
(21) 出願番号	特願2015-536976 (P2015-536976)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成25年10月14日 (2013.10.14)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月20日 (2015.5.20)		BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/064758		アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロビンス・ライン・ロード
(87) 国際公開番号	W02014/062535	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成26年4月24日 (2014.4.24)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	61/713,812	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成24年10月15日 (2012.10.15)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	61/888,647		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成25年10月9日 (2013.10.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質を製造するための哺乳動物細胞培養方法

(57) 【要約】

本発明は、動物細胞または哺乳動物細胞培養によりタンパク質を製造するための方法およびプロセスを記載する。ある局面において、該方法は成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中での細胞増殖を含む。別の局面において、該方法は製造段階中、成長因子を添加することを含む。該方法は、培養細胞の高生存率を維持し、タンパク質生成物の最終力価の増加と高品質のタンパク質生成物をもたらすことができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) タンパク質の生産を可能にする細胞培養条件下で成長因子、タンパク質、およびペプチド不含培地中でCHO細胞を培養し、
b) 該細胞に1またはそれ以上の成長因子をフィードすることを含むタンパク質を製造するための細胞培養方法

【請求項 2】

該フィード工程b)を1日1回行う請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項 3】

該フィード工程b)を連続的に行う請求項1記載の細胞培養方法。

10

【請求項 4】

該フィード工程b)を1日1回より多く行う請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項 5】

該フィード工程b)を1日1回より少なく行う請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項 6】

該成長因子を、基礎培地もしくはフィード培地に、または接種後いつでもボーラスとして加える請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項 7】

該成長因子をフィード培地中の該細胞にフィードする請求項6記載の細胞培養方法。

【請求項 8】

該成長因子が、インスリン、上皮成長因子(EGF)、インスリン様成長因子(IGF)、形質転換成長因子 α (TGF- α)、bFGF、およびPDGFからなる群から選ばれる請求項1～7に記載の細胞培養方法。

20

【請求項 9】

該成長因子がインスリンであり、該フィード培地が約1 μ g/L～10mg/Lの量のインスリンを含む請求項7記載の細胞培養方法。

【請求項 10】

該成長因子がインスリンであり、該インスリン濃度を細胞培養中1 μ g/L～10mg/Lの濃度に維持する請求項6記載の細胞培養方法。

【請求項 11】

末期細胞生存率が成長因子含有培地で増殖した細胞の末期細胞生存率に比べて増加している請求項1記載の細胞培養方法。

30

【請求項 12】

タンパク質力価が成長因子含有培地で増殖した細胞のタンパク質力価に比べて増加している請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項 13】

タンパク質凝集が成長因子含有培地で増殖した細胞のタンパク質凝集に比べて減少している請求項1記載の細胞培養方法。

【請求項 14】

- a) aCD40Lの生産を可能にする細胞培養条件下、成長因子、タンパク質、およびペプチド不含培地中でCHO細胞を培養し、
b) 該細胞に1またはそれ以上の成長因子をフィードすることを含む可溶性aCD40L融合タンパク質を製造するための細胞培養方法。

40

【請求項 15】

- a) ミオスタチンの生産を可能にする細胞培養条件下、成長因子、タンパク質、およびペプチド不含培地中でCHO細胞を培養し、
b) 該細胞に1またはそれ以上の成長因子をフィードすることを含む可溶性ミオスタチン融合タンパク質を製造するための細胞培養方法。

【請求項 16】

- a) CTLA4Igの生産を可能にする細胞培養条件下、成長因子、タンパク質、およびペプチ

50

ド不含培地中でCHO細胞を培養し、

b)該細胞に1またはそれ以上の成長因子をフィードする

ことを含む可溶性CTLA4Ig融合タンパク質を製造するための細胞培養方法。

【請求項17】

タンパク質の生産を可能にする細胞培養条件下、成長因子、タンパク質、およびペプチド不含培地中でCHO細胞を培養することを含むタンパク質を製造するための細胞培養方法。

【請求項18】

末期細胞生存率が成長因子含有培地で増殖した細胞の末期細胞生存率に比べて増加している請求項17記載の細胞培養方法。

【請求項19】

タンパク質力価が成長因子含有培地で増殖した細胞のタンパク質力価に比べて増加している請求項17記載の細胞培養方法。

【請求項20】

タンパク質凝集が成長因子含有培地で増殖した細胞のタンパク質凝集に比べて減少している請求項17記載の細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質生成物を生産する哺乳動物細胞の新規培養方法に関する。該細胞培養方法の実施は、高い細胞生存率および/または細胞密度をもたらす、高い生成物の品質と生産性ももたらすことができる。

【背景技術】

【0002】

動物細胞培養、特に哺乳動物細胞培養は、好ましくは、治療および/または予防的に適用する組換え生成タンパク質の発現に使用される。

【0003】

一般的に、哺乳動物細胞培養ベースの系のタンパク質発現レベルは、微生物発現系（例えば細菌または酵母発現系）より著しく低い。しかしながら、細菌および酵母細胞は、高分子量タンパク質生成物を最適に発現し、複雑な立体構造を有するタンパク質を適切にホールドし、および/または必要な翻訳後修飾により発現糖タンパク質を成熟させる能力が限られているため、該生成物の免疫原性およびクリアランス速度に影響を及ぼす。

【0004】

動物または哺乳動物細胞、特に組換え生成物を生成する動物または哺乳動物細胞の培養に制限があるため、大規模培養容器の使用；基本培養条件（例えば、インキュベーション温度、溶存酸素濃度、pHなど）の変更；種々の種類の培地および該培地への添加物の使用；および培養細胞密度の増加を含む種々のパラメーターの操作が検討されてきた。さらに、哺乳動物細胞培養方法の開発は、実施時間を延ばす能力を向上させ、生成物の高い品質を維持したまま最終生成物濃度を増加させるという恩恵があるだろう。細胞培養方法、特に非連続方法の実施時間は、通常、典型的には実施の過程で低下する細胞の残存生存率により制限される。したがって、生成物の品質を維持したまま高い細胞生存率を可能な限り延ばすことが望ましい。タンパク質精製の問題は、生存細胞密度の低下を最小限にし、高い細胞生存率を維持するためのさらに別の動機を与える。培養中の細胞デブリの存在と死細胞の含有量は、培養実施終了時のタンパク質生成物の単離および/または精製する能力に悪影響を与えうる。培養中の細胞の生存性をより長時間維持することにより、該細胞が生産する目的タンパク質の分解と品質の最終的低下をもたらさうる細胞性タンパク質および酵素による培養液中の夾雑が同時に減少する。

【0005】

細胞培養中の高い細胞生存率を達成するために種々のパラメーターが検討されてきた。あるパラメーターは、37℃の初期培養後に培養温度を1回下げることを含んだ（例えば、R

10

20

30

40

50

oessler et al., Enzyme and Microbial Technology, 18:423-427 (1996) ; 米国特許No. 5,705,364および5,721,121 (Etcheverry, T. et al. (1998)) ; 米国特許No. 5,976,833 (Furukawa, K. et al. (1999)) ; 米国特許No. 5,851,800 (Adamson, L. et al.) ; WO 99/61650およびWO 00/65070 (Genentech, Inc.) ; WO 00/36092 (Biogen, Inc.) ; および米国特許No. 4,357,422 (Girard et al.)) 。

【0006】

検討した他のパラメーターは、培養への成分の添加を含んだ。CHO 111-10PF細胞株にデキストラン硫酸およびポリビニル硫酸を添加すると、コントロール培養に比べて第3日の生存細胞密度および生存率が増加することがわかった(Zhang et al., Biotechnol. Prog., 16:319-325 (2000))。しかしながら、死滅期におけるデキストラン硫酸またはポリビニル硫酸の効果は報告されなかった。デキストラン硫酸およびポリビニル硫酸は細胞凝集を防ぐのに有効であることも報告された。

10

【0007】

タンパク質療法は、生物学的生成物の大きさ、構造の複雑さ、および性質により本質的に異種性である(Chirino et al., Nat. Biotechnol., 22:1383-1391 (2004))。「純粋な」タンパク質溶液でも、ある割合の低分子量断片、高分子量種、および種々の程度の化学修飾があるだろう。高分子量種の形成は、通常、タンパク質凝集によるものであり、これは生物製剤の製造中にみられる一般的問題である。典型的には、凝集物は投与すると免疫反応を生じるか、有害事象を引き起こしうるため、凝集物の存在は望ましくないと考えられる(Cromwell et al., AAPS J., 8:E572-E579 (2006))。生物製剤のある種の凝集物は正常に機能しうるが、生成物の一貫性は規制機関の承認に必須であるため生成物の品質の一貫性を維持することは依然として重要である。

20

【0008】

タンパク質の凝集物は、種々のメカニズムから生じ、製造工程中の各段階で生じうる。細胞培養において、分泌タンパク質は、タンパク質の安定性に望ましくない条件に曝されうるが、よりしばしば、大量のタンパク質の蓄積は、アンホールドタンパク質分子の相互作用によるか、または適切なホールディングを担う分子シャペロンによる初期ペプチドの非効率な認識により細胞内凝集をもたらし得る(Cromwell et al., AAPS J., 8:E572-E579 (2006))。細胞の小胞体(ER)中で新たに合成されたタンパク質のジスルフィド結合は酸性環境で形成される。正常条件下で、タンパク質スルフィドリルは可逆的に酸化されてタンパク質ジスルフィドおよびスルフェン酸になるが、より高度に酸化された状態、例えばスルフィン酸型およびスルホン酸型のタンパク質システインは不可逆的である(Thomas et al., Exp. Gerontol., 36:1519-1526 (2001))。過酸化タンパク質は、正しくないジスルフィド結合を含むか、または他の管腔ERタンパク質との混合ジスルフィド結合を有することがあり、いずれの場合もタンパク質の不適切なホールディングと凝集をもたらし得る。したがって、ERにおける適切に調節された酸化環境を維持することが極めて重要である。これに関して、Cuzzo et al. (Nat. Cell Biol., 1:130-135 (1999))は、酵母でグルタチオンがER過酸化に対して緩衝することを最初に証明し、後にChakravarthi et al. (J. Biol. Chem., 279:39872-39879 (2004))は、哺乳動物細胞ではグルタチオンが分泌経路に入るタンパク質内の天然ジスルフィド結合の形成を調節するのに必要であることを確認した。

30

40

【0009】

培養中の生成物濃度の増加に伴い、細胞培養プロセスで生成物の品質の低下がみられる可能性がある。培養中で細胞が生成した大量のタンパク質は、目的とする用途のために最終的に回収されるタンパク質の高品質を最適に伴う。

【0010】

組換え生成されたタンパク質生成物は、療法薬、治療薬、および予防薬として用いるのに医薬的および臨床的にますます重要になってきている。したがって、経済的および効率的に最終タンパク質生成物濃度の増加と高レベルの生成物の品質を達成する信頼できる細胞培養方法の開発は当該分野で望ましい必要な目的を満たす。

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、動物または哺乳動物細胞培養によるタンパク質の新規製造法を提供する。該新規方法は、生存細胞密度、細胞生存率、生産性の増加とタンパク質凝集の減少を達成する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明のある局面は、該培養プロセスによる成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中の細胞の増殖に関する。この局面において、本発明の細胞培養方法は、培養した細胞が生産したタンパク質の比生産性の増大を好都合に達成することができる。より具体的には、本発明によれば細胞培養期中に利用する成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地は、培養中の細胞の高い細胞生存率を維持し、全培養操作を通して生産された生成物の高い品質と量をもたらすことができる。また、本発明のある局面において、該培養プロセス中に利用する成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地は、好都合に培養の生産期の延長を可能にすることができる。延長された生産期中、目的とする生成物の力価は増加し、生成物の品質は高レベルに維持され、タンパク質凝集レベルは低レベルに維持され、細胞生存率も高レベルに維持される。さらに、本発明の培養方法と関連した延長された生産期は、標準的生産期中に生産される以上の生成物の生産を可能にする。

【0013】

本発明の別の局面は、接種後の成長因子/タンパク質/ペプチド不含細胞培養への1またはそれ以上の成長因子の添加に関する。本発明によれば、接種後の成長因子/タンパク質/ペプチド不含細胞培養への1またはそれ以上の成長因子の添加は、該培養中の細胞の高細胞生存率を維持し、全培養操作を通して生産された生成物の高い品質と量をもたらすことができる。成長因子フィード細胞培養の生産期中、目的生成物の力価は増加し、生成物の品質は高レベルに維持され、タンパク質凝集レベルは低レベルに維持され、細胞生存率も高レベルに維持される。

【0014】

ある特定の局面において、本発明は、タンパク質凝集レベルがフィード培地にインスリンおよび/またはIGFを添加することにより低下するプロセス（または方法）を提供する。この特定の局面では、インスリンおよび/またはIGFの添加は培養の高細胞生存率を維持し、それにより生成物、好ましくは組換え生成物の力価が増加し、生成物の品質が高レベルに維持される。

【0015】

本発明のある局面において、1またはそれ以上の成長因子は、接種時または初期死滅期が始まる前かまたは初期増殖期中、または初期増殖期の後半中、または初期増殖期の終了時もしくはほぼ終了時である接種後のある時に培養に添加される。本発明のこの局面では、該増殖期は延長され、および/または死滅期の開始は一定期間（例えば数日間）遅くなる。

【0016】

本発明のさらなる局面、特徴、および利点は、本発明の詳細な説明を読み、図面を考慮すれば分かるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1Aおよび1Bは、CHO細胞(クローンA)の成長因子(GF)不含培地における増殖への適用を示す。実施例1に記載のように、細胞を成長因子(GF)含有(黒色バー；GF)または不含(白色バー；GF不含)培地で3または4日間毎に継代した。種々の適用期での(A)細胞生存率および(B)倍加時間。初期：継代1～4；中期：継代5～8；後期：継代9～12。

【図2】クローンBの生存細胞密度(VCD)、生存率(%)および倍加時間。本試験に用いたCHO細胞株は、最初にDG44親細胞からサブクローンされ、実施例1に記載のごとく成長因子/タンパク質/ペプチド不含基礎培地(GF不含)または成長因子(GF)インスリン含有基礎培地

中で培養した。

【図 3】クローンA細胞を実施例2に記載のごとくインスリン含有(INS)および不含(INS-F)で増殖させた時のmTOR経路からのタンパク質の発現/リン酸化の変化を示す。

【図 4】図4A～Dは、実施例3に記載のごとく1mg/Lインスリン含有基礎培地および10mg/L含有フィード培地(INS)またはインスリン不含基礎もしくはフィード培地(INS不含)で増殖したクローンAの生存細胞密度(VCD)、生存率(%)、aCD40Lタンパク質力価、aCD40Lモノマーパーセントを示す。

【図 5】図5A～Dは、フェドバッチ培養アプローチを用いて評価したクローンAの種々の世代のGF不含およびGF細胞のポピュレーション倍加を示す。実施例3に記載のごとくフェドバッチ培養についてピーク生存細胞密度(A)、末期生存率(B)、正規化タンパク質力価(C)、および正規化比生産性(D)を含む因子を比較した。GF不含細胞は、GF細胞に比べて比較的安定して因子を維持したことに留意せよ。

【図 6】図6A～Dは、GF不含培養が、クローンBについて末期生存率とタンパク質力価を改善し、高分子種を減少させたことを示す。成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリンに曝された細胞(GF)と同様の継代数であった。GF不含およびGF細胞を実施例3に記載したのと同様の方法に従ってフェドバッチ法で培養した。用いた基礎培地およびフィード培地は既知組成であった。フェドバッチ培養法における第14日の(A)ピーク生存細胞密度(ピークVCD)、(B)末期細胞生存率、および(C)正規化タンパク質力価。(D)培養終了時(第14日)にGF不含およびGF細胞から生産されたタンパク質の総高分子種(HMW)。

【図 7】図7A～Cは、クローンCについてGF不含培養で細胞増殖、末期生存率、およびタンパク質力価が改善したことを示す。成長因子不含培地中での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリンに曝された細胞(GF)と同様の継代数であった。GF不含およびGF細胞を実施例3に記載したのと同様の方法に従ってバッチ法で培養した。培養に用いた培地は既知組成であった。バッチ培養法の(A)ピーク生存細胞密度(ピークVCD)、(B)末期細胞生存率、および(C)正規化タンパク質力価。

【図 8】図8A～Dは、クローンDについてGF不含培養で末期生存率が改善し、高分子種が減少したことを示す。成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリンに曝された細胞(GF)と同様の継代数であった。GF不含およびGF細胞を実施例3に記載したのと同様の方法に従ってフェドバッチ法で培養した。培養に用いた基礎培地およびフィード培地は既知組成であった。フェドバッチ培養法における第14日の(A)ピーク生存細胞密度(ピークVCD)、(B)末期細胞生存率、および(C)正規化タンパク質力価。(D)培養終了時(第14日)にGF不含およびGF細胞から生産されたタンパク質の総高分子種(HMW)。

【図 9】図9A～Dは、クローンBについてGF不含培養にGFを加え戻すと細胞増殖、末期生存率、およびタンパク質力価が改善したことを示す。成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリンに曝された細胞(GF)と同様の継代数であった。GF不含およびGF細胞を実施例4に記載のGF含有または不含の既成組成の基礎およびフィード培地中、フェドバッチ法で培養した。GF不含：細胞培養液中にGFが存在しなかった；GF不含+INS：1mg/Lインスリン含有基礎培地および10mg/Lインスリン含有フィード培地で培養したGF不含細胞；同様にGF不含+LR3：基礎培地中4μg/L LONG(登録商標)R3(LR3)、フィード培地中40μg/L LR3；GF：基礎培地中1mg/Lインスリンおよびフィード培地中10mg/Lインスリン；GF+LR3：基礎培地中1mg/Lインスリンおよび4μg/L LR3およびフィード培地中10mg/Lインスリンおよび40μg/L LR3。前記条件下でフェドバッチ法で培養した細胞の(A)ピーク生存細胞密度(ピークVCD)、(B)末期細胞生存率、および(C)正規化タンパク質力価。(D)培養終了時(第14日)に示した条件下で生産されたタンパク質の総高分子種(HMW)。

【図 10】図10A～Cは、クローンCにおいてGF不含培養にGFを加え戻すと細胞増殖、末期生存率、およびタンパク質力価が改善されたことを示す。成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリンに曝された細胞(GF)と同様の継代数であった。GF不含およびINS細胞を、実施例4に記載のごとくフェドバッチ法でGF含有または不含の既成組成の基礎およびフィード培地で培養した。GF不含+INS：GF不含細胞を1mg/Lインスリン

10

20

30

40

50

含有基礎培地および10mg/Lインスリン含有フィード培地で培養した；同様にGF不含+INS+LR3：基礎培地中1mg/Lインスリンおよび4 μ g/L LR3、およびフィード培地中10mg/Lインスリンおよび40 μ g/L LR3；GF+INS+LR3：GF細胞を基礎培地中1mg/Lインスリンおよび4 μ g/L LR3、およびフィード培地中10mg/Lインスリンおよび40 μ g/L LR3の存在下で培養した。前記条件下、フェドバッチ法で培養した細胞の(A)ピーク生存細胞密度(ピークVCD)、(B)末期細胞生存率、および(C)正規化タンパク質力価。

【図11】図11A~Cは、クローンCについて低GF濃度の培養にGFを加え戻すと末期生存率が改善され、細胞増殖およびタンパク質力価が維持されたことを示す。低インスリン濃度(0.01mg/L；低INS)の培地での増殖に適応した細胞は、常に高インスリン濃度(1mg/L；高INS)の同じ培地で培養した細胞と同じ継代数であった。実施例4の記載と同じフェドバッチ法を用いて低INS細胞を0.01mg/Lインスリン含有基礎培地および10mg/Lインスリン含有フィード培地で培養し、高INS細胞を1mg/Lインスリン含有基礎培地および10mg/Lインスリン含有フィード培地で培養した。前記条件下で培養した細胞の(A)ピーク生存細胞密度(ピークVCD)、(B)末期細胞生存率、および(C)第14日の正規化タンパク質力価。

10

【図12】図12A~Cは、クローンDについてGF不含培養にGFを加え戻すと末期生存率およびタンパク質力価が改善されたことを示す。成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリン(1mg/L；GF)に曝されていると同じ継代数であった。GF不含およびGF細胞を、実施例4に記載のごとくフェドバッチ法でGF含有または不含の既成組成の基礎およびフィード培地中で培養した。GF不含+INS+LR3：GF不含細胞をGF不含基礎培地および10mg/Lインスリンおよび40 μ g/L LONG（登録商標）R3（LR3）含有フィード培地中で培養した；同様にGF+INS+LR3：GF細胞を基礎培地中1mg/Lインスリン、およびフィード培地中10mg/Lインスリンおよび40 μ g/L LR3の存在下で培養した。前記条件で培養した細胞の(A)ピーク生存細胞密度（ピークVCD）、(B)末期細胞生存率、および(C)第14日の正規化タンパク質力価。

20

【図13】図13A~Dは、GFを加え戻す戦略は同様の方法での成績を得るのに必要なGF濃度を最小限にすることを示す。クローンB成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、実施例4に記載のごとく常にインスリン(1mg/L；GF)に曝されている細胞と同じ継代数であった。同じ方法で、GF不含細胞を種々の濃度のインスリンを含む既成組成の基礎培地中でフェドバッチ法で培養した：0mg/L（GF不含）、0.002mg/L（GF不含+2 μ g/L）、0.1mg/L（GF不含+100 μ g/L）、または1mg/L（GF不含+1000 μ g/L）。GF細胞を1mg/Lインスリン含有基礎培地中で培養した。フィード培地中のインスリン濃度は、対応する条件の基礎培地の10倍である。前記条件で培養した細胞の(A)ピーク生存細胞密度（ピークVCD）、(B)末期細胞生存率、(C)正規化タンパク質力価（第14日）、および(D)正規化比生産性(Qp)。

30

【図14】図14A~Dは、種々のGFをGF不含培養に加え戻し、細胞増殖およびタンパク質力価を増加させることができることを示す。クローンB細胞は、実施例4に記載のごとく成長因子不含培地(GF不含)中での増殖に適応した。適応GF不含細胞を種々のGF（4 μ g/L）含有または不含(GF不含)の既成組成の基礎およびフィード培地中でフェドバッチ法で培養した。bFGF：塩基性繊維芽細胞成長因子；PDGF-bb：血小板由来成長因子、2B鎖；INS：インスリン；LR3：LONG（登録商標）R3、組換えIGF1類似体。フィード培地のGF濃度は、対応する条件の基礎培地の5倍である。前記条件で培養した細胞の(A)ピーク生存細胞密度（ピークVCD）、(B)末期細胞生存率、(C)正規化タンパク質力価（第14日）、および(D)正規化比生産性(Qp)。

40

【図15】図15A~Bは、GF加え戻し戦略がクローンCについてプロセスロバスト性を改善したことを示す。成長因子不含培地での増殖に適応した細胞(GF不含)は、常にインスリン(1mg/L；GF)に曝された細胞と同じ継代数であった。GF不含およびINS細胞を実施例4に記載のごとくフェドバッチ法で既成組成の基礎およびフィード培地中で培養した。GF不含細胞用の基礎培地はGF不含であり、INS細胞用のものは1mg/Lインスリンを含有した。種々のフィーディング容量を各条件について第3日から毎日適用した：FV1：フィーディング容量(FV)初期容量の3.6%；FV2：4.3%；およびFV3：5%。フィード培地は各条件でインスリンおよびLR3の両方を含んだ。FV1ではインスリンが10mg/L、LR3が42 μ g/Lであった。FV2

50

およびFV3のインスリンおよびLR3濃度を、同量（グラム）のインスリンおよびLR3を培養容器に加えるために調節した（フィーディング容量は異なる）。前記条件で培養した細胞の(A)第14日の正規化タンパク質力価および(B)正規化末期生存率。GF不含細胞は、方法の混乱（フィーディング容量の増加）に対して比較的安定に末期生存率およびタンパク質力価を維持したことに留意のこと。

【図16】実施例5に記載のごとく接種後、成長因子インスリン(INS)および/またはLONG（登録商標）R3（LR3）を基礎およびフィード培地に加え戻した5Lリアクター中で増殖したクローンBの生存細胞密度(VCD)、生存率（%）、aCD40Lタンパク質力価、aCD40L高分子量(HMW) %を示す。

【0018】

本発明は、哺乳動物または動物細胞培養を用いるタンパク質、好ましくは組換えタンパク質生成物の新規製造方法について説明する。該方法は、生存細胞密度、細胞生存率、生産性の増加とタンパク質凝集の減少を達成する。

【0019】

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、組換え療法薬の製造に用いる主な細胞種の一つである。既成組成の細胞培養液を用いてCHO細胞でそのような療法薬を大規模に製造するには、細胞増殖と生産性を促進するために成長因子(GF)が広く用いられる。しかしながら、成長因子の使用は、製造コストを著しく増加させるだけでなく、成長因子からの細胞への複雑なシグナル伝達によりプロセス性能およびロバスト性に影響を及ぼす可能性がある。

【0020】

下記表に本発明を例示するのに用いたクローンを記載する。各クローンは、融合タンパク質を発現するDHFR選択系を有するCHO細胞株である。

【表1】

	A	B	C	D
クローン	40A6	63C2	D7	Aba
分子	融合タンパク質-1	融合タンパク質-1	融合タンパク質-2	融合タンパク質-3
細胞株	CHO	CHO	CHO	CHO
選択系	DHFR	DHFR	DHFR	DHFR

【0021】

成長因子不含細胞培養条件下で増殖した細胞

本発明のある態様は、成長因子からのシグナル伝達がCHO細胞培養において除去されることを示す。実施例1は、ドメイン融合抗体を発現する2つの異なるジヒドロ葉酸還元酵

素(DHFR)クローンを9継代以下で成長因子不含(GF不含)培地中で連続培養すると該培地に適応させることができることを示す(図1および2参照)。興味深いことに、実施例2に示すように細胞増殖とタンパク質生産を調節するmTOR経路では、mTOR経路に含まれる138タンパク質を標的とする抗体アレイが示すように成長因子除去による影響はわずかであった(図3生産)。

【0022】

実施例3に記載のフェドバッチ培養の生産分析により、GF不含条件ではピーク生存細胞密度がGF条件の 13.0×10^6 細胞/mlから 15.7×10^6 細胞/mlに増加し、培養後期の細胞生存率が第8日にGF条件の59.4%から96.2%に第14日に35.6%から65.1%に改善することがわかった。その結果、タンパク質力価は80.9%増加した。さらに、タンパク質品質はGF不含条件下で向上し、高分子種がGF条件の14.3%から4.8%に減少した(図4参照)。

10

【0023】

さらに、図5~8は、細胞の生産安定性が異なる3クローンにおいてGF不含条件下で改善したことを示す。生産性は細胞をGF条件下で培養した後に低下したが、GF不含条件下で培養した細胞は生産性を維持した。

【0024】

全体として本発明者らの結果は、タンパク質およびペプチド不含既成組成培地はCHO細胞を増殖させ、GF条件と同等の生産性をもたらし、クローンの生産安定性の維持を改善することができることを示す。

【0025】

成長因子不含条件で増殖する細胞では、培養後期の細胞生存率が増加し、タンパク質力価が増加し、目的とするタンパク質の凝集が減少することが分かった(図4、6、7、および8参照)

20

【0026】

したがって、他の態様において、本発明は、目的とするタンパク質を発現する宿主細胞を成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中で培養することを含む培養後期の細胞生存率を増加させる細胞培養方法であって、該末期細胞生存率が成長因子/タンパク質/ペプチド含有培地で増殖した細胞の末期細胞生存率に比べて増加する方法に関する。

【0027】

別の態様において、本発明は、目的とするタンパク質を発現する宿主細胞を成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中で培養することを含む目的とするタンパク質の生産を増加させる細胞培養方法であって、タンパク質力価が成長因子/タンパク質/ペプチド含有培地で増殖した細胞のタンパク質力価に比べて増加する方法に関する。

30

【0028】

別の態様において、本発明は、目的とするタンパク質を発現する宿主細胞を成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中で培養することを含むタンパク質凝集の割合を減少させるための細胞培養方法であって、高分子量種の割合が成長因子/タンパク質/ペプチド含有培地で増殖した細胞の高分子量種の割合に比べて減少する方法に関する。

【0029】

成長因子不含細胞培養条件への成長因子の加え戻し

40

ある態様において、本発明は、目的とするタンパク質を発現する宿主/接種細胞を成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中で培養し、生産細胞培養に1またはそれ以上の成長因子を加えることを含む細胞培養方法に関する。

【0030】

成長因子は、細胞の増殖と細胞の分化を刺激することができる天然物質である。通常、成長因子はタンパク質またはステロイドホルモンである。成長因子は、種々の細胞プロセスの調節に重要である。成長因子は、典型的には細胞のシグナル伝達分子として作用する。成長因子は、細胞の分化と成熟を促すことが多い(成長因子間で異なる)。

【0031】

本発明の細胞培養方法に有用な成長因子には、限定されるものではないが以下のものが

50

含まれる：インスリン(GIBCO（登録商標）rHu AOFインスリン、Biocon)、血小板由来成長因子 (PDGF)、塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF)、上皮成長因子 (EGF) (LONG（登録商標）EGF、RepliGen Bioprocessing)、インスリン様成長因子 (IGF) (LONG（登録商標）R3IGF-1、RepliGen Bioprocessing)、形質転換成長因子 α (TGF- α) (LONG（登録商標）TGF- α 、RepliGen Bioprocessing)、エリスロポイエチン、ステロイド、血清、神経成長因子 (NGF)、繊維芽細胞成長因子 (FGF)、およびコロニー刺激因子(CSF)。該化合物は、記載した供給源から容易利用可能であるか、当業者に知られた手段により容易に得ることができる。

【0032】

ある態様において、該成長因子には、限定されるものではないが、インスリンおよび/またはインスリン様成長因子(IGF)が含まれる。

10

【0033】

本発明のある態様において、成長因子は接種時に加えられるかまたは基礎培地の成分でありうる。接種は第0日に行う。

【0034】

本発明のある態様において、成長因子は接種後のある時に加えられ、基礎培地中に存在せず、接種時に存在しない。ある特定の態様において、成長因子は、培養の第1日またはそれ以後に加えられる。

【0035】

本発明によれば、成長因子は、特定の期間中に1回、2回、3回、またはあらゆる回数、細胞培養に加えることができる。1またはそれ以上の成長因子を同時に用いることができる。すなわち、成長因子のあらゆる該単回添加には、1またはそれ以上の他の成長因子の添加を含み得る。同様に、成長因子を2以上添加する場合は、異なる成長因子を異なる条件で加えることができる。成長因子を含むさらなる化合物および物質は、成長因子添加の前または後または添加時に（特定期間中または期間外に）該培養に加えることができる。特定の態様において、成長因子は、接種後に基礎培地と共に加えられる。別の態様において、成長因子はフィード培地と共に加えられる。別の特定の態様において、1つの成長因子を加える。

20

【0036】

本発明によれば、成長因子はあらゆる方法により細胞培養に加えることができる。成長因子を加える方法には、限定されるものではないが以下のものが含まれる：水に溶解する、酸に溶解する、基礎培地に溶解する、フィード培地に溶解する、適切な培地に溶解する、溶解物が得られる形、またはそのあらゆる組み合わせ。

30

【0037】

本発明のある態様において、インスリンは溶液として加えられる（インスリンを1M HCLに溶解し、次いでさらに使用するために水で希釈する（すなわち、例えばインスリンをフィード培地に加える））。

【0038】

本発明のある態様において、成長因子を加えて培養中の濃度を適切なレベルにする。非限定的例として、インスリンを加えて濃度を $1\mu\text{g/L}$ ～ 10mg/L に維持する。本発明の別の態様において、インスリンを加えて濃度を $4\mu\text{g/L}$ ～ 10mg/L に維持する。本発明のさらに別の態様において、インスリンを加えて濃度を $40\mu\text{g/L}$ ～ 10mg/L に維持する。

40

【0039】

本発明のある態様において、成長因子を約 $1\mu\text{g/L}$ ～ 10mg/L の量で基礎培地に加える。本発明の別の態様において、成長因子を約 $1\mu\text{g/L}$ ～ 1mg/L の量で基礎培地に加える。非限定的例において、インスリンを約 $2\mu\text{g/L}$ ～ $100\mu\text{g/L}$ の量で基礎培地に加えることができ、インスリンを約 $2\mu\text{g/L}$ 、 $10\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ 、または 1mg/mL の量で基礎培地に加えることができる。他の非限定的例には、IGF、bFGFおよび/またはPDGFを加えることが含まれ、これらは約 $4\mu\text{g/L}$ の量で基礎培地に加えることができる。

【0040】

本発明のある態様において、成長因子を約 $1\mu\text{g/L}$ ～ 10mg/L の量でフィード培地に加える

50

。本発明の別の態様において、成長因子を基礎培地の5倍～10倍の量でフィード培地に加える。非限定的例において、インスリンを約10mg/Lの量でフィード培地に加えることができる、および/またはインスリン様成長因子を約40 μg/Lの量でフィード培地に加えることができる。

【0041】

本発明によれば、該培養は成長因子を加えた後あらゆる長さの時間行うことができる。培養時間は、関連因子、例えば、回収可能なタンパク質の量と品質、および目的とするタンパク質の回収を困難にする細胞溶解物から生じる上清中の夾雑細胞種（例えばタンパク質およびDNA）のレベルに基づいて当業者が決定することができる。

【0042】

本発明の細胞培養方法および細胞生存率を増加させる方法のある態様において、成長因子を接種後のある時、すなわち初期死滅期が始まる前に加える。あるいはまた、成長因子を接種後のある時期、すなわち初期増殖期中に加えるか、または成長因子を初期増殖期の後半に加えるか、または成長因子を初期増殖期の終了時またはほぼ終了時に加える。

【0043】

初期増殖期とは、成長因子の規定の添加なしに観察される増殖期をいう。初期死滅期とは、成長因子の規定の添加なしに観察される死滅期をいう。

【0044】

初期増殖期は初期死滅期が始まる時に終わるか、または初期増殖期と初期死滅期の間にあらゆる長さの静止期があることがある。

【0045】

例えば、初期増殖期が第0日～第6日であり、初期死滅期が第7日に始まる培養細胞では、特定の態様において、成長因子を接種後のある時および第7日以前に加える。特定の態様において、成長因子を接種後および第6日に加える。特定の態様において、成長因子を第1日～第6日に加える。別の特定の態様において、成長因子を第3～6日にフィード培地と共に加える。他の特定の態様において、成長因子を約第2日または第2日に加える。

【0046】

本発明を実施すると細胞培養の生存率が延長することがわかった(図9および10を参照)。成長因子を加えるなどの条件は、該条件存在下で該条件非存在下に比べて一定期間、培養中の細胞生存率が高ければ、細胞生存率の延長をもたらす。

【0047】

したがって、他の態様において、本発明は、培養中の細胞生存率を延長するための細胞培養方法であって、目的とするタンパク質を発現する宿主細胞を成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中で培養し、該細胞培養に成長因子を加えることを含み、該細胞培養の末期細胞生存率が成長因子/タンパク質/ペプチド含有培地で増殖した細胞の末期細胞生存率に比べて延長する方法に関する。

【0048】

細胞培養方法、具体的には非連続方法の実施時間は、通常、死滅期に減少する残存生存細胞密度により制限される。より長い実施時間はより高い生成物力価の達成を可能にする。培養中の細胞デブリの存在と死細胞の含有量は培養実施終了時のタンパク質生成物の単離および/または精製能に悪影響を及ぼしうるので、生成物の品質の問題は死亡率を減少させる動機も与える。

【0049】

本発明の実施により達成される細胞生存率の延長はタンパク質力価の増加をもたらすことが分かった(図9、10、および12参照)。

【0050】

したがって、他の態様において、本発明は、目的とするタンパク質を発現する宿主細胞を成長因子/タンパク質/ペプチド不含培地中で培養し、成長因子を細胞培養に加えることを含む培養中のタンパク質生成を増加させる細胞培養方法であって、該タンパク質の力価が成長因子/タンパク質/ペプチド含有培地で増殖した細胞のタンパク質の力価に比べて増

10

20

30

40

50

加する方法に関する。

タンパク質の精製と分析に関する技術と手順

【0051】

本発明に含まれる培養方法では、典型的には、該細胞が生産するタンパク質を全細胞培養期間の終了時に当該分野で知られ実施されている単離および精製方法を用いて、所望により収集、回収、単離、および/または精製もしくは実質的に精製する。好ましくは、培養細胞から分泌されるタンパク質は培養液または上清から単離されるが、タンパク質は宿主細胞、例えば細胞溶解物から既知の方法を用いて回収することもできる。

【0052】

例として、タンパク質の回収、単離、および/または精製では細胞培養液または細胞溶解物を遠心分離して粒子状細胞と細胞デブリを除去する。目的とするポリペプチドを、適切な精製技術により夾雑可溶性タンパク質およびポリペプチドから単離または精製する。下記手順は、例示的で非限定的なタンパク質の精製方法を示す：イムノアフィニティまたはイオン交換カラムを用いる単離または分画；エタノール沈殿；逆相HPLC；樹脂、例えばシリカ、または陽イオン交換樹脂、例えばDEAEを用いるクロマトグラフィ；クロマトフォーカシング；SDS-PAGE；硫酸アンモニウム沈殿；SEPHADEX（登録商標）G-75、SEPHAROSE（登録商標）などを用いるゲルろ過；および免疫グロブリン夾雑物を除去するためのプロテインA SEPHAROSE（登録商標）クロマトグラフィなど。プロテアーゼ阻害剤などの添加物（例えばPMSFまたはプロテアーゼK）を用いて精製中のタンパク質分解を防ぐことができる。当業者は、目的とする特定のポリペプチドの精製方法は細胞培養中で組換え的に発現したポリペプチドの変化を可能にする修飾が必要であるかもしれないことを理解するだろう。

細胞、タンパク質、および細胞培養

【0053】

本発明の細胞培養プロセスまたは方法では細胞を種々の当該分野で通常知られた細胞培養液、すなわち基礎培養液中で維持することができる。例えば、該方法は、栄養素などを補充することができる細胞培養液中で維持した大容量の細胞での使用に応用することができる。典型的には、「既成組成の細胞培養液」（「既成組成培地」ともいう）は、当業者に理解されている、細胞、好ましくは動物または哺乳動物細胞が増殖する、一般的に以下の少なくとも1またはそれ以上の成分を提供する栄養溶液を表す用語である：エネルギー源（通常、グルコースなどの炭化水素の形の）；すべての必須アミノ酸、一般的には20の塩基性アミノ酸とシステイン；ビタミンおよび/または典型的には低濃度必要な他の有機化合物；脂質または遊離脂肪酸、例えばリノール酸；および微量元素、例えば、典型的には、非常に低濃度（通常、マイクロモルの範囲）必要な無機化合物または天然元素。細胞培養液には、種々の所望の成分、例えば塩、例えばカルシウム、マグネシウム、およびホスフェート、および緩衝剤、例えばHEPES；ヌクレオシド、および塩基、例えば、アデノシン、チミジン、ヒポキサンチン；抗生物質、例えばゲンタマイシン；および細胞保護剤、例えば、PLURONIC（登録商標）ポリオール(PLURONIC（登録商標）F68)を補充することもできる。

【0054】

本発明のある態様は、成長因子、タンパク質、およびペプチド、例えば、インスリン、トランスフェリン、上皮成長因子、血清、加水分解タンパク質、ホルモン、bFGF、IGF、PDGFを含まず、動物起源の生成物または成分を含まない既成組成の細胞培養液を利用する細胞培養方法である。

【0055】

実施者が理解しているように、動物または哺乳動物細胞は、過度な実験を行うことなく当業者が決定することができる培養する特定の細胞に適した培地中で培養される。例えば以下のものを含む市販されている培地を利用することができる：最小必須培地(MEM、Sigma、St. Louis、MO)；ハムF10培地 (Sigma)；ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、Sigma)；RPMI-1640培地(Sigma)；HYCLONE（登録商標）細胞培養液(HyClone、Logan、UT)；、およ

10

20

30

40

50

び特定の細胞株用に処方された既知組成(CD)培地、例えばCD-CHO培地 (Invitrogen、Carlsbad、CA)。EX-CELL (登録商標) CD-CHO (SAFC、Saint Louis)。

【0056】

当業者に知られ、実施されるように、前記の例示した培地に、所望により適切な濃度または量の所望の成分を含む上記補助成分または成分を加えることができる。

【0057】

さらに、本発明の方法に適した細胞培養条件は、通常用いられる、細胞のバッチ、フェドバッチ、または連続培養のために知られているものであり、温度に加えて、pH、例えば約6.5～約7.5；溶存酸素(O_2)、例えば空気飽和の約5～90%、および二酸化炭素(CO_2)、攪拌、および湿度に注意を払う。非限定的な具体例として、本発明のフェドバッチ法に適した細胞培養液は変法CD-CHO培地(Invitrogen、Carlsbad、CA)を含む。フィード培地は、例えば、変法eRDF培地(Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いることもできる。本発明のある態様は、成長因子、例えばインスリンも含むフィード培地を利用する。

【0058】

動物細胞、哺乳動物細胞、培養細胞、動物もしくは哺乳動物宿主細胞、宿主細胞、組換え細胞、および組換え宿主細胞などの用語は、すべて本発明の方法に従って培養することができる細胞を表す。そのような細胞は、典型的には、適切な栄養素を含む培養中で単層培養または浮遊培養すると増殖および生存することができる哺乳動物から得られるか、それに由来する細胞株である。

【0059】

多くの種類の細胞を本発明の方法に従って培養することができる。該細胞は、典型的には、培養液中で大量の目的とする特定タンパク質を発現および分泌することができるか、または発現および分泌するように分子的に操作することができる動物または哺乳動物細胞である。宿主細胞が生成したタンパク質は、宿主細胞に対して内因性またはホモローガスでありうる。あるいはまた、該タンパク質は、宿主細胞に対してヘテロローガスな（すなわち外来）、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)宿主細胞が生産および分泌したヒトタンパク質である。ある態様において、哺乳動物タンパク質、すなわち哺乳動物有機体から最初に得られるかまたはそれに由来するものは、本発明の方法により得られ、好ましくは培養液中に細胞によって分泌される。

【0060】

目的とするタンパク質は、融合タンパク質およびポリペプチド、キメラタンパク質およびポリペプチドを含むことができ、前記タンパク質およびポリペプチドのいずれかの断片もしくは部分、または変異体もしくは類似体も本発明の方法で生成することができる適切なタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドに含まれる。

【0061】

次の単離および/または精製のためにタンパク質を保持、発現、および生成するのに適した動物または哺乳動物宿主細胞の非限定的例には以下のものが含まれる：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., Som. Cell Molec. Genet., 12:555-556 (1986)、およびKolkekar et al., Biochemistry, 36:10901-10909 (1997))、CHO-K1 Tet-On細胞株 (Clontech)、ECACC 85050302というCHO(CAMR、Salisbury、Wiltshire、UK)、CHOクローン13 (GEIMG、Genova、IT)、CHOクローンB (GEIMG、Genova、IT)、ECACC 93061607というCHO-K1/SF (CAMR、Salisbury、Wiltshire、UK)、ECACC 92052129というRR-CHOK1(CAMR、Salisbury、Wiltshire、UK)、ジヒドロ葉酸還元酵素陰性CHO細胞 (CHO/-DHFR、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))、dp12.CHO細胞 (米国特許No. 5,721,121)、およびFUT8 (α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ)ノックアウトCHO細胞株、Ms704 (Naoko Yamane-Ohnuki et al., 2004年8月6日にWiley InterScienceにオンラインで公開(www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20151)；SV40により形質転換したサル腎CV1細胞(COS細胞、COS-7、ATCC (登録商標) CRL-1651)；ヒト胎児腎細胞 (例えば、293細胞、または浮遊培養中で増殖させるためのサブクローンした293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977))；ベジ

10

20

30

40

50

ーハムスター腎細胞 (BHK、ATCC (登録商標) CCL-10)；サル腎細胞 (CV1、ATCC (登録商標) CCL-70)；アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76、ATCC (登録商標) CRL-1587；VERO、ATCC (登録商標) CCL-81)；マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、Biol. Reprod.、23:243-251 (1980))；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC (登録商標) CCL-2)；イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC (登録商標) CCL-34)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC (登録商標) CCL-75)；ヒト肝癌細胞 (HEP-G2、HB 8065)；マウス乳癌細胞 (MMT 060562、ATCC (登録商標) CCL-51)；パッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC (登録商標) CRL-1442)；TRI細胞 (Mather、Ann. NY Acad. Sci.、383:44-68 (1982))；MCR 5細胞；FS4細胞。本発明のある態様において、該細胞は、CHO細胞、例えばCHO/-DHFR細胞、およびCHO/-GS細胞である。

【0062】

本発明の方法およびプロセスを用いて培養するのに適した細胞に、例えば、形質転換、トランスフェクション、感染、または注射により、該培養方法で発現および生産するためのタンパク質をコードするコーディング配列またはその部分を保持する発現ベクター（構築物）、例えばプラスミドなどを導入することができる。そのような発現ベクターは、挿入したコーディング配列を転写および翻訳するのに必要なエレメントを含む。当業者がよく知っており実施する方法を用いて、生成するタンパク質およびポリペプチドをコードする配列、および適切な転写および翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*遺伝子組換えが含まれる。そのような技術はSambrook、J. et al.、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Plainview、NY (1989)、およびAusubel、F.M. et al.、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、NY (1989)に記載されている。

【0063】

調節エレメントまたは調節配列は、転写および翻訳を行う宿主細胞タンパク質と相互作用する該ベクターの非翻訳領域、例えば、エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域である。そのようなエレメントは、その強度および特異性が異なりうる。用いるベクター系および宿主細胞に応じて、あらゆる数の適切な転写および翻訳エレメント（構成的および誘導性プロモーターを含む）を用いることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。例えば発現系に用いる構築物は、少なくとも1のプロモーター、エンハンサー配列（所望により哺乳動物発現系用の）、および適切な転写と遺伝子発現の調節に必要なまたは所望の他の配列（例えば、転写開始および終止配列、複製起点、ポリアダニル化配列）を含むよう設計される。

【0064】

当業者が認識するように、真核性（例えば、哺乳動物）発現系で生産されるタンパク質の適切な転写、発現および単離のための適切なベクター、例えばプラスミド、成分の選択は、当業者が知っており、日常的に決定し、実施する。本発明の方法に従って培養した細胞によるタンパク質の発現は、プロモーター、例えばウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)、チミジンキナーゼ(TK)、または α -アクチンプロモーターの調節下で行うことができる。さらに、調節されたプロモーターは、特定化合物または分子による誘導性をもたらす。また、必要または所望により組織特異的プロモーターまたは調節エレメントを用いることができる(Swift、G. et al.、Cell、38:639-646 (1984))。

【0065】

発現構築物を、以下の当業者に知られた種々の遺伝子導入法により細胞内に導入することができる：例えば、常套的遺伝子トランスフェクション法、例えばリン酸カルシウム共沈殿、リポソームトランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、および感染またはウイルストランスダクション。該方法の選択は、当業者の能力内である。細胞で発現させるDNA配列を保持する1またはそれ以上の構築物を細胞にトランスフェクションし、次いで発現産物を該細胞中で生成し、および/または該細胞から得ることができることは当業者に明らかであろう。

【0066】

特定の局面において、適切な調節および制御配列を含む哺乳動物発現系が本発明のタンパク質発現哺乳動物細胞に用いるのに好ましい。哺乳動物発現ベクターに用いる一般に使用される真核性調節配列には、哺乳動物細胞に適合性のプロモーターおよび調節配列、例えばサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(CDM8ベクター)、およびトリ肉腫ウイルス(ASV)、(π LN)などが含まれる。他の一般的に用いられるプロモーターには、シミアンウイルス40(SV40)由来の早期および後期プロモーター(Fiers et al., Nature, 273:113 (1973))または他のウイルスプロモーター、例えばポリオーマ、アデノウイルス2、およびウシパピローマウイルス由来のものが含まれる。誘導性プロモーター、例えばhMTII (Karin et al., Nature, 299:797-802 (1982))も用いることができる。

10

【0067】

真核性宿主細胞に適した発現ベクターの例には、限定されるものではないが、哺乳動物宿主細胞用のベクター (例えば、BPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1 (Life Technologies); pVPakcベクター、pCMVベクター、pSG5ベクター(Stratagene)、レトロウイルスベクター (例えば、pFBベクター (Stratagene)), pcDNA-3 (Invitrogen)、アデノウイルスベクター; アデノ関連ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、酵母ベクター(例えばpESCベクター(Stratagene)), または前記のあらゆる修飾型が含まれる。ベクターは、遺伝子発現を最適化するためのプロモーター領域配列の上流または下流にエンハンサー配列を含むこともできる。

20

【0068】

選択可能マーカーを組換えベクター (例えばプラスミド) に用いて該ベクターを保持する (好ましくは安定に統合された) 細胞に耐性を与え、適切な選択培地中での選択を可能にすることもできる。限定されるものではないが、それぞれtk-、hgprt-、またはaprt-細胞 (APRT) に用いることができるヘルペスシンプレックスウイルスチミジンキナーゼ(HSV TK)、(Wigler et al., Cell, 11:223 (1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)、(Szybalska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202 (1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., Cell, 22:817 (1980))遺伝子を含む多くの選択系を用いることができる。

【0069】

抗代謝物耐性を、以下のマーカー遺伝子の非限定的例を選択する基礎として用いることもできる: dhfr (メトトレキセートに対する耐性をもたらす) (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:357 (1980)、およびO'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981)); グルタミンシンターゼ(GS) (メチオニンスルホキシミンに対する耐性をもたらす); gpt (ミコフェノール酸に対する耐性をもたらす) (Mulligan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981)); neo (アミノグリコシドG418に対する耐性をもたらす) (Clinical Pharmacy, 12:488-505; Wu et al., Biotherapy, 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596 (1993); Mulligan, Science, 260:926-932 (1993); Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62:191-121 (1993); TIB TECH, 11(5):155-215 (1993, 5月); およびhygro (ヒグロマイシンに対する耐性をもたらす) (Santerre et al., Gene, 30:147(1984))。組換えDNA技術の分野で一般的に知られた方法を、目的とする組換え細胞クローンを選択するのに日常的に適用することができ、そのような方法は例えば以下に記載されている: Ausubel et al.編、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 第12および13章、Dracopoli et al.編、Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1 (1981)(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。

30

40

【0070】

さらに、発現したタンパク質分子の発現レベルは、ベクターの修飾により増加させることができる(総説は、Bebbington, C.R. et al., 第8章: 「The use of vectors based on

50

gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells」、Glover、D.M.編、DNA Cloning、Vol.3: A Practical Approach、pp. 163-188、IRL Press Limited、publ. (1987)を参照のこと)。タンパク質を発現するベクター系中のマーカーク修飾可能であれば、宿主細胞培養中に存在するインヒビターレベルの増加は、該マーカーク遺伝子のコピー数を増加させるであろう。増幅した領域はタンパク質をコードする遺伝子と結合するので、該タンパク質の生成が同時に増加するであろう(Crouse et al.、Mol. Cell. Biol.、3:257 (1983))。

【0071】

グルタミンシンターゼ (GS)またはジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)をコードする核酸を選択可能マーカークとして保持するベクターは、それぞれメチオニンスルホキシミンまたはメトトレキセート存在下で増幅させることができる。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼ陰性の細胞株が利用可能なことである(例えば、ネズミミエローマ細胞株、NSO)。グルタミンシンターゼ発現系は、内因性遺伝子の機能を抑制するさらなるインヒビターを提供することによりグルタミンシンターゼ発現細胞 (例えばCHO細胞)中で機能することもできる。

【0072】

DHFRを選択可能マーカークとして発現するベクターには、限定されるものではないが、pSV2-dhfrプラスミド(Subramani et al.、Mol. Cell. Biol. 1:854 (1981))が含まれる。グルタミンシンターゼを選択可能マーカークとして発現するベクターには、限定されるものではないが、Stephens et al.、Nucl. Acids. Res.、17:7110 (1989)に記載のpEE6発現ベクターがある。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は、PCT公開公報:WO 87/04462; WO 86/05807; WO 89/01036; WO 89/10404; およびWO 91/06657に詳述されている(これらの内容は本明細書の一部を構成する)。さらに、本発明に従って用いることができるグルタミンシンターゼ発現ベクターは、例えばLonza Biologics、Inc. (Portsmouth、NH)を含む供給業者から市販されている。

細胞培養の種類

【0073】

限定するものではないが理解のために、当業者は、タンパク質生成のための細胞培養および培養実施には一般の3タイプ、すなわち、連続培養、バッチ培養、およびフェドバッチ培養を含むことができることを理解するであろう。例えば連続培養では、新鮮培養液補充物(すなわちフィード培地)を培養期中に細胞に与え、古い培養液を毎日除去し、生成物を例えば毎日もしくは連続的に回収する。連続培養ではフィード培地を毎日加えることができ、連続的に、すなわち滴または注入で加えることができる。連続培養では、細胞が生存しており、環境および培養条件が維持されるかぎり、望むだけ細胞を培養中で維持することができる。

【0074】

バッチ培養では細胞を最初に培地中で培養し、この培地は除去も、交換も、補充もしない(すなわち、細胞は培養中または終了前に新たな培地をフィードされない)。目的とする生成物を培養終了時に回収する。

【0075】

フェドバッチ培養では、培養中に培養液に新鮮培地を補充して培養時間を増加する(すなわち、培養期間中、細胞に新たな培地(「フィード培地」)を「フィード」しない。フェドバッチ培養には、種々のフィーディングレジメンおよび回数、例えば1日1回、隔日、2日おきなど、1日1回より多く、または1日1回未満などを含みうる。さらに、フェドバッチ培養は、フィード培地を連続的にフィードすることができる。

【0076】

次に、目的とする生成物を培養/生成終了時に回収する。

【0077】

本発明のある態様は、成長因子、例えばインスリンおよび/またはIGFを接種時に加えるフェドバッチ細胞培養を含む。

【0078】

本発明に従って細胞培養を行うことができ、動物または哺乳動物細胞培養に通常用いる培養器および/または培養装置を用いてタンパク質の大規模または小規模製造条件下で細胞によりタンパク質を生成することができる。当業者が理解するように、実験室規模では、通常、組織培養皿、Tフラスコ、およびスピナーフラスコを用いる。限定されるものではないが、流動ベッドバイオリアクター、中空繊維バイオリアクター、ローラーボトル培養、または攪拌タンクバイオリアクターシステムを含む大規模培養(例えば、500L、5000Lなど、例えば、同一出願人による米国特許No. 7,541,164、および7,332,303、および米国特許出願No. 12/086,786 (2006年12月19日出願)に記載されている(これらの内容は本明細書の一部を構成する))方法を用いることができる。マイクロキャリアを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一緒に用いても用いなくてもよい。該システムはバッチ、連続、またはフェドバッチ法で操作することができる。さらに、該培養装置またはシステムは、フィルター、重力、遠心力などを用いる細胞分離器を装備していてもいなくてもよい。

細胞培養の期および関連パラメーター

【0079】

用語「接種」は、培養を開始するために出発培地に細胞を加えることを表す。

【0080】

培養の「増殖期」は、あらゆる時点の生存細胞密度がいかなる前の時点より高い期である。

【0081】

培養の「静止期」は、生存細胞密度がわずかな期間でもほぼ一定(すなわち測定誤差内)である期である。

【0082】

培養の「死滅期」は、あらゆる時点の生存細胞密度が該期のいかなる前の時点より低い、増殖期後または増殖期および静止期後にくる期である。

【0083】

本発明のある態様において、培養液は、特に延長された生産期において連続タンパク質生成を支持し、高品質のタンパク質生成物を大量に得るために生産期中補充(「フィード」)される。フィーディングは、毎日、または細胞生存率およびタンパク質生成を支持するための他のスケジュールにしたがって実施することができる。

【0084】

本発明の培養方法は、培養期間の終了まで生細胞のより高い生存をもたらすことができる。したがって、ある態様において、より多くの細胞が生存すれば、より多くの細胞が目的とする生成物を生成する。同様に、これは、個々の細胞によるタンパク質生成速度(すなわち細胞の比生産性)は同じままで、培養プロセス終了時の生成物のより大きな蓄積量をもたらす。当該分野で知られているように細胞の比生産性または細胞の比速度は、典型的には細胞あたりまたは細胞量もしくは容量の測定値あたりの生成される生成物の比発現速度を表す。細胞の比生産性は、例えば生成されるタンパク質(グラム)/細胞/日で測定され、下記式を含む積分法に従って測定することができる。

$$dP/dt = q_p \cdot X \text{ または}$$

$$P = q_p \int_0^t X dt$$

式中、 q_p は、細胞比生産性定数であり、 X は細胞数または細胞容量、または細胞量等価物であり、 dP/dt はタンパク質生成速度である。したがって、 q_p は、生成物濃度対生細胞の時間積分値(

10

20

30

40

$$\int_0^t X dt$$

「生細胞日数」)のプロットから得ることができる。この式では生成されたタンパク質生成物の量を生細胞日数に対してプロットすると、勾配は、細胞比速度と等価である。生細胞は、種々の方法、例えばバイオマス、 O_2 摂取率、ラクターゼデヒドロゲナーゼ(LDH)、バック細胞容量、または濁度により測定することができる。(例えば、米国特許No. 5,705,364 (Etcheverry, T. et al.))

本発明の培養方法によるaCD40L融合タンパク質の生成

【0085】

本発明に含まれる他の態様では、本発明の細胞培養方法は、本明細書に記載のクローンAおよびクローンBで例示したように可溶性aCD40L融合タンパク質を生成するのに利用される。

【0086】

可溶性aCD40Lは、ヒトCD40Lと特異的に結合する抗体ポリペプチドである。抗体ポリペプチドは可変ドメインを含むドメイン抗体(dAbs)である。可溶性aCD40Lは、CD40Lの活性化が関与する疾患、例えば自己免疫疾患の治療に有用である。米国特許出願No. 61/655,110 (2012年6月4日出願)はaCD40L dAbについて記載している(この内容は本明細書の一部を構成する)。

【0087】

別の態様では、可溶性aCD40Lは組換え操作した宿主細胞により生成される。可溶性aCD40Lタンパク質は、可溶性aCD40LをコードするDNA配列を含むベクターでトランスフェクションしたCHO細胞により組換え的に生成することができる。可溶性aCD40L融合タンパク質は、本発明の方法に従って培養すると大量に生成される。本発明は、高レベルの回収可能なタンパク質生成物、例えば、実施例3、4、および5(図4、6、および9)に示す可溶性aCD40Lタンパク質生成物の生成をもたらす。

本発明の培養方法によるミオスタチン融合タンパク質の製造

【0088】

本発明に含まれる他の態様において、本発明の細胞培養方法は、本明細書に記載のクローンCによって例示されるように可溶性ミオスタチン融合タンパク質を生成するのに利用される。

【0089】

別の態様において、ミオスタチン融合タンパク質は、組換え操作した宿主細胞により生成される。ミオスタチン融合タンパク質は、ミオスタチン融合タンパク質をコードするDNA配列を含むベクターでトランスフェクションしたCHO細胞により組換え的に生成することができる。該ミオスタチン融合タンパク質は、本発明の方法に従って培養すると大量に生成される。本発明は、実施例3および4(図7および10)に示す高レベルの回収可能なミオスタチン融合タンパク質生成物の生成をもたらす。

本発明の培養方法によるCTLA4Ig融合タンパク質の製造

【0090】

本発明に含まれる他の態様において、本発明の細胞培養方法は、本明細書に記載のクローンDによって例示されるように可溶性CTLA4Ig融合タンパク質を生成するのに利用される。CTLA4Igは、ヒト免疫グロブリンG1(IgG1)の修飾Fc(ヒンジ、CH2、およびCH3ドメイン)部分と結合したヒト細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4(CTLA-4)の細胞外ドメインからなる可溶性融合タンパク質である。CTLA4は、兆候および症状を減少させ、主な臨床反応を誘導し、構造的損傷の進行を阻害し、軽度～重症の活動性リウマチ性関節炎の成人患者の身体的機能を改善するために適用される。CTLA4Ig融合タンパク質は、米国特許No. 5,844,095 (Linsley, P.S. et al.) (この内容は本明細書の一部を構成する)に記載のCTLA4IgをコードするDNA配列を含むベクターでトランスフェクションしたCHO細胞により組換え的に生成することができる。

【0091】

10

20

30

40

50

別の態様において、可溶性CTLA4Igは組換え操作した宿主細胞により生成される。可溶性CTLA4Igタンパク質は、可溶性CTLA4IgをコードするDNA配列を含むベクターでトランスフェクションしたCHO細胞により組換え的に生成することができる。可溶性CTLA4Ig融合タンパク質は、本発明の方法に従って培養すると大量に生成される。本発明は、実施例3および4（図8および12）に示すように高レベルの回収可能な可溶性CTLA4Igタンパク質生成物の生成をもたらす。

（実施例）

【0092】

下記実施例は、本発明を限定するものではなく、本発明を例示するため本発明の具体的局面を示し、当業者に本発明の方法について説明する。本実施例は、単に、本発明の理解と実施に有用な具体的方法論と例示およびその種々の局面を提供するものである。

下記実施例1～5は、成長因子を使用および不使用での本発明の培養方法を含む細胞培養方法に関する実験について記載する。

【実施例1】

【0093】

CHO細胞はGF不含条件下で増殖することができた。

1. 初期継代の細胞の新たなバイアルを解凍し、プラットホーム培地（1または10mg/Lインスリン含有）中で培養して2回継代する。
2. 3継代で、細胞をインスリン不含基礎培地に移し、 0.6×10^6 細胞/mlの密度で3～4日間毎に分割し続ける。
3. インスリン不含条件下の最初の数継代では、細胞増殖は著しく遅くなり、生存率が減少しうる（～90％）。一方、アンモニウムの生成は、不十分なグルコース摂取とエネルギー源としてのアミノ酸の酸化により増加しうる。結果として、フラスコ中のpHは増加しうる。したがって、pHを7.0～7.3の範囲に調節するためにCO₂レベルを調節/増加する必要があるかもしれない。これは細胞を健康な状態に保つために非常に重要である。
4. 一般的には、新たな継代中に持ち越す使用済み培地は30％未満にすべきである。細胞増殖が遅すぎて基準を満たせない場合は、細胞を遠心分離して、望む数を30％の使用済み培地と70％の新鮮培地を含む新たなフラスコに移す。
5. 細胞が完全に適応すると細胞増殖は回復し、生存率は95％以上に戻るであろう。特定のクローンに応じて細胞がインスリン不含条件に適応するのに最高7～9継代かかるかもしれない。
6. 細胞培養パラメーター：振盪速度：150rpm；振盪フラスコ：250mlまたは500mlバッフル付き振盪フラスコ(Corning Inc.)（機能容量100 mlまたは200 ml）；温度：37℃；CO₂：6％（一般的に、pHを7.0～7.3に調節するために調整することができる（最高8％ CO₂））。

図1および図2は、成長因子不含培地中で増殖したそれぞれクローンAおよびクローンBの適応を示す。同様の結果が他のクローンCおよびDでみられた。

【実施例2】

【0094】

インスリンの除去はmTOR経路に大きな影響を与えなかった。

本実験の目的は、抗体アレイを用いて、成長因子のインスリン存在下および非存在下で増殖した細胞のmTORに含まれるタンパク質のリン酸化/発現レベルを比較することにより、分子および細胞生物学的観点から細胞がGF不含条件下で増殖することができることを証明することであった。

抗体アレイ試料の調製

【0095】

クローンAをインスリン不含またはインスリン含有基礎培地で培養した。 5×10^6 生細胞を第3日に条件ごとにサンプリングした。細胞を4℃で5分間、500gで遠心分離した。細胞を10ml 氷冷1xPBSで洗浄し、4℃で5分間、500gで遠心分離した。細胞は試料処理中常に氷上または4℃に保った。PBSを除去後、抗体アレイ分析まで細胞を速やかに-70℃で凍結し、保

存した。

抗体アレイプロトコール

タンパク質の抽出

【0096】

細胞を氷冷1X PBSで洗浄する。試料に溶解ビーズおよび抽出緩衝液を加える。30秒間ボルテックスして厳密に混合する。混合物を10分間インキュベーションする。60分間、10分間隔で30秒間のボルテックスを反復する。ボルテックス間に混合物を氷上でインキュベーションする。4℃で20分間、10,000 x gで混合物を遠心分離する。上清をきれいなチューブに移す。スピンカラムを用いて上清の緩衝液を標識緩衝液に交換する。タンパク質濃度を測定する。注：抽出緩衝液と標識緩衝液はホスファターゼ阻害剤を含む。

10

タンパク質の標識

【0097】

100 μLのDMFを1mgのビオチン試薬に加え、最終濃度を10 μg/μLとする。タンパク質試料に標識緩衝液を加え、容量を75 μLにする。標識緩衝中のタンパク質試料に3 μLのビオチン/DMFを加える。混合しながら室温で2時間混合およびインキュベーションする。35 μLの停止試薬を加える。混合しながら室温で30分間インキュベーションする。

カップリング

【0098】

ブロッキング：抗体マイクロアレイをブロッキング緩衝液に浸す。室温で40分間攪拌する。スライドをMILLI-Q（登録商標）グレード水ですすぐ。

20

【0099】

室温で2時間、軌道振盪器にて、カップリングチャンバー中のスライドを6mLカップリング溶液中の85 μgの標識タンパク質試料とインキュベーションする。スライドからカップリングチャンバーを除去する。スライドを新鮮洗浄緩衝液で3回洗浄する。DI水で広範にリンスする。

検出

【0100】

30 μlのCy3-ストレプトアビジン(1 mg/ml)を検出緩衝液を含む60mlボトルに加える。スライドを30mlのCy3-ストレプトアビジン溶液に浸す。遮光下、室温で45分間、軌道振盪器にてインキュベーションする。スライドを新鮮洗浄緩衝液で3回洗浄する。DI水で広範にリンスする。スライドを圧縮窒素で乾燥する。Axon GenePixアレイスキャナーでスキャンする。

30

アッセイデータ

【0101】

該アレイ上の各スポットについてスポット強度中央値をアレイイメージから抽出する。強度中央値を用いて、各抗体の複製スポットの平均シグナルを決定する。データを該アレイの複製スポットの平均シグナルとして表示する。アレイにおける複製物のCVは、各抗体の複製スポットの変動係数である。正規化するため、各アレイスライド内で、アレイ中のすべての抗体の平均シグナルの平均値を求める。この値は平均シグナルとして示される。

正規化データ = 複製スポットの平均シグナル / 平均シグナル。

40

正規化データを用いてコントロール試料と処理試料の変化倍数を求める。

シグナル変化倍数 = 処理 / コントロール。

【実施例3】

【0102】

GF/タンパク質/ペプチド不含培地はプロセス性能を改善する。

細胞：クローンA、B、C、およびD。

振盪フラスコの細胞培養パラメーター：

振盪速度：150rpm；浸透フラスコ：250mlまたは500mlバツフル振盪フラスコ(Corning Inc.)（機能容量100mlまたは200ml）；温度：37℃；CO₂：一般的に6%。

リアクターの細胞培養パラメーター：

50

【0103】

攪拌120rpm；1.3L初期培養容量の5Lリアクター；温度：37℃；溶存酸素(DO)50％に調節；pH7.0～7.3。

【0104】

接種密度：0.3または 0.6×10^6 細胞/ml。

【0105】

基礎：クローンA、B、およびCにはインスリン含有または不含171培地；クローンDにはインスリン含有または不含127G培地。

【0106】

フィード：インスリン含有または不含154A-1または154A-1由来培地(クローンAおよびBはM154A1B)。

10

【0107】

フィーディング戦略：フィーディングを第3日に開始し、初期培養容量の3.64％を第14日までフィードする。

【0108】

サンプリング：指定した時点で試料を採取し、CEDEX（登録商標）で細胞密度と生存率、HPLCで力価、およびサイズ排除クロマトグラフィ（SE）で高分子種を測定した。

【実施例4】

【0109】

GF不含条件にGFを加え戻すと細胞増殖とタンパク質生成を促進した。

20

細胞：aCD40L融合タンパク質を生成するクローンB

細胞培養パラメーター：

攪拌：120rpm；初期培養容量1.3Lの5Lリアクター；温度：37℃；溶存酸素(DO)50％に調節。

【0110】

基礎：インスリン含有または不含培地。

【0111】

フィード：インスリンおよびLONG（登録商標）R3含有および不含。

【0112】

INS不含：基礎中にインスリン不含、フィードにインスリン不含およびLONG（登録商標）R3不含。

30

【0113】

INS：基礎中に1mg/Lインスリン、フィード中に10mg/Lインスリン。

【0114】

INS加え戻し：1mg/L インスリンおよび10mg/L インスリンをそれぞれ基礎およびフィードに加え戻した。接種物はインスリン不含細胞であった。

【0115】

フィーディング戦略：フィーディングを第3日に開始し、第14日まで初期培養容量の3.64％をフィードする。

【0116】

40

サンプリング：指定した時点で試料を採取し、CEDEX（登録商標）で細胞密度と生存率、HPLCで力価、およびサイズ排除クロマトグラフィ（SE）で高分子種を測定した。

【実施例5】

【0117】

GF/タンパク質/ペプチド不含はプロセスの成績を改善する。

細胞：aCD40L融合タンパク質を生成するクローン63C2。

細胞培養パラメーター：

攪拌：120rpm；初期培養容量1.3Lの5Lリアクター；温度：37℃；溶存酸素(DO)50％に調節。

【0118】

50

基礎：インスリン含有または不含培地。

【0119】

フィード：インスリンおよびLONG（登録商標）R3含有および不含。

【0120】

INS不含+LR3：4 μ g/L LR3および40 μ g/L LR3をそれぞれ基礎フィード培地に加えた。
接種物はGF不含であった。

【0121】

INS+LR3：4 μ g/L LR3および40 μ g/L LR3をそれぞれ1mg/L含有基礎培地および10mg/L
インスリン含有フィード培地に加えた。接種物は1mg/L インスリン含有基礎培地中であっ
た。

【0122】

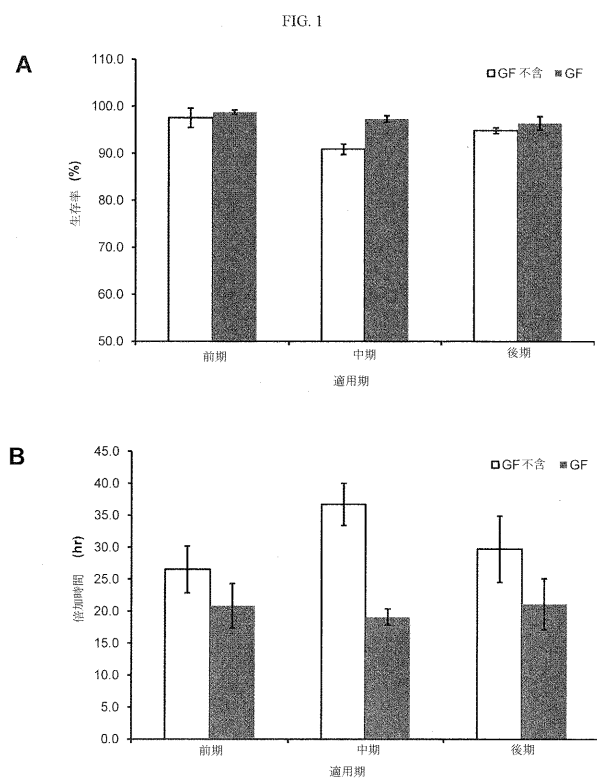
フィーディング戦略：フィーディングを第3日に開始し、第14日まで初期培養容量の3.6
4%をフィードする。

【0123】

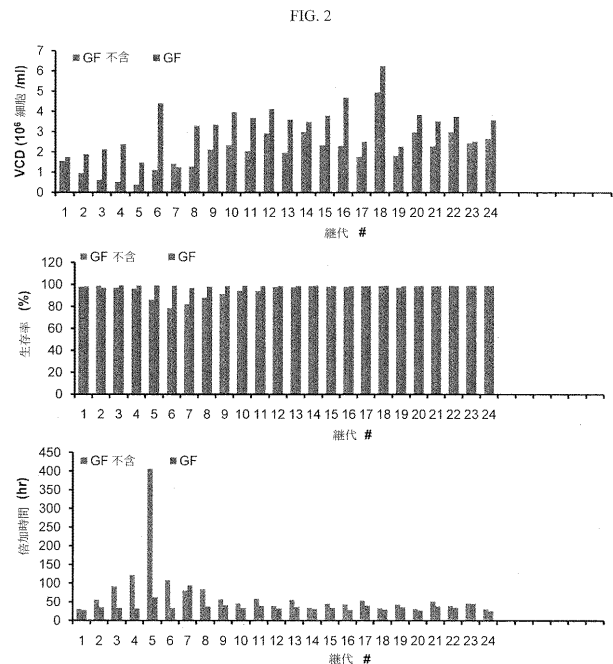
サンプリング：指定した時点で試料を採取し、CEDEX（登録商標）で細胞密度と生存率、
HPLCで力価、およびサイズ排除クロマトグラフィ（SE）で高分子種を測定した。

10

【図1】



【図2】



【図 3】

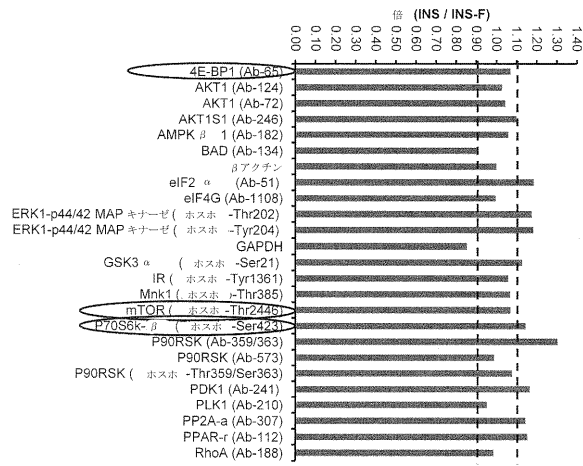


FIG. 3

【図 4】

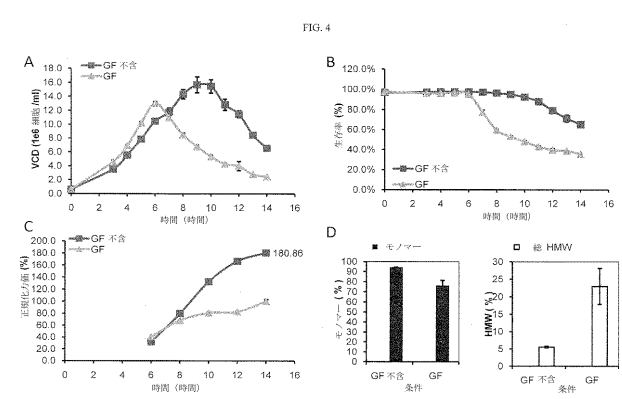


FIG. 4

【図 5】

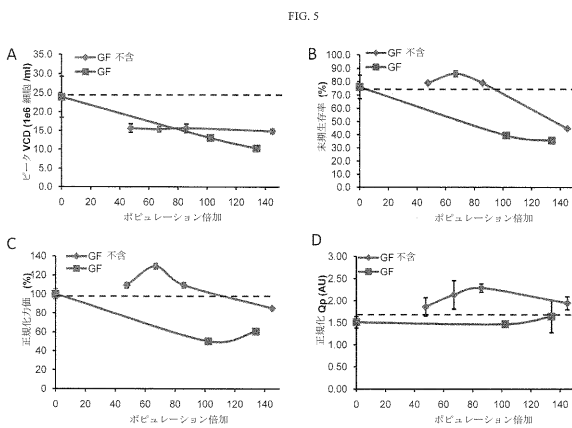


FIG. 5

【図 6】

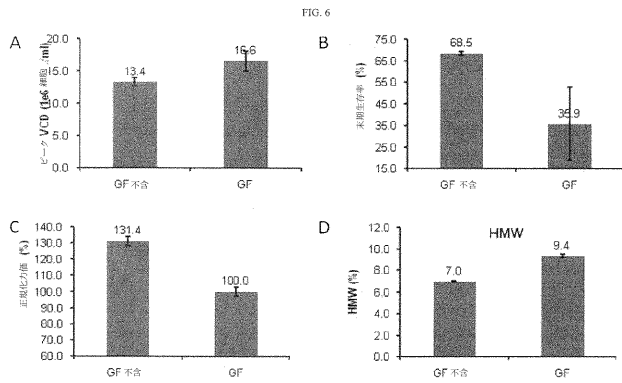


FIG. 6

【図 7】

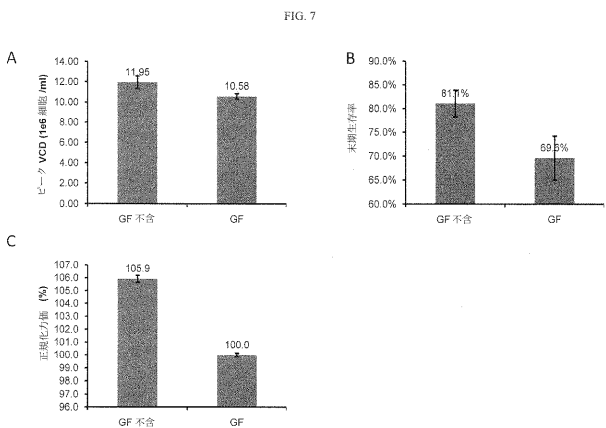
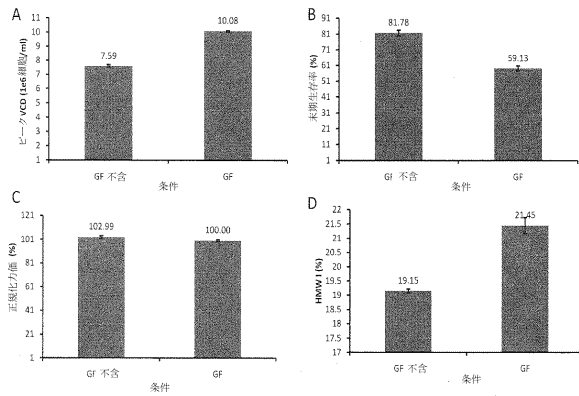


FIG. 7

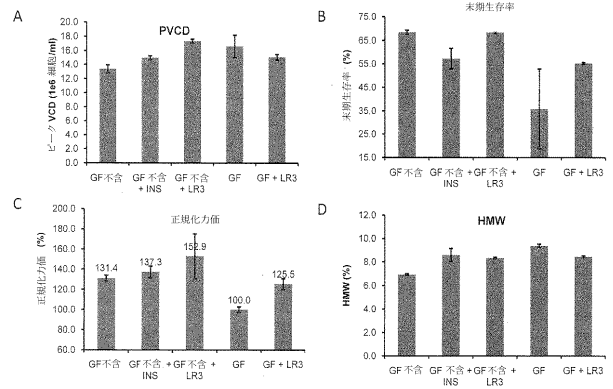
【図 8】

FIG. 8



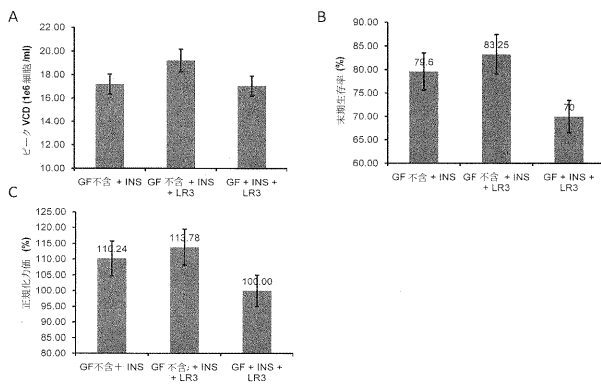
【図 9】

FIG. 9



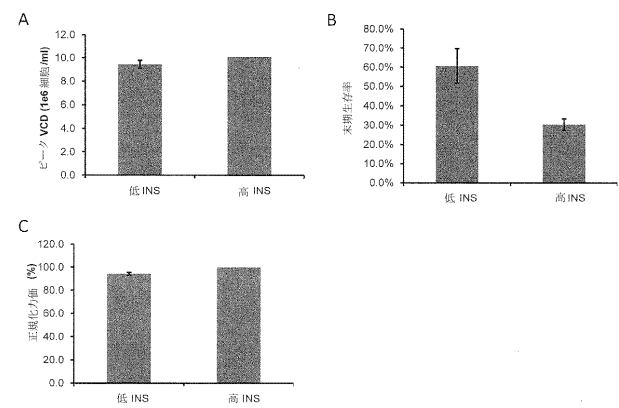
【図 10】

FIG. 10



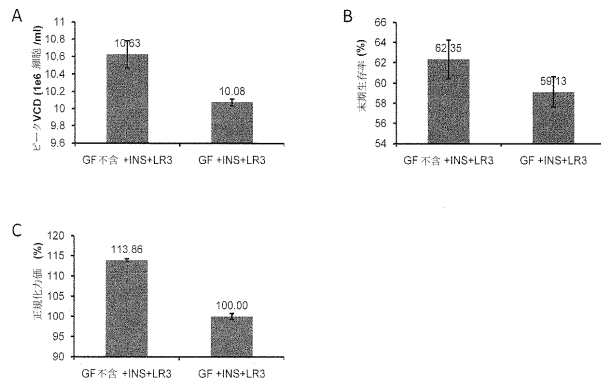
【図 11】

FIG. 11



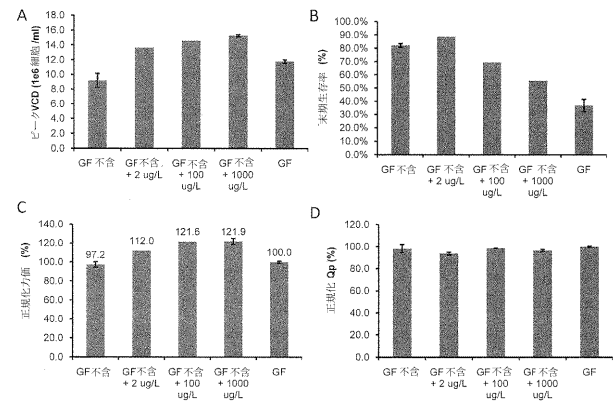
【図 1 2】

FIG. 12



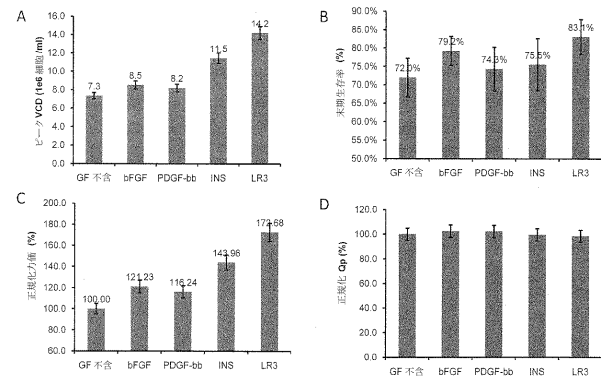
【図 1 3】

FIG. 13



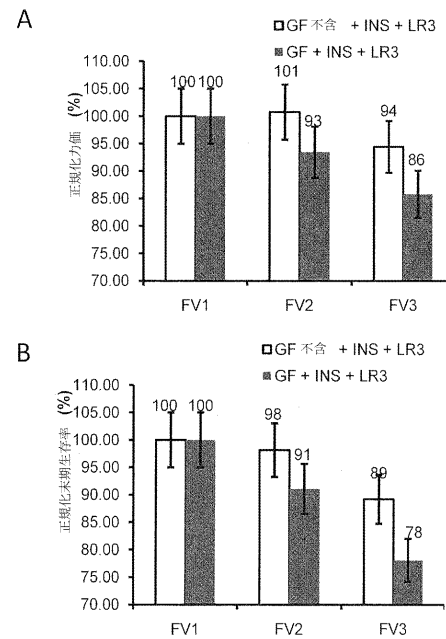
【図 1 4】

FIG. 14



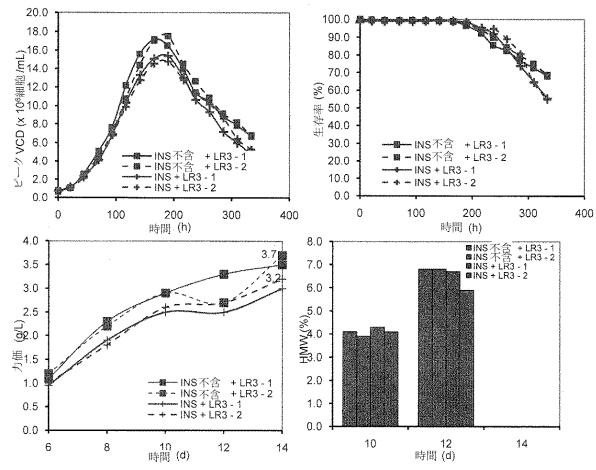
【図 1 5】

FIG. 15



【図 16】

FIG. 16



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/064758

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/00 C12N15/62 C12N15/63 C12P21/02
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)

C12N C12P

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, CHEM ABS Data, Sequence Search, 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	INN H. Y. YUK ET AL: "A GFP-based screen for growth-arrested, recombinant protein-producing cells", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 79, no. 1, 5 July 2002 (2002-07-05), pages 74-82, XP055105502, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.10293 the whole document "Selection strategy"; page 77, left-hand column figure 2 ----- -/-	1,3,6,7, 11-13, 17-20

☒ 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

5 March 2014

Date of mailing of the international search report

14/03/2014

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

Zuber Perez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/064758

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONG KWANG HONG ET AL: "Growth factor withdrawal in combination with sodium butyrate addition extends culture longevity and enhances antibody production in CHO cells", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 155, no. 2, 17 June 2011 (2011-06-17), pages 225-231, XP028260117, ISSN: 0168-1656, DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2011.06.020 [retrieved on 2011-06-23] the whole document 2.1-2.2; page 226 3.1; page 227 - page 228 -----	17-20
X	WO 2008/141207 A1 (AMGEN INC [US]; MORRIS ARVIA ELEANOR [US]; VIAJE AURORA VILLEGAS [US];) 20 November 2008 (2008-11-20) the whole document page 29 - page 31; example 1 -----	17-20
X	BRIAN RASMUSSEN ET AL: "Isolation, characterization and recombinant protein expression in Veggie-CHO: A serum-free CHO host cell line", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 28, no. 1-3, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 31-42, XP019236568, ISSN: 1573-0778, DOI: 10.1023/A:1008052908496 the whole document "Isolation of Veggie-CHO cells ..."; page 37 -----	17-20
X	MORRIS A E ET AL: "EFFECTS OF INSULIN AND LONGR3 ON SERUM-FREE CHINESE HAMSTER OVARY CELL CULTURES EXPRESSING TWO RECOMBINANT PROTEINS", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, AMERICAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS, US, vol. 16, no. 5, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 693-697, XP000979091, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/BP0000914 the whole document figures 1B, 2B -----	1,3, 6-13, 17-20
Y	----- -/--	2,4,5, 14-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/064758

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/023085 A1 (WYETH LLC [US]; MELVILLE MARK WALLACE [US]; CHAMBERLAIN TARA ANN [US];) 23 February 2012 (2012-02-23) the whole document claims 1-53 page 52 - page 58; examples 1-2 -----	2,4,5, 14-16
A	SUNLEY K ET AL: "Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 28, no. 3, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 385-394, XP026983670, ISSN: 0734-9750 [retrieved on 2010-02-13] the whole document -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/064758

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008141207 A1	20-11-2008	AU 2008251405 A1 CA 2687082 A1 EP 2152856 A1 ES 2392701 T3 US 2009123975 A1 US 2012021459 A1 WO 2008141207 A1	20-11-2008 20-11-2008 17-02-2010 13-12-2012 14-05-2009 26-01-2012 20-11-2008
WO 2012023085 A1	23-02-2012	CA 2807607 A1 EP 2606119 A1 JP 2013535981 A US 2013150554 A1 WO 2012023085 A1	23-02-2012 26-06-2013 19-09-2013 13-06-2013 23-02-2012

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

(72)発明者 ティエン・ジュン

アメリカ合衆国 1 3 0 5 7 ニューヨーク州イースト・シラキューズ、トンプソン・ロード 6 0 0 0 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 マイケル・ボリス

アメリカ合衆国 0 1 7 4 8 マサチューセッツ州ホプキントン、サウス・ストリート 3 5 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ジェンジアン・リ

アメリカ合衆国 0 1 7 4 8 マサチューセッツ州ホプキントン、サウス・ストリート 3 5 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ニコラス・アブアブシ

アメリカ合衆国 0 1 7 4 8 マサチューセッツ州ホプキントン、サウス・ストリート 3 5 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 アンジェラ・オー

アメリカ合衆国 1 3 0 5 7 ニューヨーク州イースト・シラキューズ、トンプソン・ロード 6 0 0 0 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ナン・シン・チエン

アメリカ合衆国 1 3 0 5 7 ニューヨーク州イースト・シラキューズ、トンプソン・ロード 6 0 0 0 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 シャー・ピン・ダイ

アメリカ合衆国 0 8 8 2 2 ニュージャージー州フレミントン、ストットホフ・コート 2 番

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA21 BA31 CA07 DA02 EA04 FA02 GA11

4B064 AG02 AG31 CA10 CA19 CD30

4B065 AA91X AB01 BA02 BB40 BC50 BD39 CA44