

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-537760
(P2023-537760A)

(43)公表日 令和5年9月5日(2023.9.5)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	B	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全100頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-510446(P2023-510446)			(71)出願人	391015708
(86)(22)出願日	令和3年8月13日(2021.8.13)				ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(85)翻訳文提出日	令和5年4月12日(2023.4.12)				パニー
(86)国際出願番号	PCT/US2021/046029				B R I S T O L - M Y E R S S Q U I
(87)国際公開番号	WO2022/036275				B B C O M P A N Y
(87)国際公開日	令和4年2月17日(2022.2.17)				アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャ
(31)優先権主張番号	63/066,122				ジー州 プリンストン、ルート 2 0 6 ア
(32)優先日	令和2年8月14日(2020.8.14)				ンド・プロビンス・ライン・ロード
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100145403
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			(74)代理人	弁理士 山尾 憲人
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(				100122301
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			(74)代理人	弁理士 富田 憲史
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				100157956
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			(74)代理人	弁理士 稲井 史生
	最終頁に続く				100170520
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質の製造工程

(57)【要約】

本開示は、生産中のタンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する新規な方法を提供する。本開示はまた、タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御しながら、タンパク質収量を改善する新規な方法も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質を生産するために細胞増殖速度、細胞生存率、生細胞密度および／または細胞の力価を制御する方法であって、36℃である最初の温度設定値の下でタンパク質誘導期のためにバイオリアクター内で細胞を培養すること、ならびに33℃である第2の温度設定値および31℃である最後の温度設定値で細胞を培養することを含む方法。

【請求項 2】

細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、(i) 36.0℃である最初の温度設定値および36℃未満である第2の温度設定値、(ii) 36.5℃未満である最初の温度設定値および31℃である最後の温度設定値、または(iii) 36.5℃未満である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および33℃未満である最後の温度設定値を含む、方法。

10

【請求項 3】

適した条件が、7.0である最初のpH設定値および6.9である第2のpH設定値、またはpH 6.9である最初のpH設定値をさらに含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

適した条件が、約96時間でのpHシフトをさらに含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

適した条件が、約 0.30×10^6 個/mLである最初の生細胞密度(VCD)設定値をさらに含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

適した条件が、15%と25%との間である最初のCO₂設定値をさらに含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

適した条件が、約76時間での第1の供給時間をさらに含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でタンパク質誘導期のためにバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、

30

a. 36℃である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および31℃である第3の温度設定値、

b. 7.0である最初のpH設定値および6.9である第2のpH設定値、もしくは6.9である最初のpH、

c. 0.15×10^6 個/mLと 0.45×10^6 個/mLとの間である最初の生細胞密度(VCD)設定値、

d. 10%から40%の間である最初のCO₂設定値、または

e. それらの任意の組合せ

40

を含む、方法。

【請求項 9】

適した条件が、

a. 36℃である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および31℃である第3の温度設定値、

b. 7.0である最初のpH設定値および6.9である第2のpH設定値、

c. 約 0.30×10^6 個/mLである最初の生細胞密度(VCD)設定値、ならびに

d. 15%と25%との間である最初のCO₂設定値

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

50

最後の温度設定値が、約 228 から約 252 時間で生じる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

最後の温度設定値が、最初の温度設定値の後、約 228 時間、約 234 時間、約 240 時間、約 246 時間、または約 252 時間で生じる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

最後の温度設定値が 31℃であり、240 時間後に生じる、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

第 2 の温度設定値が、約 120 時間から約 168 時間で生じる、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

第 2 の温度設定値が、約 120 時間、約 126 時間、約 132 時間、約 138 時間、約 144 時間、約 150 時間、約 156 時間、約 162 時間、または約 168 時間で生じる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

第 2 の温度設定値が 33℃であり、144 時間後に生じる、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

条件が、適した条件を用いない方法と比較して、タンパク質収量を少なくとも 150%、少なくとも約 160%、少なくとも約 170%、少なくとも約 180%、少なくとも約 190%、少なくとも約 200%、少なくとも約 210%、少なくとも約 220%、少なくとも約 230%、少なくとも約 240%、少なくとも約 250%、少なくとも約 260%、少なくとも約 270%、少なくとも約 280%、少なくとも約 290%、少なくとも約 300%、少なくとも約 310%、少なくとも約 320%、少なくとも約 330%、少なくとも約 340%、少なくとも約 350%、少なくとも約 360%、少なくとも約 370%、少なくとも約 380%、少なくとも約 390%、または少なくとも約 400% 改善させる、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

細胞増殖速度を低下させる、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

細胞増殖が、約 30.0 時間から約 40.0 時間である 0～5 日平均倍加時間を示す、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

細胞増殖が、約 35.1 時間である 0～5 日平均倍加時間を示す、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

細胞生存率を制御する、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

細胞生存率が、約 10.0×10^6 個/mL から約 15.0×10^6 個/mL である平均ピーク生細胞密度 (VCD) を示す、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

細胞生存率が、約 11.2×10^6 個/mL である平均ピーク生細胞密度 (VCD) を示す、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

細胞生存率が、約 0.05×10^9 個/mL から約 0.11×10^9 個/mL である 0～14 日平均生細胞密度積分 (IVCD) を示す、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

細胞生存率が、約 0.10×10^9 個/mL である 0～14 日平均生細胞密度積分 (IVCD) を示す、請求項 21 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

力価を制御する、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

力価が、約 1.50 g / L から約 3.5 g / L である第 14 日平均力価を示す、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

力価が、約 2.87 g / L である第 14 日平均力価を示す、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

力価が、約 20.0 pg / 細胞・日から約 40.0 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す、請求項 25 に記載の方法。

10

【請求項 29】

力価が、約 38.5 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

工程が、上流バイオリアクターパラメーターを改変することをさらに含み、上流リアクターパラメーターが、(i) 供給時間、(ii) 最初の pH、(iii) pH シフト、(iv) CO₂、(v) 最初の細胞密度、または (vi) それらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 32】

グリコシル化プロファイルが、1 つまたは複数の N 結合型グリカンを含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

N 結合型グリカンが、G0F、G1F、G2F、S1G1F、S1G2F、および／または S2G2F を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

14 日後にグリコシル化プロファイルを測定することをさらに含む、請求項 31 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 35】

タンパク質が CTLA4 ドメインを含む、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

タンパク質が融合タンパク質である、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

融合タンパク質が Fc 部分を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

タンパク質がアバタセプトである、請求項 1 から 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

タンパク質が、配列番号 5 に示されたアミノ酸配列である、請求項 38 に記載の方法。

40

【請求項 40】

G0F が、約 7.0 % または約 6.5 % 以下である相対的存在量を占める、請求項 33 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

G1F が、約 7.5 % 以下であるかまたは約 7 % である相対的存在量を占める、請求項 33 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

G2F が、約 25 % 以下であるかまたは約 1.5 % から約 23 % である相対的存在量を占める、請求項 33 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 4 3】

S 1 G 1 F が、約 1 3 . 5 % 以下であるかまたは約 1 2 . 5 % である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

S 1 G 2 F が、約 3 3 % 以上であるかまたは約 3 2 % から約 4 9 % である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

S 2 G 2 F が、約 1 2 % 以上であるかまたは約 1 4 % から約 4 8 . 5 % である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

G 2 F が、約 1 . 5 % から約 2 3 % である相対的存在量を占め、S 1 G 2 F が、約 3 2 % から約 4 9 % である相対的存在量を占め、および／または S 2 G 2 F が、約 1 4 % から約 4 8 . 5 % である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

G 2 F が、約 2 5 % 以下である相対的存在量を占め、S 1 G 2 F が、約 3 3 % 以上である相対的存在量を占め、および／または S 2 G 2 F が、約 1 2 % 以上である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

G 0 F が、約 6 . 5 % 以下である相対的存在量を占め、G 1 F が、約 7 % 以下である相対的存在量を占め、G 2 F が、約 1 . 5 % から約 2 3 % である相対的存在量を占め、S 1 G 1 F が、約 1 2 . 5 % 以下である相対的存在量を占め、S 1 G 2 F が、約 3 2 % から約 4 9 % である相対的存在量を占め、および／または S 2 G 2 F が、約 1 4 % から約 4 8 . 5 % である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

G 0 F が、約 7 . 0 % 以下である相対的存在量を占め、G 1 F が、約 7 . 5 % 以下である相対的存在量を占め、G 2 F が、約 2 5 % 以下である相対的存在量を占め、S 1 G 1 F が、約 1 3 . 5 % 以下である相対的存在量を占め、S 1 G 2 F が、約 3 3 % 以上である相対的存在量を占め、および／または S 2 G 2 F が、約 1 2 % 以上である相対的存在量を占める、請求項 3 3 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、アバタセプトの A s n 7 6 (T 5)、A s n 1 0 8 (T 7)、および／または A s n 2 0 7 (T 1 4) からなる群から選択される 1 つまたは複数の残基に位置する、請求項 3 9 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 2 . 0 % と約 1 0 . 0 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 2 . 5 % と約 1 0 % との間、約 2 . 5 % と約 9 . 5 % との間、約 2 . 5 % と約 9 % との間、約 2 . 5 % と約 8 . 5 % との間、約 2 . 5 % と約 8 % との間、約 2 . 5 % と約 7 . 5 % との間、約 2 . 5 % と約 7 % との間、約 2 . 5 % と約 6 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 1 0 % との間、約 3 . 0 % と約 9 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 9 % との間、約 3 . 0 % と約 8 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 8 % との間、約 3 . 0 % と約 7 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 7 % との間、または約 3 . 0 % と約 6 . 5 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 3 . 2 % と 6 . 6 % との間、約 3 . 2 % と約 4 . 6 % との間、または 3 . 2 % と約 6 . 6 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

G O F の相対的存在量が約 4 . 0 % である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1 . 0 % と約 6 % との間である G O F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1 . 0 % と約 6 % との間、約 1 . 0 % と約 5 . 5 % との間、約 1 . 0 % と約 5 . 0 % との間、約 1 . 0 % と約 4 . 5 % との間、約 1 . 0 % と約 4 . 0 % との間、約 1 . 5 % と約 6 % との間、約 1 . 5 % と約 5 . 5 % との間、約 1 . 5 % と約 5 . 0 % との間、約 1 . 5 % と約 4 . 5 % との間、約 1 . 5 % と約 4 . 0 % との間、約 2 . 0 % と約 6 % との間、約 2 . 0 % と約 5 . 5 % との間、約 2 . 0 % と約 5 . 0 % との間、約 2 . 0 % と約 4 . 5 % との間、または約 2 . 0 % と約 4 . 0 % との間である G O F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 2 . 1 % と約 4 . 0 % との間、約 1 . 8 % と約 3 . 5 % との間、または約 1 . 8 % と 4 . 0 % との間である G O F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

G O F の相対的存在量が約 3 . 4 % である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 5 % と約 1 2 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 5 % と約 1 2 % との間、約 5 % と約 1 1 . 5 % との間、約 5 % と約 1 1 % との間、約 5 % と約 1 0 . 5 % との間、約 5 % と約 1 0 % との間、約 5 . 5 % と約 1 2 % との間、約 5 . 5 % と約 1 1 . 5 % との間、約 5 . 5 % と約 1 1 % との間、約 5 . 5 % と約 1 0 . 5 % との間、約 5 . 5 % と約 1 0 % との間、約 6 % と約 1 2 % との間、約 6 % と約 1 1 . 5 % との間、約 6 % と約 1 1 % との間、約 6 % と約 1 0 . 5 % との間、約 6 % と約 1 0 % との間、約 6 . 5 % と約 1 2 % との間、約 6 . 5 % と約 1 1 . 5 % との間、約 6 . 5 % と約 1 1 % との間、約 6 . 5 % と約 1 0 . 5 % との間、約 6 . 5 % と約 1 0 % との間、約 7 % と約 1 2 % との間、約 7 % と約 1 1 . 5 % との間、約 7 % と約 1 1 % との間、約 7 % と約 1 0 . 5 % との間、または約 7 % と約 1 0 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 7 . 2 % と約 9 . 8 % との間、約 6 . 3 % と 1 0 . 6 % との間、または約 7 . 2 % と約 1 0 . 6 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

G 2 F の相対的存在量が約 7 . 8 % である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 5 % と約 2 1 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 5 0 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn108(T7)に位置し、約5%と約21%との間、約5%と約20.5%との間、約5%と約20%との間、約5%と約19.5%との間、約5%と約19%との間、約5.5%と約21%との間、約5.5%と約20.5%との間、約5.5%と約20%との間、約5.5%と約19.5%との間、約5.5%と約19%との間、約6%と約21%との間、約6%と約20.5%との間、約6%と約20%との間、約6%と約19.5%との間、約6%と約19%との間、約6.5%と約21%との間、約6.5%と約20.5%との間、約6.5%と約20%との間、約6.5%と約19.5%との間、約6.5%と約19%との間、約7%と約21%との間、約7%と約20.5%との間、約7%と約20%との間、約7%と約19.5%との間、約7%と約19%との間、約7.5%と約21%との間、約7.5%と約20.5%との間、約7.5%と約20%との間、約7.5%と約19.5%との間、約7.5%と約19%との間、約8%と約21%との間、約8%と約20.5%との間、約8%と約20%との間、約8%と約19.5%との間、または約8%と約19%の間であるG2Fの相対的存在量を含む、請求項50から62のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項65】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn108(T7)に位置し、約8.2%と約14.1%との間、約8.0%と約18.6%との間、または約8.2%と約14.1%との間であるG2Fの相対的存在量を含む、請求項50から62のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項66】

G2Fの相対的存在量が約12.4%である、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

G2Fが、ガラクトース- α -1,3-ガラクトース部分(G2F-Gal)をさらに含み、G2F-Galが、約1.4%以下である相対的存在量を占める、請求項63~66のいずれか一項に記載の方法。

【請求項68】

G2F-Galが、約1.0%から約1.4%の間である相対的存在量を占める、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

G2F-Galが、約0.4%から約0.9%の間である相対的存在量を占める、請求項67に記載の方法。

30

【請求項70】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn76(T5)に位置し、約29%と約38%の間であるS1G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn76(T5)に位置し、約29%と約38%との間、約29%と約37.5%との間、約29%と約37%との間、約29%と約36.5%との間、約29.5%と約38%との間、約29.5%と約37.5%との間、約29.5%と約37%との間、約29.5%と約36.5%との間、約30%と約38%との間、約30%と約37.5%との間、約30%と約37%との間、約30%と約36.5%との間、約31.5%と約38%との間、約31.5%と約37.5%との間、約31.5%と約37%との間、約31.5%と約36.5%との間であるS1G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から69のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項72】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn76(T5)に位置し、約31.6%と約35.1%との間、約31.3%と約36.5%との間、または約31.3%と約36.5%との間であるS1G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項73】

50

S 1 G 2 F の相対的存在量が約 33.3%である、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 108 (T 7) に位置し、33%と約 45%との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 108 (T 7) に位置し、約 33%と約 45%との間、約 33%と約 44.5%との間、約 33%と約 44%との間、約 33%と約 43.5%との間、約 33%と約 43%との間、約 33%と約 42.5%との間、約 33.5%と約 45%との間、約 33.5%と約 44.5%との間、約 33.5%と約 44%との間、約 33.5%と約 43.5%との間、約 33.5%と約 43%との間、約 33.5%と約 42.5%との間、約 34%と約 45%との間、約 34%と約 44.5%との間、約 34%と約 44%との間、約 34%と約 43.5%との間、約 34%と約 43%との間、約 34%と約 42.5%との間、約 34.5%と約 45%との間、約 34.5%と約 44.5%との間、約 34.5%と約 44%との間、約 34.5%と約 43.5%との間、約 34.5%と約 43%との間、または約 34.5%と約 42.5%との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 73 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 76】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 108 (T 7) に位置し、約 34.2%と約 37.7%との間、約 35.5%と約 42.3%との間、または約 34.2%と約 42.3%との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 73 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 77】

S 1 G 2 F の相対的存在量が約 36.5%である、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

S 1 G 2 F が、ガラクトース- α -1, 3-ガラクトース部分 (S 1 G 2 F-G a l) をさらに含み、S 1 G 2 F-G a l が、約 4.7%以下である相対的存在量を占める、請求項 74 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

S 1 G 2 F-G a l が、約 2.3%から約 4.7%の間である相対的存在量を占める、請求項 78 に記載の方法。

30

【請求項 80】

S 1 G 2 F-G a l が、約 1.4%から約 1.8%の間である相対的存在量を占める、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 81】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 76 (T 5) に位置し、約 13%と約 25%との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 80 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 76 (T 5) に位置し、約 13%と約 25%との間、約 13%と約 24.5%との間、約 13%と約 24%との間、約 13%と約 23.5%との間、約 13%と約 23%との間、約 13.5%と約 25%との間、約 13.5%と約 24.5%との間、約 13.5%と約 24%との間、約 13.5%と約 23.5%との間、約 13.5%と約 23%との間、約 14%と約 25%との間、約 14%と約 24.5%との間、約 14%と約 24%との間、約 14%と約 23.5%との間、約 14%と約 23%との間、約 14.5%と約 25%との間、約 14.5%と約 24.5%との間、約 14.5%と約 24%との間、約 14.5%と約 23.5%との間、約 14.5%と約 23%との間、約 15%と約 25%との間、約 15%と約 24.5%との間、約 15%と約 24%との間、約 15%と約 23.5%との間、約 15%と約 23%との間、約 15.5%と約 25%との間、約 15.5%と約 24.5%との間、約 15.5%と約

40

50

24%との間、約15.5%と約23.5%との間、または約15.5%と約23%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項83】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn76(T5)に位置し、約18.1%と約22.9%との間、約15.4%と約20%との間、約15.4%と約22.9%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項84】

S2G2Fの相対的存在量が約18.5%である、請求項83に記載の方法。

10

【請求項85】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn108(T7)に位置し、約18%と約36%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項86】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn108(T7)に位置し、約18%と約36%との間、約18%と約35.5%との間、約18%と約35%との間、約18%と約34.5%との間、約18%と約34%との間、約18%と約33.5%との間、約18.5%と約36%との間、約18.5%と約35.5%との間、約18.5%と約35%との間、約18.5%と約34.5%との間、約18.5%と約34%との間、約18.5%と約33.5%との間、約19%と約36%との間、約19%と約35.5%との間、約19%と約35%との間、約19%と約34.5%との間、約19%と約34%との間、約19%と約33.5%との間、約19.5%と約36%との間、約19.5%と約35.5%との間、約19.5%と約35%との間、約19.5%と約34.5%との間、約19.5%と約34%との間、約19.5%と約33.5%との間、約20%と約36%との間、約20%と約35.5%との間、約20%と約35%との間、約20%と約34.5%との間、約20%と約34%との間、約20%と約33.5%との間、約20.5%と約36%との間、約20.5%と約35.5%との間、約20.5%と約35%との間、約20.5%と約34.5%との間、約20.5%と約34%との間、または約20.5%と約33.5%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から84のいずれか一項に記載の方法。

20

30

【請求項87】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn108(T7)に位置し、約23.2%と約33.8%との間、約20.8%と約32.6%との間、または約20.8%と33.8%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む、請求項50から84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

S2G2Fの相対的存在量が約23.5%である、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn76(T5)に位置し、約2%と約8%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む、請求項50から88のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項90】

1つまたは複数のN結合型グリカンが、残基Asn76(T5)に位置し、約2%と約8%との間、約2%と約7.5%との間、約2%と約7%との間、約2%と約6.5%との間、約2%と約6%との間、約2%と約5.5%との間、約2.5%と約8%との間、約2.5%と約7.5%との間、約2.5%と約7%との間、約2.5%と約6.5%との間、約2.5%と約6%との間、約2.5%と約5.5%との間、約3%と約8%との間、約3%と約7.5%との間、約3%と約7%との間、約3%と約6.5%との間、約3%と約6%との間、約3%と約5.5%との間、約3.5%と約8%との間、約3.5

50

%と約 7.5 %との間、約 3.5 %と約 7 %との間、約 3.5 %と約 6.5 %との間、約 3.5 %と約 6 %との間、約 3.5 %と約 5.5 %との間、約 4 %と約 8 %との間、約 4 %と約 7.5 %との間、約 4 %と約 7 %との間、約 4 %と約 6.5 %との間、約 4 %と約 6 %との間、または約 4 %と約 5.5 %との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 91】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 76 (T 5) に位置し、約 4.4 %と約 5.6 %との間、または約 4.0 %と約 5.5 %との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 92】

S 1 G 3 F の相対的存在量が約 4.6 %である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 108 (T 7) に位置し、約 0.5 %と約 4 %との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 94】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 108 (T 7) に位置し、約 0.5 %と約 4 %との間、約 0.5 %と約 3.5 %との間、約 0.5 %と約 3 %との間、約 0.5 %と約 2.5 %との間、約 1 %と約 4 %との間、約 1 %と約 3.5 %との間、約 1 %と約 3 %との間、または約 1 %と約 2.5 %との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 95】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 108 (T 7) に位置し、約 1.4 %と約 2.2 %との間、約 1.1 %と約 1.9 %との間、または約 1.1 %と約 2.2 %との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 92 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

S 1 G 3 F の相対的存在量が約 1.8 %である、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 76 (T 5) に位置し、約 0.5 %と約 4 %との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 76 (T 5) に位置し、約 0.5 %と約 4 %との間、約 0.5 %と約 3.5 %との間、約 0.5 %と約 3 %との間、約 0.5 %と約 2.5 %との間、約 1 %と約 4 %との間、約 1 %と約 3.5 %との間、約 1 %と約 3 %との間、または約 1 %と約 2.5 %との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 99】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、残基 A s n 76 (T 5) に位置し、約 1.9 %と約 2.4 %との間、約 1.4 %と約 2.1 %との間、または約 1.4 %と約 2.4 %との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む、請求項 50 から 96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

S 2 G 4 F の相対的存在量が約 2.3 %である、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、シアル酸であり、約 8 ~ 約 11 である N A N A のモル比を有する、請求項 32 ~ 100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、シアル酸であり、約 8.3 から約 11、約 9.

10

20

30

40

50

5 から約 10.1、または約 8.3 から約 10.1 である NANA のモル比を有する、請求項 32～100 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 103】

NANA のモル比が約 10.0 である、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、シアル酸であり、約 0.1 から約 2.0 である NGNA のモル比を有する、請求項 32～103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 105】

1 つまたは複数の N 結合型グリカンが、シアル酸であり、0.90 から約 1.20、または約 0.3 から約 1.2 である NGNA のモル比を有する、請求項 32～103 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

NGNA のモル比が約 1.0 である、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

グリコシル化プロファイルが、N 結合型炭水化物プロファイル放出法を介して分析される、請求項 32 から 106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

グリコシル化プロファイルが、1 つまたは複数の非シアリル化グリカン（ドメイン I）、モノシアリル化グリカン（ドメイン II）、ジシアリル化グリカン（ドメイン III）、ならびに／またはトリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメイン IV + V）を含む、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

非シアリル化グリカン（ドメイン I）が、約 28 から約 37、約 29 から約 32、約 28 から約 32、または約 29 から約 37 のモル比を有する、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

非シアリル化グリカン（ドメイン I）が、約 31 のモル比を有する、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

モノシアリル化グリカン（ドメイン II）が、約 26 から約 28、約 27 から約 33、約 26 から約 33、約 27 から約 28 のモル比を有する、請求項 108～110 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 112】

モノシアリル化グリカン（ドメイン II）が、約 27 のモル比を有する、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

ジシアリル化グリカン（ドメイン III）が、約 27 から約 28、約 22 から約 31、約 27 から約 31、または約 22 から約 28 のモル比を有する、請求項 108～112 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

ジシアリル化グリカン（ドメイン III）が、約 27.4 のモル比を有する、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメイン IV + V）が、約 13 から約 16、約 8 から約 16、または約 8 から約 16 のモル比を有する、請求項 108～114 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 116】

トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメイン IV + V）が、約 14.6 のモル比を有する、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

グリコシル化プロファイルが、1 つまたは複数の O 結合型グリカンを含む、請求項 31

10

20

30

40

50

～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

グリコシル化プロファイルが、複数のガラクトース- α -1, 3-ガラクトース (α -gal) 結合を含まない、請求項 3 1～1 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

C T L A 4 が、C 末端リジンを含む、請求項 3 5～1 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

C 末端リジンが、約 2 0 %～約 2 5 %である相対的存在量を占める、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

C 末端リジンが、約 3 %から約 1 0 %である相対的存在量を占める、請求項 1 1 9 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

O 結合型グリカンが、残基 S e r 1 2 9、S e r 1 3 0、S e r 1 3 6、および／または S e r 1 3 9 に位置する、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

バイオリアクターが、グルコースまたはガラクトースを含む供給媒体を含む、請求項 1～1 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 1 から 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

細胞が、チャイニーズハムスター卵巢 (C H O) 細胞である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

細胞が、C H O-K 1 細胞、C H O-D X B 1 1 細胞、または C H O-D G 4 4 細胞である、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

C T L A 4-F c 融合タンパク質の二分岐グリカンを分析する方法であって、C T L A 4 タンパク質における 1 つまたは複数のアスパラギン残基に結合した 1 つまたは複数の N 結合型グリカン測定することを含み、二分岐グリカンの一方が G 2 F である、方法。

【請求項 1 2 8】

二分岐グリカンが、G 0 F、G 1 F、G 2 F、S 1 G 1 F、S 1 G 2 F、および／または S 2 G 2 F からなる群から選択される、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

二分岐グリカンが、蛍光検出を用いる超高性能液体クロマトグラフィー (U P L C-F L R) を介して測定される、請求項 1 2 7 または 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

二分岐グリカンが、H I L I C N 結合型グリカンプロファイリング法を介して測定される、請求項 1 2 7 から 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

C T L A 4-F c 融合タンパク質の F c ドメインが、測定の前に切断される、請求項 1 2 7 から 1 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

C T L A 4-F c 融合タンパク質の二分岐グリカン分析する方法であって、C T L A 4-F c 融合タンパク質の等電点電気泳動を実行することを含む方法。

【請求項 1 3 3】

等電点電気泳動が、画像化された毛細血管等電点電気泳動である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

10

20

30

40

50

等電点電気泳動が行われた C T L A 4 - F c 融合タンパク質が、第 I 群、第 I I 群、および第 I I I 群を形成する、請求項 1 3 2 または 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

第 I 群が全体の 4 % 以下であり、第 I I 群が全体の 8 7 % 以上であり、および／または第 I I I 群が全体の 1 0 % 以下である、請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

請求項 1 から 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法によって生産される細胞。

【請求項 1 3 7】

哺乳動物細胞である、請求項 1 3 6 に記載の細胞。

【請求項 1 3 8】

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である、請求項 1 3 7 に記載の細胞。

【請求項 1 3 9】

C H O - K 1 細胞、C H O - D X B 1 1 細胞、または C H O - D G 4 4 細胞である、請求項 1 3 8 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2 0 2 0 年 8 月 1 4 日に出版された米国仮出願第 6 3 / 0 6 6 , 1 2 2 号の優先権の利益を主張するものである。

【0 0 0 2】

E F S - W E B を回して電子的に提出された配列表への言及

本出願とともに出版される A S C I I テキストファイル (名称 3 3 3 8 _ 1 8 8 P C 0 1 _ S e q l i s t i n g _ S T 2 5 . t x t 、サイズ: 2 4 , 7 2 0 バイト; および作成日: 2 0 2 1 年 8 月 1 2 日) において電子的に提出される配列表の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

発明の背景

タンパク質治療薬の市場は著しく成長しており、開発のペースは上昇し続けている。しかし、量を維持し、生産コストを削減し、生産の柔軟性を提供しながら、所望の品質属性、例えば、グリコシル化を維持することは、産業界にとって難題である。市場の需要に応えるためには、タンパク質治療薬の効率的な製造規模での生産が必要である。

【0 0 0 4】

グリコシル化は、すべてのタンパク質翻訳後修飾 (P T M) の中で最も豊富なものの 1 つである。これは、タンパク質側鎖への糖残基の付加によって糖タンパク質が形成されることから生じる。哺乳動物糖タンパク質のオリゴ糖は一般的に、限られた数の単糖から構築されるが、それらの構造的多様性は膨大であり、これは主としてそれらが複雑な文枝パターンを形成することが多いことが理由である。

【0 0 0 5】

グリコシル化は、免疫防御、受精、ウイルス複製、寄生虫感染、細胞増殖、炎症、および細胞間接着を含む多くの特定の生物機能において重要な役割を果たす。医薬用の糖タンパク質の場合、グリコシル化は、タンパク質の立体配座の安定性、クリアランス速度、タンパク質分解からの保護に影響を及ぼし、タンパク質の溶解性を改善する。異なるグリコフォームは異なる生物活性を有する可能性があるため、生産中のグリコシル化をモニターして制御することができることは、バイオ医薬品分子の品質にとって極めて重要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

しかし、発酵中のグリコシル化は、天然にはある程度の不均一性を伴って起こり、発現

10

20

30

40

50

系、工程条件、培地組成、供給プロトコール、精製工程、またはそれらの任意の組合せなどの多くの異なる要因によって影響され得る。その結果、タンパク質のグリコシル化パターンを一貫して維持しながら、培養を含むタンパク質製造工程を改善することには、需要がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でタンパク質誘導期のためにバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、36℃である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および31℃である第3の温度設定値；7.0である最初のpH設定値および6.9である第2のpH設定値； 0.15×10^6 個/mLと 0.45×10^6 個/mLとの間、例えば、 0.30×10^6 個/mLである最初の生細胞密度（VCD）設定値；6.9である最初のpH；10%から40%の間である最初のCO₂設定値；またはそれらの任意の組合せを含む、方法に関する。一部の態様では、適した条件は、36℃である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および31℃である第3の温度設定値；7.0である最初のpH設定値および6.9である第2のpH設定値； 0.30×10^6 である最初の生細胞密度（VCD）設定値；ならびに15%と25%との間である最初のCO₂設定値を含む。

10

【0008】

本開示は、タンパク質を生産するために細胞増殖速度、細胞生存率、生細胞密度および／または細胞の力価を制御する方法であって、36℃である最初の温度設定値の下でタンパク質誘導期のためにバイオリアクター内で細胞を培養すること、および33℃である第2の温度設定値および31℃である最後の温度設定値で細胞を培養することを含む方法に関する。

20

【0009】

本開示はまた、細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、(i) 36.0℃である最初の温度設定値および36.0℃未満である第2の温度設定値、(ii) 36.5℃未満である最初の温度設定値および31.0℃である最後の温度設定値、または(iii) 36.5℃未満である最初の温度設定値、33.0℃である第2の温度設定値、および33.0℃未満である最後の温度設定値を含む、方法にも関する。

30

【0010】

一部の態様では、最後の温度設定値は、約228から約252時間で生じる。一部の態様では、最後の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約228時間、約234時間、約240時間、約246時間、または約252時間で生じる。一部の態様では、最後の温度設定値は31.0℃であり、240時間後に生じる。一部の態様では、第2の温度設定値は、約120時間から約168時間で生じる。一部の態様では、第2の温度設定値は、約120時間、約126時間、約132時間、約138時間、約144時間、約150時間、約156時間、約162時間、または約168時間で生じる。一部の態様では、第2の温度設定値は33.0℃であり、144時間後に生じる。

【0011】

一部の態様では、本条件は、適した条件を用いない方法と比較して、タンパク質収量を少なくとも150%、少なくとも約160%、少なくとも約170%、少なくとも約180%、少なくとも約190%、少なくとも約200%、少なくとも約210%、少なくとも約220%、少なくとも約230%、少なくとも約240%、少なくとも約250%、少なくとも約260%、少なくとも約270%、少なくとも約280%、少なくとも約290%、少なくとも約300%、少なくとも約310%、少なくとも約320%、少なくとも約330%、少なくとも約340%、少なくとも約350%、少なくとも約360%、少なくとも約370%、少なくとも約380%、少なくとも約390%、または少なくとも約400%改善させる。一部の態様では、本方法は、細胞増殖速度を低下させる。一部の態様では、細胞増殖は、約30.0時間から約40.0時間である0～5日平均倍加

40

50

時間を示す。一部の態様では、細胞増殖は、約 35.1 時間である 0～5 日平均倍加時間を示す。

【0012】

一部の態様では、本方法は、細胞生存率を制御する。一部の態様では、細胞生存率は、約 10.0×10^6 個/mL から約 15.0×10^6 個/mL である平均ピーク生細胞密度 (VCD) を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 11.2×10^6 個/mL である平均ピーク生細胞密度 (VCD) を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.05×10^9 個/mL から約 0.11×10^9 個/mL である 0～14 日平均生細胞密度積分 (IVCD) を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.10×10^9 個/mL である 0～14 日平均生細胞密度積分 (IVCD) を示す。一部の態様では、本方法は、力価を制御する。一部の態様では、力価は、約 1.50 g/L から約 3.5 g/L である第 14 日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.87 g/L である第 14 日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 20.0 pg/細胞・日から約 40.0 pg/細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 38.5 pg/細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、工程は、上流バイオリアクターパラメーターを変更することをさらに含み、上流リアクターパラメーターは、(i) 供給時間、(ii) 最初の pH、(iii) pH シフト、(iv) CO₂、(v) 最初の細胞密度、または (vi) それらの任意の組合せからなる群から選択される。

10

【0013】

一部の態様では、本方法は、タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する。一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、1 つまたは複数の N 結合型グリカンを含む。一部の態様では、N 結合型グリカンは、G0F、G1F、G2F、S1G1F、S1G2F、および/または S2G2F を含む。一部の態様では、本方法は、14 日後にグリコシル化プロファイルを測定することをさらに含み。一部の態様では、タンパク質は CTLA4 ドメインを含む。一部の態様では、タンパク質は融合タンパク質である。一部の態様では、融合タンパク質は Fc 部分を含む。一部の態様では、タンパク質はアバタセプトである。一部の態様では、タンパク質は、配列番号 5 に示されたアミノ酸配列である。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、アバタセプトの Asn76 (T5)、Asn108 (T7)、および/または Asn207 (T14) からなる群から選択される 1 つまたは複数の残基に位置する。一部の態様では、G0F は、約 7.0 % または約 6.5 % 以下である相対的存在量を占める。一部の態様では、G1F は、約 7.5 % 以下であるかまたは約 7 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F は、約 25 % 以下であるかまたは約 1.5 % から約 23 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、S1G1F は、約 13.5 % 以下であるかまたは約 12.5 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、S1G2F は、約 33 % 以上であるかまたは約 32 % から約 49 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、S2G2F は、約 12 % 以上であるかまたは約 14 % から約 48.5 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F は、約 1.5 % から約 23 % である相対的存在量を占め、S1G2F は、約 32 % から約 49 % である相対的存在量を占め、および/または S2G2F は、約 14 % から約 48.5 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F は、約 25 % 以下である相対的存在量を占め、S1G2F は、約 33 % 以上である相対的存在量を占め、および/または S2G2F は、約 12 % 以上である相対的存在量を占める。一部の態様では、G0F は、約 6.5 % 以下である相対的存在量を占め、G1F は、約 7 % 以下である相対的存在量を占め、G2F は、約 1.5 % から約 23 % である相対的存在量を占め、S1G1F は、約 12.5 % 以下である相対的存在量を占め、S1G2F は、約 32 % から約 49 % である相対的存在量を占め、および/または S2G2F は、約 14 % から約 48.5 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、G0F は、約 7.0 % 以下である相対的存在量を占める。一部の態様では、G1F は、約 7.5 % 以下である相対的存在量を占め、G2F は、約 25 % 以下である相対的存在量を占め、S1G1F は、約 13.5 % 以下である相対的存在量を占め、S1G2F は、約 33 % 以上である相対的存在量を占め、および

20

30

40

50

／または S 2 G 2 F は、約 1 2 % 以上である相対的存在量を占める。

【 0 0 1 4 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 2 . 0 % と約 1 0 . 0 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 2 . 5 % と約 1 0 % との間、約 2 . 5 % と約 9 . 5 % との間、約 2 . 5 % と約 9 % との間、約 2 . 5 % と約 8 . 5 % との間、約 2 . 5 % と約 8 % との間、約 2 . 5 % と約 7 . 5 % との間、約 2 . 5 % と約 7 % との間、約 2 . 5 % と約 6 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 1 0 % との間、約 3 . 0 % と約 9 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 9 % との間、約 3 . 0 % と約 8 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 8 % との間、約 3 . 0 % と約 7 . 5 % との間、約 3 . 0 % と約 7 % との間、または約 3 . 0 % と約 6 . 5 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 3 . 2 % と 6 . 6 % との間、約 3 . 2 % と約 4 . 6 % との間、または 3 . 2 % と約 6 . 6 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、G 0 F の相対的存在量は約 4 . 0 % である。

10

【 0 0 1 5 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1 . 0 % と約 6 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1 . 0 % と約 6 % との間、約 1 . 0 % と約 5 . 5 % との間、約 1 . 0 % と約 5 . 0 % との間、約 1 . 0 % と約 4 . 5 % との間、約 1 . 0 % と約 4 . 0 % との間、約 1 . 5 % と約 6 % との間、約 1 . 5 % と約 5 . 5 % との間、約 1 . 5 % と約 5 . 0 % との間、約 1 . 5 % と約 4 . 5 % との間、約 1 . 5 % と約 4 . 0 % との間、約 2 . 0 % と約 6 % との間、約 2 . 0 % と約 5 . 5 % との間、約 2 . 0 % と約 5 . 0 % との間、約 2 . 0 % と約 4 . 5 % との間、または約 2 . 0 % と約 4 . 0 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 2 . 1 % と約 4 . 0 % との間、約 1 . 8 % と約 3 . 5 % との間、または約 1 . 8 % と 4 . 0 % との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、G 0 F の相対的存在量は約 3 . 4 % である。

20

【 0 0 1 6 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 5 % と約 1 2 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 5 % と約 1 2 % との間、約 5 % と約 1 1 . 5 % との間、約 5 % と約 1 1 % との間、約 5 % と約 1 0 . 5 % との間、約 5 % と約 1 0 % との間、約 5 . 5 % と約 1 2 % との間、約 5 . 5 % と約 1 1 . 5 % との間、約 5 . 5 % と約 1 1 % との間、約 5 . 5 % と約 1 0 . 5 % との間、約 5 . 5 % と約 1 0 % との間、約 6 % と約 1 2 % との間、約 6 % と約 1 1 . 5 % との間、約 6 % と約 1 1 % との間、約 6 % と約 1 0 . 5 % との間、約 6 % と約 1 0 % との間、約 6 . 5 % と約 1 2 % との間、約 6 . 5 % と約 1 1 . 5 % との間、約 6 . 5 % と約 1 1 % との間、約 6 . 5 % と約 1 0 . 5 % との間、約 6 . 5 % と約 1 0 % との間、約 7 % と約 1 2 % との間、約 7 % と約 1 1 . 5 % との間、約 7 % と約 1 1 % との間、約 7 % と約 1 0 . 5 % との間、または約 7 % と約 1 0 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 7 . 2 % と約 9 . 8 % との間、約 6 . 3 % と 1 0 . 6 % との間、または約 7 . 2 % と約 1 0 . 6 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、G 2 F の相対的存在量は約 7 . 8 % である。

30

40

【 0 0 1 7 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 5 % と約 2 1 % との間である G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 5 % と約

50

21%との間、約5%と約20.5%との間、約5%と約20%との間、約5%と約19.5%との間、約5%と約19%との間、約5.5%と約21%との間、約5.5%と約20.5%との間、約5.5%と約20%との間、約5.5%と約19.5%との間、約5.5%と約19%との間、約6%と約21%との間、約6%と約20.5%との間、約6%と約20%との間、約6%と約19.5%との間、約6%と約19%との間、約6.5%と約21%との間、約6.5%と約20.5%との間、約6.5%と約20%との間、約6.5%と約19.5%との間、約6.5%と約19%との間、約7%と約21%との間、約7%と約20.5%との間、約7%と約20%との間、約7%と約19.5%との間、約7%と約19%との間、約7.5%と約21%との間、約7.5%と約20.5%との間、約7.5%と約20%との間、約7.5%と約19.5%との間、約7.5%と約19%との間、約8%と約21%との間、約8%と約20.5%との間、約8%と約20%との間、約8%と約19.5%との間、または約8%と約19%の間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn108(T7)に位置し、約8.2%と約14.1%との間、約8.0%と約18.6%との間、または約8.2%と約14.1%の間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、G2Fの相対的存在量は約12.4%である。一部の態様では、G2Fは、ガラクトース- α -1, 3-ガラクトース部分(G2F-Gal)をさらに含み、G2F-Galは、約1.4%以下である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F-Galは、約1.0%から約1.4%の間である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F-Galは、約0.4%から約0.9%の間である相対的存在量を占める。

10

20

【0018】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約29%と約38%の間であるS1G2Fの相対的存在量を占める。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約29%と約38%の間、約29%と約37.5%との間、約29%と約37%との間、約29%と約36.5%との間、約29.5%と約38%との間、約29.5%と約37.5%との間、約29.5%と約37%との間、約29.5%と約36.5%との間、約30%と約38%との間、約30%と約37.5%との間、約30%と約37%との間、約30%と約36.5%との間、約31.5%と約38%との間、約31.5%と約37.5%との間、約31.5%と約37%との間、約31.5%と約36.5%との間であるS1G2Fの相対的存在量を占める。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約31.6%と約35.1%との間、約31.3%と約36.5%との間、または約31.3%と約36.5%の間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、S1G2Fの相対的存在量は約33.3%である。

30

【0019】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn108(T7)に位置し、約33%と約45%の間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn108(T7)に位置し、約33%と約45%との間、約33%と約44.5%との間、約33%と約44%との間、約33%と約43.5%との間、約33%と約43%との間、約33%と約42.5%との間、約33.5%と約45%との間、約33.5%と約44.5%との間、約33.5%と約44%との間、約33.5%と約43.5%との間、約33.5%と約43%との間、約33.5%と約42.5%との間、約34%と約45%との間、約34%と約44.5%との間、約34%と約44%との間、約34%と約43.5%との間、約34%と約43%との間、約34%と約42.5%との間、約34.5%と約45%との間、約34.5%と約44.5%との間、約34.5%と約44%との間、約34.5%と約43.5%との間、約34.5%と約43%との間、または約34.5%と約42.5%の間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリ

40

50

カンハ、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 . 2 % と約 3 7 . 7 % との間、約 3 5 . 5 % と約 4 2 . 3 % との間、または約 3 4 . 2 % と約 4 2 . 3 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、S 1 G 2 F の相対的存在量は約 3 6 . 5 % である。一部の態様では、S 1 G 2 F は、ガラクトース- α -1, 3-ガラクトース部分 (S 1 G 2 F - G a l) をさらに含み、S 1 G 2 F - G a l は、約 4 . 7 % 以下である相対的存在量を占める。一部の態様では、S 1 G 2 F - G a l は、約 2 . 3 % から約 4 . 7 % の間である相対的存在量を占める。一部の態様では、S 1 G 2 F - G a l は、約 1 . 4 % から約 1 . 8 % の間である相対的存在量を占める。

【 0 0 2 0 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 5 % との間、約 1 3 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 3 % と約 2 4 % との間、約 1 3 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 3 % と約 2 3 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 5 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 4 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 3 % との間、約 1 4 % と約 2 5 % との間、約 1 4 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 4 % と約 2 4 % との間、約 1 4 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 4 % と約 2 3 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 5 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 4 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 3 % との間、約 1 5 % と約 2 5 % との間、約 1 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 5 % と約 2 4 % との間、約 1 5 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 5 % と約 2 3 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 5 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 4 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 3 . 5 % との間、または約 1 5 . 5 % と約 2 3 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 8 . 1 % と約 2 2 . 9 % との間、約 1 5 . 4 % と約 2 0 % との間、約 1 5 . 4 % と約 2 2 . 9 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、S 2 G 2 F の相対的存在量は約 1 8 . 5 % である。

【 0 0 2 1 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1 8 % と約 3 6 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1 8 % と約 3 6 % との間、約 1 8 % と約 3 5 . 5 % との間、約 1 8 % と約 3 5 % との間、約 1 8 % と約 3 4 . 5 % との間、約 1 8 % と約 3 4 % との間、約 1 8 % と約 3 3 . 5 % との間、約 1 8 . 5 % と約 3 6 % との間、約 1 8 . 5 % と約 3 5 . 5 % との間、約 1 8 . 5 % と約 3 5 % との間、約 1 8 . 5 % と約 3 4 . 5 % との間、約 1 8 . 5 % と約 3 4 % との間、約 1 8 . 5 % と約 3 3 . 5 % との間、約 1 9 % と約 3 6 % との間、約 1 9 % と約 3 5 . 5 % との間、約 1 9 % と約 3 5 % との間、約 1 9 % と約 3 4 . 5 % との間、約 1 9 % と約 3 4 % との間、約 1 9 . 5 % と約 3 6 % との間、約 1 9 . 5 % と約 3 5 . 5 % との間、約 1 9 . 5 % と約 3 5 % との間、約 1 9 . 5 % と約 3 4 . 5 % との間、約 1 9 . 5 % と約 3 4 % との間、約 1 9 . 5 % と約 3 3 . 5 % との間、約 2 0 % と約 3 6 % との間、約 2 0 % と約 3 5 . 5 % との間、約 2 0 % と約 3 5 % との間、約 2 0 % と約 3 4 . 5 % との間、約 2 0 % と約 3 4 % との間、約 2 0 % と約 3 3 . 5 % との間、約 2 0 . 5 % と約 3 6 % との間、約 2 0 . 5 % と約 3 5 . 5 % との間、約 2 0 . 5 % と約 3 5 % との間、約 2 0 . 5 % と約 3 4 . 5 % との間、約 2 0 . 5 % と約 3 4 % との間、または約 2 0 . 5 % と約 3 3 . 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 2 3 . 2 % と約 3 3 . 8 % との間、約 2 0 . 8 % と約 3 2 . 6 % との間、または約 2 0 . 8 % と約 3 3 . 8 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、S 2 G 2 F の相対的存在量は約 2 3 . 5 % である。

【0022】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn76(T5)に位置し、約2%と約8%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn76(T5)に位置し、約2%と約8%との間、約2%と約7.5%との間、約2%と約7%との間、約2%と約6.5%との間、約2%と約6%との間、約2%と約5.5%との間、約2.5%と約8%との間、約2.5%と約7.5%との間、約2.5%と約7%との間、約2.5%と約6.5%との間、約2.5%と約6%との間、約2.5%と約5.5%との間、約3%と約8%との間、約3%と約7.5%との間、約3%と約7%との間、約3%と約6.5%との間、約3%と約6%との間、約3%と約5.5%との間、約3.5%と約8%との間、約3.5%と約7.5%との間、約3.5%と約7%との間、約3.5%と約6.5%との間、約3.5%と約6%との間、約3.5%と約5.5%との間、約4%と約8%との間、約4%と約7.5%との間、約4%と約7%との間、約4%と約6.5%との間、約4%と約6%との間、または約4%と約5.5%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn76(T5)に位置し、約4.4%と約5.6%との間または約4.0%と約5.5%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、S1G3Fの相対的存在量は約4.6%である。

10

【0023】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約0.5%と約4%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約0.5%と約4%との間、約0.5%と約3.5%との間、約0.5%と約3%との間、約0.5%と約2.5%との間、約1%と約4%との間、約1%と約3.5%との間、約1%と約3%との間、または約1%と約2.5%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約1.4%と約2.2%との間、約1.1%と約1.9%との間、または約1.1%と約2.2%との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、S1G3Fの相対的存在量は約1.8%である。

20

【0024】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn76(T5)に位置し、約0.5%と約4%との間であるS2G4Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn76(T5)に位置し、約0.5%と約4%との間、約0.5%と約3.5%との間、約0.5%と約3%との間、約0.5%と約2.5%との間、約1%と約4%との間、約1%と約3.5%との間、約1%と約3%との間、または約1%と約2.5%との間であるS2G4Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn76(T5)に位置し、約1.9%と約2.4%との間、約1.4%と約2.1%との間、または約1.4%と約2.4%との間であるS2G4Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、S2G4Fの相対的存在量は約2.3%である。

30

40

【0025】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、シアル酸であり、約8から約11であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、シアル酸であり、約8.3から約11、約9.5から約10.1、または約8.3から約10.1であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、NANAのモル比は約10.0である。

【0026】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、シアル酸であり、約0.1から約2.0であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、シアル酸であり、0.90から約1.20または約0.3から約1.2で

50

ある N G N A のモル比を有する。一部の態様では、N G N A のモル比は約 1 . 0 である。

【 0 0 2 7 】

一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、N 結合型炭水化物プロファイル放出法を介して分析される。一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、1 つまたは複数の非シアリル化グリカン（ドメイン I ）、モノシアリル化グリカン（ドメイン I I ）、ジシアリル化グリカン（ドメイン I I I ）、および／またはトリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメイン I V + V ）を含む。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメイン I ）は、約 2 8 から約 3 7 、約 2 9 から約 3 2 、約 2 8 から約 3 2 、または約 2 9 から約 3 7 のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメイン I ）は、約 3 1 のモル比を有する。一部の態様では、モノシアリル化グリカン（ドメイン I I ）は、約 2 6 から約 2 8 、約 2 7 から約 3 3 、約 2 6 から約 3 3 、約 2 7 から約 2 8 のモル比を有する。一部の態様では、モノシアリル化グリカン（ドメイン I I ）は、約 2 7 のモル比を有する。一部の態様では、ジシアリル化グリカン（ドメイン I I I ）は、約 2 7 から約 2 8 、約 2 2 から約 3 1 、約 2 7 から約 3 1 、または約 2 2 から約 2 8 のモル比を有する。一部の態様では、ジシアリル化グリカン（ドメイン I I I ）は、約 2 7 . 4 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメイン I V + V ）は、約 1 3 から約 1 6 、約 8 から約 1 6 、または約 8 から約 1 6 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメイン I V + V ）は、約 1 4 . 6 のモル比を有する。

10

【 0 0 2 8 】

一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、1 つまたは複数の O 結合型グリカンを含む。一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、複数のガラクトース- α -1, 3-ガラクトース（ α -g a l ）結合を含まない。一部の態様では、C T L A 4 は、C 末端リジンを含む。一部の態様では、C 末端リジンは、約 2 0 % から約 2 5 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、C 末端リジンは、約 3 % から約 1 0 % である相対的存在量を占める。一部の態様では、O 結合型グリカンは、残基 S e r 1 2 9 、 S e r 1 3 0 、 S e r 1 3 6 、および／または S e r 1 3 9 に位置する。一部の態様では、バイオリアクターは、グルコースまたはガラクトースを含む供給媒体を含む。一部の態様では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の態様では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（C H O ）細胞である。一部の態様では、細胞は、C H O - K 1 細胞、C H O - D X B 1 1 細胞、または C H O - D G 4 4 細胞である。

20

30

【 0 0 2 9 】

本開示の方法はまた、C T L A 4 - F c 融合タンパク質の二分岐グリカン进行分析する方法であって、C T L A 4 タンパク質における 1 つまたは複数のアスパラギン残基に結合した 1 つまたは複数の N 結合型グリカン測定することを含み、二分岐グリカンの一方が G 2 F である、方法にも関する。一部の態様では、二分岐グリカンは、G 0 F 、 G 1 F 、 G 2 F 、 S 1 G 1 F 、 S 1 G 2 F 、および／または S 2 G 2 F からなる群から選択される。一部の態様では、二分岐グリカンは、蛍光検出（U P L C - F L R ）を用いる超高性能液体クロマトグラフィーを介して測定される。一部の態様では、C T L A 4 - F c 融合タンパク質の F c ドメインは、測定の前に切断される。一部の態様では、本方法は、バイオリアクターからタンパク質を収集することをさらに含む。一部の態様では、本方法は、タンパク質をウイルス不活性化工程にかけることをさらに含む。一部の態様では、ウイルス不活性化工程は、0 . 5 % T r i t o n X - 1 0 0 を用いて行われる。

40

【 0 0 3 0 】

一部の態様では、本方法は、タンパク質の濃度を調整することをさらに含む。一部の態様では、本方法は、タンパク質を製剤化することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 1 】

図 1 A は、一般的な N 結合型グリカンの全体構造を示している。G l c N A c （四角印）は、N-アセチルグルコサミンである。M a n （丸印）は、マンノースである。G a l

50

(黒三角印)は、ガラクトースである。NeuAcまたはNeu5Ac(星印)は、N-アセチルノイラミン酸である。Fuc(弾丸印)は、フコースである。コア構造はグレーの枠内に示されている。図1Bおよび1Cは、G0F(マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-フコース)、G1F(マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-ガラクトース-1-フコース)、G2F(マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-ガラクトース-2-フコース)、S1G1F(モノシアル化マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-ガラクトース-1-フコース)、S1G2F(モノシアル化マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-ガラクトース-2-フコース)、S1G3F(モノシアル化マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-ガラクトース-3-フコース)、およびS2G2F(ジシアル化マンノース-3-N-アセチルグルコサミン-4-ガラクトース-2-フコース)の例示的な構造を示している。図1Dは、アバタセプト分子上の特異的なN結合型グリコシル化部位(Asn76上のT5、Asn108上のT7、およびAsn207上のT14)を示している。プロテアーゼおよびアミノ酸配列も示されている。

10

20

30

40

50

【0032】

図2Aは、5Lバイオリアクター内でのさまざまな条件による処置後の平均生細胞密度(VCD)プロファイルの図表である。試験した条件には、以下が含まれる: 22.4%であるCO₂設定値、96時間後の第1の供給、6.9である最初のpH、 0.15×10^6 個/mLである最初の生細胞密度、 0.45×10^6 個/mLである最初の生細胞密度、-1°Cである全体的温度シフト(36°C、33°C、および31°Cである3つの温度設定値)、72時間であるpHシフトのタイミング時点、第2の設定値での温度シフト(37°C、33°C、および32°C)、ならびに第3の設定値での温度シフト(37°C、34°C、および31°C)。

【0033】

図2Bは、さまざまな要因による実験後の、平均ピークVCD(10^6 個/mL)、ピークVCDのDunnett検定p値、0~5日平均倍加時間(時間)、倍加時間のDunnett検定p値、0~14日平均IVCD(10^9 個・日/mL)、IVCDのDunnett検定p値、およびVCDプロファイル値を表形式で示している: 高CO₂は、22.4%であるCO₂設定値を表す。遅い第1の供給は、96時間での第1の供給である。低い最初のpHは、6.9である誘導pHである。低い最初のVCDは、 0.15×10^6 個/mLである誘導密度である。高い最初のVCDは、 0.45×10^6 個/mLである誘導密度である。低い全体的温度は、最初の温度設定値として36°C、第2の温度設定値として33°C、および最後の温度設定値として31°Cである3つの設定値を使用した温度シフトプロファイルである。低い温度シフト1は、最初の温度設定値として37°C、第2の温度設定値として33°C、および最後の温度設定値として32°Cである3つの設定値を使用した温度シフトプロファイルである。低い温度シフト2は、最初の温度設定値として37°C、第2の温度設定値として34°C、および最後の温度設定値として31°Cである3つの設定値を使用した温度シフトプロファイルである。

【0034】

図3は、各処置群について平均生産バイオリアクター生存率プロファイルを示している。試験した条件には、以下が含まれる: 22.4%であるCO₂設定値、96時間後の第1の供給、6.9である最初のpH、 0.15×10^6 個/mLである最初の生細胞密度、 0.45×10^6 個/mLである最初の生細胞密度、-1°Cである全体的温度シフト、72時間であるpHシフトタイミング時点、第2の設定値での温度シフト(37°C、33°C、および32°C)、ならびに第3の設定値での温度シフト(37°C、34°C、および31°C)。

【0035】

図4A~4Hは、アバタセプト用のバイオリアクター生産稼働の第14日に収集したさまざまなグリコシル化データを示している。図4Aは、第14日のシアル酸およびN結合型ドメイン(ドメインI、I、III、およびIV+V)の統計的比較を示している。図

4 B は、試験群間の力価および比生産性の比較を示している。高 CO_2 は、22.4% である CO_2 設定値を表す。遅い第 1 の供給は、96 時間での第 1 の供給である。低い最初の pH は、6.9 である誘導 pH である。低い最初の VCD は、 0.15×10^6 個/mL である誘導密度である。高い最初の VCD は、 0.45×10^6 個/mL である誘導密度である。低い全体的温度は、最初の温度設定値として 36℃、第 2 の温度設定値として 33℃、および最後の温度設定値として 31℃である 3 つの設定値を使用する温度シフトプロファイルである。低い温度シフト 1 は、3 つの設定値 (37℃、33℃、および 32℃) を使用する温度シフトプロファイルである。低い温度シフト 2 は、3 つの設定値 (37℃、34℃、および 31℃) を使用する温度シフトプロファイルである。図 4 C は、各試験条件を使用する 5 L バイオリアクター製造稼働中の第 14 日に部位 T5 および T7 に存在する GOF グリカンの分析を示している。図 4 D は、各試験条件を使用する 5 L バイオリアクター製造稼働中の第 14 日に部位 T5 および T7 に存在する G2F グリカンの分析を示している。図 4 E は、各試験条件を使用する 5 L バイオリアクター製造稼働中の第 14 日の部位 T5 および T7 に存在する S1G2F グリカンの分析を示している。図 4 F は、各試験条件を使用する 5 L バイオリアクター製造稼働中の第 14 日の部位 T5 および T7 に存在する S2G2F グリカンの分析を示している。図 4 G は、各試験条件を使用する 5 L バイオリアクター製造稼働中の第 14 日の部位 T5 および T7 に存在する S1G3F グリカンの分析を示している。図 4 H は、各試験条件を使用する 5 L バイオリアクター製造稼働中の第 14 日の部位 T5 および T7 に存在する S2G4F グリカンの分析を示している。

10

20

【0036】

図 5 は、N 結合型グリコシル化 (ドメイン I、II、III、および IV+V)、高分子量混入物、宿主細胞タンパク質、およびリボソーム DNA (rDNA) 混入に関する第 16 日の収集データを示している。第 16 日の収集前の N 結合型、HMW、HCP および rDNA に関するその Dunnett 検定 p 値の結果も提示している。

【0037】

図 6 A は、5 L 規模バイオリアクターに関して試験した工程パラメーターの図表を示している。図 6 B ~ 6 C は、いくつかの試料バイオリアクター稼働中に生成されたタンパク質のグリコシル化プロファイルを、HMW、HCP、および DNA などの混入物とともに示している。

30

【0038】

図 7 は、工程パラメーターの改変による影響を受ける工程属性の概要を示している。

【0039】

図 8 A は、本開示に使用した工程 (J)、および代替的な工程 (F) 中に T5 グリコシル化部位上に存在するさまざまなグリコフォームの相対的存在量を示している。図 8 B は、これらのグリコフォームを表すピークを同定している代表的な質量分析を示している。代替的な工程は、本明細書で開示される条件をいずれも使用しない制御工程を意味する。

【0040】

図 9 A は、本開示に使用した工程 (J)、および代替的な工程 (F) 中の T5 グリコシル化部位上に存在するさまざまなグリコフォームの相対的存在量を示している。図 9 B は、これらのグリコフォームを表すピークを同定している代表的な質量分析を示している。

40

【0041】

図 10 A ~ 10 F は、本開示に使用した工程 (J) と代替的な工程 (F) との間で比較した、さまざまなシアリル化 N 結合型グリカンの統計的比較を示している。グリカン分析には、ドメイン I (図 10 A)、ドメイン II (図 10 B)、ドメイン III (図 10 C)、ドメイン IV+V (図 10 D)、NANA (図 10 E)、および NGNA (図 10 F) が含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0042】

本開示は、タンパク質の所望の特性、例えば、グリコシル化パターンを維持しながら、

50

細胞によるタンパク質の収量を改善する方法を対象とする。一部の態様では、収量を改善する方法は、複数の温度に調整すること、pHを設定すること、特定の生細胞密度を使用すること、CO₂濃縮物を設定すること、またはそれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない好適な条件下で、タンパク質誘導期のためにバイオリアクター内で細胞を培養することを含む。

【0043】

I. 定義

本明細書で使用される場合、用語「および／または」は、指定された2つの特徴または構成要素のそれぞれを、他方の有無にかかわらず具体的に開示するものと解釈される。したがって、本明細書において「Aおよび／またはB」などの語句に使用される用語「および／または」は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」（単独）、および「B」（単独）を含むことを意図している。同様に、「A、B、および／またはC」などの語句に使用される用語「および／または」は、以下の態様のそれぞれを範囲に含むことを意図している：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

10

【0044】

態様が用語「含む」という言葉で本明細書に記載される場合は常に、「からなる」および／または「から本質的になる」で記載される、他の点で類似の態様も提供されることが理解される。

【0045】

20

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者が一般的に理解しているのと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; および Oxford Dictionary of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、本開示で使用される多くの用語の一般的な辞書を当業者に提供する。

【0046】

単位、接頭辞、および記号は、国際単位系（SI）で認められている形式で表される。数値の範囲は、範囲を定義する数値を含む。本明細書に提示される見出しは、明細書全体を参照することによって得ることができる本開示の様々な態様を制限するものではない。したがって、すぐ以下に定義されている用語は、明細書全体を参照することによって、より完全に定義される。

30

【0047】

代替的選択肢（例えば、「または」）の使用は、代替的選択肢の一方、両方、またはそれらの組合せのいずれかを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、不定冠詞「1つの（a）」または「1つの（an）」は、言及または列挙された構成要素の「1つまたは複数」を指すものと理解されるべきである。

【0048】

40

用語「約」または「を本質的に含む」は、当業者によって決定される特定の値または組成の許容誤差範囲内にある値または組成を指し、これはその値または組成がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの限界に部分的に依存すると考えられる。例えば、「約」または「を本質的に含む」は、当技術分野の慣例により1標準偏差の範囲内または1を超える標準偏差の範囲内を意味し得る。あるいは、「約」または「を本質的に含む」は、最大で20%までの範囲を意味し得る。さらに、特に生物学的システムまたはプロセスに関しては、この用語は最大で1桁、または最大で5倍までの値を意味し得る。特定の値または組成が出願および特許請求の範囲に提示されている場合、別段の記載がない限り、「約」または「を本質的に含む」の意味は、その特定の値または組成の許容誤差範囲内にあると想定されるべきである。

【0049】

50

本明細書に記載される場合、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲または整数範囲は、別段の指示がない限り、言及された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合にはその端数（整数の1／10および100分の1など）を含むものと理解される。

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「CTLA4細胞外ドメイン」は、B7-1（CD80）および／またはB7-2（CD86）に結合する、配列番号1に示されるアミノ酸配列のすべてまたは一部分を含むタンパク質ドメインを指す。一部の態様では、CTLA4細胞外ドメインは、配列番号1と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み得る。CTLA4細胞外ドメインは以下の配列によって表される：

10

配列番号1：

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGN
ELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPPYYLGIGNGTQIYV
IDPEPCPDSD

【0051】

本明細書で使用される場合、用語「CTLA4-Ig」または「CTLA4-Ig分子」または「CTLA4Ig分子」または「CTLA4-Igタンパク質」または「CTLA4-Igタンパク質」または「CTLA4-Fc」は、互換的に使用され、少なくともCTLA4細胞外ドメインおよび免疫グロブリン定常領域またはその一部分を有するCTLA4-Igポリペプチドを含むタンパク質分子を指す。一部の態様では、例えば、CTLA4-Igポリペプチドは、少なくとも配列番号2のアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、CTLA4細胞外ドメインおよび免疫グロブリン定常領域またはその一部分は、野生型、または突然変異型もしくは改変型であり得る。突然変異型CTLA4-Igポリペプチドは、突然変異型CTLA4細胞外ドメインを含むCTLA4-Igポリペプチドである。突然変異型CTLA4Ig分子は、少なくとも突然変異型CTLA4-Igポリペプチドを含む。一部の態様では、CTLA4細胞外ドメインおよび免疫グロブリン定常領域またはその一部分は、ヒトまたはマウスを含む哺乳動物性であり得る。一部の態様では、突然変異型CTLA4細胞外ドメインは、配列番号2、3、4、5、6、7、または8のうちの任意の1つまたは複数に示されたCTLA4細胞外ドメインと少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なアミノ酸配列を有し得る。本ポリペプチドは、追加のタンパク質ドメインをさらに含み得る。CTLA4-Ig分子は、CTLA4-Igポリペプチドの単量体を指すこともでき、本ポリペプチドの多量体形態、例えば、二量体、四量体、および六量体など（または他の高分子量種）を指すこともできる。CTLA4-Ig分子はまた、CD80および／またはCD86に結合することもできる。CTLA4-Igおよび断片（例えば、アバタセプト）の例は、配列番号2、3、4、5、6、7、および8に示されている。一部の態様では、アバタセプトは、配列番号2、3、4、5、6、7、および8の組合せである。

20

30

配列番号2 [CTLA4-Igアミノ酸配列]

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATE
VRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELL
GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

配列番号3 [配列番号2のアミノ酸25～383]

MAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMM
GNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPPYYLGIGNGT
QIYVIDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW

50

LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 4 [配列番号 2 のアミノ酸 26～383]

AMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYMMG
NELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL GIGNGTQIY
VIDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 5 [配列番号 2 のアミノ酸 27～383]

MHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYMMGN
ELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL GIGNGTQIYV
IDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

20

配列番号 6 [配列番号 2 のアミノ酸 25～382]

MAMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYM
MGNELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL GIGNGT
QIYVIDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

配列番号 7 [配列番号 2 のアミノ酸 26～382]

AMHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYMMG
NELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL GIGNGTQIY
VIDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

30

配列番号 8 [配列番号 2 のアミノ酸 27～382]

MHVAQPAVV LASSRG IASFVCEYASPGKATEVRVT VLRQADSQVTEVCAATYMMGN
ELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYL GIGNGTQIYV
IDPEPCPDSDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

40

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「可溶性CTLA4」は、インビボで循環し得る分子、または細胞膜に結合していないまたはCTLA4を意味する。例えば、可溶性CTLA4は、Igに結合したCTLA4の細胞外領域を含むCTLA4-Igを含み得る。

【0053】

本明細書で使用される場合、用語「二量体」は、2つのCTLA4-Igポリペプチドまたは単量体が連結されるかまたは結合して1つになったもので構成されるCTLA4-Ig

50

I g タンパク質または C T L A 4 - I g 分子を指す。単量体または二量体間の結合は、非共有結合性の結合もしくは相互作用、共有結合性の結合もしくは相互作用（例えば、1つまたは複数のジスルフィド結合）、またはその両方であり得る。2つの同一な単量体で構成される C T L A 4 - I g タンパク質または C T L A 4 - I g 分子は、ホモ二量体である。C T L A 4 - I g ホモ二量体は、配列がわずかに異なる2つの単量体を含む分子も範囲に含む。ホモ二量体は、結合して1つになった単量体を実質的に同じ配列を有する二量体を範囲に含む。ホモ二量体を構成する単量体は、かなり高い構造的相同性を有する。例えば、配列の違いは、単量体の N 末端プロセッシング改変に起因する可能性がある。

【0054】

本明細書で使用される場合、用語「グルタミン酸」および「グルタミン酸」は、互換的に使用される。

【0055】

本明細書で使用される場合、「T5」、「T7」、および「T15」は、アバタセプト分子上に存在する特定のグリコシル化部位を指す。これらの標識は、それぞれアスパラギン76、アスパラギン108、およびアスパラギン207に対応し、配列番号5の残基（太字）に対応している。T5、T7、およびT14のペプチド配列は、図1Cに挙げられている。主要なグリコフォームの相対的存在量は、糖ペプチドの抽出イオンクロマトグラムから計算した。

【0056】

N 結合型グリコシル化部位は、質量分析検出を用いた LC - MS トリプシンペプチドマッピングにより、配列番号5に関して、A s n 76、A s n 108（C T L A 4 領域）および A s n 207（F c 領域）で同定されている。炭水化物の構造クラスを定義するために、5文字のコード、例えば、P 2 1 0 0、P 2 1 2 0、P 2 1 2 1、P 3 1 3 1、および P 4 1 4 2 が使用される。この標識スキームについて、コードの第1の文字（P）は、放出された炭水化物を、トリマンノシルコア構造を含有する N 結合型構造として定義している。第2の文字は、コアに結合している N - アセチルグルコサミン（G l c N A c）単位の数を表す。第3の文字（0または1）は、コアの最初の G l c N A c に結合しているフコース（F u c）があるか否かを表す。第4の文字は、コアに結合しているガラクトース（G a l）糖の数を表す。第5の文字は、炭水化物に結合している S A（N - アセチルノイラミン酸または N - グリコリルノイラミン酸）の数を表す。P 2 1 0 0 は G 0 F と表記することもできる。P 2 1 1 0 は G 1 F と表記することもできる。P 2 1 2 0 は G 2 F と表記することもできる。P 2 1 2 1 は S 1 G 2 F と表記することもできる。P 2 1 2 2 は S 2 G 2 F と表記することもできる。P 3 1 3 1 は S 1 G 3 F と表記することもできる。P 4 1 4 2 は S 2 G 4 F と表記することもできる。これらのグリカンの代表的な図式は、図1Aおよび1Bに見ることができる。

【0057】

本明細書で使用される場合、「ドメイン I」は非シアリル化グリカン（G 0 F、G 1 F、G 2 F など）を指し、「ドメイン II」はモノシアリル化グリカン（S 1 G 1 F および S 1 G 2 F など）を指し、「ドメイン III」はジシアリル化グリカン（S 2 G 2 F など）を指し、「ドメイン IV」および「ドメイン V」は、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカンを指す。

【0058】

本明細書で使用される場合、用語「精製された」は、その天然環境から除去され（例えば、単離され）ていて、天然に付随する細胞材料または培養培地などの他の成分を少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%含まない、C T L A 4 - I g 分子または C T L A 4 - I g 分子の選択された集団を含む組成物を指す。「精製された」はまた、天然環境から除去されていて、自然に結合する細胞材料または培養培地などの他の成分を少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、または85%含まない、C T L A 4 - I g 分子または C T L A 4 - I g 分子の選択された集団を含む組成物を指すこともできる。例えば、

10

20

30

40

50

組換え生産された C T L A 4 - I g タンパク質分子に関して、用語「精製された」は、そのタンパク質分子が、目的とする配列番号 2 のポリペプチドまたは配列番号 2 の突然変異型ポリペプチドでないタンパク質分子を少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、または 99.9 % 含まないように生産環境から除去された C T L A 4 - I g タンパク質分子を含む組成物を指すこともできる。「精製された」は、C T L A 4 - I g 分子（二量体など）と他の C T L A 4 - I g 分子（四量体など）との混合物を除外しない。「精製された」は、C T L A 4 - I g 分子がその本来の環境から取り出されている、C T L A 4 - I g 分子と組み合わされた薬学的に許容される賦形剤または担体を除外しない。

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「大規模工程」は、用語「産業規模工程」と互換的に使用される。「培養容器」は、「バイオリアクター」、「リアクター」および「タンク」と互換的に使用される。産業規模で使用するバイオリアクターは、少なくとも 2,000 L、少なくとも 5,000 L、少なくとも 10,000 L、少なくとも 15,000 L、少なくとも 20,000 L、少なくとも 25,000 L、または産業用供給物を生産するために必要な大規模な生産規模に好適である任意のサイズであり得る。

【0060】

「液体培養物」とは、支持体上で増殖する細胞（例えば、細菌、植物、昆虫、酵母、動物細胞）、または液体の栄養培地中に浮遊して増殖する細胞を指す。

【0061】

「種培養物」とは、より多くの容量の培養培地に接種するために培養された細胞培養物を指す。種培養物は、培養物中で増殖する細胞（例えば、懸濁液中で増殖した細胞）の数を増やすために、より多くの容量培養培地に接種するために使用することができる。

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「培養培地」および「細胞培養培地」、「供給培地」および「発酵培地」は、細胞、特に哺乳動物細胞の増殖および維持のために使用される栄養分溶液を指す。限定はされないが、これらの溶液は通常、以下のカテゴリーのうちの 1 つまたは複数からの少なくとも 1 つの構成成分を提供する：（1）エネルギー源、通常はグルコースなどの炭水化物の形態にある、（2）すべての必須アミノ酸、通常は 20 種のアミノ酸 + システインの基本セット、（3）ビタミンおよび／または低濃度で必要な他の有機化合物、（4）遊離脂肪酸または脂質、例えば、リノール酸、ならびに（5）微量元素、ここで微量元素は、無機化合物または天然に存在する元素で、非常に低濃度、通常はマイクロモル濃度の範囲で必要とされるものと定義される。栄養分溶液には、以下のカテゴリーのいずれかからの 1 つまたは複数の構成成分を効果的に補充することができる：（1）ホルモンおよび他の増殖因子、例えば、血清、インスリン、トランスフェリン、および上皮増殖因子、（2）塩、例えば、マグネシウム、カルシウム、およびリン酸塩、（3）緩衝剤、例えば、H E P E S、（4）ヌクレオシドおよび塩基、例えば、アデノシン、チミジン、およびヒポキサンチン、（5）タンパク質および組織加水分解物、例えば、精製ゼラチン、植物性物質または動物性副産物から得られるペプトンまたはペプトン混合物、（6）抗生物質、例えば、ゲンタマイシン、（7）細胞保護剤、例えば、プルロニックポリオール、ならびに（8）ガラクトース。市販の培養培地、例えば、Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、(Sigma) は、宿主細胞の培養に好適である。加えて、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980) に記載されている培地のいずれかを、宿主細胞の培養培地として使用することもできる。任意の他の必要な栄養補助剤を好適な濃度で含めることもできる。

【0063】

本明細書で使用される場合、「培養」は、定義されたかまたは制御された条件下で 1 つまたは複数の細胞をインビトロで増殖させることを指す。定義され得る培養条件の例とし

10

20

30

40

50

ては、温度、ガス混合物、時間、および培地処方挙げられる。

【0064】

本明細書で使用される場合、「増大させること」は、培養物中により多数の細胞を得る目的で、1つまたは複数の細胞をインビトロで培養することを指す。

【0065】

本明細書で使用される場合、「温度設定値」は、細胞を増殖させるため、および／またはタンパク質産物を生産するために使用されるバイオリアクターまたは他の上流処理容器の温度設定を指す。温度設定値は、細胞培養の開始時に定めることができ、それを「初期温度設定値」と称することもできる。最初の温度設定値の後の細胞培養中の温度のその後の変化は、序数を使用して、すなわち、第2の温度設定値、または以後は第3の温度設定値と称することができる。下流処理の前の最終温度設定値は、「最後の温度設定値」と称することもできる。場合によっては、工程は、最初の温度設定値、第2の温度設定値、第3（および最後）の温度設定値を含み得る。

10

【0066】

本明細書で使用される場合、「CO₂設定値」または「CO₂設定値」は、上流生産工程に存在するCO₂の濃度を指す。CO₂設定値は、容量比のパーセンテージ（％）で表される。

【0067】

本明細書で使用される場合、「集団」は、1つまたは複数の測定可能または検出可能な特性の有無によって特徴付けられる2つまたはそれ以上の分子（「分子の集団」）または細胞（「細胞の集団」）の群を指す。均質な集団では、集団内の分子または細胞は、同じまたは実質的に同じ特性によって特徴付けられる（例えば、クローン細胞株の細胞）。異種集団では、集団内の分子または細胞は、同じまたは実質的に同じ少なくとも1つの特性によって特徴付けられ、細胞または分子は、同じではない特性も示し得る（例えば、実質的に類似した平均シアル酸含有量を有するが、類似していないマンノース含有量を有する、CTLA4-Ig分子の集団）。

20

【0068】

本明細書で使用される場合、「高分子量凝集物」は、少なくとも3つのCTLA4-Ig単量体を含むCTLA4-Ig分子を指すために、「高分子量種」または「HMW」と互換的に使用される。例えば、高分子量凝集物は、四量体、五量体または六量体であり得る。

30

【0069】

本明細書で使用される場合、「プロテインA」は、およそ42kDaで、免疫グロブリンのFc部分に非常に強く結合するタンパク質を指し、抗体の精製におけるその使用は当技術分野でよく知られている。プロテインAは精製のために当技術分野で広く使用されてきた。（Boyle et al., 1993; Hou et al. 1991）。プロテインAに適用される場合、用語「残留性」または「rPA」は、目的のタンパク質または製造工程のさらに上流の抗体の精製におけるその使用のために混合物に存在する任意の残留性プロテインAを指す。

【0070】

「パーセント収率（％）」は、実際の収量を理論上の収量で除算した値に100を掛けた値のことである。実際の収量は、グラム単位の重量またはモル単位（例えば、モル収量）で得ることができる。理論的な収量は、理想的な収量または数学的に計算された収量として得ることができる。

40

【0071】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化含有量」は、タンパク質分子、例えば、CTLA4-Ig分子などの糖タンパク質に共有結合したN結合型またはO結合型糖残基の量を指す。

【0072】

本明細書で使用される場合、「グリコシル化」は、ポリペプチド鎖内の特定の部位での

50

タンパク質への複雑なオリゴ糖構造の付加を指す。タンパク質のグリコシル化および付加された炭水化物のその後のプロセッシングは、タンパク質のフォールディングおよび構造、タンパク質半減期を含むタンパク質安定性、ならびにタンパク質の機能的特性に影響を及ぼす可能性がある。タンパク質のグリコシル化は、修飾が起こる配列の状況によって、O結合型グリコシル化およびN結合型グリコシル化という2つのクラスに分けることができる。O結合型多糖は、ヒドロキシル基に、通常はセリン残基またはトレオニン残基のいずれかのヒドロキシル基に連結している。O-グリカンには、すべてのセリン残基およびトレオニン残基に付加されるわけではない。O結合型オリゴ糖は通常、単枝性または二分岐性であり、すなわち、それらは1つまたは最大で2つの分枝（分岐）を含み、1つから4つの異なる種類の糖残基を含み、それらは1つずつ付加される。N結合型多糖は、アスパラギンのアミド窒素に結合している。アスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-トレオニン（ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である）という2つのトリペプチド配列のうちの一方の一部であるアスパラギンのみが、グリコシル化の標的となる。N結合型オリゴ糖は1つから4つの分枝を有することができ、単枝性、二分岐性、三分岐性、四分岐性と称される。N結合型オリゴ糖およびO結合型オリゴ糖構造に見られる糖残基の構造は異なる。この違いにもかかわらず、N結合型およびO結合型多糖の各分枝上の末端残基は、シアル酸分子によって修飾され、この修飾はシアル酸キャッピングと称される。シアル酸は、他のオリゴ糖と連結され得る特有の9炭素単糖のファミリーの一般名である。2つのファミリーメンバーには、Neu5Ac、NeuAc、またはNANAと略されるN-アセチルノイラミン酸と、Neu5GcまたはNGNAと略されるN-グリコリルノイラミン酸がある。ヒトにおけるシアル酸の最も一般的な形態はNANAである。N-アセチルノイラミン酸（NANA）は、CTLA4-Ig分子に存在する主要なシアル酸種である。しかし、CTLA4-Ig分子には、微量ではあるが検出可能なレベルのN-グリコリルノイラミン酸（NGNA）も存在することに留意されたい。さらに、本明細書に記載の方法は、NANAおよびNGNAの両方についてシアル酸のモル数を決定するために使用することができ、したがって、NANAとNGNAの両方のレベルがCTLA4-Ig分子について決定され、報告される。N結合型オリゴ糖およびO結合型オリゴ糖は分枝の数異なり、このためシアル酸分子が結合し得る位置として提供される数が異なる。N結合型オリゴ糖はシアル酸の結合部位を最大4つまで提供し得るが、一方、O結合型オリゴ糖はシアル酸の結合部位として提供し得るのは最大2つまでである。

10

20

30

【0073】

本明細書で使用される場合、用語「シアル酸のタンパク質に対するモル比」または「MR」は、タンパク質（CTLA4-Ig分子）または二量体のモルあたりのシアル酸分子のモル数として計算され、与えられる。

【0074】

本明細書で使用される場合、用語「糖タンパク質」は、1つまたは複数の糖残基の付加を含む、1つまたは複数の炭水化物の付加によって修飾されたタンパク質を指す。

【0075】

本明細書で使用される場合、用語「シアリル化」は、糖タンパク質を含むタンパク質へのシアル酸残基の付加を指す。

40

【0076】

本明細書で使用される場合、用語「糖タンパク質アイソフォーム」は、等電点電気泳動（IEF）ゲル電気泳動、またはその分子量、電荷、および／もしくは他の特性によって混合物中の異なるタンパク質を識別するための他の好適な方法によって決定される、その炭水化物およびシアル酸含有量によって特徴付けられる分子を指す。例えば、IEFゲル上で観察される個別の各バンドは、特定の等電点（pI）を有し、それ故に同じ正味の全体的電荷を有する分子を表す。糖タンパク質アイソフォームは、IEFゲル上で観察される個別のバンドであり、各バンドは特定のpIを有する分子の集団であり得る。

【0077】

本明細書で使用される場合、画像化キャピラリー等電点電気泳動（iCIEF）は、そ

50

の等電点（ pI ）によるタンパク質の分離のために使用される1つの方法を指す。この方法では、試料を水、メチルセルロース、両性電解質、および pI マーカーで約 1 mg/mL の最終濃度に調製し、次いでオートサンプラーによって画像化キャピラリー等電点電気泳動システム（ $ICIEF$ ）に注入する。電気泳動では、アイソフォームの電荷変動に基づき、フルオロカーボン（ FC ）でコーティングされたキャピラリー内の pH 勾配を通じて試料を分離する。

【0078】

「免疫寛容」は、人が通常反応する特定の抗原または抗原群に反応しない状態（例えば、 T 細胞が抗原に反応できなくなった状態）を指す。

【0079】

「効力」は、リガンド濃度の関数としての応答の尺度を指す。例えば、アゴニストの効力は、最大効果の半分を生じるリガンドの濃度（ EC_{50} ）として定量化される。限定はされないが、効力の薬理学的定義には、親和性および有効性の要素が含まれ、ここで有効性は、薬物がひとたび結合した場合に応答を引き起こす能力である。効力は親和性と関連するが、効力および親和性は薬物作用の異なる尺度である。

【0080】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、薬理学的活性薬剤のための媒体を指す。担体は、薬剤の機能を終了させることなく、標的部位への活性薬剤のデリバリーを容易にする。担体の好適な形態の非限定的な例としては、局所投与に適した溶液、クリーム、ゲル、ゲルエマルジョン、ゼリー、ペースト、ローション、軟膏、スプレー、軟膏、粉末、固体混合物、エアロゾル、エマルジョン（例えば、油中水型または水中油型）、ゲル水溶液、水溶液、懸濁液、リニメント、チンキ、およびパッチが挙げられる。

【0081】

本明細書で使用される場合、語句「薬学的に許容される組成物」（または「医薬組成物」）は、ヒトへの投与など、医薬投与のために許容される組成物を指す。そのような組成物は、不純物が医薬投与のための許容されるレベルを超えないレベルである物質（そのような不純物が存在しないことを含むレベルなど）を含むことができ、また、任意の活性薬剤に加えて、例えば、投与を容易にする目的でそのような組成物を製剤化するために、薬学的に許容される賦形剤、媒体、担体、および他の不活性成分を含むことができる。例えば、薬学的に許容される $CTLA4-Ig$ 組成物は、 $MCP-1$ または DNA を含み得るが、それらの物質がヒトへの投与のために許容されるレベルである場合に限る。

【0082】

用語「原薬」は、医薬品組成物中に含有される活性医薬成分である。用語「原薬」には、溶液および／または緩衝化形態の中の活性医薬成分が含まれる。「製剤」は、医薬投与のために製剤化された原薬を含有する医薬組成物である。原薬および／または製剤を指すことができる、実施例および本明細書中の他の箇所に含まれるアッセイの目的のために、アッセイすることができる例示的な原薬および／または製剤は、以下の通りである。

【0083】

$CTLA4-Ig$ 分子の例示的な製剤には、以下のものが含まれる。

【0084】

10

20

30

40

50

【表 1】

凍結乾燥された CTLA4-Ig タンパク質(250mg/バイアル)製剤の組成

構成成分	量(mg/バイアル)
CTLA4-Ig タンパク質	262.5
マルトースー水和物	525
リン酸二水素ナトリウム、一水和物	18.1
塩化ナトリウム	15.3
塩酸	pH 7.5 に調整
水酸化ナトリウム	pH 7.5 に調整

10

【0085】

本明細書で使用される場合、用語「接種」は、培養を開始するための培養培地への細胞の添加を指す。

【0086】

本明細書で使用される場合、細胞培養物の「誘導」または「誘導期」または「増殖期」という用語は、上流細胞培養の開始時のバイオリアクターへの最初の播種を指し、これは、細胞が主に急速に分裂している指数関数的な細胞増殖の期間（例えば、対数期）を含む。この時期には、生細胞の密度の増加速度は他のどの時点よりも高くなる。

20

【0087】

本明細書で使用される場合、細胞培養物の「生産期」という用語は、細胞増殖が定常状態にあるか、またはほぼ一定のレベルに維持されている期間を指す。生細胞の密度は、ある所与の期間にわたっておよそ一定である。対数細胞増殖は終了しており、タンパク質の生産が生産期の主要な活動である。この時点の培地には一般に、継続的なタンパク質生産を支援して、所望の糖タンパク質産物を達成するために補充される。

30

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「発現」または「発現する」は、細胞内で生じる転写および翻訳を指すために使用される。宿主細胞における産物遺伝子の発現レベルは、細胞内に存在する対応する mRNA の量、もしくは細胞が産生する産物遺伝子がコードするタンパク質の量のいずれか、またはその両方に基づいて決定することができる。

【0089】

本明細書で使用される場合、「N結合型グリカン」は、グリカンが窒素結合を介して複合糖質に連結されるタンパク質修飾を指す。グリカンのアクセプターは、それぞれ ER のペリプラズムまたは内腔に入ったポリペプチド鎖の選択されたアスパラギン残基である。N-グリコシル化経路の中心的な酵素であるオリゴサッカリルトランスフェラーゼは、コンセンサス配列 N-X-S/T によって特定されるアスパラギン残基の側鎖アミドへの、オリゴ糖の N-グリコシド結合の形成を触媒する。すべての真核生物 N-グリカンは、 $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}-\text{X}-\text{Ser}/\text{Thr}$ という共通のコア配列を有し、以下の3つのタイプに分類される：(1) オリゴマンノース、この場合は Man 残基のみがコアを伸長させる、(2) 複合体、この場合は GlcNAc によって開始される「分岐」がコアを伸長させる、および(3) ハイブリッド、この場合は Man がコアの $\text{Man}\alpha 1-6$ アームを伸長させ、1つまたは2つの GlcNAc が $\text{Man}\alpha 1-3$ アームを伸長させる。

40

【0090】

本明細書で使用される場合、「N結合型グリコシル化」は、窒素原子、通常はアスpara

50

ギン残基の N 4 への、オリゴ糖の結合を指す。N-グリコシル化は、主に真核生物および古細菌において、分泌タンパク質または膜結合タンパク質上で起こりうる。N 結合型グリカン（例えば、高マンノース型オリゴ糖）を生成するために使用される生合成経路および酵素の詳細な総説は、Stanley et al., "N-Glycans" in Essentials of Glycobiology, Ed. Varki, Cummings, and Eskho, Cold Spring Harbor Press, 2009 に記載されている。

【0091】

本明細書で使用される場合、用語「質量分析」は、質量電荷比 (m/z) に基づいて分子を検出し、同定し、定量するために使用される高感度の手法を指す。電場は、イオンを質量電荷比 (m/z)、すなわち電荷の整数に対する質量の比 (z) に従って分離するために使用され、イオンは 4 つの極またはロッドを含む四重極などの平行および等距離の極またはロッドの中心軸に沿って通過する。各ロッドには 2 つの電圧が印加されており、その一方は固定直流であり、他方は高周波を重ね合わせて周期的に変化する交流である。印加された電場の大きさは、特定の m/z 比を有するイオンのみが四重極を通過し得るように、検出される前に指示することができる。他のすべての m/z 値を有するイオンは、四重極棒と衝突して放電するか、質量分析計のフィールドから排出され、真空を介して除去されるような軌道に偏向される。四重極は、特定の m/z を有するイオンのみが四重極内で常に安定であるため、しばしば排他的検出器と称される。安定な軌道を有するイオンは、非衝突性、共鳴性、または安定な軌道を有するとしばしば称される。

【0092】

一般に、三重四重極質量分析計の実験では、最初の四重極 (Q1) は、試料中の予想される化学種の指定された m/z (前駆体イオン) のイオンのみを通過させるように設定される。第 2 の四重極 (すなわち、Q2 または衝突セル) は、Q1 を通過するイオンを断片化させるために使用される。第 3 の四重極 (Q3) は、予想される化学種の予想される断片化生成物に対応する指定された m/z のイオン (断片イオン) のみを検出器に渡すように設定される。一部の態様では、試料は質量分析計でイオン化され、1 つまたは複数のプロトン化または脱プロトン化された分子イオンを生成する。一部の態様では、1 つまたは複数のプロトン化または脱プロトン化された分子は、単電荷、二重電荷、三重電荷、またはそれ以上の電荷を有する。一部の態様では、質量分析計は三重四重極質量分析計である。Q1 および Q3 のために使用される解像度は、一部の態様では、単位解像度である。他の態様では、Q1 および Q3 のために使用される解像度は異なる。他の態様では、Q1 のために使用される解像度は、Q3 の単位解像度よりも高い。

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「蛍光団」は、光励起時に光を再放出することができる蛍光化合物を指す。蛍光団は通常、いくつかの結合した芳香族基、またはいくつかの π 結合を有する平面状もしくは環状分子を含む。一般的に使用される 2 つの蛍光団は、2-AB (2-アミノベンズアミド) および 2-AA (アントラニル酸または 2-アミノ安息香酸) である。他の蛍光団には、PA (2-アミノピリジン)、AMAC (2-アミノアクリドン)、ANDS (7-アミノ-1, 3-ナフタレンジスルホン酸)、ANTS (8-アミノナフタレン-1, 3, 6-トリスルホン酸)、APTS (9-アミノピレン-1, 4, 6-トリスルホン酸)、および 3-(アセチルアミノ)-6-アミノアクリジンがある。

【0094】

本開示において使用される「グリカンプロファイル」は、他の試料または試料群から得られた参照値またはプロファイルとの比較に使用し得る、グリカンに関する定量的な結果の任意の定義された値のセットであると理解されるべきである。例えば、タンパク質試料由来の試料のグリカンプロファイルは、代替的な供給源からの試料のグリカンプロファイルとは著しく異なる場合がある。グリカンプロファイルは、そのプロファイルを参照プロファイルまたは標準プロファイルと比較することにより、タンパク質の薬力学的 (PD) または薬物動態学的 (PK) 治療効果を予測または予想するのに役立てることができる。

参照および試料のグリカンプロファイルは、グリカンを検出し得る任意の分析機器、例えば、質量分析によって生成することができる。1つまたは複数のN-グリカンは、ガラクトース (Gal)、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc)、ガラクトサミン (GalN)、グルコース (Glc)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、グルコサミン (GlcN)、マンノース (Man)、N-アセチルマンノサミン (ManNAc)、マンノサミン (ManN)、キシロース (Xyl)、N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、2-ケト-3-デオキシノノン酸 (Kdn)、フコース (Fuc)、グルクロン酸 (GlcA)、イズロン酸 (IdoA)、ガラクトツロン酸 (GalA)、マンヌロン酸 (ManA)、またはその組合せであり得る。

10

【0095】

本明細書で使用される場合、語句「使用液」は、ある方法に使用される溶液を指す。使用液の非限定的な例には、緩衝液が含まれる。

【0096】

本明細書で使用される場合、「参照物質」は、ある方法において標準として使用される物質を指す。例えば、参照物質は、実験試料を比較するための基準として使用することができる。

【0097】

物質の非存在は、そのような物質の量の範囲について下限が規定されていない場合に想定される。

20

【0098】

本明細書で使用される場合、細胞培養に関連して言及される温度は、バイオリアクターの温度を調節する機器での温度設定を指す。当然ながら、液体培養物それ自体の温度としては、バイオリアクターの温度を調節する機器に設定された温度が採用される。温度がインキュベーター内の棚に維持されている細胞培養物を指す場合には、温度はインキュベーターの棚の温度を指す。

【0099】

II. 収量を改善する方法

本開示は、細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でタンパク質誘導期のためにバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、最初の温度設定値の調整、第2の温度設定値の調整、最後の温度設定値の調整、供給時間の調整、最初のpHの調整、pHシフトの調整、CO₂濃度の調整、最初の細胞密度の調整、またはそれらの任意の組合せの調整を含むがこれらに限定されない、方法を提供する。

30

【0100】

本開示の方法は、タンパク質収量を改善するリアクター条件である、リアクター条件を設定するために有用である。一部の態様では、本条件は、例えば、最初の、第2の、および最後の温度設定値の、例えば、36℃、33℃、および31℃である温度設定値への調整は、適した条件を用いない方法と比較して、タンパク質収量を少なくとも150%、少なくとも約160%、少なくとも約170%、少なくとも約180%、少なくとも約190%、少なくとも約200%、少なくとも約210%、少なくとも約220%、少なくとも約230%、少なくとも約240%、少なくとも約250%、少なくとも約260%、少なくとも約270%、少なくとも約280%、少なくとも約290%、少なくとも約300%、少なくとも約310%、少なくとも約320%、少なくとも約330%、少なくとも約340%、少なくとも約350%、少なくとも約360%、少なくとも約370%、少なくとも約380%、少なくとも約390%、または少なくとも約400%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも150%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも160%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも170%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも180%改善させる。一部の態様では、本条件は、タ

40

50

ンパク質収量を少なくとも190%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも200%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも210%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも220%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも230%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも240%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも250%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも260%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも270%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも280%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも290%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも300%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも310%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも320%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも330%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも340%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも350%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも360%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも370%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも380%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも390%改善させる。一部の態様では、本条件は、タンパク質収量を少なくとも400%改善させる。

10

20

【0101】

一部の態様では、本方法は、例えば、最初の、第2の、および最後の温度設定値の、例えば、36℃、33℃、および31℃である温度設定値への調整は、タンパク質収量を、適した条件を用いない方法よりも、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、または少なくとも約10倍の高さに改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約2倍から約3倍に改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約3倍から約4倍に改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約4倍から約5倍に改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約5倍から約6倍に改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約6倍から約7倍に改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約7倍から約8倍に改善する。一部の態様では、本方法は、タンパク質収量を約8倍から約9倍に改善する。

30

【0102】

本開示の方法は、バッチ当たりのタンパク質収量がより多く達成されるように、総宿主細胞タンパク質のうちの割合としての総タンパク質生産量を増加させるためにも有用である。一部の態様では、本開示の方法は、ゴルジにおけるタンパク質の滞留時間およびグリコシル化酵素への曝露の変更に基づいて、所望のグリコシル化パターンを有する総タンパク質生産量を増加させるためにも有用である。一部の態様では、本条件は、例えば、最初の、第2の、および最後の温度設定値の、例えば、36℃、33℃、および31℃である温度設定値への調整は、適した条件を用いない方法と比較して、所望のグリコシル化プロファイル

40

【0103】

本開示の方法は、全収量を改善するため、および／またはタンパク質のグリコシル化プ

50

ロファイルを制御するために、培養物の増殖速度および／または定常状態細胞密度を低下させるために有用である。一部の態様では、本方法は、細胞増殖速度を低下させる。一部の態様では、細胞増殖は、約30.0時間から約45.0時間、約30.0時間から約40.0時間、約31時間から約44時間、約32時間から約43時間、または約33時間から約42時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖は、約30時間から約42時間、例えば、30時間、31時間、32時間、33時間、34時間、35時間、36時間、37時間、38時間、39時間、40時間、41時間、または42時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖は、約32時間から約38時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖は、約33時間から約37時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖は、約34時間から約36時間の0～5日平均倍加時間を示す。

10

【0104】

一部の態様では、細胞増殖速度は、約30時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖速度は、約32時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖速度は、約34時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖速度は、約38時間の0～5日平均倍加時間を示す。一部の態様では、細胞増殖速度は、約40時間の0～5日平均倍加時間を示す。

【0105】

本開示の方法は、タンパク質生産中の生細胞密度またはピーク生細胞密度を制御するためにも有用である。一部の態様では、細胞生存率は、約 5×10^6 個/mLから約 21×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 6×10^6 個/mLから約 20×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 7×10^6 個/mLから約 19×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 8×10^6 個/mLから約 18×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 9×10^6 個/mLから約 17×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 10×10^6 個/mLから約 16×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 11×10^6 個/mLから約 15×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 12×10^6 個/mLから約 14×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。

20

30

【0106】

一部の態様では、細胞生存率は、 6×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 6×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 10×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 10.5×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 11×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 11.5×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 12×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 12.5×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 13×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 13.5×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 14×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 14.5×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。一部の態様では、細胞生存率は、 15×10^6 個/mLである平均ピーク生細胞密度(VCD)を示す。

40

【0107】

50

本開示の方法は、0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）による細胞生存率を改善するかまたは制御するためにも有用である。IVCD尺度は、生細胞密度の即時的な尺度とは対照的に、上流工程の生産を測定する代替的な方法である。各細胞は可変性のタンパク質生産寿命を有し、さまざまな細胞培養条件は時間経過に伴う生細胞率に影響を及ぼすため、IVCDは、工程全体の時間の経過に伴うタンパク質産物の総生産量を推定するために有用である。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.05×10^9 個/mLから約 0.2×10^9 個/mLである0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.1×10^9 個/mLから約 0.15×10^9 個/mLである0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.05×10^9 個/mLから約 0.15×10^9 個/mLである0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.05×10^9 個/mLから約 0.1×10^9 個/mLである0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.09×10^9 個/mLから約 0.13×10^9 個/mLである0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）を示す。一部の態様では、細胞生存率は、約 0.09×10^9 個/mLから約 0.11×10^9 個/mLである0～14日平均生細胞密度積分（IVCD）を示す。

10

【0108】

本開示の方法はまた、タンパク質力価を制御するためにも有用である。一部の態様では、力価は、約14日の期間の後に測定される。一部の態様では、力価は、約 1.5 g/L から約 3.5 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 1.5 g/L から約 3 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2 g/L から約 3 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.5 g/L から約 3 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.5 g/L から約 3 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.5 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.8 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.87 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 2.9 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 3 g/L である第14日平均力価を示す。一部の態様では、力価は、約 3.5 g/L である第14日平均力価を示す。

20

30

【0109】

本開示の方法はまた、個々の細胞の生産産出量によって測定される、細胞のタンパク質生産を制御するためにも有用である。個々の細胞の生産産出量を介して生産量を測定することは、細胞の健全性をリアクター条件の関数としてモニターするために有用である。一部の態様では、力価は、約 $20 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $45 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $20 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $40 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $30 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $45 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $20 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $35 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $25 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $35 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $25 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $30 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $30 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $40 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $30 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ から約 $35 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $20 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $25 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $30 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $31 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $32 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 $33 \text{ pg/細胞} \cdot \text{日}$ である平均比生産性を示す。

40

【0110】

50

一部の態様では、力価は、約 34 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 35 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 36 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 37 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 38 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 39 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 40 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 41 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 42 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。一部の態様では、力価は、約 45 pg / 細胞・日である平均比生産性を示す。

【0111】

本開示の方法は、エネルギー源を使用する、容器内での細胞の増殖を介して利用することができる。一部の態様では、容器はバイオリアクターであり、グルコースまたはガラクトースを含む供給媒体を含む。一部の態様では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の態様では、細胞は、真核細胞である。一部の態様では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の態様では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HEK293細胞、マウス骨髄腫 (NS0)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、サル腎臓線維芽細胞 (COS-7)、メイディン・ダービー・イヌ腎臓細胞 (MDBK)、およびそれらの任意の組合せから選択される。一態様では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞である。一部の態様では、細胞は、昆虫細胞、例えば、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞である。他の態様では、細胞は、哺乳動物細胞である。そのような哺乳動物細胞としては、CHO、VERO、BHK、Hela、MDCK、HEK293、NIH3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、NS0、CRL7030、COS (例えば、COS1またはCOS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10およびHsS78Bst細胞が挙げられるが、これらに限定されない。一部の態様では、哺乳動物細胞はCHO細胞である。一部の態様では、CHO細胞は、CHO-DG44、CHOZN、CHO/dhfr-、CHOK1SVGS-KO、またはCHO-Sである。一部の態様では、CHO細胞はCHO-DG4である。一部の態様では、CHO細胞はCHOZNである。本明細書に開示される他の適したCHO細胞株としては、CHO-K (例えば、CHO-K1)、CHO pro3-、CHO P12、CHO-K1/SF、DUXB11、CHO DUKX、PA-DUKX、CHO pro5、DUK-BIIまたはそれらの派生物が挙げられる。

【0112】

IIA. 温度

バイオリアクターの温度は、細胞増殖、生細胞密度、細胞寿命、および／または細胞内のグリコシル化酵素のグリコシル化活性において役割を果たすため、バイオリアクターなどの生産用容器の温度は、生物生産の重要な側面となり得る。温度変化は、細胞内の酵素反応の速度に大きな影響を与え、タンパク質を変性させ、および／または細胞培養物に対して他の影響を及ぼす可能性がある。細胞を、例えば、37℃などの最初の温度設定値で培養して、最大の生細胞密度を促し、次いで温度を別の温度設定値 (すなわち、第2の温度設定値または最後の温度設定値) に変更して、細胞寿命を延長させること、または細胞内の所望のグリコシル化活性を強化することができる。1つまたは複数の温度設定値を、上流生産工程のさまざまな段階で使用して、全体的な細胞密度、タンパク質収量、または目的のタンパク質のタンパク質グリコシル化プロファイルを改善することができる。一部の態様では、本方法は、タンパク質生産中の1つまたは複数の温度調整を対象とする。温度調整は、製造工程中の運転温度の低下であり得る。また、温度調整は、製造工程中の運転温度の上昇でもあり得る。一部の態様では、本開示の方法は、製造工程中の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つの温度調整を使用する。

【0113】

本開示の方法はまた、タンパク質を生産するために細胞増殖速度、細胞生存率、生細胞密度および／または細胞の力価を制御することにも関する。最初の温度設定値は、対数増殖期における細胞増大および細胞の増殖を導くリアクター条件を設定するために重要である。最初の対数期の後に、最初の設定値よりも低い第2の温度設定値を使用して、細胞増大条件を低下させ、望ましくない細胞密度およびその後の総細胞生存率の低下を招くと考えられる、細胞培養物の過剰増殖を防ぐ。一部の態様では、本開示の方法は、誘導期のために細胞をバイオリアクター内で36℃である最初の温度設定値の下で培養し、その後に細胞を33℃である第2の温度設定値で培養し、最後に細胞を31℃である最後の温度設定値で培養することを伴う。一部の態様では、本開示の方法は、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの温度設定値、例えば、最初の温度設定値、最後の設定値、または最初の温度設定値の後であるが最後の設定値の前により多くの設定値を使用する。一部の態様では、本開示の方法は、少なくとも3つの温度設定値、すなわち、最初の温度設定値、第2の温度設定値、および最後の温度設定値を使用する。

10

【0114】

一部の態様では、本方法に関する最初の温度設定値は約37℃であり、第2の温度設定値は約36℃未満である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36℃であり、第2の温度設定値は、第1の温度設定値よりも低く、例えば、約35℃、約34℃、約33℃、約32℃、または約31℃である。一部の態様では、最初の温度設定値は約37℃であり、第2の温度設定値は、約34℃未満である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36℃であり、第2の温度設定値は、約35℃、約34℃、または約33℃未満である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36.5℃未満であり、最後の温度設定値は約31℃である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36.0℃であり、最後の温度設定値は約31℃である。一部の態様では、最初の温度設定値は約35.5℃未満であり、最後の温度設定値は約31℃である。一部の態様では、最初の温度設定値は約35.0℃未満であり、最後の温度設定値は約31℃である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36.5℃未満であり、第2の温度設定値は約33℃であり、最後の温度設定値は約33℃または約32℃未満である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36.0℃であり、第2の温度設定値は約33℃であり、最後の温度設定値は約33℃未満であるかまたは約32℃である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36.0℃であり、第2の温度設定値は約33℃であり、最後の温度設定値は約32℃未満である。一部の態様では、最初の温度設定値は約36.0℃であり、第2の温度設定値は約33℃であり、最後の温度設定値は約31℃である。

20

30

【0115】

本開示の方法は、最初の温度設定値、第2の温度設定値、ならびに第3および／または最後の設定値を含み得る。最初の、第2の、ならびに第3および／または最後の温度設定値は、製造工程中の定常状態細胞密度をさらに制御するため、生細胞の割合を制御するため、培養物の細胞周期分裂を管理するため、ならびに／または生産されるタンパク質のグリコシル化率およびグリコシル化プロファイルを変更するために使用される。一部の態様では、第3の温度設定値は、第2の温度設定値よりも低い。一部の態様では、最初の温度設定値は、37℃と34℃との間の温度、例えば、37℃、36℃、35℃、または34℃であり、第2の温度設定値は、34℃と32℃との間の温度、例えば、34℃、33℃、または32℃であり、最後の温度設定値は、32℃と30℃との間の温度、例えば、32℃、31℃、または30℃であり、ここで第2の温度設定値は第1の温度設定値よりも低く、最後の温度設定値は第2の温度設定値よりも低い。一部の態様では、最初の温度設定値は、37℃と34℃との間の温度、例えば、37℃、36℃、35℃、または34℃であり、第2の温度設定値は、34℃と32℃との間の温度、例えば、34℃、33℃、または32℃であり、最後の温度設定値は、32℃と30℃との間の温度、例えば、32℃、31℃、または30℃であり、ここで第1の温度設定値は37℃ではなく、第2の温度設定値は34℃ではなく、および／または最後の温度設定値は32℃ではない。

40

【0116】

50

本開示の方法は、最初の温度設定値、第2の温度設定値、第3の温度設定値、および適宜、第4の温度設定値、適宜、第5の温度設定値、および適宜、第6の温度設定値を含み得る。これらの第4、第5、および第6の温度設定値は、製造工程中の定常状態細胞密度をさらに制御するため、生細胞の割合を制御するため、培養物の細胞周期分裂を管理するため、ならびに／または生産されるタンパク質のグリコシル化率およびグリコシル化プロファイルを変更するために使用される。一部の態様では、本方法は、適宜、第4の温度設定値、適宜、第5の温度設定値、適宜、第6の温度設定値を設定することをさらに含み、ここで適宜、第4の温度設定値、第5の温度設定値、および／または第6の温度設定値は、第3の温度設定値よりも低い。一部の態様では、本方法は、適宜、第4の温度設定値、適宜、第5の温度設定値、および適宜、第6の温度設定値を設定することをさらに含み、ここで適宜、第4の温度設定値、第5の温度設定値、および／または第6の温度設定値は、第3の温度設定値よりも高い。一部の態様では、第4、第5、もしくは第6の温度設定値、第5の温度設定値、および／または第6の温度設定値は、約30℃、約31℃、約32℃、約33℃、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃、または約40℃である。一部の態様では、第4、第5、もしくは第6の温度設定値、第5の温度設定値、および／または第6の温度設定値は、約30℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約31℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約32℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約33℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約34℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約35℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約36℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約37℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約38℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約39℃である。一部の態様では、第4、第5、または第6の温度設定値は、約40℃である。

10

20

【0117】

温度設定値とは別に、本開示の方法はまた、特定の時間枠内で温度シフトを実行するための温度設定値のタイミングの変更も含む。温度シフトのタイミングは、上流工程中の細胞培養物の細胞密度、細胞増殖、タンパク質生産特性を制御するために重要である。一部の態様では、本開示の方法は、細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、(i) 36.0℃である最初の温度設定値および36℃未満である第2の温度設定値、(ii) 36.5℃未満である最初の温度設定値および31℃である最後の温度設定値；または(iii) 36.5℃未満である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および33℃未満である最後の温度設定値を含む、方法に関する。一部の態様では、本開示の方法は、細胞によるタンパク質の収量を改善する方法であって、適した条件下でバイオリアクター内で細胞を培養することを含み、適した条件が、(i) 36.0℃である最初の温度設定値および34℃未満である第2の温度設定値、(ii) 36.5℃未満である最初の温度設定値および31℃である最後の温度設定値；または(iii) 36.5℃未満である最初の温度設定値、第2の温度設定値32℃、および32℃未満である最後の温度設定値を含む、方法に関する。

30

40

【0118】

一部の態様では、細胞は、バイオリアクター内で、(i) 35℃よりも高いが37℃未満である最初の温度設定値、および32℃よりも高いが34℃未満である第2の温度設定値、(ii) 35.5℃よりも高いが37.5℃未満である最初の温度設定値、および32℃よりも高いが34℃未満である第2の温度設定値、ならびに(iii) 35℃よりも高いが37℃未満である最初の温度設定値、32℃よりも高いが34℃未満である第2の温度設定値、および30℃よりも高いが32℃未満である最後の温度設定値を含む、適した条件下で培養される。

【0119】

50

本開示の方法はまた、最初の温度設定値の後にバイオリアクター内の温度設定値を調整することによって、細胞によるタンパク質の収量を改善するためにも有用である。一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、第 3 の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ 未満であり、例えば、約 31℃ であり、ここで第 2 の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 120 時間から約 168 時間、例えば、約 5 日、約 6 日、または約 7 日で生じる。一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は、約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、第 3 の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ であり、例えば、約 31℃ であり、ここで第 2 の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 120 時間、約 126 時間、約 132 時間、約 138 時間、約 144 時間、約 150 時間、約 156 時間、約 162 時間、または約 168 時間で生じる。

10

【0120】

一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は、約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、第 3 の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ 未満であり、例えば、約 31℃ であり、ここで第 2 の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 120 時間、5 日で生じる。一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は、約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、第 3 の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ 未満であり、例えば、約 31℃ であり、ここで第 2 の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 144 時間、6 日で生じる。一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は、約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、第 3 の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ 未満であり、例えば、約 31℃ であり、ここで第 2 の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 168 時間、7 日で生じる。一部の態様では、第 2 の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 192 時間、例えば、8 日で生じる。

20

【0121】

本開示の方法はまた、最後の温度設定値への移行タイミングを制御するためにも使用される。一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は、約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、最後の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ 未満であり、例えば、約 31℃ であり、ここで最後の温度設定値は、最初の温度設定値の後、約 168 時間から約 312 時間、約 7 日、約 8 日、約 9 日、約 10 日、約 11 日、約 12 日、または約 13 日で、7 日から 12 日、8 日から 13 日、9 日から 13 日、8 日から 12 日、8 日から 11 日で生じる。一部の態様では、最初の温度設定値は、約 35℃ よりも高く 37℃ 未満であり、例えば、約 36℃ であり、第 2 の温度設定値は、約 32℃ よりも高く約 34℃ 未満であり、約 33℃ であり、最後の温度設定値は、約 30℃ よりも高く約 32℃ 未満であり、例えば、約 31℃ であり、ここで最後の温度設定値は、約 192 時間から約 300 時間で生じる。一部の態様では、最後の温度設定値は、約 216 時間から約 288 時間で生じる。一部の態様では、最後の温度設定値は、約 216 時間から約 264 時間で生じる。

30

40

【0122】

IIB. pH

一態様では、本開示の方法は、工程の pH を改変することによって、タンパク質生産を改善するかまたは制御することを伴う。細胞内 pH の調節は、細胞の増殖および代謝にとって大きな意義のある基本的な生理的プロセスである。細胞内 pH は、栄養分およびホルモンの輸送、ならびに細胞内の酵素反応に対して広範囲にわたる結果を及ぼすため、細胞は細胞質 pH の調節に多くのエネルギーを費やしている。その上、pH は、細胞によって産生されるタンパク質のグリコシル化の率およびプロファイルにも役割を果たす。

50

【0123】

一部の態様では、pHの改変は、培養工程中に複数のpH設定値、2つを上回るpH設定値、3つを上回るpH設定値、4つを上回るpH設定値、または5つを上回るpH設定値を使用することによって行うことができる。一部の態様では、pHの改変は、最初のpH設定値および第2のpH設定値を使用する。一部の態様では、pHの改変は、最初のpH設定値、第2のpH設定値、および第3のpH設定値を使用する。一部の態様では、pHの改変は、培養工程中にpHを低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約0.5、少なくとも約1.0、少なくとも約1.5、少なくとも約2.0、少なくとも約0.1、少なくとも約0.2、少なくとも約0.3、または少なくとも約0.4低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約0.1低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約0.2低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約0.5低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約1低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約1.5低下させることを含む。一部の態様では、pHの改変は、pHを少なくとも約2低下させることを含む。

10

【0124】

一部の態様では、最初のpH設定値はpH 7.0であり、第2のpH設定値は6.9である。一部の態様では、最初のpHは7.0である。一部の態様では、最初のpH設定値は6である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.1である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.2である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.3である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.4である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.5である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.6である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.7である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.8である。一部の態様では、最初のpH設定値は6.9である。一部の態様では、最初のpH設定値は7である。一部の態様では、第2のpH設定値は6である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.1である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.2である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.3である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.4である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.5である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.6である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.7である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.8である。一部の態様では、第2のpH設定値は6.9である。一部の態様では、第2のpH設定値は7である。一部の態様では、第3のpH設定値は6である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.1である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.2である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.3である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.4である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.5である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.6である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.7である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.8である。一部の態様では、第3のpH設定値は6.9である。一部の態様では、最初のpHは7.0であり、第2のpHは6.9である。一部の態様では、最初のpHは7.1であり、第2のpHは6.8である。一部の態様では、最初のpHは7.1であり、第2のpHは6.9である。一部の態様では、最初のpHは7.1であり、第2のpHは7.0である。一部の態様では、最初のpHは6.9であり、第2のpHは6.8である。一部の態様では、最初のpHは6.9であり、第2のpHは6.7である。

20

30

40

【0125】

上流生産工程のpHが重要であるだけでなく、生産中のあらゆるpHシフトのタイミングも、工程に大きな役割を果たす。生産中のpHシフトは工程成績の変化を招き、これは主として、細胞増殖および代謝に対する影響に起因する。本開示の方法は、タンパク質のグリコシル化を制御するために、タンパク質生産中のpHをシフトさせることに関する。一部の態様では、pHを、約6.0であるpHにシフトさせる。一部の態様では、pHを

50

、約 6.1 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.2 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.3 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.4 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.5 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.6 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.7 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.8 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 6.9 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 7.0 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 7.1 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 7.2 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 7.3 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 7.4 である pH にシフトさせる。一部の態様では、pH を、約 7.5 である pH にシフトさせる。

10

【0126】

生産中に pH を調整する培養誘導後の時間（本明細書では以下、「pH シフト」「pH タイミング」と称する）も、細胞増殖および代謝に対する影響に起因して工程の変更を招く。本開示の方法は、タンパク質のグリコシル化を制御するために、タンパク質生産中の pH をシフトさせることに関する。一部の態様では、pH シフトは、誘導後、約 50 時間から約 150 時間である。一部の態様では、pH シフトは、誘導後、約 72 時間から約 120 時間である。一部の態様では、pH シフトは、誘導後、約 80 時間から約 100 時間である。一部の態様では、pH シフトは、誘導後、約 90 時間である。一部の態様では、pH シフトは、誘導後、約 100 時間である。一部の態様では、pH シフトは、誘導後、約 96 時間である。

20

【0127】

IIC. 生細胞密度

バイオリアクター工程の開始時における細胞の最初の生細胞密度（VCD）または播種密度は、最初の生細胞密度（VCD）が生産中の細胞培養物の定常状態および／または最大の生細胞密度に影響を及ぼすため、上流増殖工程の重要な側面である。最初の細胞密度が高いと、上流工程の最初の増殖期の中に生成される細胞数がはるかに多くなり、最終的にはより速い細胞死およびより短いバイオリアクター稼働時間を招く可能性がある。バイオリアクター生産工程は短縮され得るが、しかし、場合によっては、より短いバイオリアクター稼働時間はゴルジにおけるタンパク質の滞留時間の改変を招き、それ故にタンパク質のグリコシル化パターンの変化などの翻訳後修飾の改変を招くことから、工程によって生産されるタンパク質に加えられる翻訳後修が影響を受ける可能性がある。最初の細胞密度はタンパク質の全収量および品質結果に広く影響する可能性があるため、最初の生細胞密度は、上流タンパク質生産にとって重要なパラメーターである。

30

【0128】

一部の態様では、本開示の方法は、最初の生細胞密度（VCD）でバイオリアクターに播種することを伴う。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.95×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.9×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.85×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.8×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.75×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.7×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.05×10^6 個/mL と約 0.65×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.1×10^6 個/mL と約 0.6×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度（VCD）設定値は、約 0.15×10^6 個/mL と約 0.6×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度

40

50

(VCD) 設定値は、約 0.15×10^6 個/mL と約 0.55×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度 (VCD) 設定値は、約 0.15×10^6 個/mL と約 0.5×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度 (VCD) 設定値は、約 0.15×10^6 個/mL と約 0.45×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度 (VCD) 設定値は、約 0.15×10^6 個/mL と約 0.4×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度 (VCD) 設定値は、約 0.2×10^6 個/mL と約 0.4×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度 (VCD) 設定値は、約 0.2×10^6 個/mL と約 0.35×10^6 個/mL との間である。一部の態様では、最初の生細胞密度 (VCD) 設定値は、約 0.25×10^6 個/mL と約 0.35×10^6 個/mL との間である。

10

【0129】

IID. 細胞供給時間

本開示の方法はまた、細胞の増殖条件に影響を与えるかまたはそれを制御するために、細胞供給時間を変更することによっても達成することができる。供給工程のタイミングは、細胞培養物生産工程の所望の増殖特性、例えば、細胞密度を生じさせるために重要である。バイオリアクターにおける最適な供給戦略は、反応動態の構造、および異なる反応間、例えば、タンパク質合成とそれらのタンパク質の翻訳後修飾（すなわち、グリコシル化）との相互作用に依存する。細胞集団への過剰供給および供給不足は両方とも、細胞増殖および産物形成にとって有害であり、このため、最大の産物収量を確保するためには、供給のタイミングが重要である。培養物への供給不足は栄養枯渇および細胞死を招く可能性があり、一方、過剰供給は栄養分の過剰を招き、浸透圧の上昇および密な細胞環境における細胞ストレス、ならびに目的のタンパク質の望ましくない翻訳後修飾を招く可能性がある。

20

【0130】

一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 24 時間から約 100 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 48 時間から約 100 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 48 時間から約 72 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 48 時間から約 96 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 72 時間から約 96 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 24 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 48 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 72 時間である。一部の態様では、細胞供給時間は、誘導後、約 96 時間である。

30

【0131】

IEE. CO₂

本開示の方法はまた、最初の CO₂ 設定値にも関する。上流バイオリアクター工程における CO₂ の濃度は、細胞増殖および pH を制御するための重要な要素である。高濃度の CO₂ は細胞培養培地中に溶解した CO₂ の増加を招き、それは細胞培養培地の pH を低下させると考えられる。その上、二酸化炭素は呼吸プロセスの必然的な産物であり、そのため、好気性生物プロセスに常に存在するため、CO₂ の濃度は上流バイオ製造工程の間に変化する可能性が高い。製造中の高濃度の CO₂ は、細胞培養物の増殖速度および／またはタンパク質生産量の低下を招く可能性がある。また、タンパク質生産速度の変化はゴルジにおけるタンパク質滞留時間に影響を及ぼし得るため、タンパク質のグリコシル化パターンは、CO₂ 濃度の変化によっても影響される。

40

【0132】

一部の態様では、最初の CO₂ 設定値は、約 5 % と約 50 % との間、約 10 % と約 45 % との間、約 10 % と約 40 % との間、約 10 % と約 35 % との間、約 10 % と約 30 % との間、約 15 % と約 30 % との間、約 15 % と約 25 % との間、または約 20 % と約 25 % との間である。一部の態様では、最初の CO₂ 設定値は、約 0 % と約 75 % との間である。一部の態様では、最初の CO₂ 設定値は、約 5 % と約 50 % との間である。一部の態様では、最初の CO₂ 設定値は、約 10 % と約 45 % との間である。一部の態様では、最

50

初のCO₂設定値は、約10%と約40%との間である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約10%と約35%との間である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約10%と約30%との間である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約15%と約30%との間である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約15%と約25%との間である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約10%と約25%との間である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約15%、約16%、約17%（例えば、16.8%）、約18%、約19%、約20%、約21%、約22%、約23%、約24%、または約25%である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約17%（例えば、16.8%）である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約22%、例えば、22.4%である。一部の態様では、最初のCO₂設定値は、約23%である。

10

【0133】

一部の態様では、細胞培養工程を通じて、最初のCO₂濃度をモニターして維持する。他の態様では、最初のCO₂濃度は設定するが、細胞培養工程を通じてモニターすることはない。

【0134】

II F. 条件の組合せ

一部の態様では、本開示の方法は、上記に挙げた条件の任意の組合せを含む。一部の態様では、本方法は、以下のうち2つまたはそれ以上からなる群から選択される条件を含む：(i) 約35℃と約37℃との間、例えば、約36℃である最初の温度設定値、32℃と約34℃との間、例えば、約33℃である第2の温度設定値、および約30℃と約32℃との間、例えば、約31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 7.0である最初のpH設定値、および6.9である第2のpH設定値、(iii) 約0.15×10⁶個/mLと約0.45×10⁶個/mLとの間である最初の生細胞密度(VCD)設定値、(iv) 6.9である最初のpH、(v) 約96時間でのpHシフト、ならびに(vi) 約15%と約25%との間、例えば、約16.8%である最初のCO₂設定値。

20

【0135】

一部の態様では、本方法は、(i) 約35℃と約37℃との間、例えば、約36℃である最初の温度設定値、32℃と約34℃との間、例えば、約33℃である第2の温度設定値、および約30℃と約32℃との間、例えば、約31℃である第3の温度設定値、ならびに(ii) pH 7.0である最初のpH設定値、および6.9である第2のpH設定値を含む。

30

【0136】

一部の態様では、本方法は、(i) 36℃である最初の温度設定値、33℃である第2の温度設定値、および31℃である第3の温度設定値、ならびに(ii) 約0.15×10⁶個から約0.45×10⁶個（例えば、0.30×10⁶個）である最初の生細胞密度(VCD)設定値を含む。

【0137】

一部の態様では、本方法は、(i) 約35℃と約37℃との間、例えば、約36℃である最初の温度設定値、32℃と約34℃との間、例えば、約33℃である第2の温度設定値、および約30℃と約32℃との間、例えば、約31℃である第3の温度設定値、ならびに(ii) 約15%と約25%との間、例えば、約15%、約16%、約16.8%、約17%、約22%、または約22.4%である最初のCO₂設定値を含む。

40

【0138】

一部の態様では、本方法は、(i) 約35℃と約37℃との間、例えば、約36℃である最初の温度設定値、32℃と約34℃との間、例えば、約33℃である第2の温度設定値、および約30℃と約32℃との間、例えば、約31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 7.0である最初のpH設定値、および6.9である第2のpH設定値、ならびに(iii) 約0.15×10⁶個から約0.45×10⁶個（例えば、0.30×10⁶個）である最初の生細胞密度(VCD)設定値を含む。

【0139】

50

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃である最初の温度設定値、32℃と約 34℃との間、例えば、約 33℃である第2の温度設定値、および約 30℃と約 32℃との間、例えば、約 31℃である第3の温度設定値、ならびに (ii) pH 6.9である最初の pH 設定値を含む。

【0140】

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃である最初の温度設定値、32℃と約 34℃との間、例えば、約 33℃である第2の温度設定値、および約 30℃と約 32℃との間、例えば、約 31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 6.9である最初の pH 設定値、ならびに (iii) 約 0.15×10^6 個から約 0.45×10^6 個 (例えば、 0.30×10^6 個) である最初の生細胞密度 (VCD) 設定値を含む。

10

【0141】

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃である最初の温度設定値、32℃と約 34℃との間、例えば、約 33℃である第2の温度設定値、および約 30℃と約 32℃との間、例えば、約 31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 7.0である最初の pH 設定値、および pH 6.9である第2の pH 設定値、または pH 6.9である最初の pH 設定値、ならびに (iii) 約 15%と約 25%との間、例えば、約 15%、約 16%、約 16.8%、約 17%、約 22%、または約 22.4%である最初の CO₂ 設定値を含む。

【0142】

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃である最初の温度設定値、32℃と約 34℃との間、例えば、約 33℃である第2の温度設定値、および約 30℃と約 32℃との間、例えば、約 31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 7.0である最初の pH 設定値、および pH 6.9である第2の pH 設定値、または pH 6.9である最初の pH 設定値、(iii) 約 0.15×10^6 個から約 0.45×10^6 個 (例えば、 0.30×10^6 個) である最初の生細胞密度 (VCD) 設定値、ならびに (iv) 約 15%と約 25%との間、例えば、約 15%、約 16%、約 16.8%、約 17%、約 22%、または約 22.4%である最初の CO₂ 設定値を含む。

20

【0143】

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃である最初の温度設定値、32℃と約 34℃との間、例えば、約 33℃である第2の温度設定値、および約 30℃と約 32℃との間、例えば、約 31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 7.0である最初の pH 設定値、および pH 6.9である第2の pH 設定値、または pH 6.9である最初の pH 設定値、(iii) 約 15%と約 25%との間、例えば、約 15%、約 16%、約 16.8%、約 17%、約 22%、または約 22.4%である最初の CO₂ 設定値、ならびに (iv) 約 0.15×10^6 個から約 0.45×10^6 個 (例えば、 0.30×10^6 個) である最初の生細胞密度 (VCD) 設定値を含む。

30

【0144】

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃である最初の温度設定値、32℃と約 34℃との間、例えば、約 33℃である第2の温度設定値、および約 30℃と約 32℃との間、例えば、約 31℃である第3の温度設定値、(ii) pH 7.0である最初の pH 設定値、および pH 6.9である第2の pH 設定値、または pH 6.9である最初の pH 設定値、ここで最初の pH 設定値から第2の pH 設定値へのシフトは、約 96時間の時点である、ならびに (iii) 約 15%と約 25%との間、例えば、約 15%、約 16% (例えば、約 16.8%)、約 17%、約 22%、または約 22.4%である最初の CO₂ 設定値を含む。

40

【0145】

一部の態様では、本方法は、(i) 約 35℃と約 37℃との間、例えば、約 36℃であ

50

る最初の温度設定値、 32°C と約 34°C との間、例えば、約 33°C である第2の温度設定値、および約 30°C と約 32°C との間、例えば、約 31°C である第3の温度設定値、(i i) pH 7.0である最初のpH設定値、およびpH 6.9である第2のpH設定値、ここで最初のpH設定値から第2のpH設定値へのシフトは、約96時間の時点である、ならびに(i i i)約15%と約25%との間、例えば、約15%、約16%、約16.8%、約17%、約22%、または約22.4%である最初の CO_2 設定値、ならびに(i v)約 0.15×10^6 個から約 0.45×10^6 個(例えば、 0.30×10^6 個)である最初の生細胞密度(VCD)設定値を含む。

【0146】

III. グリコシル化プロファイル

本開示の方法および条件は、本方法によって生産されるタンパク質のグリコシル化プロファイルに影響を与えるため、それを維持するため、制御するため、および／または変更するために有用である。一部の態様では、本方法は、タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する。一部の態様では、タンパク質のグリコシル化プロファイルは、1つまたは複数のN結合型グリカンを含む。

【0147】

本開示の方法は、グリカン放出アッセイを含む種々の方法を使用するグリカン分析を介して達成することまたは実証することができる。糖タンパク質などの複合糖質のグリカン分析における第1段階は、糖が結合している分子からの糖の放出である。糖タンパク質上のN結合型グリカンは、ペプチド-N-グリコシダーゼF(PNGアーゼF)などのアミダーゼによって放出される。生物起源のオリゴ糖の分析のためのほとんどの方法は、グリカン誘導体化の段階を必要とする。グリカンを誘導体化して発色団または蛍光団を導入し、クロマトグラフィーまたは電気泳動による分離後の検出を容易にすることができる。また、誘導体化を、還元末端に荷電基または疎水性基を連結させて、グリカン分離および質量分析検出を強化するために適用することもできる。さらに、完全メチル化などの誘導体化の段階は、シアル酸残基を安定化すること、質量分析の感度を向上させること、および(タンデム)質量分析による詳細な構造的特徴付けを支援することを目的とする。

【0148】

質量分析(「MS」または「mass-spec」)は、質量電荷比イオンを測定するために使用される分析手法である。これは、試料をイオン化して、質量の異なるイオンを分離し、イオン束の強度を測定することによってそれらの相対的存在量を記録することによって達成される。典型的な質量分析計は、イオン源、質量分析器、および検出器システムという3つの部分で構成される。イオン源は、分析対象の物質(分析物)をイオン化する質量分析計の一部である。イオンは続いて、磁場または電場によって、イオンをその質量電荷比(m/z)に従って分離する質量分析器に運ばれる。多くの質量分析計は、タンデム質量分析のために2つまたはそれ以上の質量分析計を使用する(MS/MS)。検出器は、イオンが表面付近を通過するかまたは表面に衝突した場合に、誘導された電荷または発生した電流を記録する。質量スペクトルは、質量分析器によって m/z イオンを走査する場合に検出器に発生するシグナルを測定した結果である。

【0149】

一部の態様では、N結合型グリカンは、疎水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)によって分析することができる。グリカンをCTLA4から切断して、蛍光標識し、分析のためにHILICによって分離する。蛍光標識(例えば、2-アミノベンズアミド)によるグリカンのタグ付加により、グリカンをフェムトモルレベルで検出することが可能になる。一部の態様では、CTLA4 N結合型グリカンは、HILICを質量分析と連動させるものによって分析される。

【0150】

種々のN結合型グリカンが、タンパク質のグリコシル化プロファイルに存在し得る。一部の態様では、N結合型グリカンは、G0F、G1F、G2F、S1G1F、S1G2F、S2G2F、S1G3F、および／またはS2G4Fを含む。G0F、G1F、G2F

10

20

30

40

50

、S 1 G 1 F、S 2 G 2 F、S 1 G 3 F、およびS 2 G 4 Fの代表的な略図を、図1 B～1 Cに見ることができる。一部の態様では、本開示の方法は、第1日、第2日、第3日、第4日、第5日、第6日、第7日、第8日、第9日、第10日、第11日、第12日、第13日、第14日、第15日、第16日、第17日、第18日、第19日、第20日、または第21日の後にグリコシル化プロファイルを測定することを伴う。一部の態様では、本開示の方法は、第7日の後にグリコシル化プロファイルを測定することを伴う。一部の態様では、本開示の方法は、第14日の後にグリコシル化プロファイルを測定することをさらに含む。一部の態様では、本開示の方法は、第21日の後にグリコシル化プロファイルを測定することを伴う。

【0151】

一部の態様では、グリコシル化されたタンパク質は、C T L A 4タンパク質である。C T L A 4分子またはC T L A 4細胞外ドメインをF cと融合させることができ、この分子はC T L A 4－F cまたはC T L A 4－I gと称される。「F c領域」（断片結晶形成領域）、「F cドメイン」、または「F c」は、免疫系のさまざまな細胞（例えば、エフェクター細胞）上に位置するF c受容体、または古典的補体系の第一成分（C 1 q）への結合を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介する、抗体の重鎖のC末端領域を指す。したがって、F c領域は、第1の定常領域免疫グロブリンドメイン（例えば、C H 1またはC L）を除外した抗体の定常領域を含む。I g G、I g AおよびI g D抗体アイソタイプでは、F c領域は、抗体の2つの重鎖の第2（C H 2）および第3（C H 3）の定常ドメインに由来する2つの同一なタンパク質断片を含み、I g MおよびI g Eでは、F c領域は、各ポリペプチド鎖の中に3つの重鎖定常ドメイン（C H ドメイン2～4）を含む。I g Gアイソタイプは、ある特定の種ではサブクラスに分けられ、ヒトではI g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4に、マウスはI g G 1、I g G 2 a、I g G 2 bおよびI g G 3に分けられる。I g Gの場合、F c領域は、免疫グロブリンドメインC H 2およびC H 3、ならびにC H 1ドメインとC H 2ドメインとの間のヒンジを含む。免疫グロブリン重鎖のF c領域の境界の定義はさまざまであり得るが、本明細書で定義されるように、ヒトI g G重鎖F c領域は、I g G 1についてはアミノ酸残基D 2 2 1、I g G 2についてはV 2 2 2、I g G 3についてはL 2 2 1、およびI g G 4についてはP 2 2 4から、重鎖のカルボキシ末端までにわたると定義され、ここで番号付けはK a b a t番号付けスキームによる。ヒトI g G F c領域のC H 2ドメインは、アミノ酸2 3 7からアミノ酸3 4 0までに及び、C H 3ドメインはF c領域内のC H 2ドメインのC末端側に位置し、すなわち、それはI g Gのアミノ酸3 4 1からアミノ酸4 4 7または4 4 6（C末端リジン残基が存在しない場合）または4 4 5（C末端グリシンおよびリジン残基が存在しない場合）までに及ぶ。本明細書で使用される場合、F c領域は、任意のアロタイプ変異体を含むネイティブ配列F c、または変異体F c（例えば、天然に存在しないF c）であり得る。本開示の方法はまた、C T L A 4ドメインを含むタンパク質を生産するためにも有用である。本開示の方法はまた、C T L A 4ドメインがF c部分と融合したものを生産するためにも有用である。一部の態様では、タンパク質は融合タンパク質である。一部の態様では、融合タンパク質はF c部分を含む。一部の態様では、タンパク質はアバタセプトである。一部の態様では、タンパク質は、配列番号1～8からなる群から選択される配列を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号1を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号2を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号3を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号4を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号5を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号6を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号7を含む。一部の態様では、タンパク質は、配列番号8を含む。

【0152】

C T L A 4－I g融合タンパク質は、1つまたは複数の突然変異を含み得る。一部の態様では、C T L A 4－I g融合タンパク質は、（a）配列番号8のアミノ酸配列（アミノ酸2 7位にメチオニン、アミノ酸3 8 2位にグリシン）を有するC T L A 4－I g融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質、(b) 配列番号5のアミノ酸配列(アミノ酸27位にメチオニン、アミノ酸383位にリジン)を有するCTL A4-Ig融合タンパク質、(c) 配列番号7のアミノ酸配列(アミノ酸26位にアラニン、アミノ酸382位にグリシン)を有するCTL A4-Ig融合タンパク質、(d) 配列番号4のアミノ酸配列(アミノ酸26位にアラニン、アミノ酸383位にリジン)を有するCTL A4-Ig融合タンパク質、(e) 配列番号6のアミノ酸配列(アミノ酸25位にメチオニン、アミノ酸382位にグリシン)を有するCTL A4-Ig融合タンパク質、または(f) 配列番号3のアミノ酸配列(アミノ酸25位にメチオニン、アミノ酸383位にリジン)を有するCTL A4-Ig融合タンパク質である。一部の態様では、CTL A4-Ig融合タンパク質は、(a) 残基27のメチオニンで始まる配列番号2のアミノ酸配列を含むCTL A4-Igポリペプチドが約90%、(b) 残基番号26のアラニンで始まる配列番号2のアミノ酸配列を含むCTL A4-Igポリペプチドが約10%、(c) 残基番号383のリジンで終わる配列番号2のアミノ酸配列を含むCTL A4-Igポリペプチドが約4%、(d) 残基番号382のグリシンで終わる配列番号2のアミノ酸配列を含むCTL A4-Igポリペプチドが約96%、および適宜、(e) 残基番号25のメチオニンで始まる配列番号2のアミノ酸配列を含むCTL A4-Igポリペプチドが約1%未満である。

10

20

30

40

50

【0153】

本開示のタンパク質は、グリコシル化部位を有する。グリコシル化は、ポリペプチド鎖内の特定の部位でのタンパク質への複雑なオリゴ糖構造の付加を伴うプロセスである。タンパク質のグリコシル化および付加された炭水化物のその後のプロセッシングは、タンパク質のフォールディングおよび構造、タンパク質半減期を含むタンパク質安定性、ならびにタンパク質の機能的特性に影響を及ぼす可能性がある。タンパク質のグリコシル化は、修飾が起こる配列の状況によって、O結合型グリコシル化およびN結合型グリコシル化という2つのクラスに分けることができる。O結合型多糖は、ヒドロキシル基に、通常はセリン残基またはトレオニン残基のいずれかのヒドロキシル基に連結している。O-グリカンは、すべてのセリン残基およびトレオニン残基に付加されるわけではない。O結合型オリゴ糖は通常、単枝性または二分岐性であり、すなわち、それらは1つまたは最大で2つの分枝(分岐)を含み、1つから4つの異なる種類の糖残基を含み、それらは1つずつ付加される。N結合型多糖は、アスパラギンのアミド窒素に連結している。アスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-トレオニン(ここでXはプロリン以外の任意のアミノ酸である)という2つのトリペプチド配列のうちの一方の一部であるアスパラギンのみが、グリコシル化の標的となる。N結合型オリゴ糖は1つから4つの分枝を有することができ、単枝性、二分岐性、三分岐性、四分岐性と称される。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、アバタセプトのAsn76(T5)、Asn108(T7)、および/またはAsn207(T14)からなる群から選択される1つまたは複数のアスパラギン残基に位置する。

【0154】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約2.0%と約10.0%の間であるGOFの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約2.5%と約10%の間、約2.5%と約9.5%の間、約2.5%と約9%の間、約2.5%と約8.5%の間、約2.5%と約8%の間、約2.5%と約7.5%の間、約2.5%と約7%の間、約2.5%と約6.5%の間、約3.0%と約10%の間、約3.0%の間、約9.5%の間、約3.0%と約9%の間、約3.0%と約8.5%の間、約3.0%と約8%の間、約3.0%と約7.5%の間、約3.0%と約7%の間、または約3.0%と約6.5%の間であるGOFの相対的存在量を含む。

【0155】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約3.2%と約6.6%の間、約3.2%と約4.6%の間、または3.2%

と約 5.6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 3.2%と約 4.6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 3.2%と約 6.6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 3.2%と約 5.6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。

【 0 1 5 6 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。

10

【 0 1 5 7 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 6%との間、約 1.0%と約 5.5%との間、約 1.0%と約 5.0%との間、約 1.0%と約 4.5%との間、約 1.0%と約 4.0%との間、約 1.5%と約 6%との間、約 1.5%と約 5.5%との間、約 1.5%と約 5.0%との間、約 1.5%と約 4.5%との間、約 1.5%と約 4.0%との間、約 2.0%と約 6%との間、約 2.0%と約 5.5%との間、約 2.0%と約 5.0%との間、約 2.0%と約 4.5%との間、または約 2.0%と約 4.0%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 2.1%と約 4.0%との間、約 1.8%と約 3.5%との間、または約 1.8%と 4.0%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。

20

【 0 1 5 8 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 5.5%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 5.0%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 4.5%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.0%と約 4.0%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.5%と約 6%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.5%と約 5.5%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.5%と約 5.0%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.5%と約 4.5%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 1.5%と約 4.0%との間である G 0 F の相対的存在量を含む。

30

40

【 0 1 5 9 】

本開示の方法は、タンパク質の G 2 F 含有量を制御するかまたは維持するために有用である。タンパク質の G 2 F 含有量は、ヒト身体からのタンパク質の消失速度に関連し、このため、本方法はまた、G 2 F 含有量を含むそのグリカン含有量を制御することによってタンパク質の消失半減期を制御することも対象とする。一部の態様では、本開示の方法は、タンパク質の循環半減期を、その消失速度を低下させることによって延長するために有用である。一部の態様では、タンパク質は組換え体（例えば、アバタセプト）である。一部の態様では、タンパク質の消失半減期は短縮する。一部の態様では、タンパク質の循環半減期は延長する。

50

【0160】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約12%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約12%との間、約5%と約11.5%との間、約5%と約11%との間、約5%と約10.5%との間、約5%と約10%との間、約5.5%と約12%との間、約5.5%と約11.5%との間、約5.5%と約11%との間、約5.5%と約10.5%との間、約5.5%と約10%との間、約6%と約12%との間、約6%と約11.5%との間、約6%と約11%との間、約6%と約10.5%との間、約6%と約10%との間、約6.5%と約12%との間、約6.5%と約11.5%との間、約6.5%と約11%との間、約6.5%と約10.5%との間、約6.5%と約10%との間、約7%と約12%との間、約7%と約11.5%との間、約7%と約11%との間、約7%と約10.5%との間、または約7%と約10%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約7.2%と約9.8%との間、約6.3%と10.6%との間、または約7.2%と約10.6%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn108(T7)に位置し、約5%と約21%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、本方法は、本明細書に開示される条件の任意の1つの下で、例えば、約35℃と約37℃との間、例えば、約36℃である最初の温度設定値、32℃と約34℃との間、例えば、約33℃である第2の温度設定値、および約30℃と約32℃との間、例えば、約31℃である第3の温度設定値である条件の下で、タンパク質を培養することを含み、ここでタンパク質は、残基Asn76(T5)に、N結合型グリカン、例えば、G2Fを有し、G2Fの相対的存在量は、約5%と約12%との間である。

10

20

【0161】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約11.5%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約11%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約10.5%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約10%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5.5%と約12%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5.5%と約11.5%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5.5%と約11%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5.5%と約10.5%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5.5%と約10%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約7.2%と約9.8%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約6.3%と約10.6%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)に位置し、約5%と約21%との間であるG2Fの相対的存在量を含む。

30

40

【0162】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn108(T7)に位置し、約5%と約21%との間、約5%と約20.5%との間、約5%と約20%との

50

間、約 5 % と約 19.5 % との間、約 5 % と約 19 % との間、約 5.5 % と約 21 % との間、約 5.5 % と約 20.5 % との間、約 5.5 % と約 20 % との間、約 5.5 % と約 19.5 % との間、約 5.5 % と約 19 % との間、約 6 % と約 21 % との間、約 6 % と約 20.5 % との間、約 6 % と約 20 % との間、約 6 % と約 19.5 % との間、約 6 % と約 19 % との間、約 6.5 % と約 21 % との間、約 6.5 % と約 20.5 % との間、約 6.5 % と約 20 % との間、約 6.5 % と約 19.5 % との間、約 6.5 % と約 19 % との間、約 7 % と約 21 % との間、約 7 % と約 20.5 % との間、約 7 % と約 20 % との間、約 7 % と約 19.5 % との間、約 7 % と約 19 % との間、約 7.5 % と約 21 % との間、約 7.5 % と約 20.5 % との間、約 7.5 % と約 20 % との間、約 7.5 % と約 19.5 % との間、約 7.5 % と約 19 % との間、約 8 % と約 21 % との間、約 8 % と約 20.5 % との間、約 8 % と約 20 % との間、約 8 % と約 19.5 % との間、または約 8 % と約 19 % との間である G2F の相対的存在量を含む。

10

【0163】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 8.2 % と約 14.1 % との間、約 8.0 % と約 18.6 % との間、または約 8.2 % と約 14.1 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、G2F は、ガラクトース- α -1, 3-ガラクトース部分 (G2F-Gal) をさらに含み、G2F-Gal は、約 1.4 % 以下である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F-Gal は、約 1.0 % から約 1.4 % の間である相対的存在量を占める。一部の態様では、G2F-Gal は、約 0.4 % から約 0.9 % の間である相対的存在量を占める。

20

【0164】

一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、複数のガラクトース- α -1, 3-ガラクトース (α -gal) 結合を含まない。

【0165】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 5 % と約 21 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 5 % と約 20.5 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 5 % と約 20 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 5.5 % と約 21 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 5.5 % と約 20.5 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 5.5 % と約 20 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 8.2 % と約 14.1 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 8.0 % と約 18.6 % との間である G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカン は、残基 Asn108 (T7) に位置し、約 8.2 % と約 14.1 % との間である G2F の相対的存在量を含む。

30

40

【0166】

一部の態様では、本方法は、本明細書に開示される条件の任意の 1 つの下で、例えば、約 35 °C と約 37 °C との間、例えば、約 36 °C である最初の温度設定値、32 °C と約 34 °C との間、例えば、約 33 °C である第 2 の温度設定値、および約 30 °C と約 32 °C との間、例えば、約 31 °C である第 3 の温度設定値である条件の下で、タンパク質を培養することを含み、ここでタンパク質は、残基 Asn108 (T7) に、N 結合型グリカン、例えば、G2F を有し、G2F の相対的存在量は、約 5 % と約 21 % との間である。

【0167】

50

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29%と約38%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29%と約38%との間、約29%と約37.5%との間、約29%と約37%との間、約29%と約36.5%との間、約29.5%と約38%との間、約29.5%と約37.5%との間、約29.5%と約37%との間、約29.5%と約36.5%との間、約30%と約38%との間、約30%と約37.5%との間、約30%と約37%との間、約30%と約36.5%との間、約31.5%と約38%との間、約31.5%と約37.5%との間、約31.5%と約37%との間、約31.5%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。

10

【0168】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約38%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約37.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約37%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29%と約38%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約37.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約37%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約29.5%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約30%と約38%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約30%と約37.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約30%と約37%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約30%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約31.6%と約35.1%との間、約31.3%と約36.5%との間、または約31.3%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約31.6%と約35.1%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約31.3%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 7 6 (T 5) に位置し、約31.3%と約36.5%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。

20

30

40

【0169】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、33%と約45%との間であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約33%と約45%との間、約33%と約44.5%との間、約33%と約44%との間、約33%と約43.5%との間、約33%と約43%との間、約33%と約42.5%との間、約33.5%と約45%との間、約33.5%と約44.5%との間、約33.5%と

50

10

20

30

40

50

50

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約34%と約45%との間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約34%と約44.5%との間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約34%と約44%との間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約34%と約43.5%との間であるS1G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合

型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 % と約 4 3 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 % と約 4 3 . 5 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 % と約 4 3 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 . 2 % と約 3 7 . 7 % との間、約 3 5 . 5 % と約 4 2 . 3 % との間、または約 3 4 . 2 % と約 4 2 . 3 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 . 2 % と約 4 2 . 3 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 5 . 2 % と約 4 2 . 3 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 3 4 . 2 % と約 3 7 . 7 % との間である S 1 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、S 1 G 2 F は、ガラクトース- α -1, 3-ガラクトース部分 (S 1 G 2 F - G a l) をさらに含み、S 1 G 2 F - G a l は、約 4 . 7 % 以下である相対的存在量を占める。一部の態様では、S 1 G 2 F - G a l は、約 2 . 3 % から約 4 . 7 % の間である相対的存在量を占める。一部の態様では、S 1 G 2 F - G a l は、約 1 . 4 % から約 1 . 8 % の間である相対的存在量を占める。

10

20

【 0 1 7 3 】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 5 % との間、約 1 3 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 3 % と約 2 4 % との間、約 1 3 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 3 % と約 2 3 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 5 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 4 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 3 . 5 % と約 2 3 % との間、約 1 4 % と約 2 5 % との間、約 1 4 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 4 % と約 2 4 % との間、約 1 4 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 4 % と約 2 3 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 5 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 4 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 4 . 5 % と約 2 3 % との間、約 1 5 % と約 2 5 % との間、約 1 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 5 % と約 2 4 % との間、約 1 5 % と約 2 3 . 5 % との間、約 1 5 % と約 2 3 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 5 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 4 . 5 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 4 % との間、約 1 5 . 5 % と約 2 3 . 5 % との間、または約 1 5 . 5 % と約 2 3 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。

30

【 0 1 7 4 】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 4 . 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 4 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 3 . 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 3 % と約 2 3 . 5 % との間である S 2 G 2 F の相対的存在量を含む。

40

【 0 1 7 5 】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位

50

20

30

40

50

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカン、残基Asn108(T7)に位置し、約18%と約36%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカン、残基Asn108(T7)に位置し、約1

20

30

40

50

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約19%と約35.5%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約19%と約35%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンハ、残基Asn108(T7)に位置し、約19%と約34.5%との間であるS2G2Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合

10

20

30

40

50

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76（T5）に位置し、約2％と約8％との間であるS1G3Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76（T5）に位置し、約2％と約8％との間、約2％と約7.5％との間、約2％と約7％との間、約2％と約6.5％との間、約2％と約6％との間、約2％と約5.5％との間、約2.5％と約8％との間、約2.5％と約7.5％との間、約2.5％と約7％との間、約2.5％と約6.5％との間、約2.5％と約6％との間、約2.5％と約5.5％との間、約3％と約8％との間、約3％と約7.5％との間、約3％と約7％との間、約3％と約6.5％との間、約3％と約6％との間、約3％と約5.5％との間、約3.5％と約8％との間、約3.5％と約7.5％との間、約3.5％と約7％との間、約3.5％と約6.5％との間、約3.5％と約6％との間、約3.5％と約5.5％との間、約4％と約8％との間、約4％と約7.5％との間、約4％と約7％との間、約4％と約6.5％との間、約4％と約6

【 0 1 8 3 】

20

【 0 1 8 4 】

30

【 0 1 8 5 】

50

約 4 % と約 8 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 4 % と約 7 . 5 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 4 % と約 7 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 4 % と約 6 . 5 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 4 % と約 6 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 4 % と約 5 . 5 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカン

10

【 0 1 8 6 】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 1 0 8 (T 7) に位置し、約 0 . 5 % と約 4 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカン

20

【 0 1 8 7 】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカン

30

【 0 1 8 8 】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカン

40

50

1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 . 4 % と約 2 . 2 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 3 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 2 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 1 . 5 % との間である S 1 G 3 F の相対的存在量を含む。

【 0 1 8 9 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 0 . 5 % と約 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 0 . 5 % と約 4 % との間、約 0 . 5 % と約 3 . 5 % との間、約 0 . 5 % と約 3 % との間、約 0 . 5 % と約 2 . 5 % との間、約 1 % と約 4 % との間、約 1 % と約 3 . 5 % との間、約 1 % と約 3 % との間、または約 1 % と約 2 . 5 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 . 9 % と約 2 . 4 % との間、約 1 . 4 % と約 2 . 1 % との間、または約 1 . 4 % と約 2 . 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 2 % との間、約 1 % と約 2 % との間、または約 1 . 5 % と約 2 . 5 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。

【 0 1 9 0 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 0 . 5 % と約 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 0 . 5 % と約 3 . 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 0 . 5 % と約 3 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 0 . 5 % と約 2 . 5 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 3 . 5 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 3 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 2 . 5 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 . 9 % と約 2 . 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 . 4 % と約 2 . 1 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 . 4 % と約 2 . 4 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 % と約 2 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) に位置し、約 1 . 5 % と約 2 . 5 % との間である S 2 G 4 F の相対的存在量を含む。

【 0 1 9 1 】

一部の態様では、1つまたは複数の N 結合型グリカンは、残基 A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 7 . 0 % 以下であるかまたは約 6 . 5 % である G 0 F の相対的存在量を含む。

む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約6.0%以下、約5.5%以下、約5.0%以下、約4.5%以下、約4.0%以下、約3.5%以下、約3.0%以下、約2.5%以下、約2.0%以下、約1.5%以下、約1.0%以下、約0.5%以下であるかまたは約0.0%であるG 0 Fの相対的存在量を含む。

【0192】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約7.5%以下であるかまたは7.0%であるG 1 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約6.5%以下、約6.0%以下、約5.5%以下、約5.0%以下、約4.5%以下、約4.0%以下、約3.5%以下、約3.0%以下、約2.5%以下、約2.0%以下、約1.5%以下、約1.0%以下、約0.5%以下であるかまたは約0.0%であるG 1 Fの相対的存在量を含む。

【0193】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約25%以下であるかまたは約1.5%から約23%であるG 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約24%以下、約23%以下、約22%以下、約21%以下、約20%以下、約19%以下、約18%以下、約17%以下、約16%以下、約15%以下、約14%以下、約13%以下、約12%以下、約11%以下、約10%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、または約1%以下であるG 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約2.0%から約23%、約3%から約23%、約4%から約23%、約5%から約23%、約6%から約23%、約7%から約23%、約8%から約23%、約9%から約23%、約10%から約23%、約11%から約23%、約12%から約23%、約13%から約23%、約14%から約23%、約15%から約23%、約16%から約23%、約17%から約23%、約18%から約23%、約19%から約23%、約20%から約23%、約21%から約23%、または約22%から約23%であるG 2 Fの相対的存在量を含む。

【0194】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約13.5%以下であるかまたは約12.5%であるS 1 G 1 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約12%以下、約11%以下、約10%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、約1%以下であるかまたは約0%に等しいS 1 G 1 Fの相対的存在量を含む。

【0195】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約33%以上であるかまたは約32%から約49%であるS 1 G 2 Fの相対的存在量を含む。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基A s n 7 6 (T 5) 単独、A s n 1 0 8 (T 7) 単独、A s n 2 0 7 (T 1 4) 単独、またはそれ

10

20

30

40

50

らの任意の組合せに位置し、約 34% 以上、約 35% 以上、約 36% 以上、約 37% 以上、約 38% 以上、約 39% 以上、約 40% 以上、約 41% 以上、約 42% 以上、約 43% 以上、約 44% 以上、約 45% 以上、約 46% 以上、約 47% 以上、約 48% 以上であるかまたは約 49% 以上である S1G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンには、残基 Asn76 (T5) 単独、Asn108 (T7) 単独、Asn207 (T14) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 33% から約 49%、約 34% から約 49%、約 35% から約 49%、約 36% から約 49%、約 37% から約 49%、約 38% から約 49%、約 39% から約 49%、約 40% から約 49%、約 41% から約 49%、約 42% から約 49%、約 43% から約 49%、約 44% から約 49%、約 45% から約 49%、約 46% から約 49%、約 47% から約 49%、または約 48% から約 49% である S1G2F の相対的存在量を含む。

10

【0196】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンには、残基 Asn76 (T5) 単独、Asn108 (T7) 単独、Asn207 (T14) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 12% 以上であるかまたは約 14% から約 48.5% である S2G2F の相対的存在量を含む。一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンには、残基 Asn76 (T5) 単独、Asn108 (T7) 単独、Asn207 (T14) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 15% から約 45.5%、約 15% から約 45.5%、約 16% から約 45.5%、約 16% から約 45.5%、約 17% から約 45.5%、約 18% から約 45.5%、約 19% から約 45.5%、約 20% から約 45.5%、約 21% から約 45.5%、約 22% から約 45.5%、約 23% から約 45.5%、約 24% から約 45.5%、約 25% から約 45.5%、約 26% から約 45.5%、約 27% から約 45.5%、約 28% から約 45.5%、約 29% から約 45.5%、約 30% から約 45.5%、約 31% から約 45.5%、約 32% から約 45.5%、約 33% から約 45.5%、約 34% から約 45.5%、約 35% から約 45.5%、約 36% から約 45.5%、約 37% から約 45.5%、約 38% から約 45.5%、約 39% から約 45.5%、約 40% から約 45.5%、約 41% から約 45.5%、約 42% から約 45.5%、約 43% から約 45.5%、約 44% から約 45.5%、約 44% から約 45.5%、または約 45% から約 45.5% である S2G2F の相対的存在量を含む。

20

【0197】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンには、残基 Asn76 (T5) 単独、Asn108 (T7) 単独、Asn207 (T14) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 1.5% から約 23% である相対的存在量を占める相対的存在量の G2F、約 32% から約 49% である相対的存在量を占める S1G2F、および／または約 14% から約 48.5% である相対的存在量を占める S2G2F を含む。

30

【0198】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンには、残基 Asn76 (T5) 単独、Asn108 (T7) 単独、Asn207 (T14) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 25% 以下である相対的存在量を占める相対的存在量の G2F、約 33% 以上である相対的存在量を占める S1G2F、および／または約 12% 以上である相対的存在量を占める S2G2F を含む。

40

【0199】

一部の態様では、1 つまたは複数の N 結合型グリカンには、残基 Asn76 (T5) 単独、Asn108 (T7) 単独、Asn207 (T14) 単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約 6.5% 以下である相対的存在量を占める相対的存在量の G0F、約 7% 以下である相対的存在量を占める G1F、約 1.5% から約 23% である相対的存在量を占める G2F、約 12.5% 以下である相対的存在量を占める S1G1F、約 32% から約 49% である相対的存在量を占める S1G2F、および／または約 14% から約 48.5% である相対的存在量を占める S2G2F を含む。

【0200】

50

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、残基Asn76(T5)単独、Asn108(T7)単独、Asn207(T14)単独、またはそれらの任意の組合せに位置し、約7.0%以下である相対的存在量を占める相対的存在量のG0F、約7.5%以下である相対的存在量を占めるG1F、約25%以下である相対的存在量を占めるG2F、約13.5%以下である相対的存在量を占めるS1G1F、約33%以上である相対的存在量を占めるS1G2F、および／または約12%以上である相対的存在量を占めるS2G2Fを含む。

【0201】

本開示の方法はまた、タンパク質のシアル酸含有量を特徴付けるため、分析するため、または制御するためにも有用である。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約8から約11であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約8.3から約11、約9.5から約10.1、または約8.3から約10.1であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約8.3から約11であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約9.5から約10.1であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約8.3から約10.1であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約8から約11であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約8から約10であるNANAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約9から約10であるNANAのモル比を有する。

10

20

【0202】

一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.1から約2.0であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、0.90から約1.20、または約0.3から約1.2であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、0.80から約1.20であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、0.80から約1.30であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、0.80から約1.40であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、0.70から約1.40であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、0.70から約1.50であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.1から約2であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.9から約1.2であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.3から約1.2であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.8から約1.2であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.8から約1.3であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.8から約1.4であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.7から約1.4であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.7から約1.5であるNGNAのモル比を有する。一部の態様では、1つまたは複数のN結合型グリカンは、シアル酸であり、約0.8から約1.5であるNGNAのモル比を有する。

30

40

【0203】

本開示の方法はまた、タンパク質上に存在するグリカンのシアリル化プロファイルに分

50

析するためにも有用である。一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、1つまたは複数の非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）、モノシアリル化グリカン（ドメインⅠⅠ）、ジシアリル化グリカン（ドメインⅠⅠⅠ）、ならびに／またはトリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン（ドメインⅠⅤ＋Ⅴ）を含む。これらのドメインは、タンパク質をそれらの等電点（ pI ）によって分離するために使用される方法を指す、画像化キャピラリー等電点電気泳動（ $iCIEF$ ）を介して分析することができる。この方法では、試料を水、メチルセルロース、両性電解質、および pI マーカーで約 1 mg/mL の最終濃度に調製し、次いでオートサンプラーによって画像化キャピラリー等電点電気泳動システム（ $iCIEF$ ）に注入する。電気泳動では、アイソフォームの電荷変動に基づき、フルオロカーボン（ FC ）でコーティングされたキャピラリー内の pH 勾配を通じて試料を分離する。次いで、結果を参照の分離と比較して、構成成分の群の比較および特徴付けを行う。

10

【0204】

一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約28から約37、約29から約32、約28から約32、または約29から約37のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約28から約37のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約26から約40のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約28から約39のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約29から約39のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約29から約38のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約29から約37のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約30から約37のモル比を有する。

20

【0205】

一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約25のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約25.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約26のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約26.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約27のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約27.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約28のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約28.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約29のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約29.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約30のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約30.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約31のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約31.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約32のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約32.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約33のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約33.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約34のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約34.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約35のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約35.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約36のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約36.5のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約37のモル比を有する。一部の態様では、非シアリル化グリカン（ドメインⅠ）は、約37.5のモル比を有する。

30

40

50

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

I V + V) は、約 17.5 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン (ドメイン I V + V) は、約 18 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン (ドメイン I V + V) は、約 18.5 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン (ドメイン I V + V) は、約 19 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン (ドメイン I V + V) は、約 19.5 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン (ドメイン I V + V) は、約 20 のモル比を有する。一部の態様では、トリシアリル化およびテトラシアリル化グリカン (ドメイン I V + V) は、約 14.6 のモル比を有する。

【0212】

本開示の方法はまた、O 結合型グリカン进行分析するためにも有用である。一部の態様では、グリコシル化プロファイルは、1 つまたは複数の O 結合型グリカンを含む。一部の態様では、O 結合型グリカンは、残基 Ser 129、Ser 130、Ser 136、および／または Ser 139 に位置する。

【0213】

一部の態様では、本明細書に記載される CTLA4-Fc 融合タンパク質は、C 末端リジンを含む。一部の態様では、C 末端リジンは、約 20% から約 25% である相対的存在量を占める。一部の態様では、C 末端リジンは、約 3% から約 10% である相対的存在量を占める。

【0214】

本開示の方法はまた、CTLA4-Fc 融合タンパク質の二分岐グリカン进行分析することであって、CTLA4 タンパク質における 1 つまたは複数のアスパラギン残基に結合した 1 つまたは複数の N 結合型グリカン測定することを含み、二分岐グリカンの一方が G2F である、分析することのためにも有用である。一部の態様では、CTLA4 タンパク質における 1 つまたは複数のアスパラギン残基に結合した 1 つまたは複数の N 結合型グリカン測定し、ここで、二分岐グリカンの一方は G0F である。一部の態様では、二分岐グリカンは、G0F、G1F、G2F、S1G1F、S1G2F、および／または S2G2F からなる群から選択される。液体クロマトグラフィーを使用して、本開示のグリカン进行分析するために使用することができる。特定の糖タンパク質は、炭水化物の不均一性を示すことがある。不均一性はいくつかのレベルで見ることができ、グリコシル化部位は完全に占有されているものから占有されていないものまでさまざまであり、任意の特定の部位に多くの異なるオリゴ糖構造が存在し、各構造はシアル酸分子、例えば、NANA または NGNA によって修飾され得る。

【0215】

一部の態様では、本開示は、CTLA4-Fc 融合タンパク質の二分岐グリカン进行分析する方法であって、CTLA4-Fc 融合タンパク質の等電点電気泳動を行うことを含む方法を提供する。一部の態様では、等電点電気泳動は、画像化キャピラリー等電点電気泳動である。一部の態様では、等電点電気泳動が行われた CTLA4-Fc 融合タンパク質は、第 I 群、第 II 群、および第 III 群を形成する。一部の態様では、第 I 群は全体の 4% 以下であり、第 II 群は全体の 87% 以上であり、および／または第 III 群は全体の 10% 以下である。

【0216】

本開示のタンパク質の炭水化物含有量は、本明細書の実施例に記載されている方法を含む、当技術分野で公知の方法によって分析することができる。グリコシル化分析のためのいくつかの方法が当技術分野で公知であり、本開示の文脈において有用である。これらの方法は、産生されたペプチドに結合したオリゴ糖の実体および組成に関する情報を提供する。本開示に関連して有用な炭水化物分析のための方法としては、レクチンクロマトグラフィー、高 pH アニオン交換クロマトグラフィーを使用してオリゴ糖を電荷に基づいて分離する、パルスアンペロメトリック検出 (HPAEC-PAD) と組み合わせた高速アニオン交換クロマトグラフィー、NMR、質量分析、HPLC、多孔性黒鉛化炭素 (GPC

10

20

30

40

50

）クロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0217】

オリゴ糖を放出させるための方法には、1) ペプチド-N-グリコシダーゼF/エンド- α -ガラクトシダーゼを使用して一般的に行われる酵素的方法、2) 厳しいアルカリ環境を使用してO結合型構造を主に放出させる β 脱離法、ならびに3) 無水ヒドラジンを使用してN結合型およびO結合型オリゴ糖の両方を放出させる化学的方法が含まれる。分析のための方法は、以下の工程のうちの1つまたは複数を含み得る：1. 試料を脱イオン水に対して透析してすべての緩衝塩を除去し、その後に凍結乾燥を行うこと、2. 無水ヒドラジンによって無傷のオリゴ糖鎖を放出させること、3. 無傷のオリゴ糖鎖を無水メタノール性HClによって処理して、個々の単糖をO-メチル誘導体として遊離させること、10
4. 任意の一級アミノ基をN-アセチル化すること、5. 誘導体化して、ペルー-O-トリメチルシリルメチルグリコシドを得ること、6. C₁₈カラムでのキャピラリーガス-液体クロマトグラフィー（GLC）によって誘導体を分離すること、7. 既知の標準物質と比較して、GLCによる保持時間および質量分析によって個々のグリコシド誘導体を同定すること、ならびに8. 内部標準物質（13-O-メチル-D-グルコース）を用いるFIDによって個々の誘導体を定量すること。一部の態様では、二分岐グリカンは、蛍光検出（UPLC-FLR）を用いる超高性能液体クロマトグラフィーを介して測定される。一部の態様では、CTLA4-Fc融合タンパク質のFcドメインは、測定の前に切断される。一部の態様では、タンパク質をウイルス不活性化工程にかける。一部の態様では、ウイルス不活性化工程は、0.5% Triton X-100を用いて行われる。20

【0218】

IV. 医薬組成物

本開示の方法によって調製される組成物は、医薬製剤も想定している。医薬投与のために許容される組成物、そのような組成物は、医薬投与のために許容されるレベルを超えないレベル（そのような不純物が存在しないことを含むレベル）で不純物である物質を含むことができ、任意の活性薬剤に加えて、例えば、投与を容易にするためにそのような組成物を製剤化する目的で、薬学的に許容される賦形剤、媒体、担体および他の不活性成分を含むことができる。例えば、薬学的に許容されるCTLA4-Ig組成物は、MCP-1またはDNAを、それらの物質がヒトへの投与用に許容されるレベルである限り、含むことができる。30

【0219】

本開示はまた、凍結乾燥された混合物としての、記載されたCTLA4-Ig分子のいずれかも提供する。凍結乾燥されるCTLA4-Igを含む製剤は、以下の3つの基本的な構成成分をさらに含み得る：（1）他のタンパク質または小分子（例えば、免疫抑制剤）を含む追加の活性成分、（2）賦形剤、および（3）溶媒。賦形剤には、良好な凍結乾燥ケーキ特性を与える薬学的に許容される試薬（増量剤）のほか、タンパク質の凍結乾燥保護および／または凍結保護（「安定剤」）、pHの維持（緩衝剤）、ならびに貯蔵中のタンパク質の適正な立体配座を与え、その結果、生物活性（活性成分の安定性、例えば、タンパク質安定性を含む）の実質的な保持が維持されるようなものが含まれる。賦形剤に40
関して、製剤の一例は、緩衝剤、増量剤、タンパク質安定剤、および抗菌剤のうちの1つまたは複数を含み得る。糖またはポリオールを、溶液中ならびに冷凍融解および冷凍乾燥中に非特異的なタンパク質安定剤として使用することができる。ポリマーを、溶液中ならびに冷凍融解および冷凍乾燥中にタンパク質を安定化するために使用することができる。一般的なポリマーの1つは血清アルブミンであり、これは凍結保護剤および凍結乾燥保護剤の両方として使用されている。一態様では、本開示は、アルブミンを含まない製剤を提供する。さまざまな塩を、増量剤として使用することができる。例示的な塩増量剤としては、例えば、NaCl、MgCl₂およびCaCl₂が挙げられる。

【0220】

ある特定のアミノ酸を、凍結保護剤および／または凍結乾燥保護剤ならびに／または増50

量剤として使用することができる。使用し得るアミノ酸としては、グリシン、プロリン、4-ヒドロキシプロリン、L-セリン、グルタミン酸ナトリウム、アラニン、アルギニンおよび塩酸リジンが挙げられるが、これらに限定されない。広いpH範囲をカバーする多くの緩衝剤を、製剤中に選択することができる。緩衝剤としては、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、グリシン、ヒスチジン、リン酸塩（ナトリウムまたはカリウム）、ジエタノールアミンおよびTrisが挙げられる。緩衝剤は、凍結乾燥の前に溶液pHを許容される範囲に維持する薬剤を範囲に含む。一態様では、本開示は、配列番号1～8のいずれか1つによる任意の配列を含むCTLA4-Ig二量体が少なくとも90%、95%、99%、または99.5%を占める、凍結乾燥されたCTLA4-Ig混合物を提供する。一態様では、本開示は、CTLA4-Ig二量体が少なくとも90%、95%、99%、または99.5%を占め、CTLA4-Ig四量体が5%、4%、3%、2%、または1%以下を占める、凍結乾燥されたCTLA4-Ig混合物を提供する。別の態様では、本開示は、CTLA4-Ig二量体が少なくとも90%、95%、99%、または99.5%を占め、CTLA4-Ig四量体が5%、4%、3%、2%、または1%以下を占め、CTLA4-Ig単量体が2%、1.5%、1.0%、0.8%、0.5%、または0.3%以下を占める、凍結乾燥されたCTLA4-Ig混合物を提供する。さらなる一態様では、本開示は、CTLA4-Ig二量体またはCTLA4-Ig分子のモル当たり少なくとも8.0モルのシアル酸を含む、凍結乾燥されたCTLA4-Ig混合物を提供する。別の態様では、本開示は、CTLA4-Ig分子もしくは二量体のモル当たり約15から約35モルのGlcNAc、CTLA4-Ig二量体もしくはCTLA4-Ig分子のモル当たり約1から約5モルのGalNAc、CTLA4-Ig二量体もしくはCTLA4-Ig分子のモル当たり約5モルから約20モルのガラクトース、CTLA4-Ig二量体もしくはCTLA4-Ig分子のモル当たり約2から約10モルのフコース、および／もしくはCTLA4-Ig二量体もしくはCTLA4-Ig分子のモル当たり約5～15モルのマンノースを含む、凍結乾燥されたCTLA4-Ig混合物を提供する。

10

20

30

40

50

【0221】

本開示はまた、皮下（SC）製剤としての、記載されたCTLA4-Ig分子のいずれかも提供する。IV製剤は、頻回の長期治療を必要とする対象には不便である。対象は、1時間も続く可能性のあるIV注入を介して薬物を投与されるために頻回に通院しなければならない。したがって、自宅で自己投与し得るSC製剤が非常に有益であると考えられる。皮下投与のためには、高いタンパク質濃度を有する剤形が望まれる。1mg/kgを超える高用量（1回の投与当たり100mg超）による治療は、SC経路によって投与し得る容量の少なさ（1.5ml未満）が理由で、100mg/mlを上回る濃度での製剤の開発を必要とする。本開示のSC製剤は、水性担体中に、CTLA4-Ig分子を、安定化レベルの糖と組み合わせて少なくとも100mg/mlのタンパク質濃度で、好ましくは、安定化レベルの糖と組み合わせて少なくとも125mg/mlのタンパク質濃度で含む。糖は、タンパク質の糖に対する重量比が少なくとも1:1.1であることが好ましい。安定剤は好ましくは、SCシリンジを介した投与に望ましくないかまたは不適切な粘度をもたらし得る量以下で使用される。糖は、好ましくは二糖類であり、最も好ましくはスクロースである。SC製剤はまた、緩衝剤、界面活性剤、および保存剤からなるリストから選択される構成成分のうちの1つまたは複数も含み得る。

【0222】

V. 治療の方法

本開示の方法によって調製される組成物は、種々の疾患を治療するために有用である。本開示は、T細胞の増殖（または活性化）を阻害するための方法であって、T細胞を、本開示のCTLA4-Ig組成物の有効量と接触させることを含む方法を提供する。本開示は、対象において免疫応答を阻害するための方法であって、それを必要とする対象に本開示のCTLA4-Ig組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象において抗原に対する免疫寛容を誘導するための方法であって、それを必要とする対象に本開示のCTLA4-Ig組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本

開示は、対象において炎症を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む、関節リウマチを治療するための方法を提供する。

【0223】

本開示は、対象において乾癬を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象においてアレルギーを治療するかまたは予防するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象において移植片対宿主病を治療するかまたは予防するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象において移植臓器に対する拒絶反応を治療するかまたは予防するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0224】

本開示は、対象においてクローン病を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象において I 型糖尿病を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0225】

本開示は、対象において卵巣炎を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象において糸球体腎炎を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象においてアレルギー性脳脊髄炎を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0226】

本開示は、対象において重症筋無力症を治療するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を投与することを含む方法を提供する。したがって、本開示のある特定の態様では、本開示は、一般にあらゆる T 細胞依存性リンパ増殖性疾患または障害、およびあらゆる T 細胞依存性自己免疫疾患または障害が挙げられ、より具体的には、T 細胞リンパ腫、T 細胞急性リンパ芽球性白血病、精巣血管中心性 T 細胞リンパ腫、良性リンパ球性血管炎、移植片対宿主病 (G V H D)、移植片拒絶反応に関連する免疫疾患、乾癬、炎症、アレルギー、卵巣炎、糸球体腎炎、脳脊髄炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、アジソン病、原発性粘液水腫、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、グッドパスチャー症候群、重症筋無力症、天疱瘡、交感性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変、慢性肝炎、強皮症、多発性筋炎、および混合性結合組織病が挙げられるがこれらに限定されない、T 細胞関連の疾患または障害を治療するために、本明細書に記載される生産方法において細胞株によって産生される C T L A 4 - I g 分子を提供する。

【0227】

本開示は、T 細胞の増殖（または活性化）を阻害するための方法であって、T 細胞を、別の薬剤、例えば、メトトレキサートと組み合わせるかまたは組み合わせずに、本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量と接触させることを含む方法を提供する。本開示は、対象において免疫応答を阻害するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効量を、単独で、またはメトトレキサートと組み合わせて投与することを含む方法を提供する。本開示は、対象において対象に対する免疫寛容を誘導するための方法であって、それを必要とする対象に本開示の C T L A 4 - I g 組成物の有効

量を、メトトレキサートと組み合わせて投与することを含む方法を提供する。

【0228】

本開示のさまざまな態様は、以下のサブセクションにさらに詳細に記載される。本開示は、さらなる限定とは解釈されるべきでない以下の実施例によってさらに説明される。本出願を通して引用されるすべての参考文献の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0229】

【実施例1】

【0230】

10

5 L ベンチスケール製造

アバタセプトは、ヒト細胞傷害性Tリンパ球抗原-4 (CTLA-4) 機能的結合ドメインとIgG1クラスのヒトモノクローナル免疫グロブリンのFcドメインからなる遺伝子操作された融合タンパク質である。アバタセプトは、単一のジスルフィド結合によって共有結合しているそれぞれおよそ46 kDaの2つの相同なグリコシル化ポリペプチド鎖で構成される。

【0231】

アバタセプトは、チャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞株を使用する大規模細胞培養において、細胞外タンパク質として産生される。製造工程は、ワーキング細胞バンク (WCB) バイアルの解凍によって開始される。培養物を、一連のバッフル付き振盪フラスコ、細胞バッグバイオリアクターおよびシードバイオリアクターにおいて増殖させる。最終段階の接種培養物を生産用バイオリアクターに移す。生産用バイオリアクターからの収集は、シアル酸 (SA) とアバタセプトタンパク質の目標モル比 (MR) および細胞培養時間に基づいて行う。細胞培養収集物を、一次回収収集工程およびその後の滅菌グレード濾過によって清澄化する。無細胞収集材料を、指定のpHを達成するように調整し、下流処理のための準備としてのウイルス不活性化のためにTriton X-100を添加する。

20

【0232】

図1A、1B、および1Cは、位置T5、T7、およびT14に存在する可能性のある種々のグリカンを示している。図1Dは、アバタセプトの一次アミノ酸配列 (配列番号5にも見出される) におけるN結合型グリコシル化部位 (T5、T7、およびT14) の特定の位置を示している。図2Aは、各処置群に関する平均生細胞密度 (VCD) プロファイルを示しており、処置群別のこのバイオリアクター細胞増殖データの概要は図2Bに見ることができる。低い最初のpH (6.9) および低い最初のVCDによる処置群は、稼働の全体を通して一群の中で最低である傾向があり、第11日と第12日との間に到達したピークVCD値は最も低い2つであった。早期のpHシフト条件では、第3日までは他の条件と同程度に増殖したが、第3日のpHシフト後に対照群から徐々に逸脱し、より低いピークVCDに到達した。低い全体的温度群では、第6日以降、対照処置よりも緩徐な増殖が示された。この増殖の効果は、曲線のより平坦な形状および相対的に低いピークVCDに見ることができる。最初のVCDの高い処置群および第1の供給の遅い処置群は、第3日以降に一群の中で最上位となる傾向があった。接種物をスケールアップし、生産用バイオリアクターの前に2段階の5Lシードバイオリアクター (N-2およびN-1) に通した。次いで生産用バイオリアクターの段階を、接種後14~17日間稼働させた。表1は、本試験に使用したセンターポイント5L生産用バイオリアクターの運転パラメータを提示している。細胞生存率プロファイルを、試験条件のそれぞれに関して図3に見ることができる。0.45 × 10⁶ 個/mLである最初の細胞密度は、第14日の時点で生存率の低下が最も大きく、約86%の細胞生存率に低下しており、このことは、より高いレベルの細胞生存率を持続するには高すぎるレベルに細胞密度が到達したことを示唆する。

30

40

【0233】

50

5 L バイオリアクターのグリカンプロファイル分析

シアル酸含有量を、質量分析を介して分析した。第 14 日の収集前の NANA、NGNA、および N 結合リンク値の平均値を、各処置群による結果を対照と比較した Dunnett 検定の p 値とともに、図 4 A に示している。ドメイン IV+V は、N 結合型ドメイン IV およびドメイン V の値の合計と定義される。p 値が 0.05 以下である処置を、対照と有意差があるとみなした。第 14 日の NANA、NGNA、ドメイン I、ドメイン II、およびドメイン III の値は、対照値との有意差を示さなかった。ドメイン IV+V 値のほとんどは、対照値に比して有意差を示さなかった。しかし、低い全体的温度および低い温度シフト 1 の処置群では、対照に比して有意に低いドメイン IV+V のレベルが得られた。ドメイン IV+V に関する DS 放出の規格は 16 % 以下であり、それ故にこの低下は産物の品質にリスクを及ぼさない。平均第 14 日力価および平均比生産性 (Qp) 値は、処置群と対照と比較した対照 Dunnett 検定による p 値とともに、図 4 B に見ることができる。p 値が 0.05 以下であることを有意差とみなした。低い最初の pH、低い最初の VCD、および低い全体的温度は、対照に比して有意に低い第 14 日力価をもたらすことが示された。低い最初の pH および早い pH シフトタイミングの条件は、対照よりも有意に高い比生産性をもたらすことが見出された。

【0234】

10

20

30

40

50

【表 2】

表1: 5L生産用バイオリアクターのセンターポイント運転パラメーター

パラメーター	設定値	範囲
WCB 解凍からの、移行時の世代数	N/A ^a	25 - 55
常温での保持時間中央値(時間)	≤48	N/A
37℃での保持時間中央値(接種前)(時間)	≤24	N/A
接種生細胞密度(10 ⁶ 個/mL)	0.3	0.15-0.45
最初の温度(℃)	36	35- 37
最初のpH	7.0	6.9 - 7.1
最初の作業容量(L)	2.5	2.4 - 2.6
pHシフト設定値	6.9	6.8-7.0
pHシフトのタイミング(時間)	96	72 - 120
第 1 の温度シフト設定値(℃)	33	32 - 34
第 1 の温度シフトのタイミング(時間)	144	120 - 168
第 2 の温度シフト設定値(℃)	31	30 - 32
第 2 の温度シフト設定値のタイミング(時間)	240	228 - 252
第 6～8 日の CO ₂ 飽和目標値(飽和%)	16.8	11.2 - 22.4
pH および CO ₂ 飽和制御のための塩基	1M Na ₂ CO ₃	N/A
攪拌(rpm)	240	N/A
底部気流(mL/分)	30	N/A
上部気流(mL/分)	40	N/A
溶存酸素(%)	40	20-80
第1の供給物添加のタイミング(時間)	76	72-96
供給戦略	72～96時間の時点、およびその後は収集時まで24±4時間ごとに、接種後容量の4.5%を一定量毎日供給	N/A
グルコース添加	[グルコース]2.0g/L未満の場合、200g/L原液を使用して5g/L最終濃度を目標としてボラス添加	N/A

【0235】

各条件で単一のパラメーターをセンターポイント対照に対して変化させる、以下の表 2 に従う一時一事 (O F A T) 法で、試験を実施した。グリコシル化データの結果は、図 4 A ～ 4 H に見ることができる。各設定値を以下の通りに調整した。

【0236】

10

20

30

40

50

【表 3】

表2

実験デザイン

処置群	反復試験の数	細胞培養パラメーター	設定値
対照	2	N/A	N/A
高いpCO ₂	2	第6～8日のCO ₂ 飽和目標値 (%)	22.4%
遅い第1の供給	2	第1の供給添加のタイミング (時間)	96時間
低い最初のpH	2	最初のpH	6.90

処置群	反復試験の数	細胞培養パラメーター	設定値
低い最初のVCD	2	接種生細胞密度 (10 ⁶ 個/mL)	0.15
高い最初のVCD	2	接種生細胞密度 (10 ⁶ 個/mL)	0.45
低い全体的温度	2	最初の温度(°C)	36
		第1の温度シフト設定値(°C)	33
		第2の温度シフト設定値(°C)	31
早いpHシフトのタイミング	2	pHシフトのタイミング(時間)	72
低い温度シフト1	2	第1の温度シフト設定値(°C)	33
低い温度シフト2	2	第2の温度シフト設定値(°C)	31

10

20

【0237】

実験結果

アバタセプト分子上のN-グリコシル化の詳細な特徴付けを、バイオリアクターからの収集後に行った。バイオリアクター試料を、調製用プロテインA Waters HPLCシステムを使用して精製した。次いで、精製された試料を10 kDカットオフの遠心フィルターユニット(Millipore)を使用して、4.0 g/L超の最終濃度に濃縮した。この結果得られたアバタセプトタンパク質を還元させ、アルキル化して、トリプシンにより消化し、その後Glucにより消化した。トリプシン-Gluc消化物を逆相クロマトグラフィーによって分離して、質量分析によって検出した。各グリコフォームの割合を、その糖ペプチドの抽出されたイオンクロマトグラム下のピーク面積を、目的のすべての糖ペプチドによるピーク面積の合計によって除算して計算した。グリカンを放出させて、蛍光標識キットを使用して標識し、その後蛍光検出(UPLC-FLR)を用いる超高性能液体クロマトグラフィーシステムでの試料の分析を行う。グリカンG0F、G2F、S1G2F、S2G2F、S1G3FおよびS2G4Fを、質量分析を介して分析した。これらの6種のグリカンの分析の結果を、図4C～4Hに見ることができる。図4Cは、アバタセプト分子上のT5およびT7 N-グリコシル化部位での相対的存在量として報告された、G0Fグリコフォームに関する液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)の結果の平均を提示している。図4Dは、アバタセプト分子上のT5およびT7 N-グリコシル化部位での相対的存在量として報告された、G2Fグリコフォームに関する液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)の結果の平均を提示している。図4Eは、アバタセプト分子上のT5およびT7 N-グリコシル化部位での相対的存在量として報告された、S1G2Fグリコフォームに関する液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)の結果の平均を提示している。図4Fは、アバタセプト分子上のT5およびT7 N-グリコシル化部位での相対的存在量として報告された、S2G2Fグリコフォームに関する液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)の結果の平均を提

30

40

50

示している。図 4 G は、アバタセプト分子上の T 5 および T 7 N-グリコシル化部位での相対的存在量として報告された、S 1 G 3 F グリコフォームに関する液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) の結果の平均を提示している。図 4 H は、アバタセプト分子上の T 5 および T 7 N-グリコシル化部位での相対的存在量として報告された、S 2 G 4 F グリコフォームに関する LC-MS 結果の平均を示している。

【実施例 2】

【0238】

C T L A 4 - I g 工程の生産用バイオリアクターステップの収集前 N-グリコフォーム分布に対する細胞齢の影響

低くした温度設定値でのアバタセプト製造工程における工程および品質属性に対する接種物の世代数の影響を把握するために、バイオリアクターに接種する細胞の世代の総数について不適合境界を検討した。すべての条件を 5 L バイオリアクターにおいて二重反復試験として検討した。細胞バイアルを解凍し、継代して、増大させ、最終的に継代回数 5、10、15、および 21 でバンクとした。このバイオリアクター試験を開始する前に、細胞バンクバイアルを解凍して、6 世代にわたって増大させて、最大 3 L の段階とした。各 3 L フラスコを使用して、個々の n-2 シードバイオリアクターに接種し、次いでそれを n-1 シードバイオリアクターにまとめた。各 n-1 シードバイオリアクターを使用して、2 つずつの 5 L 生産用バイオリアクターを接種した。

10

【0239】

V C D、生存率、p H、D O、栄養分および代謝産物のレベルを含む細胞培養物の成績を毎日モニターした。力価およびシアル酸含有量を第 10 ~ 16 日に毎日測定し、分析した。高分子量種 (H M W)、残存 D N A、宿主細胞タンパク質 (H C P) および N 結合型グリコシル化を、第 16 日に測定した (図 5)。グリコフォーム分布を、第 16 日に L C / M C によって測定した (図 5)。

20

【実施例 3】

【0240】

生産用バイオリアクターの温度範囲

生産用バイオリアクターのステップにおいて許容し得る温度範囲を評価するために、工程成績および工程品質に対するバイオリアクター接種生細胞密度 (V C D)、p H シフト設定値、P C O₂ シフト設定値、第 1 の温度設定値、第 2 の温度設定値および第 3 の温度設定値の影響を分析した。工程パラメーターおよび特徴付けの範囲を図 6 A に示す。生産用バイオリアクターの特徴付けは、5 L の S a r t o r i u s および F i n e s s e 容器およびコントローラーを使用して行った。生産用バイオリアクターのステップの運転条件は、図 6 A に示す 6 つの実験範囲を除き、表 X に従った。評価した工程パラメーターに関する設定値または中間点は、表 Y に示されるように、2 つの対照を含む 22 の処置間で変化した。反復試験は、対照、センターポイント条件のみについて稼働させた。

30

【0241】

40

50

【表 4】

表 X. 5L 生産用バイオリアクターのセンターポイント運転パラメーター

パラメーター	設定値	Range
接種生細胞密度 (10 ⁶ 個/mL)	0.3	0.15-0.45
最初の温度 (°C)	36	35-37
最初の pH	7.0	6.9-7.1
最初の作業容量 (L)	2.5	2.4-2.6
pH シフト設定値	6.9	6.8-7.0
pH シフトのタイミング (時間)	96	72-100
第 1 の温度シフト設定値 (°C)	33	32-34
温度シフト設定値のタイミング (時間)	144	120-168
第 2 の温度シフト設定値 (°C)	31	30-32
第 2 の温度シフト設定値のタイミング (時間)	240	228-252

10

【 0 2 4 2 】

【表 5】

表 Y. 容器 ID 別の生産用バイオリアクター条件

20

バイオリアクター ID	接種 VCD (×10 ⁶ 個/mL)	pHシフト設定値	pCO ₂ シフト設定値	第1の温度設定値 (°C)	第2の温度設定値 (°C)	第3の温度設定値 (°C)
180608-01	0.2	6.8	11.2	35	32	30
180608-02	0.5	7.1	22.4	37	32	31
180609-03	0.5	7.1	11.2	37	34	32
180608-04	0.2	7.1	22.4	35	32	30
180608-05	0.2	6.9	11.2	35	34	32
180608-11	0.2	6.8	22.4	36	32	32
180609-12	0.5	6.8	22.4	37	34	32
180608-14	0.2	7.1	16.8	36	33	31
180608-15	0.2	6.8	11.2	36	34	30
180608-16	0.2	7	11.2	37	32	31
180608-21	0.2	6.8	22.4	37	33	32
180608-22	0.2	7.1	22.4	37	34	30
180608-24	0.3	6.9	16.8	36	33	31
180608-31	0.5	6.9	22.4	35	32	32
180608-32	0.5	6.8	11.2	37	32	30
180608-33	0.3	6.9	22.4	37	32	30
180608-34	0.3	7.1	22.4	35	34	31
180608-36	0.3	6.9	16.8	36	33	31
180609-404	0.4	7.1	11.2	36	32	32
180608-405	0.5	6.9	22.4	35	32	32
180608-406	0.5	7.1	11.2	35	33	30
180609-407	0.5	6.8	11.2	35	34	31
180609-408	0.5	7	16.8	36	33	31

30

40

【 0 2 4 3 】

工程パラメーターの有意な主な効果の概要を図 7 に示す。工程パラメーターの相互作用および二次効果は、工程成績および産物品質について統計的に有意であることが見出された。試験デザインに含めたすべての二次効果が、工程属性または品質属性のいずれかに影響を及ぼした。以下のパラメーター相互作用は、工程属性または品質属性のいずれかに影響を及ぼすと判断された：接種 V C D × 第 1 の温度設定値、接種 V C D × 第 3 の温度設定

50

値、接種 V C D × 第 2 の温度設定値、第 2 の温度設定値 × p C O₂ 設定値、第 2 の温度設定値 × p H シフト設定値、および第 3 の温度シフト設定値 × p H シフト設定値。

【実施例 4】

【0244】

C T L A 4 - I g を発現する浮遊哺乳動物細胞の工業規模での培養

本実施例は、C T L A 4 - I g 分子の生産を記載する。本実施例に記載される方法は、サイトカインおよび他のホルモンなどの分泌タンパク質、I g スーパーファミリーのメンバーであるかまたは I g スーパーファミリータンパク質の一部を含む分泌タンパク質、および一般に C H O 細胞で発現される任意のタンパク質を含むがこれらに限定されない、他のタンパク質の生産のために適応させ、拡張することができる。

10

【0245】

25, 000 L バイオリアクターに接種するのに十分な数の生細胞を得るために、凍結バイアルから細胞を連続的に増殖させるための C T L A 4 - I g 培養工程の接種物増大ステップのために、培養フラスコ（例えば、振盪フラスコおよび三角フラスコ、回転瓶、および細胞バッグを使用した。

【0246】

C T L A 4 - I g の工業規模生産：2 段階温度シフトを有する培養稼働を伴う、25, 000 L の生産用バイオリアクターにおいて行われる本開示の生産期により、大量および高品質の両方を有する C T L A 4 - I g タンパク質が生産される。バイオリアクターには、誘導のおよそ 76 時間後に供給培地が補充され、この供給は生産用リアクターに対して毎日行われる。25, 000 L の培養物を、誘導からおよそ 144 時間後まで、36°C の C D - C H O 培地中でインキュベートし、次いで約 144 時間後（対数増殖期の最後）に、36°C から 33°C への温度シフト（T-シフト）に供する。33°C の温度を約 144 時間から約 240 時間にわたり維持する。次いで、25, 000 L の培養物を、誘導から約 240 時間後に、33°C から 31°C への第 2 および最後の温度シフト（T-シフト）に約 240 時間の時点まで供して、収集する。

20

【0247】

試料を、分析のために生産用バイオリアクターから毎日収集した。例えば、細胞計数のために使用する試料は、トリパンブルー（S i g m a , S t . L o u i s , M o .）で染色した。細胞数および細胞生存率の決定は、顕微鏡下で染色された生存細胞を計数するために血球計数器を使用して行った。代謝産物の分析のためには、さらなる試料アリコート

30

を 2000 r p m（4 C）で 20 分間遠心処理して、細胞をペレット化した。当技術分野で従来より実施されている手法およびプロトコルを使用して、上清を、タンパク質力価、シアル酸、グルコース、乳酸、グルタミン、グルタミン酸、p H、p O₂、p C O₂、アンモニア、および L D H について分析した。

【実施例 5】

【0248】

25, 000 L バイオリアクター内で生産された C T L A 4 - I g のグリコシル化分析

画像化キャピラリー等電点電気泳動（i C I E F）を行って、グリカン含有量を分析した。この方法は、タンパク質をそれらの等電点（p I）によって分離するために使用される。この方法では、アバタセプト試料を水、メチルセルロース、両性電解質、および p I マーカーで約 1 m g / m L の最終濃度に調製し、次いでオートサンプラーによって画像化キャピラリー等電点電気泳動システム（i C I E F）に注入する。電気泳動では、アイソフォームの電荷変動に基づき、フルオロカーボン（F C）でコーティングされたキャピラリー内の p H 勾配を通じて試料を分離する。高電圧フォーカシングの後に、試料の移動を全カラム C C D カメラによって捕捉し、ピークの定量分析を関連ソフトウェアを使用して行う。結果は、試料中に存在する総グリコフォームの割合として報告され、図 8 A ~ 8 B および 9 A ~ 9 B に見ることができる。

40

【0249】

25, 000 L バイオリアクター内で生産された C T L A 4 - I g のグリコシル化ドメイ

50

ン分析

アバタセプトのN結合型オリゴ糖プロファイル（グリコシル化パターン）を決定する。PNGアアーゼFを用いる酵素加水分解によって、アバタセプト上のオリゴ糖を遊離させる。遊離オリゴ糖のプロファイルを、電気化学的検出を使用する高速アニオン交換クロマトグラフィー（HPAEC）によって決定する。同時に稼働させた参照材料の試料に対して、原薬のオリゴ糖プロファイルを評価する。結果は、選択されたドメインの絶対面積百分率、または選択されたドメインの、参照標準物質中の同じドメインからの偏差百分率のいずれかとして報告される。ドメインI、II、III、およびVI+Vの結果は、図10A～10Dに見ることができる。シアル酸分析（NANAおよびNGNA）の結果は、図10Eおよび10Fに見ることができる。

10

【実施例6】

【0250】

アバタセプトのインビボ有効性

参照工程（例えば、PCT/US2006/049074に記載された工程F）および本明細書に記載された工程（例えば、工程J）によって調製されたアバタセプトの薬物動態を比較するために、臨床試験を実施した。この臨床試験は、本明細書に記載された工程および参照工程によって製造されたアバタセプトの、健康参加者における単回投与（30分間のIV注入として750mgを投与）後の薬物動態（PK）を比較するために実施された非盲検ランダム化並行群間単回投与試験であった。

【0251】

20

臨床PK試験の結果から、アバタセプトのN-グリカン組成の管理の必要性が実証された。N-グリカン組成は、HILIC N結合型グリカンプロファイリング法によって決定した。この方法は、PKに影響を及ぼすCTLA4領域上の主要な二分岐グリコフォームの総和を定量するために設計された。

【0252】

臨床試験により、CTLA4 G2F、S1G2F、およびS2G2Fグリコフォームが全体的な管理戦略およびPKに対して最も影響を及ぼすことが実証され、このため、これらのグリカンに対して両側限界値を提案した（表3）。CTLA4 G2Fは、PK除去と強い相関があるため、アバタセプトの重要な品質属性である。S1G2FはPKに対する影響が最小限であり、製造の一貫性のために両側限界値が適用された。S2G2Fは、製造工程および除去のいずれにおいてもG2Fと強い相関があるため、両側限界値が適用された。G0F、G1FおよびS1G1Fは、全体的な除去への影響を無視し得るため、片側限界値が提案された。さらなる根拠を表3に示している。表3のすべてのグリカンに対して提案された限界値により、許容されるPKパラメーター内でのグリカンの管理が保証された。1つの属性の不首尾により、臨床および製造経験との一貫性を維持するためにバッチが却下された。

30

【0253】

40

50

【表 6】

表 3.

グリカン	至適範囲	根拠
G0F	$\leq 6.5\%$	改訂された限度値は、工程 F および J の臨床および製造経験に基づいており、これには追加の工程 J の製造経験も含まれる。
G1F	$\leq 7.0\%$	改訂された限度値は、工程 F および J の臨床および製造経験に基づいており、これには追加の工程 J の製造経験も含まれる。
G2F	1.5% - 23%	G2F は迅速に除去されるグリカンであり、PK の結果と相関する。改訂された限度値は、工程 F および J の臨床および製造経験に基づいており、これには追加の工程 J の製造経験も含まれる。
S1G1F	$\leq 12.5\%$	改訂された限度値は、工程 F および J の臨床および製造経験に基づいており、これには追加の工程 J の製造経験も含まれる。
S1G2F	32.0% - 49.0%	S1G2F は除去が緩徐であり、PK の結果と相関しない。改訂された限度値は、工程 F および J の臨床および製造経験に基づいており、これには追加の工程 J の製造経験も含まれる。
S2G2F	14.0% - 48.5%	S2G2F は緩徐に除去されるグリカンであり、PK の結果と相関する。改訂された限度値は、工程 F および J の臨床および製造経験に基づいており、これには追加の工程 J の製造経験も含まれる。

10

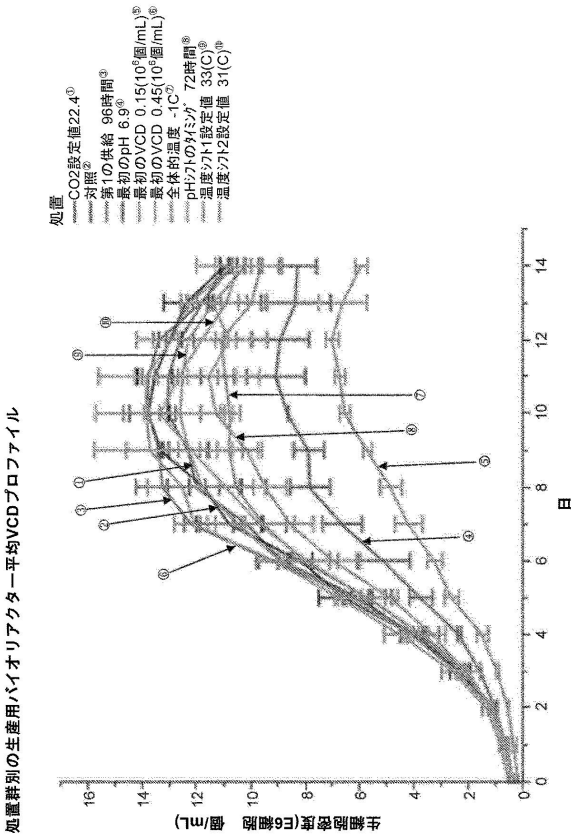
20

30

40

50

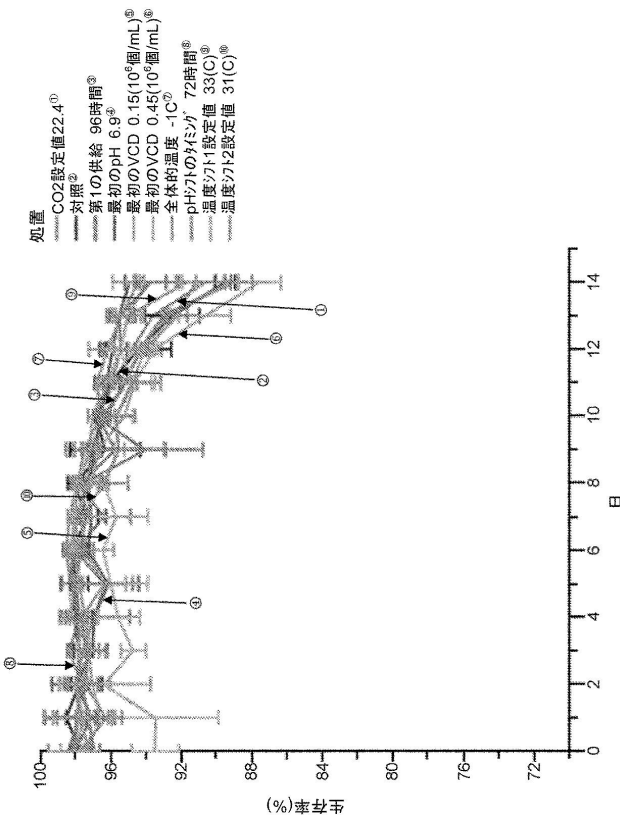
【図 2 A】



【図 2 B】

処置	平均ピーク VCD(10 ⁶ 個/ mL)	ピークVCD Dunnett検定 p値	0~5日平 均増加時 間(時間)	増加時間 Dunnett 検定p値	0~14日平均 IVCD(10 ⁶ 個 ・日/mL)	IVCD Dunnett 検定p値	VCD ⁷ b774 値
対照	13.8	N/A	34.8	N/A	0.11	N/A	N/A
高CO ₂	13.4	1.00	33.6	0.97	0.11	1.00	0.43
遅い第1の供給	14.0	1.00	33.3	0.85	0.12	1.00	0.58
低い最初のpH	9.2	<0.01	41.1	0.01	0.07	<0.01	0.02
低い最初のVCD	7.0	<0.01	34.8	0.95	0.05	<0.01	<0.01
高い最初のVCD	14.5	0.98	37.7	0.80	0.12	1.00	0.52
低い全体的温度	11.2	0.12	35.1	1.00	0.10	0.30	0.08
早いpHシフト	11.7	0.27	37.2	0.83	0.10	0.22	0.04
低い温度シフト1	12.9	0.93	33.0	1.00	0.11	0.98	0.41
低い温度シフト2	13.3	1.00	36.3	0.98	0.11	0.90	0.62

【図 3】



【図 4 A】

第14日のシリアル酸およびUN結合型ドメインの結果の統計的比較											
処置	平均第1 4日NAN A(MR)	NANA Dunnett 検定p値	平均第14 日NANA MR	NGNA Dunnett 検定p値	平均第1 4日ド ミドミ ン(MR)	ドミ ンDunnett 検定p値	平均第14 日ドミ ン(MR)	ドミ ンDunnett 検定p値	平均第14 日ドミ ンV+V(MR)	ドミ ンV+V(MR) Dunnett 検定p値	平均第14 日ドミ ンV+V Dunnett 検定p値
対照	8.50	N/A	8.55	N/A	33.45	N/A	35.5	N/A	11.40	N/A	N/A
高CO ₂	8.70	0.86	0.75	0.87	34.30	0.97	30.60	0.70	24.9	1.00	10.25
遅い最初の 供給	8.70	0.86	0.70	0.55	33.05	1.00	29.60	1.00	26.45	0.97	10.90
低い最初の pH	8.60	1.00	0.90	1.00	31.55	0.49	30.35	0.90	27.80	0.39	10.35
低い最初の VCD	8.70	0.86	1.15	0.06	30.45	0.13	29.75	1.00	28.45	0.19	11.40
高い最初の VCD	8.40	1.00	0.85	1.00	34.75	0.81	30.65	0.65	24.20	0.87	10.35
低い全体的 温度	8.30	0.86	0.80	1.00	33.55	1.00	30.05	1.00	26.85	0.85	9.55
早いpHの タイミング	8.75	0.70	0.90	1.00	31.70	0.57	30.20	0.97	27.10	0.73	11.00
低い温度 シフト1	8.60	1.00	0.75	0.87	33.35	1.00	31.05	0.33	25.95	1.00	9.60
低い温度 シフト2	8.35	0.96	0.75	0.87	34.00	1.00	30.80	0.52	24.85	1.00	10.35

【図 4 B】

処置群と対照群との間の第14日力価および比生産性の統計的比較

処置	I5				I7			
	G2F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値	G2F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値
対照	11.2	N/A	N/A	N/A	17.6	N/A	N/A	N/A
高いpCO2 シフト	9.7	-13.3	0.72	0.82	14.9	-15.3	0.82	0.98
遅い最初の 供給	9.3	-18.1	0.51	0.65	14.3	-19.0	0.65	0.99
低い最初の pH	7.0	-38.5	0.03	0.06	10.2	-42.3	0.06	0.03
低い最初の VCD	5.1	-54.9	<0.01	0.01	8.1	-54.0	0.01	0.59
高い最初の VCD	11.6	1.8	1.00	0.99	19.1	8.2	0.99	0.57
低い全体的 温度	7.2	-36.7	0.04	0.07	10.5	-40.6	0.07	0.76
早いpH シフト	8.1	-28.8	0.12	0.17	11.8	-33.0	0.17	0.04
低い温度 シフト1	8.7	-23.5	0.26	0.36	13.1	-25.9	0.36	0.22
低い温度 シフト2	10.2	-8.4	0.94	0.98	15.9	-9.7	0.98	0.97

処置群と対照群との間の第14日力価および比生産性の統計的比較

処置	I5				I7			
	G2F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値	G2F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値
対照	1.57	<0.01	<0.01	<0.01	39.4	<0.01	<0.01	<0.01
高い最初のVCD	3.30	0.93	0.93	0.93	29.0	0.93	0.93	0.93
低い全体的 温度	2.87	0.02	0.02	0.02	38.5	0.02	0.02	0.02
早いpHシフトの タイミン	3.38	1.00	1.00	1.00	45.8	1.00	1.00	1.00
低い温度シフト1	3.48	1.00	1.00	1.00	42.0	1.00	1.00	1.00
低い温度シフト2	3.03	0.10	0.10	0.10	31.6	0.10	0.10	0.10

【図 4 C】

第14日の収集前試料におけるG0F(P2100)グリコフォームの相対的存在量

処置群	I5				I7			
	G0F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値	G0F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値
対照	6.1	N/A	N/A	N/A	5.2	N/A	N/A	N/A
高いpCO2 シフト	6.3	3.3	1.00	1.00	5.2	0.0	1.00	1.00
遅い最初の 供給	6.6	8.2	0.81	0.81	5.7	9.7	0.80	0.80
低い最初の pH	5.0	-18.9	0.12	0.12	4.1	-20.4	0.16	0.16
低い最初の VCD	4.7	-23.0	0.05	0.05	4.1	-21.4	0.14	0.14
高い最初の VCD	7.1	16.4	0.21	0.21	6.2	20.4	0.16	0.16
低い全体的 温度	6.0	-2.5	1.00	1.00	5.1	-1.0	1.00	1.00
早いpH シフト	5.4	-11.5	0.53	0.53	4.4	-15.5	0.38	0.38
低い温度 シフト1	5.9	-3.3	1.00	1.00	4.9	-5.8	0.98	0.98
低い温度 シフト2	5.8	-4.9	0.98	0.98	4.9	-4.9	0.99	0.99

【図 4 D】

第14日の収集試料におけるG2F(P2120)グリコフォームの相対的存在量

処置群	I5				I7			
	G2F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値	G2F平均相 対的存在量 (%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値
対照	11.2	N/A	N/A	N/A	17.6	N/A	N/A	N/A
高いpCO2 シフト	9.7	-13.3	0.72	0.82	14.9	-15.3	0.82	0.98
遅い最初の 供給	9.3	-18.1	0.51	0.65	14.3	-19.0	0.65	0.99
低い最初の pH	7.0	-38.5	0.03	0.06	10.2	-42.3	0.06	0.03
低い最初の VCD	5.1	-54.9	<0.01	0.01	8.1	-54.0	0.01	0.59
高い最初の VCD	11.6	1.8	1.00	0.99	19.1	8.2	0.99	0.57
低い全体的 温度	7.2	-36.7	0.04	0.07	10.5	-40.6	0.07	0.76
早いpH シフト	8.1	-28.8	0.12	0.17	11.8	-33.0	0.17	0.04
低い温度 シフト1	8.7	-23.5	0.26	0.36	13.1	-25.9	0.36	0.22
低い温度 シフト2	10.2	-8.4	0.94	0.98	15.9	-9.7	0.98	0.97

【図 4 E】

第14日の収集試料におけるS1G2F(P2121)グリコフォームの相対的存在量

処置群	I5				I7			
	S1G2F平均 相対的存在 量(%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値	S1G2F平均 相対的存在 量(%)	対照から の差異率 (%)	対照 Dunnet 検定p値	対照 Dunnet 検定p値
対照	33.2	N/A	N/A	N/A	36.5	N/A	N/A	N/A
高いpCO2 シフト	33.2	0	1.00	1.00	36.1	-1.1	1.00	1.00
遅い最初の 供給	33.7	1.4	1.00	1.00	36.5	0	1.00	1.00
低い最初の pH	37.7	13.4	<0.01	0.99	36.1	-1.2	0.99	0.99
低い最初の VCD	39.9	20.0	<0.01	0.06	34.2	-6.4	0.06	0.06
高い最初の VCD	31.9	-4.1	0.57	0.67	35.5	-2.9	0.67	0.67
低い全体的 温度	37.0	11.3	<0.01	0.86	35.7	-2.2	0.86	0.86
早いpH シフト	36.0	8.13	0.54	0.92	37.2	1.9	0.92	0.92
低い温度 シフト1	34.5	3.9	0.60	1.00	36.7	0.4	1.00	1.00
低い温度 シフト2	34.4	3.6	0.71	1.00	36.2	-0.8	1.00	1.00

【図 4 F】

第14日の収集試料におけるS2G2F(P2122)グリコフォームの相対的存在量						
処置群	T5			T7		
	S2G2F平均相対的存在量(%)	対照からの差異率(%)	対照 Dunnett検定p値	S2G2F平均相対的存在量(%)	対照からの差異率(%)	対照 Dunnett検定p値
対照	14.7	N/A	N/A	20.1	N/A	N/A
高いpCO2シフト	15.1	3.1	1.00	23.1	15.2	0.79
遅い最初の供給	15.3	4.1	1.00	22.8	13.5	0.86
低い最初のpH	17.7	20.5	0.11	29.0	44.6	0.03
低い最初のVCD	18.9	29.0	0.02	32.8	63.3	<0.01
高い最初のVCD	13.2	-9.9	0.71	17.7	-11.7	0.92
低い全体的温度	16.3	10.9	0.62	28.3	40.9	0.05
早いpHシフト	16.4	11.9	0.54	26.8	33.4	0.13
低い温度シフト1	16.0	9.2	0.77	25.0	24.7	0.35
低い温度シフト2	15.5	5.8	0.97	21.9	9.2	0.98

【図 4 G】

第14日の収集試料におけるS1G3F(P3131)グリコフォームの相対的存在量						
処置群	T5			T7		
	S1G3F平均相対的存在量(%)	対照からの差異率(%)	対照 Dunnett検定p値	S1G3F平均相対的存在量(%)	対照からの差異率(%)	対照 Dunnett検定p値
対照	5.2	N/A	N/A	2.4	N/A	N/A
高いpCO2シフト	4.5	-12.6	0.71	2.0	-14.9	0.84
遅い最初の供給	4.5	-12.6	0.71	2.0	-14.9	0.84
低い最初のpH	3.6	-31.1	0.05	1.4	-40.4	0.07
低い最初のVCD	3.4	-35.0	0.025	1.2	-51.1	0.02
高い最初のVCD	5.3	2.9	1.00	2.7	12.8	0.91
低い全体的温度	3.4	-34.0	0.03	1.4	-42.6	0.06
早いpHシフト	4.0	-23.3	0.17	1.6	-31.9	0.19
低い温度シフト1	4.1	-20.4	0.27	1.9	-21.3	0.54
低い温度シフト2	4.8	-7.8	0.96	2.1	-12.8	0.91

【図 4 H】

第14日の収集試料におけるT5 S2G4F(P4142)グリコフォームの相対的存在量				
処置	T5 S2G4F平均相対的存在量(%)		対照 Dunnett検定p値	
	T5 S2G4F平均相対的存在量(%)	対照からの差異率(%)	対照 Dunnett検定p値	
対照	1.7	N/A	N/A	
高いpCO2シフト	1.6	-5.9	0.98	
遅い最初の供給	1.6	-5.9	0.98	

第14日の収集試料におけるT5 S2G4F(P4142)グリコフォームの相対的存在量				
処置	T5 S2G4F平均相対的存在量(%)		対照 Dunnett検定p値	
	T5 S2G4F平均相対的存在量(%)	対照からの差異率(%)	対照 Dunnett検定p値	
低い最初のpH	1.2	-29.4	0.04	
低い最初のVCD	1.1	-35.3	0.01	
高い最初のVCD	1.7	0.0	1.00	
低い最初の温度	1.2	-32.4	0.02	
早いpHシフト	1.4	-17.6	0.30	
低い温度シフト1	1.6	-8.8	0.88	
低い温度シフト2	1.6	-5.9	0.98	

【図 5】

第16日の収集前のN結合、HMW、HCP、およびrDNA							
条件	N結合				HMW (%)	HCP (x10 ⁵ ng/mL)	rDNA (x10 ⁶ pg/mL)
	ドメインI (%)	ドメインII (%)	ドメインIII (%)	ドメインIV+V (%)			
25世代	30.1±0.4	30.4±0.4	28.1 ^a	11.4±0.1	30.0±0.4	5.0±0.4	8.1±0.5
33世代	35.6±0.3	29.5±0.1	23.7±0.5	11.4±0.1	27.7±0.3	4.0±0.1	3.4±0.4
57世代	39±1	29.9±0.6	21±1	10±0.1	26.7±0.3	3.5±0.1	6±1
77世代	38.0±0.6	29.6±0.2	21.4±0.4	11.2±0.1	25±2	3.4±0.1	5±3 ^b
99世代	39±1	29.5±0.1	20.6±0.1	11.0±0.8	25.6±0.4	3.3 ^a	11.5±0.7

^a 二重反復試験から同一の値が得られた
^b 値は8.4×10⁵および1.0×10⁶pg/mLである

第16日の収集前N結合、HMW、HCP、およびrDNAに対するDunnett検定p値の結果							
条件	p値				HMW	HCP	rDNA
	ドメインI (%)	ドメインII (%)	ドメインIII (%)	ドメインIV+V (%)			
33世代	0.0049	0.1301	0.0014	1.0000	0.9913	0.0009	0.2844
57世代	0.0005	0.4791	0.0001	0.0501	0.3805	0.0011	0.8851
77世代	0.0009	0.1811	0.0002	0.9544	0.0834	0.0009	0.5110
99世代	0.0005	0.1534	0.0001	0.7824	0.0398	0.0007	0.4898

10

20

30

40

50

【図 6 A】

実験デザインに関する工程パラメーターおよび特徴付けの範囲

パラメーター	中点	試験範囲
接種VCD(<10 ⁵ 個/mL)	0.3	0.20-0.50
pHシフト設定値 ^a	6.9	6.8-7.1
pCO ₂ 設定値	16.8	11.2-22.4
第1の温度設定値(°C)	36	35-37
第2の温度設定値(°C)	33	32-34
第3の温度設定値(°C)	31	30-32

^a pHは設定値の±0.02単位以内に制御される

【図 6 C】

生産用バイオリアクター測定された属性値(続き)

属性	バイオリアクターID									
	180608-32	180608-33	180609-34	180609-36	180609-40A	180609-40B	180609-40C	180609-40D	180609-40E	180609-40F
IVCD(10 ⁵ 個・日/mL)	0.05	0.06	0.09	0.13	0.12	0.11	0.12	0.12	0.12	0.14
最終的生存率(%)	66.2	85.7	80.2	85.9	88.3	88.6	79.3	86.7	86.7	N/A
第16日力価(g/L)	0.9	1.6	3.8	4.6	4.8	5.0	4.7	4.2	4.2	4.8
Qp(pg/個・日)	17.5	28.0	43.7	35.4	38.7	43.1	38.0	35.3	35.3	N/A ^c
第10日NANA(MR)	6.8	7.8	8.1	8.8	9	8.3	8.6	8.9	8.9	9.6
第11日NANA(MR)	7.3	8.2	8.3	9.2	8.8	8.1	8.8	8.5	8.5	9.2
第12日NANA(MR)	7.1	7.9	8.3	8.8	8.6	8	8.8	8.5	8.5	9
第13日NANA(MR)	6.6	7.6	8	8.3	8.3	8	8.4	8.2	8.2	8.5
第14日NANA(MR)	6.1	7.4	7.8	8.1	N/A	7.7	7.9	7.8	7.8	7.8
第15日NANA(MR)	5.5	6.9	7.4	7.8	7.4	7.1	7.3	7.5	7.5	7.3
第16日NANA(MR)	5.7	7.1	7.1	7	7.1	6.9	7	7.3	7.3	6.9
第16日NGNA(MR)	0.4	0.8	1.5	1	0.8	1.3	1.1	1	1	1
N結合型 ^d ・イソII(%)	47.2	N/A	35.2	38.1	38.3	36.7	37.6	36.5	36.5	39
N結合型 ^d ・イソIII(%)	27.4	N/A	27.3	30.3	30.6	28.9	29	29.5	29.5	29.4
N結合型 ^d ・イソIV(%)	18.7	N/A	23.8	21.7	21.4	22.6	21.7	23.2	23.2	21.3
N結合型 ^d ・イソIV+V(%)	5.5	N/A	10.3	7.9	7.9	9.3	8.9	8.7	8.7	7.9
HMW (%)	26.7	27	27.7	26.5	24.9	28	27	27.4	27.4	25
DNA (10 ⁶ pg/g) ^a	8.6	1.9	4.4	3.4	4.3	4.5	4.2	3.5	3.5	3.7
DNA (10 ⁶ pg/g) ^a	7.15	2.13	1.20	1.22	2.06	1.02	1.75	1.00	1.00	1.76

^a 不純物の絶対濃度を力価により除算

(85)

JP 2023-537760 A 2023.9.5

【図 6 B】

生産用バイオリアクター測定された属性値

属性	バイオリアクターID															
	130608-401	130608-402	130608-403	130608-404	130608-405	130608-406	130608-407	130608-408	130608-409	130608-410	130608-411	130608-412	130608-413	130608-414	130608-415	130608-416
IVCD(10 ⁵ 個・日/mL)	0.03	0.15	0.14	0.04	0.05	0.02	0.08	0.09	0.04	0.06	0.04	0.04	0.10	0.10	0.14	0.11
最終的生存率(%)	81.9	73.8	81.0	82.1	88.9	83.8	69.0	82.0	85.3	88.5	79.2	90.1	83.2	86.8	86.8	86.8
第16日力価(g/L)	0.6	4.5	4.2	1.8	1.7	1.0	2.6	3.8	1.0	1.7	1.1	3.7	4.7	4.1	4.1	4.1
Qp(pg/個・日)	22.4	28.8	31.3	33.8	33.0	26.1	30.8	42.7	24.1	30.6	28.2	35.8	33.6	38.6	38.6	38.6
第10日NANA(MR)	7.4	8.8	9.8	7.3	7.8	7.5	8.5	8	7.4	7.7	7.3	8.8	9.1	8.4	8.4	8.4
第11日NANA(MR)	7.5	9.5	9	7.5	8	7.6	8.4	8.2	8.1	8.3	7.7	8.9	8.8	8.3	8.3	8.3
第12日NANA(MR)	7.5	9.1	8.7	7.2	7.8	7.7	8.1	8.2	8	7.8	7.7	8.9	8.8	8.1	8.1	8.1
第13日NANA(MR)	7.1	8.4	8.3	7.1	7.9	7.7	7.7	7.9	7.8	7.7	7.5	8.7	8.5	7.6	7.6	7.6
第14日NANA(MR)	6.6	7.8	7.8	6.8	7.6	7.3	7.3	7.5	7.6	7.5	7.2	8.2	7.7	7.4	7.4	7.4
第15日NANA(MR)	6.3	7.3	7.7	6.7	7.3	6.9	6.7	7	6.9	6.9	6.7	7.9	7.3	6.9	6.9	6.9
第16日NANA(MR)	6.5	7.1	7.8	6.8	7.2	6.9	6.5	7.1	7.1	7.2	6.8	7.6	6.5	6.9	6.9	6.9
第16日NGNA(MR)	0.6	0.8	1.2	1.3	1.4	0.6	0.7	1.5	0.7	0.9	0.6	1.2	1	1	1	1
N結合型 ^d ・イソII(%)	39.4	41.3	34.6	37.5	34.6	38	39.9	36.1	37.2	38	38.8	35.5	40.2	38.7	38.7	38.7
N結合型 ^d ・イソIII(%)	27.6	29.4	29.2	28.1	27.6	28.3	30.2	27.1	28.8	29.4	29.5	28.3	29.4	29.7	29.7	29.7
N結合型 ^d ・イソIV(%)	22.8	19.5	22.7	23	24.2	23.8	21	23.4	23.5	22.7	2.7	23.3	20.2	21.7	21.7	21.7
N結合型 ^d ・イソIV+V(%)	8.5	7.6	10.4	9	10.3	7.6	7.2	10.4	8.5	7.6	7.2	10	8.1	7.8	7.8	7.8
HMW (%)	26.7	23.9	20.9	27.8	24.1	25.7	26.2	28.4	25.5	26	26.4	28	26.8	27.6	27.6	27.6
HCP (10 ⁶ ppm) ^a	8.5	4	5	2.4	2.1	1.2	2.2	4	1.1	2.4	1.1	3.9	3.5	3.5	3.5	3.5
DNA (10 ⁶ pg/g) ^a	3.31	3.82	4.49	1.17	1.48	2.72	2.97	1.40	1.68	1.39	2.90	1.02	1.50	0.86	0.86	0.86

^a 不純物の絶対濃度を力価により除算

10

20

【図 7】

有意な主な効果の概要

工程/パラメーター	工程属性	応答	品質属性
接種VCD(10 ⁵ 個/mL)	pVCD、第16日力価、DNA	第8~14日NANA、第16日HCP、第16日DNA、T5、P2120、T5、P3131、T7、P2120、T7、P3131	
pHシフト設定値	D5増殖速度、pVCD、第16日力価、Qp	第13~16日NANA、第16日NGNA、DNA、T5、P3131、T7、P2122、T7、P3131、N結合型 ^d ・イソIVおよびIV+V	
pCO ₂ 設定値	HMW、DNA		N/A
第1の温度設定値(°C)	第16日力価、Qp、HMW、DNA	第11~12日および第16日NANA、第16日NGNA	
第2の温度設定値(°C)	DNA、第13~16日NANA、第16日NGNA	N結合型 ^d ・イソIV	
第3の温度設定値(°C)	第16日力価、HMW	第8日NANA、第12日NANA、第8~12日NGNA	

30

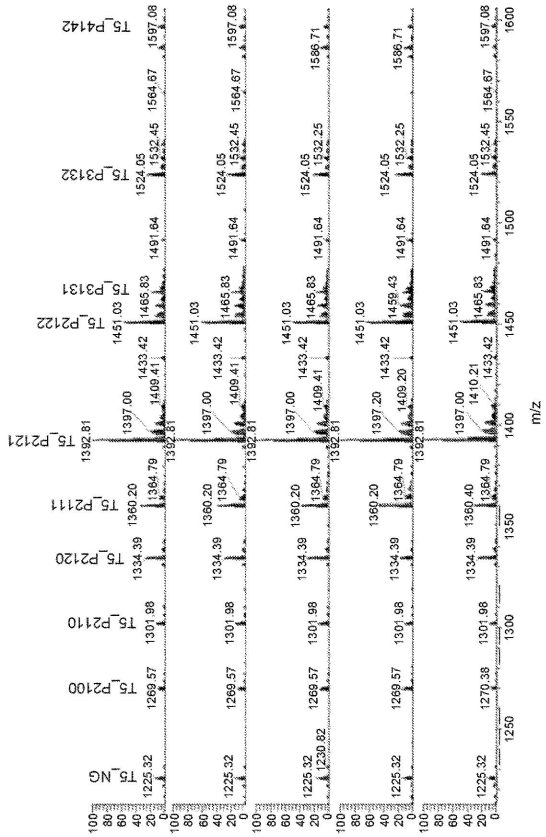
40

50

【図 8 A】

工程	試料	TS_P2100	TS_P2110	TS_P2120	TS_P2111	TS_P2121	TS_P2122	TS_P3131	TS_P3132	TS_P4142	TS_NG
F	551125	6.6	4.6	7.8	14.0	32.3	17.9	4.5	6.5	1.6	4.2
F	554326	6.4	4.1	6.3	15.1	31.3	20.0	4.0	6.9	1.6	4.1
F	554329	6.6	4.0	6.7	13.6	31.8	20.0	4.2	7.0	1.7	4.4
F	AAV2291	5.9	5.3	10.5	12.6	33.0	15.3	4.9	6.2	1.7	4.5
F	AAV2316	4.9	5.1	10.6	11.9	34.5	15.5	5.2	6.2	1.7	4.5
F	AAV2805	5.1	5.1	10.6	12.6	33.1	15.4	5.4	6.0	1.8	4.8
J	AAV7512	4.4	4.4	9.5	10.8	33.1	18.1	5.6	7.7	2.3	4.2
J	AAZ4611	5.2	3.7	7.2	10.4	35.1	21.8	4.4	7.0	1.9	5.2
J	AAZ7138	4.6	5.1	9.8	11.8	31.6	18.1	5.4	7.5	2.3	3.8
J	AAZ9651	4.0	4.9	9.7	10.8	33.3	18.5	5.5	7.1	2.4	3.7
J	ABA0706	3.2	4.3	7.2	11.8	32.7	22.9	4.4	7.7	2.1	3.7
J	ABA2568	4.4	4.4	7.8	11.1	32.6	21.2	4.6	7.5	2.3	4.1
F	RM1	3.7	4.1	10.4	11.4	36.5	16.3	5.3	6.1	1.4	4.9
F	RM2	3.2	4.0	9.7	11.1	34.8	18.3	5.5	6.9	2.1	4.4
F	範囲	3.2~6.6	4.0~5.3	6.3~10.6	11.1~15.1	31.3~36.5	15.4~20.0	4.0~5.5	6.0~7.0	1.4~2.1	4.1~4.9
F	範囲	3.2~4.6	3.7~5.1	7.2~9.8	10.4~11.8	31.6~35.1	18.1~22.9	4.4~5.6	7.0~7.7	1.9~2.4	3.7~5.2

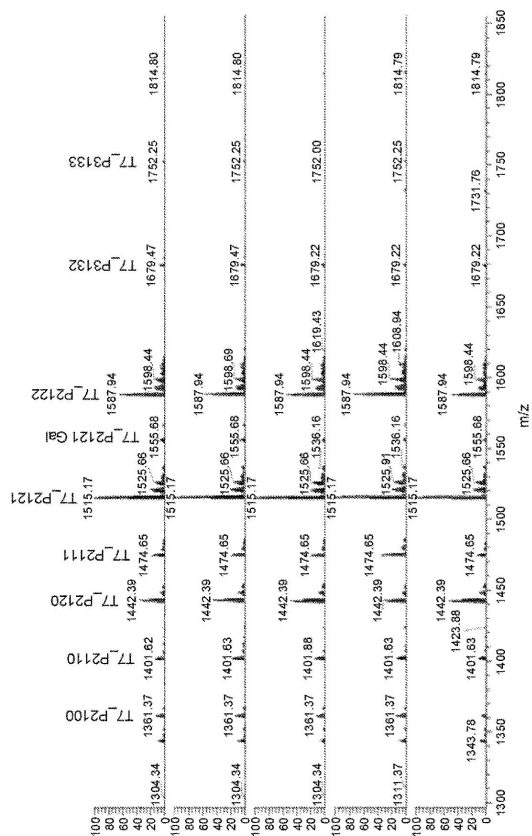
【圖 8 B】



【図 9 A】

工程	材料	T7_P2100	T7_P2101	T7_P2120	T7_P3111	T7_P3121	T7_P3122	T7_P3131	T7_P3132	T7_P3133	T7_P3121	Gal	T7_P3120	Gal	T7_P3125
F	551125	5.5	3.5	10.0	10.3	37.3	29.0	1.2	2.1	1.1	1.5	1.5	0.5	0.0	0.0
F	554526	3.4	3.3	9.0	11.3	55.3	31.0	1.2	2.3	1.4	1.5	0.4	0.0	0.0	0.0
F	554529	3.5	2.9	8.0	10.5	55.2	32.6	1.1	2.3	1.5	1.8	0.5	0.0	0.0	0.0
F	AAV2291	3.4	4.0	15.1	7.1	59.1	24.3	1.5	2.2	0.9	1.5	0.8	0.0	0.0	0.0
F	AAV2516	2.7	3.9	18.0	6.2	40.3	21.5	1.9	2.2	0.8	1.5	0.9	0.0	0.0	0.0
F	AAV2805	2.8	4.2	9.8	6.4	59.9	30.8	1.6	2.3	0.7	1.4	0.9	0.0	0.0	0.0
F	AAV7512	3.5	3.6	11.2	6.0	37.7	27.2	2.0	3.4	1.6	2.6	1.0	0.1	0.0	0.1
F	AAZ7611	2.1	2.7	8.2	5.3	35.9	33.8	1.4	2.7	1.8	4.7	1.1	0.2	1.1	0.2
F	AAZ7138	4.0	4.9	13.9	6.6	66.5	23.5	2.2	3.3	1.6	2.3	1.2	0.1	0.1	0.1
F	AAZ9551	3.4	4.9	14.1	9.6	37.0	23.2	2.2	3.1	1.5	2.7	1.3	0.1	0.1	0.1
F	ABA0706	2.5	3.8	10.1	6.3	36.4	30.2	1.7	3.1	2.0	2.8	1.0	0.1	0.1	0.1
F	ABA2568	4.0	5.0	12.4	7.1	34.2	25.9	1.9	3.1	1.8	3.1	1.4	0.1	0.1	0.1
F	RM1	1.8	2.9	17.8	4.9	42.3	23.4	1.8	2.2	0.6	1.5	0.8	0.0	0.0	0.0
F	RM2	1.9	3.0	18.0	4.9	40.4	23.8	1.9	2.6	1.0	1.6	0.9	0.0	0.0	0.0
F	範圍	1.8~3.3	2.9~4.2	8.0~18.6	4.9~11.3	35.2~42.3	20.8~32.6	1.1~1.9	2.1~2.6	0.6~1.5	1.4~1.8	0.4~0.9	0.0~0.0	0.0~0.0	0.0~0.0
F	範圍	2.1~4.0	2.7~5.0	8.2~14.1	5.3~7.1	34.2~37.7	23.2~33.8	1.4~2.2	2.7~3.4	1.5~2.0	2.2~4.7	1.0~1.4	0.1~0.2	0.1~0.2	0.1~0.2

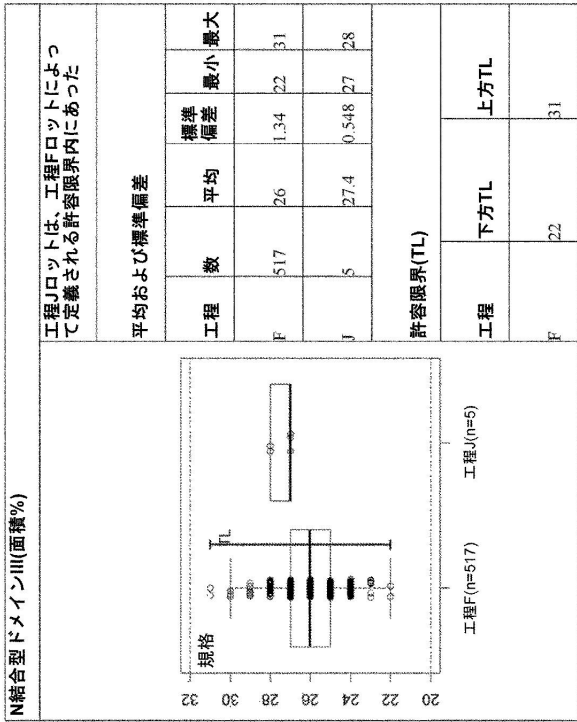
【図 9 B】



量存在對的的カンの分岐上のチンペ糖T7

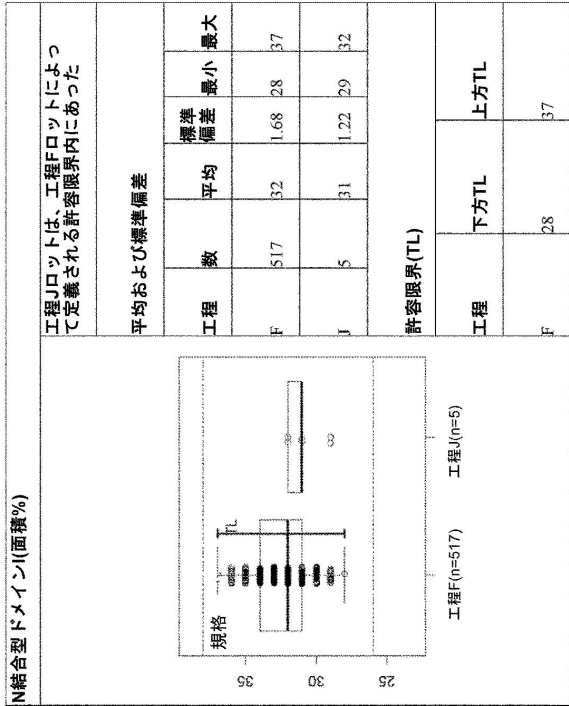
工程Fおよび工程JのロットからのN結合型ドメインIII検定結果の統計的比較

【図 1 0 C】



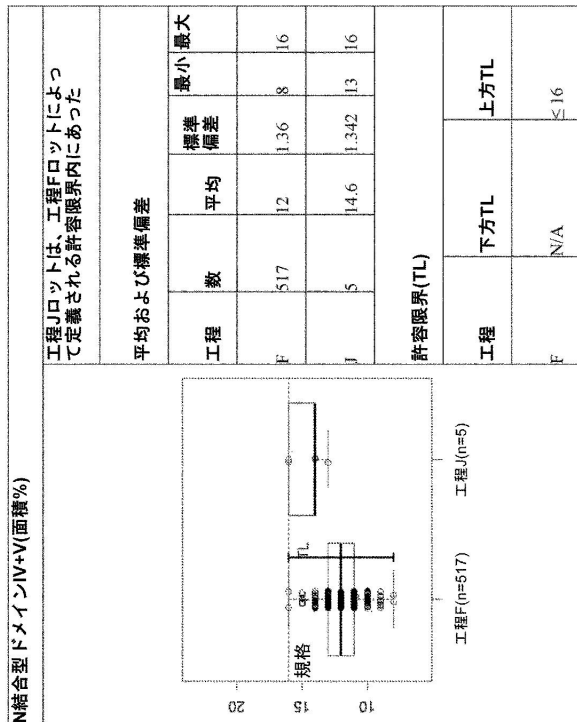
工程Fおよび工程JのロットからのN結合型ドメインII検定結果の統計的比較

【図 1 0 A】



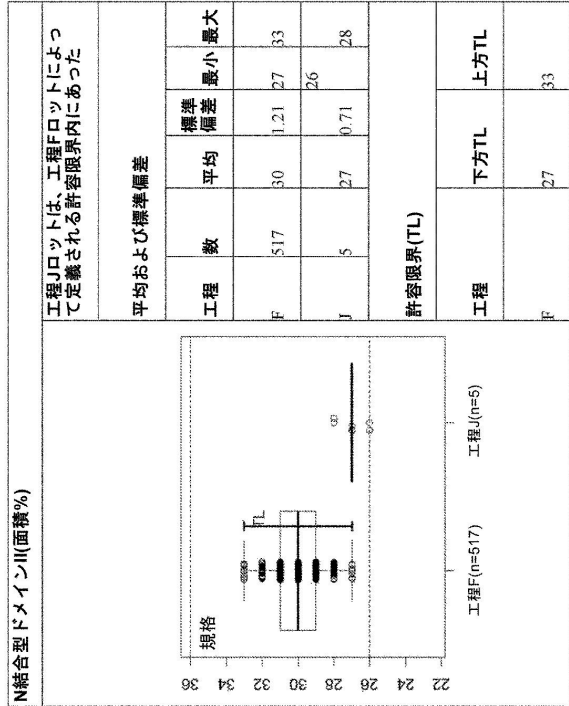
工程Fおよび工程JのロットからのN結合型ドメインIV+V検定結果の統計的比較

【図 1 0 D】



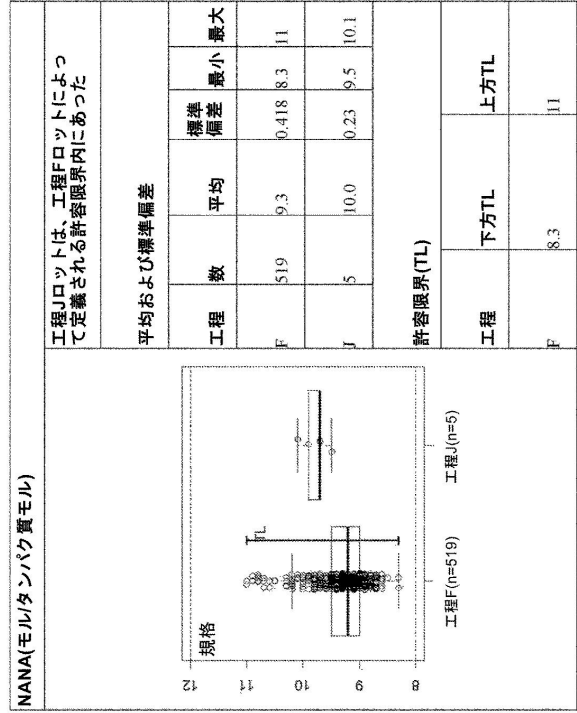
工程Fおよび工程JのロットからのN結合型ドメインII検定結果の統計的比較

【図 1 0 B】



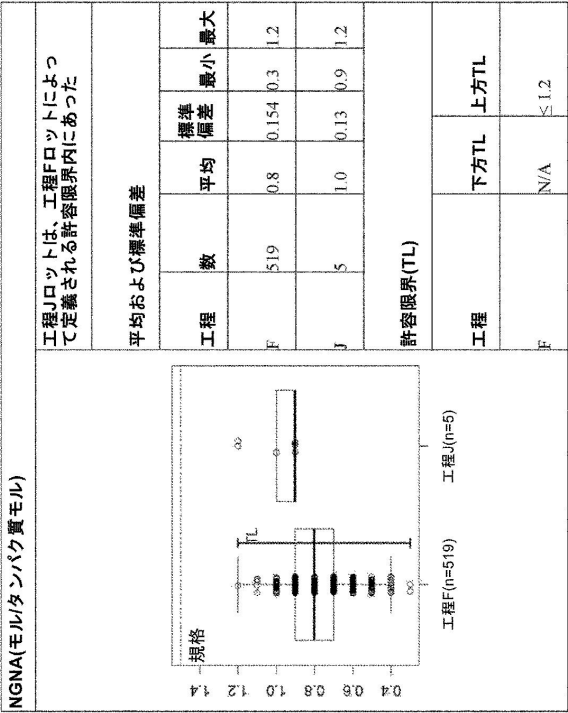
【図 10 E】

工程Fおよび工程JのロットからのNANA検定結果の統計的比較



工程Fおよび工程JのロットからのNGNA検定結果の統計的比較

【図 10 F】



【配列表】
2023537760000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/046029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P21/00 C12P21/02 C07K14/705 C12N5/071 G01N21/64 G01N33/487 G01N33/58 G01N33/68 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) C12P C07K G01N C12N 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, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, 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 2004/058944 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; SCHILLING BERNHARD M [US] ET AL.) 15 July 2004 (2004-07-15)	1-126, 136-139
Y	abstract; claims 1, 16, 23 page 26 page 46, paragraph 3 page 71, paragraph 2 examples 1-13 page 8, paragraph 1 ----- -/--	3-126
☒ 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 28 March 2022		Date of mailing of the international search report 07/04/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schröder, Gunnar

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/046029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/076032 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; LEISTER KIRK J [US] ET AL.) 5 July 2007 (2007-07-05)	1-129, 131, 132, 136-139
Y	paragraphs [0541], [0548], [0570], [0854], [0855]; example 14 paragraph [0932]; example 19 paragraph [1093]; example 28 figure 9 paragraphs [0394] - [0395], [0657] - [0723] claim 128 example 22 paragraph [0541]	3-126, 129, 130, 132-135
X	WO 2013/006479 A2 (AMGEN INC [US]; FOLLSTAD BRIAN D [US] ET AL.) 10 January 2013 (2013-01-10)	2, 3, 8, 136-139
Y	abstract; claims 2, 8-11 examples 1-6	3-126
X	US 2019/085370 A1 (LEISKE DANIEL R [US] ET AL) 21 March 2019 (2019-03-21)	2, 3, 8, 136-139
Y	abstract; claims 26, 33-36 pages 11-13; example paragraphs [0009], [0010]	3-126
X	US 9 428 727 B2 (LEIST CHRISTIAN [CH]; MEISSNER PETRA [CH] ET AL.) 30 August 2016 (2016-08-30)	2, 3, 8, 136-139
Y	abstract; claims 5, 6; examples 1-2 column 16, paragraphs 1, 2	3-126
X	HENNICKE JULIA ET AL: "Impact of temperature and pH on recombinant human IgM quality attributes and productivity", NEW BIOTECHNOLOGY, vol. 50, 25 May 2019 (2019-05-25), pages 20-26, XP085616566, ISSN: 1871-6784, DOI: 10.1016/J.NBT.2019.01.001	136-139
Y	abstract page 21, left-hand column, paragraph 2 Discussion section; pages 23-26	3-126
X	US 2018/230445 A1 (JALURIA PRATIK [US] ET AL) 16 August 2018 (2018-08-16)	8-126, 136-139
	abstract paragraphs [0113] - [0117]; figures 10B, 10C; examples 1-7	
6	X	
	US 8 765 413 B2 (JOOSTEN CHRISTOPH E [CH]; LEIST CHRISTIAN [CH] ET AL.) 1 July 2014 (2014-07-01)	8-126, 136-139
	abstract; claims 1-18	
3		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/046029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EVELYN TRUMMER ET AL: "Process parameter shifting: Part II. Biphasic cultivation-A tool for enhancing the volumetric productivity of batch processes using Epo-Fc expressing CHO cells", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 94, no. 6, 30 May 2006 (2006-05-30), pages 1045-1052, XP071052209, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.20958 abstract; figures 1-5; table I -----	8-126, 136-139
X	WO 2005/035748 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; KNUDSEN IDA MOELGAARD [DK]) 21 April 2005 (2005-04-21)	8, 136-139
Y	claims 1-3 -----	9-126
X	WO 2009/112250 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH [DE] ET AL.) 17 September 2009 (2009-09-17)	8, 136-139
Y	claims 1, 4, 7 -----	9-126
X	Irfan Kerem: "Carbon Dioxide Control in Bioreactors and the Application of Principal Component Analysis to Cell Culture Process Data (thesis)", Thesis, Newcastle University, 1 May 2017 (2017-05-01), XP055905152, Retrieved from the Internet: URL:https://theses.ncl.ac.uk/jspui/bitstream/10443/3776/1/Irfan,%20K.%202017%20(Eng.D).pdf [retrieved on 2022-03-24]	8, 136-139
Y	abstract -----	9-126
X	KARINA BORA DE OLIVEIRA ET AL: "Site-specific monitoring of N-Glycosylation profiles of a CTLA4-Fc-fusion protein from the secretory pathway to the extracellular environment", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 114, no. 7, 14 March 2017 (2017-03-14), pages 1550-1560, XP071114057, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.26266	127,128, 130,131
Y	abstract; figures 1, 4, 6 page 1552, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	129,130

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/046029

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dhume Shirish T. ET AL: "Monitoring Glycosylation of Therapeutic Glycoproteins for Consistency by HPLC Using Highly Fluorescent Anthranilic Acid (AA) Tag" In: "Post-translational Modifications of Proteins (Methods in Molecular Biology series)", 1 January 2008 (2008-01-01), Humana Press, Totowa, NJ, XP055905413, ISBN: 978-1-60327-084-7 vol. 446, pages 317-331, DOI: 10.1007/978-1-60327-084-7_22, Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-084-7_22> the whole document	129
Y	ANUMULA KALYAN RAO: "Single tag for total carbohydrate analysis", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 457, 1 July 2014 (2014-07-01), pages 31-37, XP055905371, Amsterdam, NL ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/j.ab.2014.04.019 Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269714001687/pdf?md5=6eaa8f68253fe9ae5e3b5e66744fbd23&pid=1-s2.0-S0003269714001687-main.pdf> the whole document	129,130
Y	LEI ZHANG ET AL: "Glycan analysis of therapeutic glycoproteins", MABS, vol. 8, no. 2, 24 November 2015 (2015-11-24), pages 205-215, XP055568801, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2015.1117719 figure 2	132-135

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/046029

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/046029**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2021/046029

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 (completely); 2-126, 136-139 (partially)

Method for producing protein from cell culture comprising two temperature shifts (36→33→31 °C)

2. claims: 2-7, 9-126, 136-139 (all partially)

Method for producing protein from cell culture comprising at least one temperature shift (36.0→below 36 °C or 36.5→31°C)

3. claims: 8-126, 136-139 (all partially)

Method for producing protein from cell culture comprising an initial pH set point of 7.0 and a second pH set point of 6.9, or an initial pH of 6.9.

4. claims: 8-126, 136-139 (all partially)

Method for producing protein from cell culture comprising an initial viable cell density (VCD) set point between 0.15 X 10⁶ cells/mL and 0.45 X 10⁶ cells/mL.

5. claims: 8-126, 136-139 (all partially)

Method for producing protein from cell culture comprising an initial CO₂ set point between 10% and 40%.

6. claims: 127-131

A method of analyzing bi-antennary glycans of a CTLA4-Fc fusion protein, comprising measuring one or more N-linked glycans attached to one or more asparagine residues in the CTLA4 protein.

7. claims: 132-135

A method of analyzing bi-antennary glycans of a CTLA4-Fc fusion protein, comprising performing isoelectric focusing of the CTLA4-Fc fusion protein.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/046029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004058944 A2	15-07-2004	AT 488600 T	15-12-2010
		AU 2003303394 A1	22-07-2004
		BR 0316882 A	25-10-2005
		CA 2508925 A1	15-07-2004
		CN 1820080 A	16-08-2006
		CO 5590971 A2	30-12-2005
		CY 1111358 T1	05-08-2015
		DK 1576182 T3	21-02-2011
		EP 1576182 A2	21-09-2005
		ES 2354610 T3	16-03-2011
		HK 1075474 A1	16-12-2005
		IL 168873 A	30-04-2013
		JP 4496086 B2	07-07-2010
		JP 2006511224 A	06-04-2006
		KR 20050103466 A	31-10-2005
		MX PA05006522 A	17-02-2006
		PT 1576182 E	21-01-2011
		SI 1576182 T1	31-01-2011
		TW I328614 B	11-08-2010
		US 2005084933 A1	21-04-2005
		US 2008070280 A1	20-03-2008
		WO 2004058944 A2	15-07-2004
WO 2007076032 A2	05-07-2007	AU 2006330922 A1	05-07-2007
		AU 2010241289 A1	02-12-2010
		BR PI0620178 A2	29-06-2010
		BR PI0622251 A2	19-07-2011
		CA 2634760 A1	05-07-2007
		CA 2836123 A1	05-07-2007
		CY 1114887 T1	14-12-2016
		DK 1969007 T3	25-11-2013
		DK 2253644 T3	13-01-2014
		EA 200801571 A1	26-02-2010
		EP 1969007 A2	17-09-2008
		EP 2253644 A1	24-11-2010
		ES 2433092 T3	09-12-2013
		ES 2439641 T3	24-01-2014
		HK 1121173 A1	17-04-2009
		HR P20130975 T1	22-11-2013
		IL 192098 A	30-01-2014
		JP 5096369 B2	12-12-2012
		JP 5097194 B2	12-12-2012
		JP 2009520503 A	28-05-2009
		JP 2010116402 A	27-05-2010
		KR 20080090428 A	08-10-2008
		KR 20120010275 A	02-02-2012
		MX 336807 B	02-02-2016
		NZ 597215 A	30-11-2012
		PE 20080556 A1	13-06-2008
		PL 1969007 T3	31-01-2014
		PL 2253644 T3	30-04-2014
		PT 1969007 E	10-12-2013
		PT 2253644 E	23-01-2014
		SI 1969007 T1	31-03-2014
		SI 2253644 T1	31-03-2014
		TW I398520 B	11-06-2013
		TW 201313742 A	01-04-2013
		US 2009252749 A1	08-10-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/046029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2019062399 A1	28-02-2019
		US 2019092835 A1	28-03-2019
		US 2021246188 A1	12-08-2021
		WO 2007076032 A2	05-07-2007
		ZA 200805301 B	28-11-2012
WO 2013006479 A2	10-01-2013	AU 2012279230 A1	09-01-2014
		AU 2016244255 A1	27-10-2016
		AU 2018203972 A1	21-06-2018
		AU 2020281075 A1	07-01-2021
		BR 112013033730 A2	31-01-2017
		BR 122021007265 B1	22-02-2022
		CA 2838695 A1	10-01-2013
		CA 2952347 A1	10-01-2013
		CL 2013003792 A1	25-07-2014
		CL 2016001190 A1	09-06-2017
		CN 103827292 A	28-05-2014
		CN 107988166 A	04-05-2018
		CY 1118863 T1	10-01-2018
		DK 2726600 T3	15-05-2017
		DK 2837680 T3	27-04-2020
		EA 201391826 A1	30-04-2014
		EP 2726600 A2	07-05-2014
		EP 2837680 A1	18-02-2015
		ES 2625045 T3	18-07-2017
		ES 2788132 T3	20-10-2020
		HK 1197081 A1	02-01-2015
		HK 1206057 A1	31-12-2015
		HU E033279 T2	28-11-2017
		HU E049119 T2	28-09-2020
		IL 229803 A	30-11-2020
		IL 278430 A	01-01-2022
		JP 5897708 B2	30-03-2016
		JP 2014520534 A	25-08-2014
		KR 20140031375 A	12-03-2014
		KR 20160075814 A	29-06-2016
		KR 20180050433 A	14-05-2018
		KR 20200051046 A	12-05-2020
		KR 20220021008 A	21-02-2022
		LT 2726600 T	25-05-2017
		LT 2837680 T	10-07-2020
		MX 351974 B	06-11-2017
		PL 2726600 T3	31-08-2017
		PL 2837680 T3	10-08-2020
		PT 2726600 T	24-04-2017
		PT 2837680 T	17-04-2020
		SG 10201702537R A	27-04-2017
		SI 2837680 T1	31-07-2020
		US 2014255993 A1	11-09-2014
		US 2020407427 A1	31-12-2020
		US 2021061888 A1	04-03-2021
		WO 2013006479 A2	10-01-2013
		ZA 201309372 B	27-08-2014
US 2019085370 A1	21-03-2019	AU 2015355087 A1	29-06-2017
		AU 2020202302 A1	23-04-2020
		AU 2022200586 A1	24-02-2022
		BR 112017011652 A2	26-06-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/046029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2969225 A1	09-06-2016
		CL 2017001369 A1	23-02-2018
		CN 107109455 A	29-08-2017
		DK 3227454 T3	14-04-2020
		EA 201791223 A1	31-10-2017
		EA 202091598 A2	30-10-2020
		EP 3227454 A1	11-10-2017
		EP 3680344 A1	15-07-2020
		ES 2784503 T3	28-09-2020
		HU E049201 T2	28-09-2020
		IL 252569 A	31-08-2020
		JP 6698681 B2	27-05-2020
		JP 2017538446 A	28-12-2017
		JP 2020124216 A	20-08-2020
		KR 20170083636 A	18-07-2017
		LT 3227454 T	27-07-2020
		PL 3227454 T3	27-07-2020
		PT 3227454 T	06-04-2020
		SG 10202002458P A	29-04-2020
		SG 11201704351W A	29-06-2017
		SI 3227454 T1	30-06-2020
		US 2017362625 A1	21-12-2017
		US 2019085370 A1	21-03-2019
		US 2020172947 A1	04-06-2020
		US 2021017565 A1	21-01-2021
		WO 2016089919 A1	09-06-2016
		ZA 201703729 B	31-03-2021
US 9428727	B2	30-08-2016	
		AU 2011246503 A1	22-11-2012
		BR 112012027282 A2	22-09-2015
		CA 2797356 A1	03-11-2011
		CN 102858952 A	02-01-2013
		DK 2563904 T3	07-04-2015
		EP 2563904 A1	06-03-2013
		ES 2533074 T3	07-04-2015
		IL 222452 A	31-03-2019
		JP 6347949 B2	27-06-2018
		JP 6603628 B2	06-11-2019
		JP 2013524825 A	20-06-2013
		JP 2017012180 A	19-01-2017
		JP 2019216728 A	26-12-2019
		KR 20130058699 A	04-06-2013
		PL 2563904 T3	30-06-2015
		PT 2563904 E	12-05-2015
		RU 2012150346 A	10-06-2014
		RU 2018101201 A	21-02-2019
		SG 185038 A1	29-11-2012
		US RE48864 E	28-12-2021
		US 2013122543 A1	16-05-2013
		WO 2011134920 A1	03-11-2011
US 2018230445	A1	16-08-2018	
		AU 2016308624 A1	15-02-2018
		BR 112018003214 A2	25-09-2018
		CA 2993358 A1	23-02-2017
		CN 108350440 A	31-07-2018
		CO 2018001450 A2	30-04-2018
		EP 3337894 A1	27-06-2018
		HK 1257341 A1	18-10-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/046029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		JP 6993961 B2	14-01-2022	
		JP 2018523481 A	23-08-2018	
		KR 20180040590 A	20-04-2018	
		RU 2018109368 A	19-09-2019	
		RU 2020131552 A	20-10-2020	
		US 2018230445 A1	16-08-2018	
		WO 2017031114 A1	23-02-2017	

US 8765413	B2	01-07-2014	AU 2011246502 B2	28-08-2014
			BR 112012027430 A2	22-09-2015
			CA 2795461 A1	03-11-2011
			CN 102858954 A	02-01-2013
			CN 107254499 A	17-10-2017
			DK 2563906 T3	05-02-2018
			DK 3330370 T3	10-05-2021
			EP 2563906 A2	06-03-2013
			EP 3330370 A1	06-06-2018
			EP 3862423 A1	11-08-2021
			ES 2659117 T3	13-03-2018
			ES 2870469 T3	27-10-2021
			IL 222454 A	29-11-2018
			JP 5980772 B2	31-08-2016
			JP 2013524824 A	20-06-2013
			JP 2016214254 A	22-12-2016
			KR 20130094723 A	26-08-2013
			LT 2563906 T	26-02-2018
			LT 3330370 T	10-06-2021
			PL 2563906 T3	30-04-2018
			PL 3330370 T3	20-09-2021
			PT 2563906 T	16-02-2018
			PT 3330370 T	11-05-2021
			RU 2012150283 A	10-06-2014
			SG 185014 A1	29-11-2012
			US 2013130316 A1	23-05-2013
			WO 2011134919 A2	03-11-2011

WO 2005035748	A1	21-04-2005	EP 1673452 A1	28-06-2006
			ES 2565077 T3	31-03-2016
			JP 4740138 B2	03-08-2011
			JP 2007508003 A	05-04-2007
			US 2006216790 A1	28-09-2006
			WO 2005035748 A1	21-04-2005

WO 2009112250	A1	17-09-2009	CA 2716577 A1	17-09-2009
			CN 101970646 A	09-02-2011
			DE 102008013899 A1	17-09-2009
			EP 2283120 A1	16-02-2011
			ES 2408979 T3	24-06-2013
			JP 5487124 B2	07-05-2014
			JP 2011512852 A	28-04-2011
			US 2011159539 A1	30-06-2011
			WO 2009112250 A1	17-09-2009

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	

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,N
 E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

2. T R I T O N

弁理士 笹倉 真奈美

- (72)発明者 ルイス, アマンダ モーガン
 アメリカ合衆国 0 1 4 3 4 マサチューセッツ州デベンズ、ジャクソン・ロード 3 8
- (72)発明者 マスカス, ダニエル ロバート
 アメリカ合衆国 0 1 4 3 4 マサチューセッツ州デベンズ、ジャクソン・ロード 3 8
- (72)発明者 ガー, エリック リチャード
 アメリカ合衆国 0 1 4 3 4 マサチューセッツ州デベンズ、ジャクソン・ロード 3 8
- (72)発明者 ウォレル, ダイアン ケイ
 アメリカ合衆国 0 1 4 3 4 マサチューセッツ州デベンズ、ジャクソン・ロード 3 8
- (72)発明者 ルドウィッグ, リチャード トーマス
 アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・
 ライン・ロード

F ターム (参考) 4B064 AG20 AG26 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA91X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20
 FA74