

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-513478

(P2016-513478A)

(43) 公表日 平成28年5月16日(2016.5.16)

(51) Int.Cl.

C 12 P 21/08 (2006.01)
C 07 K 16/22 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)

F 1

C 12 P 21/08
C 07 K 16/22
C 12 N 5/10

テーマコード(参考)

4 B 06 4
4 B 06 5
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁)

(21) 出願番号 特願2016-503216 (P2016-503216)
(86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014.3.14)
(85) 翻訳文提出日 平成27年11月12日 (2015.11.12)
(86) 國際出願番号 PCT/US2014/029758
(87) 國際公開番号 WO2014/145091
(87) 國際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)
(31) 優先権主張番号 61/801,247
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 509012625
ジェネンテック, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー
ウェイ 1
(74) 代理人 110002077
園田・小林特許業務法人
(72) 発明者 カルバリヤール, ヴェロニカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー／オージェネンテック, インコーポレイテッド

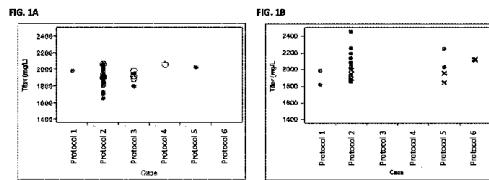
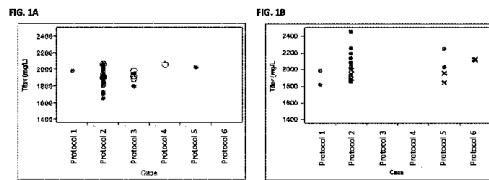
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞培養培地及び抗体を产生する方法

(57) 【要約】

本明細書では、細胞培養及び細胞からの抗体産生のための培地の使用方法と同様に細胞培養培地が提供される。本明細書の方法によって生成される抗体及びその断片を含む組成物もまた提供される。

【選択図】図1 A 及び図1 B



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する工程を含み、前記細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含み、且つ前記細胞がベバシズマブもしくはその断片を生成する方法。

【請求項 2】

細胞培養培地が銅及びインスリンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

細胞培養培地が銅及びシスチンを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

細胞培養培地がインスリン及びシスチンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

細胞培養培地が銅、インスリン及びシスチンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

細胞培養培地が植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方をさらに含む、請求項1から5の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

細胞培養培地が約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約50.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約35.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 11】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約25.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

細胞培養培地が約25mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

【請求項 13】

細胞培養培地が約69nM-約1,000nMの濃度で銅を含む、請求項1から12の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

細胞培養培地が約325nM-約375nMの濃度で銅を含む、請求項1から12の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 15】

細胞培養培地が約325nM-約350nMの濃度で銅を含む、請求項1から12の何れか一項に記載の方法。

【請求項 16】

細胞培養培地が330nM、335nM、339nM、340nM、345nMもしくは350nMのうちのおよそ何れか1つの濃度で銅を含む、請求項1から12の何れか一項に記載の方法。

【請求項 17】

細胞培養培地が約339nMの濃度で銅を含む、請求項1から12の何れか一項に記載

50

の方法。

【請求項 1 8】

細胞培養培地が約 0.7 mM - 約 2.0 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

細胞培養培地が約 1.0 mM - 約 1.6 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

細胞培養培地が約 1.2 mM - 約 1.4 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

細胞培養培地が約 1.3 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

細胞培養培地が約 6.0 g / L - 約 20.0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 21 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

細胞培養培地が約 8.0 g / L - 約 12.0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 21 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞培養培地が約 9.0 g / L - 約 11.0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 21 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

細胞培養培地が約 13 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 21 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

細胞培養培地が約 1.0 g / L - 約 10.0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 25 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

細胞培養培地が約 2.0 g / L - 約 3.0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 25 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

細胞培養培地が約 2.25 g / L - 約 2.75 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 25 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

細胞培養培地が約 3.1 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 1 から 25 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

細胞培養培地が動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、且つ前記動物由来加水分解物は前記植物由来加水分解物より多い量で存在する、請求項 1 から 29 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

細胞培養培地がインスリンを含み、方法は追加量のインスリンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 1 から 30 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に 1 回前記細胞培養培地に加えられる、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも 3 回前記細胞培養培地に加えられる、請求項 3 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも 6 回前記細胞培養培地に加えられる、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

追加量のインスリンが、約 1 . 0 m g / L - 約 1 0 0 . 0 m g / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 3 1 から 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

追加量のインスリンが、約 1 0 . 0 m g / L - 約 1 0 0 . 0 m g / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 3 1 から 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

追加量のインスリンが、約 1 0 . 0 m g / L - 約 5 0 . 0 m g / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 3 1 から 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

追加量のインスリンが、約 1 0 . 0 m g / L - 約 3 5 . 0 m g / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 3 1 から 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

追加量のインスリンが、約 1 0 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 3 1 から 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

追加量のインスリンが、約 1 5 m g / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 3 1 から 3 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

方法が、システィンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 1 から 4 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

システィンが、細胞培養培地中に約 0 . 5 - 約 2 . 0 m M のシスティンを提供する量で加えられる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

システィンが、細胞培養培地中に約 0 . 8 m M のシスティンを提供する量で加えられる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

方法が、シスチンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 1 から 4 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

シスチンが、細胞培養培地中に約 0 . 1 - 約 1 . 5 m M のシスチンを提供する量で加えられる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

シスチンが、細胞培養培地中に約 0 . 2 m M のシスチンを提供する量で加えられる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

細胞が、約 2 8 - 約 3 7 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 1 から 4 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

細胞が、約 3 1 - 約 3 5 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 4 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 9】

細胞が、第1期間は約35の第1温度で培養され、第2期間は約33の第2温度で培養され、第3期間は約31の第3温度で培養される、請求項1から46の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

ベバシズマブもしくはその断片が、細胞培養培地中に分泌される、請求項1から49の何れか一項に記載の方法

【請求項 5 1】

細胞培養からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含む、請求項1から50の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

請求項1から請求項51の何れか一項に記載の方法によって生成される、ベバシズマブもしくはその断片。

【請求項 5 3】

(i) 請求項1から請求項51の何れか一項に記載の方法によって生成されるベバシズマブもしくはその断片及び(ii)薬学的に許容される担体を含む組成物。

20

【請求項 5 4】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法であって、哺乳動物細胞を、銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含む細胞培養培地と接触させる工程を含む方法。

【請求項 5 5】

細胞培養培地が銅及びインスリンを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 6】

細胞培養培地が銅及びシスチンを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 7】

細胞培養培地がインスリン及びシスチンを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 8】

細胞培養培地が銅、インスリン及びシスチンを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項 5 9】

細胞培養培地が植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方をさらに含む、請求項54から請求項58の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 6 0】

細胞培養培地が約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項54から59の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項54から59の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 2】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約50.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項54から59の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約35.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項54から59の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約25.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項54から59の何れか一項に記載の方法。

50

【請求項 6 5】

細胞培養培地が約25mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項54から59の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

細胞培養培地が約 6 9 nM - 約 1 , 0 0 0 nM の濃度で銅を含む、請求項 5 4 から 6 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

細胞培養培地が約 3 2 5 nM - 約 3 7 5 nM の濃度で銅を含む、請求項 5 4 から 6 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

細胞培養培地が約 3 2 5 nM - 約 3 5 0 nM の濃度で銅を含む、請求項 5 4 から 6 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞培養培地が 3 3 0 nM 、 3 3 5 nM 、 3 3 9 nM 、 3 4 0 nM 、 3 4 5 nM もしくは 3 5 0 nM のうちのおよそ何れか 1 つの濃度で銅を含む、請求項 5 4 から 6 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

細胞培養培地が約 3 3 9 nM の濃度で銅を含む、請求項 5 4 から 6 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

細胞培養培地が約 0 . 7 mM - 約 2 . 0 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 5 4 から 7 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

細胞培養培地が約 1 . 0 mM - 約 1 . 6 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 5 4 から 7 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

細胞培養培地が約 1 . 2 mM - 約 1 . 4 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 5 4 から 7 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

細胞培養培地が約 1 . 3 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 5 4 から 7 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

細胞培養培地が約 6 . 0 g / L - 約 2 0 . 0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

細胞培養培地が約 8 . 0 g / L - 約 1 2 . 0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

細胞培養培地が約 9 . 0 g / L - 約 1 1 . 0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

細胞培養培地が約 1 3 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

細胞培養培地が約 1 . 0 g / L - 約 1 0 . 0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

細胞培養培地が約 2 . 0 g / L - 約 3 . 0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

細胞培養培地が約 2 . 2 5 g / L - 約 2 . 7 5 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 5 4 から 7 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

10

20

30

40

50

細胞培養培地が約3.1g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項54から78の何れか一項に記載の方法。

【請求項83】

細胞培養培地が動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、且つ前記動物由来加水分解物は前記植物由来加水分解物より多い量で存在する、請求項54から82の何れか一項に記載の方法。

【請求項84】

細胞培養培地がインスリンを含み、方法は追加量のインスリンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項54から83の何れか一項に記載の方法。

【請求項85】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に1回細胞培養培地に加えられる、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも3回細胞培養培地に加えられる、請求項84に記載の方法。

【請求項87】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも6回細胞培養培地に加えられる、請求項84に記載の方法。

【請求項88】

追加量のインスリンが、約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項84から87の何れか一項に記載の方法。

【請求項89】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項84から87の何れか一項に記載の方法。

【請求項90】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約50.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項84から87の何れか一項に記載の方法。

【請求項91】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約35.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項84から87の何れか一項に記載の方法。

【請求項92】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約25.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項84から87の何れか一項に記載の方法。

【請求項93】

追加量のインスリンが、約15mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項84から87の何れか一項に記載の方法。

【請求項94】

方法が、システインを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項54から93の何れか一項に記載の方法。

【請求項95】

システインが、細胞培養培地中に約0.5-約2.0mMのシステインを提供する量で加えられる、請求項94に記載の方法。

【請求項96】

システインが、細胞培養培地中に約0.8mMのシステインを提供する量で加えられる、請求項94に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 7】

方法が、シスチンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 5 4 から 9 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

シスチンが、細胞培養培地中に約 0 . 1 - 約 1 . 5 mM のシスチンを提供する量で加えられる、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

シスチンが、細胞培養培地中に約 0 . 2 mM のシスチンを提供する量で加えられる、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

細胞培養培地が動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、且つ前記動物由来加水分解物は前記植物由来加水分解物より多い量で存在する、請求項 5 4 から 9 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

細胞が、約 28 - 約 37 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 5 4 から 1 0 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

細胞が、約 28 - 約 35 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

細胞が、第 1 期間は約 35 の第 1 温度で培養され、第 2 期間は約 33 の第 2 温度で培養され、第 3 期間は約 31 の第 3 温度で培養される、請求項 5 4 から 1 0 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

ベバシズマブもしくはその断片が、細胞培養培地中に分泌される、請求項 5 4 から 1 0 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

哺乳動物細胞が、細胞の増殖期中に細胞培養培地と接触させられる、請求項 5 4 から 1 0 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

哺乳動物細胞が、細胞の產生期中に細胞培養培地と接触させられる、請求項 5 4 から 1 0 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地を補給するためのキットであって、成分 (i) - (i i i) : (i) 前記細胞培養培地中の約 1 . 0 mg / L - 約 1 0 0 . 0 mg / L のインスリンを提供する量にあるインスリン； (i i) 前記細胞培養培地中の約 0 . 7 mM - 約 2 . 0 mM のシスチンを提供する量にあるシスチン； (i i i) 及び前記細胞培養培地中の約 6 9 . 0 nM - 約 1 , 0 0 0 . 0 nM の銅を提供する量にある銅のうちの少なくとも 2 つを含む、キット。

【請求項 1 0 8】

キットが、植物由来加水分解物をさらに含む、請求項 1 0 7 に記載のキット。

【請求項 1 0 9】

キットは、細胞培養培地中の約 1 . 0 g / L - 約 1 0 . 0 g / L の植物由来加水分解物を提供する量にある植物由来加水分解物を含む、請求項 1 0 8 に記載のキット。

【請求項 1 1 0】

キットが、動物由来加水分解物をさらに含む、請求項 1 0 7 - 1 0 9 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 1 1 1】

キットが、細胞培養培地中の約 6 . 0 g / L - 約 2 0 . 0 g / L の動物由来加水分解物

10

20

30

40

50

を提供する量にある動物由来加水分解物を含む、請求項 110 に記載のキット。

【請求項 112】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地であって、成分 (i) - (iii) : (i) 約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L のインスリン； (ii) 約 69.0 nM - 約 1,000.0 nM の銅；及び (iii) 約 0.7 mM - 約 2.0 mM のシスチンのうちの少なくとも 2つを含む、細胞培養培地。

【請求項 113】

細胞培養培地が： (i) 約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L のインスリン；及び (ii) 約 69.0 nM - 約 1,000.0 nM の銅を含む、請求項 112 に記載の細胞培養培地。

10

【請求項 114】

細胞培養培地が： (i) 約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L のインスリン；及び (ii) 約 0.7 mM - 約 2.0 mM のシスチンを含む、請求項 112 に記載の細胞培養培地。

【請求項 115】

細胞培養培地が： (ii) 約 69.0 nM - 約 1,000.0 nM の銅；及び (iii) 約 0.7 mM - 約 2.0 mM のシスチンを含む、請求項 112 に記載の細胞培養培地。

【請求項 116】

細胞培養培地が約 1.0 g / L - 約 10.0 g / L の植物由来加水分解物をさらに含む、請求項 112 から 115 の何れか一項に記載の細胞培養培地。

20

【請求項 117】

細胞培養培地が約 6.0 g / L - 約 20.0 g / L の動物由来加水分解物をさらに含む、請求項 112 から 116 の何れか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 118】

細胞培養培地が：

約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L ;
約 10.0 mg / L - 約 100.0 mg / L ;
約 10.0 mg / L - 約 50.0 mg / L ;
約 10.0 mg / L - 約 35.0 mg / L ;
約 10.0 mg / L - 約 25.0 mg / L ; 及び

30

約 10.0 mg / L から成る群から選択される濃度にあるインスリンを含む、請求項 112 から 117 の何れか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 119】

細胞培養培地が：

約 69 nM - 約 1,000 nM ;
約 300 nM - 約 400 nM ;
約 325 nM - 約 375 nM ;
約 325 nM - 約 350 nM ;
330 nM、335 nM、339 nM、340 nM、345 nM もしくは 350 nM のうちのおよそ何れか 1 つ；及び

40

約 339 nM から成る群から選択される濃度にある銅を含む、請求項 112 から 118 の何れか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項 120】

細胞培養培地が：

約 0.7 mM - 約 2.0 mM ;
約 1.0 mM - 約 2.0 mM ;
約 1.0 mM - 約 1.6 mM ;
約 1.2 mM - 約 1.4 mM ; 及び
約 1.3 mM から成る群から選択される濃度にあるシスチンを含む、請求項 112 から

50

119の何れか一項に記載の細胞培養培地。

【請求項121】

(a) ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞；及び(b)請求項112から120の何れか一項に記載の細胞培養培地を含む、組成物。

【請求項122】

(a) ベバシズマブもしくはその断片；及び(b)請求項112から120の何れか一項に記載の細胞培養培地を含む、組成物。

【請求項123】

ベバシズマブもしくはその断片が、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞によって培地中に分泌される、請求項122に記載の組成物。

10

【請求項124】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞から生成されるベバシズマブもしくはその断片の量を強化する方法であって、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中で前記哺乳動物細胞を培養する工程を含み、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で前記哺乳動物細胞を培養することに比較して前記哺乳動物細胞から生成されるベバシズマブもしくはその断片の量が強化される方法。

【請求項125】

細胞培養培地が銅及びインスリンを含む、請求項124に記載の方法。

【請求項126】

細胞培養培地が銅及びシスチンを含む、請求項124に記載の方法。

20

【請求項127】

細胞培養培地がインスリン及びシスチンを含む、請求項124に記載の方法。

【請求項128】

細胞培養培地が銅、インスリン及びシスチンを含む、請求項124に記載の方法。

【請求項129】

細胞培養培地が植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方をさらに含む、請求項124から128の何れか一項に記載の方法。

【請求項130】

細胞培養培地が約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項131】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

【請求項132】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約50.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

【請求項133】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約35.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項134】

細胞培養培地が約10.0mg/L-約25.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

【請求項135】

細胞培養培地が約25.0mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

【請求項136】

細胞培養培地が約69nM-約1,000nMの濃度で銅を含む、請求項124から129の何れか一項に記載の方法。

50

【請求項 137】

細胞培養培地が約325nM - 約375nMの濃度で銅を含む、請求項124から135の何れか一項に記載の方法。

【請求項 138】

細胞培養培地が約325nM - 約350nMの濃度で銅を含む、請求項124から135の何れか一項に記載の方法。

【請求項 139】

細胞培養培地が330nM、335nM、339nM、340nM、345nMもしくは350nMのうちのおよそ何れか1つの濃度で銅を含む、請求項124から135の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 140】

細胞培養培地が約339nMの濃度で銅を含む、請求項124から135の何れか一項に記載の方法。

【請求項 141】

細胞培養培地が約0.7mM - 約2.0mMの濃度でシスチンを含む、請求項124から140の何れか一項に記載の方法。

【請求項 142】

細胞培養培地が約1.0mM - 約1.6mMの濃度でシスチンを含む、請求項124から140の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 143】

細胞培養培地が約1.2mM - 約1.4mMの濃度でシスチンを含む、請求項124から140の何れか一項に記載の方法。

【請求項 144】

細胞培養培地が約1.3mMの濃度でシスチンを含む、請求項124から140の何れか一項に記載の方法。

【請求項 145】

細胞培養培地が約6.0g/L - 約20.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項124から144の何れか一項に記載の方法。

【請求項 146】

細胞培養培地が約8.0g/L - 約12.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項124から144の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 147】

細胞培養培地が約9.0g/L - 約11.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項124から144の何れか一項に記載の方法。

【請求項 148】

細胞培養培地が約13g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項124から144の何れか一項に記載の方法。

【請求項 149】

細胞培養培地が約1.0g/L - 約10.0g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項124から148の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 150】

細胞培養培地が約2.0g/L - 約3.0g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項124から148の何れか一項に記載の方法。

【請求項 151】

細胞培養培地が約2.25g/L - 約2.75g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項124から148の何れか一項に記載の方法。

【請求項 152】

細胞培養培地が約3.1g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項124から148の何れか一項に記載の方法。

【請求項 153】

50

細胞培養培地が動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、且つ前記動物由来加水分解物は前記植物由来加水分解物より多い量で存在する、請求項124から152の何れか一項に記載の方法。

【請求項154】

細胞培養培地がインスリンを含み、方法は追加量のインスリンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項124から153の何れか一項に記載の方法。

【請求項155】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に1回細胞培養培地に加えられる、請求項154に記載の方法。

【請求項156】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも3回細胞培養培地に加えられる、請求項154に記載の方法。

【請求項157】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも6回細胞培養培地に加えられる、請求項154に記載の方法。

【請求項158】

追加量のインスリンが、約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項154から157の何れか一項に記載の方法。

【請求項159】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項154から157の何れか一項に記載の方法。

【請求項160】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約50.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項154から157の何れか一項に記載の方法。

【請求項161】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約35.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項154から157の何れか一項に記載の方法。

【請求項162】

追加量のインスリンが、約10.0mg/L-約25.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項154から157の何れか一項に記載の方法。

【請求項163】

追加量のインスリンが、約15.0mg/Lの濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項154から157の何れか一項に記載の方法。

【請求項164】

方法が、システインを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項124から163の何れか一項に記載の方法。

【請求項165】

システインが、細胞培養培地中に約0.5-約2.0mMのシステインを提供する量で加えられる、請求項164に記載の方法。

【請求項166】

システインが、細胞培養培地中に約0.8mMのシステインを提供する量で加えられる、請求項164に記載の方法。

【請求項167】

方法が、シスチンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項124から166の何れか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 168】

シスチンが、細胞培養培地中に約0.1 - 約1.5 mMのシスチンを提供する量で加えられる、請求項167に記載の方法。

【請求項 169】

シスチンが、細胞培養培地中に約0.2 mMのシスチンを提供する量で加えられる、請求項167に記載の方法。

【請求項 170】

細胞が、約28 - 約37の範囲にわたる温度で培養される、請求項124から169の何れか一項に記載の方法。

【請求項 171】

細胞が、約31 - 約35の範囲にわたる温度で培養される、請求項170に記載の方法。

【請求項 172】

細胞が、第1期間は約35の第1温度で培養され、第2期間は約33の第2温度で培養され、第3期間は約31の第3温度で培養される、請求項124から169の何れか一項に記載の方法。

【請求項 173】

ベバシズマブもしくはその断片が、細胞培養培地中に分泌される、請求項124から172の何れか一項に記載の方法。

【請求項 174】

ベバシズマブもしくはその断片を細胞培養物から回収する工程をさらに含む、請求項124から173の何れか一項に記載の方法。

【請求項 175】

インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法であって、哺乳動物細胞から生成されたベバシズマブもしくはその断片の量がインスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する方法に比較して強化される方法。

【請求項 176】

細胞培養培地が銅及びインスリンを含む、請求項175に記載の方法。

【請求項 177】

細胞培養培地が銅及びシスチンを含む、請求項175に記載の方法。

【請求項 178】

細胞培養培地がインスリン及びシスチンを含む、請求項175に記載の方法。

【請求項 179】

細胞培養培地が銅、インスリン及びシスチンを含む、請求項175に記載の方法。

【請求項 180】

細胞培養培地が植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方をさらに含む、請求項175から179の何れか一項に記載の方法。

【請求項 181】

細胞培養培地が約1.0 mg/L - 約100.0 mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項175から180の何れか一項に記載の方法。

【請求項 182】

細胞培養培地が約10.0 mg/L - 約100.0 mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項175から180の何れか一項に記載の方法。

【請求項 183】

細胞培養培地が約10.0 mg/L - 約50.0 mg/Lの濃度でインスリンを含む、請求項175から180の何れか一項に記載の方法。

【請求項 184】

10

20

30

40

50

細胞培養培地が約 10.0 mg / L - 約 35.0 mg / L の濃度でインスリンを含む、請求項 175 から 180 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 185】

細胞培養培地が約 10.0 mg / L - 約 25.0 mg / L の濃度でインスリンを含む、請求項 175 から 180 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 186】

細胞培養培地が約 25.0 mg / L の濃度でインスリンを含む、請求項 175 から 180 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 187】

細胞培養培地が約 69 nM - 約 1,000 nM の濃度で銅を含む、請求項 175 から 186 の何れか一項に記載の方法。 10

【請求項 188】

細胞培養培地が約 325 nM - 約 375 nM の濃度で銅を含む、請求項 175 から 186 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 189】

細胞培養培地が約 325 nM - 約 350 nM の濃度で銅を含む、請求項 175 から 186 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 190】

細胞培養培地が 330 nM、335 nM、339 nM、340 nM、345 nM もしくは 350 nM のうちのおよそ何れか 1 つの濃度で銅を含む、請求項 175 から 186 の何れか一項に記載の方法。 20

【請求項 191】

細胞培養培地が約 339 nM の濃度で銅を含む、請求項 175 から 186 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 192】

細胞培養培地が約 0.7 mM - 約 2.0 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 175 から 191 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 193】

細胞培養培地が約 1.0 mM - 約 1.6 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 175 から 191 の何れか一項に記載の方法。 30

【請求項 194】

細胞培養培地が約 1.2 mM - 約 1.4 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 175 から 191 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 195】

細胞培養培地が約 1.3 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 175 から 191 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 196】

細胞培養培地が約 6.0 g / L - 約 20.0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 195 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 197】

細胞培養培地が約 8.0 g / L - 約 12.0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 195 の何れか一項に記載の方法。 40

【請求項 198】

細胞培養培地が約 9.0 g / L - 約 11.0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 195 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 199】

細胞培養培地が約 13 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 195 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 200】

細胞培養培地が約 1.0 g / L - 約 10.0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む 50

、請求項 175 から 199 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 201】

細胞培養培地が約 2.0 g / L - 約 3.0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 199 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 202】

細胞培養培地が約 2.25 g / L - 約 2.75 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 199 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 203】

細胞培養培地が約 3.1 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 175 から 199 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 204】

細胞培養培地が動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、且つ前記動物由来加水分解物は前記植物由来加水分解物より多い量で存在する、請求項 175 から 203 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 205】

細胞培養培地がインスリンを含み、方法は追加量のインスリンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 175 から 204 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 206】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に 1 回細胞培養培地に加えられる、請求項 205 に記載の方法。

【請求項 207】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも 3 回細胞培養培地に加えられる、請求項 205 に記載の方法。

【請求項 208】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも 6 回細胞培養培地に加えられる、請求項 205 に記載の方法。

【請求項 209】

追加量のインスリンが、約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 205 から 208 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 210】

追加量のインスリンが、約 10.0 mg / L - 約 100.0 mg / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 205 から 208 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 211】

追加量のインスリンが、約 10.0 mg / L - 約 50.0 mg / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 205 から 208 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 212】

追加量のインスリンが、約 10.0 mg / L - 約 35.0 mg / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 205 から 208 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 213】

追加量のインスリンが、約 10.0 mg / L - 約 25.0 mg / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 205 から 208 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 214】

追加量のインスリンが、約 15.0 mg / L の濃度で細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる、請求項 205 から 208 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 215】

10

20

30

40

50

方法が、システインを細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 175 から 214 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 216】

システインが、細胞培養培地中に約 0.5 - 約 2.0 mM のシステインを提供する量で加えられる、請求項 215 に記載の方法。

【請求項 217】

システインが、細胞培養培地中に約 0.8 mM のシステインを提供する量で加えられる、請求項 215 に記載の方法。

【請求項 218】

方法が、シスチンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項 175 から 217 の何れか一項に記載の方法。 10

【請求項 219】

シスチンが、細胞培養培地中に約 0.1 - 約 1.5 mM のシスチンを提供する量で加えられる、請求項 218 に記載の方法。

【請求項 220】

シスチンが、細胞培養培地中に約 0.2 mM のシスチンを提供する量で加えられる、請求項 218 に記載の方法。

【請求項 221】

細胞が、約 28 - 約 37 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 175 から 220 の何れか一項に記載の方法。 20

【請求項 222】

細胞が、約 31 - 約 35 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 221 に記載の方法。

【請求項 223】

細胞が、第 1 期間は約 35 の第 1 温度で培養され、第 2 期間は約 33 の第 2 温度で培養され、第 3 期間は約 31 の第 3 温度で培養される、請求項 175 から 220 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 224】

ベバシズマブもしくはその断片が、細胞培養培地中に分泌される、請求項 175 から 223 の何れか一項に記載の方法。 30

【請求項 225】

ベバシズマブもしくはその断片を細胞培養物から回収する工程をさらに含む、請求項 175 から 223 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 226】

ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する工程を含み、細胞培養サイクル中の初期細胞培養培地が約 6.9 nM - 約 1,000 nM の濃度の銅、約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L の濃度のインスリン及び約 0.7 mM - 約 2.0 mM の濃度のシスチンから成る群から選択される 2 つ以上の成分を含み、且つ前記細胞がベバシズマブもしくは断片を生成する、方法。 40

【請求項 227】

初期細胞培養培地が(1)銅及びインスリン；(2)銅及びシスチン；(3)インスリン及びシスチン；又は(4)銅、インスリン及びシスチンを含む、請求項 226 に記載の方法。

【請求項 228】

初期細胞培養培地が約 10.0 mg / L - 約 50.0 mg / L の濃度でインスリンを含む、請求項 226 から 227 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 229】

初期細胞培養培地が約 10.0 mg / L - 約 20.0 mg / L の濃度でインスリンを含む、請求項 228 に記載の方法。 50

【請求項 230】

初期細胞培養培地が 10 . 0 mg / L、15 mg / L、20 mg / L 及び 25 mg / L のうちのおよそ何れか 1 つの濃度でインスリンを含む、請求項 228 に記載の方法。

【請求項 231】

初期細胞培養培地が約 325 nM - 約 375 nM の濃度で銅を含む、請求項 226 から 230 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 232】

初期細胞培養培地が約 325 nM - 約 350 nM の濃度で銅を含む、請求項 226 から 230 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 233】

初期細胞培養培地が 330 nM、335 nM、339 nM、340 nM、345 nM 及び 350 nM のうちのおよそ何れか 1 つの濃度で銅を含む、請求項 226 から 230 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 234】

初期細胞培養培地が約 0 . 7 mM - 約 2 . 0 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 226 から 233 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 235】

初期細胞培養培地が約 1 . 0 mM - 約 1 . 6 mM の濃度でシスチンを含む、請求項 226 から 233 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 236】

初期細胞培養培地が 1 . 0 mM、1 . 2 mM、1 . 3 mM、1 . 4 mM、1 . 5 mM 及び 1 . 6 mM のうちのおよそ何れか 1 つの濃度でシスチンを含む、請求項 226 から 233 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 237】

初期細胞培養培地が動物由来加水分解物及び / 又は植物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 236 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 238】

初期細胞培養培地が約 6 . 0 g / L - 約 20 . 0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 236 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 239】

初期細胞培養培地が約 8 . 0 g / L - 約 12 . 0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 236 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 240】

初期細胞培養培地が約 9 . 0 g / L - 約 11 . 0 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 236 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 241】

初期細胞培養培地が約 13 g / L の濃度で動物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 236 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 242】

初期細胞培養培地が約 1 . 0 g / L - 約 10 . 0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 241 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 243】

細胞培養培地が約 2 . 0 g / L - 約 3 . 0 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 242 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 244】

細胞培養培地が約 2 . 25 g / L - 約 2 . 75 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 243 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 245】

初期細胞培養培地が約 2 . 5 g / L の濃度で植物由来加水分解物を含む、請求項 226 から 244 の何れか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 246】

細胞培養培地が動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、且つ前記動物由来加水分解物は前記植物由来加水分解物より多い量で存在する、請求項226から245の何れか一項に記載の方法。

【請求項 247】

初期細胞培養培地がインスリンを含み、方法は細胞培養サイクル中に追加量のインスリンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項226から246の何れか一項に記載の方法。

【請求項 248】

追加量のインスリンが、細胞培養サイクル中に少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回又は少なくとも6回細胞培養培地に加えられる、請求項247に記載の方法。 10

【請求項 249】

各時点に加えられるインスリンが、約5mg/L-約25mg/Lである、請求項248に記載の方法。

【請求項 250】

各時点に加えられるインスリンが、5mg/L、10mg/L、15mg/L、20mg/L及び25mg/Lのうちのおよそ何れか1つである、請求項248に記載の方法。

【請求項 251】

細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量が、約20mg/L-約100mg/Lである、請求項248から250の何れか一項に記載の方法。 20

【請求項 252】

細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量が、20mg/L、25mg/L、30mg/L、35mg/L、40mg/L、45mg/L、50mg/L、55mg/L、60mg/L、65mg/L、70mg/L、75mg/L、80mg/L及び85mg/Lのうちのおよそ何れか1つである、請求項251に記載の方法。

【請求項 253】

初期細胞培養培地がシスチンを含み、方法は細胞培養サイクル中に追加量のシスチンを前記細胞培養培地に加える工程をさらに含む、請求項226から252の何れか一項に記載の方法。 30

【請求項 254】

シスチンが、細胞培養培地中に約0.1-約1.5mMの追加のシスチンを提供する量で加えられる、請求項253に記載の方法。

【請求項 255】

シスチンが、細胞培養培地中に約0.4-約0.7mMの追加のシスチンを提供する量で加えられる、請求項254に記載の方法。

【請求項 256】

シスチンが細胞培養サイクル中にバッチフィードで加えられる、請求項253から255の何れか一項に記載の方法。

【請求項 257】

方法が、細胞培養サイクル中に少なくとも1バッチフィードをさらに含む、請求項226から256の何れか一項に記載の方法。 40

【請求項 258】

方法が、細胞培養サイクル中に2、3もしくは4バッチフィードを含む、請求項257に記載の方法。

【請求項 259】

バッチフィード培地はが、動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を含む、請求項257又は259に記載の方法。

【請求項 260】

細胞培養サイクル中に、培地の温度が、培養の開始時の温度に比較して、少なくとも約 50

2 、少なくとも約 3 、少なくとも約 4 もしくは少なくとも約 5 低下させられる、請求項 226 から 259 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 261】

培地の温度が、細胞培養サイクル中に少なくとも 1 回又は少なくとも 2 回低下させられる、請求項 260 に記載の方法。

【請求項 262】

温度が、培養する工程の開始後の第 8 日及び第 10 日に低下させられる、請求項 261 に記載の方法。

【請求項 263】

細胞が、約 31 - 約 35 の範囲にわたる温度で培養される、請求項 226 から 26 10 2 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 264】

細胞が、第 1 期間は約 35 の第 1 温度で培養され、第 2 期間は約 33 の第 2 温度で培養され、第 3 期間は約 31 の第 3 温度で培養される、請求項 263 に記載の方法。

【請求項 265】

細胞が、約 7.0 - 約 7.3 の pH を有する培地中に培養される、請求項 226 から 26 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 266】

方法が、(a) 約 10 mg / L のインスリン、約 325 nM - 約 350 nM の銅及び約 1.3 mM のシスチンを含む初期細胞培養培地中で細胞を培養する工程；(b) 培養する工程の開始後の第 3 日に約 15 mg / L の濃度の追加のインスリンを提供するために細胞培養培地に第 1 バッチフィード及びインスリンフィードを提供する工程；及び(c) 培養する工程の開始後の第 6 日に約 0.4 mM - 約 0.7 mM の濃度の追加のシスチンを提供するために細胞培養培地にシスチンを含む第 2 バッチフィードを提供する工程を含み、このとき細胞は約 35 の初期温度で培養され、温度は第 8 日に約 33 へ低下させられ、培養する工程の開始後の第 10 日に約 31 へさらに低下させられる、請求項 226 から 265 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 267】

ベバシズマブもしくはその断片が、細胞培養培地中に分泌される、請求項 226 から 26 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 268】

ベバシズマブもしくはその断片を細胞培養物から回収する工程をさらに含む、請求項 226 から 26 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 269】

哺乳動物細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項 226 から 26 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 270】

請求項 226 から 26 9 の何れか一項に記載の方法によって生成される、ベバシズマブもしくはその断片。

【請求項 271】

(i) 請求項 226 から 26 9 の何れか一項に記載の方法によって生成されるベバシズマブもしくはその断片及び(ii) 薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願とのクロスリファレンス

本出願は、その全内容が本明細書に出典明示により援用される 2013 年 3 月 15 日に提出された米国特許出願第 61/801247 号の優先権の利益を主張するものである。

【0002】

10

20

30

40

50

本発明は、哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地であって、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む細胞培養培地、及びベバシズマブ生産においてその培地を使用する方法並びに本明細書に提供した方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片を含む組成物及びキットに関する。

【背景技術】

【0003】

細胞培養製造技術は、医薬製剤において使用するための、タンパク質ベースの治療薬、例えば抗体を生成するために広く使用されている。タンパク質ベースの生成物、例えば抗体生成物の商業的生産には、製造需要を満たすために十分なタンパク質生成物を細胞が生成できるために細胞培養パラメーターの最適化が必要である。しかし、タンパク質生成物の生産性を向上させるために細胞培養パラメーターが最適化される場合は、グリコシル化プロファイル、凝集体レベル、電荷不均質性及びアミノ酸配列完全性等の生成物の所望の品質特性を維持することもまた必要である (Li等, 2010, mAbs., 2(5):466-477)。

10

【0004】

「Avastin (登録商標)」としても公知であるベバシズマブは、インビトロ及びインビボアッセイ系内で血管内皮増殖因子に結合する組換え型ヒト化モノクローナル抗体であり (米国特許第7227004号; 同第6884879号; 同第7060269号; 同第7169901号; 同第7297334号)、癌の治療において使用されるが、この場合にベバシズマブは新規血管の形成をロックすることにより腫瘍増殖を阻害する。ベバシズマブは、149,000ダルトンの近似分子量を有し、グリコシル化されており、栄養細胞培養培地中の哺乳動物細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞) 発現系内で生成される。

20

【0005】

ベバシズマブもしくはその断片の改良された費用効率的な生成方法が望ましい。細胞がベバシズマブもしくはその断片の許容される生成物品質特性を維持しながら所望量のベバシズマブもしくはその断片を生成することを可能にする成分を含む細胞培養培地があれば有益であろう。製造規模の量のベバシズマブもしくはその断片を生成する際に使用するための細胞培養培地があれば特に好都合であろう。

30

【発明の概要】

【0006】

本明細書に提供した発明は、特に、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む、及び任意選択的に動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を含む細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片を生成する方法を開示する。さらに提供されるのは、本明細書に提供した細胞培養培地を使用して、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞 (例えば、CHO細胞) を培養するための方法である。本明細書でさらに開示されるのは、細胞培養中の哺乳動物細胞から生成されるベバシズマブもしくはその断片の量を強化する (例えば、力価を強化する) 細胞培養培地組成物並びに本明細書に記載した方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片を含む組成物である。

40

【0007】

したがって、1つの態様では、本発明は、ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する工程を含み、細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含み、及び細胞がベバシズマブもしくはその断片を生成する方法を提供する。また別の実施態様では、細胞培養培地は銅及びインスリンを含む。さらにまた別の実施態様では、細胞培養培地は銅及びシスチンを含む。さらにおまた別の実施態様では、細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む。またさらに別の実施態様では、細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンを含む。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地はさらに、植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を含むことができる。本明細書の実施態様の

50

一部では、細胞培養培地は表1に列挙した濃度から選択される濃度で銅を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は表1に列挙した濃度から選択される濃度でインスリンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は表1に列挙した濃度から選択される濃度でシスチンを含む。銅、インスリン及び/又はシスチンの量、例えば表1に提供した量の任意の組合せは、ありとあらゆる量の組合せが明確及び個別に列挙された場合と同一であると企図されると理解されている。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約7.0mg/L-約11.0mg/Lの濃度でインスリンを含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約69.0nM-約400.0nMの濃度で銅を含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約0.8mM-約2.5mMの濃度でシスチンを含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約5.6g/L-約38.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約1.4g/L-約6.2g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含むことができる。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は基底細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも1つを含む基底細胞培養培地であり、このとき基底細胞培養培地には(例えば、細胞培養サイクル開始後のある期間に、例えば細胞培養サイクルの少なくとも1回、2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回等)、インスリン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか1つ以上を含むフィード細胞培養培地が補給される。別の変形では、フィード細胞培養培地は、インスリン、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物、システイン及びシスチンのうちの何れか1つ以上を含む。別の変形では、フィード細胞培養培地は、インスリン、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物及びシステインを含む。別の変形では、フィード細胞培養培地は、インスリン、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物及びシスチンのうちの何れか1つ以上を含む。フィード細胞培養培地は、インスリン、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物、システイン及びシスチンのうちの何れか1つ以上を本明細書に提供した何れかの量で含んでいてよい。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地はインスリンを含み、本方法はさらに細胞培養培地に追加量のインスリンを(例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で)加える工程を含む。一部の実施態様では、追加量のインスリンは、表1に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回細胞培養培地に加えられる。また別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも3回細胞培養培地に加えられる。さらにまた別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも6回細胞培養培地に加えられる。本明細書の実施態様の一部では、追加量のインスリンは、約5.6mg/L-約66.0mg/Lの濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を(例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で)加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物は表1に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞(例えば、ベバシズマブもしくはその断片を生成できるCHO細胞)は、約28-約37又は約31-約37の範囲内の温度で培養できる。本明細書の実施態様の何れかでは、ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地中に分泌させることができる。本明細書の実施態様の何れかでは、本方法は、細胞培養からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含むことができる。特定の変形では、回収されたベバシズマブが精製される。

10

20

30

40

50

【0008】

さらに本明細書で提供されるのは、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物並びに任意選択的に銅、インスリン及び／又はシスチンを含む細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片を生成する方法である。1つのそのような態様では、動物由来加水分解物は、植物由来加水分解物より多い量で存在する。1つのそのような变形では、動物由来加水分解物は、細胞培養培地中に約5.6g/L - 約38.0g/Lもしくは約7.0g/L - 約35.0g/Lもしくは約7.0g/L - 約25.0g/Lもしくは約7.0g/L - 約15.0g/Lもしくは約8.0g/L - 約12.0g/Lもしくは約7.0g/L - 約11.0g/L又は5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L、30g/L、35g/L、40g/L、45g/Lもしくは50g/Lのうちのおよそ何れか1つ、又は5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L、11g/Lもしくは12g/Lのうちのおよそ何れか1つ、又は約10g/Lの濃度で存在する。別の变形では、植物由来加水分解物は、細胞培養培地中に約1.4g/L - 約6.2g/Lもしくは約1.5g/L - 約5.5g/Lもしくは約1.5g/L - 約4.5g/Lもしくは約1.5g/L - 約3.5g/Lもしくは約1.5g/L - 約2.5g/Lもしくは約1.75g/L - 約2.75g/Lもしくは約2.0g/L - 約3.0g/Lもしくは約2.25g/L - 約2.75g/L又は約1.75g/L、2.0g/L、2.25g/L、2.5g/L、3.0g/L、3.25g/L、3.5g/L、3.75g/Lもしくは4.0g/Lのうちの何れか1つ、又は2.0g/L、2.25g/L、2.5g/Lもしくは3.0g/Lのうちのおよそ何れか1つ、又は約2.5g/Lの濃度で存在する。動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の量のありとあらゆる組合せはありとあらゆる組合せが明確及び個別に列挙されたのと同様に記載されていると理解される。
10
20

【0009】

一部の態様では、本発明は、本明細書に記載した方法の何れかにより生成されたベバシズマブもしくはその断片を提供する。

【0010】

他の態様では、本発明は：(i)本明細書に記載した方法の何れかにより生成されたベバシズマブもしくはその断片、及び(ii)薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0011】

一部の態様では、本発明は、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法であって、哺乳動物細胞を、銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含む細胞培養培地と接触させる工程を含む方法をさらに提供する。また別の実施態様では、細胞培養培地は銅及びインスリンを含む。さらにまた別の実施態様では、細胞培養培地は銅及びシスチンを含む。さらになおまた別の実施態様では、細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む。またさらに別の実施態様では、細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンを含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地はさらに、植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約7.0mg/L - 約11.0mg/Lの濃度でインスリンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約69.0nM - 約400.0nMの濃度で銅を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約0.8mM - 約2.5mMの濃度でシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約5.6g/L - 約38.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約1.4g/L - 約6.2g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は基底細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地はフィード細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも1つを含む基底細胞培養培地であり、このとき基底細胞培養培地には（例えば、細胞培養サイクル開始後の期間に、例えば細胞培養サイクルの少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回
30
40
50

、少なくとも 5 回、少なくとも 6 回、少なくとも 7 回等)、インスリン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか 1 つ以上を含むフィード細胞培養培地が補給される。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地はインスリンを含み、本方法は追加量のインスリンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む。別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも 1 回細胞培養培地に加えられる。また別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも 3 回細胞培養培地に加えられる。さらにまた別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも 6 回細胞培養培地に加えられる。一部の実施態様では、追加量のインスリンは、約 5 . 6 mg / L - 約 66 . 0 mg / L の濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を(例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で)加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物は表 1 に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の一部では、細胞は、約 28 - 約 37 又は約 31 - 約 37 の範囲にわたる温度で培養される。本明細書の実施態様の何れかでは、ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地中に分泌させることができる。本明細書の一部の実施態様では、哺乳動物細胞は細胞の増殖期中に細胞培養培地と接触させられる。本明細書の一部の実施態様では、哺乳動物細胞は細胞の産生期中に細胞培養培地と接触させられる。

10

20

30

40

50

【0012】

他の態様では、本発明は、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地を補給するためのキットであって、成分(i) - (i i i) : (i) 細胞培養培地中の約 7 . 0 mg / L - 約 11 . 0 mg / L のインスリンを提供する量にあるインスリン；(i i) 細胞培養培地中の約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM のシスチンを提供する量にあるシスチン；及び(i i i) 細胞培養培地中の約 25 . 0 nM - 約 400 . 0 nM の銅を提供する量にある銅のうちの少なくとも 2 つを含むキットを提供する。一部の実施態様では、キットは植物由来加水分解物をさらに含む。また別の実施態様では、キットは、細胞培養培地中の約 1 . 4 g / L - 約 6 . 2 g / L の植物由来加水分解物を提供する量にある植物由来加水分解物を含む。本明細書の実施態様の何れかでは、キットは、動物由来加水分解物をさらに含む。一部の実施態様では、キットは、細胞培養培地中の約 5 . 6 g / L - 約 38 . 0 g / L の動物由来加水分解物を提供する量にある動物由来加水分解物を含む。キットは、細胞培養培地を補給する際に使用するための説明書等の使用説明書を追加して含有していてよい。

【0013】

別の態様では、本発明は、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地であって、成分(i) - (i i i) : (i) 約 7 . 0 mg / L - 約 11 . 0 mg / L のインスリン；(i i) 約 25 . 0 nM - 約 400 . 0 nM の銅；及び(i i i) 約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM のシスチンのうちの少なくとも 2 つを含む細胞培養培地を提供する。一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 7 . 0 mg / L - 約 11 . 0 mg / L のインスリン；及び約 25 . 0 nM - 約 400 . 0 nM の銅を含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 7 . 0 mg / L - 約 11 . 0 mg / L のインスリン及び約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM のシスチンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 25 . 0 nM - 約 400 . 0 nM の銅；及び約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM のシスチンを含む。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は、約 1 . 4 g / L - 約 6 . 2 g / L の植物由来加水分解物をさらに含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は、約 5 . 6 g / L - 約 38 . 0 g / L の動物由来加水分解物をさらに含むことができる。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は、(a)ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞；及び(b)本明細書に提供した何れかの細胞培養培地を含む組成物をさらに提供する。

【0015】

別の態様では、本発明は、(a)ベバシズマブもしくはその断片；及び(b)本明細書に提供した何れかの細胞培養培地を含む組成物を提供する。また別の実施態様では、ベバシズマブもしくはその断片は、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞によって培地中に分泌される。

【0016】

一部の態様では、本明細書にさらに提供されるのは、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞由来のベバシズマブもしくはその断片の力価を強化する方法であって、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する工程を含み、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する方法に比較して力価が強化させられる方法である。一部の実施態様では、細胞培養培地は銅及びインスリンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は銅及びシスチンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンを含む。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地はさらに、植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約7.0mg/L-約11.0mg/Lの濃度でインスリンを含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約69.0nM-約400.0nMの濃度で銅を含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約0.8mM-約2.5mMの濃度でシスチンを含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約5.6g/L-約38.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含むことができる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は約1.4g/L-約6.2g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含むことができる。一部の実施態様では、細胞培養培地は基底細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地はフィード細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも1つを含む基底細胞培養培地であり、このとき基底細胞培養培地には(例えば、細胞培養サイクル開始後のある期間に、例えば細胞培養サイクルの少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回等)、インスリン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか1つ以上を含むフィード細胞培養培地が補給される。一部の実施態様では、細胞培養培地はインスリンを含み、本方法は追加量のインスリンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む。別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回細胞培養培地に加えられる。また別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも3回細胞培養培地に加えられる。さらにまた別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも6回細胞培養培地に加えられる。本明細書の一部の実施態様では、追加量のインスリンは、約5.6mg/L-約66.0mg/Lの濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を(例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で)加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物は表1に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞は、約28-約37又は約31-約37の範囲にわたる温度で培養されてよい。本明細書の実施態様の何れかでは、ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地中に分泌させることができる。本明細書の実

10

20

30

40

50

施態様の何れかでは、本方法は、細胞培養からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含むことができる。別の態様では、回収されたベバシズマブもしくはその断片は精製される。

【0017】

別の態様では、本発明は、本明細書ではインスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法であって、ベバシズマブもしくはその断片の力価がインスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する方法に比較して強化される方法を提供する。一部の実施態様では、細胞培養培地は銅及びインスリンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は銅及びシスチンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地はさらに、植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約7.0mg/L-約11.0mg/Lの濃度でインスリンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約69.0nM-約400.0nMの濃度で銅を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約0.8mM-約2.5mMの濃度でシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約5.6g/L-約38.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約1.4g/L-約6.2g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は基底細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも1つを含む基底細胞培養培地であり、このとき基底細胞培養培地には(例えば、細胞培養サイクル開始後のある期間に、例えば細胞培養サイクルの少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回等)、インスリン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか1つ以上を含むフィード細胞培養培地が補給される。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地はインスリンを含むことができ、本方法は追加量のインスリンを細胞培養培地に加える工程をさらに含むことができる。別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回細胞培養培地に加えられる。また別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも3回細胞培養培地に加えられる。さらにまた別の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも6回細胞培養培地に加えられる。本明細書の実施態様の一部では、追加量のインスリンは、約5.6mg/L-約66.0mg/Lの濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を(例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で)加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物は表1に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を提供する量で加えられる。本明細書の実施態様の一部では、細胞は、約28-約37又は約31-約37の範囲にわたる温度、例えば約31、33もしくは35の温度で培養される。温度は、細胞培養工程を通して、約28-約37の範囲にわたる温度内で(上又は下の何れかに)変動してよいと理解されている。1つの態様では、細胞は、第1期間(例えば約1-10もしくは1-8もしくは1-7日間)は約35の第1温度で培養され、第2期間(例えば約1-5もしくは1-4もしくは1-3もしくは1-2日間)は約33の第2温度で培養され、第3期間(例えば約1-5もしくは1-4もしくは1-3もしくは1-2日間)は約31の第3温度で培養される。本明細書の実施態様の何れかでは、ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地中に分泌させることができる。一部の実施態様では、本方法は、細

10

20

30

40

50

胞培養からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含む。1つの態様では、回収されたベバシズマブもしくはその断片は精製される。

【0018】

別の態様では、本発明は、ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）を培養する工程を含み、細胞培養サイクル中の初期細胞培養培地は、約6.9nM-約1,000nMの濃度の銅、約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度のインスリン及び約0.7mM-約2.0mMの濃度のシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含み、細胞がベバシズマブもしくは断片を生成する。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は、（1）銅及びインスリン；（2）銅及びシスチン；（3）インスリン及びシスチン；又は（4）銅、インスリン及びシスチンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約10.0mg/L-約50.0mg/Lの濃度でインスリンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約10.0mg/L-約20.0mg/Lの濃度でインスリンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約10.0mg/L-約10.0mg/L、15mg/L、20.0mg/L及び25mg/Lの濃度でインスリンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約325nM-約375nMの濃度で銅を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約325nM-約350nMの濃度でシスチンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約0.7mM-約2.0mMの濃度でシスチンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約1.0mM-約1.6mMの濃度でシスチンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は1.0mM、1.2mM、1.3mM、1.4mM、1.5mM及び1.6mMのうちのおよそ何れか1つの濃度でシスチンを含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は、動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約6.0g/L-約20.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約8.0g/L-約12.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約9.0g/L-約11.0g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約13g/Lの濃度で動物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約1.0g/L-約10.0g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は約2.0g/L-約3.0g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は約2.25g/L-約2.75g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は約2.5g/Lの濃度で植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、動物由来加水分解物は植物由来加水分解物より多い量で存在する。一部の実施態様では、初期細胞培養培地はインスリンを含み、本方法は細胞培養サイクル中に追加量のインスリンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む。一部の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回又は少なくとも6回細胞培養培地に加えられる。一部の実施態様では、各時点に加えられるインスリンは、約5mg/L-約25mg/Lである。一部の実施態様では、各時点に加えられるインスリンは、5mg/L、10mg/L、15mg/L、20mg/L及び25mg/Lのおよそ何れか1つである。一部の実施態様では、細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量は、約20mg/L-約100mg/Lである。一部の実施態様では、細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量は、20mg/L、25mg/L、30mg/L、35mg/L、40mg/L、45mg/L、50mg/L、55mg/L、60mg/L、65mg/L、70mg/L、75mg/L、80mg/L、85mg/L、90mg/L、95mg/L及び100mg/Lのおよそ何れか1つである。一部の実施態様では、初期細胞培養培地はシスチンを含み、本方法は細胞培養サイクル中に追加量のシスチンを細胞培養

10

20

30

40

50

培地に加える工程をさらに含む。一部の実施態様では、シスチンは、細胞培養培地中に約 0.1 mM - 約 1.5 mM の追加のシスチンを提供する量で加えられる。一部の実施態様では、シスチンは、細胞培養培地中に約 0.4 mM - 約 0.7 mM (例えば、約 0.4 mM - 約 0.6 mM, 約 0.4 mM - 約 0.5 mM) の追加のシスチンを提供する量で加えられる。一部の実施態様では、シスチンは細胞培養サイクル中にバッチフィードで加えられる。一部の実施態様では、本方法は細胞培養サイクル中に少なくとも 1 バッチフィードをさらに含む。一部の実施態様では、1 バッチフィードは第 3 日 (例えば、14 日間細胞培養サイクル中ににおいて) に行われる。一部の実施態様では、本方法は細胞培養サイクル中に少なくとも 2、3 もしくは 4 バッチフィードを含む。一部の実施態様では、本方法は、第 3 日の第 1 バッチフィード及び第 6 日の第 2 バッチフィード (例えば、14 日間細胞培養サイクル中ににおいて) を含む。一部の実施態様では、バッチフィード培地は、動物由来加水分解物及び / 又は植物由来加水分解物を含む。一部の実施態様では、細胞培養サイクル中に、培地の温度は、培養の開始時の温度に比較して、少なくとも約 2、少なくとも約 3、少なくとも約 4 もしくは少なくとも約 5 低下させられる。一部の実施態様では、培地の温度は、細胞培養サイクル中に少なくとも 1 回又は少なくとも 2 回低下させられる。一部の実施態様では、温度は培養する工程の開始後の第 8 日及び第 10 日に低下させられる。一部の実施態様では、細胞は、約 31 - 約 35 の範囲にわたる温度で培養される。一部の実施態様では、細胞は、第 1 期間は約 35 の第 1 温度で培養され、第 2 期間は約 33 の第 2 温度で培養され、第 3 期間は約 31 の第 3 温度で培養される。一部の実施態様では、細胞は約 7.0 - 約 7.3 の pH を有する培地中で培養される。一部の実施態様では、本方法は、(a) 約 10 mg / L のインスリン、約 325 nM - 約 350 nM の銅及び約 1.3 mM のシスチンを含む初期細胞培養培地中で培養する工程 ; (b) 培養する工程の開始後の第 3 日に約 15 mg / L の濃度の追加のインスリンを提供するために細胞培養培地に第 1 バッチフィード及びインスリンフィードを提供する工程 ; 及び (c) 培養する工程の開始後の第 6 日に約 0.4 mM - 約 0.7 mM の濃度の追加のシスチンを提供するために細胞培養培地にシスチンを含む第 2 バッチフィードを提供する工程を含み、このとき細胞は約 35 の初期温度で培養され、温度は第 8 日に約 33 へ低下させられ、培養する工程の開始後の第 10 日に約 31 へさらに低下させられる。一部の実施態様では、細胞培養サイクルは 14 日間細胞培養サイクルである。一部の実施態様では、ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地中に分泌させられる。一部の実施態様では、本方法は、細胞培養からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含む。別の態様では、本発明は、本明細書に記載した方法の何れかにより生成されたベバシズマブもしくはその断片を提供する。他の態様では、本発明は、(i) 上述の方法の何れかにより生成されたベバシズマブもしくはその断片及び (ii) 薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。本明細書に記載した様々な実施態様の 1 つ、一部もしくは全部は本発明の他の実施態様を形成するために結合されてよいと理解すべきである。

【 0019 】

本明細書は、当業者が本発明を実施することを可能にするために十分であると考えられる。本明細書に示して記載した実施態様に加えて本発明の様々な修飾は、上記の説明から当業者には明白になり、添付の特許請求の範囲内に含まれるであろう。本明細書に言及した全ての刊行物、特許及び特許出願は、あらゆる目的のためにその全内容が本明細書に出典明示により援用される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0020 】

【 図 1 】インスリンが補給された細胞培養培地中で培養されたベバシズマブ産生 CHO 細胞からの抗体力価収率の増加を示す一連のグラフである。図 1 A 及び図 1 B は、ベバシズマブを産生する CHO 細胞の 14 日間細胞培養中に評価された 6 種の細胞培養手順の実験における抗体力価を示す図である。抗体産生は力価 (mg / L) として表示した。図 1 A は、第 3 日の 1 バッチフィードの結果を示している。図 1 B は、第 3 日の 1 バッチフィード及び第 6 日の第 2 バッチフィードの結果を示している。

10

20

30

40

50

【図2】細胞齢との関係としての14日間細胞培養サイクル中の1もしくは2バッチフィードが提供された細胞培養による細胞バイオマス蓄積及び抗体産生に及ぼす作用を示す一連のグラフである。図2Aは、第3日の1バッチフィード及び第6日の第2バッチフィードが提供されたベバシズマブ産生CHO細胞と比較して、第3日の1バッチフィードが提供されたベバシズマブ産生CHO細胞中の細胞バイオマス蓄積を示す図である。1フィード工程に対して $p < 0.004^*$; 2フィード工程に対して $p < 0.018^*$ 。図2Bは、第3日の1バッチフィード及び第6日の第2バッチフィードが提供されたベバシズマブ産生CHO細胞と比較して、第3日の1バッチフィードが提供されたベバシズマブ産生CHO細胞からの抗体産生を示す図である。1フィード工程に対して $p < 0.042^*$; 2フィード工程に対して $p < 0.82$ 。*は有意値を示す。「1」は第3日に1バッチフィードが供給された細胞を示す；「2」は第3日に1バッチフィード及び第6日に2バッチフィードが供給された細胞を示す。

【図3】新規細胞培養工程において増殖したベバシズマブ産生CHO細胞からの抗体収率の増加を示すグラフである。手順1(三角形)は手順2の細胞培養工程とは異なる細胞培養工程を示す；手順2(ダイアモンド形)は新規の細胞培養工程を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

ベバシズマブもしくはその断片の改良された費用効率的な生成方法が提供される。細胞がベバシズマブもしくはその断片の許容される生成物の品質特性を維持しながら所望量のベバシズマブもしくはその断片を生成することを可能にする成分を含む細胞培養培地について記載する。本明細書に提供した細胞培養培地は、製造規模の量のベバシズマブもしくはその断片を生産する際に利用することができる。

【0022】

(i) ベバシズマブもしくはその断片を生産する方法；(ii) ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法；及び(iii) ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞からベバシズマブもしくはその断片の生成を強化する(例えば、ベバシズマブもしくはその断片の力価収率を強化する)方法を含む本明細書に提供した方法は、1つの態様では、銅、インスリン及びシスチンのうちの2つ以上を含む細胞培養培地(例えば銅及びインスリンを含む細胞培養培地、又は銅及びシスチンを含む細胞培養培地、又はインスリン及びシスチンを含む細胞培養培地、又は銅、インスリン及びシスチンを含む細胞培養培地)を利用する。本明細書に詳述した方法の何れかによって生成されたベバシズマブもしくはその断片もまた、ベバシズマブもしくはその断片を含む組成物と同様に提供される。1つの態様では、本明細書に詳述した方法の何れかによって生成されたベバシズマブもしくはその断片は、例えばN-グリコシル化プロファイル、電荷不均質性及び配列完全性等のベバシズマブもしくはその断片の許容される製品品質特性を示す。特定の変形では、ベバシズマブもしくはその断片の製品品質特性は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地を使用しない方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片に実質的に類似する場合は許容される。銅、インスリン及びシスチンのうちの2つ以上を含む細胞培養培地(例えば、(i)銅及びインスリン；(ii)銅及びシスチン；(iii)インスリン及びシスチン；又は(iv)銅、インスリン及びシスチンを含む細胞培養培地)もまた提供される。1つの変形では、銅、インスリン及びシスチンのうちの2つ以上を含む細胞培養培地は、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する工程に比較して、培地中で培養された哺乳動物細胞によってベバシズマブもしくはその断片を強化する(例えば、ベバシズマブもしくはその断片の力価収率を強化する)。本明細書にさらに提供されるのは、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つ並びに(i)ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞及び/又は(ii)ベバシズマブもしくはその断片を含む細胞培養培地を含む組成物である。本明細書に提供した細胞培養培地の何れかを含む培養容器が提供される。1つの態様では、培養容器は、細胞培養から製造規模量のベバシズマブを生成するために必

10

20

30

40

50

要とされるように、少なくとも 2 L (リットル)、少なくとも 10 L、少なくとも 100 L、少なくとも 500 L、少なくとも 1,000 L、少なくとも 2,500 L、少なくとも 5,000 L、少なくとも 7,500 L、少なくとも 10,000 L、少なくとも 12,000 L 以上の本明細書に提供した細胞培養培地を含有することができる培養容器等の製造規模の培養容器である。そこで、本明細書に提供した方法は、ベバシズマブもしくはその断片を製造規模生産する際に利用することができる。

【0023】

I. 用語の定義

用語「ベバシズマブ」は、「r h u M A b V E G F」もしくは「AVASTIN (登録商標)」としても公知である、Presta等, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599にしたがって生成された組換え型ヒト化抗VEGFモノクローナル抗体を意味する。ベバシズマブは、突然変異ヒトIgG1フレームワーク領域及びヒトVEGFのその受容体への結合をブロックするマウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体A.4.6.1由来の抗原結合相補性決定領域を含む。フレームワーク領域の大半を含むベバシズマブのアミノ酸配列のおよそ 93 % はヒトIgG1に由来し、この配列の約 7 % はマウス抗体A4.6.1に由来する。ベバシズマブは、ハイブリドーマ ATCC HB 10709 によって生成されたモノクローナル抗VEGF抗体A4.6.1と同一エピトープに結合する。ベバシズマブ及び他のヒト化抗VEGF抗体は、さらに米国特許第 6 8 8 4 8 7 9 号に記載されている。

10

【0024】

用語「培地」及び「細胞培養培地」は、細胞を増殖又は維持するために使用される栄養源を意味する。当業者であれば理解できるように、栄養源は、細胞が増殖及び/又は生存のために必要とする成分を含有していてよい、又は細胞の増殖及び/又は生存に役立つ成分を含有していてよい。ビタミン類、必須もしくは非必須アミノ酸（例えば、システイン及びシスチン）並びに微量元素（例えば、銅）は、培地成分の例である。本明細書に提供した任意の培地には、さらにまたインスリン、植物性加水分解物及び動物性加水分解物のうちの 1 つ以上が補給されてよい。

20

【0025】

細胞を「培養する工程」は、細胞の生存及び/又は成長及び/又は増殖に適合する条件下で、細胞を細胞培養培地と接触させる工程を意味する。

30

【0026】

「バッチ培養」は、細胞培養のための全成分（細胞及び全培養栄養素を含む）が培養工程の開始時に培養容器に供給される培養を意味する。

【0027】

本明細書で使用する「フェドバッチ細胞培養」は、細胞及び培養バッチが最初に培養容器に供給され、追加の培養栄養素が連続的に、もしくは個々に少しづつ、培養終了前に定期的な細胞及び/又は生成物回収を行いながら、又は行わずに、培養工程中の培養に供給されるバッチ培養を意味する。

【0028】

「灌流培養」は、細胞が培養中に、例えば、濾過、カプセル封入、マイクロキャリアへの固定によって拘束され、培養培地は連続的もしくは間欠的に培養容器に導入され、培養容器から取り出される培養である。

40

【0029】

「培養容器」は、細胞を培養するために使用される容器を意味する。培養容器は、細胞を培養するために有用である限り、任意のサイズであってよい。

【0030】

本明細書で使用する用語「力価」は、所定量の培地容積で分割された細胞培養により生成された組換え発現抗体の総量を意味する。力価は、典型的には抗体/培地 (mg / mL) の単位で表示される。力価は、様々な培養条件下でタンパク質性生物を得る工程に比較した力価の増加率 (%) 等の相対測定によって表示もしくは評価することができる。

50

【0031】

「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、及び/又はそれらのアナログ、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼによって、もしくは合成反応によってポリマー内に組み込むことのできる任意の基質であってよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらのアナログを含んでいてよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーのアセンブリの前もしくは後に付与されてよい。

【0032】

「単離核酸」は、通常の状況の外側にある、又は分離されている非天然型、組換え型もしくは天然型配列を意味して含んでいる。単離核酸分子は、実際はその中で見いだされる形態もしくは状況以外にある。このため単離核酸分子は、自然細胞中に存在するような核酸分子とは識別される。しかし、単離核酸分子は、通常は、例えばその中では核酸分子が自然細胞の位置とは異なる染色体位置にあるタンパク質を発現する細胞中に含有される核酸分子を含む。

10

【0033】

「単離」タンパク質（例えば、単離抗体）は、その自然環境の成分から同定及び分離及び/又は回収されているタンパク質である。その自然環境の汚染物質成分は、タンパク質についての研究、診断もしくは治療使用を妨害するであろう物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質を含んでいてよい。単離タンパク質は、組換え細胞内のインサイチュータンパク質を含むが、それはタンパク質の自然環境の少なくとも1つの成分は存在しないであろうからである。しかし通常は、単離タンパク質は、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

20

【0034】

「精製」タンパク質（例えば、抗体）は、タンパク質が自然環境内に存在する場合より、及び/又は実験室条件下で最初に生成された、及び/又は合成された、及び/又は増幅させられた場合より純粋である形態で存在するように、純度が増加させられていることを意味する。純度は相対語であり、必ずしも絶対純度を意味しない。

30

【0035】

「汚染物質」は、所望のタンパク質産物とは異なる（例えば、抗体産物とは異なる）物質を意味する。汚染物質には、制限なく、宿主細胞物質、例えばCHOP；核酸；所望のタンパク質の変異体、断片、凝集体もしくは誘導体；別のポリペプチド；エンドトキシン；ウイルス性汚染物質；細胞培養培地成分等が含まれてよい。

【0036】

本明細書の用語「抗体」は、極めて広い意味で使用され、詳細にはモノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及びそれらが所望の生物学的活性を示す限り抗体断片を包含する。抗体は、ヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟であってよい。

40

【0037】

本明細書で使用する用語「全長抗体」、「完全抗体」及び「全抗体」は、本明細書では下記に規定する抗体断片ではなく実質的に完全な形態にある抗体を意味するために互換的に使用される。これらの用語は特に、Fc領域を含有する重鎖を有する抗体を意味する。

【0038】

「抗体断片」は、好ましくはその抗原結合領域を含む、完全抗体の一部分を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ；線形抗体；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0039】

抗体のパパイン消化は、それらの名称は容易に結晶化する能力を反映している、各々が单一抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片及び残留「Fc」断片を生成する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋結合できるF(ab')₂断片を产生する。Fab断片は、重鎖及び軽鎖可変ドメ

50

インを含有し、さらに軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1定常ドメイン（C H 1）も含有する。F a b' 断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の添加によってF a b断片とは異なる。F a b' - S Hは、本明細書でのその中で定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するF a b'についての名称である。F (a b')₂抗体断片は、最初はそれらの間にヒンジシステインを有する対のF a b'断片として生成された。抗体断片の他の化学的結合もまた公知である。

【0040】

「F v」は、完全抗原結合部位を含有する最小抗体断片である。1つの実施態様では、二本鎖F v種は、密接に非共有会合している1本の重鎖及び1本の軽鎖可変ドメインのダイマーから成る。一本鎖F v (s c F v)種では、1本の重鎖可変ドメイン及び1本の軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が二本鎖F v種内の構造に類似する「ダイマー」構造に会合できるように柔軟性ペプチドリンカーによって共有結合させることができる。この構成において、各可変ドメインの3つのH V R sは相互作用してV H - V Lダイマーの表面上の抗原結合部位を規定する。集合的に、6つのH V R sは、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし単一可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な3つのH V R sだけを含むF vの半分）さえ、全結合部位より低い親和性ではあるが抗原を認識して結合する能力を有する。

【0041】

「一本鎖F v」もしくは「s c F v」抗体断片は、抗体のV H及びV Lドメインを含むが、このときこれらのドメインは単一ポリペプチド鎖中に存在する。一般に、s c F vポリペプチドはさらに、s c F vが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするV H及びV Lドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。s c F vの概要については、例えば、Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Roseburg and Moore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315, 1994を参照されたい。

【0042】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を意味し、例えば、集団を含む個別抗体は、少量で存在する可能性がある、可能性のある突然変異、例えば、天然型突然変異を除いて同一である。そこで、修飾語「モノクローナル」は、抗体の特性が別個の抗体の混合物ではないことを指示する。所定の実施態様では、そのようなモノクローナル抗体は、典型的には標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体であって、標的結合ポリペプチド配列は複数のポリペプチド配列からの単一標的結合ポリペプチド配列の選択を含む工程によって得られた抗体を含む。例えば、選択工程は、複数のクローニングから、例えばハイブリドーマクローニング、ファージクローニングもしくは組換えDNAクローニングのプールからの独特の固有のクローニングの選択であってよい。選択された標的結合配列は、例えば、標的に対する親和性を改良する、標的結合配列をヒト化する、細胞培養における生産を改良する、インビオ免疫原性を低下させる、多重特異性抗体を作製する等のためにさらに変化させられること、及び変化した標的結合配列を含む抗体もまた本発明のモノクローナル抗体であることを理解すべきである。典型的には様々な決定因子（エピトープ）に向けられた様々な抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクローナル抗体製剤の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定因子に向けられる。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体製剤は、それらが典型的には他の免疫グロブリンによって汚染されていないという点で有益である。

【0043】

修飾語句「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体集団から得られる抗体の特性を意味しており、何れかの特定方法による抗体の生成を必要とすると見なすべきではない。例えば、本発明によって使用できるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo等, Hybridoma, 14 (3) : 253-260 (1995), Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling等, in: Monoclonal Antibodies and T-

10

20

30

40

50

Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法（例えば、米国特許第4816567号を参照）、ファージディスプレイテクノロジー（例えば、Clackson等, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee等, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 及びLee等, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)を含む様々な技術並びにヒト免疫グロブリン遺伝子座もしくはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部もしくは全部を有する動物においてヒトもしくはヒト様抗体を產生するための技術（例えば、国際公開第1998/24893号；国際公開第1996/34096号；国際公開第1996/33735号；国際公開第1991/10741号；Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann等, Year in Immunol. 7:33 (1993); 米国特許第5545807号；同第5545806号；同第5569825号；同第5625126号；同第5633425号；及び同第5661016号；Marks等, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 及びLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)を参照されたい）によって作製されてよい。

【0044】

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体、及び／又は本明細書に開示したようなヒト抗体を作製するための何れかの技術を使用して作製されている抗体である。ヒト抗体のこの定義は、詳細には非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を排除する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラーイを含む当分野において公知の様々な技術を使用して生成できる。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。ヒトモノクローナル抗体を調製するためにさらに利用可能であるのは、Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)に記載された方法である。さらにvan Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原投与に応答してそのような抗体を生成するように組み換えられているが、内因性遺伝子座が不能にされているトランスジェニック動物、例えば、xenomouseに抗原を投与する工程によって調製できる（例えば、XENOMOUSE（商標）に関する米国特許第6075181号及び同第6150584号を参照されたい）。さらに、例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマテクノロジーによって生成されるヒト抗体に関するLi等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)も参照されたい。

【0045】

用語「超可変領域」、「HVR」もしくは「HV」は、本明細書で使用する場合は、配列内で超可変性である、及び／又は構造的に明確なループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は、3つはVH (H1、H2、H3)内及び3つはVL (L1、L2、L3)内にある6つのHVRsを含む。自然抗体内では、H3及びL3は6つのHVRsの極めて大きな多様性を提示し、H3は特に、抗体に素晴らしい特異性を付与することに独特の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu等, Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo編, Human Press, Totowa, N.J., 2003)を参照されたい。実際に、重鎖のみから成る天然型ラクダ科(camelid)抗体は、軽鎖の非存在下で機能的及び安定性である。例えば、Hamers-Casterman等, Nature 363:446-448 (1993); Sheriffら, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)を参照されたい。

【0046】

多数のHVRの概要説明が現在使用されており、本明細書に含まれている。カバット相補性決定領域(CDRs)は配列可変性に基づいており、最も一般的に使用されている(

10

20

30

40

50

Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)。Chothiaは、その代わりに構造的ループの場所について言及している (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVRsは、カバットHVRsとコチア構造的ループとの折衷を表し、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアに使用されている。「接触」HVRsは、入手可能である複雑な結晶構造の分析に基づいている。これらのHVRsの各々からの残基を下記に記載した。

ループ	カバット	AbM	コチア	接触	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	10
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (カバット番号付け)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (コチア番号付け)	
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

【0047】

HVRsは、以下のような「伸展したHVRs」: VL内では24-36もしくは24-34(L1)、46-56もしくは50-56(L2)及び89-97もしくは89-96(L3)並びに VH内では26-35(H1)、50-65もしくは49-65(H2)及び93-102、94-102もしくは95-102(H3)を含んでいてよい。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々についてKabat等、上記にしたがって番号付けされる。

20

【0048】

「フレームワーク」もしくは「FR」残基は、本明細書で定義したHVR以外の可変ドメイン残基である。

【0049】

用語「カバットにおけるような可変ドメイン残基番号付け」もしくは「カバットにおけるようなアミノ酸位置番号付け」及びそれらの変形は、Kabat等、上記における抗体の寄せ集めの重鎖可変ドメインもしくは軽鎖可変ドメインに対して使用される番号付けシステムを意味する。この番号付けシステムを用いると、現実の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはHVRの短縮又は可変ドメインのFRもしくはHVR内への挿入に対応するより少数もしくは追加のアミノ酸を含有することができる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52後の單一アミノ酸インサート(カバットによる残基52a)及び重鎖FR残基82後の挿入残基(例えば、カバットによる残基82a、82b及び82c等)を含んでいてよい。残基のカバット番号付けは、所定の抗体について抗体の配列と「標準」カバット番号付け配列との相同性の領域でのアラインメントによって決定することができる。

30

【0050】

カバット番号システムは、一般には可変ドメイン内の残基(軽鎖のおよそ残基1-107及び重鎖の残基1-113)について言及する場合に使用される(例えば、Kabat等, *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。「EU番号付けシステム」もしくは「EU指数」は、一般に免疫グロブリン重鎖定常領域内の1つの残基について言及する場合に使用される(例えば、Kabat等、上記参照に報告されたEU指数)。「カバットにおけるようなEU指数」は、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを意味する。

40

【0051】

用語「医薬製剤」は、有効成分の生物活性が有効であることを許容するような形態にある、及びその製剤が投与されるであろう被験者にとって許容されないほど毒性である追加

50

の成分を含有していない調製物を意味する。そのような製剤は無菌である。

【0052】

「薬学的に許容される」担体、賦形剤もしくは安定剤は、使用される用量及び濃度でそれらに曝露させられる細胞もしくは哺乳動物にとって非毒性である担体、賦形剤もしくは安定剤である (Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition)編, A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。生理学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液であることが多い。生理学的に許容される担体の例には、バッファー、例えばリン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシン；グルコース、マンノースもしくはデキストリン類を含む单糖類、二糖類及び他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖アルコール、例えばマンニトールもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTween (商標)、ポリエチレングリコール(PEG)及びPluronics (商標)が含まれる。

10

【0053】

「無菌」製剤は、無菌である、又は全ての生きている微生物及びそれらの胞子を含まない、もしくは本質的に含まない。

【0054】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用する单数形の「1つの」及び「この」は、状況が明確に他のことを指示しない限り、複数形を含む。そこで、例えば、「1つの化合物」との言及は、2つ以上のそのような化合物の組合せ等を含んでいてもよい。

20

【0055】

本明細書に記載した本発明の態様及び実施態様は、「含む」、「から成る」及び「本質的に～から成る」態様及び実施態様を含む。

【0056】

本明細書における「約」値又はパラメーターとの言及には、当該値又はパラメーター自体に向けられている実施態様を含む(及び記述する)。例えば、「約X」を言及する記述は、「X」の記述を含む。数値範囲は、範囲を定義する数を含めている。

30

【0057】

本発明の態様もしくは実施態様がマーカッシュグループもしくは他の代替物のグループ分けによって記載された場合は、本発明は全体として列挙したグループ全体だけではなく、グループの各メンバーを個別的に及び主要グループの全ての可能性のあるサブグループを、さらにまたグループメンバーの1つ以上が存在しない主要グループも包含する。本発明はさらに、請求の範囲に記載された発明におけるグループメンバーの何れか1つ以上の明示的排除もまた想定している。

【0058】

I I . 細胞培養培地

本明細書に提供した細胞培養培地は、本明細書に詳述する方法(例えば、ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法；ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法；及び/又は例えばベバシズマブをコードする核酸を含む哺乳動物細胞からのベバシズマブの力価収率を強化することによる等、ベバシズマブもしくはその断片の生産を強化する方法)並びに組成物(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つ並びに(i)ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞及び/又は(ii)ベバシズマブもしくはその断片を含む細胞培養培地を含む組成物)において利用することができる。

40

【0059】

一部の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、ベバシズマブもしくはその断片を培養する際に使用できる成分(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つ)を含むが、このとき細胞は、培地成分(例えば、銅、インスリン及びシスチンの

50

うちの少なくとも 2 つ) の存在下で培養された場合、培地成分を含有していない細胞培養培地(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも 2 つを含有していない細胞培養培地) 中で培養された細胞によって生成されるベバシズマブの量より多い量であつてよい所望の量でベバシズマブもしくはその断片を生成する。1 つの態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、ベバシズマブもしくはその断片を生成する細胞を培養する際に使用されるが、このとき細胞は、培地成分(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも 2 つ) の存在下で培養された場合、例えば所望量で許容される分子量等の許容される品質特性を有するベバシズマブもしくはその断片を生成する。本明細書で使用するベバシズマブの「許容される品質特性」は、ベバシズマブの規制当局の許可もしくは市販のために必要とされる化学的及び/又は物理的特性を意味することができ、細胞によって生成されるベバシズマブもしくはその断片のバッチのロット間一貫性を評価する際に使用される化学的及び/又は物理的特性であつてよい。

10

【0060】

本発明の他の態様では、細胞培養培地成分(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも 2 つ) は、ベバシズマブを生成する、及びそれらの成分を含有していない細胞培養培地(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも 2 つを含有していない細胞培養培地) 中で培養される細胞に比較してベバシズマブのより高度の生産に寄与する(例えば、ベバシズマブのより高い力価を生じさせる) 改良された、もしくは許容される品質特性を有する抗体産生細胞を提供できると同定されている。所定の同定された培地成分(例えば、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも 2 つ) は、1 つの態様では、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも 2 つを含まない細胞培養培地中で細胞がベバシズマブもしくはその断片を生成する場合に得られる力価より高い、許容される力価を有するベバシズマブもしくはその断片を生成する能力を有する抗体産生細胞(例えば、CHO 細胞) を提供するために使用することができる。本明細書で使用する培養細胞から生成された抗体(例えば、CHO 細胞から生成されたベバシズマブ) の「許容される力価」は、非限定的例として、抗体の製造規模生産を満たすために必要とされる抗体の量又は抗体産物のロット間バッチにおける一貫性を評価するために必要とされる抗体の量を意味することができる。本明細書に提供した細胞培養培地は、様々な培地中で培養された細胞から生成されたベバシズマブの量に比較してベバシズマブをコードする核酸を含む細胞から生成されるベバシズマブの量を改良できる。

20

【0061】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地が提供されるが、このとき細胞培養培地は(a) 銅; (b) インスリン; (c) シスチン; (d) 動物由来加水分解物; 及び(e) 植物由来加水分解物のうちの何れか 1 つ以上を含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は、成分(a)、(b)、(c)、(d) 及び(e) のうちの 2 つもしくは 3 つもしくは 4 つもしくは 5 つを含む。本明細書に提供した細胞培養培地は、成分(a)、(b)、(c)、(d) 及び(e) の何れかの組合せを、あたかもありとあらゆる組合せが詳細及び個別に列挙されたかのように含有していてよいと理解されている。例えば、成分(a)、(b)、(c)、(d) 及び(e) のうちの 3 つを含む細胞培養培地は、これらの成分のうちの少なくとも 3 つが存在する限り(例えば、成分(a)、(b) 及び(c) を含む、又は成分(a)、(d) 及び(e) を含む、又は成分(c)、(d) 及び(e) を含む細胞培養培地が企図されている) 成分の任意の組合せを含んでいてよいと理解されている。一部の実施態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、成分(a)、(b)、(c)、(d) 及び(e) を含む。一部の実施態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、成分(a) 及び(b) を含む。一部の実施態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、成分(a) 及び(c) を含む。一部の実施態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、成分(b) 及び(c) を含む。

30

【0062】

一部の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、表 1 に記載した量で銅、インス

40

50

リン、シスチンから成る群から選択される1つ以上の培地成分を含有する。一部の実施態様では、細胞培養培地は、表1に記載した量で動物由来加水分解物をさらに含む。他の実施態様では、細胞培養培地は、表1に記載した量で植物由来加水分解物をさらに含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は、表1に記載した量で動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方をさらに含む。

【0063】

さらに、本明細書に提供した細胞培養培地は、表1の細胞培養培地成分の何れか1つ以上（銅、インスリン、シスチン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか1つ以上）を表1に列挙した何れかの量で、あたかも成分及び量のありとあらゆる組合せが詳細及び個別に列挙されたかのように含んでいてよいことも理解されている。1つの変形では、本明細書に提供した細胞培養培地は、表1に列挙した何れかの量で銅、インスリン、シスチン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの2つもしくは3つもしくは4つもしくは各々を、あたかも成分及び量のありとあらゆる組合せが詳細及び個別に列挙されたかのように含む。1つの態様では、細胞培養培地は、表1に列挙した何れかの量で銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを含み、並びに別の変形では、表1に列挙した何れかの量で動物由来加水分解物及び／又は植物由来加水分解物をさらに含む。

10

【0064】

表 1. 培地成分の代表的な量

成分	培地中の成分の量
(a)インスリン	約 1.0 mg/L-約 100.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 80.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 60.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 50.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 40.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 30.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 25.0 mg/L; 約 10.0 mg/L-約 25.0 mg/L; 約 10.0 mg/L-約 30.0 mg/L; 約 15.0 mg/L-約 20.0 mg/L; 約 5.0 mg/L-約 15.0 mg/L; 約 6.0 mg/L-約 12.0 mg/L; 約 7.0 mg/L-約 11.0 mg/L; 約 8.0 mg/L-約 10.0 mg/L; 約 10 mg/L-約 100 mg/L; 約 10 mg/L-約 50 mg/L; 約 10 mg/L-約 35 mg/L; 約 10 mg/L-約 250 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 66 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 60 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 50 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 40 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 30 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 20 mg/L; 約 1.0 mg/L-約 10 mg/L; 約 10 mg/L-約 66 mg/L; 約 20 mg/L-約 66 mg/L; 約 30 mg/L-約 66 mg/L; 約 40 mg/L-約 66 mg/L; 約 50 mg/L-約 66 mg/L; 約 60 mg/L-約 66 mg/L; 約 5.6 mg/L-約 66 mg/L; 約 10 mg/L-約 60 mg/L; 約 20 mg/L-約 50 mg/L; 約 30 mg/L-約 40 mg/L; 約 1 mg/L-約 14 mg/L; 約 1.3 mg/L-約 13 mg/L; 約 1.6 mg/L-約 12 mg/L; 約 1.4 mg/L-約 11 mg/L; 約 5.6 mg/L-約 14 mg/L; 約 5.9 mg/L-約 13 mg/L; 約 6.2 mg/L-約 12 mg/L; 約 7 mg/L-約 11 mg/L; 1.0 もしくは 2.0 もしくは 3.0 もしくは 4.0 もしくは 5.0 もしくは 6.0 もしくは 7.0 もしくは 8.0 もしくは 9.0 もしくは 10 もしくは 11 もしくは 12 もしくは 13 もしくは 14 もしくは 15 もしくは 16 もしくは 17 もしくは 18 もしくは 19 もしくは 20 もしくは 21 もしくは 22 もしくは 23 もしくは 24 もしくは 25 もしくは 26 もしくは 27 もしくは 28 もしくは 29 もしくは 30 もしくは 31 もしくは 32 もしくは 33 もしくは 34 もしくは 35 もしくは 36 もしくは 37 もしくは 38 もしくは 39 もしくは 40 もしくは 41 もしくは 42 もしくは 43 もしくは 45 mg/L のおよそ何れか; 5.6 mg/L, 6 mg/L, 6.2 mg/L, 7 mg/L, 8 mg/L, 9 mg/L, 10 mg/L, 11 mg/L, 12 mg/L, 13 mg/L, 14 mg/L もしくは 15 mg/L もしくは 16 mg/L もしくは 17 mg/L もしくは 18 mg/L もしくは 19 mg/L もしくは 20 mg/L もしくは 21 mg/L もしくは 22 mg/L もしくは 23 mg/L もしくは 24 mg/L もしくは 25 mg/L の何れか; 少なくとも 1.0 もしくは 3.0 もしくは 5.0 もしくは 7.0 もしくは 10 もしくは 11 もしくは 12 もしくは 13 もしくは 14 もしくは 15 もしくは 16 もしくは 17 もしくは 18 もしくは 19 もしくは 20 mg/L のおよそ何れか及び約 44 もしくは 24 もしくは 14 もしくは 11 mg/L 以下。 10
(b)シスチン	約 0.5 mM-約 2.5 mM; 約 0.5 mM-約 2.0 mM; 約 0.5 mM-約 1.75 mM; 約 0.5 mM-約 2.5 mM; 約 0.8 mM-約 2.5 mM; 約 0.8 mM-約 2.25 mM; 約 0.8 mM-約 2.0 mM; 約 0.8 mM-約 1.75 mM; 約 0.8 mM-約 1.6 mM; 約 0.8 mM-約 1.25 mM; 約 0.8 mM-約 1.0 mM; 約 1.0 mM-約 1.6 mM; 約 1.0 mM-約 2.5 mM; 約 1.25 mM-約 2.5 mM; 約 1.5 mM-約 2.5 mM; 約 1.75 mM-約 2.5 mM; 約 2.0 mM-約 2.5 mM; 約 2.25 mM-約 2.5 mM; 約 0.9 mM-約 2.0 mM; 約 0.8 mM-約 1.75 mM; 約 0.9 mM-約 1.5 mM; 約 1.0 mM-約 1.25 mM; 約 1.0 mM-約 2.0 mM; 約 1.0 mM-約 1.5 mM; 約 1.2 mM-約 1.4 mM; 0.8 もしくは 0.9 もしくは 1.0 もしくは 1.1 もしくは 1.2 もしくは 1.3 もしくは 1.4 もしくは 1.5 もしくは 1.6 mM のおよそ何れか; 0.8 mM, 0.85 mM, 0.9 mM, 0.95 mM, 1.0 mM, 1.05 mM, 1.1 mM, 1.15 mM, 1.2 mM, 1.25 mM, 1.3 mM, 1.35 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.55 mM, 1.6 mM, 1.65 mM, 1.7 mM, もしくは 1.75 mM の何れか; 少なくとも 0.8 もしくは 0.9 もしくは 1.0 もしくは 1.1 mM のおよそ何れか及び約 1.75 もしくは 1.6 もしくは 1.5 もしくは 1.4 mM 以下。 20
(c)銅	約 69 nM-約 1,000.0 nM; 約 20 nM-約 480.0 nM; 約 20 nM-約 400 nM; 約 20 nM-約 350 nM; 約 20 nM-約 300 nM; 約 20 nM-約 250 nM; 約 20 nM-約 200 nM; 約 20 nM-約 150 nM; 約 20 nM-約 100 nM; 約 20 nM-約 50 nM; 約 50 nM-約 480 nM; 約 100 nM-約 480 nM; 約 150 nM-約 480 nM; 約 200 nM-約 480 nM; 約 250 nM-約 480 nM; 約 300 nM-約 480 nM; 約 325 nM-約 375 nM; 約 350 nM-約 480 nM; 約 400 nM-約 480 nM; 約 50 nM-約 450 30

	<p>nM; 約 100 nM-約 400 nM; 約 150 nM-約 350 nM; 約 200 nM-約 300 nM; 約 22 nM-約 440 nM; 約 26 nM-約 400 nM; 約 30 nM-約 360 nM; 約 54 nM-約 480 nM; 約 62 nM-約 440 nM; 約 69 nM-約 400 nM; 約 80 nM-約 400 nM; 約 100 nM-約 400 nM; 約 125 nM-約 400 nM; 約 150 nM-約 400 nM; 約 200 nM-約 400 nM; 約 250 nM-約 400 nM; 約 300 nM-約 400 nM; 約 325 nM-約 375 nM; 約 325 nM-約 350 nM; 約 25 もしくは 26 もしくは 27 もしくは 28 もしくは 29 もしくは 30 もしくは 40 もしくは 50 もしくは 60 もしくは 69 もしくは 100 もしくは 110 もしくは 120 もしくは 125 もしくは 130 もしくは 140 もしくは 150 もしくは 160 もしくは 170 もしくは 175 もしくは 180 もしくは 190 もしくは 200 もしくは 210 もしくは 220 もしくは 225 もしくは 230 もしくは 240 もしくは 250 もしくは 260 もしくは 270 もしくは 275 もしくは 280 もしくは 290 もしくは 300 もしくは 310 もしくは 320 もしくは 325 もしくは 330 もしくは 335 もしくは 336 もしくは 337 もしくは 338 もしくは 339 もしくは 340 もしくは 345 もしくは 350 もしくは 360 もしくは 370 もしくは 375 もしくは 380 もしくは 390 もしくは 400 nM の何れか; 54 nM, 56 nM, 58 nM, 60 nM, 62 nM, 64 nM, 66 nM, 68 nM, 69 nM, 70 nM, 71 nM, 72 nM, 73 nM, 74 nM, 75 nM, 100 nM, 125 nM, 150 nM, 175 nM, 200 nM, 225 nM, 250 nM, 275 nM, 300 nM, 325 nM, 350 nM, 375 nM, もしくは 400 nM の何れか; 少なくとも 20 もしくは 25 もしくは 30 もしくは 35 もしくは 40 もしくは 45 もしくは 50 もしくは 55 もしくは 60 もしくは 65 もしくは 70 もしくは 80 nM のおよそ何れか及び約 420 もしくは 400 もしくは 380 もしくは 360 nM 以下。</p>
(d)動物由来加水分解物	<p>約 6.0 g/L-約 20 g/L; 約 5.6 g/L-約 38 g/L; 約 5.6 g/L-約 30 g/L; 約 5.6 g/L-約 25 g/L; 約 5.6 g/L-約 20 g/L; 約 7.0 g/L-約 20 g/L; 約 9.0-約 11.0 g/L; 約 5.6 g/L-約 10 g/L; 約 5.6-約 38 g/L; 約 10 g/L-約 38 g/L; 約 15 g/L-約 38 g/L; 約 20 g/L-約 38 g/L; 約 25 g/L-約 38 g/L; 約 30 g/L-約 38 g/L; 約 35 g/L-約 38 g/L; 約 10 g/L-約 30 g/L; 約 15 g/L-約 25 g/L; 約 5.6 g/L-約 14 g/L; 約 5.9 g/L-約 13 g/L; 約 6.2 g/L-約 12 g/L; 約 7.0 g/L-約 11.0 g/L; 約 7.0 g/L-約 35.0 g/L; 約 7.0 g/L-約 25.0 g/L; 約 7.0 g/L-約 15.0 g/L; 約 8.0 g/L-約 12.0 g/L; 約 2.8 もしくは 3.0 もしくは 3.2 もしくは 3.4 もしくは 3.6 もしくは 3.8 もしくは 4.0 もしくは 4.2 もしくは 4.4 もしくは 4.6 もしくは 4.8 もしくは 5.0 もしくは 5.2 もしくは 5.4 もしくは 5.6 もしくは 6 もしくは 6.2 もしくは 7 もしくは 7.4 もしくは 7.8 もしくは 8 もしくは 9 もしくは 10 もしくは 11 もしくは 12 もしくは 13 もしくは 14 もしくは 15 もしくは 20 もしくは 25 もしくは 30 もしくは 35 もしくは 40 もしくは 45 もしくは 50 g/L の何れか; 2.8 g/L, 3.0 g/L, 3.2 g/L, 3.4 g/L, 3.6 g/L, 3.8 g/L, 4.0 g/L, 4.2 g/L, 4.4 g/L, 4.6 g/L, 4.8 g/L, 5.0 g/L もしくは 6 g/L, 6.2 g/L, 7 g/L, 8 g/L, 9 g/L, 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13 g/L, もしくは 14 g/L の何れか; 少なくとも 2.8 もしくは 3.2 もしくは 3.4 もしくは 3.6 もしくは 3.8 もしくは 4.0 もしくは 4.2 もしくは 4.6 もしくは 5.0 もしくは 5.6 もしくは 6 もしくは 6.2 もしくは 7 もしくは 8 もしくは 9 g/L のおよそ何れか及び約 14 もしくは 13 もしくは 12 もしくは 11 g/L 以下。</p>
(e)植物由来加水分解物	<p>約 1.0 g/L-約 10.0 g/L; 約 1.4 g/L-約 6.2 g/L; 約 1.4 g/L-約 6.0 g/L; 約 1.4 g/L-約 5.5 g/L; 約 1.4 g/L-約 5.0 g/L; 約 1.4 g/L-約 4.5 g/L; 約 1.4 g/L-約 4.0 g/L; 約 1.4 g/L-約 3.5 g/L; 約 1.4 g/L-約 3.0 g/L; 約 1.4 g/L-約 2.5 g/L; 約 1.4 g/L-約 2.0 g/L; 約 2.0 g/L-約 6.2 g/L; 約 2.5 g/L-約 6.2 g/L; 約 3.0 g/L-約 6.2 g/L; 約 3.5 g/L-約 6.2 g/L; 約 4.0 g/L-約 6.2 g/L; 約 4.5 g/L-約 6.2 g/L; 約 5.0 g/L-約 6.2 g/L; 約 5.5 g/L-約 6.2 g/L; 約 1.5 g/L-約 6.0 g/L; 約 2.0 g/L-約 5.5 g/L; 約 2.5 g/L-約 5.0 g/L; 約 3.0 g/L-約 4.5 g/L; 約 3.0 g/L-約 3.2 g/L; 約 3.5 g/L-約 4.0 g/L; 約 4.0 g/L-約 3.4 g/L; 約 4.5 g/L-約 3.0 g/L; 約 1.75 g/L-約 2.8 g/L; 約 1.5 g/L-約 5.5 g/L; 約 1.5 g/L-約 4.5 g/L; 約 1.5 g/L-約 3.5 g/L; 約 1.5 g/L-約 3.0 g/L; 約 1.75 g/L-約 2.75 g/L; 約 2.0 g/L-約 3.0 g/L; 約 2.25 g/L-約 2.75 g/L; 約 1.4 もしくは 1.5 もしくは 1.75 もしくは 2.0 もしくは 2.25 もしくは 2.5 もしくは 2.8 もしくは 3.0 もしくは 3.1 もしくは 3.25 もしくは 3.4 もしくは 3.5 もしくは 4.0 もしくは 4.5 もしくは 5.0 もしくは 5.5 もしくは 6 もしくは 6.2 もしくは 7 もしくは 8 もしくは 9 g/L のおよそ何れか及び約 14 もしくは 13 もしくは 12 もしくは 11 g/L 以下。</p>

	は 3.75 もしくは 4.0 g/L の何れか; 1.4 g/L, 1.5 g/L, 1.75 g/L, 2.0 g/L, 2.25 g/L, 2.5 g/L, 2.8 g/L, 3.0 g/L, 3.2 g/L, 3.25 g/L, 3.4, 3.75, もしくは 4.0 g/L の何れか; 少なくとも 1.4 もしくは 1.5 もしくは 1.75 g/L のおよそ何れか及び約 3.4 もしくは 3 もしくは 2.8 g/L 以下。
--	--

【0065】

1つの変形では、インスリンは細胞培養培地中に約 1.0 mg/L - 約 100.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 80.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 60.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 50.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 40.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 30.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 25.0 mg/L もしくは約 10.0 mg/L - 約 30.0 mg/L もしくは約 15.0 mg/L - 約 20.0 mg/L もしくは約 5.0 mg/L - 約 15.0 mg/L もしくは約 6.0 mg/L - 約 12.0 mg/L もしくは約 7.0 mg/L - 約 11.0 mg/L もしくは約 8.0 mg/L - 約 10.0 mg/L の濃度で、又は 5.0 mg、6.0 mg/L、7.0 mg/L、8.0 mg/L、9.0 mg/L、10.0 mg/L、11.0 mg/L、12.0 mg/L、13.0 mg/L、14.0 mg/L、15.0 mg/L、16.0 mg/L、17.0 mg/L、18.0 mg/L、19.0 mg/L、20.0 mg/L、21.0 mg/L、22.0 mg/L、23.0 mg/L、24.0 mg/L、25.0 mg/L、26.0 mg/L、27.0 mg/L、28.0 mg/L、29.0 mg/L もしくは 30.0 mg/L のおよそ何れか 1 つの濃度で、又は 7 mg/L、8.0 mg/L、9.0 mg/L、10.0 mg/L もしくは 11.0 mg/L のおよそ何れか 1 つの濃度で存在する。10

【0066】

1つの変形では、銅は細胞培養培地中に約 69.0 nM - 約 400.0 nM もしくは約 80 nM - 約 400 nM もしくは約 100 nM - 約 400 nM もしくは約 125 nM - 約 400 nM もしくは約 150 nM - 約 400 nM もしくは約 200 nM - 約 400 nM もしくは約 250 nM - 約 400 nM もしくは約 300 nM - 約 400 nM もしくは約 325 nM - 約 375 nM もしくは約 325 nM - 約 350 nM の濃度で、又は約 100 nM、125 nM、150 nM、175 nM、200 nM、225 nM、250 nM、275 nM、300 nM、325 nM、350 nM、375 nM もしくは 400 nM のおよそ何れか 1 つの濃度又は 330 nM、335 nM、340 nM、345 nM もしくは 350 nM のおよそ何れか 1 つの濃度又は約 335 nM、336 nM、337 nM、338 nM、339 nM もしくは 400 nM の濃度又は約 339 nM の濃度で存在する。20

【0067】

1つの変形では、シスチンは細胞培養培地中に約 0.8 mM - 約 2.5 mM もしくは約 0.8 mM - 約 2.0 mM もしくは約 0.8 mM - 約 1.75 mM もしくは約 0.8 mM - 約 1.5 mM もしくは約 1.0 mM - 約 2.0 mM もしくは約 1.0 mM - 約 1.5 mM もしくは約 1.2 mM - 約 1.4 mM の濃度で、又は 0.8 mM もしくは 0.9 mM もしくは 1.0 mM もしくは 1.1 mM もしくは 1.2 mM もしくは 1.3 mM もしくは 1.4 mM もしくは 1.5 mM のおよそ何れか 1 つの濃度で、又は 1.1 mM、1.3 mM もしくは 1.5 mM のおよそ何れか 1 つの濃度で、又は約 1.3 mM の濃度で存在する。30

【0068】

1つの変形では、動物由来加水分解物は、細胞培養培地中に約 5.6 g/L - 約 38.0 g/L もしくは約 7.0 g/L - 約 35.0 g/L もしくは約 7.0 g/L - 約 25.0 g/L もしくは約 7.0 g/L - 約 15.0 g/L もしくは約 8.0 g/L - 約 12.0 g/L もしくは約 7.0 g/L - 約 11.0 g/L 又は 5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、35 g/L、40 g/L、45 g/L もしくは 50 g/L のうちのおよそ何れか 1 つ、又は 5 g/L、6 g/L、7 g/L、8 g/L、9 g/L、10 g/L、11 g/L もしくは 12 g/L のうちのおよそ何れか 1 つ、40

又は約 10 g / L の濃度で存在する。

【0069】

1つの変形では、植物由来加水分解物は、細胞培養培地中に約 1.4 g / L - 約 6.2 g / L もしくは約 1.5 g / L - 約 5.5 g / L もしくは約 1.5 g / L - 約 4.5 g / L もしくは約 1.5 g / L - 約 3.5 g / L もしくは約 1.5 g / L - 約 2.5 g / L もしくは約 1.75 g / L - 約 2.75 g / L もしくは約 2.0 g / L - 約 3.0 g / L もしくは約 2.25 g / L - 約 2.75 g / L 又は 1.75 g / L、2.0 g / L、2.25 g / L、2.5 g / L、2.5 g / L、3.0 g / L、3.25、3.5 g / L、3.75 g / L もしくは 4.0 g / L のうちのおよそ何れか 1つ、又は 2.0 g / L、2.25 g / L もしくは 2.5 g / L もしくは 3.0 g / L のうちのおよそ何れか 1つ、又は約 2.5 g / L の濃度で存在する。 10

【0070】

また別の変形では、システインが細胞培養培地中に存在する。システインは、1つの態様では、基底細胞培養培地に（例えば、基底細胞培養培地にシステインを含むフィード培地を補給することによって）加えられてよい。1つの変形では、細胞培養培地は、システイン（システインを含まない基底細胞培養培地にシステインを含むフィード培地を介して加えられてよい）を約 0.5 mM - 約 5.0 mM もしくは約 1.0 mM - 約 12.0 mM もしくは約 2.0 mM - 約 10.0 mM もしくは約 2.0 mM - 約 8.0 mM もしくは約 1.0 mM - 約 10.0 mM もしくは約 1.0 mM - 約 8.0 mM もしくは約 2.0 mM - 約 12.0 mM もしくは約 3.0 mM - 約 12.0 mM もしくは約 4.0 mM - 約 12.0 mM もしくは約 5.0 mM - 約 12.0 mM もしくは約 6.0 mM - 約 12.0 mM もしくは約 6.0 mM - 約 10.0 mM もしくは約 6.0 mM - 約 8.0 mM の濃度又は 0.5 mM、0.8 mM、1.0 mM、1.5 mM、2.0 mM、2.5 mM、5.0 mM、5.5 mM、6.0 mM、6.5 mM、7.0 mM、7.5 mM、8.0 mM、8.5 mM もしくは 9.0 mM のおよそ何れか 1つの濃度で含む。1つの態様では、システインは、基底細胞培養培地に（その添加は細胞培養サイクルの何れかの時点に行われてよい、及び同一であっても相違していてもよい 1つ以上の量にあってよい）、システインが約 7.5 mM の濃度で細胞培養培地中に存在するような量で加えられる。 20

【0071】

また別の変形では、シスチンが細胞培養培地中に存在する。シスチンは、1つの態様では、基底細胞培養培地に（例えば、シスチンを既に含んでいてよい、もしくは含んでいなくてよい基底細胞培養培地にシスチンを含むフィード培地を補給することによって）加えられてよい。1つの変形では、細胞培養培地は、シスチンを（基底細胞培養培地にシスチンを含むフィード培地を介して加えられてよい）、例えば細胞培養培地中に約 0.8 mM のシステインを提供する量にある約 0.5 mM - 約 5.0 mM の濃度で含む。 30

【0072】

所定の実施態様では、細胞培養培地は、シスチンを含むがシステインを含まない。

【0073】

細胞培養培地（例えば、基底細胞培養培地）には、追加の細胞培養培地成分が（例えば、フィード細胞培養培地を介して）さらに補給されてよい。1つの態様では、追加の細胞培養培地成分はインスリンを含む。別の態様では、追加の細胞培養培地成分はインスリン及びシステインを含む。本明細書に提供した細胞培養培地には、細胞を培養するために適合する何れかの量のインスリン及び／又はシステインが補給されてよい。1つの態様では、インスリンは、細胞培養培地に細胞培養中で約 15 mg / L もしくは約 25 mg / L のインスリン濃度を提供する量で加えられる（例えば、基底細胞培養培地に細胞培養サイクルにおける 1 回以上の時点に加えられる）。1つの態様では、インスリンは細胞培養培地に約 1.0 mg / L - 約 100.0 mg / L；約 10.0 mg / L - 約 100.0 mg / L；約 10.0 mg / L - 約 50.0 mg / L；約 10.0 mg / L - 約 35.0 mg / L；約 10.0 mg / L - 約 25.0 mg / L；約 5.0 mg / L - 約 80.0 mg / L；約 5.0 mg / L - 約 60.0 mg / L；約 5.0 mg / L - 約 50.0 mg / L；約 40

5.0 mg / L - 約 30.0 mg / L ; 約 5.0 mg / L - 約 25.0 mg / L ; 約 10.0 mg / L - 約 25.0 mg / L ; 約 10.0 mg / L - 約 30.0 mg / L ; 約 15.0 mg / L - 約 20.0 mg / L ; 約 5.0 mg / L - 約 15.0 mg / L ; 約 6.0 mg / L - 約 12.0 mg / L ; 約 7.0 mg / L - 約 11.0 mg / L ; 約 8.0 mg / L - 約 10.0 mg / L ; 5.0 mg / L、6.0 mg / L、7.0 mg / L、8.0 mg / L、9.0 mg / L、10.0 mg / L、11.0 mg / L、12.0 mg / L、13.0 mg / L、14.0 mg / L、15.0 mg / L、16.0 mg / L、17.0 mg / L、18.0 mg / L、19.0 mg / L、20.0 mg / L、21.0 mg / L、22.0 mg / L、23.0 mg / L、24.0 mg / L、25.0 mg / L、26.0 mg / L、27.0 mg / L、28.0 mg / L、29.0 mg / L もしくは 30.0 mg / L のおよそ何れか 1 つ ; 7 mg / L、8.0 mg / L、9.0 mg / L、10.0 mg / L 及び 11.0 mg / L のおよそ何れか 1 つから成る群から選択される細胞培養中のインスリン濃度を提供する量で加えられる（例えば、基底細胞培養培地に細胞培養サイクルにおける 1 回以上の時点に加えられる）。別の態様では、システインは細胞培養培地に、約 1.0 mM - 約 12.0 mM もしくは 約 2.0 mM - 約 10.0 mM もしくは 約 2.0 mM - 約 8.0 mM もしくは 約 1.0 mM - 約 10.0 mM もしくは 約 1.0 mM - 約 8.0 mM もしくは 約 2.0 mM - 約 12.0 mM もしくは 約 3.0 mM - 約 12.0 mM もしくは 約 4.0 mM - 約 12.0 mM もしくは 約 5.0 mM - 約 12.0 mM もしくは 約 6.0 mM - 約 12.0 mM もしくは 約 6.0 mM - 約 8.0 mM、又は 5.0 mM、5.5 mM、6.0 mM、6.5 mM、7.0 mM、7.5 mM、8.0 mM、8.5 mM もしくは 9.0 mM から成る群から選択される細胞培養中のシステイン濃度を提供する量で細胞培養培地中に加えられる（例えば、基底細胞培養培地に細胞培養サイクルの 1 回以上の時点に加えられる）。別の態様では、シスチンは、細胞培養培地に細胞培養中でシスチンの約 0.1 mM - 約 1.5 mM、例えば約 2 mM の濃度を提供する量で加えられる（例えば、基底細胞培養培地に細胞培養サイクルの 1 回以上の時点に加えられる）。

【0074】

一部の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、約 5.0 mg / L - 約 14.0 mg / L、約 5.5 mg / L - 約 13.0 mg / L、約 6.0 mg / L - 約 12.0 mg / L、約 7.0 mg / L - 約 11.0 mg / L、約 8.0 mg / L - 約 10.0 mg / L もしくは 約 8.5 mg / L - 約 14.0 mg / L のインスリンを含む。インスリンを含む細胞培養培地は、銅及びシスチンのうちの何れか 1 つ以上を本明細書に提供した何れかの量でさらに含んでいてよいことは理解されている。例えば、約 6.0 mg / L - 約 12.0 mg / L のインスリンを含む細胞培養培地は、約 70 nM - 約 400 nM の銅及び/又は約 0.5 mM - 約 2.5 mM のシスチンをさらに含んでいてよく、さらに動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物、例えば約 5.5 g / L - 約 40.0 g / L の動物由来加水分解物及び/又は約 1.5 g / L - 約 6.5 g / L の植物由来加水分解物をさらに含んでいてよいことは理解されている。

【0075】

他の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、約 65 nM - 約 400 nM、約 70 nM - 約 375 nM、約 75 nM - 約 350 nM、約 80 nM - 約 325 nM、約 85 nM - 約 300 nM もしくは 約 90 nM - 約 275 nM の銅を含む。銅を含む細胞培養培地は、インスリン及びシスチンのうちの何れか 1 つ以上を本明細書に提供した何れかの量でさらに含んでいてよいことは理解されている。例えば、約 85 nM - 約 300 nM の銅を含む細胞培養培地は、約 0.8 mM - 約 1.75 mM のシスチン及び/又は約 8.0 mg / L - 約 12.0 mg / L のインスリンをさらに含んでいてよく、さらに動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物、例えば約 5.5 g / L - 約 40.0 g / L の動物由来加水分解物及び/又は約 1.5 g / L - 紦 6.5 g / L の植物由来加水分解物をさらに含んでいてよいことは理解されている。

【0076】

10

20

30

40

50

一部の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、約 0.8 mM - 約 1.75 mM、約 0.9 mM - 約 1.50 mM、約 1.0 mM - 約 1.40 mM もしくは約 1.0 mM - 約 1.30 mM のシスチンを含む。シスチンを含む細胞培養培地は、インスリン及び銅のうちの何れか 1 つ以上を本明細書に提供した何れかの量でさらに含んでいてよいことは理解されている。例えば、約 0.8 mM - 約 1.75 mM のシスチンを含む細胞培養培地は、約 70 nM - 約 375 nM の銅及び / 又は約 8.0 mg / L - 約 12.0 mg / L のインスリンをさらに含んでいてよく、さらに動物由来加水分解物及び / 又は植物由来加水分解物、例えば約 5.5 g / L - 約 40.0 g / L の動物由来加水分解物及び / 又は約 1.5 g / L - 約 6.5 g / L の植物由来加水分解物をさらに含んでいてよいことは理解されている。

10

【0077】

一部の実施態様では、細胞培養培地は、表 1 に記載した量で動物由来加水分解物をさらに含む。他の実施態様では、細胞培養培地は、表 1 に記載した量で植物由来加水分解物をさらに含む。一部の実施態様では、細胞培養培地は、表 1 に記載した量で動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方をさらに含む。

【0078】

一部の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、約 1.5 g / L - 約 6.0 g / L、約 2.0 g / L - 約 5.5 g / L、約 2.5 g / L - 約 5.0 g / L、約 3.0 g / L - 約 4.5 g / L 又は約 3.5 g / L - 約 4.0 g / L の植物由来加水分解物を含む。植物由来加水分解物を含む細胞培養培地は、シスチン、インスリン及び銅のうちの何れか 1 つ以上を本明細書に提供した何れかの量でさらに含んでいてよいことは理解されている。例えば、約 0.8 mM - 約 1.75 mM のシスチンを含む細胞培養培地は、約 70 nM - 約 375 nM の銅及び / 又は約 8.0 mg / L - 約 12.0 mg / L のインスリンをさらに含んでいてよく、さらに動物由来加水分解物、例えば約 6.0 g / L - 約 20.0 g / L の動物由来加水分解物をさらに含んでいてよいことは理解されている。

20

【0079】

一部の態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、約 6.0 g / L - 約 35.0 g / L、約 7.0 g / L - 約 30.0 g / L、約 8.0 g / L - 約 25.0 g / L、約 9.0 g / L - 約 20 g / L 又は約 10.0 g / L - 約 15.0 g / L の動物由来加水分解物を含む。動物由来加水分解物を含む細胞培養培地は、シスチン、インスリン及び銅のうちの何れか 1 つ以上を本明細書に提供した何れかの量でさらに含んでいてよいことは理解されている。例えば、約 0.8 mM - 約 1.75 mM のシスチンを含む細胞培養培地は、約 70 nM - 約 375 nM の銅及び / 又は約 8.0 mg / L - 約 12.0 mg / L のインスリンをさらに含んでいてよく、さらに植物由来加水分解物、例えば約 1.5 g / L - 約 3.0 g / L の植物由来加水分解物をさらに含んでいてよいことは理解されている。

30

【0080】

本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約 0.9 mM - 約 1.5 mM のシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は、約 1.4 mg / L - 約 11.0 mg / L のインスリンもしくは約 1.44 mg / L - 約 66.0 mg / L のインスリンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は約 26.0 nM - 約 400.0 nM の銅を含む。一部の態様では、細胞培養培地は：(a) 約 69.0 nM - 約 400.0 nM の銅、(b) 約 7.0 mg / L - 約 11.0 mg / L のインスリンもしくは約 1.44 mg / L - 約 66 mg / L のインスリン、及び (c) 約 0.8 mM - 約 2.5 mM のシスチンから選択された 2 つ以上の成分を含む。

40

【0081】

本明細書に提供した細胞培養培地成分（例えば、銅、インスリン、シスチン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか 1 つ以上を含む細胞培養培地）は、例えば塩、水化物もしくはそれらの組合せ等の当分野において公知である形態で細胞培養培地に加えられてよい。細胞培養培地成分は、さらに溶液、抽出物として、もしくは固体形で細胞培養培地に提供することができる。一部の実施態様では、銅は、細胞培養培地に C

50

u SO₄として提供される。非限定的例として、シスチンは、細胞培養培地に二ナトリウム塩一水和物粉末として提供されてよい。ペプトンとしても公知であるタンパク質加水分解物は、典型的には例えば動物組織、乳汁由来生成物、微生物もしくは植物等の様々な生物学的出発物質の酵素消化によって製造される。本明細書に提供した細胞培養培地中で使用される加水分解物は、植物もしくは動物に由来してよい（例えば、植物由来加水分解物及び／又は動物由来加水分解物）。本明細書に記載する植物性加水分解物は、小麦グルテン、トウモロコシ、シリアル、大豆もしくは綿実に由来してよいがそれらに限定されない。本明細書に記載した動物性加水分解物は、ウシ、ニワトリ、ヤギ、ウマ、ヒト、ヒツジ、ブタもしくはウサギ又は他の動物に由来してよいがそれらに限定されない。

【0082】

10

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地を調製する方法であって、細胞培養のために適切な組成物中の銅、インスリン及びシスチンのうちの何れか2つ以上を組み合わせる工程を含む方法もまた提供される。1つの態様では、本方法は、銅、インスリン及びシスチンのうちの何れか2つ以上を細胞培養のために適合する組成物に加える工程を含むが、このとき銅、インスリン及びシスチンのうちの2つ以上は逐次的もしくは同時に加えられてよい。また別の変形では、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地を調製する方法であって、第1期間に細胞培養のために適切な組成物中の銅、インスリン及びシスチンのうちの何れか2つ以上を組み合わせる工程を含み、さらに第2期間、例えば細胞増殖サイクル中に少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回等にある量のインスリンを加える工程をさらに含む方法が提供される。一部の実施態様では、細胞増殖サイクルは、少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間もしくは任意の日数であるが、このとき細胞は依然として生存性のままで細胞培養中に留まることができる。細胞培養培地を調製する方法の1つの変形では、シスチンは、細胞培養培地中に約0.9mM-約1.5mMのシスチンを提供する量で加えられる。細胞培養培地を調製する方法のまた別の変形では、インスリンは、細胞培養培地中で1.4mg/L-約11.0mg/Lのインスリンもしくは約1.44mg/L-約66.0mg/Lのインスリンを提供する量で加えられる。細胞培養培地を調製する方法のまた別の変形では、銅は、細胞培養培地中に約26.0nM-約400.0nMの銅を提供する量で加えられる。一部の態様では、細胞培養培地は：(a)細胞培養培地中に約69.0nM-約400.0nMの銅を提供する量にある銅、(b)細胞培養培地中に約7.0mg/L-約11.0mg/Lもしくは約1.44mg/L-約66.0mg/Lのインスリンを提供する量にあるインスリン、及び(c)細胞培養培地中に約0.8mM-約2.5mMのシスチンを提供する量にあるシスチンから選択される2つ以上の成分を組み合わせる工程によって調製される。

【0083】

30

本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は基底細胞培養培地である。本明細書の他の実施態様では、細胞培養培地はフィード細胞培養培地である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも1つを含む基底細胞培養培地であり、このとき基底細胞培養培地には（例えば、細胞培養サイクル開始後のある期間に、例えば細胞培養サイクルの少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回等の何れか1つ）、インスリン、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物のうちの何れか1つ以上を含むフィード細胞培養培地が補給される。

【0084】

40

本明細書に提供した個別の培地成分は、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む細胞を培養するため及び／又は細胞培養からのベバシズマブ生産のための1つ以上の有益な特性を生じさせる量で存在してよい。有益な特性には、細胞生存性の増加、細

50

胞から生成されるベバシズマブの量の増加（例えば、ベバシズマブ力価の強化）及び／又は細胞培養中のベバシズマブの酸化の減少が含まれるがそれらに限定されない。本明細書に提供した細胞培養培地の有益な特性は、ベバシズマブもしくはその断片のN-グリコシリ化プロファイル、電荷不均質性及び／又はアミノ酸配列完全性を維持しながら細胞によって生成されるベバシズマブの量（例えば、抗体力価）を維持もしくは強化する工程をさらに含むことができる。これらの有益な特性は、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む細胞を培養する方法及び本明細書に記載した細胞培養中でベバシズマブもしくはその断片を生成する方法に適用できる。

【0085】

本明細書に提供した細胞培養培地は、1つの態様では、ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法において使用された場合に1つ以上の好都合の製品品質特性又は有益な特性を生じる。1つの変形では、本明細書に提供した細胞培養培地の使用は、異なる細胞培養培地中でベバシズマブ産生細胞を培養することによって生成されるベバシズマブもしくはその断片の量に比較して、細胞によって生成されるベバシズマブの量を増加させる（例えば、抗体力価を強化する）。

10

【0086】

当業者であれば理解されるように、本明細書に詳述した細胞培養培地は、細胞培養のために有用である他の成分（例えば、銅、インスリン及びシスチンの1つ以上の他に、並びに任意選択的にペプトン加水分解物）を含んでいてもよい。例えば、細胞培養培地は、追加の成分、例えばアミノ酸（例えば、グルタミン、アルギニンもしくはアスパラギン）、ビタミン類（ビタミンB類、例えばビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9もしくはビタミンB12のうちの何れか1つ以上を含むがそれらに限定されない）、微量元素、遷移金属（ニッケル、鉄（例えば、第二鉄もしくは第一鉄）もしくは亜鉛を含む）及び他の培地成分を含んでいてよいことは理解されている。本明細書に提供した何れかの培地には、さらにホルモン剤及び／又は他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリンもしくは表皮増殖因子）、イオン（例えば、ナトリウム、塩化物、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩）、バッファー（例えばH E P E S）、ヌクレオシド（例えば、アデノシン及びチミジン）、微量元素及びグルコースもしくは等価のエネルギー源が補給されてよい。追加の細胞培養培地成分、例えば本明細書に列挙した成分は、細胞培養培地中に当業者には公知であろう適切な濃度で含まれてよい。

20

【0087】

I I I . 本発明の方法及び使用

本明細書で提供されるのは、ベバシズマブもしくはその断片の生産において使用される細胞を培養する方法並びに銅、インスリン及びシスチンのうちの1つ以上を含む細胞培養培地の使用である。一部の態様では、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養するための方法であって、哺乳動物細胞を銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地と接触させる工程を含み、細胞培養培地は、植物由来加水分解物、動物・植物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を追加して含んでいてよい方法が提供される。一部の実施態様では、細胞培養培地はインスリンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は銅を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地はシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地は銅及びシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養培地中の成分の量（例えば、銅、インスリン、シスチン、植物由来加水分解物及び／又は動物由来加水分解物の量）は、表1に提供した数値から選択される量にある。一部の実施態様では、本方法は、追加量のインスリンを培地に加える工程をさらに含む。追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回、少なくとも3回、少なくとも6回又は少なくとも12回細胞培養培地に加えることができる。本明細書の実施態様の一部では、追加

30

40

50

量のインスリンは、例えば約 1 mg / L - 約 4 4 mg / L 等の表 1 から選択される濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。一部の態様では、細胞培養培地は、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物又は動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方をさらに含む。

【 0 0 8 8 】

一部の他の態様では、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養するための方法であって、細胞を、銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される 2 つ以上の成分を含む細胞培養培地と接触させる工程を含む方法が提供される。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は約 7 . 0 mg / L - 約 1 1 . 0 mg / L の濃度でインスリンを含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は約 6 9 . 0 nM - 約 4 0 0 . 0 nM の濃度で銅を含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM の濃度でシスチンを含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 7 . 0 mg / L - 約 1 1 . 0 mg / L の濃度でインスリン及び約 6 9 . 0 nM - 約 4 0 0 . 0 nM の濃度で銅を含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 7 . 0 mg / L - 約 1 1 . 0 mg / L の濃度のインスリン及び約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM の濃度でシスチンを含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 6 9 . 0 nM - 約 4 0 0 . 0 nM の濃度で銅及び約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM の濃度でシスチンを含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は、約 7 . 0 mg / L - 約 1 1 . 0 mg / L の濃度のインスリン、約 6 9 . 0 nM - 約 4 0 0 . 0 nM の濃度で銅及び約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM の濃度でシスチンを含む。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は、表 1 から選択される量でシスチン、インスリン及び銅を含んでいてよい。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに、本明細書に提供した細胞培養培地に追加量のインスリンを（例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で）加える工程を含む。追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも 1 回、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 6 回、少なくとも 9 回、少なくとも 1 2 回又は少なくとも 1 4 回細胞培養培地に加えることができる。本明細書の実施態様の一部では、追加量のインスリンは、細胞培養培地に例えば約 5 . 6 mg / L - 約 6 6 mg / L 等の表 1 から選択される濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。一部の態様では、細胞培養培地はさらに、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物又は動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含む。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物を（例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で）加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物は、表 1 に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物を提供する量で細胞培養に加えられる。

【 0 0 8 9 】

別の態様では、本明細書で提供されるのはベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、ベバシズマブもしくはその断片を生成できる細胞を、銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される 2 つ以上の成分を含む細胞培養培地と接触させる工程を含む方法である。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は約 7 . 0 mg / L - 約 1 1 . 0 mg / L の濃度でインスリンを含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は約 6 9 . 0 nM - 約 4 0 0 . 0 nM の濃度で銅を含む。本明細書の一部の実施態様では、細胞培養培地は約 0 . 8 mM - 約 2 . 5 mM の濃度でシスチンを含む。本明細書の実施態様の何れかでは、細胞培養培地は、表 1 から選択される量でシスチン、インスリンもしくは銅を含んでいてよい。本明細書の実施態様の一部では、本方法は、追加量のインスリンを本明細書に提供した細胞培養培地に加える工程をさらに含む。インスリンは、細胞培養のために適合する何れかの量で細胞培養培地に加えられてよい。1 つの態様では、インスリンは、表 1 に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中のインスリ

10

20

30

40

50

ンを提供する量で細胞培養培地に加えられる。1つの特定態様では、インスリンは：約1.0mg/L-約100.0mg/L；約5.0mg/L-約80.0mg/L；約5.0mg/L-約60.0mg/L；約5.0mg/L-約50.0mg/L；約5.0mg/L-約40.0mg/L；約5.0mg/L-約30.0mg/L；約5.0mg/L-約25.0mg/L；約10.0mg/L-約25.0mg/L；約10.0mg/L-約30.0mg/L；約15.0mg/L-約20.0mg/L；約5.0mg/L-約15.0mg/L；約6.0mg/L-約12.0mg/L；約7.0mg/L-約11.0mg/L及び約8.0mg/L-約10.0mg/Lから成る群から選択される濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で細胞培養培地に加えられる。また別の態様では、インスリンは、約5.0mg/L、6.0mg/L、7.0mg/L、8.0mg/L、9.0mg/L、10.0mg/L、11.0mg/L、12.0mg/L、13.0mg/L、14.0mg/L、15.0mg/L、16.0mg/L、17.0mg/L、18.0mg/L、19.0mg/L、20.0mg/L、21.0mg/L、22.0mg/L、23.0mg/L、24.0mg/L、25.0mg/L、26.0mg/L、27.0mg/L、28.0mg/L、29.0mg/Lもしくは30.0mg/Lのうちのおよそ何れか1つの濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で細胞培養培地に加えられる。また別の態様では、インスリンは、7mg/L、8.0mg/L、9.0mg/L、10.0mg/Lもしくは11.0mg/Lのうちのおよそ何れか1つの濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で細胞培養培地に加えられる。追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中の任意の時点に細胞培養培地に加えることができる。例えば、インスリンは、第1-20日の20日間の細胞培養サイクル中の何れか1日以上（例えば、第1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日もしくは20日のうちの何れか1日以上）に加えられてよい。追加量のインスリンが加えられる場合、インスリンは何れかの量で加えられてよく、その量は、インスリンが細胞培養サイクル中に1回より多く加えられる場合に同一であっても相違してもよい。このため、14日間細胞培養サイクルについては、インスリンは第1-14日間のうちの何れか1日以上に（例えば、第1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13もしくは14日の何れか1日以上に）、インスリンが細胞培養サイクル中の2回以上加えられる場合に同一であっても相違してもよい何れかの量で加えられてよいと理解されている。追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも6回、少なくとも9回、少なくとも12回又は少なくとも14回細胞培養培地に加えることができる。本明細書の実施態様の一部では、追加量のインスリンは、例えば約5.6mg/L-約6.6mg/L等の表1から選択される濃度にある細胞培養培地中のインスリンを提供する量で加えられる。一部の態様では、細胞培養培地はさらに、動物由来加水分解物、植物由来加水分解物又は動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含む。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物を（例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で）加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物は表1に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物を提供する量で加えられる。

【0090】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する工程を含み、細胞培養サイクル中の初期細胞培養培地は、約6.9nM-約1,000nMの濃度の銅、約1.0mg/L-約100.0mg/Lの濃度のインスリン及び約0.7mM-約2.0mMの濃度のシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含み、細胞がベバシズマブもしくは断片を生成する方法である。一部の

10

20

30

40

50

実施態様では、初期細胞培養培地は、(1)銅及びインスリン；(2)銅及びシスチン；(3)インスリン及びシスチン；又は(4)銅、インスリン及びシスチンを含んでいる。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は、銅、シスチン及び/又はインスリンを表1に記載した濃度から選択される濃度で含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は、動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を表1に記載した濃度から選択される濃度で含む。一部の実施態様では、初期細胞培養培地はインスリンを含み、本方法は細胞培養サイクル中に追加量のインスリンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む。一部の実施態様では、追加量のインスリンは、細胞培養サイクル中に少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回又は少なくとも6回細胞培養培地に加えられる。一部の実施態様では、各時点に加えられるインスリンは、約5mg/L - 約25mg/L(例えば、5mg/L、10mg/L、15mg/L、20mg/L及び25mg/Lのおよそ何れか1つ)である。一部の実施態様では、細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量は、約20mg/L - 約100mg/L(例えば、20mg/L、25mg/L、30mg/L、35mg/L、40mg/L、45mg/L、50mg/L、55mg/L、60mg/L、65mg/L、70mg/L、75mg/L、80mg/L、85mg/L、90mg/L、95mg/L及び100mg/Lのおよそ何れか1つ)である。一部の実施態様では、初期細胞培養培地はシスチンを含み、本方法は細胞培養サイクル中に追加量のシスチンを細胞培養培地に加える工程をさらに含む。例えば、シスチンは細胞培養培地中に約0.1 - 約1.5mMの追加のシスチンを提供する量(例えば、細胞培養培地中の約0.1mM、約0.2mM、約0.3mM、約0.4mM、約0.5mM、約0.6mM、約0.7mM、約1mMもしくは約1.5mMの追加のシスチン)で加えられる。一部の実施態様では、シスチンは細胞培養サイクル中にバッチフィードで加えられる。一部の実施態様では、本方法は、細胞培養サイクル中の少なくとも1バッチフィード(例えば、細胞培養サイクル中の2、3もしくは4バッチフィード)をさらに含む。一部の実施態様では、バッチフィード培地は、動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物を(例えば、表1に記載した濃度から選択される濃度で)さらに含む。一部の実施態様では、細胞培養サイクル中に、培地の温度は、培養の開始時の温度に比較して、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4もしくは少なくとも約5低下させられる。一部の実施態様では、培地の温度は、細胞培養サイクル中に少なくとも1回又は少なくとも2回低下させられる。一部の実施態様では、温度は培養する工程の開始後の第8日及び第10日に低下させられる。一部の実施態様では、細胞は、約31 - 約35の範囲にわたる温度で培養される。一部の実施態様では、細胞は、第1期間は約35の第1温度で培養され、第2期間は約33の第2温度で培養され、第3期間は約31の第3温度で培養される。一部の実施態様では、細胞は約7.0 - 約7.3のpHを有する培地中で培養される。

【0091】

本明細書で使用する用語「初期細胞培養培地」は、細胞培養サイクルの開始時の細胞培養培地を意味する。一部の実施態様では、初期細胞培養培地は、細胞が基底培地中に接種された後の細胞培養培地である。

【0092】

本明細書で使用する用語「累積」は、特定成分又は細胞培養サイクルの開始時に加えられる成分及び引き続いて加えられる成分を含む、細胞培養サイクルの間に加えられる成分の総量を意味する。一部の実施態様では、累積量は、添加後の細胞培養培地中で測定もしくは計算されるような細胞培養培地中に加えられた1つ又は複数の成分の総濃度である。一部の実施態様では、1つ又は複数の成分は、濃縮された1つ又は複数の成分を含有するフィード溶液によって細胞培養培地中に加えられる。例えば、初期培養培地が10mg/Lのインスリンを有し、及び15mg/Lの追加量のインスリンが細胞培養培地中の15mg/Lの増加を達成するために細胞培養サイクル中に加えられる場合は、細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量は25mg/Lである。

【0093】

10

20

30

40

50

一部の実施態様では、細胞培養サイクルは、細胞によって発現されるポリペプチドを生成するために基底細胞培養培地中に細胞を接種する工程から產生期間の終了時までの期間を意味する。一部の実施態様では、細胞培養サイクルは、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間、少なくとも19日間、少なくとも20日間、少なくとも21日間、少なくとも22日間、少なくとも23日間もしくは細胞によって発現されるポリペプチドを生産するために細胞が生存性のままでいる任意の日数である。

【0094】

本明細書の実施態様の一部では、本方法は、表1に列挙した1つ又は複数の成分を含んでいない細胞培養培地中で培養した場合に哺乳動物細胞が生成するベバシズマブもしくはその断片の量に比較して哺乳動物細胞によって生成されるベバシズマブもしくはその断片の量を増加させる。一部の実施態様では、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中で培養された細胞によって生成されたベバシズマブもしくはその断片の量は、銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で培養された細胞によって生成されたベバシズマブもしくはその断片の量に比較して少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%もしくは50%増加する。

10

【0095】

本明細書に提供した細胞培養培地は、基底細胞培養培地及び/又はフィード細胞培養培地として使用できる。一部の実施態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、細胞の増殖期中に細胞を培養するための方法において使用される。一部の実施態様では、本明細書に提供した細胞培養培地は、細胞の產生期中に細胞を培養するための方法において使用される。

20

【0096】

(i) ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法；(ii) ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法；及び(iii) ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞からのベバシズマブもしくはその断片の生産を強化する(例えば、ベバシズマブもしくはその断片の力価収率を強化する)方法の何れかを包含する本明細書に詳述した方法の何れかは、任意の適切なスケールで実施されてよい(例えば、ベバシズマブもしくはその断片を生成する何れかのスケール)。1つの態様では、本明細書に詳述した方法の何れもベバシズマブもしくはその断片の商業生産と釣り合う規模で実施される。例えば、1つの変形では、ベバシズマブを生成できる細胞は本明細書に提供した細胞培養培地中で培養されてよいが、このとき培養する工程は商業的バッチのベバシズマブを保持できる培養容器中、例えば少なくとも10,000Lの細胞培養を保持できる培養容器中で行われる(例えば、本法は、1つの態様では少なくとも10,000Lの細胞培養規模、例えば12,000Lの細胞培養スケールで実施される)。

30

【0097】

本明細書に提供した方法のまた別の実施態様では、ベバシズマブもしくはその断片は細胞培養物から回収される。回収されたベバシズマブもしくはその断片を含む組成物は、例えば、品質特性の評価前に少なくとも1つの精製工程にかけることができる。また別の実施態様では、組成物はベバシズマブもしくはその断片及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物である。

40

【0098】

その他の方針及び細胞培養培地は、例えば本発明の概要及び他の場所における等、全体を通して提供される。

【0099】

ポリペプチドの生成

50

本明細書に詳述した細胞培養培地は、ベバシズマブもしくはその断片を生成するために細胞を培養する方法において使用できる。培地は、バッチ培養、フェドバッチ培養又は灌流培養によってであろうと、ベバシズマブもしくはその断片を生成できる細胞を培養する方法において使用されてよい。1つの実施態様では、ベバシズマブもしくはその断片は、宿主細胞によって培地中に直接的に分泌させられる。別の実施態様では、ベバシズマブもしくはその断片は、抗体もしくはその断片をコードする核酸を含む細胞の溶解によって培地中に放出される。

【0100】

宿主細胞内で発現可能であるベバシズマブもしくはその断片は、本開示にしたがって生成することができ、提供された組成物中に存在する可能性がある。

10

【0101】

細胞培養中で抗体及びその断片を生成する方法は、当分野において周知である。本明細書で提供されるのは、細胞培養中で抗体（例えば、全長抗体、抗体断片及び多重特異性抗体）を生成するための非限定的な代表的方法である。例えば、抗体（例えば、ベバシズマブ）を生成するための一般に明確に理解されていて一般に使用される技術及び方法については、全体として出典明示により全てが本明細書に組み込まれるMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook等, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausube等編, 2003); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等編, J. Wiley and Sons, 2002); Current Protocols in Protein Science, (Horswill等, 2006); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane編, 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010)を参照されたい。

20

【0102】

細胞培養及び抗体産生

一般に、細胞は本明細書に記載した細胞培養培地の何れかと、細胞の増殖、維持及び／又は抗体産生のうちの何れかを促進する1つ以上の条件下で組み合わされる（接触させられる）。細胞を培養して抗体を産生する方法は、細胞及び細胞培地を含有するための培養容器（バイオリアクター）を使用する。培養容器は、ガラス、プラスチックもしくは金属を含む、細胞を培養するために適合する任意の材料から構成することができる。典型的には、培養容器は、少なくとも1Lであり、10、100、250、500、1,000、2,500、5,000、8,000、10,000L以上（例えば、12,000Lの容器）であってよい。1つの態様では、培養容器は、細胞培養から製造規模量のベバシズマブを生成するために必要とされるように、少なくとも2L、少なくとも10L、少なくとも100L、少なくとも500L、少なくとも1,000L、少なくとも2,500L、少なくとも5,000L、少なくとも7,500L、少なくとも10,000L、少なくとも12,000L以上の本明細書に提供した細胞培養培地を含有することができる。そこで、本明細書に提供した組成物及び方法は、ベバシズマブもしくはその断片を製造規模生産に利用することができる。例えば温度、pH等の培養条件は、発現させるために選択された宿主細胞とともに以前に使用された培養条件であり、当業者には明白であろう。培養工程中に調整されてよい培養条件には、pH及び温度が含まれるがそれらに限定されない。本明細書の実施態様の一部では、pHは、少なくとも7.0、7.15、7.2、7.25、7.30、7.35、7.4、7.45もしくは7.50以上であるが、8.0未満である。本明細書に提供した細胞培養培地中に接種できるベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む細胞の数は、当業者には明白であろう。例えば、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む約 1.0×10^6 - 約 2.0×10^6 個の（約 1.1×10^6 個、約 1.2×10^6 個、約 1.3×10^6 個、約 1.4×10^6 個、約 1.5×10^6 個、約 1.6×10^6 個、約 1.7×10^6 個、約 1.8×10^6 もしくは約 1.9×10^6 個の何れかを含む）細胞は、細胞培養サイクルを開始するために本明細書に提供した培地中に接種することができる。1つの態様では、本明細書に提供

30

40

50

した培地中に接種することができるベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む細胞の数は、約 1.2×10^6 - 約 1.8×10^6 個もしくは約 1.3×10^6 - 約 1.7×10^6 個もしくは約 1.5×10^6 - 約 1.7×10^6 個である。

【0103】

細胞培養は、一般に初期増殖期においては細胞培養の生存、増殖及び生存性（維持）を誘導する条件下で維持される。正確な条件は、細胞タイプ、それに細胞が由来する生体、及び発現抗体もしくはその断片の性質及び形質に依存して変動することになる。

【0104】

初期増殖期における細胞培養の温度は、主として細胞培養が生存性のままである温度の範囲に基づいて選択されることになる。例えば、初期増殖期中には、CHO細胞は37で良好に増殖する。一般に、大多数の哺乳動物細胞は、約25 - 42の範囲内で良好に増殖する。好ましくは、哺乳動物細胞は、約35 - 40の範囲内で良好に増殖する。当業者であれば、細胞及び生産要件の必要に依存して、その中で細胞を増殖させるために適切な温度（一又は複数）を選択することができるであろう。

10

【0105】

本発明の1つの実施態様では、初期増殖期の温度は、単一の一定温度で維持される。また別の実施態様では、初期増殖期の温度は、ある範囲の温度内で維持される。例えば、温度は、初期増殖期中に一様に上昇又は低下させられてよい。又は、温度は、初期増殖期中の様々な時点に離散量で上昇又は低下させられてよい。当業者であれば、単一もしくは複数の温度を使用すべきかどうか、及び温度を一様に、もしくは離散量ずつ調整すべきかどうかを決定することができよう。

20

【0106】

細胞は、初期増殖期中により長いもしくは短い時間にわたり培養されてよい。1つの変形では、細胞は、平穏に増殖することが許容されれば最終的には達するであろう所定のパーセンテージの最大生存性細胞密度である生存性細胞密度を達成するために十分な期間にわたり培養される。例えば、細胞は、最大生存性細胞密度の1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95もしくは99%の生存性細胞密度を達成するために十分な期間にわたり培養されてよい。

30

【0107】

また別の実施態様では、細胞は既定の期間にわたり増殖させられる。例えば、細胞培養の出発濃度、細胞が培養される温度及び細胞の内因性増殖速度に依存して、細胞は0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日間以上にわたり培養されてよい。一部の場合には、細胞は1ヶ月以上にわたり増殖させられてよい。

30

【0108】

細胞培養は、酸素化及び栄養素の細胞への分散を増加させるために初期培養期中に攪拌もしくは振盪されてよい。本発明によると、当業者であれば、pH、温度、酸素化等を含むがそれらに限定されない初期増殖期中のバイオリアクターの所定の内部条件を制御もしくは調節するために有益な可能性があることを理解するであろう。例えば、pHは、適切な量の酸もしくは塩基を供給することによって制御することができ、酸素化は当分野において周知であるスパージングデバイスを用いて制御することができる。

40

【0109】

初期培養工程は増殖期であるが、このときバッチ細胞培養条件は、シードトレイン（seed train）を生成するために組換え細胞の増殖を強化するために修飾される。増殖期は、一般に、細胞が一般に迅速に分割する、例えば増殖する指数増殖期を意味する。この期間中、細胞は、通常は1 - 4日間、例えば1、2、3もしくは4日間の期間にわたり、及び細胞増殖が最適であるような条件下で培養される。宿主細胞についての増殖サイクルの決定は、特定宿主細胞に対して、当業者には公知の方法によって決定することができる。

【0110】

50

増殖期には、本明細書に提供した基底培養培地及び細胞は、培養容器にバッチ式で補給されてよい。1つの態様での培養培地は、約5%未満もしくは1%未満もしくは0.1%未満の血清及び植物もしくは動物に由来する他のタンパク質（例えば、動物由来加水分解物及び/又は植物由来加水分解物）を含有する。一部の実施態様では、基底培地は、動物由来もしくは植物由来加水分解物を含んでいない。しかし、血清及び動物由来タンパク質は、所望であれば使用できる。それらの増殖における特定時点には、細胞は、産生期における培養の開始時に培養培地に接種するための接種材料を形成することができる。又は、産生期は増殖期と連続していてよい。細胞増殖期には、一般にポリペプチド産生期（例えば、抗体産生期）が続く。

【0111】

10

ポリペプチド産生期中には、細胞培養は（増殖期に比較して）細胞培養の生残及び生存性を誘導する、及び所望のポリペプチド（例えば、ベバシズマブもしくはその断片）の発現のために適切な第2セットの培養条件下で維持されてよい。例えば、その後の産生期中には、CHO細胞は、25 - 35 の明確に範囲内で組換えポリペプチドを良好に発現する。複数の離散温度シフトは、細胞密度もしくは生存性を増加させるため、又は組換えポリペプチドの発現を増加させるために使用されてよい。1つの実施態様では、ポリペプチド生産を増加させる（例えば、ベバシズマブもしくはその断片の生産を増加させる）方法は、ポリペプチド産生期中に1つ以上の温度シフト工程を含む。また別の実施態様では、1つ以上の温度シフト工程は、37 から 35 へ、35 から 33 へ、又は 33 から 31 への温度のシフトを含む。本明細書の実施態様の一部では、1つ以上の温度シフト工程は、第0日の約37 から第1日の35 から第8日の33 へ、及び第10日の31 への温度のシフトを含む。本明細書の実施態様の一部では、3つ以上の温度シフト工程は、第0日の約37 から第1日の35 から第8日の33 へ、及び第10日の31 への温度のシフトを含む。本明細書の一部の実施態様では、1つ以上の温度シフト工程は、第0日の約37 から第2.5日の34 への温度のシフトを含む。

20

【0112】

細胞は、その後の産生期において所望の細胞密度もしくは生産力価に到達するまで維持されてよい。1つの実施態様では、細胞は、その後の産生期には組換えポリペプチド（例えば、ベバシズマブもしくはその断片）の力価が最大値に達するまで維持される。他の実施態様では、培養はこの時点の前に回収されてよい。例えば、細胞は、最大生存性細胞密度の1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95もしくは99%の生存性細胞密度を達成するために十分な期間にわたり維持されてよい。一部の場合には、生存性細胞密度が最大値に達することを許容する、及びその後に培養を回収する前に生存性細胞密度が一部のレベルへ低下するのを許容するのが所望の場合がある。

30

【0113】

所定の場合には、その後の産生期中には細胞によって枯渇もしくは代謝されている栄養素もしくは他の培地成分を細胞培養に補給するのが有益又は必要な場合がある。例えば、細胞培養には栄養素もしくは細胞培養の開始中に枯渇していると観察された他の培地成分を補給するのが有益な場合がある。又は、もしくは追加して、その後の産生期の前に細胞培養を補給するのが有益もしくは必要な場合がある。非限定的例として、細胞培養にホルモン及び/又は増殖因子、特定イオン（例えばナトリウム、塩化物、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩）、バッファー、ビタミン、ヌクレオシドもしくはヌクレオチド、微量元素（通常は極めて低い最終濃度で存在する無機化合物）、アミノ酸、脂質もしくはグルコース又は他のエネルギー源を補給するのが有益もしくは必要な場合がある。1つの態様では、基底細胞培養には、本明細書に詳述したインスリン及び/又は植物由来加水分解物及び/又は動物由来加水分解物が補給される。

40

【0114】

本明細書の一部の実施態様では、本発明の方法は、細胞産生期中における細胞培養中の追加量のインスリンの補給を含む。例えば、追加の15mg/Lのインスリンは、細胞

50

培養サイクルの產生期の日に細胞培養に加えられてよい。別の実施例では、追加の 5 m g / L のインスリンは、細胞培養サイクルの產生期中に少なくとも 3 回細胞培養に加えられてよい。さらに別の実施例では、追加の 5 m g / L のインスリンは、細胞培養サイクルの產生期中に少なくとも 6 回細胞培養に加えられてよい。細胞培養サイクルは、少なくとも 3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間、11 日間、12 日間、13 日間もしくは 14 日間の長さであってよい。一部の実施態様では、細胞培養サイクルは 20 日間までの長さである。一部の実施態様では、細胞培養は少なくとも 20 日間の長さである。一部の実施態様では、細胞は、1 より多い細胞培養サイクルにわたり培養されてよい。本明細書の実施態様の一部では、本方法はさらに本明細書に提供した細胞培養培地に追加量の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物を(例えば、細胞培養サイクルの開始後のある期間に基底細胞培養培地に導入されたフィード培地を介して等で)加える工程を含む。本明細書の実施態様の一部では、細胞培養に加えられる追加量の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物は表 1 に列挙した濃度から選択される濃度にある細胞培養培地中の動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物を提供する量で加えられる。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

抗体の精製

ベバシズマブもしくはその断片は、好ましくは培養培地から分泌ポリペプチドとして回収されるが、ベバシズマブもしくはその断片は分泌シグナルを伴わずに直接発現した場合は宿主細胞溶解物から回収されてもよい。

【 0 1 1 6 】

培養培地もしくは溶解物は、粒子状細胞残屑を除去するために遠心分離されてよい。ベバシズマブもしくはその断片はその後に、適切な精製方法の代表である以下の:イムノアフィニティーもしくはイオン交換カラム上の分別法;エタノール沈降法;逆相 HPLC;シリカ上もしくはカチオン交換樹脂、例えば DEAE 上のクロマトグラフィー;クロマトフォーカシング法;SDS-PAGE;硫酸アンモニウム沈降法:例えば Sephadex G-75 を使用するゲル濾過法;及び例えば IgG 等の汚染物質を除去するためのプロテイン A Sepharose カラムの方法を用いて汚染性可溶性タンパク質及びポリペプチドから精製することができる。プロテアーゼ阻害剤、例えばフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) もまた、精製中のタンパク質分解を阻害するために有用な可能性がある。当業者であれば、当該の抗体もしくはその断片のために適合する精製方法が組換え細胞培養において発現後に抗体もしくはその断片の形質における変化の原因となる修飾を必要とする可能性があることを理解できるであろう。抗体もしくはその断片は、一般にクロマトグラフィー技術(例えば、工程不純物を除去するための低 pH 溶出工程を用いるアフィニティークロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィー)を使用して精製できる。精製ベバシズマブもしくはその断片は、例えば、少なくとも 100 m g / mL もしくは 125 m g / mL もしくは 150 m g / mL の抗体濃度又は約 100 m g / mL もしくは 125 m g / mL もしくは約 150 m g / mL の濃度を有する濃縮タンパク質組成物を提供するために濃縮させられてよい。濃縮ポリペプチド生成物は、濃縮条件下で確認できるレベルまで、例えば、ポリペプチドが溶液中ではもはや可溶性ではない濃度まで濃縮されてよいと理解されている。薬物製剤のための抗体を生成及び精製するための方法の非限定的例は、出典明示により全体として本明細書に援用される Kelley, B. MAbs., 2009, 1(5):443-452 に記載されている。

【 0 1 1 7 】

I V . 医薬製剤

本明細書に提供した細胞培養培地及び 1 つ以上の他の成分、例えば細胞又は所望の抗体もしくはその断片(例えば、ベバシズマブもしくはその断片)を含む組成物もまた提供される。ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞は、細胞培養中の本発明の細胞培養培地中に抗体もしくはその断片を分泌できる。したがって、本発明の組成物は、ベバシズマブもしくはその断片を生成する哺乳動物細胞及びその中にベバシ

ズマブもしくはその断片が分泌される本明細書に提供した細胞培養培地を含んでいてよい。ベバシズマブもしくはその断片及び本明細書に提供した細胞培養培地を含む組成物もまた企図されている。本発明の一部の態様では、組成物は、(a)ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞；及び(b)本明細書に提供した何れかの細胞培養培地を含む。一部の態様では、組成物は、(a)ベバシズマブもしくはその断片；及び(b)本明細書に提供した何れかの細胞培養培地を含むが、このとき抗体もしくはその断片はベバシズマブもしくはその断片をコードする単離核酸を含む哺乳動物細胞によって培地中に分泌される。他の態様では、組成物は：(a)ベバシズマブもしくはその断片；及び(b)本明細書に提供した何れかの細胞培養培地を含むが、このときベバシズマブもしくはその断片はベバシズマブもしくはその断片をコードする単離核酸を含む哺乳動物細胞の溶解によって培地中に放出される。組成物の哺乳動物細胞は、本明細書に詳述した任意の哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞）であってよく、組成物の培地は本明細書に詳述した任意の培地、例えば表1に詳述した1つ以上の化合物を含む培地であってよい。

【0118】

本明細書に記載した方法の何れかによって生成されたベバシズマブもしくはその断片の組成物（例えば、医薬製剤）は、所望の純度を有するベバシズマブもしくはその断片を凍結乾燥製剤もしくは水性液剤の形態にあってよい1つ以上の任意選択的な薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合する工程によって調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、使用される用量及び濃度でレシピエントにとって非毒性であり、バッファー、酸化防止剤、保存料、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質；親水性ポリマー；アミノ酸；単糖類；二糖類、及び他の炭水化物、キレート剤、糖類、塩形成対イオン、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）及び/又は非イオン性界面活性剤が含まれるがそれらに限定されない。一部の実施態様では、医薬製剤は、哺乳動物、例えばヒトに投与される。ベバシズマブもしくはその断片の医薬製剤は、非経口、肺内及び鼻腔内、及び所望であれば局所治療のために病巣内投与を含む任意の適切な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が含まれる。投与する工程は、任意の適切な経路によって、例えば注射によって、例えば一部には投与が短期間もしくは慢性的の何れであるかに依存して、静脈内もしくは皮下注射によってでよい。したがって、本明細書に提供した抗体含有製剤は、例えば個体への皮下注射（例えば、ヒトへの皮下注射）等の注射のために適切な場合がある。インビボ投与のために使用できる医薬製剤は、一般に無菌である。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通しての濾過によって容易に実施することができる。

【0119】

一部の態様では、本明細書に提供した組成物（例えば、医薬製剤）は、少なくとも100mg/mL、125mg/mL、150mg/mL、200mg/mLもしくは250mg/mLの濃度、又は約100mg/mL、約125mg/mL、約150mg/mL、約175mg/mLもしくは約200mg/mLの濃度のベバシズマブもしくはその断片を含む。他の態様では、本明細書に提供した組成物（例えば、医薬製剤）は、少なくとも1mg/mL、10mg/mL、25mg/mL、50mg/mLもしくは75mg/mLの濃度、又は約1mg/mL、約10mg/mL、約25mg/mL、約50mg/mLもしくは約75mg/mLの濃度のベバシズマブもしくはその断片を含む。

【0120】

V. 製造品及びキット

細胞培養培地に銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つを補給するためのキットが提供される。銅、インスリン及びシスチンのうちの少なくとも2つは、表1に提供した濃度の成分を提供する量で存在してよい。キットは、再構成される乾燥構成要素を含有していてよく、さらに（例えば、培地にキット構成要素を補給する際に使用するための）使用説明書を含有していてよい。キットは、本明細書に提供した構成要素を、ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するた

めの細胞培養培地に補給するために適合する量で含有していてよい。1つの態様では、キットは、細胞培養培地中に約0.9 mM - 約1.5 mMのシスチンを提供する量でシスチンを含む。本明細書の一部の実施態様では、キットは、細胞培養培地中の約1.4 mg / L - 約11 mg / Lのインスリンを提供する量にあるインスリンをさらに含む。本明細書の一部の実施態様では、キットは、細胞培養培地中の約26 nM - 約400 nMの銅を提供する量にある銅をさらに含む。一部の実施態様では、キットは、細胞培養培地中の約7.0 mg / L - 約11.0 mg / Lのインスリンを提供する量にあるインスリン、細胞培養培地中の約0.8 mM - 約2.5 mMのシスチンを提供する量にあるシスチン及び細胞培養培地中の約25.0 nM - 約400.0 nMの銅を提供する量にある銅から成る群から選択される2つ以上の構成要素を含む。

10

【0121】

本明細書の態様の何れかでは、キットは、動物由来加水分解物もしくは植物由来加水分解物又は動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方をさらに含んでいてよい。本明細書の実施態様の一部では、キットは、細胞培養培地中の約1.4 g / L - 約6.2 g / Lの植物由来加水分解物を提供する量にある植物由来加水分解物をさらに含む。本明細書の実施態様の一部では、キットは、細胞培養培地中の約5.6 g / L - 約38.0 g / Lの動物由来加水分解物を提供する量にある動物由来加水分解物をさらに含む。

20

【0122】

本発明のまた別の態様では、本発明の細胞培養培地を保持し、及び任意選択的に使用説明書を提供する容器を含む製造品が提供される。適切な容器には、例えば、ボトル及びバッグが含まれる。容器は、例えばガラスもしくはプラスチック等の様々な材料から形成されてよい。容器は、細胞培養培地及びその上もしくはそれに関連しているラベルを保持し、容器は（例えば、細胞を培養する際に使用するための）使用説明書を指示していてよい。製造品は、他のバッファー、希釈剤及び使用説明書を含む添付文書を含む、商業的及び使用者の観点から所望である他の材料をさらに含んでいてよい。

20

【0123】

本明細書に詳述した方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片を保持する、及び任意選択的に使用説明書を提供する容器を含む製造品もまた提供される。

30

【0124】

実施態様

本発明の様々な実施態様及び態様は、本明細書において全体を通して詳述されている。実施態様には、制限なく以下が含まれる。

【0125】

方法1：ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する工程を含み、細胞培養培地は、銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含み、及び細胞がベバシズマブもしくはその断片を生成する方法。

40

【0126】

方法2：ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法であって、哺乳動物細胞を、銅、インスリン及びシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含む細胞培養培地と接触させる工程を含む方法。

40

【0127】

方法3：ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞から生成されるベバシズマブもしくはその断片の量を強化する方法であって、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する工程を含み、インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する方法に比較して哺乳動物細胞から生成されるベバシズマブもしくはその断片の量が強化される方法。

【0128】

方法4：インスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含む細胞培養培地中

50

でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する方法であって、哺乳動物細胞から生成されたベバシズマブもしくはその断片の量がインスリン、銅及びシスチンのうちの少なくとも2つを含まない細胞培養培地中で哺乳動物細胞を培養する方法に比較して強化される方法。

【0129】

方法1-4の何れかについて、本方法は、以下の特徴(i)-(xviii)もしくはそのサブ特徴：

(i) 細胞培養培地は銅及びインスリンを含む

(ii) 細胞培養培地は銅及びシスチンを含む

(iii) 細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む

(iv) 細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンを含む

(v) 細胞培養培地(特徴(i)-(iv)の何れかを含有する培地を含む)はさらに、植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を含む

(vi) 細胞培養培地(特徴(i)-(v)のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む)は、インスリンを、

a. 約1.0mg/L-約100.0mg/L

b. 約10.0mg/L-約100.0mg/L

c. 約10.0mg/L-約50.0mg/L

d. 約10.0mg/L-約35.0mg/L

e. 約10.0mg/L-約25.0mg/L

f. 約5.0mg/L-約80.0mg/L

g. 約5.0mg/L-約60.0mg/L

h. 約5.0mg/L-約50.0mg/L

i. 約5.0mg/L-約40.0mg/L

j. 約5.0mg/L-約25.0mg/L

k. 約10.0mg/L-約25.0mg/L

l. 約10.0mg/L-約40.0mg/L

m. 約15.0mg/L-約20.0mg/L

n. 約5.0mg/L-約15.0mg/L

o. 約6.0mg/L-約12.0mg/L

p. 約7.0mg/L-約11.0mg/L

q. 約8.0mg/L-約10.0mg/L

r. 5.0mg/L、6.0mg/L、7.0mg/L、8.0mg/L、9.0mg/L、10.0mg/L、11.0mg/L、12.0mg/L、13.0mg/L、14.0mg/L、15.0mg/L、16.0mg/L、17.0mg/L、18.0mg/L、19.0mg/L、20.0mg/L、21.0mg/L、22.0mg/L、23.0mg/L、24.0mg/L、25.0mg/L、26.0mg/L、27.0mg/L、28.0mg/L、29.0mg/Lもしくは30.0mg/Lもしくは31.0mg/L又は32mg/Lもしくは33mg/Lもしくは34mg/Lもしくは35mg/Lもしくは36mg/Lもしくは37mg/Lもしくは38mg/Lもしくは39mg/Lもしくは40mg/Lのうちのおよそ何れか1つ

s. 7mg/L、8.0mg/L、9.0mg/L、10.0mg/Lもしくは11.0mg/Lのうちのおよそ何れか1つ

t. 約25mg/Lのうちの何れか1つの濃度で含む

(vii) 細胞培養培地(特徴(i)-(vi)のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む)は、銅を、

a. 約69nM-約1,000nM

b. 約69.0nM-約400.0nM

c. 約80nM-約400nM

10

20

30

40

50

- d . 約 1 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 e . 約 1 2 5 n M - 約 4 0 0 n M
 f . 約 1 5 0 n M - 約 4 0 0 n M
 g . 約 2 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 h . 約 2 5 0 n M - 約 4 0 0 n M
 i . 約 3 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 j . 約 3 2 5 n M - 約 3 7 5 n M
 k . 約 3 2 5 n M - 約 3 5 0 n M
 l . 1 0 0 n M 、 1 2 5 n M 、 1 5 0 n M 、 1 7 5 n M 、 2 0 0 n M 、 2 2 5 n M 、
 2 5 0 n M 、 2 7 5 n M 、 3 0 0 n M 、 3 2 5 n M 、 3 5 0 n M 、 3 7 5 n M もしくは 4 10
 0 0 n M のうちのおよそ何れか 1 つ
 m . 3 3 0 n M 、 3 3 5 n M 、 3 4 0 n M 、 3 4 5 n M もしくは 3 5 0 n M のうちの
 よそ何れか 1 つ
 n . 約 3 3 5 n M 、 3 3 6 n M 、 3 3 7 n M 、 3 3 8 n M 、 3 3 9 n M もしくは 4 0
 0 n M
 o . 約 3 3 9 n M のうちの何れか 1 つの濃度で含む
 (v i i i) 細胞培養培地 (特徴 (i) - (v i i) のうちの何れか 1 つ以上もしくは
 全部を含有する培地を含む) は、シスチンを、
 a . 約 0 . 7 m M - 約 2 . 0 m M
 b . 約 0 . 8 m M - 約 2 . 5 m M
 c . 約 0 . 8 m M - 約 2 . 0 m M
 d . 約 0 . 8 m M - 約 1 . 7 5 m M
 e . 約 0 . 8 m M - 約 1 . 6 m M
 f . 約 1 . 0 m M - 約 2 . 0 m M
 g . 約 1 . 0 m M - 約 1 . 6 m M
 h . 約 1 . 2 m M - 約 1 . 4 m M
 i . 0 . 8 m M もしくは 0 . 9 m M もしくは 1 . 0 m M もしくは 1 . 1 m M もしくは
 1 . 2 m M もしくは 1 . 3 m M もしくは 1 . 4 m M もしくは 1 . 5 m M のよそ何れか 1 20
 つ
 j . 1 . 1 m M 、 1 . 3 m M もしくは 1 . 5 m M のよそ何れか 1 つのうちのよそ
 何れか 1 つの濃度で含む
 (i x) 細胞培養培地 (特徴 (i) - (v i i i) のうちの何れか 1 つ以上もしくは
 全部を含有する培地を含む) は、動物由来加水分解物を、
 a . 約 6 . 0 g / L - 約 2 0 . 0 g / L
 b . 約 5 . 6 g / L - 約 3 8 . 0 g / L
 c . 約 7 . 0 g / L - 約 2 5 . 0 g / L
 d . 約 7 . 0 g / L - 約 2 0 . 0 g / L
 e . 約 7 . 0 g / L - 約 1 5 . 0 g / L
 f . 約 8 . 0 g / L - 約 1 2 . 0 g / L
 g . 約 9 . 0 g / L - 約 1 1 . 0 g / L
 h . 約 7 . 0 g / L - 約 1 1 . 0 g / L
 i . 5 g / L 、 1 0 g / L 、 1 5 g / L 、 2 0 g / L 、 2 5 g / L 、 3 0 g / L 、 3
 5 g / L 、 4 0 g / L 、 4 5 g / L もしくは 5 0 g / L のうちのよそ何れか 1 つ
 j . 5 g / L 、 6 g / L 、 7 g / L 、 8 g / L 、 9 g / L 、 1 0 g / L 、 1 1 g / L
 もしくは 1 2 g / L のうちのよそ何れか 1 つ
 k . 約 1 0 g / L
 l . 約 1 3 g / L のうちの何れか 1 つの濃度で含む
 (x) 細胞培養培地 (特徴 (i) - (i x) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含
 有する培地を含む) は、植物由来加水分解物を、
 a . 約 1 . 0 g / L - 約 1 0 . 0 g / L
 40
 50

- b . 約 1 . 4 g / L - 約 1 1 . 0 g / L
 c . 約 1 . 4 g / L - 約 6 . 2 g / L
 d . 約 1 . 5 g / L - 約 5 . 5 g / L
 e . 約 1 . 5 g / L - 約 4 . 5 g / L
 f . 約 1 . 5 g / L - 約 3 . 5 g / L
 g . 約 2 . 0 g / L - 約 3 . 0 g / L
 h . 約 1 . 5 g / L - 約 2 . 5 g / L
 i . 約 1 . 7 5 g / L - 約 2 . 7 5 g / L
 j . 約 2 . 2 5 g / L - 約 2 . 7 5 g / L
 k . 1 . 7 5 g / L、2 . 0 g / L、2 . 2 5 g / L、2 . 5 g / L、3 . 0 g / L
 、3 . 2 5 、3 . 5 g / L、3 . 7 5 g / Lもしくは4 . 0 g / Lのうちのおよそ何れか
 1 つ
 1 . 2 . 0 g / L、2 . 2 5 g / L、2 . 5 g / Lもしくは3 . 0 g / Lのうちの
 よそ何れか 1 つ
 m . 約 2 . 5 g / L
 n . 約 3 . 1 g / Lのうちの何れか 1 つの濃度で含む
- (x i) 細胞培養培地 (特徴 (i) - (x) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) は、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、動物由来加水分解物は植物由来加水分解物より多い量で存在する
- (x i i) 細胞培養培地 (特徴 (i) - (x i) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) はインスリンを含み、本方法は追加量のインスリンを細胞培養培地に加える工程を含み、追加量のインスリンは : (a) 細胞培養培地に細胞培養サイクル中に 1 回もしくは少なくとも 3 回もしくは少なくとも 6 回加えられてよく、(b) 細胞培養培地中に、
- a . 約 1 . 0 m g / L - 約 1 0 0 . 0 m g / L
 b . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 1 0 0 . 0 m g / L
 c . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 5 0 . 0 m g / L
 d . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 3 5 . 0 m g / L
 e . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
 f . 約 5 . 0 m g / L - 約 8 0 . 0 m g / L
 g . 約 5 . 0 m g / L - 約 6 0 . 0 m g / L
 h . 約 5 . 0 m g / L - 約 5 0 . 0 m g / L
 i . 約 5 . 0 m g / L - 約 4 0 . 0 m g / L
 j . 約 5 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
 k . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
 l . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 4 0 . 0 m g / L
 m . 約 1 5 . 0 m g / L - 約 2 0 . 0 m g / L
 n . 約 5 . 0 m g / L - 約 1 5 . 0 m g / L
 o . 約 6 . 0 m g / L - 約 1 2 . 0 m g / L
 p . 約 7 . 0 m g / L - 約 1 1 . 0 m g / L
 q . 約 8 . 0 m g / L - 約 1 0 . 0 m g / L
 r . 5 . 0 m g / L、6 . 0 m g / L、7 . 0 m g / L、8 . 0 m g / L、9 . 0 m
 g / L、1 0 . 0 m g / L、1 1 . 0 m g / L、1 2 . 0 m g / L、1 3 . 0 m g / L、
 1 4 . 0 m g / L、1 5 . 0 m g / L、1 6 . 0 m g / L、1 7 . 0 m g / L、1 8 . 0
 m g / L、1 9 . 0 m g / L、2 0 . 0 m g / L、2 1 . 0 m g / L、2 2 . 0 m g / L
 、2 3 . 0 m g / L、2 4 . 0 m g / L、2 5 . 0 m g / L、2 6 . 0 m g / L、2 7 .
 0 m g / L、2 8 . 0 m g / L、2 9 . 0 m g / Lもしくは3 0 . 0 m g / Lもしくは3
 1 . 0 m g / L又は3 2 m g / Lもしくは3 3 m g / Lもしくは3 4 m g / Lもしくは3
 5 m g / Lもしくは3 6 m g / Lもしくは3 7 m g / Lもしくは3 8 m g / Lもしくは3
 9 m g / Lもしくは4 0 m g / Lのうちのおよそ何れか 1 つ

10

20

30

40

50

s . 7 m g / L 、 8 . 0 m g / L 、 9 . 0 m g / L 、 10 . 0 m g / L もしくは 11 . 0 m g / L のうちのおよそ何れか 1 つ

t . 約 25 m g / L

u . 約 15 m g / L のうちの何れか 1 つの濃度のインスリンを提供する量で加えられてよい

(x i i i) 本方法は、細胞培養培地（特徴（i）-（x i i）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）にシステインを加える工程をさらに含み、システインは細胞培養培地に（a）システインを含まない基底培地に加えられるバッチフィードの 1 つの成分として加えられてよい、及び／又は（b）約 0 . 5 - 約 5 . 0 m M もしくは約 0 . 5 - 約 2 . 0 m M もしくは約 0 . 5 - 約 2 . 0 m M (0 . 8 m M の濃度等) もしくは約 7 . 0 - 約 8 . 0 m M (約 7 . 5 m M の濃度等) の濃度にある細胞培養培地中のシステインを提供する量で加えられてよい

(x i v) 本方法は、細胞培養培地（特徴（i）-（x i i）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）にシスチンを加える工程をさらに含み、シスチンは基底培地に加えられるバッチフィードの 1 つの成分として細胞培養培地に加えられてよい、及び約 0 . 1 - 約 1 . 5 m M の濃度 (0 . 2 m M の濃度等) にある細胞培養培地中のシスチンを提供する量で加えられてよい

(x v) 細胞は、（例えば特徴（i）-（x i v）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む何れかの細胞培養培地中で）約 28 - 約 37 もしくは約 31 - 約 35 の範囲内の温度で培養される

(x v i) 細胞は、（例えば特徴（i）-（x i v）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む何れかの細胞培養培地中で）第 1 期間は約 35 の第 1 温度で培養され、第 2 期間は約 33 の第 2 温度で培養され、及び第 3 期間は約 31 の第 3 温度で培養される

(x v i i) ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地（特徴（i）-（x v i）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）中に分泌される

(x v i i i) 本方法は、細胞培養（特徴（i）-（x v i）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含む）のうちの何れか 1 つ以上又は特徴もしくはサブ特徴の何れかの組合せを含んでいてよい。

【 0130 】

さらに本明細書で提供されるのは、方法 1 - 4 の何れかを制限なく含む本明細書に提供した任意の方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片であり、その方法は、特徴（i）-（x v i i i）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部又はそれらのサブ特徴もしくは上記の何れかの組合せをさらに含んでいてよい。

【 0131 】

さらに提供されるのは、（i）方法 1 - 4 の何れかを制限なく含む本明細書に提供した任意の方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片であり、その方法は、特徴（i）-（x v i i i）のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部又はそれらのサブ特徴もしくは上記の何れかの組合せをさらに含んでいてよいベバシズマブもしくはその断片及び（i i）薬学的に許容される担体を含む組成物である。

【 0132 】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使用するための細胞培養培地を補給するためのキットであって、成分（i）-（i i i）：（i）

a . 約 1 . 0 m g / L - 約 100 . 0 m g / L

b . 約 10 . 0 m g / L - 約 100 . 0 m g / L

c . 約 10 . 0 m g / L - 約 50 . 0 m g / L

d . 約 10 . 0 m g / L - 約 35 . 0 m g / L

e . 約 10 . 0 m g / L - 約 25 . 0 m g / L

10

20

30

40

50

- f . 約 5 . 0 m g / L - 約 8 0 . 0 m g / L
 g . 約 5 . 0 m g / L - 約 6 0 . 0 m g / L
 h . 約 5 . 0 m g / L - 約 5 0 . 0 m g / L
 i . 約 5 . 0 m g / L - 約 4 0 . 0 m g / L
 j . 約 5 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
 k . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
 l . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 4 0 . 0 m g / L
 m . 約 1 5 . 0 m g / L - 約 2 0 . 0 m g / L
 n . 約 5 . 0 m g / L - 約 1 5 . 0 m g / L
 o . 約 6 . 0 m g / L - 約 1 2 . 0 m g / L 10
 p . 約 7 . 0 m g / L - 約 1 1 . 0 m g / L
 q . 約 8 . 0 m g / L - 約 1 0 . 0 m g / L
 r . 5 . 0 m g / L 、 6 . 0 m g / L 、 7 . 0 m g / L 、 8 . 0 m g / L 、 9 . 0 m
 g / L 、 1 0 . 0 m g / L 、 1 1 . 0 m g / L 、 1 2 . 0 m g / L 、 1 3 . 0 m g / L
 1 4 . 0 m g / L 、 1 5 . 0 m g / L 、 1 6 . 0 m g / L 、 1 7 . 0 m g / L 、 1 8 . 0
 m g / L 、 1 9 . 0 m g / L 、 2 0 . 0 m g / L 、 2 1 . 0 m g / L 、 2 2 . 0 m g / L
 、 2 3 . 0 m g / L 、 2 4 . 0 m g / L 、 2 5 . 0 m g / L 、 2 6 . 0 m g / L 、 2 7 .
 0 m g / L 、 2 8 . 0 m g / L 、 2 9 . 0 m g / L もしくは 3 0 . 0 m g / L もしくは 3
 1 . 0 m g / L 又は 3 2 m g / L もしくは 3 3 m g / L もしくは 3 4 m g / L もしくは 3
 5 m g / L もしくは 3 6 m g / L もしくは 3 7 m g / L もしくは 3 8 m g / L もしくは 3
 9 m g / L もしくは 4 0 m g / L のうちのおよそ何れか 1 つ 20
 s . 7 m g / L 、 8 . 0 m g / L 、 9 . 0 m g / L 、 1 0 . 0 m g / L もしくは 1 1
 . 0 m g / L のうちのおよそ何れか 1 つ
 t . 約 2 5 m g / L のうちの何れか 1 つの濃度を提供する量にあるインスリン
 (i i)
 a . 約 0 . 7 m M - 約 2 . 0 m M
 b . 約 0 . 8 m M - 約 2 . 5 m M
 c . 約 0 . 8 m M - 約 2 . 0 m M
 d . 約 0 . 8 m M - 約 1 . 7 5 m M 30
 e . 約 0 . 8 m M - 約 1 . 6 m M
 f . 約 1 . 0 m M - 約 2 . 0 m M
 g . 約 1 . 0 m M - 約 1 . 6 m M
 h . 約 1 . 2 m M - 約 1 . 4 m M
 i . 0 . 8 m M もしくは 0 . 9 m M もしくは 1 . 0 m M もしくは 1 . 1 m M もしくは
 1 . 2 m M もしくは 1 . 3 m M もしくは 1 . 4 m M もしくは 1 . 5 m M のうちのおよそ何
 れか 1 つ
 j . 1 . 1 m M 、 1 . 3 m M もしくは 1 . 5 m M のうちのおよそ何れか 1 つのうちの
 何れか 1 つの濃度を提供する量にあるシスチン
 (i i i)
 a . 約 6 9 . 0 n M - 約 1 , 0 0 0 n M 40
 b . 約 6 9 . 0 n M - 約 4 0 0 . 0 n M
 c . 約 8 0 n M - 約 4 0 0 n M
 d . 約 1 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 e . 約 1 2 5 n M - 約 4 0 0 n M
 f . 約 1 5 0 n M - 約 4 0 0 n M
 g . 約 2 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 h . 約 2 5 0 n M - 約 4 0 0 n M
 i . 約 3 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 j . 約 3 2 5 n M - 約 3 7 5 n M
 k . 約 3 2 5 n M - 約 3 5 0 n M 50

1 . 1 0 0 n M、1 2 5 n M、1 5 0 n M、1 7 5 n M、2 0 0 n M、2 2 5 n M、
2 5 0 n M、2 7 5 n M、3 0 0 n M、3 2 5 n M、3 5 0 n M、3 7 5 n Mもしくは4
0 0 n Mのうちのおよそ何れか1つ

m . 3 3 0 n M、3 3 5 n M、3 4 0 n M、3 4 5 n Mもしくは3 5 0 n Mのうちの
およそ何れか1つ

n . 約3 3 5 n M、3 3 6 n M、3 3 7 n M、3 3 8 n M、3 3 9 n Mもしくは4 0
0 n M

o . 約3 3 9 n Mの何れか1つの濃度にある銅のうちの少なくとも2つを含むキット
もまた提供される。

【0 1 3 3】

10

キットは、

i . 例えば、

a . 約6 . 0 g / L - 約2 0 . 0 g / L

b . 約5 . 6 g / L - 約3 8 . 0 g / L

c . 約7 . 0 g / L - 約2 5 . 0 g / L

d . 約7 . 0 g / L - 約2 0 . 0 g / L

e . 約7 . 0 g / L - 約1 5 . 0 g / L

f . 約8 . 0 g / L - 約1 2 . 0 g / L

g . 約9 . 0 g / L - 約1 1 . 0 g / L

h . 約7 . 0 g / L - 約1 1 . 0 g / L

20

i . 5 g / L、1 0 g / L、1 5 g / L、2 0 g / L、2 5 g / L、3 0 g / L、3
5 g / L、4 0 g / L、4 5 g / Lもしくは5 0 g / Lのうちのおよそ何れか1つ

j . 5 g / L、6 g / L、7 g / L、8 g / L、9 g / L、1 0 g / L、1 1 g / L
もしくは1 2 g / Lのうちのおよそ何れか1つ

k . 約1 0 g / L

l . 約1 3 g / Lのうちの何れか1つの濃度を提供する量にある動物由来加水分解物

、

i i . 例えば、

a . 約1 . 0 g / L - 約1 0 . 0 g / L

30

b . 約1 . 4 g / L - 約1 1 . 0 g / L

c . 約1 . 4 g / L - 約6 . 2 g / L

d . 約1 . 5 g / L - 約5 . 5 g / L

e . 約1 . 5 g / L - 約4 . 5 g / L

f . 約1 . 5 g / L - 約3 . 5 g / L

g . 約2 . 0 g / L - 約3 . 0 g / L

h . 約1 . 5 g / L - 約2 . 5 g / L

i . 約1 . 7 5 g / L - 約2 . 7 5 g / L

j . 約2 . 2 5 g / L - 約2 . 7 5 g / L

k . 1 . 7 5 g / L、2 . 0 g / L、2 . 2 5 g / L、2 . 5 g / L、3 . 0 g / L
、3 . 2 5 、3 . 5 g / L、3 . 7 5 g / Lもしくは4 . 0 g / Lのうちのおよそ何れか
1つ

40

l . 2 . 0 g / L、2 . 2 5 g / L、2 . 5 g / Lもしくは3 . 0 g / Lのうちのお
よそ何れか1つ

m . 約2 . 5 g / L

n . 約3 . 1 g / Lのうちの何れか1つの濃度を提供する量にある植物由来加水分解
物のうちの何れか1つ以上を含む他の成分をさらに含んでいてよい。

【0 1 3 4】

ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する際に使
用するための細胞培養培地であって、成分 (i) - (i i i) :

(i)

50

- a . 約 1 . 0 m g / L - 約 1 0 0 . 0 m g / L
- b . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 1 0 0 . 0 m g / L
- c . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 5 0 . 0 m g / L
- d . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 3 5 . 0 m g / L
- e . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
- f . 約 5 . 0 m g / L - 約 8 0 . 0 m g / L
- g . 約 5 . 0 m g / L - 約 6 0 . 0 m g / L
- h . 約 5 . 0 m g / L - 約 5 0 . 0 m g / L
- i . 約 5 . 0 m g / L - 約 4 0 . 0 m g / L
- j . 約 5 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
- k . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 2 5 . 0 m g / L
- l . 約 1 0 . 0 m g / L - 約 4 0 . 0 m g / L
- m . 約 1 5 . 0 m g / L - 約 2 0 . 0 m g / L
- n . 約 5 . 0 m g / L - 約 1 5 . 0 m g / L
- o . 約 6 . 0 m g / L - 約 1 2 . 0 m g / L
- p . 約 7 . 0 m g / L - 約 1 1 . 0 m g / L
- q . 約 8 . 0 m g / L - 約 1 0 . 0 m g / L

10

20

30

40

50

r . 5 . 0 m g / L 、 6 . 0 m g / L 、 7 . 0 m g / L 、 8 . 0 m g / L 、 9 . 0 m g / L 、 1 0 . 0 m g / L 、 1 1 . 0 m g / L 、 1 2 . 0 m g / L 、 1 3 . 0 m g / L 、 1 4 . 0 m g / L 、 1 5 . 0 m g / L 、 1 6 . 0 m g / L 、 1 7 . 0 m g / L 、 1 8 . 0 m g / L 、 1 9 . 0 m g / L 、 2 0 . 0 m g / L 、 2 1 . 0 m g / L 、 2 2 . 0 m g / L 、 2 3 . 0 m g / L 、 2 4 . 0 m g / L 、 2 5 . 0 m g / L 、 2 6 . 0 m g / L 、 2 7 . 0 m g / L 、 2 8 . 0 m g / L 、 2 9 . 0 m g / L もしくは 3 0 . 0 m g / L もしくは 3 1 . 0 m g / L 又は 3 2 m g / L もしくは 3 3 m g / L もしくは 3 4 m g / L もしくは 3 5 m g / L もしくは 3 6 m g / L もしくは 3 7 m g / L もしくは 3 8 m g / L もしくは 3 9 m g / L もしくは 4 0 m g / L のうちのおよそ何れか 1 つ

s . 7 m g / L 、 8 . 0 m g / L 、 9 . 0 m g / L 、 1 0 . 0 m g / L もしくは 1 1 . 0 m g / L のうちのおよそ何れか 1 つ

t . 約 2 5 m g / L のうちの何れか 1 つの濃度を提供する量にあるインスリン

(i i)

- a . 約 0 . 7 m M - 約 2 . 0 m M
- b . 約 0 . 8 m M - 約 2 . 5 m M
- c . 約 0 . 8 m M - 約 2 . 0 m M
- d . 約 0 . 8 m M - 約 1 . 7 5 m M
- e . 約 0 . 8 m M - 約 1 . 6 m M
- f . 約 1 . 0 m M - 約 2 . 0 m M
- g . 約 1 . 0 m M - 約 1 . 6 m M
- h . 約 1 . 2 m M - 約 1 . 4 m M

i . 0 . 8 m M もしくは 0 . 9 m M もしくは 1 . 0 m M もしくは 1 . 1 m M もしくは 1 . 2 m M もしくは 1 . 3 m M もしくは 1 . 4 m M もしくは 1 . 5 m M のうちのおよそ何れか 1 つ

j . 1 . 1 m M 、 1 . 3 m M もしくは 1 . 5 m M のうちのおよそ何れか 1 つのうちの何れか 1 つの濃度を提供する量にあるシスチン

(i i i)

- a . 約 6 9 . 0 n M - 約 1 , 0 0 0 n M
- b . 約 6 9 . 0 n M - 約 4 0 0 . 0 n M
- c . 約 8 0 n M - 約 4 0 0 n M
- d . 約 1 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
- e . 約 1 2 5 n M - 約 4 0 0 n M
- f . 約 1 5 0 n M - 約 4 0 0 n M

g . 約 2 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 h . 約 2 5 0 n M - 約 4 0 0 n M
 i . 約 3 0 0 n M - 約 4 0 0 n M
 j . 約 3 2 5 n M - 約 3 7 5 n M
 k . 約 3 2 5 n M - 約 3 5 0 n M
 l . 1 0 0 n M、1 2 5 n M、1 5 0 n M、1 7 5 n M、2 0 0 n M、2 2 5 n M、
 2 5 0 n M、2 7 5 n M、3 0 0 n M、3 2 5 n M、3 5 0 n M、3 7 5 n Mもしくは4
 0 0 n Mのうちのおよそ何れか 1 つ
 m . 3 3 0 n M、3 3 5 n M、3 4 0 n M、3 4 5 n Mもしくは3 5 0 n Mのうちの
 およそ何れか 1 つ
 n . 約 3 3 5 n M、3 3 6 n M、3 3 7 n M、3 3 8 n M、3 3 9 n Mもしくは4 0
 0 n M
 o . 約 3 3 9 n Mの何れか 1 つの濃度にある銅のうちの少なくとも 2 つを含む細胞培
 養培地もまた提供される。

【 0 1 3 5 】

細胞培養培地は、

1) 例えれば、

a . 約 6 . 0 g / L - 約 2 0 . 0 g / L
 b . 約 5 . 6 g / L - 約 2 5 . 0 g / L
 c . 約 7 . 0 g / L - 約 2 5 . 0 g / L
 d . 約 7 . 0 g / L - 約 2 0 . 0 g / L
 e . 約 7 . 0 g / L - 約 1 5 . 0 g / L
 f . 約 8 . 0 g / L - 約 1 2 . 0 g / L
 g . 約 9 . 0 g / L - 約 1 1 . 0 g / L
 h . 約 7 . 0 g / L - 約 1 1 . 0 g / L
 i . 5 g / L、1 0 g / L、1 5 g / L、2 0 g / Lもしくは2 5 g / Lのうちのお
 よそ何れか 1 つ
 j . 5 g / L、6 g / L、7 g / L、8 g / L、9 g / L、1 0 g / L、1 1 g / L
 もしくは1 2 g / Lのうちのおよそ何れか 1 つ

k . 約 1 0 g / L
 l . 約 1 3 g / L のうちの何れか 1 つの濃度を提供する量にある動物由来加水分解物
 2) 例えれば下記 :

a . 約 1 . 0 g / L - 約 1 0 . 0 g / L
 b . 約 1 . 4 g / L - 約 1 1 . 0 g / L
 c . 約 1 . 4 g / L - 約 6 . 2 g / L
 d . 約 1 . 5 g / L - 約 5 . 5 g / L
 e . 約 1 . 5 g / L - 約 4 . 5 g / L
 f . 約 1 . 5 g / L - 約 3 . 5 g / L
 g . 約 2 . 0 g / L - 約 3 . 0 g / L
 h . 約 1 . 5 g / L - 約 2 . 5 g / L
 i . 約 1 . 7 5 g / L - 約 2 . 7 5 g / L
 j . 約 2 . 2 5 g / L - 約 2 . 7 5 g / L
 k . 1 . 7 5 g / L、2 . 0 g / L、2 . 2 5 g / L、2 . 5 g / L、3 . 0 g / L
 、3 . 2 5 、3 . 5 g / L、3 . 7 5 g / Lもしくは4 . 0 g / Lのうちのおよそ何れか
 1 つ
 l . 2 . 0 g / L、2 . 2 5 g / L、2 . 5 g / Lもしくは3 . 0 g / Lのうちのお
 よそ何れか 1 つ
 m . 約 2 . 5 g / L
 n . 約 3 . 1 g / L のうちの何れか 1 つの濃度を提供する量にある植物由来加水分解
 物のうちの何れか 1 つ以上を含む他の成分をさらに含んでいてよい。

【0136】

細胞培養培地には、追加の細胞培養培地成分がさらに補給されてよいが、このとき追加の細胞培養培地成分は、例えばインスリン及び／又はシステイン、例えば本実施態様に列挙した濃度（15 mg / L等）を含む本明細書に提供したインスリンの何れかの濃度を提供する量にあるインスリン及び／又は本実施態様に列挙した濃度を含む本明細書に提供したシステインの何れかの濃度（例えば0.8 mM）を提供する量にあるシステインを含んでいてよい。

【0137】

細胞培養培地には、追加の細胞培養培地成分がさらに補給されてよいが、このとき追加の細胞培養培地成分は、例えばインスリン及び／又はシステイン及び／又はシスチン、例えば本実施態様に列挙した濃度（15 mg / L等）を含む本明細書に提供したインスリンの何れかの濃度を提供する量にあるインスリン及び／又は本実施態様に列挙した濃度を含む本明細書に提供したシステインの何れかの濃度（例えば0.8 mM）を提供する量にあるシステイン及び／又は本実施態様に列挙した濃度を含む本明細書に提供シスチンの何れかの濃度（例えば0.2 mM）を提供する量にあるシスチンを含んでいてよい。

10

【0138】

本明細書にさらに提供されるのは、（a）ベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞；及び（b）本実施態様に提供した細胞培養培地を制限なく含む本明細書に詳述した細胞培養培地を含む組成物である。さらに提供されるのは、（a）ベバシズマブもしくはその断片；及び（b）本実施態様に提供した細胞培養培地を制限なく含む本明細書に詳述した細胞培養培地を含む組成物である。

20

【0139】

本明細書にさらに提供されるのは、ベバシズマブもしくはその断片を生成する方法であって、細胞培養培地中でベバシズマブもしくはその断片をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養する工程を含み、細胞培養サイクル中の初期細胞培養培地は、約69 nM-約1,000 nMの濃度の銅、約1.0 mg / L-約100.0 mg / Lの濃度のインスリン及び約0.7 mM-約2.0 mMの濃度のシスチンから成る群から選択される2つ以上の成分を含み、細胞がベバシズマブもしくは断片を生成する方法である。

【0140】

一部の実施態様では、制限なく、本方法は、以下の特徴（i）-（x x i i i）もしくはそのサブ特徴の何れかの組合せ：

30

（i）初期細胞培養培地は銅及びインスリンを含む

（i i）初期細胞培養培地は銅及びシスチンを含む

（i i i）初期細胞培養培地はインスリン及びシスチンを含む

（i v）初期細胞培養培地は銅、インスリン及びシスチンを含む

（v）初期細胞培養培地（特徴（i）-（i v）のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）は、インスリンを下記：

a. 約10.0 mg / L-約50.0 mg / L

b. 約10.0 mg / L-約20.0 mg / L

c. 10.0 mg / L、15.0 mg / L、20.0 mg / Lもしくは25.0 mg

40

/ Lのうちのおよそ何れか1つのうちの何れか1つの濃度で含む

（v i）初期細胞培養培地（特徴（i）-（v）のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）は、銅を下記：

a. 約325 nM-約375 nM

b. 約325 nM-約350 nM

c. 330 nM、335 nM、339 nM、340 nM、345 nM及び350 nMのうちのおよそ何れか1つのうちの何れか1つの濃度で含む

（v i i）初期細胞培養培地（特徴（i）-（v i）のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む）は、シスチンを下記：

a. 約0.7 mM-約2.0 mM

50

b. 約 1.0 mM - 約 1.6 mM

c. 1.0 mM、1.1 mM、1.2 mM、1.3 mM、1.4 mM、1.5 mM 及び 1.6 mM のうちのおよそ何れか 1 つのうちの何れか 1 つの濃度で含む

(viii) 初期細胞培養培地 (特徴 (i) - (viii) の何れかを含有する培地を含む) は、植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方をさらに含む

(ix) 初期細胞培養培地 (特徴 (i) - (viii) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) は、動物由来加水分解物を下記：

a. 約 6.0 g / L - 約 20.0 g / L

b. 約 8.0 g / L - 約 12.0 g / L

c. 約 9.0 g / L - 約 11.0 g / L

d. 約 13 g / L のうちの何れか 1 つの濃度で含む

10

(x) 初期細胞培養培地 (特徴 (i) - (ix) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) は、植物由来加水分解物を下記：

a. 約 1.0 g / L - 約 10.0 g / L

b. 約 2.0 g / L - 約 3.0 g / L

c. 約 2.25 g / L - 約 2.75 g / L

d. 約 2.5 g / L のうちの何れか 1 つの濃度で含む

20

(xi) 初期細胞培養培地 (特徴 (i) - (x) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) は、動物由来加水分解物及び植物由来加水分解物の両方を含み、動物由来加水分解物は植物由来加水分解物より多い量で存在する

(xii) 初期細胞培養培地 (特徴 (i) - (xi) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) は、インスリンを含み、本方法は、細胞培養サイクル中の細胞培養培地に追加量のインスリンを加える工程をさらに含み、及び任意選択的に a) 追加量のインスリンは細胞培養培地に細胞培養サイクル中に少なくとも 1 回、少なくとも 2 回、少なくとも 3 回、少なくとも 4 回、少なくとも 5 回、もしくは少なくとも 6 回加えられてよい；及び / 又は b) 各時点に加えられるインスリンは、約 5.0 mg / L - 約 25.0 mg / L 又は 5.0 mg / L、10.0 mg / L、15.0 mg / L、20.0 mg / L 及び 25.0 mg / L のうちの何れか 1 つである；及び / 又は c) 細胞培養サイクル中に加えられるインスリンの累積量は、下記の：約 20.0 mg / L - 約 100.0 mg / L、又は 20.0 mg / L、25.0 mg / L、30 mg / L、35 mg / L、40 mg / L、45 mg / L、50 mg / L、55 mg / L、60 mg / L、65 mg / L、70 mg / L、75 mg / L、80 mg / L 及び 85 mg / L のうちのおよそ何れか 1 つである

30

(xiii) 初期細胞培養培地 (特徴 (i) - (xii) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) は、シスチンを含み、本方法は、細胞培養サイクル中の細胞培養培地に追加量のシスチンを加える工程をさらに含み、及び任意選択的に、a) シスチンは、細胞培養培地中の約 0.1 mM - 約 1.5 mM のシスチン又は細胞培養培地中の約 0.4 mM - 約 0.7 mM (例えば、約 0.4 mM - 約 0.6 mM、約 0.4 mM - 約 0.5 mM) の追加のシスチンを提供する量で加えられる；及び / 又は b) シスチンは細胞培養サイクル中にバッチフィードで加えられる

40

(xiv) 本方法はさらに：細胞培養サイクル中の少なくとも 1 バッチフィード、又は細胞培養サイクル中の 2、3 もしくは 4 バッチフィードのうちの何れか 1 つを加える工程をさらに含む；及び任意選択的にバッチフィード培地は植物由来加水分解物、動物由来加水分解物又は植物由来加水分解物及び動物由来加水分解物の両方を含む

(xv) 細胞培養サイクル中に、培地 (特徴 (i) - (xiv) のうちの何れか 1 つ以上もしくは全部を含有する培地を含む) の温度は、培養の開始時の温度に比較して、少なくとも約 2、少なくとも約 3、少なくとも約 4 もしくは少なくとも約 5 低下させられる

(xvi) 細胞培養サイクル中に、培地 (特徴 (i) - (xv) のうちの何れか 1 つ以

50

上もしくは全部を含有する培地を含む)の温度は、a)細胞培養サイクル中に少なくとも1回もしくは少なくとも2回低下させられる;及び/又はb)温度は培養の開始時後の第8日及び第10日に低下させられる

(x v i i)細胞は、(例えば特徴(i)-(x v i)のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む何れかの細胞培養培地中で)約31-約35の範囲内の温度で培養される

(x v i i i)細胞は、(例えば特徴(i)-(x v i i)のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む何れかの細胞培養培地中で)、第1期間は約35の第1温度で培養され、第2期間は約33の第2温度で培養され、及び第3期間は約31の第3温度で培養される。

(x i x)細胞は、約7.0-約7.3のpHを有する培地中(例えば特徴(i)-(x v i i i)のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む何れかの細胞培養培地中)で培養される。

(x x)本方法は、(a)約10mg/Lのインスリン、約325nM-約350nMの銅及び約1.3mMのシスチンを含む初期細胞培養培地中で細胞を培養する工程;(b)培養する工程の開始後の第3日に約15mg/Lの濃度の追加のインスリンを提供するために細胞培養培地に第1バッチフィード及びインスリンフィードを提供する工程;及び(c)培養する工程の開始後の第6日に約0.4mM-約0.7mMの濃度の追加のシスチンを提供するために細胞培養培地にシスチンを含む第2バッチフィードを提供する工程を含み、このとき細胞は約35の初期温度で培養され、温度は第8日に約33へ低下させられ、培養する工程の開始後の第10日に約31へさらに低下させられる

(x x i)ベバシズマブもしくはその断片は、細胞培養培地(特徴(i)-(x x))のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む)中へ分泌される

(x x i i)本方法は、細胞培養(特徴(i)-(x x i))のうちの何れか1つ以上もしくは全部を含有する培地を含む)からベバシズマブもしくはその断片を回収する工程をさらに含む

(x x i i i)哺乳動物細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞である、の何れか1つ以上を含んでいてよい。

【0141】

さらに本明細書で提供されるのは、本明細書に提供した任意の方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片であり、その方法は、特徴(i)-(x x i i i)のうちの何れか1つ以上もしくは全部又はそれらのサブ特徴もしくは上記の何れかの組合せをさらに含んでいてよい。

【0142】

さらに提供されるのは、(i)本明細書に提供した任意の方法によって生成されたベバシズマブもしくはその断片であり、その方法は、特徴(i)-(x x i i i)のうちの何れか1つ以上もしくは全部又はそれらのサブ特徴もしくは上記の何れかの組合せをさらに含んでいてよいベバシズマブもしくはその断片及び(ii)薬学的に許容される担体を含む組成物である。

【0143】

下記の実施例は、本発明を限定するためではなく例示するために提供する。

【実施例】

【0144】

実施例1: 細胞培養培地成分が哺乳動物細胞系によって生成されるベバシズマブの量に及ぼす影響

ベバシズマブを产生するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、様々な量のインスリンを含有する細胞培養培地中で培養し、インスリンが产生したベバシズマブの量に及ぼす影響を評価した。ベバシズマブの产生は、細胞培養中に339nMの銅、1%の動物性加水分解物及び0.25%の植物性加水分解物を含有する基底培地中に細胞を接種する工程によって開始し、バッチフィード培地はバイオリアクター内で14日間細胞培養サ

10

20

30

40

50

イクルの間の第3日に加えた。コントロール細胞培養の基底細胞培養培地には、10 mg/L未満のインスリンを補給したが、細胞培養サイクル中には追加のインスリンを補給しなかった。2つの代表的な実験ケース（ケース1及びケース2）では、基底細胞培養培地中のインスリンレベルは10 mg/Lであった。追加のインスリンは、14日間細胞培養サイクル中の終了時に各々25 mg/L及び40 mg/Lの最終量を用いる細胞培養ケース1及び細胞培養ケース2を提供できるように細胞培養サイクル中に3-6回加えた（表A）。細胞は第1日に37で培養し、温度はその後第1日に35へ、第8日に33へ、及び第10日に31へ下方シフトさせた。力価の改善は、コントロールに比較した増加率によって定量した。細胞培養サイクル中のインスリンの10 mg/L未満から25 mg/Lもしくは40 mg/Lの全添加は、コントロールと比較して各々約16%もしくは約18%の力価改善をもたらした（表A）。

10

【0145】

表A. 代表的なインスリン添加手順及び結果

	インスリンの添加 ケース1	インスリンの添加 ケース2
14日間中に加えられた総インスリン濃度	25 mg/L	40 mg/L
力価改善の増加率	16 %	18 %

20

【0146】

ベバシズマブを产生するCHO細胞を、様々な起源由来の様々な量の加水分解物を含有する細胞培養培地中で培養し、特定加水分解物が产生したベバシズマブの量に及ぼす影響を評価した。2つの代表的な手順では、ベバシズマブの产生は細胞培養中で、339 nMの銅を含有する基底細胞培養培地中で細胞を接種する工程によって開始し、バッチフィード培地はバイオリアクター内で14日間細胞培養サイクルの間の第3日に加えた。手順1のための基底細胞培養培地は植物由来加水分解物を含まず1%の動物由来加水分解物を有したが、手順2は、0.25%の植物由来加水分解物と組み合わせて0.75%の動物由来加水分解物が補給された基底細胞培養培地を有した（表B）。2つの手順によって生成された抗体力価の分析は、手順2は、手順1を使用して培養された細胞によって生成されるベバシズマブの量に比較して細胞から生成されるベバシズマブの量における27%増加を提供することを証明した（表B）。

30

【0147】

表B. 代表的な実験手順

	手順1	手順2
ブタペプトン	1%	0.75%
植物性ペプトン	なし	0.25%
力価改善の増加率	非適用	27%

40

【0148】

実施例2：細胞培養培地成分が哺乳動物細胞系によって生成されるベバシズマブの量に及ぼす影響

ベバシズマブを产生するCHO細胞は、モノマー形（Cys、システイン）もしくはダイマー形（Cys-Cys、シスチン）内のどちらかのアミノ酸システインを含む基底培地中で培養した（表C）。ベバシズマブの产生は、細胞培養中に339 nMの銅、1%の動物性加水分解物及び0.25%の植物性加水分解物を含有する基底培地中に細胞を接種する工程によって開始し、バッチフィードはバイオリアクター内で14日間細胞培養サイクルの間の第3日に加えた。基底培地中のインスリンレベルは、10 mg/L未満もしくは10 mg/Lのどちらかの濃度であった。実験細胞培養の2つ（システイン+インスリ

50

ン及びシスチン + インスリン)は、25 mg / L もしくは40 mg / L の最終量を提供できるように細胞培養サイクル中に3回もしくは6回加えられた追加のインスリンを有した(表C)。細胞は第1日に37で培養し、温度はその後第1日に35へ、第8日に33へ、及び第10日に31へ下方シフトさせた。力価の改善は、コントロールに比較した増加率によって定量した。システイン(Cys)のシスチン(Cys-Cys)による置換は、コントロールに比較して力価を11%改善した。インスリン添加の影響は、シスチン(Cys-Cys)を使用して作製された基底培地中でもまた観察された。

【0149】

表C. 手順及び結果の概要

	システイン (コントロール)	シスチン	システイン+ インスリン	シスチン+イン スリン
基底培地中のシステイン (Cys)濃度	2.6 mM	0 mM	2.6 mM	0 mM
基底培地中のシスチン (Cys-Cys)濃度	0 mM	1.3 mM	0 mM	1.3 mM
14日間に加えられた総イン スリン濃度	10 mg/L 未満	10 mg/L 未 満	25 mg/L	40 mg/L
力価改善の増加率	非適用	11%	11%	14%

10

20

【0150】

実施例3: インスリン添加が哺乳動物細胞系によって生成されるベバシズマブの量に及ぼす影響

ベバシズマブを产生するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、様々な量のインスリンを含有する細胞培養培地中で培養し、インスリン添加が产生したベバシズマブの量に及ぼす影響を評価した。ベバシズマブの产生は、基底培地中に細胞を接種する工程によって細胞培養中で開始された。接種後、培地(即ち、初期細胞培養培地)は300 nMの硫酸銅(CuSO₄)、1%の動物性加水分解物及び0.25%の植物性加水分解物及び1.3 mMのシスチンを含有していた。培地はさらに、接種後に10 mg / L もしくは20 mg / L のインスリンも含有していた(表D)。バイオリアクター内の14日間細胞培養サイクルの間に、1バッチフィード培地は第3日に加え、又は2バッチフィード培地は第3日に(1バッチフィードは第3日及び2バッチフィードは第6日に)加えた。一部の細胞培養は、14日間細胞培養サイクル中の終了時に細胞培養に25 mg / L - 85 mg / L の累積量を提供できるように細胞培養サイクル中に追加のインスリンを1-6回添加された(表D)。細胞は第1日に37で培養し、温度はその後第1日に35へ、第8日に33へ、及び第10日に31へ下方シフトさせた。力価の改善を2件の代表的実験における様々な培養にわたって比較し、25 mg / mL の累積量のインスリンについては第3日にインスリンが添加された初期細胞培養培地中の10 mg / mL のインスリンが最高力価収率を生成すると決定された(図1A(1バッチフィード)及び1B(2バッチフィード))。追加のインスリン補給を行わなかった初期細胞培養培地中に20 mg / L のインスリンを含有する細胞培養は、初期細胞培養培地中の10 mg / L のインスリン及び細胞培養サイクル中に加えられた追加のインスリンを有した培養と匹敵する力価収率を証明したが、これは初期細胞培養培地中のインスリンが力価収率を増加させるための重要な因子であることを指摘していた(表D、図1A及び1B)。

30

40

【0151】

表D. 代表的なインスリン添加手順

手順	初期細胞培養培地中のインスリン	インスリンフィード	インスリンフィード日	14日後の細胞培養中の累積インスリン
1	20 mg/L	なし	なし	20 mg/L
2	10 mg/L	15 mg/L	第3日	25 mg/L
3	10 mg/L	5 mg/L	第3、6及び9日	25 mg/L
4	10 mg/L	5 mg/L	第3、5、7、9、11及び13日	40 mg/L
5	10 mg/L	15 mg/L	第3、6及び9日	55 mg/L
6	10 mg/L	25 mg/L	第3、6及び9日	85 mg/L

10

【0152】

実施例4：追加のバッチ培地フィードが哺乳動物細胞系によって生成されるベバシズマブの量に及ぼす影響

ベバシズマブを产生するCHO細胞の4種のサンプルを細胞培養培地中で培養し、生成されるベバシズマブの量に及ぼす影響を決定するために1もしくは2バッチ培地フィードを供給した。ベバシズマブの产生は、基底培地中に細胞を接種する工程によって細胞培養中で開始された。接種後、培地（即ち、初期細胞培養培地）は300nMの硫酸銅（CuSO₄）、1%の動物性加水分解物及び0.25%の植物性加水分解物及び1.3mMのシスチンを含有していた。1つの手順では、バッチフィード培地はバイオリアクター内の14日間細胞培養サイクルの間の第3日に加えた。第2手順では、バッチフィード培地はバイオリアクター内の14日間細胞培養サイクルの間の第3日及び第6日に加えた（表E）。第3日に送達されたバッチフィード培地は、2.5%の動物性加水分解物及び0.625%の植物性加水分解物を含有し、125mL/Lの用量で細胞培養内に加えた。第6日に送達されたバッチフィード培地は、7.5mMのシステイン及び7.5mMのシスチンを含有し、90mL/Lの用量で細胞培養内に加えた。したがって、細胞培養はフィード後にシスチン濃度における0.62mMの上昇を有した。細胞は第1日に37で培養し、温度はその後第1日に35へ、第8日に33へ、及び第10日に31へ下方シフトさせた。力価改善は、平均力価を示す1フィードだけを添加された培養を有する第2フィードを第6日に添加された細胞培養内で観察され、2フィード工程は0.3g/Lへの力価上昇をもたらした（約20%の力価上昇）。第14日のバイオマス蓄積（図2A）及び力価（図2B）は、第6日の第2フィードが収率を改善すること、及びこの第2フィードはより高度の増殖及び変動性におけるより早期の低下が観察されるより高い細胞齢を有する培養についてはより有意であったことを指摘した。

20

30

30

【0153】

表E. 代表的なバッチフィード添加手順

培地	手順1	手順2
初期細胞培養培地	1%の動物性加水分解物 0.25%の植物性加水分解物 1.3 mM のシスチン 10 mg/L のインスリン 300 nM の CuSO ₄	1%の動物性加水分解物 0.25%の植物性加水分解物 1.3 mM のシスチン 10 mg/L のインスリン 300 nM の CuSO ₄
第3日のバッチフィード	2.5%の動物性加水分解物 0.625%の植物性加水分解物(125mL/Lとして提供される)	2.5%の動物性加水分解物 0.625%の植物性加水分解物(125mL/Lとして提供される)
第6日のバッチフィード	なし	7.5 mM のシステイン 7.5 mM のシスチン (90 mL/Lとして提供される)

40

50

【0154】

上記に記載した結果の分析は、ベバシズマブを产生するCHO細胞を培養するための新規な工程の開発を提供した。新規な工程は、10 mg/Lのインスリン並びにシステインの代わりにシスチンを含有する初期細胞培養培地、細胞培養サイクル中の第3日及び第6日のバッチフィード並びに細胞培養の第3日のインスリンの添加の使用を組み入れた(表F、手順2)。細胞培養工程へのこれらの成分の添加は、約60%までの力価増加を生じさせた。例えば、図3及び表F、手順1に比較した手順2を参照されたい。

【0155】

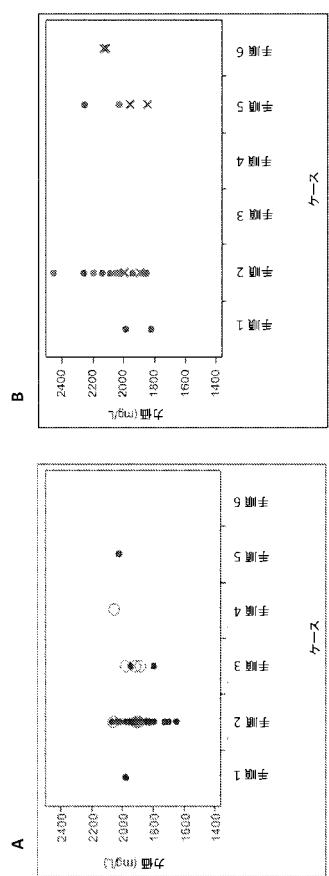
表F. 新規な細胞培養工程

培地	手順1	手順2
初期細胞培養培地	1%の動物性加水分解物 2.6 mM のシステイン 2 mg/L のインスリン	1%の動物性加水分解物 0.25%の植物性加水分解物 1.3 mM のシスチン 10 mg/L のインスリン 300 nM の CuSO ₄
第3日のバッチフィード	2.5%の動物性加水分解物 (125 mL/L として提供される)	2.5%の動物性加水分解物 0.625%の植物性加水分解物 (125 mL/L として提供される)
第3日のインスリンフィード	なし	15 mg/L のインスリン
第6日のバッチフィード	なし	7.5 mM のシステイン 7.5 mM のシスチン (90 mL/L として提供される)
温度	33°C	第1日の35°C、第8日の33°C及び 第10日の31°C

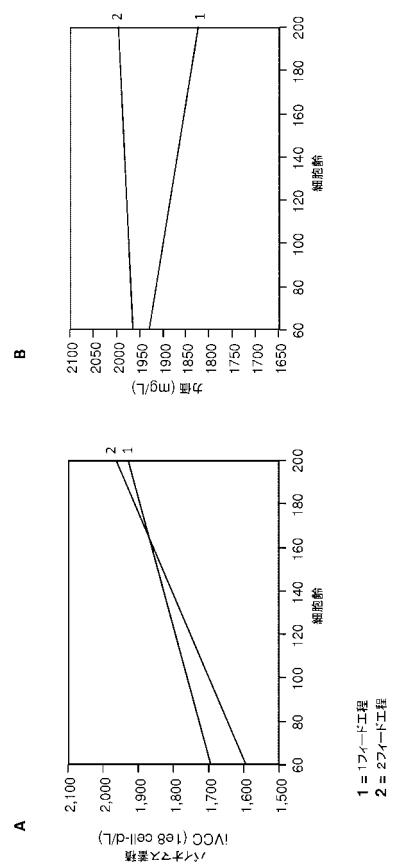
10

20

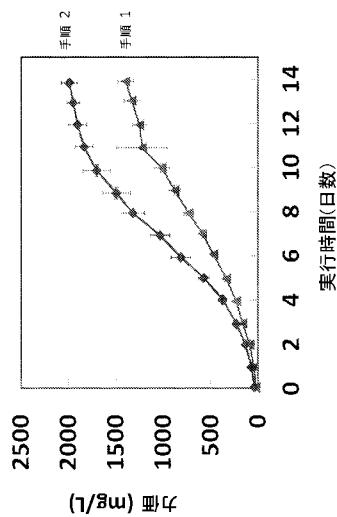
【図1】



【図2】



【図3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US14/29758
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/00; C12N 5/00 (2014.01) USPC - 530/287.1, 386, 380, 350; 424/130.1; 435/404, 325, 41 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) IPC(8): A61K 39/395; C07K 16/00; C12N 5/00 (2014.01) USPC: 530/287.1, 386, 380, 350; 424/130.1; 435/404, 325, 41		
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) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, DE-C, B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); Google; Google Scholar; Dialog ProQuest; Entrez PubMed; bevacizumab, 'Avastin,' 'cell culture medium,' copper, insulin, cystine, kit, 'plant-derived hydrolysate,' 'animal-derived hydrolysate,' 'culture yield'		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/0177640 A1 (BURG, J et al.) July 12, 2012; abstract; paragraphs [0016], [0021], [0026], [0027], [0040], [0103]-[0108], [0130], [0131], [0134]-[0136], [0192], [0249]	1-5, 6/1-8/5, 54-58, 59/34-59/58, 112-115, 116/112-116/115, 124-128, 129/124-129/128, 175-179, 180/175-180/179, 226, 227, 228/226-228/227, 229/228/226-229/228/227, 230/228/226-230/228/227
Y	WO 2012/145682 A1 (JERUMS, MI et al.) October 26, 2012; page 2, lines 21-36; page 3, lines 2-3; page 5, lines 10-19; page 13, lines 9-23	1-5, 6/1-8/5, 54-58, 59/34-59/58, 107-109, 110/107-110/109, 111/110/107-111/110/109, 112-115, 116/112-116/115, 124-128, 129/124-129/128, 175-179, 180/175-180/179, 226, 227, 228/226, 228/227, 229/228/226-229/228/227, 230/228/226-230/228/227
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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		
Date of the actual completion of the international search 28 July 2014 (28.07.2014)	Date of mailing of the international search report 19 AUG 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/29758

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0129926 A1 (FIKE, RM et al.) June 2, 2011; abstract; paragraphs [0003], [0014], [0032], [0034], [0056], [0093]-[0095], [[0185], [0186], [0188], [0526]	107-109, 110/107-110/109, 111/110/107- 111/110/109
Y	US 2010/0098725 A1 (LIU, J et al.) April 22, 2010; paragraphs [0070], [0073], [0482]	107-109, 110/107-110/109, 111/110/107- 111/110/109, 112-115, 116/112-116/115, 226, 227, 228/226, 228/227, 229/228/226, 229/228/227, 230/228/226, 230/228/227
Y	WO 2003/046182 A2 (KATINGER, H et al.) June 5, 2003; page 7, line 4-10; page 19, line 1-4	113, 115, 116/113, 116/115

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/29758

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.: 7-53, 60-106, 117-123, 130-174, 181-225, 231-271 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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 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.:

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.

フロントページの続き

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

(72)発明者 ビジャヤサンカラン, ナタラジャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ブラウン, ローレン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ディロッコ, トーマス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 マクナイト, ネイサン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC03 CD01 CD13 CD20 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 BB02 BB12 BB19 BB23 BB26 CA25

CA44

4H045 AA20 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74