

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成29年11月9日 (2017.11.9)

【公表番号】特表2016-532457(P2016-532457A)

【公表日】平成28年10月20日 (2016.10.20)

【年通号数】公開・登録公報2016-060

【出願番号】特願2016-547976(P2016-547976)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/16 (2006.01)

C 1 2 N 5/12 (2006.01)

C 1 2 N 5/18 (2006.01)

C 1 2 N 5/22 (2006.01)

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 1/14 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 5/07

C 1 2 M 1/00 D

C 1 2 N 1/16 B

C 1 2 N 5/12

C 1 2 N 5/18

C 1 2 N 5/22

C 1 2 N 1/00 U

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 K 1/14

C 0 7 K 16/00

C 0 7 K 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成29年9月27日 (2017.9.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を培養するための方法であって、

( a ) 細胞を、第 1 の細胞培養において培養する工程

( b ) ラクテート消費への代謝シフトが該第 1 の細胞培養において起こったことを決定する工程、および

( c ) 該細胞におけるラクテート消費への該代謝シフトが起こった後に、該細胞を、第 2 の細胞培養に移す工程、

を包含し、ここで該第 2 の細胞培養におけるラクテート濃度は、正味のラクテート消費を示す、方法。

**【請求項 2】**

前記細胞は、第 1 の細胞培養において細胞を培養する前に、目的のポリペプチドをコードする DNA でトランスフェクトされ、前記方法は、前記第 2 の細胞培養を、該目的のポリペプチドの発現を可能にする条件下で維持する工程、および該目的のポリペプチドを該第 2 の細胞培養から採取する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

ラクテート消費への前記代謝シフトは、前記第 1 の細胞培養における pH、ラクテートもしくは塩基の測定によって検出される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

ラクテート消費への前記代謝シフトは、塩基の添加なしの前記第 1 の細胞培養培地における pH 増大後に検出される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記代謝シフトは、細胞が前記第 1 の細胞培養において対数期から抜け出したときに起こるか、または静止期に達したときに起こる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記代謝シフトは、ラクテートレベルが前記第 1 の細胞培養においてプラトーに達したときに起こる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記代謝シフトは、前記第 1 の細胞培養における細胞増殖 3 日間でまたはそれより後に、該第 1 の細胞培養において起こる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記移された細胞は、前記第 2 の細胞培養において、約  $0.5 \times 10^6$  細胞 / mL ~ 約  $3.0 \times 10^6$  細胞 / mL の間の接種細胞密度を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記代謝シフトを決定する工程は、

(a) 前記第 1 の細胞培養において pH を測定する工程

(b) 塩基を添加して、pH を所定の下限より高く維持する工程、

(c) 該 pH が該所定の下限より高いことを、間隔をあけて引き続いて決定する工程、および

(d) 該塩基の添加を中止する工程、

を包含し、それによって、ラクテート消費への該代謝シフトは、該第 1 の細胞培養において起こったことを決定する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記第 1 の細胞培養は、シードトレイン培養である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記第 2 の細胞培養は、生産培養である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 12】**

細胞を第 2 の細胞培養に移す工程は、細胞を生産用バイオリアクターに移す工程を包含する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記目的のポリペプチドは、抗体、抗原結合タンパク質、および融合タンパク質からなる群より選択される、請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 14】**

1 種またはそれより多くの核酸配列は、前記細胞の細胞ゲノムの中に安定して組み込まれ、ここで該核酸配列は目的のポリペプチドをコードする、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記細胞は、目的のポリペプチドをコードする 1 種またはそれより多くの発現ベクターを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記目的のポリペプチドは、抗体、抗原結合タンパク質、および融合タンパク質からなる群より選択される、請求項 14 または請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記細胞は、CHO 細胞、COS 細胞、網膜細胞、Vero 細胞、CV1 細胞、HEK 293 細胞、293 EBNA 細胞、MSR 293 細胞、MDCK 細胞、HaK 細胞、BHK 21 細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞、WI38 細胞、MRC 5 細胞、Colo25 細胞、HB 8065 細胞、HL-60 細胞、Jurkat 細胞、Daudi 細胞、A431 細胞、CV-1 細胞、U937 細胞、3T3 細胞、L 細胞、C127 細胞、SP2/0 細胞、NS-0 細胞、MMT 細胞、PER.C6 細胞、ネズミリンパ系細胞、およびネズミハイブリドーマ細胞からなる群より選択される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

本発明のいくつかの実施形態において、上記細胞は、CHO 細胞、COS 細胞、網膜細胞、Vero 細胞、CV1 細胞、HEK 293 細胞、293 EBNA 細胞、MSR 293 細胞、MDCK 細胞、HaK 細胞、BHK 21 細胞、HeLa 細胞、HepG2 細胞、WI38 細胞、MRC 5 細胞、Colo25 細胞、HB 8065 細胞、HL-60 細胞、Jurkat 細胞、Daudi 細胞、A431 細胞、CV-1 細胞、U937 細胞、3T3 細胞、L 細胞、C127 細胞、SP2/0 細胞、NS-0 細胞、MMT 細胞、PER.C6 細胞、ネズミリンパ系細胞、およびネズミハイブリドーマ細胞からなる群より選択される。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

細胞を培養するための方法であって、

(a) 細胞を、第 1 の細胞培養において培養する工程

(b) ラクテート消費への代謝シフトが該第 1 の細胞培養において起こったことを決定する工程、および

(c) 該細胞におけるラクテート消費への該代謝シフトが起こった後に、該細胞を、第 2 の細胞培養に移す工程、

を包含し、ここで該第 2 の細胞培養におけるラクテート濃度は、正味のラクテート消費を示す、方法。

(項目 2)

前記細胞は、第 1 の細胞培養において細胞を培養する前に、目的のポリペプチドをコードする DNA でトランスフェクトされ、前記方法は、前記第 2 の細胞培養を、該目的のポリペプチドの発現を可能にする条件下で維持する工程、および該目的のポリペプチドを該第 2 の細胞培養から採取する工程を包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

ラクテート消費への前記代謝シフトは、前記第 1 の細胞培養における pH、ラクテートもしくは塩基の測定によって検出される、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

ラクテート消費への前記代謝シフトは、塩基の添加なしの前記第 1 の細胞培養培地にお

ける pH 増大後に検出される、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5)

前記代謝シフトは、細胞が前記第 1 の細胞培養において対数期から抜け出したときに起こるか、または静止期に達したときに起こる、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6)

前記代謝シフトは、ラクテートレベルが前記第 1 の細胞培養においてプラトーに達したときに起こる、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7)

前記代謝シフトは、前記第 1 の細胞培養における細胞増殖 3 日間でまたはそれより後に、該第 1 の細胞培養において起こる、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8)

前記移された細胞は、前記第 2 の細胞培養において、約  $0.5 \times 10^6$  細胞 / mL ~ 約  $3.0 \times 10^6$  細胞 / mL の間の接種細胞密度を有する、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

前記代謝シフトを決定する工程は、

a . 前記第 1 の細胞培養において pH を測定する工程

b . 塩基を添加して、pH を所定の下限より高く維持する工程、

c . 該 pH が該所定の下限より高いことを、間隔をあけて引き続いて決定する工程、および

d . 該塩基の添加を中止する工程、

を包含し、それによって、ラクテート消費への該代謝シフトは、該第 1 の細胞培養において起こったことを決定する、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 10)

前記第 1 の細胞培養は、シードトレイン培養である、項目 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 11)

前記第 2 の細胞培養は、生産培養である、項目 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 12)

細胞を第 2 の細胞培養に移す工程は、細胞を生産用バイオリアクターに移す工程を包含する、項目 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 13)

前記目的のタンパク質は、抗体、抗原結合タンパク質、および融合タンパク質からなる群より選択される、項目 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 14)

項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法によって生産される、代謝がシフトした宿主細胞。

(項目 15)

細胞ゲノムの中に安定して組み込まれた 1 種またはそれより多くの核酸配列を含み、ここで該核酸配列は目的のタンパク質をコードする、項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法によって生産される、代謝がシフトした宿主細胞。

(項目 16)

目的のタンパク質をコードする 1 種またはそれより多くの発現ベクターを含む、項目 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法によって生産される、代謝がシフトした宿主細胞。

(項目 17)

前記目的のタンパク質は、抗体、抗原結合タンパク質、および融合タンパク質からなる群より選択される、項目 15 または項目 16 に記載の宿主細胞。

(項目 18)

前記細胞は、CHO 細胞、COS 細胞、網膜細胞、Ver o 細胞、CV 1 細胞、HEK 293 細胞、293 EBNA 細胞、MSR 293 細胞、MDCK 細胞、HaK 細胞、

B H K 2 1 細胞、H e L a 細胞、H e p G 2 細胞、W I 3 8 細胞、M R C 5 細胞、C o  
l o 2 5 細胞、H B 8 0 6 5 細胞、H L - 6 0 細胞、J u r k a t 細胞、D a u d i 細  
胞、A 4 3 1 細胞、C V - 1 細胞、U 9 3 7 細胞、3 T 3 細胞、L 細胞、C 1 2 7 細胞、  
S P 2 / 0 細胞、N S - 0 細胞、M M T 細胞、P E R . C 6 細胞、ネズミリンパ系細胞、  
およびネズミハイブリドーマ細胞からなる群より選択される、項目 1 4 ~ 1 7 のいずれか  
1 項に記載の宿主細胞。