

發明專利說明書

(本)

中文說明書替換本(101年1月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：095100075

※ 申請日期：95.01.02

※IPC 分類：C12N

5/00 (2006.01)

5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

細胞之培養方法及其利用

A METHOD OF CULTURING A CELL AND USE OF THE SAME

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商中外製藥股份有限公司

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中文/英文)

永山 治

NAGAYAMA, OSAMU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都北區浮間5丁目5番1號

5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU, TOKYO 115-8543, JAPAN

國籍：(中文/英文)

日本 JAPAN

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 後藤 進

GOTO, SUSUMU

2. 岸下 昇平

KISHISHITA, SHOHEI

3. 田熊 晉也

TAKUMA, SHINYA

4. 平島 親

HIRASHIMA, CHIKASHI

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN

2. 日本 JAPAN

3. 日本 JAPAN

4. 日本 JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2005年01月05日；特願2005-000747

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係使用含有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基，而使細胞高量產生蛋白質。本發明係關於一種細胞之培養方法，其特徵在於：於添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基中開始細胞培養，進而於細胞培養中之培養基中至少添加一次魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物，其係一種利用該培養方法用以製造所希望獲得之蛋白質之方法。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種細胞之培養方法及其利用，更詳細的是，本發明係關於一種細胞之培養方法及利用其使細胞生產蛋白質之方法。

【先前技術】

於培養動物細胞而欲獲得由該動物細胞所產生之天然型蛋白質之情形時，或者於培養導入有用以編碼所希望獲得蛋白質之基因之動物細胞而製造所希望獲得之蛋白質等之情形時，除鹽類、糖類、胺基酸類及維生素類等基礎營養物質以外，為使該動物細胞增殖，通常是添加源自哺乳動物之萃取物，具體而言係於培養基中以5~20%之範圍添加胎牛血清等血清。然而，源自相關哺乳動物之血清占培養基成本之75~95%，故而存在有因於品質方面存有批次間之差異而無法獲得穩定增殖之缺點。又，源自哺乳動物之血清無法以高壓蒸氣等進行滅菌，故而可能被病毒或黴菌所污染，雖然其大多數無害，但就穩定生產方面而言則可能成為附加性未知因素。進而，於血清中含有500種以上之蛋白質，故而使得來自培養基之細胞產物，即所希望獲得之蛋白質之分離、純化複雜化。為解決如此之穩定生產方面之問題，現採用一種方法，其使用白蛋白、胰島素、轉鐵蛋白等源自血清之純化蛋白質作為血清替代品。又，就製造成本方面而言，業者亦正嘗試有一種方法，其使用自哺乳動物身上所萃取出之培養基成分。

但是，近年來關於源自哺乳動物之成分，業者擔心其與狂牛症 (mad cow disease)、牛海綿體腦病 (Bovine Spongiform Encephalopathy : BSE)、傳染性腦海綿狀病變 (Transmissible Spongiform Encephalopathy : TSE)，進而與科羅伊茨費特-雅各布氏病 (Creutzfeld-Jakob Disease : CJD) 等存有關聯，就安全性方面而言，業者期望出現一種動物細胞培養用培養基，其未含有源自該等哺乳動物之成分。

於培養動物細胞之時，若於所使用之培養基中不添加源自上述哺乳動物之成分，則於培養早期細胞生存率顯著下降，培養液中之活細胞數減少，故而存在有無法進行長期培養或大量培養之問題。

為解決上述問題，現報導有一種方法，其於培養用培養基中添加魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物(專利文獻1、2)。根據該方法，則可不使用通常所必須使用之胎牛血清，即可高產蛋白質。

然而，就製造成本方面而言，蛋白質產量於可能之範圍內越多越好，故而業者一直期望進一步加以改良。

[專利文獻1]國際公開專利第99/63058號案

[專利文獻2]日本專利特開2003-334068號公報

[發明所欲解決之問題]

本發明之目的在於：藉由使用含有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基進行饋料批次培養，而使細胞高產蛋白質。

【發明內容】

本發明者等為解決上述課題而不懈努力，結果發現可藉由使用添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基進行饋料批次培養，而使細胞以更高產量產生出所希望獲得之蛋白質，最終完成本發明。

本發明之要點如下。

(1)一種細胞之培養方法，其特徵在於：於起始培養基中開始細胞培養，進而於正在細胞培養之培養基中至少添加一次饋料批次培養基，且於起始培養基或饋料批次培養基之至少一方中添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

(2)一種細胞之培養方法，其特徵在於：於添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基中開始細胞培養，進而於正在細胞培養之培養基中至少添加一次魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

(3)如第(2)項之培養方法，其中以饋料批次培養法培養細胞。

(4)如第(1)至第(3)項中任一項之培養方法，其中細胞係導入編碼有所希望獲得蛋白質之基因者。

(5)如第(4)項之培養方法，其中所希望獲得之蛋白質為抗體。

(6)如第(1)至第(5)項中任一項之培養方法，其中細胞為動物細胞。

(7)如第(6)項之培養方法，其中細胞為哺乳動物細胞。

(8)如第(7)項之培養方法，其中哺乳動物細胞為CHO細

胞。

(9)一種製造方法，其特徵在於：於起始培養基中開始細胞培養，進而於正在細胞培養之培養基中至少添加一次饋料批次培養基而培養細胞，藉此用以製造蛋白質；且於起始培養基或饋料批次培養基之至少一方中添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

(10)一種製造方法，其特徵在於：用以製造蛋白質，且以添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基開始細胞培養，進而於正在細胞培養之培養基中至少添加一次魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

(11)如第(10)項之製造方法，其中以饋料批次培養法培養細胞。

(12)如第(9)至第(11)項中任一項之製造方法，其中細胞係導入編碼有所希望獲得蛋白質之基因者。

(13)如第(12)項之製造方法，其中所希望獲得之蛋白質為抗體。

(14)如第(9)至第(13)中任一項之製造方法，其中細胞為動物細胞。

(15)如第(14)項之製造方法，其中細胞為哺乳動物細胞。

(16)如第(15)項之製造方法，其中哺乳動物細胞為CHO細胞。

[發明之效果]

於本發明中，不僅於細胞培養開始時之培養基中添加魚

肉之酵素分解物或魚肉萃取物，而且於正在細胞培養之培養基中亦添加魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物，藉此可使細胞以更高產量生產出所希望獲得之蛋白質。

本說明書包含作為本申請案優先權基礎之日本國專利申請、日本專利特願2005-000747號說明書及/或圖式中所揭示之內容。

【實施方式】

以下，就本發明之實施形態加以更加詳細之說明。

於本發明中，以起始培養基開始細胞培養，進而於正在細胞培養之培養基中至少添加一次饋料批次培養基。此處，於起始培養基或饋料批次培養基之至少一方中添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

進而，作為本發明之較好態樣，以添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基開始細胞培養，進而於正在細胞培養之培養基中至少添加一次魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

根據本發明，於先前作為動物細胞培養用培養基而通常所使用之培養基中，即使不添加源自哺乳動物細胞之成分，亦可良好地培養細胞。

通常而言，細胞培養方法可分類為：批次培養法(batch culture)、連續培養法(continuous culture)、饋料批次培養法(fed-batch culture)。於本發明之方法中，可使用其中任一培養方法，但較好的是使用饋料批次培養法或連續培養法，尤其好的是使用饋料批次培養法。

批次培養法係於培養基中添加少量種類培養液，而不是於培養過程中重新添加培養基或排出培養液，從而使細胞增殖之培養方法。

連續培養法係於培養過程中連續添加培養基，且連續排出培養基之培養方法。再者，連續培養法中亦包含灌流培養。

因饋料批次培養法介於批次培養法與連續培養法之間，故而亦稱為半批次培養法(semi-batch culture)，其係於培養過程中連續或逐次添加培養基，但不進行如連續培養法中之連續排出培養液之培養方法。於進行饋料批次培養時所添加之培養基(以下，稱為饋料批次培養基)，其不必係與培養過程中已經使用之培養基(以下，稱為起始培養基)相同之培養基，可添加不同之培養基，亦可僅添加特定成分。

本發明中所謂之起始培養基，通常係指於細胞培養之最初階段所使用之培養基。其中，於分成多次添加饋料批次培養基之情形時，可將於分別添加饋料批次培養基前之培養基作為起始培養基。

於本發明之方法中，於採用饋料批次培養法之情形時，饋料批次培養基或起始培養基中之任一者含有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物，但較好的是饋料批次培養基及起始培養基之兩者中均含有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。又，與起始培養基中魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之濃度相比較，較好的是提高饋料批次培養基中魚肉之酵素分

解物或魚肉萃取物之濃度。起始培養基中魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之濃度，其通常較好的是1~30 g/L，更好的是3~20 g/L，尤其好的是5~15 g/L。饋料批次培養基中魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之濃度，其通常較好的是5~150 g/L，更好的是10~120 g/L，尤其好的是20~90 g/L，特別好的是30~75 g/L。培養開始之培養基與饋料批次培養基之使用量比並無特別限定，但於將培養開始之培養基容量設為1之情形時，饋料批次培養基通常是0.01~10，較好的是0.1~1，更好的是0.2~0.3。饋料批次培養基可連續添加，亦可逐次添加。於逐次添加之情形時，添加次數並無特別限定，可添加一次，亦可分成多次添加。

關於本發明中所使用之魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物，至於其中所使用之魚肉，可列舉：鯷魚、金槍魚、鮪魚、鯖魚、秋刀魚、沙丁魚、鰵魚、鮭魚等赤身魚，或鱈魚、鱸魚、平目魚、鰈魚、鯛魚等白身魚等之魚肉；較好的是鯷魚、金槍魚、鱈魚、鯖魚、鮭魚、沙丁魚。

本發明中所使用之魚肉萃取物，例如可將上述魚肉切成合適之片狀或者切碎成漿狀，使用熱水例如90~95℃熱水，萃取數十分鐘至數十小時，藉此可獲得其可溶性成分。具體可列舉：製造鯷魚幹時之鯷魚煮汁或製造罐頭時之煮汁等。

又，例如直接於水煮魚肉中，或者於切碎後成漿狀之魚肉中，或者於以上述方式所得之魚肉萃取物中，添加適量水，根據需要進行加熱而使蛋白質改性後，以蛋白質分解

酶加以處理且藉由適當離心分離或過濾等去除油分或非溶化物，藉此可獲得魚肉之酵素分解物。相關之魚肉萃取物或者魚肉之酵素分解物，可將其pH值調整為7~7.4左右後加以使用。

至於蛋白質分解酶，可列舉：蛋白酶及/或肽酶。於本說明書中，作為蛋白酶之用語，其係指以蛋白質作為基質而水解蛋白質之酶；所謂肽酶之用語，其係指將肽作為基質之肽結合水解酶。即，可將蛋白酶針對於蛋白質基質之活性作為蛋白酶活性，而將針對於肽基質之活性作為肽酶活性加以區別。根據蛋白酶針對於蛋白質基質之活性，於催化來自肽鍵鏈中間之切斷時，可使用蛋白酶之用語，因此於本說明書中，內肽酶係作為一種蛋白酶加以使用。

具體可列舉：木瓜酶、木瓜凝乳蛋白酶、菠蘿蛋白酶、無花果蛋白酶等植物來源之酶，以及真菌、細菌、酵母等微生物來源之酶，內肽酶、外肽酶、胺基肽酶、羧肽酶、二肽酶等酶等。該等酶可單獨使用或併用。於併用之情形時，可同時添加該等酶，亦可分階段添加。

作為本發明中之魚肉之酵素分解物，較好的是以上述蛋白酶進行處理，其次以肽酶進行處理後所得之魚肉之酵素分解物。

酶處理係根據所使用酶之種類而不同，通常是於pH值2~12，較好的是pH值4~8下，於30~90°C，較好的是40~65°C溫度下，進行30分鐘~72小時，較好的是進行3~24小時之酶處理。此時，酶係以作為基質之蛋白質之

0.001~10 W/W%，較好的是0.1~1 W/W%，更好的是0.2~0.6 W/W%左右加以使用。可經由加溫等而使以如此方式所得之魚肉之酵素分解物中之酶失活後，適當地進行離心分離或過濾，去除油分或非溶化物，藉此調製出酶分解物。

魚肉中包含魚之內臟及肉塊，內臟與肉塊之比率並無特別限定，可使用任意比率，例如可使用於日本專利特開2003-334068號中所揭示之比率。

作為本發明中所使用之培養基之其他成分，通常可適當使用於細胞(較好的是動物細胞)培養之培養基中所使用之各成分，此等中包含：胺基酸、維生素類、脂質因子、能量源、浸透壓調節劑、鐵源以及pH緩衝劑。除上述成分以外，例如亦可添加微量金屬元素、界面活性劑、增殖輔助因子以及核苷等。

具體而言，例如可例示含有下述成分之培養基：L-丙胺酸、L-精胺酸、L-天冬醯胺、L-天門冬醯胺酸、L-半胱胺酸、L-胱胺酸、L-穀氨醯胺、L-穀氨醯胺酸、甘胺酸、L-組胺酸、L-異亮胺酸、L-亮胺酸、L-離胺酸、L-蛋胺酸、L-鳥胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸等，較好的是L-丙胺酸、L-精胺酸、L-天冬醯胺、L-天門冬醯胺酸、L-胱胺酸、L-穀氨醯胺、L-穀氨醯胺酸、甘胺酸、L-組胺酸、L-異亮胺酸、L-亮氨酸、L-離胺酸、L-蛋胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺

酸、L-纈胺酸等胺基酸類；i-肌醇、生物素、葉酸、硫辛酸、煙鹼醯胺、煙鹼酸、對胺基苯甲酸、泛酸鈣、鹽酸吡哆醛、鹽酸吡哆醇、核糖黃素、鹽酸硫胺素、維生素B12、抗壞血酸等，較好的是生物素、葉酸、硫辛酸、煙鹼酸醯胺、泛酸鈣、鹽酸吡哆醛、核糖黃素、鹽酸硫胺素、維生素B12、抗壞血酸等維生素類；氯化膽鹼、酒石酸膽鹼、亞油酸、油酸、膽固醇等，較好的是氯化膽鹼等脂質因子；葡萄糖、半乳糖、甘露糖、果糖等，較好的是葡萄糖等能量源；氯化鈉、氯化鉀、硝酸鉀等，較好的是氯化鈉等浸透壓調節劑；EDTA鐵、檸檬酸鐵、氯化亞鐵、氯化鐵、硫酸亞鐵、硫酸鐵、硝酸鐵等，較好的是氯化鐵、EDTA鐵、檸檬酸鐵等鐵源類；碳酸氫鈉、氯化鈣、磷酸二氫鈉、HEPES、MOPS等，較好的是碳酸氫鈉等pH緩衝劑。

除上述成分以外，例如可添加：硫酸銅、硫酸錳、硫酸鋅、硫酸鎂、氯化鎳、氯化錫、氯化鎂、亞矽酸鈉等，較好的是硫酸銅、硫酸鋅、硫酸鎂等微量金屬元素；Tween 80、普朗尼克(Pluronic)F68等界面活性劑；以及重組型胰島素、重組型IGF、重組型EGF、重組型FGF、重組型PDGF、重組型TGF- α 、鹽酸乙醇胺、亞硒酸鈉、維A酸、鹽酸腐胺等，較好的是亞硒酸鈉、鹽酸乙醇胺、重組型IGF、鹽酸腐胺等增殖輔助因子；去氧腺苷、去氧胞苷、去氧鳥嘌呤核糖、腺苷、胞嘧啶核糖、鳥嘌呤、尿嘧啶等核糖等。再者，於上述本發明之合適例中，亦可含有鏈黴

素、青黴素G鉀及 gentamicin 等抗生物質或酚紅等 pH 指示劑。

培養基可藉由於市售之動物細胞培養用培養基中，例如 D-MEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium，病毒性液體培養基)、D-MEM/F-12 1:1 混合培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)、RPMI1640、CHO-S-SFMII(Invitrogen 公司)、CHO-SF(Sigma-Aldrich 公司)、EX-CELL 301(JRH biosciences 公司)、CD-CHO(Invitrogen 公司)、IS CHO-V(Irvine Scientific 公司)、PF-ACF-CHO(Sigma-Aldrich 公司)等培養基中，添加魚肉萃取物或魚肉之酵素分解物而加以調製。

於本發明中，添加有魚肉萃取物或魚肉之酵素分解物之培養基，其並無特別限定，可使用任意之培養基，但較好的是未含有源自哺乳動物之血清之無血清培養基，尤其好的是未含源自哺乳動物成分之培養基，其未含有自哺乳類動物身上所分離之源自哺乳動物之成分。

添加有魚肉萃取物或魚肉之酵素分解物之培養基，於其係無血清培養基或未含源自動物成分之培養基之情形時，通常是以使被培養細胞即使於無血清培養基或未含源自動物成分之培養基中亦可繁殖之方式，使細胞於該等培養基中得以馴化。細胞之馴化方法現已為業者所熟知。

又，培養基中其他成分之含量，其較好的是胺基酸為 0.05~1500 mg/L，維生素類為 0.001~10 mg/L，脂質因子為 0~200 mg/L，能量源為 1~20 g/L，浸透壓調節劑為

0.1~10000 mg/L，鐵源為0.1~500 mg/L，pH緩衝劑為1~10000 mg/L，微量金屬元素為0.00001~200 mg/L，界面活性劑為0~5000 mg/L，增殖輔助因子為0.05~10000 µg/L及核苷為0.001~50 mg/L之範圍；可根據培養細胞之種類、所希望獲得蛋白質之種類等加以更合適之規定。

培養基之pH值係根據所培養之細胞而不同，但通常為pH值6.8~7.6，多數情形下較好的是pH值7.0~7.4。

本發明之培養方法並無特別限定，可用於培養各種細胞(例如，細菌細胞、真菌細胞、昆蟲細胞、植物細胞、動物細胞等)。例如，可培養COS細胞或CHO細胞，或者可培養融合細胞，上述COS細胞或CHO細胞係藉由基因工程學操作而將用以編碼所希望獲得蛋白質之基因進行重組；上述融合細胞係以產生抗體之小鼠—人、小鼠—小鼠、小鼠—大鼠等融合瘤為代表。本發明之方法亦可用於培養動物細胞而欲獲得由該動物細胞所產生之天然型蛋白質之情形，除上述細胞外，亦可用於培養BHK細胞、HeLa細胞等。

於本發明中，尤其好的動物細胞是導入有用以編碼所希望獲得蛋白質之基因之CHO細胞。所希望獲得之蛋白質並無特別限定，亦可係抗體(天然抗體、低分子化抗體、嵌合體抗體、人化抗體等)或生理活性蛋白質(顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、紅血球生成素、干擾素、IL-1或IL-6等介白素、t-PA、尿激酶、血清白蛋白、血液凝固因子等)等任意之蛋

白質，但尤其好的是抗體。

作為根據本發明之製造方法所生產之抗體，不僅包含人、小鼠、大鼠、倉鼠、兔、猴等源自動物之單株抗體，而且亦包含嵌合體抗體、人化抗體、雙專一性抗體(bispecific抗體)等人為改變之基因重組型抗體。又，抗體之免疫球蛋白類型並無特別限定，其亦可係IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等IgG，IgA，IgD，IgE，IgM等中之任一者，但用於醫藥之情形時，較好的是IgG及IgM。進而，作為本發明之抗體，不僅包含全部抗體，而且亦包含Fv、Fab、F(ab)₂等抗體片段，或者以肽連接子等連接子與抗體可變區域相結合之一價或二價以上之一條鏈Fv(scFv、sc(Fv)₂等)之低分子化抗體等。

培養條件係根據所使用細胞之種類而不同，故而可適當地規定合適條件。例如，若係CHO細胞，則通常是於氣相之CO₂濃度為0~40%，較好的是2~10%之氣體環境下，於30~39℃下，較好的是於37℃左右培養1~14天。

又，至於動物細胞培養用之各種培養裝置，例如可使用發酵槽型箱培養裝置、空氣升液型培養裝置、培養瓶型培養裝置、攪拌瓶型培養裝置、微載體型培養裝置、流動層型培養裝置、全纖維型培養裝置、旋轉瓶型培養裝置、填充槽型培養裝置等進行培養。

根據本發明之方法，可藉由培養細胞(較好的是動物細胞)而高產蛋白質。

動物細胞產生蛋白質，存在有單純培養動物細胞者，或

者需要進行特殊操作者，但可根據所培養之動物細胞而適當規定該等之操作或條件等。例如，於以載體所轉型之CHO細胞中，於如上述條件下實施培養，藉此於1~14天，較好的是7~10天左右，可於培養基中獲得所希望獲得之蛋白質；上述載體含有藉由基因工程學操作用以編碼小鼠-人嵌合體抗體之基因。可根據常用方法(例如，參照抗體工學入門，地人書館，p. 102~104；Affinity Chromatography Principles & Methods，Amersham Pharmacia Biotech(有限公司)，p. 56~60等)將其分離、純化，藉此可獲得所希望獲得之蛋白質。

根據本發明，可以高產量製造出重組抗體(天然抗體、抗體片段、低分子化抗體、嵌合體抗體、人化抗體、bispecific抗體(雙專一性抗體)等)、基因重組蛋白質(顆粒球群落刺激因子(G-CSF)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、紅血球生成素、干擾素、IL-1或IL-6等介白素、t-PA、尿激酶、血清白蛋白、血液凝固因子等)等。

[實施例]

以下，根據實施例及參考例，就本發明加以具體說明。再者，該等實施例等係用以說明本發明者，而非用以限制本發明之範圍。

[實施例1]使用有鯉魚水解物之饋料批次培養

培養基組成及調製法如下。

起始培養基：於未含源自哺乳動物之成分之培養基中，添加於參考例1中所調製之鯉魚水解物5 g/L，將其溶解後

進行過濾滅菌。

饋料批次培養基：將於起始培養基中所使用之未含源自哺乳動物成分之培養基成分設為起始培養基之約兩倍濃度，添加30 g/L鰹魚水解物，將其溶解後進行過濾滅菌。

細胞：用以產生於國際公開專利第2005/005636號案中所示之重組型抗神經節苷脂GM3人類抗體(L612)之CHO細胞株。本抗體之類型為IgM。

於罐型細胞培養裝置中添加起始培養基，以成為 2×10^5 cells/mL之方式於其中添加上述CHO細胞株，於37°C、10% CO₂條件下開始培養。於饋料批次培養過程中，自培養第3天起以固定流速供應饋料批次培養基，培養至第14天為止。於培養開始時及第3、7、10、14天進行取樣。關於各樣本之培養上清液，使用尺寸排除層析法測定所產生之抗體蛋白質濃度。如圖1所示，於未進行饋料批次培養時之抗體蛋白質濃度，其經由10天培養後達到0.6 g/L左右。於此相對，若供應含有鰹魚水解物之溶液，則經由10天培養後可獲得1.2 g/L以上之抗體蛋白質濃度，經由14天培養後可獲得超過1.7 g/L之抗體蛋白質濃度。

[實施例2]使用有鰹魚水解物之饋料批次培養

培養基組成及調製法如下。

起始培養基：於未含源自哺乳動物之成分之培養基中，添加於參考例1中所調製之鰹魚水解物15 g/L，將其溶解後進行過濾滅菌。

饋料批次培養基：將於起始培養基中所使用之未含源自

哺乳動物成分之培養基成分設為起始培養基之約四倍濃度，添加75 g/L鰹魚水解物，將其溶解後進行過濾滅菌。

細胞：利用國際公開專利第92/19759號案之實施例10中所揭示之人多肽鏈延長因子1 α 啟動子，用以產生根據日本專利特開平8-99902號公報之參考例2中所揭示方法所製作之人類型化PM-1抗體(抗人類IL-6受體抗體)之CHO細胞株。本抗體之類型為IgG1。

於罐型細胞培養裝置中添加起始培養基，以進行饋料批次培養時成為 1×10^6 cells/mL而於未進行饋料批次培養時成為 0.5×10^6 cells/mL之方式，於其中添加上述CHO細胞株，於37°C、10% CO₂條件下開始培養。於饋料批次培養過程中，自培養第2天起以固定流速供應饋料批次培養基，培養至第10天為止。於培養開始時及第3、5、7、10天進行取樣。關於各樣本之培養上清液，藉由使用有蛋白質A管柱之親和層析法測定所產生之抗體蛋白質濃度。如圖2所示，於未進行饋料批次培養時之抗體蛋白質濃度，其經由7天培養後達到0.5 g/L左右。於此相對，若供應含有鰹魚水解物之溶液，則經由7天培養後可獲得1.1 g/L以上之抗體蛋白質濃度，經由10天培養後可獲得超過1.4 g/L之較高抗體蛋白質濃度。

[實施例3]使用有鰹魚水解物之饋料批次培養

培養基組成及調製法如下。

起始培養基：於未含源自哺乳動物之成分之培養基中，添加於參考例1中所調製之鰹魚水解物5 g/L，將其溶解後

進行過濾滅菌。將未含鰹魚水解物者用於比較對照。

饋料批次培養基：將未含源自哺乳動物成分之培養基成分設為起始培養基之兩倍濃度，添加30 g/L鰹魚水解物，將其溶解後進行過濾滅菌。將未含鰹魚水解物者用於比較對照。

細胞：根據國際公開專利第2005/056604號案中所揭示之方法加以製作且用以產生MPL結合性單鏈(Fv)₂(sc(Fv)₂)之重組CHO細胞。

培養結果：於罐型細胞培養裝置中添加起始培養基，以成為 3×10^5 cells/mL之方式，於其中添加上述CHO細胞株，於37°C、10% CO₂條件下開始培養。自培養第3天起以固定流速供應饋料批次培養基，培養至第14天為止。於培養期間進行適當取樣。關於各樣本之培養上清液，可使用MPL於胺基酸序列中sc(Fv)₂所結合之部分，藉由BIACORE法測定所產生之蛋白質濃度。如圖3所示，於未含鰹魚水解物之饋料批次培養過程中，蛋白質濃度經由14天培養後達到450 mg/L左右。於此相對，若供應含有鰹魚水解物之溶液，則經由14天培養後可獲得超過760 mg/L之高蛋白質濃度。

[參考例1]鰹魚酶分解物之調製

使用市售之鰹魚作為魚肉。於840 kg切碎之鰹魚中，添加1200 kg水，以源自植物之木瓜酶3.2 kg，於pH值6.0、65°C條件下培育一小時，進行酶分解。其次，再者以3.2 kg源自真菌之外肽酶，於上述條件下進行15小時之酶分解

後，藉由加熱至95°C而使酶失活。其後，藉由離心分離、過濾而去除且濃縮非溶物、油分，調製出約150 kg魚肉(鯉魚)之酶分解物。

本說明書中所引用之全部刊物、專利及專利申請係作為直接參考而載入本說明書中者。

[產業上之可利用性]

根據本發明，無需使用胎牛血清等高價且品質參差不齊之蛋白質，即可穩定地培養細胞。進而，根據本發明之方法培養細胞，藉此可消除近年來日益成為問題之由異常朊病毒或病毒等所造成污染之危險性，從而可高產且可提供安全之生物醫藥品。

【圖式簡單說明】

圖1係表示以添加有5 g/L鯉魚水解物之未含源自哺乳動物成分之培養基(起始培養基)及添加有30 g/L鯉魚水解物之未含源自哺乳動物成分之培養基(饋料批次培養基)所培養之CHO細胞，其於培養基中所產生之抗體蛋白質濃度(g/L)之曲線圖。

圖2係表示以添加有15 g/L鯉魚水解物之未含源自哺乳動物成分之培養基(起始培養基)及添加有75 g/L鯉魚水解物之未含源自哺乳動物成分之培養基(饋料批次培養基)所培養之CHO細胞，其於培養基中所產生之抗體蛋白質濃度(g/L)之曲線圖。

圖3係表示以添加有5 g/L鯉魚水解物之未含源自哺乳動物成分之培養基(起始培養基)及添加有30 g/L鯉魚水解物

之未含源自哺乳動物成分之培養基(饋料批次培養基)所培養之CHO細胞，其於培養基中所產生之抗體蛋白質濃度(g/L)之曲線圖。

十、申請專利範圍：

1. 一種細胞之培養方法，其係於起始培養基中開始細胞培養，進而於細胞培養中之培養基中至少添加一次饋料批次培養基(feeding culture)，其特徵在於：於起始培養基或饋料批次培養基之至少一方中添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。
2. 一種細胞之培養方法，其特徵在於：於添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基中開始細胞培養，進而於正在細胞培養中之培養基中至少添加一次魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。
3. 如請求項2之培養方法，其中以饋料批次培養法培養細胞。
4. 如請求項1至3中任一項之培養方法，其中細胞係導入編碼有所希望獲得蛋白質之基因者。
5. 如請求項4之培養方法，其中所希望獲得之蛋白質為抗體。
6. 如請求項1至3中任一項之培養方法，其中細胞為動物細胞。
7. 如請求項6之培養方法，其中細胞為哺乳動物細胞。
8. 如請求項7之培養方法，其中哺乳動物細胞為CHO細胞。
9. 一種製造蛋白質之方法，其特徵在於：於起始培養基中開始細胞培養，進而於細胞培養中之培養基中至少添加一次饋料批次培養基培養細胞，藉此製造蛋白質，且於

起始培養基或饋料批次培養基之至少一方中添加魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。

10. 一種製造蛋白質之方法，其特徵在於：於添加有魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物之培養基中開始細胞培養，進而於細胞培養中之培養基中至少添加一次魚肉之酵素分解物或魚肉萃取物。
11. 如請求項10之製造方法，其中以饋料批次培養法培養細胞。
12. 如請求項9至11中任一項之製造方法，其中細胞係導入編碼有所希望獲得蛋白質之基因者。
13. 如請求項12之製造方法，其中所希望獲得之蛋白質為抗體。
14. 如請求項9至11中任一項之製造方法，其中細胞為動物細胞。
15. 如請求項14之製造方法，其中細胞為哺乳動物細胞。
16. 如請求項15之製造方法，其中哺乳動物細胞為CHO細胞。

公告本

十一、圖式：

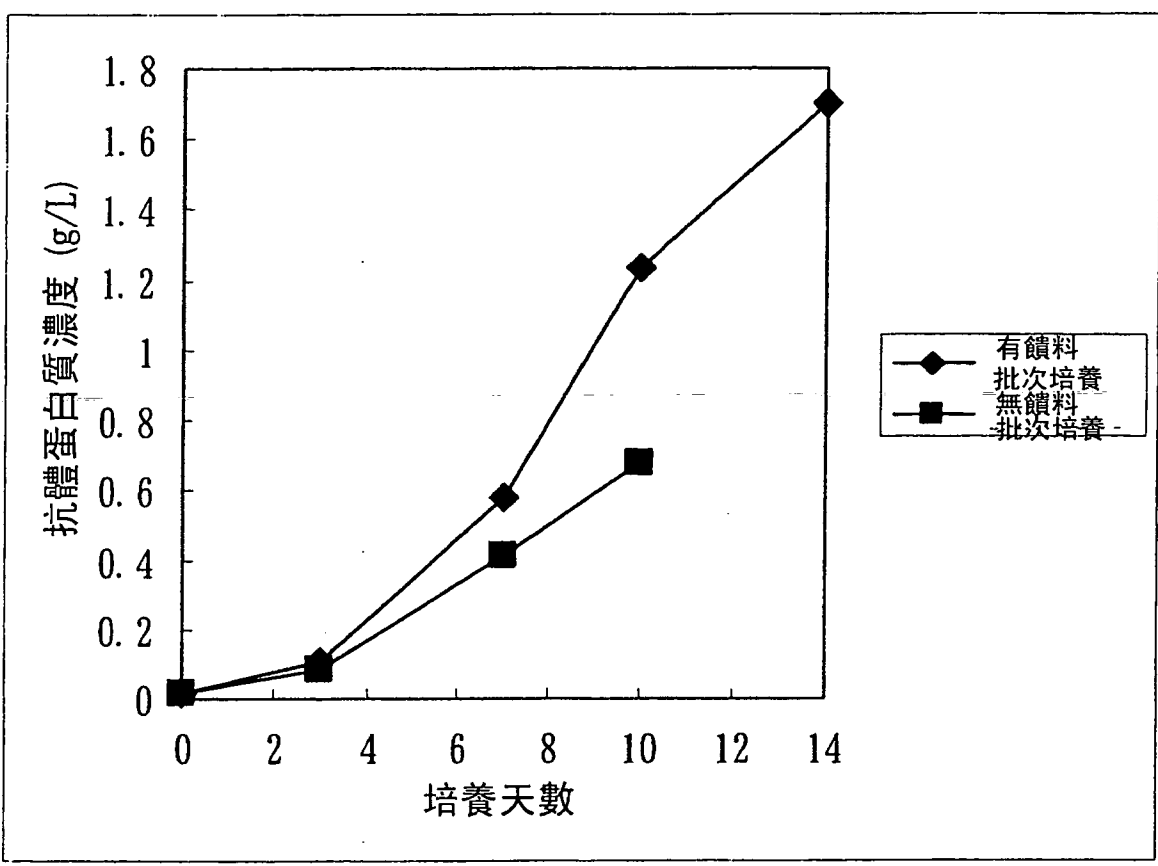


圖1



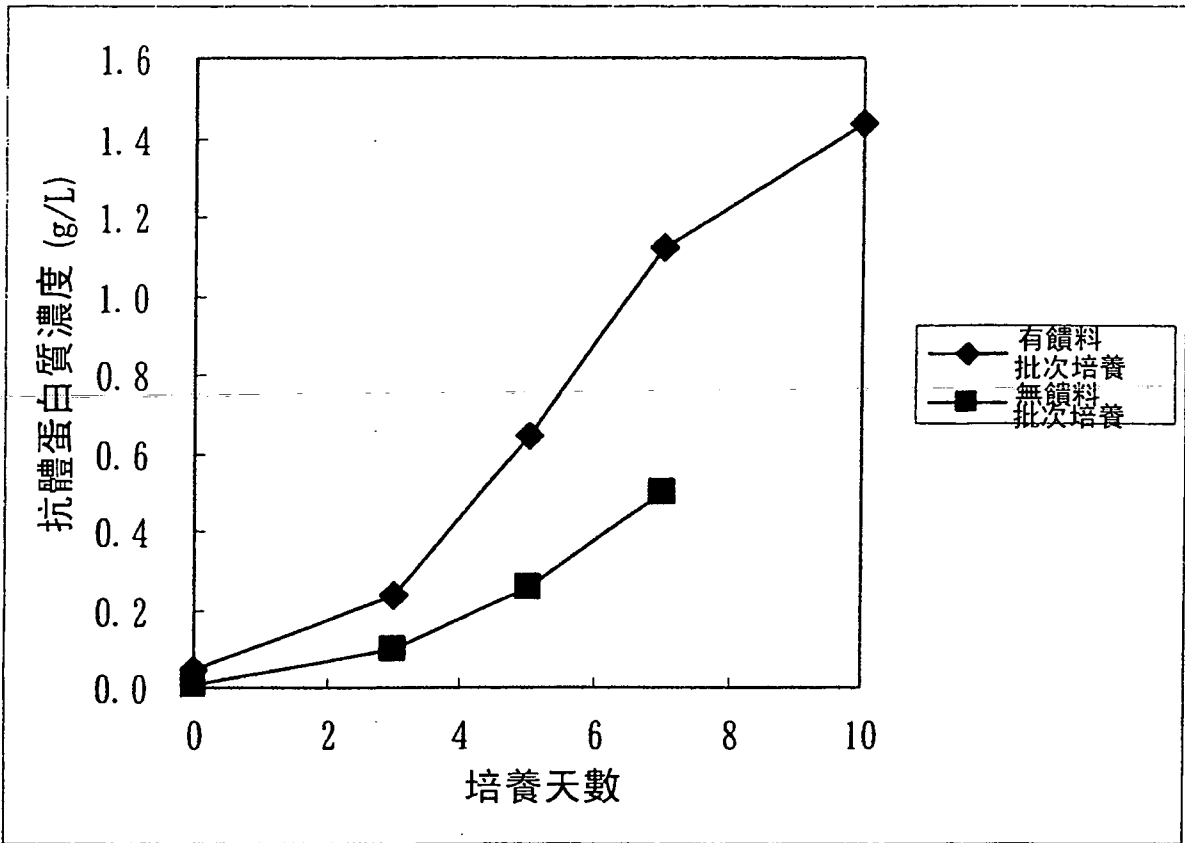


圖2



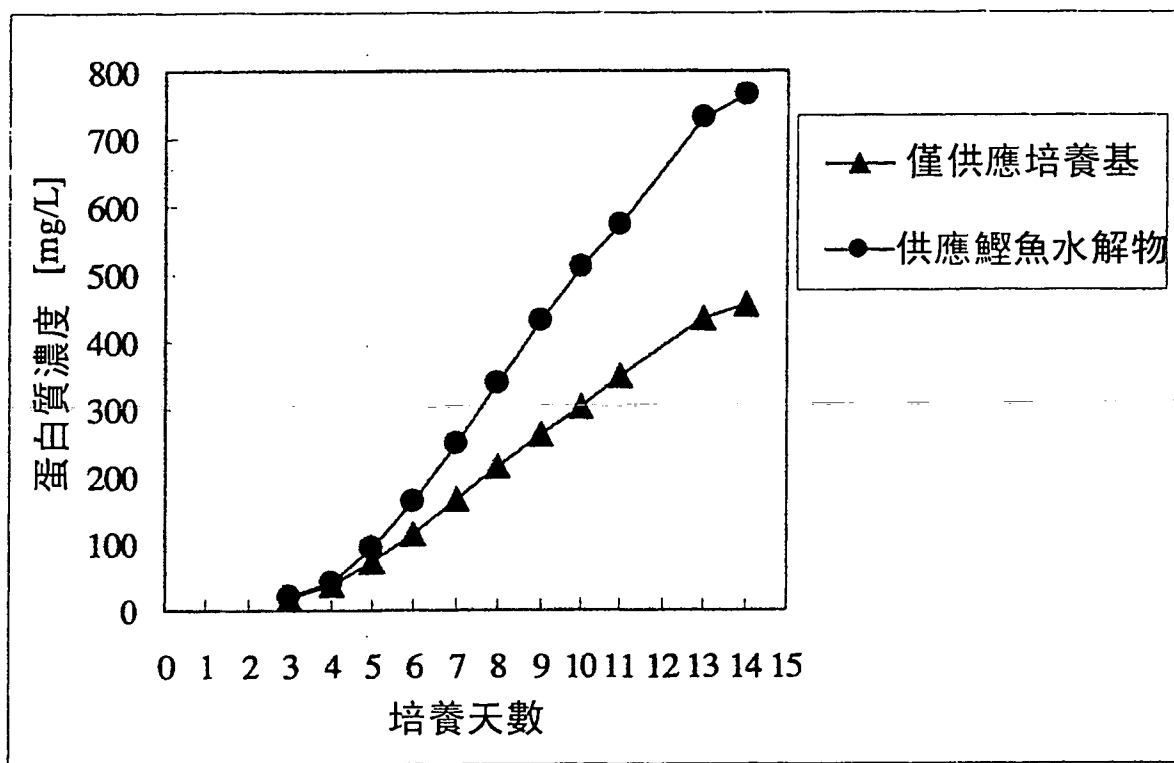


圖3

