

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年4月26日 (26.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/29246 A1

(51) 国際特許分類: C12P 21/00, C12N  
5/06, 15/11 // (C12P 21/00, C12R 1:91)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07288

(22) 国際出願日: 2000年10月19日 (19.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平 11/296267  
1999年10月19日 (19.10.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵  
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番  
1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小川達也

(OGAWA, Tatsuya) [JP/JP]. 明石尚久 (AKASHI, Nao-  
hisa) [JP/JP]; 〒747-8522 山口県防府市協和町1番1  
号 協和醸酵工業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi  
(JP). 今野由信 (KONNO, Yoshinobu) [JP/JP]. 高杉 浩  
(TAKASUGI, Hiroshi) [JP/JP]. 杉本整治 (SUGIMOTO,  
Seiji) [JP/JP]. 矢野敬一 (YANO, Keiichi) [JP/JP]; 〒  
194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工  
業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: ポリペプチドの製造方法

(57) Abstract: A process for producing a desired polypeptide by using rat cells. More particularly speaking, a process for producing the polypeptide which comprises culturing rat cells such as YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (hereinafter referred to as YB2/0), preferably rat cells obtained by transferring a recombinant DNA containing a DNA encoding the desired polypeptide such as an immunologically functional molecule, in a serum-free medium. Among the desired polypeptides obtained by this method, an antibody obtained by, for example, using transformants of YB2/0 has a high antibody-dependent cytotoxic activity and thus is useful as drugs.

(57) 要約:

本発明は、ラット細胞を用いた所望のポリペプチドの製造方法に関する。詳しくは、YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (以下、YB2/0 という) 等のラット細胞、好ましくは免疫機能分子等の所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入してなるラット細胞を、血清を含有しない培地で培養することによる、該ポリペプチドの製造方法に関する。本発明の方法で得られる所望のポリペプチドのうち、例えばYB2/0の形質転換細胞を用いて得られる抗体は抗体依存性細胞障害活性が高く、医薬品として有用である。



WO 01/29246 A1



添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

### ポリペプチドの製造方法

#### 技術分野

本発明は、ラット細胞を用いた所望のポリペプチドの製造方法に関する。詳しくは、YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20（以下、YB2/0という）等のラット細胞、好ましくは免疫機能分子等の所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入してなるラット細胞を、血清を含有しない培地（以下、無血清培地という）で培養することによる、該ポリペプチドの製造方法に関する。本発明の方法で得られる所望のポリペプチドのうち、例えばYB2/0の形質転換細胞を用いて得られる抗体は抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC活性ともいう）が高く、医薬品として有用である。

#### 背景技術

抗体等の免疫機能を有するポリペプチドは、さまざまな医薬品用途を示し、その有用性は腎移植の拒絶反応の低減化、RSV小児感染に対する抗ウイルス剤、乳がんに対する抗ガン剤として医薬品に応用されている。また、抗体医薬はその重要性が今後ますます高くなると予想されている。

例えば、抗体をコードする遺伝子を用いて抗体を製造するには、抗体をコードする遺伝子を導入したベクターを保有する組換え細胞を培養し、培養物中に生産される抗体を採取することにより行うが、当該遺伝子組換え抗体は動物細胞からしか完全な形で生産されることはないため、遺伝子組換え抗体の製造は動物細胞を用いて行うことが好ましい。

動物細胞または組換え動物細胞を用いての有用物質の生産は、研究や産業化を目的として広く行われている。動物細胞を培養して物質を生産する方法においては、通常培地中に血清を存在させて培養する。しかしながら、血清が存在するとそのロット差が細胞収率や物質生産に大きな影響を与える。従って、動物細胞を用いて物質生産をする場合、血清を含有しない培地で培養することが望まれる。

ラットミエローマ細胞系であるYB2/3.0Ag30（以下、Y0という）を無蛋白培地中で培養する方法は知られている〔Cytotechnology, 17, 193(1995)〕。また、

無血清培地を用いて動物細胞を培養し、ポリペプチドを生産する方法は知られている。〔Biotechnol. Prog., 10, 87(1994)、Cytotechnology, 19, 27(1996)、特公平6-70757〕さらに、血清を含む培地中で増殖させたラット細胞の形質転換体を無血清培地に接種し、該培地中で培養してポリペプチドを生産する方法も知られている（特表昭62-502377）。

しかし、無血清培地に馴化させたラット細胞を用いて所望のポリペプチドを長期間安定に生産する方法は知られていない。

一方、動物細胞の培養方法としては、新鮮培地へ細胞を接種し、そのまま一定時間後に培養を終了する培養方法、すなわち、バッチ培養方法が主として用いられている。しかし、バッチ培養で動物細胞を培養すると、培養中における栄養分の枯渇、細胞からの老廃物の蓄積等、培養環境の劣化が顕著に現れるため、細胞増殖や所望のポリペプチドの生産性が低くなることが知られている。結果として、培養物中に含まれる該ポリペプチドの濃度が低くなるため、培養物中に占める所望のポリペプチド以外の蛋白質成分、例えば細胞に由来する蛋白質または培地に由来する蛋白質などの濃度が相対的に高くなる。このため、該ポリペプチドを分離、精製する工程における負荷が増大し、生産コストが高くなるという欠点がある。

#### 発明の開示

本発明の目的は、ラット細胞を用いて所望のポリペプチドを効率よく製造する方法を提供することにある。

本発明は、以下の(1)~(24)に関する。

- (1) 無血清培地に馴化したラット細胞株を無血清培地で培養し、培養物中から所望のポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造方法。
- (2) 無血清培地に馴化したラット細胞株が無血清培地に2ヶ月以上増殖継代できるラット細胞株である、(1)に記載の製造方法。
- (3) ラット細胞がミエローマ細胞またはミエローマ細胞系の雑種細胞である(1)または(2)に記載の方法。
- (4) ラット細胞がYB2/0である(1)または(2)に記載の方法。
- (5) 細胞が所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入してなる細胞である、(1)~(4)のいずれかに記載の方法。

- (6) 培養がバッチ培養、フェドバッチ培養またはパーフュージョン培養である、(1)~(5)のいずれかに記載の方法。
- (7) 培養中に、栄養因子および生理活性物質から選ばれる少なくとも一種を培地に添加する、(1)~(6)のいずれかに記載の方法。
- (8) 栄養因子がグルコース、アミノ酸およびビタミンから選ばれる少なくとも一種である、(7)に記載の方法。
- (9) 生理活性物質が、インシュリン、トランスフェリンおよびアルブミンから選ばれる少なくとも一種である(7)に記載の製造方法。
- (10) 所望のポリペプチドが免疫機能分子である、(1)~(9)のいずれかに記載の方法。
- (11) 免疫機能分子が蛋白質またはペプチドである、(10)に記載の方法。
- (12) 蛋白質またはペプチドが、抗体、抗体の断片または抗体のFc領域を有する融合蛋白質である、(11)に記載の方法。
- (13) 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーもしくは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスもしくは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、(12)に記載の方法。
- (14) 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FGF8受容体抗体、抗インシュリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルス

- または細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ペロ毒素抗体である、(13)に記載の方法。
- (15) 抗体が抗GD3ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗インターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖抗体または抗GM2ヒト型CDR移植抗体である、(13)に記載の方法。
- (16) ラット細胞を、培養液中のインシュリン濃度を10mg/L以上に維持して培養した後、培養液中のインシュリン濃度を10mg/L以下に維持して培養する、(1)~(15)のいずれかに記載の方法。
- (17) 細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように、ラット細胞を馴化培地へ接種することを特徴とする、ラット細胞の無血清培地への馴化方法。
- (18) ラット細胞がミエローマ細胞またはミエローマ細胞系の雑種細胞である(17)に記載の方法。
- (19) ラット細胞がYB2/0である(17)に記載の方法。
- (20) 細胞が所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入された細胞である、(17)~(19)のいずれかに記載の方法。
- (21) (17)~(20)のいずれかに記載の方法でラット細胞を無血清培地に馴化させた後、クローン化することを特徴とする、無血清培地に馴化したラット細胞株の製造方法。
- (22) (21)に記載の方法で得られる無血清培地に馴化したラット細胞株。
- (23) 無血清培地に馴化したラット細胞株が無血清培地に2ヶ月以上増殖継代できるラット細胞株である、(22)に記載の細胞株。
- (24) 無血清培地に馴化したラット細胞株61-33 $\gamma$ (FERM BP-7325)。

本発明の細胞としては、ラット細胞であればいずれも用いられるが、所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入してなるラット細胞が好ましい。ラット細胞としては、例えばY3 Ag1.2.3. (ATCC CRL 1631)、Y0 (ECACC No:85110501)、YB2/0 (ATCC CRL 1662) 等、ミエローマ細胞またはミエローマ細胞系の雑種細胞が好適に用いられる。また、これらの細胞に変異処理を施したり、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と細胞融合等によって得られ、これらの細胞と同等の性質を有する細胞も、本発明の細胞に含まれる。

本発明の所望のポリペプチドとしては、真核細胞ポリペプチドが好ましく、ほ乳動物細胞ポリペプチドがさらに好ましい。真核細胞ポリペプチドは少なくとも1部分が真核細胞ポリペプチドであれば、融合ポリペプチド等、人工的に改変されたポリペプチドであっても、その部分断片であってもよい。

また、本発明のポリペプチドは、抗体等の免疫機能分子、酵素等の生体触媒分子、構造蛋白質等の構造の形成・保持分子など、いずれであってもよいが、免疫機能分子であることが好ましい。

免疫機能分子としては、生体内で免疫反応に関与する蛋白質またはペプチド等のポリペプチドであれば、例えばインターフェロン分子であるインターロイキン-2 (IL-2) [Science, 193, 1007 (1976)]、インターロイキン-12 (IL-12) [J. Leuc. Biol., 55, 280 (1994)]、コロニー刺激因子である顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF) [J. Biol. Chem., 258, 9017 (1983)]、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF) [J. Exp. Med., 173, 269 (1992)]、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) [J. Biol. Chem., 252, 1998 (1977)]、増殖因子であるエリスロポイエチン(EPO) [J. Biol. Chem., 252, 5558 (1977)]、トロンボポイエチン(TPO) [Nature, 369, 533 (1994)]等、いかなるものであってもよい。

抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。

抗体としては、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体の他、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。

本発明において、ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と、ラットに由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相同性決定領域 (complementarity determining region : 以下、CDRという) 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHともいう）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLともいう）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、定常領域はC領域としてCHともいう）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLともいう）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgという）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型CDR移植抗体を発現させ、製造することができる。

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hIgに属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト



型CDR移植抗体(CLとしては、hlgに属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスまたは $\lambda$ クラスのものを用いることができる。

免疫機能分子としては、例えば、ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体等が挙げられる。具体的には、ガングリオシドGD3に対する抗体(以下、抗GD3抗体という)、ヒトインターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖に対する抗体(以下、抗IL-5受容体 $\alpha$ 鎖抗体という)等があげられる。例えば、抗GD3抗体としては、抗ガングリオシドGD3ヒト型キメラ抗体(以下、抗GD3キメラ抗体という)KM-871(特開平5-304989)、抗IL-5受容体 $\alpha$ 鎖抗体としては、ヒト化抗IL-5受容体 $\alpha$ 鎖抗体KM8399(WO97/10354)、抗GM2ヒト型CDR移植抗体KM8966、KM8967、KM8969またはKM8970(特開平10-257893)等をコードするDNAがあげられる。

所望のポリペプチドをコードするDNAは、該ポリペプチドを発現できるものであればいずれでも用いられるが、免疫機能分子をコードするDNAであることが好ましい。

所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体ベクターを調製するために用いられる発現ベクターとしては、例えば、pcDNA1、pcDM8(フナコシ社製)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133(1990)〕、pAS3-3(特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840(1987)〕、pcDNA1/Amp(Invitrogen社製)、pREP4(Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307(1987)〕、pAGE210等があげられる。

プロモーターとしては、本発明で用いる動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

宿主細胞としては、ラット細胞であればいずれも用いられるが、例えばY3 Ag1.2.3.、Y0、YB2/0等、ミエローマ細胞またはミエローマ細胞系の雑種細胞が

好適に用いられる。また、これらの細胞に変異処理を施したり、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得されたB細胞と細胞融合等によって得られ、これらの細胞と同等の性質を有する細胞も、本発明の細胞に含まれる。

ラット細胞への組換え体ベクターの導入方法としては、当該細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)〕等をあげることができる。

上記方法で組換え体ベクターを導入された細胞を、適当な培地中で培養することにより、細胞内または培養上清中に、所望のポリペプチドを生産することができる。

本発明の細胞としては、例えば抗GD3ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換細胞7-9-51 (FERM BP-6691)、抗IL-5受容体 $\alpha$ 鎖キメラ抗体を生産する形質転換細胞KM7399 (FERM BP-5649)、抗IL-5受容体 $\alpha$ 鎖ヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換細胞KM9399 (FERM BP-5647)、抗GM2ヒト型CDR移植抗体を生産する形質転換細胞KM8966 (FERM BP-5105)、KM8967 (FERM BP-5106)、KM8969 (FERM BP-5527) およびKM8970 (FERM BP-5528) 等があげられる。

本発明の無血清培地への馴化方法としては、血清を含有する培地で継代したラット細胞を市販の無血清培地等へ直接馴化させる方法や連続馴化の方法 (Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, JOHON WILEY & SONS 2C:1) 等があげられる。

無血清馴化中には細胞の生存率が一時的に低下し、細胞が死滅してしまうことがある。このため、細胞の生存率を戻し、あるいは高く維持するためには、無血清馴化培地への細胞接種時に細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/ml、好ましくは $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように接種することが好ましい。例えば、直接馴化法では、培地中に細胞を接種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ インキュベーターでのバッチ培養等、通常の動物細胞の培養方法を用いて培養し、細胞濃度が $10 \times 10^5 \sim 40 \times 10^5$ 細胞/mlに達したら、無血清培

地中に細胞を接種し、同様な条件で培養を繰り返す。

無血清培地にラット細胞を $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/ml、好ましくは $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように接種し、通常の動物細胞の培養方法を用いて4~7日後に、細胞密度が $10 \times 10^5 \sim 40 \times 10^5$ 細胞/mlに達したラット細胞を無血清培地に馴化した細胞として選択する。

無血清培地に馴化した細胞は、細胞濃度が下記のバッチ培養で用いられる培地中に $10 \times 10^5 \sim 30 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように接種し、下記のバッチ培養で用いられる培養条件で3~5日間培養して、継代培養を行うことができる。なお、継代培養の期間中、無血清培地に馴化した細胞の生存率は、90%以上に維持しておくことが望ましい。また、ラット細胞、例えばYB2/0細胞またはYB2/0の形質転換細胞について、無血清培地に馴化した細胞が所望のポリペプチドの生産性を維持するためには、アルブミンを好ましくは0.1~10g/L、さらに好ましくは0.5~3g/Lとなるように無血清培地へ添加しておくことよい。

本発明の細胞を無血清培地に馴化させた後、96ウェルプレートによる限界希釈方法、コロニー形成方法等を用いることにより、クローン（単一細胞）化した細胞株を調製することができる。

以下に、限界希釈法を用いたクローン化した細胞株を調製する方法を示す。

細胞懸濁液を希釈し、ひとつのウェルに1個以下の確率で細胞が入るように接種し、市販の無血清培地などを用いて、30~40°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で数週間培養する。培養終了後、細胞増殖の認められた細胞の培養上清中の所望のポリペプチドの濃度を調べ、該ポリペプチドの生産性の高い細胞を選択する。

コロニー形成方法を用いてクローン化する方法は以下のとおりである。

附着性細胞の場合は、細胞懸濁液を希釈し、シャーレに細胞を接種して培養後、コロニーの形成を確認する。ペニシリンキャップ等のリングでコロニーを分離し、トリプシン等の酵素で細胞を分離後、適当な培養器に移し、所望のポリペプチドの生産量を調べ、該ポリペプチドの生産性の高い細胞を選択する。

浮遊細胞の場合は、細胞懸濁液を希釈し、軟寒天中に細胞を接種して培養し、生じたコロニーを顕微鏡下でピックアップした後、静置培養に戻して所望のポ

リペプチドの生産量を調べ、生産性の高い細胞を選択する。

上記方法を繰り返して行なうことで、無血清に馴化され、かつ目的とする細胞特性を持ったクローン化されたラット細胞株を選択することができる。

上記方法により、無血清培地に馴化したラット細胞株、好ましくは無血清培地中で2ヶ月以上継代培養できるラット細胞株を得ることができる。また、無血清培地に馴化した細胞を長期培養するためには、無血清培地中で2ヶ月以上継代培養できるラット細胞株であることがさらに好ましい。

なお、無血清培地に馴化したラット細胞株は、上記の無血清培地に馴化した細胞を継代培養する方法で継代培養することができる。無血清培地に馴化したラット細胞株としては、61-33γ (FERM BP-7325) が例示される。

本発明の細胞を培養する方法としては、所望のポリペプチドを効率よく生産できる培養方法であれば、通常用いられる動物細胞の培養法のいずれでも用いられる。例えば、バッチ培養、リピートバッチ培養、フェドバッチ培養、パーフュージョン培養等があげられるが、所望のポリペプチドの生産性を高めるにはフェドバッチ培養またはパーフュージョン培養が好ましい。

#### 1. バッチ培養

本発明の方法において用いられる無血清培地は、通常の動物細胞の培養に用いられる基礎培地に血清の代わりに、各生理活性物質、栄養因子が添加され、かつ動物細胞が同化する炭素源、窒素源等を含有させたものが用いられる。

具体的には、RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕、F12培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288(1965)〕、IMDM培地〔J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)〕等があげられるが、好ましくは、DMEM培地、F12培地、IMDM培地等が用いられる。

無血清培地には、必要に応じて動物細胞の生育に必要な栄養因子、生理活性物質等を添加する。これらの添加物は、培養前に予め培地に含有させる。

栄養因子としては、グルコース、アミノ酸、ビタミン等があげられる。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

生理活性物質としては、インシュリン、トランスフェリン、アルブミン等があげられる。

栄養因子の濃度として、グルコースの濃度は200~6000mg/L、好ましくは3000~5000mg/Lである。

アミノ酸の濃度は、例えば、L-アラニン1~160mg/L（好ましくは3~120mg/L）、L-アルギニン-塩酸10~1000mg/L（好ましくは30~800mg/L）、L-アスパラギン-水和物10~200mg/L（好ましくは20~150mg/L）、L-アスパラギン酸5~100mg/L（好ましくは10~75mg/L）、L-シスチン二塩酸10~200mg/L（好ましくは20~150mg/L）、L-グルタミン酸5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-グルタミン50~2000（好ましくは100~1500mg/L）、グリシン2~100mg/L（好ましくは5~75mg/L）、L-ヒスチジン-塩酸二水和物5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-イソロイシン2~300mg/L（好ましくは4~200mg/L）、L-ロイシン5~300mg/L（好ましくは10~200mg/L）、L-リジン-塩酸10~300mg/L（好ましくは20~250mg/L）、L-メチオニン5~100mg/L（好ましくは10~75mg/L）、L-フェニルアラニン5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-プロリン5~200mg/L（好ましくは10~150mg/L）、L-セリン5~200mg/L（好まし

くは10~150mg/L)、L-スレオニン5~200mg/L(好ましくは10~150mg/L)、L-トリプトファン1~40mg/L(好ましくは2~30mg/L)、L-チロシンニナトリウム二水和物2~300mg/L(好ましくは4~200mg/L)、L-バリン5~300mg/L(好ましくは10~200mg/L)である。

ビタミンの濃度は、例えば、d-ビオチン0.001~0.4mg/L(好ましくは0.002~0.3mg/L)、D-パントテン酸カルシウム0.001~10.0mg/L(好ましくは0.002~7.5mg/L)、塩化コリン0.1~20.0mg/L(好ましくは0.2~15.0mg/L)、葉酸0.005~20.0mg/L(好ましくは0.01~15.0mg/L)、myo-イノシトール0.01~300mg/L(好ましくは0.05~200mg/L)、ナイアシンアミド0.01~20.0mg/L(好ましくは0.02~15.0mg/L)、ピリドキサール-塩酸0.01~15.0mg/L(好ましくは0.02~10.0mg/L)、リボフラビン0.005~2.0mg/L(好ましくは0.01~1.5mg/L)、チアミン-塩酸0.005~20.0mg/L(好ましくは0.01~15.0mg/L)、シアノコバラミン0.001~5.0mg/L(好ましくは0.002~3.0mg/L)である。

生理活性物質の濃度は、例えば、インシュリン10~500mg/L、好ましくは50~300mg/L、トランスフェリン10~500mg/L、好ましくは50~300mg/L、アルブミン200~6000mg/L、好ましくは700~4000mg/Lである。

バッチ培養は、通常pH6~8、30~40℃等の条件下で3~12日間行う。また、培養中必要に応じて、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。なお、溶存酸素濃度制御、pH制御、温度制御、攪拌などは通常の動物細胞の培養に用いられる方法に準じて行うことができる。

## 2. フェドバッチ培養

本発明の方法において使用される無血清培地は、通常の動物細胞の培養に用いられる基礎培地に血清の代わりに、各生理活性物質、栄養因子が添加され且つ通常動物細胞が同化する炭素源、窒素源等を含有させたものが用いられる。

具体的には、RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕、F12培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288(1965)〕、IMDM培地〔J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)〕等があげられるが、好ましくは、DMEM培地、F12培地、IMDM培地等が用いられる。上記培地以外に、バッチ培養で記載した無血清培地を用いてもよい。

無血清培地には、必要に応じて動物細胞の生育に必要な生理活性物質、栄養因子等を添加する。これらの添加物は、予め培養前に培地に含有させるか、または必要に応じて、培養中に培養液へ適宜追加供給する。

栄養因子としては、グルコース、アミノ酸、ビタミン等があげられる。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

生理活性物質としては、インシュリン、トランスフェリン、アルブミン等があげられる。

培地または培養液中への栄養因子の最終添加量として、グルコースは200~6000mg/L、好ましくは1000~5000mg/Lである。

アミノ酸は、例えば、L-アラニン1~960mg/L (好ましくは1~640mg/L)、L-アルギニン-塩酸10~6000mg/L (好ましくは11~4000mg/L)、L-アスパラギン-水和物10~1200mg/L (好ましくは11~800mg/L)、L-アスパラギン酸5~600mg

/L (好ましくは5~400mg/L)、L-シスチン二塩酸10~1200mg/L (好ましくは11~800mg/L)、L-グルタミン酸5~1200mg/L (好ましくは5~800mg/L)、L-グルタミン53~12000 (好ましくは55~8000mg/L)、グリシン2~600mg/L (好ましくは2~400mg/L)、L-ヒスチジン一塩酸二水和物5~1200mg/L (好ましくは5~800mg/L)、L-イソロイシン4~1800mg/L (好ましくは4~1200mg/L)、L-ロイシン13~1800mg/L (好ましくは14~1200mg/L)、L-リジン一塩酸10~1800mg/L (好ましくは11~1200mg/L)、L-メチオニン4~600mg/L (好ましくは5~400mg/L)、L-フェニルアラニン5~1200mg/L (好ましくは5~800mg/L)、L-プロリン5~1200mg/L (好ましくは5~800mg/L)、L-セリン5~1200mg/L (好ましくは5~800mg/L)、L-スレオニン5~1200mg/L (好ましくは5~800mg/L)、L-トリプトファン1~240mg/L (好ましくは1~160mg/L)、L-チロシン二ナトリウム二水和物8~1800mg/L (好ましくは8~1200mg/L)、L-バリン12~1800mg/L (好ましくは12~1200mg/L) である。

ビタミンは、例えば、d-ビオチン0.001~2.4mg/L (好ましくは0.001~1.6mg/L)、D-パントテン酸カルシウム0.011~60mg/L (好ましくは0.011~40mg/L)、塩化コリン0.11~90mg/L (好ましくは0.11~60mg/L)、葉酸0.01~120mg/L (好ましくは0.01~80mg/L)、myo-イノシトール0.05~1800mg/L (好ましくは0.05~1200mg/L)、ナイアシンアミド0.02~120mg/L (好ましくは0.03~80mg/L)、ピリドキサーール一塩酸0.02~90mg/L (好ましくは0.03~60mg/L)、リボフラビン0.01~12mg/L (好ましくは0.01~98mg/L)、チアミン一塩酸0.01~120mg/L (好ましくは0.01~80mg/L)、シアノコバラミン0.001~30mg/L (好ましくは0.001~20mg/L) である。

培地または培養液中への生理活性物質の最終添加量として、例えば、インシ



ユリン10~3000mg/L、好ましくは11~2000mg/L、トランスフェリン10~3000mg/L、好ましくは11~2000mg/L、アルブミン200~36000mg/L、好ましくは220~24000mg/Lである。

本発明において物質の「最終添加量」は、フェドバッチ培養中に添加する濃縮培養液を最終的に添加し終わった後、培地に含まれる該物質の重量と培養液中に添加した該物質の重量との合計量を、培地量と添加した濃縮培養液量との合計量で除した値として表わされる。

フェドバッチ培養においては、生理活性物質、栄養因子等は通常に使用される濃度よりも高い濃度で添加することが好ましい。例えば、培養液量の1/30~1/3好ましくは1/20~1/5を一回分として添加する。培養液中に添加する場合は、培養期間中、連続的にまたは数回~十数回に分けて追加供給することが好ましい。生理活性物質、栄養因子等を連続的、または間欠的に少量ずつ追加供給する上記フェドバッチ培養法は、細胞の代謝効率が高く、培養液中の老廃物が蓄積されることによる培養細胞の到達細胞密度の低下を防止することができ、また、回収された培養液中の所望のポリペプチドの濃度はバッチ培養法に比べて高濃度であるため、該ポリペプチドの分離・精製が容易になり、バッチ培養に比べ、培地当りの該ポリペプチドの生産量を増大させることができる。

フェドバッチ培養は、通常pH6~8、30~40℃で、3~12日間行う。また、培養中必要に応じて、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。なお、溶存酸素濃度制御、pH制御、温度制御、攪拌などは通常の動物細胞の培養に用いられる方法に準じて行うことができる。

### 3. パーフュージョン培養

本発明の方法において使用される無血清培地は、通常の動物細胞の培養に用いられる基礎培地に血清の代わりに、各生理活性物質、栄養因子が添加され且つ通常動物細胞が同化する炭素源、窒素源等を含有させたものが用いられる。具体的には、RPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培

地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕、F12培地〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288(1965)〕、IMDM培地〔J. Experimental Medicine, 147, 923 (1978)〕等があげられるが、好ましくは、DMEM培地、F12培地、IMDM培地等が用いられる。上記培地以外に、バッチ培養で記載した無血清培地を用いてもよい。

無血清培地には、必要に応じて動物細胞の生育に必要な生理活性物質、栄養因子等を添加する。これらの添加物は、培養前の培地または培養液中に供給する培地に含有させておくといよい。

栄養因子としては、グルコース、アミノ酸、ビタミン等があげられる。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。

生理活性物質としては、インシュリン、トランスフェリン、アルブミン等があげられる。

栄養因子の濃度として、グルコースの濃度は500~6000mg/L、好ましくは1000~2000mg/Lにコントロールされる。

栄養因子としては、アミノ酸、ビタミン等があげられる。他の生理活性物質または栄養因子の添加量は、例えば、インシュリン4~560mg/L、好ましくは20~360mg/L、トランスフェリン4~560mg/L、好ましくは20~360mg/L、アルブミン80~6500mg/L、好ましくは280~4500mg/Lである。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリ

シン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。アミノ酸濃度は、例えば、L-アラニン1~200mg/L (好ましくは2~160mg/L)、L-アルギニン-塩酸10~1140mg/L (好ましくは30~940mg/L)、L-アスパラギン-水和物10~250mg/L (好ましくは20~200mg/L)、L-アスパラギン酸5~148mg/L (好ましくは10~120mg/L)、L-シスチン二塩酸10~350mg/L (好ましくは20~300mg/L)、L-グルタミン酸5~320mg/L (好ましくは10~270mg/L)、L-グルタミン50~3300 (好ましくは100~1800mg/L)、グリシン2~148mg/L (好ましくは5~123mg/L)、L-ヒスチジン-塩酸二水和物5~270mg/L (好ましくは10~220mg/L)、L-イソロイシン4~470mg/L (好ましくは4~370mg/L)、L-ロイシン10~470mg/L (好ましくは13~370mg/L)、L-リジン-塩酸10~530mg/L (好ましくは20~480mg/L)、L-メチオニン4~150mg/L (好ましくは4~120mg/L)、L-フェニルアラニン4~310mg/L (好ましくは4~260mg/L)、L-プロリン5~270mg/L (好ましくは10~210mg/L)、L-セリン5~270mg/L (好ましくは10~220mg/L)、L-スレオニン5~350mg/L (好ましくは10~300mg/L)、L-トリプトファン1~65mg/L (好ましくは2~55mg/L)、L-チロシン二ナトリウム二水和物4~470mg/L (好ましくは8~370mg/L)、L-バリン10~450mg/L (好ましくは11~350mg/L)である。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、DL- $\alpha$ -トコフェロール等があげられ、1種または2種以上組み合わせて用いられる。ビタミンの最終添加量は、例えば、d-ビオチン0.001~0.44mg/L (好ましくは0.02~0.34mg/L)、D-パントテン酸カルシウム0.01~16mg/L (好ましくは0.

0.2~1.4 mg/L)、塩化コリン0.1~2.1 mg/L (好ましくは3.0.2~1.6 mg/L)、葉酸0.01~2.6 mg/L (好ましくは0.01~2.1 mg/L)、myo-イノシトール0.05~3.10 mg/L (好ましくは0.05~2.11 mg/L)、ナイアシンアミド0.02~2.6 mg/L (好ましくは0.02~2.1 mg/L)、ピリドキサル-塩酸0.02~2.1 mg/L (好ましくは0.02~1.6 mg/L)、リボフラビン0.01~2.6 mg/L (好ましくは0.01~2.1 mg/L)、チアミン-塩酸0.01~2.6 mg/L (好ましくは0.01~2.1 mg/L)、シアノコバラミン0.001~5 mg/L (好ましくは0.002~3 mg/L)である。

本発明において培養液は、通常使われている培養液と細胞を分離する装置により効率的に分離され、濃縮された細胞液が元の培養槽に戻り、減少した分の新鮮培地が新たに供給される。このことにより常に培養環境が良好に保たれる。

本発明の細胞の場合、新鮮培地での培地交換率とは別に、増殖する細胞を細胞の増殖率に合わせて、培養系外へ捨てることによって系を安定させ、所望のポリペプチドの生産性を高めることができる。例えば、細胞を系外へ捨てる速度を細胞増殖率に合わせて、目的とする細胞密度が維持されるよう細胞の倍加時間に培養槽にある全細胞の2/5~3/5を系外に出すことにより生産性の高い培養が可能となる。

本発明において培養は、通常pH 6~8、30~40℃等の条件下で10~40日間行う。また、培養中必要に応じて、ストレプトマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。なお、溶存酸素濃度制御、pH制御、温度制御、攪拌などは通常の動物細胞の培養に用いられる方法に準じて行うことができる。

上記のとおり、本発明にかかるラット細胞を培養し、所望のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

本発明の培養において、細胞を増殖させる場合には、培養液中のインシュリン濃度を1.0 mg/L以上、好ましくは2.0 mg/L以上に維持して培養することが好ましい。一方、所望のポリペプチドを生産させる場合には、例えば培養液中のインシュリン濃度を、1.0 mg/L以下、好ましくは5 mg/L以下

に維持して培養することが好ましい。なお、前培養において培地中にインシュリンが含まれていれば、抗体の生産性を高めるために、インシュリンは添加しなくてよいが、通常は培養液中にインシュリン濃度を0.01~10 mg/L、好ましくは0.01~5 mg/Lになるように維持することが好ましい。

培養液中のインシュリン濃度を調節する方法は、インシュリンの濃度調整が可能である培養、例えばフェドバッチ培養、パーフージョン培養等の培養方法において、好適に用いられる。

本発明の製造方法としては、宿主細胞内にポリペプチドを生産させる直接発現方法、宿主細胞外にポリペプチドを分泌生産させる方法（モレキュラー・クロニング第2版）等があげられる。

所望のポリペプチドは、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平5-336963、WO94/23021等に記載の方法を準用することにより、宿主細胞外へ積極的に分泌させることができる。すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明にかかるの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、所望のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用することにより、所望のポリペプチドの生産量を上昇させることもできる。

本発明の方法により製造される所望のポリペプチドは、通常のポリペプチドの単離精製法を用いて単離精製することができる。

本発明の方法により製造されるポリペプチドが細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-セファロースF

F（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等を、単独あるいは組合わせて用い、精製標品を得ることができる。

本発明の方法により製造されるポリペプチドが細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドを回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

本発明の方法により製造されるポリペプチドのうち、免疫機能分子、特に抗体は抗体依存性細胞障害活性（ADCC活性）が高く、腫瘍、炎症、アレルギー等の疾患の治療等に有用である。

#### 図面の簡単な説明

図1 無血清培地に馴化した抗GD3キメラ抗体生産細胞株61-33γ（FERM BP-7325）の培養における、生細胞濃度と生存率の推移を示す。

図2 無血清培地に馴化した抗GD3キメラ抗体生産細胞株61-33γ（FERM BP-7325）の培養における、抗GD3キメラ抗体KM-871の抗体濃度の推移を示す。

図3 無血清培地に馴化した抗GD3キメラ抗体生産細胞株61-33γ（FERM BP-7325）のパーフュージョン培養における、生細胞濃度と生存率の推移を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例を示す。

##### 実施例1. 抗GD3キメラ抗体の作製

###### 1. 抗GD3ヒトキメラ抗体のタンデム型発現ベクターpChiLHGM4の構築

抗GD3キメラ抗体のL鎖の発現ベクターpChi641LGM4[J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)] を制限酵素 MluI（宝酒造社製）と SalI（宝酒造社製）で切断して得られるL鎖cDNAを含む約4.03kbの断片と動物細胞用発現ベ

クターpAGE107 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] を制限酵素 MluI (宝酒造社製) と SalI (宝酒造社製) で切断して得られる G 4 1 8 耐性遺伝子およびスプライシングシグナルを含む約 3. 4 0 k b の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結し、大腸菌 HB 1 0 1 株 [モレキュラー・クローニング: ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、さらに MluI (宝酒造社製) で切断して得られる L 鎖 c DNA を含む約 5. 6 8 k b の断片と抗 G D 3 キメラ抗体の H 鎖の発現ベクター pChi641HGM4 [J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 XhoI (宝酒造社製) で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用いて平滑末端化し、さらに MluI (宝酒造社製) で切断して得られる H 鎖 c DNA を含む約 8. 4 0 k b の断片を DNA Ligation Kit (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 HB 1 0 1 株 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] を形質転換して抗 G D 3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を構築した。

## 2. ラットミエローマ細胞 YB2/0 を用いた生産細胞の作製

実施例 1 の 1 項で構築した抗 G D 3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 の 5  $\mu$  g を 4  $\times$  1 0<sup>6</sup> 細胞/ml のラットミエローマ YB2/0 へエレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により導入後、4 0 ml の R P M I 1 6 4 0 - F B S ( 1 0 ) [ F B S ( G I B C O B R L 社製) を 1 0 % 含む R P M I 1 6 4 0 培地] に懸濁し、9 6 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 2 0 0  $\mu$  l / ウェルずつ分注した。5 % C O<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 7 ° C 、 2 4 時間培養した後、G 4 1 8 を 0. 5 m g / m l になるように添加して 1 ~ 2 週間培養した。G 4 1 8 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 G D 3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す E L I S A 法により測定した。

培養上清中に抗 G D 3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株に

については、DHFR遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418を0.5mg/ml、DHFRの阻害剤であるメソトレキセート（以下、MTXという；シグマ社製）を50nM含むRPMI1640-FBS（10）培地に $1\sim 2\times 10^5$ 細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレート（Greiner社製）に2mlずつ分注した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で1～2週間培養して、50nM MTX耐性を示す形質転換株を誘導した。

形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗GD3キメラ抗体の抗原結合活性を実施例1の3項に示すELISA法により測定した。培養上清中に抗GD3キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX濃度を100nM、200nMと順次上昇させ、最終的にG418を0.5mg/ml、MTXを200nMの濃度で含むRPMI1640-FBS（10）培地で増殖可能かつ、抗GD3キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株については、2回の限界希釈法によるクローン化（単一細胞化）を行った。

このようにして得られた抗GD3キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン7-9-51は、平成11年4月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-6691として寄託されている。

### 3. 抗体のGD3に対する結合活性の測定（ELISA法）

抗体のGD3に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmolのGD3を10μgのジバルミトイルフォスファチジルコリン（シグマ社製）と5μgのコレステロール（シグマ社製）とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。該溶液の20μl（40pmol/ウェルとなる）を96ウェルのELISA用のプレート（Greiner社製）の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%牛血清アルブミン（シグマ社製；以下、BSAという）を含むPBS（以下、1%BSA-PBSという）を100μl/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を50μl/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween20（和光純薬社製）を含むPBS（以下、Twe



en-PBSという)で洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、50 $\mu$ l/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1 $\mu$ l/mlで添加した溶液)を50 $\mu$ l/ウェルで加えて発色させ、415nmの吸光度(以下、OD415という)を測定した。

## 実施例2

抗GD3抗体を生産する形質転換細胞クローン7-9-51(FERM BP-6691)の無血清培地への馴化を行った。培養はいずれも温度37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>濃度5%、培養液量5mlでの、T型フラスコによる静置継代培養とし、継代時には遠心分離により、培養液から新鮮培地への全量交換を実施した。

FERM BP-6691を、IMD培地(ライフテクノロジー社製)および200nM MTX(シグマ社製)からなる無血清馴化用基本培地に牛血清アルブミン(BSA:JRH社製)、インシュリン(ライフテクノロジー社製)およびトランスフェリン(ライフテクノロジー社製)を含有してなる血清添加培地に、2~4 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ml接種し、継代期間を2~4日として継代培養を行った。

上記継代培養で得られた細胞を該基本培地に5%(v/v) $\gamma$ 線照射透析牛胎児血清(dFBS;ライフテクノロジー社製)および100nM T3を含有してなる血清添加培地により継代培養を行った後、該基本培地に0.2%(w/v)BSA、50mg/Lインシュリンおよび50mg/Lトランスフェリンを含有してなる培地で9継代27日間、該基本培地に0.2%(w/v)BSA、20mg/Lインシュリンおよび20mg/Lトランスフェリンを含有してなる培地で1継代3日間、該基本培地に0.1%(w/v)BSA、20mg/Lインシュリンおよび20mg/Lトランスフェリンを含有してなる培地で1継代3日間、該基本培地に0.05%(w/v)BSA、10mg/Lインシュリンおよび10mg/Lトランスフェリンを含有する培地で、1継代3日間の継代培養を連続的に実施した。

無血清培地に馴化した細胞株を作製する際に、該基本培地に0.2% (w/v) BSA、50 mg/Lインシュリンおよび50 mg/Lトランスフェリンを含有してなる培地で27日間の培養期間中、細胞の生存率が断続的に低下した。そこで、種々検討した結果、培地への細胞接種時の細胞密度を $4 \times 10^6$ 細胞/mlにすることにより、細胞の生存率を維持しながら無血清培地に馴化させることができた。

無血清培地に馴化させたラット細胞について、限界希釈法により細胞の単一化を、以下のとおり実施した。

96ウエルプレートに0.25細胞/ウエル、0.2 ml/ウエルになるよう細胞懸濁液を調製して接種した。合計1632ウエルに播種した結果、72クローンを得た。6ウエルプレート、三角フラスコと拡大し、生産性と増殖性を考慮しながら、3クローンを選択した。このうち、生産性の高いクローン株を61-33 $\gamma$ 株とした。無血清培地に馴化した細胞株61-33 $\gamma$ 株は、平成12年10月13日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）にFERM BP-7325として寄託されている。

なお、上記方法で得られた無血清培地に馴化した細胞株61-33 $\gamma$ 株は、無血清培地である該基本培地に0.2% (w/v) BSA、10 mg/Lインシュリン、10 mg/Lトランスフェリンおよび200 nM MTXを含有してなる培地中で継代期間を3~5日として継代培養を行うことより、110日間にわたって安定して継代培養を行うことができた。

また、FERM BP-7325をHybridoma-SFM培地に0.1% (w/v) BSAおよび200 nM MTXを含有してなる無血清培地に $3 \times 10^6$ 細胞/mlとなるよう接種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで3日間のバッチ培養を行った。その結果、培養終了時において、細胞濃度は $17.5 \times 10^6$ 細胞/mlであり、上清から得られる抗体濃度は39 mg/Lであった。

一方、FERM BP-6691をIMD培地に10% (v/v) dFBSおよび200 nM MTXを含有してなる血清培地に $3 \times 10^6$ 細胞/mlとなるよう接種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで3日間のバッチ培養を行った。その結果、培養終了時において、細胞濃度は $14.2 \times 10^6$ 細胞/ml

1であり、上清から得られる抗体濃度は28 mg/Lであった。

### 実施例3

スピナーフラスコに無血清培地を加え、FERM BP-7325のバッチ培養を行った。

FERM BP-7325を無血清培地 (Hybridoma-SFM培地; ライフテクノロジー社製) 30 mlを入れたT-225 cm<sup>2</sup>フラスコを用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3日間静置培養した。得られたFERM BP-7325を、0.7 Lの無血清培地 (Hybridoma-SFM培地; ライフテクノロジー社製) を入れた1 L容スピナーフラスコ (柴田ハリオ社製) に、 $3 \times 10^5$ 細胞/ml接種した。

培養液のpHを7.1 ± 0.1、溶存酸素濃度を5 ± 0.2 ppmに制御しながら、攪拌速度30 rpmで攪拌培養を行った。通気はスピナーフラスコ内に設置した多孔性テフロンチューブを用い空気、酸素、二酸化炭素の混合ガスを供給した。pHの制御は空気と二酸化炭素の比率を変えること、および1 M炭酸ナトリウム溶液の供給することにより行った。また、溶存酸素濃度の制御は空気と酸素の比率を変えることにより行った。

結果を図1および図2に示す。

図1および図2に示されるとおり、細胞増殖は培養3日目までは対数増殖を示したものの、培養3日目以降は比増殖速度が低下した。生細胞濃度は4日目に最大値約 $3 \times 10^6$ 細胞/mlに達した後、急激に低下し、培養6日目には生存率が10%以下に低下したため、培養を終了した。

抗体の生産量は、培養6日間で45 mg/Lであり、バッチ培養による抗体生産速度は7.5 mg/L/日であった。

### 実施例4

スピナーフラスコに無血清培地を加え、FERM BP-7325のフェドバッチ培養を行った。

FERM BP-7325を無血清培地 (Hybridoma-SFM培地; ライフテクノロジー社製) 30 mlを入れたT-225 cm<sup>2</sup>フラスコを用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3日間静置培養した。得られたFERM BP-7325を、0.7 LのHybridoma-SFM培地を入れた1 L容スピナーフラスコ (

柴田ハリオ社製) に、 $3 \times 10^5$ 細胞/ml接種した。

通常の添加濃度より高濃度に調整された、アミノ酸 (L-アラニン0.140 g/L、L-アルギニン-塩酸0.470 g/L、L-アスパラギン-水合物0.159 g/L、L-アスパラギン酸0.168 g/L、L-シスチン二塩酸0.511 g/L、L-グルタミン酸0.420 g/L、L-グルタミン4.677 g/L、グリシン0.168 g/L、L-ヒスチジン-塩酸二水合物0.235 g/L、L-イソロイシン0.588 g/L、L-ロイシン0.588 g/L、L-リジン-塩酸0.818 g/L、L-メチオニン0.168 g/L、L-フェニルアラニン0.370 g/L、L-プロリン0.224 g/L、L-セリン0.235 g/L、L-スレオニン0.532 g/L、L-トリプトファン0.090 g/L、L-チロシン二ナトリウム二水合物0.581 g/L、L-バリン0.526 g/L)、ビタミン (d-ビオチン0.0728 mg/L、D-パントテン酸カルシウム0.0224 g/L、塩化コリン0.0224 g/L、葉酸0.0224 g/L、myo-イノシトール0.0403 g/L、ナイアシンアミド0.0224 g/L、ピリドキサル塩酸0.0224 g/L、リボフラビン0.00224 g/L、チアミン塩酸0.0224 g/L、シアノコバラミン0.0728 mg/L)、インシュリン0.2 g/L、トランスフェリン0.2 g/L、アルブミン1.6 g/Lから構成されるフィード培地を、アミノ酸の比消費速度から推測される消費量を補う目的で累積生細胞濃度が $4 \times 10^6$ 細胞/ml×日を超えた場合に、1回以内/1日の頻度で0.07 Lずつ添加するようにした。すなわち、培養3日目、5日目、6日目、7日目、8日目に、フィード培地を0.07 Lずつ添加した。また、培養3日目以降、添加直後の培養液中のグルコース濃度が約2500 mg/Lとなるように、100 g/Lグルコース溶液を適時添加した。

培養液のpHを $7.1 \pm 0.1$ 、溶存酸素濃度を $5 \pm 0.2$  ppmに制御しながら、攪拌速度30 rpmで攪拌培養を行った。通気はスピナーフラスコ内に設置した多孔性テフロンチューブを用い空気、酸素、二酸化炭素の混合ガスを供給した。pHの制御は空気と二酸化炭素の比率を変えること、および1M炭酸ナトリウム溶液を供給することにより行った。また、溶存酸素濃度の制御は空気と酸素の比率を変えることにより行った。

その結果を図1および図2に示す。

細胞増殖は培養5日目まで対数増殖を示し、培養5日目以降は比増殖速度が低下するものの、培養6日目に生細胞濃度は約 $1 \times 10^7$ 細胞/mlにまで達した。

生細胞濃度が最大値に達した後、生細胞濃度および生存率が緩やかに低下し、培養10日目に生存率が20%以下に低下したため、培養を終了した。

抗体の生産量は、培養10日間で260 mg/Lを示した。フェドバッチ培養による抗体生産速度は26.0 mg/L/日であり、同一スケールのバッチ培養と比較して、抗体生産速度が約3.5倍に向上した。

#### 実施例5

スピナーフラスコに無血清培地を加え、FERM BP-7325の連続培養を行った。なお、連続培養におけるパーフュージョンを実施するため、細胞濃縮液と培養上清の固液分離には、遠心分離器を用いた。

FERM BP-7325を無血清培地 (Hybridoma-SFM培地; ライフテクノロジー社製) 30 mlを入れたT-225 cm<sup>2</sup> フラスコを用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で3日間静置培養した。得られたFERM BP-7325を、Hybridoma-SFM培地にアミノ酸 (L-アラニン0.220 g/L、L-アルギニン-塩酸0.739 g/L、L-アスパラギン-水和物0.264 g/L、L-アスパラギン酸0.220 g/L、L-シスチン二塩酸塩0.803 g/L、L-グルタミン酸0.660 g/L、L-グルタミン7.34 g/L、グリシン0.264 g/L、L-ヒスチジン-塩酸二水和物0.370 g/L、L-イソロイシン0.924 g/L、L-ロイシン0.924 g/L、L-リジン-塩酸1.285 g/L、L-メチオニン0.264 g/L、L-フェニルアラニン0.581 g/L、L-プロリン0.352 g/L、L-セリン0.370 g/L、L-スレオニン0.836 g/L、L-トリプトファン0.141 g/L、L-チロシン二ナトリウム二水和物0.915 g/L、L-バリン0.827 g/L)、ビタミン (d-ビオチン0.114 mg/L、D-pnt pテン酸カルシウム0.0352 g/L、塩化コリン0.0352 g/L、葉酸0.0352 g/L、myo-イノシトール0.0634 g/L、ナイアンシンアミド0.0352 g/L、ピリドキサール塩酸0.0352 g

/L、リボフラビン0.00352 g/L、チアミン塩酸塩0.0352 g/L、シアノコバラミン0.114 mg/L)、インシュリン(0.3 g/L)、トランスフェリン(0.3 g/L)およびアルブミン(2.5 g/L)からなる補強培地を18% (v/v) 添加した培地を1 L入れた1 L容スピナーフラスコ(柴田ハリオ社製)に、 $3 \times 10^5$ 細胞/mlとなるように播種した。

パーフュージョンは $1 \times 10^6$ 細胞/mlに到達したところで開始した。その後、パーフュージョン速度(perfusion rate)、すなわち1日当たりの培地交換率を細胞数に応じて上昇させ、1 L/日としたところで、生細胞数の維持期間に入った。なお、固液分離装置は培養細胞用の小型連続遠心機(Lab-II:ソール社製)を使用した。

培養細胞用の小型連続遠心機の回転速度は、培養開始から生細胞濃度が $1 \times 10^7$ 細胞/mlに達するまで800 rpmとし、生細胞濃度が $1 \times 10^7$ 細胞/mlに達した後は400 rpm(18×G)とし、35日間の培養を行った。

なお、回転速度を800 rpmに設定した場合、ほぼ全ての細胞が系内に回収され、系外には細胞がほとんど含まれない培養上清のみが排出された。また、400 rpmに設定した場合、全細胞数の1/2の細胞が系外へ排出されるため、系外へ排出される細胞数と増殖した細胞数とが均衡し、細胞濃度が一定に保持された。

FERM BP-7325のパーフュージョン培養期間中の生細胞濃度および生存率を図3に示す。

図3に示されるとおり、生細胞濃度は培養開始5日目以降の30日間は $1 \times 10^7$ 細胞/mlに、生存率は培養期間を通じて90%に、それぞれ維持されていた。また、抗体の生産量は、培養35日間で2200 mg/Lを示した。パーフュージョン培養による抗体の生産速度は、62.9 mg/L/日であった。

#### 実施例6

FERM BP-7325を、インシュリンを含有しないHybridoma-SFM培地(ライフテクノロジー社製)に20 mg/Lとなるようにインシュリンを添加した培地の入ったT-75フラスコ中に接種して、継代培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して上清を除去し、細胞を回収した。回収した細胞をインシュリンを含有しないHybridoma-SFM培地の入ったT-75の静置培養フラスコ

中に接種し、3日間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して上清を除去し、細胞を回収した。

回収した細胞を、インシュリンを含有しないHybridoma-SFM培地にそれぞれ0、5、10および20 mg/Lとなるようにインシュリンを添加した培地に懸濁した後、T-フラスコへ接種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で6日間静置培養した。

培養終了後、培養液中の生細胞数と抗体濃度を測定し、抗体濃度の比生産速度を算出した。

結果を、第1表に示す。

第1表

インシュリン濃度(mg/L)	比生産速度( $\mu$ g/10 <sup>6</sup> /日)
0	13.1
5.0	9.0
10.0	7.6
20.0	7.8

第1表に示されるとおり、インシュリンを添加しなかった培地、つまりインシュリンがごく微量に残っている培地で抗体の生産性が一番高くなり、インシュリンを5 mg/L含有する培地でも抗体の生産性が高くなった。

なお、細胞増殖率はインシュリンの濃度依存的に若干低下したが、顕著な低下は認められなかった。

#### 産業上の利用可能性

本発明によれば、ラット細胞を用いた所望のポリペプチドの製造方法を提供することができる。特に、本発明の方法で得られる抗体は、ADCC活性が高く、医薬品として有用である。

## 請求の範囲

1. 血清を含有しない培地（以下、無血清培地という）に馴化したラット細胞株を無血清培地で培養し、培養物中から所望のポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造方法。
2. 無血清培地に馴化したラット細胞株が無血清培地に2ヶ月以上増殖継代できるラット細胞株である、請求の範囲1に記載の製造方法。
3. ラット細胞がミエローマ細胞またはミエローマ細胞系の雑種細胞である請求の範囲1または2に記載の方法。
4. ラット細胞がYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL 1662: 以下、YB2/0という)である請求の範囲1または2に記載の方法。
5. 細胞が所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入してなる細胞である、請求の範囲1～4のいずれかに記載の方法。
6. 培養がバッチ培養、フェドバッチ培養またはパーフュージョン培養である、請求の範囲1～5のいずれかに記載の方法。
7. 培養中に、栄養因子および生理活性物質から選ばれる少なくとも一種を培地に添加する、請求の範囲1～6のいずれかに記載の方法。
8. 栄養因子がグルコース、アミノ酸およびビタミンから選ばれる少なくとも一種である、請求の範囲7に記載の方法。
9. 生理活性物質が、インシュリン、トランスフェリンおよびアルブミンから選ばれる少なくとも一種である請求の範囲7に記載の製造方法。
10. 所望のポリペプチドが免疫機能分子である、請求の範囲1～9のいずれかに記載の方法。
11. 免疫機能分子が蛋白質またはペプチドである、請求の範囲10に記載の方法。
12. 蛋白質またはペプチドが、抗体、抗体の断片または抗体のFc領域を有する融合蛋白質である、請求の範囲11に記載の方法。
13. 抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーもしくは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスもしくは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体である、請求の範囲12に記載の方法。



14. 腫瘍関連抗原を認識する抗体が抗GD2抗体、抗GD3抗体、抗GM2抗体、抗HER2抗体、抗CD52抗体、抗MAGE抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子抗体、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗FGF8抗体、抗FGF8受容体抗体、抗インシュリン様増殖因子抗体、抗PMSA抗体、抗血管内皮細胞増殖因子抗体または抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体であり、アレルギーまたは炎症に関連する抗原を認識する抗体が抗インターロイキン6抗体、抗インターロイキン6受容体抗体、抗インターロイキン5抗体、抗インターロイキン5受容体抗体、抗インターロイキン4抗体、抗インターロイキン4受容体抗体、抗腫瘍壊死因子抗体、抗腫瘍壊死因子受容体抗体、抗CCR4抗体、抗ケモカイン抗体または抗ケモカイン受容体抗体であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗GpIIb/IIIa抗体、抗血小板由来増殖因子抗体、抗血小板由来増殖因子受容体抗体または抗血液凝固因子抗体であり、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗自己DNA抗体であり、ウイルスまたは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体が抗gp120抗体、抗CD4抗体、抗CCR4抗体または抗ペロ毒素抗体である、請求の範囲13に記載の方法。

15. 抗体が抗GD3ヒト型キメラ抗体、ヒト化抗インターロイキン5受容体 $\alpha$ 鎖抗体または抗GM2ヒト型CDR移植抗体である、請求の範囲13に記載の方法。

16. ラット細胞を、培養液中のインシュリン濃度を10mg/L以上に維持して培養した後、培養液中のインシュリン濃度を10mg/L以下に維持して培養する、請求の範囲1~15のいずれかに記載の方法。

17. 細胞密度を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように、ラット細胞を馴化培地へ接種することを特徴とする、ラット細胞の無血清培地への馴化方法。

18. ラット細胞がミエローマ細胞またはミエローマ細胞系の雑種細胞である請求の範囲17に記載の方法。

19. ラット細胞がYB2/0である請求の範囲17に記載の方法。

20. 細胞が所望のポリペプチドをコードするDNAを含有する組換え体DNAを導入された細胞である、請求の範囲17~19のいずれかに記載の方法。

21. 請求の範囲17～20のいずれかに記載の方法でラット細胞を無血清培地に馴化させた後、クローン化することを特徴とする、無血清培地に馴化したラット細胞株の製造方法。
22. 請求の範囲21に記載の方法で得られる無血清培地に馴化したラット細胞株。
23. 無血清培地に馴化したラット細胞株が無血清培地に2ヶ月以上増殖継代できるラット細胞株である、請求の範囲22に記載の細胞株。
24. 無血清培地に馴化したラット細胞株61-33γ (FERM BP-7325)。

図 1

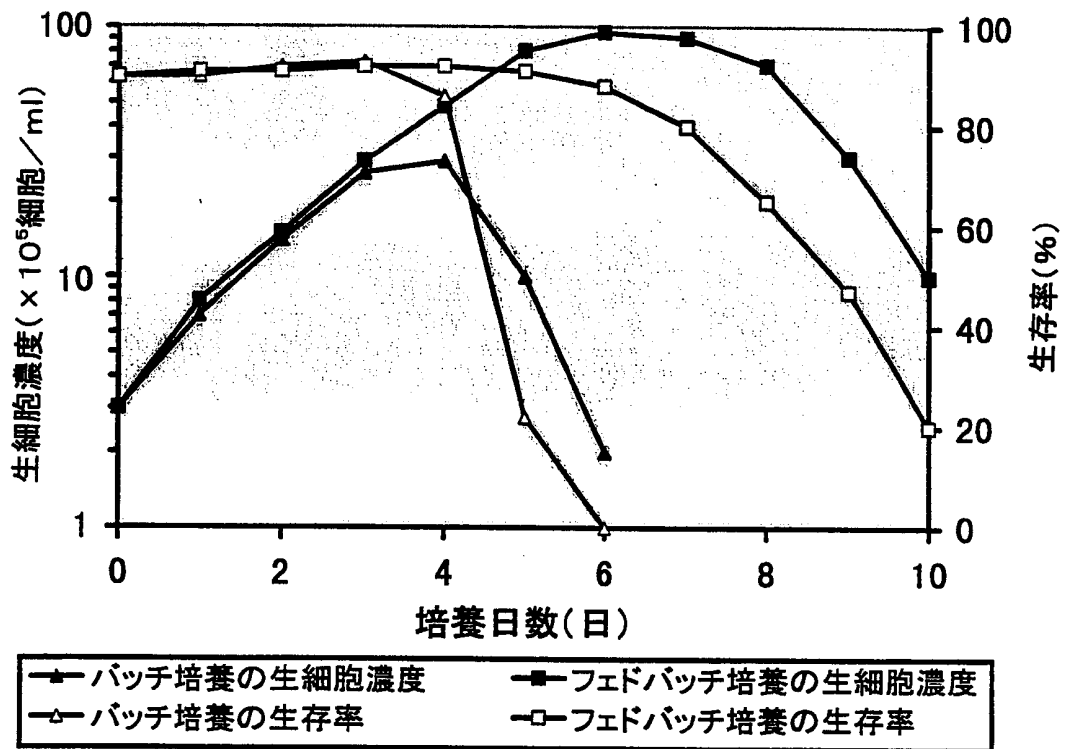


図2

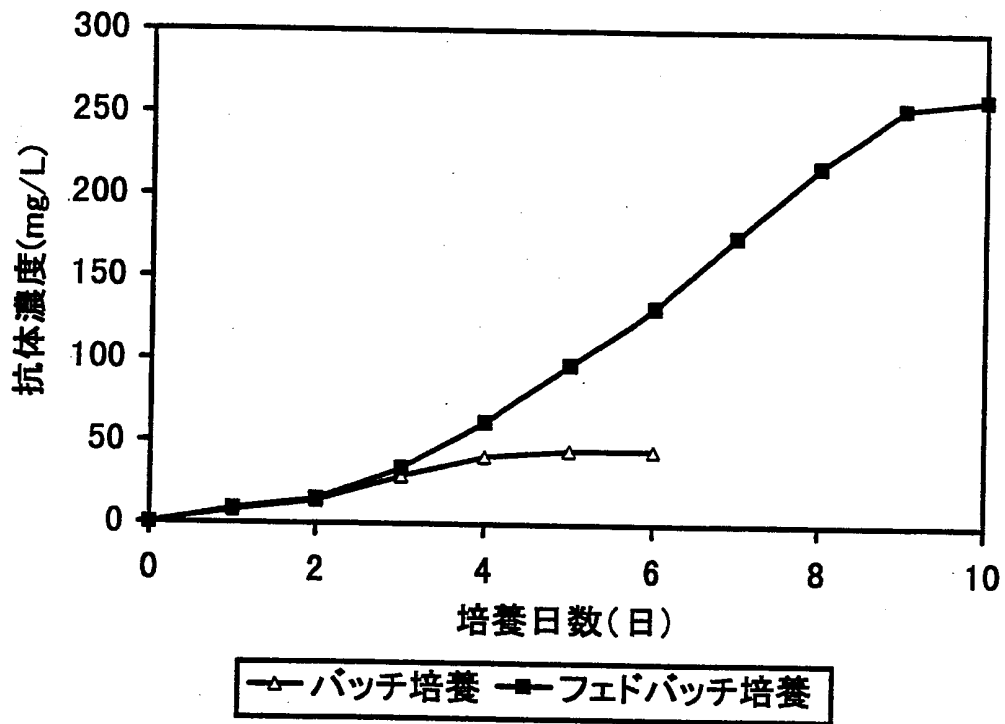
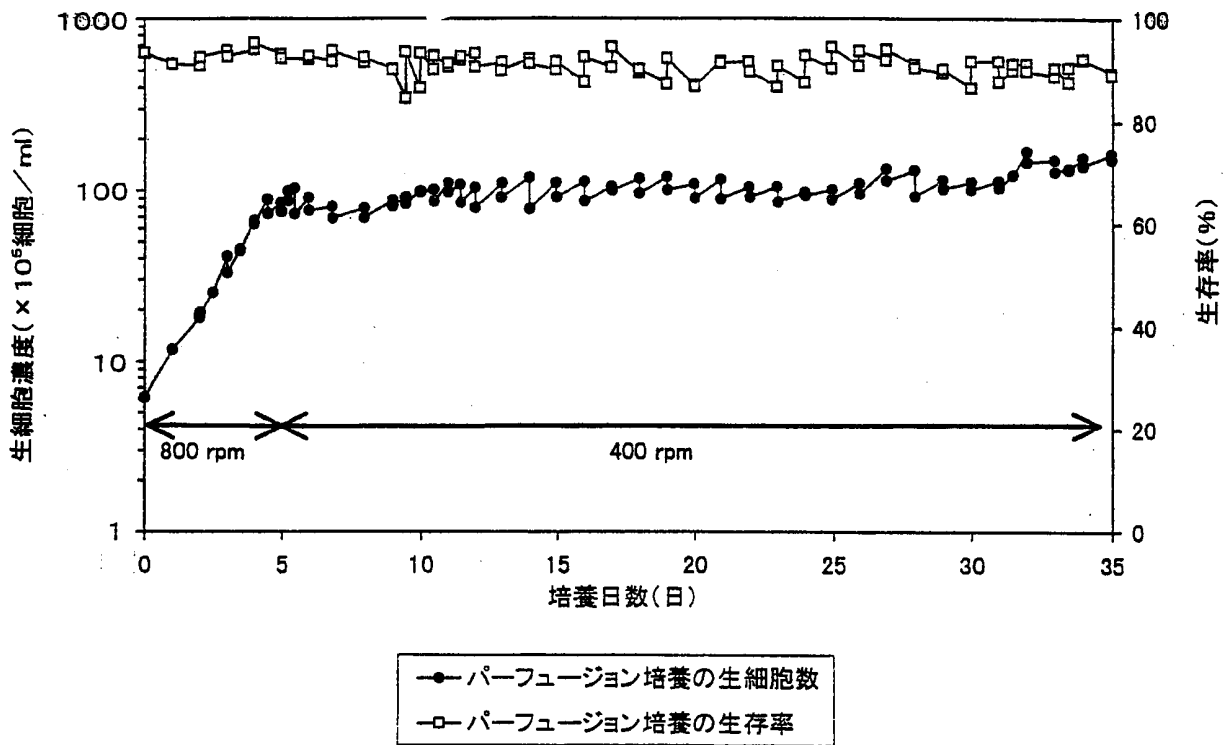


図3



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/07288

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/00, C12N5/06, 15/11 //(C12P21/00, C12R1:91)

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)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P21/00-21/08, C12N5/00-5/28

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)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 11-127890, A (Kazuo SHIMADA), 18 May, 1999 (18.05.99), esp., Column 6, lines 17 to 20; Column 11, line 44 to Column 12, line 3 (Family: none)	1-24
A	JP, 9-49836, A (Hitachi, Ltd.), 18 February, 1997 (18.02.97), esp., Column 4, lines 45 to 48; Column 8, lines 40 to 49 (Family: none)	1-24
A	WO, 97/33978, A1 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.), 18 September, 1997 (18.09.97), esp., page 14, lines 16-20 & AU, 9722600, A & EP, 891419, A1 & JP, 2000-507812, A	1-24
A	EP, 481791, A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED), 22 April, 1992 (22.04.92) & AU, 9185915, A & CA, 2053586, A & ZA, 9108249, A & JP, 6-70757, A & US, 5316938, A & US, 5633162, A	1-24

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"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)	"&" document member of the same patent family
"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 19 January, 2001 (19.01.01)	Date of mailing of the international search report 30 January, 2001 (30.01.01)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07288

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	& NZ, 240248, A  WO, 86/05807, A1 (CELLTECH LIMITED), 09 October, 1986 (09.10.86) & AU, 8656665, A & EP, 216846, A1 & GB, 2183662, A & JP, 62-502377, A & DE, 3668186, G & CA, 1319120, C & RU, 2079553, C1 & US, 5981216, A	1-24
A	STEVENSON, Geoffrey A. et al., "Rat carcinoma cells in long-term, serum-free culture provide a continuing supply of collagenase", Bioscience Reports, December, 1985, Volume 5, Number 12, pages 1071-1077	1-24
A	ATKISON, Paul R. et al., "Production of somatomedin-like activity by human adult tumor-derived, transformed, and normal cell cultures and by cultured rat hepatocytes: effects of culture conditions and of epidermal growth factor (urogastrone)", Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology, December, 1984, Volume 62, Number 12, pages 1343-1350	1-24

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12P21/00, C12N5/06, 15/11 // (C12P21/00, C12R1:91)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> C12P21/00-21/08, C12N5/00-5/28		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 11-127890, A (嶋田一夫) 18.5月.1999 (18.05.99) 特に、第6欄第17-20行、第11欄第44行-第12欄第3行を参照。 (ファミリーなし)	1-24
A	JP, 9-49836, A (株式会社日立製作所) 18.2月.1997 (18.02.97) 特に、第4欄第45-48行、第8欄第40-49行を参照。 (ファミリーなし)	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	19.01.01	国際調査報告の発送日
		30.01.01
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B 8214
日本国特許庁 (ISA/JP)	内田 俊生 印	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/33978, A1 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) 18.9月.1997 (18.09.97) 特に、第14ページ第16-20行を参照。 & AU, 9722600, A & EP, 891419, A1 & JP, 2000-507812, A	1-24
A	EP, 481791, A2 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED) 22.4月.1992 (22.04.92) & AU, 9185915, A & CA, 2053586, A & ZA, 9108249, A & JP, 6-70757, A & US, 5316938, A & US, 5633162, A & NZ, 240248, A	1-24
A	WO, 86/05807, A1 (CELLTECH LIMITED) 9.10月.1986 (09.10.86) & AU, 8656665, A & EP, 216846, A1 & GB, 2183662, A & JP, 62-502377, A & DE, 3668186, G & CA, 1319120, C & RU, 2079553, C1 & US, 5981216, A	1-24
A	STEVENSON, Geoffrey A. et al., "Rat carcinoma cells in long-term, serum-free culture provide a continuing supply of collagenase", Bioscience Reports, December, 1985, Volume 5, Number 12, pages 1071-1077	1-24
A	ATKISON, Paul R. et al., "Production of somatomedin-like activity by human adult tumor-derived, transformed, and normal cell cultures and by cultured rat hepatocytes: effects of culture conditions and of epidermal growth factor (urogastrone)", Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology, December, 1984, Volume 62, Number 12, pages 1343-1350	1-24