(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7001585号
(P7001585)

(45)発行日　令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日　令和3年12月28日(2021.12.28)

(51)国際特許分類

		FI	
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10
C12Q	*1/68 (2018.01)*	C12Q	1/68
C12N	*1/15 (2006.01)*	C12N	1/15
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21

請求項の数　38　（全102頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-514809(P2018-514809)
(86)(22)出願日　平成28年9月22日(2016.9.22)
(65)公表番号　特表2018-527009(P2018-527009A)
(43)公表日　平成30年9月20日(2018.9.20)
(86)国際出願番号　PCT/IB2016/055666
(87)国際公開番号　WO2017/051347
(87)国際公開日　平成29年3月30日(2017.3.30)
審査請求日　令和1年9月13日(2019.9.13)
(31)優先権主張番号　62/222,555
(32)優先日　平成27年9月23日(2015.9.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/396,475
(32)優先日　平成28年9月19日(2016.9.19)
最終頁に続く

(73)特許権者　593141953
ファイザー・インク
アメリカ合衆国１００１７ニューヨーク州ニューヨーク市イースト・フォーティーセカンド・ストリート２３５
(74)代理人　100133927
弁理士　四本 能尚
(74)代理人　100185960
弁理士　池田 理愛
(74)代理人　100137040
弁理士　宮澤 純子
(74)代理人　100147186
弁理士　佐藤 眞紀
(74)代理人　100174447
弁理士　龍田 美幸
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞および細胞培養の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

細胞培養の方法であって、（ｉ）細胞培養培地中に細胞を提供して細胞培養プロセスを開始するステップを含み、細胞は、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように改変されており、細胞がフェニルアラニン／チロシン経路における１つまたは複数の遺伝子の発現を改変するように改変され、改変された１つまたは複数の遺伝子が３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（ＨＰＬＡ）、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、フェニルピルベート、ＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）、ＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２の合成を触媒する酵素をコードする、方法。

【請求項２】

改変された１つまたは複数の遺伝子が、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１、Ｆａｈから選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

改変された１つまたは複数の遺伝子が、（ｉ）ＰＣＢＤ１、（ｉｉ）Ｐａｈ、（ｉｉｉ）ＱＤＰＲ、（ｉｖ）ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ、（ｖ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、（ｖｉ）ＰａｈおよびＱＤＰＲ、（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、およびＱＤＰＲ、（ｖｉｉｉ）（ｉ）～（ｖｉｉ）のいずれか、ならびにＨｐｄおよび／またはＨｇｄから選択される、請求項２に記載の方法。

【請求項４】
１つまたは複数の遺伝子が、遺伝子発現を増大または低下させるように改変されている、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
１つまたは複数の遺伝子が、遺伝子発現を増大させるように改変されている、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
（ｉｉ）３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、またはフェニルピルベートから選択される少なくとも１種の代謝産物を細胞培養培地中で濃度Ｃ１未満に維持することをさらに含み、Ｃ１が３ｍＭである、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
Ｃ１が２ｍＭ、１ｍＭ、または０．５ｍＭである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
ステップ（ｉｉ）が、前記少なくとも１種の代謝産物の濃度を測定するステップを含み、測定濃度が既定値より上であるとき、細胞培養培地中の前記少なくとも１種の代謝産物の前駆体の濃度が、細胞に提供される前駆体の量を低減することによって低下する、請求項６または７に記載の方法。
【請求項９】
前記少なくとも１種の代謝産物の前記濃度が、ＮＭＲ、ＨＰＬＣ、またはＵＰＬＣを使用して測定される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
（ａ）３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、および／またはフェニルラクテートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、フェニルアラニンの濃度が細胞培養培地中で低下し、かつ／または
（ｂ）３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートおよび／もしくは４－ヒドロキシフェニルピルベートの測定濃度が、前記既定値より上であるとき、チロシンの濃度が細胞培養培地中で低下する、
請求項８または９に記載の方法。
【請求項１１】
ステップ（ｉｉ）が、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、およびフェニルラクテートのうちの２、または３種を、細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む、請求項６から９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
（ｉｉｉ）フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、トレオニン、およびグリシンから選択される少なくとも１種のアミノ酸を、細胞培養培地中で濃度Ｃ２未満に維持するステップであって、Ｃ２が２ｍＭである、ステップをさらに含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の細胞培養の方法。
【請求項１３】
ステップｉｉｉ）が、前記少なくとも１種のアミノ酸の濃度を測定するステップを含み、測定濃度が既定値より上であるとき、細胞培養培地中の前記少なくとも１種のアミノ酸の濃度が、細胞に提供されるアミノ酸の量を低減することによって低下する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記既定値が、Ｃ２、もしくはＣ２の５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、もしくは９５％であり、または２ｍＭ、１ｍＭ、もしくは０．５ｍＭ以下である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、トレオニン、およびグリシンのそれぞれの濃度が、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される、請求項１２

から１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
細胞培養培地が、０．５ｍＭ、１ｍＭ、１．５ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、または５ｍＭより上の濃度でプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１、２、３、４、５、６、または７種を含む、請求項６から１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
細胞培養培地がチロシンを含まない、またはチロシンを含まないＨｉＰＤＯＧ培養もしくはプロセスが使用される、請求項１から１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
改変された１つまたは複数の遺伝子が、（ｉ）ＰＣＢＤ１、（ｉｉ）Ｐａｈ、（ｉｉｉ）ＱＤＰＲ、（ｉｖ）ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ、（ｖ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、（ｖｉ）ＰａｈおよびＱＤＰＲ、（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、ならびにＱＤＰＲ、（ｖｉｉｉ）（ｉ）～（ｖｉｉ）のいずれか、ならびにＨｐｄおよび／またはＨｇｄから選択される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
細胞が、
（ｉ）ＰＣＢＤ１遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｉ）Ｐａｈ遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｉｉ）Ｐａｈ遺伝子およびＰＣＢＤ１遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｖ）ＰＣＢＤ１遺伝子もしくはＰａｈ遺伝子、またはＰａｈ遺伝子およびＰＣＢＤ１遺伝子、ならびにさらにＱＤＰＲ遺伝子を含む、発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｖ）Ｈｐｄ遺伝子および／またはＨｇｄ遺伝子をさらに含む（ｉ）～（ｉｖ）の発現可能核酸またはベクターコンストラクト
を含む、請求項１７または１８に記載の方法。
【請求項２０】
ｐＨセンサーが、細胞培養液のｐＨをモニターするのに使用され、所定のｐＨ値より上への上昇に応答して、グルコースが細胞培養液にフィードされる、請求項１から１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
細胞培養がフェドバッチ培養である、請求項１から２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
細胞培養法が、増殖期および産生期を含み、ステップ（ｉｉ）および／またはステップ（ｉｉｉ）が増殖期中に適用される、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減する１種または複数の改変遺伝子を含む細胞であって、改変された１種または複数の遺伝子がフェニルアラニン／チロシン経路における、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（ＨＰＬＡ）、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、フェニルピルベート、ＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）、ＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２の合成を触媒する酵素をコードする、細胞。
【請求項２４】
改変により遺伝子発現が増大または低下するＰａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１およびＦａｈから選択される１種または複数の改変遺伝子を含む、請求項２３に記載の細胞。
【請求項２５】
Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、およびＰａｈから選択される１種または複数の改変遺伝子を含み、改変により、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、およびＰａｈ

の１つもしくは複数の遺伝子発現が増大し、かつ／または細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルが低減する、請求項２３または２４に記載の細胞。
【請求項２６】
１種または複数の改変遺伝子が、
（ｉ）Ｐａｈであり、
（ｉｉ）ＰＣＢＤ１であり、
（ｉｉｉ）ＰＣＢＤ１および／もしくはＱＤＰＲであり、
（ｉｖ）ＨｐｄおよびＨｇｄの１種もしくは複数であり、
（ｖ）Ｐａｈおよび／もしくはＰＣＢＤ１、ならびにＨｐｄおよびＨｇｄの１種もしくは複数であり、
（ｖｉ）ＰａｈおよびＰＣＢＤ１、またはＰａｈ、ＰＣＢＤ１、およびＱＤＰＲであり、
（ｖｉｉ）Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ、またはＰａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、およびＱＤＰＲである、
請求項２３から２５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項２７】
細胞が、
（ｉ）ＰＣＢＤ１遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｉ）Ｐａｈ遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｉｉ）Ｐａｈ遺伝子およびＰＣＢＤ１遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｖ）ＰＣＢＤ１遺伝子もしくはＰａｈ遺伝子、またはＰａｈ遺伝子およびＰＣＢＤ１遺伝子、ならびにＱＤＰＲ遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、または
（ｖ）ＨＰＤ遺伝子および／またはＨＧＤ遺伝子をさらに含む（ｉ）～（ｉｖ）の発現可能核酸またはベクターコンストラクト
を含む、請求項２３から２６のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項２８】
細胞がＣＨＯ細胞である、請求項１から２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
細胞がＣＨＯ細胞である、請求項２３から２７のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３０】
細胞が、組換えタンパク質または異種組換えタンパク質を発現する、請求項１から２２および２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
細胞が、組換えタンパク質または異種組換えタンパク質を発現する、請求項２３から２７および２９のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３２】
細胞によって産生される組換えタンパク質を得るステップおよび精製するステップをさらに含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
細胞増殖および／または産生性が、対照培養と比較して増大し、前記対照培養が、非改変細胞を含むことを除いて同一である、請求項１から２２、２８、３０および３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
細胞増殖および／または産生性が、対照培養と比較して増大し、前記対照培養が、非改変細胞を含むことを除いて同一である、請求項２３から２７、２９および３１のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３５】
細胞増殖が、最大生存細胞密度によって判定され、対照培養と比較して少なくとも５％増大する、請求項３３に記載の方法。

【請求項３６】
産生性が、発現される組換えタンパク質の力価によって判定され、対照培養と比較して少なくとも５％増大する、請求項３３に記載の方法。
【請求項３７】
細胞培養の最大生存細胞密度が、１×１０^{6}細胞／ｍＬ、５×１０^{6}細胞／ｍＬ、１×１０^{7}細胞／ｍＬ、５×１０^{7}細胞／ｍＬ、１×１０^{8}細胞／ｍＬ、または５×１０^{8}細胞／ｍＬ超である、請求項１から２２、２８、３０、３２、３３、３５および３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
細胞培養の最大生存細胞密度が、１×１０^{6}細胞／ｍＬ、５×１０^{6}細胞／ｍＬ、１×１０^{7}細胞／ｍＬ、５×１０^{7}細胞／ｍＬ、１×１０^{8}細胞／ｍＬ、または５×１０^{8}細胞／ｍＬ超である、請求項２３から２７、２９、３１および３４のいずれか一項に記載の細胞。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように細胞が改変される細胞培養の方法に関する。本発明はまた、特に、高細胞密度での哺乳動物細胞のフェドバッチ培養における細胞増殖および産生性を改善するための細胞培養の方法に関する。本発明はさらに、細胞培養において細胞増殖および／または産生性が改善された細胞を産生する方法、ならびにこのような方法によって得られる、または得ることが可能な細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
タンパク質は、診断剤および治療剤としてますます重要となっている。ほとんどの場合、商業的用途のタンパク質は、著しく高レベルの特定の目的のタンパク質を産生するように操作および／または選択された細胞から細胞培養において産生される。細胞培養条件の最適化は、タンパク質の商業生産の成功に重要である。哺乳動物細胞の代謝は、非効率であり、それは、細胞に大量の栄養分を消費させ、栄養分のうちの相当量を副生物に変換させる。副生物は、培養液中に放出され、培養の過程にわたって蓄積する。培養における細胞の従来のインヒビターであることが公知のラクテートおよびアンモニアは、培養液中で高レベルに、かつある特定の濃度を超えて蓄積する細胞代謝の２種類の主要な副生物であり、これらは、培養液中の細胞の増殖および産生性を阻害し始める。細胞培養培地中のラクテートおよびアンモニアの量を低減することを目的とした細胞培養法が開発されており、哺乳動物細胞の増殖および産生性を増大させることができる。しかし、細胞増殖は、ラクテートおよびアンモニアの濃度が低く保たれているときでさえ依然として減速し、それにより細胞の最大細胞密度および産生性を制限する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
したがって、タンパク質の最適な産生のための改善された細胞培養システムの開発の必要性が存在する。特に、生存細胞密度および／または力価を増大させる、特に、増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように改変された細胞のための細胞培養法の必要性が存在する。
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本発明は、（ｉ）細胞培養培地中に細胞を提供して細胞培養プロセスを開始するステップを含み、細胞は、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように改変されている、細胞培養の方法に関する。
【０００５】

本発明はまた、細胞培養において細胞増殖および／または産生性が改善された細胞を産生する方法であって、
（ｉ）細胞増殖および／または産生性インヒビターである１種または複数の細胞代謝産物を同定するステップと、
（ｉｉ）細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成をもたらす１つまたは複数の細胞代謝経路を同定するステップと、
（ｉｉｉ）細胞増殖および／もしくは産生性インヒビター、またはその代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路における１つもしくは複数の遺伝子、ならびに／またはそれから分岐する、もしくは直接的に分岐する代謝経路における酵素をコードする１つもしくは複数の遺伝子を同定するステップと、
（ｉｖ）細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように１つまたは複数の遺伝子の発現を改変するステップと
を含む、方法に関する。

【０００６】

本発明はさらに、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減する１つまたは複数の改変遺伝子を含む細胞であって、特に、１つまたは複数の改変遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、およびＰａｈから選択され、改変により、遺伝子発現が増大または低下する、細胞、ならびに組換えタンパク質またはポリペプチドの発現のための上記細胞の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【０００７】

【図１Ａ】従来のフェドバッチプロセスにおけるＣＨＯ細胞の増殖特性および代謝プロファイルを示す図である。報告されたデータは、生存細胞密度（黒四角）、培養ラクテートレベル（黒三角）、およびアンモニアレベル（黒菱形）を含む。回収力価（ｈａｒｖｅｓｔ　ｔｉｔｅｒ）（１２日目のタンパク質濃度）も報告されている。

【図１Ｂ】ＨｉＰＤＯＧプロセスにおけるＣＨＯ細胞の増殖特性および代謝プロファイルを示す図である。報告されたデータは、生存細胞密度（黒四角）、培養ラクテートレベル（黒三角）、およびアンモニアレベル（黒菱形）を含む。回収力価（１２日目のタンパク質濃度）も報告されている。

【図２】漸増濃度の２－ヒドロキシ酪酸（図２Ａ）、ホモシステイン（図２Ｂ）、またはインドールカルボン酸（図２Ｃ）に曝露された０日目、３日目、および６日目にＧＳ－ＣＨＯ細胞（以下ＧＳ－ＣＨＯ、細胞株Ａ）の生存細胞密度を示すグラフである。ＧＳ－ＣＨＯ細胞を低生存細胞密度で培地Ａに接種し、報告された濃度のインヒビターで個別に処置した。細胞の増殖に対するインヒビターの効果を、６日間モニターした。

【図３】ＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度に対する漸増濃度の２種の代謝産物、４－ヒドロキシフェニルピルベート（図３Ａ）およびフェニルラクテート（図３Ｂ）の効果を示す図である。ＧＳ－ＣＨＯ細胞を低生存細胞密度で培地Ａに接種し、報告された濃度のインヒビターで個別に処置した。

【図４】ＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度に対する漸増濃度の４種の代謝産物、インドールラクテート（図４Ａ）、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図４Ｂ）、ホルメートナトリウム（図５Ａ）、およびイソバレレート（図５Ｂ）の効果を示す図である。ＧＳ－ＣＨＯ細胞を低生存細胞密度で培地Ａに接種し、報告された濃度のインヒビターで個別に処置した。

【図５】ＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度に対する漸増濃度の４種の代謝産物、インドールラクテート（図４Ａ）、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図４Ｂ）、ホルメートナトリウム（図５Ａ）、およびイソバレレート（図５Ｂ）の効果を示す図である。ＧＳ－ＣＨＯ細胞を低生存細胞密度で培地Ａに接種し、報告された濃度のインヒビターで個別に処置した。

【図６】細胞が代謝産物の非存在下で培養されている対照と比較したＧＳ－ＣＨＯ細胞の

生存細胞密度に対するＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度に対する４種の代謝産物（４－ヒドロキシフェニルピルベート、インドールラクテート、フェニルラクテート、および３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート）の効果を示す図である。ＧＳ－ＣＨＯ細胞を低生存細胞密度で培地Ａに接種し、新鮮培地単独、またはＨｉＰＤＯＧ培養の７日目で検出された濃度で組み合わされた上述した４種の代謝産物を含む新鮮培地で処置した（表４を参照）。細胞の増殖に対するインヒビターの効果を６日間モニターした。

【図７Ａ】「ＨｉＰＤＯＧ」プロセス（黒四角）および「低ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ」（黒菱形）プロセス中のＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度を示す図である。

【図７Ｂ】「ＨｉＰＤＯＧ」プロセス（黒四角）および「低ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ」（黒菱形）プロセスにおける異なる日での培養力価（ＩｇＧ）を示す図である。

【図８】「アミノ酸制限ＨｉＰＤＯＧプロセス「低ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ」（黒四角）および「ＨｉＰＤＯＧ」プロセス（黒菱形）における４種のアミノ酸のアミノ酸濃度を示す図である。４種のアミノ酸は、チロシン（図７Ａ）、トリプトファン（図８Ｂ）、フェニルアラニン（図９Ａ）、およびメチオニン（図９Ｂ）を含む。

【図９】「アミノ酸制限ＨｉＰＤＯＧプロセス「低ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ」（黒四角）および「ＨｉＰＤＯＧ」プロセス（黒菱形）における４種のアミノ酸のアミノ酸濃度を示す図である。４種のアミノ酸は、チロシン（図７Ａ）、トリプトファン（図８Ｂ）、フェニルアラニン（図９Ａ）、およびメチオニン（図９Ｂ）を含む。

【図１０Ａ】実施例５（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ（黒三角））に開示された異なる条件を使用する細胞培養プロセス中のＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度を示す図である。

【図１０Ｂ】ＧＳ－ＣＨＯ細胞および実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の異なる細胞培養条件を使用する細胞培養プロセスにおける異なる日の培養力価（ＩｇＧ）を示す図である。

【図１１】実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、（ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養中のチロシン（図１１Ａ）、メチオニン（図１１Ｂ）、フェニルアラニン（図１２Ａ）、トリプトファン（図１２Ｂ）、ロイシン（図１３Ａ）、トレオニン（図１３Ｂ）、グリシン（図１４Ａ）、およびセリン（図１４Ｂ）の濃度を示す図である。

【図１２】実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、（ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養中のチロシン（図１１Ａ）、メチオニン（図１１Ｂ）、フェニルアラニン（図１２Ａ）、トリプトファン（図１２Ｂ）、ロイシン（図１３Ａ）、トレオニン（図１３Ｂ）、グリシン（図１４Ａ）、およびセリン（図１４Ｂ）の濃度を示す図である。

【図１３】実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、（ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養中のチロシン（図１１Ａ）、メチオニン（図１１Ｂ）、フェニルアラニン（図１２Ａ）、トリプトファン（図１２Ｂ）、ロイシン（図１３Ａ）、トレオニン（図１３Ｂ）、グリシン（図１４Ａ）、およびセリン（図１４Ｂ）の濃度を示す図である。

【図１４】実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、（ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養中のチロシン（図１１Ａ）、メチオニン（図１１Ｂ）、フェニルアラニン（図１２Ａ）、トリプトファン（図１２Ｂ）、ロイシン（図１３Ａ）、トレオニン（図１３Ｂ）、グリシン（図１４Ａ）、およびセリン（図１４Ｂ）の濃度を示す図である。

【図１５】実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、（ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４Ａ

Ａ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養の５日目、７日目、および９日目における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図１５Ａ）、イソバレレート（図１５Ｂ）、およびインドール－３－ラクテート（図１６）の濃度を示す図である。

【図１６】実施例５（（ＨｉＰＤＯＧ１（黒四角）、（ＨｉＰＤＯＧ２（黒丸）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養の５日目、７日目、および９日目における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図１５Ａ）、イソバレレート（図１５Ｂ）、およびインドール－３－ラクテート（図１６）の濃度を示す図である。

【図１７】実施例５（（低４ＡＡ＋ＨｉＰＤＯＧ（黒菱形）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用する細胞培養プロセス中のＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度および培養力価（ＩｇＧ）を示す図である。

【図１８】実施例６（（ＨｉＰＤＯＧ（黒四角）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用する細胞培養プロセス中のＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度および培養力価（ＩｇＧ）を示す図である。

【図１９】実施例６（（ＨｉＰＤＯＧ（黒四角）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養の５日目、７日目、および１０日目における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図１９Ａ）、イソバレレート（図１９Ｂ）、およびインドール－３－ラクテート（図２０）の濃度を示す図である。

【図２０】実施例６（（ＨｉＰＤＯＧ（黒四角）、低８ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒三角））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養の５日目、７日目、および１０日目における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図１９Ａ）、イソバレレート（図１９Ｂ）、およびインドール－３－ラクテート（図２０）の濃度を示す図である。

【図２１】実施例６（（ＨｉＰＤＯＧ（黒四角）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形））に開示の異なる条件を使用する細胞培養プロセス中のＧＳ－ＣＨＯ細胞の生存細胞密度および培養力価（ＩｇＧ）を示す図である。

【図２２】実施例６（（ＨｉｐＤＯＧ（黒四角）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養の５日目および７日目における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図２２Ａ）、イソバレレート（図２２Ｂ）、およびインドール－３－ラクテート（図２３）の濃度を示す図である。

【図２３】実施例６（（ＨｉｐＤＯＧ（黒四角）、低４ＡＡ＋ＨｉｐＤＯＧ（黒菱形））に開示の条件を使用するＧＳ－ＣＨＯ細胞の細胞培養の５日目および７日目における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（図２２Ａ）、イソバレレート（図２２Ｂ）、およびインドール－３－ラクテート（図２３）の濃度を示す図である。

【図２４】経路およびその分岐に関与する代謝酵素を含むフェニルアラニン／チロシンおよびロイシン経路をそれぞれ示す図であり、サイクル数またはC_T（閾値サイクル）としての経路の遺伝子について示された転写量のＲＴ　ｑＰＣＲ尺度も表にされている。代謝関連遺伝子のC_T値が表にされ、十分特徴付けられたハウスキーピング遺伝子、ベータアクチンのC_T値と比較されている。標的遺伝子のC_TとベータアクチンのC_Tとの差異がΔC_Tとして表にされている。高いΔC_T値は、低遺伝子発現レベルを示す。

【図２５】経路およびその分岐に関与する代謝酵素を含むフェニルアラニン／チロシンおよびロイシン経路をそれぞれ示す図であり、サイクル数またはC_T（閾値サイクル）としての経路の遺伝子について示された転写量のＲＴ　ｑＰＣＲ尺度も表にされている。代謝関連遺伝子のC_T値が表にされ、十分特徴付けられたハウスキーピング遺伝子、ベータアクチンのC_T値と比較されている。標的遺伝子のC_TとベータアクチンのC_Tとの差異がΔC_Tとして表にされている。高いΔC_T値は、低遺伝子発現レベルを示す。

【図２６】ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用したフェニルアラニン／チロシン経路遺伝子の遺伝子発現分析を示す図である。（Ａ）ＣＨＯ細胞株ＡおよびＣＨＯ親細胞株内のフェニルアラニン／チロシン経路遺伝子の発現レベル。データは、目的の遺伝子転写量とＢ－アクチン転写量との比の対数としてプロットされている。より高い値は、遺伝子のより高い

発現を示す。（Ｂ）フェニルアラニン／チロシン異化経路の概略図。経路のフェニルピルベート、フェニルラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、および３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートは、経路の阻害性中間体および副生物である。薄灰色色調における酵素は、非常に低レベルで発現されるものである。

【図２７】ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用するテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）生合成、および再生経路遺伝子の遺伝子発現分析を示す図である。（Ａ）テトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）生合成および再生経路の略図である。ＧＴＰは、３種の酵素ＧＣＨ１、ＰＴＳ、およびＳＰＲによって触媒されるＢＨ４の生合成のための炭素供給源である。ＢＨ４再生経路は、２種の酵素、ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲからなり、これらは、ＢＨ４－４ａ－カルビノールアミンからＢＨ４を再生し、ＢＨ４は、ＰＡＨによって触媒される反応の産物である。（Ｂ）マウスＰＡＨを過剰発現するＣＨＯ細胞株Ａ、ＣＨＯ細胞株Ｂ、またはＣＨＯ親細胞株の細胞プール内のテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）生合成および再生経路遺伝子の発現レベル。データは、目的の遺伝子転写量とＢ－アクチン転写量との比の対数としてプロットされている。より高い値は、遺伝子のより高い発現を示す。

【図２８】マウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１を発現するトランスジェニックＣＨＯ細胞株を生成するのに使用されるプラスミドを示す図である。（Ａ）マウスＰＡＨの発現ベクターの発現ベクターのプラスミドマップ。（Ｂ）マウスＨＰＤの発現ベクターのプラスミドマップ。（Ｃ）マウスＨＧＤの発現ベクターのプラスミドマップ。（Ｄ）マウスＰＣＢＤ１の発現ベクターのプラスミドマップ。

【図２９】２つの後続のチロシンフリー細胞培養継代における４倍トランスフェクト（４ｘ－ｔｆｘｎ）または陰性４倍のトランスフェクション対照（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ）細胞プールの増殖動態を示す図である。初代の長さは３日であり、第２の継代の長さは５日であった。（Ａ）ＣＨＯ細胞株Ｂに由来する細胞プール。（Ｂ）ＣＨＯ親細胞株に由来する細胞プール。黒三角：４ｘ－ｔｆｘｎ、黒四角：４ｘ－対照－ｔｆｘｎ。

【図３０】元のＨｉＰＤＯＧフェドバッチプロセス（チロシンを補充した）における陰性４倍トランスフェクション対照（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ）細胞プールと比較したＨｉＰＤＯＧフェドバッチプロセスにおける細胞株Ｂ由来４倍トランスフェクト（４ｘ－ｔｆｘｎ）細胞プールの性能の比較を示す図である。（Ａ）生存細胞密度、（Ｂ）生存能、（Ｃ）力価（Ｄ）３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートのレベル黒三角：４ｘ－ｔｆｘｎ、黒四角：４ｘ－対照－ｔｆｘｎ．

【図３１】ＣＨＯ細胞株Ａの増殖に対する２－メチルブチレート（Ａ）またはイソブチレート（Ｂ）の異なる濃度の効果を示す図である。

【図３２】ＣＨＯ細胞株Ｃのフェドバッチ培養において低レベルでイソロイシン（Ａ）およびバリン（Ｃ）の濃度を制御することによって２－メチルブチレート（Ｂ）およびイソブチレート（Ｄ）の蓄積を抑制することを示す図である。黒三角：低ＡＡ、黒菱形：低ＡＡ、黒四角：対照

【図３３】ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用したロイシン経路遺伝子の遺伝子発現分析を示す図である。（Ａ）ＣＨＯ細胞株ＡおよびＣＨＯ親細胞株内のロイシン経路遺伝子の発現レベル。データは、目的の遺伝子の転写量とＢ－アクチン転写量との比としてプロットされている。より高い値は、遺伝子のより高い発現を示す。（Ｂ）ロイシン、イソロイシン、およびバリン異化経路の概略図。イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレートは、それぞれロイシン、イソロイシン、およびバリン異化経路の増殖阻害性副生物である。ＢＣＡＴ１（ＢＣＡＴ２）およびＢＣＫＨＤＡ／ＢＣＫＨＤＢは、３種すべての異化経路によって共有される。ＢＣＡＴ１（および／もしくはＢＣＡＴ２）またはＢＣＫＤＨＡ／ＢＣＫＤＨＢの酵素活性のノックダウンもしくはノックアウトまたは阻害、例えば、低分子阻害剤分子を用いた阻害は、３種の阻害性代謝産物（イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレート）の生合成を同時的に低減するであろう。

【図３４】ＢＣＡＴ１に対する５種のｍｉＲＮＡで独立に一過性にトランスフェクトされたＣＨＯ細胞内のＢＣＡＴ１およびＢ－アクチンのレベルをプローブするためのウェスタンブロットを示す図である。（Ａ）非トランスフェクトもしくはトランスフェクトＣＨＯ

親細胞株内のＢ－アクチンタンパク質レベル、（Ｂ）非トランスフェクトもしくはトランスフェクトＣＨＯ親細胞株内のＢＣＡＴ１タンパク質レベル、（Ｃ）非トランスフェクトもしくはトランスフェクトＣＨＯ細胞株Ｂ内のＢ－アクチンタンパク質レベル、（Ｄ）非トランスフェクトもしくはトランスフェクトＣＨＯ細胞Ｂ内のＢＣＡＴ１タンパク質レベル。すべてのゲルについてのゲル装填量の詳細は以下の通りである。レーン１：タンパク質ラダー、レーン２：非トランスフェクト細胞、レーン３：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ１．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン４：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ２．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン５：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ３．１ａをトランスフェクトした細胞：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ３．１ａ、レーン６：ｍｉＲＮＡ ＢＣＡＴ１ ｓｅｑ４．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン７：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ５．１ａをトランスフェクトした細胞：レーン８：陰性対照ｍｉＲＮＡをトランスフェクトした細胞。タンパク質サイズ：Ｂ－アクチンについて４２ｋＤおよびＢＣＡＴ１について４３ｋＤ。

【図３５】ＢＣＡＴ１に対する５種のｍｉＲＮＡを用いた独立したトランスフェクションから生成される安定ＣＨＯ細胞プール内のＢＣＡＴ１およびＢ－アクチンをプローブするためのウェスタンブロットを示す図である。（Ａ）ＣＨＯ親細胞株内へのトランスフェクションから生成される安定プール内のＢ－アクチンタンパク質レベル、（Ｂ）ＣＨＯ親細胞株内へのトランスフェクションから生成される安定プール内のＢＣＡＴ１タンパク質レベル。すべてのゲルについてのゲル装填量の詳細は以下の通りである。レーン１：タンパク質ラダー、レーン２：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ１．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン３：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ２．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン４：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ３．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン５：ｍｉＲＮＡ ＢＣＡＴ１ ｓｅｑ４．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン６：ＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ５．１ａをトランスフェクトした細胞、レーン７：陰性対照ｍｉＲＮＡをトランスフェクトした細胞。タンパク質サイズ：Ｂ－アクチンについて４２ｋＤおよびＢＣＡＴ１について４３ｋＤ。

【発明を実施するための形態】

【０００８】

本発明は、細胞培養のための方法および培地を提供する。本発明は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート、フェニルピルベート、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、インドールカルボン酸（インドール－３－カルボキシレート）、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、およびホルメートから選択される少なくとも１種の代謝産物、および／またはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシンから選択される少なくとも１種のアミノ酸の濃度が細胞培養培地中で、低レベルで維持される細胞培養法を提供する。

【０００９】

本発明者らは、細胞培養、特に、高密度細胞培養、例えば、高い量の組換えタンパク質を産生する目的のフェドバッチ細胞培養などにおいて、細胞の増殖が、代謝産物、例えば、細胞培養培地中で３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート、フェニルピルベート、インドールラクテート、インドールカルボン酸、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、およびホルメートなどの蓄積によって阻害されることが予想外に発見された。これらの代謝産物の阻害効果は、これらが細胞増殖を阻害するレベル未満で細胞培養培地中のこれらの濃度を維持することによって限定することができる。これらの代謝産物の阻害効果は、特に、１つまたは複数の改変遺伝子がＢｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、およびＱＤＰＲから選択される場合、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルが低減するように細胞内の１つまたは複数の遺伝子を改変することによっ

ても限定することができる。
【００１０】
低レベルで細胞培養培地中の代謝産物濃度を制御するステップを含む方法
第１の態様では、本発明は、細胞培養の方法であって、（ｉ）細胞培養培地中に細胞を提供して細胞培養プロセスを開始するステップを含み、細胞が細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように改変される。
【００１１】
一部の実施形態では、細胞は、１つまたは複数の遺伝子の発現を改変するように改変され、一実施形態では、遺伝子は、増殖インヒビターもしくはその代謝中間体、または増殖インヒビターもしくはその代謝中間体の代謝産物、または代謝中間体の代謝産物を合成する１つまたは複数の細胞代謝経路にある。
【００１２】
「代謝中間体」は、細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成に要求される前駆体または代謝産物であり、これらとしては、１つまたは複数の細胞代謝経路の酵素の反応物、産物、およびコファクター分子があると理解されている。関連したコファクターとしては、例えば、ＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）、またはＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２がある。代謝中間体は、細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路として同じ経路内で合成することができ、あるいは分岐経路内で合成することができる。「代謝産物」は、１つまたは複数の細胞代謝経路の酵素によって触媒される代謝反応の産物を含み、これらとしては前記酵素の反応物、産物、およびコファクター分子、例えば、ＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）、またはＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２などがあると理解されている。代謝産物は、細胞増殖および／もしく産生性インヒビター、またはその中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路と同じ経路内で生じ得、あるいは分岐経路内で合成され得る。分岐経路は、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターまたはその中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路内で１つまたは複数の遺伝子の上方または下方に位置したノードで生じ得る。
【００１３】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（ＨＰＬＡ）、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、フェニルピルベート、インドール－３－カルボキシレート（インドールカルボン酸）、インドール－３－ラクテート（インドールラクテート）、２－ヒドロキシ酪酸、ホモシステイン、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、ブチレート、ホルメート、もしくはその代謝中間体、または前記分子の代謝産物もしくはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物の合成を触媒する酵素をコードする。
【００１４】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は４－ヒドロキシフェニルピルベートもしくはフェニルラクテート（ＰＬＡ）、その代謝産物、またはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物の合成を触媒する酵素をコードする。
【００１５】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、もしくはブチレート、その代謝産物、またはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物の合成を触媒する酵素をコードする
【００１６】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｐａｈ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１、Ｆａｈから選択される。
【００１７】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｈ

ｐｄ、Ｈｇｄ、およびＰａｈから選択され；一実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、（ｉ）ＰＣＢＤ１、（ｉｉ）Ｐａｈ、（ｉｉｉ）ＱＤＰＲ、（ｉｖ）ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ、（ｖ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、（ｖｉ）ＰａｈおよびＱＤＰＲ、（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、ならびにＱＤＰＲ、（ｖｉｉｉ）（ｉ）～（ｖｉｉ）ならびにＨｐｄおよび／またはＨｇｄのいずれかから選択される。

【００１８】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ｂｃｋｄｈａ／ｂ、Ｄｂｔ／Ｄｌｄ、Ｉｖｄ、Ａｃａｄｍ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ａｕｈ、Ｈｍｇｃｌ、Ｆａｓｎから選択される。

【００１９】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄから選択される。

【００２０】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は；

（ｉ）Ａｕｈ、

（ｉｉ）Ｂｃａｔ１、

（ｉｉｉ）Ｂｃａｔ２

（ｉｖ）Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄの１つまたは複数、

（ｖ）Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２および／またはＡｕｈ、ならびに１つまたは複数のＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄ、

（ｖｉ）Ｐａｈ、

（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１、

（ｖｉｉｉ）ＰＣＢＤ１および／またはＱＤＰＲ

（ｉｘ）ＨｐｄおよびＨｇｄの１つまたは複数、

（ｘ）Ｐａｈおよび／またはＰＣＢＤ１、ならびに１つまたは複数のＨｐｄおよびＨｇｄ

（ｘｉ）ＰａｈおよびＰＣＢＤ１、ならびに任意選択によりＱＤＰＲ

（ｘｉｉ）Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲ

（ｘｉｉｉ）Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、ならびにＩｖｄ、または

（ｉｘ）Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲ。

【００２１】

一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子が、遺伝子発現を増大または低下させるように改変されている。

【００２２】

一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子が、遺伝子発現を増大させるように改変されており、一実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、ＰａｈおよびまたはＰＣＢＤ１および／もしくはＱＤＰＲおよび／もしくはＨｐｄおよび／もしくはＨｇｄである。

【００２３】

一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、遺伝子発現を低下させるように改変されており、一実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２である。

【００２４】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、（ｉ）ＰＣＢＤ１、（ｉｉ）Ｐａｈ、（ｉｉｉ）ＱＤＰＲ、（ｉｖ）ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ、（ｖ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、（ｖｉ）ＰａｈおよびＱＤＰＲ、（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、ならびにＱＤＰＲ、（ｖｉｉｉ）（ｉ）～（ｖｉｉ）、ならびにＨｐｄおよび／もしくはＨｇｄのいずれかから選択される。

【００２５】

一部の実施形態では、細胞は、

（ｉ）ＰＣＢＤ１遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｉ）Ｐａｈ遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｉｉ）Ｐａｈ遺伝子およびＰＣＢＤ１遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｉｖ）ＰＣＢＤ１遺伝子もしくはＰａｈ遺伝子またはＰａｈ遺伝子およびＰＣＢＤ１遺伝子、ならびにさらにＱＤＰＲ遺伝子を含む発現可能核酸またはベクターコンストラクト、
（ｖ）Ｈｐｄ遺伝子および／もしくはＨｇｄ遺伝子をさらに含む（ｉ）～（ｉｖ）の発現可能核酸またはベクターコンストラクト
を含む。

【００２６】

一部の実施形態では、本方法は、
（ｉｉ）細胞培養培地中で濃度Ｃ１未満の３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、インドールカルボン酸（インドール－３－カルボキシレート）、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、およびホルメートから選択される少なくとも１種の代謝産物を維持するステップであって、Ｃ１が３ｍＭである、ステップ
をさらに含む。

【００２７】

一部の実施形態では、Ｃ１は、２．５ｍＭ、２ｍＭ、１．５ｍＭ、１ｍＭ、０．９ｍＭ、０．８ｍＭ、０．７ｍＭ、０．６ｍＭ、０．５ｍＭ、０．４ｍＭ、０．３ｍＭ、０．２ｍＭ、または０．１ｍＭである。一部の実施形態では、Ｃ１は、１ｍＭである。一部の実施形態では、Ｃ１は、０．５ｍＭである。

【００２８】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、前記少なくとも１種の代謝産物の濃度を測定するステップを含む。

【００２９】

一部の実施形態では、測定濃度が既定値より上であるとき、細胞培養培地中の前記少なくとも１種の代謝産物の前駆体の濃度は、細胞に提供される前駆体の量を低減することによって低下する。前記既定値は、前記前駆体の濃度が代謝産物の濃度の低下が上記Ｃ１から上昇することを防止するように選択される。既定値は、Ｃ１に等しくあり得、またはＣ１のパーセンテージであり得る。一部の実施形態では、パーセンテージは、Ｃ１の５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、または９５％である。一部の実施形態では、パーセンテージは、Ｃ１の８０％である。

【００３０】

一部の実施形態では、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、および／もしくはフェニルラクテートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、フェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。

【００３１】

一部の実施形態では、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートおよび／もしくは４－ヒドロキシフェニルピルベートの測定濃度は、前記既定値より上であるとき、チロシンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。

【００３２】

一部の実施形態では、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、および／もしくはフェニルラクテートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、チロシンおよびフェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。

【００３３】

一部の実施形態では、インドールラクテートおよび／もしくはインドールカルボン酸の測定濃度が前記既定値より上であるとき、トリプトファンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。

【００３４】
一部の実施形態では、ホモシステインおよび／もしくは２－ヒドロキシ酪酸の測定濃度が前記既定値より上であるとき、メチオニンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００３５】
一部の実施形態では、イソバレレートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、ロイシンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００３６】
一部の実施形態では、２－メチルブチレートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、イソロイシンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００３７】
一部の実施形態では、イソブチレートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、バリンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００３８】
一部の実施形態では、ホルメートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、セリン、トレオニン、および／もしくはグリシンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００３９】
一部の実施形態では、ホルメートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、セリンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００４０】
一部の実施形態では、ホルメートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、トレオニンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００４１】
一部の実施形態では、ホルメートの測定濃度が前記既定値より上であるとき、グリシンの濃度は、細胞培養培地中で低下する。
【００４２】
細胞培養培地中の前駆体の濃度は、細胞に提供される前駆体の量を低減することによって、例えば、フィード培地中の前記前駆体の濃度を低減し、フィードの供給速度を低減し、またはフィードの数もしくは体積を低減することによって低下させることができる。例えば、フィード培地は、より低い濃度の前駆体を含むフィード培地に置き換えることができる。
【００４３】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、インドールカルボン酸（インドール－３－カルボキシレート）、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、およびホルメートの１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、または１１種を細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００４４】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート、インドールラクテート、インドールカルボン酸、ホモシステイン、および２－ヒドロキシ酪酸の１、２、３、４、５、６、または７種を細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００４５】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、およびフェニルラクテートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００４６】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、およびインドールカルボン酸（インドール－３－カルボキシレート）を細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。

【００４７】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、ホモシステインおよび２－ヒドロキシ酪酸を細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００４８】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００４９】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、イソブチレートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００５０】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、２－メチルブチレートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００５１】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、イソバレレートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００５２】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）ば、ホルメートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００５３】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、イソバレレートおよび４－ヒドロキシフェニルピルベートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００５４】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、インドールカルボン酸（インドール－３－カルボキシレート）、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、およびホルメートを細胞培養培地中でＣ１未満に維持することを含む。
【００５５】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートの濃度は、０．５ｍＭ、０．４ｍＭ、０．３ｍＭ、０．２ｍＭ、または０．１ｍＭ未満に維持される。
【００５６】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートの濃度は、０．３ｍＭ未満に維持される。
【００５７】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートの濃度は、０．１ｍＭ未満に維持される。
【００５８】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、４－ヒドロキシフェニルピルベートの濃度は、０．１ｍＭ、０．０８ｍＭ、０．０６ｍＭ、０．０５ｍＭ、０．０４ｍＭ、０．０３ｍＭ、または０．０２ｍＭ未満に維持される。
【００５９】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、４－ヒドロキシフェニルピルベートの濃度は、０．０５ｍＭ未満に維持される。
【００６０】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、４－ヒドロキシフェニルピルベートの濃度は、０．０２ｍＭ未満に維持される。
【００６１】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、フェニルラクテートの

濃度は、０．５ｍＭ、０．４ｍＭ、０．３ｍＭ、０．２ｍＭ、または０．１ｍＭ未満に維持される。

【００６２】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、フェニルラクテートの濃度は、０．２ｍＭ未満に維持される。

【００６３】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、フェニルラクテートの濃度は、０．１ｍＭ未満に維持される。

【００６４】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）の濃度は、３ｍＭ、２ｍＭ、１ｍＭ、０．５ｍＭ、０．３ｍＭ、または０．１ｍＭ未満に維持される。

【００６５】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールラクテートの濃度は、１ｍＭ未満に維持される。

【００６６】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールラクテートの濃度は、０．３ｍＭ未満に維持される。

【００６７】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールラクテートの濃度は、０．１ｍＭ未満に維持される。

【００６８】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールカルボン酸（インドール－３－カルボキシレート）の濃度は、１ｍＭ、０．８ｍＭ、０．６ｍＭ、０．４ｍＭ、または０．２ｍＭ未満に維持される。

【００６９】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールカルボン酸の濃度は、０．５ｍＭ未満に維持される。

【００７０】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、インドールカルボン酸の濃度は、０．２ｍＭ未満に維持される。

【００７１】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、ホモシステインの濃度は、０．５ｍＭ、０．４ｍＭ、０．３ｍＭ、０．２ｍＭ、または０．１ｍＭ未満に維持される。

【００７２】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、ホモシステインの濃度は、０．３ｍＭ未満に維持される。

【００７３】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、ホモシステインの濃度は、０．１ｍＭ未満に維持される。

【００７４】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、２－ヒドロキシ酪酸の濃度は、１ｍＭ、０．８ｍＭ、０．６ｍＭ、０．４ｍＭ、または０．２ｍＭ未満に維持される。

【００７５】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、２－ヒドロキシ酪酸の濃度は、０．５ｍＭ未満に維持される。

【００７６】

上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、２－ヒドロキシ酪酸の

濃度は、０．２ｍＭ未満に維持される。
【００７７】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、イソバレレートおよび／または、２－メチルブチレート、および／またはイソブチレートの濃度は、２ｍＭ、１ｍＭ、０．８ｍＭ、０．６ｍＭ、０．４ｍＭ、または０．２ｍＭ未満に維持される。
【００７８】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、イソバレレートおよび／または、２－メチルブチレート、および／またはイソブチレートの濃度は、１ｍＭ未満に維持される。
【００７９】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、イソバレレート、および／または２－メチルブチレート、および／またはイソブチレートの濃度は、０．５ｍＭ未満に維持される。
【００８０】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、ホルメートの濃度は、４ｍＭ、３ｍＭ、２ｍＭ、１ｍＭ、０．５ｍＭ、または０．２ｍＭ未満に維持される。
【００８１】
ｖの一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、ホルメートの濃度は、３ｍＭ未満に維持される。
【００８２】
上述した方法の一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）において、ホルメートの濃度は、１ｍＭ未満に維持される。
【００８３】
低レベルで細胞培養培地中のアミノ酸濃度を制御するステップを含む方法
一部の実施形態では、細胞培養の方法は、
（ｉｉｉ）フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンから選択される少なくとも１種のアミノ酸を、細胞培養培地中で濃度Ｃ２未満に維持するステップであって、Ｃ２が２ｍＭである、ステップ
をさらに含む。
【００８４】
一部の実施形態では、前記濃度は、０．１ｍＭとＣ２、０．２ｍＭとＣ２、０．３ｍＭとＣ２、０．４ｍＭとＣ２、または０．５ｍＭとＣ２との間で維持される。一部の実施形態では、前記濃度は、０．５ｍＭとＣ２との間で維持される。
【００８５】
一部の実施形態では、Ｃ２は、２ｍＭ、１．５ｍＭ、１ｍＭ、０．９ｍＭ、０．８ｍＭ、０．７ｍＭ、０．６ｍＭ、０．５ｍＭ、０．４ｍＭ、０．３ｍＭ、０．２ｍＭ、０．１ｍＭ、０．０５ｍＭである。一部の実施形態では、Ｃ２は１ｍＭである。
【００８６】
細胞培養培地中のアミノ酸濃度を測定するステップを含む方法
一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）は、前記少なくとも１種のアミノ酸の濃度を測定するステップを含む。アミノ酸の濃度は、オフラインおよびオンライン測定法を含めた当業者に公知の任意の方法によって測定することができる。
【００８７】
アミノ酸の濃度は、細胞培養中に１回または数回測定することができる。一部の実施形態では、アミノ酸濃度は、連続的に、間欠的に、３０分毎、毎時間、２時間毎、１日２回、毎日、または２日毎に測定される。好適な実施形態では、アミノ酸の濃度は、毎日測定される。
【００８８】
アミノ酸の濃度は、当業者に公知の任意の方法によって測定することができる。オンライ

ンまたはオフライン方法においてアミノ酸の濃度を測定する好適な方法としては、例えば、液体クロマトグラフィー、例えば、ＨＰＬＣ、ＵＰＬＣ、もしくはＬＣＭＳなど、ＮＭＲ、またはＧＣＭＳがある。

【００８９】

一部の実施形態では、アミノ酸の濃度は、前記試料中の前記少なくとも１種のアミノ酸の濃度を測定することによってオフラインで測定される。一部の実施形態では、アミノ酸の濃度は、実施例４で開示した通り測定される。オフライン法でアミノ酸の濃度を測定する好適な方法は、ＵＰＬＣである。

【００９０】

一部の実施形態では、アミノ酸の濃度は、オンラインで測定される。一部の実施形態では、アミノ酸の濃度は、ラマン分光法を使用してオンラインで測定される。一部の実施形態では、アミノ酸の濃度は、実施例７に開示したラマン分光法を使用してオンラインで測定される。一部の実施形態では、アミノ酸の濃度は、反応器から試料を引き出し、プログラムされた様式で装置に移動するオートサンプラーを用いたＨＰＬＣまたはＵＰＬＣ技術を使用してオンラインで測定される。

【００９１】

一部の実施形態では、測定濃度が既定値より上であるとき、細胞培養培地中の前記少なくとも１種のアミノ酸の濃度は低下する。既定値は、Ｃ２に等しくあり得、またはＣ２のパーセンテージであり得る。一部の実施形態では、パーセンテージは、Ｃ２の５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、または９５％である。一部の実施形態では、パーセンテージは、Ｃ２の８０％である。

【００９２】

細胞培養培地中のアミノ酸の濃度は、細胞に提供されるアミノ酸の量を低減することによって、例えば、フィード培地中の前記アミノ酸の濃度を低減し、フィードの供給速度を低減し、またはフィードの数もしくは体積を低減することによって低下させることができる。例えば、フィード培地は、より低いアミノ酸の濃度を含むフィード培地によって置き換えることができる。

【００９３】

細胞培養培地中のフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンの濃度

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、フェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、フェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、フェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、フェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、フェニルアラニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【００９４】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、チロシンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、チロシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、チロシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、チロシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、チロシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【００９５】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、トリプトファンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、トリプトファンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、トリプトファンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、トリプトファンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適

な実施形態では、トリプトファンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【００９６】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、メチオニンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、メチオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、メチオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、メチオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、メチオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【００９７】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、ロイシンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、ロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、ロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、ロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、ロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【００９８】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、イソロイシンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、イソロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、イソロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、イソロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、イソロイシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【００９９】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、バリンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、バリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、バリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、バリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、バリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【０１００】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、セリンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、セリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、セリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、セリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、セリンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【０１０１】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、トレオニンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、トレオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、トレオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、トレオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、トレオニンの濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。

【０１０２】

一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）では、グリシンの濃度は、細胞培養培地中で２ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、グリシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から２ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、グリシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．１から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、グリシンの濃度は、細胞培養培地中で、０．２から１ｍＭの間で維持される。好適な実施形態では、グリシン

の濃度は、細胞培養培地中で、０．５から１ｍＭの間で維持される。
【０１０３】
一部の実施形態では、ステップ（ｉｉｉ）において、チロシン、フェニルアラニン、およびロイシンの濃度は、細胞培養中培地で２ｍＭ未満、好ましくは０．１から２ｍＭの間、０．１から１ｍＭの間、０．２から１ｍＭの間、または０．５から１ｍＭの間で維持される。
【０１０４】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、１ｍＭ、１．５ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、または５ｍＭより上の濃度でグリシン、プロリン、セリン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０種を含む。
【０１０５】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭより上の濃度でグリシン、プロリン、セリン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１種を含む。
【０１０６】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、５ｍＭより上の濃度でグリシン、プロリン、セリン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１種を含む。
【０１０７】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、１ｍＭ、１．５ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、または５ｍＭより上の濃度でプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１、２、３、４、５、６、または７種を含む。
【０１０８】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭより上の濃度でプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１種を含む。
【０１０９】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、５ｍＭより上の濃度でプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの１種を含む。
【０１１０】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、チロシンを含まない。一部の実施形態では、細胞培養は、培地がチロシンを含まないＨｉＰＤＯＧ培養である。一部の実施形態では、細胞培養培地はＨｉＰＤＯＧ培養であり、ＨｉＰＤＯＧプロセスで使用されるが、チロシンを含まない培地である。一部の実施形態では、細胞培養培地はチロシンを含まず、ここでチロシンを含まないＨｉＰＤＯＧ培養またはプロセスが使用される。
【０１１１】
ラクテートおよびアンモニアの濃度
細胞の増殖を阻害する他の代謝産物の一部の実施形態では、例えば、ラクテートおよびアンモニアも細胞培養培地中で低レベルに維持されるなどである。低レベルでラクテートおよびアンモニアを保つ方法も、当業者に公知である。
【０１１２】
例えば、ラクテートは、ＷＯ２００４１０４１８６、Ｇａｇｎｏｎら、ＢｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙおよびＢｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、１０８巻、６号、２０１１年６月（Ｇａｇｎｏｎら）、またはＷＯ２００４０４８５５６に開示された方法を使用することによって細胞培養液中で低レベルにて保つことができる。
【０１１３】
様々な他のストラテジーを使用してラクテート産生を制限し、かつ／またはラクテート消費を誘導することができる。これらとしては、わずかに低減されたｐＨ（６．７～７．０

）下での細胞の培養、それだけに限らないが、フルクトース（Ｗｌａｓｃｈｉｎ＆Ｈｕ、２００７）およびガラクトース（Ａｌｔａｍｉｒａｎｏら、２００６）を含めた代替炭素供給源を使用することによる低グルコース濃度での細胞の培養、それだけに限らないが、ヘキソーストランスポーターまたはラクテート脱水素酵素（Ｋｉｍ＆Ｌｅｅ、２００７ａ）を含めた糖分解酵素のタンパク質レベルが低減された細胞株の使用、ラクテート脱水素酵素およびピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの両方の細胞タンパク質レベルが抑制された細胞株の使用またはピルビン酸カルボキシラーゼ酵素（Ｋｉｍ＆Ｌｅｅ、２００７ｂ）の過剰発現を伴った、もしくはエネルギー代謝経路（解糖、ＴＣＡサイクル、およびレドックス経路）の活性を調節するシグナリング経路（ＡＫＴ（Ｍｕｌｕｋｕｔｌａら、２０１２）、ｍＴＯＲ（Ｄｕｖｅｌら、２０１０；Ｌｅｅ＆Ｌｅｅ、２０１２）、ＨＩＦ１ａなど）のインヒビター（低分子またはタンパク質ベース）を使用した細胞株（Ｚｈｏｕら、２０１１）がある。

【０１１４】

一部の実施形態では、ラクテートは、Ｇａｇｎｏｎらにおいて開示されたグルコース（ＨｉＰＤＯＧプロセス／ＨｉＰＤＯＧ培養）のハイエンドｐＨ制御送達を使用することによって低レベルで維持される。

【０１１５】

一部の実施形態では、ラクテートは、細胞培養培地中で、低レベルで維持される。一部の実施形態では、細胞培養培地中のラクテートの濃度は、９０ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、細胞培養培地中のラクテートの濃度は、７０ｍＭ未満に維持される。一部の実施形態では、細胞培養培地中のラクテートの濃度は、５０ｍＭ未満に維持される。一部の実施形態では、細胞培養培地中のラクテートの濃度は、４０ｍＭ未満に維持される。一部の実施形態では、ラクテートは、細胞培養液に提供されるグルコースの量を制御することによって低レベルで維持される。一部の実施形態では、ラクテートは、ＨｉＰＤＯＧプロセス／培養液を使用することによって低レベルで維持される。一部の実施形態では、ｐＨセンサーが使用されて細胞培養液のｐＨがモニターされ、所定のｐＨ値を超える上昇に応答して、グルコースが細胞培養液にフィードされる。一部の実施形態では、所定のｐＨ値は、およそ７である。

【０１１６】

アンモニアは、例えば、Ｂｕｔｌｅｒら、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５：８７～９４、１９９４またはＨｏｎｇら、Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２０１０）、８８：８６９－８７６に開示された方法などの当業者に公知の任意の方法によって細胞培養液中で、低レベルで保つことができる。代替として、アンモニアは、グルタミン合成酵素（ＧＳ）発現系を使用することによって低レベルで保つことができる。このようなシステムは、市販されており（Ｌｏｎｚａ）、組換え細胞株を生成するのに使用することができる。ＧＳ発現系を使用する細胞株は、ｉｎ ｖｉｖｏでグルタミンを合成する機能の獲得を実証し、それにより、外部から供給されるグルタミンへの細胞依存性を完全に解放する。培養で産生されるアンモニアの主要画分は、外部から供給されるグルタミンの異化作用（ｃａｔａｂｏｌｙｓｉｓ）由来であるので、代謝機能のこのような獲得により、培養で産生されるアンモニアのレベルが低減される。

【０１１７】

一部の実施形態では、アンモニアは、細胞培養培地中で低レベルにて維持される。好適な実施形態では、細胞培養培地中のアンモニアの濃度は、２０ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、細胞培養培地中のアンモニアの濃度は、１０ｍＭ未満に維持される。好適な実施形態では、細胞培養培地中のアンモニアの濃度は、８ｍＭ未満に維持される。

【０１１８】

細胞培養法

用語「培養」および「細胞培養」は、本明細書では、細胞集団の生存および／または増殖に適した条件下で培地中に供給される細胞集団を指す。当業者に明らかとなるように、一部の実施形態では、これらの用語は、本明細書では、細胞集団および集団が懸濁される培

地を含む組合せを指す。一部の実施形態では、細胞培養液の細胞は、哺乳動物細胞を含む。
【０１１９】
本発明は、所望のプロセス（例えば、組換えタンパク質（例えば、抗体）の産生）に適用できる任意の細胞培養法を用いて使用することができる。非限定的な例として、細胞は、培養が組換えタンパク質（例えば、抗体）の十分な発現の後に終わるバッチまたはフェドバッチ培養で増殖することができ、その後発現タンパク質（例えば、抗体）が回収される。代替として、別の非限定的な例として、細胞は、バッチリフィードで増殖させることができ、この場合、培養は終わらず、新しい栄養分および他のコンポーネントは、培養液に定期的または連続的に添加され、その間に、発現される組換えタンパク質（例えば、抗体）が定期的または連続的に回収される。他の適当な方法（例えば、スピンチューブ培養）は、当技術分野で公知であり、本発明を実施するのに使用することができる。
【０１２０】
一部の実施形態では、本発明に適した細胞培養は、フェドバッチ培養である。用語「フェドバッチ培養」は、本明細書では、追加のコンポーネントが、培養プロセスが始まると同時にまたは始まった後時折培養液に提供される細胞を培養する方法を指す。このように提供されるコンポーネントは、典型的には、培養プロセス中に枯渇した細胞のための栄養分を含む。フェドバッチ培養は、典型的にはある時点で停止され、培地中の細胞および／またはコンポーネントが回収され、任意選択により精製される。一部の実施形態では、フェドバッチ培養は、フィード培地を補充された基本培地を含む。
【０１２１】
細胞は、専門家が選択する任意の好都合なボリュームで増殖させることができる。例えば、細胞は、２～３ミリリットル～数リットルの容積の範囲の小規模反応器で増殖させることができる。代替として、細胞は、およそ少なくとも１リットル～１０、５０、１００、２５０、５００、１０００、２５００、５０００、８０００、１０，０００、１２，０００、１５０００、２００００、もしくは２５０００リットルまたはそれ超、あるいはその間の任意の容積の範囲の大規模市販バイオリアクターで増殖させることができる。
【０１２２】
細胞培養の温度は、細胞培養物が生存可能なままであり、高レベルの所望産物（例えば、組換えタンパク質）が産生される範囲にとどまる温度の範囲に主に基づいて選択されることになる。一般に、ほとんどの哺乳動物細胞は、十分に増殖し、約２５℃～４２℃の範囲内で所望産物（例えば、組換えタンパク質）を産生することができるが、本開示により教示される方法は、これらの温度に限定されない。ある特定の哺乳動物細胞は、十分に増殖し、約３５℃～４０℃の範囲内で所望産物（例えば、組換えタンパク質または抗体）を産生することができる。ある特定の実施形態では、細胞培養は、細胞培養プロセス中の１回または複数回において２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、または４５℃の温度で増殖される。当業者は、細胞の特定の必要性および専門家の特定の産生要件に応じて細胞を増殖させる適切な１つまたは複数の温度を選択することができるであろう。細胞は、専門家の必要性および細胞自体の要求に応じて任意の量の時間にわたって増殖させることができる。一部の実施形態では、細胞は、３７℃で増殖される。一部の実施形態では、細胞は、３６．５℃で増殖される。
【０１２３】
一部の実施形態では、細胞は、専門家の必要性および細胞自体の要求に応じて、より大きいまたはより小さい量の時間にわたって最初の増殖期（または増殖期）中に増殖させることができる。一部の実施形態では、細胞は、既定の細胞密度を実現するのに十分な時間にわたって増殖される。一部の実施形態では、細胞は、妨害されないで増殖させられた場合に細胞が最終的に到達するはずである最大細胞密度の所与のパーセンテージである細胞密度を実現するのに十分な時間にわたって増殖される。例えば、細胞は、最大細胞密度の１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または９９パーセントの所望の生存細胞密度を実現

するのに十分な時間にわたって増殖させることができる。一部の実施形態では、細胞は、細胞密度が培養の１日当たり１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％超増大しなくなるまで増殖される。一部の実施形態では、細胞は、細胞密度が培養の１日当たり５％超増大しなくなるまで増殖される。

【０１２４】

一部の実施形態では、細胞は、規定された期間にわたって増殖させられる。例えば、細胞培養の出発濃度、細胞が増殖される温度、および細胞の固有増殖速度に応じて、細胞は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ超の日にわたって、好ましくは４～１０日間増殖させることができる。一部の場合では、細胞は、１カ月またはそれ超増殖させられ得る。本発明の専門家は、タンパク質産生要件および細胞自体の必要性に応じて最初の増殖期の継続時間を選択することになる。

【０１２５】

細胞培養は、細胞への栄養分の酸素化および分散を増大させるために初期培養段階中にアジテートまたは振盪させてもよい。本発明によれば、当業者は、それが、それだけに限らないが、ｐＨ、温度、酸素化などを含めた最初の増殖期中にバイオリアクターのある特定の内部条件を制御または調節するのに有益となり得ることを理解するであろう。

【０１２６】

最初の増殖期の最後に、培養条件の少なくとも１つを、培養中に第２のセットの培養条件が適用され、代謝シフトが起こるようにシフトさせてもよい。代謝シフトは、例えば、細胞培養液の温度、ｐＨ、オスモル濃度、または化学誘導物質（ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｉｎｄｕｃｔａｎｔ）レベルの変化によって達成することができる。限定されない一実施形態では、培養条件は、培養の温度をシフトすることによってシフトされる。しかし、当技術分野で公知であるように、温度のシフトは、適切な代謝シフトを実現することができる唯一の機構ではない。例えば、このような代謝シフトは、それだけに限らないが、ｐＨ、オスモル濃度、および酪酸ナトリウムレベルを含めた他の培養条件をシフトすることによっても実現することができる。培養シフトのタイミングは、タンパク質産生要件または細胞自体の必要性に基づいて、本発明の専門家が判定することになる。

【０１２７】

培養の温度をシフトさせるとき、温度シフトは、段階的であってもよい。例えば、温度変化を完了するのに数時間または数日間要し得る。代替として、温度シフトは、急激であってもよい。例えば、温度変化は、数時間未満内で完了し得る。ポリペプチドまたはタンパク質の商業的大規模生産において標準的である適切な生産および制御装置を考慮すると、温度変化は、１時間未満内でさえ完了し得る。

【０１２８】

一部の実施形態では、細胞培養の条件が上記に論じたようにシフトされると、細胞培養は、細胞培養物の生存および生存能に寄与し、商業的に適切なレベルで所望のポリペプチドまたはタンパク質の発現に適切である第２の培養条件下で後続の産生期にわたって維持される。

【０１２９】

上記に論じたように、培養は、それだけに限らないが、温度、ｐＨ、オスモル濃度、および酪酸ナトリウムレベルを含めたいくつかの培養条件の１つまたは複数をシフトさせることによってシフトさせることができる。一部の実施形態では、培養の温度がシフトされる。この実施形態によれば、後続の産生期中に、培養物は、最初の増殖期の温度または温度範囲未満である温度または温度範囲で維持される。上記に論じたように、複数の個別の温度シフトを使用して、細胞密度もしくは生存能を増大させ、または組換えタンパク質の発現を増大させることができる。

【０１３０】

一部の実施形態では、細胞は、所望の細胞密度または産生力価に到達するまで後続の産生

期において維持され得る。本発明の別の実施形態では、細胞は、後続の産生期中の規定の期間にわたって増殖させられる。例えば、後続の増殖期の開始時における細胞培養の濃度、細胞が増殖される温度、および細胞の固有増殖速度に応じて、細胞は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ超にわたって増殖させることができる。一部の場合では、細胞は、１カ月またはそれ超にわたって増殖させられ得る。本発明の専門家は、ポリペプチドまたはタンパク質産生要件および細胞自体の必要性に応じて後続の産生期の継続時間を選択することができるであろう。

【０１３１】

細胞培養は、細胞への栄養分の酸素化および分散を増大させるために後続の産生期中にアジテートまたは振盪させることができる。本発明によれば、当業者は、それが、それだけに限らないが、ｐＨ、温度、酸素化などを含めた後続の増殖期中にバイオリアクターのある特定の内部条件を制御または調節するのに有益であり得ることを理解するであろう。

【０１３２】

一部の実施形態では、細胞は、組換えタンパク質を発現し、本発明の細胞培養法は、増殖期および産生期を含む。

【０１３３】

細胞培養の方法のいくつかの実施形態では、ステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）は、細胞培養法全体の間に適用される。一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）は、細胞培養法の一部の間に適用される。一部の実施形態では、ステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）は、所定の生存細胞密度が得られるまで適用される。

【０１３４】

一部の実施形態では、本発明の細胞培養法は、増殖期および産生期ならびにステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）を含み、増殖期中に適用される。一部の実施形態では、本発明の細胞培養法は、増殖期および産生期ならびにステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）を含み、増殖期の一部の間に適用される。一部の実施形態では、本発明の細胞培養法は、増殖期および産生期ならびにステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）を含み、増殖期および産生期の間に適用される。

【０１３５】

ステップ（ｉｉ）および／または（ｉｉｉ）では、用語「維持すること」は、培養プロセス全体にわたって（回収まで）、または培養プロセスの一部にわたって、例えば、増殖期、増殖期の一部、または所定の細胞密度が得られるまでＣ１またはＣ２未満にアミノ酸の濃度または代謝産物を維持することを指すことができる。

【０１３６】

本発明はまた、細胞培養において細胞増殖および／または産生性が改善された細胞を産生する方法であって、

（ｉ）細胞増殖および／または産生性インヒビターである１種または複数の細胞代謝産物を同定するステップと、

（ｉｉ）細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成をもたらす１つまたは複数の細胞代謝経路を同定するステップと、

（ｉｉｉ）細胞増殖および／もしくは産生性インヒビター、またはその代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路における１つもしくは複数の遺伝子、またはそれから分岐する、もしくは直接分岐する代謝経路における酵素をコードする１つもしくは複数の遺伝子を同定するステップと、ならびに／あるいは

（ｉｖ）細胞増殖および／もしくは産生性インヒビター、または細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターの代謝産物、または細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターの代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物、もしくは１つまたは複数の細胞代謝経路もしくはＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）におけるコファクター、またはＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路における１つまたは複数の遺伝子を同定するステップと、

（ｖ）細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減するように１つまたは複数の遺伝子の発現を改変するステップと
を含む、方法を提供する。
【０１３７】
一部の実施形態では、細胞増殖および／または産生性インヒビターである細胞代謝産物を同定するステップは、
（ｉ）最大生存細胞密度まで細胞培養中に産生される測定可能な細胞代謝産物の濃度／レベルを測定することと、
（ｉｉ）高度に発現される代謝産物もしくは高レベル／濃度まで蓄積する代謝産物であり、かつ／または他の代謝産物と比べた細胞培養中の代謝産物産生の速度の増大もしくは代謝産物産生のレベル／濃度の増大を実証する細胞代謝産物を同定することと
を含む。
【０１３８】
高度に発現される代謝産物である細胞代謝産物、または高レベル／濃度に蓄積する代謝産物の同定は、ＮＭＲ、ＬＣ／ＭＳ、およびＧＣ／ＭＳ技法の１つもしくは複数、またはこれらの組合せを使用して、細胞培養培地中または細胞内、例えば細胞ペレット中で代謝産物濃度を同定および／または測定するための方法を使用して実施することができる。メタボローム解析について、使用済み培地試料および細胞ペレット試料を、例えば、０、１、２、３、４、５、７、８、９、１１、および１２から選択される日の時点で、例えば最大でかつ／または最大生存細胞密度を含めて、例えば培養全体にわたる時点で採用される各条件について実施される単一のまたは二重の反応器ランから収集および分析することができる。すべての測定可能な代謝産物の相対的レベル（倍率変化）が測定および算出される。相対的レベルは、所望の時間エンドポイント、通常最大生存細胞密度まで、最初に検出される代謝産物のレベルと比較した倍率変化に基づいて使用済み培地および／または細胞ペレット試料の両方において判定され、算出される。高レベルに蓄積している代謝産物は、代謝産物が測定された第１の時点と所望の時間エンドポイント、例えば、最大生存細胞密度との間で１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、または１００倍より大きい、またはそれに等しいのうちのいずれか１つの倍率変化カットオフから判断される。一部の実施形態では、それは、２０倍より大きく、またはそれに等しい。
【０１３９】
一部の実施形態では、代謝産物産生の速度の増大、または代謝産物産生のレベル／濃度の増大は、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０倍より大きく、またはそれに等しい。一部の実施形態では、それは、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０倍より大きく、またはそれに等しい。一部の実施形態では、それは、４０倍より大きく、またはそれに等しい。一部の実施形態では、それは、５０倍より大きく、またはそれに等しい。
【０１４０】
一部の実施形態では、細胞増殖（産生性）インヒビターである細胞代謝産物の同定は、
（ｉ）最大生存細胞密度で高度に発現される代謝産物産生／濃度を定量化することと、
（ｉｉ）（ｉ）において高度に発現される代謝産物の量の存在を伴った、および伴わない細胞を培養することと、
（ｉｉｉ）（ｉｉ）における各細胞集団の細胞培養中の最大生存細胞密度もしくは産生性ならびに／または最大生存細胞密度および／もしくは産生性を比較し、培養細胞増殖および／もしくは産生性に対する高度に発現される代謝産物の効果を判定することと
をさらに含む。
【０１４１】
最大生存細胞密度で高度に発現される代謝産物産生／濃度を定量化することは、細胞培養培地中または細胞内で代謝産物濃度を同定および／または測定するための方法を使用して実施することができる。一部の実施形態では、高度に発現される代謝産物を含む代謝産物

の測定および／または定量化は、質量分析を伴った液体クロマトグラフィー（ＬＣ／ＭＳ）、質量分析を伴ったガスクロマトグラフィー（ＧＣ／ＭＳ）、または核磁気共鳴（ＮＭＲ）を使用して実施される。一部の実施形態では、細胞代謝産物および／または高度に発現される代謝産物は、培養培地の試料もしくは細胞培養中の培養細胞から同定される。

【０１４２】

代謝産物または高度に発現される代謝産物の測定および／または定量化は、代謝産物または高度に発現される代謝産物の得られた精製化合物形態を使用することによって実施することができる。これらの化合物は、その方法から得られる測定値を代謝産物の濃度と正確に相関させるために、既知の濃度における化合物についての較正曲線を調製するのに使用することができる。このように、代謝産物の濃度の正確な測定は、最大生存細胞密度で細胞培養における任意の所与の時点で決定できる。

【０１４３】

高度に発現される代謝産物の定量化された濃度の効果は、細胞の培養液中に所定濃度を導入し、導入される代謝産物を欠くその他は同一の培養液を用いた細胞増殖および／または産生性に対する効果を比較することによって、細胞培養液中の細胞の細胞増殖および／または産生性に対して判定することができる。例えば、組換えタンパク質を産生する細胞であり得る細胞は、単独で、または選択された濃度で他の異なる高度に発現される代謝産物と組み合わせて、異なる選択された濃度の高度に発現される代謝産物でスパイクインされた培養培地に接種することができ、これらの濃度は、例えば、最大生存細胞密度において判定された濃度またはその連続希釈であり得る。培養培地のｐＨは、細胞を接種する前に７に調整することもできる。比較により、同じ尺度で細胞増殖および／もしくは産生性に対する代謝産物の負の効果の存在、ならびに／または代謝産物同士間の相乗効果の存在を判定することができ、それにより、このような高度に発現される代謝産物を細胞増殖および／または産生性のインヒビターであると判定することができる。

【０１４４】

細胞を産生する方法のいくつかの実施形態では、１つまたは複数の細胞代謝経路が、細胞増殖および／または産生性インヒビターである高度に発現される代謝産物または１種もしくは複数の細胞代謝産物の培養培地の栄養源またはコンポーネントから判定され、これらは、広くアミノ酸、ビタミン、無機塩、微量元素、ビタミン、エネルギー源、脂質、およびヌクレオチドに入り、さらなる開示が本明細書に提供されている。阻害性代謝産物である高度に発現される代謝産物の同一性の知識および代謝産物の栄養源の知識を有する当業者は、細胞に共通の代謝経路の生化学的知識を適用して、増殖および／または産生性インヒビターの合成に寄与し、代謝産物の中間体に至る経路およびそれからの経路分岐を含み得る関連した１つまたは複数の細胞代謝経路を推測することができる。

【０１４５】

一部の実施形態では、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビター、または代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つもしくは複数の細胞代謝経路における１つもしくは複数の遺伝子、またはそれからの代謝経路分岐における酵素をコードする１つもしくは複数の遺伝子の同定は、

（ｉ）１つもしくは複数の細胞代謝経路中の相対的な遺伝子発現レベルを判定し、増大もしくは低下したレベルで発現される遺伝子を同定すること、および／または

（ｉｉ）突然変異を含む１つまたは複数の細胞代謝経路中の遺伝子を同定すること

をさらに含む。

【０１４６】

一部の実施形態では、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターまたはその代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子、あるいはそれからの代謝経路分岐中の酵素をコードする１つまたは複数の遺伝子の同定、あるいは細胞増殖および／もしくは産生性インヒビター、または細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターの代謝産物または細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターの代謝中間体、あるいは代謝中間体の代謝産物、あるいは１つまたは複数の細胞

代謝経路中のコファクター、例えば、ＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）またはＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）またはｑ－ＢＨ２の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子の同定は、１つまたは複数の遺伝子を改変することをさらに含む。一部の実施形態では、１つもしくは複数の遺伝子の同定は、遺伝子発現分析を含み、一部の実施形態では、それは、同定された１つもしくは複数の経路中の１つもしくは複数の遺伝子発現分析を含み、一部の実施形態では、それは、同定された１つまたは複数の経路中のすべての遺伝子の遺伝子発現分析を含む。一部の実施形態では、それは、転写量を測定することによる遺伝子発現分析を含み、一部の実施形態では、それは、リアルタイム定量的ＰＣＲアッセイまたはＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを含む。ＲＴ　ｑＰＣＲは、検出試薬、例えば、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎと組み合わせてＰＣＲを使用して標的ｃＤＮＡ配列を増幅することによって転写量を測定することができる。相対的遺伝子発現レベルは、バックグラウンドを上回る検出試薬からのシグナルに要求されるＰＣＲサイクルの数を測定することによって判定することができ、対数的に増大し得る。このサイクル数は、C_T（閾値サイクル）と一般に呼ばれる。ベーターアクチンなどの低存在量転写物は、転写量の公知の対照標準と比較して高いC_T値を有し、逆もまた同様である。

【０１４７】

一部の実施形態では、相対的な遺伝子発現レベルは、リアルタイム定量的ＰＣＲ、ＲＴ－ｑＰＣＲによって判定され、一部の実施形態では、遺伝子突然変異の同定は、ｍＲＮＡシーケンシングによって判定される。

【０１４８】

一部の実施形態では、同定された遺伝子は、対照遺伝子の発現レベルより高いまたは低い増大または低下したレベルで発現され、一部の実施形態では、レベルは、例えば、Ｃｔ値またはｄＣｔ値によって判断される場合、対照遺伝子の発現レベルより５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、または９５パーセント高く、または低いのいずれか１つを超え、またはそれに等しい。一部の実施形態では、同定された遺伝子は、対照遺伝子の発現レベルより１０％高くまたは低く、一部の実施形態では、１５％高くまたは低く、一部の実施形態では、対照遺伝子の発現レベルより２０％高くまたは低く発現される。一部の実施形態では、対照遺伝子は、１４および１７に等しい、または１４から１７の間のＣｔ値を有し、またはＲＴ－ｑＰＣＲによって測定される場合、１５および１６に等しい、もしくは１５から１６の間のＣｔ値を有し、一部の実施形態では、対照遺伝子は、ベータアクチンである。一部の実施形態では、同定された遺伝子は、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、または３０超のいずれか１つより大きい、またはそれに等しいC_t値を有し、一部の実施形態では、同定された遺伝子は、ＲＴ－ｑＰＣＲによって測定した場合、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１、または１４未満のいずれか１つより少ない、またはそれに等しいC_t値を有する。一部の実施形態では、同定された遺伝子は、ＲＴ－ｑＰＣＲによって測定した場合、－１未満もしくは－１に等しい、０未満もしくは０に等しい、１未満もしくは１に等しい、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、もしくは１１のいずれか１つ超もしくはそれに等しい、または１１超もしくは１１に等しいｄＣｔ値を有する。

【０１４９】

一部の実施形態では、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターまたはその代謝中間体の合成を、触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子、あるいはそれからの代謝経路分岐中の酵素をコードする１つまたは複数の遺伝子の同定は、追加的にまたは代替として、同定された１つまたは複数の経路中の１つまたは複数の遺伝子の遺伝子突然変異分析を含む。一部の実施形態では、それは、同定された１つまたは複数の経路中のすべての遺伝子の遺伝子突然変異分析を含む。

【０１５０】

一部の実施形態では、細胞代謝経路中の、または細胞増殖および／もしくは産生性インヒ

ビターまたはその代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の遺伝子が、または、それからの代謝経路分岐中の酵素をコードする１つもしくは複数の遺伝子が、対照遺伝子の発現レベルより高いもしくは低い増大もしくは低下したレベルで発現され、かつ／または突然変異されている場合、１つまたは複数の遺伝子の発現は、改変されている／改変され得る。

【０１５１】

一部の実施形態では、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターまたはその代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子の発現が改変されている。

【０１５２】

一部の実施形態では、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターまたはその代謝中間体の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の遺伝子を含む１つまたは複数の細胞代謝経路からの代謝経路分岐中の酵素をコードする１つまたは複数の遺伝子が改変されている。

【０１５３】

一部の実施形態では、分岐は、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターまたはその代謝中間体の合成を触媒する触媒をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子より上に位置したノード中に生じる。一部の実施形態では、分岐は、下に位置したノード中に生じる。

【０１５４】

一部の実施形態では、分岐は、細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子より上に位置したノード中に生じ、一部の実施形態では、分岐は、下に位置したノード中に生じる。

【０１５５】

一部の実施形態では、細胞増殖および／もしくは産生性インヒビター、または細胞増殖および／もしくは産生性インヒビターの代謝産物、または細胞増殖および／または産生性インヒビターの代謝中間体、もしくは代謝中間体の代謝産物、あるいは１つまたは複数の細胞代謝経路中のコファクター、例えば、ＢＨ４（テトラヒドロビオプテリン）、またはＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２の合成を触媒する酵素をコードする１つまたは複数の細胞代謝経路中の１つまたは複数の遺伝子が改変されている。

【０１５６】

実施例において例示された通り、改善された細胞培養において細胞増殖および／または産生性を伴った細胞を産生する方法は、細胞によって産生される代謝産物インヒビターを同定することを伴う。本方法は、代謝がインヒビター合成のポイントに、かつ／またはそのポイントからチャネリングするように合成に至る代謝経路、インヒビター合成のポイントに至る、またはこのポイントから離れる代謝経路を同定することをさらに伴う（図２４を参照）。同様に、これらの代謝経路からの経路分岐が同定される（図２５を参照）。このような分岐は、インヒビター合成のポイントより上、下、またはそのポイントに位置した経路中のノードに生じ得、代謝をインヒビターに向けて、かつ／もしくはインヒビター合成ポイントから離してチャネリングするように同様に機能を果たし、または代謝をインヒビター合成の中間体の合成ポイントに向けて、もしくはそこから離してチャネリングするように機能を果たすことができる。さらに、実施例に例示した方法は、分岐または分岐経路を含むこれらの上述した経路における酵素をコードする遺伝子の同定を伴う。これらの遺伝子は、インヒビターを合成する酵素をコードすることができ；これらは、インヒビターを合成するための中間体または上流の中間体を合成する酵素をコードすることができ；これらは、インヒビターが酵素作用の中間体または上流の中間体である酵素をコードすることができ；またはこれらは、インヒビターが酵素作用（例えば、これは、遺伝子ＨｐｄおよびＨｇｄによって図２４に例示されている）の直接的な中間体または基質である酵素をコードすることができ、１つまたは複数の細胞代謝経路中のコファクター、例えば、Ｂ

Ｈ４（テトラヒドロビオプテリン）、またはＢＨ４－４ａ（カルビノールアミン）、またはｑ－ＢＨ２を生成する酵素をコードし得る。

【０１５７】

実施例に例示した通り、本方法は、１つまたは複数の上述した遺伝子の発現を改変して、細胞増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減することをさらに伴う。この目的は、実施例が例示する通りいくつかのやり方で実現することができる。インヒビターを合成する酵素、またはインヒビターもしくはそれからの経路分岐に至る経路中の中間体を合成する酵素をコードする遺伝子を、遺伝子発現を低減するように改変することができ、したがって、特に１つまたは複数の遺伝子が高度に発現される場合において、インヒビターの産生に向けた代謝のチャネリングを低減する。インヒビターが、インヒビターから至る経路もしくはそれからの経路分岐中の基質または中間体もしくは上流の中間体である酵素をコードする遺伝子は、遺伝子発現を増大させるように改変することができ、したがって、特に、１つまたは複数の遺伝子が過少発現され、かつ／または突然変異され、かつ／または機能もしくは酵素活性喪失を被る場合において、インヒビターの産生から離れる代謝チャネリングを増大させる。同様に、インヒビター合成の中間体または上流の中間体も中間体、すなわち、インヒビター合成ポイントの上流の中間体合成ポイントに位置したノードからの経路分岐中の遺伝子でもある酵素をコードする遺伝子は、遺伝子発現を増大させるように改変することができ、したがって、特に、１つまたは複数の遺伝子が過少発現され、かつ／または突然変異され、かつ／または機能もしくは酵素活性の喪失を被る場合において、インヒビターの産生に至る経路から離れる代謝チャネリングを増大させる。

【０１５８】

同定された１つまたは複数の遺伝子は、インヒビターまたは中間体のインヒビター合成もしくは代謝産物の中間体を直接合成する酵素をコードし、このような遺伝子を、これらが他の重要な代謝過程において伴われる場合、改変することが望ましくない場合がある。これは、遺伝子Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、およびＭｉｆを参照して実施例４（図２４）に例示されており、正常または高レベルで発現され得る。この状況において、分岐経路中の１つまたは複数の遺伝子が、例えば、インヒビター合成ポイントの上流の中間体合成ポイントにおいて位置したノードから経路分岐において改変され得、インヒビターの産生に至る経路から離れる代謝チャネリングを増大させる。これは、分岐中の遺伝子の発現を増大させることによって、特に、分岐中に遺伝子の発現を増大させることによって、分岐中の１つまたは複数の遺伝子が過少発現され、かつ／または突然変異され、かつ／または機能もしくは酵素活性喪失を被る場合において、実現することができる。これは、遺伝子Ｐａｈについて実施例４（図２４）において例示されている。インヒビターが基質または上流の中間体である酵素をコードする代替の遺伝子として、特に、分岐中に遺伝子の発現を増大させることによって、１つまたは複数の遺伝子が過少発現され、かつ／または突然変異され、かつ／または機能もしくは酵素活性喪失を被る場合において、改変して遺伝子発現を増大させることができるので、したがって、インヒビターの産生から離れる代謝チャネリングを増大させることができる。これは、遺伝子Ｈｐｄおよび／またはＨｇｄについて実施例４（図２４）に例示されている。したがって、フェニルアラニン／チロシン経路（図２４）の代謝標的は、Ｐａｈ、Ｈｐｄ、および／またはＨｇｄ遺伝子および／またはＰＣＢＤ１および／またはＱＤＰＲの１つまたは複数である（図２６および２７）。これらは、活性の喪失もしくは活性の増大を補正するように遺伝子を突然変異させることによって、かつ／または細胞内に導入することができる発現可能ベクター中に１つもしくは複数の遺伝子の追加の１つもしくは複数の野生型コピーを提供することによって実現することができる発現を増大させるための標的である。

【０１５９】

同定される１つまたは複数の遺伝子がインヒビター、またはインヒビター合成の中間体、またはインヒビターもしくは中間体の代謝産物を直接合成する酵素をコードする場合では、インヒビター合成の産生に向けた代謝チャネリングを防止するようにこのような遺伝子

を改変することが望ましい場合がある。実施例２４において例示されている通り、これは、遺伝子Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２について示されている通り、インヒビターの産生から直接上流の１つまたは複数の遺伝子を改変することによって実現することができる。このような改変は、遺伝子ノックダウンまたは遺伝子ノックアウトによるものであり得る。

【０１６０】

一実施形態では、遺伝子ノックダウンは、非改変細胞と比較して、９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５、２．５パーセントのいずれか未満、またはいずれかに等しくなるまでコードされる分子の遺伝子発現または活性を低減する。

【０１６１】

一実施形態では、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２ノックダウンは、非改変細胞と比較して、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２発現のレベルまたは活性を９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５、２．５パーセントのいずれか未満であり、またはいずれかに等しいまでにする。

【０１６２】

ノックダウンは、低下したレベルで発現される同定された遺伝子に適用される遺伝子欠損、破壊、置換、点突然変異、多重点突然変異、挿入突然変異、もしくはフレームシフト突然変異ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ９、またはＣＲＩＳＰＲ干渉もしくは干渉ＲＮＡ、干渉ｍＲＮＡもしくは干渉アプタマーのいずれか１つまたは複数によって、またはｓｉＲＮＡもしくはｓｉＲＮＡ干渉または亜鉛フィンガー転写因子または亜鉛フィンガーヌクレアーゼもしくは転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）の使用による遺伝子発現の抑制によって、または、インヒビター分子もしくは低分子インヒビターなどのインヒビター、例えば、タンパク質もしくは酵素活性の活性インヒビターの使用によって実現することができる。

【０１６３】

実施例においてやはり例示したように、インヒビター合成の産生から離れる代謝チャネリングを増大させることは、これら自体の中間体としてインヒビター産生の中間体をそれら自体共有する酵素をコードする１つまたは複数の遺伝子を改変することによって実現することができる。実施例５に例示した通り、インヒビター産生（図２５）から直接下流の、またはインヒビター産生に向けて分岐するノードから下流の１つまたは複数の遺伝子を改変して発現を増大させることによって実現することができる。これは、１つまたは複数の遺伝子が過少発現されまたは突然変異され、機能または酵素活性の喪失を被る場合特にである。これは、酵素が突然変異を変更する活性を被った場合の遺伝子Ｉｖｄ、Ｍｃｃｃ１、および／またはＭｃｃｃ２、ならびに過少発現される遺伝子Ａｕｈについて例示される。したがって、ロイシン経路の代謝標的は、Ｉｖｄ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＡｕｈ遺伝子のうちの１つまたは複数である。これらは、活性の喪失もしくは活性の増大を補正するように遺伝子を突然変異させることによって、かつ／または細胞内に導入することができる発現可能ベクター中に１つもしくは複数の遺伝子の野生型コピーを提供することによって実現することができる発現を増大させるための標的である。

【０１６４】

いくつかの実施形態によれば、改変は、増殖および／または産生性インヒビターおよび／またはその中間体の生合成を抑制、低減、防止し、一部の実施形態では、改変は、増殖および／または産生性インヒビターの生合成を抑制、低減、防止する。いくつかの実施形態によれば、改変により、細胞培養において細胞増殖および／または産生性が改善された細胞が産生される。

【０１６５】

一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子の発現を改変するステップは、

（ａ）増大もしくは低下したレベルで発現される同定された遺伝子もしくは突然変異を含む同定された遺伝子に適用される遺伝子欠損、破壊、置換、点突然変異、多重点突然変異

、挿入突然変異、もしくはフレームシフト突然変異のうちのいずれか１つもしくは複数、または
（ｂ）任意選択により発現可能核酸もしくはベクターコンストラクトとして細胞内への遺伝子を含む１種もしくは複数の核酸の導入、
（ｃ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ９もしくはＣＲＩＳＰＲ干渉もしくは干渉ＲＮＡ、干渉ｍＲＮＡもしくは干渉アプタマー、またはｓｉＲＮＡもしくはｓｉＲＮＡ干渉または亜鉛フィンガー転写因子または亜鉛フィンガーヌクレアーゼまたは転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）の使用による遺伝子発現の抑制もしくは活性化
を含む。

【０１６６】

１つまたは複数の遺伝子の発現を改変することが干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）の使用を含む場合、適当なＲＮＡｉには、遺伝子産物のレベルを低下もしくは増大させる、すなわち、１つまたは複数の遺伝子を標的にするＲＮＡｉが含まれる。例えば、ＲＮＡｉは、ｓｈＲＮＡまたはｓｉＲＮＡであり得る。「低分子干渉」または「短鎖干渉ＲＮＡ」またはｓｉＲＮＡは、目的の遺伝子または１つもしくは複数の遺伝子に標的化されているヌクレオチドのＲＮＡデュプレックスである。「ＲＮＡデュプレックス」は、ＲＮＡ分子の２つの領域間の相補的対合によって形成される構造体を指す。ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡのデュプレックス部分のヌクレオチド配列が標的遺伝子のヌクレオチド配列に相補的である点で遺伝子に「標的化されている」。一部の実施形態では、ｓｉＲＮＡのデュプレックスの長さは、３０ヌクレオチド未満である。一部の実施形態では、デュプレックスは、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、または１０ヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態では、デュプレックスの長さは、１９～２５ヌクレオチド長である。ｓｉＲＮＡのＲＮＡデュプレックス部分は、ヘアピン構造の一部であり得る。デュプレックス部分に加えて、ヘアピン構造は、デュプレックスを形成する２つの配列間に位置したループ部分を含有し得る。ループは、長さが変動し得る。一部の実施形態では、ループは、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、または１３ヌクレオチド長である。ヘアピン構造は、３’または５’オーバーハング部分も含有し得る。一部の実施形態では、オーバーハングは、０、１、２、３、４、または５ヌクレオチド長の３’または５’オーバーハングである。「ショートヘアピンＲＮＡ」またはｓｈＲＮＡは、ｓｉＲＮＡなどの干渉ＲＮＡを発現するように作製することができるポリヌクレオチドコンストラクトである。

【０１６７】

一部の実施形態では、ベクターは、プロモーター配列、ディレクショナルクローニング部位、エピトープタグ、ポリアデニル化配列、および抗生物質耐性遺伝子のうちの１つまたは複数を含有する。一部の実施形態では、プロモーター配列は、ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーターであり、ディレクショナルクローニング部位はＴＯＰＯであり、エピトープタグは、抗Ｖ５抗体を使用して検出するためのＶ５であり、ポリアデニル化配列は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ由来であり、抗生物質耐性遺伝子はブラストサイジンである。

【０１６８】

一部の実施形態では、細胞増殖および／または産生性インヒビターは、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（ＨＰＬＡ）、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、インドールカルボキシレート（インドール－３－カルボキシレート）、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、２－ヒドロキシ酪酸、ホモシステイン、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、ブチレート、ホルメートからなる群から選択される。

【０１６９】

一部の実施形態では、１つまたは複数の細胞代謝経路は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（ＨＰＬＡ）、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、インドールカルボキシレート（インドール－３－カルボキシレート）、インド

ールラクテート（インドール－３－ラクテート）、２－ヒドロキシ酪酸、ホモシステイン、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、ブチレート、ホルメート、またはその代謝産物、またはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物を合成する。

【０１７０】

一部の実施形態では、細胞代謝経路は、ロイシン経路および／もしくはイソロイシン経路および／もしくはバリン経路、またはフェニルアラニン／チロシン経路、またはアセトアセテート／フマレートである。一部の実施形態では、細胞代謝経路は、ロイシン経路またはフェニルアラニン／チロシン経路である。一部の実施形態では、細胞代謝経路は、ロイシン経路およびイソロイシン経路およびバリン経路および／またはフェニルアラニン／チロシン経路である。

【０１７１】

一部の実施形態では、改変された遺伝子は、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート（ＨＰＬＡ）、４－ヒドロキシフェニルピルベート、フェニルラクテート（ＰＬＡ）、インドールカルボキシレート（インドール－３－カルボキシレート）、インドールラクテート（インドール－３－ラクテート）、２－ヒドロキシ酪酸、ホモシステイン、イソバレレート、２－メチルブチレート、ブチレート、ブチレート、ホルメート、またはその代謝産物、またはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物の合成を触媒する酵素をコードする。

【０１７２】

一部の実施形態では、改変された遺伝子は、４－ヒドロキシフェニルピルベートもしくはフェニルラクテート（ＰＬＡ）またはその代謝産物、またはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物の合成を触媒する酵素をコードする。

【０１７３】

一部の実施形態では、改変された遺伝子は、イソバレレート、２－メチルブチレート、イソブチレート、もしくはブチレート、またはその代謝産物、またはその代謝中間体、または代謝中間体の代謝産物の合成を触媒する酵素をコードする。

【０１７４】

一部の実施形態では、改変される１つまたは複数の遺伝子は、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｐａｈ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１、Ｆａｈから選択される。

【０１７５】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ｂｃｋｄｈａ／ｂ、Ｄｂｔ／Ｄｌｄ、Ｉｖｄ、Ａｃａｄｍ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ａｕｈ、Ｈｍｇｃｌ、Ｆａｓｎから選択される。

【０１７６】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｐａｈ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１、Ｆａｈ、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ｂｃｋｄｈａ／ｂ、Ｄｂｔ／Ｄｌｄ、Ｉｖｄ、Ａｃａｄｍ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ａｕｈ、Ｈｍｇｃｌ、Ｆａｓｎ、Ｆａｓｎから選択される。

【０１７７】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、およびＰａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲから選択される。

【０１７８】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄから選択される。

【０１７９】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、およびＰａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲから選択される。

【０１８０】
一部の実施形態では、遺伝子は、遺伝子発現を増大または低下させるように改変されている。
【０１８１】
一部の実施形態では、遺伝子は、遺伝子発現を低下させるように改変されている。
【０１８２】
一部の実施形態では、改変は、（ａ）遺伝子発現を増大させ、（ｂ）遺伝子が、改変により遺伝子発現が低下するＢｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２である場合を除いて遺伝子発現を増大させる。
【０１８３】
いくつかの実施形態によれば、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減する１つまたは複数の改変された遺伝子を含む細胞が提供されている。一部の実施形態では、細胞は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１／２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、およびＰａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲから選択される１つまたは複数の改変された遺伝子を含み、ここで、改変により遺伝子発現が増大または低下し、一部の実施形態では、それを増大させ、一部の実施形態では、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２の遺伝子発現が低減され、一部の実施形態では、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルも低減される。
【０１８４】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ａｕｈであり、またはＢｃａｔ１であり、またはＢｃａｔ２であり、またはＢｃａｔ１およびＢｃａｔ２であり、またはＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄのうちの１つまたは複数であり、例えば、Ａｕｈおよび／もしくはＢｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２と組み合わせてもよい、Ｍｃｃｃ１もしくはＭｃｃｃ２もしくはＩｖｄであり、またはＡｕｈならびに１つもしくは複数のＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄであり、またはＢｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２と組み合わせてもよいＡｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄである。前記実施形態の一部の実施形態では、遺伝子の突然変異によって、一部の実施形態では、任意選択により発現可能ベクターとして細胞内に野生型遺伝子のコピーの導入によって、１つまたは複数の遺伝子は、遺伝子発現を増大させるように改変される。一部の実施形態では、Ａｕｈ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって、一部の実施形態では、突然変異によって、代わりに両方によって増大させることができる。一部の実施形態では、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ遺伝子発現は、突然変異によって、一部の実施形態では、野生型遺伝子のコピーの導入によって、代わりに両方によって増大させることができる。一部の実施形態では、Ａｕｈ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって、かつ／またはＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄ遺伝子発現は、突然変異によって増大する。一部の実施形態では、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２の遺伝子発現は、遺伝子ノックダウンまたはノックアウトによって低減され、一部の実施形態では、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２ノックダウンは、非改変細胞と比較して、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２発現または活性の９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５、２．５パーセントレベルのいずれか未満であり、またはいずれかに等しいまでにする。一部の実施形態では、１つまたは複数の改変遺伝子は、（ａ）Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１、Ｆａｈ、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ｂｃｋｄｈａ／ｂ、Ｄｂｔ／Ｄｌｄ、Ｉｖｄ、Ａｃａｄｍ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ａｕｈ、Ｈｍｇｃｌ、Ｆａｓｎ、Ｆａｓｎ、（ｂ）Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｍｉｆ、Ｇｏｔ１、Ｇｏｔ２、Ｎｕｐ６２－ｉｌ４ｉ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、Ｇｓｔｚ１、Ｆａｈ、（ｃ）Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ｂｃｋｄｈａ／ｂ、Ｄｂｔ／Ｄｌｄ、Ｉｖｄ、Ａｃａｄｍ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ａｕｈ、Ｈｍｇｃｌ、Ｆａｓｎ、Ｆａｓｎ、（ｄ）Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、ＨｇｄおよびＰａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲから選択され、改変により遺伝子発現が増大または低下する。

【０１８５】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、ＰａｈおよびもしくはＰＣＢＤ１およびもしくはＱＤＰＲであり、またはＨｐｄおよびＨｇｄの１つもしくは複数であり、例えば、ＨｐｄもしくはＨｇｄであり、ＰａｈおよびまたはＰＣＢＤ１およびまたはＱＤＰＲと組み合わせてもよく、またはＰａｈならびにＨｐｄおよびＨｇｄの１つもしくは複数であり、Ｐａｈ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄである。一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、（ｉ）ＰＣＢＤ１、（ｉｉ）Ｐａｈ、（ｉｉｉ）ＱＤＰＲ、（ｉｖ）ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ、（ｖ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、（ｖｉ）ＰａｈおよびＱＤＰＲ、（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、ならびにＱＤＰＲ、（ｖｉｉｉ）（ｉ）～（ｖｉｉ）のいずれか、ならびにＨｐｄおよびまたはＨｇｄから選択される。前記実施形態の一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、遺伝子発現を増大させるように改変される。一部の実施形態では、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ遺伝子発現のいずれか１つまたは複数は、野生型遺伝子のコピーの導入によって、一部の実施形態では、突然変異によって、代わりに両方によって増大させることができる。一部の実施形態では、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大する。一部の実施形態では、ＨｐｄおよびＨｇｄ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大する。一部の実施形態では、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、および／またはＱＤＰＲ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大する。

【０１８６】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄである。一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲである。一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、ならびにＨｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲである。前記実施形態の一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、野生型遺伝子のコピーの導入の関連した方法によって、突然変異によって、代わりに両方によって遺伝子発現を増大させるように改変される。一部の実施形態では、Ａｕｈ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大し、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ遺伝子発現は、突然変異によって増大する。

【０１８７】
本発明はさらに、細胞を産生する方法によって得られる、または得ることが可能な細胞を提供する。一部の実施形態では、細胞は、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減する１つまたは複数の改変遺伝子を含む。一部の実施形態では、細胞は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、およびＰａｈ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲから選択される１つまたは複数の改変遺伝子を含み、改変により遺伝子発現が増大または低下する。一部の実施形態では、遺伝子発現が増大する。一部の実施形態では、細胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルも低減される。

【０１８８】
細胞を産生する方法によって得られる細胞の一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ａｕｈであり、またはＢｃａｔ１であり、またはＢｃａｔ２であり、またはＢｃａｔ１およびＢｃａｔ２であり、またはＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄのうちの１つまたは複数であり、例えば、Ａｕｈおよび／もしくはＢｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２と組み合わせてもよい、Ｍｃｃｃ１もしくはＭｃｃｃ２もしくはＩｖｄであり、またはＡｕｈならびに１つもしくは複数のＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄであり、またはＢｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２と組み合わせてもよいＡｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄである。前記実施形態の一部の実施形態では、遺伝子の突然変異によって、一部の実施形態では、任意選択により発現可能ベクターとして

細胞内に野生型遺伝子のコピーの導入によって、１つまたは複数の遺伝子は、遺伝子発現を増大させるように改変される。一部の実施形態では、Ａｕｈ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって、一部の実施形態では、突然変異によって、代わりに両方によって増大させることができる。一部の実施形態では、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ遺伝子発現は、突然変異によって、一部の実施形態では、野生型遺伝子のコピーの導入によって、代わりに両方によって増大させることができる。一部の実施形態では、Ａｕｈ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって、かつ／またはＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄ遺伝子発現は、突然変異によって増大する。一部の実施形態では、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２の遺伝子発現は、遺伝子ノックダウンまたはノックアウトによって低減され、一部の実施形態では、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２ノックダウンは、非改変細胞と比較して、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２発現または活性の９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５、２．５パーセントレベルのいずれか未満であり、またはいずれかに等しいまでにする。

【０１８９】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、ＰａｈおよびＰＣＤＢ１および／もしくはＱＤＰＲであり、またはＨｐｄおよびＨｇｄの１つもしくは複数であり、例えば、ＨｐｄもしくはＨｇｄであり、Ｐａｈおよび／またはＰＣＤＢ１および／またはＱＤＰＲと組み合わせてもよく、またはＰａｈならびにＨｐｄおよびＨｇｄの１つもしくは複数であり、Ｐａｈ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄである。一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、（ｉ）ＰＣＤＢ１、（ｉｉ）Ｐａｈ、（ｉｉｉ）ＱＤＰＲ、（ｉｖ）ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ、（ｖ）ＰＣＢＤ１およびＰａｈ、（ｖｉ）ＰａｈおよびＱＤＰＲ、（ｖｉｉ）ＰＣＤＢ１およびＰａｈ、ならびにＱＤＰＲ、（ｖｉｉｉ）（ｉ）～（ｖｉｉ）のいずれか、ならびにＨｐｄおよび／またはＨｇｄから選択される。前記実施形態の一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、遺伝子発現を増大させるように改変される。一部の実施形態では、Ｐａｈ、ＰＣＤＢ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって、一部の実施形態では、突然変異によって、代わりに両方によって増大させることができる。一部の実施形態では、Ｐａｈ、ＰＣＤＢ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大する。一部の実施形態では、ＨｐｄおよびＨｇｄ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大する。一部の実施形態では、Ｐａｈ、ＰＣＤＢ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大する。

【０１９０】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄである。一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、ＰＣＤＢ１、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲである。一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２、Ｐａｈ、ＰＣＤＢ１、Ｈｐｄ、ならびにＨｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲである。前記実施形態の一部の実施形態では、１つまたは複数の遺伝子は、野生型遺伝子のコピーの導入の関連した方法によって、突然変異によって、代わりに両方によって遺伝子発現を増大させるように改変される。一部の実施形態では、Ａｕｈ遺伝子発現は、野生型遺伝子のコピーの導入によって増大し、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、ＰＣＤＢ１、ＱＤＰＲ、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ遺伝子発現は、突然変異によって増大する。

【０１９１】

一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、Ｂｃａｔ１、Ｂｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、およびＰａｈから選択され、改変は、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、ＰＣＢＤ１、ＱＤＰＲ、およびＰａｈの１つもしくは複数の遺伝子発現を増大させ、かつ／またはＢｃａｔ１もしくはＢｃａｔ２の遺伝子発現を低減し、かつ／または細

胞による増殖および／または産生性インヒビターの合成のレベルを低減する。
【０１９２】
一部の実施形態では、改変された１つまたは複数の遺伝子は、（ｉ）Ａｕｈ、（ｉｉ）Ｂｃａｔ１、（ｉｉｉ）Ｂｃａｔ２、（ｉｖ）Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄの１つもしくは複数、（ｖ）Ｂｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２および／もしくはＡｕｈ、ならびに１つもしくは複数のＭｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、およびＩｖｄ、（ｖｉ）Ｐａｈ、（ｖｉｉ）ＰＣＢＤ１、（ｖｉｉｉ）ＰＣＢＤ１および／もしくはＱＤＰＲ、（ｉｘ）ＨｐｄおよびＨｇｄの１つもしくは複数、（ｘ）Ｐａｈおよび／もしくはＰＣＢＤ１、ならびにＨｐｄおよびＨｇｄの１つもしくは複数、（ｘｉ）ＰａｈおよびＰＣＢＤ１、ならびに任意選択によりＱＤＰＲ、（ｘｉｉ）Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、およびＨｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲ、（ｘｉｉｉ）Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、ならびにＩｖｄ、または（ｘｉｖ）Ｂｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２、Ａｕｈ、Ｍｃｃｃ１、Ｍｃｃｃ２、Ｉｖｄ、Ｐａｈ、ＰＣＢＤ１、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、ならびに任意選択によりＱＤＰＲ、（ｘｖ）Ｂｃａｔ１および／もしくはＢｃａｔ２である。一部の実施形態では、改変は、（ａ）遺伝子発現を増大させ、（ｂ）遺伝子が、改変により遺伝子発現が低下するＢｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２である場合を除いて遺伝子発現を増大させ、任意選択によりＢｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２ノックダウンは、非改変細胞と比較して、Ｂｃａｔ１および／またはＢｃａｔ２発現または活性の９０、８０、７０、６０、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５、２．５パーセントレベルいずれか未満であり、またはいずれかに等しいまでにする。一実施形態では、細胞は、組換えタンパク質または異種組換えタンパク質を発現する。
【０１９３】
細胞
細胞培養に感受性の任意の細胞を本発明により利用することができる。一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。本発明によって使用され得る哺乳動物細胞の非限定的な例としては、ＢＡＬＢ／ｃマウス骨髄腫株（ＮＳＯ／ｌ、ＥＣＡＣＣ番号：８５１１０５０３）；ヒト網膜芽細胞（ＰＥＲ．Ｃ６、ＣｒｕＣｅｌｌ、Ｌｅｉｄｅｎ、オランダ）；ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚腎臓株（懸濁培養で増殖させるためにサブクローニングされた２９３または２９３細胞、Ｇｒａｈａｍら、Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．、３６：５９、１９７７）；仔ハムスター腎細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞＋／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、ＵｒｌａｕｂおよびＣｈａｓｉｎ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７：４２１６、１９８０）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Ｍａｔｈｅｒ、Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．、２３：２４３～２５１、１９８０）；サル腎細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）；アフリカミドリザル腎細胞（ベロ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１　５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨｅＬａ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）；イヌ腎細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）；バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）；ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨＢ　８０６５）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；トリ細胞（Ｍａｔｈｅｒら、Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、３８３：４４～６８、１９８２）；ＭＲＣ　５細胞；ＦＳ４細胞；およびヒト肝細胞癌株（Ｈｅｐ　Ｇ２）がある。一部の好適な実施形態では、細胞は、ＣＨＯ細胞である。一部の好適な実施形態では、細胞は、ＧＳ細胞である。
【０１９４】
さらに、任意の数の市販および非市販のハイブリドーマ細胞株を本発明によって利用することができる。用語「ハイブリドーマ」は、本明細書では、不死化細胞および抗体産生細胞の融合から生じる細胞または細胞の子孫を指す。このような結果として生じるハイブリドーマは、抗体を産生する不死化細胞である。ハイブリドーマを創製するのに使用される個々の細胞は、それだけに限らないが、ラット、ブタ、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、お

よびヒトを含めた任意の哺乳動物細胞源であり得る。一部の実施形態では、ハイブリドーマは、ヒト細胞とネズミ骨髄腫細胞株との融合の産物であるヘテロハイブリッド骨髄腫融合の子孫が、血漿細胞と引き続いて融合されるとき生じるトリオーマ細胞株である。一部の実施形態では、ハイブリドーマは、例えば、クアドローマなどの抗体を産生する任意の不死化ハイブリッド細胞株である（例えば、Ｍｉｌｓｔｅｉｎら、Ｎａｔｕｒｅ、５３７：３０５３、１９８３を参照）。ハイブリドーマ細胞株は、異なる栄養要件を有し得、かつ／または最適な増殖のために異なる培養条件を要求し得、必要に応じ、条件を改変できることになることを当業者は察知するであろう。

【０１９５】

細胞培養培地または細胞（細胞ペレット試料）内の代謝濃度を同定および／または測定することを含む方法

代謝産物を同定することができ、かつ／または代謝産物の濃度を、オフラインおよびオンライン測定法を含めた当業者に公知の任意の方法によって測定することができ、このような測定もメタボローム解析またはメタボローム測定を構成する。細胞培養培地または細胞の試料、例えば、細胞ペレットに適用される。

【０１９６】

代謝産物の同定および／または濃度は、細胞培養中に１回または複数回、測定することができる。一部の実施形態では、代謝産物濃度は、連続的に、間欠的に、３０分毎、毎時間、２時間毎、１日２回、毎日、または２日毎に測定される。好適な実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、毎日測定される。

【０１９７】

オフライン測定方法は、本明細書では、濃度などのパラメータの測定が、細胞培養法に対して自動化および一体化されていない方法を指す。例えば、具体的な濃度を前記試料中で測定することができるように細胞培養培地から試料が手作業で採取される測定法は、オフライン測定法とみなされる。

【０１９８】

オンライン測定法は、本明細書では、濃度などのパラメータの測定が、細胞培養法に対して自動化および一体化されている方法を指す。

【０１９９】

例えば、実施例７に開示されたラマン分光法を使用する方法は、オンライン測定法である。代替として、プログラムされた様式で反応器から試料を引き出し、装置にこれを移すオートサンプラーを伴った高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）または超高性能液体クロマトグラフィー（ＵＰＬＣ）に基づく技術の使用は、オンライン測定法である。

【０２００】

代謝産物の同定および／または濃度は、当業者に公知の任意の方法によって測定することができる。オンラインまたはオフライン法で代謝産物の濃度を同定および／または測定する好適な方法としては、例えば、液体クロマトグラフィー、例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、超高性能液体クロマトグラフィー（ＵＰＬＣ）、もしくは液体クロマトグラフィー－質量分析（ＬＣＭＳ）など、核磁気共鳴（ＮＭＲ）、またはガスクロマトグラフィー－質量分析（ＧＣＭＳ）がある。

【０２０１】

一部の実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、細胞培養培地の試料を採取し、前記試料中の前記少なくとも１種の代謝産物の濃度を測定することによってオフラインで測定される。一部の実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、実施例２に開示されている通り測定される。オフライン法で代謝産物の同定および／または濃度を測定する好適な方法は、ＬＣＭＳである。

【０２０２】

一部の実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、オンラインで測定される。一部の実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、ラマン分光法を使用してオンラインで測定される。一部の実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、実

施例７に開示されたラマン分光法を使用してオンラインで測定される。一部の実施形態では、代謝産物の同定および／または濃度は、プログラムされた様式で反応器から試料を引き出し、装置にこれを移すオートサンプラーを伴ったＨＰＬＣまたはＵＰＬＣに基づく技術を使用してオンラインで測定される。代謝産物の同定は、代謝産物の存在および／または同一性を判定することを含む。

【０２０３】

細胞増殖および産生性の改善

上述した方法の一部の実施形態では、細胞増殖および／または産生性は、対照培養と比較して増大し、前記対照培養は、ステップ（ｉｉ）および／もしくは（ｉｉｉ）を含まず、かつ／または細胞を産生する方法によって産生される改変細胞または細胞を含まない、すなわち細胞が非改変であることを除いて同一である。

【０２０４】

上述した方法の一部の実施形態では、本発明の方法は、細胞増殖を改善するための方法である。一部の実施形態では、本発明の方法は、高細胞密度での高密度細胞培養において細胞増殖を改善するための方法である。

【０２０５】

高細胞密度は、本明細書では、１×１０^{6}細胞／ｍＬ、５×１０^{6}細胞／ｍＬ、１×１０^{7}細胞／ｍＬ、５×１０^{7}細胞／ｍＬ、１×１０^{8}細胞／ｍＬもしくは５×１０^{8}細胞／ｍＬ超、好ましくは１×１０^{7}細胞／ｍＬ超、より好ましくは５×１０^{7}細胞／ｍＬ超の細胞密度を指す。

【０２０６】

一部の実施形態では、上述した方法は、細胞密度が１×１０^{6}細胞／ｍＬ、５×１０^{6}細胞／ｍＬ、１×１０^{7}細胞／ｍＬ、５×１０^{7}細胞／ｍＬ、１×１０^{8}細胞／ｍＬ、または５×１０^{8}細胞／ｍＬ超である細胞培養において細胞増殖を改善するためである。一部の実施形態では、方法は、最大細胞密度が１×１０^{6}細胞／ｍＬ、５×１０^{6}細胞／ｍＬ、１×１０^{7}細胞／ｍＬ、５×１０^{7}細胞／ｍＬ、１×１０^{8}細胞ｓ／ｍＬ、または５×１０^{8}細胞／ｍＬ超である細胞培養における細胞増殖を改善するためである。

【０２０７】

一部の実施形態では、細胞増殖は、生存細胞密度（ＶＣＤ）、最大生存細胞密度、または積算生細胞数（ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ｖｉａｂｌｅ　ｃｅｌｌ　ｃｏｕｎｔ）（ＩＶＣＣ）によって判定される。一部の実施形態では、細胞増殖は、最大生存細胞密度によって判定される。

【０２０８】

用語「生存細胞密度」は、本明細書では、所与の体積の培地中に存在する細胞の数を指す。生存細胞密度は、当業者に公知の任意の方法によって測定することができる。好ましくは、生存細胞密度は、Ｂｉｏｐｒｏｆｉｌｅ　Ｆｌｅｘ（登録商標）などの自動細胞計数器を使用して測定される。用語最大細胞密度は、本明細書では、細胞培養中に実現される最大細胞密度を指す。用語「細胞生存能」本明細書では、培養液中の細胞が所与のセットの培養条件または実験的変動下で生存する能力を指す。当業者は、細胞生存能を判定するための多くの方法の１つは、本発明において包含されていることを察知するであろう。例えば、細胞生存能を判定するために生細胞の膜を通過しないが、死細胞または瀕死細胞の破壊された膜を通過することができる色素（例えば、トリパンブルー）を使用することができる。

【０２０９】

用語「積算生細胞数（ＩＶＣＣ）」は、本明細書では、生存細胞密度（ＶＣＤ）曲線下面積を指す。ＩＶＣＣは、以下の式を使用して計算することができる：

$IVCC_{t+1} = IVCC_{t} + (VCD_{t} + VCD_{t+1}) * (\Delta t) / 2$

式中、Δｔは、ｔ時点とｔ＋１時点との間の時差であり、$IVCC_{t=0}$は無視できると仮定することができる。VCD_{t}およびVCD_{t+1}は、ｔおよびｔ＋１時点での生存細胞密度である。

【０２１０】
用語「力価」は、本明細書では、例えば、所与の量の培地体積中の細胞培養によって産生される組換え発現タンパク質の合計量を指す。力価は、典型的には、培地１リットル当たりのタンパク質グラム単位で表現される。
【０２１１】
上述した方法の一部の実施形態では、細胞増殖は、対照培養と比較して少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、または２５％増大する。一部の実施形態では、細胞増殖は、対照培養と比較して少なくとも１０％増大する。一部の実施形態では、細胞増殖は、対照培養と比較して少なくとも２０％増大する。
【０２１２】
上述した方法の一部の実施形態では、産生性は、力価および／または体積生産性によって判定される。
【０２１３】
用語「力価」は、本明細書では、例えば、所与の量の培地体積中の細胞培養によって産生される組換え発現タンパク質の合計量を指す。力価は、典型的には、培地１リットル当たりのタンパク質グラム単位で表現される。
【０２１４】
上述した方法の一部の実施形態では、産生性は、力価によって判定される。一部の実施形態では、産生性は、対照培養と比較して少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、または２５％増大する。一部の実施形態では、産生性は、対照培養と比較して少なくとも１０％増大する。一部の実施形態では、産生性は、対照培養と比較して少なくとも２０％増大する。
【０２１５】
上述した方法の一部の実施形態では、細胞培養の最大細胞密度は、1×10^6細胞／ｍＬ、5×10^6細胞／ｍＬ、1×10^7細胞／ｍＬ、5×10^7細胞／ｍＬ、1×10^8細胞／ｍＬ、または5×10^8細胞／ｍＬ超である。一部の実施形態では、細胞培養の最大細胞密度は、5×10^6細胞／ｍＬ超である。一部の実施形態では、細胞培養の最大細胞密度は、1×10^8細胞／ｍＬ超である。
【０２１６】
細胞培養培地
用語「培地」、「細胞培養培地」、および「培養培地」は、本明細書では、増殖中の哺乳動物細胞に栄養を与えるコンポーネントまたは栄養分を含有する溶液を指す。典型的には、栄養分としては、最小限の増殖および／または生存のために細胞が要求する必須および非必須アミノ酸、ビタミン、エネルギー源、脂質、ならびに微量元素がある。このような溶液は、それだけに限らないが、ホルモンおよび／または他の増殖因子、特定イオン（ナトリウム、塩化物、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸など）、緩衝液、ビタミン、ヌクレオシド、もしくはヌクレオチド、微量元素（非常に低い最終濃度で通常存在する無機化合物）、高最終濃度で存在する無機化合物（例えば、鉄）、アミノ酸、脂質、および／もしくはグルコース、または他のエネルギー源を含めた最小限の割合を超える増殖および／または生存を増強するさらなる栄養分または追加のコンポーネントも含有する。一部の実施形態では、培地は、細胞生存および増殖に最適なｐＨおよび塩濃度に有利には配合される。一部の実施形態では、培地は、細胞培養が始まった後に添加されるフィード培地である。
【０２１７】
多種多様な哺乳動物増殖培地を本発明によって使用することができる。一部の実施形態では、細胞は、様々な化学的に定義された培地の１つの中で増殖され、培地のコンポーネントは、ともに公知であり制御される。一部の実施形態では、細胞は、培地のすべてのコンポーネントが公知であるわけはなく、かつ／または制御されるわけではない複雑な培地中で増殖され得る。
【０２１８】

哺乳動物細胞培養用の化学的に定義された増殖培地は、過去数十年にわたって広範に開発および公開されてきた。定義された培地のすべてのコンポーネントは、十分特徴付けられており、定義された培地は、複雑な付加物、例えば、血清または加水分解物などを含有しない。初期の培地処方は、タンパク質産生にほとんどまたはまったく関心がなく細胞増殖および生存能の維持を可能にするために開発された。より最近、培地処方は、高度に生産的な組換えタンパク質産生細胞培養液をサポートする明確な目的で開発された。このような培地は、本発明の方法において使用するのに好適である。このような培地は一般に、高密度での細胞の増殖および／または維持をサポートするために高い量の栄養分、特にアミノ酸を含む。必要であれば、これらの培地は、本発明の方法において使用するために当業者によって改変することができる。例えば、当業者は、本明細書に開示の方法において基本培地またはフィード培地としてこれらを使用するためにこれらの培地中でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、および／またはメチオニンの量を低下させることができる。

【０２１９】

複合培地のすべてのコンポーネントが十分に特徴付けられているわけではなく、したがって複合培地は、付加物、例えばとりわけ、単純なおよび／または複雑な炭素供給源、単純なおよび／または複雑な窒素供給源、ならびに血清などを含有し得る。一部の実施形態では、本発明に適した複合培地は、本明細書に記載の定義された培地の他のコンポーネントに加えて、加水分解物などの付加物を含有する。

【０２２０】

一部の実施形態では、定義された培地は典型的には、水中に既知の濃度でおおよそ５０の化学エンティティまたはコンポーネントを含む。これらのほとんどは、１種または複数のよく特徴づけられたタンパク質、例えば、インスリン、ＩＧＦ－１、トランスフェリン、またはＢＳＡなども含有するが、その他は、タンパク質コンポーネントを必要とせず、したがってタンパク質を含まない定義された培地と呼ばれる。培地の典型的な化学コンポーネントは、５つの広いカテゴリー：アミノ酸、ビタミン、無機塩、微量元素、およびきちんとした分類をしにくい多岐にわたるカテゴリーに入る。

【０２２１】

細胞培養培地に追加のコンポーネントを補充してもよい。用語「追加コンポーネント」は、本明細書では、それだけに限らないが、ホルモンおよび／または他の増殖因子、特定イオン（ナトリウム、塩化物、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸など）、緩衝液、ビタミン、ヌクレオシド、もしくはヌクレオチド、微量元素（非常に低い最終濃度で通常存在する無機化合物）、アミノ酸、脂質、および／またはグルコース、または他のエネルギー源を含めた最小限の割合を超える増殖および／または生存を増強するさらなるコンポーネントを指す。一部の実施形態では、追加コンポーネントは、最初の細胞培養液に添加してもよい。一部の実施形態では、追加コンポーネントは、細胞培養が始まった後に添加することができる。

【０２２２】

典型的には、微量元素であるコンポーネントは、マイクロモルまたはより低いレベルで含まれる様々な無機塩を指す。例えば、一般に含まれる微量元素は、亜鉛、セレン、銅などである。一部の実施形態では、鉄（第一鉄または第二鉄塩）は、マイクロモル濃度で最初の細胞培養培地中に微量元素として含めることができる。マンガンは、ナノモル～マイクロモル濃度の範囲内で二価陽イオン（$MnCl_2$または$MnSO_4$）として微量元素の中でも頻繁に含められる。多数のあまり一般的ではない微量元素は、通常、ナノモル濃度で添加される。

【０２２３】

一部の実施形態では、本発明の方法で使用される培地は、細胞培養液中で高細胞密度、例えば、1×10^6細胞／ｍＬ、5×10^6細胞／ｍＬ、1×10^7細胞／ｍＬ、5×10^7細胞／ｍＬ、1×10^8細胞／ｍＬ、または5×10^8細胞／ｍＬなどをサポートするのに適した培地である。一部の実施形態では、細胞培養液は、哺乳動物細胞フェドバッチ

培養、好ましくはＣＨＯ細胞フェドバッチ培養である。
【０２２４】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１および２ｍＭの間、０．１から１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニンを含む。
【０２２５】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でチロシンを含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、チロシンを含まない。一部の実施形態では、細胞培養培地は、ＨｉＰＤＯＧ培地、ＨｉＰＤＯＧプロセスで使用されるがチロシンを含まない培地である。一部の実施形態では、細胞培養培地は、チロシンを含まないＨｉＰＤＯＧ培養またはプロセスが使用される。
【０２２６】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でトリプトファンを含む。
【０２２７】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でメチオニンを含む。
【０２２８】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でロイシンを含む。
【０２２９】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でイソロイシンを含む。
【０２３０】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でバリンを含む。
【０２３１】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でセリンを含む。
【０２３２】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でトレオニンを含む。
【０２３３】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でグリシンを含む。
【０２３４】
一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンのうちの２種を含む。
【０２３５】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニンおよびチロシンを含む。

【０２３６】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニンおよびトリプトファンを含む。

【０２３７】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニンおよびメチオニンを含む。

【０２３８】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でチロシンおよびトリプトファンを含む。

【０２３９】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でチロシンおよびメチオニンを含む。

【０２４０】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でトリプトファンおよびメチオニンを含む。

【０２４１】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシンのうちの３種を含む。

【０２４２】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンを含む。

【０２４３】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、およびメチオニンを含む。

【０２４４】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。

【０２４５】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でチロシン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。

【０２４６】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンのうちの４種を含む。

【０２４７】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニンを含む。

【０２４８】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンのうちの５種を含む。

【０２４９】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンのうちの６種を含む。

【０２５０】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンのうちの７種を含む。

【０２５１】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ未満、１ｍＭ未満、０．１から２ｍＭの間、０．１～１ｍＭの間、０．５から１．５ｍＭの間、または０．５～１ｍＭの間の濃度でフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、トレオニン、およびグリシンを含む。

【０２５２】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭを超える濃度、好ましくは２ｍＭでグリシン、プロリン、セリン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、または９種をさらに含む。

【０２５３】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭを超える濃度、好ましくは２ｍＭで、グリシン、プロリン、セリン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの少なくとも５種をさらに含む。

【０２５４】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭを超える濃度、好ましくは２ｍＭでグリシン、プロリン、セリン、トレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンをさらに含む。

【０２５５】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭを超える濃度、好ましくは２ｍＭでプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの少なくとも１、２、３、４、５、６、または７種をさらに含む。

【０２５６】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭを超える濃度、好ましくは２ｍＭでプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンのうちの少なくとも５種をさらに含む。

【０２５７】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、１

５ｍＭを超える濃度、好ましくは２ｍＭでプロリン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、およびアスパラギンをさらに含む。

【０２５８】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、３ｍＭ、５ｍＭ、７ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭ、または２０ｍＭを超える濃度、好ましくは１０ｍＭでセリンを含む。

【０２５９】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、３ｍＭ、５ｍＭ、７ｍＭ、１０ｍＭ、１５ｍＭ、または２０ｍＭを超える濃度、好ましくは１０ｍＭでシステインを含む。

【０２６０】

一部の実施形態では、上記細胞培養培地は、本明細書に開示の方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、上記細胞培養培地は、基本培地として本明細書に開示の方法において使用される。一部の実施形態では、上記細胞培養培地は、フィード培地として本明細書に開示の方法において使用される。

【０２６１】

タンパク質の発現

上述したように、多くの事例において、細胞は、高レベルの所望産物（例えば、組換えタンパク質または抗体）を産生するように選択または操作されることになる。多くの場合、細胞は、例えば、目的のタンパク質をコードする遺伝子の導入および／またはその遺伝子（内因性であっても導入されたものであっても）の発現を調節する遺伝子制御エレメントの導入によって高レベルの組換えタンパク質を産生するように人の手によってマニピュレートされることになる。

【０２６２】

ある特定のタンパク質は、細胞増殖、細胞生存能に対する有害効果、または何らかのやり方で目的のタンパク質の産生を最終的に制限する細胞の一部の他の特性を有し得る。特異的タンパク質を発現するように操作された一特定タイプの細胞の集団の中でさえ、細胞集団内でばらつきが存在し、その結果、ある特定の個々の細胞はより良好に増殖し、より多くの目的のタンパク質を産生し、またはより高い活性レベル（例えば、酵素活性）を有するタンパク質を産生することになる。本発明のある特定の実施形態では、細胞株は、細胞を培養するために選択された特定の条件下でロバストな増殖のために専門家によって経験的に選択される。一部の実施形態では、特定のタンパク質を発現するように操作された個々の細胞は、細胞増殖、最終細胞密度、パーセント細胞生存能、発現タンパク質の力価、もしくはこれらの任意の組合せ、または専門家が重要とみなす任意の他の条件に基づいて大規模生産のために選択される。

【０２６３】

宿主細胞内で発現可能である任意のタンパク質を、本教示に従って産生することができ、本発明の方法によって、または本発明の細胞によって産生することができる。用語「宿主細胞」は、本明細書では、本明細書に記載の目的のタンパク質を産生するように本発明によってマニピュレートされた細胞を指す。タンパク質は、細胞にとって内因性である遺伝子から、または細胞内に導入された異種遺伝子から発現させることができる。タンパク質は、自然界に存在するものであり得、または代わりに、人の手で操作または選択された配列を有し得る。

【０２６４】

本発明によって望ましくは発現され得るタンパク質は、興味あるまたは有用な生物学的または化学的活性に基づいて選択されることになることが多いであろう。例えば、本発明は、任意の薬学的または商業的に関連した酵素、受容体、抗体、ホルモン、調節因子、抗原、結合剤などを発現させるのに使用され得る。一部の実施形態では、培養液中の細胞によって発現されるタンパク質は、抗体もしくはその断片、ナノボディ、単一ドメイン抗体、糖タンパク質、治療タンパク質、増殖因子、凝固因子、サイトカイン、融合タンパク質、医薬物質、ワクチン、酵素、またはＳｍａｌｌ　Ｍｏｄｕｌａｒ　ＩｍｍｕｎｏＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（商標）（ＳＭＩＰ）から選択される。当業者は、本発明によって

任意のタンパク質が発現され得ることを理解することになり、または当業者の特定の必要に基づいて産生される特定のタンパク質を選択することができることになる。

【０２６５】

抗体

医薬剤または他の商業的作用物質として現在使用中または調査下にある多数の抗体を考慮すると、抗体の産生は、本発明によれば特に目的とするものである。抗体は、特定抗原を特異的に結合させる能力を有するタンパク質である。宿主細胞内で発現され得る任意の抗体を、本発明によって産生することができ、本発明の方法によって、または本発明の細胞によって産生することができる。一部の実施形態では、発現される抗体は、モノクローナル抗体である。

【０２６６】

一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体は、１種を超える生物体に由来するアミノ酸断片を含有する。キメラ抗体分子は、例えば、マウス、ラット、または他の種由来の抗体からの抗原結合ドメインを含み得る。キメラ抗体を作製するための様々な手法が記載されている。例えば、Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８１、６８５１（１９８５）；Ｔａｋｅｄａら、Ｎａｔｕｒｅ、３１４、４５２（１９８５）、Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｂｏｓｓら、米国特許第４，８１６，３９７号；Ｔａｎａｇｕｃｈｉら、欧州特許公開ＥＰ１７１４９６号；欧州特許公開０１７３４９４号、英国特許第ＧＢ２１７７０９６Ｂ号を参照。

【０２６７】

一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、例えば、リボソームディスプレイもしくはファージディスプレイライブラリーの使用（例えば、Ｗｉｎｔｅｒら、米国特許第６，２９１，１５９号およびＫａｗａｓａｋｉ、米国特許第５，６５８，７５４号を参照）、または、天然抗体遺伝子が天然免疫系の他のコンポーネントをインタクトなままにしながら、不活化され、ヒト抗体遺伝子と機能的に置き換えられている異種移植種の使用によって導出されたヒト抗体である（例えば、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉら、米国特許第６，６５７，１０３号を参照）。

【０２６８】

一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、アミノ酸残基の大多数がヒト抗体に由来し、したがってヒト対象に送達されたときいずれの潜在的な免疫反応も最小限にするキメラ抗体である。ヒト化抗体では、相補性決定領域中のアミノ酸残基は、所望の抗原特異性または親和性を付与する非ヒト種由来の残基と少なくとも一部が置き換えられている。このような変更された免疫グロブリン分子は、当技術分野で公知のいくつかの技法（例えば、Ｔｅｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、８０、７３０８～７３１２（１９８３）；Ｋｏｚｂｏｒら、ＩｍｍｕｎｏｌｏｇｙＴｏｄａｙ、４、７２７９（１９８３）；Ｏｌｓｓｏｎら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．９２、３～１６（１９８２））のいずれかによって作製することができ、ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０６１９３号またはＥＰ０２３９４００の教示に従って好ましくは作製され、これらの文献のすべては、参照により本明細書に組み込まれている）。ヒト化抗体は、例えば、Ｓｃｏｔｇｅｎ Ｌｉｍｉｔｅｄ、２ Ｈｏｌｌｙ Ｒｏａｄ、Ｔｗｉｃｋｅｎｈａｍ、Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ、Ｇｒｅａｔ Ｂｒｉｔａｉｎによって商業的に生産することができる。さらなる参考文献について、Ｊｏｎｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ、３２１：５２２～５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３３２：３２３～３２９（１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．、２：５９３～５９６（１９９２）を参照。これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれている。

【０２６９】

一部の実施形態では、上述したモノクローナル、キメラ、またはヒト化抗体は、自然界における任意の種の中の任意の抗体中に自然に存在しないアミノ酸残基を含有し得る。これ

らの外来残基を利用して、例えば、モノクローナル、キメラ、またはヒト化抗体に新規のまたは改変された特異性、親和性、またはエフェクター機能を付与することができる。一部の実施形態では、上述した抗体は、全身薬物療法の薬物、例えば、毒素、低分子量細胞傷害性薬、生物学的応答調節剤、および放射性核種などにコンジュゲートされ得る（例えば、Ｋｕｎｚら、Ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ－ｃａｒｒｉｅｒ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ、ＵＳ２００４００８２７６４Ａ１を参照）。

【０２７０】

一般に、本発明の専門家は、目的のタンパク質を選択することになり、その正確なアミノ酸配列を知ることになる。本発明によって発現される任意の所与のタンパク質は、独自の特定の特性を有し得、培養細胞の細胞密度または生存能に影響し得、同一の培養条件下で増殖した別のタンパク質より低いレベルで発現され得、実施される正確な培養条件およびステップに応じて異なる生物活性を有し得る。当業者は、細胞増殖および任意の所与の発現タンパク質の産生および／または活性レベルを最適にするために、本発明の教示によって特定のタンパク質を産生するのに使用されるステップおよび組成物を適切に改変することができるであろう。

【０２７１】

宿主細胞内へのタンパク質の発現のための遺伝子の導入

一般に、本発明によって発現されることが望まれるタンパク質をコードする細胞内に導入される核酸分子は、本発明の方法によって、または本発明の細胞内にかつ本発明の細胞によって導入および発現され得る。代替として、核酸分子は、細胞による所望のタンパク質の発現を誘導する遺伝子産物をコードすることができる。例えば、導入される遺伝物質は、内因性または異種タンパク質の転写を活性化する転写因子をコードし得る。代替としてまたは追加的に、導入される核酸分子は、細胞によって発現されるタンパク質の翻訳または安定性を増大させることができる。

【０２７２】

哺乳動物宿主細胞内への目的のタンパク質の発現を実現するのに十分な核酸を導入するのに適した方法は、当技術分野で公知である。例えば、Ｇｅｔｈｉｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ、２９３：６２０～６２５、１９８１；Ｍａｎｔｅｉら、Ｎａｔｕｒｅ、２８１：４０～４６、１９７９；Ｌｅｖｉｎｓｏｎら、ＥＰ１１７，０６０；およびＥＰ１１７，０５８を参照。これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれている。哺乳動物細胞について、哺乳動物細胞内に遺伝物質を導入する共通方法は、Ｇｒａｈａｍおよびｖａｎ ｄｅｒ Ｅｒｂのリン酸カルシウム沈殿法（Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２：４５６～４５７、１９７８）またはＨａｗｌｅｙ－Ｎｅｌｓｏｎのｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（商標）（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）法（Ｆｏｃｕｓ １５：７３、１９９３）を含む。哺乳動物細胞宿主系形質転換の一般的な側面は、１９８３年８月１６日に発行された米国特許第４，３９９，２１６号においてＡｘｅｌが記載している。哺乳動物細胞内に遺伝物質を導入するための様々な技法について、Ｋｅｏｗｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１９８９、Ｋｅｏｗｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１８５：５２７～５３７、１９９０、およびＭａｎｓｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ、３３６：３４８～３５２、１９８８を参照。核酸を導入するのに適した追加の方法としては、例えば、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ ＸＣｅｌｌ（商標）エレクトロポレーターを使用して利用されるＢｉｏＲａｄ（商標）による電気穿孔がある。

【０２７３】

一部の実施形態では、導入される核酸は、裸の核酸分子の形態にある。例えば、細胞内に導入される核酸分子は、タンパク質をコードする核酸および必要な遺伝子制御エレメントのみからなる場合がある。代替として、タンパク質をコードする核酸（必要な調節エレメントを含む）は、プラスミドベクター内に含有され得る。哺乳動物細胞内のタンパク質の発現に適したベクターの限定されない代表例としては、ｐＣＤＮＡ１；ｐＣＤ、Ｏｋａｙａｍａら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．５：１１３６～１１４２、１９８５を参照；ｐＭＣｌｎｅｏ Ｐｏｌｙ－Ａ、Ｔｈｏｍａｓら、Ｃｅｌｌ、５１：５０３～５１２、１９

８７を参照；バキュロウイルスベクター、例えば、ｐＡＣ３７３またはｐＡＣ６１０など；ＣＤＭ８、Ｓｅｅｄ、Ｂ．、Ｎａｔｕｒｅ、３２９：８４０、１９８７を参照；およびｐＭＴ２ＰＣ、Ｋａｕｆｍａｎら、ＥＭＢＯ Ｊ．６：１８７～１９５、１９８７を参照、がある。これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、細胞内に導入される核酸分子は、ウイルスベクター内に含有される。例えば、タンパク質をコードする核酸は、ウイルスゲノム（または部分的ウイルスゲノム）内に挿入され得る。タンパク質の発現を指示する調節エレメントは、ウイルスゲノム内に挿入される核酸とともに含まれ得（すなわち、ウイルスゲノム内への挿入遺伝子に連結した）、またはウイルスゲノムそれ自体によって提供することができる。

【０２７４】

裸のＤＮＡは、ＤＮＡおよびリン酸カルシウムを含有する沈殿物を形成することによって細胞内に導入することができる。代替として、裸のＤＮＡは、ＤＮＡおよびＤＥＡＥ－デキストランの混合物を形成し、細胞とともにインキュベートすることによって、または適切な緩衝液内に細胞およびＤＮＡを一緒にインキュベートし、細胞を高電圧電気パルスに付すことによって（例えば、電気穿孔によって）細胞内に導入することもできる。裸のＤＮＡ細胞を導入するためのさらなる方法は、ＤＮＡを、カチオン性脂質を含有するリポソーム懸濁液と混合することによるものである。次いでＤＮＡ／リポソーム複合体は、細胞とともにインキュベートされる。裸のＤＮＡは、例えば、マイクロインジェクションによって細胞内に直接注入することもできる。

【０２７５】

代替として、裸のＤＮＡは、ポリリシンなどのカチオンにＤＮＡを複合体形成させることによって細胞内に導入することもでき、それは、細胞表面受容体のリガンドにカップリングされる（例えば、Ｗｕ、Ｇ．およびＷｕ、Ｃ．Ｈ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６３：１４６２１、１９８８；Ｗｉｌｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６７：９６３～９６７、１９９２；および米国特許第５，１６６，３２０号を参照。これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている）。ＤＮＡ－リガンド複合体を受容体に結合させると、受容体媒介エンドサイトーシスによるＤＮＡの取込みが促進される。

【０２７６】

特定の核酸配列、例えば、ｃＤＮＡコードタンパク質を含有するウイルスベクターの使用は、核酸配列を細胞内に導入するための一般的な手法である。細胞にウイルスベクターを感染させることは、大きい割合の細胞が核酸を受け取るという利点を有し、それは、核酸を受けた細胞を選択するための必要性を取り除くことができる。さらに、例えば、ウイルスベクター内に含有されるｃＤＮＡによってウイルスベクター内でコードされる分子は、一般に、ウイルスベクター核酸を吸収した細胞内で効率的に発現される。

【０２７７】

欠損したレトロウイルスは、遺伝子療法目的のために遺伝子移入において使用するのに十分特徴付けられている（総説について、Ｍｉｌｌｅｒ、Ａ．Ｄ．、Ｂｌｏｏｄ、７６：２７１、１９９０を参照）。レトロウイルスゲノム内に挿入された目的のタンパク質をコードする核酸を有する組換えレトロウイルスを構築することができる。さらに、レトロウイルスゲノムの部分を除去してレトロウイルス複製を欠陥のあるモノにすることができる。このような複製欠陥のあるレトロウイルスは、次いでビリオン内にパッケージし、それを標準技法によってヘルパーウイルスを使用して標的細胞を感染させることができる。

【０２７８】

アデノウイルスのゲノムをマニピュレートすることができ、その結果それは、目的のタンパク質をコードおよび発現し、正常な溶解性ウイルスライフサイクル中で複製するその能力の観点から不活化されている。例えば、Ｂｅｒｋｎｅｒら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、６：６１６、１９８８；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５２：４３１～４３４、１９９１；およびＲｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｃｅｌｌ、６８：１４３～１５５、１９９２を参照。アデノウイルス菌株Ａｄ５型ｄｌ３２４、またはアデノウイルスの他の菌株（例えば、Ａｄ２、Ａｄ３、Ａｄ７など）に由来する適当なアデノウイルスベクターは

、当業者に公知である。組換えアデノウイルスは、これらが効率的な遺伝子送達ビヒクルとなるように細胞を分裂させることを必要とせず、気道上皮（上記に引用したＲｏｓｅｎｆｅｌｄら、１９９２）、内皮細胞（Ｌｅｍａｒｃｈａｎｄら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：６４８２～６４８６、１９９２）、肝実質細胞（ＨｅｒｚおよびＧｅｒａｒｄ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：２８１２～２８１６、１９９３）、および筋細胞（Ｑｕａｎｔｉｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：２５８１～２５８４、１９９２）を含めた多種多様な細胞型に感染するのに使用することができる点で有利である。さらに、導入されるアデノウイルスＤＮＡ（およびそれに含有される外来ＤＮＡ）は、宿主細胞のゲノム内に一体化されないが、エピソームを残し、それによりこの場合、導入されたＤＮＡは、宿主ゲノム（例えば、レトロウイルスＤＮＡ）内に一体化された状態になる状況において挿入突然変異誘発の結果として起こり得る潜在的な問題を回避する。さらに、外来ＤＮＡについてのアデノウイルスゲノムの運搬能力は、他の遺伝子送達ベクター（上記に引用したＢｅｒｋｎｅｒら；Ｈａｊ－ＡｈｍａｎｄおよびＧｒａｈａｍ、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、５７：２６７、１９８６）と相対的に大きい（最大で８キロベース）。現在使用中のほとんど複製欠損アデノウイルスベクターは、ウイルスＥ１およびＥ３遺伝子のすべてまたは一部について欠失されており、アデノウイルス遺伝物質の８０％もの多くを保持する。

【０２７９】

アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）は、効率的複製および生産的ライフサイクルのためのヘルパーウイルスとしてアデノウイルスまたはヘルペスウイルスなど別のウイルスを要求する天然に存在する欠陥ウイルスである（総説について、Ｍｕｚｙｃｚｋａら、Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐｉｃｓ ｉｎ Ｍｉｃｒｏ．ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５８：９７～１２９、１９９２を参照）。そのＤＮＡを非分裂細胞内に一体化させることができ、高い頻度の安定した一体化を呈する数ウイルスのうちの１つでもある（例えば、Ｆｌｏｔｔｅら、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、７：３４９～３５６、１９９２；Ｓａｍｕｌｓｋｉら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３：３８２２～３８２８、１９８９；およびＭｃＬａｕｇｈｌｉｎら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、６２：１９６３～１９７３、１９８９を参照）。ＡＡＶのわずか３００塩基対を含有するベクターは、パッケージすることができ、一体化することができる。外因性ＤＮＡの空間は、約４．５ｋｂに制限されている。Ｔｒａｔｓｃｈｉｎら（Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３２５１～３２６０、１９８５）に記載されたものなどのＡＡＶベクターは、細胞内にＤＮＡを導入するのに使用することができる。様々な核酸は、ＡＡＶベクターを使用して異なる細胞型内に導入された（例えば、Ｈｅｒｍｏｎａｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８１：６４６６～６４７０、１９８４；Ｔｒａｔｓｃｈｉｎら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．４：２０７２～２０８１、１９８５；Ｗｏｎｄｉｓｆｏｒｄら、Ｍｏｌ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２：３２～３９、１９８８；Ｔｒａｔｓｃｈｉｎら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．５１：６１１～６１９、１９８４；およびＦｌｏｔｔｅら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：３７８１～３７９０、１９９３を参照）。

【０２８０】

細胞の集団内に核酸分子を導入するのに使用される方法が大きな割合の細胞の改変および細胞によるタンパク質の効率的発現をもたらすとき、細胞の改変された集団を、集団内でさらに単離し、または個々の細胞をサブクローニングすることなく使用することができる。すなわち、細胞の集団によるタンパク質の十分な産生が存在し得、その結果、さらなる細胞単離を必要とせず、集団をタンパク質の産生のために直ちに使用して細胞培養液を播種することができる。代替として、タンパク質を効率的に産生する数細胞または単一細胞から細胞の均質集団を単離および拡張することが望ましい場合がある。

【０２８１】

目的のタンパク質をコードする細胞内に核酸分子を導入することの代替は、導入される核酸が、細胞によって内因的に産生されるタンパク質の発現のレベルを誘導し、または増大させる別のポリペプチドまたはタンパク質をコードし得る。例えば、細胞は、特定のタン

パク質を発現することができ、細胞に追加の処置をしないとそれを発現することに失敗し得る。同様に、細胞は、所望の目的に関して不十分な量のタンパク質を発現し得る。よって、目的のタンパク質の発現を刺激する作用物質を使用して、細胞によるそのタンパク質の発現を誘導し、または増大させることができる。例えば、導入される核酸分子は、目的のタンパク質の転写を活性化または上方調節する転写因子をコードし得る。このような転写因子の発現は、ひいては目的のタンパク質の発現またはよりロバストな発現に至る。

【０２８２】

ある特定の実施形態では、タンパク質の発現を指示する核酸は、宿主細胞内に安定に導入される。ある特定の実施形態では、タンパク質の発現を指示する核酸は、宿主細胞内に一過性に導入される。当業者は、実験的必要性に基づいて細胞内に核酸を安定または一過性に導入するか否かを選択することができるであろう。

【０２８３】

目的のタンパク質をコードする遺伝子は、１つまたは複数の調節遺伝子制御エレメントに連結されてもよい。ある特定の実施形態では、遺伝子制御エレメントは、タンパク質の構成的発現を指示する。ある特定の実施形態では、目的のタンパク質をコードする遺伝子の誘導性発現をもたらす遺伝子制御エレメントを使用することができる。誘導性遺伝子制御エレメント（例えば、誘導プロモーター）を使用すると、細胞内のタンパク質の産生のモジュレーションが可能になる。真核細胞内で使用するのに潜在的に有用な誘導性遺伝子制御エレメントの非限定的な例としては、ホルモン調節エレメント（例えば、Ｍａｄｅｒ、Ｓ．およびＷｈｉｔｅ、Ｊ．Ｈ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：５６０３～５６０７、１９９３を参照）、合成リガンド調節エレメント（例えば、Ｓｐｅｎｃｅｒ、Ｄ．Ｍ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ２６２：１０１９～１０２４、１９９３を参照）およびイオン化放射線調節エレメント（例えば、Ｍａｎｏｍｅ、Ｙ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ３２：１０６０７～１０６１３、１９９３；Ｄａｔｔａ、Ｒ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：１０１４９～１０１５３、１９９２を参照）がある。当技術分野で公知の追加の細胞特異的または他の調節システムを本発明によって使用してもよい。

【０２８４】

当業者は、細胞に本発明の教示によって目的のタンパク質を発現させる遺伝子を導入する方法を選択することができ、適切に改変してもよい。

【０２８５】

発現タンパク質の単離

一般に、本発明によって発現されるタンパク質を単離および／または精製することが典型的には望ましいことになる。ある特定の実施形態では、発現タンパク質は、培地中に分泌され、よって細胞および他の固体を、例えば、精製法における第１のステップとして遠心分離または濾過によって除去することができる。

【０２８６】

代替として、発現タンパク質は、宿主細胞の表面に結合され得る。例えば、培地を除去することができ、タンパク質を発現する宿主細胞が精製法における第１のステップとして溶解される。哺乳動物宿主細胞の溶解は、ガラスビーズによる物理的破壊および高ｐＨ条件への曝露を含めた当業者に周知の任意の数の手段によって実現することができる。

【０２８７】

発現タンパク質は、それだけに限らないが、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、サイズ排除、およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー）、ゲル濾過、遠心分離、もしくは示差溶解度、エタノール沈殿を含めた標準方法によって、かつ／またはタンパク質を精製するための任意の他の利用可能な技法によって単離および精製することができる（例えば、Ｓｃｏｐｅｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ、２版、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９８７；Ｈｉｇｇｉｎｓ、Ｓ．Ｊ．およびＨａｍｅｓ、Ｂ．Ｄ．（編）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、

Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖ Ｐｒｅｓｓ、１９９９；ならびにＤｅｕｔｓｃｈｅｒ、Ｍ．Ｐ．、Ｓｉｍｏｎ、Ｍ．Ｉ．、Ａｂｅｌｓｏｎ、Ｊ．Ｎ．（編）、Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｓｅｒｉｅｓ、１８２巻）、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９９７を参照。これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれている）。免疫親和性クロマトグラフィーについて、特に、タンパク質は、そのタンパク質に対して産生され、固定支持体に付けられた抗体を含むアフィニティーカラムにそれを結合することによって単離することができる。代替として、親和性タグ、例えば、インフルエンザコート配列、ポリ－ヒスチジン、またはグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼなどを、標準組換え技法によってタンパク質に付着させて適切なアフィニティーカラム上を通過させることによって容易な精製を可能にすることができる。プロテアーゼインヒビター、例えば、フェニルメチルフッ化スルホニル（ＰＭＳＦ）、ロイペプチン、ペプスタチン、またはアプロチニンなどを、精製法中のタンパク質の分解を低減または排除するために、任意かつすべての段階で添加してもよい。プロテアーゼインヒビターは、特に、発現タンパク質を単離および精製するために溶解されなければならないとき特に有利である。

【０２８８】

当業者は、正確な精製技法が、精製されるタンパク質の特徴、タンパク質が発現される細胞の特徴、および／または細胞が増殖されることに応じて培地の組成を変動することになることを察知するであろう。

【０２８９】

医薬製剤

本発明のある特定の好適な実施形態では、産生されるポリペプチドまたはタンパク質は、薬理的活性を有することになり、医薬品の調製において有用となる。上述した発明組成物は、対象に投与することができ、またはそれだけに限らないが、非経口（例えば、静脈内）、皮内、皮下、経口、経鼻、気管支、眼、経皮（局部的な）、経粘膜、直腸、および膣経路を含めた任意の利用可能な経路によって送達するために最初に製剤化することができる。本発明の医薬組成物は、典型的には、薬学的に許容できる担体と組み合わせて、哺乳動物細胞株から発現される精製されたポリペプチドまたはタンパク質、送達剤（すなわち、上述したカチオン性ポリマー、ペプチド分子トランスポーター、界面活性剤など）を含む。本明細書では、言い回し「薬学的に許容できる担体」は、薬剤投与に適合する溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。追加の活性化合物も組成物中に組み込んでもよい。

【０２９０】

医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように配合される。非経口、皮内、または皮下用途に使用される溶液または懸濁液は、以下のコンポーネント：滅菌希釈剤、例えば、注射用水、食塩液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒など；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなど；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；緩衝液、例えば、酢酸、クエン酸、またはリン酸など、および張性の調整のための作用物質、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどを含み得る。ｐＨは、酸または塩基、例えば、塩酸または水酸化ナトリウムなどで調整することができる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てのシリンジ、または複数回用量バイアル中に密閉することができる。

【０２９１】

注射使用に適した医薬組成物は、典型的には、滅菌注射用溶液または分散体を即座に調整するための滅菌水溶液（水溶性である場合）または分散体および滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適当な担体としては、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ、Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ、ＮＪ）、またはリン酸緩衝液（ＰＢＳ）を含む。すべての場合において、組成物は、滅菌されているべきであり、注射容易性（ｅａｓｙ ｓｙｒｉｎｇａｂｉｌｉｔｙ）が存在する程度に流体であるべきである。好適な医薬

製剤は、製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されていなければならい。一般に、関連した担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにこれらの適当な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散体の場合において要求される粒径を維持することによって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどによって実現することができる。多くの場合では、組成物中に等張剤、例えば、糖や、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムなどを含むことが好ましいことになる。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含めることによってもたらすことができる。

【０２９２】

滅菌注射用溶液は、上記に列挙した成分の１種または組合せとともに、適切な溶媒中に必要量で精製ポリペプチドまたはタンパク質を組み込み、必要に応じて、その後濾過滅菌をして調製することができる。一般に分散体は、基本分散媒および上記に列挙したものからの要求される他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に哺乳動物細胞株から発現される精製ポリペプチドまたはタンパク質を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合では、調製の好適な方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、それにより、以前に滅菌濾過したこれらの溶液から活性成分＋任意の追加の所望の成分の粉末を生じる。

【０２９３】

経口組成物は一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療投与の目的のために、精製ポリペプチドまたはタンパク質は、賦形剤とともに組み込むことができ、錠剤、トローチ、またはカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセル剤の形態で使用される。経口組成物は、洗口液として使用するための流体担体を使用して調製することもできる。薬学的適合性の結合剤および／またはアジュバント材料を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、ピル、カプセル剤、トローチなどは、以下の成分、または同様の特質の化合物：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチンなど；賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトースなど、崩壊剤、例えば、アルギン酸、プリモゲル、もしくはコーンスターチなど；滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはステロテスなど；コロイド二酸化ケイ素などの流動促進剤；甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリンなど；または香味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香味料などのいずれも含有し得る。経口送達用製剤は、胃腸管内の安定性を改善し、かつ／または吸収を増強する作用物質を有利には組み込むことができる。

【０２９４】

吸入による投与について、哺乳動物細胞株から発現される精製ポリペプチドまたはタンパク質、および送達剤を含む本発明の組成物は、適当な噴霧剤、例えば、二酸化炭素などのガス、またはネブライザーを含有する加圧容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレーの形態で好ましくは送達される。本発明は、鼻腔用スプレー剤を使用する組成物の送達、吸入器、または上および／もしくは下気道への他の直接的な送達を特に企図する。インフルエンザウイルスに向けられたＤＮＡワクチンの鼻腔内投与は、ＣＤ８　Ｔ細胞応答を誘導することが示されており、気道内の少なくとも一部の細胞は、この経路によって送達されるときＤＮＡを吸収することができ、本発明の送達剤は、細胞取込みを増強することになることを示す。本発明のある特定の実施形態によれば、哺乳動物細胞株から発現される精製ポリペプチドおよび送達剤を含む組成物は、エアロゾル投与用大多孔質粒子として製剤化される。

【０２９５】

全身投与は、経粘膜または経皮手段によるものであってもよい。経粘膜または経皮投与に

ついて、浸透させる障壁に適切な浸透剤が製剤中に使用される。このような浸透剤は、当技術分野で一般に公知であり、これらとしては、例えば、経粘膜投与について、界面活性剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体がある。経粘膜投与は、鼻腔用スプレー剤または坐剤の使用によって達成することができる。経皮投与について、精製ポリペプチドまたはタンパク質および送達剤は、製剤化されて当技術分野で一般に公知である軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームにされる。

【０２９６】

組成物は、直腸送達のために坐剤（例えば、従来の坐剤ベース、例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどを用いた）または停留浣腸の形態で調製することもできる。

【０２９７】

一部の実施形態では、組成物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含めた制御放出製剤など体からの急速な排除に対してポリペプチドまたはタンパク質を保護する担体を用いて調製される。生分解性生体適合性ポリマー、例えば、エチレンビニルアセテート、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリラクテートなどを使用することができる。このような製剤を調製するための方法は、当業者に明らかとなるであろう。材料は、Ａｌｚａ　ＣｏｒｐｏｒａｔｉｏｎおよびＮｏｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｉｎｃ．から商業的に得ることもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む感染細胞に標的化されたリポソームを含む）も、薬学的に許容できる担体として使用することができる。これらは、例えば米国特許第４，５２２，８１１号に記載されている通り、当業者に公知の方法によって調製することもできる。

【０２９８】

投与の容易さおよび投与量の均一性について単位剤形で経口または非経口組成物を製剤化することが有利である。単位剤形は、本明細書では、処置される対象について単位投与量として適した物理的に個別のユニットを指し；各ユニットは、要求される薬学的担体と共同して所望の治療効果を生じさせるように算出された所定量の活性ポリペプチドまたはタンパク質を含有する。

【０２９９】

本発明によって発現されるポリペプチドまたはタンパク質は、様々な間隔で、かつ必要に応じて異なる期間にわたって、例えば、約１～１０週間の間、２～８週間の間、約３～７週間の間、約４、５、または６週間などにわたって週１回投与することができる。当業者は、ある特定の因子がそれだけに限らないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全体的な健康および／または年齢、ならびに存在する他の疾患を含めた対象を有効に処置するのに要求される投与量およびタイミングに影響を与え得ることを察知するであろう。一般に、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質を用いた対象の処置は、単回処置を含み得、または多くの場合では、一連の処置を含み得る。適切な用量は、ポリペプチドまたはタンパク質の効能に依存し得、例えば、予め選択された所望の応答が実現されるまで漸増用量の投与によって特定のレシピエントに適応させてもよいことがさらに理解される。任意の特定の動物対象の具体的な用量レベルは、使用される具体的なポリペプチドまたはタンパク質の活性、対象の年齢、体重、全体的な健康、性別、および食事、投与の時間、投与経路、排泄率、任意の薬物の組合せ、モジュレートされる発現または活性の程度を含めた様々な因子に依存し得ることが理解される。

【０３００】

本発明は、非ヒト動物を処置するための組成物の使用を含む。したがって、用量および投与の方法は、獣医薬理学および医薬の公知の原理に従って選択することができる。ガイダンスは、例えば、Ａｄａｍｓ、Ｒ．（編）、Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、８版、Ｉｏｗａ　Ｓｔａｔｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ；ＩＳＢＮ：０８１３８１７４３９；２００１に見いだすことができる。

【０３０１】

医薬組成物は、投与のための指示書と一緒に容器、パック、またはディスペンサー中に含めることができる。

【０３０２】

以下の実施例は、例示的な目的のためだけに提供されており、本発明の射程を限定するように決して意図されていない。実際に、本明細書に示し、記載したものに加えて本発明の様々な改変が上記の記述から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲内に入る。本出願全体にわたって引用されたすべての図面ならびにすべての参考文献、特許、および公開済み特許出願の内容は、参照により本明細書に明白に組み込まれている。

【実施例】

【０３０３】

（実施例１）

培養において哺乳動物細胞の増殖に阻害作用を有するフェドバッチ培養中に蓄積する代謝副生物の同定

目標：

この実験は、包括的な代謝産物プロファイリング手法を使用した哺乳動物細胞のグルコース制限および従来のフェドバッチ培養において蓄積する主要な増殖インヒビター（代謝副生物）を同定するのに実行された。

【０３０４】

材料および方法：

細胞および培地

ＣＨＯはグルタミン合成酵素発現系（Ｌｏｎｚａから市販されている）（以下ＧＳ－ＣＨＯ、細胞株Ａ）を含み、組換え抗体を発現する本実験で使用した。２つのタイプの培地を本実験で使用した。第１の培地は、「培地Ａ」であり、これは、培養の０日の実験の接種のために使用される。第２の培地は、培養用の従来の、およびＨＩＰＤＯＧフェドバッチプロセスのフィード培地として使用される強化栄養培地である「培地Ｂ」である（次セクションに記載されている）。

【０３０５】

培地Ａは、炭酸水素ナトリウムおよび塩化カリウムの濃度にわずかな差異があり、ポリビニルアルコールの代わりにプルロニックＦ６８を含有するインスリンフリー培地９の強化版（ＵＳ７２９４４８４、表１４）である。これは、１０％グルタミンフリー培地５を添加し（ＵＳ７２９４４８４、表７）、８種のアミノ酸（Ｇｌｕ、Ｔｙｒ、Ｇｌｙ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、およびＶａｌ）の濃度をさらに上昇させることによって強化した。アミノ酸の濃度を、以下で表１に列挙する。

【０３０６】

【表１】

表１：培地Ａ中のアミノ酸の濃度

アミノ酸	培地Ａ中の濃度(mM)
アラニン	0.4
アルギニン	5.3
アスパラギン・H2O	21.1
アスパラギン酸	2.3
システイン・HCl・H2O	0.4
シスチン・2HCl	1.5
グルタミン酸	0
グルタミン酸一ナトリウム	2.0
グルタミン	0
グリシン	3.6
ヒスチジン・HCl・H2O	2.7
イソロイシン	5.4
ロイシン	9.4
リシン・HCl	8.9
メチオニン	3.1
フェニルアラニン	4.5
プロリン	9.1
セリン	11.8
トレオニン	10.8
トリプトファン	2.3
チロシン・2Na・2H2O	5.1
バリン	10.3

【０３０７】

培地Ｂは、培地５と同じ組成を有するが（ＵＳ７２９４４８４、表７）、より高いレベルのアミノ酸を含む（２．５倍）。培地Ｂ中のアミノ酸の濃度を表２に示す。

【０３０８】

【表２】

表 2:培地 B 中のアミノ酸の濃度

アミノ酸	培地 B 中の濃度(mM)
アラニン	6.0
アルギニン	32.9
アスパラギン・H_2O	54.0
アスパラギン酸	15.0
システイン・HCl・H_2O	0.0
シスチン・2HCl	4.7
グルタミン酸	6.0
グルタミン酸一ナトリウム	0.0
グルタミン	0.0
グリシン	6.0
ヒスチジン・HCl・H_2O	10.5
イソロイシン	27.0
ロイシン	38.9
リシン・HCl	30.0
メチオニン	12.0
フェニルアラニン	15.0
プロリン	18.0
セリン	45.2
トレオニン	24.0
トリプトファン	4.8
チロシン・2Na・$2H_2O$	12.0
バリン	24.0

【０３０９】
バイオリアクターセットアップ
従来のフェドバッチプロセスおよびグルコース制限フェドバッチプロセスを含む２つの条件を使用した。グルコース制限フェドバッチプロセス（以下ＨＩＰＤＯＧ培養）では、グルコースは、ＨＩＰＤＯＧ技術を使用して制限された（Ｇａｇｎｏｎら、２０１１）。ＨＩＰＤＯＧ対照が使用可能であった間に使用したｐＨ不感帯は、７．０２５＋／－０．０２５であった。

【０３１０】
従来のプロセスは、標的にした接種細胞密度（１Ｅ６細胞／ｍＬ）、使用した培地、培養容積（１Ｌ）、培養液に毎日添加したフィードの量、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（６．９～７．２）、および撹拌速度（２６７ｒｐｍ）を含めたプロセスパラメータに関してＨＩＰＤＯＧプロセス／培養と同一であった。２つの培養は、これらのグルコースレベルが異なっただけであった。従来の培養では、グルコースは、２日目から５日目の間に２ｇ／Ｌ超で維持し、一方、ＨＩＰＤＯＧ培養では、グルコースは、グルコースレベルが、細胞がラクテートも消費し始める（培養のｐＨのわずかな上昇により観察された）ポイントまで降下し、ＨＩＰＤＯＧ技術／フィーディングストラテジーを開始するまで自然に細胞によって消費された。５日後に、両条件におけるグルコースレベルを必要に応じてグルコースを供給することによって２ｇ／Ｌ超の濃度に維持し、１２日目まで同様に処置し

た。細胞培養培地中の生存細胞密度、ラクテート、およびアンモニア濃度を両条件ついて毎日測定した。使用した基本培地は培地Ａであり、使用したフィード培地は培地Ｂであった。

【０３１１】

メタボローム解析について、使用済み培地試料および細胞ペレット試料を２つ組の反応器ランから収集および解析し、各条件について実施した。解析のために考慮した時点は、０、２、３、５、７、９、および１０日目を含む。使用したメタボローム手法は、ＮＭＲ（表３の群４および５）、ＬＣ／ＭＳおよびＧＣ／ＭＳ（表３の群１～３）技法を使用して、培養の異なる時点で代謝産物の相対的レベルを査定した。ＮＭＲ、ＬＣ／ＭＳ、およびＧＣ／ＭＳ解析に使用した試料調製の詳細および装置／方法のタイプを以下に記載する。すべての代謝産物の相対的レベル（倍率変化）を測定および算出した。相対的レベルを、使用済み培地および細胞ペレット試料の両方において判定し、これらは、最初に検出されたときの代謝産物のレベルと比較して倍率変化に基づいて算出した。倍率変化は、ＨＩＰＤＯＧおよび従来のフェドバッチ培養の７日目まで非常に高レベルまで蓄積していた代謝産物を同定するのに使用した。

【０３１２】

メタボローム解析の方法

質量分析を伴った液体／ガスクロマトグラフィー

試料調製を、メタノール抽出を使用して行ってタンパク質画分を除去した一方、低分子の最大回収を可能にした。結果として生じる抽出物を真空下で乾燥させ、適切な計測器、ＬＣ／ＭＳまたはＧＣ／ＭＳのための試料調製に引き続いて使用した。

【０３１３】

プラットフォームのＬＣ／ＭＳ部分は、Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣおよびＴｈｅｒｍｏ－Ｆｉｎｎｉｇａｎ　ＬＴＱ質量分析計に基づき、この分析計は、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）源および線形イオントラップ（ＬＩＴ）質量分析器からなっていた。試料は、陽および陰イオンモードの両方において独立に分析した。試料を、陽イオンモードについて酸性条件下で再構成し、ともに０．１％ギ酸を含有する水およびメタノールを使用して勾配溶出した一方、陰イオンモードについて、試料を、勾配溶出のためにやはり水／メタノールを使用し、６．５ｍＭ炭酸水素アンモニウムを含有した塩基性抽出物中に再構成した。ＭＳ分析は、動的除外を使用してＭＳスキャンとデータ依存性ＭＳ２スキャンとの間で交互させた。

【０３１４】

ＧＣ／ＭＳ分析を予定した試料を、最低２４時間真空乾燥化で再乾燥させた後、ビストリメチル－シリル－トリフルオロアセトアミド（ＢＳＴＦＡ）を使用して乾燥窒素下で誘導体化した。ＧＣカラムは、５％フェニルであった。温度傾斜は、１６分の期間中４０℃～３００℃である。試料は、電子衝撃イオン化を使用してＴｈｅｒｍｏ－Ｆｉｎｎｉｇａｎ　Ｔｒａｃｅ　ＤＳＱ高速スキャニング単一四重極質量分析計で分析した。計測器は、質量分解能および質量精度について頻繁に調整および較正した。

【０３１５】

データは、生質量スペクトルデータファイルから抽出し、ピークを同定した。引き続いて、ピークを精製標準物質のライブラリーエンティティまたは反復性の未知のエンティティと比較することによって化合物情報を用いてアノテートおよび定量化（任意の強度値）した。クロマトグラフィー性質および質量スペクトルの組合せは、特定の化合物または同重体エンティティとの一致の目安を与えた。

【０３１６】

ＮＭＲ試料調製、データ取得および処理

各試料１０００μＬをＮａｎｏｓｅｐ　３Ｋ　Ｏｍｅｇａ微量遠心フィルターチューブを使用して６０分間濾過し、濾過した試料６３０μＬをＮＭＲ分析に使用した。これらのフィルターは、グリセロールで保存したので、何らかの微量のグリセロールが分析に現れ得る。内部標準溶液を各試料溶液に添加し、得られた混合物を３０秒間ボルテックスした。遠

心分離した溶液７００μＬをＮＭＲチューブに移し、データを取得した。
【０３１７】
ＮＭＲスペクトルは、自動調整付き低温冷却１Ｈ／１３Ｃ三重共鳴生体分子プローブを備えたＶａｒｉａｎ４チャネルＶＮＭＲＳ　７００ＭＨｚ　ＮＭＲ分光計で取得した。使用したパルスシーケンスは、水に対する９９０ｍｓのプレサチュレーションおよび４秒の捕捉時間を伴った１Ｄ－ｔｎｎｏｅｓｙであった。スペクトルは、２９８Ｋで３２回のトランジェントおよび４回の定常状態スキャンを用いて収集した。
【０３１８】
スペクトルを処理し、．ｃｎｘ　ｆｉｌｅを、Ｃｈｅｎｏｍｘ　ＮＭＲ　Ｓｕｉｔｅ８．０のプロセッサーモジュールを使用して作成した。化合物を、３３２の化合物を含有するＣｈｅｎｏｍｘ　Ｃｏｍｐｏｕｎｄ　Ｌｉｂｒａｒｙバージョン９を伴ったＣｈｅｎｏｍｘ　ＮＭＲ　Ｓｕｉｔｅ８．０のプロファイラーモジュールを使用して同定および定量化した。報告目的で、プロファイリングした濃度を補正してＮＭＲチューブの内容物の代わりに元の試料の組成を反映させた。試料調製中、各試料を、内部標準を導入することによって希釈して、必要な場合、小試料の分析体積を増大させる。
【０３１９】
結果：
最初に細胞は、従来およびＨＩＰＤＯＧ培養の両方において指数関数的に増殖し、それぞれ６日目および７日目にピーク細胞密度を達成し、ＨＩＰＤＯＧ培養でははるかにより高い細胞密度でピークとなった（図１）。ＨＩＰＤＯＧプロセス／培養におけるラクテートレベルは、ＨＩＰＤＯＧ対照の適用（２日目～５日目の間）に起因して低いままであったが、一方、ラクテートレベルは、従来フェドバッチ培養の場合では非常に高レベルまで蓄積した。アンモニアも、グルタミン合成酵素発現系を含む細胞の使用によって従来およびＨＩＰＤＯＧ培養中に低レベルで維持された。力価（細胞培養培地１リットル当たりの目的のタンパク質の量）を培養の最後（１２日目）に測定した。ＨＩＰＤＯＧ培養は、従来プロセスと比較してより高い力価を達成した。細胞密度および力価値の差異は、２つの培養間で観察されたラクテート蓄積の差異の成果と考えられる。
【０３２０】
ＨＩＰＤＯＧ培養の７日目に高レベルに蓄積していた代謝産物を、包括的代謝産物プロファイリング技法を使用して測定した倍率変化に基づいて同定した。上記同定された代謝産物のそれぞれについて、代謝産物が細胞の増殖に、負に影響する濃度を、精製化合物を使用してスパイクイン実験によって判定した（実施例３を参照）。これらの実験の結果を使用して推定上の新規インヒビターのリストを狭めた。合計９種のインヒビターをこのプロセスによって同定した。潜在的インヒビターとして同定された９種の代謝産物および細胞培養培地中のこれらの潜在的代謝源のリストを表３に報告する。
【０３２１】

【表３】

表 3 は、GS-CHO フェドバッチ培養において蓄積する推定上の増殖インヒビターとして同定された 9 種の代謝産物の名称および機能クラスを示す

群	代謝産物	機能クラス/代謝源
1	3-(4-ヒドロキシフェニル)ラクテート(HPLA)	フェニルアラニン&チロシン代謝
	4-ヒドロキシフェニルピルベート	
	フェニルラクテート(PLA)	フェニルアラニン代謝
2	インドールラクテート(インドール-3-ラクテート)	トリプトファン代謝
	インドールカルボン酸(インドール-3-カルボン酸)	
3	ホモシステイン	メチオニン代謝
	2-ヒドロキシ酪酸	
4	イソバレレート	ロイシン
5	ホルメート	セリン、トレオニン、およびグリシン

【０３２２】
（実施例２）
実施例２：ＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養の後期に蓄積する推定上のインヒビターの濃度の判定
目標：
この実験は、ＧＳ－ＣＨＯ細胞のＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養における異なる時点で新しく同定された推定上の増殖インヒビター（代謝副生物）の濃度を査定するのに実行した。
【０３２３】
材料および方法：
実験セットアップは、実施例１で定義したものと同じである。定量化は、表３の最初の２つの群中の代謝産物についてＬＣ／ＭＳおよびＧＣ／ＭＳ法によって実施し、ＮＭＲ技術を群４および５中の代謝産物の定量化について使用した。表３の代謝産物列に列挙した代謝産物の最初の２つの群について、精製化合物を商業的に得、既知の濃度のこれらの化合物の溶液をベース溶媒として培地Ａを使用して調製した。インヒビター同定および相対定量化（実施例１を参照）に使用したのと同様のＬＣ／ＭＳおよびＧＣ／ＭＳ包括的代謝産物プロファイリング手法を使用して、４種の代謝産物について独立した較正曲線を調製した。これらの較正曲線は、ＬＣ／ＭＳおよびＧＳ／ＭＳ技法で使用した代謝産物の実際量のこの技法によって生成された強度値との数学的相関である。相関を実施例１で生成した強度値とともに引き続いて使用して、培養における異なる時点での代謝産物の濃度を算出した。
【０３２４】
結果：
表３の最初の２つの群からの新しく同定した代謝産物の濃度を、描いた較正曲線を使用して判定し、群４および５に列挙した代謝産物の濃度を、実施例１の材料および方法セクションで論じたＮＭＲ技術によって判定した。ＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養の７日目の６種の推定上のインヒビター（フェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、インドールラクテート、イソバレレート、

およびホルメート）の濃度を表４に列挙する。

【０３２５】

【表４】

表 4-HIPDOG 培養の 7 日目の 6 種の代謝産物の濃度

代謝産物	7 日目 濃度 (mM)
3-(4 ヒドロキシフェニル)ラクテート(HPLA)	0.38
4-ヒドロキシフェニルピルベート	0.08
フェニルラクテート(PLA)	0.20
インドールラクテート	0.26
イソバレレート	2.41
ホルメート	3.97

【０３２６】

（実施例３）

ＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養の７日目に検出された濃度の同定された推定上のインヒビターの増殖抑制効果を確立するための実験

目標：

この実験は、培養におけるＧＳ－ＣＨＯ細胞の増殖に対するＨｉＰＤＯＧ培養の７日目に判定した濃度で新しく同定された推定上のインヒビターの効果を査定するのに実行した。細胞の増殖に対する９種の代謝産物（フェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、インドールラクテート、インドールカルボン酸、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、イソバレレート、およびホルメート）の独立した効果を最初に試験した。引き続いて、細胞増殖に対する４種の代謝産物（フェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、およびインドールラクテート）の相乗効果を試験した。

【０３２７】

材料および方法：

組換え抗体を産生するＧＳ－ＣＨＯ細胞を、５ｍｌ容積、６－ウェルプレート培養において様々な条件下で低生存細胞密度（０．１Ｅ６細胞／ｍＬ）で接種した。これらの条件は、新鮮培地Ａ、または実施例１のＨＩＰＤＯＧ培養の７日目に検出された濃度で４種の推

定上のインヒビター（０．２ｍＭのフェニルラクテート、０．３８ｍＭの３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、０．０８ｍＭの４－ヒドロキシフェニルピルベート、０．２６ｍＭのインドールラクテート）でスパイクインした新鮮培地Ａを含む。別個の実験において、組換え抗体を産生するＧＳ－ＣＨＯ細胞に、１条件当たり１回に１種のインヒビターで、異なる濃度の９種のインヒビター（インドールカルボン酸、ホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、フェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、インドールラクテート、イソバレレート、およびホルメート）でスパイクインした新鮮培地Ａ中で低生存細胞密度で接種した。９種の代謝産物のいずれか１つ、または９種の代謝産物の任意の組合せでスパイクインした培地ＡのｐＨを７に調整した後、細胞に接種した（０日目）。試験した濃度は、

－　インドールカルボン酸：０、０．５、および１ｍＭ
－　ホモシステイン：０、０．５、および１ｍＭ
－　２－ヒドロキシ酪酸：０、１、および５ｍＭ
－　フェニルラクテート：０、１、および５ｍＭ
－　３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート：０、０．１、０．３、０．５、１、および５ｍＭ
－　４－ヒドロキシフェニルピルベート：０、０．０５、０．１、および０．２５ｍＭ
－　インドールラクテート：０、１、および３ｍＭ
－　イソバレレート：０、１、２．５、および５ｍＭ
－　ホルメート：０、２、４、および６ｍＭ

インドールラクテートについて、原液（５００ｍＭ）をＤＭＳＯ中に調製した。したがって、純粋なＤＭＳＯスパイクイン条件（「ＤＭＳＯ　ｃｏｎｔ」またはＤＭＳＯ対照）を、細胞の増殖に対してＤＭＳＯの効果について制御するために、試験したあらゆる濃度のインドールラクテートを含めた。すべての条件を２通りにまたは３通りに行った。上述した条件における細胞の増殖を５または６日間モニターした。

【０３２８】

結果：

ＧＳ－ＣＨＯ細胞の増殖に対する９種すべてのインヒビターの独立した効果を調査した（図２、図３、図４、および図５）。インドールカルボン酸および４－ヒドロキシフェニルピルベートを、１ｍＭまたはより低い濃度で細胞の増殖に対する強力な負の効果を有することを観察した。ＧＳ－ＣＨＯ細胞が、０．５ｍＭまたは１ｍＭより高い濃度でホモシステイン、２－ヒドロキシ酪酸、または３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートに曝露したとき、増殖の中程度の阻害が観察された。Ｌ－フェニルラクテートは、１ｍＭの濃度で細胞の増殖に対する軽度の効果を有した。インドールラクテートは、３ｍＭまたはそれ未満の濃度で細胞の増殖に対する効果をほとんどまたはまったく効果を示さなかった。ホルメートは、２ｍＭおよびそれを超える濃度で増殖に対する負の効果を有した。イソバレレートは、１ｍＭ超の濃度で細胞の増殖に対する有意な負の効果を有した。

【０３２９】

より早期の実験は、細胞増殖が阻害される濃度が、９種の推定上のインヒビターのそれぞれをＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養の７日目に観察された濃度より、独立添加したとき、はるかに高かったことを示した。したがって、組合せで処置したときのこれらのインヒビターの効果を引き続いて調査した。興味深いことに、ＨＩＰＤＯＧ培養の７日目に検出された濃度で、９種の代謝産物のうちの４種の［フェニルラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、インドールラクテート］の組合せで細胞を処置すると、細胞増殖を新鮮培地中の細胞増殖と比較したとき、有意に阻害された（図６）。このデータは、４種を超える代謝産物が細胞の増殖を阻害する相乗的様式で作用することを示す。上述した９種の代謝産物は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ロイシン、セリン、トレオニン、メチオニン、およびグリシン代謝の副生成物である。インヒビターの生合成に寄与するこれらの経路における酵素を同定すると、遺伝子組み換えによってその産生を抑制する細胞を遺伝的に改変するストラテジーが

もたらされる。
【０３３０】
これらの４種の代謝産物は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン代謝の副生成物であるので、培養中にこれらの前駆体アミノ酸の濃度を低減すると、対応する阻害性代謝産物の形成を制限することができる。さらに、メチオニン代謝産物（ホモシステインおよび２－ヒドロキシブチレート）、ならびにロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシン代謝産物（イソバレレートおよびホルメート）も、細胞増殖に負の効果を有するので、培養中にメチオニン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシンレベルを低減すると、これらの代謝産物の形成を潜在的に制限し、細胞増殖を促進することができる。
【０３３１】
（実施例４）
フェドバッチ培養における栄養分制限ストラテジーによる新しく同定されたインヒビターの増殖抑制効果の低減
目標：
この実験は、これらの生合成を担う炭素供給源の供給を制限することによって新しく同定されたインヒビターの形成を低減するために実施した。この実験の目標は、インヒビター形成をこのように低減すると、培養の後期において増殖抑制が緩和され、フェドバッチ培養において最大生存細胞密度の増大をもたらすか否かを査定することであった。
【０３３２】
材料および方法：
細胞およびバイオリアクターセットアップ
組換え抗体（細胞株Ａ）を発現するＧＳ－ＣＨＯ細胞を本実験で使用した。２つの条件をこの実験の一部として試験した：Ａ）低レベルの４種のアミノ酸（（チロシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファン）を含むＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（低ＡＡ条件））、Ｂ）通常のアミノ酸濃度を有するＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（対照ＨＩＰＤＯＧ条件／培養）。シード培養からの指数関数的増殖細胞を各産生バイオリアクター中に１×１０^{6}細胞／ｍＬで接種した。両条件について、ＨＩＰＤＯＧストラテジーを培養の２日目から７日目の間に運用した。低アミノ酸条件では、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニンの濃度を、培養の最初の７日間、０．５ｍＭから１ｍＭの間で維持し、その後、これらを対照ＨＩＰＤＯＧ条件におけるこれらのそれぞれのアミノ酸のレベルに調整した。７日目後、両条件を同様に処置した。生存細胞密度、ラクテート、アンモニア、およびアミノ酸の濃度を毎日測定した（アミノ酸は、最初の７日間のみ測定した）。両条件について、標的にした接種生存細胞密度（１×１０^{6}細胞／ｍＬ）、および培養容積（１Ｌ）、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（６．９～７．２）、および撹拌速度（２６７ｒｐｍ）を含むプロセスパラメータは同一であった。対照ＨＩＰＤＯＧ条件で使用した基本培地は、培地Ａであり、低ＡＡ条件で使用したものは、低濃度の４種のアミノ酸（およそ０．６ｍＭのチロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニン）を含む培地Ａの改良版であった。対照ＨＩＰＤＯＧ培養に使用したフィード培地は、培地Ｂであった。低ＡＡ条件について、元の培地Ｂまたはより高濃度の４種のアミノ酸（チロシン、トリプトファン、メチオニン、およびフェニルアラニン）を含む培地Ｂの改良版をフィード培地（元のフィード培地Ｂと比較してメチオニンについて６０％高い、チロシン、トリプトファン、およびフェニルアラニンについて約１００％高いレベル）として配合および使用した。培地Ｂの改良版における４種のアミノ酸のレベルを、培養のＨＩＰＤＯＧプロセスにおける細胞株Ａについての４種のアミノ酸の細胞特異的消費率および予め決定したフィーディングスケジュールに基づいて構成した。アミノ酸濃度をＵＰＬＣアミノ酸法（ＵＰＬＣ ｂａｓｅｄ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｍｅｔｈｏｄ）を使用して、毎日測定した。この方法を以下でより詳細に記載する。所与のサンプリングポイントでのアミノ酸のレベルおよびフィーディングスケジュールに基づいて、２タイプの培地Ｂの一方（元の、またはより高い濃度）を４種のアミノ酸の濃度が次サンプリ

ング時点で０．５～１ｍＭの間であるように次サンプリングポイントまでフィード培地として選択した。

【０３３３】

アミノ酸分析

標準アミノ酸ミックス溶液または使用済み培地試料（１０倍希釈試料）１０μＬをＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａホウ酸塩緩衝液（Ｗａｔｅｒｓ ＵＰＬＣ ＡＡＡ Ｈ－クラス Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｋｉｔ［１７６００２９８３］）７０μＬと混合し、ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａ試薬希釈剤１．０ｍＬ中に以前に溶解させたＡｃｃＱ・Ｔａｇ試薬２０μＬを添加した。反応を５５℃で１０分間進行させた。液体クロマトグラフィー分析は、バイナリソルベントマネージャー、オートサンプラー、カラムヒーター、およびＰＤＡ検出器を備えたＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣシステムで実施した。分離カラムは、Ｗａｔｅｒｓ ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａカラム（２．１ｍｍ ｉ．ｄ．×１００ｍｍ、１．７μｍ粒子）であった。カラムヒーターは、５５℃に設定し、移動相流量は、０．７ｍＬ／分で維持した。溶離液Ａは、１０％ ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａ濃縮溶媒Ａであり、溶離液Ｂは、１００％ ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａ溶媒Ｂであった。非線形分離勾配は、０～０．５４分（９９．９％ Ａ）、５．７４分 （９０．０％ Ａ）、７．７４分（７８．８％ Ａ）、８．０４～８．６４分（４０．４％ Ａ）、８．７３～１０分（９９．９％ Ａ）であった。試料１マイクロリットルを分析のために注入した。ＰＤＡ検出器は、２６０ｎｍに設定した。アミノ酸について以前に決定した溶出時間を使用して各試料のクロマトグラム上の特定のアミノ酸ピークを同定した。アミノ酸濃度を、ピーク下面積および標準液（Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ Ｓｔａｎｄａｒｄ Ｈ、ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＰＩ－２００８８）を使用して作成した較正曲線を使用して推定した。

【０３３４】

結果：

アミノ酸の濃度を、低ＡＡ条件中で０．５ｍＭ～１ｍＭの間で順調に維持した（図８および図９）。対照ＨＩＰＤＯＧプロセス中のアミノ酸濃度は、培養の過程にわたって高いままであった。図７に示した通り、低ＡＡ条件における細胞密度は、７日目に３５×１０６細胞／ｍｌ付近でピークとなった一方、対照ＨＩＰＤＯＧ条件における細胞密度は、３２×１０６細胞／ｍＬ付近でピークとなった。低ＡＡ条件（５．３ｇ／Ｌ）における回収力価レベルは、対照条件（４．５ｇ／Ｌ）より１８％高かった。明らかに、アミノ酸供給を制限すると、培養の後期に細胞密度（それによって力価）が増大した。

【０３３５】

実施例５は、増殖および産生性のこのような増大が、新しく同定されたインヒビターの産生の低減の結果として理解することができることを実証する。

【０３３６】

（実施例５）

フェドバッチ培養における（ｉ）アミノ酸の制限による新しく同定されたインヒビターの蓄積の低減、および（ｉｉ）ＧＳ－ＣＨＯ細胞（細胞株Ａ）の増殖に対する阻害性代謝産物のこのような制限のプラス効果の再現性の実証

目標：

本実施例の主目標は、フェドバッチ培養における新しく同定されたインヒビターの蓄積の、これらの生合成を担う炭素供給源（アミノ酸）の供給を制限することによる低減を実証することであった。本実施例では、２つの実験が、４種のアミノ酸または８種のアミノ酸の制限による新しく同定されたインヒビターのレベルのこのような低減が、最大生存細胞密度の増大をもたらすフェドバッチ培養の後期における増殖抑制を緩和することを実証するのに含められた。

【０３３７】

材料および方法：

細胞およびバイオリアクターセットアップ

細胞株Ａを本実施例の一部として実施した２つの実験で使用した。
【０３３８】
３つの条件を第１の実験において試験した：
Ａ）低レベルのチロシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファン（培養の低４ＡＡ＋ＨＩＰＤＯＧ条件）を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養、
Ｂ）低レベルのチロシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシン（低８ＡＡ＋ＨＩＰＤＯＧ条件）を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養、および
Ｃ）通常のアミノ酸濃度を用いた２つのＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（ＨＩＰＤＯＧ１およびＨＩＰＤＯＧ２）。
【０３３９】
第２の実験では、２つの条件を試験した：
Ａ）低レベルのチロシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシンを用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（低８ＡＡ＋ＨＩＰＤＯＧ条件）、および
Ｂ）低レベルのチロシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファンを用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（低４ＡＡ＋ＨＩＰＤＯＧ条件）。
【０３４０】
第１の実験は、１２日間行った一方、第２の実験は、１６日間行った。
【０３４１】
両実験において、シード培養からの指数関数的増殖細胞を１×１０^{6}細胞／ｍＬで接種した。すべての条件について、ＨＩＰＤＯＧ対照を培養の２日目から７日目の間運用し、低アミノ酸条件では、上述した４種または８種のアミノ酸の濃度を、培養の最初の７日間、０．５ｍＭから１ｍＭの間で維持し、その後、これらを対照ＨＩＰＤＯＧ条件におけるそれぞれのアミノ酸に近いレベルに調整した。７日目後、両条件を同様に処置した。生存細胞、アンモニア、およびアミノ酸濃度を毎日測定した。すべての条件について、標的にした接種生存細胞密度（１×１０^{6}細胞／ｍＬ）、培養容積（１Ｌ）、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（６．９～７．２）、および撹拌速度（２５９ｒｐｍ）を含むプロセスパラメータは同一であった。ＨＩＰＤＯＧ条件で使用した基本培地は、培地Ａであり、低アミノ酸条件で使用したものは、低濃度の４種のアミノ酸（およそ０．６ｍＭのチロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニン）または８種のアミノ酸（およそ０．６ｍＭのチロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシン）を含む培地Ａの改良版であった。すべての条件に使用したフィード培地は、培地Ｂであった。アミノ酸濃度を、実施例４に記載のＵＰＬＣアミノ酸法を使用して毎日測定した。低アミノ酸条件では、所与のサンプリングポイントでのアミノ酸のレベルおよび後に続くフィーディングスケジュールに基づいて、アミノ酸の濃縮溶液を対応する低アミノ酸条件における４種のアミノ酸または８種のアミノ酸の濃度が次サンプリング時点で０．５ｍＭ～１ｍＭの間であるように条件に補充した。両実験にわたる様々な条件から使用済み培地試料を、実施例１の材料および方法セクションに記載のＮＭＲ技術を使用して新しく同定されたインヒビターのレベルについて分析した。
【０３４２】
結果：
第１の実験では、アミノ酸の濃度を、フェドバッチ培養の７日目まで低４ＡＡおよび低８条件の両方において０．５ｍＭ～１ｍＭの間で順調に維持した（図１１～１４）。２つの条件におけるアミノ酸レベルのこのような制限は、新しく同定された代謝産物のより低いレベルの蓄積をもたらした（図１５および図１６）。イソバレレート、ホルメート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、およびインドール－３－ラクテートを具体的にプロファイリングした。イソバレレートおよびホルメートは、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニンの副生物であり、これらは、低８ＡＡ条件においてのみ低レベルで制御される。これらのアミノ酸は、低４ＡＡ条件では低レベルで制御されない。対応して

、有意により低い濃度のイソバレレートは、低８ＡＡ条件においてのみ見られる。イソバレレートのレベルは、対照ＨＩＰＤＯＧ条件および低４ＡＡ条件においてより高かった（図１５Ｂ）。ホルメートレベルは、培養の７日目ですべての条件にわたって同様であったが、細胞１個当たりに基づくと、産生されるホルメートの量は、ＨＩＰＤＯＧ条件と比較して低８ＡＡ条件においてより低い。プロファイリングした他の２種のインヒビター、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートおよびインドール－３－ラクテートは、アミノ酸フェニルアラニンおよびトリプトファンの副生物であり、これらは、低８ＡＡおよび低４ＡＡ条件の両方においてより低いレベルで制御される。これらの２種のインヒビターの有意により低い濃度が７日目にＨＩＤＰＯＧ条件と比較して低８ＡＡおよび低４ＡＡ条件の両方において観察された（図１５Ａおよび１６）。

【０３４３】

低８ＡＡおよび低４ＡＡ条件における細胞は、対照条件（ＨＩＰＤＯＧ１およびＨＩＰＤＯＧ２）より良好に増殖し、９日目にそれぞれ、細胞密度５０×１０^{6}細胞／ｍＬおよび４５×１０^{6}細胞／ｍＬでピークとなった一方、対照ＨＩＰＤＯＧ条件における細胞密度は、３２×１０^{6}細胞／ｍＬ付近でピークとなった（図１０Ａ）。低アミノ酸条件の後期に観察された細胞増殖のこのような増大は、培養におけるインヒビター蓄積の低減の成果として説明することができる（図１５および１６）。さらに、低アミノ条件での力価は、９日目まで対照ＨＩＰＤＯＧ条件と比較してより高く、次いでそれは、漸減して培養の最後までにＨＩＰＤＯＧ条件の力価レベルに一致した（図１０Ｂ）。９日目後、低アミノ酸条件におけるタンパク質産生の低減が、培養におけるチロシンレベルの枯渇付近まで生じた（図１１Ａ）。

【０３４４】

第２の実験は、低４ＡＡ条件と比較したとき、低８ＡＡ条件においてロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニンを制限することのプラス効果の増大を検証および再現するために実施した（図１７）。細胞株Ａを使用して低８ＡＡおよび低４ＡＡ条件を含む２つの条件のみを本実験で試験した。８種のアミノ酸または４種のアミノ酸を培養の７日目まで０．５ｍＭから１ｍＭの間に制御した。アミノ酸データは、本実験について示されていないが、本実験で消耗されなかったチロシンを除いて上記実験における２つの条件について観察されたアミノ酸プロファイルと同様である（図１１～１４）。細胞は、低８ＡＡにおいてより良好に増殖し、９日目に４２×１０^{6}細胞／ｍＬでピークとなった一方、低４ＡＡ条件における細胞密度は、３２×１０^{6}細胞／ｍＬ付近でピークとなった（図１７）。細胞密度のこのような増大も、低４ＡＡ条件と比較したとき、低８ＡＡ条件におけるより高いレベルの回収力価となる。

【０３４５】

（実施例６）

（ｉ）アミノ酸の制限による新しく同定されたインヒビターの蓄積の低減、および（ｉｉ）フェドバッチ培養における異なるＧＳ－ＣＨＯ細胞株（細胞株Ｂ）の増殖に対する阻害性代謝産物のこのような制限のプラス効果の実証。

目標：

この実験は、細胞の増殖に対するある特定のアミノ酸のレベルを制限することの増殖に有益な効果は、１つの細胞株（細胞株Ａ）に特異的でなかったが、より一般的であり、他の細胞株に適用できることを実証するために実施した。２つの栄養分制限実験を、異なる組換え抗体を産生する異なるＣＨＯ細胞株（細胞株Ｂ）を使用して本実施例の一部として実施した。これらの実験の目標は、フェドバッチ培養では、より低いレベルでアミノ酸を制御すると、インヒビター蓄積が低減され、インヒビターのこのような低い蓄積は、低アミノ酸フェドバッチ培養において見られた生存細胞密度およびタンパク質力価の増大を説明することができることを示すためであった。

【０３４６】

材料および方法：

細胞およびバイオリアクターセットアップ

異なる組換え抗体を発現する新しいＧＳ－ＣＨＯ細胞株（細胞株Ｂ）を本実施例で使用した。４種または８種のアミノ酸を同時に制限することの効果を理解するために２つの実験を実施した。第１の実験では、２つの条件を試験した：Ａ）チロシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニンを含む低レベルの８種のアミノ酸を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（低８ＡＡ＋ＨＩＰＤＯＧ条件）、およびＢ）通常のアミノ酸濃度を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（ＨＩＰＤＯＧ条件）。第２の実験では、２つの条件を試験した：Ａ）チロシン、メチオニン、フェニルアラニン、およびトリプトファンを含む低レベルの４種のアミノ酸を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（低４ＡＡ＋ＨＩＰＤＯＧ条件）、およびＢ）通常のアミノ酸濃度を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養（ＨＩＰＤＯＧ条件）。第１の実験は、１２日間行った一方、第２の実験は、培養の８日目までのみ行った。

【０３４７】

シード培養からの指数関数的増殖細胞を各産生バイオリアクター中に１×１０^{6}細胞／ｍＬで接種した。すべての条件について、ＨＩＰＤＯＧストラテジーを培養の２日目から７日目の間に運用した。低アミノ酸条件では、上述した４種または８種のアミノ酸の濃度を、培養の最初の７日間、０．５ｍＭから１ｍＭの間で維持し、その後、これらを対照ＨＩＰＤＯＧ条件におけるそれぞれのアミノ酸に近いレベルに調整した。７日目後、両条件を同様に処置した。生存細胞、アンモニア、およびアミノ酸濃度を、培養全体にわたって毎日測定した。すべての条件について、標的にした接種生存細胞密度（１×１０^{6}細胞／ｍＬ）、および培養容積（１Ｌ）、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（６．９～７．２）、および撹拌速度（２５９ｒｐｍ）を含むプロセスパラメータは同一であった。ＨＩＰＤＯＧ条件で使用した基本培地は、培地Ａであり、低ＡＡ条件で使用したものは、低濃度の４種のアミノ酸（およそ０．６ｍＭのチロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、およびメチオニン）または８種のアミノ酸（およそ０．６ｍＭのチロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、セリン、トレオニン、およびグリシン）を含む培地Ａの改良版であった。すべての条件に使用したフィード培地は、培地Ｂであった。アミノ酸濃度を、実施例４に記載のＵＰＬＣアミノ酸法を使用して毎日測定した。低アミノ酸条件では、所与のサンプリングポイントでのアミノ酸のレベルおよび後に続くフィーディングスケジュールに基づいて、アミノ酸の濃縮溶液を対応する条件における４種のアミノ酸または８種のアミノ酸の濃度が次サンプリング時点で０．５ｍＭ～１ｍＭの間であるように条件に補充した。両実験にわたる様々な条件から使用済み培地試料を、実施例１の材料および方法セクションに記載のＮＭＲ技術を使用して新しく同定されたインヒビターのレベルについて分析および定量化した。

【０３４８】

結果：

第１の実験では、８種のアミノ酸の濃度を、フェドバッチ培養の７日目まで低８ＡＡ条件中で０．５ｍＭ～１ｍＭの間で順調に維持した。アミノ酸培養プロファイルは、本実験について示されていないが、本実験で消耗されなかったチロシンを除いて実施例５の実験１における同様の条件について観察されたものと同様である（図１１～１４）。低８ＡＡ条件におけるアミノ酸レベルのこのような制限は、新しく同定された代謝産物のより低いレベルの生合成および蓄積の低減をもたらした。表３に列挙した９種のインヒビターのうちの４種をプロファイリングした（図１９および図２０）。低８ＡＡ条件では、イソバレレート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、およびインドール－３－ラクテートの有意により低い蓄積が対照ＨＩＰＤＯＧ条件と比較して観察された。ホルメートレベルは、培養の１０日目で低８ＡＡ条件においてより高いと観察されたが、細胞１個当たりに基づくと、産生されるホルメートの量は、ＨＩＰＤＯＧ条件と比較して低８ＡＡ条件において同様であった。低８ＡＡ条件における細胞は、９日目に４０×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度でピークとなった対照条件（ＨＩＰＤＯＧ）より良好に増殖した一方、対照ＨＩＰＤＯＧ条件における細胞密度は、３２×１０^{6}細胞／ｍＬ付近でピークとなった（図１８Ａ）。さらに、低８ＡＡ条件において観察される増殖の増大は、対照ＨＩＰＤＯＧ条件と

比較してより高い力価レベルとなる（図１８Ｂ）。低アミノ酸条件で観察された細胞増殖および産生性のこのような増大は、インヒビター生合成および蓄積の低減の成果として説明することができる（図１９および２０）。

【０３４９】

第２の実験は、対照ＨＩＰＤＯＧ条件と比較したとき、細胞株Ｂの増殖および産生性に対する４種のアミノ酸（チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニン）のレベルを０．５ｍＭ～１ｍＭの間に制御することの効果（低４ＡＡ＋ＨＩＯＤＯＧ）を調査するために実施した（図２１～２３）。アミノ酸培養プロファイルは、本実験について示されていないが、本実験で消耗されなかったチロシンを除いて実施例５の実験１における同様の条件について観察されたものと同様である（図１１～１４）。低４ＡＡ条件におけるアミノ酸レベルのこのような制限は、新しく同定された代謝産物のより低いレベルの生合成および蓄積の低減をもたらした。表３に列挙した９種のインヒビターのうちの４種をプロファイリングした（図２２および図２３）。イソバレレートを除いて、他の３種のインヒビターのレベルは、ＨＩＰＤＯＧ条件と比較して低４ＡＡ条件においてより低かった。低４ＡＡ条件において低レベルで制御されるアミノ酸の１つでないロイシン、その代謝中間体イソバレレートは、対照ＨＩＰＤＯＧ条件で見られるものと同様のレベルまで低４ＡＡ条件において蓄積する。低４ＡＡ条件における細胞は、９日目に３７×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度でピークとなってより良好に増殖した一方、対照ＨＩＰＤＯＧ条件における細胞密度は、３２×１０^{6}細胞／ｍＬ付近でピークとなった（図２１Ａ）。さらに、低４ＡＡ条件において観察される増殖の増大は、対照ＨＩＰＤＯＧ条件と比較してより高い力価レベルとなる（図２１Ｂ）。低アミノ酸条件で観察された細胞増殖および産生性のこのような増大は、インヒビター生合成および蓄積の低減の成果として説明することができる（図２２および２３）。

【０３５０】

（実施例７）

４種（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニン）、または８種のアミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニン）、ならびに新しく同定されたインヒビターをオンラインで測定するためのラマン分光法の使用

ラマン分光法は分子による単色光（光子）の非弾性散乱に基づく。本技術は、光子が分子によって吸収および再放出されるときの光子のエネルギーの変化に起因する光の周波数シフトを使用して分子の特性を判定する。本技術は、微生物および哺乳動物細胞培養バイオリアクターにおいて順調に使用されており、様々なプロセスパラメータのレベルを測定することに成功している。ラマン分光法は、ＣＨＯ細胞培養液中のグルコース、ラクテート、アンモニア、グルタミン、およびグルタミン酸の濃度を判定するのにも使用されている。

【０３５１】

すべてのアミノ酸のラマンスペクトルは、文献で以前に報告されている。新しく同定されたインヒビター代謝産物のラマンスペクトルは、精製代謝産物の溶液を使用して特徴付けられている。経験的モデルは、４種もしくは８種のアミノ酸、または新しく同定されたインヒビターのそれぞれの既知の濃度を個別に使用して生成されたスペクトルデータの訓練セットを使用することによって構築される。較正試料の調製に使用される（訓練セットとして使用される）試料マトリックス（バックグラウンド）は、異なる細胞培養プロセスの異なる時点から採取される使用済み培地試料のミックスである。このような訓練セットを使用して開発されたモデルは、より一般的であり、任意の他の細胞培養プロセスに適用することができる。このモデルは、培養液中の４種もしくは８種のアミノ酸または代謝産物（インヒビター）の濃度を測定し（オンライン）、したがって、フィードバック制御フィーディングストラテジーによってアミノ酸のレベルを制御するのに使用される。

【０３５２】

（実施例８）

インヒビター濃度のオンライン測定を使用することによってフェドバッチ培養において低

レベルでアミノ酸を制御することによるインヒビター形成の抑制
フェドバッチプロセスは、４種（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニン）または８種のアミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニン）を細胞培養培地中で低レベル、例えば、０．２～１ｍＭの間に制御することによってインヒビターの形成を低減するように設計されている。インヒビター産生のこのような制御は、インヒビター自体のオンライン測定に基づいてフィードバックループとして運用するフィーディングストラテジーによって達成される。このようなオンライン測定は、ラマン分光法の形態であり、またはプログラムされた様式で反応器から試料を引き出し、装置にこれを移すオートサンプラーを伴ったＨＰＬＣまたはＵＰＬＣに基づく技術を使用するものである。インヒビターの濃度は指定レベル（例：０．２ｍＭ）より上に上昇するので、かつ上昇したとき、細胞にフィードされるフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニンの量は、インヒビターの濃度が既定レベル（例えば、０．１ｍＭ）未満に降下するまで低下する。

【０３５３】

（実施例９）
オンラインまたはオフライン測定によるインヒビター形成の抑制およびフェドバッチ培養における低レベルでのアミノ酸の制御
フェドバッチプロセスは、４種（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニン）または８種のアミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニン）を低レベル（０．２～１ｍＭ）で制御することによってインヒビターの形成を低減するように設計されている。インヒビター形成のこのような制御は、アミノ酸のオンライン測定に基づいてフィードバックループとして運用するフィーディングストラテジーによって達成される。このようなオンライン測定は、ラマン分光法の形態であり、またはプログラムされた様式で反応器から試料を引き出し、装置にこれを移すオートサンプラーを伴ったＨＰＬＣまたはＵＰＬＣに基づく技術を使用するものである。アミノ酸の濃度は指定レベル（例：０．５ｍＭ未満）に降下するので、かつ降下したとき、推定量のフィード培地（培地Ｂと同様の）が４種または８種のアミノ酸の濃度を維持するために培養液中に添加される。

【０３５４】

代替として、試料は、１日１回採取され、アミノ酸濃度は、ＵＰＬＣ／ＨＰＬＣ法を使用してオフラインで測定される。得られたアミノ酸濃度は、以前の２つのサンプリング時点間で４種（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニン）または８種のアミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニン）の細胞特異的取込み速度を算出するのに使用される。細胞が次サンプリング時点まで同じ特定の速度のアミノ酸消費を維持すると仮定して、次サンプリングポイントまでに添加されるフィード培地（例：培地Ｂ）の量が、アミノ酸の濃度が所望の範囲（０．２ｍＭ～１ｍＭ）内に常にあるように判定され、細胞に提供される。

【０３５５】

（実施例１０）
フェドバッチ培養において低レベルでアミノ酸を保つためのプログラムフィーディングによるインヒビター形成の抑制
培養液中の新しく同定されたインヒビターの形成は、４種（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、およびメチオニン）または８種のアミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ロイシン、セリン、グリシン、およびトレオニン）の濃度を培養液中で低レベル（０．２～１ｍＭ）で維持することによって低く保たれる。これは、アミノ酸の濃度が培養中の任意の所与の時点で所望の範囲（０．２ｍＭ～１ｍＭ）内に常にあるようにプログラムフィーディングストラテジー（改変培地Ｂを使用して）を設計することによって達成される。このようなフィーディングストラテジーは、培養に

沿って異なる時点でアミノ酸の特定の消費率を査定し、上記に定義されたフィーディングストラテジー／スケジュールを用いて、十分な量のアミノ酸が培養液に提供されて所望の範囲（０．２～１ｍＭ）内にアミノ酸濃度が維持されるようにフィード培地（培地Ｂ）中の濃度を改変することによって工夫されている。

【０３５６】

（実施例１１）

フェニルアラニン／チロシン経路に関連したインヒビターの生合成を抑制するための代謝操作の遺伝子標的を判定する実験

目標：

本実験は、フェニルラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、および３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートを含めたインヒビター分子の産生の原因を判定するのに実施された。フェニルアラニン／チロシン経路におけるすべての酵素の遺伝子発現をリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ｑＰＣＲ）アッセイを使用してプローブした。フェニルアラニン／チロシン異化経路の遺伝子発現および生化学に基づいて、上述したインヒビターの生合成を抑制するＣＨＯ細胞株Ａを代謝操作するための遺伝子標的を同定した。

【０３５７】

材料および方法：

遺伝子発現分析

ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用してロイシンおよびフェニルアラニン／チロシン代謝経路における酵素の相対的遺伝子発現レベルを査定した。ＲＴ　ｑＰＣＲは、検出試薬（すなわち、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ）と組み合わせてＰＣＲを使用して標的ｃＤＮＡ配列を増幅することによって転写量、したがって遺伝子発現を測定する。ＳＹＢＲ　ｇｒｅｅｎは、二本鎖ＤＮＡに結合されているとき蛍光を発する分子であり、蛍光は、ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイ中にリアルタイムで測定することができる。蛍光の量は、反応における二本鎖ＰＣＲ産物（アンプリコンとも呼ばれる）の量に正比例する。相対的遺伝子発現レベルは、バックグラウンド蛍光を上回るのにＳＹＢＲ　ｇｒｅｅｎ蛍光に必要とされるＰＣＲサイクルの数を測定することによって判定され、対数的に増大する。このサイクル数は一般に、Ｃ$_T$（閾値サイクル）と呼ばれる。高存在量での転写物は、より低いＣ$_T$値を有するはずであり、その理由は、蛍光がバックグラウンド蛍光を上回るためにより少ないＰＣＲサイクルを必要とするためであり、反対に、より低い存在量での転写物は、より高いＣ$_T$値を有するはずであり、その理由は、蛍光がバックグラウンドレベルを上回るためにより多くのＰＣＲサイクルを必要とするはずであるためである。

【０３５８】

ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイは、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　７５００リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＰｏｗｅｒＵＰ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して実施した。ＰＣＲプライマーは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）ゲノムブラウザ（ｃｈｏｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ）に含まれているゲノムＤＮＡ配列に基づいてＰｒｉｍｅｒ３アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｕｔ．ｅｅ／ｐｒｉｍｅｒ３－０．４．０／ｐｒｉｍｅｒ３／）を使用して設計した。ＲＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＣＨＯ細胞株Ａから調製し、それをひいては、ＲＴ－ＰＣＲ用ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓシステム（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してオリゴｄＴプライミングｃＤＮＡを合成するための鋳型として使用した。標的代謝関連遺伝子のＣ$_T$値を表にし、十分特徴付けられたハウスキーピング遺伝子、ベータアクチンのＣ$_T$値と比較した。標的遺伝子のＣ$_T$とベータアクチンのＣ$_T$との差異をΔＣ$_T$として報告した。高ΔＣ$_T$値は、低遺伝子発現レベルを示す。

【０３５９】

結果：

フェニルアラニン／チロシン経路における遺伝子のＣ$_T$およびΔＣ$_T$値を図２４に示す。フェニルアラニン／チロシン経路からの遺伝子発現データは、ＣＨＯ細胞株Ａは、ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤ遺伝子の発現が低いことを示す。発現タンパク質（または酵素）レベルは、転写量に相関するので、低レベルのＰＡＨ酵素は、ともにＣＨＯ細胞株Ａ内で高レベルで発現されるＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦ酵素の触媒作用によってフェニルピルベートに、引き続いてフェニルラクテートに変換されるフェニルアラニンをもたらし得る。同様に、ＣＨＯ細胞株内のＨＰＤおよびＨＧＤ酵素が低レベルであることに起因して、チロシンは、ＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦ酵素の触媒作用によって４－ヒドロキシフェニルピルベートおよび３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートの産生にチャネリングされる。インヒビター産生に向けたフェニルアラニンおよびチロシンフラックスのチャネリングの低減は、ＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦ遺伝子の発現の下方調節を必要とする。しかし、ＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦは、他の生理学的に重要な代謝機能に極めて重要である。したがって、２種の酵素の下方調節は、生存細胞株を潜在的に生じないはずである。インヒビター生合成を低減する代替のやり方は、ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤ遺伝子の過剰発現によるものであり、次いでそれは、インヒビター産生から離してクレブス回路代謝産物（これらは、ミトコンドリア内のエネルギー合成に使用される）の産生に向けてフラックスをチャネリングする。したがって、フェニルアラニン／チロシン経路の代謝標的は、ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤ遺伝子である。

【０３６０】

（実施例１２）

ロイシン経路に関連したインヒビターの生合成を抑制するための代謝操作の遺伝子標的を判定する実験

目標：

本実験は、ロイシン代謝の副生物であり、ＣＨＯ細胞のフェドバッチ培養において非常に高レベルに蓄積するイソ吉草酸の生合成および蓄積の原因を判定するのに実施した。ロイシン経路内のすべての酵素の遺伝子発現を、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ｑＰＣＲ）アッセイを使用してプローブした。さらに、イソ吉草酸血症などのヒトの病状におけるイソ吉草酸の産生は、イソバレリル－ＣｏＡ、ロイシン異化作用経路の中間体の下流の酵素における「機能喪失」突然変異に起因すると報告された。これらの酵素としては、Ｉｖｄ、Ｍｃｃｃ１、およびＭｃｃｃ２があり、これらは、活性喪失突然変異を宿し得るが高レベルで発現される。したがって、ＣＨＯ細胞株Ａ内のこれらの酵素の突然変異状態を調査した。ロイシン異化作用経路における上述した酵素の遺伝子発現分析および突然変異分析に基づいて、イソ吉草酸の生合成を抑制することになるＣＨＯ細胞株Ａの代謝操作の遺伝子標的を同定した。

【０３６１】

材料および方法：

突然変異分析

Ｉｖｄ、Ｍｃｃｃ１、およびＭｃｃｃ２の翻訳領域にフランクする（５’および３’末端で）ゲノムＤＮＡ配列を同定し、Ｐｒｉｍｅｒ３アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｕｔ．ｅｅ／ｐｒｉｍｅｒ３－０．４．０／ｐｒｉｍｅｒ３／）を使用してＰＣＲプライマー設計の鋳型として使用した。ＲＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＣＨＯ細胞株Ａから調製し、それをひいては、ＲＴ－ＰＣＲ用ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩ Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓシステム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してオリゴｄＴプライミングｃＤＮＡ合成の鋳型として使用した。伸長温度およびマグネシウム濃度が最適化されたＰＣＲ反応を、Ｐｆｕ Ｔｕｒｂｏ ＨｏｔＳｔａｒｔ ２Ｘ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して実施した。試料を、ＱＩＡｑｕｉｃｋ ＰＣＲ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して精製し、Ｗｙｚｅｒｂｉｏ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）での配列分析に送った。

【０３６２】

結果：
ロイシン経路内の遺伝子のＣ$_T$およびΔＣ$_T$値を図２５に示す。フェニルアラニン／チロシン経路からの遺伝子発現データは、ＣＨＯ細胞株ＡのＡＵＨ酵素のレベルが経路内の他の酵素と相対的に低いことを示す。しかし、このデータは、より早期の実験において報告された高レベルのイソ吉草酸産生を強く説明せず、その理由は、酵素がイソ吉草酸産生に向けて分岐するノードのさらに下流にあるためである（図２５）。したがって、ＩＶＤ、ＭＣＣＣ１、および／またはＭＣＣＣ２の機能（酵素活性）の喪失は、イソ吉草酸産生のより良好な原理を与えることができる。ＤＮＡシーケンシング結果は、突然変異状態およびコードされる酵素の機能のもっともらしいレベルを明らかにする。ＩＶＤ、ＭＣＣＣ１、およびＭＣＣＣ２遺伝子中の突然変異を変更する酵素活性が見つかった場合、対応する野生型（非突然変異）遺伝子の過剰発現を伴う代謝操作手法が行われることになり、この場合、遺伝子起源は、ＣＨＯ細胞株由来であるはずであるが、野生型遺伝子の他の起源、例えば、ヒト、ラット、マウスなども利用可能であり、使用することができる。これに加えて、ＡＵＨ遺伝子も、同じＣＨＯ細胞株Ａ内で過剰発現されることになる。
【０３６３】
本明細書で論じる遺伝子の遺伝子頭字語と完全命名法との相関を表５で以下に提供する。
【０３６４】

【表５】

表 5:図 24 および 25 にも例示したフェニルアラニン/チロシンおよびロイシン経路の遺伝子

記号	名称
Pah	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ
Mif	マクロファージ遊走阻止因子
Got1	グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 1、可溶性
Got2	グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 2、ミトコンドリア
Hpd	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ
Hgd	ホモゲンチセート 1、2-ジオキシゲナーゼ
Gstz1	グルタチオントランスフェラーゼゼータ 1(マレイルアセトアセテートイソメラーゼ)
Fah	フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ
Bcat1	分岐鎖アミノトランスフェラーゼ 1、細胞質ゾル
Bckdha	分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ E1、アルファポリペプチド
Bckdhb	分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ E1、ベータポリペプチド
Dbt	ジヒドロリポアミド分岐鎖トランスアシラーゼ E2
Dld	ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ
Ivd	イソバレリル補酵素 A デヒドロゲナーゼ
Acadm	アシル-補酵素 A デヒドロゲナーゼ、中鎖
Mccc1	メチルクロトノイル-補酵素 A カルボキシラーゼ 1(アルファ)
Mccc2	メチルクロトノイル-補酵素 A カルボキシラーゼ 2(ベータ)
Auh	AU RNA 結合タンパク質/エノイル-補酵素 A ヒドラターゼ
Hmgcl	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-補酵素 A リアーゼ
Fasn	脂肪酸合成酵素
Nup62-il4i1	ヌクレオポリン 62-インターロイキン 4 誘導 1/L-アミノ酸オキシダーゼ

【０３６５】

（実施例１３）

ＨＰＤ、ＨＧＤ、ＰＡＨ、ＡＵＨ、および突然変異分析によって実施例１２で判定した任意の他の遺伝子標的の野生型形態のマウス遺伝子をＣＨＯ細胞株Ａ内で異所性に発現させる実験

目標：

ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイによって判定されるベータアクチンと相対的低遺伝子発現レベルに基づいて４つの標的をＣＨＯ細胞内の過剰発現について選択した：Ａｕｈ（ロイシン代謝経路）ならびにＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＡＨ（フェニルアラニン／チロシン代謝経路

）。さらに、ＩＶＤ、ＭＣＣＣ１、およびＭＣＣＣ２の活性喪失突然変異状態に基づいて、突然変異酵素の野生型遺伝子をＣＨＯ細胞内の過剰発現について選択するであろう。一般に、遺伝子が突然変異され、または不活性であると見いだされる場合、ストラテジーは、野生型遺伝子を過剰発現させることである。目標は、これらの遺伝子のマウスｍＲＮＡ配列を市販の哺乳動物発現ベクター中にクローニングし、ＣＨＯ細胞株Ａにこれらの発現ベクターをトランスフェクトすることである。得られる細胞株は、マウスＡＵＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、またはＰＡＨ遺伝子の発現が高レベルであり、ひいてはより高いレベルのＡＵＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、またはＰＡＨ酵素活性を有する。これらの重要な酵素の活性が増大すると、おそらく代謝フラックスが改善され、ある特定の公知の阻害性物質の細胞濃度が低減されることになる。

【０３６６】

材料および方法：

過剰発現カセットを、ＡＵＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、および／またはＰＡＨ遺伝子のＭＧＣコレクション（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｅｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ．ｎｃｉ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＭＧＣ／）からマウスｃＤＮＡ配列を使用して構築した。配列は、標的遺伝子のｃＤＮＡを含むシャトルベクターを含有する大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）グリセロールストック（ＧＥ　Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）として提供した。ＰＣＲプライマーを、Ｐｒｉｍｅｒ３アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｕｔ．ｅｅ／ｐｒｉｍｅｒ３－０．４．０／ｐｒｉｍｅｒ３／）を使用して設計して、Ｐｆｕ　Ｔｕｒｂｏ　ＨｏｔＳｔａｒｔ　２Ｘ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ａｇｉｌｅｎｔ）と呼ばれる校正ポリメラーゼを用いて反応におけるｃＤＮＡのコード領域を増幅した。ＰＣＲ産物は、ｐｃＤＮＡ　Ｇａｔｅｗａｙ　Ｄｉｒｅｃｔｉｏｎ　ＴＯＰＯ発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中に指向的にクローニングした。ベクターは、ウイルスプロモーター配列（ヒトサイトメガロウイルス最初期プロモーター）、指向性ＴＯＰＯクローニング部位、抗Ｖ５抗体を使用して検出するためのエピトープタグ（Ｖ５）、ポリアデニル化配列（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）、および抗生物質耐性遺伝子（ブラストサイジン）を含有する。ベクターは、ＷｙｚｅｒＢｉｏによって確認され、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＸＣｅｌｌエレクトロポレーター（ＢｉｏＲａｄ）を使用して過剰発現のためにＣＨＯ細胞株Ａ内にトランスフェクトされ、選択圧についてブラストサイジンの存在下で回収される配列である。操作されたＣＨＯ細胞を、ＲＴ　ｑＰＣＲ、ウェスタンハイブリダイゼーション、および酵素アッセイによって導入遺伝子の発現について査定する。ブラストサイジンを含有する培地で選択した後、細胞をバイオリアクターで後に実験するために凍結保存する。

【０３６７】

トランスフェクト細胞株は、操作されて高レベルでマウスＡＵＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、および／またはＰＡＨ遺伝子を発現し、ひいては増大したＡＵＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、またはＰＡＨ酵素活性を有する。ＲＴ　ｑＰＣＲ、ウェスタンハイブリダイゼーション、および酵素アッセイによる分析を実施して、新しく創製されたトランスジェニック細胞株内での総Ａｕｈ、Ｈｐｄ、Ｈｇｄ、またはＰａｈ遺伝子発現および酵素活性（ともに内因性かつトランスジェニック）の増大を明らかにする。

【０３６８】

（実施例１４）

実施例１１および１２で判定された標的遺伝子を発現する遺伝子操作された細胞株内でのインヒビター形成の抑制をプローブする実験

目標：

本実験の一部として、標的遺伝子を過剰発現するクローン（およびプール）の表現型を調査した。表現型判定は主に、ＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養におけるこれらのクローンのピーク細胞密度および産生性ならびに／または培養液中のインヒビター分子蓄積のレベルを主に伴う。

【０３６９】

材料および方法：

細胞およびバイオリアクターセットアップ
実験で使用したＣＨＯ細胞は、ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、ＡＵＨ、および突然変異分析によって実施例１１および１２で判定した任意の他の遺伝子標的の野生型形態の過剰発現から得られるＣＨＯ細胞株Ａの操作された形態である。２つの条件を本実験の一部として試験する：Ａ）すべての標的遺伝子を発現するＣＨＯ細胞を使用するＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養Ｂ）ＧＦＰタンパク質を発現するＣＨＯ細胞を用いたＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養。ＨＩＰＤＯＧ技術の使用についての詳細は、実施例１の材料および方法セクションに記載されている。シード培養からの指数関数的増殖細胞を１×１０６細胞／ｍＬでＨｉＰＤＯＧプロセスを使用する産生バイオリアクター内に接種した。両条件について、ＨｉＰＤＯＧ対照を培養の２日目と７日目との間で運用する。生存細胞密度、ラクテート、アンモニア、およびアミノ酸濃度を１２日目まで毎日測定する（アミノ酸は、最初の７日のみ測定する）。両条件について、標的にした接種生存細胞密度（１×１０６細胞／ｍＬ）、および培養容積（１Ｌ）、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（６．９～７．２）、および撹拌速度（２６７ｒｐｍ）を含むプロセスパラメータは同一であった。両条件について、使用される基本培地は培地Ａとなり、フィード培地は培地Ｂである。両実験にわたる様々な条件からの上清試料を、実施例１の材料および方法セクションに記載のＮＭＲ技術を使用して新しく同定されたインヒビターのレベルについて分析する。アミノ酸濃度を以下で詳細に記載するＵＰＬＣアミノ酸法を使用して試料について測定する。

【０３７０】

アミノ酸分析
標準アミノ酸ミックス溶液または使用済み培地試料（１０倍希釈試料）１０μＬをＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａホウ酸塩緩衝液（Ｗａｔｅｒｓ ＵＰＬＣ ＡＡＡ Ｈ－クラス Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ Ｋｉｔ［１７６００２９８３］）７０μＬと混合し、ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａ試薬希釈剤１．０ｍＬ中に以前に溶解させたＡｃｃＱ・Ｔａｇ試薬２０μＬを添加した。反応を５５℃で１０分間進行させる。液体クロマトグラフィー分析を、バイナリソルベントマネージャー、オートサンプラー、カラムヒーター、およびＰＤＡ検出器を備えたＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ ＵＰＬＣシステムで実施した。分離カラムは、Ｗａｔｅｒｓ ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａカラム（２．１ｍｍ ｉ．ｄ．×１００ｍｍ、１．７μｍ粒子）である。カラムヒーターを５５℃に設定する。移動相流量を０．７ｍＬ／分で維持した。溶離液Ａは、１０％ ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａ濃縮溶媒Ａであり、溶離液Ｂは、１００％ ＡｃｃＱ・Ｔａｇ Ｕｌｔｒａ溶媒Ｂである。非線形分離勾配は、０～０．５４分（９９．９％ Ａ）、５．７４分（９０．０％ Ａ）、７．７４分（７８．８％ Ａ）、８．０４～８．６４分（４０．４％ Ａ）、８．７３～１０分（９９．９％ Ａ）である。試料１マイクロリットルを分析のために注入する。ＰＤＡ検出器を２６０ｎｍに設定する。アミノ酸について以前に決定した溶出時間を使用して各試料のクロマトグラム上の特定のアミノ酸ピークを同定する。アミノ酸濃度を、ピーク下面積および標準液（Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ Ｓｔａｎｄａｒｄ Ｈ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＰＩ－２００８８）を使用して作成した較正曲線を使用して推定する。

【０３７１】

結果：
標的遺伝子を発現する細胞は、より少ない炭素（フェニルアラニン、チロシン、およびロイシン）をインヒビターの生合成に向けてチャネリングし、培養培地中の化合物の蓄積がより低くなる。しかし、ＧＦＰ分子（陰性対照）を発現する細胞は、より多くの炭素をインヒビター産生に向けてチャネリングし、培養培地中の化合物のより高い蓄積をもたらす。インヒビター産生および蓄積のレベルのこのような差異は、ＧＦＰを発現する細胞と比較して標的遺伝子セットを発現する細胞内のより高いピーク細胞密度に至る増殖差異をもたらせる。全細胞のこのような増加も、細胞によって産生される組換えタンパク質のより高い過剰収量に至る。

【０３７２】

（実施例１５）

フェニルアラニン／チロシン経路に関連したインヒビターの生合成を抑制するための代謝操作の遺伝子標的を判定する実験

目標

本実験は、フェニルラクテート、４－ヒドロキシフェニルピルベート、および３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートを含めたインヒビター分子の産生の原因を判定するのに実施された。フェニルアラニン／チロシン経路におけるすべての酵素の遺伝子発現をリアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ｑＰＣＲ）アッセイを使用してプローブした。フェニルアラニン／チロシン異化経路の遺伝子発現および生化学に基づいて、上述したインヒビターの生合成を抑制するＣＨＯ細胞（ＣＨＯ細胞株Ａ、ＣＨＯ細胞株Ｂ、および親細胞株）の代謝操作の遺伝子標的を同定した。

【０３７３】

材料および方法

遺伝子発現分析

ＲＴ－ｑＰＣＲアッセイを使用してフェニルアラニン／チロシン代謝経路における酵素の相対的遺伝子発現レベルを査定した。ＲＴ　ｑＰＣＲは、検出試薬（すなわち、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ）と組み合わせてＰＣＲを使用して標的ｃＤＮＡ配列を増幅することによって転写量、したがって遺伝子発現を測定する。ＳＹＢＲ　ｇｒｅｅｎは、二本鎖ＤＮＡに結合されているとき蛍光を発する分子であり、蛍光は、ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイ中にリアルタイムで測定することができる。蛍光の量は、反応における二本鎖ＰＣＲ産物（アンプリコンとも呼ばれる）の量に正比例する。相対的遺伝子発現レベルは、バックグラウンド蛍光を上回るのにＳＹＢＲ　ｇｒｅｅｎ蛍光に必要とされるＰＣＲサイクルの数を測定することによって判定され、対数的に増大する。このサイクル数は一般に、C_T（閾値サイクル）と呼ばれる。高存在量での転写物は、より低いC_T値を有するはずであり、その理由は、蛍光がバックグラウンド蛍光を上回るためにより少ないＰＣＲサイクルを必要とするためであり、反対に、より低い存在量での転写物は、より高いC_T値を有するはずであり、その理由は、蛍光がバックグラウンドレベルを上回るためにより多くのＰＣＲサイクルを必要とするはずであるためである。

【０３７４】

ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイは、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　７５００リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＰｏｗｅｒＵＰ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ　試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して実施した。ＰＣＲプライマーは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）ゲノムブラウザ（ｃｈｏｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ）に含まれているゲノムＤＮＡ配列に基づいてＰｒｉｍｅｒ３アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｕｔ．ｅｅ／ｐｒｉｍｅｒ３－０．４．０／ｐｒｉｍｅｒ３／）を使用して設計した。ＲＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＣＨＯ細胞株Ａから調製し、それをひいては、ＲＴ－ＰＣＲ用ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓシステム（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してオリゴｄＴプライミングｃＤＮＡを合成するための鋳型として使用した。標的代謝関連遺伝子のC_T値を表にし、十分特徴付けられたハウスキーピング遺伝子、ベータアクチンのC_T値と比較した。標的遺伝子のC_TとベータアクチンのC_Tとの差異をΔC_Tとして報告した。高ΔC_T値は、低遺伝子発現レベルを示す。

【０３７５】

結果

ＣＨＯ細胞株Ａおよび親細胞株のフェニルアラニン／チロシン経路中の遺伝子についてのC_TおよびΔC_T値を図２６に示す。ＣＨＯ細胞株Ｂは、ＣＨＯ細胞株Ａと同様のレベルの遺伝子発現を有する（データを示さず）。フェニルアラニン／チロシン経路からの遺伝子発現データは、ＣＨＯ細胞株Ａおよび親細胞株は、ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤ遺伝子の発現が低いことを示す。タンパク質（または酵素）レベルは、転写量に相関し、低レベルのＰＡＨ酵素は、ともにＣＨＯ細胞株Ａおよび親細胞株内で高レベルで発現されるＧ

ＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦ酵素の触媒作用（または非特異的酵素反応）によってフェニルピルベートに、引き続いてフェニルラクテートに変換されるフェニルアラニンをもたらし得る。同様に、ＣＨＯ細胞株Ａおよび親細胞株内のＨＰＤおよびＨＧＤ酵素が低レベルであることに起因して、チロシンは、ＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦ酵素の触媒作用（または非特異的酵素反応）によって４－ヒドロキシフェニルピルベートおよび３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートの産生にチャネリングされる。フェニルアラニンおよびチロシンフラックスのインヒビター産生に向けたチャネリングを低減する一つのやり方は、ＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦ遺伝子の発現を下方調節することであるはずである。しかし、ＧＯＴ１／ＧＯＴ２およびＭＩＦは、他の生理学的に重要な代謝機能に極めて重要である。したがって、これらの２つの酵素の下方調節またはノックアウトは、生存細胞株を潜在的に生じないはずである。インヒビター生合成を低減する代替のやり方は、ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤ遺伝子の過剰発現によるものであり、次いでそれは、インヒビター産生から離してクレブス回路代謝産物（これらは、ミトコンドリア内のエネルギー合成に使用される）の産生に向けてフラックスをチャネリングする。したがって、フェニルアラニン／チロシン経路のために選択された代謝標的は、ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤ遺伝子である。

【０３７６】

ＲＴ　ｑＰＣＲによって同定されたフェニルアラニン／チロシン経路中の３つ標的（ＰＡＨ、ＨＧＤ、およびＨＰＤ）に加えて、４番目の標的を検査した。ＰＡＨ酵素は、その触媒活性のためにテトラヒドロビオプテリン（ＢＨ４）と呼ばれるコファクターを必要とする。哺乳動物細胞は、基質としてＧＴＰを使用してＢＨ４を合成する（図２７Ａ）。ＢＨ４の生合成に関与する酵素としては、ＧＣＨ１、ＰＴＳ、およびＳＰＲがある。さらに、ＢＨ４は、ＰＡＨ活性によって触媒される反応中にＢＨ４－４ａ－カルビノールアミンに変換され、ＰＣＢＤ１およびＱＤＰＲ酵素の活性によってＢＨ４に再利用される。生合成および再利用酵素をコードする遺伝子の発現は、ＣＨＯ細胞（遺伝子発現分析に使用した細胞は、マウスＰＡＨ遺伝子での第１ラウンドのトランスフェクションを経験したものであった；実施例１６を参照）内でＲＴ　ｑＰＣＲによって同様にアッセイした（図２７Ｂ）。高C_T値、高ΔC_T、およびしたがって、低レベルの遺伝子発現に基づいて、ＰＣＢＤ１遺伝子も過剰発現について選択した。ＢＨ４経路中のすべての他の遺伝子は、合理的なレベルで発現された（図２７Ｂを参照）。

【０３７７】

（実施例１６）

ＣＨＯ細胞株内でＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１を過剰発現させる実験

目標

ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイによって判定した場合にＢ－アクチンと相対的低遺伝子発現レベルに基づいて、４つの標的をＣＨＯ細胞の過剰発現について選択した：ＨＰＤ、ＨＧＤ、ＰＡＨ、およびＰＣＢＤ１。本実験の主目標は、市販の哺乳動物発現ベクター内にこれらの遺伝子のｍＲＮＡ配列をクローニングし、ＣＨＯ親細胞株、ＣＨＯ細胞株Ａ、およびＣＨＯ細胞株Ｂに発現ベクターをトランスフェクトすることであった。得られる細胞株は、ＨＰＤ、ＨＧＤ、ＰＡＨ、およびＰＣＢＤ１遺伝子の発現が高レベルであり、ひいてはより高いレベルのＨＰＤ、ＨＧＤ、ＰＡＨ、およびＰＣＢＤ１酵素活性を有する。これらの重要な酵素の活性が増大すると、代謝フラックスが改善され、同定された阻害性物質の細胞濃度が低減された。

【０３７８】

材料および方法

ＨＰＤ、ＨＧＤ、ＰＡＨ、およびＰＣＢＤ１遺伝子の発現ベクターを、ＭＧＣコレクション（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｅｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ．ｎｃｉ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＭＧＣ／）からマウスｃＤＮＡ配列を使用して構築した（図２８）。配列は、標的遺伝子のｃＤＮＡを含むシャトルベクターを含有する大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）グリセロールストックとしてＧＥ　Ｄｈａｒｍａｃｏｎによって提供した。ＰＣＲプライマーを、Ｐｒｉｍｅｒ３

アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｕｔ．ｅｅ／ｐｒｉｍｅｒ３－０．４．０／ｐｒｉｍｅｒ３／）を使用して設計して、Ｐｆｕ Ｔｕｒｂｏ ＨｏｔＳｔａｒｔ ２Ｘ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ａｇｉｌｅｎｔ）と呼ばれる校正ポリメラーゼを用いて反応におけるｃＤＮＡのコード領域を増幅した。ＰＣＲ産物は、異なる抗生物質耐性遺伝子を含む市販の構成的発現ベクター内にクローニングして表６に示した発現プラスミドの個々の選択を可能にした。さらに、対照ベクターも、陰性対照（トランスフェクション対照）として機能を果たすために供給業者によって提供された。ベクターは、ＷｙｚｅｒＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）が確認した配列であった。発現および対照プラスミドを、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ ＸＣｅｌｌエレクトロポレーター（ＢｉｏＲａｄ）を使用してＣＨＯ親細胞、ＣＨＯ細胞株Ａ、およびＣＨＯ細胞株Ｂ内にトランスフェクトし、選択圧について抗生物質の存在下で回収した。段階的手法を採用し、それにより細胞にＰＡＨ発現ベクターを最初にトランスフェクトし、回収した。次いでＰＡＨ発現細胞プールにＨＰＤおよびＨＧＤを一緒にトランスフェクトし、得られる細胞プールに、最終産物、４倍トランスフェクト細胞株が実現されるまでＰＣＢＤ１をトランスフェクトした。抗生物質を含有する培地で選択した後、細胞プールをバイオリアクターで後に実験するために凍結保存した。図２８は、発現されたマウス遺伝子、Ｐｆｉｚｅｒの研究所で創製された発現ベクター、および抗生物質選択遺伝子を示す。ＣＨＯ細胞株Ａは、ＰＡＨをトランスフェクトしただけであり、後続のセットのトランスフェクションは行わなかった。表６は、使用した市販の発現ベクター、選択圧として使用した抗生物質、および発現ベクターの供給業者を含む、発現された各遺伝子に使用したプラスミドの概要を示す。陰性トランスフェクション対照細胞株を生成するのに使用したヌルベクターも列挙されている。

【０３７９】

【表６】

表６

遺伝子	トランスフェクション用ベクター	抗生物質選択	発現ベクターの供給業者
PAH	pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO	G418(ジェネテシン)	Invitrogen (Thermo Fisher)
HPD	pMONO-hygro-mcs	ハイグロマイシン	Invivogen
HGD	pcDNA6.2/V5/GW/D-TOPO	ブラストサイジン	Invitrogen (Thermo Fisher)
PCBD1	pSELECT-puro-mcs	ピューロマイシン	Invivogen
PAH の対照	pcDNA3.2/V5/GW-CAT	G418(ジェネテシン)	Invitrogen (Thermo Fisher)
HPD の対照	pMONO-hygro-mcs	ハイグロマイシン	Invivogen
HGD の対照	pcDNA6.2/V5/GW-CAT	ブラストサイジン	Invitrogen (Thermo Fisher)
PCBD1 の対照	pSELECT-puro-mcs	ピューロマイシン	Invivogen

【０３８０】

結果

細胞プールを、付随する陰性対照ベクター（空ベクターまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）を含有するベクター）（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールと呼ぶ）とともにＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１発現ベクター（４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールと呼ぶ）をトランスフェクトした後生成した。トランスフェクションから得た４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールは、高レベルでマウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子を発現し、増大したＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１酵素活性を有するように設計した。ＲＴ ｑＰＣＲおよびウェスタンハイブリダイゼーション（データを示さず）による分析を使用して、新しく創製されたトランスジェニック細胞プ

ール内でのＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子発現（ともに内因性かつトランスジェニック）の変化を判定した（実施例１７を参照）。

【０３８１】

（実施例１７）

４倍トランスフェクションから生成された細胞プール内のマウス導入遺伝子（ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１）の発現をプローブする実験

目標

ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイを実施して親細胞株またはＣＨＯ細胞株Ｂに由来する４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プール内のマウス導入遺伝子ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１の相対的遺伝子発現レベルを査定した。

【０３８２】

材料および方法

ＲＴ　ｑＰＣＲアッセイは、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　７５００リアルタイムＰＣＲシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）およびＰｏｗｅｒＵＰ　ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ試薬（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して実施した。ＰＣＲプライマーは、ＧＥ　Ｄｈａｒｍａｃｏｎによって提供されたＭＧＣコレクション（ｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｅｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎｓ．ｎｃｉ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＭＧＣ／）からのマウスｃＤＮＡ配列に基づいてＰｒｉｍｅｒ３アルゴリズム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｕｔ．ｅｅ／ｐｒｉｍｅｒ３－０．４．０／ｐｒｉｍｅｒ３／）を使用して設計した。ＲＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＣＨＯ細胞株Ａまたは親細胞株の４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールおよび４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールから調製し、それをひいては、ＲＴ－ＰＣＲ用ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓシステム（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してオリゴｄＴプライミングｃＤＮＡ合成の鋳型として使用した。マウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子のＣ$_T$値を表にし、十分特徴付けられたハウスキーピング遺伝子、Ｂ－アクチンのＣ$_T$値と比較した。標的遺伝子のＣ$_T$とＢ－アクチンのＣ$_T$とのデルタをΔＣ$_T$として報告した。４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プール内でのマウス導入遺伝子ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子の順調な発現を、マウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１発現を欠く陰性対照（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ）細胞プール内の導入遺伝子のΔＣ$_T$値と比較したときのΔＣ$_T$値の低減（したがって遺伝子発現レベルの増大）によって同定した。

【０３８３】

結果

４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールおよび対応する陰性対照プール（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ）内のマウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子のＣ$_T$値を表７に示す。対応する陰性対照細胞プール（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ）と比較して、より低いΔＣ$_T$値が、ＣＨＯ細胞株Ｂおよび親細胞株の４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プール内のマウス導入遺伝子について観察された。これは、標的の遺伝子発現が、４ｘ－ｔｆｘｎプールにおいてより高かったので、アミノ酸フラックスをフェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、および４－ヒドロキシフェニルラクテートインヒビター生合成経路から離すチャネリングを促進することを示す（実施例１９を参照）。４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プール内でのマウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１の発現の明らかな存在は、トランスジェニック（マウス）ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子と内因性（ハムスター）ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子との間の高レベルの配列相同性に部分的に起因する。これは、データがトランスジェニックおよび内在性遺伝子の両方を含めたＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子発現の総レベルを正確に反映することを示唆する。

【０３８４】

表７は、ＣＨＯ親細胞株およびＣＨＯ細胞株Ｂの４倍トランスフェクション（４ｘ－ｔｆｘｎ）または陰性４倍トランスフェクション対照（４ｘ－対照－ｔｆｘｎ）細胞プール内

のマウスＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１遺伝子の、ＲＴ－ｑＰＣＲによってアッセイした場合の発現レベルを示す。

【０３８５】

【表７】

表７

遺伝子	B-アクチンと比較した平均 ΔC_t(低 ΔC_t 値=高発現)			
	CHO 親細胞株 4x-対照-tfxn	CHO 親細胞株 4x-tfxn	CHO 細胞株 B 4x-対照-tfxn	CHO 細胞株 B 4x-tfxn
PAH	11.53	8.2	11.96	7.86
HPD	18.13	5.02	18.01	3.11
HGD	20.21	16.34	19.23	15.25
PCBD1	12.7	6.24	14.66	3.97

【０３８６】

（実施例１８）

チロシンフリー培地中でＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１を含む４種のトランスフェクションマウス遺伝子を発現して増殖する細胞プール（４ｘ－ｔｆｘｎ）の能力のプローブ

目標

ＰＡＨおよびＰＣＢＤ１酵素活性の発現は、細胞に、フェニルアラニンからのチロシンの合成を触媒し、したがってアミノ酸フラックスをフェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、および４－ヒドロキシフェニルラクテートインヒビター生合成経路から離すチャネリングを促進する能力を付与した（実施例１９を参照）。本実験の目標は、ＣＨＯ細胞株Ｂまたは親宿主細胞株に由来するＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１を含む４種のマウス遺伝子を発現する４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールがチロシンフリー培地条件下で増殖する能力を有するか否かを試験することであった。

【０３８７】

材料および方法

細胞、培地、および実験セットアップ

ＣＨＯ細胞株Ｂまたは親細胞株の４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールまたは４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールをスピンダウンし、細胞ペレットを培地Ｄ（チロシンを含まないが追加量（２ｍＭ）のフェニルアラニンが補充された培地Ｃ）に接種した。培地Ｃは、培地Ａ中のレベルの様々なアミノ酸の濃度のおよそ３分の１である。培地Ａは、炭酸水素ナトリウムおよび塩化カリウムの濃度にわずかな差異があり、ポリビニルアルコールの代わりにＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ６８を含有する、ＵＳ７２９４４８４、表１４に開示のインスリンフリー培地９の強化版である。これは、１０％グルタミンフリー培地５（ＵＳ７２９４４８４、表７）を添加し、８種のアミノ酸（Ｇｌｕ、Ｔｙｒ、Ｇｌｙ、Ｐｈｅ、Ｐｒｏ、Ｔｈｒ、Ｔｒｐ、およびＶａｌ）の濃度をさらに上昇させることによって強化した。アミノ酸の濃度を以下で表８に列挙する。

【０３８８】

【表８】

表８：培地Ａ中のアミノ酸の濃度

アミノ酸	培地Ａ中の濃度(mM)
アラニン	0.4
アルギニン	5.3
アスパラギン・H2O	21.1
アスパラギン酸	2.3
システイン・HCl・H2O	0.4
シスチン・2HCl	1.5
グルタミン酸	0
グルタミン酸ーナトリウム	2.0
グルタミン	0
グリシン	3.6
ヒスチジン・HCl・H2O	2.7
イソロイシン	5.4
ロイシン	9.4
リシン・HCl	8.9
メチオニン	3.1
フェニルアラニン	4.5
プロリン	9.1
セリン	11.8
トレオニン	10.8
トリプトファン	2.3
チロシン・2Na・2H2O	5.1
バリン	10.3

【０３８９】
細胞を、１２５ｍＬ振盪フラスコ中の２５ｍＬ作業容量に０．３Ｅ６細胞ｓ／ｍＬで接種した。振盪フラスコを、３６．５℃および５％二酸化炭素環境にて振盪プラットフォーム（１２５ｒｐｍ）でインキュベートした。細胞増殖を３日間モニターした。３日目に、細胞をスピンダウンし、細胞ペレットを０．３Ｅ６細胞／ｍＬで新鮮培地Ｄ中に再接種し、細胞増殖を次の５日間モニターした。
【０３９０】
結果
初代において、３日間の過程にわたって、４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールに由来する細胞株Ｂ

および親細胞株はともに、チロシンフリー培地条件下で十分増殖した一方、４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールは、いずれの増殖も示さなかった（図２９）。第２の継代において、第１のラウンドと同様に、４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールは、十分増殖した一方、４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールは、いずれの増殖も示さなかった。このデータは、４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールが、フェニルアラニンからチロシン合成を合成し、したがってアミノ酸フラックスをフェニルラクテート、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、および４－ヒドロキシフェニルラクテートインヒビター生合成経路から離すチャネリングを促進することができることを示唆した（実施例１９を参照）。

【０３９１】

さらに、細胞株Ｂおよび親細胞株の両方に由来する３ｘ－ｔｆｘｎ細胞プール（ＰＡＨ、ＨＰＤ、およびＨＧＤの過剰発現を有する）がチロシンフリー培地中で増殖することができないことも観察された（データを示さず）。これは、ＰＣＢＤ１の発現が、チロシンを生合成する細胞の能力に極めて重要であることを示唆した。ＰＡＨ酵素の活性が高ｐＨで増強されることが以前に報告されている（Ｐａｒｎｉａｋら、１９８８）。より高いｐＨ（＞７．０）でチロシンフリー条件下にて４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールを培養すると、細胞増殖速度および生存能がさらに増大した（データを示さず）。

【０３９２】

（実施例１９）

（ｉ）チロシン補充培養における４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールと比較したときのチロシンフリーフェドバッチ培養における４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールの同様のまたはより良好な増殖／産生性、および（ｉｉ）４ｘ－ｔｆｘｎ培養における３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテート、チロシン経路の副生物の蓄積の低減の実証

目標

本実験の目標は、４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールが、典型的な（チロシン補充）ＨｉＰＤＯＧ培養における４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールと比較したとき、同様のまたはより高い増殖速度でチロシンフリーＨｉＰＤＯＧ培養下で増殖し、同様のまたはより高いピーク細胞密度に到達し、同様のまたはより高い力価を生じさせることができることを実証することであった。別の目標は、チロシンフリー培地中での培養を用いたＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１発現の組合せが、チロシン経路の代謝産物副生物、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートの産生を抑制することを確立することであった。

【０３９３】

材料および方法：

細胞およびバイオリアクターセットアップ

組換え抗体を発現するＣＨＯ細胞株Ｂに由来する４ｘ－ｔｆｘｎ細胞および４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールを本実施例で使用した。４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールは、４種のマウス酵素（ＰＡＨ、ＨＰＤ、ＨＧＤ、およびＰＣＢＤ１）を発現した一方、４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールは、選択圧の耐性マーカーのみを発現した対照細胞である。

【０３９４】

４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞プールに由来する細胞株Ｂを、それぞれチロシンフリー培地Ａ、または培地Ａの元の配合（チロシンを含有する）を使用してＨＩＰＤＯＧフェドバッチ培養中に１．２Ｅ６細胞／ｍＬで接種した（培地Ａの情報について実施例１８を参照）。培養中に栄養分を補充するために、チロシンフリーフィード培地Ｂを４ｘ－ｔｆｘｎ細胞プールフェドバッチ培養に使用した一方、フィード培地Ｂの元の組成（チロシンを含有する）を４ｘ－対照－ｔｆｘｎフェドバッチ培養について使用した（培地Ｂの情報について、以下を参照）。両条件について、培養容積（１Ｌ）、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（２日目まで：７．１５～７．２０、２日目より後：７．１０～７．１５）、および撹拌速度（２５９ｒｐｍ）を含むプロセスパラメータは、同一であった。ＨｉＰＤＯＧストラテジーを実行全体にわたって使用した。生存細胞密度、グルコース、ラクテート、アンモニア、およびアミノ酸濃度を１２日目まで毎日測定した。両条件からの上清試料を以下に記載のＮＭＲ技術を使用して３－（４－ヒドロキシルフェニル）ラクテートのレベルに

ついて分析した。培養アミノ酸レベルを以下に記載のアミノ酸分析法を使用して測定した。

【０３９５】

培地Ｂは、培地５と同じ組成を有する（ＵＳ７２９４４８４、表７）が、より高いレベルのアミノ酸を含む（２．５倍）。培地Ｂ中のアミノ酸の濃度を表９に示す。

【０３９６】

【表９】

表 9:培地 B 中のアミノ酸の濃度

アミノ酸	培地 B 中の濃度(mM)
アラニン	6.0
アルギニン	32.9
アスパラギン・H_2O	54.0
アスパラギン酸	15.0
システイン・HCl・H_2O	0.0
シスチン・2HCl	4.7
グルタミン酸	6.0
グルタミン酸一ナトリウム	0.0
グルタミン	0.0
グリシン	6.0
ヒスチジン・HCl・H_2O	10.5
イソロイシン	27.0
ロイシン	38.9
リシン・HCl	30.0
メチオニン	12.0
フェニルアラニン	15.0
プロリン	18.0
セリン	45.2
トレオニン	24.0
トリプトファン	4.8
チロシン・2Na・$2H_2O$	12.0
バリン	24.0

【０３９７】

ＮＭＲ試料調製、データ取得および処理

各試料１０００μＬをＮａｎｏｓｅｐ　３Ｋ　Ｏｍｅｇａ微量遠心フィルターチューブを使用して６０分間濾過し、濾過した試料６３０μＬをＮＭＲ分析に使用した。これらのフィ

ルターは、グリセロールで保存したので、何らかの微量のグリセロールが分析に現れ得る。内部標準溶液を各試料溶液に添加し、得られた混合物を３０秒間ボルテックスした。遠心分離した溶液７００μＬをＮＭＲチューブに移し、データを取得した。

【０３９８】

ＮＭＲスペクトルは、自動調整付き低温冷却１Ｈ／１３Ｃ三重共鳴生体分子プローブを備えたＶａｒｉａｎ４チャネルＶＮＭＲＳ　７００ＭＨｚ　ＮＭＲ分光計で取得した。使用したパルスシーケンスは、水に対する９９０ｍｓのプレサチュレーションおよび４秒の捕捉時間を伴った１Ｄ－ｔｎｎｏｅｓｙであった。スペクトルは、２９８Ｋで３２回のトランジェントおよび４回の定常状態スキャンを用いて収集した。

【０３９９】

スペクトルを処理し、．ｃｎｘ　ｆｉｌｅを、Ｃｈｅｎｏｍｘ　ＮＭＲ　Ｓｕｉｔｅ８．０のプロセッサーモジュールを使用して作成した。化合物を、３３２の化合物を含有するＣｈｅｎｏｍｘ　Ｃｏｍｐｏｕｎｄ　Ｌｉｂｒａｒｙバージョン９を伴ったＣｈｅｎｏｍｘ　ＮＭＲ　Ｓｕｉｔｅ８．０のプロファイラーモジュールを使用して同定および定量化した。報告目的で、プロファイリングした濃度を補正してＮＭＲチューブの内容物の代わりに元の試料の組成を反映させた。試料調製中、各試料を、内部標準を導入することによって希釈して、必要な場合、小試料の分析体積を増大させる。

【０４００】

アミノ酸分析

標準アミノ酸ミックス溶液または使用済み培地試料（１０倍希釈試料）１０μＬをＡｃｃＱ・Ｔａｇ　Ｕｌｔｒａホウ酸塩緩衝液（Ｗａｔｅｒｓ　ＵＰＬＣ　ＡＡＡ　Ｈ－クラス　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　Ｋｉｔ［１７６００２９８３］）７０μＬと混合し、ＡｃｃＱ・Ｔａｇ　Ｕｌｔｒａ試薬希釈剤１．０ｍＬ中に以前に溶解させたＡｃｃＱ・Ｔａｇ試薬２０μＬを添加した。反応を５５℃で１０分間進行させた。液体クロマトグラフィー分析は、バイナリソルベントマネージャー、オートサンプラー、カラムヒーター、およびＰＤＡ検出器を備えたＷａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣシステムで実施した。分離カラムは、Ｗａｔｅｒｓ　ＡｃｃＱ・Ｔａｇ　Ｕｌｔｒａカラム（２．１ｍｍ　ｉ．ｄ．×１００ｍｍ、１．７μｍ粒子）であった。カラムヒーターは、５５℃に設定し、移動相流量は、０．７ｍＬ／分で維持した。溶離液Ａは、１０％　ＡｃｃＱ・Ｔａｇ　Ｕｌｔｒａ濃縮溶媒Ａであり、溶離液Ｂは、１００％　ＡｃｃＱ・Ｔａｇ　Ｕｌｔｒａ溶媒Ｂであった。非線形分離勾配は、０～０．５４分（９９．９％　Ａ）、５．７４分　（９０．０％　Ａ）、７．７４分（７８．８％　Ａ）、８．０４～８．６４分（４０．４％　Ａ）、８．７３～１０分（９９．９％　Ａ）であった。試料１マイクロリットルを分析のために注入した。ＰＤＡ検出器は、２６０ｎｍに設定した。アミノ酸について以前に決定した溶出時間を使用して各試料のクロマトグラム上の特定のアミノ酸ピークを同定した。アミノ酸濃度を、ピーク下面積および標準液（Ａｍｉｎｏ　Ａｃｉｄｓ　Ｓｔａｎｄａｒｄ　Ｈ、ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ＰＩ－２００８８）を使用して作成した較正曲線を使用して推定した。

【０４０１】

結果

両培養における細胞プールは、指数関数的様式で増殖し、わずかにより良好な増殖が４ｘ－対照－ｔｆｘｎ培養と比較して４ｘ－ｔｆｘｎ細胞チロシンフリーフェドバッチ培養において観察された（図３０Ａ）。両培養は、培養の７日目と９日目との間で３５Ｅ６細胞／ｍＬのピーク細胞密度を達成した。両培養において、細胞生存能は、培養の１２日目を通じて９７％超であった（図３０Ｂ）。両培養の力価プロファイルは、非常に同様であり、１１日目の力価は２．５ｇ／Ｌであった（図３０Ｃ）。さらに、４ｘ－ｔｆｘｎ細胞は、４ｘ－対照－ｔｆｘｎ細胞より速い速度でフェニルアラニンを消費することが観察された（データを示さず）。チロシン蓄積が４ｘ－ｔｆｘｎ培養で観察された（データを示さず）。これは、４ｘ－ｔｆｘｎ細胞がフェニルアラニンをチロシンに変換してこの細胞の生理的必要性（バイオマスおよびタンパク質合成）のためにそれを供給することを示唆し

た。過剰のチロシンが培養液中に分泌された。４ｘ－対照－ｔｆｘｎ培養液に、接種およびフィード培地で外因性チロシンを補充した。チロシンのレベルは、４ｘ－対照－ｔｆｘｎ培養の過程にわたって低下し、これらの細胞によるチロシンの消費を示した（データを示さず）。さらに、チロシン代謝の副生物、３－（４－ヒドロキシフェニル）ラクテートのレベルは、４ｘ－対照－ｔｆｘｎ培養と比較して４ｘ－ｔｆｘｎ培養において著しく低く、フェニルアラニンおよび／またはチロシンの副生物合成に向けたチャネリングがより低いことを示した（図３０Ｄ）。

【０４０２】

（実施例２０）

ＣＨＯ細胞の増殖に対する２－メチルブチレートおよびイソブチレートの効果のプローブ

目標：

２－メチルブチレートおよびイソブチレートは、イソロイシンおよびバリン経路の副生物であり、これらは、ＣＨＯ細胞株ＡのＨｉＰＤＯＧフェドバッチ培養において蓄積することが観察された。７日目の蓄積のレベルは、２－メチルブチレートで約９ｍＭであり、イソブチレートで２ｍＭであった（データを示さず；ＣＨＯ細胞株Ｃの蓄積は、同じ順序である（実施例２１を参照））。本実験は、ＨｉＰＤＯＧフェドバッチ培養において観察された濃度範囲内でＣＨＯ細胞株Ａの増殖に対するこれらの２種の化合物の効果を個別にプローブするために設定した。

【０４０３】

材料および方法：

組換え抗体を産生するＣＨＯ細胞株Ａを、６－ウェルプレート培養液中に３通りで様々な条件下で低細胞密度（０．１Ｅ６細胞／ｍＬ）で接種した。０日目の各ウェル作業容量は、４ｍＬであった。試験した条件は、新鮮培地Ａまたは様々な濃度で２－メチルブチレートもしくはイソブチレートを個別に補充した新鮮培地Ａを含む。２－メチルブチレートについて試験した濃度は、［０、５、１０、および２０ｍＭ］であり、イソブチレートについて試験した濃度は、［０、１、２、および４ｍＭ］である。６－ウェルプレートを、３６．５℃および５％二酸化炭素下にて振盪プラットフォームでインキュベートした。すべての条件下の細胞増殖を５日間モニターした。

【０４０４】

結果：

図３１は、ＣＨＯ細胞株Ａの増殖に対する２－メチルブチレートまたはイソブチレートの独立した効果を示す。新鮮培地中で培養した細胞は、非常によく増殖した。細胞増殖は、細胞をそれぞれ５ｍＭまたは１ｍＭ超の濃度で２－メチルブチレート（図３１Ａ）またはイソブチレート（図３１Ｂ）を補充した新鮮培地中で培養したとき抑制された。これは、２－メチルブチレートおよびイソブチレートが細胞増殖を阻害することを実証する。２－メチルブチレートは、イソロイシン代謝の代謝副生物であり、イソブチレートは、バリン代謝の代謝副生物である。

【０４０５】

（実施例２１）

ＣＨＯ細胞（ＣＨＯ細胞株Ｃ）のフェドバッチ培養における、それぞれイソロイシンまたはバリンの制限による２－メチルブチレートまたはイソブチレートの蓄積の低減の実証。

目標

本実施例の主目標は、それぞれイソロイシンまたはバリンの供給を制限することによるＣＨＯ細胞のフェドバッチ培養における２－メチルブチレートまたはイソブチレートの蓄積の低減を実証することであった。

【０４０６】

材料および方法

細胞およびバイオリアクターセットアップ

組換え抗体を発現するＧＳ－ＣＨＯ細胞株（細胞株Ｃ）を本実施例で使用した。２つの条件は、本実施例の一部として試験した：Ａ）低レベルのイソロイシンおよびバリン（低Ａ

Ａ）を有するフェドバッチ培養、Ｂ）通常のアミノ酸濃度を有するフェドバッチ培養（対照）。実験は、１２日間実行した。

【０４０７】

シード培養からの指数関数的増殖細胞を、典型的なフェドバッチプロセス（典型的なレベルのアミノ酸を含む）または低アミノ酸フェドバッチプロセスを使用した産生バイオリアクター中に約４Ｅ６細胞／ｍＬで接種した。低アミノ酸条件では、イソロイシンおよびバリンの濃度を、培養の最初の７日間、０．５ｍＭから１ｍＭの間で維持し、その後、これらを１ｍＭを超えて増大させた。生存細胞密度、グルコース、ラクテート、アンモニア、およびアミノ酸濃度を１２日目まで毎日測定した。両条件について、培養容積（１Ｌ）、ならびに温度（３６．５℃）、ｐＨ（６．９～７．２）、および撹拌速度（２５９ｒｐｍ）を含むプロセスパラメータは、同一であった。対照条件で使用した基本培地は、培地Ａであり、低アミノ酸条件で使用したものは、チロシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、セリン、グリシン、トレオニン、ロイシン、イソロイシン、およびバリンを含む低濃度のアミノ酸を有する培地Ａの改良版であった。両条件に使用したフィード培地は、培地Ｂであった。培地Ｂ中のアミノ酸レベルは、半連続様式での培地Ｂのフィードによって送達されるアミノ酸の量が培養液が吸収するアミノ酸の量におよそ等しいように調整した。使用したフィード速度は、培養液中の不可欠な生存細胞に比例した。両条件からの上清試料を実施例１９に記載のＮＭＲ技術を使用して２－メチルブチレートおよびイソブチレートのレベルについて分析した。培養アミノ酸レベルは、実施例１９に記載のアミノ酸分析法を使用して測定した。

【０４０８】

結果

アミノ酸、イソロイシン、およびバリンの濃度は、低ＡＡ条件下で０．５ｍＭ～１ｍＭの間で順調に維持された（図３２Ａおよび３２Ｃ）。低ＡＡ条件下でアミノ酸レベルをこのように制限すると、２－メチルブチレート（図３２Ｂ）およびイソブチレート（図３２Ｄ）のより低い蓄積がもたらされた。

【０４０９】

（実施例２２）

分岐鎖アミノ酸経路から産生されるインヒビター（イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレート）の生合成を抑制するための代謝操作の遺伝子標的を判定する実験

目標

本実験は、ＣＨＯ細胞のフェドバッチ培養において非常に高レベルに蓄積した分岐鎖アミノ酸代謝の副生物であるイソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレートの生合成の原因を判定するために実施した。分岐鎖アミノ酸経路（ＢＣＡＡ）中のすべての酵素の遺伝子発現をプローブした。ＢＣＡＡ異化作用経路における遺伝子発現分析に基づいて、イソバレレート、イソブチレート、および２－メチルブチレートの生合成を抑制するＣＨＯ細胞（ＣＨＯ細胞株Ｂおよび親細胞株）の代謝操作の遺伝子標的を同定した。

【０４１０】

結果

ＲＴ　ｑＰＣＲ分析をロイシン異化経路遺伝子について実施した。ロイシン経路中の遺伝子の対数発現値を図３３Ａに示す。ロイシン経路からの遺伝子発現データは、経路中のすべての酵素が同様のレベルで発現されたことを示す。イソロイシンおよびバリン経路中の酵素の遺伝子発現も、親細胞株内で相対的に高いことが観察された（データを示さず）。データは、イソバレレート、イソブチレート、および２－メチルブチレート生合成および分泌の高い速度を説明し得るＢＣＡＡ経路中の明らかの標的の方向を指さなかった。しかし、イソバレレート、イソブチレート、または２－メチルブチレートノードの下流の酵素は、イソバレレート、イソブチレート、または２－メチルブチレートに向けたフラックスのチャネリングを説明することができる機能損失突然変異を宿し得る。ＢＣＡＴ１（またはＢＣＡＴ２）およびＢＣＫＤＨＡ／ＢＣＫＤＨＢ酵素は、３つすべての分岐鎖アミノ酸

経路における最初の２つのステップを触媒するので、任意の上述した酵素の活性のノックダウンもしくはノックアウトまたは阻害を、イソバレレート、イソブチレート、および２－メチルブチレートの生合成を低減する目的で行った（図３３Ｂ）。

【０４１１】

（実施例２３）

ＢＣＡＡ経路インヒビター（イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレート）生合成の産生量を抑制する一過性ＢＣＡＴ１ノックダウンＣＨＯ細胞プールの生成

目標

本実験は、それぞれの細胞培養においてイソバレレート、イソブチレート、および２－メチルブチレートの産生量を制限するために、ＣＨＯ細胞株ＢおよびＣＨＯ親細胞株内のＢＣＡＴ１遺伝子発現をノックダウンするように設定した。

【０４１２】

材料および方法

ｍｉＲＮＡノックダウンは、標的遺伝子配列（例えば、ＢＣＡＴ１）に相補的である低分子ＲＮＡ配列（およそ２０～２５塩基）を発現させることによって働く。ｍｉＲＮＡは、標的遺伝子のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）に結合し、二本鎖ＲＮＡの領域を形成する。この二本鎖ＲＮＡは、細胞による切断および分解を標的にされ、翻訳されるｍＲＮＡ、およびしたがって産生されるタンパク質の正味の低下をもたらす。ＢＣＡＴ１のマイクロＲＮＡノックダウンは、ＥｍＧＦＰを含むＢＬＯＣＫ－ｉＴ Ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ Ｐｏｌ ＩＩ ｍｉＲ ＲＮＡｉ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｖｅｃｔｏｒ Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して実施した。５つのｍｉＲＮＡオリゴヌクレオチド対（ＢＣＡＴ１の相補的トップおよびボトム鎖）を、Ｂｌｏｃｋ－ｉＴ ＲＮＡｉデザイナーと呼ばれるオンラインツール（ｈｔｔｐｓ：／／ｒｎａｉｄｅｓｉｇｎｅｒ．ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ．ｃｏｍ／ｒｎａｉｅｘｐｒｅｓｓ／）を使用して設計し、ＤＮＡオリゴヌクレオチドは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ技術（ｗｗｗ．ｉｄｔｄｎａ．ｃｏｍ）によって調製した。オリゴヌクレオチド対をアニールし、ｐｃＤＮＡ（商標）６．２－ＧＷ／ＥｍＧＦＰ－ｍｉＲベクター中にライゲーションした。ベクター（これらのうちの５種）は、ＷｙｚｅｒＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）が確認した配列であった。５種のｍｉＲＮＡベクターまたはｐｃＤＮＡ（商標）６．２－ＧＷ／ＥｍＧＦＰ－ｍｉＲ－ｎｅｇという名称の陰性対照ベクター（キットとともにＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎにより提供された）を、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ ＸＣｅｌｌエレクトロポレーター（ＢｉｏＲａｄ）を使用してＣＨＯ親細胞株またはＣＨＯ細胞株Ｂ内にトランスフェクトし、２日間放置して回収した。２日後、細胞を、安定な細胞プールを生成させるために抗生物質（プラストサイジン、１０μｇ／ｍＬ）による選択圧に付し（実施例２４を参照）、またはトランスフェクト細胞（もしくは非トランスフェクト細胞）由来の細胞ライセートを、ｃＯｍｐｌｅｔｅ、Ｍｉｎｉ、ＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ）を補充したＭ－ＰＥＲタンパク質抽出試薬（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）で調製した。試料を、Ｎｏｖｅｘ ＮｕＰａｇｅシステム（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ）を使用してウェスタンブロットによって分析した。システムは、ポリアクリルアミドゲル、試料ローディング緩衝液、試料還元剤、ゲルランニング緩衝液、タンパク質質量標準物質、ニトロセルロース膜、および化学発光検出試薬を提供する。ブロットは、ウサギポリクローナル抗ＢＣＡＴ１抗体（ＡｂＣａｍ、カタログ番号ａｂ１１０７６１）またはＢ－アクチン抗体（ＡｂＣａｍ、カタログ番号ａｂ８２２７）を用いてプローブした。ウェスタンブロットを、ＢｉｏＲａｄ ＣｈｅｍｉＤｏｃシステムを使用して画像化し、Ｂ－アクチンおよびＢＣＡＴ１のレベルについて分析した。

【０４１３】

使用したＢＣＡＴ１ ｍｉＲＮＡ配列：

ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ１．１ａ：ＴＧＧＧＡＧＡＡＧＣＣＴＣＡＣＡＴＴＡＡＡ

ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ２．１ａ：ＴＣＴＧＣＴＧＴＧＡＧＧＡＣＣＡＣＴＴＴＧ

ｍｉＲＮＡ ｓｅｑ３．１ａ：ＡＧＴＧＧＧＣＡＣＧＡＴＧＡＡＴＣＴＧＴＴ

ｍｉＲＮＡ　ｓｅｑ４．１ａ：ＣＡＣＧＡＴＧＡＡＴＣＴＧＴＴＣＣＴＣＴＡ
ｍｉＲＮＡ　ｓｅｑ５．１ａ：ＣＴＴＧＧＧＣＡＡＡＣＴＧＡＣＴＧＡＴＡＴ
【０４１４】
結果
図３４は、一過性トランスフェクト細胞内のＢＣＡＴ１およびＢ－アクチンタンパク質レベルのウェスタンブロットを示す。Ｂ－アクチンは、ハウスキーピング遺伝子（またはタンパク質）として含まれ、タンパク質発現の内部コンパレーターとして使用した。Ｂ－アクチンのレベルは、５つすべてのｍｉＲＮＡ（一過性）トランスフェクション、陰性ｍｉＲＮＡ対照トランスフェショントおよび非トランスフェクト細胞（ＣＨＯ細胞株Ｂおよび親細胞株の両方について）にわたって同様であった。これは、すべての条件にわたるタンパク質ローディングさえ示した（図３４Ａおよび３４Ｃ）。ＣＨＯ親細胞株一過性トランスフェクションでは、より低いレベルのＢＣＡＴ１タンパク質が、ｍｉＲＮＡ　Ｓｅｑ　２．１ａ、ｍｉＲＮＡ　Ｓｅｑ　３．１ａ、ｍｉＲＮＡ　Ｓｅｑ　４．１ａ、およびｍｉＲＮＡ　Ｓｅｑ　５．１ａを使用したノックダウンの場合において観察された。親細胞株一過性トランスフェクションでは、より低いレベルのＢＣＡＴ１タンパク質が、試験した５つすべてのノックダウン条件下で観察された。非トランスフェクト対照および陰性対照は、より強いバンディングパターンを示し、より高いレベルのＢＣＡＴ１タンパク質を示した。
【０４１５】
（実施例２４）
ＢＣＡＡ経路インヒビター（イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレート）生合成の産生量を抑制する安定なＢＣＡＴ１ノックダウンＣＨＯ細胞プールの生成
目標
本実験の主目標は、ＢＣＡＴ１のレベルが低減された安定なＣＨＯ細胞プールを開発することであった。目的は、これらの安定プールは、ＢＣＡＡ経路インヒビター代謝産物（イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレート）を産生する能力が低減されており、その低減がより良好な増殖および産生性をもたらしたことをさらに実証することであった。
【０４１６】
結果
５つのＢＣＡＴ１　ｍｉＲＮＡノックダウンベクターをトランスフェクトした親およびＣＨＯ細胞株Ｂ細胞を、安定な細胞プールについて選択した。次いで安定なプールをＢＣＡＴ１のタンパク質レベルについてプローブした。親細胞株のすべての安定なプールは、５種のｍｉＲＮＡでのトランスフェクションから生成され、陰性ｍｉＲＮ配列対照でのトランスフェクションから生成された安定なプールと比較したとき、様々な程度にＢＣＡＴ１のタンパク質レベルを低減した（図３５Ａおよび３５Ｂ）。これは、ＢＣＡＴ１がノックダウンされた安定な細胞プールの順調な生成を示した。ＢＣＡＴ１のタンパク質レベルがより低いプールを、フェドバッチ培養（ＨｉＰＤＯＧストラテジーを使用した、または使用しない）におけるイソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレートを含むインヒビターの産生量について選択および試験した。より低いレベルのこれらの阻害性代謝産物を産生する培養物は、より高い細胞密度に増殖し、より高い力価を生じた。イソ酵素ＢＣＡＴ２の等価なノックダウンも実施して、イソバレレート、２－メチルブチレート、およびイソブチレートを含むインヒビターの産生の低減について試験するために、ＢＣＡＴ２産生量のレベルの低減を実証した。ＢＣＡＴ２は、ＢＣＡＴ１のイソ酵素形態であり、これは、ＢＣＡＴ１と触媒的および機能的に等価であり、図３３Ｂに表したロイシン、イソロイシン、およびバリン経路中の同じ機能を遂行する。
【０４１７】

【表１０－１】

表 10 - 略語

略語	記述
B-アクチン	アクチン、ベータ
MIF	マクロファージ遊走阻止因子
GOT1	グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 1、可溶性
GOT2	グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ 2、ミトコンドリア
TAT	チロシンアミノトランスフェラーゼ
FAH	フマリルアセトアセテートヒドロラーゼ
GSTZ1	グルタチオントランスフェラーゼゼータ 1(マレイルアセトアセテートイソメラーゼ)
PAH	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ
HPD	4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ
HGD	ホモゲンチセート 1、2-ジオキシゲナーゼ
DLD	ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ
IVD	イソバレリル補酵素 A デヒドロゲナーゼ
MCCC1	メチルクロトノイル-補酵素 A カルボキシラーゼ 1(アルファ)
MCCC2	メチルクロトノイル-補酵素 A カルボキシラーゼ 2(ベータ)
BCKDHA	分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ E1、アルファポリペプチド
BCKDHB	分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ E1、ベータポリペプチド
DBT	ジヒドロリポアミド分岐鎖トランスアシラーゼ E2
BCAT1	分岐鎖アミノトランスフェラーゼ 1、細胞質ゾル
BCAT2	分岐鎖アミノトランスフェラーゼ 2、ミトコンドリア
AUH	AU RNA 結合タンパク質/エノイル-補酵素 A ヒドラターゼ
HMGCL	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-補酵素 A リアーゼ
ACADM	アシル-補酵素 A デヒドロゲナーゼ、中鎖

【０４１８】

【表１０－２】

GCH1	GTP シクロヒドロラーゼ１
PTS	6-ピルボイル-テトラヒドロプテリン合成酵素
SPR	セピアプテリンレダクターゼ
PCBD1	肝実質細胞核因子１アルファ(TCF1)1 のプテリン４アルファカルビノールアミンデヒドラターゼ/二量体化コファクター
QDPR	キノイドジヒドロプテリジンレダクターゼ
BH_4	テトラヒドロビオプテリン
BH_4 - 4a - カルビノールアミン	テトラヒドロビオプテリン-4 アルファ-カルビノールアミン
q-BH_2	キノイドジヒドロビオプテリン
NAD^+	酸化ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADH	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
GTP	グアノシン-5'-トリホスフェート
4x-tfxn	目的の遺伝子および耐性マーカー(PAH&ジェネテシン、またはHGD&ブラストサイジン、またはHPD&ハイグロマイシン、またはPCBD1&ピューロマイシン)を含有する４種のベクターをトランスフェクトした細胞プール
4x-対照-tfxn	耐性マーカー(ジェネテシン、またはブラストサイジン、またはハイグロマイシン、またはピューロマイシン)のみを含有する４種のヌルベクターをトランスフェクトした細胞プール
CoA	補酵素 A

【０４１９】

参考文献

Ａｌｔａｍｉｒａｎｏ Ｃ、Ｉｌｌａｎｅｓ Ａ、Ｂｅｃｅｒｒａ Ｓ、Ｃａｉｒｏ ＪＪ、Ｇｏｄｉａ Ｆ（２００６）、Ｃｏｎｓｉｄｅｒａｔｉｏｎｓ ｏｎ ｔｈｅ ｌａｃｔａｔｅ ｃｏｎｓｕｍｐｔｉｏｎ ｂｙ ＣＨＯ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｔｈｅ ｐｒｅｓｅｎｃｅ ｏｆ ｇａｌａｃｔｏｓｅ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１２５：５４７～５５６

Ｂｅｒｔｏｎｉ ＪＭ（１９８１）、Ｃｏｍｐｅｔｉｔｉｖｅ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｒａｔ ｂｒａｉｎ ｈｅｘｏｋｉｎａｓｅ ｂｙ ２－ｄｅｏｘｙｇｌｕｃｏｓｅ、ｇｌｕｃｏｓａｍｉｎｅ、ａｎｄ ｍｅｔｒｉｚａｍｉｄｅ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｎｅｕｒｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、３７：１５２３～１５２８

Ｃｌｅｍ Ｂ、Ｔｅｌａｎｇ Ｓ、Ｃｌｅｍ Ａ、Ｙａｌｃｉｎ Ａ、Ｍｅｉｅｒ Ｊ、Ｓｉｍｍｏｎｓ Ａ、Ｒａｓｋｕ ＭＡ、Ａｒｕｍｕｇａｍ Ｓ、Ｄｅａｎ ＷＬ、Ｅａｔｏｎ Ｊ、Ｌａｎｅ Ａ、Ｔｒｅｎｔ ＪＯ、Ｃｈｅｓｎｅｙ Ｊ（２００８）Ｓｍａｌｌ－ｍｏｌｅｃｕｌｅ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ６－ｐｈｏｓｐｈｏｆｒｕｃｔｏ－２－ｋｉｎａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ ｇｌｙｃｏｌｙｔｉｃ ｆｌ

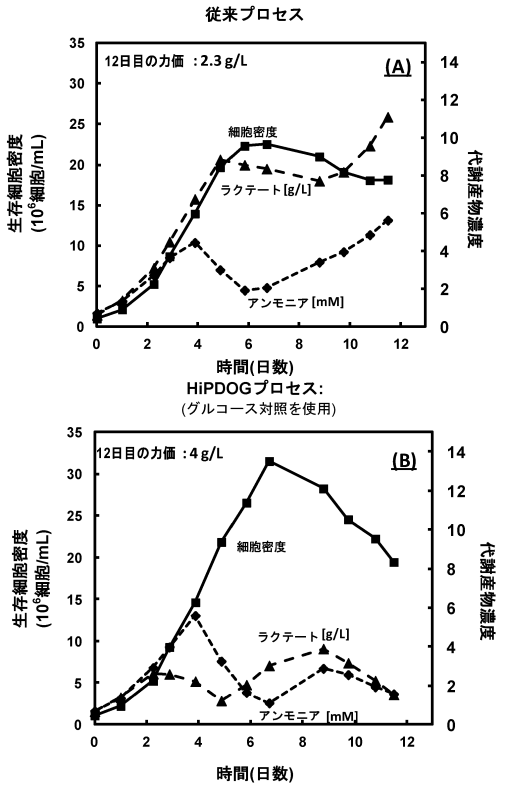
ux and tumor growth.、Molecular cancer therapeutics、7：110～120
Duvel K、Yecies JL、Menon S、Raman P、Lipovsky AI、Souza AL、Triantafellow E、Ma Q、Gorski R、Cleaver S、Vander Heiden MG、MacKeigan JP、Finan PM、Clish CB、Murphy LO、Manning BD（2010）、Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. Molecular cell、39：171～183
Gagnon M、Hiller G、Luan YT、Kittredge A、DeFelice J、Drapeau D（2011）、High-end pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO fed-batch cultures. Biotechnology and bioengineering、108：1328～1337
Kim SH、Lee GM（2007a）、Down-regulation of lactate dehydrogenase-A by siRNAs for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. Applied microbiology and biotechnology、74：152～159
Kim SH、Lee GM（2007b）、Functional expression of human pyruvate carboxylase for reduced lactic acid formation of Chinese hamster ovary cells (DG44). Applied microbiology and biotechnology、76：659～665
Lee HLT、Boccazzi P、Gorret N、Ram RJ、Sinskey AJ（2004）、In situ bioprocess monitoring of Escherichia coli bioreactions using Raman spectroscopy. Vibrational Spectroscopy、35：131～137
Lee JS、Lee GM（2012）、Rapamycin treatment inhibits CHO cell death in a serum-free suspension culture by autophagy induction. Biotechnology and bioengineering、109：3093～3102
Li B、Ryan PW、Ray BH、Leister KJ、Sirimuthu NM、Ryder AG（2010）、Rapid characterization and quality control of complex cell culture media solutions using raman spectroscopy and chemometrics. Biotechnology and bioengineering、107：290～301
Morgan HP、O'Reilly FJ、Wear MA、O'Neill JR、Fothergill-Gilmore LA、Hupp T、Walkinshaw MD（2013）、M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、110：5881～5886
Mulukutla BC、Gramer M、Hu WS（2012）、On meta

bolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells. Metabolic engineering、14：138～149
Whelan J、Craven S、Glennon B（2012）、In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors. Biotechnology progress、28：1355～1362
Whitehouse S、Cooper RH、Randle PJ（1974）Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. The Biochemical journal、141：761～774
Wlaschin KF、Hu WS（2007）Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. Journal of biotechnology、131：168～176
Yi W、Clark PM、Mason DE、Keenan MC、Hill C、Goddard WA、3rd、Peters EC、Driggers EM、Hsieh-Wilson LC（2012）、Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. Science、337：975～980
Zhou M、Crawford Y、Ng D、Tung J、Pynn AF、Meier A、Yuk IH、Vijayasankaran N、Leach K、Joly J、Snedecor B、Shen A（2011）Decreasing lactate level and increasing antibody production in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) by reducing the expression of lactate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinases. Journal of biotechnology、153：27～34
Zhu G、Zhu X、Fan Q、Wan X（2011）Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. Spectrochimica acta Part A、Molecular and biomolecular spectroscopy、78：1187～1195
Parniak、M. A.、Davis、M. D.、およびKaufman、S.（1988）Effect of alkaline pH on the activity of rat liver phenylalanine hydroxylase.、The Journal of biological chemistry、263、1223～1230。

【図面】

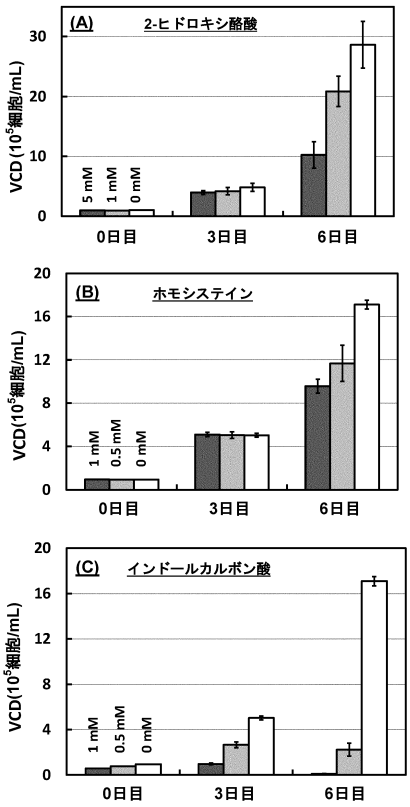
【図１】

図1A、1B



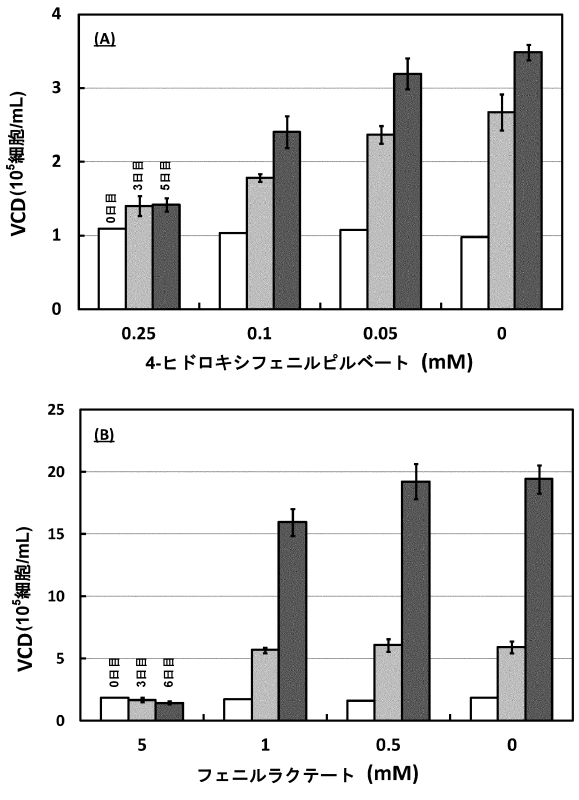
【図２】

図2A、2B、2C



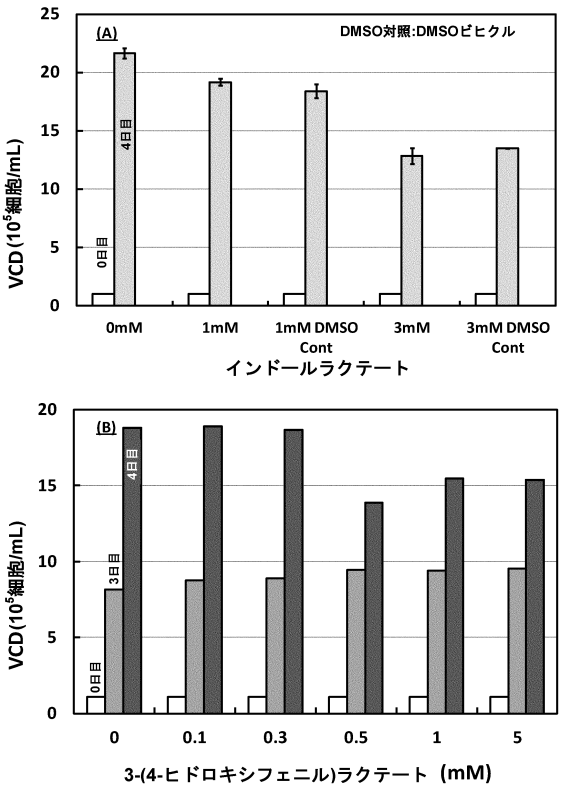
【図３】

図3A、3B



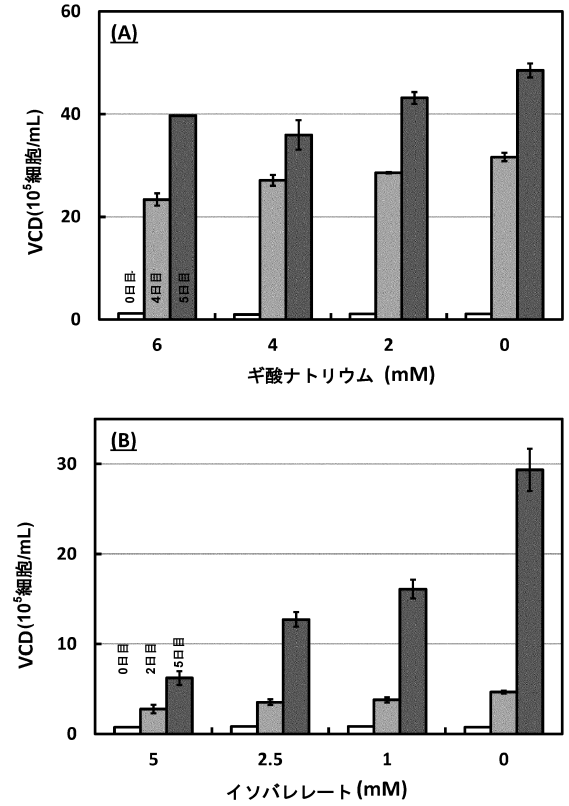
【図４】

図4A、4B



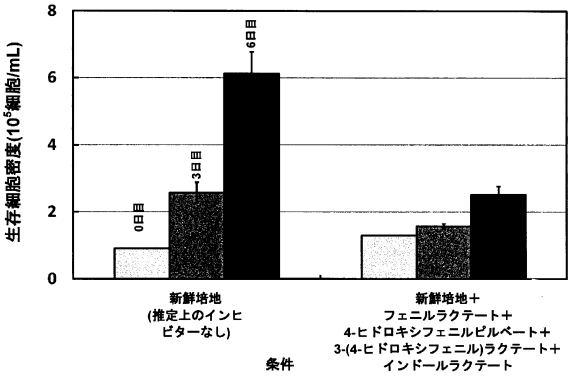
【図５】

図5A、5B



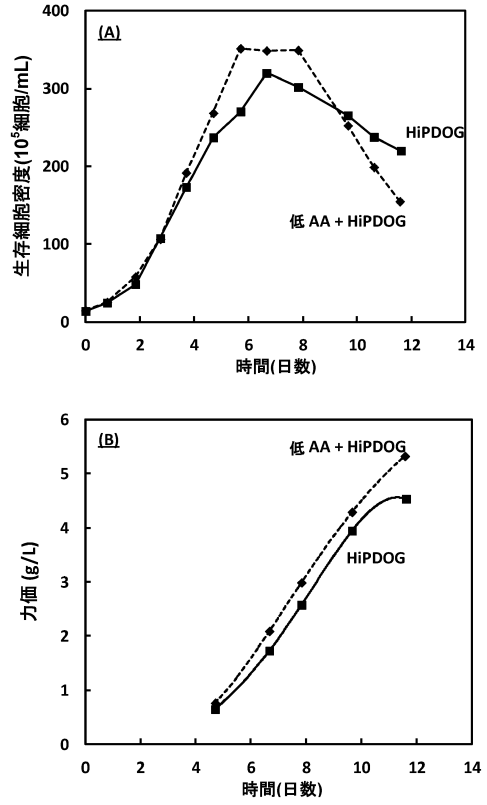
【図６】

図6



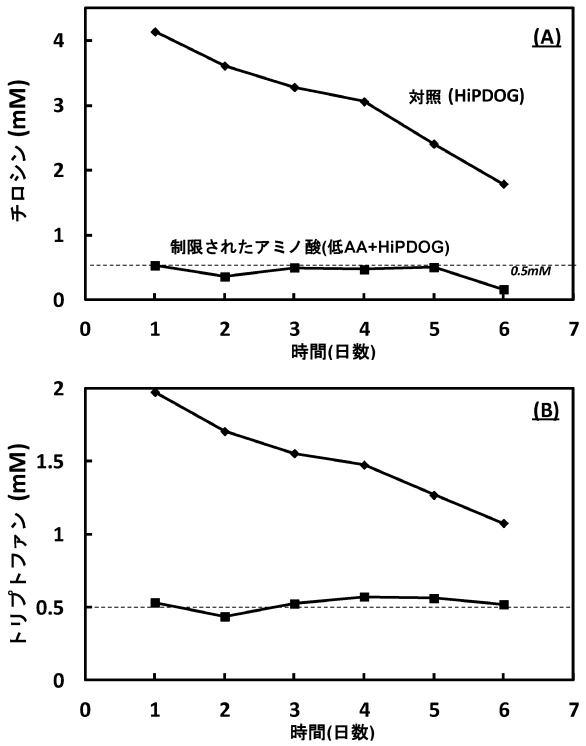
【図７】

図7A、7B



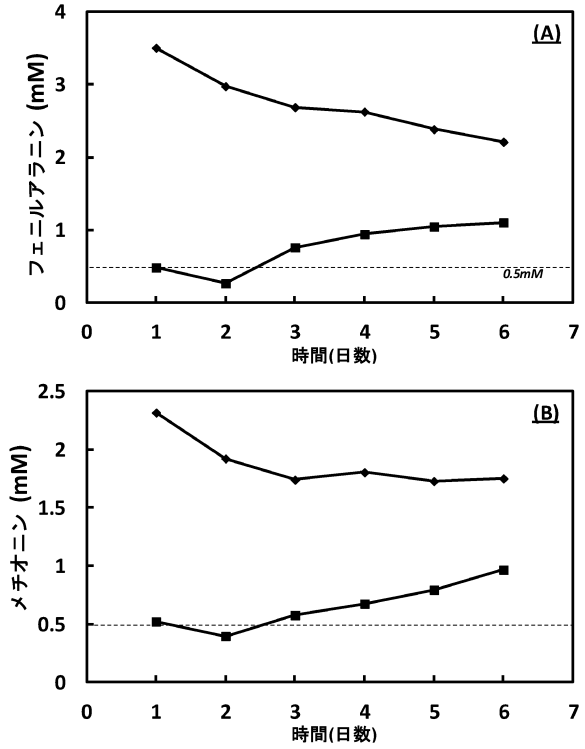
【図８】

図8A、8B



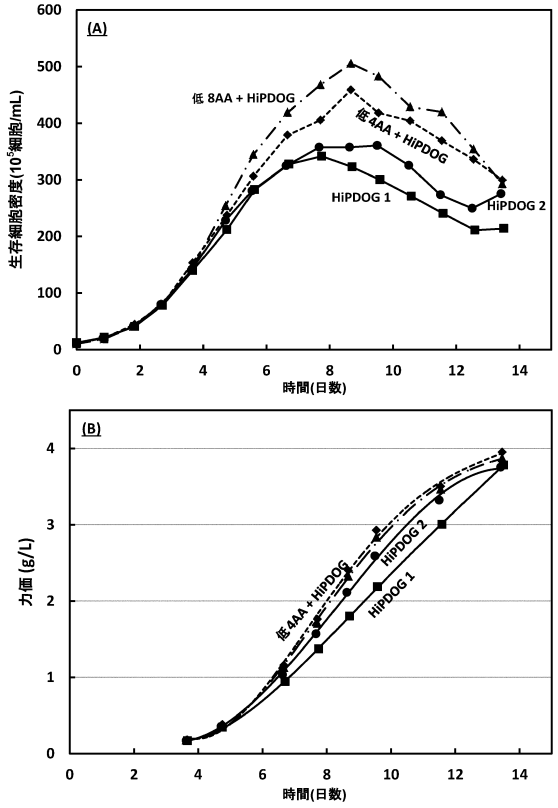
【図９】

図9A、9B



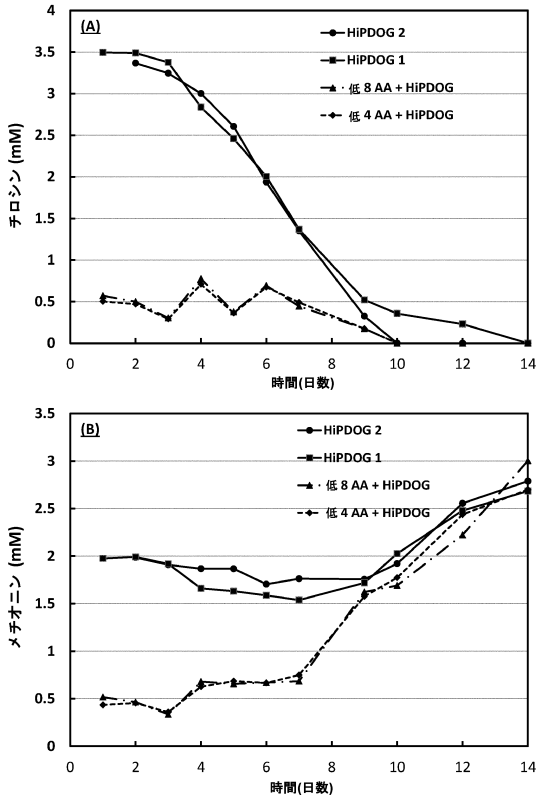
【図１０】

図10A、10B



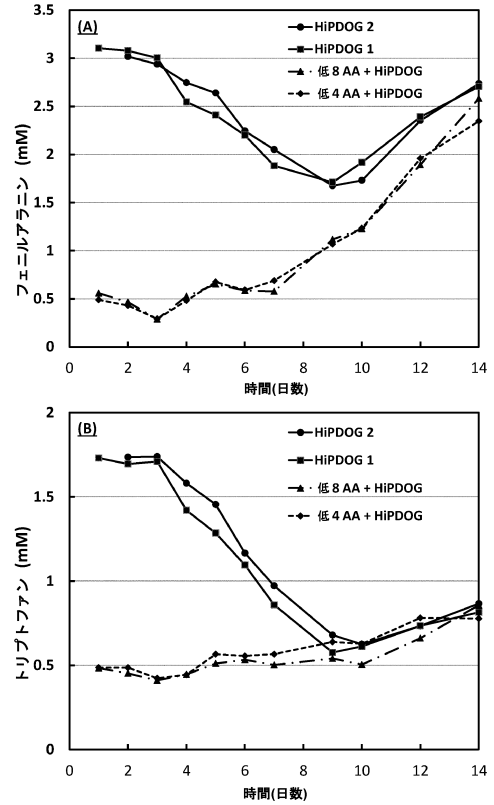
【図１１】

図11A、11B



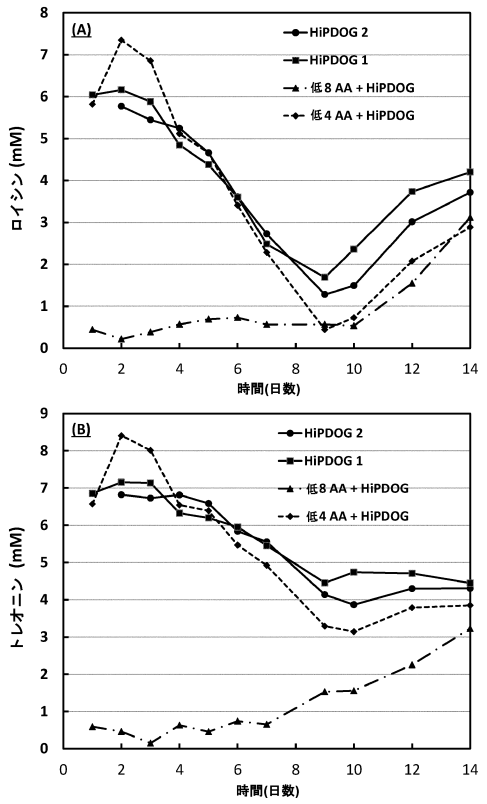
【図１２】

図12A、12B



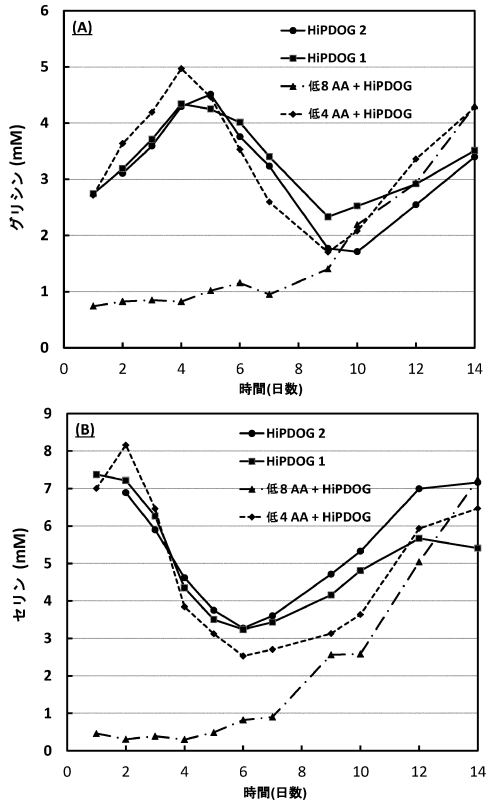
【図１３】

図13A、13B



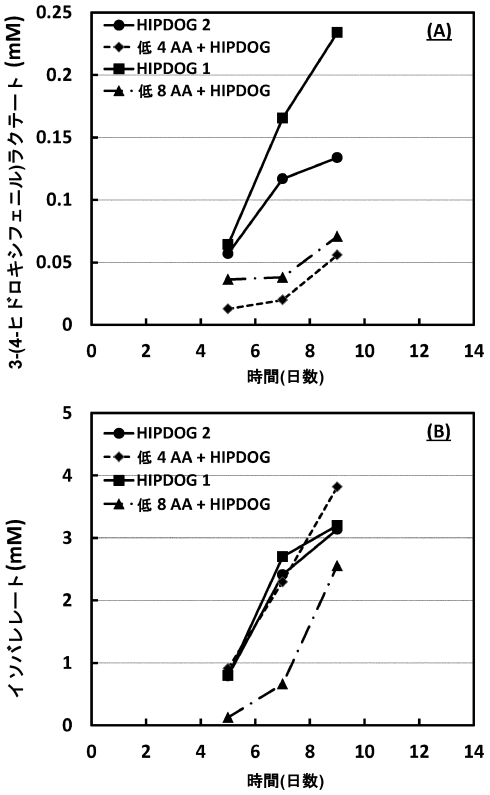
【図１４】

図14A、14B



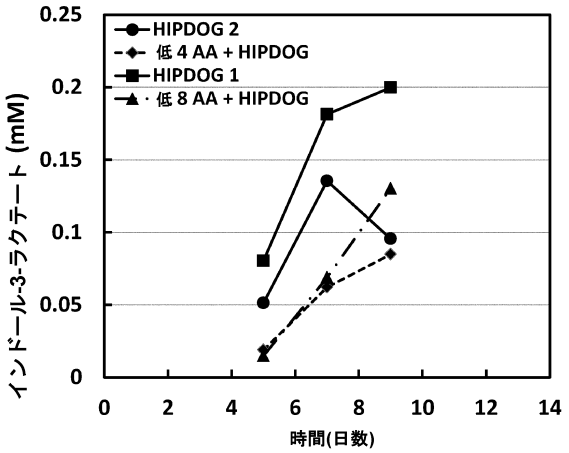
【図１５】

図15A、15B



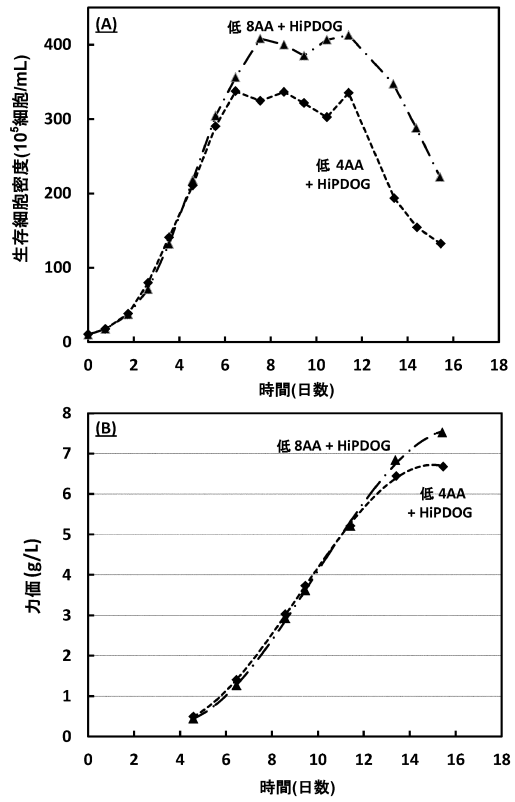
【図１６】

図16



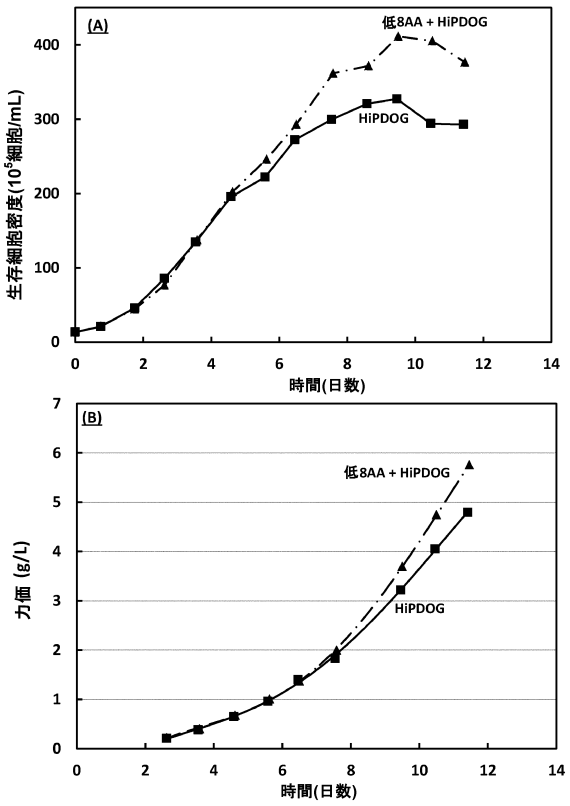
【図１７】

図17A、17B



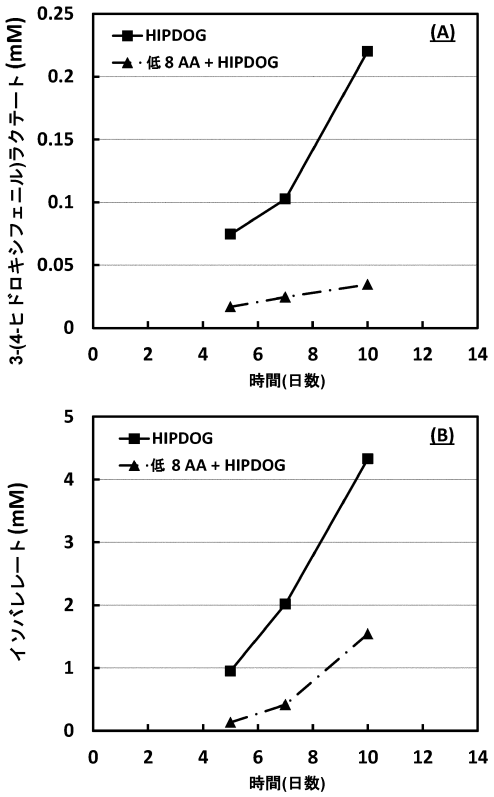
【図１８】

図18A、18B



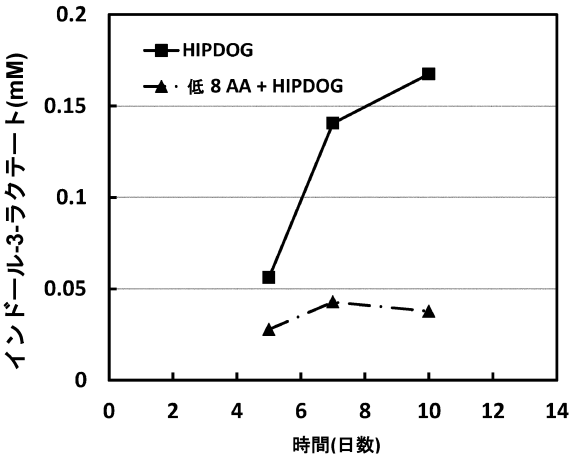
【図１９】

図19A、19B



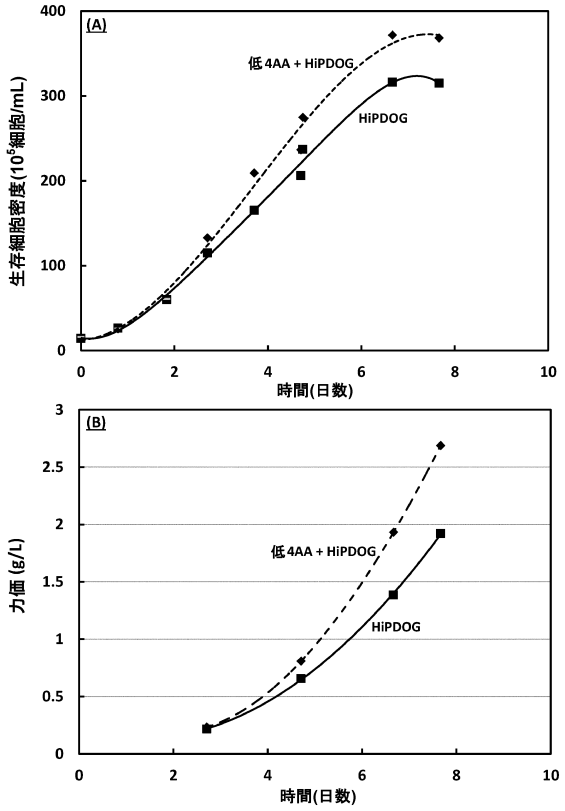
【図２０】

図20



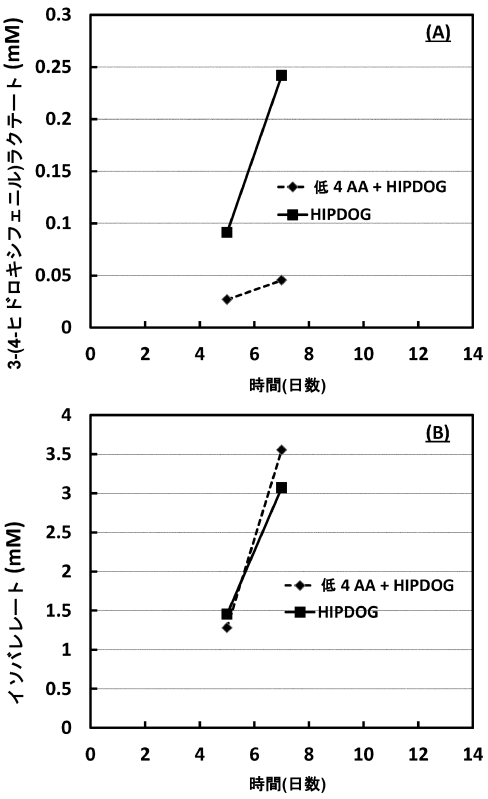
【図２１】

図21A、21B



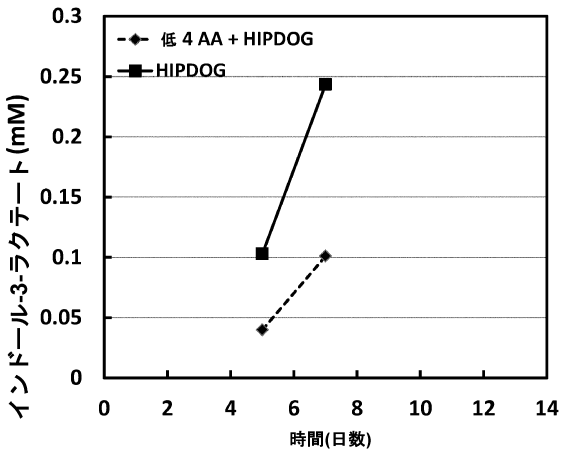
【図２２】

図22A、22B



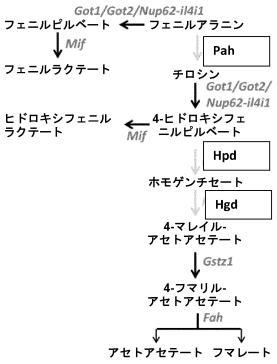
【図２３】

図23



【図２４】

図24

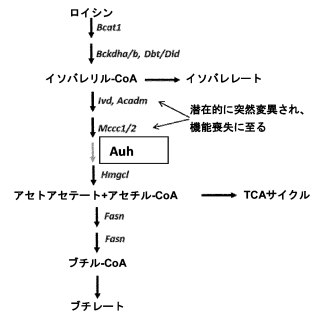


遺伝子		
	Ct値	Δ Ct
B-アクチン(CHO)	15.9	
Slc2a1	21.8	5.9
Mif	16.9	1.0
Got2	17.7	1.8
Dld	19.2	3.8
Got1	21.0	5.1
Fah	24.3	8.4
Gstz1	24.6	8.7
Pah	27.7	11.8
Hgd	35.3	19.4
Hpd	37.0	21.1

Pah、Hpd&Hgdの過剰発現は、フラックスをインヒビター産生から潜在的にそらすことができる

【図２５】

図25



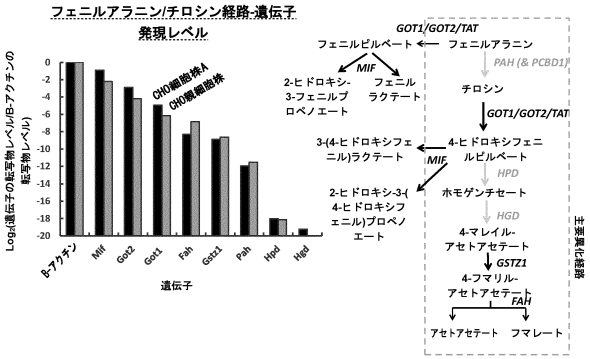
遺伝子	Ct値	Δ Ct
B-アクチン(CHO)	15.9	
Slc2a1	21.8	5.9
Mccc2	21.8	5.0
Ivd	21.9	5.1
Hmgcl	21.9	6.1
Bckdhb	22.5	5.6
Acadm	22.9	6.0
Bckdha	22.8	6.9
Dbt	22.9	7.0
BCAT1	23.4	7.5
Mccc1	23.8	7.0
Auh	29.8	13.9

AUHの過剰発現は、フラックスをイソバレレート産生から潜在的にそらすことができる

WT IVDおよびMCCC1/2の過剰発現は、インヒビター産生を潜在的に低減することができる

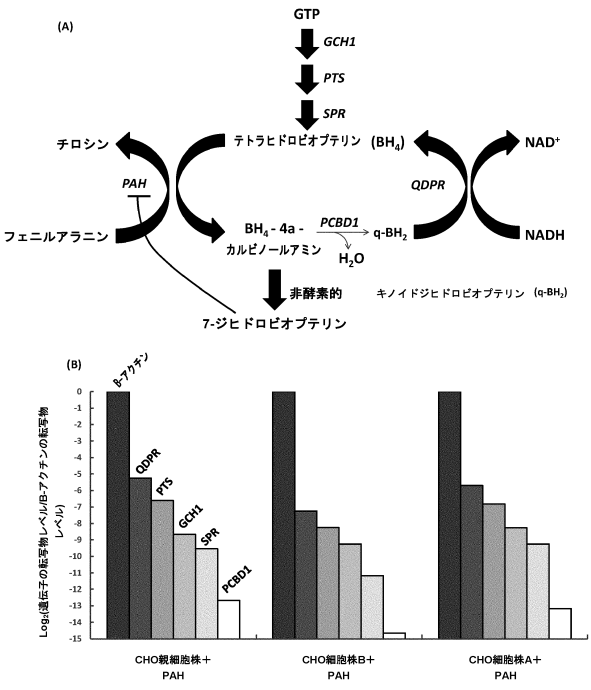
【図２６】

図26



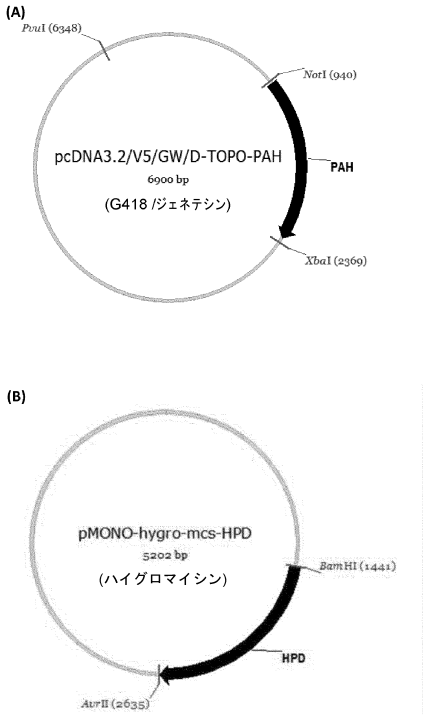
【図２７】

図27、27B



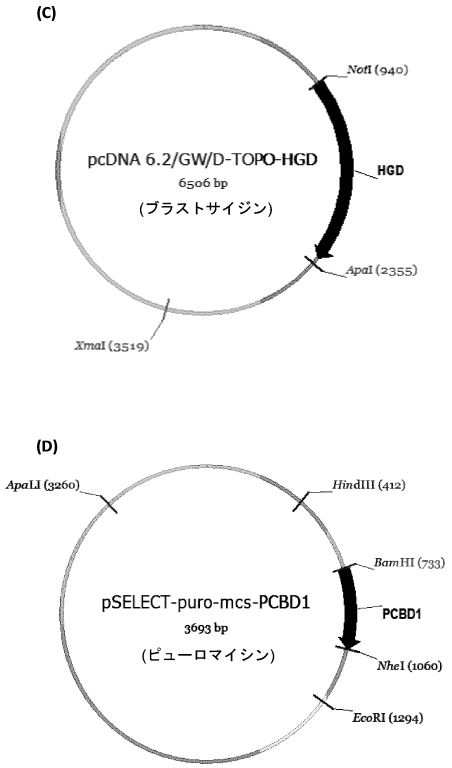
【図２８－１】

図28Aおよび28B



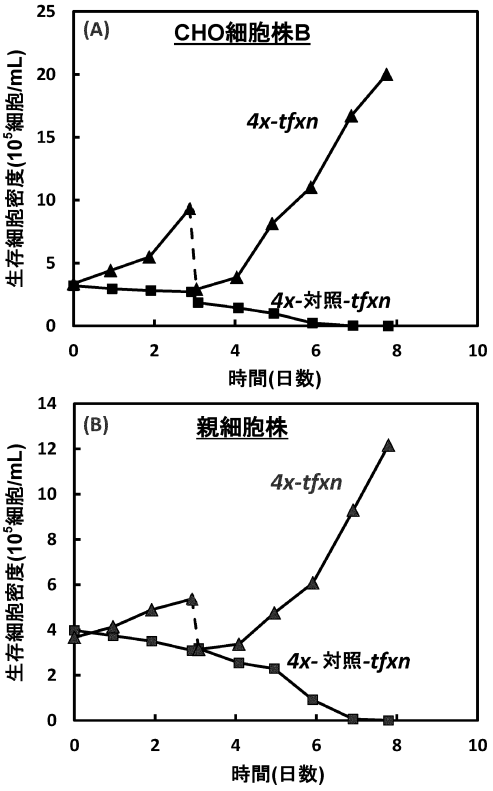
【図２８－２】

図28Cおよび28D



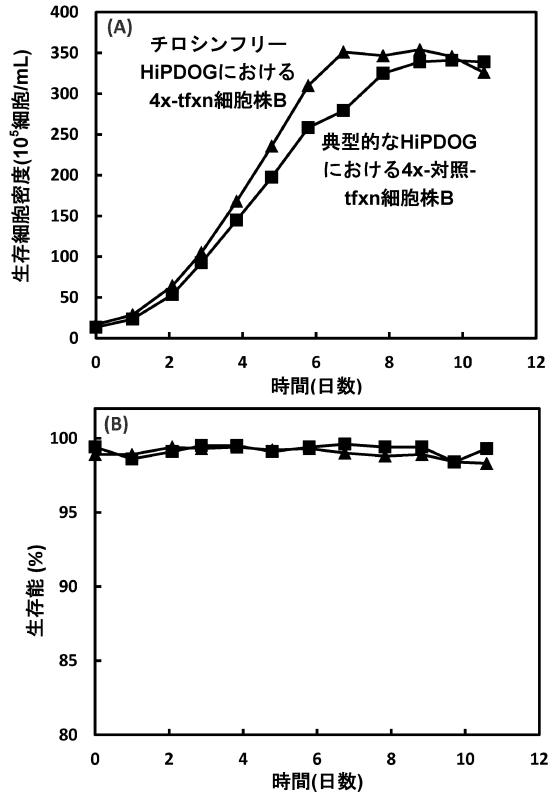
【図２９】

図29A、29B



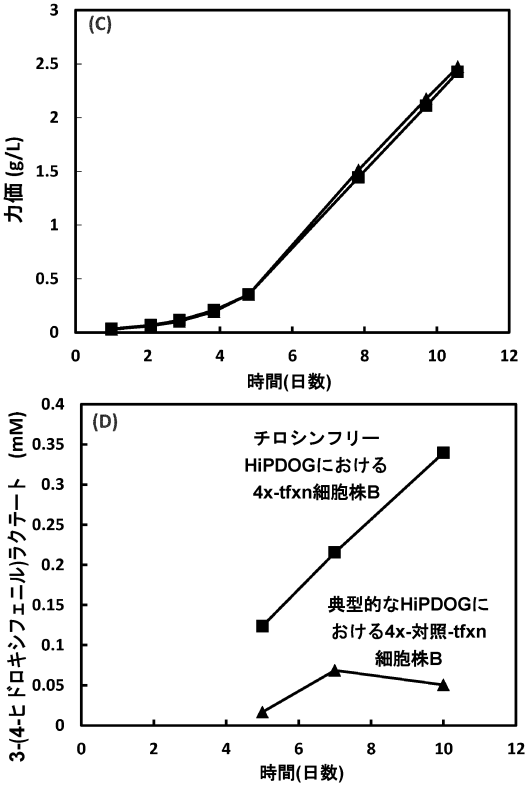
【図３０－１】

図30Aおよび30B



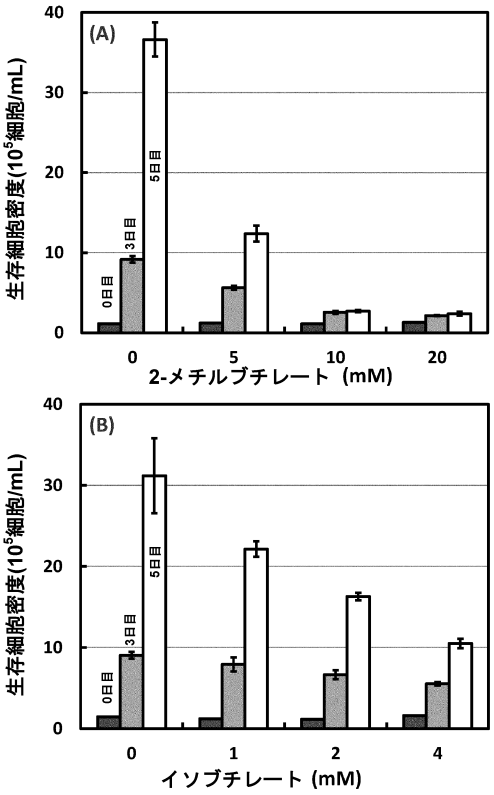
【図３０－２】

図30Cおよび30D



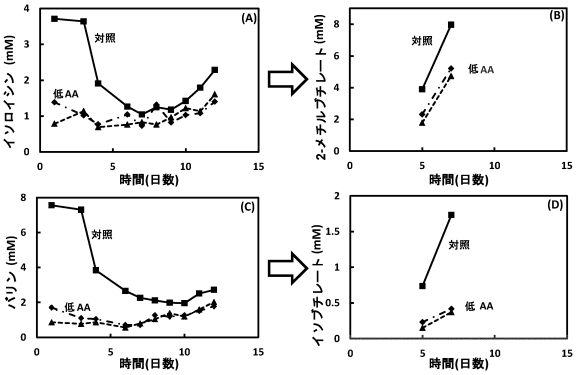
【図３１】

図31A、31B



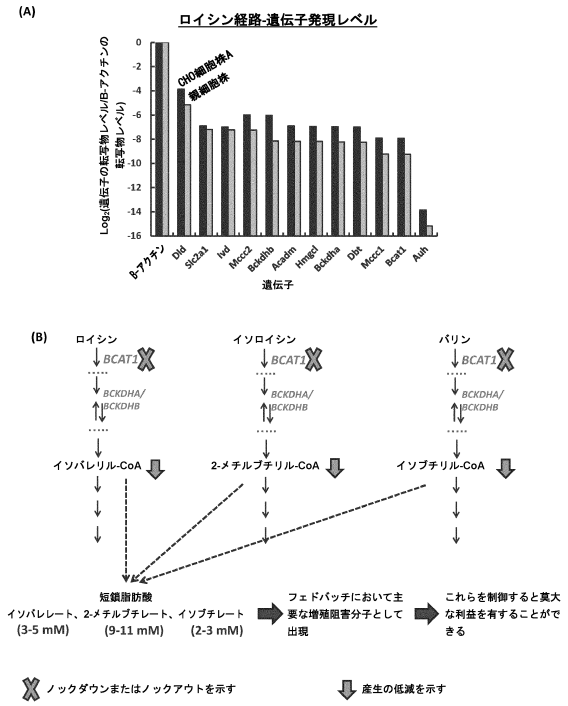
【図３２】

図32A、32B、32C、32D



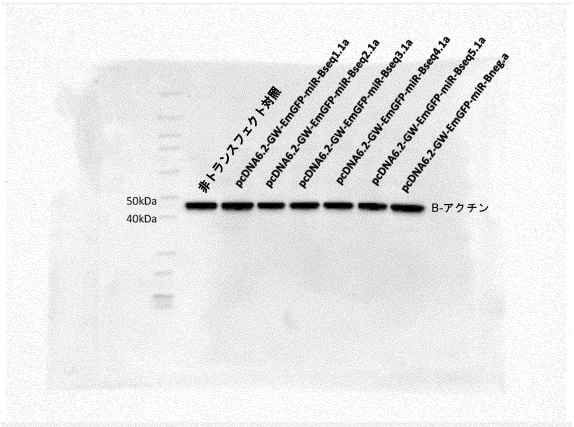
【図３３】

図33A、33B



【図３４－１】

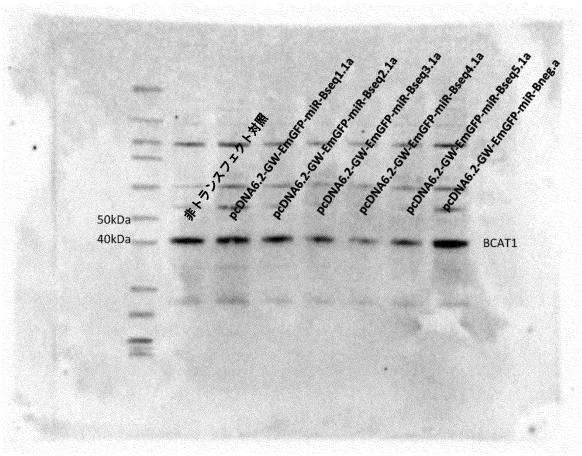
図34A



【図３４－２】

図34B

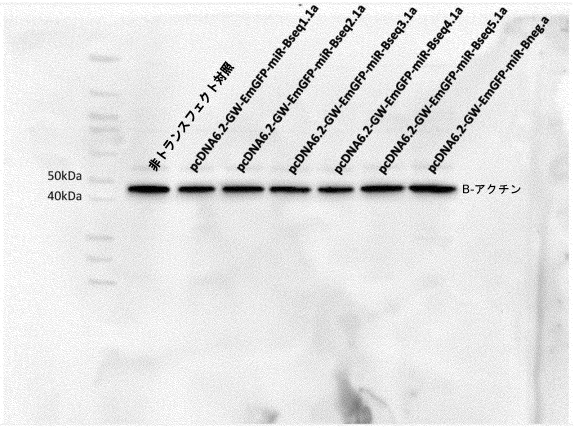
43kDaと予測されたCHO親細胞株内の
BCAT1



【図３４－３】

図34C

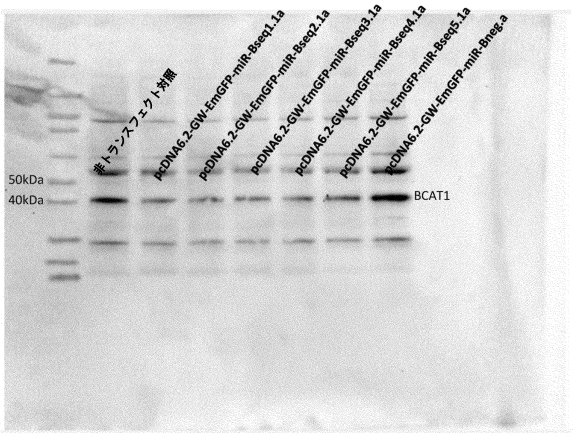
42kDaと予測されたCHO細胞株B内の
B-アクチン



【図３４－４】

図34D

43kDaと予測されたCHO細胞株B内の
BCAT1

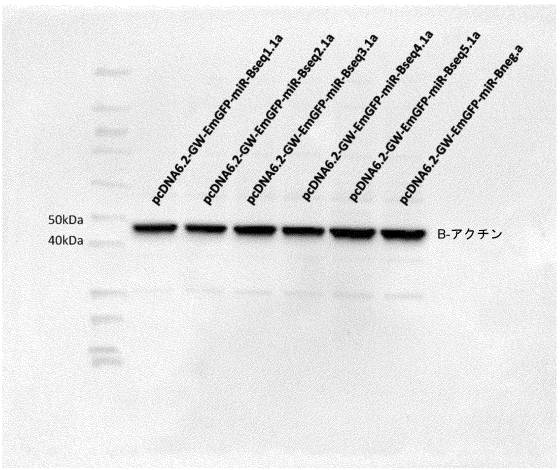


【図３５－１】

図35A

CHO親細胞株から産生される安定なノックダウンプール内の
B-アクチン発現

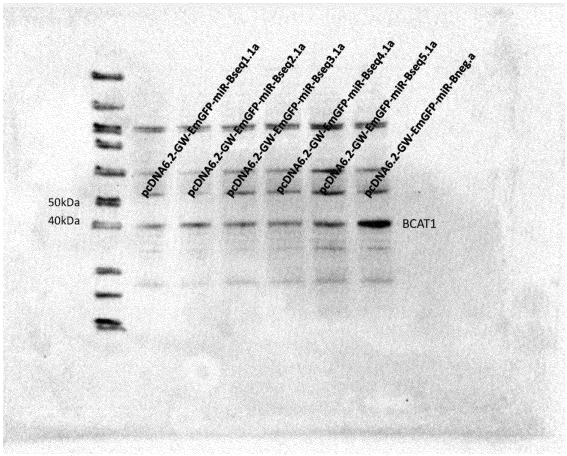
42kDaと予測



【図３５－２】

図35B

CHO親細胞株から産生される安定なノックダウンプール内の
BCAT1発現
43kDaと予測



フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C12Q 1/686(2018.01)		C12Q	1/686	Z
C12Q 1/6869(2018.01)		C12Q	1/6869	Z
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C
C12N 15/53 (2006.01)		C12N	15/53	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(72)発明者 グレゴリー ウォルター ヒラー
アメリカ合衆国 ０１８８０ マサチューセッツ州 ウェークフィールド市 ケンドリック・ロード ７４
(72)発明者 ジェフリー ジョセフ ミッチェル
アメリカ合衆国 ０３０６４ ニューハンプシャー州 ナシュア市 ウェストフィールド・ストリート ７
(72)発明者 バヌー チャンドラ ムルクトラ
アメリカ合衆国 ０１８４３ マサチューセッツ州 ローレンス市 ホーソン・ウェイ １０４ アパートメント ＃２１７
(72)発明者 パメラ マリー ペグマン
アメリカ合衆国 ０２４９３ マサチューセッツ州 ウェストン市 ノース・アヴェニュー ４３６

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第２００９／０８６２１５（WO，Ａ２）
Journal of Biotechnology，2011年，Vol. 153，pp. 27-34
NATURE MEDICINE，2013年06月23日，Vol. 19, No. 7，p. 901-908，http://dx.doi.org/10.1038/nm.3217

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／００
Ｃ１２Ｑ １／６８
Ｃ１２Ｎ １５／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）