

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年2月1日(01.02.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/024720 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/00 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/026987

(22) 国際出願日: 2023年7月24日(24.07.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-118189 2022年7月25日(25.07.2022) JP

(71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松葉 恵奈 (MATSUBA, Ayana); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 辻 ちひろ (TSUJI, Chihiro); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 原田 真志 (HARADA, Masashi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 樋口 拓哉 (HIGUCHI, Takuya); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). ▲高▼橋 健 (TAKAHASHI, Takeshi); 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 園田・小林弁理士法人 (SONODA & KOBAYASHI INTELLECTUAL PROPERTY LAW); 〒1630434 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 新宿三井ビル34階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: CELL CULTURE MEDIUM

(54) 発明の名称: 細胞培養用の培地

(57) Abstract: Provided are a method, an agent, etc. for enhancing the stability of a medium and enhancing the productivity of a recombinant protein. More specifically, provided are: a medium containing N-acetylcysteine and L-cysteine; a method for culturing cells using a medium containing N-acetylcysteine and L-cysteine; a method for producing a recombinant protein using a medium containing N-acetylcysteine and L-cysteine; and a method, an agent, etc. for stabilizing an L-cysteine-containing medium using N-acetylcysteine.

(57) 要約: 培地の安定性を向上させ、組換えタンパク質の生産性を向上させる方法又は剤等が提供される。具体的には、N-アセチルシステイン及びL-システインを含む培地、N-アセチルシステイン及びL-システインを含む培地を用いて細胞を培養するための方法、N-アセチルシステイン及びL-システインを含む培地を用いて組換えタンパク質を製造するための方法、N-アセチルシステインを含む、L-システインを含む培地を安定化する方法又は剤等が提供される。

WO 2024/024720 A1

明 細 書

発明の名称：細胞培養用の培地

技術分野

[0001] 本発明は、培地に関する。また、本発明は、培地において細胞を培養するための方法又は組換えタンパク質を製造するための方法に関する。さらに、本発明は、培地の安定性を向上させるための方法又は剤にも関する。

背景技術

[0002] 細胞培養に用いる培地は、しばしば物理的、化学的に不安定であり、調製中、保存中及び／又は細胞培養中に成分が変化し、細胞培養のプロセスに悪影響を及ぼすことがある。したがって、特に産業規模で細胞を培養する場合、生産性を向上させ、生産コストを低減するには、高い安定性を有する培地を開発することが重要である。

安定性が高い培地を開発することは、とりわけ組換えタンパク質を用いた製品の生産性を向上させる上で、重要である。例えば組換えタンパク質を用いた抗体医薬の場合、安定性が高い培地を用いることにより、高い社会的需要がある抗体医薬をより安定的に、またより安価に、製造することが可能になる。また、莫大な時間と費用を要する抗体医薬の研究開発を、より効率的に行うことも可能になる。

[0003] 培地を改善する多くの試みが、報告されている。例えば、特表2000-507812号公報には、培養物中造血細胞の増殖を支持する培地に有用な、安定な培地補充成分が記載されている。

[0004] 特許文献1：特表2000-507812号公報

発明の概要

[0005] 本発明は、高い安定性を有する培地を提供することができる。

[0006] すなわち、本発明によれば、以下に示す態様が提供される。

[1] 10～40mMのL-システイン及び1～40mMのN-アセチルシステインを含む、フィード培地。

〔２〕Ｌ－システイン及びＮ－アセチルシステインを含み、Ｎ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．０４～１．０である、フィード培地。

〔３〕１５～３０ｍＭのＬ－システインを含む、〔１〕又は〔２〕に記載のフィード培地。

〔４〕２～１０ｍＭのＮ－アセチルシステインを含む、〔１〕から〔３〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔５〕Ｎ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が、０．０４～１．０である、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔６〕Ｎ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が、０．１～０．４である、〔１〕から〔５〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔７〕ｐＨが５．０～９．０である、〔１〕から〔６〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔８〕ｐＨが６．５～７．６である、〔１〕から〔７〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔９〕無血清培地及び／又は動物性タンパク質不含培地である、〔１〕から〔８〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔１０〕合成培地である、〔１〕から〔９〕のいずれかに記載のフィード培地。

〔１１〕１０～４０ｍＭのＬ－システイン及び１～４０ｍＭのＮ－アセチルシステインを含むフィード培地の調製のための、Ｌ－システイン及びＮ－アセチルシステインを含む粉末培地。

〔１２〕Ｎ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．０４～１．０であるフィード培地の調製のための、Ｌ－システイン及びＮ－アセチルシステインを含む粉末培地。

〔１３〕フィード培地が１５～３０ｍＭのＬ－システインを含む、〔１１〕

又は〔１２〕に記載の粉末培地。

〔１４〕フィード培地が２～１０ｍＭのＮ－アセチルシステインを含む、〔１１〕から〔１３〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔１５〕フィード培地中のＮ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．０４～１．０である、〔１１〕から〔１４〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔１６〕フィード培地中のＮ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．１～０．４である〔１１〕から〔１５〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔１７〕フィード培地のｐＨが５．０～９．０である〔１１〕から〔１６〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔１８〕フィード培地のｐＨが６．５～７．６である、〔１１〕から〔１７〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔１９〕フィード培地が無血清培地及び／又は動物性タンパク質不含培地である、〔１１〕から〔１８〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔２０〕フィード培地が合成培地である、〔１１〕から〔１９〕のいずれかに記載の粉末培地。

〔２１〕細胞を培養する培地に〔１〕から〔１０〕のいずれかに記載のフィード培地を添加することを含む、細胞を培養するための方法。

〔２２〕細胞が動物細胞、植物細胞、細菌細胞、又は真菌細胞である、〔２１〕に記載の方法。

〔２３〕細胞が動物細胞である、〔２１〕又は〔２２〕に記載の方法。

〔２４〕細胞が哺乳動物細胞である、〔２１〕から〔２３〕のいずれかに記載の方法。

〔２５〕細胞がチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である、〔２１〕から〔２４〕のいずれかに記載の方法。

〔２６〕細胞が組換えタンパク質を発現する、〔２１〕から〔２５〕のいずれかに記載の方法。

〔27〕組換えタンパク質が抗体又はその抗原結合断片を含む、〔21〕から〔26〕のいずれかに記載の方法。

〔28〕抗体又はその抗原結合断片がIgG由来である、〔27〕に記載の方法。

〔29〕熱負荷による培地成分の析出がない、〔21〕から〔28〕のいずれかに記載の方法。

〔30〕組換えタンパク質産生能を有する細胞を培養する培地に〔1〕から〔10〕のいずれかに記載のフィード培地を添加することを含む、組換えタンパク質を製造するための方法。

〔31〕細胞が動物細胞、植物細胞、細菌細胞、又は真菌細胞である、〔30〕に記載の方法。

〔32〕細胞が動物細胞である、〔30〕又は〔31〕に記載の方法。

〔33〕細胞が哺乳動物細胞である、〔30〕から〔32〕のいずれかに記載の方法。

〔34〕細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である、〔30〕から〔33〕のいずれかに記載の方法。

〔35〕組換えタンパク質が抗体又はその抗原結合断片を含む、〔30〕から〔34〕のいずれかに記載の方法。

〔36〕抗体又はその抗原結合断片がIgG由来である、〔35〕に記載の方法。

〔37〕熱負荷による培地成分の析出がない、〔30〕から〔36〕のいずれかに記載の方法。

〔38〕液体培地の安定性を向上させるための方法であって、L-システインの濃度が10～40mM、N-アセチルシステインの濃度が1～40mMになるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。

〔39〕液体培地の安定性を向上させるための方法であって、N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0に

なるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。

〔40〕液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法であって、L-システインの濃度が10～40 mM、N-アセチルシステインの濃度が1～40 mMになるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。

〔41〕液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法であって、N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0になるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。

〔42〕L-システイン及びN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、〔38〕から〔41〕のいずれかに記載の方法。

〔43〕液体培地が10～40 mMのL-システインを含み、前記方法がN-アセチルシステインの濃度が1～40 mMになるようにN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、〔38〕から〔41〕のいずれかに記載の方法。

〔44〕液体培地が1～40 mMのN-アセチルシステインを含み、前記方法がL-システインの濃度が10～40 mMになるようにL-システインを培地に添加することを含む、〔38〕から〔41〕のいずれかに記載の方法。

〔45〕L-システインの濃度が15～30 mMになるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、〔38〕から〔44〕のいずれかに記載の方法。

〔46〕N-アセチルシステインの濃度が2～10 mMになるようにL-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、〔38〕から〔45〕のいずれかに記載の方法。

〔47〕N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0になるようにL-システイン及び／又はN-アセチルシ

ステインを培地に添加することを含む、[38] から [46] のいずれかに記載の方法。

[48] N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.1～0.4になるようにL-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、[38] から [47] のいずれかに記載の方法。

[49] 液体培地のpHが5.0～9.0になるようにL-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、[38] から [48] のいずれかに記載の方法。

[50] 液体培地のpHが6.5～7.6になるようにL-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、[38] から [49] のいずれかに記載の方法。

[51] 液体培地の安定性を向上させるための、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が10～40 mMのL-システイン及び1～40 mMのN-アセチルシステインを含む、剤。

[52] 液体培地の安定性を向上させるための、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるN-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、剤。

[53] 10～40 mMのL-システインを含む液体培地の安定性を向上させるための、N-アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が1～40 mMのN-アセチルシステインを含む、剤。

[54] L-システインを含む液体培地の安定性を向上させるための、N-アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるN-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、剤。

[55] 液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための

、Ｌ－システイン及びＮ－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が１０～４０ｍＭのＬ－システイン及び１～４０ｍＭのＮ－アセチルシステインを含む、剤。

〔５６〕液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、Ｌ－システイン及びＮ－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるＮ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．０４～１．０である、剤。

〔５７〕１０～４０ｍＭのＬ－システインを含む液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、Ｎ－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が１～４０ｍＭのＮ－アセチルシステインを含む、剤。

〔５８〕Ｌ－システインを含む液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、Ｎ－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるＮ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．０４～１．０である、剤。

〔５９〕前記剤を添加後の液体培地が１５～３０ｍＭのＬ－システインを含む、〔５１〕から〔５８〕のいずれかに記載の剤。

〔６０〕前記剤を添加後の液体培地が２～１０ｍＭのＮ－アセチルシステインを含む、〔５１〕から〔５９〕のいずれかに記載の剤。

〔６１〕前記剤を添加後の液体培地におけるＮ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．０４～１．０である、〔５１〕から〔６０〕のいずれかに記載の剤。

〔６２〕前記剤を添加後の液体培地におけるＮ－アセチルシステインのＬ－システインに対するモル濃度の比率が０．１～０．４である、〔５１〕から〔６１〕のいずれかに記載の剤。

〔６３〕前記剤を添加後の液体培地のｐＨが５．０～９．０である、〔５１〕から〔６２〕のいずれかに記載の剤。

〔６４〕前記剤を添加後の液体培地のｐＨが６．５～７．６である、〔５１〕

〕から〔63〕のいずれかに記載の剤。

〔65〕〔1〕から〔10〕のいずれかに記載のフィード培地又は〔11〕から〔20〕のいずれかに記載の粉末培地を調製するための、N－アセチルシステイン及びL－システインを含む培地添加物。

〔66〕〔1〕から〔10〕のいずれかに記載のフィード培地又は〔11〕から〔20〕のいずれかに記載の粉末培地を調製するための、N－アセチルシステインを含む培地添加物。

[0007] 本発明は、培地の安定性を向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、液体培地におけるL－システイン、シスチン、N－アセチルシステイン、N－アセチルシスチン及びN，N’－ジアセチルシスチンの濃度の経時的変化を示すグラフである。

[図2]図2は、L－システインを含む培地における培地成分の析出に及ぼす、N－アセチルシステインの影響を示す写真である。

[図3]図3は、L－システインを含む培地における生細胞密度に及ぼす、N－アセチルシステインの影響を示すグラフである。培養開始9及び14日目の生細胞密度を示す。

[図4]図4は、L－システインを含む培地における抗体産生量に及ぼす、N－アセチルシステインの影響を示すグラフである。培養開始7、9、11及び14日目の抗体産生量を示す。

[図5]図5は、培地における抗体産生量に及ぼす、L－システイン濃度の影響を示すグラフである。培養開始14日目の抗体産生量の相対値を示す。

発明を実施するための形態

[0009] [用語の説明]

本開示における各用語は、特記のない限り、以下に示す意味を有する。

[0010] 本開示における「細胞培養培地」は、細胞を増殖又は維持するために使用される、細胞の生育環境を提供するものを指す。細胞培養培地は、典型的には、細胞の増殖や生存に必須な成分や有用な成分を含む。

[0011] 本開示における「フィード培地」は、細胞培養プロセス開始後、細胞培養中の培地に追加で添加する成分を意味する。

フィード培地は、典型的には、細胞の増殖や生存を達成する上で必須な成分や有用な成分を含む。フィード培地は、これら成分の内の1つのみからなるものでも、複数の成分を含む組成物であってもよい。例えば、本開示においては、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインのみを含む液体も、フィード培地に含まれる。フィード培地は、細胞培養培地の成分（例えば、糖（グルコース）、アミノ酸など）を含んでいてもよい。なお、「培地」との表現は、細胞培養培地の意味で用いられることも、フィード培地の意味で用いられることもあり、その双方の意味を含む。

[0012] フィード培地は、典型的には、フェドバッチ培養法（流加培養法）による細胞培養において用いられる。フェドバッチ培養法は、培養プロセス開始時に細胞培養のための全成分（細胞及び全栄養源を含む）を含む基礎培地を培養容器に供給し、その後、フィード培地を連続的に又は段階的に培養容器に添加する培養法である。ここで、基礎培地は、細胞培養プロセス開始時から使用する培地であり、基礎培地として使用可能な培地であれば、特に限定されることなく、基礎培地として用いることができる。

フィード培地は、一般に、液体培地又は粉末培地の形態で提供、販売される。フィード培地の保存には、典型的には、プラスチックボトルやステンレスタンクが用いられるが、これらに限定されない。

[0013] フィード培地を培養容器に添加する時期は、特に限定されるものではなく、例えば、細胞培養の開始時、誘導期、対数増殖期、静止期及び／又は死滅期であってよい。また、フィード培地は、他の培養法、例えば連続培養法において用いられてもよい。連続培養法は、灌流培養法ともいい、一定の速度で培養容器に追加の培地（フィード培地等）を供給し、同時に同量の培養液を培養容器から抜き取る培養法である。

[0014] 細胞の増殖や生存に必須な成分や有用な成分の非限定な例として、例えば、糖類（例えば、グルコース）などの炭水化物、脂質、核酸、ビタミン（例

例えば、チアミン）、必須及び非必須アミノ酸、アンモニウム塩、硝酸塩、ミネラル（例えば、リン、イオウ、カリウム、マグネシウム、鉄、マグネシウム及びそれらの塩）、微量元素（例えば、コバルト、銅、亜鉛、ニッケル及びそれらの塩）、血清及びその代替物、動物性タンパク質、動物由来成分（例えば、加水分解物）、植物性タンパク質、植物由来成分（例えば、加水分解物）、微生物性タンパク質、微生物由来成分、（例えば、加水分解物）、栄養／増殖因子、ホルモン、酵素補助因子、pH緩衝剤、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、抗生剤、保存剤（例えば、抗酸化剤）並びにpH指示薬（例えば、フェノールレッド）が挙げられる。

[0015] 必須及び非必須アミノ酸の非限定的な例として、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、チロシン、シスチン、ヒドロキシプロリン、チロキシン、ホスホセリン、デスモシン、 β -アラニン、サルコシン、オルニチン、シトルリン及び γ -アミノ酪酸並びにそれらの塩、並びにそれらの水和物が挙げられる。

培地における必須及び非必須アミノ酸の濃度は、培養の目的や細胞に応じ、適宜選択される。培地が液体培地であり、かつフィード培地として用いられる場合、培地が含む必須及び非必須アミノ酸の総濃度は、典型的には、10～1000mMである。

pH緩衝剤の非限定的な例として、炭酸ナトリウム緩衝剤、炭酸カリウム緩衝剤、リン酸ナトリウム緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリスヒドロキシメチルアミノメタン緩衝剤、クエン酸緩衝剤及びグッドの緩衝剤（例えば、HEPES緩衝剤及びMES緩衝剤）が挙げられる。培地がpH緩衝剤を含む場合、pH緩衝剤の濃度は、典型的には、10～500mMである。

[0016] 培地は、培養する細胞や目的に応じて、商業的に入手可能な培地や文献に記載された公知の培地から適宜選択することができる。培養の目的や細胞に応じて組成を変更したり、剤や培地添加物を培地に添加したり、2種類以上

の培地を混合して用いたりしてもよい。また、細胞培養中に、追加の培地、剤及び／又は培地添加物を培地に添加してもよい。

培地は、合成培地であってよい。また、培地は、無血清培地であってよく、動物性タンパク質不含培地であってよい。また、培地は、液体培地又は粉末培地であってよい。

[0017] 商業的に利用可能な培地の非限定的な例として、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、DME/F12、イーグルの最小必須培地 (MEM)、基本培地イーグル (BME)、F-10培地、F-12培地、 α 最小必須培地 (α -MEM)、グラスゴー最小必須培地 (G-MEM)、PF CHO培地、イスコフ改変ダルベッコ培地、AmpliCHO CD培地、Dynamis™培地、EX-CELL™ Advanced™ CHO流加培地、CD FortiCHO™培地、CP OptiCHO™、Balanced™ CHO増殖A培地、ActiPro™、RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)培地、CELLIST™ Basal Media (BASAL3、BASAL10) 及びFeed Media (FEED2)、HyClone™ Cell Boost™ 7a Supplement、Cellvento™ Feed-200、Cellvento™ Feed-210、Cellvento™ Feed-220並びにCellvento™ 4CHO COMP Balanced CHO Feed 4が挙げられる。これらの培地は、細胞培養培地としても、フィード培地としても用いられる。また、これらの培地は、液体培地及び／又は粉末培地の形態で提供、販売される。

[0018] 本開示における「合成培地」は、化学的に定義された成分のみで調製された培地を指す。合成培地は、典型的には、血清及びその代替物、未精製の動物性タンパク質、未精製の動物由来成分（例えば、加水分解物）、未精製の植物性タンパク質、未精製の植物由来成分（例えば、加水分解物）、未精製の微生物性タンパク並びに未精製の微生物由来成分（例えば、加水分解物）

が添加されていない培地である。

[0019] 本開示における「無血清培地」は、無調整又は未精製の血清を含まない培地を指す。精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混入している培地も、無調整又は未精製の血清を含まない限り、無血清培地に含まれる。

[0020] 本開示における「動物性タンパク質不含培地」は、動物性タンパク質（例えば、アルブミン、トランスフェリン、インスリン及び成長因子などの動物由来のタンパク質）を含まない培地を指す。動物性タンパク質不含培地は、小ペプチド及び／又はオリゴペプチドを含んでいてもよい。

[0021] 本開示における「粉末培地」は、粉末形態の培地を指す。粉末培地には、顆粒形態の培地も含まれる。また、粉末培地には、乾燥培地も含まれる。粉末培地は、適切な溶媒（例えば、水）に溶解し、液体培地とすることができる。本開示における任意の培地を、粉末培地の形態で調製し、また提供することができる。

[0022] 本開示における「液体培地」は、液体形態の培地を指す。本開示における任意の培地を、液体培地の形態で調製し、また提供することができる。また、液体培地は、本開示における任意の粉末培地を適切な溶媒（例えば、水）に溶解することによっても、調製することができる。液体培地は、フィード培地として用いることができる。

[0023] 本開示における「組換えタンパク質」は、任意の遺伝子組換え技術を用いて製造された任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖状でも分岐状でもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、アミノ酸以外の成分を含んでいてもよい。また、組換えタンパク質は、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、アミド化、保護基等による誘導体化、切断又は標識成分（例えば、放射性同位体）若しくは薬物（例えば、毒素、細胞傷害性薬物又は放射性同位体）との結合等の化学的又は生物学的修飾を受けていてもよい。組換えタンパク質部分をその構造の一部に含む分子は全て、本開示における組換えタンパク質に含まれる。遺伝子組換

え技術は、遺伝子を人工的に操作する技術であれば特に限定されるものではないが、典型的な例として、組換えタンパク質をコードする核酸の宿主細胞への導入技術が挙げられる。

[0024] 組換えタンパク質の非限定的な例として、遺伝子組換え技術を用いて製造される抗体及びその抗原結合断片、抗体ミメティック、イムノアドヘシン、酵素、ホルモン、サイトカイン、凝固因子（又は血液凝固関連タンパク質）、細胞外タンパク質並びに膜タンパク質が挙げられる。これらの組換えタンパク質は、主に、医薬、農薬、食品及びその他化学工業分野で用いられるが、特定の用途に限定されるものではない。

[0025] 本開示における「抗体」は、抗原との結合性を有する免疫グロブリン分子を指す。抗体には、軽鎖と重鎖とを含むポリペプチド鎖を有する全長抗体及びその断片（例えば、 F_v 、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 及びVHHフラグメント）が含まれる。抗体は、重鎖及び／又は軽鎖を含んでもよい。重鎖及び／又は軽鎖は、可変領域（抗原に対する認識及び結合に関係する）と定常領域（局在化及び細胞間相互作用に関係する）を含んでもよい。最も一般的な全長抗体は、2箇所の重鎖定常領域（CH）、2箇所の重鎖可変領域（VH）、2箇所の軽鎖定常領域（CL）及び2箇所の軽鎖可変領域（VL）を含む。可変領域は、抗原特異性を抗体に付与する配列である相補性決定領域（CDR）とフレームワーク領域（FR）とを含む。

抗体には、モノクローナル抗体、2種類以上の抗体又は抗原結合部位から形成される多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、所望の生物学的活性を有する抗体断片及び抗体の抗原結合部位を含む融合タンパク質が含まれる。また、抗体には、キメラ抗体、哺乳動物抗体（例えば、ヒト抗体）、哺乳動物化抗体（例えば、ヒト化抗体）、多価抗体及び改変抗体が含まれる。

抗体は、いずれのクラス（例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）であってもよく、また、いずれのサブクラス（アイソタイプ）であってもよい。

抗体は、他の分子（例えば、低分子若しくは高分子の毒素（細胞傷害性薬

物)又は放射性同位体)と結合するなどの、化学的又は生物学的修飾を受けていてもよく、これらの修飾を受けた抗体も、本発明の抗体に含まれる。

[0026] 本開示における「抗体ミメティック」は、抗原と特異的に結合することができるが、抗体と構造的に関連しないタンパク質のことをいう。抗体ミメティックの具体的な例として、プロテインAのZドメイン(アフィボディ; Affibody)が挙げられ、より具体的な例として、ZHER2 affibodyが挙げられる。

[0027] 酵素の例として、アルカリホスファターゼ、 β -ラクタマーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ及びDNaseが挙げられる。

[0028] ホルモンの例として、レニン、成長ホルモン(ヒト成長ホルモン又はウシ成長ホルモンなど)、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、カルシトニン、性腺刺激ホルモン(例えば、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン)、グルカゴン、インスリン(インスリンA鎖及びインスリンB鎖)及びプロインスリンが挙げられる。

[0029] サイトカインの例として、腫瘍壊死因子(例えば、TNF- α 及び β)、血管内皮増殖因子(VEGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経栄養因子(例えば、NT-3~NT-6)、神経成長因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、線維芽細胞増殖因子(例えば、aFGF、bFGF)、上皮成長因子(EGF)、トランスフォーミング増殖因子(例えば、TGF- α 、TGF- β 1~TGF- β 5)、アクチビン(例えば、アクチビンA、アクチビンC、アクチビンE)、インスリン様成長因子(例えば、IGF-I、IGF-II)、肝細胞増殖因子(HGF)、ケラチノサイト増殖因子、幹細胞因子(SCF)、骨形成タンパク質(BMP)、RANTES、エリスロポエチン(EPO)、トロンボポエチン(TPO)、インターフェロン- α 、- β 及び γ 、コロニー刺激因子(例えば、M-CSF、GM-CSF、G-CSF)及びインターロイキン(例えば、IL-1~IL-13)が挙げられる。

[0030] 凝固因子及び血液凝固関連タンパク質の例として、第Ⅴ因子、第Ⅴ因子、第Ⅴ因子、第ⅢC因子、第ⅠX因子、第Ⅹ因子、第Ⅷ因子、第Ⅶ因子、組織因子、フォン・ヴィレブランド因子、プロテインC、プロテインS、プラスミノゲン活性化因子（例えば、ウロキナーゼ、ヒト尿又はヒト組織プラスミノゲン活性化因子（t-PA））、トリプシン、プロトリプシン、トリポエチン、トリボモジュリン、アンチトリプシン、フィブリノゲン及び血清アルブミンが挙げられる。

[0031] 細胞外タンパク質の例として、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲン、オステオポンチン、ラミニン及びそれらの断片が挙げられる。

[0032] 膜タンパク質の例として、膜受容体タンパク質、膜輸送体タンパク質、膜酵素及び細胞接着因子並びにそれらの断片が挙げられる。

[0033] 組換えタンパク質は、上記の例に限定されるものではなく、例えば、上記サイトカイン等の受容体、トランスフェリン、各種CDタンパク質、腫瘍関連抗原（例えば、HER2、HER3又はHER4受容体、CA125）、ワクチン用などのウィルス抗原（例えば、ウィルスのエンベロープタンパク質）なども、組換えタンパク質に含まれる。また、上述のいずれかのタンパク質を含む融合タンパク質も、組換えタンパク質に含まれる。

[0034] 本開示における「組換えタンパク質産生能を有する」とは、遺伝子組換え技術によりタンパク質を産生する能力を有することを意味する。産生された組換えタンパク質は、細胞外（すなわち、培地中）に分泌されても、細胞内に蓄積されてもよいが、好ましくは、細胞外に分泌される。

[0035] 典型的には、組換えタンパク質をコードする核酸を宿主細胞内に導入することにより、組換えタンパク質を産生する能力を宿主細胞に与えることができる。すなわち、典型的な組換えタンパク質産生能を有する細胞は、組換えタンパク質をコードする核酸を含む細胞である。核酸を宿主細胞内に導入する方法として、様々な方法が当該技術分野において知られている。本開示では、これら様々な方法を含め、本発明を実施する時点で公知の方法を任意に用いることができる。このような方法の非限定的な例として、組換えタンパ

ク質をコードする核酸を含むベクターを宿主細胞に導入する方法が挙げられる。ベクターは、発現可能な形（例えばプロモーター、エンハンサー、リボソーム結合配列及び／又は転写終結配列等の調節配列と作動可能に連結した形で）で組換えタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターが好ましく、プラスミドであってもよい。

[0036] ベクターを宿主細胞に導入する方法の非限定的な例として、エレクトロポレーション法、パーティクル・ガン法、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法により、物理的又は化学的に宿主細胞内にベクターを導入する方法、及びウィルスベクターを宿主細胞に感染させる方法が挙げられる。また、宿主細胞内に導入されたベクター内の核酸は、CRISPR/Cas9等のゲノム編集技術により、宿主細胞中のゲノムに組み込まれてもよい。あるいは、組換えタンパク質をコードする核酸を宿主細胞内に導入する代わりに、CRISPR/Cas9等のゲノム編集技術等によりゲノムDNA上の遺伝子配列を直接改変して目的の組換えタンパク質をコードするようにしたり、制御配列等を改変して目的の内在性タンパク質の産生を制御しても（例えば、向上させても）よい。このような態様で産生されるタンパク質も全て、本開示における組換えタンパク質に含まれる。

[0037] 本開示における「細胞」には、動物細胞、植物細胞、細菌細胞及び真菌細胞が含まれる。細胞は、好ましくは、組換えタンパク質の産生に好適に用いられる株化細胞である。

動物細胞は、任意の動物由来の細胞であってよいが、好ましくは哺乳動物（哺乳類）、鳥類、両生類、魚類又は昆虫類由来の細胞、より好ましくは哺乳動物又は昆虫類由来の細胞、最も好ましくは哺乳動物由来の細胞である。

[0038] 哺乳動物由来の細胞の非限定的な例として、ヒト又はサル等の霊長類由来の細胞やマウス、ラット又はハムスター等のげっ歯類由来の細胞が挙げられる。

哺乳動物由来の細胞の非限定的な例として、HL-60 (ATCC No. CCL-240)、HT-1080 (ATCC No. CCL-121)

、HeLa (ATCC No. CCL-2)、293 (ECACC No. 85120602)、Hep G2 (ATCC No. HB8065)、VERO (ATCC No. CCL-1651)、CV1 (ATCC No. CCL70)、COS-7 (ATCC No. CRL-1651)、NIH 3T3 (ATCC No. CRL-1658)、NSO (ATCC No. CRL-1827)、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、BHK 21 (単にBHK細胞とも称される。ATCC No. CRL-10) 及び MDCK (ATCC No. CCL-34) 等の細胞株や、これらの細胞株から誘導された亜株 (例えば、BHK細胞の亜株としてのBHK TK-細胞や、CHO細胞の亜株としてのCHO-K1細胞、CHO-S細胞、CHO-DXB11細胞 (CHO-DUKX細胞又はDuxB11細胞とも称される) 及びCHO-DG44細胞) が挙げられる。

[0039] 鳥類由来の細胞の非限定的な例として、ニワトリ細胞株SL-29が挙げられる。両生類由来の細胞の非限定的な例として、アフリカツメガエル卵母細胞が挙げられる。魚類由来の細胞の非限定的な例として、ゼブラフィッシュ細胞株ZF4が挙げられる。

[0040] 昆虫類由来の細胞の非限定的な例として、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 由来の細胞が挙げられる。ツマジロクサヨトウ由来の細胞の非限定的な例として、Sf9細胞、Sf21細胞及びSF+細胞が挙げられる。

[0041] 植物細胞は、採取した細胞及び／又は組織が液体培養可能なものであれば特に限定はない。植物細胞の非限定的な例として、生薬類 (例えば、サポニン、アルカロイド類、ベルベリン、スコポリン又は植物ステロール) を生産する植物 (例えば、薬用人参、ニチニチソウ、ヒヨス、オウレン又はペラドンナ) や、化粧品・食品原料となる色素や多糖体 (例えば、アントシアニン、ベニバナ色素、アカネ色素、サフラン色素又はフラボン類) を生産する植物 (例えば、ブルーベリー、紅花、セイヨウアカネ又はサフラン) 又は医薬品原料を生産する植物が挙げられる。

[0042] 細菌細胞は、真正細菌（グラム陽性又はグラム陰性）又は古細菌の細胞である。細菌細胞の非限定的な例には、エシェリヒア（*Escherichia*）属の細菌細胞（例えば、*Escherichia coli*）、バチルス（*Bacillus*）属の細菌細胞（例えば、*Bacillus subtilis*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）属の細菌細胞（例えば、*Pseudomonas fluorescens*）、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属の細菌細胞及びラクトコッカス属の細菌細胞（例えば、*Lactococcus lactis*）が挙げられる。

[0043] 真菌細胞は、真核生物に属する分化した細胞小器官と典型的な核をもつ大型の細胞である。真菌細胞の非限定的な例には、サッカロミセス（*Saccharomyces*）属の真菌（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）属の真菌（例えば、*Schizosaccharomyces pombe*）及びピチア（*Pichia*）属の真菌（例えば、*Pichia pastoris*）が挙げられる。

[0044] 本開示における「レーシステイン」は、溶液（例えば、水、緩衝液又は培地を溶媒とする溶液）中でレーシステインとして機能するレーシステイン塩、レーシステインの水和物及びレーシステイン塩の水和物を含む。ただし、レーシステインの濃度について言及する場合、その濃度は、溶液中で機能するレーシステインの濃度を意味する。

溶液中のレーシステインの濃度は、典型的には、その溶液を調製した時点のレーシステインの濃度（計算値が好ましいが、調製直後の実測値でもよい）で表す。ただし、溶液調製後の経時的な濃度変動について言及する場合、レーシステインの濃度は、溶液調製後所定の時間が経過した時点のレーシステインの濃度を意味する。

レーシステイン塩の非限定的な例として、レーシステイン塩酸塩、レーシステインナトリウム塩及びレーシステインアンモニウム塩が挙げられる。L

ーシステイン水和物の非限定的な例として、Lーシステイン塩酸塩一水和物、Lーシステインナトリウム塩一水和物及びLーシステインアンモニウム塩一水和物が挙げられる。Lーシステインとして、Lーシステイン、Lーシステイン塩及びそれらの水和物の内の複数を組み合わせて用いることも、可能である。

[0045] 本開示における「Nーアセチルシステイン」は、溶液（例えば、水、緩衝液又は培地を溶媒とする溶液）中でNーアセチルシステインとして機能する、Nーアセチルシステイン塩、Nーアセチルシステインの水和物及びNーアセチルシステイン塩の水和物を含む。ただし、Nーアセチルシステイン濃度について言及する場合、その濃度は、溶液中で機能するNーアセチルシステインの濃度を意味する。

Nーアセチルシステインは、L体であってもよく、D体であってもよい。また、L体とD体の混合物であってもよい。

溶液中のNーアセチルシステインの濃度は、典型的には、その溶液を調製した時点のNーアセチルシステインの濃度（計算値が好ましいが、調製直後の実測値でもよい）で表す。ただし、溶液調製後の経時的な濃度変動について言及する場合、Nーアセチルシステインの濃度は、溶液調製後所定の時間が経過した時点のNーアセチルシステインの濃度を意味する。

Nーアセチルシステイン塩の非限定的な例として、Nーアセチルシステインナトリウム塩及びNーアセチルシステインアンモニウム塩が挙げられる。Lーシステイン水和物の非限定的な例として、Nーアセチルシステインナトリウム塩一水和物及びNーアセチルシステインアンモニウム塩一水和物が挙げられる。Nーアセチルシステインとして、Nーアセチルシステイン、Nーアセチルシステイン塩及びこれらの水和物の内の複数を組み合わせて用いることも可能である。

[0046] 本開示における「熱負荷」は、調製中、保存中及び／又は細胞培養中の培地に与えられる場合、培地に悪影響を及ぼし得る温度の熱を与えることをいう。そのような悪影響の非限定的な例として、調製中、保存中及び／又は細

胞培養中の培地における培地成分の析出、並びに培地において産生される組換えタンパク質の収量及び／又は品質の低下が挙げられる。培地に悪影響を及ぼし得る温度は、調製、保存及び／又は細胞培養時の培地が通常取り得る温度（典型的には、4～40℃）であってもよく、より高い温度を含む温度（例えば、4℃～120℃）であってもよい。

[0047] 本開示における「安定性」は、培地について用いられる場合、調製中、保存中及び／又は細胞培養中に物理的、化学的変化が生じない、又は生じにくい性質を指す。例えば、培地中における副生成物（例えば、L-システインから生成するシスチン）の生成速度が遅い場合や、培地成分（例えば、シスチン）が析出しない場合又は析出するまでの時間（日数等）が長い場合、その培地の安定性は高いといえる。

[0048] 本開示における「培地添加物」は、培地に添加される任意の物質又は物質を含む組成物を指す。培地添加物は、添加する培地に既に存在する成分を補充するものでも、添加する培地に存在しない成分を新規に追加するものでもよい。培地添加物は、典型的には、液体形態又は粉末形態（顆粒形態を含む）で提供される。また、添加の目的は、特に限定されない。

[0049] 本開示で使用される単数形「a」、「an」及び「the」は、別途明確に指示されない限り、複数の対象を含み得る。

本開示で使用される「及び／又は」は、「及び」で表される関係性と、「又は」で表される関係性の双方を含む。「及び」は、「かつ」又は「並びに」と表現されることもある。「又は」は、「若しくは」と表現されることもある。本開示における「を含む」には、「から主としてなる」、「から実質的になる」及び「からなる」が含まれ、「から主としてなる」には「から実質的になる」及び「からなる」が含まれ、「から実質的になる」には「からなる」が含まれる。

[0050] 本開示におけるそれぞれの数値範囲については、「～」、「から」で示された上限値及び下限値をそれぞれ含むものとする。例えば、数値A及びBを用いた「A～B」又は「AからB」なる記載は、A以上B以下であることを

意味する。また、本開示に段階的に記載されている数値範囲における「A～B」、「AからB」又は「A以上B以下」との記載は、独立して、「A以上が好ましい」ことと「B以下が好ましい」こととの双方を含み、これらの下限値又は上限値を他の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示に記載されている数値範囲の下限値又は上限値は、その数値範囲内の数値であって、実施例で示されている数値に置き換えてもよい。

[0051] [実施形態]

以下、発明を実施するための形態を用いて、本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

これらの実施形態は、単独で実施しても、複数を組み合わせて実施してもよい。実施形態における定義や詳細について、上述の「用語の説明」を参照することができる。

本開示で用いられる公知の技術及び手順は、当業者に十分に理解されるものであり、常法に従って実施することができる。

[0052] ある実施形態では、L-システイン及びN-アセチルシステインを含むフィード培地（又は液体培地）が提供される。また、他の実施態様では、フィード培地（又は液体培地）を調製するためのN-アセチルシステイン及びL-システインを含む粉末培地が提供される。また、他の実施態様では、フィード培地（又は液体培地）あるいは粉末培地を調製するための方法が提供される。さらに、他の実施態様では、フィード培地（又は液体培地）あるいは粉末培地を調製するための培地添加物が提供される。これらの実施形態において、液体培地は、好ましくは、フィード培地である。

これらの実施形態の液体培地（以下、液体培地の形態のフィード培地を含む）において、

（１）L-システインの濃度は、1～40 mM、好ましくは10～40 mM、10～30 mM又は15～40 mM、より好ましくは15～30 mMであり、かつ／若しくはN-アセチルシステインの濃度は、1～40 mM、好ましくは1～30 mM、1～20 mM又は1～10 mM、より好ましくは2～

10 mMであり、かつ／又は

(2) N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率は、0.04～2.0、好ましくは0.04～1.0、0.04～0.4、0.1～2.0、0.1～1.0又は0.1～0.4、より好ましくは0.2～0.4である。

[0053] これらの実施形態における液体培地は、N-アセチルシステインを好適な濃度や含有比で含むことにより、好ましくは、L-システインからのシスチンの形成及び／又は析出が抑制され、かつ／又は、安定性が向上している。また、これらの実施形態における液体培地は、好ましくは、培養細胞の生長又は増殖に有利な高濃度のL-システインを含む。このような液体培地を用いることにより、細胞培養のプロセスを安定的に実施することが可能である。また、好ましくは、細胞培養に係るコストが削減される。さらに、このような液体培地を組換えタンパク質の産生に用いることにより、組換えタンパク質を用いた製品の生産性を向上させることができる。また、好ましくは、組換えタンパク質を用いた製品の製造コストが削減される。また、好ましくは、組換えタンパク質を用いた製品の研究開発が、効率化される。

[0054] これらの実施形態における液体培地は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む限りにおいて特定の組成に限定されるものではなく、任意の液体培地を用いることができる。液体培地のpHは5.0～9.0であってもよく、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは6.5～7.5、最も好ましくは6.5～7.0である。液体培地は、無血清培地及び／又は動物性タンパク質不含培地であってもよい。また、液体培地は、合成培地であってもよい。液体培地は、ラージスケールプロセス（例えば500Lスケールの細胞培養）で用いられてもよい。

[0055] これらの実施形態における液体培地を組換えタンパク質産生能を有する細胞の培養に用いる場合、組換えタンパク質の産生能を向上させることができる。すなわち、細胞培養に係る諸条件を最適化した場合、典型的には、1～20 g/Lの組換えタンパク質の産生が可能になり、好ましくは2～16 g

／L、より好ましくは6～14 g／L、さらにより好ましくは8～12 g／L、最も好ましくは10～12 g／Lの組換えタンパク質の産生が可能になる。また、液体培地の成分は、好ましくは、調製中、保存中及び／又は細胞培養中、熱負荷により析出しない。

[0056] これらの実施形態における粉末培地は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む。粉末培地は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む限りにおいて、特定の組成に限定されるものではなく、任意の粉末培地を用いることができる。粉末培地は、溶媒（例えば、水）に溶解して本開示の実施形態の液体培地を調製するために用いることができる。この場合、粉末培地は、液体培地におけるL-システイン及びN-アセチルシステインの濃度を所望の濃度とする量のL-システイン及びN-アセチルシステインを含む。粉末培地には、液体培地におけるL-システイン及びN-アセチルシステインの濃度を所望の濃度とするように希釈するための指示書又はウェブサイト上での説明等が付随していてもよい。

粉末培地は、液体培地と比較して、一般に取扱いがより容易であり、例えば、より安定に保存、流通できる点で有利である。

[0057] 液体培地又は粉末培地を調製するための方法は、L-システイン、N-アセチルシステイン及び細胞の増殖や生存に必須な成分や有用な成分等を混合し、本開示の実施形態のいずれかの液体培地又は粉末培地を得ることを含む。L-システイン及び／又はN-アセチルシステインとして、本開示の実施形態のいずれかの培地添加物や剤を用いることもできる。この方法によれば、液体培地又は粉末培地を、当業者が適切に調製することができる。

[0058] 培地添加物は、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを含む。培地添加物は、細胞培養培地及びフィード培地のいずれの培地にも添加されてもよく、また、両方の培地に添加されてもよい。培地添加物は、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを含む限りにおいて、特定の組成に限定されるものではなく、任意の組成のものを用いることができる。培地添加物は、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインのみからな

っても、あるいは、担体、pH調整剤、培地等を含む組成物であってもよい。培地添加物は、液体の形態であってもよく、固体の形態、例えば粉末の形態（顆粒の形態を含む）であってもよい。

[0059] 培地添加物は、任意の液体培地に添加することができる。この場合、培地添加物は、典型的には、液体培地におけるL-システイン及びN-アセチルシステインの濃度を所望の濃度とする量のL-システイン及び／又はN-アセチルシステインを含む。また、培地添加物は、任意の粉末培地に添加することができる。この場合、培地添加物は、典型的には、培地添加物を添加した粉末培地を溶媒（例えば、水）に溶解して液体培地を調製する際に、液体培地におけるL-システイン及びN-アセチルシステインの濃度を所望の濃度とする量のL-システイン及び／又はN-アセチルシステインを含む。

また、培地添加物には、液体培地におけるL-システイン及びN-アセチルシステインの濃度を所望の濃度とするように希釈するための指示書又はウェブサイト上での説明等が付随していてもよい。

[0060] 培地添加物を添加することにより、本開示の実施形態の液体培地又は粉末培地を得ることができる。

培地添加物は、液体培地又は粉末培地を調製することをその用途とする。用途は、好ましくは、培地添加物の販売用パンフレット、取扱説明書等に記載される。この場合、用途は、培地添加物の効果として記載されることもあり得る。

[0061] ある実施形態では、細胞を培養する培地に、本開示の実施形態の液体培地を添加することを含む、細胞を培養するための方法が提供される。また、他の実施態様では、組換えタンパク質産生能を有する細胞を培養する培地に、本開示の実施形態の液体培地を添加することを含む、組換えタンパク質を製造するための方法が提供される。

細胞を培養する培地は、典型的には、細胞培養中の培養容器に張り込まれている培地である。また、細胞を培養する培地は、典型的には、基礎培地又はフィード培地を添加した基礎培地である。細胞を培養する培地及びフィー

ド培地として、それぞれ、本開示の実施形態のいずれかの液体培地（粉末培地から調製した液体培地及び培地添加物を添加した液体培地を含む）を用いることができる。細胞を培養する培地に添加する液体培地は、典型的には、フィード培地である。

[0062] 細胞を培養するための方法は、安定性が向上した培地並びに／又はシスチンの形成及び／若しくは析出が抑制されている培地を用いることにより、好ましくは、細胞培養を安定的に実施することを可能にする。また、細胞を培養するための方法は、好ましくは、培養に係るコストを削減する。

[0063] 組換えタンパク質を製造するための方法は、安定性が向上した培地並びに／又はシスチンの形成及び／若しくは析出が抑制されている培地を用いることにより、組換えタンパク質を用いた製品の生産性を向上させることができる。また、組換えタンパク質を製造するための方法は、好ましくは、組換えタンパク質を用いた製品の製造コストを削減する。また、組換えタンパク質を製造するための方法は、好ましくは、組換えタンパク質を用いた製品の研究開発の効率化に貢献する。

[0064] 細胞は、動物細胞、植物細胞、細菌細胞又は真菌細胞、好ましくは動物細胞、より好ましくは哺乳細胞、さらにより好ましくはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞であってもよい。また、細胞は、タンパク質を発現してもよい。タンパク質は、典型的には、組換えタンパク質である。組換えタンパク質は、抗体又はその抗原結合断片を含んでもよい。抗体又はその抗原結合断片は、IgG由来であってもよい。

[0065] 細胞を培養する培地に液体培地を添加する回数は、特に限定されるものではなく、1回であっても、複数回であってもよい。細胞を培養する培地に液体培地を添加する時期も、特に限定されるものではなく、培養開始前、培養開始時及び培養開始後の内のいずれの時期でも、その複数の時期であってもよい。また、液体培地は、細胞を培養する細胞に、連続的に添加されてもよく、段階的に添加されてもよい。また、液体培地は、細胞を培養する培地に、単独で添加されてもよく、他の培地、剤又は培地添加物と一緒に添加され

てもよい。また、液体培地を添加する際、同時に同量の培養液が、抜き取られてもよい。

細胞を培養する培地に添加する液体培地の量は、典型的には細胞を培養する培地の量の1～20%であり、好ましくは2～10%である。液体培地を添加後の細胞を培養する培地におけるL-システインの濃度は、典型的には0.01～8 mMであり、好ましくは、0.02～4 mMである。液体培地を添加後の細胞を培養する培地におけるN-アセチルシステイン濃度は、典型的には0.01～8 mMであり、好ましくは、0.02～4 mMである。

細胞を培養するための方法及び組換えタンパク質を製造するための方法は、ラージスケールプロセス（例えば500 Lスケールの細胞培養）で用いられてもよい。

[0066] 細胞を培養するための方法は、培地を調製することを含んでもよい。また、細胞を培養するための方法は、細胞を培養することを含んでもよい。細胞を培養するための方法は、典型的にはフェドバッチ培養法に従うが、他の培養法（例えば、連続培養法）に従ってもよい。

[0067] 組換えタンパク質を製造するための方法は、培地を調製することを含んでもよい。また、組換えタンパク質を製造するための方法は、細胞を培養することを含んでもよい。また、組換えタンパク質を製造するための方法は、組換えタンパク質を産生することを含んでもよい。また、組換えタンパク質を製造するための方法は、産生された組換えタンパク質を回収することを含んでもよい。また、組換えタンパク質を製造するための方法は、その他の追加工程を含んでもよい。追加的な工程の非限定な例として、組換えタンパク質を精製することや、組換えタンパク質を化学的又は生物学的に修飾することが挙げられる。組換えタンパク質の精製には、通常、複数の手法が組合わせて用いられるが、クロマトグラフィーが好適に用いられる。特に組換えタンパク質が抗体である場合、アフィニティークロマトグラフィーやプロテインAクロマトグラフィーなどが好適に用いられる。

[0068] 組換えタンパク質の化学的又は生物学的な修飾の非限定的な例として、ジ

スルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、アミド化、保護基等による誘導体化、切断又は標識成分若しくは薬物（毒素等）などとの結合が挙げられる。組換えタンパク質を製造するための方法には、毒素等の薬物と結合した抗体の製造方法も含まれる。この場合、組換えタンパク質を製造するための方法は、追加工程として、抗体と薬物とを結合させることをさらに含んでいてもよい。薬物と結合した抗体は、本開示の組換えタンパク質に含まれる。

[0069] 本開示の組換えタンパク質を製造するための方法によれば、高い産生量の組換えタンパク質を製造できる。すなわち、本開示の組換えタンパク質を製造するための方法によれば、培養に係る条件を最適化した場合、典型的には、 $1 \sim 20 \text{ g/L}$ の組換えタンパク質の産生が可能になり、好ましくは $2 \sim 16 \text{ g/L}$ 、より好ましくは $6 \sim 14 \text{ g/L}$ 、さらにより好ましくは $8 \sim 12 \text{ g/L}$ 、最も好ましくは $10 \sim 12 \text{ g/L}$ の組換えタンパク質の産生が可能になる。また、本開示の組換えタンパク質を製造するための方法によれば、液体培地の培地成分は、好ましくは、調製中、保存中及び／又は細胞培養中、熱負荷により析出しない。

[0070] ある実施形態では、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、液体培地（又はフィード培地）の安定性を向上させるための方法又は剤が提供される。他の実施態様では、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、液体培地（又はフィード培地）におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法又は剤が提供される。他の実施形態では、液体培地（又はフィード培地）の安定性を向上させるための、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインの使用が提供される。他の実施形態では、液体培地（又はフィード培地）におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインの使用が提供される。これらの実施態様における液体培地は、好ましくは、フィード培地である。

[0071] これらの実施形態において、L-システイン及び／又はN-アセチルシス

テインは、

(1) L-システインの濃度が、1～40 mM、好ましくは10～40 mM、10～30 mM又は15～40 mM、より好ましくは15～30 mMに、かつ／若しくはN-アセチルシステインの濃度が、1～40 mM、好ましくは1～30 mM、1～20 mM又は1～10 mM、より好ましくは2～10 mMになるように、かつ／又は

(2) N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が、0.04～2.0、好ましくは0.04～1.0、0.04～0.4、0.1～2.0、0.1～1.0又は0.1～0.4、より好ましくは0.2～0.4になるように、

液体培地に添加されるか、あるいは、上記剤を添加後の液体培地における濃度又は比率が上記の範囲内となる。

[0072] これらの実施形態の方法、剤又は使用によれば、好適な濃度や含有比のN-アセチルシステインを含むことにより、L-システインを含む液体培地の安定性を向上させ、かつ／又は、液体培地におけるシスチンの形成及び／又は析出を抑制することができる。したがって、これらの実施形態の方法、剤又は使用によれば、産業規模の細胞培養を安定的に実施することが可能になる。

また、これらの実施形態の方法、剤又は使用を組換えタンパク質の生産プロセスに用いる場合、組換えタンパク質を用いた製品の生産性を向上させることができる。また、好ましくは、組換えタンパク質を用いた製品の製造コストが削減する。また、好ましくは、組換えタンパク質を用いた製品の研究開発が効率的になる。

[0073] これらの実施形態の方法、剤又は使用は、L-システインを含むがN-アセチルシステインを含まない液体培地と比較して、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地の安定性を向上させることができる。液体培地の安定性の向上は、公知の方法で評価してもよく、あるいは、評価は行わず、単に安定性の向上を目的とするものであってもよい。安定性を評価

する方法の非限定な例として、目視又は分光学的手段（例えば、濁度計）により培地成分（例えば、シスチン）の析出を検出し、析出が生じるまでの時間（日数等）により安定性を評価する方法、及び物理化学的分析手段を用いて培地成分（例えば、シスチン）の濃度変化を解析することにより安定性を評価する方法が挙げられる。物理化学的分析手段の非限定な例として、例えば国際公開第2021/060517号に記載される、液体クロマトグラフータンデム質量分析装置を用いる手段が挙げられる。

[0074] 本開示のさらなる実施形態では、液体培地の安定性を向上させるための方法又は剤は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地において析出が生じるまでの時間（日数等）を、L-システインを含むがN-アセチルシステインを含まない液体培地と比較して、長くする。長くなる時間は、例えば1日以上、好ましくは5日以上、より好ましくは10日以上、さらにより好ましくは15日以上である。また、別の実施形態では、液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法、剤又は使用は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地における副生成物（例えば、シスチン）の生成速度を、L-システインを含むがN-アセチルシステインを含まない液体培地と比較して、10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、さらにより好ましくは40%以上低下させる。また、さらに別の実施形態では、液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法、剤又は使用は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地において、副生成物（例えば、シスチン）を、2週間以上、好ましくは3週間以上、より好ましくは1月間以上、さらにより好ましくは2月間以上、最も好ましくは3月間以上の期間、析出させない。

[0075] 液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法、剤又は使用は、L-システインを含むがN-アセチルシステインを含まない液体培地と比較して、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制することができる。液

体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出は、公知の方法により評価してもよく、あるいは、評価は行わず、単に液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出の抑制を目的とするものであってもよい。シスチンの生成及び／又は析出の抑制を評価する方法の非限定的な例として、目視又は分光学的手段（例えば、濁度計）によりシスチンの析出を検出し、析出が生じるまでの時間（日数等）によりシスチンの生成及び／又は析出の抑制を評価する方法、及び物理化学的分析手段を用いてシスチンの濃度変化を解析することによりシスチンの生成及び／又は析出の抑制を評価する方法が挙げられる。物理化学的分析手段の非限定な例として、例えば国際公開第2021/060517号に記載される、液体クロマトグラフトンデム質量分析装置を用いる手段が挙げられる。

[0076] 本開示のさらなる実施形態では、液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法、剤又は使用は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地においてシスチンが析出するまでの日数を、L-システインを含むがN-アセチルシステインを含まない液体培地と比較して、長くする。長くなる時間は、例えば1日以上、好ましくは5日以上、より好ましくは10日以上、さらにより好ましくは15日以上である。また、別の実施形態では、液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法、剤又は使用は、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出の速度を、L-システインを含むがN-アセチルシステインを含まない液体培地と比較して、10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは30%以上、さらにより好ましくは40%以上低下させる。

[0077] L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加した後の液体培地のpHは、5.0～9.0であってもよく、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは6.5～7.5、最も好ましくは6.5～7.0である。L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加した後の液体培地の特徴は、本開示におけるいずれかに記載の液体培地の特徴と同

じであってもよい。

[0078] L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを液体培地に添加することには、（１）L-システイン及び／若しくはN-アセチルシステイン又はこれらを含む組成物を液体培地に添加すること、（２）L-システイン及び／若しくはN-アセチルシステイン又はこれらを含む組成物を他の成分若しくは他の成分を含む他の組成物（培地等）と混合した後にその混合物を培地に添加すること、並びに、（３）N-アセチルシステイン又はそれらを含む組成物と他の成分若しくは他の成分を含む他の組成物（培地等）とを混合して培地を作ること、の全てが含まれる。

[0079] L-システイン及び／若しくはN-アセチルシステイン、又は上記剤を添加する液体培地は、これを添加する前に、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを含んでいてもよい。この場合、液体培地におけるL-システイン及びN-アセチルシステインの所望の濃度は、L-システイン及び／若しくはN-アセチルシステイン、又は剤を添加した後に、達成されてもよい。

[0080] 上記剤は、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを含む限りにおいて、特定の形態に限定されるものではなく、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインのみからなっても、あるいは、担体やpH調整剤、培地等を含む組成物の形態であってもよい。また、剤は、液体の形態であってもよく、固体、例えば粉末の形態（顆粒の形態を含む）であってもよい。

上記剤は、好ましくは、液体培地の安定性を向上させること、又は液体培地におけるシスチンの生成及び／若しくは析出を抑制することを、その用途とする。用途は、好ましくは、剤の販売用パンフレット、取扱説明書、製品に関するウェブサイト等において記載される。この場合、用途は、剤の効果として記載されることもあり得る。

[0081] なお、上記実施形態等により説明される培地、方法、剤、添加物、使用等は、本発明を限定するものではなく、例示することを意図して開示されているものである。本発明の技術的範囲は、特許請求の範囲の記載により定めら

れるものであり、当業者は、特許請求の範囲に記載された発明の技術的範囲において、様々な設計の変更が可能である。

[0082] 例えば、上記の実施形態の説明では、フィード培地を中心に説明をしてきたが、本開示の実施形態はフィード培地に限られるものではなく、フィードに用いられないものも含む任意の液体培地等に対して適用することもできる。すなわち、本開示の他の実施形態は、フィード培地が液体培地（フィード培地でないものも含む）に置き換えられた上記いずれかの実施形態である。

[0083] また、例えば、ある実施形態では、本開示の実施形態で製造された組換えタンパク質が提供される。また、別の実施形態は、その組換えタンパク質を含む薬学的組成物又は医薬、その組換えタンパク質の医薬の製造における使用、あるいはその組換えタンパク質を投与することを含む疾患の治療方法に関する。また、別の実施形態は、本開示の実施形態に係るいずれかの工程、又は本開示の実施形態に係るいずれかの方法を含み、それにより組換えタンパク質を得ることを含み、さらにその組換えタンパク質と担体とを混合することを含む、医薬組成物又は医薬製剤の製造方法にも関する。

実施例

[0084] 以下、実施例により、本発明を説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。なお、実施例で言及されている市販試薬・機器等は、特に示さない限り、製造者の使用説明又は定法に従い使用された。

[0085] [実施例 1]

Ｌ－システイン高濃度化フィード培地の液体安定性に及ぼす、Ｎ－アセチルシステインの影響

市販培地である $C E L L i S T^{\text{TM}}$ $F e e d \text{ media}$ （味の素株式会社： $F E E D 2$ ）を基に、 $F e e d$ 培地 A が調製された。 $F e e d$ 培地 A は、 N －アセチルシステインを含まない。

終濃度として $18 \sim 26 \text{ mM}$ の L －システイン及び 60 g/L のグルコースを含む $F e e d$ 培地 A に、終濃度として $0 \sim 5.5 \text{ mM}$ の N －アセチルシステインが添加され、 $F E E D 2$ の製品説明書に記載の手順により、 $p H 6$

． 7 ～ 6． 9 の液体培地が調製された。調製した液体培地は、200 mL ずつ、150 mL 容のステリカップー GP (Merck : S2GPU01RE) を用いてフィルトレーションされ、4℃又は25℃の遮光条件で18日間保管された。

[0086] 保管後、目視にて析出を検出した結果が表1に示される。N－アセチルシステインが添加されないFeed培地Aでは、18日後に析出が検出された。一方、18 mMのL－システインが添加されたFEED培地Aにおいて2． 7 ～ 5． 5 mMのN－アセチルシステインがさらに添加された場合、析出は検出されなかった。

また、22 mMのL－システインが添加されたFEED培地Aにおいて、2． 7 ～ 5． 5 mMのN－アセチルシステインがさらに添加された場合、析出は検出されなかった。

さらに、24 mM又は26 mMのL－システインが添加されたFEED培地Aにおいて、3． 7 mMのN－アセチルシステインが添加された場合、析出が検出された。一方、5． 5 mMのN－アセチルシステインが添加された場合、析出が検出されなかった。

[0087] [表1]

培地	L－システイン 濃度(mM)	N－アセチルシステイン 添加濃度(mM)	4℃、 18日間	25℃、 18日間
Feed培地A	18	0	析出有り	析出有り
Feed培地A	18	2． 7	析出無し	析出無し
Feed培地A	18	3． 7	析出無し	析出無し
Feed培地A	18	5． 5	析出無し	析出無し
Feed培地A	22	2． 7	析出無し	析出無し
Feed培地A	22	3． 7	析出無し	析出無し
Feed培地A	22	5． 5	析出無し	析出無し
Feed培地A	24	3． 7	析出有り	析出有り
Feed培地A	24	5． 5	析出無し	析出無し
Feed培地A	26	3． 7	析出有り	析出有り
Feed培地A	26	5． 5	析出無し	析出無し

[0088] 以上の結果から、N－アセチルシステインを添加することにより、N－アセチルシステインを添加しない場合と比較して、高濃度のL－システインを

含む液体培地における析出の生成が抑制され、液体培地の安定性が向上することが示された。

[0089] [実施例 2]

Ｌ－システイン高濃度化培地の液体安定性及び培地保管中のシスチン濃度に及ぼす、Ｎ－アセチルシステインの影響

市販培地であるCELLIST™ Feed media（味の素株式会社：FEED 2）を基に、Feed 培地 A が調製された。Feed 培地 A は、Ｎ－アセチルシステインを含まない。

終濃度として 18 mM 又は 24 mM のＬ－システイン及び 60 g/L のグルコースが添加された Feed 培地 A に、終濃度として 0～5.5 mM のＮ－アセチルシステインが添加され、FEED 2 の製品説明書に記載の手順により、pH 6.7～6.9 の液体培地が調製された。調製した液体培地は、ステリカップー GP を用いてフィルトレーションされ、その 25 mL 又は 50 mL が、60 mL 容の PETG 角型培地ボトル（Thermo Fisher Scientific：2019-0030）に張り込まれ、4℃の遮光条件で 21 日間保管された。

[0090] 保管後、目視にて結晶の析出を検出した結果が表 2 に示される。18 mM のＬ－システインを含む Feed 培地 A において、Ｎ－アセチルシステインが添加されない場合、18 又は 13 日後に析出が検出された。一方、5.5 mM のＮ－アセチルシステインが添加された場合、析出は検出されなかった。

また、24 mM のＬ－システインを含む FEED 培地 A において、Ｎ－アセチルシステインが添加されない場合、7 日後に析出が検出された。一方、2.8 mM のＮ－アセチルシステインが添加された場合、8 又は 13 日後に析出が検出された。また、5.5 mM のＮ－アセチルシステインが添加された場合、液量 25 mL 条件では 21 日後に析出が検出され、液量 50 mL 条件では析出が検出されなかった。

[0091]

[表2]

培地	L-システイン 濃度(mM)	N-アセチルシステイン 添加濃度(mM)	液量 (mL)	析出が初めて 認められた日数
Feed培地A	18	0	50	8
Feed培地A	18	0	25	13
Feed培地A	18	5.5	50	認められず
Feed培地A	18	5.5	25	認められず
Feed培地A	24	0	50	7
Feed培地A	24	0	25	7
Feed培地A	24	2.8	50	13
Feed培地A	24	2.8	25	8
Feed培地A	24	5.5	50	認められず
Feed培地A	24	5.5	25	21

[0092] 次に、表2で用いた液量25mL条件の5つの培地について、液体中のL-システイン、シスチン、N-アセチルシステイン、N-アセチルシスチン及びN, N'-ジアセチルシスチンの濃度変化が、国際公開第2021/060517号に記載の方法に従って、経時的に分析された。

結果は図1に示される。N-アセチルシステインが添加されない培地において（図1A、C）、液体中のシスチン濃度が上昇し、また、析出が検出された。一方、N-アセチルシステインが添加された培地において（図1B、D、E）、N-アセチルシスチンが生じ、また、N-アセチルシステインを添加しない培地と比較して、シスチンの生成速度が鈍化した。

[0093] さらに、（A）18mMのL-システインを含みN-アセチルシステインを含まない液体培地、（B）24mMのL-システインを含みN-アセチルシステインを含まない液体培地、並びに（C）24mMのL-システイン及び5.5mMのN-アセチルシステインを添加した液体培地について（各液体培地の液量は、50mL）、調製後13日目に10mLの液体培地を抜き取った後、63日目まで保管を継続し、析出を目視にて検出した。

結果は、図2に示される。N-アセチルシステインを含まない液体培地（A）及び（B）において、析出が検出された。一方、N-アセチルシステインを含む液体培地（C）において、析出は検出されなかった。

[0094] 以上の結果から、N-アセチルシステインを添加したL-システインを含

む液体培地において、析出の生成が抑制されること、シスチン生成の速度が鈍化することが示された。

[0095] [実施例3]

L-システイン高濃度化培地の液体安定性に及ぼす、N-アセチルシステインの影響

市販培地であるCELLIST™ Feed media（味の素株式会社：FEED2）が用いられた。FEED2は、N-アセチルシステインを含まない。72 g/Lのグルコースを含有するFEED2に、終濃度として18 mMのL-システイン及び終濃度として0、3又は9 mMのN-アセチルシステインがさらに添加された。調製した液体培地は、ステリカップーGPを用いてフィルトレーションされ、50 mLのファルコンチューブに10又は40 mL張り込まれ、25℃の遮光条件で保管された。

[0096] 保管後、結晶の析出を目視にて検出した結果が、表3に示される。FEED2に18 mMのL-システインを添加した培地において、液量10 mL条件では2日後、液量40 mL条件では5日後に、析出が検出された。

FEED2に18 mMのL-システイン及び3 mMのN-アセチルシステインを添加した培地では、液量10 mL条件では5日後、液量40 mL条件では10日後に析出が検出された。

FEED2に18 mMのL-システイン及び9 mMのN-アセチルシステインが添加された培地では、液量10 mL条件では10日後、液量40 mL条件では19日後に析出が示された。

[0097] [表3]

培地	L-システイン 添加濃度(mM)	N-アセチルシステイン 添加濃度(mM)	液量 (mL)	析出が初めて 認められた日数
FEED2	18	0	10	2
FEED2	18	0	40	5
FEED2	18	3	10	5
FEED2	18	3	40	10
FEED2	18	9	10	10
FEED2	18	9	40	19

[0098] 以上の結果から、N－アセチルシステインが添加されることにより、L－システイン高濃度化培地における析出の生成が抑制され、液体安定性が向上することが示された。

[0099] [実施例 4]

フィード培地の液体安定性に及ぼす、N－アセチルシステインの影響

市販培地であるCELLISTTM Feed media（味の素株式会社：FEED2）が用いられた。FEED2は、N－アセチルシステインを含まない。72 g/Lのグルコースを含有するFEED2に、3、6、9、13.5又は18 mMのN－アセチルシステインが添加された。調製した液体培地は、ステリカップーGPを用いてフィルトレーションされ、酸化反応が促進される条件下、50 mLのファルコンチューブに10 mL張り込まれ、25℃の遮光条件で32日間保管された。

[0100] 保管後、結晶の析出を目視にて検出した結果が、表4に示される。N－アセチルシステインを添加しなかったFEED2培地において、22日後に析出が検出された。一方、FEED2に3、6、9、13.5又は18 mMのN－アセチルシステインを添加した培地において、析出は検出されなかった。

[0101] [表4]

培地	N－アセチルシステイン 添加濃度 (mM)	析出が初めて 認められた日数
FEED2	0	22
FEED2	3	認められず
FEED2	6	認められず
FEED2	9	認められず
FEED2	13.5	認められず
FEED2	18	認められず

[0102] 以上の結果から、N－アセチルシステインを添加することにより、L－システイン高濃度化培地における析出の生成が抑制され、液体安定性が向上することが示された。

[0103] [実施例 5]

CHO細胞の増殖及び抗体生産に及ぼす、Feed培地へのN-アセチルシステイン添加の影響

CELLIST™ Basal media (味の素株式会社: BASAL 3) に、LR3-IGF-1 (SIGMA-ALDRICH: I1271-1MG、終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$) と L-Glutamine (Thermo Fisher SCIENTIFIC: 25030081、終濃度 6mM) が添加され、基礎培地が調製された。

実施例4で用いられたN-アセチルシステインの濃度が異なる6種類の培地が、調製後速やかに使用された。

調製された基礎培地を用いて $3 \times 10^5 \text{cells}/\text{mL}$ に調整されたCHO細胞懸濁液が、6-well plate (CORNING、Cat. No. CLS3471) に播種され、4mLで培養が開始され、14日間培養が行われた。全ての実験群は、 $n=2$ で実施された。培養温度は、 37°C 、攪拌速度は 110rpm とされた。培養開始4、7、9及び11日目に、張り込み培地に対しての7%のフィード培地が添加された。培養開始7、9、11及び14日目に細胞培養液がサンプリングされ、生細胞数が生死細胞オートアナライザー Vi-CELL™ XR (ベックマン・コールター社) を用いて測定され、抗体産生量が Octet QK (FORTEBIO社) を用いて測定された。

[0104] 結果は、図3及び4に示される。Feed培地へ3、6、9、13、5又は18mMのN-アセチルシステインを添加した培地においても、十分な細胞増殖及び抗体生産が可能であった。

これらの結果から、N-アセチルシステインを添加した場合においても、L-システイン高濃度化培地がもたらす優れた細胞増殖能、組換えタンパク質生産能が維持されることが示された。

[0105] [実施例6]

CHO細胞の増殖及び抗体生産に及ぼす、L-システイン高濃度化Feed培地の影響

CELLiST™ Basal media (味の素株式会社: BASAL 10) を基に設計された培地に、終濃度 4 mM の L-Glutamine (Thermo Fisher SCIENTIFIC: 25030081) が添加され、基礎培地が調製された。

市販培地である CELLiST™ Feed media (味の素株式会社: FEED 2) を基に、Feed 培地 A が調製された。終濃度として 11 または 18 mM の L-システイン、及び 60 g/L のグルコースを含有する Feed 培地 A が、FEED 2 の製品説明書に記載の手順により、pH 6.7 ~ 6.9 となるように調製された。

110 mM の L-システイン溶液 (pH 11.3) が、調製された。

調製された基礎培地を用いて、 7×10^5 cells/mL に調整された CHO 細胞懸濁液が、ambri 15 細胞培養装置 (Sartorius 社) を用いて 14 日間培養された。全ての実験群は、 $n = 2$ で実施された。実験群は、11 または 18 mM の L-システインを含む Feed 培地 A が培養開始 2 日目から毎日 3.3% ずつ添加される条件区 (11 mM 区、18 mM 区) と、18 mM の L-システインを含む Feed 培地 A が培養開始 2 日目から毎日 3.3% ずつ加えられ、110 mM の L-システイン溶液が培養開始 2 日目から毎日 0.163% 添加される条件区 (23-24 mM 相当区) とを含む。これら条件区における 14 日目の抗体産生量は、Cedex Bio HT (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いて測定された。

[0106] 結果が図 5 に示される。培養過程で供給する L-システイン量が増加することにより、抗体生産量が向上することが示された。

[0107] [実施例 7]

L-システイン高濃度化培地の液体安定性に及ぼす、N-アセチルシステインの影響

市販培地である CELLiST™ Feed media (味の素株式会社: FEED 2) が用いられた。FEED 2 は、N-アセチルシステインを含まない。FEED 2 に、終濃度として 0、4、9 または 18 mM の L-シス

テイン及び終濃度として0、2、10又は20 mMのN-アセチルシステインがさらに添加された。調製した液体培地は、ステリカップーGPを用いてフィルトレーションされ、50 mLのファルコンチューブに10又は40 mL張り込まれ、4℃の遮光条件で29日間保管された。

保管後、結晶の析出を目視にて検出した結果が、表5に示される。

[0108] [表5]

培地	L-システイン 添加濃度 (mM)	N-アセチルシステイン 添加濃度 (mM)	液量 (mL)	析出が初めて 認められた日数
FEED2	0	0	10	析出無し
FEED2	0	2	10	析出無し
FEED2	0	10	10	析出無し
FEED2	0	20	10	析出無し
FEED2	4	0	10	14
FEED2	4	2	10	19
FEED2	4	10	10	析出無し
FEED2	4	20	10	析出無し
FEED2	9	0	10	6
FEED2	9	2	10	10
FEED2	9	10	10	29
FEED2	9	20	10	析出無し
FEED2	18	0	10	3
FEED2	18	2	10	3
FEED2	18	10	10	11
FEED2	18	20	10	21
FEED2	0	0	40	析出無し
FEED2	0	2	40	析出無し
FEED2	0	10	40	析出無し
FEED2	0	20	40	析出無し
FEED2	4	0	40	19
FEED2	4	2	40	19
FEED2	4	10	40	析出無し
FEED2	4	20	40	析出無し
FEED2	9	0	40	10
FEED2	9	2	40	10
FEED2	9	10	40	21
FEED2	9	20	40	析出無し
FEED2	18	0	40	3
FEED2	18	2	40	3
FEED2	18	10	40	11
FEED2	18	20	40	16

[0109] 表5に示されるように、L-システインを添加していないFEED2培地で

は、液量 10 mL 条件、液量 40 mL 条件のいずれにおいても 29 日後に、析出は検出されなかった。

F E E D 2 に 4 mM の L - シス테인を添加した培地では、液量 10 mL 条件では 14 日後、液量 40 mL 条件では 19 日後に析出が検出された。液量 10 mL 条件では 2 mM の N - アセチルシス테인添加により析出の検出日が 19 日後に遅延し、10 又は 20 mM の N - アセチルシス테인を添加した培地では、29 日後まで析出が確認されなかった。液量 40 mL 条件では、10 又は 20 mM の N - アセチルシス테인を添加した培地では、29 日後まで析出が確認されなかった。

また、F E E D 2 に 9 mM の L - シス테인を添加した培地では、液量 10 mL 条件では、6 日後、液量 40 mL 条件では 10 日後に析出が検出された。液量 10 mL 条件では 2 又は 10 mM の N - アセチルシス테인添加により析出の検出日が 10 日後、29 日後に遅延し、20 mM の N - アセチルシス테인を添加した培地では、29 日後まで析出が確認されなかった。液量 40 mL 条件では、10 mM の N - アセチルシス테인添加により析出の検出日が 21 日後に遅延し、20 mM の N - アセチルシス테인を添加した培地では、29 日後まで析出が確認されなかった。

また、F E E D 2 に 18 mM の L - シス테인を添加した培地では、液量 10 mL 条件、液量 40 mL 条件のいずれにおいても、3 日後に析出が検出された。液量 10 mL 条件では、10 又は 20 mM の N - アセチルシス테인添加により析出の検出日が 11 日後、21 日後に遅延した。液量 40 mL 条件では、10 又は 20 mM の N - アセチルシス테인添加により析出の検出日が 11 日後、16 日後に遅延した。

[0110] 以上の結果から、N - アセチルシス테인を添加することにより、N - アセチルシス테인を添加しない場合と比較して、高濃度の L - シス테인を含む液体培地における析出の生成が抑制され、液体培地の安定性が向上することが示された。

[0111] なお、本開示に引用された特許、特許出願及び出版物の開示内容は、その

全体が、参照により本開示に援用される。

産業上の利用可能性

- [0112] 本実施形態の培地は、組換えタンパク質を用いた製品の生産性を向上させることができるため、例えば組換えタンパク質を用いた抗体医薬の生産に好適に用いることができ、産業上の利用可能性を有している。

請求の範囲

- [請求項1] 10～40 mMのL-システイン及び1～40 mMのN-アセチルシステインを含む、フィード培地。
- [請求項2] L-システイン及びN-アセチルシステインを含み、N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、フィード培地。
- [請求項3] 15～30 mMのL-システインを含む、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項4] 2～10 mMのN-アセチルシステインを含む、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項5] N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が、0.04～1.0である、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項6] N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が、0.1～0.4である、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項7] pHが5.0～9.0である、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項8] pHが6.5～7.6である、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項9] 無血清培地及び／又は動物性タンパク質不含培地である、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項10] 合成培地である、請求項1に記載のフィード培地。
- [請求項11] 10～40 mMのL-システイン及び1～40 mMのN-アセチルシステインを含むフィード培地の調製のための、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む粉末培地。
- [請求項12] N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0であるフィード培地の調製のための、L-システイン及びN-アセチルシステインを含む粉末培地。
- [請求項13] フィード培地が15～30 mMのL-システインを含む、請求項1に記載の粉末培地。
- [請求項14] フィード培地が2～10 mMのN-アセチルシステインを含む、請

求項 1 1 に記載の粉末培地。

- [請求項15] フィード培地中の N-アセチルシステインの L-システインに対するモル濃度の比率が 0.04～1.0 である、請求項 1 1 に記載の粉末培地。
- [請求項16] フィード培地中の N-アセチルシステインの L-システインに対するモル濃度の比率が 0.1～0.4 である、請求項 1 1 に記載の粉末培地。
- [請求項17] フィード培地の pH が 5.0～9.0 である、請求項 1 1 に記載の粉末培地。
- [請求項18] フィード培地の pH が 6.5～7.6 である、請求項 1 1 に記載の粉末培地。
- [請求項19] フィード培地が無血清培地及び／又は動物性タンパク質不含培地である、請求項 1 1 に記載の粉末培地。
- [請求項20] フィード培地が合成培地である、請求項 1 1 に記載の粉末培地。
- [請求項21] 細胞を培養する培地に請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載のフィード培地を添加することを含む、細胞を培養するための方法。
- [請求項22] 細胞が動物細胞、植物細胞、細菌細胞、又は真菌細胞である、請求項 2 1 に記載の方法。
- [請求項23] 細胞が動物細胞である、請求項 2 1 に記載の方法。
- [請求項24] 細胞が哺乳動物細胞である、請求項 2 1 に記載の方法。
- [請求項25] 細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である、請求項 2 1 に記載の方法。
- [請求項26] 細胞が組換えタンパク質を発現する、請求項 2 1 に記載の方法。
- [請求項27] 組換えタンパク質が抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 2 6 に記載の方法。
- [請求項28] 抗体又はその抗原結合断片が IgG 由来である、請求項 2 7 に記載の方法。
- [請求項29] 熱負荷による培地成分の析出がない、請求項 2 1 に記載の方法。

- [請求項30] 組換えタンパク質産生能を有する細胞を培養する培地に請求項1から10のいずれか1項に記載のフィード培地を添加することを含む、組換えタンパク質を製造するための方法。
- [請求項31] 細胞が動物細胞、植物細胞、細菌細胞、又は真菌細胞である、請求項30に記載の方法。
- [請求項32] 細胞が動物細胞である、請求項30に記載の方法。
- [請求項33] 細胞が哺乳動物細胞である、請求項30に記載の方法。
- [請求項34] 細胞がチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である、請求項30に記載の方法。
- [請求項35] 組換えタンパク質が抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項30に記載の方法。
- [請求項36] 抗体又はその抗原結合断片がIgG由来である、請求項35に記載の方法。
- [請求項37] 熱負荷による培地成分の析出がない、請求項30に記載の方法。
- [請求項38] 液体培地の安定性を向上させるための方法であって、L-システインの濃度が10～40mM、N-アセチルシステインの濃度が1～40mMになるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。
- [請求項39] 液体培地の安定性を向上させるための方法であって、N-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0になるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。
- [請求項40] 液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための方法であって、L-システインの濃度が10～40mM、N-アセチルシステインの濃度が1～40mMになるように、L-システイン及び／又はN-アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。
- [請求項41] 液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための

方法であって、N－アセチルシステインのL－システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0になるように、L－システイン及び／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、方法。

[請求項42] L－システイン及びN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項43] 液体培地が10～40 mMのL－システインを含み、前記方法がN－アセチルシステインの濃度が1～40 mMになるようにN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項44] 液体培地が1～40 mMのN－アセチルシステインを含み、前記方法がL－システインの濃度が10～40 mMになるようにL－システインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項45] L－システインの濃度が15～30 mMになるように、L－システイン及び／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項46] N－アセチルシステインの濃度が2～10 mMになるようにL－システイン及び／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項47] N－アセチルシステインのL－システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0になるようにL－システイン及び／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38又は40に記載の方法。

[請求項48] N－アセチルシステインのL－システインに対するモル濃度の比率が0.1～0.4になるようにL－システイン及び／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項49] 液体培地のpHが5.0～9.0になるようにL－システイン及び

／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項50] 液体培地のpHが6.5～7.6になるようにL－システイン及び／又はN－アセチルシステインを培地に添加することを含む、請求項38から41のいずれか1項に記載の方法。

[請求項51] 液体培地の安定性を向上させるための、L－システイン及びN－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が10～40mMのL－システイン及び1～40mMのN－アセチルシステインを含む、剤。

[請求項52] 液体培地の安定性を向上させるための、L－システイン及びN－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるN－アセチルシステインのL－システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、剤。

[請求項53] 10～40mMのL－システインを含む液体培地の安定性を向上させるための、N－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が1～40mMのN－アセチルシステインを含む、剤。

[請求項54] L－システインを含む液体培地の安定性を向上させるための、N－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるN－アセチルシステインのL－システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、剤。

[請求項55] 液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、L－システイン及びN－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が10～40mMのL－システイン及び1～40mMのN－アセチルシステインを含む、剤。

[請求項56] 液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、L－システイン及びN－アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるN－アセチルシステインのL－シス

テインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、剤。

[請求項57] 10～40 mMのL-システインを含む液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、N-アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地が1～40 mMのN-アセチルシステインを含む、剤。

[請求項58] L-システインを含む液体培地におけるシスチンの生成及び／又は析出を抑制するための、N-アセチルシステインを含む剤であって、前記剤を添加後の液体培地におけるN-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、剤。

[請求項59] 前記剤を添加後の液体培地が15～30 mMのL-システインを含む、請求項51から58のいずれか1項に記載の剤。

[請求項60] 前記剤を添加後の液体培地が2～10 mMのN-アセチルシステインを含む、請求項51から58のいずれか1項に記載の剤。

[請求項61] 前記剤を添加後の液体培地におけるN-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.04～1.0である、請求項51、53、55及び57のいずれか1項に記載の剤。

[請求項62] 前記剤を添加後の液体培地におけるN-アセチルシステインのL-システインに対するモル濃度の比率が0.1～0.4である、請求項51から58のいずれか1項に記載の剤。

[請求項63] 前記剤を添加後の液体培地のpHが5.0～9.0である、請求項51から58のいずれか1項に記載の剤。

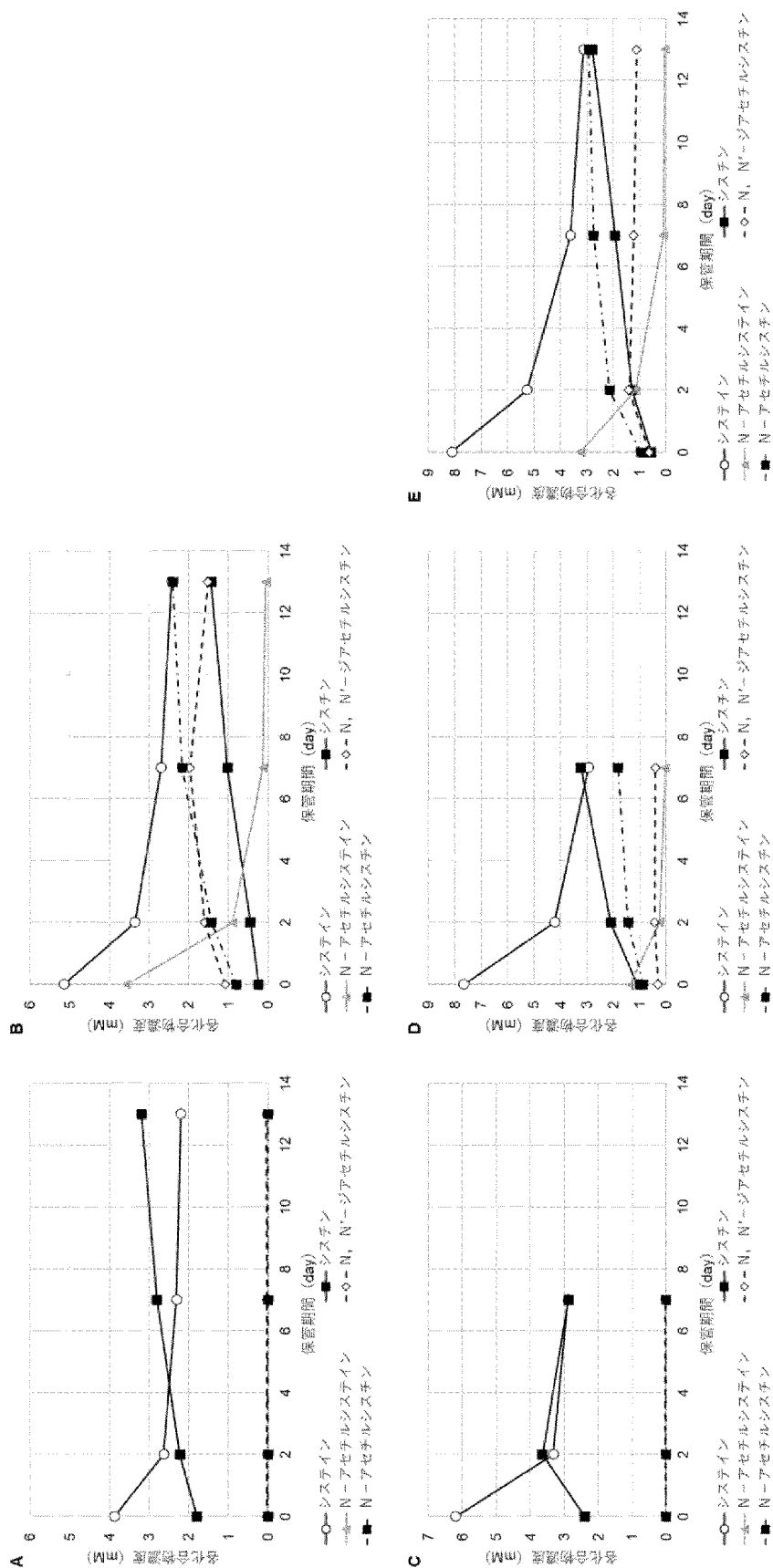
[請求項64] 前記剤を添加後の液体培地のpHが6.5～7.6である、請求項51から58のいずれか1項に記載の剤。

[請求項65] 請求項1から10のいずれか1項に記載のフィード培地又は請求項11から20のいずれか1項に記載の粉末培地を調製するための、N-アセチルシステイン及びL-システインを含む培地添加物。

[請求項66] 請求項1から10のいずれか1項に記載のフィード培地又は請求項11から20のいずれか1項に記載の粉末培地を調製するための、N

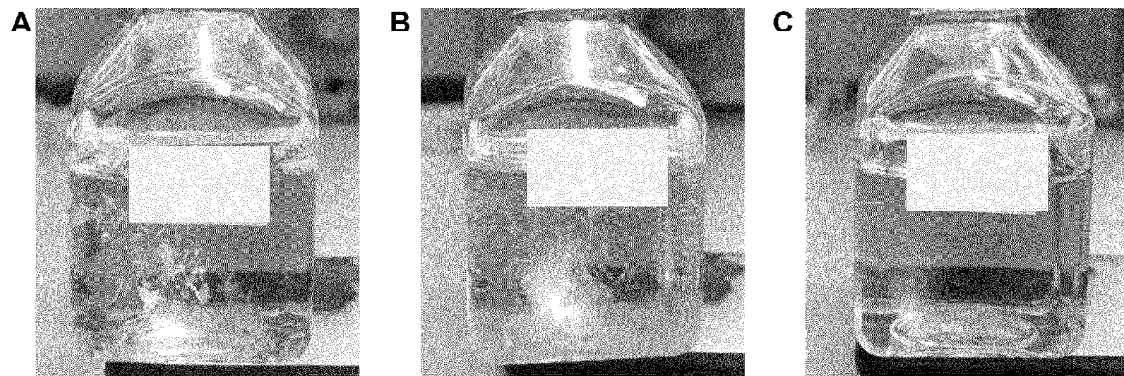
ーアセチルシステインを含む培地添加物。

[図1]



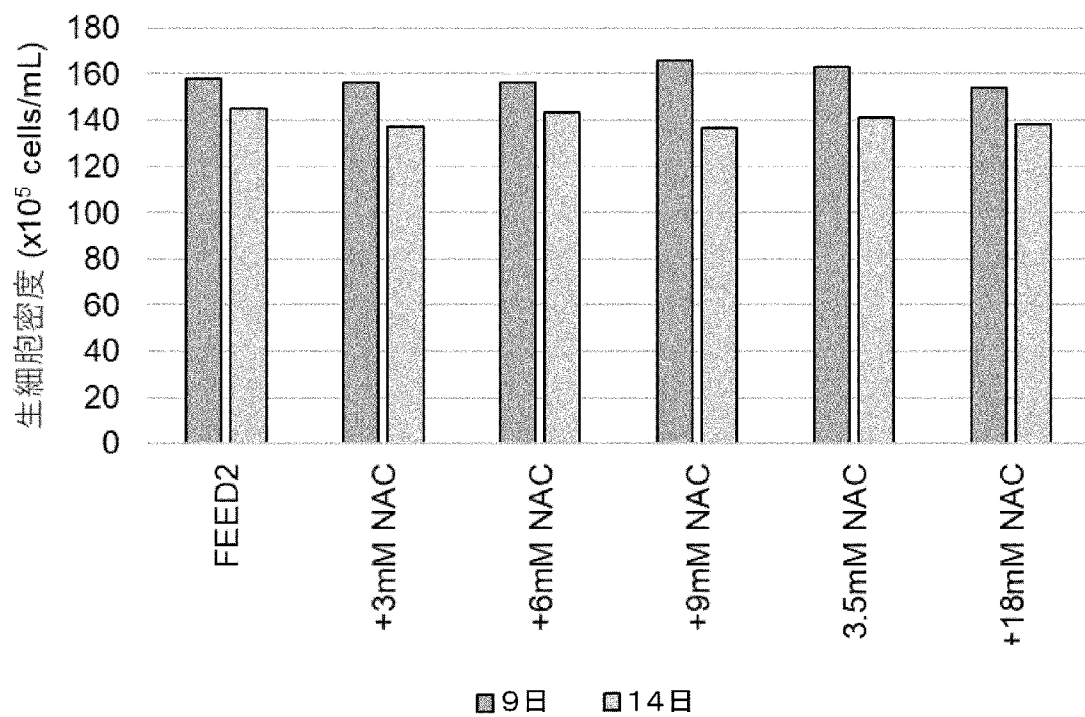
(A) L-システインを18mM含む、N-アセチルシステインを含まない、Feed 培地A
(B) L-システインを18mM含む、N-アセチルシステインを5.5mM含む、Feed 培地A
(C) L-システインを24mM含む、N-アセチルシステインを含まない、Feed 培地A
(D) L-システインを24mM含む、N-アセチルシステインを2.8mM含む、Feed 培地A
(E) L-システインを24mM含む、N-アセチルシステインを5.5mM含む、Feed 培地A

[図2]

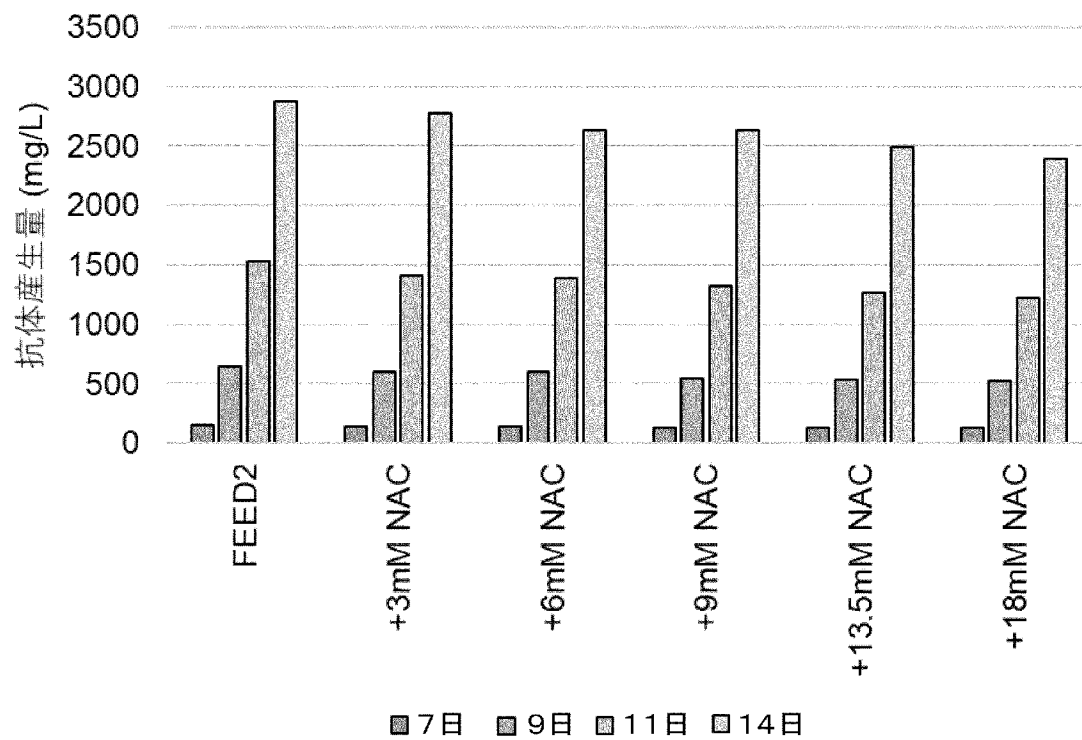


- (A) L-システインを18 mM含み、N-アセチルシステインを含まない、Feed培地A
(B) L-システインを24 mM含み、N-アセチルシステインを含まない、Feed培地A
(C) L-システインを24 mM含み、N-アセチルシステインを5.5 mM含む、Feed培地A

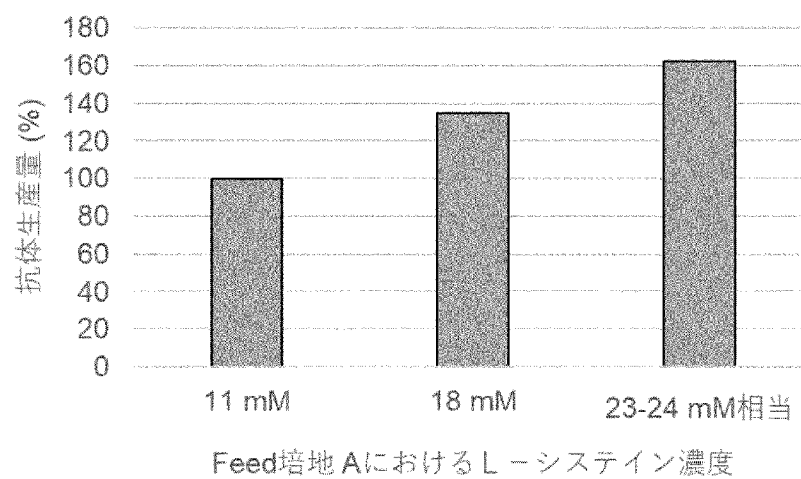
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/026987

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/00(2006.01)i; **C12N 1/15**(2006.01)i; **C12N 1/19**(2006.01)i; **C12N 1/21**(2006.01)i; **C12N 5/071**(2010.01)i;
C12N 5/10(2006.01)i; **C12P 21/02**(2006.01)i; **C12P 21/08**(2006.01)i

FI: C12N1/00 F; C12N1/00 A; C12N5/071; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/02 C; C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/071; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2021-503938 A (UCB BIOPHARMA SPRL) 15 February 2021 (2021-02-15) claims, paragraph [0004], examples, fig. 1-23	1-37, 66
Y		1-66
Y	JP 6-200475 A (TSUYATSUKU KK) 19 July 1994 (1994-07-19) paragraphs [0006], [0010]	1-66
X	CHEVALLIER, V. et al. Use of novel cysteine analogs to decrease oxidative stress and control product quality. Journal of Biotechnology. 2021, vol. 327, pp. 1-8 entirety in particular, abstract, p. 3, fig. 2, p. 4, fig. 3	1-37, 66
Y		38-65
Y	US 2009/0123975 A1 (AMGEN INC.) 14 May 2009 (2009-05-14) entirety in particular, claims, paragraphs [0028], [0045]	1-66
A	WO 2021/165302 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 26 August 2021 (2021-08-26) entirety in particular, claims, examples	1-66

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2023

Date of mailing of the international search report

26 September 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/026987

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2021-503938	A	15 February 2021	US 2020/0308536 A1 claims, paragraph [0004], examples, fig. 1-23 WO 2019/106091 A1 EP 3492582 A1 CN 111417715 A KR 10-2020-0092348 A	
JP	6-200475	A	19 July 1994	(Family: none)	
US	2009/0123975	A1	14 May 2009	WO 2008/141207 A1 EP 2152856 A1	
WO	2021/165302	A1	26 August 2021	JP 2008/141207 A US 2023/0106023 A1 EP 4107249 A1 CN 115103902 A KR 10-2022-0143108 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/00(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i FI: C12N1/00 F; C12N1/00 A; C12N5/071; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P21/02 C; C12P21/08										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N1/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/071; C12N5/10; C12P21/02; C12P21/08										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	JP 2021-503938 A (ユーシービー バイオファルマ エスアールエル) 15.02.2021 (2021 - 02 - 15) 特許請求の範囲、[0004] 段落、実施例、図1 - 23	1-37, 66								
Y		1-66								
Y	JP 6-200475 A (ツヤック株式会社) 19.07.1994 (1994 - 07 - 19) [0006]、[0010] 段落	1-66								
X	CHEVALLIER, V. et al., Use of novel cysteine analogs to decrease oxidative stress and control product quality, Journal of Biotechnology, 2021, Vol.327, pp.1-8 全体。特に、要約、第3頁Fig. 2、第4頁Fig. 3	1-37, 66								
Y		38-65								
Y	US 2009/0123975 A1 (AMGEN INC.) 14.05.2009 (2009 - 05 - 14) 全体。特に、特許請求の範囲、[0028]、[0045] 段落	1-66								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 15.09.2023		国際調査報告の発送日 26.09.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 上村 直子 4N 4508 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2021/165302 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 26.08.2021 (2021 - 08 - 26) 全体。特に、特許請求の範囲、実施例	1-66

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/026987

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2021-503938	A	15.02.2021	US 2020/0308536 A1 特許請求の範囲、[0004]段落、実施例、図1-23	
				WO 2019/106091 A1	
				EP 3492582 A1	
				CN 111417715 A	
				KR 10-2020-0092348 A	
JP	6-200475	A	19.07.1994	(ファミリーなし)	
US	2009/0123975	A1	14.05.2009	WO 2008/141207 A1	
				EP 2152856 A1	
WO	2021/165302	A1	26.08.2021	JP 2023-513830 A	
				US 2023/0106023 A1	
				EP 4107249 A1	
				CN 115103902 A	
				KR 10-2022-0143108 A	