

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5711751号
(P5711751)

(45) 発行日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(24) 登録日 平成27年3月13日(2015.3.13)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 P 21/02	(2006.01)	C 12 P 21/02	Z
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 2
C 07 K 16/00	(2006.01)	C 07 K 16/00	
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	A

請求項の数 15 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2012-535769 (P2012-535769)
(86) (22) 出願日	平成22年10月25日 (2010.10.25)
(65) 公表番号	特表2013-507979 (P2013-507979A)
(43) 公表日	平成25年3月7日 (2013.3.7)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/066073
(87) 国際公開番号	W02011/051231
(87) 国際公開日	平成23年5月5日 (2011.5.5)
審査請求日	平成24年6月15日 (2012.6.15)
(31) 優先権主張番号	09013455.2
(32) 優先日	平成21年10月26日 (2009.10.26)
(33) 優先権主張国	欧洲特許庁 (EP)

(73) 特許権者	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(73) 特許権者	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】グリコシル化された免疫グロブリンの調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫グロブリン調製物中におけるマンノース - 5 糖構造体を含む免疫グロブリンの量を減少させるための、

a) 免疫グロブリンをコードする核酸を含む真核細胞を、培地中の単一細胞の現時点のグルコース比消費速度 - 対 - その種類の細胞の既知の最大グルコース比消費速度の比が一定に維持された培地中で培養し、そして

b) 培養物から免疫グロブリンを回収することを含む方法の使用。

【請求項 2】

比が 0 . 8 から 0 . 2 までであることを特徴とする、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

比が 0 . 6 から 0 . 4 までであることを特徴とする、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

免疫グロブリン調製物中におけるマンノース - 5 糖構造体を含む免疫グロブリンの量を減少させるための、

a) 免疫グロブリンをコードする核酸を含む真核細胞を、培地中の単位時間当たり利用できるグルコースの量が一定に維持され、かつ単位時間当たりその培地中でその細胞が最大限に利用できる量の 80 % 未満の一定値に制限された培地中で培養し、そして

b) 培養物から免疫グロブリンを回収する

10

20

ことを含む方法の使用。

【請求項 5】

一定値が 80 % 未満であって 20 % を超えることを特徴とする、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

培養がフェドバッチ培養であることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 7】

培養がフェドバッチ培養であり、その際、流加を培養 2 日目または 3 日目に開始することを特徴とする、請求項 6 に記載の使用。

10

【請求項 8】

培養を pH 6.5 から 7.5 までの pH 値で行なうことを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 9】

培養を pH 6.9 から 7.3 までの pH 値で行なうことを特徴とする、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

培養を pH 6.95 から pH 7.05 までの pH 値、または pH 7.15 から pH 7.25 までの pH 値で行なうことを特徴とする、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

免疫グロブリンがクラス G またはクラス E の免疫グロブリンであることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の使用。

20

【請求項 12】

真核宿主細胞が CHO 細胞、 NS0 細胞、 HEK 細胞、 BHK 細胞、ハイブリドーマ細胞、 PER.C6 (登録商標) 細胞、昆虫細胞、および Sp2/0 細胞を含む群から選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の使用。

【請求項 13】

真核細胞がチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞であることを特徴とする、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

宿主細胞の培養を 6 ~ 20 日間実施することを特徴とする、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の使用。

30

【請求項 15】

免疫グロブリンが抗 IL-6R 抗体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書には、細胞における免疫グロブリン調製の分野の方法であって、調製される免疫グロブリンのグリコシル化パターンを培養条件に基づいて改変できる方法を記述する。

40

【背景技術】

【0002】

近年、免疫グロブリンの生産は常に増加しており、近い将来に免疫グロブリンは各種疾患の処置に利用できる最大グループの療法薬となるであろうと思われる。免疫グロブリンの影響はそれらの特異性から生じる；それには、それらの特異的な標的認識および結合の機能、ならびに抗原 / Fc 受容体の結合と同時または結合後の特異的作用の活性化が含まれる。

【0003】

特異的な標的認識および結合は、免疫グロブリンの可変部により仲介される。作用が生じる他の免疫グロブリン分子部分は、翻訳後修飾、たとえばグリコシル化パターンである

50

。翻訳後修飾は実際に、免疫グロブリンの有効性、安定性、免疫原性潜在性、結合などに對して影響をもつ。それに関連して、補体依存性細胞傷害性 (complement-dependent cytotoxicity) (CDC)、抗体依存性細胞性細胞傷害性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity) (ADC)、およびアポトーシス誘導に對処しなければならない。

【0004】

免疫グロブリンのグリコシル化パターン、すなわち結合した糖構造体の糖の組成および数が生物学的特性に強い影響をもつことが報告された(たとえば、Jefferis, R., Biotechnol. Prog. 21 (2005) 11-16を参照)。哺乳動物細胞により產生される免疫グロブリンは2～3質量%の炭水化物を含有する(Taniguchi, T., et al., Biochem. 24 (1985) 5551-5557)。これは、たとえばクラスGの免疫グロブリン(IgG)において、マウス由来のIgGにおける2・3個のオリゴ糖残基(Mizuochi, T., et al., Arch. Biochem. Biophys. 257 (1987) 387-394)、およびヒト由来のIgGにおける2・8個のオリゴ糖残基と同等であり(Parekh, R.B., et al., Nature 316 (1985) 452-457)、これらのうち一般に2個はFc領域、残りは可変部に位置する(Saba, J.A., et al., Anal. Biochem. 305 (2002) 16-31)。

【0005】

クラスGの免疫グロブリンのFc領域において、オリゴ糖残基はアミノ酸残基297、すなわちアスパラギン残基(Asn²⁹⁷と表記される)にN-グリコシル化により導入される可能性がある。Youingsらは、ポリクローナルIgG分子の15%～20%でFc領域にさらに他のN-グリコシル化部位が存在することを示した(Youings, A., et al., Biochem. J., 314 (1996) 621-630; たとえば、Endo, T., et al., Mol. Immunol. 32 (1995) 931-940も参照)。不均一な、すなわち非対称的なオリゴ糖プロセシングのため、異なるグリコシル化パターンをもつ多数のイソ形免疫グロブリンが存在する(Patel, T.P., et al., Biochem. J. 285 (1992) 839-845; Ip, C.C., et al., Arch. Biochem. Biophys. 308 (1994) 387-399; Lund, J., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 741-748)。同時に、オリゴ糖の構造および分布は高度に再現性があり(すなわち、非ランダム)、かつ部位特異的である(Dwek, R.A., et al., J. Anat. 187 (1995) 279-292)。

【0006】

免疫グロブリンの幾つかの特性はFc領域のグリコシル化に直接関連する(たとえば、Dwek, R.A., et al., J. Anat. 187 (1995) 279-292; Lund, J., et al., J. Immunol. 157 (1996) 4963-4969; Lund, J., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Wright, A. and Morrison, S.L., J. Immunol. 160 (1998) 3393-3402を参照); たとえば、熱安定性および溶解性(West, C.M., Mol. Cell. Biochem. 72 (1986) 3-20)、抗原性(Turco, S.J., Arch. Biochem. Biophys. 205 (1980) 330-339)、免疫原性(Bradshaw, J.P., et al., Biochim. Biophys. Acta 847 (1985) 344-351; Feizi, T. and Childs, R.A., Biochem. J. 245 (1987) 1-11; Schauer, R., Adv. Exp. Med. Biol. 228 (1988) 47-72)、クリアランス速度/循環半減期(Ashwell, G. and Harford, J., Ann. Rev. Biochem. 51 (1982) 531-554; McFarlane, I.G., Clin. Sci. 64 (1983) 127-135; Baenziger, J.U., Am. J. Path. 121 (1985) 382-391; Chan, V.T. and Wolf, G., Biochem. J. 247 (1987) 53-62; Wright, A., et al., Glycobiology 10 (2000) 1347-1355; Rifai, A., et al., J. Exp. Med. 191 (2000) 2171-2182; Zukier, L.S., et al., Cancer Res. 58 (1998) 3905-3908)、ならびに特異的生物活性(Jefferis, R. and Lund, J., Antibody Engineering, ed. by Capra, J. D., Chem. Immunol. Basel, Karger, 65 (1997) 111-128)。

【0007】

グリコシル化パターンに影響を及ぼす要因が調べられた: たとえば、発酵培地中のウシ胎仔血清の存在(Gawlitzek, M., et al., J. Biotechnol. 42(2) (1995) 117-131)、緩衝作用条件(Muething, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 83 (2003) 321-334)、溶存酸素濃度(Saba, J.A., et al., Anal. Biochem. 305 (2002) 16-31; Kunkel, J.P., et al., J. Biotechnol. 62 (1998) 55-71; Lin, A.A., et al., Biotechnol. Bioeng. 42 (1993) 339-350)、オリゴ糖の位置およびコンホーメーション、ならびに宿主細胞タイプおよび細

胞増殖状態(Hahn, T.J. and Goochee, C.F., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 23982-23987; Jenkins, N., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 975-981)、細胞のヌクレオチド-糖代謝(Hills, A.E., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 239-251)、栄養素制限(Gawlitzeck, M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 46 (1995) 536-544; Hayter, P.M., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 327-335)、特にグルコース制限(Tachibana, H., et al., *Cytotechnology* 16 (1994) 151-157)、ならびに細胞外 pH(Borys, M.C., et al., *Bio/Technology* 11 (1993) 720-724)。

【0008】

たとえばNS0骨髄腫細胞における免疫グロブリンの組換え発現により、オリゴマンノース構造体およびトランケート型オリゴ糖構造体の増加が観察された(Ip, C.C., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1994) 387-399; Robinson, D.K., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994) 727-735)。グルコース飢餓条件下で、グリコシル化の変動、たとえばより小さな前駆オリゴ糖の結合またはオリゴ糖部分の完全な不存在が、CHO細胞、ネズミ3T3細胞、ラット肝癌細胞、ラット腎細胞およびネズミ骨髄腫細胞において観察された(Rearick, J.I., et al., *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 6255-6261; Davidson, S.K. and Hunt, L.A., *J. Gen. Virol.* 66 (1985) 1457-1468; Gershman, H. and Robbins, P.W., *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 7774-7780; Baumann, H. and Jahreis, G.P., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 3942-3949; Strube, K.-H., et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3762-3771; Stark, N.J. and Heath, E.C., *Arch. Biochem. Biophys.* 192 (1979) 599-609)。低グルタミン/グルコース濃度に基づく方法がWong, D.C.F., et al., *Biotechnol. Bioeng.* 89 (2005) 164-177により報告された。

【0009】

日本国特許出願JP 62-258252には哺乳動物細胞の灌流培養が記述され、一方、US 5,443,968にはタンパク質分泌細胞のフェドバッチ(fed-batch)培養法(流加培養法)が報告されている。WO 98/41611には、低い乳酸産生を特徴とする代謝状態に細胞を適応させるのに有効な細胞培養法が報告されている。物質を産生させるために細胞を培養する方法がWO 2004/048556に報告されている。Elbein, A.D., *Ann. Rev. Biochem.* 56 (1987) 497-534には、グルコースの不存在下でインキュベートした哺乳動物細胞はマンノース-9含有構造体の代わりにマンノース-5含有構造体をタンパク質へ伝達することが報告されている。pCO₂の依存性は、グルコース制限に際してCHO細胞の増殖、代謝およびIgG産生に影響を及ぼすことがTakuma, S., et al. in *Biotechnol. Bioeng.* 97 (2007) 1479-1488により報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】JP 62-258252

【特許文献2】US 5,443,968

【特許文献3】WO 98/41611

【特許文献4】WO 2004/048556

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Jefferis, R., *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 11-16【非特許文献2】Taniguchi, T., et al., *Biochem.* 24 (1985) 5551-5557【非特許文献3】Mizuuchi, T., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 257 (1987) 387-394【非特許文献4】Parekh, R.B., et al., *Nature* 316 (1985) 452-457【非特許文献5】Saba, J.A., et al., *Anal. Biochem.* 305 (2002) 16-31【非特許文献6】Youings, A., et al., *Biochem. J.*, 314 (1996) 621-630【非特許文献7】Endo, T., et al., *Mol. Immunol.* 32 (1995) 931-940【非特許文献8】Patel, T.P., et al., *Biochem. J.* 285 (1992) 839-845【非特許文献9】Ip, C.C., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1994) 387-399

10

20

30

40

50

【非特許文献 10】Lund, J., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 741-748

【非特許文献 11】Dwek, R.A., et al., J. Anat. 187 (1995) 279-292

【非特許文献 12】Lund, J., et al., J. Immunol. 157 (1996) 4963-4969

【非特許文献 13】Lund, J., FASEB J. 9 (1995) 115-119

【非特許文献 14】Wright, A. and Morrison, S.L., J. Immunol. 160 (1998) 3393-3402

【非特許文献 15】West, C.M., Mol. Cell. Biochem. 72 (1986) 3-20

【非特許文献 16】Turco, S.J., Arch. Biochem. Biophys. 205 (1980) 330-339

【非特許文献 17】Bradshaw, J.P., et al., Biochim. Biophys. Acta 847 (1985) 344-351

【非特許文献 18】Feizi, T. and Childs, R.A., Biochem. J. 245 (1987) 1-11

【非特許文献 19】Schauer, R., Adv. Exp. Med. Biol. 228 (1988) 47-72

【非特許文献 20】Ashwell, G. and Harford, J., Ann. Rev. Biochem. 51 (1982) 531-554

【非特許文献 21】McFarlane, I.G., Clin. Sci. 64 (1983) 127-135

【非特許文献 22】Baenziger, J.U., Am. J. Path. 121 (1985) 382-391

【非特許文献 23】Chan, V.T. and Wolf, G., Biochem. J. 247 (1987) 53-62

【非特許文献 24】Wright, A., et al., Glycobiology 10 (2000) 1347-1355

【非特許文献 25】Rifai, A., et al., J. Exp. Med. 191 (2000) 2171-2182

【非特許文献 26】Zukier, L.S., et al., Cancer Res. 58 (1998) 3905-3908

【非特許文献 27】Jefferis, R. and Lund, J., Antibody Engineering, ed. by Capra, J.D., Chem. Immunol. Basel, Karger, 65 (1997) 111-128

【非特許文献 28】Gawlitzek, M., et al., J. Biotechnol. 42(2) (1995) 117-131

【非特許文献 29】Muething, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 83 (2003) 321-334

【非特許文献 30】Kunkel, J.P., et al., J. Biotechnol. 62 (1998) 55-71

【非特許文献 31】Lin, A.A., et al., Biotechnol. Bioeng. 42 (1993) 339-350

【非特許文献 32】Hahn, T.J. and Goochee, C.F., J. Biol. Chem. 267 (1992) 23982-23987

【非特許文献 33】Jenkins, N., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 975-981

【非特許文献 34】Hills, A.E., et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 239-251

【非特許文献 35】Gawlitzek, M., et al., Biotechnol. Bioeng. 46 (1995) 536-544

【非特許文献 36】Hayter, P.M., et al., Biotechnol. Bioeng. 39 (1992) 327-335

【非特許文献 37】Tachibana, H., et al., Cytotechnology 16 (1994) 151-157

【非特許文献 38】Borys, M.C., et al., Bio/Technology 11 (1993) 720-724

【非特許文献 39】Robinson, D.K., et al., Biotechnol. Bioeng. 44 (1994) 727-735

【非特許文献 40】Rearick, J.I., et al., J. Biol. Chem. 256 (1981) 6255-6261

【非特許文献 41】Davidson, S.K. and Hunt, L.A., J. Gen. Virol. 66 (1985) 1457-1468

【非特許文献 42】Gershman, H. and Robbins, P.W., J. Biol. Chem. 256 (1981) 7774-7780

【非特許文献 43】Baumann, H. and Jahreis, G.P., J. Biol. Chem. 258 (1983) 3942-3949

【非特許文献 44】Strube, K.-H., et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 3762-3771

【非特許文献 45】Stark, N.J. and Heath, E.C., Arch. Biochem. Biophys. 192 (1979) 599-609

【非特許文献 46】Wong, D.C.F., et al., Biotechnol. Bioeng. 89 (2005) 164-177

【非特許文献 47】Elbein, A.D., Ann. Rev. Biochem. 56 (1987) 497-534

【非特許文献 48】Takuma, S., et al. in Biotechnol. Bioeng. 97 (2007) 1479-1488

【発明の概要】

【0012】

真核細胞が産生するポリペプチドのグリコシル化パターンにおけるマンノース - 5 糖構造体の量を、培養プロセスで細胞に流加するグルコースの量に基づいて改変できることが見出された。利用できるグルコースの量を減らすことによって、たとえば D G L 値を 1 . 0 からより小さな、たとえば 0 . 8 、 0 . 6 、 0 . 5 、 0 . 4 または 0 . 2 の値に変化させることによって、グリコシル化パターンにおけるマンノース - 5 糖構造体の量の改変を達成できる。D G L 値またはそれ単位時間当たり利用できるグルコースの量を、一定にかつ単位時間当たり規定した低い値に維持しなければならない。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記述する第一観点は、真核細胞においてポリペプチド（一態様においては免疫グロブリン）を調製するための下記の工程を含む方法である：

10

- a) ポリペプチドをコードする核酸を含む真核細胞を用意し、
- b) グルコース制限度 (degree of glucose limitation) (D G L) が一定に維持され、かつ D G L が 0 . 8 未満である条件下で、その細胞を培養し、そして
- c) 培養物からポリペプチドを回収する；

その際、マンノース - 5 糖構造体を含むポリペプチドの画分は、マンノース - 5 糖構造体を含むポリペプチドの量、ポリペプチド G (0) イソ型の量、ポリペプチド G (1) イソ型の量、およびポリペプチド G (2) イソ型の量を含めた合計の 1 0 % 以下である。

【 0 0 1 4 】

一態様において、D G L を 0 . 8 から 0 . 2 までの範囲で一定に維持する。さらに他の態様において、D G L を 0 . 6 から 0 . 4 までの範囲で一定に維持する。他の態様において、マンノース - 5 糖構造体を含むポリペプチドの画分は、マンノース - 5 糖構造体を含むポリペプチド、ポリペプチド G (0) イソ型、ポリペプチド G (1) イソ型、およびポリペプチド G (2) イソ型を含めた合計の 8 % 以下である。さらに他の態様においてポリペプチドは免疫グロブリンであり、一態様においてクラス G または E の免疫グロブリンである。

20

【 0 0 1 5 】

本明細書に記述する他の観点は、免疫グロブリンを調製するための下記の工程を含む方法である：

- a) 免疫グロブリンをコードする核酸を含む哺乳動物細胞を用意し、
- b) 培地中の単位時間当たり利用できるグルコースの量が一定に維持され、かつ単位時間当たりその培地中でその細胞が最大限に利用できる量の 8 0 % 未満に制限された培地中で、前記の真核細胞を培養し、そして
- c) 細胞または培地から免疫グロブリンを回収する。

30

【 0 0 1 6 】

一態様において、培地中の単位時間当たり利用できるグルコースの量は一定に維持され、かつ 8 0 % から 2 0 % までの範囲の値に制限される。さらに他の態様において、この範囲は 6 0 % から 4 0 % までである。他の態様において、培地中の細胞はその培地中で生存可能な細胞である。

【 0 0 1 7 】

本明細書に記述する観点の一態様において、真核細胞は C H O 細胞、 N S 0 細胞、 H E K 細胞、 B H K 細胞、ハイブリドーマ細胞、 P E R . C 6 (登録商標) 細胞、昆虫細胞、または S p 2 / 0 細胞から選択される。一態様において、真核細胞はチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞である。本明細書に記述する観点の他の態様において、培養は約 pH 7 . 0 から約 pH 7 . 2 までの範囲の pH 値で行なわれる。

40

【 0 0 1 8 】

本明細書に記述する観点のさらに他の態様において、培養は連続培養またはフェドバッヂ培養である。本方法は、他の態様において、ポリペプチドを精製する最終工程を含むことができる。さらに他の態様において、細胞を 6 ~ 2 0 日間、または 6 ~ 1 5 日間、培養する。さらに他の態様において、細胞を 6 ~ 8 日間培養する。

【 0 0 1 9 】

50

本明細書に記述する他の観点は免疫グロブリンを含む組成物であり、その際、組成物は本明細書に記述する方法で調製されたものである。

一態様において、免疫グロブリンは抗IL-6R抗体である。さらに他の態様において、抗IL-6R抗体はトリリズマブ(Tocilizumab)を含む。他の態様において、抗IL-6R抗体に結合したマンノース-5糖構造体は8%以下である。さらに他の態様において、マンノース-5糖構造体は6%以下である。他の態様において、マンノース-5糖構造体は4%以下である。さらに他の態様において、抗IL-6R抗体に結合したG(0)糖構造体は40%から46%までの範囲であり、抗IL-6R抗体に結合したG(2)糖構造体は9%から11%までの範囲である。

【図面の簡単な説明】

10

【0020】

【図1】図1は、DGL制御を用いたフェドバッチ方式における生細胞密度(a)および細胞生存率プロフィール(b)である；中空丸：初発細胞密度 8×10^5 細胞/m1；中実三角：初発細胞密度 10×10^5 細胞/m1；中空四角：初発細胞密度 12×10^5 細胞/m1。

【図2】図2は、免疫グロブリン産生におけるフェドバッチ方式でのDGLの経時的变化である；丸：初発細胞密度 8×10^5 細胞/m1；三角：初発細胞密度 10×10^5 細胞/m1；四角：初発細胞密度 12×10^5 細胞/m1。

【図3】図3は、免疫グロブリン産生におけるフェドバッチ方式によるDGLに基づく流加培地の流加プロフィールである；丸：初発細胞密度 8×10^5 細胞/m1；三角：初発細胞密度 10×10^5 細胞/m1；四角：初発細胞密度 12×10^5 細胞/m1

20

【図4】図4は、DGL制御でのフェドバッチ方式による免疫グロブリン産生プロフィールである；中空丸：初発細胞密度 8×10^5 細胞/m1；中実三角：初発細胞密度 10×10^5 細胞/m1；中空四角：初発細胞密度 12×10^5 細胞/m1；中実小丸：一定流加法：FR = 0.02 g グルコース/時間(対照)。

【図5】図5は、細胞のフェドバッチ培養に際してのDGLの時間経過である：菱形：单一流加培地流加で毎日流加，四角：二種流加培地流加で毎日流加；三角：单一流加培地流加でプロフィール流加；X：二種流加培地流加でプロフィール流加。

【発明を実施するための形態】

【0021】

30

本明細書には下記の工程を含む、免疫グロブリンの調製方法を記述する：

a) 免疫グロブリンをコードする核酸を含む哺乳動物細胞を、0.8未満の一定のDGL(すなわち、単位時間当たり利用できるグルコースの量が一定であり、かつ単位時間当たりその細胞が最大限に利用できるグルコースの量の80%以下である)の培地中で培養し、そして

b) 細胞または培地から免疫グロブリンを回収する。

【0022】

本明細書に記述する方法で免疫グロブリンを得ることができ、その際、マンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンの量は調整したDGL値に依存し、その量はマンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンの量、および免疫グロブリンG(0)イソ型の量、および免疫グロブリンG(1)イソ型の量、および免疫グロブリンG(2)イソ型の量の合計のうちの画分である。一態様において、DGLは0.8から0.2までである。この態様において、画分は10%以下である。他の態様において、DGLは0.6から0.4までである。この態様において、画分は6%以下である。本明細書に記述する方法で、マンノース-5糖構造体をもつ免疫グロブリンの画分が、マンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンの量、免疫グロブリンG(0)イソ型の量、免疫グロブリンG(1)イソ型の量、および免疫グロブリンG(2)イソ型の量を含む合計の10%以下である免疫グロブリンを得ることができる。他の態様において、画分は液体クロマトグラフィー法で測定した面積%画分である。一態様において、DGLは0.8から0.2までの範囲に維持される。他の態様において、DGLは0.6から0.2までの範囲に維持される。さらに他の態

40

50

様において、DGLは0.6から0.4までの範囲に維持される。一態様において、単位時間当たり細胞が最大限に利用できるグルコースの量は、すべての化合物が過剰にある（すなわち、細胞の増殖を制限する化合物がない）培養に際して利用されるグルコースの平均量であり、少なくとも5回の培養に基づいて決定される。一態様において、この画分は培養7日目に測定される。

【0023】

本発明を実施するのに有用な、当業者に既知の方法および技術は、たとえば下記に記載されている：Ausubel, F.M. (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumes I to III (1997), Wiley and Sons; Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); Glover, N.D. (ed.), *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (1985); Freshney, R.I. (ed.), *Animal Cell Culture* (1986); Miller, J.H. and Calos, M.P. (eds.), *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1987); Watson, J.D., et al., *Recombinant DNA*, Second Edition, N.Y., W.H. Freeman and Co (1992); Winnacker, E.L., *From Genes to Clones*, N.Y., VCH Publishers (1987); Celis, J. (ed.), *Cell Biology*, Second Edition, Academic Press (1998); Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, Second Edition, Alan R. Liss, Inc., N.Y. (1987)。

【0024】

組換えDNA技術を用いてポリペプチドの多数の誘導体を製造することができる。そのような誘導体は、たとえば個々のまたは数個のアミノ酸位置において、置換、変更または交換により修飾されたものであってもよい。誘導体化は、たとえば部位特異的変異誘発により実施できる。そのようなバリエーションは当業者が容易に実施できる(Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (2001); Hames, B.D. and Higgins, S.G., *Nucleic acid hybridization - a practical approach* (1985) IRL Press, Oxford, England)。

【0025】

用語“核酸”は、天然に存在するか、または一部もしくは全体が天然に存在しない核酸分子であって、ポリペプチドをコードするものを表わす。核酸は、単離されるかあるいは化学的手段で合成できるDNAフラグメントの構築体(build up)であってもよい。核酸は、たとえば発現プラスミドにおいて、または真核細胞のゲノム/染色体において、他の核酸に組み込むことができる。用語“プラスミド”には、シャトルプラスミドおよび発現プラスミドが含まれる。一般にプラスミドは、それぞれ原核細胞におけるプラスミドの複製および選択のための複製起点(たとえば、Col E 1複製起点)および選択マーカー(たとえば、アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性遺伝子)を含めた、原核細胞増殖ユニットをも含むであろう。当業者には、たとえばポリペプチドのアミノ酸配列を、各アミノ酸配列をコードする対応する核酸に変換するための手順および方法が周知である。したがって核酸は、個々のヌクレオチドからなるその核酸配列によっても、またそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列によっても特徴付けられる。

【0026】

用語“発現力セット”は、少なくとも含まれる構造遺伝子が細胞において発現し、場合により細胞から分泌されるのに必要なエレメント、たとえばプロモーター、ポリアデニル化部位、ならびに3'側および5'側-非翻訳領域を含む核酸を表わす。

【0027】

用語“遺伝子”は、たとえば染色体上またはプラスミド上のセグメントであって、ポリペプチドの発現に必要なものを表わす。遺伝子は、コード領域のほかに、プロモーター、イントロン、および1以上の転写ターミネーターを含めた、他の機能性エレメントを含む。“構造遺伝子”は、遺伝子のシグナル配列を含まないコード領域を表わす。

【0028】

10

20

30

40

50

用語“発現”は、細胞内での構造遺伝子の転写および翻訳を表わす。細胞内での構造遺伝子の転写のレベルは、細胞内に存在する対応するmRNAの量に基づいて測定できる。たとえば、選択した核酸から転写されるmRNAは、PCRにより、またはノーザンハイブリダイゼーションにより定量できる(たとえば、Sambrook et al. (前掲)を参照)。核酸によりコードされるポリペプチドは、種々の方法により定量できる;たとえば、ELISAによるか、そのポリペプチドの生物活性の測定によるか、またはそのような活性とは無関係な方法、たとえばウェスタンプロット法もしくはラジオイムノアッセイの使用、そのポリペプチドを認識してそれに結合する抗体の使用による(たとえば、Sambrook et al. (前掲)を参照)。

【0029】

10

用語“細胞”は、ポリペプチドをコードする核酸(一態様においては異種ポリペプチド)が導入された細胞を表わす。用語“細胞”は、プラスミド/ベクターの増殖のために用いる原核細胞と、構造遺伝子の発現のために用いる真核細胞の両方を含む。一態様において、免疫グロブリンの発現のための真核細胞は哺乳動物細胞である。他の態様において、哺乳動物細胞はCHO細胞、NS0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、HEK細胞、BHK細胞、PER.C6(登録商標)細胞、およびハイブリドーマ細胞から選択される。真核細胞はさらに昆虫細胞、たとえば毛虫の細胞(ヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)、sf細胞)、ショウジョウバエの細胞(キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*))、蚊の細胞(ネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)、セスジヤブカ(ヒトスジシマカ)(*Aedes albopictus*))、およびカイコの細胞(カイコガ(*Bombyx Mori*))などから選択できる。

【0030】

20

用語“ポリペプチド”は、自然界または合成のいずれで生成したかにかかわらず、ペプチド結合により連結したアミノ酸残基のポリマーを表わす。約20アミノ酸残基未満のポリペプチドを“ペプチド”と呼ぶことができる。100アミノ酸残基を超えるポリペプチド、または1より多いポリペプチドを含む共有結合および非共有結合した凝集物を“タンパク質”と呼ぶことができる。ポリペプチドは非アミノ酸成分、たとえば炭水化物基を含む場合がある。非アミノ酸成分はそのポリペプチドを產生する細胞によってポリペプチドに付加される可能性があり、細胞のタイプに応じて異なる可能性がある。本明細書中でポリペプチドはそれらのアミノ酸配列によりN末端からC末端方向に規定される。それらへの炭水化物基などの付加物は一般に明記されないが、それにもかかわらず存在する可能性がある。

【0031】

30

用語“異種DNA”または“異種ポリペプチド”は、その細胞内に自然界では存在しないDNA分子もしくはポリペプチドまたはDNA分子の集団もしくはポリペプチドの集団を表わす。細胞種に由来するDNA(すなわち内在性DNA)が宿主のものではないDNA(すなわち外来DNA)と結合するならば、特定の細胞にとって異種であるDNA分子はその細胞種に由来するDNAを含む可能性がある。たとえば、細胞のものではないDNAセグメント(たとえば、ポリペプチドをコードするもの)が細胞のDNAセグメント(たとえば、プロモーターを含む)に作動可能な状態で連結したものを含むDNA分子は、異種DNA分子とみなすことができる。同様に、異種DNA分子は外来プロモーターに作動可能な状態で連結した内在性構造遺伝子を含むことができる。異種DNA分子によりコードされるポリペプチドは“異種”ポリペプチドである。

【0032】

40

用語“発現プラスミド”は、発現させるべきポリペプチドをコードする少なくとも1つの構造遺伝子を含む核酸を表わす。一般に、発現プラスミドは下記のものを含む;原核細胞プラスミド増殖ユニット:これには、複製起点、および選択マーカー、たとえば大腸菌(*E. coli*)については真核細胞選択マーカーが含まれる;ならびに目的とする構造遺伝子(単数または複数)の発現のための1以上の発現カセット:これらはそれぞれ、プロモーター、少なくとも1つの構造遺伝子、および転写ターミネーター(ポリアデニル化シグ

50

ナルを含む)を含む。遺伝子発現は通常はプロモーターの制御下に置かれ、そのような構造遺伝子はプロモーターに“作動可能な状態で連結”しているべきである。同様に、調節エレメントとコアプロモーターは、その調節エレメントがそのコアプロモーターの活性を調節するならば、作動可能な状態で連結している。

【0033】

用語“単離されたポリペプチド”は、付隨する細胞成分、たとえばそのポリペプチドと共有結合していない炭水化物、脂質、または他のタンパク性もしくは非タンパク性の不純物を本質的に含まないポリペプチドを表わす。一般に、単離されたポリペプチドの調製物は、ある態様においてはそのポリペプチドを高純度形態で、すなわち少なくとも約80%の純度、少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、95%を超える純度、または99%を超える純度で含有する。特定のタンパク質調製物が単離されたポリペプチドを含有することを示すための1方法は、調製物のドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-page)およびそのゲルのクーマシーブリリアントブルー染色の後に単一バンドが出現することによる。しかし、用語“単離された”は、同じポリペプチドが別の物理的形態、たとえば二量体で、または別のグリコシル化もしくは誘導体化形態で存在するのを除外しない。

【0034】

免疫グロブリンは一般に5つの異なるクラスに配属される: IgA(クラスAの免疫グロブリン)、IgD、IgE、IgGおよびIgM。これらのクラス間で、免疫グロブリンはそれらの全体的構造および/またはアミノ酸配列が異なるが、同じ構築ブロックをもつ。完全な免疫グロブリンは2対のポリペプチド鎖から構成される: それぞれ、免疫グロブリン軽ポリペプチド鎖(短い: 軽鎖)および免疫グロブリン重ポリペプチド鎖(短い: 重鎖)を含む。これらの鎖は可変部と定常部を含む。軽鎖においては両領域とも1ドメインからなり、これに対し重鎖においては可変部は1ドメインからなり、定常部は最高5つのドメインからなる(N末端からC末端方向へ): CH1ドメイン、場合によりヒンジ部ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、および場合によりCH4ドメイン。免疫グロブリンはFab領域とFc領域に分けることができる。軽鎖全体、重鎖可変ドメイン、およびCH1ドメインをFab領域(フラグメント抗原結合領域)と呼ぶ。Fc領域は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、および場合によりCH4ドメインを含む。

【0035】

本明細書中で用いる用語“免疫グロブリン”は、1以上のポリペプチドからなるタンパク質を表わす。エンコーディング免疫グロブリン遺伝子は、種々の定常部遺伝子および無数の免疫グロブリン可変部遺伝子を含む。“免疫グロブリン”には、一態様において、モノクローナル抗体、およびそのフラグメント、たとえば単離された重鎖、または重鎖定常部、ならびに融合ポリペプチドであって少なくとも免疫グロブリン重鎖CH2ドメインを含むものが含まれる。本明細書に記述する方法の一態様において免疫グロブリンは完全な免疫グロブリンであり、他の態様において免疫グロブリンは完全な免疫グロブリンのFc領域である。他の態様において、免疫グロブリンは免疫グロブリン、または免疫グロブリンフラグメント、または免疫グロブリンコンジュゲートである。

【0036】

用語“免疫グロブリンフラグメント”は、少なくとも免疫グロブリンデルタ、イプシロンもしくはアルファ重鎖のCH2ドメイン、および/または免疫グロブリンイプシロンもしくはデルタ重鎖のCH3ドメインを含む、ポリペプチドを表わす。その誘導体およびバリエントであって、CH2ドメインまたはCH3ドメイン中のN-グリコシル化モチーフAsn-Xaa-Ser/Thrが変化していないものも含まれる。

【0037】

用語“免疫グロブリンコンジュゲート”は、少なくとも免疫グロブリンデルタ、イプシロンもしくはアルファ重鎖のCH2ドメインおよび/または免疫グロブリンイプシロンもしくはデルタ重鎖のCH3ドメインが、非免疫グロブリンポリペプチドに融合したものを含むポリペプチドを表わす。それらにおいて、CH2ドメインまたはCH3ドメイン

10

20

30

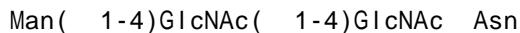
40

50

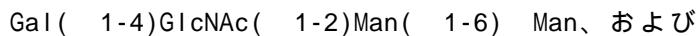
中のN-グリコシル化モチーフAsn-Xaa-Ser/Thrは変化していない。

【0038】

免疫グロブリン重鎖のC_H2ドメインのAsn²⁹⁷(IgG、IgE)もしくはAsn²⁶³(IgA)に、および/またはC_H3ドメインのAsn³⁹⁴、Asn⁴⁴⁵、またはAsn⁴⁹⁶(IgE、IgD)に結合したオリゴ糖は、二分岐(biantennary)構造をもつ(Mizuochi, T., et al., Arch. Biochem. Biophys. 257 (1987) 387-394)、すなわちそれらはコア構造



からなり、末端GalcNAc残基に任意選択的Fuc(1-6)結合をもつ。このコア構造の末端マンノースに次式をもつ2つの外側アームが結合している：



これらにおいて末端ガラクトース残基は任意選択的である(Man = マンノース、GalcNAc = N-アセチルグルコース、Gal = ガラクトース；Fuc = フコース)。

【0039】

【表1】

表1: 免疫グロブリンのグリコシル化部位

免疫グロブリンクラス	糖構造体が結合できる残基
IgG	Asn 297
IgE	Asn 255, Asn 297, Asn 361, Asn 371, Asn 394
IgA	Asn 263, Asn 459
IgD	Asn 445, Asn 496
IgM	Asn 395

【0040】

用語“免疫グロブリンG(0)イソ型の量、免疫グロブリンG(1)イソ型の量、および免疫グロブリンG(2)イソ型の量”は、免疫グロブリンのアスパラギン(Asn)にN-結合した種々の異種二分岐オリゴ糖の量の合計を表わす。G(2)イソ型はオリゴ糖構造体の外側アームそれぞれに末端ガラクトース残基をもち、G(1)イソ型は(1-6)または(1-3)結合した外側アームのいずれかのみにガラクトース残基を保有し、G(0)イソ型は両方の外側アームにガラクトース残基を保有しない。

【0041】

用語“マンノース-5糖構造体”は、ポリペプチドのAsn残基に連結して、5つのマンノース残基および2つのN-アセチルグルコースコア残基を含むかあるいはそれからなる三分岐(triantennary)構造を形成した、オリゴマンノース構造体を表わす。

【0042】

本明細書に記述する1観点は、下記の工程を含む免疫グロブリンの調製方法である：

a) 免疫グロブリンをコードする1以上の核酸を含む真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞を、培地中の単位時間当たり利用できるグルコースの量が一定に維持され、かつ単位時間当たりその培地中でその細胞が最大限に利用できる量の80%未満の値に制限された培地中で培養し、そして

b) 細胞または培地から免疫グロブリンを回収し、これにより免疫グロブリンを調製する。

【0043】

この方法で、マンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンを最大で10%含む免疫グロブリンが得られる。この10%は、マンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンの量、免疫グロブリンG(0)イソ型の量、免疫グロブリンG(1)イソ型の量、および免疫グロブリンG(2)イソ型の量の合計に基づいて計算される。

10

20

30

40

50

【0044】

用語“グルコース制限度”とその略号“DGL”は、本明細書中で互換性をもって使用でき、培養物中の単一細胞の現時点のグルコース比消費速度 - 対 - その単一細胞または同じ種類の単一細胞の既知の最大グルコース比消費速度の比を表わす。グルコース制限度は下記のとおり定義される：

【0045】

【数1】

$$DGL = \frac{qGlc}{qGlc_{max}}$$

【0046】

ここで、

$qGlc$ = 単一細胞の現時点のグルコース比消費速度；

$qGlc_{max}$ = その単一細胞または同じ種類の単一細胞について既知の最大グルコース比消費速度。

【0047】

DGLはDGL_{maintenance}と1の間で変動させることができ、ここでDGL_{maintenance} (<1および>0)は完全な増殖制限を表わし、1は無制限または完全なグルコース過剰を表わす。

【0048】

ポリペプチド、たとえば免疫グロブリンへの糖構造体の導入は翻訳後修飾である。各細胞のグリコシル化操作は不完全であるため、発現した各ポリペプチドは、種々の糖構造体を含むグリコシル化パターンで得られる。したがって、ポリペプチドはそれを発現する細胞から、同一ポリペプチド、すなわち同一アミノ酸配列をもつものの、異なるグリコシル化形態を含む組成物の形態で得られる。個々の糖構造体の合計はグリコシル化パターンとして表わされ、これには糖構造体を全く含まないポリペプチド、異なるプロセシングを受けた糖構造体および/または異なる組成の糖構造体を含むポリペプチドが含まれる。

【0049】

糖構造体のひとつはマンノース-5糖構造体（高マンノース、Man 5、M 5、またはオリゴ-マンノースとも表記される）である。培養時間の長期化に伴って、またはグルコース飢餓状態で、マンノース-5糖構造体を含む組換え產生されたポリペプチドの画分が増加すると報告されている(Robinson, D.K., et al., Biotechnol. Bioeng. 44 (1994) 7 27-735; Elbein, A.D., Ann. Rev. Biochem. 56 (1987) 497-534)。

【0050】

真核細胞が產生するポリペプチドのグリコシル化パターンにおけるマンノース-5糖構造体の量を、培養プロセスで細胞に流加するグルコースの量に基づいて改変できることが見出された。グルコースの量を減らすことによって、すなわちDGL値を1.0からより小さな、たとえば0.8、0.6、0.5、0.4または0.2の値に変化させることによって、グリコシル化パターンにおけるマンノース-5糖構造体の量の改変を達成できることが見出された。一態様において、DGL値は0.8から0.2まで、または0.6から0.4までの範囲内の値で一定に維持される。すなわち、ポリペプチド、一態様において免疫グロブリンの調製は、グリコシル化パターンにおいて規定量のマンノース-5糖構造体を含むポリペプチドを得るために、培養細胞が利用できるグルコースの量を制限した条件下で実施できる。細胞が（一態様においては、対数増殖している細胞が）単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量の80%以下の量のグルコースを単位時間当たり利用できる（すなわち、0.8以下のDGLをもつ）培養により、1.0のDGLをもつ培養と比較してマンノース-5糖構造体の量が変化したグリコシル化パターンをもつポリペプチドが得られることが見出された。一態様において、細胞密度は生細胞密度である。さらに、得られるポリペプチド収率が増大する。

10

20

30

40

50

【0051】

用語“細胞が単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量”は、単一細胞が最適増殖条件下で対数増殖期に何ら栄養素制限のない培養において単位時間当たり最大限に消費または利用または代謝できるグルコースの量を表わす。したがって、細胞が単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量は、何ら栄養素制限のない培養において細胞が最適増殖条件下で対数増殖期に単位時間当たり代謝するグルコースの量を測定することにより決定できる。利用できるグルコースの量をそれ以上増加させても、細胞が単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量はそれ以上は増加しない、すなわち変化しないであろう。この量が単一細胞の最大グルコース消費レベルを規定する。これは、遺伝子修飾した形の細胞がよりいっそう高い最大グルコース消費レベルをもつ可能性がないことを意味するものではない。あるいは、細胞が単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量は、これまでの培養およびモニターされたデータに基づいて決定できる。

【0052】

本明細書に記述する方法は、測定および制御のための努力が最小限に抑えられることに関連して特に実施するのが簡単であり、特に経済的である。

限定ではないが、たとえば栄養素供給が不十分であると、培養細胞は不経済な状態で増殖して栄養素を最大速度で消費する。消費される培地栄養素のひとつはグルコースであり、これは培養細胞が細胞の代謝のためのエネルギーおよび構築ブロックを产生するために代謝する。過剰のグルコースの存在下では、細胞の代謝はグルコースについて最大の代謝回転速度で進行している。細胞が単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量は、たとえば、制限されたグルコースでの、すなわちその細胞が単位時間当たり利用できる量より少ないグルコース量での培養にも用いられる同じ培養条件を用いてまたは同じ培養条件下で培養された、過剰のグルコースの存在下で対数増殖している細胞のグルコース消費量から決定できる。この最大量は、固定した時間範囲の最初と最後の細胞密度およびグルコース濃度を測定することによって、容易に計算できる。この値は、普通は0.006から190mmol/時間/10⁹細胞までの範囲にある(Baker, K.N., et al., Biotechnol. Bioeng. 73 (2001) 188-202; WO 98/41611; Muething, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 83 (2003) 321-334; WO 2004/048556)。一態様において、標準的なプロセス条件下にpH 7.0で、qGlc_{max}は約0.142mmol/時間/10⁹細胞である。

【0053】

本明細書に記述する方法は、一態様において、単位時間当たり利用できるグルコースの量が一定に、かつ単位時間当たりその細胞が最大限に利用できるグルコースの量の80%以下(0.8 DGL > 0)に維持される条件下で実施され、一態様においては利用できるグルコースの量は一定に、かつ60%以下(0.6 DGL > 0)に、他の態様においては50%以下(0.5 DGL > 0)に、さらに他の態様においては約40%に維持される。本出願で用いる用語“約”は、その数値が厳密な数値ではなく、それはある範囲の中央点にすぎないことを表わし、その際、その数値は最大10%変動できる；すなわち、用語“約40%”は44%から36%までの範囲(DGL = 0.44 ~ 0.36)を表わす。

【0054】

一態様において、培養は、単位時間当たりその細胞が最大限に利用できるグルコースの量の80%~10%の範囲で一定に維持される量のグルコースを単位時間当たり利用できる状態で行なわれる(0.8 DGL 0.1)。他の態様において、利用できるグルコースの量は60%~10%の範囲で一定に維持される(0.6 DGL 0.1)。さらに他の態様において、利用できるグルコースの量は50%~10%の範囲で一定に維持される(0.5 DGL 0.1)。他の態様において、利用できるグルコースの量は45%~20%の範囲で一定に維持される(0.45 DGL 0.2)。同様に、ある態様において、利用できるグルコースの量は80%~60%の範囲で一定に維持される(0.8 DGL 0.6)。

【0055】

10

20

30

40

50

一態様において本方法は、DGLが一定に約0.4の値に維持される条件下で細胞を培養する工程を含み、これによれば培養は1.0~0.5のDGLで開始され、DGLを約0.4の値に低下させ、その後はこのDGLを一定に維持することを含む。一態様において、DGLの低下は100時間以内の期間である。用語“DGLを一定に維持する”および文法的にそれの均等物は、そのDGL値がある期間維持されること、すなわちDGL値の変動がその数値の10%以内であることを表わす(たとえば、図2を参照)。

【0056】

免疫グロブリンは、產生後に、直接または細胞を破壊した後に回収される。回収された免疫グロブリンは、一態様において、当業者に既知の方法で精製される。タンパク質精製のために種々の方法が十分に確立され、広く使用されている;たとえば、微生物タンパク質によるアフィニティークロマトグラフィー(たとえば、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィー)、イオン交換クロマトグラフィー(たとえば、陽イオン交換(カルボキシメチル樹脂)、陰イオン交換(アミノエチル樹脂)および混合型交換)、チオ親和性(thiophilic)吸着(たとえば、ベータ-メルカプトエタノールその他のSHリガンドによる)、疎水性相互作用または芳香族吸着クロマトグラフィー(たとえば、フェニル-セファロース、アザ-アレン親和性(aza-arenophilic)樹脂、またはm-アミノフェニルボロン酸による)、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(たとえば、Ni(II)-およびCu(II)-アフィニティー材料による)、サイズ排除クロマトグラフィー、および電気泳動法(たとえば、ゲル電気泳動、毛細管電気泳動)(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102)。

10

20

【0057】

たとえば、免疫グロブリンの精製法は一般に多工程クロマトグラフィー部分を含む。第1工程で、たとえば、プロテインAまたはプロテインGによるアフィニティークロマトグラフィーにより、免疫グロブリンではないポリペプチドを免疫グロブリン画分から分離する。その後、たとえばイオン交換クロマトグラフィーを実施して、個々のクラスの免疫グロブリンを分離し、かつ第1カラムから共溶出した痕跡量のプロテインAを除去する。最後に、クロマトグラフィー工程を用いて免疫グロブリン単量体を同じクラスの多量体およびフラグメントから分離する。

【0058】

一般的なクロマトグラフィー法およびそれらの使用は当業者に既知である。たとえば下記を参照: Heftmann, E. (ed.), Chromatography, 5th edition, Part A: Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Deyl, Z. (ed.), Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Poole, C. F. and Poole, S. K., Chromatography Today, Elsevier Science Publishing Company, New York (1991); Scopes, R.K., Protein Purification: Principles and Practice (1982); Sambrook, J. et al. (eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001);またはAusubel, F. M. et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (1990)。

30

40

【0059】

一態様において、回収した免疫グロブリンを、集団の量、すなわちマンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリン、免疫グロブリンG(0)イソ型、免疫グロブリンG(1)イソ型、および免疫グロブリンG(2)イソ型の量の合計に対する、マンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンの量により特性分析する。本明細書に記述する方法によれば、マンノース-5糖構造体を含む免疫グロブリンの量は集団の10%以下であり、他の態様においては集団の8%以下であり、さらに他の態様においては集団の6%以下である。

【0060】

本明細書に記述する方法は、ある態様において、連続培養として、フェドバッチ培養として、またはその組合せとして、たとえばフェドバッチ培養として開始した後に連続培

50

養に切り換えて、実施できる。さらに、本明細書に記述する方法は種々の様式で実施できる。たとえば一態様においては、D G L 値が 1 . 0 未満の条件下で、すなわちたとえば利用できるグルコースの量が単位時間当たりその細胞がその培養で最大限に利用できるグルコースの量の 8 0 % 以下である条件下で培養する前に、過剰のグルコース、すなわち D G L 値が 1 . 0 の状態で培養する。他の態様において、たとえば前規定した細胞密度（たとえば、一態様において 10^5 細胞 / m l ）を得るために、標準培地に含有される量のグルコース、たとえば 1 ~ 1 0 g / l (培地) で培養を開始する。さらに他の態様において、培養の開始を過剰量のグルコースの存在下で、すなわち 1 . 0 の D G L で行ない、そして単位時間当たりある量のグルコースを添加する；これは単位時間当たりその細胞がその培養で最大限に利用できるグルコースの量の 8 0 % 以下である。他の態様においては、培地 10 中に存在するグルコースの量がその培養に際して前設定した値以下に低下した時点で流加を開始する。最後の 2 例では、培養に際して利用できるグルコースの量は培養における細胞の代謝によって減少する。

【 0 0 6 1 】

一態様において、本明細書に記述する方法では単位時間当たり利用できるグルコースの量または添加するグルコースの量（最大限に利用できるグルコースの量より少ない）を同じ値に、すなわち一定に維持する。たとえば、単位時間当たり最大限に利用できるグルコースの量の 5 0 % の量を利用できるように制御する場合、この制御量（D G L 値に基づく）はグルコース制限流加を実施しているすべての期間に適用される。ただし、この数値は生細胞の絶対密度に依存した相対値であるので、生細胞密度が培養中に変化する（すなわち、それは初期に増加し、最大に達し、その後、再び低下する）のに伴って、利用できるグルコースの絶対量は変化する。相対値は一定に（すなわち、たとえば 8 0 % に）維持されるけれども絶対基準値が変化する（すなわち、生細胞密度が増大する）ので、相対的な絶対値も変化する（すなわち、増加する数値の 8 0 % も増加する）。

【 0 0 6 2 】

用語“単位時間当たり”は、固定した時間範囲、たとえば 1 分、1 時間、6 時間、12 時間、または 24 時間を表わす。一態様において、単位時間は 12 時間または 24 時間である。本出願で用いる用語“単位時間当たり利用できるグルコースの量”は、下記のものの合計を表わす：1) 固定した時間範囲の開始時の培養の培地中に含有されるグルコースの量、および 2) その単位時間中に添加した、すなわち流加したグルコースの量。したがって、ある量のグルコースを細胞培養培地に、たとえば培養容器に添加すると、これは固定した時間範囲の開始時の培地中のグルコースの量を前決定量まで増加させる。この量のグルコースは、固体として、水に溶解して、緩衝液に溶解して、または栄養培地に溶解して添加することができ、その際、水および緩衝液はグルコースを含有すべきではない。添加されるグルコースの量は、利用できるグルコースの量から培養容器内の培地中に存在するグルコースの量を差し引いたものに相当する。この量のグルコースを添加するプロセスは、前記の単位時間中に 1 回添加として、少量の等分の多数回添加として、または連続添加として実施できる。

【 0 0 6 3 】

本明細書に記述する方法はいかなる種類の培養にも、またいかなる培養規模にも適切である。たとえば、一態様において、この方法は連続法またはフェドバッチ法に用いられる；他の態様において培養容量は $100\text{m}l$ から $50,000\text{l}$ までであり、他の態様においては 100l から $10,000\text{l}$ までである。本明細書に記述する方法は、マンノース - 5 糖構造体をもつ免疫グロブリンが 10 % 以下、または 8 % 以下、または 6 % 以下である免疫グロブリンの調製に有用である。一態様において、免疫グロブリンは免疫グロブリン G または E である。本明細書に記述する方法は真核細胞を含み、この細胞は免疫グロブリンの重鎖またはそのフラグメントをコードする核酸、および免疫グロブリンの軽鎖またはそのフラグメントをコードする核酸を含む。真核細胞は、一態様において C H O 細胞、N S 0 細胞、B H K 細胞、ハイブリドーマ細胞、P E R . C 6 (登録商標) 細胞、S p 2 / 0 細胞、H E K 細胞、および昆虫細胞から選択される。

10

20

30

40

50

【0064】

当業者はグルコースの量のほか、種々の細胞が最適増殖のために要求する培地の組成および成分ならびに栄養素濃度を周知しており、その細胞の培養に適切な培地を選択するであろう(たとえば、Mather, J.P., et al., Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Vol. 2 (1999) 777-785を参照)。

【0065】

一態様において、本明細書に記述する方法に従った培養に際して細胞が利用できるはずのグルコースの量は、培養容器内において特定の培養時点での容量の培養容器および最大限に利用できるグルコースの量で普通に達成できる生細胞密度に、単位時間当たりの対数増殖中の細胞数、および意図するDGLを掛けることにより計算される。より詳細には、その実際の時点以前の培養中のグルコース濃度の経過および培養中の細胞密度の経過から、将来のグルコース濃度および細胞密度の経過を推定する。この推定を用いて、意図するDGLを達成するために添加しなければならないグルコースの量を、次式により計算する：

$$(グルコース添加量[グルコースpg/ml/時間]) =$$

(現時点の細胞密度[細胞/ml]) × (細胞の最大グルコース消費速度[グルコースpg/細胞/時間]) × (DGL値) - 培養容器内の培地中に存在するグルコースの量

一態様において、培養のpH値はpH 6.5 ~ pH 7.8である。他の態様において、pH値はpH 6.9 ~ pH 7.3である。さらに態様において、pH値はpH 7.0 ~ 7.2である。実施例1に概説するように、一定流加法で制限グルコース流加とpH値7.0を組み合わせると、pH値7.2と比較してM5含量を規定値、すなわち8%未満に効率的に調節できることが見出された。それぞれ7.0または7.2のpH値でフェドバッチ法での培養に際して、DGL制御法を用いるとM5含量を5.5%未満に調節できることが見出された。培養のpH値を低下させるとDGL値の低下によるM5量の増加に対抗できることが見出された。

【0066】

培養は、一態様において27 ~ 39で、他の態様において35 ~ 37.5で実施される。

本明細書に記述する方法では、糖構造体を含むいすれかのポリペプチド、たとえば免疫グロブリン、インターフェロン、サイトカイン、増殖因子、ホルモン、プラスミノーゲンアクチベーター、エリスロポエチンなどを調製できる。

【0067】

本明細書に記述する方法における培養は、哺乳動物細胞培養のためのいすれかの攪拌式または振とう式装置、たとえば発酵槽タイプのタンク培養装置、エアリフト(air lift)タイプの培養装置、培養フラスコタイプの培養装置、スピナーフラスコタイプの培養装置、マイクロキャリヤータイプの培養装置、流動床タイプの培養装置、中空纖維タイプの培養装置、ローラーボトルタイプの培養装置、または充填床タイプの培養装置を用いて実施できる。

【0068】

本明細書に記述する方法は、一態様において最高15日間実施される。他の態様において、培養は6 ~ 15日間行なわれる。一態様において、免疫グロブリンは抗IL-6R抗体である。

【0069】

本明細書に記述する方法を、たとえばEP 0 409 607、EP 0 628 639、US 5,670,373、またはUS 5,795,965(本明細書にそれらの全体を援用する)に記述されたヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体について例示する；この抗体およびそれを発現する細胞系は本発明の時点で我々の実験室において十分な量で入手できたからである。これは本発明の範囲を限定するものではない。

【0070】

以下の実施例および図面は本発明の理解を補助するために示すものであり、本発明の真

10

20

30

40

50

の範囲は特許請求の範囲に示される。ここに示す方法において本発明の精神から逸脱することなく改変をなしうることを理解すべきである。

【実施例】

【0071】

材料および方法

細胞系：

組換え產生される免疫グロブリンのマンノース - 5 糖構造体の量を改変できる C H O 細胞系の例は、EP 0 409 607 およびUS 5,795,965 による抗 I L - 6 R 抗体をコードする核酸を含む C H O 細胞系である。この組換え C H O 細胞の培養のためには、本発明の方法によるグルコース補給を実施できる限り、いかなる培地も使用できる。培地の例は I M D M、D M E M もしくは H a m の F 1 2 培地、またはその組合せであり、それらを培地成分とグルコースの質量比が受け継がれるように本明細書に記述する方法に適合させた。培地からグルコースを排除し、それを別個に培養に添加することもできる。

【0072】

培養：

抗 I L - 6 R 抗体を発現する C H O 細胞を 1 l または 2 l の発酵容器で培養した。流加培地は 1 5 ~ 4 0 g / l のグルコースを含有していた。グルコースは、たとえば 4 0 0 g / l のグルコースを含有する別個の濃厚溶液で流加することができた。p H 7.0 から 7.2 までの範囲の p H 値で培養を実施した。

【0073】

糖構造体の決定：

I g G グリコシル化パターンの分析のために、Kondo らによる方法 (Kondo, A., et al., Agric. Biol. Chem. 54 (1990) 2169-2170) を用いた。I g G を、培地の遠心上清から小規模プロテイン A カラムを用いて精製した。精製 I g G のオリゴ糖を N - グリコシダーゼ F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) により放出させ、還元末端を 2 - アミノピリジンで標識した。標識したオリゴ糖を逆相クロマトグラフィー (H P L C) により分析した。質量分析およびオリゴ糖の標準品の両方により、各ピークの帰属を判定した。

【0074】

グルコースの測定：

YSI 2700 SELECT (商標) 分析計 (YSI, Yellow Springs, OH, USA) を用い、製造業者のマニュアルに従った方法でグルコース濃度を測定した。

【0075】

生細胞密度の測定：

自動イメージプロセシングおよび分析システム (CEDEX (登録商標) ; Innovatis, Germany)、ならびにトリパンブルー色素排除法を用いて、生細胞密度を測定した。

【0076】

実施例 1

D G L 制御および p H が抗体產生およびマンノース - 5 糖構造体 (M 5) 含量に及ぼす影響

ヒト化した抗 I L - 6 受容体抗体 (トシリズマブ (Tocilizumab) , RoACTEMRA (登録商標)) を產生する C H O 細胞株を用いて試験を実施した；これは、日本国公開特許公報第9 9902/1996 の参考例 2 に記載された方法に従い、国際特許出願公開 No. WO 92/19759 (US 5,795,965、US 5,817,790、およびUS 7,479,543 に対応する) の例 1 0 に記述されたヒト伸長因子 I プロモーターを用いて調製された。

【0077】

定速流加法で、p H 制御が免疫グロブリン產生に及ぼす影響を観察した。表 2 は、定速流加法で p H 制御が抗体オリゴ糖產生および M 5 含量に及ぼす影響を示す。

【0078】

10

20

30

40

【表2】

表2: 定速流加方式におけるpH制御の影響

No.	[日目]の試料	pH設定点	DGL	相対抗体濃度[%]	M5含量[%]
1	7	7.0	0.80-0.45	90.1	3.6
2	7	7.0	0.49-0.21	100	5.4
3	7	7.2	0.73-0.35	135.1	11.7
4	7	7.2	0.69-0.30	120	10.8
5	7	7.2	0.35-0.29	127	25.2
6	7	7.2	0.64-0.25	122.5	8.7

10

【0079】

pH 7.0では、マンノース-5糖構造体(M5)の量は5.5%未満に調節された。DGL値は細胞密度の変化のため0.80から0.21まで低下した。他方、pH 7.2ではM5の量は8.7%と25.2%の間で変動し、pH 7.0の場合より高かった。pH 7.2におけるDGL値は0.73から0.25までの範囲であった。さらに、この場合、pH 7.2での免疫グロブリン産生は120%を超えた(pH 7.0に比較した相対値)。定速流加法で免疫グロブリン産生がより高いと、より高い8%を超えるM5含量が誘導される。したがって、定速流加法でpH 7.0に制御して、pH 7.2に制御した方法と比較してM5含量をより低い値、すなわち8%未満に効率的に調節できた。

20

【0080】

種々のpHでのフェドバッチ方式による免疫グロブリン産生のために、DGL制御法(=一定相対量流加法)も採用し、M5含量を分析した。表3は、流加開始後2~3日目のDGL制御およびpHが免疫グロブリン産生およびM5含量に及ぼす影響を示す。

【0081】

【表3】

表3: 供給-バッチ方式におけるDGLおよびpH制御の影響

No.	[日目]の試料	pH設定点	DGL	相対抗体濃度[%]	M5含量[%]
1	7	7.0	0.8	102.7	2.9
2	7	7.0	0.6	96.2	2.7
3	7	7.0	0.4	100.0	3.3
4	7	7.0	0.3	91.1	3.9
5	7	7.0	0.2	83.0	4.0
6	7	7.2	0.6	100.9	4.4
7	7	7.2	0.4	90.1	5.3

30

【0082】

pH 7.0において、0.2から0.8までの範囲のDGLでDGL制御法を適用した。その結果、M5含量は4.0%以下に調節された。他方、pH 7.2ではDGL値を0.4から0.6までの範囲で操作した。この場合、M5含量を5.5%未満に制御できた。

40

【0083】

実施例2

種々のDGL値での培養

抗IL-6R抗体をコードする核酸を含むCHO細胞の培養を種々のDGL値で実施した。結果を下記の表4にまとめる。

50

【0084】

【表4】

表4: DGL制御値が免疫グロブリンの産生およびM5含量に及ぼす影響

No.	[日目] の試料	DGL	相対 抗体濃度 [%]	M5 含量 [%]	G(0) 含量 [%]	G(1) 含量 [%]	G(2) 含量 [%]
1	7	0.6-0.5	107.3	3.5	38.4	46.7	11.4
2	7	0.4	111.0	3.5	38.8	46.9	10.8
3	7	0.2	111.5	4.5	40.1	45.2	10.1
4	8	一定 供給	100.0	5.9	43.8	42.0	8.3

【0085】

定速流加法と比較して、DGL値0.4～0.6での制御DGL法はマンノース-5含量の低下を示す。

実施例3

種々の流加法での培養

抗IL-6R抗体をコードする核酸を含むCHO細胞の培養を1種類のDGL値で、ただし種々の流加法を用いて実施した。結果を下記の表5にまとめる。

【0086】

【表5】

表5: 流加法が生存率および生細胞密度に及ぼす影響

No.	[時間]後 の試料	DGL	流加	調整	生存率 [%]	生細胞密度 [$\times 10^6$ 細胞 /ml]
1	112	0.4	单一流加培地	毎日	71	5.1
2	115	0.4	二種流加培地	毎日	75	5.8
3	115	0.4	单一流加培地	プロフィール	73	4.9
4	115	0.4	二種流加培地	プロフィール	70	5.1

【0087】

单一流加培地流加実験では、すべての栄養素およびグルコースを含有する单一の流加物を用いた。二種培地流加実験では、すべての栄養素およびグルコースを含有する2種類の流加物を用いた：第1流加物はすべての栄養素および15g/lの低濃度のグルコースを含有し、第2流加物は高濃度のグルコースを含有する。これらの種々の流加実験を、一方の設定では流加速度を毎日調整して実施し、他方の設定では以前の培養における生細胞密度変化記録計に基づく前決定プロフィールに従って実施した。表5から分かるように、生存率および生細胞密度は採用した流加法とは無関係に類似する。

【0088】

実施例4

フェドバッチ方式による免疫グロブリン調製のためのグルコース制限度(DGL)制御CHO細胞(8.0～12×10⁵細胞/ml)を前記の無血清培地に接種した。細胞を37、98%相対湿度、および10%CO₂の雰囲気で増殖させた。フェドバッチ培養で、主発酵槽へ培養開始から2日目または3日目に流加するように、グルコースを含有する培地の流加を開始した。流加法はグルコース制限度(DGL)を制御するための米国特許出願公開公報US 2006/0127975 A1による方法に従った。DGLは、観察されたグルコース比消費速度-対-これらの細胞が自由にグルコースを利用できる場合の既知の最大グルコース比消費速度の比として定義できる(DGL = Q(glc) / Q(glc)_m)

10

20

30

40

50

a_x , ここで、 $Q (g/l/c)$ = 現時点で観察されたグルコース比消費速度 ; $Q (g/l/c)_{max}$ = これらの細胞についての既知の最大グルコース比消費速度) 。

【 0089 】

図 1 は、この培養の生細胞密度および細胞生存率プロフィールを示す。図 2 に示すように、種々の細胞密度で DGL を 0.4 ~ 0.5 の値になるように制御した。その時点の細胞密度に応じて流加速度を 1 日 1 回または 2 回変化させた。図 3 は、フェドバッチ方式による DGL に基づく流加プロフィールを示す。細胞密度に応じて流加速度を 0.8 ~ 1.6 ml / 時間で変化させた。この流加法を適用して、図 4 に示す免疫グロブリン産生プロフィールが得られた。表 6 に示すように 10×10^5 細胞 / ml および 12×10^5 細胞 / ml の接種サイズを用いると、7 日目に免疫グロブリン産生はほぼ同じであり、一定流加法 (グルコース 0.02 g / 時間の流加速度) での免疫グロブリン産生の 120 % を超えた。初期細胞密度の差 20 % にもかかわらず、DGL 制御法ではほぼ同等の免疫グロブリン力値を得ることができた。さらに、接種サイズを 8.0×10^5 細胞 / ml に設定した場合、流加開始点の 20 時間の遅れにもかかわらず、得られた免疫グロブリンは 7 日目に 110 % (相対値) を超えた。これらの結果において、DGL 制御法は種々の接種サイズで安定な免疫グロブリン産生を達成できた。

【 0090 】

実施例 5

DGL 制御がオリゴ糖のマンノース - 5 糖構造体およびガラクトシル化に及ぼす影響

DGL 制御を用いるフェドバッチ培養により産生された免疫グロブリンについて、グリコシル化パターンを分析した。表 6 は、DGL 制御フェドバッチ培養から得られた免疫グロブリンについてのオリゴ糖分析の結果を、一定流加法 (流加速度: グルコース 0.02 g / 時間) と比較して示す。 8.0×10^5 細胞 / ml の接種サイズでは、マンノース - 5 糖構造体 (M5) の含量は 2.8 % であった。 10×10^5 細胞 / ml および 12×10^5 細胞 / ml の接種サイズでは、M5 含量はそれぞれ 4.1 % および 3.8 % であった。すべての培養条件で、DGL 制御法は M5 含量を 5.0 % 未満に調節できた。

【 0091 】

一方、各条件で、免疫グロブリン G(0) イソ型および免疫グロブリン G(2) イソ型は、それぞれ 40 % から 46 % まで、および 9.0 % から 11 % までの範囲で制御された。

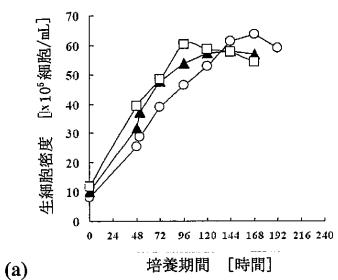
【 0092 】

【表 6】

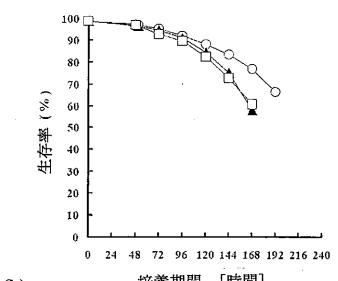
表 6: DGL の制御値が免疫グロブリンの産生およびグリコシル化パターンに及ぼす影響

No	【日目】の試料	DGL	接種細胞密度 [$\times 10^5$ 細胞 / ml]	抗体相対濃度 [%]	M5 含量 [%]	G(0) 含量 [%]	G(1) 含量 [%]	G(2) 含量 [%]
1	7	一定供給	10	100.0	3.5	45.7	41.5	9.2
2	7	0.4	8	112.5	2.8	41.7	44.7	10.8
3	7	0.4	10	122.6	4.1	42.9	43.1	9.8
4	7	0.4	12	127.1	3.8	45.5	41.5	9.1

【図1】

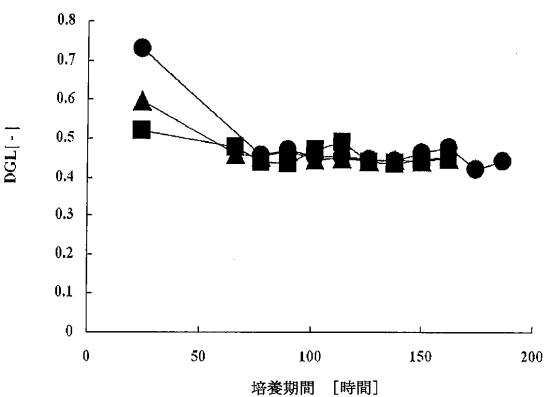


(a)

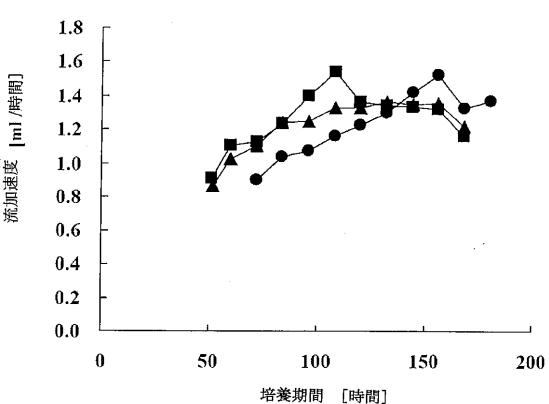


(b)

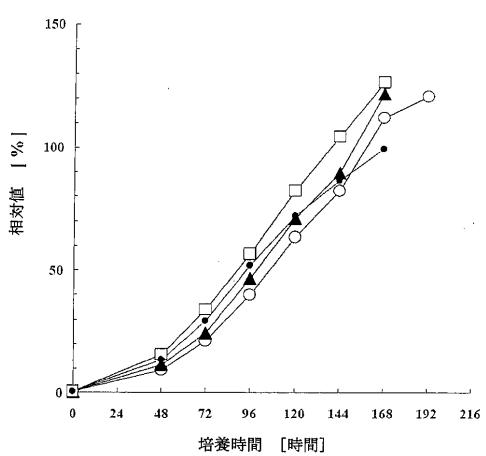
【図2】



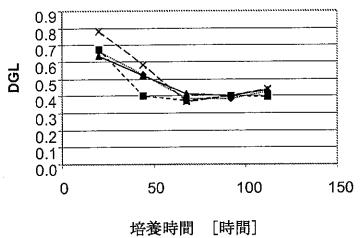
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74)代理人 100092967
弁理士 星野 修
(74)代理人 100118902
弁理士 山本 修
(72)発明者 フランツェ, ラインハルト
ドイツ国 82377 ペンツベルク, アム・シュヴァダーグラーベン 11
(72)発明者 平島 親
東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内
(72)発明者 リンク, トマス
ドイツ国 82377 ペンツベルク, ガブリエレ-ミュンター-ヴェーク 5
(72)発明者 高木 良智
東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内
(72)発明者 田熊 晋也
東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内
(72)発明者 津田 祐理子
東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2006-507821(JP, A)
特開平06-292592(JP, A)
国際公開第02/002793(WO, A1)
国際公開第2004/104186(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/00-21/08
C12N 15/00-15/90
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS /
WPI D S (STN)
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
PubMed