

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-518409

(P2012-518409A)

(43) 公表日 平成24年8月16日(2012.8.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/00 Z N A G	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/00 U	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁)

(21) 出願番号	特願2011-551225 (P2011-551225)	(71) 出願人	511203570
(86) (22) 出願日	平成22年2月18日 (2010.2.18)		ベントリア・バイオサイエンス
(85) 翻訳文提出日	平成23年9月1日 (2011.9.1)		Ventria Bioscience
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/024626		アメリカ合衆国80525コロラド州フォート・コリンズ、スウィート102、マイルストーン・ドライブ2120番
(87) 国際公開番号	W02010/096588	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成22年8月26日 (2010.8.26)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	61/154, 204	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成21年2月20日 (2009.2.20)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の組み合わせを含有する細胞培養培地

## (57) 【要約】

本発明は、タンパク質の組み合わせを含有する細胞培養培地、ならびにそれらの細胞培養培地を作製する方法、および培養細胞の成長特性を改善するためにそれらの細胞培養培地を使用する方法に関する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

培養中の細胞の細胞成長を高めるための方法であって、前記細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含み、前記栄養補助剤は、組換えアルブミンとトランスフェリン関連タンパク質との混合物を含み、前記組換えアルブミンは、

- i ) 植物中で産生され、
- i i ) アルブミン 1 m g 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、かつ
- i i i ) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、前記栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と前記組換えアルブミンとの比率 ( 重量 / 重量 ) から成る、方法。

10

## 【請求項 2】

無血清培地に適応した細胞の生産性を高めるための方法であって、前記無血清培地への栄養補助剤の添加を含み、前記栄養補助剤は、組換えアルブミンとトランスフェリン関連タンパク質との混合物を含み、前記組換えアルブミンは、

- i ) 植物中で産生され、
- i i ) アルブミン 1 m g 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、かつ
- i i i ) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、前記栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と前記組換えアルブミンの比率 ( 重量 / 重量 ) から成る、方法。

20

## 【請求項 3】

培養中の細胞から産生される組換え産物の収率を改善するための方法であって、前記培養への栄養補助剤の添加を含み、前記栄養補助剤は、組換えアルブミンとトランスフェリン関連タンパク質との混合物を含み、

前記組換えアルブミンは、i ) 植物中で産生され、i i ) アルブミン 1 m g 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、かつ i i i ) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、前記栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と前記組換えアルブミンとの比率 ( 重量 / 重量 ) から成る、方法。

## 【請求項 4】

バイオリアクター内で培養中の細胞の生存率を改善するための方法であって、前記バイオリアクター内での前記培養への栄養補助剤の添加を含み、前記栄養補助剤は、

組換えアルブミンとトランスフェリン関連タンパク質との混合物を含み、前記組換えアルブミンは、i ) 植物中で産生され、i i ) アルブミン 1 m g 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、かつ i i i ) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、前記栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と前記組換えアルブミンとの比率 ( 重量 / 重量 ) から成る、方法。

30

## 【請求項 5】

無血清培地中で成長する細胞の生存率を改善するための方法であって、前記無血清培地への栄養補助剤の添加を含み、前記栄養補助剤は、

組換えアルブミンとトランスフェリン関連タンパク質との混合物を含み、前記組換えアルブミンは、i ) 植物中で産生され、i i ) アルブミン 1 m g 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、かつ i i i ) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、前記栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と前記組換えアルブミンとの比率 ( 重量 / 重量 ) から成り、前記栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と前記組換えアルブミンとの比率 ( 重量 / 重量 ) から成る、方法。

40

## 【請求項 6】

50

前記培養中の細胞の生存率が増加する、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記栄養補助剤は、インスリンをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記栄養補助剤は、セレンおよびエタノールアミンをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞は、組織培養細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記細胞は、CHO 細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 11】

前記細胞は、ハイブリドーマ細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記タンパク質は、抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 13】

前記組換えアルブミンは、少なくとも約 0.01 重量 / 重量 % の熱ショックタンパク質を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記熱ショックタンパク質は、イネ熱ショックタンパク質である、請求項 13 に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記熱ショックタンパク質は、イネ HSP70 遺伝子と、イネ胚乳内腔結合タンパク質とから成る群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記熱ショックタンパク質は、イネ (gb|ACJ54890.1|) と、EEC69073/OsI\_37938 と、AAB63469 とから成る群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記トランスフェリン関連タンパク質は、ラクトフェリンである、請求項 13 に記載の方法。

30

【請求項 18】

前記トランスフェリン関連タンパク質は、トランスフェリンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

前記トランスフェリンと前記組換えアルブミンとの前記比率は、約 1 対 50 ~ 約 1 対 5000 である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ラクトフェリンは、組換えラクトフェリンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ラクトフェリンと前記組換えアルブミンとの前記比率は、約 1 対 3 ~ 約 1 対 0.3 である、請求項 20 に記載の方法。

40

【請求項 22】

細胞生存率における前記改善は、同一の培養条件下で測定される時に、単独で添加された場合の前記組換えアルブミンおよび前記トランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、30% より大きい、請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

組換えアルブミンとトランスフェリン関連タンパク質との混合物を含む栄養補助剤であって、前記組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1mg 当たり約 1EU 未満の内毒素を有し、かつ iii) 約 2% 未満の凝集アルブミンを有し、前記栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 の前記トランスフェリン関連タンパク質と

50

前記組換えアルブミンとの比率（重量／重量）から成る、栄養補助剤。

【請求項 24】

前記組換えアルブミンは、少なくとも約 0.01 重量／重量％の熱ショックタンパク質を含む、請求項 23 に記載の栄養補助剤。

【請求項 25】

前記熱ショックタンパク質は、イネ熱ショックタンパク質である、請求項 24 に記載の栄養補助剤。

【請求項 26】

前記熱ショックタンパク質は、イネ HSP70 遺伝子と、イネ胚乳内腔結合タンパク質とから成る群から選択される、請求項 24 に記載の栄養補助剤。

10

【請求項 27】

前記熱ショックタンパク質は、イネ（gb|ACJ54890.1|）と、EEC69073/OsI\_37938 と、AAB63469 とから成る群から選択される、請求項 24 に記載の栄養補助剤。

【請求項 28】

前記栄養補助剤は、少なくとも約 0.04 重量／重量％の HSP70 を含む、請求項 24 に記載の栄養補助剤。

【請求項 29】

前記トランスフェリン関連タンパク質は、ラクトフェリンである、請求項 24 に記載の栄養補助剤。

20

【請求項 30】

前記トランスフェリン関連タンパク質は、トランスフェリンである、請求項 24 に記載の栄養補助剤。

【請求項 31】

前記トランスフェリンと前記組換えアルブミンとの前記比率は、約 1 対 50 ～ 約 1 対 5000 である、請求項 30 に記載の栄養補助剤。

【請求項 32】

前記ラクトフェリンと前記組換えアルブミンとの前記比率は、約 1 対 3 ～ 約 1 対 0.3 である、請求項 31 に記載の栄養補助剤。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質の組み合わせを含有する細胞培養培地、ならびにそれらの細胞培養培地を作製する方法、および培養細胞の成長特性を改善するためにそれらの細胞培養培地を使用する方法に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2009 年 2 月 20 日に出願された、米国特許仮出願第 61,154,204 号の利益を主張し、その全体の内容が、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

40

【0003】

細胞培養技術は、組織から除去された動物または植物細胞が、適切な栄養素および状況を提供された時に成長することを可能にする。細胞は分裂することができ、栄養枯渇または毒性蓄積等の培養変数によって制限されるまで成長し続けることができる（Butler, M. & Jenkins, H., "Nutritional aspects of growth of animal cells in culture," J of Biotechnol. (1989) 12:97-110）。細胞培養技術は、細胞の通常の生理学または生化学の研究（Balaban, B. & Urman, B., "Embryo culture as a diagnostic tool," Reprod. Biomed. Online (2003) 7(6):671-82）、特定の細胞型

50

への多様な化学化合物または薬物の効果を試験すること (Farkas, D. & Tannenbaum, S. R., "In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: a literature review," *Curr. Drug Metab.* (2005) 6 (2): 111 - 25)、人工組織を生み出すために、多様な細胞型の逐次的または同時の組み合わせを研究すること (Wang et al., "Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes," *Biomaterials* (2006))、ならびに大規模の細胞培養物から有益な生物製剤を合成すること (Zeilinger et al., "Three-dimensional co-culture of primary human liver cells in bioreactors for in vitro drug studies: effects of the initial cell quality on the long-term maintenance of hepatocyte-specific functions," *Altern. Lab Anim.* (2002) 30 (5): 525 - 38)を含む多数の適用を有する。細胞培養技術はまた、体外受精 (Blake et al., "Protein supplementation of human IVF culture media," *J Assist. Reprod. Genet.* (2002) 19 (3): 137 - 43、Bungum et al., "Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF: a prospective randomized study," *Reprod. Biomed. Online* (2002) 4 (3): 233 - 6)幹細胞研究 (Conley et al., "Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells," *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2004) 36 (4): 555 - 67)、ワクチン産生 (Chuang et al., "Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human albumin," *Pharm. Res.* (2002) 19 (5): 569 - 77、GlaxoSmithKline, HAVRIX (登録商標) (Hepatitis A Vaccine, Inactivated) - Prescribing Information (2005)、[http://us.gsk.com/products/assets/us\\_havrix.pdf](http://us.gsk.com/products/assets/us_havrix.pdf)から入手可能、Innis et al., "Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine," *JAMA* (1994) 271 (17): 1328 - 34、Merck, PROQUAD (登録商標) - Measles, Mumps, Rubella, and Varicella (Oka/Merck) Virus Vaccine Live - Prescribing Information (2005)、[http://www.merck.com/product/usa/pi\\_circulars/p/proquad/proquad\\_pi.pdf](http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/p/proquad/proquad_pi.pdf)から入手可能、Litwin, J., "The growth of Vero cells in suspension as cell-aggregates in serum-free media," *Cytotechnology* (1992) 10 (2): 169 - 74)、人工皮膚を含む組織工学 (Atala, A., "Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineering," *Urol. Clin. North Am.* (1999) 26 (1): 157 - 65, ix-x、Sher, et al., "Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation," *J Biol. Chem.* (2006) 281 (8): 5178 - 87)、およ

び臓器 (Neronov et al., "Integrity of endothelium in cryopreserved human cornea," Cryo Letters (2005) 26 (2): 131 - 6、Han, et al., "Interleukin-1 alpha-induced proteolytic activation of metalloproteinase-9 by human skin," Surgery (2005) 138 (5): 932 - 9)、ならびに遺伝子および細胞療法 (Chadd, H. E. & Chamow, S. M., "Therapeutic antibody expression technology," Curr. Opin. Biotechnol. (2001) 12 (2): 188 - 94) にも使用されている。

10

#### 【0004】

生物製剤は、広範囲の細胞産物を包含し、増殖のために動物細胞を必要とする特定のタンパク質またはウイルスを含む。例えば、モノクローナル抗体等の治療用タンパク質は、大規模培養で遺伝子操作された細胞を生育させることによって、大量に合成することができる (Dewar et al., "Industrial implementation of in vitro production of monoclonal antibodies, Ilar J (2005) 46 (3): 307 - 13)。そのような商業的に有益な生物製剤の数は、過去10年で急速に増加しており、哺乳類細胞培養科学技術への現在の広範な関心につながっている (Mizrahi, A., "Biologicals produced from animal cells in culture-an overview," Biotechnol. Adv. (1988) 6 (2): 207 - 20)。

20

#### 【0005】

上の適用のいずれにおいても、細胞培養を使用する主な利点は、クローン細胞のバッチを使用することで得ることができる結果の一貫性および再生産性である。特に大規模での細胞培養の必要性は、ウイルスワクチンの必要性とともに明らかになった。1940年代および1950年代の大規模なポリオの流行によって、効果的なワクチンの開発努力が奨励された。1949年、ポリオウイルスがヒト細胞の培養物中で成長可能であることが示され、それは、細胞培養を使用する大量のポリオワクチンの開発への重要な関心につながった (Ligon, B. L., "Thomas Huckle Weller MD: Nobel Laureate and research pioneer in poliomyelitis, Varicella-zoster virus, cytomegalovirus, rubella, and other infectious diseases," Semin. Pediatr. Infect. Dis. (2002) 13 (1): 55 - 63)。不活性ウイルスから産生されたポリオワクチンは、動物培養細胞の最初の商用産物の1つとなった (Furesz, J., "Developments in the production and quality control of poliovirus-Historical perspectives," Biologicals (2006))。

30

#### 【0006】

動物由来細胞培養培地成分の使用に関連する安全性および道徳的配慮によって、細胞培養培地および培地成分に対する代替源を提供する努力がされている。

40

#### 【0007】

2006年6月28日に出願された、米国仮出願第60/694,236号に基づいた、公開PCT出願第WO2007/002762号は、植物細胞を使用する細胞培養培地の成分の組換え生産、およびそのような組換えタンパク質を含有する細胞培養培地に関する。この出願の全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

したがって、細胞培養中に使用された時に、培養細胞の改善された成長および/または

50

生産性をもたらす、タンパク質成分の組み合わせを含有する細胞培養培地または培地栄養補助剤を提供することが、本発明の目的である。

【0009】

本発明の一実施形態は、細胞培養培地基材と、成長因子、ラクトフェリン、トランスフェリン、アルブミン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、およびアルファラクトアルブミンから成る群から選択される2つ以上のタンパク質とを含む、細胞培養培地である。

【0010】

本発明のさらに別の実施形態は、細胞培養培地基材と、アルブミンと、成長因子、ラクトフェリン、トランスフェリン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、およびアルファラクトアルブミンから成る群から選択される少なくとも1つの追加のタンパク質とを含む、細胞培養培地である。

【0011】

さらなる実施形態によると、細胞培養培地中に提供され得る成長因子は、上皮細胞成長因子、ケラチノサイト成長因子、インスリン様成長因子、腸トレフォイル因子、形質転換成長因子、顆粒球コロニー刺激因子、神経成長因子、および線維芽細胞成長因子から成る群から選択される。

【0012】

本発明の別の実施形態は、細胞培養培地基材と、ラクトフェリンと、上皮細胞成長因子、ケラチノサイト成長因子、インスリン様成長因子、腸トレフォイル因子、形質転換成長因子、顆粒球コロニー刺激因子、神経成長因子、線維芽細胞成長因子、トランスフェリン、アルブミン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、およびアルファラクトアルブミンから成る群から選択される少なくとも1つの追加のタンパク質を含む、細胞培養培地である。

【0013】

さらなる実施形態によると、細胞培養培地中に含有されるタンパク質は、組換えタンパク質、好ましくは、組換えヒトタンパク質である。またさらなる実施形態によると、細胞培養培地中のタンパク質の1つ以上が、植物産生された異種タンパク質であり、好ましくは、細胞培養培地中のタンパク質の2つ以上が、植物産生された異種タンパク質であり、より好ましくは、細胞培養培地中のタンパク質の全てが、植物産生された異種タンパク質である。

【0014】

さらなる実施形態によると、細胞培養培地中に提供され得るタンパク質の好ましい組み合わせは、ラクトフェリンおよびアルブミンを含む。

【0015】

本発明の別の実施形態は、補充細胞培養培地を産生するための方法を提供し、細胞培養培地基材を提供すること、成長因子、ラクトフェリン、トランスフェリン、アルブミン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、およびアルファラクトアルブミンから成る群から選択される2つ以上のタンパク質を提供すること、ならびに補充細胞培養培地を形成するために、2つ以上のタンパク質を細胞培養培地基材と組み合わせることを含む。

【0016】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態によると、細胞培養培地を産生するための方法で使用されるタンパク質は、組換えタンパク質、好ましくは、組換えヒトタンパク質である。またさらなる実施形態によると、細胞培養培地を産生するための方法で使用されるタンパク質の1つ以上が、植物産生された異種タンパク質、好ましくは、細胞培養培地を産生するための方法で使用されるタンパク質の2つ以上が、植物産生された異種タンパク質、より好ましくは、細胞培養培地を産生するための方法で使用されるタンパク質の全てが、植物産生された異種タンパク質である。

【0017】

さらなる実施形態によると、細胞培養培地を産生する方法で提供され得る成長因子は、上皮細胞成長因子、ケラチノサイト成長因子、インスリン様成長因子、腸トレフォイル因子、形質転換成長因子、顆粒球コロニー刺激因子、神経成長因子、および線維芽細胞成長因子から成る群から選択される。

10

【0018】

さらなる実施形態によると、細胞培養培地を産生する方法で使用され得るタンパク質の好ましい組み合わせは、ラクトフェリンおよびアルブミンを含む。

【0019】

本発明の別の実施形態は、細胞を培養するための方法を提供し、細胞培養培地基材を提供すること、補充細胞培養培地を形成するために、細胞培養培地基材を、成長因子、ラクトフェリン、トランスフェリン、アルブミン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、およびアルファラクトアルブミンから成る群から選択される2つ以上のタンパク質で補充すること、ならびに培養すべき細胞を補充細胞培養培地内に導入することを含む。補充細胞培養培地中で成長する細胞は、非補充細胞培養培地中で成長する細胞と比較して、改善された成長特性を示す。

20

【0020】

さらなる実施形態によると、細胞を培養するための方法で使用されるタンパク質は、組換えタンパク質、好ましくは、組換えヒトタンパク質である。またさらなる実施形態によると、細胞を培養するための方法で使用されるタンパク質の1つ以上が、植物産生された異種タンパク質、好ましくは、細胞を培養するための方法で使用されるタンパク質の2つ以上が、植物産生された異種タンパク質、より好ましくは、細胞を培養するための方法で使用されるタンパク質の全てが、植物産生された異種タンパク質である。

30

【0021】

さらなる実施形態によると、細胞を培養するための方法で使用され得る成長因子は、上皮細胞成長因子、ケラチノサイト成長因子、インスリン様成長因子、腸トレフォイル因子、形質転換成長因子、顆粒球コロニー刺激因子、神経成長因子、および線維芽細胞成長因子から成る群から選択される。

【0022】

さらなる実施形態によると、細胞を培養する方法で使用され得るタンパク質の好ましい組み合わせは、ラクトフェリンおよびアルブミンを含む。

40

【0023】

本発明のさらなる態様は、本発明の細胞培養培地中の培養細胞を培養することによる、培養細胞の改善された成長速度、および培養細胞のより高い生産性を達成するための方法を含む。

【0024】

別の実施形態では、本発明には、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含む栄養補助剤が含まれ、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン1mgあたり約1EU未満の内毒素を有し、ならびにiii) 約2%未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約1対5, 000~約1対0.5のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率から成る。

50



## 【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、本発明には、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含む栄養補助剤が含まれ、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 m g 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 1 0 0 , 0 0 0 ~ 約 1 対 1 , 0 0 0 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

## 【 0 0 2 6 】

特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0 . 0 1 重量 / 重量 % の熱ショックタンパク質を含む。本実施形態の態様では、熱ショックタンパク質は、イネ熱ショックタンパク質である。別の態様では、熱ショックタンパク質は、イネ H S P 7 0 遺伝子およびイネ胚乳内腔結合タンパク質から成る群から選択される。別の態様では、熱ショックタンパク質は、イネ ( g b | A C J 5 4 8 9 0 . 1 | ) 、 E E C 6 9 0 7 3 / O s I \_ 3 7 9 3 8 、および A A B 6 3 4 6 9 から成る群から選択される。

10

## 【 0 0 2 7 】

特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0 . 0 1 重量 / 重量 % の H S P 7 0 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0 . 0 4 重量 / 重量 % の H S P 7 0 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0 . 0 6 重量 / 重量 % の H S P 7 0 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0 . 0 8 重量 / 重量 % の H S P 7 0 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0 . 1 重量 / 重量 % の H S P 7 0 を含む。

20

## 【 0 0 2 8 】

特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリン関連タンパク質は、ラクトフェリンである。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリン関連タンパク質は、トランスフェリンである。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、ラクトフェリンは、ヒトである。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、トランスフェリンは、ヒトである。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、ラクトフェリンは、組換え体である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、ラクトフェリンは、血漿に由来する。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、トランスフェリンは、組換え体である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、トランスフェリンは、血漿に由来する。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、I G F - 1 は、ヒトである。特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、I G F - 1 は、組換え体である。

30

## 【 0 0 2 9 】

特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 5 0 ~ 約 1 対 2 0 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、の比率トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 7 5 ~ 約 1 対 1 8 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 8 0 ~ 約 1 対 1 2 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 5 0 ~ 約 1 対 1 0 0 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 5 0 ~ 約 1 対 2 0 0 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 5 0 ~ 約 1 対 3 0 0 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 5 0 ~ 約 1 対 4 0 0 0 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 5 0 ~ 約 1 対 5 0 0 0 である。

40

## 【 0 0 3 0 】

特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 3 ~ 約 1 対 0 . 3 3 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別

50

の態様では、ラクトフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 0.5 ~ 約 1 対 2 である。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 0.8 ~ 約 1 対 1.2 である。

【0031】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞の細胞成長を高めるための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

10

【0032】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞の細胞成長を高めるための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100,000 ~ 約 1 対 1,000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0033】

別の実施形態では、本発明は、無血清培地への栄養補助剤の添加を含む、無血清培地に適応された細胞の生産性を高めるための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

20

【0034】

別の実施形態では、本発明は、無血清培地への栄養補助剤の添加を含む、無血清培地に適応された細胞の生産性を高めるための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100,000 ~ 約 1 対 1,000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

30

【0035】

別の実施形態では、本発明は、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内の乳酸塩の蓄積を低減するための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0036】

別の実施形態では、本発明は、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内の乳酸塩の蓄積を低減するための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100,000 ~ 約 1 対 1,000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

40

【0037】

別の実施形態では、本発明は、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内のブドウ糖および他の糖の消費を低減するための方法を含

50

み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0038】

別の実施形態では、本発明は、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内のブドウ糖および他の糖の消費を低減するための方法を含み、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 1 0 0 , 0 0 0 ~ 約 1 対 1 , 0 0 0 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0039】

別の実施形態では、本発明には、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内での培養の開始から採取まで、タンパク質を産生するのに必要とされる時間を削減する方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0040】

別の実施形態では、本発明には、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内での培養の開始から採取まで、タンパク質を産生するのに必要とされる時間を削減する方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 1 0 0 , 0 0 0 ~ 約 1 対 1 , 0 0 0 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0041】

別の実施形態では、本発明には、バイオリアクターへの栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内の細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1 対 0 . 5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0042】

別の実施形態では、本発明には、バイオリアクターへの栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内の細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 1 0 0 , 0 0 0 ~ 約 1 対 1 , 0 0 0 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0043】

別の実施形態では、無血清培地への栄養補助剤の添加を含む、本発明には、無血清条件下で成長する細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5 , 0 0 0 ~ 約 1

対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 4 4 】

別の実施形態では、本発明には、無血清培地への栄養補助剤の添加を含む、無血清条件下で成長する細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100, 000 ~ 約 1 対 1, 000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 4 5 】

別の実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、低密度で蒔かれる時に細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5, 000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、低密度で蒔かれる時に細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100, 000 ~ 約 1 対 1, 000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 4 7 】

別の実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、単細胞クローンから培養される細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5, 000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 4 8 】

別の実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、単細胞クローンから培養される細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100, 000 ~ 約 1 対 1, 000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 4 9 】

別の実施形態では、本発明には、培養培地への栄養補助剤の添加を含む、培養中で成長する初代細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 E U 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5, 000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率（重量 / 重量）から成る。

【 0 0 5 0 】

別の実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、培養中で成長する初代細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブ

10

20

30

40

50

ミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100,000 ~ 約 1 対 1,000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0051】

別の実施形態では、本発明には、トランスフェクションの前、最中、または直後の細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、トランスフェクション後の細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

10

【0052】

別の実施形態では、本発明には、トランスフェクションの前、最中、または直後の細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、トランスフェクション後の細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100,000 ~ 約 1 対 1,000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

20

【0053】

別の実施形態では、本発明には、凍結保存もしくは解凍の前、最中、または直後の細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、凍結保存後の細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、および iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

【0054】

別の実施形態では、本発明には、凍結保存もしくは解凍の前、最中、または直後の細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、凍結保存後の細胞の生存率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100,000 ~ 約 1 対 1,000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。

30

【0055】

別の実施形態では、培養への栄養補助剤の添加を含む、本発明には、培養中の細胞から産生される組換え産物の収率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 5,000 ~ 約 1 対 0.5 のトランスフェリン関連タンパク質とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。本方法の一態様では、細胞培養物の生存率が増加する。本方法の一態様では、産物は、タンパク質または細胞内細菌である。別の態様では、タンパク質は、抗体である。一態様では、タンパク質は、組換えタンパク質であり、別の態様では、タンパク質は、単量体であり、別の態様では、タンパク質は、多量体タンパク質であり、別の態様では、抗体は、全長である。別の態様では、抗体は、一本鎖抗体である。

40

【0056】

別の実施形態では、本発明には、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から

50

産生される組換え産物の収率を改善するための方法が含まれ、栄養補助剤は、組換えアルブミンおよびインスリン関連成長因子の混合物を含み、組換えアルブミンは、i) 植物中で産生され、ii) アルブミン 1 mg 当たり約 1 EU 未満の内毒素を有し、ならびに iii) 約 2 % 未満の凝集アルブミンを有し、栄養補助剤は、約 1 対 100, 000 ~ 約 1 対 5, 000 のインスリン関連成長因子とアルブミンとの比率 (重量 / 重量) から成る。本方法の一態様では、細胞培養物の生存率が増加する。本方法の一態様では、産物は、タンパク質または細胞内細菌である。別の態様では、タンパク質は、抗体である。一態様では、タンパク質は、組換えタンパク質であり、別の態様では、タンパク質は、単量体であり、別の態様では、タンパク質は、多量体タンパク質であり、別の態様では、抗体は、全長である。別の態様では、抗体は、一本鎖抗体である。

10

#### 【0057】

これらの方法のいずれかの一態様では、栄養補助剤は、インスリンをさらに含む。これらの方法のいずれかの一態様では、栄養補助剤は、IGF-1 をさらに含む。別の態様では、栄養補助剤は、セレンおよびエタノールアミンをさらに含む。

#### 【0058】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞は、組織培養細胞である。別の態様では、細胞は、CHO 細胞である。別の態様では、細胞は、ハイブリドーマ細胞である。別の態様では、細胞は、ペロ細胞である。別の態様では、細胞は、フローサイトメトリーで選別される。別の態様では、細胞は、初代細胞である。一態様では、初代細胞は、胚性幹細胞である。別の態様では、初代細胞は、B 細胞由来である。別の態様では、細胞初代細胞は、T 細胞由来である。別の態様では、細胞は、B 細胞であるか B 細胞由来である。別の態様では、細胞は、T 細胞であるか T 細胞由来である。別の態様では、細胞は、別の態様では、細胞は、マイクロ流体素子で単離される。別の態様では、細胞は、単細胞サブクロニングで単離される。

20

#### 【0059】

特許請求される方法のいずれかの一態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0.01 重量 / 重量 % の熱ショックタンパク質を含む。本実施形態の態様では、熱ショックタンパク質は、イネ熱ショックタンパク質である。別の態様では、熱ショックタンパク質は、イネ HSP70 遺伝子およびイネ胚乳内腔結合タンパク質から成る群から選択される。別の態様では、熱ショックタンパク質は、イネ (gb|ACJ54890.1|)、EEC69073/OsI\_37938、および AAB63469 から成る群から選択される。

30

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0.01 重量 / 重量 % の HSP70 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0.04 重量 / 重量 % の HSP70 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0.06 重量 / 重量 % の HSP70 を含む。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0.08 重量 / 重量 % の HSP70。別の態様では、組換えアルブミンは、少なくとも約 0.1 重量 / 重量 % の HSP70 を含む。

#### 【0060】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリン関連タンパク質は、ラクトフェリンである。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリン関連タンパク質は、トランスフェリンである。特許請求される方法のいずれかの一態様では、ラクトフェリンは、ヒトである。特許請求される方法のいずれかの一態様では、トランスフェリンは、ヒトである。特許請求される方法のいずれかの一態様では、ラクトフェリンは、組換え体である。特許請求される方法のいずれかの一態様では、トランスフェリンは、組換え体である。

40

#### 【0061】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 50 ~ 約 1 対 200 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 75 ~ 約 1 対 180 である。特許請

50

求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 80 ~ 約 1 対 120 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 120 ~ 約 1 対 200 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 200 ~ 約 1 対 1,000 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 1,000 ~ 約 1 対 2,000 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 2,000 ~ 約 1 対 3,000 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 3,000 ~ 約 1 対 4,000 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 4,000 ~ 約 1 対 5,000 である。

10

**【0062】**

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 3 ~ 約 1 対 0.33 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 0.5 ~ 約 1 対 2 である。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンとアルブミンとの比率は、約 1 対 0.8 ~ 約 1 対 1.2 である。

**【0063】**

ラクトフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンは、約 100 mg / L ~ 400 mg / L の終末濃度に添加される。ラクトフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンは、約 400 mg / L ~ 800 mg / L の終末濃度に添加される。ラクトフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンは、約 800 mg / L ~ 1000 mg / L の終末濃度に添加される。ラクトフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、ラクトフェリンは、約 1000 mg / L ~ 2000 mg / L の終末濃度に添加される。

20

**【0064】**

トランスフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンは、約 1  $\mu$ g / L ~ 50  $\mu$ g / L の終末濃度に添加される。トランスフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンは、約 2  $\mu$ g / L ~ 10  $\mu$ g / L の終末濃度に添加される。トランスフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンは、約 3  $\mu$ g / L ~ 8  $\mu$ g / L の終末濃度に添加される。トランスフェリンを含む特許請求される方法のいずれかの別の態様では、トランスフェリンは、約 4  $\mu$ g / L ~ 6  $\mu$ g / L の終末濃度に添加される。

30

**【0065】**

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、組換えアルブミンは、約 100 mg / L ~ 2000 mg / L の終末濃度に添加される。特許請求される方法のいずれかの別の態様では、組換えアルブミンは、約 200 mg / L ~ 1000 mg / L の終末濃度に添加される。

**【0066】**

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、30%より大きい。

40

**【0067】**

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、40%より大きい。

**【0068】**

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、50%より大きい。

50

## 【 0 0 6 9 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、60%より大きい。

## 【 0 0 7 0 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で測定される時、組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、70%より大きい。

## 【 0 0 7 1 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、80%より大きい。

10

## 【 0 0 7 2 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、90%より大きい。

## 【 0 0 7 3 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、100%より大きい。

20

## 【 0 0 7 4 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、150%より大きい。

## 【 0 0 7 5 】

特許請求される方法のいずれかの別の態様では、細胞の生存率における改善は、同一の培養条件下で単独で添加された場合の組換えアルブミンまたはトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、200%より大きい。

## 【 0 0 7 6 】

本発明の他の新規特性および利点は、以下を検討すると、または本発明の実践により学ぶ際に、当業者に明らかになるであろう。

30

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 7 7 】

本発明、それによって満たされる必要性、ならびにその目的、特性、および利点のより完全な理解のために、ここで、添付図面に関連して行われる以下の説明を参照する。

【 図 1 】 コドン最適化ヒトラクトフェリン配列 (「 c o d o p t l a c 」) と天然ヒトラクトフェリン配列 (「 n a t i v e l a c 」) の比較であり、413 (59.6%) のコドン変化および467 (22.5%) のヌクレオチド変化を伴って、693コドンを示すように整列される。

【 図 2 】 5,817bp プラスミドである A P I 1 6 4 ( G T 1 - L a c ) プラスミドマップであり、ヒトラクトフェリンへの発現カセットを示し、G t 1 プロモーター、G t 1 シグナルペプチド、コドン最適化ヒトラクトフェリン、N o s ターミネータ、およびカナマイシン耐性選択可能なマーカーを含有する。

40

【 図 3 】 組換えヒトラクトフェリンの発現に関する S D S - P A G E 分析の結果を示す。イネ種子抽出物からの総タンパク量をラエムリ試料緩衝液中に懸濁し、勾配ゲルで実行し、クマシーブルーで染色した。レーン 1 は、分子量マーカーである。レーン 3 ~ 6 は、精製ヒト由来ラクトフェリンである ( S i g m a C h e m i c a l , U S A ) 。レーン 8 ~ 13 は、ホモ接合性の独立した遺伝子組換えイネ系統からの単一種子抽出物であり、レーン 14 は、非形質転換イネ品種 T a i p e i 3 0 9 からの種子抽出物である。

【 図 4 】 R<sub>2</sub> から R<sub>10</sub> 世代の遺伝子組換え米穀粒中の組換えヒトラクトフェリンの安定

50



発現である。1 gの玄米粉からの総可溶性タンパク量を40 mLの抽出緩衝液で抽出し、遠心分離で浄化した。抽出物を、ELISAによって分析した。抽出を3回繰り返し、標準偏差がエラーバーとして示される。

【図5】Gt1シグナルペプチド(Gt1 SP)とP02768(スイスプロット)に由来する天然タンパク質配列に基づくコドン最適化ヒトアルブミン(最適化HSA)配列との間の融合のDNAおよびタンパク質配列を示す。

【図6】5,496 bpプラスミドであるAPI504(GT1-HSA)のプラスミドマップであり、ヒトアルブミンへの発現カセットを示し、Gt1プロモーター、Gt1シグナルペプチド、コドン最適化ヒトアルブミン、Nostターミネータ、およびカナマイシン耐性選択可能なマーカーを含有する。

【図7】12,388 bpプラスミドであるAPI508(JH/GT1-HSA)のプラスミドマップであり、ヒト血清アルブミン(HSA)への発現カセットを示し、Gt1プロモーター、Gt1シグナルペプチド、コドン最適化ヒトアルブミン、Nostターミネータ、およびカナマイシン耐性選択可能なマーカーを含有する。

【図8】アルブミンの他の供給源および精製の方法と比較した、イネから産生された組換えHSAのHPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる比較を示す。図8Aは、血清由来(非組換えHSA)に対するクロマトグラムを示す。図8Bは、精製のために「旧式の方法」B000を用いて作製されたイネ組換えHSA(Cellastim P0107)に関するクロマトグラムを示す。図8Cは、精製のために「新規の方法」B0000Cを用いて作製されたイネ組換えHSA(Cellastim P0171)に関するクロマトグラムを示す。図8Dは、血清由来アルブミン(1A、点線)および新規の方法を用いて調製されたCellastim HSA(1C、実線)に関するクロマトグラムのオーバーレイを示す。図8Eは、旧式の方法B000を用いて調製されたHSA(Cellastim P0107)(1B、点線)および新規の方法B0000Cを用いて調製されたHSA(Cellastim P0171)(1C、実線)に関するクロマトグラムのオーバーレイを示す。

【図9】HSAの他の供給源および精製の方法と比較した、イネから産生された組換えアルブミンのSDS PAGE分析による比較を示す。図9Aは、Cellastim P0171アルブミンおよびCellprimeアルブミン(Millipore/Novozymes)の比較を示す。レーン1は、分子量マーカーである。レーン4は、Cellastimアルブミン(10 µg)であり、レーン7は、Cellprimeアルブミン(10 µg)である。図9Bは、以前の方法(B000)(レーン2、3、および4)ならびにCellastimの新規の方法(B0000C)(レーン6、7、および8)からの3つのCellastimロットのSDS PAGE分析による比較を示す。1レーンにつき20 µgで、6つの試料を装填した。

【図10】：酵母組換えHSA(Cellprime)、ヒト血漿由来HSA(Seracare)、および植物組換えHSA(Cellastim P0171)の、細胞成長および生存率を促進するそれらの能力に関する、効果の比較を示す。(図10A)。図10Bは、組換えアルブミン産生のための、旧式の方法(B000)および新規の方法(B0000C)を用いて産生されたアルブミンの内毒素量の比較を示す。図10Cは、組換えアルブミン産生のための、旧式の方法(B000)および新規の方法(B0000C)を用いて産生されたCellastim HSAの存在下で成長した細胞の細胞成長および生存率の比較を示す。

【図11】：植物由来組換えHSAが、ATPアフィニティークラムによって選択的に濃縮され(レーン4および9)、抗HSP抗体に対して反応することができるタンパク質を含むことを示す、2つの独立した実験のウエスタンブロット法を示す。レーン3および7は、10 µgの出発原料を示し、レーン4および9は、ATPアフィニティークラムからの溶出および濃縮後の画分を示し、レーン5および8は、溶出後におけるATPでの洗浄を示し、レーン10は、hsp正の対照である。(詳細については、実施例9を参照)。

【図12】：熱ショックタンパク質を除去するために、ATPアフィニティークラム上で

10

20

30

40

50

新規の方法を用いて産生されたアルブミンを通過させた後の、Cell lastim組換えアルブミンの細胞成長および生存率の効果の比較を示す。(詳細については、本文を参照)。

【図13】: 培養中のハイブリドーマ細胞による抗体の産生への、トランスフェリン(pTF)との組み合わせの血漿由来ヒト血清アルブミン(pHSA)の同一の濃度と比較した、トランスフェリン(pTF)との組み合わせの1g/Lの組換え植物由来ヒト血清アルブミン(rHSA)の効果の比較を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0078】

定義

本開示がより容易に理解され得るために、ある特定の用語をまず定義する。詳細説明を通してさらなる定義を説明する。別途示されない限り、本明細書で使用される全ての用語は、下に提供される意味を有するか、または通常、本発明の当業者にとって、該用語が有する同一の意味と一致する。実践者は、当分野の定義および用語に関して、特に、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., Ausubel FM et al. (1993), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., および Gelvin and Schilperoot, eds. (1997) Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands を参照されたい。

【0079】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値に対する許容可能な誤差の範囲内を意味し、値がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの制限に依存する。例えば、「約」は、当分野における実践に従い、1または1を超える標準偏差以内を意味することができる。あるいは、組成物に対する「約」は、20%以下、好ましくは、10%以下、より好ましくは、5%以下のプラスまたはマイナス範囲を意味することができる。

【0080】

「抗原結合フラグメント」という用語は、抗原に結合するか、もしくは抗原結合(すなわち、特異結合)に対して、無傷抗体と(すなわち、それらが由来する無傷抗体と)競合する、免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチド部分を指す。結合フラグメントは、組換えDNA技術によって、または無傷免疫グロブリンの酵素もしくは化学分解によって産生することができる。結合フラグメントには、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、一本鎖、および一本鎖抗体が含まれる。

【0081】

「アポトーシス」(「正常な」または「プログラム化された」細胞死)という用語は、不要もしくは無用な細胞が、発達および他の通常の生物過程の間に排除される、生理学的過程を指す。アポトーシスは、正常な生理学的条件下で発生する細胞死の様式であり、細胞は、それ自身の死亡における積極的な参与物である(「細胞自殺」)。これは、ほとんどの場合、正常な細胞回転および組織の恒常性、胚形成、免疫寛容の誘導ならびに維持、神経系および内分泌依存性組織萎縮の進行中に見出される。アポトーシスはまた、ストレスに反応して、組織培養条件下で成長する細胞内で誘発され得る。アポトーシスを経験する細胞は、特徴的な形態学および生化学的特性を示し、容易に測定ならびに定量化することができる。これらの特性には、クロマチン凝集、細胞核および細胞質凝縮、リボソームを含有する膜結合小胞(アポトーシス小体)への細胞質および細胞核の分割、形態学的に無傷のミトコンドリアならびに核物質が含まれる。生体内において、これらのアポトーシス小体は、マクロファージまたは隣接する上皮細胞のいずれかによって、急速に認識さ

10

20

30

40

50

れ、貪食される。生体内でのアポトーシス細胞の除去のためのこの効率的な機構のおかげで、炎症反応は誘発されない。生体外において、アポトーシス小体、ならびに残存する細胞片は、最終的に肥大し、最終的に溶解する。生体外細胞死のこの末期は、「二次壊死」と称されている。

#### 【0082】

本明細書で使用される「1つの細胞」、「複数の細胞」、「1つの細胞株」、「宿主細胞」、および「複数の宿主細胞」という用語は、互換可能に使用され、植物および動物細胞を包含し、無脊椎動物、非哺乳類脊椎動物、ならびに哺乳類細胞を含む。全てのそのような名称には、細胞集団および子孫が含まれる。したがって、「形質転換細胞」および「トランスフェクタント」という用語には、転移の回数に関係なく、一次対象細胞およびそれに由来する細胞株が含まれる。例示的な非哺乳類脊椎動物細胞には、例えば、鳥の細胞、爬虫類の細胞、および両生類の細胞が含まれる。例示的な無脊椎動物細胞には、例えば、毛虫（ヨトウガ）細胞、蚊（ネッタイシマカ）細胞、ミバエ（キイロショウジョウバエ）細胞、シュナイダー細胞、およびカイコ細胞等の昆虫細胞が含まれるが、それらに限定されない。例えば、Luckow et al., Bio/Technology 6: 47-55 (1988) を参照されたい。細胞、例えば、胚性幹細胞および多能性幹細胞を含む幹細胞は、分化され得るか、もしくは部分的に分化され得るか、または分化され得ない。さらに、臓器または臓器系に由来する組織試料は、本発明に従って使用されてもよい。例示的な哺乳類細胞には、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、マウス、ハムスター、ラット、およびテンジクネズミを含む齧歯類に由来する細胞、ならびにその派生物および子孫が含まれる。

10

20

#### 【0083】

「細胞培養物」または「組織培養物」という用語は、懸濁液中で成長する細胞、またはローラーボトル、組織培養フラスコ、ディッシュ、複数ウェルプレート等の容器内の多種多様の表面もしくは基質に接着して成長する細胞を指す。攪拌型発酵槽内のマイクロキャリアに付着して成長する接着細胞を含む、バイオリアクター等の大規模なアプローチもまた、「細胞培養物」という用語によって包含される。さらに、特許請求される本発明の方法において、接触依存的細胞を培養することのみならず、懸濁培養技術を使用することもまた可能である。例示的なマイクロキャリアには、例えば、デキストラン、コラーゲン、プラスチック、ゼラチン、およびセルロース、ならびにButler, Spier & Griffiths, Animal cell Biotechnology 3: 283-303 (1988) に記載される他のものが含まれる。例えば、Cytoline (商標) もしくはCytopore (商標) 等の多孔質担体、ならびにDEAE-デキストラン (Cytodex 1 (商標) 四級アミンコーティングデキストラン (Cytodex (商標)) 等のデキストランベースの担体、またはゼラチン被覆されたデキストラン (Cytodex 3 (商標)) 等のゼラチンベースの担体も使用されてもよい。タンパク質の大規模および小規模産生の両方に関する細胞培養手順が、本発明によって包含される。流動層バイオリアクター、中空繊維バイオリアクター、ローラーボトル培養、または攪拌槽型バイオリアクターシステムを含むが、それらに限定されない手順が、マイクロキャリアの有無に関わらず使用されてもよく、代案として、バッチ、フェドバッチ、または還流モードで操作されてもよい。

30

40

#### 【0084】

「1つの細胞培養培地」、「複数の細胞培養培地」、および「培養培地」という用語は、細胞および細胞株を培養、保存、処理、維持するために使用される溶液を指す。そのような溶液には、通常、細胞接着、成長、および細胞環境の維持のために必要な多様な因子が含まれる。例えば、典型的な溶液には、基礎培地製剤、細胞型に依存する多様な栄養補助剤、および時折、抗生物質が含まれ得る。いくつかの実施形態では、溶液には、以下の部類の1つ以上のうちの少なくとも1つの成分が含まれ得る：1) 通常、ブドウ糖等の炭水化物の形でエネルギー源、2) 全ての必須アミノ酸、ならびに通常、基本的な一組の20個のアミノ酸およびシスチン、3) 低濃度で必要とされるビタミンおよび/または他

50

の有機化合物、４）遊離脂肪酸、および５）非常に低い濃度、通常、マイクロモル範囲で典型的に必要とされる有機化合物もしくは自然発生元素として定義される微量元素。

【００８５】

溶液は、任意で、以下の部類のいずれかのうちの１つ以上の成分で補充され得る：１）例えば、インスリン、トランスフェリン、および上皮細胞成長因子等のホルモンおよび他の成長因子、２）例えば、カルシウム、マグネシウム、リン酸塩、トリス、ヘペス、および重炭酸ナトリウム等の塩および緩衝剤、３）例えば、アデノシン、チミジン、およびヒポキサンチン等のヌクレオシドおよび塩基、ならびに４）タンパク質および組織加水分解物。概して、任意の好適な細胞培養培地が使用され得る。培地には、例えば、ウシ胎仔血清または子牛血清等の血清が含まれ得る。あるいは、培地は、無血清であってもよく、無動物質を含まなくてもよく、または無タンパク質であってもよい。

10

【００８６】

「細胞培養培地成分」または「細胞培養成分」という用語は、細胞培養培地用の栄養補助剤として使用される任意の異種タンパク質を指す。

【００８７】

「細胞培養培地材料」という用語には、細胞培養培地成分、タンパク質、ペプチド、ホルモン、炭水化物、アミノ酸、脂質、ビタミン、抗生物質、有機塩、および無機塩が含まれる。

【００８８】

「細胞培養培地栄養補助剤」という用語は、細胞培養培地への添加に対して、他の材料の有無に関わらず、１つまたは複数の細胞培養培地成分の組み合わせを指す。

20

【００８９】

「細胞培養培地基材」または「基礎培地」という用語は、例えば、以下の成分のいずれかまたは全てを含有し得る細胞培養培地を指す：タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物、アミノ酸、有機および/または無機塩、緩衝剤（例えば、重炭酸塩）、ビタミン、ホルモン、抗生物質、およびpH指示薬（例えば、フェノールレッド）。本発明に従って使用することができる細胞培養培地基材の例には、ダルベッコ改変イーグル培地（DME）、ハム栄養混合物、MCD B培地、最小必須培地イーグル、RPMI培地、エームズ培地、BGJb培地（フィットンジャクソン改変）、クリック培地、CMRL-1066培地、フィッシャー培地、グラスゴー最小必須培地（GMEM）、イスコーブ改変ダルベッコ培地（IMDM）、L-15培地（Leibovitz）、マッコイ5A改変培地、NCTC培地、スィムS-77培地、ウェイマウス培地、およびウィリアム培地Eが挙げられる。細胞培養培地基材は、細胞培養培地成分または細胞培養培地栄養補助剤を用いて補充され得る。

30

【００９０】

幹細胞培養を参照する時の「細胞系統」という用語は、最初期の前駆細胞から完全な成熟細胞までの細胞型（すなわち、特殊化細胞）の発達の段階の全てを指す。

【００９１】

「細胞の生存率」または「生存率」という用語は、任意の所与の時間において細胞の集団に存在する、生細胞および死細胞の相対量を指す。細胞の生存率は、集団の任意の所与の試料における生細胞および死細胞の相対数を測定することによって決定され得る。細胞の生存率はまた、細胞成長の速度と細胞死の総合的なバランスを表す全集団の細胞成長の速度を測定することによって推定され得る。細胞成長の速度は、同様に、細胞を計数することによって、および細胞成長の速度を直接スコア化するいかなる市販の細胞増殖アッセイを使用することによっても、直接測定され得る。

40

【００９２】

「馴化培地」は、胚性幹細胞を多能性状態で培養および維持することができるフィーダー細胞の培養から得られる細胞培養培地を指す。フィーダー細胞は、いくつかの成分の馴化培地を枯渇させるが、同様に、恐らく少量の成長因子を含む細胞由来物質で培地を富化する。本明細書で使用される「フィーダー細胞因子」という用語は、フィーダー細胞によ

50

って馴化培地中に放出される細胞由来物質を意味する。細胞培養培地中に放出される細胞因子は、胚性幹細胞の成長を高めるのに、または多能性状態で胚性幹細胞を維持するのに有用である。当業者に知られており、本明細書に記載される技術を用いて、フィーダー細胞因子を特定および精製することができる。

【0093】

「保存アミノ酸置換」または「保存的突然変異」という語句は、共通の性質を有する別のアミノ酸による1つのアミノ酸の置換を指す。個々のアミノ酸間の共通の性質を定義するための機能的手段は、同種生物の対応するタンパク質間のアミノ酸変化の正規化された頻度を分析することである (Schulz, G. E. および R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。そのような分析に従って、アミノ酸が優先的に相互に交換し、したがって、総合的なタンパク質構造へのそれらの影響において最も相互に類似するように、アミノ酸の群を定義することができる (Schulz, G. E. および R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。

10

【0094】

このように定義されるアミノ酸群の例には、Glu、Asp、Asn、Gln、Lys、Arg、およびHisから成る「荷電/極性基」、Pro、Phe、Tyr、およびTrpから成る「芳香族基または環状基」、ならびにGly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Ser、Thr、およびCysから成る「脂肪族基」が挙げられる。

20

【0095】

各群内で、下位群を特定することもでき、例えば、荷電/極性アミノ酸の群を、Lys、Arg、およびHisから成る「正に荷電した下位群」、GluおよびAspから成る「負に荷電した下位群」、ならびにAsnおよびGlnから成る「極性下位群」から成る下位群に細分化することができる。芳香族基または環状基を、Pro、His、およびTrpから成る「窒素環下位群」、PheおよびTyrから成る「フェニル下位群」から成る下位群に細分化することができる。脂肪族基を、Val、Leu、およびIleから成る「大型の脂肪族非極性下位群」、Met、Ser、Thr、およびCysから成る「脂肪族弱極性下位群」、GlyおよびAlaから成る「小残基下位群」から成る下位群に細分化することができる。

30

【0096】

保存的突然変異の例には、例えば、正電荷を維持することができるように、LysをArgに、およびその逆、負電荷を維持することができるように、GluをAspに、およびその逆、遊離OHを維持することができるように、SerをThrに、遊離NH<sub>2</sub>を維持することができるように、GlnをAsnに、上の下位群内のアミノ酸の置換が挙げられる。

【0097】

「細胞毒性」という用語は、化学化合物（化学もしくはタンパク質汚染物質、界面活性剤、または毒素等）の細胞を死滅させる性質を指す。壊死およびアポトーシスとは対照的に、細胞毒性という用語は、必ずしも特定の細胞死機構を示す必要はない。

40

【0098】

本明細書で使用される「減少」という用語または「減少した」、「低減する」、または「低減した」という関連用語は、統計的に有意な減少を指す。誤解を避けるために、用語は、通常、所与のパラメータにおいて少なくとも10%の減少を指し、少なくとも20%の減少、30%の減少、40%の減少、50%の減少、60%の減少、70%の減少、80%の減少、90%の減少、95%の減少、97%の減少、99%またはさらに100%の減少（すなわち、測定されたパラメータはゼロである）を包含することができる。

【0099】

本明細書で使用される「発達」、「分化する」、および「成熟」という用語は、幹細胞を説明するために使用される際、少なくとも2つの異なる細胞系統に分化する可能性を有

50

する段階から、特定化および最終分化された細胞への、細胞の進行を指す。本出願の目的のために、そのような用語を互換可能に使用することができる。

【0100】

本明細書で使用される「発現」という用語は、宿主細胞内のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳を指す。宿主細胞中の所望の産物の発現レベルは、細胞中に存在する対応するmRNAの量、または選択配列によってコードされる所望のポリペプチドの量のいずれかに基づいて決定され得る。例えば、選択配列から転写されたmRNAを、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、リボヌクレアーゼRNA保護、細胞RNAへの原位置ハイブリダイゼーションによって、またはPCRによって定量化することができる。例えば、選択配列によってコードされるタンパク質を、ELISA、ウエスタンブロット法、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降、タンパク質の生物学的活性のためのアッセイ、またはタンパク質の免疫染色に続くFACS分析が含まれるが、それらに限定されない多様な方法で定量化することができる。

10

【0101】

「発現制御配列」は、宿主細胞内でコード配列の発現を提供するプロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化信号、ターミネータ、内部リボソーム侵入部位(IRES)等のDNA調節配列である。例示的な発現制御配列は、Goeddel、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)で説明される。

20

【0102】

「フィーダー細胞」という用語は、生体外で成長し、かつ少なくとも1つの因子を培養培地中に分泌し、培養中での対象となる別の細胞の成長を支持するために使用することができる細胞の培養物を指す。本明細書で使用する際、「フィーダー細胞層」を、「フィーダー細胞」という用語と互換可能に使用することができる。フィーダー細胞は、相互の上部に成長する前に培養ディッシュの表面を完全な層で被覆する単分子層を含むことができるか、または細胞のクラスターを含むことができる。

【0103】

細胞培養の「増殖期」という用語は、細胞が定速で分裂する指数関数的細胞成長(対数期)の期間を指す。この段階の間に、細胞は、ある期間、細胞成長が最大化されるような条件下で培養される。宿主細胞の成長周期の決定を、想起される特定の宿主細胞に対して、過度の実験なしで決定することができる。「ある期間、細胞成長が最大化されるような条件下で」等は、特定の細胞株に対して、細胞成長および分裂に最適であるように決定されるそれらの培養条件を指す。増殖期の間、特定の細胞株、例えば、哺乳類細胞に対して最適成長が達成されるように、細胞は、必要な添加物を含有する培養液中で、通常約30~40、一般的に約37で、湿気のある制御された雰囲気内で培養される。

30

【0104】

「異種DNA」という用語は、別の供給源に由来する細胞中に導入されたか、または同一の供給源からであるが、異なる(すなわち、非天然)環境に位置付けられるDNAを指す。「異種タンパク質」または「組換えタンパク質」という用語は、異種DNAによって全体的または部分的にコードされるタンパク質、または内因性遺伝子の発現を活性化する異種DNAによって全体的または部分的に作製される発現制御配列(プロモーターもしくはエンハンサー等)から発現されるタンパク質を指す。

40

【0105】

「相同的」という用語は、類似の機能もしくはモチーフで遺伝子またはタンパク質を特定するために使用される配列類似性の数学に基づく比較を説明する。本発明の核酸およびタンパク質配列を、例えば、他のファミリーメンバー、関連配列、または相同体を特定するため、公開データベースに対して検索を実行するために、「問い合わせ配列」として使用することができる。そのような検索を、Altschulら(1990)J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージ

50

ョン2.0)を用いて、実行することができる。本発明の核酸分子に対するヌクレオチド配列相同性を得るために、BLASTヌクレオチド検索をNBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で実行することができる。本発明のタンパク質分子に対するアミノ酸配列相同性を得るために、BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で実行することができる。比較目的としてギャップド整理を得るために、Altschulら(1997)Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402で説明されるように、ギャップドBLASTを利用することができる。BLASTならびにギャップドBLASTプログラムを利用する時、各々のプログラム(例えば、XBLASTおよびBLAST)の初期設定パラメータを使用することができる。

10

#### 【0106】

「相同性」という用語は、「共通の進化的起源」を有する2つのタンパク質間の関係を指し、それらのタンパク質は、同一種の動物におけるスーパーファミリー(例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー)からのタンパク質、ならびに異なる種の動物由来の相同性タンパク質を含む(例えば、ミオシン軽鎖ポリペプチド等、Reeck et al., Cell, 50:667, 1987を参照)。そのようなタンパク質(およびそれらのコード核酸)は、パーセント同一性の観点から、あるいは特定の残基もしくはモチーフならびに保存位置の存在による、それらの配列類似性によって反映される配列相同性を有する。

20

#### 【0107】

「成長因子」という用語は、アンフィレギュリン、アンジオポエチン、ベータセルリン(骨形態形成タンパク質-13、骨形態形成タンパク質-14、骨形態形成タンパク質-2、ヒトBMP-3、骨形態形成タンパク質-4、ヒトBMP-5、骨形態形成タンパク質-6、骨形態形成タンパク質-7、ヒトCD135リガンド/Flt-3リガンド、ヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ヒトマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、ヒトクリプト-1、ヒトCTGF(結合組織成長因子)、ヒトEGF(上皮増殖因子)、ヒトEG-VEGF(内分泌腺由来血管内皮成長因子)、ヒトエリスロポエチン(EPO)、ヒトFGF(線維芽細胞成長因子1-23)、ヒトGDF-11、ヒトGDF-15、ヒトGDF-8、ヒト成長ホルモン放出因子(GHRF、GRF、GHRH、成長ホルモン放出ホルモン)、ヘパリン結合性上皮増殖因子(HB-EGF)、ヒト肝細胞成長因子(HGF)、ヒトヘレグリンベータ1、ヒトインスリン、ヒトIGF-1(インスリン様成長因子-1)、ヒトIGF-2(インスリン様成長因子-2)、ヒトIGFBP-1(インスリン様成長因子結合タンパク質-1)、ヒトIGFBP-3(インスリン様成長因子結合タンパク質-3)、腸トレフォイル因子(ITF)、ヒトケラチノサイト成長因子1および2、ヒト白血病抑制因子(LIF)、ヒトMSP、ヒトミオスタチン、ヒトミオスタチン、プロ(プロペプチド)、ヒトNRG1、ヒトNGF、ヒトオンコスタチンM、ヒト骨芽細胞特異的因子1(OSF-1、プレイオトロフィン)、ヒトPD-ECGF(血小板由来血管内皮細胞成長因子)、ヒトPDGF、ヒトPIGF、ヒト胎盤成長因子1(PLGF1)、ヒト胎盤成長因子2(PLGF2)、ヒトSCGF-a(幹細胞増殖因子アルファ)、ヒトSCGF-b(幹細胞増殖因子ベータ)、ヒト幹細胞因子(SCF)/CD117リガンド、ヒトトロポポエチン(TPO、THPO)、ヒト形質転換成長因子、ヒトTGFアルファ(形質転換成長因子アルファ、TGFa)、ヒトTGF-ベータ1(形質転換成長因子ベータ1、TGFb)、ヒトTGF-ベータ1.2(形質転換成長因子ベータ1、TGFb)、ヒトTGF-ベータ2(形質転換成長因子ベータ2、TGFb)、ヒトTGF-ベータ3(形質転換成長因子ベータ3、TGFb)、ヒトVEGF(血管内皮成長因子)、ヒトVEGF-121、ヒトVEGF-165、およびヒトVEGF-Aを指す。

30

40

#### 【0108】

本明細書で使用される「同一性」は、配列が配列適合を最大化するように整列される時

50

の、すなわち、ギャップおよび挿入を考慮する時の、2つ以上の配列における対応する位置での同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を意味する。Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988、Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993、Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987、ならびにSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991、およびCarillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)に記載される方法を含むが、それらに限定されない知られている方法で、同一性を容易に計算することができる。同一性を決定するための方法は、試験される配列間に最大適合をもたらすように設計される。さらに、同一性を決定するための方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラム内で成文化される。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム法には、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、ならびにFASTA(Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)およびAltschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1997))が含まれるが、それらに限定されない。BLAST Xプログラムは、NCBIおよび他の供給源(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894、Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))から公的に入手可能である。周知のスミスウォーターマンアルゴリズムも同一性を決定するために使用することができる。

#### 【0109】

「免疫グロブリン」または「抗体」(本明細書で互換可能に使用される)という用語は、典型的に2つの重鎖および2つの軽鎖から成る基本的な4ポリペプチド鎖構造を有し、鎖は、例えば、鎖間ジスルフィド結合によって安定化される、抗原に特異的に結合する能力を有するタンパク質を指す。「一本鎖免疫グロブリン」または「一本鎖抗体」(本明細書で互換可能に使用される)という用語は、1つの重鎖および1つの軽鎖から成る2ポリペプチド鎖構造を有し、鎖は、例えば、鎖間ペプチドリinkerによって安定化される、抗原に特異的に結合する能力を有するタンパク質を指す。「ドメイン」という用語は、例えば、ベータ-プリーツシートおよび/または鎖内ジスルフィド結合によって安定化されるペプチドループ(例えば、3~4個のペプチドループを含む)を含む重鎖または軽鎖ポリペプチドの球状領域を指す。ドメインは、さらに、本明細書で「定常」または「可変」と称され、これは「定常」ドメインの場合、多様なクラスメンバーのドメイン内の配列変動の相対的欠如、または「可変」ドメインの場合、多様なクラスメンバーのドメイン内の著しい配列変動に基づく。抗体またはポリペプチド「ドメイン」は、しばしば、互換可能に、当分野で抗体またはポリペプチド「領域」と称される。抗体軽鎖の「定常」ドメインは、互換可能に、「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「CL」領域、または「CL」ドメインと称される。抗体重鎖の「定常」ドメインは、互換可能に、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域、または「CH」ドメインと称される。抗体軽鎖の「可変」ドメインは、互換可能に、「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「VL」領域、または「VL」ドメインと称される。抗体重鎖の「可変」ドメインは、互換可能に、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「VH」領域、または「VH」ドメイ



ンと称される。免疫グロブリンまたは抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、単量体型または多量体型で存在し、例えば、五量体型で存在するIgM抗体および/または単量体型、二量体型、もしくは多量体型で存在するIgA抗体である。「フラグメント」という用語は、無傷もしくは完全抗体または抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基を含む抗体または抗体鎖の一部もしくは一部分を指す。無傷もしくは完全抗体または抗体鎖の化学または酵素処理を介して、フラグメントを得ることができる。組換え手段によってフラグメントを得ることもできる。例示的なフラグメントには、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fab<sub>2</sub>、および/またはFvフラグメントが挙げられる。

#### 【0110】

本明細書で使用される「増加する」という用語または「増加した」、「高める」、「高まった」という関連用語は、統計的に有意な増加を指す。誤解を避けるために、用語は、通常、所与のパラメータにおいて少なくとも10%の増加を指し、対照値に対して少なくとも20%の増加、30%の増加、40%の増加、50%の増加、60%の増加、70%の増加、80%の増加、90%の増加、95%の増加、97%の増加、99%またはさらに100%の増加を包含することができる。

10

#### 【0111】

「単離された」という用語は、本明細書に開示される細胞培養成分、すなわち、アルブミン、またはトランスフェリン関連タンパク質を説明するために使用される時に、その自然環境の成分から特定、および分離、ならびに/または回収されたタンパク質を意味する。その自然環境の汚染物質成分は、典型的には、タンパク質に関する研究、診断、または治療用途を妨害するであろう物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク性もしくは非タンパク性溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、クマシーブルー、または好ましくは、銀染色を用いて、非還元もしくは還元条件下でSDS-PAGEによって評価される時に、少なくとも95%の均一性まで精製される。単離されたタンパク質は、目的のタンパク質の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内の原位置でタンパク質を含む。しかしながら、通常、単離されたタンパク質は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。

20

#### 【0112】

「成熟特異的タンパク質プロモーター」という用語は、種子成熟の間に、大幅に上方制御された活性(25%より大きい)を示すプロモーターを指す。

30

#### 【0113】

「成熟植物」という用語は、完全に分化した植物を指す。

#### 【0114】

本明細書で使用される「マーカー」は、核酸または目的の細胞内で差次的に発現されるポリペプチド分子である。この文脈において、差次的発現は、陽性マーカーに対して増加したレベルおよび陰性マーカーに対して減少したレベルを意味する。マーカー核酸またはポリペプチドの検出可能なレベルは、当分野で知られている多種多様の方法のいずれかを用いて、目的の細胞を他の細胞から同定または区別することができるように、他の細胞と比較して、目的の細胞内で十分に高い、もしくは低い。

40

#### 【0115】

「膵臓内分泌系統のマーカー」を発現する細胞は、転写因子PDX-1および以下の転写因子、すなわち、NGN-3、NRx2.2、NRx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3ベータ、MAFA、Pax4、およびPax6の少なくとも1つに対する遺伝子発現を伴う細胞を指す。膵臓細胞系統の特性を示すマーカーを発現する細胞には、膵臓細胞が含まれる。

#### 【0116】

本明細書で使用される「内胚葉系統の特性を示すマーカー」を発現する細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：SOX-17、GATA-4、HNF-3ベータ、GSC、Cer1、Nodal、FGF8、ブラキュリ、Mix様ホメオボックスタンパク質、FGF4、CD48、eomesodermin(EOMES)、D

50

K K 4、F G F 1 7、G A T A - 6、C X C R 4、C - K i t、C D 9 9、またはO T X 2。最終内胚葉系統の特性を示すマーカーを発現する細胞には、原始線条前駆細胞、原始線条細胞、中内胚葉細胞、および最終内胚葉細胞が含まれる。

【0117】

本発明の方法に由来する多能性マーカーを発現する細胞は、以下から成る群から選択される多能性マーカーの少なくとも1つを発現する：A B C G 2、c r i p t o、F o x D 3、コネキシン43、コネキシン45、O c t 4、S O X - 2、N a n o g、h T E R T、U T F - 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、T r a l - 6 0、およびT r a l - 8 1。

【0118】

本明細書で使用される「中胚葉系統の特性を示すマーカー」を発現する細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：C D 4 8、e o m e s o d e r m i n (E O M E S)、S O X - 1 7、D K K 4、H N F - 3 ベータ、G S C、F G F 1 7、G A T A - 6。

【0119】

本明細書で使用される「外胚葉系統の特性を示すマーカー」を発現する細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する細胞を指す：B M P - 4、ノギン、コーディン、O t x 2、F o x J 3、ネスチン、p 6 3 / T P 7 3 L、ベータI I I チュープリン。

【0120】

「単子葉植物種子成分」は、単子葉植物種子、典型的には、成熟単子葉植物種子から抽出可能な、炭水化物、タンパク質、および脂質成分を指す。

【0121】

所与の細胞、タンパク質、ポリペプチド、核酸、形質、または表現型に関連して、本明細書で使用される「天然の」または「野生型」という用語は、それが典型的に自然の中で見出される型を指す。

【0122】

本明細書で互換可能に使用される「操作可能に連結される」および「操作可能なように連結される」という用語は、それらの意図された方法でそれらが機能することを許す方法で、2つ以上のヌクレオチド配列または配列要素の位置付けを指す。いくつかの実施形態では、本発明に記載の核酸分子は、染色質を開放するか、および/または開放状態で染色質を維持することができる、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列に操作可能に連結された、1つ以上のDNA要素を含む。他の実施形態では、核酸分子は、(a)翻訳を増加させることができるヌクレオチド配列、(b)細胞の外で組換えタンパク質の分泌を増加させることができるヌクレオチド配列、および(c) mRNAの安定性を増加させることができるヌクレオチド配列から選択される1つ以上のヌクレオチド配列をさらに含んでもよく、そのようなヌクレオチド配列は、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列に、操作可能なように連結される。概して(しかし必然的ではないが)、操作可能に連結されるヌクレオチド配列は近接し、必要に応じて読み枠に存在する。しかしながら、染色質を開放するか、および/または開放状態で染色質を維持することができる操作可能に連結されるDNA要素は、通常、組換えタンパク質をコードするヌクレオチド配列の上流に位置付けられるが、必ずしもそれと近接しない。多様なヌクレオチド配列の操作可能な連結は、当分野で周知の組換え方法、例えば、PCR法を用いて、好適な制限酵素部位での核酸連結によって、またはアニーリングで、多様なヌクレオチド配列の操作可能な連結を達成される。好適な制限酵素部位が存在しない場合に、従来の実践に従って、合成オリゴヌクレオチドリinkerまたはアダプターを使用することができる。

【0123】

「植物細胞」は、植物に由来する任意の細胞を指し、未分化組織(例えば、カルス)、ならびに植物種子、花粉、珠芽、胚芽、懸濁培養物、分裂組織部位、葉、根、芽、配偶体、孢子体、および小孢子を含む。

【0124】

10

20

30

40

50

本明細書で互換可能に使用される「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドの多量体型を指す。これらの用語には、一本鎖、二本鎖、もしくは三本鎖DNA、ゲノムDNA、cDNA、RNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリンおよびピリミジン塩基を含むポリマー、または他の天然の、化学的かつ生化学的に修飾された、非天然もしくは誘導体化ヌクレオチド塩基が含まれる。ポリヌクレオチドの骨格は、糖およびリン酸塩基（典型的には、RNAもしくはDNAで見出され得る）、または修飾もしくは置換された糖もしくはリン酸塩群基を含むことができる。さらに、適切な条件下で相補鎖を合成し、鎖をアニーリングするか、または適切なプライマーとともにDNAポリメラーゼを用いて新たに相補鎖を合成するかのいずれかによって、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド産物から、二本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。核酸分子は、多くの異なる形態、例えば、遺伝子もしくは遺伝子フラグメント、1つ以上のエクソン、1つ以上のイントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマーの形態を取る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体、ウラシル、他の糖、フルオロリボース（fluororibose）およびチオアート等の連結基、ならびにヌクレオチド分枝等の修飾されたヌクレオチドを含み得る。本明細書で使用される「DNA」または「ヌクレオチド配列」は、塩基A、T、CおよびGのみならず、メチル化ヌクレオチド等のこれらの塩基、非荷電連結およびチオアート等のヌクレオチド間修飾、糖類似体の使用、ならびにポリアミド等の修飾された構造、および/または代替の骨格構造等のそれらの類似体もしくはこれらの塩基の修飾された型のいずれをも含む。

10

20

30

40

50

#### 【0125】

「多能性幹細胞」という用語は、胚芽、胎児、または成体組織から得られる幹細胞を包含する。好ましい一実施形態では、多能性幹細胞は、胚性幹細胞である。別の実施形態では、多能性幹細胞は、始原生殖細胞等の胎児幹細胞である。別の実施形態では、多能性幹細胞は、成熟幹細胞である。

#### 【0126】

本明細書で使用される「多能性」という用語は、外胚葉性、内胚葉性、および中胚葉性細胞の1つに少なくとも成長することができる細胞を指す。本明細書で使用される「多能性」という用語には、分化全能性および多分化能である細胞が含まれる。本明細書で使用される「分化全能性細胞」という用語は、細胞の全ての系統に成長することができる細胞を指す。「多分化能」という用語は、末期分化されていない細胞を指す。

#### 【0127】

「プロモーター」は、細胞中でRNAポリメラーゼに結合し、下流（3'方向）コード配列の転写を開始することができるDNA調節領域である。本明細書で使用されるプロモーター配列は、転写開始部位によってその3'末端で境界付けられ、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小限の数の塩基または要素を含むように上流（5'方向）に伸長する。転写開始部位（ヌクレアーゼS1を用いたマッピングによって都合よく定義される）は、プロモーター配列内で、ならびにRNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）に見出すことができる。真核生物プロモーターは、頻繁に（しかし常にではないが）、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含有することができる。原核生物プロモーターは、~10および~35コンセンサス配列に加えて、シャインダルガーノ配列を含有する。

#### 【0128】

恒常的、誘導性、および抑制可能なプロモーターを含む、多種多様の異なる供給源からの多数のプロモーターが当分野で周知である。代表的な供給源には、例えば、ウイルス性、哺乳動物、昆虫、植物、酵母、および細菌性細胞型が含まれ、これらの供給源からの好適なプロモーターは、容易に入手可能であるか、またはオンラインで、もしくは例えば、ATCC等の寄託機関、ならびに他の商用もしくは個々の供給源から公的に入手可能な配

列に基づいて合成的に作製することができる。プロモーターは、一方向性（すなわち、1つの方向で転写を開始する）または双方向性（すなわち、3'または5'方向のいずれかで転写を開始する）であることができる。プロモーターの非限定的な例には、例えば、T7細菌性発現システム、pBAD (araA)細菌性発現システム、サイトメガロウイルス (CMV)プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、イネ胚乳特異的グルテリン (Gt1)プロモーター、CaMV35Sウイルス性プロモーターが挙げられる。誘導性プロモーターには、Tetシステム（米国特許第5,464,758号および同第5,814,618号）、エクジソン誘導性システム（No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93(8): 3346-3351、T-REx (商標)システム（Invitrogen Carlsbad, CA）、Lac Switch (登録商標)（Stratagene, (San Diego, CA)、およびCre-ER<sup>T</sup>タモキシフェン誘導性リコンビナーゼシステム（Indra et al. Nuc. Acid. Res. (1999) 27(22): 4324-4327、Nuc. Acid. Res. (2000) 28(23): e99、米国特許第7,112,715号、ならびにKramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol. (2005) 308: 123-144)または当分野で知られている、所望の細胞内での発現に好適な任意のプロモーターが含まれる。

#### 【0129】

「目的のタンパク質」という用語は、研究、診断、または治療目的に有用であり得る任意のタンパク質を指す。目的のタンパク質には、哺乳類タンパク質もしくは非哺乳類タンパク質が含まれてもよく、任意で受容体またはリガンドが含まれてもよい。例示的な目的のタンパク質には、レニン等の分子、ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン、成長ホルモン放出因子、副甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、リボタンパク質、アルファ1-抗トリプシン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、プロインスリン、卵胞刺激ホルモン、カルシトニン、黄体形成ホルモン、グルカゴン、因子VIIIC、因子IX、組織因子、およびフォンヴィレブランド因子等の凝固因子、タンパク質C等抗凝固因子、心房性ナトリウム利尿因子、肺表面活性剤、ウロキナーゼもしくはヒト尿または組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)等のプラスミノゲンアクチベーター、ボンベシン、トロンピン、造血成長因子、腫瘍壊死因子アルファおよびベータ、CD40リガンド、Apo-2リガンド/TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2、DcR3、OPG、Fasリガンド等のTNFおよびTNF受容体 (TNFR)ファミリーのメンバー、エンケファリナーゼ、ランテス（活性化において制御され、通常、T細胞で発現および分泌される）、ヒトマクロファージ炎症性タンパク質 (MIP-1アルファ)、ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン、ミューラー管抑制因子、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、プロレラキシン、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、ベータラクタマーゼ等の微生物タンパク質、DNase、IgE、CTLA-4等の細胞傷害性Tリンパ球関連抗原 (CTLA)、インヒビン、アクチビン、血管内皮成長因子 (VEGF)、ホルモンもしくは成長因子に対する受容体、タンパク質AもしくはD、リウマチ因子、骨由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5、もしくは-6 (NT-3、NT-4、NT-5、もしくはNT-6)等、またはNGF等の神経成長因子等の神経栄養因子、血小板由来成長因子 (PDGF)、aFGFおよびbFGF等の線維芽細胞成長因子、上皮細胞成長因子 (EGF)、TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4、もしくはTGF-5を含むTGFアルファおよびTGFベータ等の形質転換成長因子 (TGF)、インスリン様成長因子IおよびII (IGF-IおよびIGF-II)、des (1-3)-IGF-I (脳IGF-I)、タンパク質に結合するインスリン様成長因子、CD3、CD4、CD8、CD19、およびCD20等のCDタンパク質、エリスロポエチン、骨誘導因子、免疫毒素、骨形成タンパク質 (BMP)、インターフェロナルファ、ベータ、およびガンマ等のインターフェロン、例えば、M-CSF、GM-CSF、およびG-CSFのコロニー刺激因子 (CSF)、トロンボポエチン (TPO)、例えば、IL-1~IL-10のインターロイキン (IL)、スーパ

ーオキシドジスムターゼ、T細胞受容体、表面膜タンパク質、分解促進因子、例えば、AIDSエンベロープの一部、gp120等のウイルス性抗原、輸送タンパク質、ホーミング受容体、アドレシン、調節タンパク質、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4、およびVCAM等のインテグリン、HER2、HER3、もしくはHER4受容体等の腫瘍関連抗原、ならびに上記のポリペプチドのいずれかの変異体および/またはフラグメント、ならびにCD3、CD4、CD8、CD19、CD20、およびCD34等のCDタンパク質等の多様なタンパク質抗原に対する抗原、EGF受容体、HER2、HER3、もしくはHER4受容体等のErbb受容体ファミリーのメンバー、LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、およびその もしくは サブユニットのいずれかを含む v / 3 インテグリン (例えば、抗CD11a、抗CD18、もしくは抗CD11b抗体)等の細胞接着分子、VEGF等の成長因子、IgE、血液型抗原、flk2/flt3受容体、肥満(OB)受容体、mpl受容体、CTLA-4、タンパク質C、Apo-2(DR5)、DR4、DcR1、DcR2、DcR3等のApo-2L受容体、ならびに上に列挙した抗体の変異体および/またはフラグメント等が含まれるが、それらに限定されない。本発明の一実施形態では、目的のタンパク質には、Apo-2リガンド/TRAIL、Fasリガンド、またはTNFアルファ等の、それ自身が、生体外または生体内において、哺乳類もしくは非哺乳類細胞内でアポトーシスを誘導することができるタンパク質が含まれる。

10

#### 【0130】

細胞培養の「産生段階」という用語は、細胞成長がプラトーに達している間の期間を指す。産生段階の間、対数細胞成長が終わり、タンパク質産生が主要となる。この期間中、培地は通常、継続するタンパク質産生を支持し、所望のタンパク質産物を達成するよう補充される。

20

#### 【0131】

「植物中で産生される」という用語は、本明細書に開示される細胞培養成分を説明するために使用される時、タンパク質が植物細胞から直接的または間接的に得られたことを意味する。組換えタンパク質に対して、「植物中で産生される」という用語は、組換えタンパク質が植物細胞内で発現され、次いで、宿主細胞タンパク質および脂質から精製されたことを意味する。植物中で産生されたタンパク質は、少なくとも3つの基準によって他の生物から精製したタンパク質から分化され得る。1)植物中で産生されるタンパク質には、異なる生物内で産生されるタンパク質と比較して、翻訳後修飾の異なるパターンが典型的に含まれ、質量スペクトル分析によって容易に特定され得る。2)植物中で産生されるタンパク質には、異なる発現システムで産生されるか、もしくは異なる供給源から精製される同一のタンパク質と比較して、異なる一組の結合した共同因子、脂質、および夾雑タンパク質が典型的に含まれる。3)植物中で産生されるタンパク質は、異なる供給源から産生または精製される同一のタンパク質と比較して、異なる生物学的活性を示し得る。植物中で産生されるタンパク質の活性の相違は、異なる生物から産生または単離されるタンパク質と比較して、植物中で産生されるタンパク質の立体配座、フォールディング、凝集状態、翻訳後修飾、もしくは結合した因子、または同時精製された夾雑タンパク質の相違から生じ得る。植物中で産生されるタンパク質の特定の活性の相違は、定義される濃度ならびにアッセイ条件、例えば、実施例11~19に開示される、細胞成長および因子相乗作用アッセイを用いて、ルーチンアッセイによって容易に確認され得る。具体的には、植物中で産生されるタンパク質は、非植物産生のタンパク質の同一の濃度と比較して、単独または他の因子との組み合わせのいずれかで少なくとも10%より大きい細胞成長活性を示し得る。好ましくは、植物中で産生されるタンパク質は、非植物産生のタンパク質の同一の濃度と比較して、単独または他の因子との組み合わせのいずれかで少なくとも20%より大きい細胞成長活性を示し得る。より好ましくは、植物中で産生されるタンパク質は、非植物産生のタンパク質の同一の濃度と比較して、単独または他の因子との組み合わせのいずれかで少なくとも30%より大きい細胞成長活性を示し得る。より好ましくは、植物中で産生されるタンパク質は、非植物産生のタンパク質の同一の

30

40

50

濃度と比較して、単独または他の因子との組み合わせのいずれかで少なくとも少なくとも40%より大きい細胞成長活性を示し得る。さらにより好ましくは、植物中で産生されるタンパク質は、非植物産生のタンパク質の同一の濃度と比較して、単独または他の因子との組み合わせのいずれかで少なくとも少なくとも50%より大きい細胞成長活性を示し得る。

#### 【0132】

「単離された」または「精製された」という用語は、本明細書に開示される細胞培養成分を説明するために使用される時、その自然環境の成分から特定、および分離、ならびに/または回収されたタンパク質を意味する。その自然環境の汚染物質成分は、典型的には、タンパク質に関する研究、診断、または治療用途を妨害するであろう物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質もしくは非タンパク質性溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は、クマシーブルー、または好ましくは、銀染色を用いて、非還元もしくは還元条件下でSDS-PAGEによって評価される時、少なくとも95%の均一性にまで精製される。単離されたタンパク質には、目的のタンパク質の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内の原位置でタンパク質が含まれる。しかしながら、通常、単離されたタンパク質は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。

10

#### 【0133】

「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」という用語は、ポリペプチドを産生する細胞に対して、外因性、すなわち、異種もしくは外来性ポリペプチドを指す。

20

#### 【0134】

アポトーシスまたは細胞培養との関連において「ストレス」という用語は、以下のうちの任意の組み合わせを含む、組織培養に対する非最適条件を指す：毒素の存在、栄養素もしくは成長因子の欠乏または枯渇、低酸素状態、熱ストレス（好ましい範囲と比較して、温度が高すぎるか、または低すぎる）、細胞間接触の損失、ウイルス感染、浸透ストレス（好ましい範囲と比較して、浸透圧が高すぎるか、または低すぎる）、酸化ストレス、細胞密度（好ましい範囲と比較して、細胞密度が高すぎるか、または低すぎる）、およびpHストレス（好ましい範囲と比較して、pHが高すぎるか、または低すぎる）。

#### 【0135】

「形質転換」という用語は、宿主細胞または生物内への1つ以上の核酸分子の転移を指す。宿主細胞内に核酸分子を導入する方法には、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、微量注入、陽イオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、スクレープローディング、弾道導入、またはウイルス感染もしくは他の感染病原体が含まれる。「形質転換された」、「形質導入された」、「遺伝子導入」、および「組換え体」は、組換えもしくは異種核酸分子（例えば、1つ以上のDNAコンストラクトもしくはRNA、またはsiRNA対応物）が導入された宿主細胞または生物を指す。核酸分子は、安定的に発現させることができるか（すなわち、機能的形態で細胞中に約3ヶ月以上維持される）、または機能的形態で細胞中に3ヶ月未満不安定に維持させることができ、すなわち、一時的に発現される。例えば、「形質転換された」、「形質導入された」、および「遺伝子導入された」細胞は、形質転換過程を経て、外来性核酸を含有する。「非形質転換された」という用語は、形質転換過程を経ていない細胞を指す。

30

40

#### 【0136】

細胞培養の「過渡期」という用語は、産生段階のための培養条件に従う間の期間を指す。過渡期の間、pH、イオン濃度、および温度等の環境因子を成長条件から産生条件に移行させることができる。

#### 【0137】

「種子産物」という用語には、脱ぶ（だっぶ）全粒種等の種子破片、粉末種子（フライス加工によって脱ぶ（だっぶ）され、粉状に挽かれた種子）、種子抽出物、好ましくは、タンパク質抽出物（粉末種子のタンパク質画分が炭水化物画分から分離されたもの）、麦

50

芽（麦芽抽出物もしくは麦芽シロップを含む）、および／または遺伝子組換え穀物に由来する精製タンパク質が含まれるが、それらに限定されない。

【0138】

「種子成熟」は、代謝可能な貯蔵物質、例えば、糖、オリゴ糖、澱粉、フェノール性物質、アミノ酸、およびタンパク質が、空胞標的の有無に関わらず、種子（穀物）の多様な組織、例えば、内胚乳、種皮、糊粉層、および胚盤上皮に沈着される受精に始まり、穀物の肥大、穀物の充填をもたらし、穀物の乾燥に至る期間を指す。

【0139】

「配列類似性」という用語は、共通の進化的起源を共有し得るか、もしくは共有し得ない核酸配列とアミノ酸配列との間の同一性または一致の程度を指す（上の Re e c k らを参照）。しかしながら、一般の使用、および本明細書における適用において、「相同性」という用語は、「大いに」等の副詞と修飾される時、配列類似性を指し得、共通の進化的起源に関連し得るか、もしくは関連し得ない。

10

【0140】

特定の実施形態では、ヌクレオチドの少なくとも約85%、より好ましくは、少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%が、BLAST、FASTA、DNA Str i d e r、CLUSTAL等の知られている配列比較アルゴリズムによって決定して、核酸配列の定義される長さ上で適合する時、2つの核酸配列は、「実質的に相同」または「実質的に類似」する。そのような配列の例は、本発明の特異遺伝子の対立遺伝子または種変異体である。実質的に相同である配列はまた、ハイブリダイゼーションによって、例えば、その特定のシステムに対して定義されるストリンジェント条件下におけるサザンハイブリダイゼーション実験において特定され得る。

20

【0141】

同様に、本発明の特定の実施形態では、80%を超えるアミノ酸残基が同一である時、または約90%を超えるアミノ酸残基が類似する（すなわち、機能的に同一である）時、2つのアミノ酸配列は「実質的に相同」もしくは「実質的に類似」する。好ましくは、類似する、もしくは相同のポリペプチド配列は、例えば、GCG (Genetics Computer Group, Version 7, Madison, Wis.) パイルアッププログラムを使用することによる、または上で説明したプログラムおよびアルゴリズムのいずれかを使用することによる整列によって特定される。プログラムは、初期設定値、すなわち、ギャップ生成ペナルティ =  $-(1 + 1/n)$  であって、 $n$  はギャップエクステンションペナルティであり、平均適合 = 1、平均不適合 = -0.333 で、スミスおよびウォーターマンの局所的相同性アルゴリズムを使用することができる。

30

【0142】

本明細書および添付の請求の範囲で使用される、単数形「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」は、文脈が別様に明確に示さない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの分子」への言及は、そのような分子の1つ以上を含み、「1つの試薬」は、そのような異なる試薬の1つ以上を含み、「1つの抗体」は、そのような異なる抗体の1つ以上を含み、「その方法」への言及は、本明細書で説明される方法に修正または代用される場合もある、当業者に知られている同等のステップおよび方法への言及を含む。

40

【0143】

本発明の実践は、別途示されない限り、当業者の能力の範囲内である、化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を採用する。そのような技術は、文献内で説明される。実践者は、特に、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., Ausubel FM et al. (1993), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., および Gelvin a

50

nd Schilperoot, eds. (1997) Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands、DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons、J. M. Polak and James O' D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice、Oxford University Press、M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press、D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press、Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. I by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0 - 87969 - 544 - 7)、Antibodies: A Laboratory Manual by Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0 - 87969 - 3, 4 - 2), 1855. Handbook of Drug Screening, edited by Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, New York, N. Y., Marcel Dekker, ISBN 0 - 8247 - 0562 - 9)、ならびに Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, Edited Jane Roskams and Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0 - 87969 - 630 - 3を参照されたい。これらの一般的教科書の各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

#### 【0144】

上で述べた出版物は、本出願の出願日前のそれらの開示のためのみに提供される。本明細書において、本発明が先行発明に基づいてそのような開示に先行する資格を有しないことを認めるものと如何様にも解釈されない。

#### 【0145】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者が一般に理解するものと同一の意味を有する。任意の方法、組成物、試薬、細胞、本明細書に説明されるものと類似または同等のものを、本発明の実践もしくは試験で使うことができるが、好ましい方法および材料が本明細書に説明される。本明細書で言及する全ての出版物は、全ての図、図式、等式、図解、および図面を含めて、参考文献が関連して引用された特定の情報を説明および開示するために、本明細書に組み込まれる。

40

#### I. 本発明の栄養補助剤を使用する方法

#### 【0146】

しばしば、細胞培養培地は、5 ~ 10 %の濃度の血清で補充される。血清は、細胞成長に対して未定義の必須物質を含有する複合混合物である。一般に使われる血清は、ウシ胎児血清 (FCS) およびウシ胎仔血清 (FBS) である。その複雑性、一貫性の欠如、および病原菌汚染に対する潜在的危険性のため、細胞培養産業および管理機関は、血清の細胞培養培地への添加に対する代替法を模索している。

#### 【0147】

基礎培地に添加される細胞培養成分および細胞培養栄養補助剤は、細胞成長を促進する

50



はっきりと異なる機能を提供する。これらのタンパク質成分は、典型的には動物由来である。動物性材料からの潜在的な病原菌汚染の懸念の増加に伴って、細胞培養産業は、動物成分を含まない培地を開発する努力をしている。植物ベースの加水分解および微生物系を用いて産生される組換えタンパク質の使用によっていくつかの成功がもたらされているが、植物ベースの加水分解は、成分の未定義の混合物であり、微生物源からの組換えタンパク質は、日常的な細胞培養で使用するには高価すぎる。非動物由来成分の代替供給源は、細胞培養技術に依存する産業にとって有益であろう。

【0148】

したがって、一実施形態では、本発明は、ラクトフェリン、トランスフェリン、アルブミン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、アルファラクトアルブミン、および派生物、破片、ならびに生物学的に活性であるそのフラグメントから成る群から選択される2つ以上のタンパク質で補充される細胞培養培地を提供すること、ならびに培養するために細胞を細胞培養培地に導入することを含む、細胞を培養する方法を提供する。細胞培養培地中で成長する細胞は、強化されていない細胞培養培地中で成長する細胞と比較して、改善された成長特性を示す。

10

【0149】

したがって、一実施形態では、本発明は、ラクトフェリン、トランスフェリン、アルブミン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、アルファラクトアルブミン、および派生物、破片、ならびに生物学的に活性であるそのフラグメントから成る群から選択される2つ以上のタンパク質で補充される細胞培養培地を提供すること、ならびに培養するために細胞を細胞培養培地に導入することを含む、細胞を培養する方法を提供する。細胞培養培地中で成長する細胞は、強化されていない細胞培養培地中で成長する細胞と比較して、改善された成長特性を示す。

20

【0150】

さらなる実施形態によると、本発明の細胞を培養する方法において使用されるタンパク質の組み合わせおよび栄養補助剤は、細胞培養培地中に存在する細胞の成長および/または生産性に相乗効果を提供する。またさらなる実施形態によると、細胞を培養する方法で使用され得るタンパク質の1つの組み合わせを含む栄養補助剤には、ラクトフェリンおよびアルブミンが含まれる。

30

【0151】

別の態様では、栄養補助剤は、細胞成長ならびに生産性に相乗効果を提供するトランスフェリン関連タンパク質およびアルブミンの組み合わせを含む。

【0152】

本発明のさらなる態様には、本発明の栄養補助剤を細胞培養培地に添加することによって、培養細胞の改善された成長速度および培養細胞のより高い生産性を達成するための方法が含まれる。

40

【0153】

特許請求される栄養補助剤は、アポトーシスを防止し、特にストレスに応じて、組織培養の間、細胞の生存率を改善するのに著しい改善を提供する組織および細胞培養物ならびに組換えタンパク質産生への広範囲の適用において有用である。

【0154】

アポトーシスは、特徴的な細胞形態学および細胞死につながる一連の生化学的事象を含む。これらの変化には、膜の非対称および付着の損失、細胞プレブ形成細胞収縮、細胞核断片化、染色質凝縮、ならびに染色体DNA断片化等の細胞膜に対する変化が含まれる。

【0155】

アポトーシスの過程は、細胞外（外因性誘導因子）または細胞内（内因性誘導因子）の

50

いずれかで開始し得る様々な範囲の細胞信号によって制御される。細胞外信号には、毒素、ホルモン、成長因子、一酸化窒素、サイトカインが含まれ得、異なる程度で組織培養培地中に存在し得る。これらの信号は、アポトーシスに肯定的（すなわち、誘発する）または否定的（すなわち、抑制する、阻害する、もしくは弱める）に影響を及ぼし得、したがって、全体の細胞の生存率に影響を与える。ATP含有量、カルシウムレベル、ならびに多数のアポトーシスおよび抗アポトーシス遺伝子を含む多数の細胞内成分もまた、アポトーシスを調節する助けとなる。細胞は、ストレスに応じて細胞内アポトーシス信号を開始し得、それはほぼ細胞自殺をもたらし得る。組織培養中に遭遇するストレスを誘導する作用因子には、例えば、内毒素等の組織培養成分ならびにプラスチック容器から浸出される重金属に関連する毒素、トランスフェクション試薬（例えば、リポフェクタミンおよび類似の脂質ベースのトランスフェクション試薬）、ウイルス性形質転換、無血清培養に関連する栄養素ならびに成長因子欠乏、または例えば、界面活性剤および電気穿孔によって引き起こされる細胞膜への損傷による、バイオリアクター内の高密度培養ならびに増加した細胞内カルシウム濃度に関連する細胞分化プロトコルの低酸素状態ならびに酸化ストレスが含まれる。

10

#### 【0156】

細胞死の実際の過程が発生する前に、アポトーシス信号は、アポトーシス経路の活性化を監視するゲートキーパーの機能を果たす調節タンパク質を克服しなければならない。生体内において、細胞はもはや死ぬ必要がない場合、このステップがその過程を停止させる。いくつかのタンパク質がこのステップに関与するが、調節の2つの主要機構が同定されており、ミトコンドリア機能性に関連するもの、およびアダプタータンパク質を介してアポトーシス機構に信号を変換することに直接関与するものを含む。

20

#### 【0157】

細胞培養条件下で成長する細胞は、アポトーシス信号を誘発し得、かつアポトーシスに対して細胞の感受性を増加し得る、上述の日常的な組織培養手順に関連する細胞ストレスを経験し得る。例えば、無血清培養に関連する栄養欠乏、バイオリアクター内での高密度成長に関連する酸化ストレス、DNAトランスフェクション試薬に関連する細胞毒性化合物の使用、および凍結保存に関連する熱ストレスは、細胞がアポトーシスに入りやすくし得る。そのような信号を乗り切る細胞の能力を高めるために、これらの手順中に、細胞死に対する細胞のコミットメントを防止することによって、細胞の生存率を改善することが可能であり、それによって、これらのアプローチの成功および有用性を改善する。

30

#### 【0158】

近年、アポトーシスの開始を阻害するか、もしくはその影響を低減する真核細胞中の多数の遺伝子が特定されている。これらの遺伝子のいくつかは、細胞中のカスパーゼ依存性アポトーシス経路を阻害し、実際、抗アポトーシス遺伝子でトランスフェクトした細胞は、生物学的に要件の厳しい条件下で成長するトランスフェクトした細胞の延命および生産性に有用であり得る。（米国特許第6,586,206号、同第7,531,327号、米国特許出願米国第2009/0170165号、同米国2009/0181426号）。

#### 【0159】

さらに、ある場合には、外因性熱ショックタンパク質の添加は、様々な条件下で培養中の細胞の生存を改善することを示している（Novoselova et al., J. Neurochem. 94 597-606 (2005)、Tidwell et al., Cell Stress & Chap 9 (1) 88-90 (2004)、Guzhova et al., Cell Stress & Chap. 3 (1) 67-77 (1998)、Hounenou et al., Cell Stress & Chap 1 (3) 161-166 (1996)、Johnson et al., In vitro Cell. Dev. Biol., 29 A 807-812 (1993)）。

40

#### 【0160】

本発明は、植物由来組換え細胞培養成分タンパク質が、特定の混合で、培養で成長する

50

哺乳類細胞に添加された時に、細胞成長および生存率を驚くほど高めたという証明に一部基づいている。驚いたことに、タンパク質のいくつかの組み合わせは、細胞成長および生産性に、個々のタンパク質での使用と比較して、予期せぬ利益を提供する相乗効果を提供する。具体的には、植物由来組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質を含むそのような栄養補助剤は、改善された培養生存率、延長された細胞生存、細胞成長の改善された速度、ならびに組織培養バイオリアクターから産生される組換えタンパク質の改善された収率をもたらす。栄養補助剤が予想外に改善された活性および安定性を示すため、標準の組換えまたは精製タンパク質の使用と比較して、それらは著しい改善を提供する。

【0161】

本出願に開示される栄養補助剤は、例えば、細胞の生存率を改善するのに、ならびに培養中で成長する細胞の細胞成長速度を加速するのに有用である。一態様では、本発明の栄養補助剤は、細胞培養からの組換えタンパク質の収率を改善または高めるのに有用である。本発明で提供するさらなる改善が、下で詳しく説明される。

【0162】

一実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞の細胞成長を高めるための方法が含まれる。

【0163】

一実施形態では、本発明には、無血清培地への栄養補助剤の添加を含む、無血清培地に適応された細胞の生産性を高めるための方法が含まれる。

【0164】

一実施形態では、本発明には、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内の乳酸塩の蓄積を低減するための方法が含まれる。

【0165】

一実施形態では、本発明には、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内のブドウ糖および他の糖の消費を低減するための方法が含まれる。

【0166】

一実施形態では、本発明には、バイオリアクター内の培養中の細胞への栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内での培養の開始から採取までの、タンパク質を産生するために必要とされる時間を減らす方法が含まれる。

【0167】

一実施形態では、本発明には、バイオリアクターへの栄養補助剤の添加を含む、バイオリアクター内の細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

【0168】

一実施形態では、本発明には、無血清培地への栄養補助剤の添加を含む、無血清条件下で成長する細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

【0169】

一実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、低密度で播種する時に細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

【0170】

一実施形態では、本発明には、細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、単細胞クローンから成長する細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

【0171】

一実施形態では、本発明には、培養培地への栄養補助剤の添加を含む、培養中で成長する初代細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

【0172】

一実施形態では、本発明には、トランスフェクションの前、最中、または直後の細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、トランスフェクション後の細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 3 】

一実施形態では、本発明には、凍結保存もしくは解凍の前、最中、または直後の細胞培養培地への栄養補助剤の添加を含む、凍結保存後の細胞の生存率を改善するための方法が含まれる。

## 【 0 1 7 4 】

一実施形態では、本発明には、細胞培養培地への本発明の栄養補助剤の添加を含む、培養中で成長する幹細胞の細胞成長速度または生存率を改善するための方法が含まれる。

## 【 0 1 7 5 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、細胞培養培地への本発明の栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生される組換え産物の収率を改善するための方法が含まれる。

10

## 【 0 1 7 6 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生される組換え産物の精製を改善するための方法が含まれる。

## 【 0 1 7 7 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生される組換え産物のタンパク質分解を減少するための方法が含まれる。

## 【 0 1 7 8 】

20

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生される組換え産物の生物活性を改善するための方法が含まれる。

## 【 0 1 7 9 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生される組換え産物の安定性を改善するための方法が含まれる。

## 【 0 1 8 0 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生される組換え産物の構築を改善するための方法が含まれる。

30

## 【 0 1 8 1 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への栄養補助剤の添加を含む、培養中の細胞から産生されるよりヒト様にグリコシル化した組換え産物を作製するための方法が含まれる。

## 【 0 1 8 2 】

一実施形態では、本発明には、培養の増殖期、過渡期、または産生段階のうちの1つ以上の間に、培養への組換えアルブミンを含む栄養補助剤の添加を含む、より低い免疫原性で培養中の細胞から産生される組換え産物を作製するための方法が含まれる。

## 【 0 1 8 3 】

40

これらの方法のいずれにおいても、本発明の栄養補助剤は、培養中（および発酵の間）の宿主細胞の生存率を増加させることによって、機能的組換えタンパク質の収率、およびまたは純度、生物活性、安定性、ならびに構築を増加させるための単純かつ費用効率の高い方法を提供する。さらに、本発明の栄養補助剤は、細胞培養中のアポトーシスを減少させるか、または阻害することによって、培養培地中の有害なプロテアーゼの数または存在を減少させ、タンパク質分解に対して発現した目的のタンパク質を保護することができ、それによって、活性タンパク質の増加した量および無傷タンパク質の増加した収率によって証明されるように、産生された目的のタンパク質の質を増加させる。さらに、出願者は、本発明の栄養補助剤が、界面活性剤、重金属、および培養成分中に存在する内毒素汚染物等の薬剤の潜在的な悪影響に対して細胞を保護し得るか、またはトランスフェクション

50

もしくは凍結保存の間に細胞に導入される毒性試薬から細胞を保護し得る。

【0184】

特許請求される方法のいずれにおいても、本発明の栄養補助剤を、任意の都合のよい時、例えば、培地を変更する時、細胞を継代する時、または細胞を低密度で播種する時に、培養培地に直接、もしくは混合で添加することができる。任意で、栄養補助剤は、細胞培養過程の初期（開始する時、0日目）に培養培地に添加される。一態様では、本発明の栄養補助剤は、予測されるストレスの多い事象前、例えば、凍結保存前、トランスフェクション前、または血清枯渇前等に添加され得る。

【0185】

別の態様では、栄養補助剤は、アポトーシスの誘導が典型的に発生するより前に、細胞の培養の間に培養培地に添加される。例えば、大規模細胞培養の間、アポトーシスの誘導は培養の約3日目または4日目に観察され得、したがって、栄養補助剤は、好ましくは、3日目または4日目の前に添加される。任意で、栄養補助剤の所望の量が、細胞培養を通して、または細胞培養の期間中、例えば、発酵全体を通して、毎日添加される。例として、5日間の培養では、栄養補助剤は、0日目に、その後、培養が終了するまで24時間おきに添加され得る。

10

【0186】

したがって、一実施形態では、本発明は、本発明の栄養補助剤をバイオリアクターに添加することによって、バイオリアクター内で産生される組換えタンパク質の収率および質を改善する方法を提供する。一実施形態では、バイオリアクターは、細菌性細胞を含む。別の態様では、バイオリアクターは、酵母細胞を含む。別の態様では、バイオリアクターは、植物細胞を含む。別の態様では、バイオリアクターは、哺乳類細胞を含む。

20

【0187】

別の実施形態では、本発明は、本発明の栄養補助剤を細胞培養に添加することによって、細菌性細胞中で産生される組換えタンパク質の収率および質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、本発明の栄養補助剤を細胞培養に添加することによって、酵母細胞中で産生される組換えタンパク質の収率および質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、本発明の栄養補助剤を細胞培養に添加することによって、植物細胞中で産生される組換えタンパク質の収率および質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、本発明の栄養補助剤を細胞培養に添加することによって、昆虫細胞中で産生される組換えタンパク質の収率および質を改善する方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、本発明の栄養補助剤を細胞培養に添加することによって、哺乳類細胞中で産生される組換えタンパク質の収率および質を改善する方法を提供する。

30

【0188】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養系の産生段階の前または最中に、本発明の栄養補助剤を細胞培養系に添加することによって、細胞培養系の産生段階の収率を増加させ、それによって、バイオリアクターの生産性を増加させる方法を提供する。

【0189】

本方法の一態様では、産生段階の収率が約10%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約20%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約30%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約40%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約50%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約60%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約70%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約80%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約90%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約100%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約200%増加する。本方法の一態様では、産生段階の収率が約500%増加する。

40

【0190】

これらの方法のいずれかの一態様では、栄養補助剤が添加されなかった対照細胞培養系と比較して、収率が増加する。これらの方法のいずれかの一態様では、トランスフェリン

50

関連タンパク質または組換え血清アルブミンのいずれかを欠如する栄養補助剤が添加される対照細胞培養系と比較して、収率が増加する。一態様では、同一の培養条件下で測定される時、単独で添加された場合の組換えアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質の合算効果と比較して、収率が増加する。

【0191】

別の実施形態では、本発明は、目的のタンパク質を発現する細胞への本発明の栄養補助剤の添加を含む、そのタンパク質の産生に関する正常な成長条件と比較して上昇する温度で、目的のタンパク質を産生する方法を提供する。

【0192】

別の実施形態では、本発明は、細胞培養発現システムへの本発明の栄養補助剤の添加を含む、凝集の傾向のある目的のタンパク質によって細胞培養発現システム中で形成される凝集物の量を減少させる方法を提供し、それによって、タンパク質の凝集状態が低減する。

10

【0193】

別の実施形態では、本発明は、細胞への本発明の栄養補助剤の添加を含む、組換えタンパク質の変性および凝集を防止することによって、細胞によって発現される目的タンパク質のタンパク質の活性を増加する方法を提供し、それによって、目的のタンパク質の特定の活性が増加する。

別の実施形態では、本発明は、細胞培養発現システムへの本発明の栄養補助剤の添加を含む、凝集傾向があり、沈殿を引き起こすか、またはそれら自体が細胞に対して毒性である細胞培養発現システム中でタンパク質の発現を改善する方法を提供し、それによって、目的のタンパク質の発現が増加する。

20

【0194】

これらの方法のいずれにおいても、添加する栄養補助剤の量は、例えば、宿主細胞の種類、細胞密度、目的のタンパク質、および培養条件等の多様な要因に依存する。培養培地に添加する栄養補助剤の所望の濃度を決定することは、当技術分野の範囲内であり、日常の最適化によって、および過度の実験なしで、実験的に解明することができる。

【0195】

当業者は、異なる細胞型が、本発明の栄養補助剤に対して異なる大きさの応答を有し、これはある程度、栄養補助剤中のタンパク質の量または種類によって決定されることを容易に理解する。さらに、細胞の異なる密度は、増加した細胞数を計上するために、栄養補助剤の総量、ならびに培養物に添加される個々のタンパク質の濃度における適切な調整を必要とする。さらに、懸濁培養中で、または接着培養を介して成長する細胞は、タンパク質侵入に使用可能な異なる膜表面を有し、典型的には、異なる速度および程度の反応を示す。したがって、アポトーシスの十分な阻害、または生存率の増加もしくは正味の細胞成長を提供する濃度を選択しなければならない。典型的には、本発明の栄養補助剤は、約0.1%、約0.5%、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、約20%、約25%、約30%、約40%、または約50重量/重量%、もしくは重量/体積%の終末濃度になるまで添加される。

30

40

【0196】

細胞生存のさらなる増加がそれを超えて発生しない栄養補助剤の濃度の上限範囲が典型的には存在する。下の実施例で説明されるように、出願者は、本発明の栄養補助剤が、約200mg/L~約2g/L、またはより好ましくは、約200mg/L~約1000mg/L、またはより好ましくは、約250~約500mg/Lの濃度で細胞培養に添加される時に、アポトーシスを阻害することができることを見出した。

II. 栄養補助剤

【0197】

細胞培養培地、補充細胞培養培地を産生するための方法、ならびに本発明に従って強化された細胞培養培地を用いて細胞を培養する方法には、動物、植物、細菌、酵母、および

50

昆虫源に由来する成分が含まれ得る。本発明の一態様によると、成分は、植物源に由来し、好ましくは、単子葉植物由来である。成分は、多種多様の異なる細胞培養培地を形成するために、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、および $\text{MgCl}_2$ 等の無機塩と、ならびにアミノ酸、ビタミン、成長因子、糖、および抗生物質等の他の材料と混合され得る。

【0198】

さらなる実施形態によると、細胞培養培地中に含有されるタンパク質は、組換えタンパク質、好ましくは、組換えヒトタンパク質である。またさらなる実施形態によると、細胞培養培地中のタンパク質の1つ以上は、植物産生された異種タンパク質であり、好ましくは、細胞培養培地中のタンパク質の2つ以上は、植物産生された異種タンパク質であり、より好ましくは、細胞培養培地中のタンパク質の全ては、植物産生された異種タンパク質である。

10

【0199】

別の態様によると、タンパク質の1つは、アルブミンであり、少なくとも1つの追加のタンパク質は、成長因子、ラクトフェリン、トランスフェリン、インスリン、成長ホルモン、フィブロネクチン接合因子、ラミン接合因子、コラゲナーゼ、血小板由来成長因子、脳由来神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、胸腺因子、ハプトコリン、ラクタヘドリン、ラクトペルオキシダーゼ、アルファフェトプロテイン、免疫グロブリン、アルファラクトアルブミン、および派生物、破片、ならびに生物学的に活性であるそのフラグメントから成る群から選択される。

20

【0200】

さらなる実施形態によると、補充細胞培養培地を産生する方法で使用されるタンパク質の組み合わせは、細胞培養培地中に存在する細胞の成長および/または生産性に相乗効果を提供する。またさらなる実施形態によると、補充細胞培養培地を産生する方法で使用され得るタンパク質の1つの組み合わせには、ラクトフェリン、トランスフェリン、メラノトランスフェリン、およびオボトランスフェリンから成る群から選択される少なくとも1つの他のタンパク質とアルブミンとの組み合わせが含まれる。

【0201】

一態様では、本発明の栄養補助剤には、植物由来組換えヒト血清アルブミンが含まれる。

30

【0202】

「アルブミン」という用語は、アルブミンの全ての自然発生形態および合形成態を指す。好ましくは、「アルブミン」という用語は、組換えアルブミンを指す。一態様では、アルブミンは、脊椎動物由来である。一態様では、アルブミンは、哺乳動物由来である。さらなる実施形態では、アルブミンはヒトである。別の態様では、組換えアルブミンは、植物細胞から産生される。特に好ましい一実施形態では、組換えアルブミンは、遺伝子組換えイネ（オリザサティバ）から産生される。多様な種のアルブミンに関する代表的な種および遺伝子バンク受入番号は、下の表D1に記載される。

【表 D 1】

表D 1 例示的なアルブミン遺伝子	
種	遺伝子バンク受入番号
ヒト	NP_000468.1
チンパンジー	XP_517233.2
イエイヌ	XP_855557.1
ウシ	NP_851335.1
ハツカネズミ	NP_033784.1
ドブネズミ	NP_599153.1
セキショクヤケイ	NP_990592.1

10

## 【0203】

異なる種におけるアルブミンの組換え産生のために、対象となる宿主生物に対して遺伝子の核酸配列をコドン最適化することが典型的に必要であることが理解される。そのようなコドン最適化を、対象となる宿主生物に対する好ましいコドン使用頻度、ならびに標準のDNA合成を介する最適化された核酸の合成の標準分析によって完了することができる。多数の会社がサービス手数料方式でそのようなサービスを提供し、例えば、DNA 2.0 (CA, USA) および Operon Technologies (CA, USA) が含まれる。

20

## 【0204】

アルブミンは、その自然形態、すなわち、天然に見られる対立遺伝子変異体であってもよく、それらは例えば、トランケーション（例えば、N末端もしくはC末端または両方から）、または他のアミノ酸欠失、付加、挿入、置換、もしくは翻訳後修飾により、それらのアミノ酸配列で異なってもよい。例えば、ピログルタミニル、イソ-アスパルチル、アルブミンのタンパク分解、リン酸化、グリコシル化、低減した、酸化、異性化、脱アミノ化変異体を含む、アルブミンの翻訳後修飾および分解産物を含む自然に発生する化学修飾もまた、本発明の方法のいずれにも明確に含まれる。

## 【0205】

天然もしくは合成アルブミン配列のフラグメントも同様に、それらが由来するペプチドの望ましい機能的特性を有し得、本発明の方法のいずれでも使用され得る。したがって、本明細書で使用される「フラグメント」という用語には、フラグメントが全分子の生物学的または治療的に有益な活性を保持することを条件とするアルブミンのフラグメントが含まれる。

30

## 【0206】

例えば、アルブミンは、銅、亜鉛、カドミウム、およびニッケルを含む、多数の生理学的に重要な金属イオンに対して、少なくとも2個の、高親和性の複数の金属結合部位を含有する。(Carter et al., Advances in Protein Chemistry 45 153-203 (1994)、Bai et al., J. Inorg Biochem 70 (1) 33-39 (1998)、Blindauer et al., J. Biol. Chem. 284 (34) 23116-24 (2009)、米国特許第6,787,636号)。これらの金属は典型的にはアルブミンの組換え産生に微量存在するため、大量のこれらの金属イオンはタンパク質に対してキレート化し得る。これらのイオンの結合、特に、組換えアルブミンへのカドミウムおよびニッケルの結合は、組織培養物成分として細胞に添加される時に、タンパク質の細胞毒性に関連する。

40

## 【0207】

したがって、一態様では、本発明のアルブミンは、アルブミンの複数の金属結合部位に関与する1つまたはアミノ酸の欠失を含むアルブミンのフラグメントを含むことができる。一態様では、アルブミンフラグメントは、成熟タンパク質のN末端において、1つ以上

50





Q L G E Y K F Q N A   L L V R Y T K K V P   Q V S T P T L V E V   S R N L G K V  
 G S K   C C K H P E A K R M   P C A E D Y L S V V  
 L N Q L C V L H E K   T P V S D R V T K C   C T E S L V N R R P   C F S A L E V  
 D E T   Y V P K E F N A E T   F T F H A D I C T L  
 S E K E R Q I K K Q   T A L V E L V K H K   P K A T K E Q L K A   V M D D F A A  
 F V E   K C C K A D D K E T   C F A E E G K K L V  
 A A S Q A A L G L 。

#### 【0211】

他のタンパク質に対するアルブミンの融合タンパク質も含まれ、これらの融合タンパク質は、活性、標的、安定性、または効力を高め得る。

10

#### 【0212】

アルブミン活性もしくは生物学的半減期を保持または安定化する天然アルブミン構造の化学修飾もまた、本明細書で説明される方法のいずれでも使用することができる。そのような化学修飾戦略には、制限なしに、ペグ化、グリコシル化、ならびにアシル化が含まれ (Clark et al. : J. Biol. Chem. 271 (36) : 21969 - 21977, 1996、Roberts et al. : Adv. Drug. Deliv. Rev. 54 (4) : 459 - 476, (2002)、Felix et al. : Int. J. Pept. Protein. Res. 46 (3 - 4) : 253 - 264, (1995)、Garber Diabetes Obes. Metab. 7 (6) 666 - 74 (2005) を参照)、CおよびN末端保護基ならびにペプチド模倣ユニットも含まれ得る。

20

#### 【0213】

天然L-アミノ酸、例えば、D-アミノ酸の異性体は、アルブミンの上記の形態のいずれにも組み込まれ得、本発明の方法のいずれにおいても使用され得る。アルブミンの全てのそのような変異体、派生物、融合タンパク質、またはフラグメントが含まれ、本明細書に特許請求もしくは開示される方法のいずれかにおいて使用され得、ならびに「アルブミン」という用語下に包含される。

#### 【0214】

本発明の栄養補助剤の一態様では、アルブミンは、植物中で産生された組換えヒト血清アルブミンである。別の態様では、アルブミンには、約2%未満の凝集アルブミンが含まれる。別の態様では、アルブミンには、約1%未満の凝集アルブミンが含まれる。

30

#### 【0215】

一実施形態では、本発明の栄養補助剤には、同時精製組換えアルブミンおよびhspの肯定的な影響をさもなければ遮蔽または阻害するであろう本質的に界面活性剤もしくは内毒素を含んでいないイネhspの調製が含まれる。一態様では、本発明の栄養補助剤は、約1EU未満の内毒素を有し、アルブミンは、少なくとも約95%純粋である。別の態様では、本発明の栄養補助剤には、熱ショックタンパク質に結合する組換えアルブミンを含む組成物が含まれる。別の態様では、本発明の栄養補助剤には、組換えアルブミンおよびイネhsp70相同体が含まれる。一態様では、イネhsp70相同体は、HSP70、Bip、およびイネ間質タンパク質から選択される。

40

#### 【0216】

本明細書で使用される「熱ショックタンパク質」、「HSP」、または「hsp」という用語には、抗アポトーシス活性を保持する熱ショックタンパク質スーパーファミリーの全ての自然発生形態および合形成態が含まれる。そのような熱ショックタンパク質には、小さい熱ショックタンパク質/HSPBファミリー、Hsp40/DnaJファミリー、HSP70/HSPAファミリー、HSP90/HSPCファミリー、HSP110/HSPHファミリー、およびシャペロンファミリー、ならびに2つ以上の熱ショックタンパク質またはそれらに由来するヌクレオチド交換因子 (例えば、HSP70およびHSP40の複合体) のペプチドフラグメントおよびタンパク質複合体が含まれる。熱ショックタンパク質は、それらの自然形態、すなわち、機能的に同等の変異体と見なされ得る異なる

50

種において、天然に見られる異なる変異体であってもよく、またはそれらは、機能的に同等のその自然派生物であってもよく、トランケーション（例えば、N末端もしくはC末端または両方から）、または他のアミノ酸欠失、付加、挿入、置換、もしくは翻訳後修飾により、それらのアミノ酸配列で異なってもよい。例えば、ピログルタミンル、イソ-アスパルチル、HSPのタンパク分解、リン酸化、グリコシル化、酸化、異性化、ならびに脱アミノ化変異体を含む、HSPの翻訳後修飾および分解産物を含む自然に発生する化学派生物もまた、本発明の方法のいずれかに明確に含まれる。

#### 【0217】

「トランスフェリン関連タンパク質」という用語は、トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノトランスフェリン、およびオボトランスフェリンを含むトランスフェリンファミリータンパク質を指す。これまでに解析されている全ての種にわたるトランスフェリンファミリーメンバーの結晶構造は、高度の構造上の類似性を示し、これは、トランスフェリン、ラクトフェリン、およびオボトランスフェリンが60～80%の配列同一性を共有するため、驚くべきことではない。(Walby and Buchanan, Biometals (2007) 20: 249-262)。全てのトランスフェリン関連タンパク質は、約340個の残基の2つのドメインを含有し、それらは古代の複製事象から進化したと考えられる。血清トランスフェリン、オボトランスフェリン、およびラクトフェリンに関して、重複ロープの各々は、Fe(III)の1つの原子ならびに1つの炭酸アニオンに結合する。少数の特記すべき例外を除いて、各々の鉄原子は、4個の保存アミノ酸残基、すなわち、アスパラギン酸、2つのチロシン、およびヒスチジンに配位する一方で、アニオン結合は、近接近してアルギニンならびにトレオニンに関連する。(Anderson et al., (1989) J. Mol. Biol. 209: 711-734)。

#### 【0218】

ヒトトランスフェリンおよびラクトフェリンは、61%以上の配列同一性を共有し、類似した三次元構造を有する。トランスフェリンは、TF-受容体複合体が内部移行され、鉄がエンドソーム内に放出され、かつ複合体が、TFが放出された細胞表面に再循環される、受容体媒介エンドサイトーシス過程において、遊離鉄イオンを受け取り、それを細胞に送達することによって、血液内で鉄を輸送する。対照的に、ラクトフェリンもしくはオボトランスフェリンに関する鉄輸送の役割は知られていない。比較して、これらのタンパク質は、全ての利用可能な鉄を隔離することによって、侵略細菌が鉄を獲得するのを防止するように機能すると考えられる。ヒトトランスフェリンは、ヒトラクトフェリンが放出するよりも高いpHで鉄を放出し、それは、恐らく、ヒトトランスフェリンがエンドサイトーシス後に鉄をエンドソーム内に放出する必要性、ならびにラクトフェリンが胃等の低pH環境で鉄を保持する必要性に関連する(Baker & Backer (2004) Biometals 17: 209-216)。

#### 【0219】

「トランスフェリン」という用語は、トランスフェリンの全ての自然発生形態および合形成態を指す。一態様では、「トランスフェリン」という用語は、組換えトランスフェリンを指す。一態様では、「トランスフェリン」という用語は、血漿由来トランスフェリンを指す。一態様では、トランスフェリンは、脊椎動物由来である。一態様では、トランスフェリンは、哺乳動物由来である。さらなる実施形態では、トランスフェリンは、ヒトである。別の態様では、組換えトランスフェリンは、植物細胞から産生される。特に好ましい一実施形態では、組換えトランスフェリンは、遺伝子組換えイネ(オリザサティバ)から産生される。トランスフェリンの様々な種に関する代表的な種および遺伝子バンク受入番号は、下の表D2に記載される。

【表 D 2】

表D 2 例示的なトランスフェリン遺伝子	
種	遺伝子バンク受入番号
ヒト	NP_001054.1
イエイヌ	XP_864550.1
ウシ	NP_803450.2
ハツカネズミ	NP_598738.1
ドブネズミ	NP_001013128.1
セキショクヤケイ	NP_990635.1
ゼブラフィッシュ	NP_001015057.1

10

## 【0220】

トランスフェリンは、その自然形態、すなわち、天然に見られる異なるアポ型、もしくは対立遺伝子変異体であってもよく、それらは例えば、トランケーション（例えば、N末端もしくはC末端または両方から）、または他のアミノ酸欠失、付加、挿入、置換、もしくは翻訳後修飾により、それらのアミノ酸配列で異なってもよい。例えば、ピログルタミン、イソ-アスパルチル、トランスフェリンのタンパク分解、リン酸化、グリコシル化、低減した、酸化、異性化、および脱アミノ化変異体を含む、トランスフェリンの翻訳後修飾および分解産物を含む自然に発生する化学修飾もまた、本発明の方法のいずれかに明確に含まれる。

20

## 【0221】

本発明の方法のいずれにおいて使用され得るトランスフェリンも、天然トランスフェリンアミノ酸配列、例えば、表D2に記載される天然トランスフェリン遺伝子配列のいずれかに実質的に相同するか、もしくは実質的に類似するアミノ酸配列を有し得る。あるいは、トランスフェリンは、表D2に記載されるトランスフェリンと少なくとも30%、好ましくは、少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。好ましい実施形態では、本発明の方法のいずれかにおける使用のためのトランスフェリンは、成熟ヒトトランスフェリンと少なくとも80%同一である。

30

## 【0222】

「ラクトフェリン」という用語は、ラクトフェリンの全ての自然発生形態および合形成態を指す。一態様では、「ラクトフェリン」という用語は、組換えラクトフェリンを指す。一態様では、「ラクトフェリン」という用語は、乳由来ラクトフェリンを指す。一態様では、ラクトフェリンは、脊椎動物由来である。一態様では、ラクトフェリンは、哺乳動物由来である。さらなる実施形態では、ラクトフェリンは、ヒトである。別の態様では、組換えラクトフェリンは、植物細胞から産生される。特に好ましい一実施形態では、組換えラクトフェリンは、遺伝子組換えイネ（オリザサティバ）から産生される。ラクトフェリンの様々な種に関する代表的な種および遺伝子バンク受入番号は、下の表D3に記載される。

40

【表 D 3】

表D 3 例示的なラクトフェリン遺伝子	
種	遺伝子バンク受入番号
ヒト	AAA59511.1
イノシシ	AAA31059.1
ヒトコブラクダ	CAB53387.1
ウシ	AAA30610.1
ウマ	CAA09407.1

10

## 【 0 2 2 3 】

ラクトフェリンは、その自然形態、すなわち、天然に見られる異なるアポ型、もしくは対立遺伝子変異体であってもよく、それらは例えば、トランケーション（例えば、N末端もしくはC末端または両方から）、または他のアミノ酸欠失、付加、挿入、置換、もしくは翻訳後修飾により、それらのアミノ酸配列で異なってもよい。例えば、ピログルタミル、イソ-アスパルチル、ラクトフェリンのタンパク分解、リン酸化、グリコシル化、低減した、酸化、異性化、および脱アミノ化変異体を含む、ラクトフェリンの翻訳後修飾および分解産物を含む自然に発生する化学修飾もまた、本発明の方法のいずれかに明確に含まれる。本発明の方法のいずれにおいて使用され得るラクトフェリンも、天然ラクトフェリンアミノ酸配列、例えば、表D 3に記載される天然ラクトフェリン遺伝子配列のいずれかに実質的に相同するか、もしくは実質的に類似するアミノ酸配列を有し得る。あるいは、ラクトフェリンは、表D 3に記載されるラクトフェリンと少なくとも30%、好ましくは、少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。好ましい実施形態では、本発明の方法のいずれかにおける使用のためのラクトフェリンは、成熟ヒトラクトフェリンと少なくとも80%同一である。

20

## 【 0 2 2 4 】

「メラノトランスフェリン」という用語は、メラノトランスフェリンの全ての自然発生形態および合形成態を指す。一態様では、「メラノトランスフェリン」という用語は、組換えメラノトランスフェリンを指す。一態様では、「メラノトランスフェリン」という用語は、細胞または組織から精製されるメラノトランスフェリンを指す。一態様では、メラノトランスフェリンは、脊椎動物由来である。一態様では、メラノトランスフェリンは、哺乳動物由来である。さらなる実施形態では、メラノトランスフェリンは、ヒトである。別の態様では、組換えメラノトランスフェリンは、植物細胞から産生される。特に好ましい一実施形態では、組換えメラノトランスフェリンは、遺伝子組換えイネ（オリザサティバ）から産生される。メラノトランスフェリンの様々な種に関する代表的な種および遺伝子バンク受入番号は、下の表D 4に記載される。

30

【表 D 4】

表D 4 例示的なメラノトランスフェリン遺伝子	
種	遺伝子バンク受入番号
ヒト	AAA59992.1
アナウサギ	NP_001075461.1
ハツカネズミ	NP_038928.1
イエイヌ	XP_545158.2
セキショクヤケイ	CAA63003.1

10

## 【 0 2 2 5 】

「オボトランスフェリン」という用語は、オボトランスフェリンの全ての自然発生形態および合形成態を指す。一態様では、「オボトランスフェリン」という用語は、組換えオボトランスフェリンを指す。一態様では、オボトランスフェリンは、脊椎動物由来である。一態様では、オボトランスフェリンは、トリ由来である。別の態様では、組換えオボトランスフェリンは、植物細胞から産生される。特に好ましい一実施形態では、組換えオボトランスフェリンは、遺伝子組換えイネ（オリザサティバ）から産生される。オボトランスフェリンの様々な種に関する代表的な種および遺伝子バンク受入番号には、C A A 2 6 0 4 0 . 1 が含まれる。

20

## 【 0 2 2 6 】

「インスリン関連成長因子」または「I G F - 1」という用語は、I G F - 1、I G F - 1 A、I G F - 1 B、I G F - 2 A、およびI G F - 2 Bを含む、インスリン関連成長因子の全ての自然発生形態および合形成態を指す。一態様では、「インスリン関連成長因子」という用語は、組換えインスリン関連成長因子を指す。一態様では、「インスリン関連成長因子」という用語は、細胞または組織から精製されるインスリン関連成長因子を指す。一態様では、インスリン関連成長因子は、脊椎動物由来である。一態様では、インスリン関連成長因子は、哺乳動物由来である。さらなる実施形態では、インスリン関連成長因子は、ヒトである。別の態様では、組換えインスリン関連成長因子は、植物細胞から産生される。特に好ましい一実施形態では、組換えインスリン関連成長因子は、遺伝子組換えイネ（オリザサティバ）から産生される。インスリンの様々な種に関する代表的な種および遺伝子バンク受入番号は、下の表 D 5 に記載される。

30

【表 D 5】

表D 5 例示的なインスリン関連成長因子遺伝子	
種	遺伝子バンク受入番号
ヒト	P01343 P05019 CAA01954.1 CAA40093.1 CAA40092.1
ウシ	NP_001071296
ハツカネズミ	NP_001104746.1 NP_034642.2 NP_908941.1 NP_001104745.1 NP_001104744.1
アフリカツメガエル (アフリカツメガエル)	Q90WW4
ゼブラフィッシュ (ゼブラフィッシュ)	NP_571900

10

## 【0227】

インスリン関連成長因子は、その自然形態、すなわち、天然に見られる異なるアボ型、もしくは対立遺伝子変異体であってもよく、それらは例えば、トランケーション（例えば、N末端もしくはC末端または両方から）、または他のアミノ酸欠失、付加、挿入、置換、もしくは翻訳後修飾により、それらのアミノ酸配列で異なってもよい。例えば、ピログルタミンル、イソ-アスパルチル、インスリン関連成長因子のタンパク分解、リン酸化、グリコシル化、低減した、酸化、異性化、および脱アミノ化変異体を含む、インスリン関連成長因子の翻訳後修飾および分解産物を含む自然に発生する化学修飾もまた、本発明の方法のいずれにも明確に含まれる。本発明の方法のいずれにおいて使用され得るインスリン関連成長因子も、天然インスリン関連成長因子アミノ酸配列、例えば、表D5に記載される天然インスリン関連成長因子遺伝子配列のいずれかに実質的に相同するか、もしくは実質的に類似するアミノ酸配列を有し得る。あるいは、インスリン関連成長因子は、表D5に記載されるインスリン関連成長因子と少なくとも30%、好ましくは、少なくとも40、50、60、70、75、80、85、90、95、98、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。好ましい実施形態では、本発明の方法のいずれかにおける使用のためのインスリン関連成長因子は、成熟ヒトインスリン関連成長因子と少なくとも80%同一である。

20

30

## 【0228】

一態様では、栄養補助剤には、約1対5、約1対10、約1対15、約1対20、または約1対25のラクトフェリンとアルブミンとの比率で混合されたラクトフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のラクトフェリンの濃度は、約0.1~約0.5g/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも30%の増加を示す。

40

## 【0229】

一態様では、栄養補助剤には、約1対1、約1対2、約1対3、約1対4、または約1対5のラクトフェリンとアルブミンとの比率で混合されたラクトフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のラクトフェリンの濃度は、約0.5~約0.8g/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも30%の増加を示す。

50

## 【0230】

一態様では、栄養補助剤には、約1対0.5、約1対0.75、約1対1.0、約1対1.25、約1対1.5、約1対1.75、または約1対2.0のラクトフェリンとアルブミンとの比率で混合されたラクトフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養物中のラクトフェリンの濃度は、約0.8～約1.5 g/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも30%の増加を示す。

## 【0231】

一態様では、栄養補助剤には、約1対0.25、約1対0.33、約1対0.66、約1対1.00、約1対1.33、約1対1.66、または約1対2.0のラクトフェリンとアルブミンとの比率で混合されたラクトフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のラクトフェリンの濃度は、約1.0～約1.5 g/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも30%の増加を示す。

10

## 【0232】

一態様では、栄養補助剤には、約1対0.8、約1対1、または約1対1.2のラクトフェリンとアルブミンとの比率で混合されたラクトフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のラクトフェリンの濃度は、約0.1～約1.5 g/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも50%の増加を示す。

20

## 【0233】

一態様では、栄養補助剤には、約1対20、約1対100、または約1対200のトランスフェリンとアルブミンとの比率で混合されたトランスフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のトランスフェリンの濃度は、約1～約10 µg/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも50%の増加を示す。

30

## 【0234】

一態様では、栄養補助剤には、約1対500、約1対1000、および約1対2000のトランスフェリンとアルブミンとの比率で混合されたトランスフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のトランスフェリンの濃度は、約1～約10 µg/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも50%の増加を示す。

40

## 【0235】

一態様では、栄養補助剤には、約1対3000、約1対4000、および約1対5000のトランスフェリンとアルブミンとの比率で混合されたトランスフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のトランスフェリンの濃度は、約1～約10 µg/Lである。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも50%の増加を示す。

## 【0236】

一態様では、栄養補助剤には、約1対80、約1対100、および約1対120のトランス

50



ンスフェリンとアルブミンとの比率で混合されたトランスフェリンおよび組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のトランスフェリンの濃度は、約3～約8  $\mu\text{g/L}$ である。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも80%の増加を示す。

【0237】

一態様では、栄養補助剤には、約1対100000、約1対10000、または約1対1000のIGF-1とアルブミンとの比率で混合されたIGF-1および組換えアルブミンの混合物が含まれる。これらの栄養補助剤のいずれかの一態様では、培養中のIGF-1の濃度は、約1～約10  $\mu\text{g/L}$ である。一態様では、栄養補助剤は、組織培養成分の組み合わせと同一の濃度で培養に添加され、同一の培養条件下で測定された場合の各々の細胞培養成分の相加効果のみと比較して、生産性において少なくとも50%の増加を示す。

10

【0238】

本発明の別の態様では、栄養補助剤は、成長因子、セレン酸ナトリウム、およびエタノールアミンから成る群から選択される1つ以上の付加的因子を含有する。

【0239】

本発明の別の態様では、成長因子は、インスリン、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞成長因子1-23(FGF)、インスリン様成長因子-1(IGF)、ケラチノサイト成長因子1および2(KGF)、ならびに白血病抑制因子(LIF)から独立して選択される。一態様では、成長因子は、インスリンである。別の態様では、成長因子は、トランスフェリンである。

20

【0240】

一態様では、本発明の栄養補助剤は、水溶液中で単離した細胞培養成分を混合することによって調製され得る。

【0241】

1つの成分パートA(アルブミンまたは別の細胞培養成分)を含有する知られている濃度の液体を、パートB(トランスフェリン関連タンパク質またはIGF-1等)を含有する液体に混ぜ合わせ、成分の所望の比率を含有する比率を得ることもできる。他の細胞培養成分に対する任意の所望の範囲において、アルブミンの乾燥重量に基づく比率を得るために、粉末、凍結乾燥、またはさもなければ乾燥粉末(アルブミン)を、細胞培養成分(トランスフェリン関連タンパク質等)を含有する水溶液に直接添加することができる。粉末、凍結乾燥、またはさもなければ乾燥アルブミンを、細胞培養成分粉末とブレンドし、完全に重量測定に基づいた比率を得ることもできる。得られた粉末を、当分野に共通の好適な緩衝液中に、非常に低い濃度(ピコモル)から非常に高い濃度(ミリモル)に及ぶ濃度で溶解し、細胞培養成分を再構成することができる。

30

【0242】

一態様では、本発明の栄養補助剤は、したがって、組換えアルブミンおよび1つ以上のトランスフェリン関連タンパク質ならびに/またはIGF-1を含む。そのような栄養補助剤は、滅菌液または粉末形状として一般に調製される。組成物中のトランスフェリン関連タンパク質の総量は、細胞培養成分の50%～約0.0001%の重量まで様々であり得る。他の態様では、組成物中のトランスフェリン関連タンパク質の総量は、約0.01%～約0.02%、もしくは約0.01%～約0.09%、もしくは約0.02%～約0.04%、もしくは約0.02%～約0.06%、もしくは約0.02%～約0.08%まで様々であり得る。別の態様では、組成物中のトランスフェリン関連タンパク質の量は、アルブミンに対して、約0.01%より大きい、またはより好ましくは、約0.05%より大きい、またはより好ましくは、約0.1重量/重量%より大きい、またはより好ましくは、約0.2重量/重量%のトランスフェリン関連タンパク質より大きい。

40

【0243】

50

特許請求される栄養補助剤のいずれかの一態様では、組換えアルブミンは、本質的に内毒素および界面活性剤を含んでいない。別の態様では、アルブミンは、1 mg 当たり、約 1 E U 未満の内毒素を有する。さらに別の態様では、アルブミンは、約 10 ppm 未満の界面活性剤を含有する。特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、アルブミンは、95%より大きい純度を有する。

#### 【0244】

特許請求される栄養補助剤のいずれかの別の態様では、栄養補助剤は、イネ熱ショックタンパク質に結合される組換えアルブミンを含み、複合体は、約 1 E U 未満の内毒素を有し、アルブミンに対して少なくとも 95% 純粋である。一態様では、組換えアルブミンは、イネ中で産生される。

10

#### 【0245】

これらの方法のいずれかの別の態様では、栄養補助剤は、細胞培養成分として組換えアルブミンを含有し、アルブミンは、本質的に凝集アルブミンを含んでいない。これらの栄養補助剤のいずれかの別の態様では、組換えアルブミンは、約 2% 未満の凝集アルブミンを有する。

#### 【0246】

したがって、一態様では、本発明の栄養補助剤は、1つ以上の結合した h s p を伴う組換えアルブミンを含む。そのような栄養補助剤は、滅菌液または粉末形状として一般に調製される。アルブミン組成物中の h s p の総量は、アルブミンの 5% ~ 約 0.001% の重量まで様々であり得る。他の態様では、アルブミン組成物中の h s p の総量は、約 0.01% ~ 約 0.02%、もしくは約 0.01% ~ 約 0.09%、もしくは約 0.02% ~ 約 0.04%、もしくは約 0.02% ~ 約 0.06%、もしくは約 0.02% ~ 約 0.08% まで様々であり得る。別の態様では、アルブミン組成物中の h s p の量は、アルブミンに対して、約 0.02% より大きい、またはより好ましくは、約 0.03% より大きい、またはより好ましくは、約 0.04 重量 / 重量% より大きい、またはより好ましくは、約 0.05 重量 / 重量% の h s p より大きい。

20

III. 細胞培養培地成分の産生

#### 【0247】

本発明の栄養補助剤における使用のためのアルブミンおよびトランスフェリン関連タンパク質、ならびに他の細胞培養培地成分を、任意の好適な方法、例えば、自然発生源からの単離によって、発現システムを含む遺伝子操作された宿主細胞（以下を参照）から、もしくは例えば、自動ペプチドシンセサイザーを使用する化学合成によって、またはそのような方法の任意の組み合わせによって調製することができる。そのようなポリペプチドを調製するための手段は、当分野でよく理解されている。

30

#### 【0248】

組換え産生のために、細胞培養培地成分をコードする核酸を組み込むように宿主細胞を遺伝子操作することができる。典型的には、核酸は、選択の発現システムにおける高レベル発現のためにコドン最適化され、宿主細胞中の目的のタンパク質の発現を可能にするために、発現ベクター中に組み込まれる。ベクターは、円形二重鎖 DNA として存在し、数千ベース (kb) から数百 kb の大きさに及び得る。好ましいクローニングベクターは、ポリヌクレオチド配列のクローニングおよび組換え操作を促進するように自然発生プラスミドから修飾されている。多くのそのようなベクターは、当分野では周知であり、かつ市販されており、例えば、Sambrook (In. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," second edition, edited by Sambrook, Fritsch, & Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)), Maniatis, In: Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 3, Gene Sequence Expression, Academic Press, NY, pp. 563 - 608 (1980) を参照されたい。

40

#### 【0249】

50

植物細胞からタンパク質を産生するための一般的かつ特定の方法は、以下の特許および適用から得られることができ、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：米国特許公開第2003/0172403号A1( "Plant Transcription Factors and Enhanced Gene Expression" )、米国特許第6,991,824号( "Expression of Human Milk Protein in Transgenic Plants" )、米国特許公開第2003/0221223号( "Human Blood Proteins Expressed in Monocot Seeds" )、米国特許公開第2004/0063617号( "Method of Making an Anti-infective Composition for Treating Oral Infections" )、および国際出願PCT/米国第2004/041083号( "High-level Expression of Fusion Polypeptides in Plant Seeds Utilizing Seed-Storage Proteins as Fusion Carriers" )。植物細胞からタンパク質を産生するための他の一般的かつ特定の方法は、例えば、以下の参考文献から得られることができ、それらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：米国特許第5,693,507号、米国特許第5,932,479号、米国特許第6,642,053号、および同第6,680,426号( each titled "Genetic Engineering of Plant Chloroplasts" )、米国特許公開第2005/0066384号( "Site-Targeted Transformation Using Amplification Vectors" )、米国特許公開第2005/0221323号( "Amplification Vectors Based on Trans-Splicing" )、米国特許公開第2006/0026718号( "Method of Controlling Cellular Processes in Plants" )、ならびに米国特許公開第2006/0075524号( Method of Controlling A Cellular Process in a Multi-Cellular Organism )、Marillonnet et al., Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants, Nature Biotech. (2005) 23(6): 718-723。

発現ベクターには、プラスミド、エピソーム、コスミッド、レトロウイルス、またはファージが含まれ、発現ベクターは、細胞培養培地成分をコードするDNA配列を発現するために使用されることができ、一態様では、発現制御配列の構築を含む。プロモーターおよび他の調節要素の選択は、目的とする宿主細胞によって異なる可能性があり、多くのそのような要素は市販されており、Invitrogen(CA, USA)のGateway System等の分離部品から容易に組み立てることができる。細胞培養培地成分への発現システムは、安定的または一過性発現システムであってもよい。

#### 【0250】

代表的な市販のウイルス性発現ベクターには、Crucell, Inc. から入手可能なPer.C6システム等のアデノウイルスベースのシステム、InvitrogenのpLP1等のレンチウイルスベースのシステム、タバコモザイクウイルスベースのベクター(Lindbo et al., BMC Biotechnol. (2007) 7: 52-58)等のレトロウイルスベクターが含まれるが、それらに限定されない。

#### 【0251】

エピソーム発現ベクターは、宿主細胞中で複製可能であり、かつ適切なエピソーム選択圧の存在下で、宿主細胞内の染色体外エピソームとして存続する。(例えば、Conese et al., Gene Therapy 11: 1735-1742 (2004) を参照)。代表的な市販のエピソーム発現ベクターには、エプスタインバー核抗原1(E

BNA1) およびエプスタインバーウイルス (EBV) 複製起点 (oriP) を利用するエピソームプラスミドが含まれるが、それらに限定されず、具体例として、Invitrogen のベクター pREP4、pCEP4、pREP7 が挙げられる。EBV ベースのベクターの宿主域は、EBNA1 結合タンパク質 2 (EPB2) の同時発現を介して、事実上任意の真核細胞型にまで増加することができ (Kapoor et al., EMB O. J. 20: 222 - 230 (2001))、Invitrogen のベクター pcDNA3.1 ならびに Stratagene の pBK-CMV は、EBNA1 および oriP の代わりに T 抗原および SV40 複製起点を使用するエピソームベクターの非限定的な例を表す。

#### 【0252】

組込み発現ベクターは、宿主細胞の DNA 中に無作為に組み込んでもよく、または発現ベクターと宿主細胞染色体との間の特異的組換えを可能にする組換え部位を含んでもよい。そのような組込み発現ベクターは、所望のタンパク質の発現をもたらすために、宿主細胞の染色体の内因性発現制御配列を利用することができる。部位特異的様式で組み込まれるベクターの例には、例えば、Invitrogen の flp-in システム (例えば、pcDNA (商標) 5/FRT) または Stratagene の pExchange-6 Core Vectors で見出され得るもの等の cre-lox システムの成分が挙げられる。無作為な方法で宿主細胞染色体中に組み込まれるベクターの例には、例えば、Invitrogen の pcDNA3.1 (T 抗原の不在下で導入される場合)、または Promega の pCI もしくは pFN10A (ACT) Flexi (登録商標) が挙げられる。

#### 【0253】

あるいは、目的の内因性遺伝子の発現を調節するように、細胞中の遺伝子座に強力なプロモーターまたはエンハンサー配列を導入し、かつ組み込むために、発現ベクターを使用することができる (Capecchi MR. Nat Rev Genet. (2005) 6 (6): 507 - 12、Schindehutte et al., Stem Cells (2005) 23 (1): 10 - 5)。このアプローチを、目的の内因性遺伝子の誘導性発現を提供するように、細胞のゲノム DNA 中に Tet-On プロモーター (米国特許第 5,464,758 号および同第 5,814,618 号) 等の誘導性プロモーターを挿入するために使用することもできる。活性化コンストラクトはまた、目的の遺伝子に特異的な所望の遺伝子座への活性化配列の相同的または非相同的組換えを可能にするように標的化配列を含むこともできる (例えば、Garcia-Otin & Guillo, Front Biosci. (2006) 11: 1108 - 36 を参照)。あるいは、4-ヒドロキシタモキシフェンの存在下でトランス遺伝子を活性化するために、Cre-ER システム等の誘導性リコンビナーゼシステムを使用することができる (Indra et al. Nuc. Acid. Res. (1999) 27 (22): 4324 - 4327、Nuc. Acid. Res. (2000) 28 (23): e99、および米国特許第 7,112,715 号)。

#### 【0254】

細胞培養培地成分を産生するための好適な細胞には、原核生物細胞、酵母、昆虫細胞、植物発現システム、および哺乳類発現システムが含まれる。これらの一般的な指針の範囲内で、有用な微生物宿主には、バシラス属、エシェリキア属 (大腸菌等)、シュドモナス属、ストレプトミセス属、サルモネラ属、エルビニア属、枯草菌、バチルスプレビス菌、大腸菌の多様な菌株 (例えば、HB101、(ATCC 番号 33694) DH5、DH10、および MC1061 (ATCC 番号 53338)) 由来の細菌が含まれるが、それらに限定されない。

#### 【0255】

酵母の多くの菌株は、当業者に知られており、また、ハンゼヌラ属、クリベロマイセス属、ピキア属、リノスポリジウム属、サッカロミセス属、およびシゾサッカロミセス属、ならびに他の菌類由来のものを含む、細胞培養培地成分の発現のための宿主細胞として入

10

20

30

40

50

手可能である。好ましい酵母細胞には、例えば、サッカロミセスセレビシアエおよびピキアパストリスが含まれる。

【0256】

さらに、所望する場合、昆虫細胞システムを、本発明の栄養補助剤および方法における使用のための細胞培養培地成分を産生するために利用することができる。そのようなシステムは、例えば、Kitts et al., Biotechniques, 14:810-817 (1993)、Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572 (1993)、およびLucklow et al. (J. Virol., 67:4566-4579 (1993))によって説明される。好ましい昆虫細胞には、Sf-9およびHI5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)が含まれる。

10

【0257】

細胞培養培地成分の発現のために、多くの好適な植物発現システムを使用することができ、例として、例えば、任意の単子葉植物または双子葉植物が挙げられる。好適な単子葉植物には、制限なしに、イネ、オオムギ、コムギ、ライムギ、トウモロコシ、キビ、ライコムギ、またはソルガムが含まれ、好ましくは、イネである。他の好適な植物には、シロイヌナズナ、ムラサキウマゴヤシ、タバコ、ピーナッツ、およびダイズが含まれる。

【0258】

一般的に、植物での使用のための発現ベクターには、キメラ遺伝子を構成する以下の操作可能に連結する要素が含まれる：植物タンパク質をコードする遺伝子に由来し、細胞培養培地成分をコードする遺伝子に操作可能に連結するプロモーター。プロモーター領域は、種子成熟条件下での誘導を可能にする様式で調節されるように選択される。本発明における使用のためのプロモーターは、典型的には、イネ、オオムギ、コムギ、カラスムギ、ライムギ、トウモロコシ、キビ、ライコムギ、またはソルガム等の穀類に由来する。

20

【0259】

一態様では、キメラ遺伝子には、種子成熟中に増加した発現を示すプロモーターが含まれる。そのようなプロモーターの例には、以下の成熟特異的単子葉植物貯蔵タンパク質の1つに関連する成熟特異的プロモーター領域が挙げられる：イネグルテリン、オリジン、ならびにプロラミン、オオムギホルデイン、コムギグリアジンおよびグルテリン、トウモロコシゼインおよびグルテリン、カラスムギグルテリン、ならびにソルガムカフィリン、キビベニセチン、ならびにライムギセカリン。

30

【0260】

一態様では、キメラ遺伝子には、i) 成熟特異的単子葉植物貯蔵タンパク質の遺伝子由来のプロモーター、ii) プロモーターに操作可能に連結し、胚乳細胞、好ましくは、タンパク質貯蔵体等の胚乳細胞小器官に連結するポリペプチドを標的とすることができる単子葉植物種子特異的信号配列 (N末端リーダー配列もしくはC末端トレーラー配列等) をコードする第1のDNA配列、ならびにiii) 翻訳フレーム中で第1のDNA配列と連結し、細胞培養培地成分をコードする第2のDNA配列が含まれる。信号配列は、好ましくは、植物細胞中の細胞培養培地成分から切断される。

【0261】

キメラ遺伝子は、典型的には、次いで、(i) プラスミドまたはウイルス起源であり、ベクターが細菌から所望の植物宿主にDNAを移動させるのを許すためにベクターに必要な特性を提供する、キメラ遺伝子の上流および/または下流のコンパニオン配列、(ii) 選択可能なマーカー配列、ならびに(iii) 通常、転写開始調節領域からのベクターの反対端における転写終結領域を有する、好適な植物形質転換ベクター内に設置される。適切な発現ベクターおよび好適な調節配列の多数の種類が、多種多様の植物宿主細胞に関して当分野で知られている。

40

【0262】

少なくとも1つの選択的精製タグおよび/または少なくとも1つの特定のプロテアーゼ切断部位が、単子葉植物種子貯蔵タンパク質担体からの細胞培養培地成分の最終的な放出

50

のために提供され得る。例えば、化学分解部位を提供する戦略的メチオニンまたはトリプトファン残基は、内因性植物タンパク質からの細胞培養培地成分の放出のために、ドメイン間のフレーム内で操作され得る。他の選択的プロテアーゼ切断部位には、エンテロキナーゼ (ek)、因子 Xa、トロンピン、V8 プロテアーゼ、GENENASE (商標) (サブチリシン BPN' の変異体)、-溶菌プロテアーゼ、またはタバコエッチウイルスプロテアーゼが含まれるが、それらに限定されない。あるいは、融合タンパク質の切断は、臭化シアンまたは N-クロロサクシニミド等の化学分解剤を介して実行され得る。

#### 【0263】

多数の好適な哺乳類宿主細胞が当分野でも知られており、多くは、アメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 から入手可能である。例として、チャニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) (ATCC 番号 CCL61)、CHO DHFR-細胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 4216-4220 (1980))、ヒト胎児腎臓 (HEK) 293 もしくは 293 T 細胞 (ATCC 番号 CRL1573)、または 3T3 細胞 (ATCC 番号 CCL92) 等の哺乳類細胞が挙げられるが、それらに限定されない。好適な哺乳類宿主細胞の選択、および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、ならびに産物産生および精製のための方法は当分野で知られている。他の好適な哺乳類細胞株は、サル COS-1 (ATCC 番号 CRL1650) および COS-7 細胞株 (ATCC 番号 CRL1651)、ならびに CV-1 細胞株 (ATCC 番号 CCL70) である。さらなる例示的な哺乳類宿主細胞には、形質転換細胞株を含む、霊長類細胞株および齧歯類細胞株が含まれる。

10

20

#### 【0264】

本発明の DNA コンストラクト (または DNA コンストラクトに由来する RNA) を用いてそのようなタンパク質を産生するために、無細胞転写および翻訳システムを採用することができる。

#### 【0265】

本発明の組換えタンパク質の産生は、当分野で周知の方法によって、発現システムを含む遺伝子操作された宿主細胞から調製され得る。したがって、さらなる態様では、本発明は、細胞培養培地成分をコードする 1 つのポリヌクレオチドまたは複数のポリヌクレオチドを含む発現システム、およびそのような発現システムで遺伝子操作される宿主細胞、ならびに組換え技術によるそのようなタンパク質の産生に関する。一実施形態では、宿主細胞は、目的の熱ショックタンパク質を内因的に発現する。

30

#### 【0266】

本発明の栄養補助剤の発現タンパク質の精製が必要である場合、本発明のタンパク質を、細胞を溶解させる前または細胞溶解後の細胞環境のいずれかから回収することができる。タンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出物、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法で、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。精製のために高速液体クロマトグラフィーも同様に採用される。

40

#### 【0267】

特許、公開された特許出願、ならびに関連出版物の探索は、本開示を読解する当業者には、アルブミンを調製および精製するための重大かつ可能な方法を提供する。例えば、米国特許 第 4,075,197 号、同第 4,086,222 号、同第 4,093,612 号、同第 4,097,473 号、同第 4,136,094 号、同第 4,228,154 号、同第 5,250,662 号、同第 5,656,729 号、同第 5,677,424 号、同第 5,710,253 号、同第 5,728,553 号、同第 5,994,507 号、同第 6,001,974 号、同第 6,638,740 号、同第 6,617,133 号、および同第 7,423,124 号は、アルブミンを精製するための多様な方法を開示する。一態

50

様では、本発明での使用のためのアルブミンは、上述の当分野で認識される方法のいずれかを用いて精製され、次に、水溶液中で熱ショックタンパク質と混合される。陰イオン交換クロマトグラフィーおよびATPアガロース親和性クロマトグラフィーを含む熱ショックタンパク質の精製のための方法が当分野で周知である(Welch & Feramisco, J. Biol. Chem. 257(24)14949-14959; (1982)、Welch & Feramisco, Mol. Cell. Biol. 5(6)1229-1237(1985)。タンパク質をリフォールディングするための周知の技術が、ポリペプチドが細胞内合成、分離、および/または精製の間に変性する時に、活性立体配座を再生するために採用され得る。

#### 【0268】

好ましい一態様では、組換えアルブミンは、組換えアルブミンおよび熱ショックタンパク質の両方、または例えば、下ならびに実施例の項で説明されるhspタンパク質複合体の直接的な同時精製を可能にする手順を用いて精製される。一態様では、組換えアルブミンは、イネ中で産生され、熱ショックタンパク質は、内因性イネ熱ショックタンパク質である。

#### 【0269】

本方法の一態様では、発現ベクターは、宿主細胞中の組換えアルブミンの発現を増加させるために使用され、一方、宿主細胞内因性熱ショックタンパク質の発現は、宿主細胞hsp遺伝子の発現を活性化することによって達成される。別の態様では、発現ベクターは、熱ショックタンパク質の発現を増加させるために使用される。別の態様では、発現ベクターは、熱ショックタンパク質およびアルブミンの発現を増加させるために使用される。別の態様では、熱ショックタンパク質およびアルブミンをコードする核酸配列は、同一の発現ベクター内に配置される。

#### 【0270】

アルブミンおよびhsp70の類似した電気陰性度の理由から、陰イオン交換クロマトグラフィーは、Hsp中で濃縮されるアルブミンを調製する好ましい方法である。例えば、アルブミンおよびHsp70の両方を、高pH(7.5以上)で、ポリペプチド(巨大分子排除限界および好適な大きさ)のイオン交換に好適であるビーズ上に付着させた四級アミンまたはジエチルアミノエチルのいずれかから成る樹脂を含む陰イオン交換カラムに結合させる。そのような樹脂の例は、General Electric(GE)Q SepharoseおよびGE DEAE Sepharoseである。それらの類似した電気陰性度の理由から、低pH条件(pH6.5を下回る)を利用することは、同様に、陽イオン交換体での2つの分子の同時精製を可能にする。そのような陽イオン交換体の例は、GEのCarboxymethyl SepharoseおよびSulfonic acid Sepharoseベースの樹脂である。アルブミンおよびHsp70は、類似した等電点を有するため、混合モード樹脂も同様に、アルブミンおよびHsp70の同時精製のために採用され得る。Hsp70およびアルブミンの両方が、脂肪酸および他の疎水性分子に結合することで周知であるため、オクチルセファロース(GE)等の疎水性ベースの樹脂上でアルブミンおよびHspを同時精製することも可能である。Hsp70タンパク質およびアルブミン(65~75kDa)の同様の大きさの理由から、hspとともにアルブミンを同時精製し、したがって濃縮するために、65~75kDaより高い分子排除および65~75kDaより低い分子排除の両方を利用する接線流限外濾過による、2つのタンパク質の同時精製およびHsp70の濃縮が採用され得る。

#### 【0271】

同様に、それらの類似した分子量の理由から、分子篩およびゲル濾過またはサイズ排除クロマトグラフィー等の、大きさに基づいてポリペプチドを分離する任意の方法は、アルブミンおよびHsp70を効率的に同時精製するはずである。さらに、疎水性ならびに電気陰性度または表面電荷の観点でのHsp70およびアルブミンの類似した性質の理由から、多数の条件下での沈殿により同時精製され得る。それらの条件のいくつかは、硫酸アンモニウムによる沈殿、尿素等の変性剤による沈殿、または等電点および溶解度に基づく

10

20

30

40

50

沈殿である。

【0272】

該方法は、他の供給源から h s p を有するアルブミンを濃縮するためにも適用される。例えば、哺乳類細胞等の脊椎動物細胞、および昆虫等の無脊椎動物細胞、ならびに植物、および酵母等の菌類等に基づく、天然および遺伝子組換え動物の原料血清に由来するアルブミン、ならびに組換え生物および組織培養システムから産生されるアルブミンである。

【0273】

特許、公開された特許出願、ならびに関連出版物の探索もまた、本開示を読解する当業者に、トランスフェリン関連タンパク質を調製および精製するための重大かつ可能な方法を提供する。例えば、米国特許第 7,368,141 号、同第 7,354,902 号、同第 5,708,149 号、同第 5,596,082 号、同第 5,169,936 号、同第 4,791,193 号、および同第 4,667,018 号は、トランスフェリン関連タンパク質を精製するための多様な方法を開示する。

IV. 例示的な細胞

【0274】

理論によって拘束されることを望むことなく、初代細胞、不死化細胞、分化細胞、未分化細胞、または幹細胞等の細胞を含む、アポトーシスに感受性の高い任意の細胞が、本発明の方法において、特殊化の様々な程度で使用され得ることが企図される。特定の実施形態では、本発明の方法で使用される細胞は、目的のタンパク質、例えば、治療用タンパク質または抗体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子でトランスフェクトされる。

【0275】

特定の実施形態では、本発明の方法で使用される細胞は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞である。哺乳類細胞の例には、ヒト B 細胞、および T 細胞、ならびにハイブリドーマ等のその派生物、ならびに B 細胞もしくは T 細胞のマーカーを発現する細胞、SV40 により形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651)、ヒト胎児腎臓株 (293 細胞または懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された 293 細胞、Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977))、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))、CHO-K1 細胞 (ATCC CCL-61)、ヒト PER.C6 細胞 (Crucell, NV)、マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))、サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL70)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa、ATCC CCL2)、イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL34)、バッファローラット肝臓細胞 (BRL3A、ATCC CRL1442)、ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL75)、ヒト肝細胞 (Hep G2、HB8065)、マウス乳腺腫瘍 (MMT060562、ATCC CCL51)、TRI 細胞 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982))、MRC5 細胞、FS4 細胞、NSO マウス骨髓腫細胞 (EACC、SIGMA)、およびヒト肝細胞腫株 (Hep G2) が挙げられるが、それらに限定されない。有用な細胞株のさらなる例には、HT1080 細胞 (ATCC CCL121)、MCF-7 乳癌細胞 (ATCC BTH22)、K-562 白血病細胞 (ATCC CCL243)、KB 癌細胞 (ATCC CCL17)、2780AD 卵巣癌細胞 (Van der Blic, A.M. et al., Cancer Res., 48:5927-5932 (1988) を参照)、ラジ細胞 (ATCC CCL86)、ジャーカット細胞 (ATCC TIB152)、ナマルワ細胞 (ATCC CRL1432)、HL-60 細胞 (ATCC CCL240)、ダウディ細胞 (ATCC CCL213)、RPMI 8226 細胞 (ATCC CCL155)、U-937 細胞 (ATCC CRL1593)、バウス黒色腫細胞 (ATCC CRL9607)、WI-38 VA13 亜株 2R4 細胞 (AT

10

20

30

40

50



C C C L L 7 5 . 1 )、および M O L T - 4 細胞 ( A T C C C R L 1 5 8 2 )、ならびに別の種のヒト細胞および細胞の融合によって產生されるヘテロハイブリドーマ細胞が挙げられるが、それらに限定されない。これらおよび他の細胞ならびに細胞株は、アメリカ培養細胞系統保存機関 ( V i r g i n i a , U S A ) から市販されている。多くの他の細胞株が当分野で知られており、かつ当業者に精通しており、したがって、そのような細胞株を、本発明の方法で同様にうまく使用することができる。特定の実施形態では、本発明の方法で使用される細胞は、C H O 細胞または N S O 細胞である。ハイブリドーマおよび抗体產生細胞もまた、本発明の方法で使用され得る。

#### 【 0 2 7 6 】

別の実施形態では、本発明の方法のいずれかで使用される細胞は、幹細胞である。幹細胞は、自己再生前駆体、非再生前駆体、および末期分化細胞を含む、子孫細胞を產生するために、単細胞レベルで自己再生するだけではなく分化もするそれらの能力によって定義される未分化細胞である。幹細胞はまた、複数の胚葉 ( 内胚葉、中胚葉、および外胚葉 ) 由来の多様な細胞系統の機能的細胞に生体外で分化し、また移植後に複数の胚葉の組織を生み出し、胚盤胞への注入後に、全てではないとしても実質的にほとんどの組織に十分に寄与するそれらの能力によって特徴付けられる。

#### 【 0 2 7 7 】

本発明の方法のいずれかで使用され得るヒト胚性幹細胞の種類には、妊娠中の任意の時点、典型的であっても必ずしもではないが、妊娠の約 1 0 ~ 1 2 週間前に採取される前胚組織 ( 例えば、胚盤胞等 )、胚組織、または胎生組織を含む、妊娠後に形成される組織に由来するヒト胚細胞の樹立株が含まれる。非限定的な例は、例えば、ヒト胚性幹細胞株 H 1、H 7、および H 9 ( W i c e l l ) 等のヒト胚性幹細胞またはヒト胚幹細胞の樹立株である。そのような細胞の初期の確立または安定化の間の本開示の組成物の使用も同様に企図され、その場合、供給源細胞は、供給源組織から直接採取される初代多能性細胞であろう。フィーダー細胞の不在下ですでに培養された多能性幹細胞集団から採取される細胞もまた好適である。例えば、B G 0 1 v ( B r e s a G e n , A t h e n s , G a . ) 等の変異ヒト胚性幹細胞株も同様に好適である。一実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、T h o m s o n ら ( 米国特許第 5 , 8 4 3 , 7 8 0 号、S c i e n c e 2 8 2 : 1 1 4 5 , 1 9 9 8、C u r r . T o p . D e v . B i o l . 3 8 : 1 3 3 f f . , 1 9 9 8、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 2 : 7 8 4 4 , 1 9 9 5 ) によって説明されるように調製される。

#### 【 0 2 7 8 】

さらに、ハイブリドーマ細胞を本発明の方法で使用することもできる。「ハイブリドーマ」という用語は、免疫学的起源の不死化細胞株および細胞を產生する抗体の融合によって產生されるハイブリッド細胞株を指す。該用語は、ヘテロハイブリッド骨髓腫融合の子孫を包含し、それは、後にトリオーマ細胞株として一般に知られている血漿細胞と融合されるヒト細胞およびマウス骨髓腫細胞株との融合の結果である。さらに、該用語は、例えば、クアドローマ等の抗体を產生する任意の不死化ハイブリッド細胞株を含むように意図されている。例えば、M i l s t e i n e t a l . , N a t u r e , 5 3 7 : 3 0 5 3 ( 1 9 8 3 ) を参照されたい。ハイブリッド細胞株は、ヒト、ウサギ、およびマウスを含む任意の種であることができる。

#### 【 0 2 7 9 】

いくつかの実施形態では、本発明の方法で使用される細胞株は、抗体產生細胞株である。抗体產生細胞株は、当業者に周知の技術を使用して選択および培養されてもよい。例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , C o l i g a n e t a l . , E d s . , G r e e n P u b l i s h i n g A s s o c i a t e s a n d W i l e y - I n t e r s c i e n c e , J o h n W i l e y a n d S o n s , N e w Y o r k ( 1 9 9 1 ) を参照されたく、補足を含む、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一般的に、細胞培養中の組換えタンパク質発現に好適な任意の細胞を本発明の方法で使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0280】

いくつかの実施形態では、本発明の方法で使用される細胞には、所望の組換えタンパク質、例えば、本発明の方法を使用して産生されることが望ましい治療用タンパク質または抗体をコードする異種核酸分子が含まれ得る。特定の実施形態では、本発明の方法は、1つ以上の汚染物質の低減したレベルの存在下で、所望の組換えタンパク質、例えば、治療用タンパク質または抗体の高力価を産生するのに有用である。

## V. 細胞培養培地

## 【0281】

細胞成長およびタンパク質産生に好適な任意の好適な培養培地またはフィード培地が、本発明の方法で使用され得る。好適な培養またはフィード培地は、宿主細胞および目的の過程とのそれらの適合性のために選択される。好適な培養またはフィード培地が当分野で周知であり、Ham's F10 (SIGMA)、Minimal Essential Medium (SIGMA)、RPMI-1640 (SIGMA)等の商用培地を含むが、それらに限定されず、ダルベッコ変法イーグル培地 (SIGMA) は、動物細胞を培養するのに好適である。さらに、Ham and Wallace, (1979) Meth. Enz., 58:44、Barnes and Sato, (1980) Anal. Biochem., 102:255、米国特許第4,767,704号、同第4,657,866号、同第4,927,762号、同第5,122,469号、または同第4,560,655号、国際公開 WO第90/03430号、およびWO第87/00195号で説明される培地のいずれかが使用され得る。

10

20

## 【0282】

任意のそのような培地は、必要に応じて、ホルモン、および/または他の成長因子 (インスリン、トランスフェリン、または上皮細胞成長因子等)、塩 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩等)、緩衝液 (ヘブス等)、ヌクレオシド (アデノシンおよびチミジン等)、抗生物質 (Gentamycin (商標) 等)、微量元素 (ミクロモルの範囲での終末濃度において通常存在する無機化合物として定義される)、ならびにブドウ糖もしくは同等のエネルギー源で補充され得る。任意の他の必要な栄養補助剤はまた、当業者に知られているであろう適切な濃度で含まれ得る。温度、pH等の培養条件は、先に発現のために選択された宿主細胞で使用された条件であり、当業者には明らかである。特定の細胞にとって必要な成長因子は、例えば、Mammalian Cell Culture (Mather, J. P. ed., Plenum Press, N. Y. (1984)、およびBarnes and Sato, Cell, 22:649 (1980)で説明されるように、過度の実験なしで、経験的に容易に決定される。

30

## 【0283】

組換え脊椎動物細胞培養中の目的のタンパク質の合成への適合に好適な他の方法、ベクター、および宿主細胞は、Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)、Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)、EP117,060、およびEP117,058で説明される。一般的に、哺乳類細胞培養の生産性を最大化するための原理、プロトコル、および実践的技術を、A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)で見出すことができる。

40

## VI. 例示的な細胞培養発現産物

## 【0284】

特許請求される方法のいずれかの一態様では、本発明の栄養補助剤は、目的のタンパク質を発現および産生するために使用される細胞の生存率ならびに成長を改善するために使用される。細胞は、目的のタンパク質を内因的に発現してもよく、またはその細胞に対するバックグラウンドを超えるレベルで目的のタンパク質を発現するように遺伝子的に修飾された、操作された細胞株であってもよい。

## 【0285】

細胞は、目的のタンパク質をコードする核酸での形質転換によって、または内因性遺伝

50

子の発現を促進する活性化配列の形質転換によって、タンパク質を発現するように遺伝的に修飾されてもよい。一態様では、目的のタンパク質は、発現ベクターから発現され得、その中で、当分野で知られている、恒常的発現または誘導性発現のいずれかを可能にするために、目的のタンパク質のコード配列が発現制御配列に操作可能に連結される。

#### 【0286】

目的のタンパク質は、任意のタンパク質、またはそのフラグメントであってもよく、それには、商業的、治療的、診断的価値があるものであり、それらには、制限なしに、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、抗体、抗酸化分子、操作された免疫グロブリン様分子、一本鎖抗体、ヒト化抗体、融合タンパク質、酵素、免疫共刺激分子、免疫調節分子、標的タンパク質のトランスドミナントネガティブ変異体、毒素、条件付き毒素、抗原、腫瘍抑制タンパク質、成長因子、膜タンパク質、血管作用性タンパク質およびペプチド、抗ウイルス性タンパク質およびリボザイム、ならびにその派生物（関連レポーター基を伴って等）が含まれる。目的のタンパク質は、プロドラッグ活性化酵素も含んでもよい。

10

#### 【0287】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質は、糖タンパク質、または1つ以上の翻訳後修飾を有する任意の他のタンパク質から成る。例えば、真核生物宿主における産生に好適である任意のタンパク質を、ここで説明される方法および組成物を使用して発現させることができる。

#### 【0288】

本発明の方法を、任意の所望の組換えタンパク質またはそのフラグメントを産生するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で説明される方法を使用して産生される組換えタンパク質は、治療用タンパク質である。他の実施形態では、組換えタンパク質は、抗体またはその機能的フラグメントである。本発明の方法を使用して産生され得る抗体には、例えば、多クローン性、単クローン性、単一特異性、多特異性、完全なヒト、ヒト化、一本鎖、キメラ、ハイブリッド、CDR移植を含む。それは、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、およびscfv等の全長IgG1抗体またはその抗原結合フラグメントを含み得る。

20

#### 【0289】

本発明の範囲内の抗体には、トラスツズマブ（HERCEPTIN（商標））（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 - 4289 (1992)、米国特許第5,725,856号）を含む抗HER2抗体、米国特許第5,736,137号（RITUXAN（商標））のキメラ抗CD20「C2B8」等の抗CD20抗体、米国特許第5,721,108号の2H7抗体のキメラもしくはヒト化変異体、B1、またはトシツモマブ（BEXXAR（商標））、抗IL-8（St John et al., Chest, 103: 932 (1993)、および国際公開WO第95/23865号）、ヒト化抗VEGF抗体huA4.6.1 AVASTIN（商標）（Kim et al., Growth Factors, 7: 53 - 64 (1992)、国際公開WO第96/30046号、および1998年10月15日に出版されたWO第98/45331号）等のヒト化および/もしくは親和性成熟抗VEGF抗体を含む抗VEGF抗体、抗PSCA抗体（WO第01/40309号）、S2C6およびそのヒト化変異体（WO第00/75348号）を含む抗CD40抗体、抗CD11a（米国特許第5,622,700号、WO第98/23761号、Steppe et al., Transplant Intl. 4: 3 - 7 (1991)、およびHourmant et al., Transplantation 58: 377 - 380 (1994)）、抗IgE（Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 - 2632 (1993)、および国際公開WO第95/19181号）、抗CD18（1997年4月22日に刊行された米国特許第5,622,700、または1997年7月31日に出版されたWO第97/26912号）、抗IgE（E25、E26、およびE27を含む、1998年2月3日に刊行された米国特許第5,714,338号、もしくは1992年2月25日に刊行された米国特許第5,091,313号、1993年

30

40

50

3月4日に出版されたWO第93/04173号、または1998年6月30日に出版された国際出願PCT/米国第98/13410号、米国特許第5,714,338号)、抗Apo-2受容体抗体(1998年11月19日に出版されたWO第98/51793号)、抗TNFアルファ、cA2(REMICADE(商標))、CDP571、およびMAK-195を含む抗体(1997年9月30日に刊行された米国特許第5,672,347号、Lorenz et al., J. Immunol., 156(4):1646-1653(1996)、およびDhainaut et al., Crit. Care Med., 23(9):1461-1469(1995)を参照)、抗組織因子(TF)(1994年11月9日に交付された欧州特許第0420937号B1)、抗ヒトアルファ4ベータ7インテグリン(1998年2月19日に出版されたWO第98/06248号)、抗EGFR(1996年12月19日に出版されたWO第96/40210号のキメラ化もしくはヒト化225抗体)、OKT3等の抗CD3抗体(1985年5月7日に刊行された米国特許第4,515,893号)、抗CD25もしくはCHI-621等の抗tac抗体(SIMULECT(商標))および(ZENAPAX(商標))(1997年12月2日に刊行された米国特許第5,693,762号を参照)、cM-7412抗体等の抗CD4抗体(Choy et al., Arthritis Rheum 39(1):52-56(1996))、CAMPATH-1H等の抗CD52抗体(Riechmann et al., Nature 332:323-337(1988))、Graziano et al., J. Immunol., 155(10):4996-5002(1995)のFcガンマRIに対して対象とされるM22抗体等の抗Fc受容体抗体、hMN-14等の抗癌胎児性抗原(CEA)抗体(Sharkey et al., Cancer Res., 55(23 Suppl):5935s-5945s(1995))、huBrE-3、hu-Mc3、およびCHL6を含む乳房上皮細胞に対して対象とされる抗体(Ceriani et al., Cancer Res., 55(23):5852s-5856s(1995))、ならびにRichman et al., Cancer Res., 55(23 Suppl):5916s-5920s(1995))、C242等の結腸癌細胞に結合する抗体(Litton et al., Eur. J. Immunol., 26(1):1-9(1996))、抗CD38抗体、例えば、AT13/5(Ellis et al., J. Immunol., 155(2):925-937(1995))、HuM195等の抗CD33抗体(Jurcic et al., Cancer Res., 55(23 Suppl):5908s-5910s(1995))およびCMA-676もしくはCDP771、LL2またはLymphocide等の抗CD22抗体(Juwaid et al., Cancer Res., 55(23 Suppl):5899s-5907s(1995))、17-1A等の抗EpCAM抗体(PANOREX(商標))、アブシキシマブまたはc7E3Fab等の抗GpIIb/IIIa抗体(MEDI-493(SYNAGIS(商標))等のREOPRO(商標)抗RSV抗体)、PROTOVIR(商標)等の抗CMV抗体、PRO542等の抗HIV抗体、抗HepB抗体OSTAVIR(商標)等の抗肝炎抗体、抗CA125抗体OvaRex、抗イディオタイプGD3エピトープ抗体BEC2、抗アルファvベータ3抗体VITAXIN(商標)、ch-G250等のING-1抗ヒト腎細胞癌抗体、抗ヒト17-1A抗体(3622W94)、抗ヒト大腸腫瘍抗体(A33)、GD3ガングリオシドに対して対象とされる抗ヒト黒色腫抗体R24、抗ヒト扁平上皮癌(SF-25)、ならびにSmart ID10および抗HLA-DR抗体Oncolym(Lym-1)等の抗ヒト白血球抗原(HLA)抗体が含まれるが、それらに限定されない。本明細書の抗体に対する好ましい標的抗原は、HER2受容体、VEGF、IgE、CD20、CD11a、およびCD40である。

#### 【0290】

組換えタンパク質は、受容体(例えば、膜結合性もしくは細胞質)または構造タンパク質(例えば、細胞骨格タンパク質)等の細胞タンパク質であってもよい。組換えタンパク質は、細胞によって分泌される細胞因子であってもよく、または1つ以上の信号形質導入

経路で内部的使用されてもよい。非制限例には、CD 2、CD 3、CD 4、CD 8、CD 11a、CD 14、CD 18、CD 20、CD 22、CD 23、CD 25、CD 33、CD 40、CD 44、CD 52、CD 80 (B7.1)、CD 86 (B7.2)、CD 147、IL-1、IL-2、IL-3、IL-7、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-2受容体、IL-4受容体、IL-6受容体、IL-13受容体、IL-18受容体サブユニット、PDGF、EGF受容体、VEGF受容体、肝細胞成長因子、破骨細胞分化抑制因子リガンド、インターフェロンガンマ、Bリンパ球刺激因子C5補体TAG-72、インテグリンアルファ4ベータ7、インテグリンVLA-4、B2インテグリン、TRAIL受容体1、2、3、および4、RANK、RANKリガンド、TNF、接着分子VAP-1、上皮細胞接着分子(EpCAM)、細胞間接着分子-3(ICAM-3)、ロイコインテグリンアドヘシン、血小板糖タンパク質gp IIb/IIIa、心臓ミオシン重鎖、副甲状腺ホルモン、rNAPc2、ならびにCTLA4(細胞毒性Tリンパ球関連抗原である)が挙げられるが、それらに限定されない。

10

#### 【0291】

組換えタンパク質はまた、ウイルス、細菌、または真菌等の感染病原体に由来し得る。タンパク質は、細菌性膜もしくは細胞壁に由来してもよく、または細菌性シトソルに由来し得る。タンパク質は、細菌性もしくは酵母酵素、転写因子、または構造タンパク質であり得る。細菌性もしくは酵母タンパク質は、膜結合性、細胞質であり得、または分泌され得る。感染病原体の例には、ミュータンス菌、および黄色ブドウ球菌、ならびにカンジダアルビカンスが挙げられるが、それらに限定されない。

20

#### 【0292】

上述のタンパク質の任意の全てまたは一部を含む組換え融合タンパク質を産生するために、本発明の方法を使用することもできる。例えば、上述のタンパク質の1つに加えて、ロイシンジッパー、コイルドコイル、抗体のFc部分、または実質的に類似したタンパク質等の多量体化ドメインを含む組換え融合タンパク質を、本発明の方法を使用して産生することができる。例えば、国際出願WO第94/10308号、Lovejoy et al.(1993)、Science 259:1288-1293、Harbury et al.(1993)、Science 262:1401-05、Harbury et al.(1994)、Nature 371:80-83、Hangkansson et al.(1999)、Structure 7:255-64を参照されたい。

30

#### 【0293】

本明細書で説明される方法によって産生される1つ以上の組換えタンパク質を含む薬学的組成物もまた、この本発明によって包含される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物には、医薬的に許容可能な担体がさらに含まれる。本明細書で使用される「医薬的に許容可能な担体」という用語は、1つ以上の適合性の固体もしくは液体賦形剤、希釈剤、または対象への投与に好適なカプセル化物質を意味する。

VII. 幹細胞

#### 【0294】

一実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、本質的にフィーダー細胞のない培養システムで培養されるが、それにもかかわらず、大幅な分化を経ることなく、本発明の栄養補助剤を含むヒト胚性幹細胞の増殖を支持する。分化なしでの無フィーダー培養におけるヒト胚性幹細胞の成長は、先に別の細胞型で培養することで馴化され、本発明の栄養補助剤をさらに含む培地を使用することによって支持される。あるいは、分化なしでの無フィーダー培養中におけるヒト胚性幹細胞の成長は、本発明の栄養補助剤を含む化学的に定義された培地を使用することによって支持される。胚性幹細胞自己再生を誘発することができる異なる成長因子で補充される不馴化血清置換(SR)培地中に維持される、胚性幹細胞中の無フィーダー無血清培養システムの例には、米国特許出願、米国第20050148070号、米国第20050244962号、米国第20050233446号、米国特許第6,800,480号、ならびにPCT公開WO第2005065354号および同WO第2

40

50

005086845号に開示される例が挙げられる。

【0295】

代替実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、ヒト胚性幹細胞を支持し、本発明の栄養補助剤をさらに含むフィーダー細胞の層で最初に培養される。次いで、ヒト胚は、本質的にフィーダー細胞のない培養システムに転送されるが、それにもかかわらず、実質的な分化を経ることなく、本発明の栄養補助剤をさらに含むヒト胚性幹細胞の増殖を支持する。これらのアプローチのいずれにおいても、本発明の栄養補助剤の使用は、著しく高まった細胞成長速度および改善された細胞の生存率をもたらす。

【0296】

本発明の栄養補助剤での使用に好適な馴化培地の例は、米国第号20020072117号、米国特許第6,642,048号、WO第2005014799号、およびXuら(Stem Cells 22:972-980, 2004)に開示される。本発明の栄養補助剤での使用に好適な化学的に定義された培地の例は、米国第20070010011号で見出され得る。

【0297】

フィーダー細胞の例には、線維芽細胞、MRC-5細胞、胎児腎臓細胞、間葉細胞、骨肉腫細胞、ケラチノサイト、軟骨細胞、Fallopian導管上皮細胞、肝細胞、心臓細胞、骨髄間質細胞、顆粒膜細胞、骨格筋細胞、筋細胞、および大動脈血管内皮細胞から成る群から選択されるフィーダー細胞が挙げられる。好ましい実施形態では、MRC-5細胞は、ATCCカタログ番号55-Xを有し、形質転換されてATCC受入番号CRL-2309を有し、ヒト骨肉腫細胞は、ATCC受入番号HTB-96を有し、および間葉細胞は、ATCC受入番号CRL-1486を有するヒト胎児口蓋間葉細胞である。他の好ましい実施形態では、ヒト線維芽細胞は、皮膚ケロイド線維芽細胞、KELFIBであり、ATCC受入番号CRL-1762を有するか、もしくは胎児皮膚線維芽細胞であり、ならびに骨髄間質細胞、HS-5は、ATCC受入番号CRL-11882を有する。

【0298】

好適な培養培地は、例えば、以下の成分等から作製され得る：ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、Gibco社#11965-092、ノックアウトダルベッコ変法イーグル培地(KO DMEM)、Gibco社#10829-018、Ham's F12/50%のDMEM基礎培地、200mMのL-グルタミン、Gibco社#15039-027、非必須アミノ酸溶液、Gibco社11140-050、 $\beta$ -メルカプトエタノール、Sigma社#M7522、ヒト組換え塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、Gibco社#13256-029。

【0299】

一実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、本発明の栄養補助剤を含む組成物とともに、調製前に本発明の方法に従って処理された好適な培養基質上に播種される。一実施形態では、調製物は、例えば、基底膜に由来するもの等の、または接着分子受容体リガンド結合の一部を形成し得る細胞外マトリックス成分である。一実施形態では、好適な培養基質は、MATRIGEL(Becton Dickinson)である。MATRIGELは、再構成された基底膜を形成するために室温でゲル化するEngelbreth-Holm-Swarm腫瘍細胞由来の可溶性の製剤である。

【0300】

他の細胞外マトリックス成分および成分の混合物は、代替物として好適であり、本発明の栄養補助剤と共に使用することができる。これには、単独または本発明の栄養補助剤との多様な組み合わせで、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパラン硫酸等が含まれ得る。

【0301】

別の実施形態では、本発明は、胚性幹細胞培養を包含し、本発明の栄養補助剤を含むヒト多能性幹細胞および無フィーダー無血清培養システムを含む。一実施形態では、本発明

10

20

30

40

50

は、ヒト多能性幹細胞培養を包含し、本発明の栄養補助剤を含むヒト多能性幹細胞および無フィーダー無血清培養システムを含む。

【0302】

別の実施形態では、本発明は、胚性幹細胞培養を包含し、本発明の栄養補助剤を含むヒト胚性幹細胞およびヒトフィーダー細胞培養物を含む。別の実施形態では、本発明は、ヒト多能性幹細胞培養を包含し、本発明の栄養補助剤を含むヒト多能性幹細胞およびヒトフィーダー細胞培養物を含む。

【0303】

別の実施形態では、本発明は、多能性マーカーを発現する細胞を含む細胞の集団を得るための方法を提供し、

10

ヒト胚性幹細胞を培養するステップ、

ヒト胚性幹細胞を、多能性マーカーを発現する細胞に分化するステップを含み、分化は、本発明の栄養補助剤の存在下で行われる。

【0304】

別の実施形態では、本発明は、外胚葉性、内胚葉性、または中胚葉性細胞の特性を示すマーカーを発現する細胞を含む細胞集団を得るための方法を提供し、

多能性幹細胞を培養するステップ、

a. 多能性幹細胞を外胚葉性、内胚葉性、または中胚葉性細胞の特性を示すマーカーを発現する細胞に分化するステップを含み、分化は、本発明の栄養補助剤の存在下で行われる。

20

【0305】

これらの方法のいずれにおいても、幹細胞を、当分野の任意の方法で、内胚葉、外胚葉、または中胚葉系統の特性を示すマーカーを発現する細胞に分化することができる。例えば、多能性マーカーを発現する細胞は、D'Amour et al, Nature Biotechnology 23, 1534-1541 (2005)、Shinozaki et al, Development 131, 1651-1662 (2004)、McLean et al., Stem Cells 25, 29-38 (2007)、D'Amour et al., Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006) に開示される方法に従って、最終内胚葉系統の特性を示すマーカーを発現する細胞に分化され得る。

30

【0306】

内胚葉系統の特性を示すマーカーを発現する細胞は、当分野の任意の方法で、膵臓内分泌系統の特性を示すマーカーを発現する細胞にさらに分化され得る。例えば、膵臓内胚葉系統の特性を示すマーカーを発現する細胞は、D'Amour et al, Nature Biotechnology 24, 1392-1401 (2006) に開示される方法に従って、膵臓内分泌系統の特性を示すマーカーを発現する細胞に分化され得、分化は、本発明の栄養補助剤の存在下で行われる。

【0307】

分化のこれらの方法のいずれかの一態様では、ヒト胚性幹細胞は、細胞外マトリックスで被覆された組織培養基質上で培養および分化される。細胞外マトリックスは、マウス肉腫細胞から抽出される可溶化基底膜調製物 (MATRIGELの商品名でBD Biosciencesから販売されている) であり得る。あるいは、細胞外マトリックスは、成長因子低減MATRIGELであり得る。あるいは、細胞外マトリックスは、フィブロネクチンであり得る。代替実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、ヒト血清で被覆された組織培養基質上で培養および分化される。一態様では、組織培養基質は、細胞外マトリックスおよび本発明の栄養補助剤で被覆される。

40

【0308】

細胞外マトリックスは、組織培養基質を被覆する前に希釈されてもよい。細胞外マトリックスを希釈するための、および組織培養基質を被覆するための好適な方法の例は、Kleinman, H.K., et al., Biochemistry 25:312 (1

50

986)、ならびにHadley, M. A., et al., J. Cell. Biol. 101:1511(1985)で見出され得る。

#### 【0309】

幹細胞分化の方法の一態様では、培養培地は、例えば、インスリンおよびIGF(WO第2006020919号に開示される)等の内胚葉、外胚葉、または中胚葉系統の細胞へのヒト胚性幹細胞の文化を可能にするために、ある特定の因子の十分に低い濃度を含有しなければならない。これは、血清濃度を低下させることによって、またはあるいは、インスリンおよびIGFを欠如する化学的に定義された培地を使用することによって、達成され得る。化学的に定義された培地の例は、Wilesら(Exp Cell Res. 1999 Feb. 25; 247(1):241-8)に開示される。これらの方法のい

10

#### 【0310】

培養培地は、ヒト胚性幹細胞由来の内胚葉、中胚葉、または外胚葉系統の特性を示すマーカーを発現する細胞の形成を増強し得る少なくとも1つの他の付加的因子も含有し得る。少なくとも1つの付加的因子は、例えば、ニコチンアミド、TGF-1、2、および3を含むTGF-ファミリーのメンバー、血清アルブミン、線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバー、血小板由来成長因子-AAおよび-BB、多血小板血漿、インスリン成長因子(IGF-I、II)、成長分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、11)、グルカゴン様ペプチド-IおよびII(GLP-およびII)、GLP-1およびGLP-2ミメト体、エキセンディン-4、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、インスリン、

プロゲステロン、アプロチニン、ヒドロコルチゾン、エタノールアミン、ベータメルカプトエタノール、上皮細胞成長因子(EGF)、ガストリンIおよびII、例えば、トリエチレンペンタミン等の銅キレート化剤、ホルスコリン、Na-酪酸、アクチビン、ベータセルリン、ITS、ノギン、神経突起成長因子、ノーダル、バルプロ酸、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、肝細胞成長因子(HGF)、スフィンゴシン1、VEGF、MG132(EMD, CA)、N2およびB27栄養補助剤(Gibco, CA)、例えば、シクロパミン(EMD, CA)等のステロイドアルカロイド、ケラチノサイト成長因子(KGF)、Dickkopfタンパク質ファミリー、ウシ下垂体抽出物、臍島新生関連タンパク質(INGAP)、インディアンヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、プロテアソーム阻害剤、ノッチ経路阻害剤、ソニックヘッジホッグ阻害剤、またはそれらの組み合わせ

であってよい。これらの方法のいずれかの好ましい実施形態では、上に記載される少なくとも1つの付加的因子を含有する培養培地は、本発明の栄養補助剤をさらに含む。

20

30

#### 【0311】

少なくとも1つの他の付加的因子は、例えば、PANC-1(ATCC番号:CRL-1469)、CAPAN-1(ATCC番号:HTB-79)、BxPC-3(ATCC番号:CRL-1687)、HPAF-II(ATCC番号:CRL-1997)等の膵臓細胞株、例えば、HepG2(ATCC番号:HTB-8065)等の肝細胞株、および例えば、FHS74(ATCC番号:CCL-241)等の腸細胞株から得られる馴化培地によって供給され得る。好ましい実施形態では、これらの方法のいずれにおいても、馴化培地は、本発明の栄養補助剤をさらに含む。

40

#### 【0312】

別の実施形態では、本発明は、ヒトもしくは動物における疾患または状態の実験的、治療的、および予防的治療のための前述の幹細胞のいずれかの細胞または組織を使用する方法を包含する。好ましくは、疾病は、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、脊髄損傷、脳卒中、黄斑変性症、熱傷、肝不全、心疾患、糖尿病、デュシェンヌ筋ジストロフィー、骨形成不全症、変形性関節症、リウマチ性関節炎、貧血症、白血病、乳癌、固形腫瘍、およびAIDSから成る群から選択される。好ましい実施形態では、疾病は、パーキンソン病またはアルツハイマー病である。より好ましい実施形態では、疾病は、パーキンソン病である。

VIII. 組換えタンパク質の大規模産生

50



## 【0313】

一実施形態では、本発明の栄養補助剤を、栄養補助剤の存在下で宿主細胞を培養することによって目的のタンパク質を産生するために使用することができる。一実施形態では、細胞培養は、攪拌槽型バイオリアクターシステム内で実行され、フェドバッチ培養手順が採用される。別の実施形態では、使い捨て型波動バイオリアクターが採用される。バイオリアクターシステムでは、バイオリアクターの大きさは、1,000リットルもしくは12,000リットルサイズ等の、目的のタンパク質の所望の量を産生するのに十分に大きい、より小さい（すなわち、2リットル、400リットル）またはより大きい（すなわち、25,000リットル、50,000リットル）バイオリアクター容器が適切であり得るので、そのような大きさに限定されない。好ましいフェドバッチ培養では、哺乳類宿主細胞および培養培地は、初めに培養容器に供給され、培養の終了前の定期的な細胞および/または産物採取のを伴い、又は伴わず、さらなる培養栄養物が、培養中に、連続的に、または離散的増分で、培養物にフィードされる。フェドバッチ培養は、例えば、半連続フェドバッチ培養を含んでもよく、全ての培養物（細胞および培地を含む）は断続的に除去され、新鮮培地に取り換えられる。フェドバッチ培養は、細胞培養のための全ての成分（細胞および全ての培養栄養物を含む）が、培養過程の最初に培養容器に供給される単純なバッチ培養と区別される。浮遊物が培養容器から培養過程中には除去されないが、培養過程の終了時に除去される場合に、フェドバッチ培養を灌流培養とさらに区別することができる（灌流培養では、細胞は、例えば、濾過、カプセル化、マイクロキャリアを固定すること等によって培養中に抑制され、培養培地は、連続的または断続的に導入され、培養容器から除去される）。

10

20

## 【0314】

さらに、培養細胞は、特定の宿主細胞および企図される特定の産生計画に好適であり得る任意の計画または日常的方法に従って繁殖され得る。したがって、本発明は、単一ステップまたは複数のステップの培養手順を企図する。単一ステップ培養では、宿主細胞は、培養環境に植え付けられ、本発明の方法ステップは、細胞培養の単一産生段階中に採用される。あるいは、多段階培養が構想される。多段階培養では、細胞は、多数のステップまたは段階で培養され得る。例えば、細胞は、最初のステップまたは増殖期培養で成長し得、貯蔵庫から除去される細胞は、成長および高い生存率を促進するのに好適な本発明の栄養補助剤を含む培地に植え付けられる。細胞は、好適な期間の増殖期において、宿主細胞培養への新鮮培地の添加によって維持され得る。

30

## 【0315】

本発明の好ましい態様によると、フェドバッチまたは連続的な細胞培養条件は、細胞培養の増殖期において哺乳類細胞の成長を高めるために考案される。増殖期では、細胞は、成長を最大限に生かす条件下および期間で成長する。温度、pH、溶存酸素（ $dO_2$ ）等の培養条件は、特定の宿主を伴って使用される条件であり、当業者には明らかである。通常、pHは、酸（例えば、 $CO_2$ ）または塩基（例えば、 $Na_2CO_3$ もしくは $NaOH$ ）のいずれかを使用して、約6.5～7.5のレベルに調整される。CHO細胞等の哺乳類細胞を培養する好適な温度範囲は、約30～38であり、好ましくは、約37であり、好適な $dO_2$ は、5～90%の空気飽和である。

40

## 【0316】

特定の段階において、細胞は、細胞培養の産生段階またはステップで植え付けるために使用されてもよい。あるいは、上述のように、産生段階またはステップは、植え付けまたは増殖期もしくはステップに続いてよい。

## 【0317】

本発明によると、細胞培養の産生段階中の細胞培養環境は制御される。現在開示される方法のステップに従って、本発明の栄養補助剤の添加を、目的のタンパク質の所望の容量および質が得られた細胞培養液中で達成および維持されるように調整することができる。好ましい態様では、細胞培養の産生段階の前に細胞培養の過渡期が先行し、そこでは、本発明の栄養補助剤の添加が細胞培養の産生段階を開始する。

50

## 【0318】

上述の方法のいずれかにおいても、本発明の栄養補助剤との組み合わせで、細胞培養培地の酪酸塩またはトリコスタチンA等の薬剤の所望の量を含むことが望ましいことが企図される。酪酸ならびに酪酸ナトリウム等の酪酸塩およびその塩の多様な形成が当分野で知られており、Sigma Chemical Co等の供給源から公的に入手可能である。酪酸塩は、細胞培養の生産性およびタンパク質発現を高めることが、文献で報告されている[Arts et al., Biochem J., 310:171-176(1995)、Gorman et al., Nucleic Acids Res., 11:7631-7648(1983)、Krugh, Mol. Cell. Biochem. 42:65-82(1982)、Lamotte et al., Cytotechnology, 29:55-64(1999)、Chotigeat et al., Cytotechnology, 15:217-221(1994)]。トリコスタチンA(TSA)は、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であり、酪酸塩のように、細胞培養の生産性およびタンパク質発現を高める役割を果たし得る[Medina et al., Cancer Research, 57:3697-3707(1997)]。酪酸塩は、タンパク質発現にいくらかのプラスの効果があるが、酪酸塩は、ある特定の濃度で、培養細胞中でアポトーシスを誘導することができ、それによって、培養物の生存率、ならびに生存細胞密度を減少させることも当分野で理解される[Hague et al., Int. J. Cancer, 55:498-505(1993)、Calabresse et al., Biochim. Biophys. Res. Comm., 195:31-38(1993)、Fillipovich et al., Biochim. Biophys. Res. Comm., 198:257-265(1994)、Medina et al., Cancer Research, 57:3697-3707(1997)]。本発明の方法では、酪酸塩またはTSAの所望の量が産生段階の開始時に細胞培養に添加され得、より好ましくは、温度変化が実行された後に細胞培養に添加され得る。酪酸塩またはTSAを、当業者によって経験的に決定される所望の量で添加することができるが、好ましくは、酪酸塩を、約1~約25mMの濃度で、より好ましくは、約1~約6mMの濃度で、細胞培養物に添加する。

## 【0319】

目的のタンパク質の発現は、適切に標識されたプローブを使用して、例えば、ELISA、従来のサザンブロット法、mRNAの転写を定量化するノーザンブロット法[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205(1980)]、ドットブロット法(DNA分析)、または原位置ハイブリダイゼーションによって、試料中で直接測定され得る。多様な標識を採用してもよく、最も一般的には、放射性同位元素、特に<sup>32</sup>Pである。しかしながら、ポリヌクレオチドへの導入のためにビオチン修飾ヌクレオチドを使用して等、他の技術も採用してもよい。次に、ビオチンは、アビジンまたは抗体に結合するために部位としての機能を果たし、それは、放射性ヌクレオチド、蛍光色素分子、または酵素等の多岐にわたる標識で標識化されてもよい。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二本鎖またはDNAタンパク質二本鎖を含む特定の二本鎖を認識することができる抗体を採用してもよい。抗体を順に標識化してもよく、二本鎖が表面に結合される場合に、表面上での二本鎖の形成時に二本鎖に結合する抗体の存在を検出することができるように、アッセイを実行してもよい。

## 【0320】

あるいは、遺伝子発現は、遺伝子産物の発現を直接定量化するために、細胞もしくは組織切片の免疫組織化学染色、および細胞培養または体液のアッセイ等の免疫学的方法によって測定されてもよい。免疫組織化学染色技術を用いて、細胞試料を典型的には脱水および固定によって調製し、その後、結合した遺伝子産物に特異的な標識抗体との反応が続く、酵素標識、蛍光標識、発光標識等の標識は通常、視覚的に検出可能である。

## 【0321】

試料液体の免疫組織化学染色および／またはアッセイに有用な抗体は、単クローン性または多クローン性のいずれかであってもよく、任意の哺乳動物で調製されてもよい。多くは市販されている。

【0322】

本明細書で特許請求される栄養補助剤を、トランスフェクション中に細胞のトランスフェクション効率および生存率を増加させるために使用することができる。リポフェクタミン等の多様なトランスフェクション技術で使用される条件および試薬は、細胞に対して相対的に毒性である一方で、電気穿孔は細胞に激しく圧力を加える可能性がある。トランスフェクション試薬のより高い濃度の使用、ならびにより広範な電気穿孔条件は、より高いトランスフェクション効率を達成するのに好ましい。したがって、トランスフェクション前、最中、および後の本発明の栄養補助剤の添加は、より高いトランスフェクション効率、ならびに組換えタンパク質のより高い収率をもたらすことができる。

10

【0323】

Apoptosisリガンド／TRAILまたはFasリガンド等のアポトーシスを誘導する目的のタンパク質を発現するために、本発明の栄養補助剤を使用することができる。本発明の栄養補助剤の存在は、そのようなアポトーシス活性を阻止し得、目的のタンパク質の改善された発現を可能にし得る。

【0324】

さらに、凍結／貯蔵／解凍手順を経験する細胞の生存率を増加させるために、該方法を使用することができる。これらの手順の間、一般に、細胞は生存能力を失う可能性がある。細胞培養培地に添加されるアポトーシス阻害剤の存在は、増加した細胞の生存率を提供することができ、細胞のアリコート間またはバイアル間の細胞生存率を還元または排除するのに役立つことができる。

20

IX．キット

【0325】

細胞の生存率を促進するためのキットも本発明によって包含される。一実施形態では、本発明に記載のキットは、(a)トランスフェクションのための1つ以上の試薬または装置、および(b)本発明の栄養補助剤から成る。いくつかの実施形態では、本明細書で取り上げられるキットには、トランスフェクション装置、トランスフェクション薬剤、および栄養補助剤の使用に関する詳細を含む、使用説明書および／または販売促進用資料が含まれる。

30

【0326】

別の実施形態では、本発明に記載のキットは、(a)凍結もしくは解凍細胞のための1つ以上の試薬または装置、ならびに(b)本発明の栄養補助剤から成る。いくつかの実施形態では、本明細書で取り上げられるキットには、凍結もしくは解凍細胞株のためのプロトコルならびに試薬の使用に関する詳細を含む、使用説明書および／または販売促進用資料が含まれる。

【0327】

別の実施形態では、本発明に記載のキットは、(a)細胞を培養するための1つ以上の組織培養産物、ならびに(b)本発明の栄養補助剤から成る。いくつかの実施形態では、本明細書で取り上げられるキットには、希釈クローニング技術のためのプロトコルならびにそのようなアプローチにおける試薬の使用に関する詳細を含む、使用説明書および／または販売促進用資料が含まれる。

40

【0328】

全ての出版物、特許、および特許出願は、個々の出版物、特許、または特許出願が、参照によりその全体が組み込まれることを、具体的にかつ個別に示されるのと同じ程度に、参照によりそれらの全体が明示的に本明細書に組み込まれる。以下の実施例が図解されるが、本発明の範囲を限定することを決して意図しない。

【実施例】

【0329】

50

## 実施例 1：組換えヒトラクトフェリンの発現

### A．遺伝子組換えイネにおけるヒトラクトフェリン発現のための発現ベクター

ヒト乳腺ラクトフェリンの完全なヌクレオチド配列を、Operon Technologies (CA, USA) によってコドン最適化および合成した。ヒト乳ラクトフェリン遺伝子 (ジェンバンク受入番号：発現の最適レベルを得るために、HSU07642) を、イネ種子タンパク質の翻訳において、最も頻繁に使用されるコドンで再合成した (図 1)。変化したコドンの数が全配列の 22.46% の割合を占めたが、アミノ酸組成物は、天然ヒトラクトフェリンと同一のままである。コドン最適化遺伝子を含むプラスミドを Lac-ger と名付けた。Lac-ger を Sma I / Xho I で消化し、ラクトフェリン遺伝子を含むフラグメントを、Nae I で部分的に消化し、かつ Xho I で完全に消化された pAPI141 にクローン化した。イネ種子における hLF の発現に関して、コドン最適化遺伝子を、イネ胚乳特異的グルテリン (Gt1) プロモーターおよび NOS ターミネータに操作可能に連結した。得られたプラスミドを pAPI164 と命名した (図 2)。

### B．産生システム

#### 【0330】

イネ品種 Taipei 309 (オリザサティバ、ジャボニカ) を組換えヒトラクトフェリンのための産生システムとして選択し、遺伝子組換えイネ事象を、プラスミド pAPI164 を有する胚形成イネカルスと選択可能なマーカーとしてハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むコンパニオンマーカープラスミドとの粒子衝突によって発生させた。完全に成長し、繁殖力のあるイネ植物を、この手順で得た。

### C．米穀粒における組換えヒトラクトフェリンの高レベルタンパク質発現

#### 【0331】

組換えヒトラクトフェリンの発現は、種子成熟特異的プロモーター Gt1 の制御下にあった。独立した遺伝子組換えイネ事象をスクリーニングした際、組換えヒトラクトフェリンの高レベル発現は、図 3 において明白である。成熟イネ種子抽出物からの総可溶性タンパク量は、ラエムリゲルで実行し、タンパク質を可視化するためにクマシーブルーで染色した。約 80 kD の組換えラクトフェリンタンパク質が、染色ゲルで示されるように、全ての遺伝子組換え系統で得られた。組換えヒトラクトフェリンの発現レベルは、0.5% の種子量に対応した。組換えヒトラクトフェリンの安定発現を、10 世代にわたって監視した。発現レベルを玄米の約 0.5% の種子量で維持される (図 4)。

## 実施例 2：組換えヒトトランスフェリンの発現および精製

#### 【0332】

米穀粒からの組換えヒトの精製。

標準の食品工業手順を使用して、米穀粒を脱穀分離し、平均の 100 メッシュ粉まで製粉する。下に説明される抽出後に、残存する外皮および固形物を破棄する。室温で 40 分間攪拌して、組換えヒトトランスフェリンを抽出緩衝液 (20 mM のトリス塩基、pH 7.5) で粉から抽出する。濾過助剤 (Cellpure 300) を抽出混合物に 20 g/L で添加した後、10 kDa の再生セルロースでフィルタプレスを通して濾過する。

#### 【0333】

DEAE クロマトグラフィーの準備をするために、フィルタプレス濾液を 30 kDa の分子量カットオフセルロース膜で、10 mM のトリス塩基 pH 8.5 にダイア濾過し、濃縮した。濃縮物をカラムに装填する前に、DEAE カラムを (20 mM のトリス塩基、40 mM の塩化ナトリウム、pH 7.5) で洗浄した。装填した後、カラムを 10 mM のトリス塩基の 3 容積、0.5% (v/v) トリトン X-114、pH 8.5 の緩衝液、続いて、10 mM のトリス塩基の 7 容積、pH 8.5 の緩衝液で洗浄した。次に、トランスフェリンを、20 mM のトリス塩基、40 mM の塩化ナトリウム、pH 7.5 で溶出した。

#### 【0334】

DEAE カラムから回収されたトランスフェリンを、10 mM のリン酸ナトリウム、25 mM の塩化ナトリウム、pH 7.0 の緩衝液に、10 kDa の分子量カットオフセルロ

ース膜でダイア濾過し、濃縮した。ダイア濾過後、組換えトランスフェリンを乾燥させる前に0.2μのフィルタを通して濾過した。

### 実施例3：米穀粒における組換えヒトアルブミンの発現

#### 【0335】

多様なデータベースからのヒトアルブミン(HSA)のタンパク質配列を比較した。受入番号P02768(スイスプロット)で表されるコンセンサス配列を、米穀粒におけるヒトアルブミンの好適な発現に対する遺伝子コドン最適化のための基盤として使用した(図5)。遺伝子合成をBlue Heron(Seattle, WA)で実行し、pUC-HSAを作製するために、合成フラグメントをpUCベースのベクターに挿入した。正しいDNAならびにタンパク質配列の確認後、pUC-HASをMlyIおよびXhoIで消化した。コドン最適化HSA遺伝子を含むフラグメントをNaeIおよびXhoIで予切断されたpAPI405に挿入した。プラスミドAPI405は、Gt1プロモーター、Gt1信号配列、およびnosターミネータを含んだpAPI141の派生物であった。

#### 【0336】

pAPI405へのMlyI/XhoIフラグメントの挿入は、pAPI504をもたらした(図6)。次に、プラスミドAPI504を、HindIIIおよびEcoRIで切断した。全発現カセット、Gt1プロモーター、Gt1信号配列、コドン最適化HSA遺伝子、およびnosターミネータを含むHindIII/EcoRIフラグメントを、pAPI508をもたらす同一の酵素で予消化されたpJH2600にクローン化した(図7)。プラスミドJH2600は、大腸菌とアグロバクテリウムとの間のシャトルベクターであった。DNA配列検証後、イネ形質転換のために、pAPI508をアグロバクテリウム内に移動させた。プラスミドAPI504も、先に説明した手順に従って、衝突ベースの形質転換を介して使用した。形質転換の際に、遺伝子組換え植物が生成され、温室に送り、そこで遺伝子組換えR0の植物が成熟成長してR1種子を結実した。

#### 【0337】

イネ種子におけるHASの発現を監視するために、10mLの抽出緩衝液(50mMのトリスHCl、pH8.0、150mMのNaCl)を使用して、各々のR0植物から10個のR1種子を抽出した。上澄みを回収し、イネ抽出物からの発現レベルをELISAで監視した(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)。結果は、イネ遺伝子組換え種子におけるHSA発現レベルが、0.01~0.85%の玄米粉量(1kg当たり0.1~8.5グラムの粉)に及ぶことを示した。最も高い発現レベルを有する8つの事象の結果を、以下の表に示す(表E1)。

#### 【表E1】

表E1. 上位8つの事象における組換え HSA 発現レベル	
系統番号	発現レベル (g/kg の粉)
508-30	5.5
508-17	8.0
508-71	8.7
508-73	4.0
508-77	8.5
508-83	8.5
508-101	3.0
508-113	4.0

#### 【0338】

### 実施例4：細胞培養培地成分としての組換えヒトラクトフェリンの精製

組換えヒトラクトフェリンで補充された細胞培養培地を調製するために、組換えヒトラクトフェリンを米粉から精製した。組換えヒトLFの高レベルを発現する遺伝子組換えイ

ネ系統 ( 1 6 4 - 1 2 ) を選択した。ここで L F 1 6 4 と命名したこの系列を、夏季に屋外播種、および冬季に温室播種を交互に行う、1年に2回の産生で播種した。タンパク質精製のために、r h L F を発現する水稻を外皮分離し ( R i c e M i l l , P S - 1 6 0 , R i m a c , F L ) 、次いで、ハンマーミル ( 8 W A , S c h u t t e - B u f f a l o , N Y ) を使用して粉碎化した ( 1 0 0 メッシュの平均粒径 ) 。

#### 【 0 3 3 9 】

5 0 L のタンクで1時間、2 k g の米粉と2 0 L の抽出緩衝液 ( 0 . 0 2 M のリン酸ナトリウム、p H 6 . 5 、および0 . 3 M の塩化ナトリウム ) を混合することによって、遺伝子組換え粉からのタンパク質抽出を実行した。混合時間の最後に、懸濁液を一晩静置させるか、もしくは1分当たり3 7 5 0 回の速度で遠心分離した。両方の場合において、M - 0 5 およびM - 7 0 セルロース / パーライトベースフィルタ ( E r t e l A l s o p , N Y ) を使用して、それぞれ、プレートならびにフレームフィルタプレス ( E r t e l A l s o p , 8 S , N Y ) を通して上澄みを濾過した。

10

#### 【 0 3 4 0 】

さらなる精製のために、r h L F および他の米粉可溶性タンパク質を含有する濾液をイオン交換カラムに装填した。S P セファロース高速流 ( A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h , N J ) を充填した I N D E X 2 0 0 / 5 0 0 プロセスカラム ( A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h , N J ) を使用した。カラムを1時間当たり1 5 0 ~ 2 0 0 c m の線流速で実行した。樹脂床の充填、清掃、試験を製造業者の指示ごとに実行した ( H E T P 試験 ) 。1時間当たり1 7 5 c m の線速度で濾液を樹脂に装填し、A<sub>280</sub> がベースラインに戻るまで、0 . 3 M の N a C l を含有する0 . 0 2 M のリン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 6 . 5 ) で洗浄した。0 . 8 M の N a C l を含有する2 0 m M のリン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 6 . 5 ) を使用して、組換え h L F を溶出した。1時間当たり2 0 0 c m および1 5 0 c m で、それぞれ、洗浄および溶出を実行した。

20

#### 【 0 3 4 1 】

1 f t<sup>2</sup> 5 0 k D a のポリエーテルスルホン ( P a l l B i o p h a r m a c e u t i c a l , M A ) 膜を有する C e n t r a m a t e モジュール ( P a l l B i o p h a r m a c e u t i c a l , M A ) を使用して、溶出した h L F を濃縮および脱塩 ( 限外濾過 ) した。1分当たり約1 . 5 L のクロスフロー速度および1 0 p s i g の平均膜透過圧で濾過を実行した。溶出した r h L F を0 . 2 5 L の最終容積に濃縮および脱塩し、次いで、凍結乾燥させた。通常、1 キログラムの遺伝子組換え米粉から、約3 グラムの精製組換えヒトラクトフェリンが回収された。

30

#### 【 0 3 4 2 】

米粉から精製された組換えヒトラクトフェリンは、鉄で約5 0 % 飽和される ( 部分的ラクトフェリン ) 。次いで、5 0 % の飽和組換えヒトラクトフェリンを、鉄摂取処理によって9 0 % 超に鉄飽和させ、ホトラクトフェリンを得、結合した鉄を除去するために、酸処理によって鉄飽和を1 0 % 未満にさせ、アボラクトフェリンを得た。精製されたラクトフェリン ( ホロ、部分的、およびアボ ) を細胞培養培地成分として使用した。

40

#### 実施例 5 : 組換え血清ヒトアルブミン ( r H S A ) の精製および特徴付け

##### B 0 0 0 産生過程の概要

#### 【 0 3 4 3 】

米穀粒から r H S A を精製するために、上で説明される、組換えヒト血清を発現する米穀粒を脱穀分離して粉碎化し、r H S A 抽出緩衝液 ( 酢酸ナトリウム、p H 4 . 9 ) と3 0 分間混合した。濾過による浄化後、1時間当たり約1 5 0 c m の速度で、濾液をアニオン交換カラム ( Q - S e p h a r o s e , G E H e a l t h c a r e ) で装填した。装填した時点で、次に、樹脂を平衡緩衝液で洗浄し、いかなる非結合タンパク質をも除去した。溶出した r H S A は、S D S - P A G E によって分析して、約9 0 % の純度である。次いで、S D S - P A G E ゲルの走査分析に基づいて、9 0 % から約9 8 % に純度を高めるために、B l u e - S e p h a r o s e ( G E H e a l t h c a r e ) を使用するこ

50

とができる。次に、rHSAを濃縮し、凍結乾燥前に限外濾過によって脱塩する。

#### 【0344】

pHSA（血漿由来HSA）との比較のために、精製組換えHSAを、様々な生化学的および生物物理学的特徴付けに供した（表E2）。これらの試験は、イネ中で発現するrHSAがpHSAと同等であることを示す。

#### 【表E2】

表E2 血漿由来アルブミン(pHSA)と比較しての組換えアルブミン(rHSA)の特性		
特性	pHSA	rHSA
N末端配列	DAHKSE	DAHKSE
グリコシル化	なし	なし
SDS-PAGE/ウエスタンブロット法	約 66 kDa	約 66 kDa
分子量(MALDI)	66.9-68.1 kDa	66.8-67.9 kDa
等電点電気泳動点	pI 5.3	pI 5.3
リガンド結合	する	する
熱安定性	中点 65℃	中点 65℃
エステラーゼ活性	する	する
プロテアーゼ感受性	互いに同一	互いに同一

10

#### 【0345】

B0000C産生過程：Ventríaで成長したイネに関して、イネをコンバインまたは手で採取した。この過程の間、成熟種子を、コンバイン分離器または手作業で植物性植物物質から分離した。採取したイネを、鳥類、齧歯類、トカゲ、昆虫、および他の害虫から穀粒を保護する無菌の穀粒貯蔵所、貯蔵大型バッグ、大袋、または容器に貯蔵するのに好適である約12%の湿度にまで乾燥させた。米穀粒を粉にする必要がある時は、まず最初に脱穀分離または外皮分離する。細片および種子の外層が内胚乳および胚芽層または糠層から一掃されるように、この過程を真空下で行う。次に、脱穀分離した穀粒を、洗浄して乾燥させるか、または洗浄して湿潤均質化するように直接処理するか、もしくは乾燥させて脱穀分離した状態でさらに処理する。乾燥させて脱穀分離した物質を、白米生産者にとって一般的な精米機または脱糠機で脱糠してもよい。

20

#### 【0346】

脱糠し、脱穀分離したイネをこの時点で洗浄および湿潤製粉してもよく、または乾燥製粉のために乾燥させてもよく、もしくは、粉に挽いて直接処理してもよい。ローラーミルまたはピンミル等を使用して、最小量の剪断および熱での製粉が好ましい。ハンマーミルも好適である。タンパク質を水中で5分未満激しくかき混ぜて90%にまで抽出することができるように、粉を挽かなければならない。通常は、400マイクロメートルまたは4ミリメートルより小さい粒子の大きさが求められる。しかしながら、より長い時間を与えられる場合、より大きい粒子も抽出することができる。あるいは、90%の抽出可能なタンパク質を可溶化するように、穀粒を洗浄して設置された液体均質器で湿潤製粉することができる。

30

#### 【0347】

典型的には、粉スラリーを、少なくとも水3に対して粉1、および水20に対して粉1までの比率で混合する。典型的には、水は、pHがpH7前後に維持されるように、トリス/HCl、クエン酸塩、リン酸塩、ヘプス等の好適な緩衝液、および100mMのNaCl等の少量の塩を含有する。スラリーを湿潤製粉の場合に均質化した後、または乾燥粉のために完全に混合した後、バルク固体を固液分離によってスラリーから除去する。例えば、パッドを有するプレートおよびフレーム、加圧フィルタ、ベルトフィルタ、真空フラスコ、ハイドロクロン、または真空ベルトフィルタを使用して、これをデカンティング、遠心分離、または濾過によって実行する。濾過後、ケーキからタンパク質を回収するために、圧縮されたケーキを抽出緩衝液で洗浄しなければならない。珪藻土または他のフィルタ培地の添加は、濾液の透明度を促進するのに有用であるが、適切な設備を用いればそ

40

50

の必要はない。あるいは、浄化を助けるための凝集剤を使用することができる。そのアルブミン含有量に関して浄化した濾液を検査し、回収がイネ種子において決定された発現レベルと一致することを検証しなければならない。

#### 【0348】

澱粉、沈殿タンパク質、ウイルス、および他の汚染物質を除去するために、pHが5.0に達し、溶液が白色になるまで、5Mの酢酸を浄化した濾液に添加する。白色の溶液を少なくとも20分間かき混ぜ、不溶性物質の沈殿を助長する。次に、限外濾過に好適な光学的透明度、または10NTU未満に達するように（比濁法、濁度ユニット）、沈殿した溶液をキャニスターフィルタ、カートリッジフィルタ等のデプスフィルタもしくは他の濾過装置を通して濾過する。フィルタプレス、加圧フィルタで、またはあるいはクロスフローを利用するセラミックフィルタもしくは他の物質を使用して、それを洗浄してもよい。さらに、この物質は、膨張床クロマトグラフィーカラムへの直接適用に好適である。

10

#### 【0349】

好ましい方法では、浄化した濾液を、0.2ミクロンフィルタを通す濾過によって洗浄し、1MのNaOHでpH7.0まで中和させる。その結果、この物質は、ホローファイバー、フラットシートによる限外濾過、または螺旋状に巻回されたクロスフロー濾過に好適である。物質を、100キロダルトン(kDa)の大きさ、またはそれより大きい膜を通して、ウイルス、より大きい不要な汚染物質、および凝集物を除去することができる。膜を通る物質を10または30kDaのクロスフロー膜で濃縮することができ、次いで、クロマトグラフィーのための溶液を調製するために同一の膜を使用することができる。次に、伝導率とpHが同等化されるまで、濃縮した物質をカラム平衡緩衝液でダイア濾過することができる。

20

#### 【0350】

GE DEAEセファロースまたはGE Qセファロース上の陰イオン交換クロマトグラフィーのための好ましい緩衝液は、pH8.0に均衡したpHを有する10もしくは20mMのトリス/HCl緩衝液である。対照的に、例えば、負に帯電した樹脂、もしくは疎水性リンカー（混合モード吸収剤）と混合された負に帯電した樹脂の使用を介する陽イオン交換のための好ましい緩衝液、またはあるいはBlue Sepharose (GE)等のblue Cibicronは、4.8~5.0に均衡したpHを有する酢酸塩またはクエン酸塩緩衝液である。

30

どちらのシステムに関しても、アルブミンおよび他の同様に帯電したタンパク質をマトリックスで保持し、洗浄を行い、疎水性不純物を除去する手助けをするのに必要であると思なされる界面活性剤も含み得る、少なくとも5カラム容積の装填緩衝液で洗浄することによって緩く結合した物質を除去する。物質を、陽イオン交換のために2~4ユニット増加したpH、または陰イオン交換のために2~4ユニット減少したpHを有する同一の緩衝液もしくは修飾緩衝液で装填することによって、溶出することができる。結果として生じるpHの変化はイオンの交換を可能にし、タンパクを鋭いバンドで溶出する。溶出分画の純度を増加させるために、最初の部分（10%）もしくは最後の部分（10%）または両方の部分を主溶出ピークから溶出することができるように、溶出ピークを精査することができる。好ましい方法では、100mMのリン酸塩、pH4.0に調整されたpHを含有し、10mMのNaClを含む溶液が、タンパク質をGE Q sepharose（高速流）から溶出するために使用される。この場合において、物質を溶出するために、非結合汚染物質（貫流および洗浄）と、より強力な結合汚染物質（100mMのリン酸塩、10mMのNaCl、および4.0に調整されたpHでカラム上に保持される物質）との間の識別を可能にするpHおよび伝導率を使用する。

40

#### 【0351】

溶出後、溶出した物質のpHが、6.0未満のpHを有する場合、それを1MのNaOHで中和させる。次に、得られた溶液を、次のクロマトグラフィーステップのために、同一の緩衝液に対してダイア濾過するが、好ましい方法においては、100mMのリン酸塩、10mMのNaCl、およびpH7.0での非結合モードを除いて、同一のマトリック

50



ス(すなわち、Q sepharose)のカラムを通して溶出液を流すことを含む。

【0352】

第2のカラムステップは、第1のステップと同一の原理を使用するが、結合カラム上に共溶出された汚染物質が、中性pHでマトリックス上に保持される機会を有するように逆モードである。第1の捕獲カラムから物質を通る流れを、様々な代替の種類のクロマトグラフィーアプローチ、例えば、陽イオン交換、疎水性、混合モード、またはゲル濾過クロマトグラフィーで処理することができる。

【0353】

好ましい方法では、濃度が15~25%のアルブミンになるまで、Q sepharose非結合カラムから物質を通る流れを10kDaまたは30kDaのクロスフロー膜上で濃縮する。次いで、緩衝液をダイア濾過によって、ダルベッコPBSまたはあるいは20mMのリン酸塩、50mMのNaCl、およびpH7.0等の細胞培養に好適な緩衝液に変える。次に、物質を無菌容器内に滅菌グレードフィルタで濾過する。エンペローブウイルスを破棄し、疎水性毒素および汚染物質の除去を助けるために、無菌濾過した物質を界面活性剤で処理してもよい。好ましい方法では、0.5%v/vのトリトンX-114またはX-100を、15~25%のアルブミン溶液に(23未満で18を超える)室温で添加し、溶液を少なくとも1時間かき混ぜる、または攪拌する。次に、物質は、アルブミンの分子量よりも非常に少ない分子量排除限界を有する疎水性樹脂を通る。Bio-radおよびPall Corporationからの樹脂を含む、多くの市販の樹脂が入手可能である。

【0354】

生物学的活性を確認するために、カラムを通る物質を界面活性剤に敏感な細胞中で試験する。残存する残渣界面活性剤は、典型的には、アルブミン溶液に対して0.005%未満でなければならない。次に、自由に貫流する界面活性剤を、直送のために容器内に無菌濾過してもよく、または安定剤を添加してもよく、もしくは安定剤での低温殺菌に供してもよく、または乾燥後もしくは直接乾燥して安定剤を添加してもよい。物質を凍結乾燥または噴霧乾燥で乾燥させてもよい。乾燥前に、場合によっては、GE、Pall、およびMillipore等から入手可能である、使い捨てかつ認証されたウイルス除去カプセルを使用して、物質をウイルス濾過ステップに供することが有用であり得る。事前濾過ステップが、濃縮した物質を20nmのフィルタに通すのに必要であり得ることを理解することが当分野において一般的である。

【0355】

結果：米粉を、リン酸塩で緩衝した生理食塩水との1:5の比率で抽出し、20分間混合した。NaI遺伝子フィルタフラスコを使用して、液体を浄化した。その後の浄化された抽出物を、該方法で説明されるように酸沈殿に供した。次に、溶液を濾過し、中和し、浄化した濾液を得た。物質および緩衝液が平衡化されるまで、この物質を50mMのトリス/Cl、pH8.0に対してダイア濾過した。次に、50g/Lの結合能力を可能にするために、物質を事前に平衡化したGE Q-セファロースカラム上に装填した(300~600cmh)。上で説明したように、装填した物質を同一の緩衝液で洗浄し、次いで、物質を100mMのリン酸塩、10mMのNaCl、およびpH4.0で溶出した。鋭いピークに溶出された物質および回収した溶出液は、約5.8の安定したpHを有した。下により完全に開示されるように、本方法を使用して産生されたアルブミンを、アルブミンの他の供給源と比較した。溶出液をプールに回収し、pHが6.0以上になるまで、1MのNaOHを添加した。次に、物質を10kDaの再生セルロース膜に濃縮し、約5倍および約5等容量のダイア濾過を、100mMのリン酸塩、10mMのNaCl、pH7.0で実行した。ダイア濾過した最終物質を、アルブミンタンパク質含有量(出発原料中の発現レベルとの関連で、80%以上でなければならない)および内毒素レベル(供給物質に応じて、1mg当たり、100EU未満でなければならない)に関して検査した。この物質を、約2~3回の装填容量を可能にするのに十分な大きさの、100mMのリン酸塩、10mMのNaCl、pH7.0で平衡化したQ-セファロースカラム上に通した(

60 ~ 160 cmh)。物質を同一の緩衝液を有する樹脂を通して洗浄し、回収した。回収した物質を10 kDaの再生セルロース膜にダイア濾過し、約10倍に濃縮するか、またはアルブミン濃度が少なくとも10%もしくは20%以下に達するまで濃縮し、5等容量のダイア濾過を20 mMのリン酸塩、50 mMのNaCl、pH 7.0で実行した。滅菌グレードフィルタ濾過(0.2 μm)後、溶液を、0.5% (v/v) トリトンX-100、20 + / - 2 で1時間かき混ぜた。インキュベーション後、製造業者の指示に従って、物質をPall SDR樹脂に通した。貫流物質を無菌容器内に滅菌グレードフィルタで濾過し、タンパク質および食塩水においてよく用いられるように、冷蔵または凍結乾燥させた。

実施例6：アルブミンの他の供給源と比較した、B0000C過程を使用してイネから産生される組換えアルブミンの比較およびアルブミンの産生の先述の方法

【0356】

方法：実施例5で説明される過程B000Cを使用して調製されたアルブミンを、組換えアルブミンを調製するために先に使用された代替の過程(B000)を使用して調製されたアルブミンと比較した(Cellastim(バッチB202~B217))。

アルブミン産生(旧式の方法、B000)：

【0357】

米粉および25 mMのリン酸ナトリウム、50 mMの塩化ナトリウムをNaOHで6.5にpH均衡し、約1:10のS/Lの比率で、20分間室温で混合した。濾過助剤(Cellpure 300)を10 g/Lで添加し、スラリーをフィルタプレス、真空濾過、または遠心分離で濾過した。浄化した濾液を、1 Mの酢酸で約pH 5.0まで酸沈殿した。上で説明されるように、得られた溶液を5 g/Lの濾過助剤(Cellpure 300)の添加を伴って濾過した。物質をすぐに1 MのNaOHでpH 6.5~7.0まで中和した。物質を抽出のために使用された同一の緩衝液の5等ダイア容積(diavolume)でダイア濾過した(全てのUFDFステップのための10 kDaの再生セルロース)。物質を事前に平衡化したQ-セファロースカラム(GE Healthcare)上に装填し、60 cmhで樹脂1リットル当たり8 gのアルブミン結合を可能にした。

【0358】

同一の緩衝液の5カラム容積でカラムを洗浄した後、1つのステップにおいて、塩濃度を250 mMのNaClに高めることによってアルブミンを溶出した。得られた物質を100 mMのリン酸ナトリウム、10 mMのNaCl、pH 7.0に対して5~7等ダイア容積(diavolume)でダイア濾過した。得られた物質を、100 mMのリン酸ナトリウム、10 mMのNaCl、pH 7.0で平衡化したQ-セファロースカラムに通し、貫流として回収した。次に、貫流物質を濃縮し、20 mMのリン酸ナトリウム、5ダイア容積(diavolume)で、10 mMのNaCl、pH 7.0に対してダイア濾過した。濃縮した最終物質を無菌濾過し、10 g/Lの界面活性剤CHAPS((3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸)でインキュベートし、室温で1時間混合した。1時間のインキュベーション後、物質をBiorad SM-2カラムに通した。物質を無菌濾過し、凍結乾燥させた。

サイズ排除クロマトグラフィー分析

【0359】

HPLCによる純度分析を、214および280 nmにおける検出セットを用いて、1分当たり1 mLの流速で、100 mMのリン酸塩、pH 7.0で、GF-250カラム(Agilent Technologies)上で実行した。標準曲線は、塩および水分に対する0.92の修正率の乾燥粉で作製された5つの異なる希釈物を注入することによって生み出された。214 nmからの主ピークを、保持時間またはあるいは基準のいずれかによって統合した。未知の試料を標準注入の範囲内の濃度で注入した。乾燥粉重量ごとのアルブミンの未知の濃度(純度)を標準曲線から計算した。典型的な実験では、0、5、8、10、15、および20 μgの標準物質を注入し、次いで、約50 μLの注入量中の約10 μgの未知の試料を注入した。ピークを統合した後の標準曲線に対する相関係

10

20

30

40

50

数は、典型的には0.98を超えた。

S D S P A G E および濃度測定：（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）。

【0360】

各タンパク質の規定量を各ウェルに装填させるために、タンパク質溶液を1~2mg/mLに希釈することによって試料を調製した。試料を、還元薬剤（Invitrogen NP0004）を含有するトリスグリシンSDS試料緩衝液（LC2673 Novex）と1:1で混合し、70℃まで5分間加熱した。試料をNovex 4~20%のプレキャストゲルに装填（10、20、または30μg）し、標準のトリスグリシンSDSランニング緩衝液中で、定電圧（130V）で分離した。追跡用色素がゲルの先端に達した時に電気泳動は終了した。分子量マーカーには、参照として第1のレーンが含まれた。

10

【0361】

ゲルをG Bioscience（786-35G）で染色し、水で脱染した。Hewlett Packard Scanner（G4010）でデジタル画像を得た。次に、画像ファイルをUN-SCAN-IT（Silk Scientific Corp.）で開いた。全ての可視バンドが個々の部分として含まれた256のグレースケールにおける肯定的な画像解析で、濃度測定を実行した。各部分に対してソフトウェアで特定化されるように、背景雑音を4隅補間によって修正した。次に、各部分またはバンドに対する信号を画素数および平均画素強度（0~255）の産物から計算した。全体のレーン（全ての可視部分またはバンド）に対する信号の合計を100%とし、アルブミン純度を計算するために不純物バンドを減算した。各バンドにおける各夾雑タンパク質の割合は、特定のバンドにおいて特定された全てのペプチドの総数で割られたペプチドマッピングによって決定されるように、その夾雑タンパク質に対して特定されたペプチドの数に応じて計算された。標準偏差が100%中0.5%未満であるように、画像解析を3回繰り返した。

20

Pyrogene rFC法による内毒素の決定

【0362】

内毒素含有量をPyrogene rFC法で決定した。標準曲線を生成するために、凍結乾燥された内毒素標準物質を、製造業者（Lonza）によって指示されるように内毒素が含まれていない水と混合した。タンパク質試料を、そのまま液体に希釈するか、またはあるいは内毒素が含まれていない水で粉末に戻すかのいずれかを行った。測定値が標準曲線の範囲内に現れるべく、異なる希釈物を調製した。望まれない分子間相互作用を解離するために、試料を100℃まで10分間加熱した。典型的な実験では、試料および標準物質を、1ウェルにつき0、0.001、0.005、0.01、0.05、および0.1の内毒素ユニットを伴って、1ウェルにつき100μlで添加した。試料を同様に100μlで添加し、アッセイ阻害または妨害に関する試験をするために、1ウェルにつき0.001~0.01の内毒素ユニットでのスパイクを添加するように、追加の試料を含めた。製造業者（Lonza）に従って、1:4:5の比率で、それぞれ、rFC酵素、アッセイ緩衝液、および基質を混合して、作業試薬を調製した。試料または標準物質と等容積で、作業試薬をウェルに添加した。蛍光プレートリーダー（BioTek FLX 800T）を励起のために380nm（バンド幅=20nm）に設定し、発光波長を440nm（バンド幅=30nm）に設定した。0時間で得た測定値を、37℃で1時間後に得た測定値から減算した。標準物質に対する相関係数、勾配、およびY切片が設定限度内であった場合に、測定値は有効であると見なされ、スパイク実験は、スパイクした内毒素が、設定限度内で測定可能および回復可能であったことを示す。さらに、複製試料に対する標準偏差は、標準偏差が指定の任意に選択された限度内であるように、合理的に一致しなければならない。全ての試料を無菌で回収し、試験のために使用された管/バイアル/容器は、正確および的確な内毒素試験に関連するため、良好な研究実践後に非常に少ない内毒素を有することが検証された。

30

40

細胞の生存率の決定

【0363】

50

ハイブリドーマ細胞株 A E 1 ( A T C C ) を、5 % のウシ胎仔血清 ( F B S ) を含有する D M E M 基礎培地中に維持した。ウシ胎仔血清の補給なしで、アルブミンを無血清条件下 ( A F M 6、K C B i o、K a n s a s ) で試験した。細胞を複数の継代にわたって 5 % の F B S から無血清培地に継代培養した。各継代培養において、アルブミンの望ましい濃度の存在下で、細胞を総細胞数および生存率に関して分析した。(トリプシン処理および N e u b a u e r 血球計算器を使用して直接計数することによって評価して)。細胞を標準の培養条件下 ( 5 % の C O <sub>2</sub> で 3 7 ) で約 7 0 時間成長させ、その後培養物の生存率が測定された。実験を二重に行った。データは、1 0 <sup>5</sup> で割られた 1 m L 当たりの生存細胞の数を示す。

#### 界面活性剤の決定

##### 【 0 3 6 4 】

アルブミンの界面活性剤濃度を ( 細胞ベースの ) 界面活性剤アッセイで決定した。手短に言えば、界面活性剤に敏感な細胞を、異なる量の界面活性剤でスパイクし、結果として生じる細胞の生存率および細胞の運命決定を使用して、1 6 の独立したデータポイントから成る標準曲を生み出した。界面活性剤濃度における変化に対する生存率における変化をプロットし、対数関数に当てはめた。次に、同一の細胞ベースのアッセイで試験された試料において未知の界面活性剤濃度を計算するために、この等式を使用した。所与のデータに関する標準曲線に対する相関係数は、0 . 9 8 1 6 であった。典型的には、C e l l a s t i m の乾燥重量につき約 1 0 p p m 以上の界面活性剤濃度は、顕著な毒性作用をもたらす。1 0 % のアルブミン溶液と比較すると、界面活性剤の毒作用は、界面活性剤濃度が約 1 0 0 p p m ~ 2 0 0 p p m、または 0 . 0 1 % ~ 0 . 0 2 % ( v / v ) を超える時に明らかになる。

結果および考察：

##### 【 0 3 6 5 】

I . 血漿由来血清 ( S i g m a アルブミン ) のサイズ排除クロマトグラフィー、ならびに新規の方法 ( B 0 0 0 C ) ( C e l l a s t i m P 0 1 7 1 ) および旧式の方法 ( C e l l a s t i m P 0 1 0 7 ) を使用して産生される組換え H S A ( C e l l a s t i m ) による分析。

##### 【 0 3 6 6 】

3 つの種類のアルブミンに関する H P L C サイズ排除特性 ( 図 8 A、C、および D ) は、全体の純度については、異なるアルブミン調製が一般に類似することを示す。具体的には、4 . 5 k D a および 2 4 0 k D a 前後におけるピークは、内部標準であり、3 つ全ての産物が、約 1 0 ~ 1 2 k D a で、非常に少量の標準から外れた主ピーク信号を含有する。

##### 【 0 3 6 7 】

ヒト血漿由来アルブミン ( S i g m a アルブミン ) ( 図 8 A ) は、1 7 k D a 前後で汚染物質を含有し、それに対して、新規の方法 ( C e l l a s t i m P 0 1 7 1 ) ( 図 8 C ) を使用する組換えイネ由来アルブミンは、4 4 K D a および 5 5 k D a 前後の 2 つのタンパク質汚染物質を含有し、これは新規の方法で作製される C e l l a s t i m において、旧式の方法 ( C e l l a s t i m P 0 1 0 7 ) ( 図 8 B ) を使用する時よりも著しく高いレベルで発生する。これらのピークは、H P L C 分離では完全に消失されないが、C e l l a s t i m P 0 1 7 1 および S i g m a アルブミン ( 図 8 D ) ならびに図 8 E で示される旧式および新規の方法を使用して作製される C e l l a s t i m のオーバーレイ特性においてより明確に見ることができる。

##### 【 0 3 6 8 】

これらのピークに対応するタンパク質は、さらに下で考察されるように、実施例 5 で説明される過程を使用して産生される C e l l a s t i m において、主アルブミンピークのペプチド質量指紋分析によって特定される夾雑タンパク質の全ての約 5 % を表す。

##### 【 0 3 6 9 】

試験した全てのアルブミン産物も同様に、大体はアルブミン二量体を表す 1 3 0 k D a

10

20

30

40

50

前後におけるピークを含有し、Cellastim二量体ピークは、血漿由来アルブミンよりも著しく小さいことが顕著である。凝集アルブミンの生成は、業界全体において、分解または安定性喪失のための1つのマーカーとして使用されるタンパク質分解の指標である。Cellastimに存在するHspは、アルブミンの解離を促進すると見なされ、したがって、これはHsp70および他のHspタンパク質の一般的に知られている機能であるため、二量体の数を低減する。

#### 【0370】

II. Millipore/Novozymes (Cat 番号9301-01) によって産生されるアルブミンと比較した、Cellastim batch P0171 (新規の方法) のSDS PAGEによる分析。

10

#### 【0371】

結果: SDS-PAGE 分析 (図9AおよびB) は、全体の純度について、産物が通常類似していることを示す。図9Aは、Cellastim P0171およびCellprimeアルブミン (Millipore/Novozymes) の比較を示す。レーン1は、分子量マーカーである。レーン4は、Cellastimアルブミン (10 µg) であり、レーン7は、Cellprimeアルブミン (10 µg) である。図9Bは、以前の方法 (B000) (レーン2、3、および4) ならびにCellastimの新規方法 (B0000C) (レーン6、7、および8) からの3つのCellastimロットのSDS PAGE 分析による比較を示す。6つの試料を1レーンにつき20 µgで装填した。

20

#### 【0372】

ゲルの目視検査は、より厳密な規格を満たす新規の方法が、試験した3ロットの中ではより一貫性があることを示す。(図9B、レーン2、3、4対レーン6、7、8)。横縞模様は、新規の方法と比較して、以前の方法からの3つの試料の中で著しく異なる。重要なことに、新規の方法の試料は、旧式の方法の試料が有するよりも著しく少ない凝集物を250 KDa前後で有する。(旧式の方法に対して平均2%より大きく、新規の方法に対して平均1%未満)。新規の方法を使用して産生されるCellastimで濃縮されるタンパク質汚染物質の同一性は、下でさらに考察される。

#### 【0373】

III. Cellastimの旧式および新規バッチの能力を促進する内毒素、界面活性剤、および成長の分析。アルブミンのいくつかの異なるロットを調製するための2つの異なる方法の性能の比較 (表E3およびE4) は、旧式の方法が、実施例5で説明される新規の方法と比較して、著しく多い内毒素および界面活性剤を含有した組換えアルブミンを産生し、細胞の生存率を著しく高めた産物をもたらしたことを証明する。

30

【表 E 3 E 4】

表 E 3 Cellastim—旧式の方法 B000								
産生日	バッチ 番号	産物の グラム	EU/mg の 乾燥物質	界面活性剤 (ppm)	生存率 (生存細胞の数/mL/10 <sup>5</sup> )			
					1 mg/m L	2 mg/m L	5 mg/m L	10 mg/m L
2/27/08	B202	70.6	25.3	815.3	15	7.9	4.1	0.9
2/27/08	B203	58.8	23.1	267.7	15.8	12.4	6.5	4.1
2/28/08	B204	59.9	29.2	589.2	16.3	11.1	5.2	2.9
2/28/08	B205	63	64.3	133.4	14	11.6	6.9	3.8
3/3/08	B206	41.1	35.1	1182.2	14.9	2.3	0.0	0.0
3/3/08	B207	94.2	28.7	388	16.5	12.7	7.6	4
3/4/08	B208	24.5	80 超	467.2	15.3	11.4	7.1	2.7
3/4/08	B209	66.1	91.8	406.4	16.7	15.2	6.9	4.1
3/4/08	B210	87.3	67.8	76.4	17.5	19.1	15.4	8.5
3/11/08	B217	62.09	4.4	127.3	16.7	18.7	13.2	6.6
平均			44.97	445.31	15.87	12.24	7.29	3.76
表 E 4 Cellastim—新規の方法 B0000C								
産生日	バッチ 番号	産物の グラム	EU/mg の 乾燥物質	界面活性剤 (ppm)	生存率 (生存細胞の数/mL/10 <sup>5</sup> )			
					0.5 mg/m L	2 mg/m L	5 mg/m L	10 mg/m L
2/2/2009	B0032C	209.4	0.35	3.1	13.1	15.7	13.4	11.2
2/2/2009	B0033C	271.4	0.26	7.9	18.4	17.4	15.1	14.3
2/10/2009	B0041C	247.1	0.18	5.4	15.4	17.2	14.1	12.1
4/27/2009	B0118C	617.4	0.11	1 未満	15.7	15.4	19.2	16.8
5/14/2009	B0138C	610.6	0.48	1 未満	12.5	15.8	15.1	14.6
6/9/2009	B0158C	598.0	0.13	3.9	13.7	17.1	13.2	11
6/15/2009	B0162C	618.6	0.20	2.0	15.5	17.5	17.2	14.7
7/28/2009	B0196C	507.0	0.36	3.9	17.4	17.3	18.8	14.8
8/26/2009	B0219C	851.4	0.86	8.2	17.9	16.3	16.6	13.7
8/31/2009	B0220C	897.8	0.93	1 未満	13.5	16	15.5	15.1
9/9/2009	B0227C	929.9	0.13	1 未満	11.1	14.4	12.5	11.4
平均			0.36	3.45	14.92	16.37	15.52	13.6

## 【 0 3 7 4 】

考察：実施例 5 で説明される新規の方法を作製するために旧式の方法を再設計することは、下でより完全に説明されるように、全体の産物の純度および性能の両方において著しい変化をもたらした。

## 【 0 3 7 5 】

該変化は、界面活性剤がより少なく、内毒素がより少なく、かつ純度を高めた産物の作製を可能にした。具体的には、新規の過程は、定期的に、全体の純度の約 95 % 以上で組換えアルブミンを産生した。比較して、旧式の方法は、定期的に、最大純度の約 90 % でアルブミンを産生した。驚いたことに、増加した産物純度にもかかわらず、過程におけるこれらの変化はまた、組換えアルブミンとの熱ショックタンパク質の高まった同時精製をもたらした（下を参照）。任意の特定の動作理論に縛られることなく、アルブミンの高純度、内毒素および / または界面活性剤の相対的欠如の組み合わせ、ならびに熱ショックタンパク質の同時精製は、アルブミンを調製するための以前の方法より著しく優れた産物をもたらすと考えられる。

## 【 0 3 7 6 】

具体的には、表 E 3 および E 4 は、組換えアルブミンを産生するための新規の方法が、

例えば、5 mg / mL で、平均バッチ対バッチの 100 パーセントの細胞の生存率における改善を (5 mg / mL で) もたらし、同様に、旧式の方法よりも平均 100 倍少ない内毒素、および 100 倍少ない界面活性剤を有する産物をもたらすことを証明する。

#### 実施例 7 : 細胞成長および生存率への効果の分析

##### 【0377】

上で調製された組換えアルブミンの能力を促進する細胞成長を、他の市販のアルブミン産物、アルブミンの異なる供給源と比較するために、それらを細胞成長および生存率アッセイにおいて並べて比較した。試験した 3 つの産物は、(Cellastim、ロット番号 P0153)、Cellprime アルブミン (Millipore / Novozymes Cat 番号 9301-01)、および血漿由来アルブミン (Seracare Cat 番号 HS-400-60) であった。

10

##### 【0378】

方法：残渣培地を除去するために同一の培地で 2 度洗浄した後、特別に調製したハイブリドーマ細胞 AE1 を、培地の 1 mL 当たり  $0.5 \times 10^5$  細胞の密度で DF12 / ITSE 中に播種した。次に、培地および細胞は、無処理のまま放置し (負の対照)、図説明文に示される濃度で、Seracare アルブミンで処理し、Cellprime アルブミンで処理し、イネ由来組換えアルブミンで処理した。培養物に対する生存率が測定された後に、細胞を標準の培養条件下 (5% の  $CO_2$  で 37 ) で約 70 時間成長させた。実験を二重に行った。結果は、図 10 に示される。

20

##### 【0379】

結果：Novazyme の Cellprime アルブミンは、生存率の損失を引き起こした (網目の棒)。Seracare アルブミン (白色の棒) は、生存率に測定可能な増加を引き起こしたが、新規の方法 (Cellastim) でのイネ中で作製された組換えアルブミン (黒色の棒) で見られる増加ほど大きくはない。これらの条件下で、イネ由来組換えアルブミンは、他のアルブミン産物のいずれと比較しても、試験した任意の濃度において、細胞の生存率を促進するのに約 5 倍活動的であった。負の対照は、縞模様の棒で表される。

##### 【0380】

考察：他の市販のアルブミン産物が、イネ由来組換えアルブミンと類似した全体の純度、内毒素、および界面活性剤レベルを有し得る可能性を考慮すると、他の市販のアルブミンと比較した、組換えイネ由来アルブミンの著しく優れた性能は、血漿由来アルブミン (実施例 5) と比較して、Cellastim において同定された、これまで未同定であったタンパク質汚染物質が、細胞の生存率に肯定的な影響を有し得ることを示唆する。Cellastim の特性へのこれらのタンパク質の影響を特定、および次に特徴付けるために、下で説明されるように、組換えアルブミンの試料をペプチド質量指紋に供した。

30

#### 実施例 8 : 組換えヒト血清アルブミンのペプチド質量指紋

##### 【0381】

方法：Nano LCMS / MS ペプチドシーケンシングシステム (ProteTech, Inc.) ならびにペプチドフラグメントの分子量に基づいてタンパク質を特定するための専売ソフトウェアを使用して、著しいタンパク質汚染物質を決定するためにアルブミンの試料を分析した。手短に、アルブミンの試料を SDS-PAGE で分析し、各々の主なバンドゲルバンドを、シーケンシンググレード修飾トリプシンを含むゲル中で脱染、清掃、および消化した。得られたペプチド混合物を、75 マイクロメートル内径の逆相 C18 カラムを有する高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) をイオントラップ質量分析計と連結して直列で使用した LC-MS / MS システムによって分析した。得られた質量分析データを、ProteTech の専売ソフトウェアスイートをを用いて最新の非重複タンパク質データベースを検索するために使用した。報告する前に、データベース検索からの出力を手入力で有効にした。

40

##### 【0382】

結果：組換えアルブミンの 3 つの代表的なロットの試験時に、3 つの Hsp70 タンバ

50

ク質をペプチド質量指紋で特定した（表 E 5）。同定された 3 つの特定の配列、A B F 9 5 2 6 7、A B A 9 7 2 1 1、および B A D 0 7 9 3 8 を、高い関連性および相同性のあるタンパク質を特定するために、非重複データベースと比較した。これらの比較の各々からの上位ヒットの結果は、下の表 E 6、E 7、および E 8 に示される。

【表 E 5】

表 E 5 質量指紋によって Cellastim から特定されたペプチド	
配列	ペプチド
ABF95267	ATAGDTHLGGEDFDNRVVPGPADKSPMIVVITYKGEEK NAVITVPAYFN DSQRIINEPTAAAIAYGLDKK (配列番号 2)
AAB63469 BAD07938 BAD07713	NQAAVNPER NGHVEIANDQGNRIVNKDGKPYIQVK IINEPTAAAIAYGLDKK KLGTVIGIDLGTTYSCVGVYK VEIESLFDGTDSFSEPLTR (配列番号 3)
ABA97211	NQADSVVYQTEK KQDITITGASTLPKDEVERDVVLLDVTPSLSLGLET LGGVMTK (配列番号 4)

10

【 0 3 8 3 】

Genbank（登録商標）（Nucleic Acids Research, 2008 Jan、36（Database issue）：D25 - 30）中のタンパク質配列の非重複データベースにおける A B F 9 5 2 6 7 配列との配列比較の結果は、下の表 E 6 に示される。

20



【表 E 6】

表 E 6 ABF95267 とともに有意な整列を作り出す配列：			
遺伝子参照	遺伝子説明	(ビット)	値
ref NP_001140835.1	仮定上のタンパク質 LOC100272911 [Zea ma...	79.7	8e-14
ref XP_002465468.1	仮定上のタンパク質 SORBIDRAFT_01g039390...	79.7	9e-14
ref NP_001049719.1	<b>Os03g0277300 [オリザサティバ (ジャポニカ cult...</b>	<b>79.7</b>	<b>9e-14</b>
gb ACJ54890.1	熱ショックタンパク質 70 [オリザサティバジャポニカ G...	79.7	9e-14
Sp P09189.1	HSP7C_PETHY RecName: Full = 熱ショック同族 70k...	77.0	5e-13
emb CAA31663.1	hsp70 (AA 6 - 651) [ペチュニア]	77.0	5e-13
ref XP_002312089.1	予測タンパク質 [コットンウッド]>...	77.0	5e-13
sp P24629.1	HSP71_SOLLC RecName: Full = 熱ショック同族 70k...	77.0	5e-13
gb AAB99745.1	HSP70 [コムギ]	76.6	6e-13
gb AAB42159.1	Hsc70 [トマト]	76.6	7e-13
gb ACD45076.1	熱ショックタンパク質 70 [カモガヤ]	76.3	8e-13
ref XP_002512741.1	熱ショックタンパク質、推定上 [Ricinus com...	75.9	1e-12
ref XP_002512742.1	熱ショックタンパク質、推定上 [Ricinus com...	75.9	1e-12
gb AAA82975.1	PsHSP71.2>emb CAA67867.1 熱ショックタンパク質...	75.9	1e-12
gb AAS09825.1	熱ショック同族タンパク質 70 [Thellungiella h...	75.9	1e-12
emb CAA44820.1	熱ショックタンパク質 70 [タバコ]	75.5	2e-12
ref NP_001055754.1	Os05g0460000 [オリザサティバ (japonica cult...	75.5	2e-12
ref NP_001051724.1	Os03g0821100 [オリザサティバ (japonica cult...	75.1	2e-12
ref XP_002456611.1	仮定上のタンパク質 SORBIDRAFT_03g039360...	75.1	2e-12
ref NP_001044757.1	Os01g0840100 [オリザサティバ (japonica cult...	75.1	2e-12
gb ACR35910.1	未知の [トウモロコシ]	75.1	2e-12
ref XP_002284017.1	予測: HSC70-1 に類似 (熱ショック...	75.1	2e-12
ref XP_002532297.1	熱ショックタンパク質、推定上 [Ricinus com...	75.1	2e-12
ref XP_002284008.1	予測: HSC70-1 に類似 (熱ショック...	75.1	2e-12
ref XP_002283532.1	予測: HSC70-1 に類似 (熱ショック...	74.7	3e-12
ref XP_002332067.1	予測タンパク質 [コットンウッド]	74.7	3e-12
gb AAF34134.1	高分子量熱ショックタンパク質[Malu...	74.7	3e-12
gb EEC76425.1	仮定上のタンパク質 OsI_14101 [オリザサティバ I...	74.7	3e-12
ref XP_002316294.1	予測タンパク質 [コットンウッド]>...	74.7	3e-12
ref XP_002283516.1	予測: HSC70-1 に類似 (熱ショック...	74.3	3e-12
ref XP_002441219.1	仮定上のタンパク質 SORBIDRAFT_09g022580...	74.3	4e-12

【 0 3 8 4 】

Genbank (登録商標) 中のタンパク質配列の非重複データベースにおける配列との ABB63469 の配列比較の結果は、下の表 E 7 に示される。

【表 E 7】

表E 7 AAB63469 とともに有意な整列を作り出す配列：			
遺伝子参照	遺伝子説明	(ビット)	値
emb CAP31983.1	C. briggsae CBR-HSP-4 タンパク質 [Caenorhabditis...	50.1	7e-05
dbj BAG60366.1	無名タンパク質産物 [ヒト]	49.7	8e-05
ref YP_002421952.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.7	9e-05
ref YP_001640420.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.7	9e-05
ref NP_001105893.1	タンパク質相同体 1 の前駆体に結合 [Zea m...	49.3	1e-04
gb AAA62325.1	HSP70	49.3	1e-04
ref YP_001756576.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.3	1e-04
gb AAB63469.1	胚乳内腔結合タンパク質 [オリザサティバ]	49.3	1e-04
ref YP_001925829.1	シャペロンタンパク質 DnaK [メチロバクテリウム...	49.3	1e-04
ref NP_001105894.1	タンパク質相同体 2 の前駆体に結合 [Zea m...	49.3	1e-04
gb ACF86491.1	未知の [トウモロコシ]	49.3	1e-04
ref NP_001045675.1	Os02g0115900 [オリザサティバ (japonica cult...	49.3	1e-04
ref ZP_02191025.1	分子シャペロン [アルファプロテオバクテリア...	49.3	1e-04
ref XP_001701685.1	タンパク質 1 に結合 [コナミドリムシ...	48.5	2e-04
ref XP_001701884.1	タンパク質 2 に結合 [コナミドリムシ...	48.5	2e-04
emb CAC37635.1	タンパク質に内腔結合、BiP [スケルフェリアデュビア (Scherffelia dubia)]	48.1	3e-04
gb AAM93256.1	熱ショックタンパク質 70-C [ダイズシスト線虫]...	48.1	3e-04

10

20

【 0 3 8 5 】

Genbank (登録商標) 中のタンパク質配列の非重複データベースにおける配列との配列 A B A 9 7 2 1 1 の配列比較の結果は、下の表 E 8 に示される。

【表 E 8】

表E 8 ABA97211 とともに有意な整列を作り出す配列			
遺伝子参照	遺伝子説明	(ビット)	値
gb AAK13022.1	熱ショックタンパク質 70 [Fibrobacter succinogene...	44.3	0.004
ref XP_002442079.1	仮定上のタンパク質 SORBIDRAFT_08g009580...	44.3	0.004
gb EEC69073.1	仮定上のタンパク質 OsI_37938 [オリザサティバ L...	44.3	0.004
ref XP_001752769.1	予測タンパク質 [ニセツリガネゴケ...	44.3	0.004
ref NP_001066486.1	Os12g0244100 [オリザサティバ (japonica cult...	44.3	0.004
gb ACT65562.1	70kDa 熱ショックタンパク質 [コムギ]	43.9	0.005
ref NP_001152528.1	間質 70kDa 熱ショック関連タンパク質...	43.9	0.005
gb ACN31310.1	未知の [トウモロコシ]	43.9	0.005
ref XP_001772650.1	予測タンパク質 [ニセツリガネゴケ...	43.9	0.005
ref NP_001146752.1	仮定上のタンパク質 LOC100280354 [Zea ma...	43.9	0.005
gb ABP65327.1	葉緑体熱ショックタンパク質 70 [Pennisetum...	43.9	0.005
gb AAO72585.1	熱ショック関連タンパク質 [オリザサティバ (japo...	43.5	0.007
ref YP_001740846.1	シャペロンタンパク質 dnaK (熱ショック protei...	43.5	0.008
ref ZP_03728467.1	シャペロンタンパク質 DnaK [Dethiobacter alkal...	43.1	0.009

30

40

【 0 3 8 6 】

考察：ペプチド質量指紋は、アルブミン、2つのイネHSP70遺伝子、(gb|ACJ54890.1|)、EEC69073、およびイネ胚乳組織(胚乳内腔結合タンパク質)由来のBiP相同体であるAAB63469で同時精製する3つのイネ熱ショックタンパク質スーパーファミリーメンバーを特定した。これらの遺伝子によってコード化された完全なアミノ酸配列は、以下に記載される。

【 0 3 8 7 】

遺伝子gb|ACJ54890.1|熱ショックタンパク質70 [オリザサティバジャポニカ群] HSP70は、約0.07重量/重量%でCelllastim中の組換えアル

50

ブミンにおいて発生することが見出された。その完全なアミノ酸コード配列（配列番号5）を下に提供する。

```

MAGNKGEGPA  IGIDLGTTYSCVGVWQHDRV  EIIANDQ
GNR  TTPSYVAFTD  TERLIGDAAK
NQVAMNPTNT  VFD AKRLIGR  RFS DPSVQAD  MKMWPFK
VVP  GPADKPMIVV  TYKGEEKKFS
121  AEEISSMVLTKMKEIAEAFL  STTIKNAVIT  VPA
YFNDSQR  QATK DAGVIS  GLNVMRIINE
181  PTAAAIAYGL  DKKAASTGEK  NVLI FDLGGG  TFD
VSILTIE  EGIFEVKATA  GDTHLGGEDF
241  DNRMVNH FVQ  EFKRKHKKDI  TGNPRALRRL  RTA
CERAKRT  LSSTAQT TIE  IESLYEGIDF
301  YATITRARFE  ELNMDLFRRC  MEPVEKCLRD  AKM
DKAQIHD  VVLVGGSTRI  PKVQQLLQDF
361  FNGKELCKSI  NPDEAVAYGA  AVQAAAILSGE  GNQ
RVQDLLL  LDVTPLSLGL  ETAGGVMTVL
421  IPRNTTIP TK  KEQVFSTYSD  NQPGVLIQVY  EGE
RTRTKDN  NLLGKFELTG  IPPAPRGVPQ
481  INVTFDIDAN  GILNVSAEDK  TTGKKNKITTI  TND
KGRLSKE  EIERMVQEAE  KYKAEDEQVR
541  HKVEARNALE  NYAYNMRNTV  RDEKIASKL P  ADD
KKKIEDA  IEDAIKWLDG  NQLAEADEFE
601  DKMKELESLC  NPIISKMYQG  GAGGPAGMDE  DAP
NGSAGTG  GGS GAGPKIE  EVD

```

10

20

【0388】

イネ胚乳組織（胚乳内腔結合タンパク質〔オリザサティバ〕）BiP由来のAAB63469BiP相同体は、約0.09重量/重量%でCellastim中の組換えアルブミンにおいて発生することが見出された。その完全なアミノ酸コード配列（配列番号6）を下に提供する。

```

mdrvrgsafllgvl lagsl f  afsvakeetk  klg tvi g
idl  gttyscvgvy  knghveii an
dqgnritpsw  vaftdserli  geaaknqaav  npertif
dvk  rdigrkfeek  evqrdmklvp
121  ykivnkigkp  yiqvki kdge  nkvf spees  ami
lgkmet  aeaylgkkin  davvtvpayf
181  ndaqrqatkd  agviaglnva  riineptaaa  iay
gl dkkgg  eknilvf d l g  ggtf d v s i l t
241  idngvf evla  tngdthlgge  dfdqrim eyf  ikl
ikkkysk  diskdnralg  klrreaerak
301  ralsnqh qvr  veieslfdgt  dfsepltr ar  fee
lnndlfr  ktmgpvkkam  ddagleksqi
361  heivlv ggst  ripkvqql l r  dyfegkep nk  gvn
pdeavay  gaavqgsils  geggdetkdi
421  lll d v a p l t l  g i e t v g g v m t  k l i p r n t v i p  t k k
sqvftty  qdqqt t v s i q  v f e g e r s m t k
481  dcrllgkfdl  sgipaapr gt  pqievtfevd  ang
ilnvkae  dkg t g k s e k i  t i t n e k g r l s
541  qeeidr m v r e  a e e f a e e d k k  v k e r i d a r n q  l e t
yvynmkn  tvgdkdklad  kleseek ekv
601  eealkealew  ldenqtae ke  eyeekl keve  avc

```

30

40

50

n p i i s a v y q r t g g a p g g r r r g r l d d e h  
6 6 1 d e l

【0389】

EEC69073/OsI\_37938 [オリザサティバインディカ群] 間質HSP70は、約0.06重量/重量%でCellastim中の組換えアルブミンにおいて発生することが見出された。その完全なアミノ酸コード配列(配列番号7)を下に提供する。

masfts q l g a macgaaps ts plaarrsgql f v g r k p a  
aas v q m r v p r a g r a r g v a m r v a c  
61 ekvvgidlgt tnsavaameg gkptvitnae gqrt  
tps v v a y t k g g e r l v g q i a k r q a v v n  
121 pentffsvkr figrkmaevd deakqv syhv vrd  
dngn v k l d c p a i g k q f a a e e i s a q v l r  
181 klvddaskfl ndkitkavvt vpayfndsqr tat  
kdagria glevlriine ptaaslaygf  
241 ekknnetilv fdllgggtfdv svlevgdgvf evl  
stsgdth lggddfdkfy fcwvf yfgam  
301 thetpkvvdw lasnfkkdeg idllkdkqal qrl  
tea a e k a k m e l s t l s q t n i s l p f i t a t  
361 adgpkhiet t l s r a k f e e l c s d l i d r l k t p v t n  
alrdakl svdnldevil vggstripsv  
421 qelvkkitgk dpnvtvnpde vvs l g a a v q g g v l  
agd v k d v v l l d v t p l s l g l e t l g g v m t  
481 kiiprnttlp tsks evfst a adgqtsvein vlq  
gerefv r d n k s l g s f r l d g i p p a p r g v  
541 pqievkf did angilsvaai dkg t g k k q d i t i t  
gastlpk de ver m v e e a d k f a q e d k e k  
601 rda id t k n q a d s v v y q t e k q l k e l g d k v p a p v k  
ekvdakl nelkeaiaagg stqsmkdama  
661 alneevmqig qamynqqpna gaagptpgad agp  
tssggkg pndgdvidad ftdsn

10

20

30

【0390】

これらのタンパク質は、アルブミンに対してイネ組換えアルブミンの新規バッチにおいて低レベルでのみ発生するので、これらの汚染物質が、組換えアルブミンの新規バッチの効果を促進しながら優れた成長に実質的に関与することを確認するための事前の必要条件は、アルブミンへのこれらの成分の添加し戻しが、Cellastim中の各成分に対して実質的に特定されたものに匹敵するレベルで、組換えアルブミンの活性を促進しながら成長を回復または高めるかを決定することである。

実施例9：親和性クロマトグラフィーによる組換えアルブミンからの熱ショックタンパク質の分離

【0391】

方法：新規の方法[ロットP0153、P0156、および/またはP0171]を使用して産生したCellastimの粉末を、1リットル当たり約20gで精製水と混合した。得られた溶液を、緩衝液の少なくとも5等容積で、50mMのトリス/Cl、pH7.0に対してダイア濾過した。得られた溶液をATPアガロースカラムに通し、得られた貫流を画分Aと名付けた。カラムを平衡緩衝液の5カラム容積で洗浄し、ATPアガロースに結合する物質を50mMのトリス/Cl、1MのKCl、pH7.0で溶出した。溶出した物質を画分Bと名付けた。洗浄物を画分Cとして保持した。画分Aを1リットル当たり100gにまで直接濃縮し、d-PBSでダイア濾過した。さらなる分析のために、画分Bを50mMのトリス/Cl中で20倍または100倍になるまで著しく濃縮した。さらなる参照のために、洗浄物の画分Cを保持した。ウエスタンブロット法のために、

40

50

(アルブミンの  $e.c.$  (減衰係数) が  $1\text{ mg}$  当たり  $0.53\text{ cm}^2$  であり、H s p 7 0 の  $e.c.$  が  $1\text{ mg}$  当たり  $0.41\text{ cm}^2$  である、A 2 8 0 による)  $10\text{ }\mu\text{g}$  の各タンパク質画分を、 $2\times$  S D S 装填緩衝液中の  $4\sim 20\%$  の S D S P A G E ゲルに装填した。装填する前に、試料を  $80^\circ\text{C}$  まで約  $5$  分間加熱した。 $200\text{ V}$  (定電圧) で分離を行い、約  $90$  分間実行した。得られたゲルを水中で  $30$  分間 $\sim 2$  時間すすぎ、次いで、タンパク質を  $30\text{ mA}$  (一定電流) で  $2$  時間、ニトロセルロース膜に搬送した。得られたプロットは、転写対照としての分子量マーカータンパク質を含有し、次いで、水中で  $5\%$  (w/v) の粉乳にブロックした。初代単クローン性抗体 (マウス抗ウシ H s p 7 0 (S i g m a / A l d r i c h # H 5 1 4 7)) を  $5\%$  の乳溶液中でプロット ( $1:2500$ ) に添加し、プロットを緩徐な揺動を伴う揺動装置上で、 $4^\circ\text{C}$  で一晩インキュベートした。次に、プロットを毎回  $1:2500$  の希釈で添加した  $5\%$  の乳溶液中の T D N および第二抗体 (P i e r c e 抗マウス H R P 共役) で  $4$  回、 $10$  分間洗浄した。 $4^\circ\text{C}$  での  $2\sim 3$  時間のインキュベーション後、プロットを毎回 T D N で  $4$  回、 $10$  分間洗浄した。次に、得られたプロットを p i c o (P i e r c e) 化学発光基質で  $5$  分間インキュベートした。K o d a k 写真用フィルムを暗室でプロットに露光し、その結果生じたフィルムを現像し、すすぎ、調整し、すすぎ、乾燥させた。フィルム上の分子量マーカー位置の正確な転移を決定するために、発光ラベルを使用した。

### 【0392】

結果：結果を図 1 1 に示す。撮されたウエスタンプロットは、分離スキームが、A (貫流) および B (A T P 結合) 画分におけるタンパク質の  $2$  つの集団を産生することを示す。出発原料 (レーン 2)、画分 A 貫流 (レーン 3)、画分 C の洗浄物 (レーン 4)、および画分 B (レーン 5) を、単クローン性抗体に反応する能力に関して試験した。さらに、正の対照としての機能を果たす市販の H s p 7 0 タンパク質を最終レーン (レーン 10) に装填した。図 1 1 のプロットで示されるように、貫流画分 A (レーン 3) は、顕著な量の H s p 7 0 を含有しない。溶出および濃縮された画分 B (レーン 4) は、プロットで示されるように、抗体に対して極めて反応性に富み、 $75\text{ kDa}$  の分子量マーカーを中心とする少なくとも  $2$  つのはっきりと異なるバンドを示す。洗浄物の画分 C (レーン 5) は、 $75\text{ kDa}$  をやや下回って走る  $2$  つのバンドの存在を示す。別個の独立した実験では、貫流画分 A (レーン 7) は、この場合もやはり抗体に反応せず、洗浄物の画分 C (レーン 8) も同様に抗体に反応しないが、レーン 9 に示される A T P 結合タンパク質で濃縮された画分 (画分 B) は、最初の分離で見られたのと同じのバンド模様をもたらす。

### 【0393】

考察：A T P アガロース親和性樹脂に結合するそれらの能力に基づいて、H S P 7 0 タンパク質を分離するために、分離プロトコルを開発し、その有効性に関して試験した。手順は、A T P アガロースを使用する最小量の試料の取り扱い、および緩衝液を濃縮して変化を導くための限外濾過、ならびに h s p の存在を検出するための抗 h s p 7 0 抗体のみを伴った。該手順の結果 (図 1 1) は、 $10\text{ }\mu\text{g}$  の出発原料、 $10\text{ }\mu\text{g}$  の貫流、または  $10\text{ }\mu\text{g}$  の洗浄物画分中にある間、a n t - H s p 抗体によって検出される十分な h s p 7 0 が存在しないことを明瞭に証明する。対照的に、A T P アガロースカラムから溶出した画分は、抗 H s p 7 0 抗体によって明瞭に認識される少なくとも  $2$  つのタンパク質を含有する。したがって、結果は、分離スキームが成功し、 $2$  つの独立したクロマトグラフィーおよびダイア濾過において再現可能であることを示す。さらに、データは、先に考察したように、ペプチド質量指紋によってもたらされた熱ショックタンパク質の特定を立証し、これらのタンパク質が機能的であり、かつ単純な A T P アガロースクロマトグラフィー、続いてダイア濾過で容易に単離および濃縮することができることを証明する。熱ショックタンパク質は、組換えアルブミンと同時に精製すると結論付けられる。そのような同時精製は、熱ショックタンパク質がアルブミンに結合し、かつアルブミンが安定した立体配座において熱ショックタンパク質を安定化させる役割を果たすという仮説と一致する。驚いたことに、組換えアルブミン/熱ショックタンパク質複合体は、機能熱ショックタンパク質の存在と一致する著しい A T P a s e 活性 (データ示さず) を保持する。この増加し

た活性は、下で説明するように、効果を促進しながら成長をもたらす時にさらに確認された。

実施例 10：細胞の生存率へのイネ組換えアルブミン由来の H s p の除去の効果

【0394】

方法：細胞培養試験に好適な画分 A を產生するために、実施例 9 で説明した分離スキームを同様に使用した（図 12）。方法は、それを A T P アガロースカラムに貫流させ、次にダイア濾過で濃縮し、細胞培養に好適な P B S で緩衝する際の、最小量の画分 A の取り扱いを伴う。方法の意図は、生存率の損失が見られるが、それが A T P 結合タンパク質の除去を超える他の何らかの理由または原因の理由であるように、実験に新規の変数を導入しないことである。ハイブリドーマ細胞培養生存率を促進する能力に関して、画分 A を純粹な対照（出発原料）に対して試験した。試験の結果は、図 12 に示される。

10

【0395】

結果：図 12 に示されるように、C e l l a s t i m 出発原料（網目の棒）およびパート A（無地の棒）を同一の濃度で試験し、負の対照（縞模様の棒）と比較した。試験した 4 つの濃度全てにおいて、統計的に著しい減少が観察可能である。結果は、A T P アガロース処理後、C e l l a s t i m の性能における著しい損失があったことを示す。処理は、C e l l a s t i m と比較して、A T P 結合タンパク質の除去前に、28.0、21.7、26.7、および 79.5 % の損失をもたらした。この実験において、試料の取り扱いまたは新規の汚染物質の不慮の導入の理由から、性能における任意の不注意による損失を最小限にすることを保証するために、試料の設計および取り扱いにおいて注意を払った。

20

【0396】

考察：細胞培養の結果（図 12）は、単にそれを A T P 結合カラムに通過させることによって、イネ由来組換えアルブミンの性能を低減することが可能であることを証明する。このデータは、実施例 9 に示される結果と組み合わせた時に、A T P アガロースカラムによるアルブミンからの h s p の枯渇が、アルブミンの特性を促進する細胞成長を直接低減させることを証明する。したがって、この結果は、アルブミンの優れた特性が、少なくともある程度、アルブミン中の夾雑熱ショックタンパク質に起因することを証明する。

実施例 11：無血清培養における C H O K 1 の増殖へのラクトフェリンとの組み合わせでのイネ由来組換えヒト血清アルブミンの効果

30

【0397】

植物由来ヒト血清アルブミン（C e l l a s t i m）の固有の性状が、これらの成分との組み合わせで添加された時に、他の細胞培養成分の活性を促進しながら成長にプラスの影響を与え得るかを調査するために、さらなる一連の実験を考案し、そのような成分との最適な組み合わせを評価および同定した。

【0398】

方法：C H O K 1 系列の D P 1 2 クローン 1934（A T C C # C R L - 12445）を、125 mL のフラスコの 14 mL の培地中の 0.5 % の F B S、1  $\mu$  M のメトトレキサート、50  $\mu$  g / mL のペニシリン / ストレプトマイシン、1 mM の G l u t a m a x（I n v i t r o g e n）で補充した S A F C 325 P F 無タンパク質 C H O 培地中に維持した。C H O K 1 系列の D P 1 2 は、分泌産物としてヒト化単クローン性抗体を発現する。植物由来組換えヒト血清アルブミン（r H S A）（実施例 3 および 5）ならびに植物由来組換えラクトフェリン（r L F）（実施例 1 および 4）の成長および生産性増進効果を、単独または組み合わせで検査した。細胞を 200 n M のメトトレキサート、50  $\mu$  g / mL のペニシリン / ストレプトマイシンを含有する 325 P F C H O 培地中で 2 回洗浄し、同一の培地中で、1 mL 当たり  $1.5 \times 10^5$  の細胞で 4 mL の振盪バッチ培養物に播種した。4 mL の振盪培養物を、r H S A もしくは r L F または 2 つの添加物の多様な混合物の多様な濃度でさらに補充した。r H S A または r L F が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。G u a v a P C A 細胞計数器（G u a v a T e c h n o l o g i e s）を介して、14 日間のバッチ期間

40

50

、生存細胞の濃度を毎日測定した。培養の6日後に、対数期成長を細胞の相対的増殖によって判断した。全ての培養物を、加湿環境下で、37℃、6%のCO<sub>2</sub>で成長させた。観察された効果を正味の生存細胞濃度（観察ベースの培地）として計算した。予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

#### 【0399】

表E9は、培養の6日後の生存細胞の数を示す。補給なしの培地中の細胞は、1mL当たり $3.3 \times 10^5$ の生存細胞に増殖した。植物由来組換えヒト血清アルブミン（rHSA）もしくは組換えラクトフェリン（rLF）、またはそれら2つの組み合わせの添加は、下で示されるように細胞の増殖を増加させた。列2は、基準の対照培養を上回る、各々の添加物の観察された効果を示す。列3は、予測相加効果が添加物1および添加物2の合計に等しいというモデルを使用した、予測された効果を示す。

#### 【表E9】

表E9				
	1mL当たりの生存細胞 (e <sup>5</sup> )	観察された効果	予測された効果	ラクトフェリン対アルブミンの比率
添加物なし (基準)	3.3	0		
rHSA 0.5 g/L	7.3	4.0		
rHSA 1 g/L	7.9	4.6		
rLF 0.1 g/L	7.5	4.2		
rLF 0.8 g/L	16.0	12.7		
rLF 0.1 g/L + rHSA 0.5 g/L	18.9	15.6	8.2	1:5
rLF 0.8 g/L + rHSA 0.5 g/L	29.0	25.7	16.7	1:0.625
rLF 0.1 g/L + rHSA 1 g/L	23.6	20.3	8.8	1:10
rLF 0.8 g/L + rHSA 1 g/L	35.4	32.1	17.3	1:1.25

#### 【0400】

考察：ラクトフェリンは、鉄を輸送する役割を果たす無血清細胞培養培地にとって必須因子であり、さらに、ラクトフェリンは、最近になって、いくつかの細胞型においてアポトーシスの成長因子および阻害剤として特定された（Huang et al., *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* (2008) 44 (10) 464 - 71、Wong et al., *Rheumatology* 48 (1) 39 - 44、Bi et al., *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (1997) 45 (4) 315 - 20、Hashizume et al., *Biochem. Biophys. Acta* (1983) 763 (4) 377 - 82）。表E9では、データは、0.1 g/Lおよび0.8 g/Lの組換えラクトフェリンの添加が、ラクトフェリン成長刺激特性と一致する細胞成長の基準速度と比較して、細胞成長の著しい増進をもたらしたことを示す。

#### 【0401】

ラクトフェリンの成長刺激効果は、植物由来組換えヒト血清アルブミンの添加によってさらに高まった。予想外に、0.1 g/Lのラクトフェリンおよび0.5 g/Lの植物由来組換えヒト血清アルブミンの組み合わせ（1対5の比率）は、同一の濃度で試験したアルブミン単独またはラクトフェリン単独のいずれかよりも約4倍高い、細胞成長における刺激をもたらした。一方で、0.1 g/Lのラクトフェリンおよび1.0 g/Lのヒト血清アルブミンの組み合わせ（1対10の比率）は、同一の濃度において、アルブミンまたはラクトフェリン単独のいずれかよりも約4.4～5倍近く高い、細胞成長における刺激をもたらした。

#### 【0402】

植物由来組換えヒト血清アルブミンを0.8 g/Lの濃度でラクトフェリンに添加した時に、相乗作用も同様に観察された。この著しく高い濃度においてさえ、植物由来組換えヒト血清アルブミンの添加は、2～2.5倍、細胞成長をさらに増加させた。

## 【 0 4 0 3 】

アルブミンおよびラクトフェリンは、構造または機能的類似性が少ししか重複しない、はっきりと異なるタンパク質ファミリーである。したがって、それらの異なる構造および機能に基づいて、相乗作用がこれらのタンパク質で観察されるという事実は予想外である。相乗作用は、ラクトフェリンおよびアルブミンの最適な比率を使用することによって、栄養補助剤に高められた細胞培養特性（すなわち、改善された細胞成長および生存率）を提供する、改善された栄養補助剤を開発する機会を提供する。

実施例 12：無血清培養で成長する CHO K1 細胞の生産性へのラクトフェリンとの組み合わせでのイネ由来組換えアルブミンの効果

## 【 0 4 0 4 】

方法：CHO K1 系列の DP12 クローン 1934 (ATCC# CRL-12445) を、125 mL のフラスコの 14 mL の培地中の 0.5% の FBS、1  $\mu$ M のメトトレキサート、50  $\mu$ g/mL のペニシリン/ストレプトマイシン、1 mM の Glutamax (Invitrogen) で補充した SAFC325PF 無タンパク質 CHO 培地中に維持した。CHO K1 系列の DP12 は、分泌産物としてヒト化単クローン性抗体を発現する。植物由来組換えヒト血清アルブミン (rHSA) (実施例 3 および 5) ならびに植物由来組換えラクトフェリン (rLF) (実施例 1 および 4) の成長および生産性増強効果を、単独または組み合わせで検査した。細胞を 200 nm のメトトレキサート、50  $\mu$ g/mL のペニシリン/ストレプトマイシンを含有する 325PF CHO 培地中で 2 回洗浄し、同一の培地中で、1 mL 当たり  $1.5 \times 10^5$  の細胞で 4 mL の振盪バッチ培養物に播種した。4 mL の振盪培養物を、植物由来組換えヒト血清アルブミンもしくは LF または 2 つの添加物の多様な混合物の多様な濃度でさらに補充した。HSA または LF が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。Guava PCA 細胞計数器 (Guava Technologies) を介して、14 日間のバッチ期間、生存細胞の濃度を毎日決定した。培養の 6 日後に、対数期成長を細胞の相対的増殖によって判断した。細胞の生存率が 10% 未満にまで低下した時に（典型的には、13 日目または 14 日目）、抗体生産性をバッチ培養の最後に定量 ELISA (Bethyl Laboratories) によって決定した。全ての培養物を、加湿環境下で、37、6% の CO<sub>2</sub> で成長させた。観察された効果を正味の生存細胞濃度（観察ベースの培地）として計算した。予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

## 【 表 E 1 0 】

表 E 1 0				
	産物濃度 (1 mL 当たり の $\mu$ g)	観察された 効果	予測された 効果	HSA 対ラクトフ ェリンの比率
添加物なし(基準)	47.1	0		
rHSA 0.5 g/L	114.6	67.5		
rHSA 1 g/L	136.1	89.0		
rLF 0.1 g/L	91.9	44.8		
rLF 0.8 g/L	138.5	91.4		
rLF 0.1 g/L + rHSA 0.5 g/L	183.7	136.6	112.3	1:5
rLF 0.8 g/L + rHSA 0.5 g/L	242.1	195.0	158.9	1:0.625
rLF 0.1 g/L + rHSA 1 g/L	219.3	172.2	133.8	1:10
rLF 0.8 g/L + rHSA 1 g/L	260.2	213.1	180.4	1:1.25

## 【 0 4 0 5 】

表 E 1 0 は、CHO K1 細胞の生産性への、単子葉植物細胞中で産生される植物由来組換えヒト血清アルブミンおよび組換えラクトフェリン、ならびに 2 つのタンパク質の多様な組み合わせの効果を示す。表 E 1 0 は、基準の培地（添加物なし）中の 13 日間の培養後の細胞によって産生される抗体産物の濃度が、47.1  $\mu$ g/mL の抗体産物を産生したことを示す。組換えアルブミンもしくは組換えラクトフェリン単独で、または植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびラクトフェリンの組み合わせで補充された培地は、添



加物を有さない対照培地よりも著しく高いレベルの抗体を産生した。列 2 は、基準の対照培地を上回る添加物の観察された効果を示す。列 3 は、予測添加物が各添加物単独の合計に等しいというモデルを使用した、2 つの添加物の組み合わせの予測相加効果を示す。

【0406】

考察：表 E 10 は、細胞成長および生存率における改善が、改善された抗体発現ならびに細胞生産性に直接つながったことを証明する。細胞の生存率および細胞成長の場合のように、これらをとともに培養に添加した時に、タンパク質成分の最大効果が観察された。

【0407】

表 E 11 は、実施例 12 と同一の条件を使用した、拡大した範囲の濃度で添加物の効果を示す、さらなるデータセットを示す。組換えアルブミン単独、もしくはラクトフェリン単独、または両タンパク質の組み合わせで補充した培地は、添加物を含まない対照培地よりも高い抗体のレベルを産生した。列 2 は、基準の対照培地を上回る添加物の観察された効果を示す。列 3 は、同一の濃度で単独で添加された場合の各添加物の効果の合計に等しいというモデルを使用した、2 つの添加物の組み合わせの予測された効果を示す。データは、組み合わせの実際の効果が、試験した 2 つのタンパク質の比率全体にわたって、予測された効果以上であることを示す。

【表 E 11】

表 E 11					
	産物濃度 (1 mL 当たりの ug)	観察された 効果	予測された 効果	予測された 活性におけ る改善の%	ラクトフェリ ン対 HSA の 比率
添加物なし (基準)	56.9	0.0			
<b>単一添加物</b>					
HSA 0.5 g/L	99.1	42.2			
HSA 1 g/L	126.3	69.4			
HSA 2 g/L	186.0	129.1			
HSA 3 g/L	212.9	156.0			
<b>LF</b>					
LF 0.1 g/L	123.1	66.2			
LF 0.5 g/L	173.5	116.6			
LF 0.8 g/L	182.0	125.1			
LF 1.5 g/L	196.3	139.4			
<b>組み合わせ</b>					
LF 0.1 g/L + HSA 0.5 g/L	212.4	155.5	108.5	143%	1:5
LF 0.5 g/L + HSA 0.5 g/L	314.9	258.0	158.9	163%	1:1
LF 0.8 g/L + HSA 0.5 g/L	302.8	245.9	167.4	147%	1:0.625
LF 1.5 g/L + HSA 0.5 g/L	336.8	279.9	181.7	154%	1:0.33
<b>LF + HSA 1.0 g/L</b>					
LF 0.1 g/L + HSA 1.0 g/L	239.7	182.8	135.7	133	1:10
LF 0.5 g/L + HSA 1.0 g/L	339.4	282.5	186.1	152	1:2
LF 0.8 g/L + HSA 1.0 g/L	357.7	300.8	194.6	155	1:1.2
LF 1.5 g/L + HSA 1.0 g/L	343.7	286.8	208.9	137	1:0.66
<b>LF + HSA 2.0 g/L</b>					
LF 0.1 g/L + HSA 2.0 g/L	261.3	204.4	195.4	105	1:20
LF 0.5 g/L + HSA 2.0 g/L	377.2	320.3	245.8	131	1:4
LF 0.8 g/L + HSA 2.0 g/L	414.8	357.9	254.3	141	1:2.4
LF 1.5 g/L + HSA 2.0 g/L	358.0	301.1	268.6	112	1:1.33

【0408】

考察：1 対 0 . 3 3 3 の低比率から 1 対 2 0 までの高比率に及ぶラクトフェリン対アルブミンの比率は、細胞成長の相乗的刺激を産生した。ラクトフェリン対アルブミンの最適な比率は、1 対 0 . 3 3 3 重量 / 重量 ( 0 . 5 g / L のアルブミン濃度 ) 、 1 対 1 . 2 重

量 / 重量 ( 1 . 0 g / L のアルブミン濃度 ) 、および 1 対 2 . 4 重量 / 重量 ( 2 . 0 g / L のアルブミン濃度 ) で見出された。

【 0 4 0 9 】

したがって、細胞生産性の刺激は、組換えアルブミンおよびラクトフェリンの広範囲の比率を超えて発生する。ラクトフェリンおよび組換えアルブミンの最適な比率は、ある程度、両タンパク質成分の絶対濃度によって変わる。ラクトフェリン対アルブミンの好ましい比率は、約 1 ( ラクトフェリン ) 対 0 . 3 3 ( アルブミン ) ~ 約 1 ( ラクトフェリン ) 対 3 ( アルブミン ) 重量 / 重量に及ぶ。

実施例 1 3 : 他の細胞培養成分の存在下におけるアルブミンおよびトランスフェリンの組み合わせの効果の評価

10

【 0 4 1 0 】

細胞成長および生存率へのラクトフェリンおよびアルブミンの相乗効果への他の細胞培養成分の効果を決するため、細胞成長に必須であることが先に示された他の細胞培養成分を用いて、さらなる一連の実験を無血清条件下で実行した。

【 0 4 1 1 】

方法 : 1 0 % の F B S を有する D M E M / F 1 2 培地中で活発に成長するハイブリドーマ細胞を、F B S を除去するために、F B S なしで、D M E M / F 1 2 中で 3 回洗浄した。植物由来トランスフェリン、植物由来ヒト組換え血清アルブミン、亜セレン酸ナトリウム、ならびにエタノールアミン単独および組み合わせでの成長および生産性増強効果を、1 m L 当たり  $0 . 4 \times 10^5$  の生存細胞の初期細胞密度で D M E M / F 1 2 中に播種された細胞において検査した。これらの実験では、トランスフェリン ( T F ) を  $5 . 5 \mu g / m L$  の初期濃度で使用し、植物由来組換えヒト血清アルブミン ( H S A ) を  $100 \mu g / m L$ 、 $500 \mu g / m L$ 、および  $1000 \mu g / m L$  の初期濃度で使用し、亜セレン酸ナトリウム ( S E ) ならびにエタノールアミンをそれぞれ 1 : 500 , 000 v / v および  $6 . 7 \mu g / m L$  の濃度で使用した。観察された効果を正味の生存細胞濃度 ( 観察ベースの培地 ) として計算した。予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

20

【 0 4 1 2 】

振盪培養を下の表 E 1 2 で説明するように、上に記載される栄養補助剤の多様な濃度でさらに補充した。栄養補助剤が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。G u a v a P C A 細胞計数器 ( G u a v a T e c h n o l o g i e s ) を介して、3 日後に生存細胞の濃度を決定した。全ての培養物を、加湿環境下で、3 7 、 6 % の C O <sub>2</sub> で成長させた。

30

【表 E 1 2】

表E 1 2						
	1 mL 当たりの 生存細胞	標準 偏差	観察され た効果	予測され た効果	相乗作用	トランスフ ェリン対ア ルブミンの 比率
DMEM/F12 単独	0.01	0.01				
10% の FBS	11.40	0.71	11.39			
TF 5.5 µg/L	0.02	0.00	0.01			
SE 6.7 µg/L	0.22	0.13	0.21			
HSA 0.1 g/L	2.31	0.06	2.30			
HSA 0.5 g/L	4.67	0.18	4.66			
HSA 1 g/L	4.55	0.46	4.54			
2 種類						
TF+SE	0.40	0.04	0.38	0.21	あり	
TF+HSA 0.1 g/L	3.00	0.02	2.98	2.30	あり	1:18
TF+HSA 0.5 g/L	5.42	0.20	5.41	4.67	あり	1:90
TF+HSA 1 g/L	5.71	0.14	5.69	4.55	あり	1:181
2 種類						
SE+HSA 0.1 g/L	2.76	0.06	2.75	2.50	あり／なし	
SE+HSA 0.5 g/L	4.15	0.16	4.14	4.87	なし	
SE+HSA 1 g/L	3.75	0.22	3.74	4.75	なし	
3 種類						
TF+SE+HSA 0.1 g/L	7.40	0.00	7.39	2.51	あり	1:18
TF+SE+HSA 0.5 g/L	9.48	0.31	9.46	4.87	あり	1:90
TF+SE+HSA 1 g/L	9.71	0.11	9.70	4.75	あり	1:181

## 【0 4 1 3】

考察：組換えトランスフェリンとの組み合わせでの組換えヒト血清アルブミンは、ともに培養培地に添加された時に相乗効果を示した。この効果は、セレンの存在下でさらに増大した。しかしながら、セレンの添加は、組換え植物由来ヒト血清アルブミン単独とは相乗的に作用しなかった。トランスフェリンおよび植物由来組換えヒト血清アルブミンの最大相乗効果は、セレンの存在下、ならびに約 1（トランスフェリン）対 100（アルブミン）重量 / 重量、および約 1（トランスフェリン）対 200（アルブミン）のトランスフェリン対植物由来組換えヒト血清アルブミンの比率で発生した。

## 【0 4 1 4】

セレンは、細胞成長および発達の周知の必須の微量元素であり、生物学的システムにおけるそのプラスの役割には、グルタチオンペルオキシダーゼを活性化することによる遊離基の解毒が含まれる。さらに、セレンは、無血清培地中で非常に効果的な鉄担体の機能を果たす可能性があり、細胞成長を刺激するトランスフェリンへのその相乗的影響を説明するのに役立つ。（Zhang et al., Biotechnol. Bioeng. (2006) 95 (6) 1188 - 97）。

実施例 1 4：アルブミン、トランスフェリン、およびインスリンの組み合わせの効果の評価

## 【0 4 1 5】

方法：10%のFBSを有するDMEM/F12培地中で活発に成長するハイブリドーマ細胞を、FBSを除去するために、FBSなしで、DMEM/F12中で3回洗浄した。植物由来トランスフェリン、植物由来ヒト組換え血清アルブミン、亜セレン酸ナトリウム、ならびにエタノールアミン単独およびインスリンとの組み合わせでの成長および生産性増強効果を、1 mL当たり  $0.4 \times 10^5$  の生存細胞の初期細胞密度でDMEM/F1

2 中に播種された細胞において検査した。これらの実験では、組換えヒトインスリン (IN) (Millipore) を  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で使用し、トランスフェリン (TF) を  $5.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  の初期濃度で使用し、植物由来組換えヒト血清アルブミンを  $0.1 \text{ g}/\text{L}$ 、 $0.5 \text{ g}/\text{L}$ 、および  $1 \text{ g}/\text{L}$  の初期濃度で使用し、亜セレン酸ナトリウムならびにエタノールアミンをそれぞれ  $6.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $1:500$ 、 $0.00 \text{ v}/\text{v}$  の濃度で使用した。観察された効果を正味の生存細胞濃度 (観察ベースの培地) として計算した。予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

【0416】

振盪培養を下の表 E 13 で説明するように、上に記載される因子の多様な濃度でさらに補充した。栄養補助剤が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。Guava PCA 細胞計数器 (Guava Technologies) を介して、3 日後に生存細胞の濃度を決定した。全ての培養物を、加湿環境下で、 $37^\circ\text{C}$ 、 $6\%$  の  $\text{CO}_2$  で成長させ、1 分当たり 120 回の速度において  $2 \text{ cm}$  の回転軌道で振盪した。

【表 E 13】

表 E 13					
	1 mL 当たりの 生存細胞	標準 偏差	観察された 効果	予測された 効果	相乗作用
D/F12 単独	0.01	0.01			
10% の FBS	11.65	0.21	11.64		
因子単独					
インスリン (IN) $10 \mu\text{g}/\text{L}$	0.04	0.02	0.03		
トランスフェリン (TF) $5.5 \mu\text{g}/\text{L}$	0.02	0.00	0.01		
亜セレン酸ナトリウム (SE) $6.7 \mu\text{g}/\text{L}$	0.22	0.13	0.21		
HSA $0.1 \text{ g}/\text{L}$	2.31	0.06	2.30		
HSA $0.5 \text{ g}/\text{L}$	4.67	0.18	4.66		
HSA $1 \text{ g}/\text{L}$	4.55	0.46	4.54		
2 種類					
IN + TF	0.03	0.02	0.02	0.06	
IN + SE	1.06	0.15	1.05	0.26	あり
IN + HSA $0.1 \text{ g}/\text{L}$	2.54	0.08	2.53	2.35	なし
IN + HSA $0.5 \text{ g}/\text{L}$	3.96	0.34	3.95	4.71	なし
IN + HSA $1 \text{ g}/\text{L}$	4.61	0.16	4.60	4.59	なし
3 種類					
IN + TF + SE	2.13	0.49	2.12	0.28	あり
IN + TF + HSA $0.1 \text{ g}/\text{L}$	3.29	0.03	3.28	2.37	あり
IN + TF + HSA $0.5 \text{ g}/\text{L}$	5.84	0.49	5.83	4.73	あり
IN + TF + HSA $1 \text{ g}/\text{L}$	6.84	0.34	6.83	4.61	あり
3 種類					
IN + SE + HSA $0.1 \text{ g}/\text{L}$	2.21	0.17	2.19	2.37	なし
IN + SE + HSA $0.5 \text{ g}/\text{L}$	3.41	0.21	3.39	4.73	なし
IN + SE + HSA $1 \text{ g}/\text{L}$	3.62	0.23	3.60	4.61	なし
4 種類					
IN + TF + SE + HSA $0.1 \text{ g}/\text{L}$	7.91	0.46	7.90	2.59	あり
IN + TF + SE + HSA $0.5 \text{ g}/\text{L}$	9.14	0.63	9.13	4.95	あり
IN + TF + SE + HSA $1 \text{ g}/\text{L}$	10.07	0.67	10.05	4.83	あり

【0417】

考察：これらの研究では、インスリンおよび植物由来組換えヒト血清アルブミンの添加は、細胞成長への相乗効果を産生しなかった。対照的に、植物由来組換えヒト血清アルブ

ミンおよびトランスフェリンならびにインスリンの添加は、細胞成長への相乗効果を産生した。

実施例 15：セレンの存在下におけるアルブミン、トランスフェリン、およびインスリンの組み合わせの効果の評価

【0418】

方法：10%のFBSを有するDMEM/F12培地中で活発に成長するハイブリドーマ細胞を、FBSを除去するために、FBSなしで、DMEM/F12中で3回洗浄した。植物由来トランスフェリン(TF)、植物由来ヒト組換え血清アルブミン(HSA)、亜セレン酸ナトリウム、ならびにエタノールアミン単独および組み合わせでの成長および生産性増強効果を、1mL当たり $0.4 \times 10^5$ の生存細胞で $6.7 \mu\text{g/mL}$ の亜セレン酸ナトリウムを含有する基本培地中で検査した。これらの実験では、組換えヒトインスリン(IN)(Millipore)を $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度で使用し、トランスフェリン(TF)を $5.5 \mu\text{g/mL}$ の初期濃度で使用し、植物由来組換えヒト血清アルブミンを $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $500 \mu\text{g/mL}$ 、および $1000 \mu\text{g/mL}$ の初期濃度で使用し、エタノールアミンを1:500, 000 v/vの濃度で使用した。観察された効果を正味の生存細胞濃度(観察ベースの培地)として計算した。予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

10

【0419】

振盪培養を下の表E14で説明するように、上に記載される因子の多様な濃度でさらに補充した。栄養補助剤が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。Guava PCA細胞計数器(Guava Technologies)を介して、3日後に生存細胞の濃度を決定した。全ての培養物を、加湿環境下で、37、6%のCO<sub>2</sub>で成長させた。

20

【表 E 1 4】

表 E 1 4						
条件	生存細胞 計数 10e5	標準 偏差	観察された 効果	予測された 効果	予測された 活性における 改善の%	相乗作用
D/F12+セレンの 基本培地	0.08	0.04	0.00			
10%のFBS	13.20	0.28	13.12			
インスリン	0.30	0.09	0.22			
因子単独						
TF	0.27	0.04	0.19			
HSA 0.1 g/L	2.23	0.11	2.15			
HSA 0.5 g/L	6.21	0.20	6.13			
HSA 1 g/L	8.00	0.05	7.91			
2種類						
IN+TF	0.48	0.02	0.40	0.41		なし
IN+HSA 0.1 g/L	1.81	0.02	1.72	2.37		なし
IN+HSA 0.5 g/L	6.00	0.09	5.91	6.35		なし
IN+HSA 1 g/L	7.43	0.19	7.35	8.13		なし
2種類						
TF+HSA 0.1 g/L	4.29	0.04	4.20	2.34	179	あり
TF+HSA 0.5 g/L	12.35	0.21	12.27	6.32	194	あり
TF+HSA 1 g/L	15.48	0.71	15.39	8.1	190	あり
3種類						
IN+TF+HSA 0.1 g/L	4.18	0.21	4.09	2.56	159	あり
IN+TF+HSA 0.5 g/L	13.60	0.00	13.52	6.54	206	あり
IN+TF+HSA 1 g/L	15.38	0.22	15.29	8.32	184	あり

## 【0 4 2 0】

考察：この場合もやはり、先の実験に示されるように、植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびインスリンの組み合わせは、これらの2つの成分とともに細胞培養培地に添加した時に、細胞成長の相乗的刺激を産生しなかった。比較して、試験した濃度範囲全体にわたって、植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびトランスフェリンの混合物の間で相乗作用が観察された。インスリンの存在下で、植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびトランスフェリンの相乗作用も観察された。

実施例 16：エタノールアミンの存在下におけるアルブミンおよびトランスフェリンの組み合わせの効果の評価

## 【0 4 2 1】

方法：10%のFBSを有するDMEM/F12培地中で活発に成長するハイブリドーマ細胞を、FBSを除去するために、FBSなしで、DMEM/F12中で3回洗浄した。植物由来トランスフェリン(TF)、植物由来ヒト組換え血清アルブミン(HSA)、亜セレン酸ナトリウム、ならびにエタノールアミン単独および組み合わせでの成長および生産性増強効果を、1mL当たり $0.4 \times 10^5$ の生存細胞で1:500,000のエタノールアミンv/vを含有する基本培地中で検査した。これらの実験では、組換えヒトインスリン(IN)(Millipore)を10μg/mLの濃度で使用し、トランスフェリン(TF)を5.5μg/mLの初期濃度で使用し、植物由来組換えヒト血清アルブミンを100μg/mL、500μg/mL、および1000μg/mLの初期濃度で使用し、亜セレン酸ナトリウムを6.7μg/mLの濃度で使用した。観察された効果を正味の生存細胞濃度(観察ベースの培地)として計算した。予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

## 【0422】

振盪培養を下の表 E 1 5 で説明するように、上に記載される因子の多様な濃度でさらに補充した。栄養補助剤が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。Guava PCA 細胞計数器 (Guava Technologies) を介して、3 日後に生存細胞の濃度を決定した。全ての培養物を、加湿環境下で、37℃、6%のCO<sub>2</sub>で成長させた。

【表 E 1 5】

表 E 1 5				
条件	観察された効果 (1 mL 当たりの 生存細胞)	標準偏差	予測された効果 (1 mL 当たりの 生存細胞)	相乗作用
D/F12+エタノール アミンの基本培地	0.51	0.16		
10% の FBS	14.45	0.64		
IN	1.41	0.24		
因子単独				
TF	2.08	0.15		
HSA 0.1 g/L	2.16	0.07		
HSA 0.5 g/L	5.66	0.35		
HSA 1 g/L	7.08	0.21		
2 種類				
IN + TF	3.12	0.11	3.48	なし
IN + HSA 0.1 g/L	1.87	0.00	3.57	なし
IN + HSA 0.5 g/L	4.48	0.25	7.07	なし
IN + HSA 1 g/L	5.14	0.19	8.49	なし
2 種類				
TF + HSA 0.1 g/L	6.72	0.35	4.24	あり
TF + HSA 0.5 g/L	12.30	0.26	7.74	あり
TF + HSA 1 g/L	16.20	0.65	9.16	あり
3 種類				
IN + TF + HSA 0.1 g/L	7.46	0.28	5.64	あり
IN + TF + HSA 0.5 g/L	13.30	0.36	9.15	あり
IN + TF + HSA 1 g/L	16.60	0.48	10.57	あり

## 【0423】

考察：この場合もやはり、先の実験に示されるように、植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびインスリンの組み合わせは、これらの2つの成分とともに細胞培養培地に添加した時に、細胞成長の相乗的刺激を産生しなかった。比較して、試験した濃度範囲全体にわたって、植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびトランスフェリンの混合物の間で相乗作用が観察された。これらの条件下で、インスリンの存在下において、植物由来組換えヒト血清アルブミンおよびトランスフェリンの相乗作用も観察された。

## 【0424】

驚いたことに、インスリン、トランスフェリン、および植物由来組換えヒト血清アルブミンの組み合わせは、10%の血清と比較して、優れた細胞成長を産生し、タンパク質のこれらの組み合わせの優れた特性を証明した。

実施例 17：イネ組換えで産生されるアルブミンおよび血漿由来アルブミンの比較

## 【0425】

イネ由来組換えヒト血清アルブミン (rHSA) の効果と血漿由来血清アルブミン (pHSA) の効果を直接比較するために、細胞成長を刺激するそれらの能力のためにイネ由来組換えトランスフェリンと混合した時に、両方の試料を2つの比率で直接比較した。

## 【 0 4 2 6 】

方法：ハイブリドーマ細胞を 10 % の F B S を有する D M E M / F 1 2 ( G i b c o ) 中で成長させた。対数期成長における細胞を採取し、F B S を除去するために D M E M / F 1 2 中で 3 回洗浄し、1) D M E M / F 1 2 基本培地、2) D M E M / F 1 2 + セレン酸ナトリウム基本培地、または 3) 1 m L 当たり  $0.75 \times 10^5$  の生存細胞における D M E M / F 1 2 基本培地のいずれかに播種した。各基本培地を、組換えトランスフェリン ( T F )、イネ由来組換えヒト血清アルブミン ( r H S A )、血漿由来ヒト血清アルブミン ( p H S A )、またはトランスフェリンとアルブミンのいずれかの形態との両方の組み合わせのいずれかでさらに補充した。37 °C、5 % の C O <sub>2</sub> でのインキュベーションの 3 日後、製造業者によって指示されるように、生存細胞の濃度を G u a v a P C A 細胞計数器で決定した。観察された効果を正味の生存細胞濃度 ( 観察ベースの培地 ) として計算した。予測効果は、個々の成分の効果の合計として計算した。効果係数は、予期した効果で割った観察された効果として計算した。1 の効果係数は、予期した効果 ( 添加物 ) を示す。1 を超える効果係数は、相加効果より大きい、または相乗効果を示す。

10

## 【 0 4 2 7 】

これらの実験では、トランスフェリン ( T F ) を 1 および 3 m g / L の初期濃度で使用し、アルブミンを 5 g / L の濃度で使用し、亜セレン酸ナトリウムを  $6.7 \mu\text{g} / \text{L}$  の濃度で使用し、エタノールアミンを 1 : 500 , 000 v / v で使用した。



【表 E 1 6 - 1】

表E 1 6					
基本培地: DMEM/F12	1 mL 当りの 生存細胞 10e5	標準 偏差	観察された 効果	予測された 効果	効果係数 (実質／予期)
基本培地	0.11	0.07			
成分単独					
rTF 1 mg/L	0.21	0.01	0.10		
rTF 3 mg/L	0.28	0.09	0.18		
pH SA 5 g/L (Seracare)	11.30	0.28	11.19		
rHSA 5 g/L (Cellastim)	5.11	0.02	5.00		
pH SA との組み合わせ					
rTF 1 mg/L + pH SA 5 g/L	12.85	0.49	12.74	11.51	1.1
rTF 3 mg/L + pH SA 5 g/L	13.20	0.42	13.09	16.41	0.8
rHSA との組み合わせ					
rTF 1 mg/L + rHSA 5 g/L	18.80	0.71	18.69	5.31	3.5
rTF 3 mg/L + rHSA 5 g/L	18.85	0.92	18.74	5.39	3.5
基本培地: DMEM/F12	1 mL 当りの 生存細胞 10e5	標準 偏差	観察された 効果	予測された 効果	効果係数 (実質／予期)
基本培地	0.04	0.02			
成分単独					
rTF 1 mg/L	0.14	0.01	0.10		
rTF 3 mg/L	0.14	0.05	0.10		
pH SA 5 g/L	6.08	0.13	6.04		
rHSA 5 g/L	1.76	0.17	1.72		
pH SA との組み合わせ					
rTF 1 mg/L + pH SA 5 g/L	7.46	0.49	7.42	6.22	1.2
rTF 3 mg/L + pH SA 5 g/L	7.84	0.05	7.79	7.84	1.0
rHSA との組み合わせ					
rTF 1 mg/L + rHSA 5 g/L	8.55	0.79	8.51	1.90	4.5
rTF 3 mg/L + rHSA 5 g/L	8.37	0.23	8.33	1.90	4.4

10

20

30

【表 E 1 6 - 2】

基本培地: DMEM/F12	1 mL 当りの生存細胞 10e5	標準 偏差	観察された 効果	予測された 効果	効果係数 (実質/予期)
基本培地	1.01	0.02			
成分単独					
rTF 1 mg/L	3.45	0.27	2.44		
rTF 3 mg/L	3.47	0.27	2.46		
pH SA 5 g/L	13.15	0.49	12.14		
rHSA 5 g/L	3.46	0.13	2.45		
pH SA との組み合わせ					
rTF 1 mg/L + pH SA 5 g/L	14.83	0.49	13.82	16.60	0.8
rTF 3 mg/L + pH SA 5 g/L	14.57	0.12	13.56	16.61	0.8
rHSA との組み合わせ					
rTF 1 mg/L + rHSA 5 g/L	17.87	1.46	16.86	6.91	2.4
rTF 3 mg/L + rHSA 5 g/L	20.20	1.13	19.19	6.93	2.8

10

## 【0428】

考察：表 E 1 4 は、イネ由来組換えヒト血清アルブミンとの T F の組み合わせが、予測された効果よりもはるかに大きい値の観察された効果を生じたことを確認する、3つの独立した実験の結果を示す。比較して、血漿由来 H A S およびトランスフェリンの組み合わせは、予期した効果に類似するか、もしくはそれ未満の値を生じた。したがって、トランスフェリンおよびラクトフェリンの活性を相乗的に高めるアルブミンの能力は、アルブミン自体の本来の特徴というよりはむしろ、アルブミンの供給源に依存していると思われる。具体的には、本実験は、トランスフェリンおよびラクトフェリン等のトランスフェリン関連タンパク質とのヒト血清アルブミンの相乗的特性が、イネ由来組換えヒト血清アルブミンの予想外の驚くべき特性であることを確認する。有意に、トランスフェリンおよび植物由来組換えアルブミンの組み合わせは、血漿由来アルブミンが、5 g / L において単独で、同一の濃度のイネ由来ヒト血清アルブミンのよりも効果的であったにもかかわらず、血漿由来アルブミンおよびトランスフェリンの組み合わせよりも、刺激細胞成長に効果的であった。

20

30

実施例 1 8 : 血漿由来トランスフェリンまたは組換えトランスフェリンのいずれかとの組み合わせで細胞成長を刺激するイネ由来組換えアルブミンの能力の評価

## 【0429】

イネ由来組換えヒトトランスフェリン ( r T F ) の効果と血漿由来トランスフェリン ( p T F ) の効果を直接比較するために、細胞成長を刺激するそれらの能力のためにイネ由来組換えヒト血清アルブミンと混合した時に、両方の試料を2つの比率で直接比較した。

## 【0430】

方法：DMEM / F 1 2 + から成る基本培地 ( B M ) を 0 . 0 0 6 7 m g / L の亜セレン酸ナトリウム、1 : 5 0 0 , 0 0 0 v / v のエタノールアミンで構成した。基本培地は、血漿 H S A ( p H S A 、細胞培養グレード S e r a c a r e ) またはイネ由来組換え H S A ( r H S A ) のいずれかとの組み合わせで、5 . 5 m g / L の濃度でヒト血漿トランスフェリン p T F を含んだ。対数期成長におけるハイブリドーマ細胞を採取し、F B S を除去するために DMEM / F 1 2 中で3回洗浄し、1 mL 当たり 0 . 8 0 × 1 0 <sup>5</sup> の生存細胞に播種し、37 °C、6 % の C O <sub>2</sub> でインキュベートした。生存細胞の濃度を、製造業者によって指示されるとおり、Guava PCA 細胞計数器で毎日決定した。細胞によって産生され、培地中に分泌される抗体の濃度を、定量 E L I S A ( B e t h y l l a b o r a t o r i e s ) で6日目に決定した。エラーバーは、標準偏差を示す。p T F および r H S A の組み合わせを有する抗体の産生は、DMEM / F 1 2 ならびに 1 0 % の

40

50

FBSの産生に類似した。

#### 【0431】

考察：図13は、イネ由来組換えヒト血清アルブミンが、細胞の成長および生産性を著しく高めるように、血漿由来トランスフェリンと相乗的に作用することができたことを示す。比較して、血漿由来血清アルブミンは、類似した刺激効果を発揮できなかった。具体的には、本実験は、イネ由来ヒト血清アルブミンの相乗的特性が、同様に、血漿由来または組換え体のいずれかであったトランスフェリン関連タンパク質を伴って効果的であることを確認する。

実施例19：インスリン関連成長因子-1との組み合わせで細胞成長を刺激するイネ由来組換えアルブミンの能力の評価

#### 【0432】

植物由来ヒト血清アルブミン(Cellastim)の独特な性状が、成長因子IGF-1等の他の細胞培養成分の活性を促進しながら成長にプラスの影響を与え得るかを調査するために、さらなる実験を実行してこの可能性を評価した。

#### 【0433】

方法：CHO K1系列のDP12クローン1934(ATCC#CRL-12445)を、先に説明したように、0.5%のFBS、1μMのメトトレキサート、50μg/mLのペニシリン/ストレプトマイシン、1mMのGlutamax(Invitrogen)で補充したSAC325PF無タンパク質CHO培地中に維持した。植物由来組換えヒト血清アルブミン(rHSA)(実施例3および5)ならびに組換えインスリン関連成長因子1(IGF1)(Ajinomoto)の成長および生産性増強効果を、単独または組み合わせで検査した。細胞を200nMのメトトレキサート、50μg/mLのペニシリン/ストレプトマイシンを含有する325PF CHO培地中で2回洗浄し、同一の培地中で、1mL当たり $1.5 \times 10^5$ の細胞で4mLの振盪バッチ培養物に播種した。4mLの振盪培養物を、rHSAもしくはIGF-1または2つの添加物の多様な混合物の多様な濃度でさらに補充した。rHSAまたはIGF-1が添加されていない対照培養を基準として使用した。全ての培養条件を二重に実行した。Guava PCA細胞計数器(Guava Technologies)を介して、14日間のバッチ期間、生存細胞の濃度を毎日決定した。培養の6日後に、対数期成長を細胞の相対的増殖によって判断した。全ての培養物を、加湿環境下で、37℃、6%のCO<sub>2</sub>で成長させた。表E17は、実験の結果を示す。ここで、観察された効果を正味の生存細胞濃度(観察ベースの培地)として計算し、予測効果を個々の成分の効果の合計として計算した。

#### 【表E17】

表E17			
	1 mL当たりの 生存細胞 10e5	観察された効果 (細胞計数-基準)	予測された効果
添加物なし (基準)	3.3	0.0	
HSA 0.5 g/L	7.3	4.0	
HSA 1 g/L	7.9	4.6	
IGF-1 30 nm	12.0	8.7	
HSA 0.5 g/L + IGF-1 30 nM	23.5	15.6	12.7
HSA 1 g/L + IGF-1 30 nM	25.6	13.6	13.3

#### 【0434】

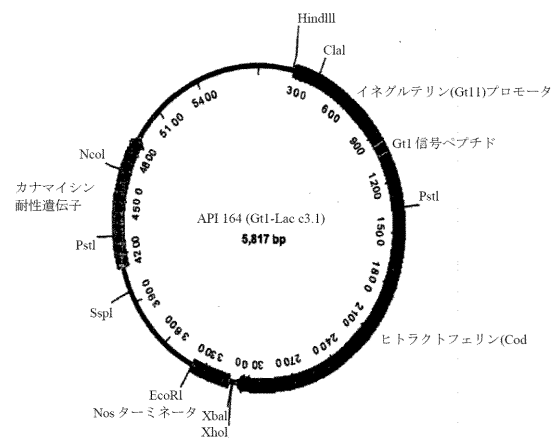
結果および考察：表E17は、イネ由来組換えヒト血清アルブミンが、細胞の成長および生産性を著しく高めるように、組換えIGF-1と相乗的に作用することができたことを示す。比較して、組換えアルブミンは、インスリンと相乗的に作用することができず(表E15)、相乗作用は、全ての細胞培養成分における一般的効果ではないことを示唆した。具体的には、本実験は、イネ由来ヒト血清アルブミンの相乗的特性が、同様に、IG



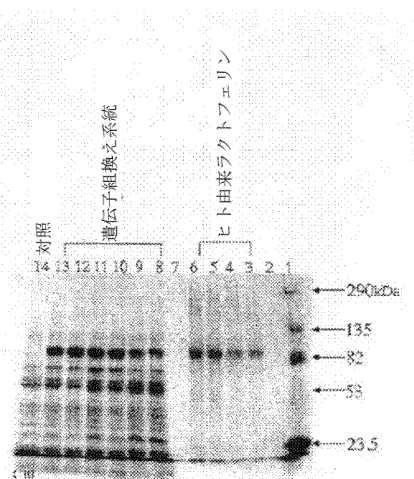
【 図 1 D 】

[illegible]

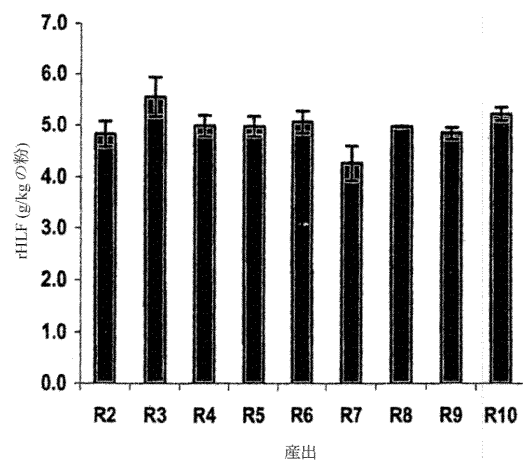
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



## 【図 5 A】

10 20 30 40  
ATG GCA TCC ATA AAT CCG CCC ATA GTT TTC TTC ACA GTT TGC TTG  
M A S I N R F I V F F T V C L>  
\_ \_ \_ \_ \_ GT1 SP \_ \_ \_ \_ \_>

50 60 70 80 90  
TTC CTC TTG TGC GAT GGC TCC CTA GCC GAC GCC CAC AAG AGC GAG  
F L L C D G S L A>  
\_ \_ \_ \_ \_ GT1 SP \_ \_ \_ \_ \_>

100 110 120 130  
GTG GCC CAC CGC TTC AAG GAC CTC GGC GAG GAG AAC TTC AAG GCC  
V A H R F K D L G E E N F K A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

140 150 160 170 180  
CTC GTG CTC ATC GCC TTC GCC CAG TAC CTC CAG CAG TGC CCG TTC  
L V L I A F A Q Y L Q Q C P F>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

190 200 210 220  
GAG GAC CAC GTG AAG CTC GTG AAC GAG GTG ACC GAG TTC GCC AAG  
E D H V K L V N E V T E F A K>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

230 240 250 260 270  
ACC TGC GTG GCC GAC GAG AGC GCC GAG AAC TGC GAC AAG AGC CTC  
T C V A D E S A E N C D K S L>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

280 290 300 310  
CAC ACC CTC TTC GGC GAC AAG CTC TGC ACC GTG GCC ACC CTC CGC  
H T L F G D K L C T V A T L R>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

320 330 340 350 360  
GAG ACC TAC GGC GAG ATG GCC GAC TGC TGC GCC AAG CAG GAG CCG  
E T Y G E M A D C C A K Q E P>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

370 380 390 400  
GAG CGC AAC GAG TGC TTC CTC CAG CAC AAG GAC GAC AAC CCG AAC  
E R N E C P L Q H K D D N P N>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

410 420 430 440 450  
CTC CCG CGC CTC GTG CGC CCG GAG GTG GAC GTG ATG TGC ACC GCC  
L P R L V R P E V D V M C T A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

## 【図 5 B】

460 470 480 490  
TTC CAC GAC AAC GAG GAG ACC TTC CTC AAG AAG TAC CTC TAC GAG  
F H D N E E T F L K K Y L Y E>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

500 510 520 530 540  
ATC GCC CGC CGC CAC CCG TAC TTC TAC GCC CCG GAG CTC CTC TTC  
I A R R H P Y F Y A P E L L P>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

550 560 570 580  
TTC GCC AAG CGC TAC AAG GCC GCC TTC ACC GAG TGC TGC CAG GCC  
F A K R Y K A A F T E C C Q A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

590 600 610 620 630  
GCC GAC AAG GCC GCC TGC CTC CTC CCG AAG CTC GAC CAG CTC CGC  
A D K A A C L L P K L D E L R>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

640 650 660 670  
GAC GAG GGC AAG GCC TCC AGC GCC AAG CAG CGC CTC AAG TGC GCC  
D E G K A S S A K Q R L K C A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

680 690 700 710 720  
AGC CTC CAG AAG TTC GGC GAG CGC GCC TTC AAG GCC TGC GGC GTG  
S L Q K F G E R A F K A W A V>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

730 740 750 760  
GCC CGC CTC AGC CAG CGC TTC CCG AAG GCC GAG TTC GCC GAG GTG  
A R L S Q R F P K A E C A E V>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

770 780 790 800 810  
TCC AAG CTC GTG ACC GAC CTC ACC AAG GTG CAC ACC GAG TGC TGC  
S K L V T D L T K V H T E C C>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

820 830 840 850  
CAC GGC GAC CTC CTG GAG TGC GCC GAC GAC CGC GCC GAC CTC GCC  
H G D L L E C A D D R A D L A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

860 870 880 890 900  
AAG TAC ATC TGC GAG AAC CAG GAC ACC ATC TCC AGC AAG CTC AAG  
K Y I C E N Q D S I S S K L K>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

910 920 930 940  
GAG TGC TGC GAG AAG CCG CTC CTG GAG AAG TCC CAC TGC ATC GCC  
E C C E K P L L E K S H C I A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

## 【図 5 C】

950 960 970 980 990  
GAG GTG GAG AAC GAC GAG ATG CCG GCC GAC CTC CCG TCC CTC GCC  
E V E N D E M P A D L P S L A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1000 1010 1020 1030  
GCC GAC TTC GTG GAG AGC AAG GAC GTG TGC AAG AAC TAC GCC GAG  
A D F V E S K D V C K H Y A B>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1040 1050 1060 1070 1080  
GCC AAG GAC GTC TTC CTC GGC ATG TTC CTC TAC GAG TAC GCC CGC  
A K D V F L G M F L Y E Y A R>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1090 1100 1110 1120  
CGC CAC CCG GAC TAC TCC GTG GTG CTC CTC CTC CGC CTC GCC AAG  
R H P D Y S V L L L R L A K>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1130 1140 1150 1160 1170  
ACC TAC GAG ACC ACC CTG GAG AAG TGC TGC GCC GCC GCC GAC CCG  
T Y E T T L E K C C A A A D P>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1180 1190 1200 1210  
CAC GAG TGC TAC GCC AAG GTG TTC GAC GAG TTC AAG CCG CTC GTG  
H E C Y A K V F D E F K F L V>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1220 1230 1240 1250 1260  
GAG GAG CCG CAG AAC CTC ATC AAG CAG AAC TGC GAG CTC TTC GAG  
E E P Q N L I K Q N C E L F E>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1270 1280 1290 1300  
CAG CTC GGC GAG TAC AAG TTC CAG AAC GCC CTC CTC CTC GTG CCG TAC  
Q L G E Y K F Q N A L L V R Y>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1310 1320 1330 1340 1350  
ACC AAG AAG GTG CCG CAG GTG TCC ACC CCG ACC CTC GTG GAG GTG  
T K K V P Q V S T P T L V E V>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1360 1370 1380 1390  
TCC CGC AAC CTC GGC AAG GTG GCC AAG TGC TGC AAG CAC CCG  
S R N L G K V G S K C C K H P>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1400 1410 1420 1430 1440  
GAG GCC AAG CGC ATG CCG TGC GCC GAG GAC TAC CTC TCC GTG GTG  
E A K R M P C A E D Y L S V V>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

## 【図 5 D】

1450 1460 1470 1480  
CTC AAC CAG CTC TGC GTG CTC CAC GAG AAG ACC CCG GTG AGC GAC  
L N Q L C V L H E K T P V S D>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1490 1500 1510 1520 1530  
CGC GTG ACC AAG TGC TGC ACC GAG AGC CTC GTG AAC CGC CGC CCG  
R V T K C C T E S L V N R R P>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1540 1550 1560 1570  
TGC TTC TCC GCC CTG GAG GTC GAC GAG ACC TAC GTC CCG AAG GAG  
C F S A L E V D E T Y V P K E>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1580 1590 1600 1610 1620  
TTC AAC GCC GAG ACC TTC ACC TTC CAC GCC GAC ATC TGC ACC CTC  
F N A E T F T F H A D I C T L>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1630 1640 1650 1660  
TCC GAG AAG GAG CGC CAG ATC AAG AAG CAG ACC GCC CTC GTC GAG  
S E K E R Q I K K Q T A L V E>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

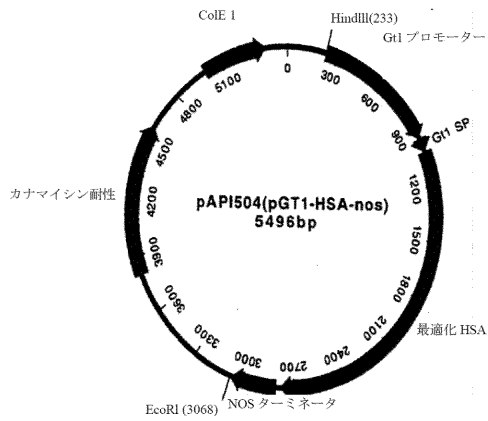
1670 1680 1690 1700 1710  
CTC GTG AAG CAC AAG CCG AAG GCC ACC AAG GAG CAG CTC AAG GCC  
L V K H K P K A T K E Q L K A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1720 1730 1740 1750  
GTG ATG GAC GAC TTC GCC GCC TTC GTG GAG AAG TGC TGC AAG GCC  
V M D D F A A F V E K C C K A>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

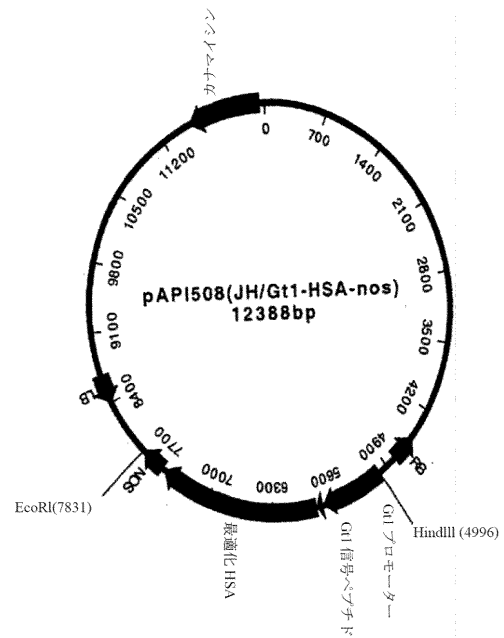
1760 1770 1780 1790 1800  
GAC GAC AAG GAG ACC TGC TTC GCC GAG GAG GCC AAG AAG CTC GTG  
D D K E T C F A E E G K K L V>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

1810 1820 1830  
GCC GCC AGC CAG GCC GCC CTC GGC CTC TGA  
A A S Q A A L G L \*>  
\_ \_ \_ \_ \_ 最適化 HSA \_ \_ \_ \_ \_>

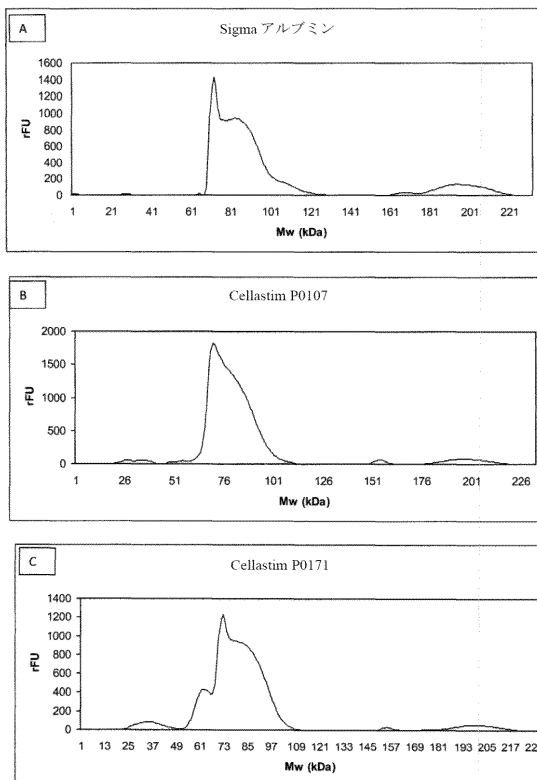
【 図 6 】



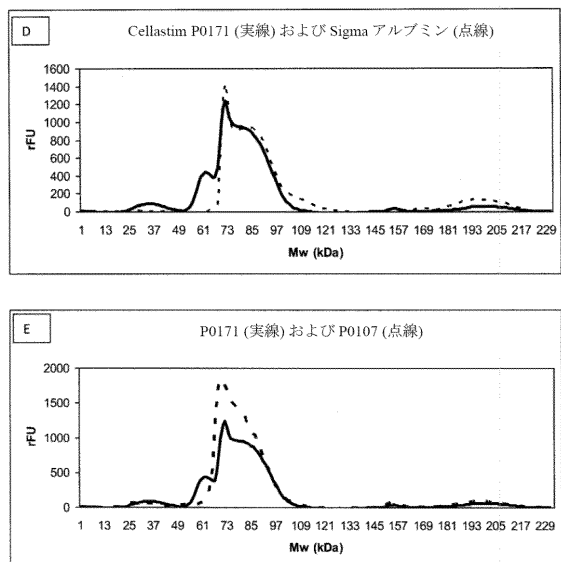
【 図 7 】



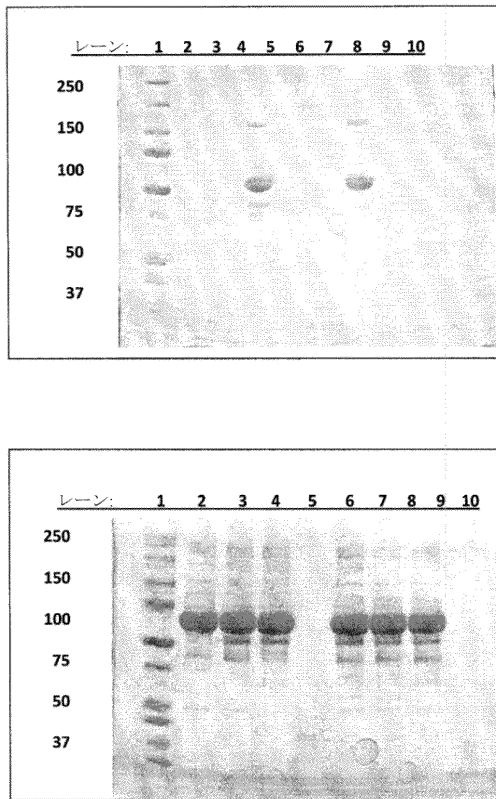
【 図 8 】



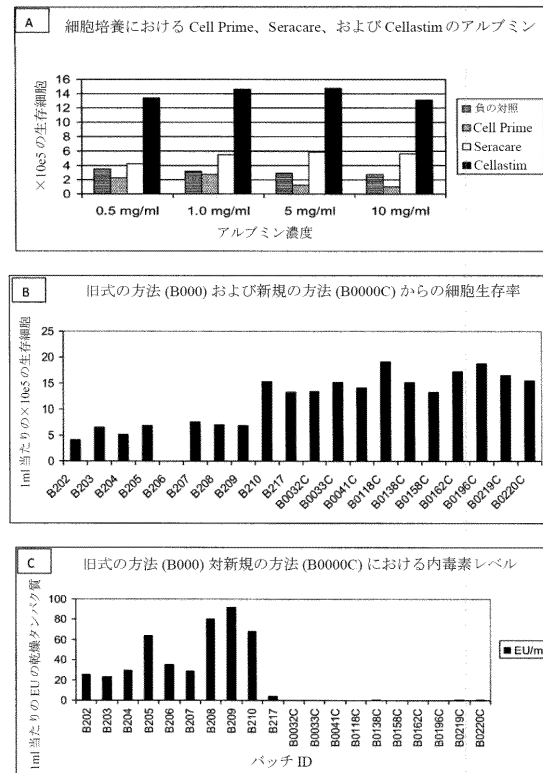
【 図 8 ( I I ) 】



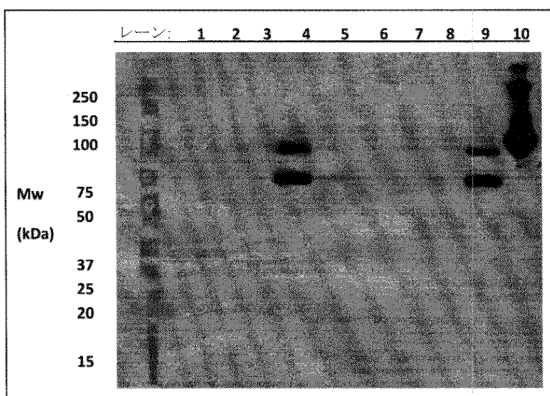
【図 9】



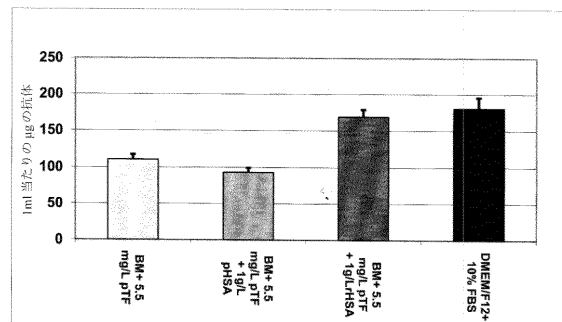
【図 10】



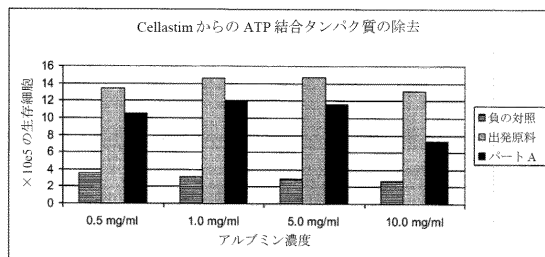
【図 11】



【図 13】



【図 12】





【配列表】

2012518409000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年11月9日(2011.11.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表



【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012518409000001.app

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2010/024626</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 5/02(2006.01)i, C07K 14/76(2006.01)i, C07K 14/79(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/02; A01N 63/00; C12N 5/06; A01N 65/00; C12P 21/02; C12N 5/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & PubMed Keywords: recombinant albumin, plant, cell proliferation, heat shock protein		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nature, 22 May 2008, Vol. 453, pp.519-523. See page 519 right column last paragraph and Fig. 1	1-32
Y	US 6733746 B2 (DALEY JOHN P. et al.) 11 May 2004 See claims 8,9	1-32
Y	WO 2007-002762 A2 (VENTRIA BIOSCIENCE et al.) 04 January 2007 See abstract and examples 3,7-9	1-32
Y	Nature Cell Biol. Sep. 2001, Vol. 3, pp.839-843. See abstract and Fig. 1	13-21,24-32
A	US 2002-0076747 A1 (PAUL J. PRICE et al.) 20 June 2002 See abstract and claims	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 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 25 OCTOBER 2010 (25.10.2010)		Date of mailing of the international search report <b>29 OCTOBER 2010 (29.10.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, KYOUNG MI Telephone No. 82-42-481-8161 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2010/024626**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6733746 B2	11.05.2004	US 2001-0033835 A1 US 2004-0072349 A1 US 2009-028838 A1	25.10.2001 15.04.2004 29.01.2009
WO 2007-002762 A2	04.01.2007	AU 2006-261687 A1 CA 2613697-A1 EP 1896568 A2 EP 1896568 A4 EP 2230311 A1 KR 10-2008-0039885 A KR20080039885A KR20080039885A US 2010-015713 A1 WO 2007-002762 A2 WO 2007-002762 A3 WO 2007-002762 A3	04.01.2007 04.01.2007 12.03.2008 29.04.2009 22.09.2010 07.05.2008 07.05.2008 07.05.2008 21.01.2010 04.01.2007 22.11.2007 04.01.2007
US 2002-0076747 A1	20.06.2002	AU 5734998 A AU 5734998 A CA 2277278-A1 EP 0986635 A1 EP 0986635 A4 JP 2001-508302 A JP 2001-508302 T JP 2001-508302 T US 2002-076747 A1 WO 98-30679 A1 WO 98-30679A1	03.08.1998 03.08.1998 16.07.1998 22.03.2000 07.11.2001 26.06.2001 26.06.2001 26.06.2001 20.06.2002 16.07.1998 16.07.1998

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 スティーブン・シー・ペティ

アメリカ合衆国 8 0 5 2 5 コロラド州フォート・コリンズ、スウィート 1 0 2、マイルストーン・ドライブ 2 1 2 0 番

(72)発明者 メアリー・エイ・フェルナンデス - サントス

アメリカ合衆国 8 0 5 2 5 コロラド州フォート・コリンズ、スウィート 1 0 2、マイルストーン・ドライブ 2 1 2 0 番

(72)発明者 ニン・ファン

アメリカ合衆国 8 0 5 2 5 コロラド州フォート・コリンズ、スウィート 1 0 2、マイルストーン・ドライブ 2 1 2 0 番

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA01 CA04 DA01 EA04 GA11 HA06

4B065 AA91X AB01 AC14 AC20 BA02 BB34 BB40 BC01 CA24