

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6282467号
(P6282467)

(45) 発行日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)

(24) 登録日 平成30年2月2日 (2018. 2. 2)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02 A
C O 7 K 14/745 (2006. 01)	C O 7 K 14/745

請求項の数 6 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2013-532180 (P2013-532180)	(73) 特許権者	511031755
(86) (22) 出願日	平成23年10月5日 (2011. 10. 5)		ノヴォ・ノルディスク・ヘルス・ケア・ア ーゲー
(65) 公表番号	特表2013-538588 (P2013-538588A)		スイス・CH-8050・チューリッヒ・ サーガウアーシュトラッセ・36/38
(43) 公表日	平成25年10月17日 (2013. 10. 17)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/067372	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開番号	W02012/045769		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開日	平成24年4月12日 (2012. 4. 12)	(74) 代理人	100110364
審査請求日	平成26年10月3日 (2014. 10. 3)		弁理士 実広 信哉
審判番号	不服2016-11710 (P2016-11710/J1)	(74) 代理人	100133400
審判請求日	平成28年8月4日 (2016. 8. 4)		弁理士 阿部 達彦
(31) 優先権主張番号	61/392, 713	(72) 発明者	ヤルノ・ロビン
(32) 優先日	平成22年10月13日 (2010. 10. 13)		デンマーク・DK-2880・ハウスベア ・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ ノルディスク・アー／エス内
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	10186545. 9		
(32) 優先日	平成22年10月5日 (2010. 10. 5)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 タンパク質を生産するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

懸濁物中の細胞培養物の連続灌流培養によって、止血タンパク質を生産するための方法であって、

前記細胞培養物が、前記培養物の懸濁物中に前記止血タンパク質を発現し、

前記細胞培養物が、フィルターモジュールを通過して流動し、前記フィルターモジュールが、回収ポートに通じ、前記フィルターモジュールが、前記止血タンパク質の通過を可能とする 0 . 1 から 2 . 9 μ m までのメッシュサイズを有し、

前記フィルターモジュールを通過する前記流動が、交互のタンジェンシャルフローであり、

前記細胞の濃度が、 8×10^6 細胞 / ml 未満に維持され、

前記止血タンパク質が、第 I X 因子である、

方法。

【請求項 2】

大規模発酵（少なくとも 500 L）において行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記灌流の速度が、1 日当たり 0 . 7 から 10 容量までである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ろ過されていない細胞培養物の懸濁物が、1 日当たり 0 から 0 . 5 容量の速度で取り除

かれる、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ろ過されていない細胞培養物の懸濁物が、1 日当たり 0 . 0 1 から 0 . 2 容量の速度で取り除かれる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ろ過されていない細胞培養物の懸濁物が、連続的にまたは不連続的に取り除かれる、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、懸濁物中の細胞培養物の連続灌流培養によって、止血タンパク質を生産するための方法に関し、前記細胞培養物が、前記培養物の懸濁物中に前記止血タンパク質を発現し、前記細胞培養物が、フィルターモジュールを通過して流動し、前記フィルターモジュールが、回収ポートに通じ、前記フィルターモジュールが、前記止血タンパク質の通過を可能とする 0 . 1 から 2 . 9 μ m までのメッシュサイズを有し、且つ前記フィルターモジュールを通過する前記流動が、交互のタンジェンシャルフローである。本発明はまた、本発明の方法によって生産されるタンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

止血タンパク質は、凝固カスケードの構成要素である。これらのタンパク質のいずれか一つの欠乏は、健康上の合併症から生命を脅かす疾患までに及ぶ。これらのタンパク質の欠乏は、動物源由来の止血タンパク質の供給によって初期には治療されていた。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2006 / 0166915 号公報

【特許文献 2】国際公開第 2004 / 000366 号公報

【特許文献 3】米国特許出願公開第 2009 / 0130060 号公報

【特許文献 4】国際公開第 2006 / 018204 号公報

【特許文献 5】国際公開第 2009 / 130198 号公報

30

【特許文献 6】米国特許第 4 , 770999 号公報

【特許文献 7】米国特許出願公開第 20100120094 号公報

【特許文献 8】国際公開第 97 / 43436 号公報

【特許文献 9】国際公開第 88 / 08035 号公報

【特許文献 10】国際公開第 87 / 04187 号公報

【特許文献 11】国際公開第 90 / 02175 号公報

【特許文献 12】米国特許出願公開第 20050227913 号公報

【特許文献 13】欧州特許出願公開第 1707634 号公報

【特許文献 14】米国特許第 6 , 544 , 424 号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

典型的には、組換え止血タンパク質が、連続灌流発酵方法または繰り返されるバッチ発酵方法のいずれかによって生産されている。これらの発酵方法は、質の高い生成物をもたらす。しかしながら、質的水準を低下させることなく、より大量の生成物を生産する方法を提供する継続的な必要性が存在する。本発明は、そのような方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0005】

したがって、本発明の第一の態様は、懸濁物中の細胞培養物の連続灌流培養によって、止血タンパク質を生産するための方法を提供し、前記細胞培養物が、前記培養物の懸濁物

50

中に前記止血タンパク質を発現し、前記細胞培養物が、フィルターモジュールを通過して流動し、前記フィルターモジュールが、回収ポートに通じ、前記フィルターモジュールが、前記止血タンパク質の通過を可能とする0.1から2.9 μm までのメッシュサイズを有し、且つ前記フィルターモジュールを通過する前記流動が、交互のタンジェンシャルフローである。前記フィルターモジュール内に含有される前記メッシュのサイズが、前記止血タンパク質を前記フィルターモジュールに通過させるが、前記細胞または細胞残屑を通過させないことを可能とする。

【0006】

本発明の第一の態様の方法は、従来的に使用されている方法より、顕著に高い力価で、質の高い止血タンパク質の生産を可能とする。

10

【0007】

さらに、増殖を損なうことのないより高い力価、生産性、および生成物の質という利点は、実験室規模の発酵（約5 L）から大規模発酵（少なくとも500 L）まで得られる。本発明は、生成物の質を損なうことのない、従来技術の方法の最大10倍の量の、所望のタンパク質の生産を可能とする。

【0008】

本発明は、処理パラメータの慎重な制御を可能とし、バイオリアクターの物理特徴内において、高濃度で質の高い生成物をもたらすために、ある特定の細胞の密度で、方法を実行することを可能とする。

【図面の簡単な説明】

20

【0009】

【図1】出液（bleed）を伴って行われるATFを使用する、実験室規模およびパイロットプラント規模（>500 L）での、第IX因子に関する生細胞の濃度および生存率を示す図である。

【図2】第IX因子に関する従来方法（「半連続方法」）とATF方法との間における、大規模（>500 L）の収量比較（相対的尺度における）を示す図である。

【図3】出液を伴わずに行われるATFを使用する、実験室規模での、第IX因子の細胞株に関する生細胞の濃度および生存率を示す図である。

【図4】ATFを使用する、実験室規模での、第VII因子に関する生細胞の濃度および生存率を示す図である。

30

【図5】ATFを使用する、実験室規模での、第VII因子に関する生細胞の濃度および生存率を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の方法では、前記止血タンパク質は、好ましくは、第VII因子（FVII）、第VII因子（FVII）または第IX因子（FIX）のうちの一つである。当該技術分野においては、前記止血タンパク質、例えばFVII、FVIIおよびFIXの生産を記載する多数の文献が存在する。細胞株、細胞培養物およびタンパク質生産技術は、周知であり、FVIIについては特許文献1および特許文献2、FVIIおよびFIXについては特許文献3および特許文献4、FIXについては特許文献5および特許文献6、ならびにFVIIについては特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11、特許文献12および特許文献13等の文献に記載されている。これらの文献の全てが、参照によって援用され、止血タンパク質生産に関する周知の原理を記載しており、これらの方法の工程を、本発明によって使用することができる。本発明によって組換え的に前記タンパク質を生産するために、培養時に（適当な条件下で）前記タンパク質を発現する細胞株が使用される。そのような細胞株（FVII、FVIIまたはFIX等の止血タンパク質をコードする組換え核酸を含む）、例えばベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、不死化ヒト細胞（例えばPER.C6細胞）を含むヒト細胞、ラット細胞およびマウス細胞は、当該技術分野において既知である。本発明によれば、前記細胞培養物は、好ましくは、培養物中に目的の止血タンパク質を発現するチャイニーズハムスター卵巣

40

50

(CHO)細胞株の培養物である。より好ましくは、前記培養物はCHO-K1細胞株である。

【0011】

前記細胞培養物は、懸濁物中に存在する。前記培養物および目的のタンパク質の組換え生産に有用な培地の例は、周知である。好適な例は、上述の特許出願を含む従来技術、およびこの文献の実施例の節において、見出すことができる。

【0012】

本発明は、細胞を培養するための連続灌流方法である。細胞を培養するための灌流方法という用語は、当該技術分野における従来の意味を有しており、培養中に、分離装置によって細胞が保持されることを意味する。すなわち、分離前よりも低い細胞の密度を有する（前記培養物からの）液体の流出が存在し、細胞培養培地の（前記培養物への）流入が存在する。本発明は、所望のタンパク質の生産に関する。前記方法から回収される清澄化された液体は、前記細胞培養物と同じ範囲の所望のタンパク質の濃度を有する。本発明では、前記細胞培養培地の少なくとも一つの成分が連続的に添加されることが好ましい。前記培地の他の成分を、連続的に、半連続的に、またはその他の様式で添加しても良い。

【0013】

本発明に係る分離装置は、フィルターモジュールである。前記フィルターモジュールは、好ましくは、管状膜の形態の中空繊維フィルターである。そのようなフィルター/膜は、当該技術分野において広く知られており、例えばGeneral Electric（以前はAmershamであった）から入手することができる。前記フィルターは、前記メッシュサイズが0.1から2.9 μmまでとなるように選択される。このメッシュサイズは、細胞残屑が前記フィルターを通過することをできる限り防止するために選択されるため、このことは、本発明の重要な特徴である。本発明に従って使用するための好ましいフィルターは、PS（ポリスルホン）またはPES（ポリエーテルスルホン）から作製されるフィルターを含む。

【0014】

交互のタンジェンシャルフロー（ATF）が、2000年というかなり前から記載されている。ATFシステムは、一般的に、任意の種類のバイオリアクター（ステンレス鋼、ガラス、単回使用バイオリアクター等）と連結することができる（上述のような）前記フィルターに加えて、ダイアフラムから構成される。前記フィルターのポアサイズを変化させることによって、生産される生成物を、前記バイオリアクター内に高度に濃縮する（up-concentrated）ことができるか、または連続的に取り出すことができる。ATFは、前記フィルターモジュールにおいて発生する交互のタンジェンシャルフローが存在すること、すなわち、前記フィルターモジュールの膜の表面と同じ方向の（すなわち、接線方向の）ある流動が存在すること、および前記フィルター表面と実質的に垂直の方向の別の流動が存在することを意味する。タンジェンシャルフローは、その内容が参照によって援用される特許文献14に記載されるもののような、当該技術分野において既知の方法によって得ることができる。

【0015】

好ましいバイオリアクターは、出液ポート、ATFポート（回収ポート）、培地ポート、塩基ポート、気体ポート、および他の添加のための更なるポートを備える古典的な攪拌型バイオリアクター装置である。

【0016】

他の方法を使用して生産される物質は、顕著に低い収量、例えば1日生産レベルもしくは容量生産レベルまたはバルク生成物濃度を有するので、他の方法で生産した場合と同様の質（例えば、GLAプロファイル、または活性化形態、またはグリコールプロファイル、または重鎖等の質）を有する止血タンパク質を生産するための方法に、ATFを使用することができることは、従来は考えられていなかった。

【0017】

前記システムのパラメータは、一般的に、当該技術分野において記載されるようなものである。前記細胞培養培地のpH、温度、溶存酸素濃度、浸透圧は、原理上重要ではなく

10

20

30

40

50

、選択される細胞、および生産される生成物に依存する。前記パラメータは、生成物の質および量を最大化するために変化させることができる。バランスが通常は必要とされる。本発明によれば、前記灌流の速度は、好ましくは1日当たり0.7から10容量まで、より好ましくは1日当たり0.9から4容量までである。

【0018】

前記方法は、回収される液体の体積と前記培養物に添加される液体の体積とのバランスをとることを目的として、ろ過されていない細胞培養物の懸濁物を取り除くために「出液」させても良い。この出液の速度は、変化させることができる。前記ろ過されていない液体は、好ましくは、1日当たり0から0.2容量（前記方法の総体積）の速度で前記方法から取り除かれる。前記ろ過されていない細胞培養物の懸濁物を、前記方法から連続的に取り除いても良い（連続出液）。別法として、前記ろ過されていない細胞培養物の懸濁物を、前記方法から不連続的に取り除いても良い（パルス出液）。第IX因子に関しては、好ましい出液の速度は、1日当たり0.01から0.2容量（前記方法の総体積）である。この出液は、以下に示すように、例えば80%を超える高い細胞生存率を維持するために、生産段階中に適用される。

【0019】

所望の止血タンパク質は、前記回収ポートを介して前記システムから回収される。所望の止血タンパク質は、最も好ましくは、下流処理において精製される。複数の下流処理工程を、組み合わせても良い。本発明のタンパク質の典型的な下流処理が、上記参照される特許出願を含むこれらの従来技術等の当該技術分野において、記載されている。本発明の方法では、前記フィルターモジュールを通過する液体は、所望のタンパク質を含有し、このタンパク質は、前記フィルターを通過することによって、懸濁物の培養物中の前記細胞および細胞残屑から分離される。この液体は、清澄化され、ろ過される懸濁物であり、この懸濁液は、前記生産された止血タンパク質を含有する。前記ろ過される懸濁物は、好ましくは、1日当たり0.7から10容量（前記方法の総体積）まで、好ましくは1日当たり0.7から1.0容量、または0.8から1.4容量、または1.0から1.2容量の速度で回収される。

【0020】

前記方法の生産性は、前記方法のパラメータにある程度依存し、さもなければ、前記止血タンパク質を分泌する（exposing）細胞クローンに依存する。本発明の利益は、同じ細胞クローンを使用する非ATF方法における生産量と比較して、より大きな生産量である。

【0021】

開始時および前記方法の実施中における前記細胞の生存率は、80%より大きく、好ましくは90%より大きいべきである。前記細胞の生存率は、前記方法の実施中に測定されるべきであり、前記細胞の生存率が所望のレベル未満に低下したならば、全ての培養物において同様に条件が調節される。

【0022】

前記細胞の密度は変化し得る。好適な接種量は、 $3 \sim 6 \times 10^5$ 細胞/mlの範囲である。

【0023】

前記培養物中の標的となる細胞の密度は、 80×10^6 細胞/ml未満である。より高い細胞の密度は、より低い生成物の量および/または質をもたらす。FIXに関する一つの好ましい実施形態では、前記培養物中の前記細胞の密度は、 8×10^6 細胞/ml未満である。

【0024】

前記懸濁物の温度は、好ましくは、約35.5から37.5、最も好ましくは約36.5に維持される。前記懸濁物のpHは、好ましくは、約 6.95 ± 0.45 に維持される。

【0025】

前記懸濁物中の溶存酸素の濃度は重要である。好ましくは、前記懸濁物中の溶存酸素の濃度は、約 20 から 120 %、好ましくは約 30 から 70 %、好ましくは約 45 から 55 %、好ましくは約 50 % である。曝気は、任意の手段によって達成することができる。典型的且つ好ましい手段は、ヘッドスペースに一定の空気流を保持した状態での、スパーージャによる、空気と酸素との混合物、好ましくは 100 % の酸素を使用する曝気を含む。

【0026】

特に、本発明は、第 V I I 因子タンパク質または第 V I I I 因子タンパク質または第 I X 因子タンパク質を生産するための、請求項 1 に記載の方法に関する。

【0027】

本発明の第二の態様は、本発明の第一の態様に係る方法によって生産される F V I I タンパク質、F V I I I タンパク質または F I X タンパク質を提供する。第一の態様の全ての好ましい特徴は、また、第二の態様に適用される。

【0028】

止血タンパク質は当該技術分野において既知であるため、前記タンパク質の質は、そのタンパク質に関する基準に従って測定することができる。F V I I および F I X の質の測定は、通常、G L A プロファイル (G l a 1 0 から G l a 1 2) に関する。F V I I I の質の測定は、通常、重鎖および軽鎖 (heavy and light claims) の組合せに関する。

【実施例】

【0029】

実施例 1

実施例 1 は、5 L バイオリアクター (実験室規模) での A T F 灌流装置において、本発明の方法を使用して行われる、第 I X 因子タンパク質に関する培養を記載する。前記培養は、A T F 灌流装置を使用して実施した。前記培養は、安定な細胞の密度、生存率、および生成物の収量をもたらした。出液の範囲は、0 から 20 % まで変化させた。

【0030】

前記生成物の質に関しては、活性化型 F I X (「 F I X a 」) は、前記方法において安定且つ小量に維持される。G L A 1 1 および G L A 1 2 に関する G L A プロファイル (F I X のグルタミン酸に富む - カルボキシグルタミン酸ドメイン) は、F I X の濃度が増大するにつれて、90 ~ 95 % から 80 ~ 85 % まで僅かに減少した。到達した F I X の収量は、使用した現行の従来技術 (非 A T F) 方法の約 10 倍であり、生成物の質を損な

【0031】

菌株の詳細

細胞型は、F I X を発現する C H O - K 1 株である。

【0032】

培地：

使用した培地は、細胞の増殖および生成物の産生を支持する市販の培地であった。そのような培地には、通常、インスリン、ビタミン K 1、グルタミンおよびグルコースが添加される。

【0033】

方法の概略

F I X の培養のための方法の後に、本発明に係る A T F 方法を設定した。前記方法は、細胞バンクのバイアルを解凍すること、および T - フラスコまたは低撹拌 (< 30 r p m) を伴う振とうフラスコへの細胞の移行を含んでいた。5 L バイオリアクターに接種するために、十分な細胞がもたらされるまで、細胞増殖を振とうフラスコにおいて行った。全ての方法工程で、前記細胞は、無血清培地中の懸濁物において培養される。前記バイオリアクターでは、最初の 2 ~ 3 日間、バッチモードで培養を行った。灌流、パルスおよび回収を開始するための前記基準が満たされると、培地を連続的に供給した。グルタミンおよびグルコースを、一度にまたは連続的に (必要に応じて) 添加した。回収物を、遠心分離および / またはろ過によって G M O 清澄化し、一次回収物に移した。

【 0 0 3 4 】

バイオリアクターのパラメータ：5 LのB i o s t a t B p l u sの準備および試験タンクを組み立てる前に、p H電極を、4 . 0 緩衝液および7 . 4 緩衝液を用いて校正し、7 . 0 緩衝液を用いて検査した。前記タンクは、P B S (9 . 6 g / l) と共に滅菌し、P B S を、その後、培地と交換した。酸素電極を、P B S 溶液中の窒素 (0 %) および空気 (1 0 0 %) を用いて校正した。

【 0 0 3 5 】

前記p H電極を、外部のp H測定値に対して最終的に再校正した。タンク、配管およびフィルターを、漏れに関して試験した。

【 0 0 3 6 】

方法操作条件

前記方法のパラメータの設定点を、以下の表 1 に特定されるように調節した。

【 0 0 3 7 】

【表 1】

表 1 : 5 L の B i o s t a t B p l u s に関する方法操作条件

パラメータ	単位	設定点
温度	℃	3 4 ~ 3 8
p H		6 . 7 ~ 7 . 5
DOT (溶存酸素圧)	空気飽和の%	1 0 ~ 9 0
攪拌速度	r p m	1 0 0 ~ 1 5 0
実効体積	L	4
塩基 (p H 制御用の炭酸ナトリウム)	M	1 ~ 3
CO ₂ (ヘッドスペース)	NA	必要に応じて
O ₂ または空気または混合物 (スパージ)	%	0 ~ 1 0 0 %

【 0 0 3 8 】

接種

播種する細胞の濃度は、 $3 \sim 6 \times 10^5$ 細胞 / m l の範囲を標的とした。塩基は、接種の 2 日後まで接続した。

【 0 0 3 9 】

増殖期

前記細胞の濃度が実験的増殖期に到達した際に、灌流および出液を開始した。出液 / 回収の速度の比率は、1 0 / 9 0 (%) であった。回収ボトルは、培養中、毎日交換した。

【 0 0 4 0 】

前記細胞の濃度が細胞の濃度の標的 (6×10^6 細胞 / m l) より高くなると直ぐに、パルス出液ストラテジーを適用した。前記細胞の濃度に応じて、前記パルス出液の量を、前記バイオリアクターの実効体積の 0 から 2 0 % まで変化させた。

【 0 0 4 1 】

回収速度は、一定に維持し、毎日検査した。

【 0 0 4 2 】

回収

前記細胞培養物を、前記タンクからブルーキャップフラスコへと回収した。前記培養物を、0 . 2 2 μ m のフィルターを使用して滅菌ろ過した。約 1 L の回収物を、滅菌バッグ中に移し、凍結した。

【 0 0 4 3 】

結果

前記細胞の濃度は、約 $7 \sim 8 \times 10^6$ 細胞 / m l で安定なままであった。

【 0 0 4 4 】

生存率は、前記培養に対して約 8 5 % および 9 0 % に維持された。これは、約 0 . 0 7

10

20

30

40

50

%というF I X a含有量をもたらした。

【 0 0 4 5 】

G L A プロファイルに関しては、G l a - 1 1 および G l a - 1 2 が 8 0 % 超に維持された。

【 0 0 4 6 】

高い生産性および安定な生成物が、また、連続出液内に得られた。

【 0 0 4 7 】

実施例 2

実施例 2 は、大規模 (> 5 0 0 L) での A T F 灌流装置において、本発明の方法を使用して行われる、第 I X 因子タンパク質に関する培養を記載する。大規模での方法 (実施例 2) は、実施例 1 において上述のものと同一菌株、培地、および全体的な方法工程を使用して行った。方法のパラメータ (すなわち、バイオリアクターのパラメータ、操作条件等) に関しては、これらは、また、実施例 1 において上述のものと同様であった。

【 0 0 4 8 】

【表 2】

表 2 : 従来の方法 (「半連続方法」) および A T F 方法についての、実験室規模および大規模での、第 I X 因子に関する生成物の質のデータ

バイオリアクター	方法	G L A 1 1 + 1 2 (%)	F I X a (%)
実験室規模	半連続方法	9 0	~ 0 . 0 3
大規模 (> 5 0 0 L)	半連続方法	9 0 ~ 9 3	0 . 0 2 ~ 0 . 0 6
実験室規模	A T F	8 0 ~ 9 0	0 . 0 6 ~ 0 . 1 3
大規模 (> 5 0 0 L)	A T F	8 7 ~ 9 6	0 . 0 2 ~ 0 . 1 5

【 0 0 4 9 】

結果

表 2 は、生産された第 I X 因子の質が、従来の方法 (「半連続方法」) と比較して A T F 方法を使用した場合も、維持されることを示す。しかしながら、A T F 方法は、はるかに大きな量 / 収量をもたらす (図 2 に示されるように) 。

【図 1】

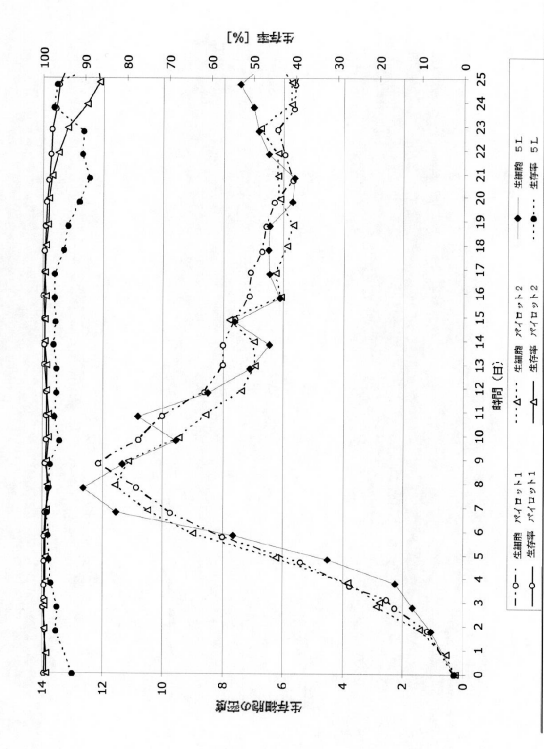


図 1

【図 2】

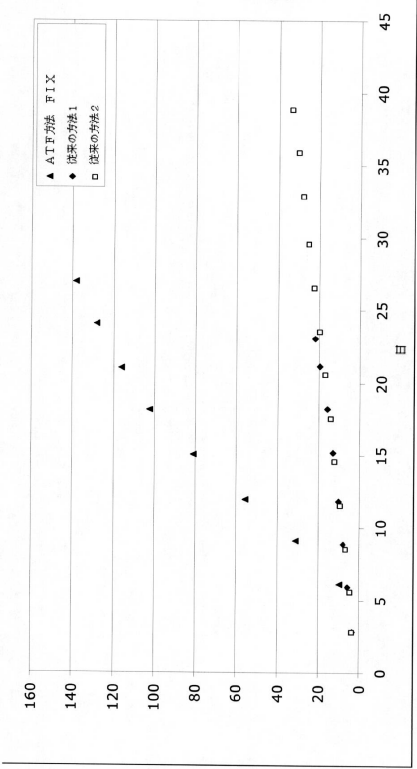


図 2

【図 3】

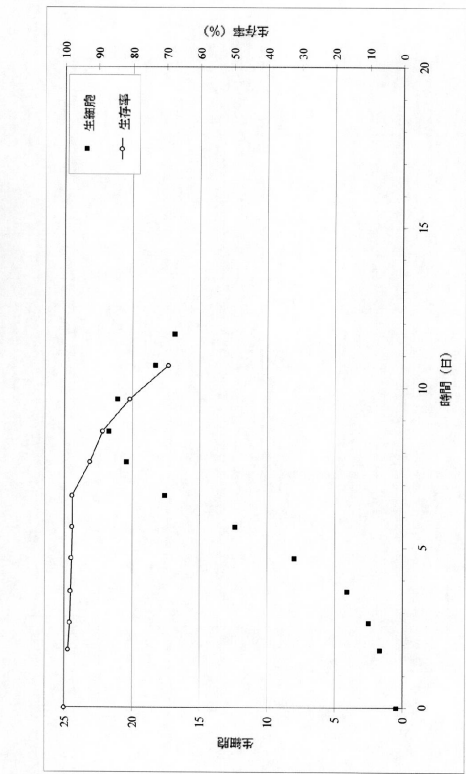


図 3

【図 4】

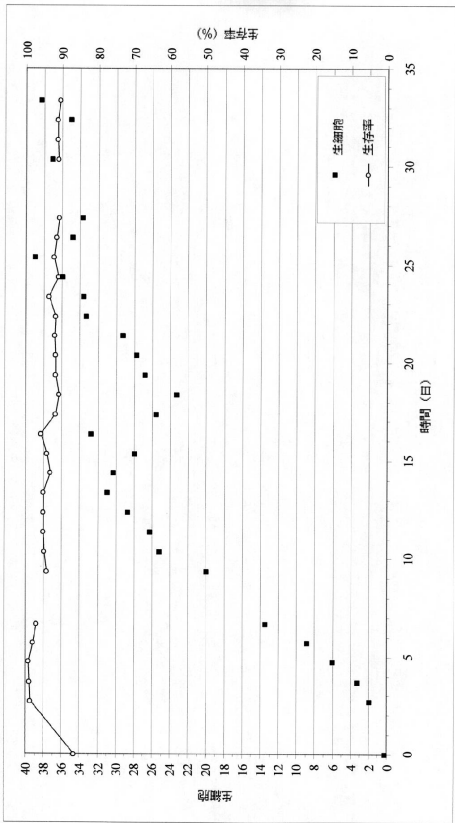


図 4

【図 5】

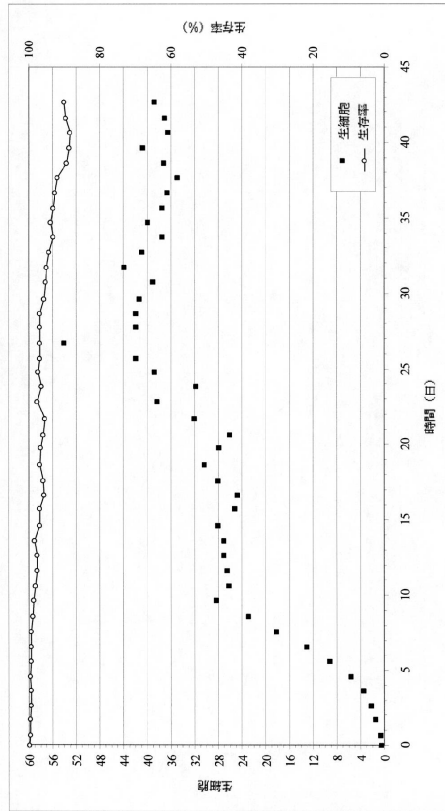


図 5

フロントページの続き

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 松田 芳子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第2010/003759号(WO, A2)

特表2007-525984号(JP, A)

特表2006-525015号(JP, A)

特表2009-535019号(JP, A)

特開平1-101882号(JP, A)

特開平2-53483号(JP, A)

Biotechnol. Bioengg., 2005年, Vol. 90, No. 6, p. 663
- 674

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12M 1/00-3/10

C12P 1/00-41/00

C12N 1/00-5/10

MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)