明 細 書

高濃度アミノ酸含有培地を用いた細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は所望のタンパク質を生産する細胞を培養して当該タンパク質を製造するための方法およびその方法に用いる培地に関する。詳細には、本発明は、所望のタンパク質を生産する細胞を培養して当該タンパク質を製造する方法において、培養液中のセリンを高濃度に維持して培養することを特徴とする無血清培養法及びタンパク質製造方法、並びにこの方法に用いる細胞培養用流加培地に関する。

背景技術

[0002] 動物細胞を培養して該動物細胞の産生する天然型タンパク質を得ようとする場合、あるいは所望のタンパク質をコードする遺伝子を導入した動物細胞を培養して所望のタンパク質等を製造する場合には、塩類、糖類、アミノ酸類、およびビタミン類等の基礎栄養物のほかに、該動物細胞の増殖のために、従来、哺乳動物由来の抽出物、具体的には牛胎児血清などの血清が5～20%の範囲で培地に添加されていたが、かかる哺乳動物由来の血清は、培地のコストの75～95%を占めること、品質にロット間差があるため安定した増殖が得られないという欠点がある。また、哺乳動物由来の血清はオートクレーブ等で滅菌できないので、ウイルス又はマイコプラズマ汚染される可能性があり、その多くは無害であるものの、安定生産という点からは付加的な未知の要因となりうる。

[0003] 近年、哺乳動物由来の成分については、狂牛病(mad cow disease)、ウシ海綿状脳症(Bovine Spongiform Encephalopathy:BSE)、感染性海綿状脳症(Transmissible Spongiform Encephalopathy:TSE)、更にはクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeld-Jakob Disease:CJD)などとの関係が懸念され、安全性の点からこれら哺乳動物由来の成分を含有しない動物細胞培養用培地の出現が望まれている。更に血清には500種以上のタンパク質が含まれており、このため培養培地からの細胞産物である所望のタンパク質の単離、精製を複雑化する。

[0004] 従来、上記のような問題を解決するために、動物細胞を血清の非存在下で培養す

るための無血清培養法の開発が行われている。無血清培養法では、血清の効果を代替する物質としてフェツイン、トランスフェリン、アルブミンなどの血漿タンパク質、ステロイドホルモン、インシュリンなどのホルモン類、増殖因子、アミノ酸、ビタミンなどの栄養因子などを添加した無血清培養液が開発されてきた。

[0005] 無血清培養法で使用される、フェツイン、インスリン、トランスフェリン、増殖因子などは血清由来の純化されたタンパク質もしくは組換え生物由来の組換え体タンパク質の利用がなされている。これらを使用する上で、微量ではあるが、生物由来成分を含む点、高価な製品を使用しなければならない点、ロット間差による培養のばらつきなどの、問題点がある。

[0006] 近年、タンパク質加水分解物を利用した無血清培養法も開発されているが、上記と同じく生物由来成分を含む点、高価である点、ロットの違いによる製造のばらつき、などの問題点があり、有用タンパク質の生産に十分とは言い難い。

[0007] そこで、できるだけ生物由来成分を含まず、安価で、なおかつロット間差が少ないタンパク質産生量を増強する合成培地を使用する培養法が望まれている。近年、流加培養における培養液中のグルコースやアミノ酸の挙動について分析し、流加培養でグルタミン酸を増量することにより、アンチトロンビンの産生量増加に寄与することが明らかとなった(非特許文献1)。しかしながら、これらの知見は、グルタミン合成酵素を発現したCHO細胞によってのみ調べられているため、通常のCHO細胞で検証はされておらず、さらには、他のアミノ酸の個々の効果については不明である。また、タンパク質産生量も、いまだ十分とは言い難い。そこで、さらに産生量を増強する合成培地を使用する培養法が強く熱望されている。

非特許文献1:Journal of Bioscience and Bioengineering (2005), 100(5), 502-510

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、生物由来培地成分を極力排除した培地による流加培養を行う際、培地を改良することにより、細胞にタンパク質を高生産させることを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記のような課題を達成すべく鋭意工夫を重ねた結果、無血清培

養液において枯渇しがちな特定のアミノ酸の濃度を高濃度に維持することにより、細胞にタンパク質を高生産させることができることを見出し、この知見に基き、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

(1)所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において、培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

(2)上記(1)の方法において、さらに少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする方法。

(3)1mM以上のセリンまたはその塩を含有する動物細胞培養用培地。

(4)1mM以上のセリンまたはその塩を含有し、さらに少なくとも、1mM以上のチロシン、及び／又は0．4mM以上のシステインを含有する動物細胞培養用培地。

(5)上記(3)又は(4)に記載の動物細胞培養用培地を用いて所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造することを特徴とする、所望のタンパク質の製造方法。

(6)所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも培養する細胞が十分に増殖できる期間あるいは産生する所望のタンパク質が十分に産生できる期間の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

(7)上記(6)の方法において、さらに少なくとも培養する細胞が十分に増殖できる期間あるいは産生する所望のタンパク質が十分に産生できる期間の一部或いは全ての期間において、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする方法。

(8)所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも細胞の対数増殖期の一部或いは全ての期間で、培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

(9)上記(8)の方法において、さらに少なくとも細胞の対数増殖期の一部或いは全て

の期間で、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする方法。

(10)少なくとも細胞の対数増殖期の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度を2mM以上とする、上記(8)又は(9)の方法。

(11)所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で、培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

(12)上記(11)の方法において、さらに少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする方法。

(13)少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度を2mM以上とする、上記(11)又は(12)の方法。

(14)上記(1)、(2)、(5)～(13)のいずれかの培養方法あるいは製造方法において、細胞を、回分培養法(batch culture)、繰り返し回分培養法(repeated batch culture)、流加培養法(fed-batch culture)、または、繰り返し流加培養法(repeated fed-batch culture)、連続培養法(continuous culture)、灌流培養法(perfusion culture)で培養する、培養方法あるいは製造方法。

(15)細胞を流加培養法で培養する、上記(1)、(2)、(5)～(13)のいずれかの培養方法あるいは製造方法。

(16)セリン及びチロシン及び／又はシステインが、逐次的に複数回、又は連続的に、流加することによって培養液中に供給される、上記(15)の方法。

(17)細胞が所望のタンパク質をコードする遺伝子を導入したものである、上記(1)、(2)、(5)～(16)のいずれかの培養方法あるいは製造方法。

(18)所望のタンパク質が抗体である、上記(17)の方法。

(19)細胞が哺乳動物細胞である、上記(1)、(2)、(5)～(18)のいずれかの方法。

(20)哺乳動物細胞がCHO細胞である、上記(19)の方法。

(21)10mM～1000mMの濃度のセリンを含有する細胞培養用流加培地。

(22)20mM～500mMの濃度のセリンを含有する細胞培養用流加培地。

(23)さらに、システイン及び／又はチロシンが添加されている上記(21)又は(22)の流加培地。

(24)さらに、システイン及びチロシンが添加されている上記(21)又は(22)の流加培地。

(25)上記(21)～(24)のいずれかに記載の流加培地を添加することを特徴とする、培養細胞を流加培養法で培養する方法。

(26)細胞を培養して所望のタンパク質を製造する方法において、培養を上記(1)、(2)、(6)～(20)のいずれかに記載の方法を使用して行うことを特徴とする、タンパク質の製造方法。

(27)上記(5)又は(26)に記載の製造方法で製造されたタンパク質を有効成分とする医薬の製造方法。

発明の効果

[0011] 本発明は、生理活性ペプチドまたはタンパク質の生産に極めて有利に使用できる。本発明の特徴として、生物由来成分を含まない合成培地を用いた培養でタンパク質の生産性を増大させることが可能である。さらに、本発明で使用する流加培地は、極めて純粋なアミノ酸を添加することから、成分組成が明らかでありロット間の差が少ない均一である培地である。そのためより均一なタンパク質が得られる可能性が高く、工業生産に有利な培地である。具体的には例えば、医薬品用抗体などの大量供給に大きく貢献することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]培養期間中の抗体濃度の推移を示す。(実施例1)

[図2]培養期間中の生存率の推移を示す。(実施例1)

[図3]培養期間中の乳酸濃度の推移を示す。(実施例1)

[図4]培養期間中の抗体濃度の推移を示す。(実施例2)

[図5]培養期間中の生存率の推移を示す。(実施例2)

[図6]培養期間中の乳酸濃度の推移を示す。(実施例2)

[図7]培養期間中の抗体濃度の推移を示す。(実施例3)

[図8]培養期間中のセリン濃度の推移を示す。(実施例3)

[図9]培養期間中のチロシン濃度の推移を示す。(実施例3)

[図10]ハムスタータウリントランスポーターのアミノ酸配列及びこれをコードする遺伝子の塩基配列を示す。(参考例1)

[図11]ハムスタータウリントランスポーターの構造を示す。(参考例1)

[図12]発現プラスミドpHyg/TauTの構造を示す。(参考例2)

発明を実施するための最良の形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

[0014] 本発明の方法は、所望のタンパク質を生産する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、培養液中のセリンを高濃度に維持して培養することを特徴とする。具体的には、少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において培養液中のセリンの濃度を1mM以上、好ましくは2mM以上とすることを特徴とする。

[0015] したがって、1mM以上のセリンまたはその塩を含有する動物培養用培地が本発明の一態様である。本発明において、「1mM以上のセリン(またはその塩)を含有する動物培養用培地」とは、初発培地のセリン濃度が1mM以上である培地だけでなく、流加培地などの添加により少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において培養液中のセリンの濃度を1mM以上、好ましくは2mM以上に調製される培地も含まれる。

[0016] さらに、本発明の方法においては、培養液中に、高濃度のセリンに加えて、チロシン及び/又はシステインを補充して培養することを特徴とする。具体的には、少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間で培養液中のチロシンの濃度が1mM以上、及び/又はシステインの濃度が初発培地の濃度以上となるようにする。ここで、初発培地のシステイン濃度が通常0.4mM程度であることから、前記システイン濃度は、初発培地のシステイン濃度に関わらず、少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間で培養液中のシステインの濃度が0.4mM以上、好ましくは1mM以上であってもよい。

[0017] したがって、1mM以上のセリンまたはその塩を含有し、さらに少なくとも、1mM以上のチロシン、及び/又は0.4mM以上のシステインを含有する動物培養用培地も、本発明の一態様である。本発明において、「1mM以上のチロシンを含有する動物

培養用培地」とは、初発培地のチロシン濃度が1mM以上である培地だけでなく、流加培地などの添加により少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において培養液中のチロシンの濃度を1mM以上に調製される培地も含まれる。同様に、「0.4mM以上のシステインを含有する動物培養用培地」とは、初発培地のシステイン濃度が0.4mM以上である培地だけでなく、流加培地などの添加により少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において培養液中のシステインの濃度を0.4mM以上に調製される培地も含まれる。

[0018] このように培養液中のセリン(及びチロシン及び/又はシステイン)の濃度を維持して培養することにより、培養する細胞が十分に増殖できる期間あるいは産生する所望のタンパク質が十分に産生できる期間の少なくとも一部の期間において、培養液中のセリン(及びチロシン及び/又はシステイン)の濃度が所定の濃度以上に維持されることとなり、細胞にタンパク質を高生産させることが可能となるのである。

[0019] このように、所望のタンパク質を産生する細胞を培養する際に、セリン(及びチロシン及び/又はシステイン)の濃度が所定の濃度以上に調製されるような培地を使用して培養することにより当該タンパク質を製造する方法も、本発明の一つの側面となる。したがって、上述の1mM以上のセリンまたはその塩を含有する動物培養用培地を用いて所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造することを特徴とする、所望のタンパク質の製造方法も本発明の一態様である。また、1mM以上のセリンまたはその塩を含有し、さらに少なくとも、1mM以上のチロシン、及び/又は0.4mM以上のシステインを含有する動物培養用培地を用いて所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造することを特徴とする、所望のタンパク質の製造方法も本発明の一態様である。

[0020] 本発明において、上述のように培養液中のセリン(及びチロシン及び/又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に維持する期間としては、増殖期開始時期から終了時期までの一部の期間のみでもよく、あるいは増殖期開始時期から終了時期までの全期間を通じて、あるいは培養期間の全期間を通じて、維持されてもよい。

[0021] ここで、「増殖期開始時期」とは、培養細胞の増殖の誘導期から加速期に移行する時期をいう。その後、加速期から対数増殖期、減速期、停止期、死滅期へと移行する

。(小林　猛、本多裕之　著、「生物化学工学」、東京化学同人、応用生命科学シリーズ8、発刊年「2002年」)

本発明の別の側面において、本発明の培養法では、培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に維持する期間は、培養する細胞が十分に増殖できる期間あるいは産生する所望のタンパク質が十分に産生できる期間の一部或いは全てで維持されていればよく、具体的には、培養する細胞の増殖期開始時期から終了時期までの一部或いは全ての期間で維持されていればよい。特に、培養3日目以降において初発培地中のアミノ酸含量が枯渇していくので、培養3日目以降の一定期間培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上にしておくことが重要である。従って、本発明のこの側面において、さらに具体的には、培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に維持しておく必要のある期間は、少なくとも培養3日目から培養細胞の減速期から停止期に至るまでの期間の一部或いは全期間、好ましくは培養3日目から培養細胞の対数増殖期から減速期に至るまでの期間の一部或いは全期間であればよい。

[0022] さらに具体的な態様としては、培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に維持しておく好ましい期間として、少なくとも細胞の増殖期開始時期(通常は培養1日目頃)の4日後(通常は培養5日後)以降、好ましくは少なくとも増殖期開始時期の3日後(通常は培養4日後)以降，さらに好ましくは少なくとも増殖開始時期の2日後(通常は培養3日後)以降、さらに好ましくは増殖期開始時期以降であればよい。また、培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に維持しておく必要のある期間としては、培養期間が二週間以内の場合、少なくとも培養が終了する5日前まで、好ましくは4日前まで、さらに好ましくは3日前までであればよい。培養期間が二週間を超える場合、少なくとも培養10日目まで、好ましくは培養が終了する5日前まで、より好ましくは培養が終了する4日前まで、さらに好ましくは培養が終了する3日前までであればよい。

[0023] 本発明のさらに別の側面において、培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に連続して維持しておく好ましい期間としては、少

なくとも細胞の対数増殖期の一部の期間であればよい。具体的には、対数増殖期開始時期の4日後以降、好ましくは対数増殖期開始時期の3日後以降，さらに好ましくは対数増殖期開始時期以降である。ここで、「細胞の対数増殖期の一部の期間」とは、対数増殖期の一部の期間のみでもよく、あるいは対数増殖期開始時期から終了時期までの全期間を通じて、あるいは培養期間の全期間を通じて、維持されてもよいという意味である。

[0024] 典型的な細胞培養において、対数増殖期開始時期は、通常は培養3日目頃である。従って、本発明のさらに具体的な態様においては、少なくとも培養3日目以降の一部或いは全ての培養期間で培養液中のセリンの濃度を1mM以上、好ましくは2mM以上とすることを特徴とする。さらに、チロシン及び／又はシステインの濃度も所定の濃度以上とする場合は、少なくとも培養3日目以降の一部或いは全ての培養期間で培養液中のチロシンの濃度が1mM以上、及び／又はシステインの濃度が初発培地の濃度以上となるようにする。ここで、初発培地のシステイン濃度が通常0．4mM程度であることから、前記システイン濃度は、初発培地のシステイン濃度に関わらず、培養3日目以降の一部或いは全ての培養期間で培養液中のシステインの濃度が0．4mM以上、好ましくは1mM以上であってもよい。

[0025] 本発明における「少なくとも培養3日目以降の一部或いは全ての培養期間」とは、培養4日目、5日目、6日目或いは7日目以降の培養期間などでもよく、逆に培養開始時、培養1日目或いは2日目以降で培養3日目以降の一部或いは全ての培養期間が含まれている培養期間であればよい。

[0026] さらに、培養期間が二週間以内の場合、培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に連続して維持しておく好ましい期間としては、少なくとも培養が終了する5日前まで、好ましくは4日前まで、さらに好ましくは3日前までであればよい。培養期間が二週間を超える場合、少なくとも培養10日目まで、好ましくは培養が終了する5日前まで、より好ましくは培養が終了する4日前まで、さらに好ましくは培養が終了する3日前までであればよい。

[0027] 従って、本発明のさらに別の態様では、少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度を1mM以上、好ましくは2mM以上とすることを

特徴とする。さらに、チロシン及び／又はシステインの濃度も所定の濃度以上とする場合は、少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で培養液中のチロシンの濃度が1mM以上、及び／又はシステインの濃度が初発培地の濃度以上となるようにする。初発培地のシステイン濃度が通常0．4mM程度であることから、前記システイン濃度は、初発培地のシステイン濃度に関わらず、培養3～10日目の一部或いは全ての期間で培養液中のシステインの濃度が0．4mM以上、好ましくは1mM以上であってもよい。

[0028] 本発明における「少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての培養期間」とは、培養4日目、5日目、6日目或いは7日目以降の培養期間などでもよく、逆に培養開始時、培養1日目或いは2日目以降で培養3～10日目の一部或いは全ての培養期間が含まれている培養期間であればよい。

[0029] また、前述の態様では、少なくとも培養3日目以降の一部或いは全ての期間で培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度が所定の濃度以上に維持されていればよく、仮に培養期間が10日よりも短い場合であっても培養3日目以降の一部或いは全ての期間で培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度が所定の濃度以上に維持されていれば本発明に含まれる。

[0030] このような本発明の方法で細胞を培養することにより、細胞産物であるタンパク質を高生産させることが可能となり、培養培地から当該タンパク質を単離しこれを精製することにより、所望のタンパク質が製造できる。

[0031] 培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)を所定の濃度に維持して培養するための手段としては、細胞培養の最初の段階から培地中に高濃度のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)を含有させておくこと、あるいは高濃度のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)を含有する培地を培養中に追加してこれらのアミノ酸を補給すること、のいずれも可能である。

[0032] 培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を所定の濃度以上に維持するために、培養液にアミノ酸を補給を開始する時期としては、少なくとも培養液中の上記アミノ酸が所定濃度以下になって3日以内に、好ましくは1日以内、最も好ましくはアミノ酸が所定濃度以下になる前に補給を開始することが望ましい。アミノ酸

の補給の方法としては一回又は断続的に数回に分けて補給してもよいし、継続的に補給してもよい。また、初発培地で培養期間を通して所定濃度を維持するのに必要なアミノ酸量全てを含んでいてもよい。

[0033] 一般に、細胞培養方法は、回分培養法(batch culture)、連続培養法(continuous culture)、流加培養法(fed-batch culture)に分類される。本発明の方法においては、いずれの培養方法を用いてもよいが、好ましくは、流加培養法又は連続培養法が用いられ、特に好ましくは、流加培養法が用いられる。

[0034] 回分培養法は、培地に少量の種培養液を加え、培養中に新たに培地を加えたり又は培養液を排出したりせずに、細胞を増殖させる培養方法である。本発明において回分培養法を用いる場合には、細胞培養の最初の段階から培地中に高濃度のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)を含有させておく。

[0035] 連続培養法は、培養中に連続的に培地を加え、かつ、連続的に排出させる培養方法である。なお、連続法には、灌流培養(perfusion culture)も含まれる。

[0036] 流加培養法は回分培養法と連続培養法の中間にあたる為、半回分培養法(semi-batch culture)とも呼ばれ、培養中に連続的に又は逐次的に培地が加えられるが、連続培養法のような連続的な培養液の排出が行われない培養方法である。流加培養の際に加えられる培地(以下、流加培地という)は、既に培養に使用されている培地(以下、初発培地という)と同じ培地である必要はなく、異なる培地を添加してもよいし、特定の成分のみを添加してもよい。

[0037] 本発明において初発培地とは、通常、細胞培養の最初の段階で使用されている培地のことをいう。但し、流加培地を複数回に分けて添加する場合には、流加培地をそれぞれ添加する前の培地を初発培地としてもよい。

[0038] 本発明において、流加培養法又は連続培養法を用いる場合には、培養途中に添加する培地中に高濃度のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)を含有させておいてもよいし、細胞培養の最初の段階から培地中に高濃度のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)を含有させておいてもよい。重要なことは、上述したように、培養の少なくとも所定の段階でセリンの濃度、あるいはセリン及びチロシンの濃度、あるいはセリン及びシステインの濃度、あるいはセリン及びチロシン及びシステインの濃度

が所定濃度以上に維持されるようにすることである。このためには、例えば、適時培養液中のセリン(及びチロシン及び／又はシステイン)の濃度を分析し、加える培地中におけるこれらのアミノ酸の濃度を調整することで、培養液中のこれらのアミノ酸の濃度を制御することができる。あるいは、例えば細胞数から培養中の細胞増殖の段階を判断してアミノ酸の補給を制御する方法も採用できる。

[0039] 次に、本発明を特徴づける培養液中の成分であるセリン、チロシン及びシステインについて詳細に述べる。

[0040] セリンとしては、単品、その誘導体、その塩のいずれを用いてもよい。また、天然のセリンまたは合成法や遺伝子組換え法を用いて製造したセリン、が使用できる。溶液中の濃度としては、例えば、少なくとも培養中の所定期間において培養液中のセリンの濃度が1mM以上、好ましくは2mM以上であることが特徴である。従来用いられているセリンを含む培地は、典型的には 約0.5 mMを含むものであるから、本発明におけるセリン濃度は極めて高濃度であると言える(Dulbecco, R ., Freeman, G. Virology 8, p396 (1959), Nature, New Biology (1971) 230, p52)。

[0041] チロシンについても同様に、単品、その誘導体、その塩のいずれを用いてもよい。また、天然のチロシン、または合成法や遺伝子組換え法を用いて製造したチロシンが使用できる。システインについても、単品、その誘導体、その塩のいずれを用いてもよいし、システインの2量体、シスチンも含まれる。天然のシステインまたは合成法や遺伝子組換え法を用いて製造したシステインが使用できる。溶液中の濃度としては、例えば、少なくとも培養中の所定期間において培養液中のチロシンの濃度が1mM以上、及び／又はシステインが初発培地の濃度以上であることが特徴である。

[0042] 本発明において、細胞培養方法として流加培養法を用いる場合には、流加培地中に高濃度のセリン及びチロシン及び／又はシステインを溶解させておき、培養中に連続的又は逐次的に流加培地を追加することにより、これらのアミノ酸の濃度を所定濃度以上に維持することができる。具体的には例えば、流加培地の濃度において、L-セリンとして約10～1000mM、好ましくは20～500mM、さらに好ましくは50～200mM含むものを流加培地として用いることができる。また、L-チロシンとして約0．01～1000mM、好ましくは1～200mM、さらに好ましくは10～100mM含む流加培地

、また、L-システイン塩酸塩として約0．01～500mM、好ましくは0．1～50mM、さらに好ましくは1～10mM含む流加培地を用いることができる。

[0043] 本発明において前記流加培地を培養液に添加する場合、初発培地量の1～150％、好ましくは5～50％、さらに好ましくは8～20％を、培養期間を通して連続的に、又は一定期間、又は逐次的に添加する流加培地量として用いることができる。

[0044] 本発明において、前記流加培地を培養液に添加する期間としては、少なくとも培養する細胞の増殖期開始時期から終了時期までの一部或いは全ての期間を含む。好ましい期間としては、少なくとも培養中の細胞が対数増殖期開始時期(通常は培養3日目頃)の4日後以降、好ましく対数増殖期開始時期の3日後以降，さらに好ましくは対数増殖期開始時期(通常は培養3日目頃)以降である。あるいは、少なくとも培養液中の上記アミノ酸が所定濃度以下になって3日以内に、好ましくは1日以内、最も好ましくはアミノ酸が所定濃度以下になる前に流加を開始することが望ましい。また、流加を実行或いは継続する時期としては、培養期間が二週間以内の場合、少なくとも培養が終了する5日前まで、好ましくは4日前まで、さらに好ましくは3日前までであればよい。培養期間が二週間を超える場合、少なくとも培養10日目まで、好ましくは培養が終了する5日前まで、より好ましくは培養が終了する4日前まで、さらに好ましくは培養が終了する3日前までであればよい。

[0045] 本発明の方法で用いる培養液中の他の成分としては、通常、細胞(好ましくは、動物細胞)培養培地で使用されている各成分が適宜使用できるが、これらにはアミノ酸、ビタミン類、脂質因子、エネルギー源、浸透圧調節剤、鉄源、pH緩衝剤を含む。上記成分のほか、例えば、微量金属元素、界面活性剤、増殖補助因子、ヌクレオシドなどを添加しても良い。また、本発明で用いる特徴的な成分も含め培地成分を分割し別々に添加して細胞培養に使用しても良い。具体的には、例えば高濃度セリン単独と培地成分を同時にまたは時間を変えて細胞培養に使用しても良い。

[0046] 培養液中の他の成分として具体的には、例えば、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-オルニチン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-バリン等、好ましくはL-アラニ

ン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-バリン等のアミノ酸類;i－イノシトール、ビオチン、葉酸、リポ酸、ニコチンアミド、ニコチン酸、p-アミノ安息香酸、パントテン酸カルシウム、塩酸ピリドキサール、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、塩酸チアミン、ビタミンB12、アスコルビン酸等、好ましくはビオチン、葉酸、リポ酸、ニコチン酸アミド、パントテン酸カルシウム、塩酸ピリドキサール、リボフラビン、塩酸チアミン、ビタミンB12、アスコルビン酸等のビタミン類;塩化コリン、酒石酸コリン、リノール酸、オレイン酸、コレステロール等、好ましくは塩化コリン等の脂質因子;グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース等、好ましくはグルコース等のエネルギー源;塩化ナトリウム、塩化カリウム、硝酸カリウム等、好ましくは塩化ナトリウム等の浸透圧調節剤;EDTA鉄、クエン酸鉄、塩化第一鉄、塩化第二鉄、硫酸第一鉄、硫酸第二鉄、硝酸第二鉄等、好ましくは塩化第二鉄、EDTA鉄、クエン酸鉄等の鉄源類;炭酸水素ナトリウム、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、HEPES、MOPS等、好ましくは炭酸水素ナトリウム等のpH緩衝剤が例示できる。

[0047] 上記成分のほか、例えば、硫酸銅、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸マグネシウム、塩化ニッケル、塩化スズ、塩化マグネシウム、亜ケイ酸ナトリウム等、好ましくは硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸マグネシウム等の微量金属元素;Tween80、プルロニックF68等の界面活性剤;および組換え型インシュリン、組換え型IGF、組換え型EGF、組換え型FGF、組換え型PDGF、組換え型TGF-α、塩酸エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、レチノイン酸、塩酸プトレッシン等、好ましくは亜セレン酸ナトリウム、塩酸エタノールアミン、組換え型IGF、塩酸プトレッシン等の増殖補助因子;デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、アデノシン、シチジン、グアノシン、ウリジン等のヌクレオシドなどを添加してもよい。なお上記本発明の好適例においては、ストレプトマイシン、ペニシリンGカリウム及びゲンタマイシン等の抗生物質や、フェノールレッド等のpH指示薬を含んでいても良い。

[0048] また、培養液中のその他の成分の含量は、アミノ酸は0.05－1500mg/L、ビタミン類は0.001－10mg/L、脂質因子は0－200mg/L、エネルギー源は1－20g/L、浸透圧調

節剤は0.1－10000mg/L、鉄源は0.1－500mg/L、pH緩衝剤は1－10000mg/L、微量金属元素は0.00001－200mg/L、界面活性剤は0－5000mg/L、増殖補助因子は0.05－10000μg/Lおよびヌクレオシドは0.001－50mg/Lの範囲が適当であり、培養する細胞の種類、所望のタンパク質の種類などにより適宜決定できる。

[0049] 培養液のpHは培養する細胞により異なるが、一般的にはpH6．8～7．6、多くの場合pH7．0～7．4が適当である。

[0050] 本発明では、上述の成分を溶解した完全合成培地を用いて、細胞を培養することができる。あるいは、従来公知の動物細胞培養用培地を基礎培地として用い、これに本発明で用いる特徴的な成分を補充することも可能である。動物細胞培養用培地として市販の基礎培地を例示するならば、D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、D-MEM/F-12 1:1 Mixture (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12)、RPMI1640、CHO-S-SFMII(Invitrogen社)、CHO-SF (Sigma-Aldrich社)、EX-CELL 301 (JRH biosciences社)、CD-CHO (Invitrogen社)、IS CHO-V (Irvine Scientific社)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich社)などが使用可能である。流加培養法で細胞を培養する場合には、細胞培養の最初の段階で使用される初発培地として、このような市販の培地を使用することができる。そして、初発培地に用いる培地を高濃度に調製したものに、さらにセリン及びチロシン及び／又はシステインを補充したものを流加培地として使用することができる。

[0051] 本発明の培養方法は特に限定されることなく種々の細胞（例えば、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞など）の培養に使用できる。例えば、遺伝子工学的操作によって所望のタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだCOS細胞やCHO細胞、あるいは、抗体を産生するマウスーヒト、マウスーマウス、マウスーラット等のハイブリドーマに代表される融合細胞を培養することが可能である。本発明の方法は、動物細胞を培養して該動物細胞の産生する天然型タンパク質を得ようとする場合にも使用でき、上述した細胞の他に、BHK細胞、HeLa細胞などの培養にも使用できる。

[0052] 本発明において特に好ましい動物細胞は所望のタンパク質をコードする遺伝子が導入されたCHO細胞である。所望のタンパク質は特に限定されず、天然抗体、抗体

断片、低分子化抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの抗体（例えば、抗IL-6レセプター抗体、抗グリピカン-3抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗GPIIb/IIIa抗体、抗TNF抗体、抗CD25抗体、抗EGFR抗体、抗Her2/neu抗体、抗RSV抗体、抗CD33抗体、抗CD52抗体、抗IgE抗体、抗CD11a抗体、抗VEGF抗体、抗VLA4抗体など）や生理活性タンパク質（顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリスロポエチン、インターフェロン、IL-1やIL-6等のインターロイキン、t-PA、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固因子、など）など如何なるタンパク質でもよいが、特に抗体が好ましい。

[0053] 本発明の製造方法で生産される抗体としては、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル等の動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、キメラ抗体、ヒト化抗体、bispecific抗体など人為的に改変した遺伝子組み換え型抗体も含まれる。また、抗体の免疫グロブリンクラスは特に限定されるものではなく、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgG、IgA、IgD、IgE、IgMなどいずれのクラスでもよいが、医薬として用いる場合はIgG及びIgMが好ましい。さらに本発明の抗体としてはwholeの抗体だけでなく、Fv、Fab、$F(ab)_2$などの抗体断片や、抗体の可変領域をペプチドリンカー等のリンカーで結合させた1価または2価以上の一本鎖Fv（scFv、$sc(Fv)_2$など）の低分子化抗体なども含まれる。

[0054] 培養条件は使用する細胞の種類によって異なるので、適宜好適な条件を決定することが可能である。例えばCHO細胞であれば通常、気相のCO_2濃度が0－40%、好ましくは、2－10%の雰囲気下、30－39℃、好ましくは、37℃程度で、1－50日間培養、さらに好ましくは1－14日間培養してもよい。

[0055] また、動物細胞培養用の各種の培養装置としては、例えば発酵槽型タンク培養装置、エアーリフト型培養装置、カルチャーフラスコ型培養装置、スピンナーフラスコ型培養装置、マイクロキャリアー型培養装置、流動層型培養装置、ホロファイバー型培養装置、ローラーボトル型培養装置、充填槽型培養装置等を用いて培養することができる。

[0056] 本発明の方法により細胞（好ましくは、動物細胞）を培養することにより、タンパク質を高産生させることが可能となる。

[0057] 動物細胞のタンパク質の産生は、単にそれを培養するのみで良いものや、特殊な操作を必要とするものも存在するがそれらの操作又は条件等は培養する動物細胞により適宜決定すれば良い。例えば遺伝子工学的操作によりマウスーヒトキメラ抗体をコードする遺伝子を含むベクターでトランスフォームされたCHO細胞では、前記のような条件下で培養を実施することにより、1－50日間、好ましくは5－21日、さらに好ましくは7－14日間程度で所望のタンパク質を培地中に得ることができる。これを常法(例えば、抗体工学入門、地人書館、(1994)p.102-104;Affinity Chromatography Principles & Methods、GE ヘルスケア(株)、(2003)p.56-60など参照)に従い単離、精製することによって、所望のタンパク質を得ることができる。

[0058] 本発明により、組換え抗体(天然抗体、抗体断片、低分子化抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、bispecific抗体など)、遺伝子組換えタンパク質(顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン、インターフェロン、IL-1やIL-6等のインターロイキン、t-PA、ウロキナーゼ、血清アルブミン、血液凝固因子、など)などを高い生産量で製造することができる。

[0059] 本発明の方法により製造されたタンパク質又はポリペプチド(本発明のタンパク質とも称する)が医薬として利用可能な生物学的活性を有する場合には、そのようなタンパク質又はポリペプチドを医薬的に許容される担体又は添加剤と混合して製剤化することにより、医薬品を製造することができる。本発明のタンパク質及び本発明のタンパク質を有効成分とする医薬品も本発明の範囲に包含される。

[0060] 医薬的に許容される担体及び添加剤の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

[0061] 実際の添加物は、本発明の医薬品である治療剤の剤型に応じて上記の中から単

独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製されたポリペプチドを溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

[0062] ポリペプチドの有効投与量は、ポリペプチドの種類、治療や予防の対象とする疾患の種類、患者の年齢、疾患の重篤度などにより適宜選択される。例えば、本発明のタンパク質が抗グリピカン抗体等の抗体である場合、その有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0．001mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0．01～100000mg／bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、これらの投与量に制限されるものではない。

[0063] 本発明の医薬品の投与方法は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射（例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによる全身又は局所投与）、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。

実施例

[0064] 以下、本発明を実施例及び参考例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例等は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

[0065] 〔実施例1〕高濃度セリン、システイン、チロシン含有低pH流加培地による流加培養（抗体遺伝子導入CHO細胞株）

培地組成及び調製法は以下の通りである。

初発培地：市販の動物細胞培養用培地を溶解後濾過滅菌した。

流加培地：初発培地に用いる動物細胞培養用培地を初発培地に対し3倍濃度とし溶解後、セリン50mM、システイン塩酸塩一水和物1.8mM、チロシン14.5mMを加え、塩酸によりpHを培地成分が全て溶解するまで落とし（pH1.5付近）、培地成分が全て溶

解していることを確認後濾過滅菌した。

細胞:ヒト化IgG(抗グリピカン-3抗体)産生CHO細胞株(国際公開第WO 2006/006693号パンフレットを参照)。

[0066] ジャー型細胞培養装置に初発培地を加え、これに上記CHO細胞株を、2 x10^5 cells/mLとなるよう加えて37℃、10% CO_2の条件で培養を開始した。培養期間14日間を通じ、pH下限7.0、溶存酸素濃度40%の自動制御を行った。培養3日目より流加培地を一定流速(初発培地1Lに対し、1.0g/時間)で流加し、14日目まで培養を行った。培養開始時および3、5、7、10、12、14日目にサンプリングを行った。各サンプルの培養上清について、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより産生された抗体濃度、トリパンブルー染色法により生存率、固定化酵素法により乳酸の測定をした。図1に示すように、セリン、システィン、チロシンを増量しない流加培地を用いた流加培養(Control)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.6 g/L程度であった。これに対し、高濃度セリン、システィン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養(Ser,Cys,Tyr)の場合、14日間の培養で抗体濃度は2.2 g/L程度と約40 %も高い抗体濃度を得ることができた。図2には培養期間における生存率の推移を示した。また図3に示すように、乳酸濃度は培養3日目以降、セリン、システィン、チロシンを増量しない流加培地を用いた流加培養の場合に比べ、高濃度セリン、システィン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養の場合は低乳酸濃度を推移した。

[0067] 〔実施例2〕高濃度セリン、システィン、チロシン含有低pH流加培地による流加培養(抗体遺伝子およびハムスター・タウリントランスポーター遺伝子導入CHO細胞株)

培地組成及び調製法は以下の通りである。

初発培地:市販の動物細胞培養用培地を溶解後濾過滅菌した。

流加培地:初発培地に用いる動物細胞培養用培地を初発培地に対し3倍濃度とし溶解後、セリン50mM、システィン塩酸塩一水和物1.8mM、チロシン14.5mMを加え、塩酸によりpHを培地成分が全て溶解するまで落とし(pH1.5付近)、培地成分が全て溶解していることを確認後濾過滅菌した。

細胞:タウリントランスポーター遺伝子を導入したヒト化IgG産生CHO細胞株。

[0068] ジャー型細胞培養装置に初発培地を加え、これに上記CHO細胞株を、2 x10^5 cells

/mLとなるよう加えて37℃、10% CO_2の条件で培養を開始した。培養期間14日間を通じ、pH下限7.0、溶存酸素濃度40%の自動制御を行った。培養3日目より流加培地を一定流速(初発培地1Lに対し、1.5g/時間)で流加し、14日目まで培養を行った。培養開始時および3、5、7、10、12、14日目にサンプリングを行った。各サンプルの培養上清について、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより産生された抗体濃度、トリパンブルー染色法により生存率、固定化酵素法により乳酸の測定をした。図4に示すように、セリン、システイン、チロシンを増量しない流加培地を用いた流加培養(Control)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.3 g/L程度であった。これに対し、高濃度セリン、システイン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養(Ser,Cys,Tyr)の場合、14日間の培養で抗体濃度は2.0 g/L程度と約54 %高い抗体濃度を得ることができた。図5に示すように、セリン、システイン、チロシンを増量しない流加培地を用いた流加培養の場合、14日間の培養で14日目の生存率は52 %であった。これに対し、高濃度セリン、システイン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養の場合、14日間の培養で14日目の生存率は78 %と高い生存率を維持することができた。また図6に示すように、乳酸濃度は培養3日目以降、セリン、システイン、チロシンを増量しない流加培地を用いた流加培養の場合に比べ、高濃度セリン、システイン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養の場合は低乳酸濃度を推移した。

[0069] 〔実施例3〕高濃度セリン、システイン、チロシンの抗体高産生化への寄与を確認する為の流加培養(抗体遺伝子およびハムスター・タウリントランスポーター遺伝子導入CHO細胞株)

培地組成及び調製法は以下の通りである。

初発培地:市販の動物細胞培養用培地を溶解後濾過滅菌した。

流加培地(Ser,Cys,Tyr):初発培地に用いる動物細胞培養用培地を初発培地に対し3倍濃度とし溶解後、セリン50mM、システイン塩酸塩一水和物1.8mM、チロシン14.5 mMを加え、塩酸によりpHを培地成分が全て溶解するまで落とし(pH1.5付近)、培地成分が全て溶解していることを確認後濾過滅菌した。

流加培地(Ser,Cys):初発培地に用いる動物細胞培養用培地を初発培地に対し3倍濃度とし溶解後、セリン50mM、システイン塩酸塩一水和物1.8mMを加え、塩酸により

pHを培地成分が全て溶解するまで落とし(pH1.0付近)、培地成分が全て溶解していることを確認後濾過滅菌した。

流加培地(Ser,Tyr):初発培地に用いる動物細胞培養用培地を初発培地に対し3倍濃度とし溶解後、セリン50mM、チロシン14.5mMを加え、塩酸によりpHを培地成分が全て溶解するまで落とし(pH1.0付近)、培地成分が全て溶解していることを確認後濾過滅菌した。

流加培地(Cys,Tyr):初発培地に用いる動物細胞培養用培地を初発培地に対し3倍濃度とし溶解後、システイン塩酸塩一水和物1.8mM、チロシン14.5mMを加え、塩酸によりpHを培地成分が全て溶解するまで落とし(pH1.0付近)、培地成分が全て溶解していることを確認後濾過滅菌した。

細胞:タウリントランスポーター遺伝子を導入したヒト化IgG産生CHO細胞株。

[0070] ジャー型細胞培養装置に初発培地を加え、これに上記CHO細胞株を、2 x10^5 cells/mLとなるよう加えて37℃、10% CO_2の条件で培養を開始した。培養期間14日間を通じ、pH下限7.0、溶存酸素濃度40%の自動制御を行った。培養3日目より流加培地を一定流速(初発培地1Lに対し、1.5g/時間)で流加し、14日目まで培養を行った。培養開始時および3、5、7、10、12、14日目にサンプリングを行った。各サンプルの培養上清について、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより産生された抗体濃度測定、イオン交換カラムを用いたアミノ酸分析によりセリンとチロシンのアミノ酸濃度の測定を行った。図7に示すように、セリン、システイン、チロシンを増量しない流加培地を用いた流加培養(Control)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.16 g/L程度であった。これに対し、高濃度セリン、システイン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養(Ser,Cys,Tyr)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.87 g/L、高濃度セリン、システイン増量低pH流加培地を用いた流加培養(Ser,Cys)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.47 g/L、高濃度セリン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養(Ser,Tyr)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.41 g/L、高濃度システイン、チロシン増量低pH流加培地を用いた流加培養(Cys,Tyr)の場合、14日間の培養で抗体濃度は1.18 g/Lという抗体濃度測定結果が得られた。従って高濃度セリン、システイン、チロシンの順に、抗体高産生化へ寄与していることが示唆された

。また高濃度セリン、システイン、チロシンを同時に流加培地に添加することが、最も抗体高産生化へ寄与していることが示唆された。

[0071] 図8、図9は、14日間の培養期間中のセリン及びチロシンの濃度の推移を示す。Controlでは培養5日目で、セリンは0．63mM及びチロシンは0．34mM、培養7日目以降セリンは0．4mM以下及びチロシンは0．4mM以下となったが、セリンを補充した流加培地を用いた培養ではセリンの濃度は2mM以上、チロシンを補充した流加培地を用いた培養ではチロシンの濃度は1mM以上で維持された。

[0072] 以下の参考例では、上述の実施例2及び3で使用したタウリントランスポーター遺伝子を導入したヒト化IgG産生CHO細胞株の作成について記載する。

〔参考例1〕CHO細胞由来ハムスター・タウリントランスポーター遺伝子クローニング

CHO DXB11細胞に抗IL-6レセプター抗体遺伝子を導入した抗IL-6レセプター抗体産生細胞（特開平8-99902号公報）からtotal RNA抽出をおこなったのち、ポリAに依存するcDNAを合成した。SalI、XhoI、EcoRIの三種類の制限酵素で断片化したcDNAを鋳型することで、ハムスター・タウリントランスポーター（Hamster TauT）遺伝子をPCRにより得た。PCRプライマーは 既知であるRat/Mouse TauT間で遺伝子配列が保存されている5',3'を含むものを設計して用いた。クローニングされた遺伝子は塩基配列を決定し、既知の生物種のTauT との相同性から Hamster TauTをコードしていることを確認した（図10）。Hamster TauTアミノ酸配列はMouse(96% Identity)、Rat(96% Identity)、Human(93% Identity) TauTに対して高い相同性を有しており、12の膜貫通領域をもつトランスポーターであることが予想された（図11）。

〔参考例2〕ハムスター・タウリントランスポーター遺伝子導入CHO細胞株の作成

参考例1のクローニングにより取得したHamster TauT（以下TauT）遺伝子にKozak配列を加え、CMVプロモーター発現プラスミドpHyg/TauT（図12）を構築した。pHyg/TauTあるいはTauT遺伝子を除いたコントロールプラスミドpHygを、親株である抗グリピカン-3抗体産生CHO細胞（国際公開第WO 2006/006693号パンフレットを参照）にエレクトロポレーション法で導入した。発現プラスミド導入細胞をHygromycin(400 μg/ml)存在下で選抜したのち、安定して増殖する細胞株すべてを拡大した（pHyg/TauT：8株，pHyg：7株）。TauT mRNAを調製ののちTaqMan法により、親株に対して優

位な発現を確認できる7株をpHyg/TauT導入細胞とした。導入細胞（7株）のmRNA平均発現量はコントロール（7株）の約40倍であった。

[配列表フリーテキスト]

＜配列番号1＞　配列番号1は、ハムスタータウリントランスポーターをコードする遺伝子の塩基配列を示す。

＜配列番号2＞　配列番号2は、ハムスタータウリントランスポーターのアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

[1] 所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において、培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

[2] さらに少なくとも細胞の増殖期開始時期以降の一定期間において、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする、請求項1記載の方法。

[3] 1mM以上のセリンまたはその塩を含有する動物細胞培養用培地。

[4] さらに少なくとも、1mM以上のチロシン、及び／又は0．4mM以上のシステインを含有する請求項3記載の動物細胞培養用培地。

[5] 請求項3又は4に記載の動物細胞培養用培地を用いて所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造することを特徴とする、所望のタンパク質の製造方法。

[6] 所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも培養する細胞が十分に増殖できる期間あるいは産生する所望のタンパク質が十分に産生できる期間の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

[7] さらに少なくとも培養する細胞が十分に増殖できる期間あるいは産生する所望のタンパク質が十分に産生できる期間の一部或いは全ての期間で培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする、請求項6記載の方法。

[8] 所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも細胞の対数増殖期の一部或いは全ての期間で、培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

[9] さらに少なくとも細胞の対数増殖期の一部或いは全ての期間で、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする、請求項8記載の方法。

[10] 少なくとも細胞の対数増殖期の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度

を2mM以上とする、請求項8又は9に記載の方法。

[11] 所望のタンパク質を産生する細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に、少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で、培養液中のセリンの濃度を1mM以上とすることを特徴とする、細胞の培養方法。

[12] さらに少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で、培養液中のチロシンの濃度を1mM以上、及び／又はシステインの濃度を初発培地の濃度以上もしくは0．4mM以上とする、請求項11記載の方法。

[13] 少なくとも培養3～10日目の一部或いは全ての期間で培養液中のセリンの濃度を2mM以上とする、請求項11又は12に記載の方法。

[14] 細胞を、回分培養法(batch culture)、繰り返し回分培養法(repeated batch culture)、流加培養法(fed-batch culture)、または、繰り返し流加培養法(repeated fed-batch culture)、連続培養法(continuous culture)、灌流培養法(perfusion culture)で培養する、請求項1、2、5～13のいずれかに記載の方法。

[15] 細胞を流加培養法で培養する、請求項1、2、5～13のいずれかに記載の方法。

[16] セリン及びチロシン及び／又はシステインが、逐次的に複数回、又は連続的に、流加することによって培養液中に供給される、請求項15記載の方法。

[17] 細胞が所望のタンパク質をコードする遺伝子を導入したものである、請求項1、2、5～16のいずれかに記載の方法。

[18] 所望のタンパク質が抗体である、請求項17記載の方法。

[19] 細胞が哺乳動物細胞である、請求項1、2、5～18のいずれかに記載の方法。

[20] 哺乳動物細胞がCHO細胞である、請求項19記載の方法。

[21] 10mM～1000mMの濃度のセリンを含有する細胞培養用流加培地。

[22] 20mM～500mMの濃度のセリンを含有する細胞培養用流加培地。

[23] さらに、システイン及び／又はチロシンが添加されている請求項21又は22に記載の流加培地。

[24] さらに、システイン及びチロシンが添加されている請求項21又は22に記載の流加培地。

[25] 請求項21～24のいずれかに記載の流加培地を添加することを特徴とする、培養

細胞を流加培養法で培養する方法。

[26] 細胞を培養して所望のタンパク質を製造する方法において、培養を請求項1、2、6～20のいずれかに記載の方法を使用して行うことを特徴とする、当該タンパク質の製造方法。

[27] 請求項5又は26に記載の方法で製造されたタンパク質を有効成分とする医薬の製造方法。