明　細　書

発明の名称 ： 動物細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は所望のタンパク質を生産する動物細胞を培養して当該タンパク質を製造する際の、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）を抑制するための培養方法およびその方法を用いて所望のタンパク質を製造する方法に関する。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、一定期間通常の培養温度で培養した後、培養温度を25℃乃至35℃に低下させて培養を継続することを特徴とする、方法に関する。

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際、そのような天然型タンパク質または所望のタンパク質の、脱アミド体やアミノ酸の置換・欠失体、糖鎖構造の違い等によって形成される電荷不均一性（酸性ピーク、塩基性ピーク）や会合体等といった不均質成分（heterogeneity）の生成を如何に抑制するかが課題であった。

[0003] 近年、免疫原性等の問題が懸念され、安全性の点や、単離・精製工程の複雑化を防ぐためにも、これらの不均質成分の生成をできる限り抑制する細胞培養方法の出現が望まれている。

[0004] 従来、上記のような問題を解決するために、種々の動物細胞の培養方法の開発が行われている。具体的には、ミスフォールドまたは凝集した形態のタンパク質の産生を低減するために、27℃～30℃の低温または低ｐＨで細胞を培養することや（特許文献１：WO2008/131374）、銅やグルタミン酸の添加（特許文献２：WO2008/109410）が開発されてきた。しかしながら、電荷不均一性を制御する方法に関しては、これまで報告されていない。

[0005] CHO細胞の培養中に培養温度を低温に変化させる培養法としては、低温において目的タンパク質の細胞当たり生産性の上昇を示す、特定の形質を持ったCHO細胞を用いて、目的タンパク質の産生量を向上させる方法が開示されている（特許文献３；特開平9-75077）。しかし、培養温度を低温にシフトすることにより、目的タンパク質（好ましくは抗体）の不均質を抑制すること、特に抗体の電荷不均一性を抑制することについては全く示唆されていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO2008/131374

特許文献2：WO2008/109410

特許文献3：特開平9-75077

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、所望のタンパク質を生産する動物細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に生じる、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）を抑制することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 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、細胞培養の温度条件を操作することにより、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）を抑制できることを見出した。具体的には、一定期間通常の培養温度で培養した後、培養温度を低下させて培養を継続することにより、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）を抑制することができることを見出し、この知見に基づき、本発明を完成するに至った。

[0009] 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動物細胞を培養して当該タンパク質を産生させることにより所望のタンパク質を製造する際の、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）成分の生成を抑制する方法であって、一定期間通常

の培養温度(36℃乃至38℃)で培養した後、培養温度を25℃乃至35℃に低下させて培養を継続することを特徴とする、方法。

（２）動物細胞が、通常の培養温度(36℃乃至38℃)より低温において所望のタンパク質の細胞当たりの生産性が上がらないもしくは生産性が減少する形質を有する細胞である、（１）の方法。

（３）所望のタンパク質の不均質成分の生成を抑制することが、酸性ピークの生成を抑制することを含む、上記方法。

（４）培養開始日から３日後乃至７日後まで通常の培養温度で培養し、その後培養温度を低下させることを特徴とする、上記方法。

（５）一定期間36℃乃至38℃で培養した後、培養温度を32℃乃至35℃に低下させて培養を継続することを特徴とする、上記方法。

（６）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、上記方法。

（７）動物細胞を流加培養法で培養する、上記方法。

（８）動物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、上記方法。

（９）所望のタンパク質が抗体である、上記方法。

（１０）動物細胞が哺乳動物細胞である、上記方法。

（１１）哺乳動物細胞がCHO細胞である、（１０）の方法。

（１２）CHO細胞が、DG44、DXB-11、K-1またはCHO-Sである細胞株から選択される、（１１）の方法。

（１３）上記方法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。

（１４）所望のタンパク質を産生する細胞を培養して、培養液中から当該タンパク質を回収する工程を含む、（１３）の製造方法。

（１５）上記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

。

（１６）所望のタンパク質が抗グリピカン３抗体または抗IL-31RA抗体である、上記方法。

発明の効果

[0010] 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、所望のタンパク質を生産する動物細胞を培養して当該タンパク質を製造する際に生じる、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）を抑制することが可能である。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、単離・精製工程が簡便になり、工業生産に有利である。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

[0011] [図1]温度シフトによる抗体の酸性ピーク抑制に関する実施例（実施例１）の結果を示す。

[図2]温度シフトによる抗体の酸性ピーク抑制に関する実施例（実施例２）の結果を示す。

[図3]温度シフトによる抗体の酸性ピーク抑制に関する実施例（実施例３）の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

[0013] 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生じる、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）成分の生成を抑制することを特徴とする。具体的には、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、一定期間通常の培養温度で培養した後、培養温度を25℃乃至35℃に低下させて培養を継続することを特徴とする。

[0014] 本発明の一例としては、本発明の培養法では、動物細胞が、通常の培養温度(36℃乃至38℃)より低温において所望のタンパク質の細胞当たりの生産性

が上がらないもしくは減少する形質を有する細胞である。

[0015] 一定期間通常の培養温度で培養した後に培養温度を低下させて培養することを、本明細書において、培養温度をシフトする、あるいは「温度シフト」と称する。通常の培養温度は、恒温動物由来の細胞の細胞増殖に適した温度である36℃～38℃が一般的であり、37℃が最も一般的である。一方、低下させた培養温度を「シフト温度」と称する。シフト温度は、通常の培養温度よりも低く、且つ37℃未満の温度であり、例えば25℃乃至35℃、好ましくは30℃乃至35℃、さらに好ましくは32℃乃至35℃である。

[0016] 本発明者らは、組換えヒト化抗体を産生するＣＨＯ細胞株に及ぼす温度シフトの影響について、細胞密度、細胞生存率、培地成分の変化、産生された抗体タンパク質濃度、および抗体の不均質成分の変化を検討した。

[0017] その結果、培養期間を通して37℃に維持して培養するコントロールに比べて、温度シフトの条件では、生細胞数と生存率が維持され、グルコースの消費と乳酸の蓄積が抑制されることが分かった。さらに、産生された抗体の物性については、温度シフトにより酸性ピークの生成が抑制されるという、目的物の品質として望ましい結果が得られることが分かった。この現象は、温度シフトによって、不均質（heterogeneity）成分の生成が抑制可能であることを示すものである。ただ、抗体たんぱく質の産生量については通常の温度条件で培養した場合に比べ若干低下した。

[0018] 本発明のさらに別の側面において、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）成分の生成を抑制することは、電荷不均一性を抑制することを含む。電荷不均一性とは、脱アミド体やアミノ酸の置換・欠失体、糖鎖構造の相違に起因して、主成分よりもｐＩが高い成分（塩基性ピーク）および低い成分（酸性ピーク）が生成されることにより、タンパク質の電荷が不均一となる現象である。

[0019] 本発明のさらに別の側面において、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）成分の生成を抑制することは、酸性ピークの生成を抑制することを含む。

[0020] タンパク質の酸性ピークとは、主成分よりもpIが低い成分を指し、脱アミド体や糖鎖構造の違い等によって形成される。酸性ピークは、イオン交換クロマトグラフィーにより測定され、主成分に対する割合（%）として算出される。

[0021] 温度シフトの時期は、使用する動物細胞および培養条件により異なる。使用する動物細胞について、実験を実施し、目的タンパク質の生産性と不均質（heterogeneity）成分の生成のバランスを指標として最適化を行う。

[0022] 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。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。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。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。

[0023] 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。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。典型的には、流加培地の組成は、培養中に消費されてしまった成分が補給されるように、調製される。例えば、動物細胞増殖のための主要なエネルギー源であるグルコースを、流加により補給することができる。

[0024] 温度シフトのタイミングは、目的タンパク質の発現量と酸性ピークの生成のバランスによって決定される。具体的には、実施例２に示す実験を行うことにより、最適な温度シフトタイミングを知ることができる。細胞が十分に高密度となる時期に温度シフトを開始することが好ましいが、使用する細胞

や培養条件によって達成し得る細胞密度が異なるため、狭い範囲で限定することはできず、一般的には１０^{6}cells/mL～１０^{8}cells/mL程度である。

[0025] 本発明の方法で用いる培養液中の成分としては、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。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 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、これに必要に応じて他の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(Invitro

gen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。

[0031] 本発明の方法の好ましい態様は、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細胞などの動物培養細胞、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際に、所望のタンパク質の不均質（heterogeneity）成分の生成を抑制する方法である。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る。

[0032] 本発明で所望のタンパク質の発現に用いる動物培養細胞は、特に限定されるものではないが、哺乳動物細胞が好ましい。哺乳動物細胞としては、ヒト、チンパンジーなどの霊長類、マウス、ラット、ハムスターなどのげっ歯類など如何なる哺乳動物由来の細胞でもよいが、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、３Ｔ３細胞、ミエローマ細胞、ＢＨＫ細胞、ＨｅＬａ細胞、Ｖｅｒｏ細胞など一般に使用されている動物培養細胞が好ましく、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。また、所望のタンパク質を製造するためには、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO 細胞であるdhfr-CHO細胞（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220 ）やCHO K-1 細胞（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275）など所望の遺伝子を導入するのに適した細胞であることが好ましい。

[0033] 上記のCHO細胞としては特に、DG44株、DXB-11株、K-1、CHO-Sが好ましく、特にDG44株及びDXB-11株が好ましい。

[0034] 宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポーレーション法、リポフェクションなどの方法

で行うことが可能である。

[0035] 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、Bi-specific抗体などの抗体（例えば、抗IL-6レセプター抗体、抗IL-6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、抗NR10（IL-31RA）抗体、抗ガングリオシドGM3抗体、抗TPO受容体アゴニスト抗体、凝固第VIII因子代替抗体、抗IL-31レセプター抗体、抗HLA抗体、抗AXL抗体、抗CXCR4抗体、ファクターIXとファクターXとのBi-specific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。

[0036] 抗体には、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。

[0037] 好ましい実施態様において、本発明は、抗体の製造を目的として、抗体をコードする遺伝子を導入したCHO細胞を培養する際に、抗体の酸性ピークの生成を抑制するための方法であって、培養開始日から３日後乃至７日後まで通

常の培養温度で培養し、その後培養温度を低下させることを特徴とする。すなわち、例えば、培養開始から３日目まで、あるいは培養開始から４日目まで、あるいは培養開始から５日目まで、あるいは培養開始から６日目まで、あるいは培養開始から７日目まで、通常の培養温度で培養した後に温度シフトを開始し、以降はシフト温度で培養を継続する。

[0038] 低温に温度シフトした後から培養を終了するまでの期間としては、一般的には1日～50日であり、好ましくは、5日～15日であり、さらに好ましくは、7日～12日である。

[0039] 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、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。

[0040] 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。

[0041] 本発明において、好適な培養条件は、動物細胞が産生する目的のタンパク質の不均質（heterogeneity）成分の生成が抑制され、生産性の低下が少ない条件が選択される。実際には、本願において本発明者らは、温度シフトによって細胞当たりの抗体産生量が若干低下することを確認しているが、シフト温度とタイミングを調整することで、目的タンパク質の発現量低下は最小限に留め、不均質（heterogeneity）成分の生成を抑制することが可能である。

[0042] 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、ヒト化抗体等の抗体や他のタンパク質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。

[0043] 動物培養細胞から培地中に分泌されるタンパク質はその培養液から常用の方法で回収できる。あるいは、タンパク質は宿主細胞の細胞溶解物からも常用の方法で回収することができる。具体的には、所望のタンパク質の回収は、細胞培養液または細胞溶解物を遠心等により、細胞および細胞の破片を除去した後に、一般的なタンパク質の単離・精製技術を適用して行うことができる。すなわち、塩析法（例えば、硫酸アンモニウム分画法）、アルコール沈殿法（例えば、エタノール沈殿）、ＰＥＧ法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、超遠心法、ゲルろ過法、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどが用いられる。所望のタンパク質が抗体である場合、プロテインＡクロマトグラフィが好適に用いられるが、これに限定されない。さらに、アフィニティを利用した様々な分離または分画法を用いることで、抗体を免疫グロブリンのクラスに分ける、または抗原結合性により分取することができる。

[0044] 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、高い生産量で且つ高い均質性を保持して製造することができる。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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０．０１～１００００００ｍｇ／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。

[0049] 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

[0050] 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。

[0051] 〔実施例１〕温度シフトによる抗体の酸性ピーク抑制（シフト温度の検討）

初発培地

市販の動物細胞培養用無血清培地に植物由来の加水分解物を添加し、溶解後濾過滅菌した。

流加培地

市販の動物細胞培養用無血清培地にグルコースを添加し、溶解後濾過滅菌した。

細胞

組換え型抗グリピカン-3（GPC-3）ヒト化抗体（WO2006/006693の実施例24に記載の方法でヒト化し、実施例25の方法でL鎖が改変されたヒト化GC33抗体、抗体クラスはIgG1）を産生するCHO細胞株（DXB-11株；G. Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980；ATCCから購入可能）。

培養法

1 Lのジャー型細胞培養装置（5台）に初発培地を加え、これに上記CHO細胞株を2 x10^5 cells/mLとなるよう播種し、37℃で培養を開始した。培養5日目より温度シフトを行った。シフト温度は、培養槽1から順に、32℃、33℃、34℃、35℃、37℃（温度シフト無し）で、以降の培養は、それぞれシフトした温度で行った。DOは40%、pHは6.9で制御した。流加培地は培養3日目より、一定流

速で添加した。

分析方法

生細胞数・生存率測定はトリパンブルー染色法により行った。細胞自動測定装置Cedexに細胞懸濁液1 mLをセットし，生死細胞数測定を実施した。生死細胞数測定及び生細胞密度（10^5cells/mL）と生存率（%）の算出はデータ解析ソフトウェアCedex Loader（Innovatis, ver. 1.51以降）を用いて自動的に行った。

グルコース及び乳酸濃度測定は、サンプリングした培養液の遠心（1000 rpm, 5 min）上清を、バイオケミストリアナライザー（model 2700, YSI）を用いて測定した。

抗体濃度は、サンプリングした培養液の遠心（1000 rpm, 5 min）上清を、Protein A-HPLC法を用いて測定した。

IECに関しては、陽イオンカラム（ProPac WCX-10）を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。

結果

結果を図１に示す。

到達細胞密度は、温度シフト無しの37℃の培養が最も高く、温度シフトをしたものは、細胞の増殖が抑制された。しかしながら、シフト温度が低くなるほど、生存率が維持される傾向にあり、培養後期においても高い生細胞数を保っていた。抗体産生量は、温度シフト無しの37℃が3.61 g/Lで最も高く、温度シフトしたものはすべて3.2 g/L以下となり、温度シフトにより抗体産生量が低下した。これは、温度シフトにより細胞自体の活性が低下したものと考える。グルコース及び乳酸の培養挙動に関しては、シフト温度の低下に伴ってグルコース消費量が減少し、乳酸産生量も低下する結果となった。これも、温度シフトにより細胞自身の活性が低下したためと考える。IECの酸性ピークは、温度シフト無しが47.5%に対して、35℃の温度シフトが29.1%、34℃の温度シフトが18.7%、33℃の温度シフトが19.4%、32℃の温度シフトが14.7%と、温度シフトによって生成が抑制され、シフト温度の低下に伴って低下す

る傾向にもあった。

[0052] 〔実施例２〕温度シフトによる抗体の酸性ピーク抑制（シフトタイミングの検討：１）

初発培地

市販の動物細胞培養用無血清培地に植物由来の加水分解物を添加し、溶解後濾過滅菌した。

流加培地

市販の動物細胞培養用無血清培地にグルコースを添加し、溶解後濾過滅菌した。

細胞

組換え型抗グリピカン-3（GPC-3）ヒト化抗体を産生するCHO細胞株。

培養法

1 Lのジャー型細胞培養装置（5台）に初発培地を加え、これに上記CHO細胞株を2 x10^5 cells/mLとなるよう播種し、37℃で培養を開始した。シフト温度を33℃として、シフトタイミングを、培養槽1.から順に、培養3日目、4日目、5日目、6日目、温度シフト無とし、以降の培養は、シフトした温度で行った。DOは40%、pHは6.9で制御した。流加培地は培養3日目より、一定流速で添加した。

分析方法

生細胞数・生存率測定はトリパンブルー染色法により行った。細胞自動測定装置Cedexに細胞懸濁液1 mLをセットし，生死細胞数測定を実施した。生死細胞数測定及び生細胞密度（10^5cells/mL）と生存率（%）の算出はデータ解析ソフトウェアCedex Loader（Innovatis, ver. 1.51以降）を用いて自動的に行った。

グルコース及び乳酸濃度測定は、サンプリングした培養液の遠心（1000 rpm, 5 min）上清を、バイオケミストリアナライザー（model 2700, YSI）を用いて測定した。

抗体濃度は、サンプリングした培養液の遠心（1000 rpm, 5 min）上清を、Pr

otein A-HPLC法を用いて測定した。

IECに関しては、陽イオンカラム（ProPac WCX-10）を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行った。

結果

結果を図２に示す。

到達細胞密度は、温度シフト無しの培養が最も高く、温度シフトをしたものは細胞の増殖が抑制された。温度シフトのタイミングが早いほど、到達細胞密度が低下する結果となったが、生存率は維持される傾向にあった。抗体産生量は、温度シフト無しが3.61 g/Lで最も高く、培養6日目からの温度シフトが3.57 g/L、培養5、4、3日目からの温度シフトは順に2.91、2.13、1.61 g/Lと温度シフトのタイミングが早くなるに伴って、抗体産生量の低下が見られた。グルコース濃度は、シフトタイミングが早いほどグルコースの蓄積量が多かった。乳酸産生量に関しては、温度シフト無しの培養のみ培養後期に蓄積が見られたが、温度シフトをしたものはすべて0.5g/L以下の濃度であった。IECの酸性ピークは、温度シフト無しが47.5%に対して、培養6日目からの温度シフトが21.9%、培養3、4、5日目からの温度シフトはすべて20%以下となった。培養6日からの温度シフトであっても、IECの酸性ピーク生成が抑制されていた。

[0053] 〔実施例３〕温度シフトによる抗体の酸性ピーク抑制（シフトタイミングの検討：２）

初発培地

市販の動物細胞培養用無血清培地を溶解後、濾過滅菌した。

流加培地

市販の動物細胞培養用無血清培地にグルコースを添加し、溶解後濾過滅菌した。

細胞

抗NR10（IL-31RA）ヒト化抗体（WO2009/072604の実施例12に記載の方法で作製した完全ヒト化NS22抗体）を産生するCHO細胞株（DXB-11株；G. Urlaub et

al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980；ATCCから購入可能）、当該抗NR10ヒト化抗体の抗体クラスはIgG2。

培養法

実施例2と同様の方法で培養を行った。即ち、37℃で培養を開始し、シフト温度を33℃として、シフトタイミングを、培養5日目、７日目、温度シフト無とし、以降の培養は、シフトした温度で行った。

分析方法

実施例2と同様の方法で行った。

結果

実施例2と同様に、温度シフトを行うと、抗体の酸性ピークの生成が顕著に抑制された（図3）。

請求の範囲

[請求項1] 所望のタンパク質を産生する動物細胞を培養して当該タンパク質を産生させることにより所望のタンパク質を製造する際の、所望のタンパク質の不均質成分の生成を抑制する方法であって、一定期間通常の培養温度で培養した後、培養温度を25℃乃至35℃に低下させて培養を継続することを特徴とする、方法。

[請求項2] 動物細胞が、通常の培養温度より低温において所望のタンパク質の細胞当たりの生産性が上がらないもしくは生産性が減少する形質を有する細胞である、請求項１記載の方法。

[請求項3] 所望のタンパク質の不均質成分の生成を抑制することが、酸性ピークの生成を抑制することを含む、請求項１または２記載の方法。

[請求項4] 培養開始日から３日後乃至７日後まで通常の培養温度で培養し、その後培養温度を低下させることを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

[請求項5] 一定期間36℃乃至38℃で培養した後、培養温度を32℃乃至35℃に低下させて培養を継続することを特徴とする、請求項１または２記載の方法。

[請求項6] 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乃至５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 動物細胞を流加培養法で培養する、請求項１乃至５のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 動物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乃至７のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 所望のタンパク質が抗体である、請求項８記載の方法。

[請求項10] 動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項１乃至９記載の方法。

[請求項11] 哺乳動物細胞がCHO細胞である、請求項１０記載の方法。

[請求項12] CHO細胞が、DG44、DXB-11、K-1またはCHO-Sである細胞株から選択される、請求項１１記載の方法。

[請求項13] 請求項１乃至１２に記載の方法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。

[請求項14] 所望のタンパク質を産生する細胞を培養して、培養液中から当該タンパク質を回収する工程を含む、請求項１３記載の製造方法。

[請求項15] 請求項１３または１４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。

[請求項16] 所望のタンパク質が抗グリピカン３抗体または抗IL-31RAである、請求項１乃至１５のいずれかに記載の方法。