

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6925127号
(P6925127)

(45) 発行日 令和3年8月25日 (2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月5日 (2021.8.5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 K
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07

請求項の数 17 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願2016-542875 (P2016-542875)	(73) 特許権者	500034653
(86) (22) 出願日	平成26年9月16日 (2014.9.16)		ジェンザイム・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2016-530893 (P2016-530893A)		アメリカ合衆国02142マサチューセツ州 ケンブリッジ、ビニー・ストリート 50番
(43) 公表日	平成28年10月6日 (2016.10.6)	(74) 代理人	100127926
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/055897		弁理士 結田 純次
(87) 国際公開番号	W02015/039115	(74) 代理人	100140132
(87) 国際公開日	平成27年3月19日 (2015.3.19)		弁理士 竹林 則幸
審査請求日	平成29年9月15日 (2017.9.15)	(72) 発明者	ハン・ジョウ
審判番号	不服2020-5202 (P2020-5202/J1)		中華人民共和国201323シャンハイ、ブードンニューディストリクト、キンインロード1000、ビルディング103-301
審判請求日	令和2年4月17日 (2020.4.17)		
(31) 優先権主張番号	61/878,502		
(32) 優先日	平成25年9月16日 (2013.9.16)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養物を処理する方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物細胞培養物を処理する方法であって、

(a) 開回路濾過システムを提供する工程であって、該システムは、哺乳動物細胞培養物を含むバイオリアクタと、

第1および第2の入口を有するタンジェントフロー濾過 (TFF) ユニットと、
バイオリアクタとTFFユニットの第1の入口との間で流体連通している第1の導管と、

バイオリアクタとTFFユニットの第2の入口との間で流体連通している第2の導管と、

該システムを通じて流体を流通させるための、該システム内に配置された第1および第2の低乱流ポンプ (LTP) と、
を含み、

該システムは、

流体が、第1および第2のLTPを経由して、該システムを通じてバイオリアクタから、またはバイオリアクタに向かって、

第1と第2の導管およびTFFユニットを通じて、反転可能に流通できるように、

濾過液が、TFFユニットから収集できるように構成されており、

該第1のLTPは、哺乳動物細胞培養物を第1の流れの向きで流通させ、該第2の

10

20

L T P は、哺乳動物細胞培養物を第 2 の流れの向きで流通させる、工程と、

(b) 哺乳動物細胞培養物を、バイオリアクタから T F F ユニットを通じて、第 1 の L T P を用いて第 1 の流れの向きで第 1 の期間流通させる工程と、

(c) 第 1 の流れの向きを反転させ、哺乳動物細胞培養物を、T F F ユニットを通じて、第 2 の L T P を用いて第 2 の流れの向きで第 2 の期間流通させる工程と、

(d) 第 2 の流れの向きを反転させ、哺乳動物細胞培養物を、T F F ユニットを通じて、第 1 の L T P を用いて第 1 の流れの向きで第 3 の期間流通させる工程と、

(e) 工程 (c) ~ (d) を少なくとも 2 回繰り返す工程と、

(f) 濾過液を収集する工程と、

10

を含む前記方法。

【請求項 2】

T F F ユニットは、管状クロスフローフィルタのような単一のクロスフローフィルタを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

T F F ユニットは、2 つまたはそれ以上のクロスフローフィルタを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

システムは、第 1 の導管、第 2 の導管、またはその両方に配置された 1 つまたはそれ以上の追加の T F F ユニットを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

第 1 および / または第 2 の L T P は、第 1 の導管もしくは第 2 の導管、またはその両方に配置されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

第 1 および / または第 2 の L T P は、任意の 2 つの T F F ユニットの間にシステム内に配置されている、請求項 4 に記載の方法

【請求項 7】

第 1 および / または第 2 の L T P は、バイオリアクタ内で、第 1 または第 2 の流体導管の近位に配置されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

30

(i) 濾過液は、哺乳動物細胞を含まない、および / または

(ii) 哺乳動物細胞培養物は、分泌型組み換えタンパク質を含み、濾過液は、該分泌型組み換えタンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

分泌型組み換えタンパク質は、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、増殖因子、サイトカイン、もしくは酵素、またはその組合せである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

酵素が - ガラクトシダーゼである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

分泌型組み換えタンパク質を濾過液から単離する工程をさらに含み；および
場合により、単離する工程は、少なくとも 1 つのマルチカラムクロマトグラフィシステム (M C C S) を通じて単離する工程を含む、一体化した連続的なプロセスを用いて実行される、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 12】

単離した組み換えタンパク質を、薬学的に許容される賦形剤またはバッファーと混合することにより、治療用原薬を処方する工程をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

哺乳動物細胞培養物もしくは濾過液、またはその両方は、滅菌状態にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

50

開回路濾過システムであって、
バイオリアクタと、
第 1 および第 2 の入口を有するタンジェントフロー濾過（TFF）ユニットと、
バイオリアクタと TFF ユニットの第 1 の入口との間で流体連通している第 1 の導管と、
バイオリアクタと TFF ユニットの第 2 の入口との間で流体連通している第 2 の導管と、
該システム内に配置された第 1 および第 2 の低乱流ポンプ（LTP）と、
を含み、

第 1 および第 2 の LTP ポンプを作動させると、流体は該システムを通じて反転可能に流通し、バイオリアクタから、第 1 の導管、TFF ユニットの第 2 の導管を経由して、バイオリアクタに戻り、

該第 1 の LTP は、哺乳動物細胞培養物を第 1 の流れの向きで流通させるように適用され、該第 2 の LTP は、哺乳動物細胞培養物を第 2 の流れの向きで流通させるように適用されている、
前記システム。

【請求項 15】

第 1 の導管、第 2 の導管、またはその両方に配置された 1 つまたはそれ以上の追加の TFF ユニットの含む、請求項 14 に記載の開回路濾過システム。

【請求項 16】

第 1 および第 2 の LTP は、第 1 の導管もしくは第 2 の導管、またはその両方に配置されている、請求項 14 に記載の開回路濾過システム。

【請求項 17】

濾過液貯蔵タンク、および TFF ユニットの該濾過液貯蔵タンクとの間で流体連通している濾過液導管をさらに含む、請求項 14 に記載の開回路濾過システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013 年 9 月 16 日付け出願の米国仮特許出願第 61/878,502 号に対する優先権を主張し、その全内容を参照によって本明細書に組み入れる。

【0002】

本発明は、細胞培養物を処理する方法およびバイオテクノロジー、ならびにより具体的には、灌流バイオリアクタ内で細胞培養物を連続的に処理する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

哺乳動物細胞は、治療用タンパク質を製造するのに多くの場合用いられる。いくつかの処理法では、哺乳動物細胞は、灌流バイオリアクタ内で培養され、組み換えタンパク質を含むある容積の細胞培養物がバイオリアクタから除去され、そして新規培養培地が添加されてその容積に置き換わる。かかる灌流式培養法では、除去された細胞培養物は多くの場合濾過され、哺乳動物細胞がさらなる組み換えタンパク質製造用として、バイオリアクタ内で保持される一方、組み換えタンパク質を含む培養培地（時に「使用済み培地」と呼ばれる）が回収される。

【0004】

灌流バイオリアクタから細胞培養物を濾過する従来の方法およびデバイスは、いくつかの欠点を有する。例えば、閉システムの交互タンジェントフロー濾過（ATF）では、細胞培養物がバイオリアクタにより管理された増殖条件外で長時間（長期外部滞留時間）を費やすこととなり、また逆流を伴わない伝統的な一方向タンジェントフロー濾過（TFF）では、フィルタ汚損が生じる。したがって、従来の灌流バイオリアクタ法は、細胞培養物がバイオリアクタにより管理された増殖条件外で長時間を費やすことと多くの場合関係

10

20

30

40

50

し、生存細胞密度、生存率(%)、および培養物の比生産性および容積生産性の低下を引き起こす。さらに、従来法は、多くの場合システムフィルタのフラッシングが不完全となり、フィルタ汚損を引き起こす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本出願者らは、クロスフローフィルタ表面を横断する反転可能なタンジェント流体フローをもたらす開回路濾過システム(open circuit filtration system)は、従来型の一方向開回路または二方向閉回路濾過システムとは異なり、生存細胞密度の増加、生存細胞率(%)の増加、比生産性および/または容積生産性の増加、比グルコース消費量の増加、およびフィルタ汚損の低減をもたらすことを発見した。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本明細書に提示する開回路濾過システムは、例えば他の一方向開回路濾過システム(例えば、一方向TFFシステム)、または二方向閉回路濾過システム(閉回路ATF(商標)システム)と比較して、組み換えタンパク質の生成および収率について、最適条件、例えば1つもしくはそれ以上の細胞培養物の外部容積(リザーバの外部)の減少、交換分画(例えば、第1の導管、TFFユニット、および第2の導管内)の増加、細胞培養物の外部(リザーバ外部)滞留時間の短縮、細胞培養物濾過中の剪断応力の低下、細胞培養物中の細胞生存率の改善、細胞培養物中の生存細胞密度の向上、および/またはフィルタ汚損の減少(フィルタのより良好なフラッシングに起因する)をもたらす。したがって、リザーバ(例えば、バイオリアクタ)、第1および第2の入口を有するタンジェントフロー濾過(TFF)ユニット、リザーバとTFFユニットの第1の入口との間で流体連通している第1の導管、ならびにリザーバとTFFユニットの第2の入口との間で流体連通している第2の導管、ならびに少なくとも1つのポンプが作動すると、流体がシステムを通じて反転可能に流通し、リザーバから第1の導管、TFFユニット、第2の導管を経由してリザーバに戻るようにシステム内に配置された少なくとも1つのポンプを含む開回路濾過システムが本明細書で提供される。細胞培養物を処理する方法であって、(a)開回路濾過システム(例えば、本明細書に記載するいずれかの開回路濾過システム)を提供する工程、(b)細胞培養物を、リザーバからTFFユニットを通じて、第1の流れの向きで第1の期間流通させる工程、(c)第1の流れの向きを反転させ、細胞培養物を、TFFユニットを通じて、第2の流れの向きで第2の期間流通させる工程、(d)第2の流れの向きを反転させ、培養物を、TFFユニットを通じて、第1の流れの向きで第3の期間流通させる工程、(e)工程(c)~(d)を少なくとも2回繰り返す工程、および(f)濾過液を収集する工程を含む、方法も提供される。

20

30

【0007】

細胞培養物を処理する方法が本明細書で提供される。これらの方法は以下の工程を含む：(a)開回路濾過システムを提供する工程であって、該システムは、細胞培養物を含むリザーバ、第1および第2の入口を有するタンジェントフロー濾過(TFF)ユニット、リザーバとTFFユニットの第1の入口との間で流体連通している第1の導管、ならびにリザーバとTFFユニットの第2の入口との間で流体連通している第2の導管、ならびに該システムを通じて流体を流通させるための、該システム内に配置された少なくとも1つのポンプを含み、ここで、該システムは、流体が、少なくとも1つのポンプを経由して、システムを通じてリザーバから、またはリザーバに向かって、第1および第2の導管およびTFFユニットを通じて、反転可能に流通可能できるように、濾過液が、TFFユニットから収集できるように構成されている、工程；(b)細胞培養物を、リザーバからTFFユニットを通じて、第1の流れの向きで第1の期間流通させる工程、(c)第1の流れの向きを反転させ、細胞培養物を、TFFユニットを通じて、第2の流れの向きで第2の期間流通させる工程；(d)第2の流れの向きを反転させ、培養物を、TFFユニットを通じて、第1の流れの向きで第3の期間流通させる工程；(e)工程(c)~(d)を少

40

50

なくとも2回繰り返す工程；ならびに（f）濾過液を収集する工程。いくつかの例では、リザーバは、バイオリアクタまたは冷蔵貯蔵タンクである。いくつかの例では、第1および第2の導管の一方または両方は、生体適合性チューブを含む。TFFユニットは、単一のクロスフローフィルタ（例えば、管状クロスフローフィルタ）を含んでもよく、2つまたはそれ以上のクロスフローフィルタを含んでもよい。

【0008】

いくつかの例では、システムは、第1の導管、第2の導管、またはその両方に配置された1つまたはそれ以上の追加のTFFユニットを含む。いくつかの例では、クロスフローフィルタは、約0.2マイクロメートルの平均ポアサイズを有する。

【0009】

いくつかの例では、少なくとも1つのポンプが、第1の導管または第2の導管、またはその両方に配置されている。さらなる例では、少なくとも1つのポンプが、任意の2つのTFFユニット間でシステム内に配置されている。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのポンプが、リザーバ内で、第1または第2の流体導管の近位に配置されている。本明細書に記載するすべての方法のいくつかの実施形態では、少なくとも1つのポンプは、低乱流ポンプ（LTP）（例えば、蠕動ポンプ）である。いくつかの例では、システムは、第1および第2のLTPを含み、第1のLTPは、細胞培養物を第1の方向で流通させ、第2のLTPは、細胞培養物を第2の方向で流通させる。いくつかの実施形態では、システムは、単一のLTPを含み、該単一のLTPは、細胞培養物を第1の方向で第1および第3の期間中流通させ、細胞培養物を第2の方向で第2の期間中流通させる。

【0010】

本明細書に記載するどの方法でも、第1、第2、および第3の期間は、約30秒～約15分である。いくつかの実施形態では、細胞培養物は、（a）、（b）、および（c）のうちの1つまたはそれ以上において、約0.5L/分～約80L/分（例えば、約3.0L/分～約60L/分）の速度で流通する。

【0011】

いくつかの実施形態では、（b）および（c）を単回反復すると、その結果、交換分画は50%を上回る。いくつかの例では、濾過液は、哺乳動物細胞を含まない。いくつかの実施形態では、細胞培養物は、分泌型組み換えタンパク質を含み、濾過液は、分泌型組み換えタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、分泌型組み換えタンパク質は、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、増殖因子、サイトカイン、もしくは酵素、またはその組合せである。いくつかの実施形態は、分泌型組み換えタンパク質を濾過液から単離する工程をさらに含む。例えば、単離する工程は、少なくとも1つのマルチカラムクロマトグラフィシステム（MCCS）を通じて単離する工程を含む、一体化した連続プロセスを用いて実施可能である。いくつかの実施形態は、単離された組み換えタンパク質を薬学的に許容される賦形剤またはバッファーと混合することにより治療用原薬を処方する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養物または濾過液またはその両方は、滅菌状態にある。いくつかの例では、方法は、約14日間～約80日間、連続的に実施される。

【0012】

リザーバ、第1および第2の入口を有するタンジェントフロー濾過（TFF）ユニット、リザーバとTFFユニットの第1の入口との間で流体連通している第1の導管、ならびにリザーバとTFFユニットの第2の入口との間で流体連通している第2の導管、ならびにシステム内に配置された少なくとも1つのポンプを含み、該少なくとも1つのポンプを作動すると、流体がシステムを通じて反転可能に流通し、リザーバから、第1の導管、TFFユニット、第2の導管を経由して、リザーバに戻る、開回路濾過システムも提供される。いくつかの例では、リザーバは、バイオリアクタまたは冷蔵貯蔵タンクである。いくつかの実施形態では、第1および第2の導管の一方または両方は、生体適合性チューブを含む。いくつかの実施形態では、TFFユニットは、単一のクロスフローフィルタ（例えば、管状クロスフローフィルタ）を含む。いくつかの実施形態では、TFFユニットは、2つまたはそれ以上のクロスフローフィルタを含む。いくつかの例では、システムは、第

10

20

30

40

50

1の導管、第2の導管、またはその両方に配置された1つまたはそれ以上の追加のTFFユニットを含む。いくつかのシステムでは、クロスフローフィルタは、約0.2マイクロメートルの平均ポアサイズを有する。

【0013】

本明細書に記載するシステムのいくつかの実施形態では、少なくとも1つのポンプが、第1の導管または第2の導管、またはその両方に配置される。他の実施形態では、少なくとも1つのポンプが、任意の2つのTFFユニット間でシステム内に配置される。他の例では、少なくとも1つのポンプが、リザーバ内で、第1または第2の流体導管の近位に配置される。本明細書に記載するどのシステムでも、少なくとも1つのポンプは、低乱流ポンプ(LTP)(例えば、蠕動ポンプ)である。いくつかの実施形態では、システムは、第1および第2のLTPを含み、第1のLTPは、細胞培養物を第1の流れの向きで流通させるように適用されており、第2のLTPは第1の流れの向きを反転させ、細胞培養物を第2の流れの向きで流通させるように適用されている。他の実施形態では、システムは、細胞培養物を第1および第2の流れの向きで反転可能に流通させるように適用された単一のLTPを含む。いくつかの実施形態では、蠕動ポンプのポンプヘッド容積は、約20mL~約250mLである。

【0014】

本明細書に記載するシステムのいくつかの実施形態は、濾過液貯蔵タンク、およびTFFユニットと濾過液貯蔵タンクとの間で流体連通している濾過液導管をさらに含む。本明細書に記載するシステムのいくつかの実施形態は、生物学的製造システムをさらに含み、同システムは、少なくとも1つのマルチカラムクロマトグラフィシステム(MCCS)および入口および出口、TFFユニットと生物学的製造システムの入口との間で流体連通している濾過液導管を含み、デバイスは、濾過液が、少なくとも1つのMCCSを通じて生物学的製造システムの入口に流入し、生物学的製造システムの出口を通じてデバイスから退出するように構成されている。本明細書に記載するどのシステムでも、TFFユニットは、ハウジング内に配置される。

【0015】

本明細書で用いる場合、名詞の前の単語「1つの(a)」または「複数の(plurality)」は、1つまたはそれ以上の特定の名詞を表す。例えば、慣用句「哺乳動物細胞」は、「1つまたはそれ以上の哺乳動物細胞」を表し、慣用句「複数のマイクロキャリア」は、「1つまたはそれ以上のマイクロキャリア」を意味する。

【0016】

用語「哺乳動物細胞」とは、任意の哺乳動物(例えば、ヒト、ハムスター、マウス、ミドリザル、ラット、ブタ、ウシ、またはウサギ)から得られた細胞、またはそれに由来する任意の細胞を意味する。いくつかの実施形態では、哺乳動物細胞は、例えば、不死化細胞、分化細胞、または未分化細胞であり得る。

【0017】

用語「細胞培養物」とは、液体培養培地(例えば、本明細書に記載するいずれかの液体培養培地)に懸濁した複数の哺乳動物細胞(例えば、本明細書に記載するいずれかの哺乳動物細胞)を意味する。細胞培養物の細胞密度は、細胞約 0.1×10^6 個/mL超(例えば、細胞約 1×10^6 個/mL超、細胞約 5×10^6 個/mL超、細胞約 10×10^6 個/mL超、細胞約 15×10^6 個/mL超、細胞約 20×10^6 個/mL超、細胞約 25×10^6 個/mL超、細胞約 30×10^6 個/mL超、細胞約 35×10^6 個/mL超、細胞約 40×10^6 個/mL超、細胞約 45×10^6 個/mL超、細胞約 50×10^6 個/mL超、細胞約 55×10^6 個/mL超、細胞約 60×10^6 個/mL超、細胞約 65×10^6 個/mL超、細胞約 70×10^6 個/mL超、細胞約 75×10^6 個/mL超、細胞約 80×10^6 個/mL超、細胞約 85×10^6 個/mL超、細胞約 90×10^6 個/mL超、細胞約 95×10^6 個/mL超、または細胞約 100×10^6 個/mL超)であり得る。いくつかの例では、細胞培養物中に存在する哺乳動物細胞は、マイクロキャリア(例えば、本明細書に記載するいずれかのまたは当技術分野において公知のマイクロ

キャリア)に結合している。

【0018】

用語「バイオリアクタ」とは、当技術分野で公知であり、液体培養培地中で哺乳動物細胞の維持または増殖を可能にする管理された一連の物理的条件下で、細胞培養物をインキュベーションすることができる容器を意味する。例えば、バイオリアクタは、細胞培養物中の哺乳動物細胞が組み換えタンパク質を生成および分泌できるようにする条件下で、細胞培養物をインキュベーションすることができる。例えば、バイオリアクタは、 O_2 および N_2 スパージ、保温ジャケット、1つまたはそれ以上の流体ポート、ならびに攪拌システムを一般的に含む。バイオリアクタの非限定的な例は、本明細書に記載されている。さらなるバイオリアクタの例は、当技術分野において公知である。

10

【0019】

用語「開回路濾過システム」とは、リザーバ(例えば、バイオリアクタ)、およびリザーバより開始し、かつそこで終わる連続的な閉じた流体ループを意味し、同システムはTFFユニットを含み、閉じた流体ループ内の流体(例えば、細胞培養物)は、TFFユニットを通じてリザーバ(第1または第2の流れの向きで)に流入およびそこから流出して、リザーバに戻ることができる。開回路濾過システムは、流体(例えば、細胞培養物)を、TFFユニットを通じてリザーバに、かつ/またはそこからポンプ搬送し、リザーバに戻すのに適する少なくとも1つのポンプも含む。

【0020】

用語「タンジェントフロー濾過ユニット」または「TFFユニット」とは、当技術分野で公知あり、少なくとも1つのハウジング(シリンダー等)、およびフィルタ表面の大部分が、ユニットを経由する流体(例えば、細胞培養物)の流れと並行して位置するように、ハウジング内に位置する少なくとも1つのクロスフローフィルタを含むデバイス意味する。TFFユニットは、当技術分野において周知であり、商業的に入手可能である。代表的な市販のTFFユニットとして、Minimate(商標)TFFカプセル(Pall Corporation)、Vivaflow(登録商標)50および200システム(Sartorius)、BioCap25、E0170、E0340、およびE1020カプセル(3M)、ならびにATF4フィルタ(Refine Technology)が挙げられる。ハウジングは、例えば流体が第1の入口/出口を通過し、少なくとも1つのクロスフローフィルタを横断し、第2の入口/出口を通過できるように位置する第1の入口/出口および第2の入口/出口を含み得る。いくつかの例では、開回路濾過システムは、例えば直列および/または並列に接続された複数のTFFユニットを含み得る。例えば、2つまたはそれ以上のTFFユニットを含むシステムは、システム内で隣接して対をなすTFFユニットを流体連結する流体導管を含み得る。他の例では、システムは、流体導管により流体連結した2つまたはそれ以上のTFFユニットからなる2つまたはそれ以上のセットを含み得る。本明細書に記載するまたは当技術分野において公知のどのTFFユニットも、第1の流れの向きおよび第2の流れの向きで流体を受け入れる能力を有する。

20

30

【0021】

用語「クロスフローフィルタ」とは、当技術分野において公知であり、TFFユニット内に配置可能なように設計されたフィルタを意味し、同フィルタは、フィルタ表面の大部分が、流体(例えば、細胞培養物)の流れ(例えば、第1および第2の流れの向き)に対して並行となるように配置可能である。例えば、クロスフローフィルタは、タンジェントフロー濾過を可能にする任意の形状、例えば管状または長方形の形状を有し得る。特に有用なクロスフローフィルタは、流体がクロスフローフィルタの表面を横断して第1および第2の方向で流通する際に、流体(例えば、細胞培養物)にもたらされる流体の乱れまたは剪断応力の量が低くなるように設計される。クロスフローフィルタは、例えばSartorius、Membrapure、Millipore、およびPall Corporationから市販されている。

40

【0022】

50

用語「低乱流ポンプ」または「LTP」とは、当技術分野において公知であり、流体（例えば、細胞培養物）を、単一の方向（例えば、第1または第2の流れの向き）で、システム内を移動させることができる、または流体（例えば、細胞培養物）内で相当量の剪断応力または流体の乱れを誘発することなく、流体（例えば、細胞培養物）を、2つの方向（第1および第2の流れの向き）でシステム内を反転可能に流通させることができるデバイスを意味する。LTPが、第1と第2の流れの向きを切り替えて流体（例えば、細胞培養物）を流通させるのに用いられる場合、第2の流れの向きは、第1の流れの向きとほぼ逆方向である。LTPの例として、蠕動ポンプが挙げられる。他のLTPの例は、当技術分野において公知である。

【0023】

10

用語「流れを反転させる」または「流れの向きを反転させる」は、当業者に周知である。例えば、当業者は、流体の流れを反転させるとは、流体の全体的な流れの向きを、全体的な流れの向き（例えば、本明細書に記載するあらゆる方法またはシステム内の細胞培養物の流れの向き）とは一般的に逆方向に変更することを意味すると認識する。

【0024】

用語「交換分画」とは、第1の方向で第1の期間、流体をリザーバの外部にある開回路濾過システムの構成要素を通じて流通させ（例えば、第1の導管、少なくとも1つのTFFユニット、および第2の導管を通じて）、流体を第2の方向で第2の期間流通させた後、リザーバに帰着する流体（例えば、細胞培養物）の割合を意味する。

【0025】

20

用語「実質的に含まない」とは、特定の物質（例えば、哺乳動物細胞または宿主哺乳動物細胞タンパク質または核酸）に関して、少なくともまたは約90%含まない（例えば、少なくとももしくは約95%、96%、97%、98%、または少なくとももしくは約99%含まない、または約100%含まない）組成物（例えば、液体または固体）を意味する。例えば、本明細書に記載する方法を用いて生成した濾過液は、哺乳動物細胞またはマイクロキャリアを実質的に含まないものとすることができる。別の例では、本明細書に記載するいずれかのプロセスを用いて単離された組み換えタンパク質は、宿主哺乳動物細胞タンパク質、核酸、および/または汚染性ウイルスを実質的に含まないものとすることができる。

【0026】

30

用語「培養」または「細胞培養」とは、管理された一連の物理的条件下の液体培養培地中での哺乳動物細胞の維持または増殖を意味する。

【0027】

用語「液体培養培地」とは、培地中、*in vitro*で哺乳動物細胞が増殖するのを可能にする、十分な栄養分を含む流体を意味する。例えば、液体培養培地は、アミノ酸（例えば、20種類のアミノ酸）、プリン（例えば、ヒポキサンチン）、ピリミジン（例えば、チミジン）、コリン、イノシトール、チアミン、葉酸、ピオチン、カルシウム、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チミジン、シアノコバラミン、ピルビン酸、リポ酸、マグネシウム、グルコース、ナトリウム、カリウム、鉄、銅、亜鉛、セレンウム、および他の必須微量元素、および重炭酸ナトリウムのうちの1つまたはそれ以上を含み得る。液体培養培地は、哺乳動物由来の血清を含み得る。いくつかの事例では、液体培養培地は、哺乳動物由来の血清または別の抽出物を含まない（定義された液体培養培地）。液体培養培地は、微量元素、哺乳動物の成長ホルモン、および/または哺乳動物の増殖因子を含み得る。液体培養培地の非限定的な例は、本明細書に記載されており、追加の例は、当技術分野において公知であり、商業的に入手可能である。

40

【0028】

用語「マイクロキャリア」とは、哺乳動物細胞（例えば、本明細書に記載するまたは当技術分野において公知の哺乳動物細胞のいずれか）の付着を許容するまたは促進する表面を備える、サイズが20 μm ~ 約1000 μm である粒子（例えば、有機ポリマー）を意味する。マイクロキャリアは、1つまたはそれ以上のポア（例えば、平均直径が約10 μ

50

m ~ 約 100 μ m のポア) を含み得る。マイクロキャリアの非限定的な例は、本明細書に記載されている。マイクロキャリアの追加の例は、当技術分野において公知である。マイクロキャリアは、例えばポリマー (例えば、セルロース、ポリエチレングリコール、またはポリ - (乳酸 - c o - グリコール酸)) を含み得る。

【0029】

用語「動物由来成分を含まない液体培養培地」とは、動物に由来するあらゆる成分 (例えば、タンパク質または血清) を含まない液体培養培地を意味する。

【0030】

用語「血清を含まない液体培養培地」とは、動物血清を含まない液体培養培地を意味する。

【0031】

用語「血清含有液体培養培地」とは、動物血清を含む液体培養培地を意味する。

【0032】

用語「化学的に定義された液体培養培地」とは、実質的にすべての化学成分が既知である液体培養培地を意味する。例えば、化学的に定義された液体培養培地は、ウシ胎仔血清、ウシ血清アルブミン、またはヒト血清アルブミンを含まないが、それは、これらの調製物は、アルブミンや脂質からなる複雑な混合物を一般的に含むためである。

【0033】

用語「タンパク質を含まない液体培養培地」とは、タンパク質 (例えば、検出可能なあらゆるタンパク質) を一切含まない液体培養培地を意味する。

【0034】

用語「免疫グロブリン」とは、免疫グロブリンタンパク質 (例えば、可変ドメイン配列、フレームワーク配列、または定常ドメイン配列) の少なくとも15個のアミノ酸 (例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または100個のアミノ酸) からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。免疫グロブリンは、例えば軽鎖免疫グロブリンの少なくとも15個のアミノ酸、および/または重鎖免疫グロブリンの少なくとも15個のアミノ酸を含み得る。免疫グロブリンは、単離された抗体 (例えば、IgG、IgE、IgD、IgA、またはIgM) であり得る。免疫グロブリンは、IgGのサブクラス (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4) であり得る。免疫グロブリンは、抗体フラグメント、例えばFabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、またはscFvフラグメントであり得る。免疫グロブリンは、二重特異性抗体または三重特異性抗体、または二量体、三量体、または多量体抗体、または二機能性抗体、Affibody (登録商標)、またはNanobody (登録商標) でもあり得る。免疫グロブリンは、少なくとも1つの免疫グロブリンドメイン (例えば、融合タンパク質) を含む工学的に作出されたタンパク質でもあり得る。免疫グロブリンの非限定的な例は、本明細書に記載されており、免疫グロブリンの追加の例は、当技術分野において公知である。

【0035】

用語「タンパク質フラグメント」または「ポリペプチドフラグメント」は、長さが少なくとももしくは約4個のアミノ酸、例えば少なくとももしくは約5個のアミノ酸、少なくとももしくは約6個のアミノ酸、少なくとももしくは約7個のアミノ酸、少なくとももしくは約8個のアミノ酸、少なくとももしくは約9個のアミノ酸、少なくとももしくは約10個のアミノ酸、少なくとももしくは約11個のアミノ酸、少なくとももしくは約12個のアミノ酸、少なくとももしくは約13個のアミノ酸、少なくとももしくは約14個のアミノ酸、少なくとももしくは約15個のアミノ酸、少なくとももしくは約16個のアミノ酸、少なくとももしくは約17個のアミノ酸、少なくとももしくは約18個のアミノ酸、少なくとももしくは約19個のアミノ酸、または少なくとももしくは約20個のアミノ酸、または長さが20個を超えるアミノ酸であるポリペプチド配列の一部を意味する。組み換えタンパク質フラグメントは、本明細書に記載するいずれかの方法を用いて生成可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 6 】

用語「工学的に作出されたタンパク質」とは、生物（例えば、哺乳動物）内に存在する内因性の核酸により本来コードされたものではないポリペプチドを意味する。工学的に作出されたタンパク質の例として、酵素（例えば、工学的に作出された酵素の安定性および／または触媒活性の増加を引き起こす、１つまたはそれ以上のアミノ酸置換、欠損、挿入、または付加を伴う）、融合タンパク質、抗体（例えば、二価抗体、三価抗体、または二機能性抗体）、および少なくとも１つの組み換えスキャフォールド配列を含む抗原結合タンパク質が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

ある特定の文脈において、用語「単離する（*isolate*）」または「単離すること（*isolating*）」とは、濾過液（例えば、本発明に記載されている方法を用いて生成される濾過液）中に存在する１つまたはそれ以上の他の成分、例えば濾過液中に存在するDNA、RNA、および／または他のタンパク質からなる１つまたはそれ以上の成分から、組み換えタンパク質を、少なくとも部分的に精製する、または精製する（例えば、重量として、少なくとももしくはは約５％、例えば少なくとももしくはは約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとももしくはは約９５％純粋に）ことを意味する。濾過液からタンパク質を単離するための非限定的な方法は、本明細書に記載されており、他は当技術分野において公知である。

【 0 0 3 8 】

用語「分泌型タンパク質」または「分泌型組み換えタンパク質」とは、哺乳動物細胞内で翻訳された際に、少なくとも１つの分泌シグナル配列を当初含んでいたが、分泌シグナル配列が、少なくとも部分的に、哺乳動物細胞内で酵素的に切断されることにより、細胞外空間（例えば、液体培養培地）に少なくとも部分的に放出されるタンパク質または組み換えタンパク質を意味する。

【 0 0 3 9 】

慣用句「グラジエント灌流（*gradient perfusion*）」とは、当技術分野で公知であり、培養期間中の増加性の期間（例えば、約２４時間、約１分～約２４時間、または２４時間を上回る期間）における、当初の培養容積から除去され、またこれに添加されて培養培地容積に生じた増加性の変化（例えば、増加または減少）を指す（例えば、１日当たりの培養培地の再供給速度）。１日当たり、除去および置き換えられる培地の分画は、培養される特定の細胞、初期の播種密度、および特定の時点における細胞密度に応じて変化し得る。

【 0 0 4 0 】

本明細書で用いられる「比生産率」または「SPR」とは、１日当たり哺乳動物細胞１個から生成される組み換えタンパク質の質量または酵素活性を指す。組み換え抗体のSPRは、質量／細胞／日として通常測定される。組み換え酵素のSPRは、ユニット／細胞／日または（ユニット／質量）／細胞／日として通常測定される。

【 0 0 4 1 】

本明細書で用いられる「容積生産性率」または「VPR」とは、１日当たり培養物１容積当たり（例えば、バイオリアクタ、容器、またはチューブ容積１Ｌ当たり）生成される組み換えタンパク質の質量または酵素活性を指す。組み換え抗体のVPRは、質量／Ｌ／日として通常測定される。組み換え酵素のVPRは、ユニット／Ｌ／日または質量／Ｌ／日として通常測定される。

【 0 0 4 2 】

別段規定されていなければ、本明細書で用いられるすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解される意味と同一の意味を有する。方法および材料は、本発明での使用を目的として本明細書に記載されている；当技術分野において公知の他の適する方法および材料も使用可能である。材料、方法、および例は単に説明目的であり、制限することを意図しない。本明細書に記載されるすべての出版物

10

20

30

40

50

、特許出願、特許、配列、データベース登録、および他の参考資料を、そのまま参照によって組み入れる。矛盾する場合、定義を含め、本明細書が統制する。

【0043】

本発明のその他の特徴および長所は、下記の詳細な説明および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】細胞培養物を処理するのに使用可能である代表的な開回路濾過システムを示す概略図である。示すようなシステムは、第1の導管6内に配置された単一のポンプ8を含む。

10

【図2】第2の導管7内に配置された単一のポンプ8を含む代表的な開回路濾過システムを示す概略図である。

【図3】リザーバ2（例えば、バイオリアクタ）内で、第1の導管6の近位に配置された単一のポンプ8を含む代表的な開回路濾過システムを示す概略図である。

【図4】2つのTFFユニット3を含み、各ユニットは、2つのクロスフローフィルタ12を含む代表的な開回路濾過システムを示す概略図であり、この場合、2つのTFFユニット3は、第3の導管14により流体連結しており、単一のポンプ8は、第3の導管14内に配置されている。

【図5】第2の導管7内に配置された単一のポンプ8を含み、ならびにいくつかの圧力センサ14、および流量計15を含む代表的な開回路濾過システムを示す概略図である。

20

【図6】第1の導管6内に配置されたポンプ8、および第2の導管7内に配置されたポンプ8を含む代表的な開回路濾過システムを示す概略図である。

【図7】リザーバ2ならびに第1および第2のサブシステム19を含む、代表的な開回路濾過システムを示す概略図である。

【図8】代表的なシステムの第1の流れの向きを示す概略図である。

【図9】第1の期間において第1の流れの向き、期間(t_{r1})において第1の流れの向きとは逆の細胞培養物の流れ、第2の期間(t_2)において第2の流れの向き、期間(t_{r2})において第2の流れの向きとは逆の細胞培養物の流れ、および第3の期間(t_3)において第1の流れの向きの細胞培養物の流れを示す図である。ダイアグラムFでは、細胞培養物の流速(L/分)を示す。

30

【図10】本明細書に記載する方法(GC2008 Set6 TFF V24; グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology)濾過法(GC2008 Set5 ATF(商標)V21; 黒)を用いて処理した細胞培養物における生存細胞密度のグラフである。

【図11】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology)濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物中の生存細胞の割合のグラフである。

【図12】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology)濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物のキャパシタンス(pF)のグラフである。

40

【図13】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology)濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の平均生存細胞直径のグラフである。

【図14】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、およびATF(商標)(Refine Technology)濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物において検出された分泌型免疫グロブリン(IgG)のグラフである。

【図15】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、およびATF(商標)(Refine Technology)濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の容積生産性(g/L/d)のグラフである。

【図16】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、およびATF(商標)(Ref

50

ine Technology) 濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の比生産性($\text{pg}/\text{細胞}/\text{日}$)のグラフである。

【図17】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology) 濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の篩係数(%)のグラフである。

【図18】本明細書に記載する方法(GC2008 Set6 TFF V24)(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology) 濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の比グルコース消費量($\text{ng}/\text{細胞}/\text{日}$)のグラフである。

【図19】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology) 濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の比乳酸生成量($\text{ng}/\text{細胞}/\text{日}$)のグラフである。

【図20】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology) 濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物の比好気性グルコース消費量($\text{cpmol}/\text{細胞}/\text{時間}$)のグラフである。

【図21】本明細書に記載する方法(グレー)を用いて、またはATF(商標)(Refine Technology) 濾過法(黒)を用いて処理した細胞培養物のグルコースからの乳酸収率(mol/mol)のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0045】

リザーバ、第1および第2の入口を有するTFFユニット、リザーバとTFFユニットの第1の入口との間で流体連通している第1の導管、ならびにリザーバとTFFユニットの第2の入口との間で流体連通している第2の導管、ならびにシステム内に配置された少なくとも1つのポンプを含む、開回路濾過システムであって、少なくとも1つのポンプが作動すると、流体は、システムを通じて反転可能に流通し、リザーバから流体導管、TFFユニット、第2の導管を経由してリザーバに戻る、開回路濾過システムが本明細書で提供される。開回路濾過システム(例えば、本明細書に記載する任意の開回路濾過システムのいずれか)を使用する工程を含む、細胞培養物を処理する方法も提供される。本明細書に記載するシステムおよび方法は、例えば、細胞培養物を処理する間に、高い細胞生存率および/または細胞生存率(%)をもたらす。本明細書で提示するシステムおよび方法に関する追加の利点を以下に記載する。

【0046】

開回路濾過システム

本明細書は、本明細書に記載する方法を実施するのに有用な代表的な開回路濾過システムを提示する。これらのシステムは、少なくとも1つのポンプ(システム内の)が作動すると、流体は、システムを通じて反転可能に流通し、リザーバから第1の導管、TFFユニット、第2の導管を経由してリザーバに戻るように設計される。

【0047】

代表的な単一ポンプシステム

システム1の非限定的な例を、図1に記載する。システム1は、リザーバ2、例えばバイオリアクタ、第1の導管6、第2の導管7、ならびにハウジング11および単一のクロスフロー管状フィルタ12、第1の入口4、および第2の入口5を含むTFFユニット3を含む。単一のクロスフロー管状フィルタ12は、例えば約 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のポアサイズを有し得る。第1の導管6は、リザーバ2と第1の入口4との間で流体連通している。第2の導管7は、リザーバ2と第2の入口5との間で流体連通している。流体導管6および流体導管7は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。TFFユニット3は、図1に示すような単一のクロスフロー管状フィルタ12、または2つもしくはそれ以上のクロスフローフィルタを含み得る。

【0048】

図1のシステム1は、第1の導管6内に配置されたポンプ8、例えば蠕動ポンプ等の低

10

20

30

40

50

乱流ポンプ（ＬＴＰ）も含む。作動すると、ポンプ８は、流体を、システムを通じて反転可能に流通させ、リザーバ２から第１の導管６、ＴＦＦユニット３、第２の導管７を経由してリザーバ２に戻す。ＴＦＦユニット３のハウジング１１は、濾過液出口１３を含む。システム１は、濾過液貯蔵タンク１０および濾過液出口１３と濾過液貯蔵タンク１０との間で流体連通している濾過液導管９も含む。濾過液貯蔵タンク１０は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管９は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。

【００４９】

少なくともＬＴＰがシステムの異なる部分に位置している点を除き、図１に示すシステムと類似した、別の代表的なシステム１を図２に示す。システム１は、リザーバ２、例えばバイオリアクタ、第１の導管６、第２の導管７、ならびにハウジング１１および単一のクロスフロー管状フィルタ１２、第１の入口４、および第２の入口５を含むＴＦＦユニット３を含む。単一のクロスフロー管状フィルタ１２は、例えば約０．２μmのポアサイズを有し得る。第１の導管６は、リザーバ２と第１の入口４との間で流体連通している。第２の導管７は、リザーバ２と第２の入口５との間で流体連通している。流体導管６および流体導管７は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。ＴＦＦユニット３は、図２に示すような単一のクロスフロー管状フィルタ１２を含み得る、または２つもしくはそれ以上セットとなったクロスフローフィルタを含み得る。

【００５０】

図２のシステム１は、第２の導管７内に配置されたポンプ８、例えば蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ（ＬＴＰ）も含む。作動すると、ポンプ８は、流体を、システムを通じて反転可能に流通させ、リザーバ２から第１の導管６、ＴＦＦユニット３、第２の導管７を経由してリザーバ２に戻す。ＴＦＦユニット３のハウジング１１は、濾過液出口１３を含む。システム１は、濾過液貯蔵タンク１０および濾過液出口１３と濾過液貯蔵タンク１０との間で流体連通している濾過液導管９も含む。濾過液貯蔵タンク１０は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管９は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。

【００５１】

追加の代表的なシステム１を、図３に示す。システム１は、リザーバ２、例えばバイオリアクタ、第１の導管６、第２の導管７、ならびにハウジング１１および単一のクロスフロー管状フィルタ１２、第１の入口４、および第２の入口５を含むＴＦＦユニット３を含む。単一のクロスフロー管状フィルタ１２は、例えば約０．２μmのポアサイズを有し得る。第１の導管６は、リザーバ２と第１の入口４との間で流体連通している。第２の導管７は、リザーバ２と第２の入口５との間で流体連通している。流体導管６および流体導管７は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。ＴＦＦユニット３は、図３に示すような単一のクロスフロー管状フィルタ１２を含み得る、または２つもしくはそれ以上セットになったクロスフローフィルタを含み得る。

【００５２】

図３のシステム１は、リザーバ２、例えばバイオリアクタ内で、第１の導管６の近位に配置された単一のポンプ８、例えば蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ（ＬＴＰ）も含む。作動すると、単一のポンプ８は、流体を、システムを通じて反転可能に流通させ、リザーバ２から第１の導管６、ＴＦＦユニット３、第２の導管７を経由してリザーバ２に戻す。ＴＦＦユニット３のハウジング１１は、濾過液出口１３を含む。システム１は、濾過液貯蔵タンク１０および濾過液出口１３と濾過液貯蔵タンク１０との間で流体連通している濾過液導管９も含む。濾過液貯蔵タンク１０は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管９は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。

【００５３】

少なくとも、システムが複数のＴＦＦユニットを含む点を除き、図１～３で説明したシステムと類似した代表的なシステム１を図４に示す。システム１は、リザーバ２、例えばバイオリアクタ、第１の導管６、第２の導管７、および２つのＴＦＦユニット３を含み、

10

20

30

40

50

各 T F F ユニット 3 は以下を含む：ハウジング 1 1、第 1 の入口 4、第 2 の入口 5、および 2 つのクロスフローフィルタ 1 2。2 つの T F F ユニット 3 は、第 3 の導管 1 4 により流体連結している。クロスフローフィルタ 1 2 のそれぞれは、例えば約 0 . 2 μ m のポアサイズを有し得る。第 1 の導管 6 は、リザーバ 2 と 2 つの T F F ユニット 3 のうちの一方の第 1 の入口 4 との間で流体連通しており、第 2 の導管 7 は、リザーバ 2 と 2 つの T F F ユニット 3 のうちの他方の第 2 の入口 5 との間で流体連通している。第 3 の導管は、例えば図 4 に示すように、T F F ユニット 3 の第 2 の入口 5 と他方の T F F ユニット 3 の第 1 の入口 4 との間で流体連通している。流体導管 6、7、および 1 4 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。当業者なら理解できるように、T F F ユニット 3 は、代替的に、単一のクロスフローフィルタ、例えば管状クロスフロー

10

【 0 0 5 4 】

図 4 のシステム 1 は、第 3 の導管 1 4 内に配置された単一のポンプ 8、例えば蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ (L T P) も含む。作動すると、単一のポンプ 8 は、流体を、システムを通じて反転可能に流通させ、リザーバ 2 から第 1 の導管 6、T F F ユニット 3、第 3 の導管 1 4、他方の T F F ユニット 3、第 2 の導管 7 を経由してリザーバ 2 に戻す。2 つの T F F ユニット 3 のそれぞれのハウジング 1 1 は、濾過液出口 1 3 を含む。システム 1 は、2 つの濾過液貯蔵タンク 1 0 および 2 つの濾過液導管 9 も含む。単一の濾過液貯蔵タンク 1 0 のそれぞれは、濾過液導管 9 により T F F ユニット 3 内の濾過液出口 1 3 と流体連結される。濾過液貯蔵タンク 1 0 は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管 9

20

【 0 0 5 5 】

追加の代表的なシステム 1 を図 5 に示す。システム 1 は、リザーバ 2、例えばバイオリアクタ、第 1 の導管 6、第 2 の導管 7、ならびにハウジング 1 1 および単一のクロスフロー管状フィルタ 1 2、第 1 の入口 4、および第 2 の入口 5 を含む T F F ユニット 3 を含む。クロスフローフィルタ 1 2 は、例えば約 0 . 2 μ m のポアサイズ、約 8 3 0 ファイバ / フィルタのファイバカウントを有し、I D が 1 mm および長さが 3 0 c m のファイバを含み、0 . 7 7 m² の濾過面積を有し得る。第 1 の導管 6 は、リザーバ 2 と第 1 の入口 4 との間で流体連通している。第 2 の導管 7 は、リザーバ 2 と第 2 の入口 5 との間で流体連通している。流体導管 6 および 7 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコン

30

【 0 0 5 6 】

図 5 のシステム 1 は、第 2 の導管 7 内に配置された単一のポンプ 8、例えば蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ (L T P) も含む。ポンプ 8 は、ツインチャンネル G O R E S t a - P u r e チューブ (1 6 mm の I D、4 mm の壁) を備えた W a t s o n - M a r l o w 蠕動ポンプ 6 2 0 D u であり得る。作動すると、単一のポンプ 8 は、流体を、システムを通じて反転可能に流通させ、リザーバ 2 から、第 1 の導管 6、T F F ユニット 3、第 2 の導管 7 を経由してリザーバ 2 に戻す。T F F ユニット 3 のハウジング 1 1 は、濾過液出口 1 3 を含む。システム 1 は、濾過液貯蔵タンク 1 0 および濾過液出口 1 3 と濾過液貯蔵タンク 1 0 との間で流体連通する濾過液導管 9 も含む。濾過液貯蔵タンク 1 0 は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管 9 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。システム 1 は、第 1 の導管 6、濾過液導管 9、および第 2 の導管 7 のそれぞれに配置された圧力センサ 1 4 も含む。圧力センサ 1 4 は、P e n d o T E C H P r e s s u r e M A T (商標) 圧力センサであり得る。システム 1 は、第 2 の導管 7 内に配置された流量計 1 5 も含む。流量計 1 5 は、E M - T E C B i o P r o T T、非侵襲式リアルタイム流量計であり得る。

40

【 0 0 5 7 】

図 5 のシステム 1 は、ポート導管 1 6 およびポート 1 7 も含み、ポート導管 1 6 は、第 1 の導管 6 とポート 1 7 との間で流体連通している。システム 1 は、ポート導管 1 6 内に

50

配置されたクランプ 18 も含み得る。ポート 17 およびポート導管 16 は、第 1 の導管 6 を通じてシステム 1 に流体を添加するのに使用可能である。

【0058】

代表的な複数ポンプシステム

2 つのポンプ 8 を含むシステム 1 の非限定的な例を図 6 に示す。システム 1 は、リザーバ 2、例えばバイオリアクタ、第 1 の導管 6、第 2 の導管 7、ならびにハウジング 11 および単一のクロスフロー管状フィルタ 12、第 1 の入口 4、および第 2 の入口 5 を含む TFF ユニット 3 を含む。単一のクロスフロー管状フィルタ 12 は、約 $0.2 \mu\text{m}$ のポアサイズを有し得る。第 1 の導管 6 は、リザーバ 2 と第 1 の入口 4 との間で流体連通している。第 2 の導管 7 は、リザーバ 2 と第 2 の入口 5 との間で流体連通している。流体導管 6 および 7 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。TFF ユニット 3 は、図 6 に示すような単一のクロスフロー管状フィルタ 12 を含み得る、または 2 つもしくはそれ以上セットになったクロスフローフィルタを含み得る。

【0059】

図 6 のシステム 1 は、第 1 の導管 6 内に配置されたポンプ 8、例えば蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ (LTP)、および第 2 の導管 7 内に配置された蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ (LTP)、ポンプ 8 も含む。作動すると、第 1 の導管 6 内に配置されたポンプ 8 は、流体を、システムを通じて第 1 の方向で流通させ、リザーバ 2 から、第 1 の導管 6、TFF ユニット 3、第 2 の導管 7 を経由してリザーバ 2 に戻す。作動すると、第 2 の導管 7 内に配置されたポンプ 8 は、流体を、システムを通じて第 2 の方向 (第 1 の方向とは逆方向) で流通させ、リザーバ 2 から、第 2 の導管 7、TFF ユニット 3、第 1 の導管 6 を経由してリザーバ 2 に戻す。TFF ユニット 3 のハウジング 11 は、濾過液出口 13 を含む。システム 1 は、濾過液貯蔵タンク 10、および濾過液出口 13 と濾過液貯蔵タンク 10 との間で流体連通している濾過液導管 9 も含む。濾過液貯蔵タンク 10 は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管 9 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。

【0060】

2 つまたはそれ以上のサブシステムを含む代表的なシステム

当業者は、複数のサブシステムをシステムに付加可能である認識する。2 つまたはそれ以上のサブシステム 19 を含む代表的なシステム 1 を図 7 に示す。システム 1 は、図 7 に示すように、リザーバ 2 ; ならびに第 1 および第 2 のサブシステム 19 を含み、各サブシステム 19 は、第 1 の導管 6、第 2 の導管 7、ならびにハウジング 11 および単一のクロスフロー管状フィルタ 12、第 1 の入口 4、および第 2 の入口 5 を含む TFF ユニット 3 を含む。単一のクロスフロー管状フィルタ 12 は、約 $0.2 \mu\text{m}$ のポアサイズを有し得る。各サブシステムでは、第 1 の導管 6 は、リザーバ 2 と第 1 の入口 4 との間で流体連通している。各サブシステム内の第 2 の導管 7 は、リザーバ 2 と第 2 の入口 5 との間で流体連通している。流体導管 6 および 7 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであり得る。TFF ユニット 3 は、図 7 に示すように、単一のクロスフロー管状フィルタ 12 をそれぞれ含み得る、または 2 つもしくはそれ以上セットになったクロスフローフィルタをそれぞれ含み得る。単一のクロスフロー管状フィルタ 12 は、約 $0.2 \mu\text{m}$ のポアサイズを有し得る。

【0061】

図 7 の各サブシステム 19 は、第 1 の導管 6 内に配置された単一のポンプ 8、例えば蠕動ポンプ等の低乱流ポンプ (LTP) も含む。作動すると、各サブシステム 19 内の単一のポンプ 8 は、流体を、システムを通じて反転可能に流通させ、リザーバ 2 から、第 1 の導管 6、TFF ユニット 3、第 2 の導管 7 を経由してリザーバ 2 に戻す。2 つの TFF ユニット 3 それぞれのハウジング 11 は、濾過液出口 13 を含む。各サブシステム 19 は、濾過液貯蔵タンク 10 および TFF ユニット 3 と濾過液貯蔵タンク 10 との間で流体連通している濾過液導管 9 も含む。濾過液貯蔵タンク 10 は、例えば冷蔵貯蔵タンクであり得る。濾過液導管 9 は、任意の種類の生体適合性チューブ、例えばシリコンチューブであ

り得る。

【0062】

追加の代表的なシステム構造および特徴

リザーバ、導管、TFFユニット、ポンプ、濾過液貯蔵タンク、流量計、圧力センサ、クランプ、ポート、および生物学的製造システムで使用可能である非限定的な代表的構造を以下に記載する。

【0063】

リザーバ

リザーバは、バイオリアクタであり得る。バイオリアクタは、例えば約1L～約10,000L（例えば、約1L～約50L、約50L～約500L、約500L～約1000L、約500L～約5000L、約500L～約10,000L、約5000L～約10,000L、約1L～約10,000L、約1L～約8,000L、約1L～約6,000L、約1L～約5,000L、約100L～約5,000L、約10L～約100L、約10L～約4,000L、約10L～約3,000L、約10L～約2,000L、または約10L～約1,000L）の容積を有し得る。本明細書に記載するバイオリアクタは、いずれも灌流バイオリアクタであり得る。代表的なバイオリアクタは、いくつかの異なる商業ベンダー（例えば、Xcellerex（Marlborough, MA）およびHolland Applied Technologies（Burr Ridge, IL））から購入可能である。

【0064】

二者択一的または付加的に、リザーバは、貯蔵タンクであり得る。例えば、かかる冷蔵貯蔵タンクは、組み換えタンパク質を含む細胞培養物を、約5分間～約1週間（例えば、約5分間～約6日間、約5分間～約5日間、約5分間～約4日間、約5分間～約3日間、約5分間～約2日間、約5分間～約36時間、約5分間～約24時間、約5分間～約12時間）保持可能である。貯蔵タンク内の細胞培養物は、約15～約37、約20～約37、約25～約37、約30～約37、または約20～約30の温度に維持可能である。

【0065】

導管

本明細書に記載する導管は、単純なチューブ、例えば生体適合性チューブであり得る。有用なチューブの非限定的な例として、シリコンゴム、ポリウレタン、ポリジオキサノン（PDO）、ポリヒドロキシアルカノエート、ポリヒドロキシブチレート、ポリ（グリセロールセバケート）、ポリグリコリド、ポリラクチド、ポリカプロラクトン、もしくはポリアンヒドリド、またはこれらを含むコポリマーまたは誘導体、および/または他のポリマーが挙げられる。二者択一的または付加的に、本明細書に記載する導管は、いずれもポリ塩化ビニルを含み得る。導管は、いずれも、例えば約5mm～約50mm（例えば、約10mm～約40mm、約10mm～約35mm、または約10mm～約30mm、約10mm～約20mm）の内径（ID）を有し得る。導管は、溶接可能な移送チューブであり得る。導管の追加の例、ならびに本発明のデバイスおよび方法で使用可能である、導管の特性は、当業者に周知である。

【0066】

TFFユニットおよびクロスフローフィルタ

本明細書に記載するシステムもしくはサブシステム、または方法のいずれかで用いられるTFFユニットは、1つまたはそれ以上のクロスフローフィルタを含み得る。例えば、本明細書に記載するTFFユニットは、単一のクロスフローフィルタ（例えば、管状クロスフローフィルタ）を含み得る。他の例では、TFFユニットは、2つまたはそれ以上（例えば、3、4、5、または6つ）のクロスフローフィルタ（例えば、管状クロスフローフィルタ）を含み得る。TFFユニット内の2つまたはそれ以上のクロスフローフィルタは、同一であってもよく、異なってもよい（例えば、番号、種類、形状、表面積、またはポアサイズが異なる）。具体例では、TFFユニットは、2つの管状クロスフローフィル

10

20

30

40

50

タを含み得る。T F Fユニット中に存在する2つまたはそれ以上のクロスフローフィルタは、湾曲した長方形の形状であり得る。

【0067】

クロスフローフィルタは、約 $0.1\mu\text{m}$ ～約 $0.45\mu\text{m}$ （例えば、約 $0.15\mu\text{m}$ ～約 $0.40\mu\text{m}$ 、約 $0.15\mu\text{m}$ ～約 $0.35\mu\text{m}$ 、約 $0.15\mu\text{m}$ ～約 $0.30\mu\text{m}$ 、約 $0.15\mu\text{m}$ ～約 $0.25\mu\text{m}$ ）、または約 $0.20\mu\text{m}$ の平均ポアサイズを有し得る。クロスフローフィルタは、ポリエーテルスルホン（P E S）から構成されるスペクトルフィルタであり得る。

【0068】

クロスフローフィルタは、約 0.1m^2 ～約 5m^2 （例えば、約 0.5m^2 ～約 4.5m^2 、約 0.5m^2 ～約 4.0m^2 、約 0.5m^2 ～約 3.5m^2 、約 0.5m^2 ～約 3.0m^2 、約 0.5m^2 ～約 2.5m^2 、約 0.5m^2 ～約 2.0m^2 、約 0.5m^2 ～約 1.5m^2 、または約 0.5m^2 ～約 1.0m^2 ）の表面積（濾過面積）を有し得る。クロスフローフィルタは、約500ファイバ/フィルタ～約2500ファイバ/フィルタ（例えば、約500ファイバ/フィルタ～約2400ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約2300ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約2200ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約2100ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約2000ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1900ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1800ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1700ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1600ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1500ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1400ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1300ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1200ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1100ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約1000ファイバ/フィルタ、約500ファイバ/フィルタ～約900ファイバ/フィルタ、約600ファイバ/フィルタ～約900ファイバ/フィルタ、約700ファイバ/フィルタ～約900ファイバ/フィルタ、または約800ファイバ/フィルタ～約900ファイバ/フィルタ）のフィルタ1つ当たりの合計ファイバ数を有し得る。いくつかの例では、クロスフローフィルタ内のファイバは、約 0.05mm ～約 1.0mm （例えば、約 0.1mm ～約 9mm 、約 0.1mm ～約 8mm 、約 0.1mm ～約 7mm 、約 0.1mm ～約 6mm 、約 0.1mm ～約 5mm 、約 0.1mm ～約 4mm 、約 0.1mm ～約 3mm 、約 0.1mm ～約 2.5mm 、約 0.1mm ～約 2.0mm 、約 0.1mm ～約 1.5mm 、約 0.5mm ～約 1.5mm 、または約 0.75mm ～約 1.25mm ）の内径を有する。クロスフローフィルタ中に存在するファイバは、約 0.2cm ～約 200cm （例えば、約 0.2cm ～約 190cm 、約 0.2cm ～約 180cm 、約 0.2cm ～約 170cm 、約 0.2cm ～約 160cm 、約 0.2cm ～約 150cm 、約 0.2cm ～約 140cm 、約 0.2cm ～約 130cm 、約 0.2cm ～約 120cm 、約 0.2cm ～約 110cm 、約 0.2cm ～約 100cm 、約 0.2cm ～約 90cm 、約 0.2cm ～約 80cm 、約 0.2cm ～約 70cm 、約 0.2cm ～約 60cm 、約 0.2cm ～約 55cm 、約 0.2cm ～約 50cm 、約 1cm ～約 45cm 、約 1cm ～約 40cm 、約 1cm ～約 35cm 、約 1cm ～約 30cm 、約 1cm ～約 25cm 、約 1cm ～約 20cm 、約 1cm ～約 15cm 、約 1cm ～約 10cm 、約 0.1cm ～約 5cm 、約 20cm ～約 40cm 、または約 25cm ～約 35cm ）の長さを有し得る。クロスフローフィルタは、フィルタの大部分の表面積が、システム内の流体（例えば、細胞培養物）の流れに対して並行に位置するように、任意の形状を有し得る。例えば、クロスフローフィルタは、管状形状または湾曲した長方形の形状、またはドーナツ形状を有し得る。本明細書に記載するシステムで使用可能であるクロスフローフィルタの例として、A T F 4フィルタ（R e f i n e T e c h n o l o g y）が挙げられる。追加のクロスフローフィルタは本明細書に記載されており、当技術分野において公知である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

当業者なら理解できるように、ＴＦＦユニット内のクロスフローフィルタは、ケーシング（例えば、硬質プラスチックまたは金属ケーシング）内に収容可能である。ハウジングは、任意の形状、円筒状または長方形の形状であり得、１つまたはそれ以上のクロスフローフィルタを保持できるように設計可能である。ハウジングは、１つまたはそれ以上のクロスフローフィルタをハウジングに挿入、またはそこから除去できるようにする面を含み得る。

【 0 0 7 0 】

いくつかのシステムは、直列または並列で配置された２つまたはそれ以上のＴＦＦユニットを含む。例えば、２つまたはそれ以上のＴＦＦユニットが直列で配置されているシステムでは、流体導管は、２つの隣接したＴＦＦユニット（例えば、本明細書に記載するまたは当技術分野において公知の代表的なＴＦＦユニットのいずれか）を流体連結させるのに使用可能である。システム内の２つのＴＦＦユニットに関する１つのかかる代表的な配置を図４に示す。直列で配置されている２つまたはそれ以上のＴＦＦユニットは、システム内の少なくとも１つのポンプが作動して、細胞培養物の反転可能な流れを引き起こし、リザーバ、例えばバイオリアクタから、第１の導管、２つまたはそれ以上のＴＦＦユニット、隣接したＴＦＦユニット間に位置する１つまたはそれ以上の導管、第２の導管を經由してリザーバ、例えばバイオリアクタに戻す限り、任意の方法で設計可能である。２つまたはそれ以上のＴＦＦユニットは、同一（例えば、クロスフローフィルタの番号および種類が同一）であっても異なってもよい（例えば、クロスフローフィルタの番号および種類が異なる）。いくつかの例では、２つまたはそれ以上のＴＦＦユニットそれぞれは、単一の管状クロスフローフィルタを含む。各ＴＦＦユニットは、ＴＦＦユニットから流出した濾過液が、濾過液貯蔵タンク（例えば、本明細書に記載する濾過液貯蔵タンクのいずれか）に流入できるようにする濾過液導管と流体連結し得る。いくつかの実施形態では、２つまたはそれ以上のＴＦＦユニットが、単一のハウジング（例えば、本明細書に記載する任意のまたは当技術分野において公知の代表的種類のハウジングのいずれか）内に配置可能である。

【 0 0 7 1 】

ポンプ

本明細書に記載するシステムは、１つまたはそれ以上のポンプを含み得る。いくつかの例では、１つまたはそれ以上のポンプは、低乱流ポンプ（ＬＴＰ）である。ＬＴＰは、流体（例えば、細胞培養物）内で相当量の剪断応力および／または流体の乱れを誘発することなく、単一の方向（例えば、第１もしくは第２の流れの向き）で流体（例えば、細胞培養物）を移動させる、または流体（例えば、細胞培養物）を、２つの方向（第１および第２の流れの向き）で反転可能に移動させることが可能なポンプである。ＬＴＰが、第１および第２の流れの向きを切り替えて、流体（例えば、細胞培養物）を流通させるのに用いられる際には、第２の流れの向きは、第１の流れの向きとほぼ逆方向ある。

【 0 0 7 2 】

ＬＴＰポンプの例として蠕動ポンプが挙げられる。蠕動ポンプは、容積が約２０ｍＬ～約２５０ｍＬ（例えば、約２０ｍＬ～約２４０ｍＬ、約２０ｍＬ～約２２０ｍＬ、約２０ｍＬ～約２００ｍＬ、約２０ｍＬ～約１８０ｍＬ、約２０ｍＬ～約１６０ｍＬ、約２０ｍＬ～約１４０ｍＬ、約２０ｍＬ～約１２０ｍＬ、約２０ｍＬ～約１００ｍＬ、約２０ｍＬ～約８０ｍＬ、約２０ｍＬ～約６０ｍＬ、約２０ｍＬ～約５０ｍＬ、約２０ｍＬ～約４０ｍＬ、約２０ｍＬ～約３０ｍＬ、約３０ｍＬ～約２４０ｍＬ、約３０ｍＬ～約２２０ｍＬ、約３０ｍＬ～約２００ｍＬ、約３０ｍＬ～約１８０ｍＬ、約３０ｍＬ～約１６０ｍＬ、約３０ｍＬ～約１４０ｍＬ、約３０ｍＬ～約１２０ｍＬ、約３０ｍＬ～約１００ｍＬ、約３０ｍＬ～約８０ｍＬ、約３０ｍＬ～約６０ｍＬ、約４０ｍＬ～約２５０ｍＬ、約４０ｍＬ～約２４０ｍＬ、約４０ｍＬ～約２２０ｍＬ、約４０ｍＬ～約２００ｍＬ、約４０ｍＬ～約１８０ｍＬ、約４０ｍＬ～約１６０ｍＬ、約４０ｍＬ～約１４０ｍＬ、約４０ｍＬ～約１２０ｍＬ、約４０ｍＬ～約１００ｍＬ、約４０ｍＬ～約８０ｍＬ、約４０ｍＬ～約６

0 m L、約 5 0 m L ~ 約 2 5 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 2 4 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 2 2 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 2 0 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 1 8 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 1 6 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 1 4 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 1 2 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 1 0 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 8 0 m L、約 5 0 m L ~ 約 7 5 m L、約 6 0 m L ~ 約 2 5 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 2 4 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 2 2 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 2 0 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 1 8 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 1 6 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 1 4 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 1 2 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 1 0 0 m L、約 6 0 m L ~ 約 8 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 2 5 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 2 4 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 2 2 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 2 0 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 1 8 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 1 6 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 1 4 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 1 2 0 m L、約 7 0 m L ~ 約 1 0 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 2 5 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 2 4 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 2 2 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 2 0 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 1 8 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 1 6 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 1 4 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 1 2 0 m L、約 8 0 m L ~ 約 1 0 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 2 5 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 2 4 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 2 2 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 2 0 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 1 8 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 1 6 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 1 4 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 1 2 0 m L、約 9 0 m L ~ 約 1 0 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 2 5 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 2 4 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 2 2 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 2 0 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 1 8 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 1 6 0 m L、約 1 0 0 m L ~ 約 1 4 0 m L、または約 1 0 0 m L ~ 約 1 2 0 m L) のポンプヘッドを有し得る。蠕動ポンプは、内径が約 5 mm ~ 約 4 0 0 mm (例えば、約 5 mm ~ 約 3 8 0 mm、約 5 mm ~ 約 3 6 0 mm、約 5 mm ~ 約 3 4 0 mm、約 5 mm ~ 約 3 2 0 mm、約 5 mm ~ 約 3 0 0 mm、約 5 mm ~ 約 2 8 0 mm、約 5 mm ~ 約 2 6 0 mm、約 5 mm ~ 約 2 4 0 mm、約 5 mm ~ 約 2 2 0 mm、約 5 mm ~ 約 2 0 0 mm、約 5 mm ~ 約 1 8 0 mm、約 5 mm ~ 約 1 6 0 mm、約 5 mm ~ 約 1 4 0 mm、約 5 mm ~ 約 1 2 0 mm、約 5 mm ~ 約 1 0 0 mm、約 5 mm ~ 約 8 0 mm、約 5 mm ~ 約 6 0 mm、約 5 mm ~ 約 5 5 mm、約 5 mm ~ 約 5 0 mm、約 5 mm ~ 約 4 5 mm、約 5 mm ~ 約 4 0 mm、約 5 mm ~ 約 3 5 mm、約 5 mm ~ 約 3 0 mm、約 5 mm ~ 約 2 5 mm、約 5 mm ~ 約 2 0 mm、約 5 mm ~ 約 1 5 mm、約 5 mm ~ 約 1 0 mm、約 1 mm ~ 約 1 0 mm、約 1 0 mm ~ 約 6 0 mm、約 1 0 mm ~ 約 3 5 mm、約 1 0 mm ~ 約 2 5 mm、約 1 0 mm ~ 約 2 0 mm、約 2 0 mm ~ 約 6 0 mm、約 2 0 mm ~ 約 5 0 mm、または約 3 0 mm ~ 約 5 0 mm) のチューブを有し得る。蠕動ポンプ内のチューブの壁直径は、約 1 mm ~ 約 3 0 mm (例えば、約 1 mm ~ 約 2 5 mm、約 1 mm ~ 約 2 0 mm、約 1 mm ~ 約 1 8 mm、約 1 mm ~ 約 1 6 mm、約 1 mm ~ 約 1 4 mm、約 1 mm ~ 約 1 2 mm、約 1 mm ~ 約 1 0 mm、約 1 mm ~ 約 8 mm、約 1 mm ~ 約 6 mm、または約 1 mm ~ 約 5 mm) であり得る。本発明のシステムおよび方法で使用可能である蠕動ポンプの例として、Watson Marlow 620、および Watson Marlow 800 ポンプが挙げられる。本明細書に記載するどの蠕動ポンプも、ツインチャンネルを有し、および/または GORE Sta-Pure チューブ (例えば、内径が 16 mm、および壁が 4 mm のチューブ) を含み得る。

【0073】

LTP ポンプの追加の例は、米国特許第 4,037,984 号; 同第 5,033,943 号; および同第 5,458,459 号; 米国特許出願公開第 2009/0199904 号、および国際特許出願番号 WO 06/021873 号に記載されている。LTP ポンプの他の例として、回転容積移送式真空ポンプ、ローブポンプ、内接ギアポンプ、およびプログレッシブキャビティポンプが挙げられる。当業者は、他の種類の LTP が市販されており、本明細書に記載するどのシステムおよび方法でも使用可能であることを認識する。

【0074】

いくつかの例では、少なくとも 1 つのポンプが、第 1 または第 2 の導管、またはその両方に配置される。他の例では、少なくとも 1 つのポンプが、リザーバ内で、第 1 または第 2 の流体導管の近位に配置される。2 つまたはそれ以上の TFF ユニットの含むシステムでは、少なくとも 1 つのポンプは、2 つの隣接した TFF ユニットの間に配置された導管 (

例えば、図 4 に示す導管 14) 内に配置可能である。少なくとも 1 つのポンプが作動すると、その結果、流体がシステムを通じて反転可能に流通し、リザーバから、第 1 の導管、T F F ユニット、第 2 の導管を経由してリザーバに戻る、または 2 つもしくはそれ以上の T F F ユニットの備えるシステムでは、流体がシステムを通じて反転可能に流通し、リザーバから、第 1 の導管、2 つもしくはそれ以上の T F F ユニット、隣接した T F F ユニット間の 1 つもしくはそれ以上の導管、第 2 の導管を経由して、リザーバに戻る限り、少なくとも 1 つのポンプが、本明細書に記載するシステム内のどこでも配置可能である。

【 0 0 7 5 】

濾過液貯蔵タンク

濾過液貯蔵タンクは、場合により、例えば濾過液を収納するためにシステムに含めることができる。例えば、濾過液は、約 1 時間 ~ 約 1 週間（例えば、約 1 時間 ~ 約 6 日間、約 1 時間 ~ 約 5 日間、約 1 時間 ~ 約 4 日間、約 1 時間 ~ 約 3 日間、約 1 時間 ~ 約 2 日間、約 1 時間 ~ 約 3 6 時間、約 1 時間 ~ 約 2 4 時間、約 1 時間 ~ 約 2 0 時間、約 1 時間 ~ 約 1 6 時間、約 1 時間 ~ 約 1 2 時間、または約 1 時間 ~ 約 6 時間）収納可能である。濾過液貯蔵タンクの内部容積は、約 5 0 m L ~ 約 5 0 L（例えば、約 5 0 m L ~ 約 4 5 L、約 5 0 m L ~ 約 4 0 L、約 5 0 m L ~ 約 3 5 L、約 5 0 m L ~ 約 3 0 L、約 5 0 m L ~ 約 2 5 L、約 5 0 m L ~ 約 2 0 L、約 5 0 m L ~ 約 1 8 L、約 5 0 m L ~ 約 1 6 L、約 5 0 m L ~ 約 1 4 L、約 5 0 m L ~ 約 1 2 L、約 5 0 m L ~ 約 1 0 L、約 5 0 m L ~ 約 9 L、約 5 0 m L ~ 約 8 L、約 5 0 m L ~ 約 7 L、約 5 0 m L ~ 約 6 L、約 5 0 m L ~ 約 5 L、約 5 0 m L ~ 約 4 . 5 L、約 5 0 m L ~ 約 4 . 0 L、約 5 0 m L ~ 約 3 . 5 L、約 5 0 m L ~ 約 3 . 0 L、約 5 0 m L ~ 約 2 . 5 L、約 5 0 m L ~ 約 2 . 0 L、約 5 0 m L ~ 約 1 . 5 L、約 5 0 m L ~ 約 1 . 0 L、約 1 0 0 m L ~ 約 1 . 0 L、または約 5 0 0 m L ~ 約 1 . 0 L）であり得る。濾過液貯蔵タンクの内部表面は、生体適合性材料（例えば、当技術分野において公知の任意の生体適合性材料）を含み得る。濾過液貯蔵タンクは、約 1 0 ~ 約 3 5（例えば、約 1 0 ~ 約 3 0、約 1 0 ~ 約 2 5、約 1 0 ~ 約 2 0、約 1 0 ~ 約 1 5、または約 1 5 ~ 約 2 5）の温度で、濾過液を収納する能力を有する冷蔵貯蔵タンクであり得る。当業者なら理解できるように、いくつかの異なる市販貯蔵タンクが、本明細書に記載するシステムおよび方法において濾過液貯蔵タンクとして使用可能である。

【 0 0 7 6 】

流量計

本明細書に記載するシステムのいくつかの例は、1 つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、または 5 つ）の流量計を含み得る。例えば、1 つまたはそれ以上の流量計は、システム内の 1 つまたはそれ以上の任意の導管内に配置可能である（例えば、第 1 の導管、第 2 の導管、隣接した T F F ユニット間の 1 つもしくはそれ以上の導管、および / または濾過液導管）。例えば、流量計は、2 つの隣接した T F F ユニット間に配置可能である。いくつかの例では、流量計は、非侵襲的である。当業者は、本発明のシステムおよび方法で使用可能である多様な市販の流量計を理解する。例えば、E M - T E C B i o P r o T T 非侵襲式リアルタイム流量計、P T 8 7 8 超音波流量計（R s h y d r o）、および S o n o - T r a k 超音波非侵襲式流量計（E M C O）が、本発明のシステムおよび方法で使用可能な市販の流量計である。

【 0 0 7 7 】

圧力センサ

本明細書に記載するシステムは、1 つまたはそれ以上の圧力センサを含み得る。例えば、1 つまたはそれ以上の圧力センサは、システム内の導管のいずれか（例えば、第 1 の導管、第 2 の導管、隣接した T F F ユニット間の 1 つもしくはそれ以上の導管、および / または濾過液導管）内に配置可能である。例えば、圧力センサは、システム内の 2 つの隣接した T F F ユニット間に配置可能である。当業者は、本発明のシステムおよび方法で使用可能である多様な市販の圧力センサを理解する。本明細書に記載するシステムおよび方法で使用可能である圧力センサの非限定的な例として、P e n d o T E C H P r e s s u

10

20

30

40

50

reMAT圧力センサが挙げられる。

【0078】

クランプ/ポート

本明細書に記載するどのシステムも、場合により、第1または第2の導管と、第1または第2の導管それぞれをポートと流体連結させる該ポートとの間にポート導管を含むことができる。ポートは、流体（例えば、細胞培養物または洗浄溶液）をシステムに送達する、またはシステムから除去する（第1または第2の導管それぞれを通じて）のに使用可能である。クランプは、ポート導管内に配置可能である。多様な、適するクランプが、当技術分野において公知である（例えば、スクリュークランプ）。ポート導管は、導管について上記した特徴の任意の組合せを有し得る。ポートは、当技術分野において一般的に公知の任意の種類のポートであり得る。例えば、ポートは注入ポートであり得る、またはリブ付きスレッド（ribbed threading）を有し得る。

10

【0079】

生物学的製造システム

本明細書に記載するどのデバイスも、入口および出口を有する少なくとも1つ（例えば、2、3、または4つ）のマルチカラムクロマトグラフィシステム（MCCS）、ならびにTFFユニットまたは濾過液貯蔵タンクの間の濾過液導管を含む、生物学的製造システムを含み得るが、この場合、該デバイスは、濾過液が、生物学的製造システムの入口に流入し、少なくとも1つのMCCSを通過し、生物学的製造システムの出口を通じて該デバイスから退出するように構成される。MCCSは、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフィカラム、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフ用メンブレン、または少なくとも1つのクロマトグラフィカラムと少なくとも1つのクロマトグラフ用メンブレンとの組合せを含み得る。非限定的な例では、MCCSは、4つのクロマトグラフ用カラム、3つのクロマトグラフ用カラムとクロマトグラフ用メンブレン、3つのクロマトグラフ用カラム、2つのクロマトグラフ用カラム、2つのクロマトグラフ用メンブレン、および2つのクロマトグラフ用カラムと1つのクロマトグラフ用メンブレンを含み得る。クロマトグラフィカラムおよび/またはクロマトグラフ用メンブレンの組合せの追加の例が、非限定的に、MCCSで用いられるものと、当業者は想像可能である。MCCS中に存在する個々のクロマトグラフィカラムおよび/またはクロマトグラフ用メンブレンは、同一であってもよく（例えば、形状、容積、樹脂、捕捉機構、およびユニット操作が同一）、異なってもよい（例えば、形状、容積、樹脂、捕捉機構、およびユニット操作が1つまたはそれ以上異なる）。MCCS中に存在する個々のクロマトグラフィカラムおよび/またはクロマトグラフ用メンブレンでは、実施するユニット操作（例えば、捕捉、精製、ポリッシング、ウイルスの不活性化、組み換え治療用タンパク質を含む流体のイオン濃度および/もしくはpHの調整、または濾過のユニット操作）は同一であってもよく、異なってもよい（例えば、捕捉、精製、ポリッシング、ウイルスの不活性化、組み換え治療用タンパク質を含む流体のイオン濃度および/またはpHの調整、ならびに濾過等からなる群より選択されるユニット操作が異なる）。

20

30

【0080】

1つまたはそれ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24）の異なる種類のバッファーが、本明細書に記載する生物学的製造デバイスのいずれかにおいて、1つまたはそれ以上のMCCSの使用中に利用可能である。当技術分野において公知のように、本明細書に記載する生物学的製造システムが用いる1つまたはそれ以上のMCCSで用いられる1つまたはそれ以上の種類のバッファーは、1つまたはそれ以上のMCCS（例えば、第1および第2のMCCS）のクロマトグラフィカラムおよび/またはクロマトグラフ用メンブレン中に存在する樹脂、組み換え治療用タンパク質、ならびに1つまたはそれ以上のMCCSの特定のクロマトグラフィカラムおよび/またはクロマトグラフィメンブレンにより実施されるユニット操作（例えば、本明細書に記載する代表的なユニット操作のいずれか）に依存する。また、本明細書に記載する生物学的処理デバイスのい

40

50

れかにおいて、1つまたはそれ以上のMCCSの使用中に利用される容積およびバッファの種類についても、当業者は決定可能である。例えば、本明細書に記載するプロセスのいずれかにおいて、1つまたはそれ以上のMCCSの使用中に利用されるバッファの容積および種類は、得られる単離された組み換えタンパク質（例えば、医薬品）に関する下記事項の1つまたはそれ以上について最適化するために選択可能である：組み換え治療用タンパク質の全体的な収率、組み換え治療用タンパク質の活性、組み換え治療用タンパク質の純度レベル、および組み換え治療用タンパク質を含む流体からの生物学的汚染物質除去（例えば、活性なウイルス、マイコバクテリア、酵母菌、細菌、または哺乳動物細胞がないこと）。

【0081】

1つまたはそれ以上のMCCSは、周期的向流分配クロマトグラフィシステム（periodic counter current chromatography system）（PCCS）であり得る。PCCSは、例えば2つまたはそれ以上のクロマトグラフィカラム（例えば、3つのカラムまたは4つのカラム）を含むことができ、そのようなカラムは、2つまたはそれ以上のクロマトグラフィカラムから組み換え治療用タンパク質を連続的に溶出可能となるように切り替えられる。PCCSは、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフィカラム、2つもしくはそれ以上のクロマトグラフ用メンブレン、または少なくとも1つのクロマトグラフ用カラムおよび少なくとも1つのクロマトグラフ用メンブレンを含み得る。カラム操作は、負荷、洗浄、溶出、および再生工程から一般的に構成される。PCCSでは、複数のカラムが、循環しながら個別におよび連続的に同一の工程を行うのに用いられる。カラムは、連続的に操作されるので、1つのカラムからの通過画分と洗浄部分は、別のカラムにより捕捉される。このPCCSの特有の特徴は、樹脂を、バッチモードのクロマトグラフィにおいて一般的なように、動的結合容量（dynamic binding capacity）ではなく、その静的結合容量（static binding capacity）近傍で負荷できるようにする。連続的な循環および溶出の結果として、PCCSに流入する流体は、連続的に処理され、組み換え治療用タンパク質を含む溶出物が連続的に生成される。

【0082】

生物学的製造システム内の少なくとも1つのMCCSが実施可能な1つまたはそれ以上のユニット操作は、例えば組み換え治療用タンパク質を捕捉する工程、組み換え治療用タンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化する工程、組み換え治療用タンパク質を精製する工程、組み換え治療用タンパク質をポリッシングする工程、組み換え治療用タンパク質を含む流体を保持する工程（例えば、ブレイクタンクを用いて）、組み換え治療用タンパク質を含む流体から微粒子状物質を濾過または除去する工程、ならびに組み換え治療用タンパク質を含む流体のイオン濃度および/またはpHを調整する工程を含む。

【0083】

捕捉する工程のユニット操作は、例えば捕捉機構を利用する少なくとも1つのクロマトグラフィカラムおよび/またはクロマトグラフィ樹脂を含む、1つまたはそれ以上のMCCSを用いて実施可能である。捕捉機構の非限定的な例として、タンパク質A結合捕捉機構、抗体または抗体フラグメント結合捕捉機構、基質結合捕捉機構、アプタマー結合捕捉機構、タグ結合捕捉機構（例えば、ポリ-Hisタグに基づく捕捉機構）、および補助因子結合捕捉機構が挙げられる。捕捉は、陽イオン交換もしくは陰イオン交換クロマトグラフィ、または分子篩クロマトグラフィを実施するのに使用可能である樹脂を用いても実施可能である。組み換え治療用タンパク質を捕捉するのに使用可能である樹脂の例は、当技術分野において公知である。

【0084】

組み換え治療用タンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化する工程のユニット操作は、1つまたはそれ以上のMCCSを用いて実施可能であり、同MCCSは、例えばクロマトグラフィカラム、クロマトグラフィメンブレン、または約3.0~5.0（例えば、約3.5~約4.5、約3.5~約4.25、約3.5~約4.0、約3.5~

10

20

30

40

50

約 3.8、または約 3.75) の pH にて、少なくとも 30 分間 (例えば、約 30 分間 ~ 1.5 時間、約 30 分間 ~ 1.25 時間、約 0.75 時間 ~ 1.25 時間、または約 1 時間)、組み換え治療用タンパク質を含む流体をインキュベーションする能力を有する貯蔵タンクを含む。

【0085】

組み換えタンパク質を精製する工程のユニット操作は、1つまたはそれ以上の M C C S を用いて実施可能であり、同 M C C S は、例えば樹脂を含むクロマトグラフィカラムまたはクロマトグラフ用メンブレンを含み、該樹脂は、例えば捕捉システムを利用する。捕捉機構の非限定的な例として、タンパク質 A 結合捕捉機構、抗体または抗体フラグメント結合捕捉機構、基質結合捕捉機構、アプタマー結合捕捉機構、タグ結合捕捉機構 (例えば、ポリ-His タグに基づく捕捉機構)、および補助因子結合捕捉機構が挙げられる。精製する工程も、陽イオン交換もしくは陰イオン交換クロマトグラフィ、または分子篩クロマトグラフィを実施するのに使用可能である樹脂を用いて実施可能である。組み換え治療用タンパク質を精製するのに使用可能である樹脂の例は、当技術分野において公知である。

【0086】

組み換えタンパク質をポリッシングする工程のユニット操作は、1つまたはそれ以上の M C C S を用いて実施可能であり、同 M C C S は、例えば樹脂を含むクロマトグラフィカラムまたはクロマトグラフ用メンブレンを含み、該樹脂は、例えば陽イオン交換、陰イオン交換、または分子篩クロマトグラフィを実施するのに使用可能である。組み換え治療用タンパク質をポリッシングするのに使用可能である樹脂の例は、当技術分野において公知である。

【0087】

組み換え治療用タンパク質を含む流体を保持する工程のユニット操作は、M C C S を用いて実施可能であり、同 M C C S は、生物学的製造システム内の 1つまたはそれ以上の M C C S 内には、少なくとも 1つのリザーバ (例えば、ブレイクタンク) または最大 1、2、3、4、または 5つのリザーバ (例えば、ブレイクタンク) を含む。例えば、このユニット操作を達成するのに使用可能であるリザーバ (例えば、ブレイクタンク) は、約 1 mL ~ 約 1 L (例えば、約 1 mL ~ 約 800 mL、約 1 mL ~ 約 600 mL、約 1 mL ~ 約 500 mL、約 1 mL ~ 約 400 mL、約 1 mL ~ 約 350 mL、約 1 mL ~ 約 300 mL、約 10 mL ~ 約 250 mL、約 10 mL ~ 約 200 mL、約 10 mL ~ 約 150 mL、および約 10 mL ~ 約 100 mL) の容積をそれぞれ有し得る。本明細書に記載する生物学的製造システムで用いられるリザーバ (例えば、ブレイクタンク) の容量は、例えば 1 mL と約 300 mL とを含めてこれらの間、例えば 1 mL と約 280 mL、約 260 mL、約 240 mL、約 220 mL、約 200 mL、約 180 mL、約 160 mL、約 140 mL、約 120 mL、約 100 mL、約 80 mL、約 60 mL、約 40 mL、約 20 mL、または約 10 mL とを含めこれらの間であり得る。生物学的製造システム内のリザーバ (例えば、ブレイクタンク) は、それぞれ、少なくとも 10 分間 (例えば、少なくとも 20 分間、少なくとも 30 分間、少なくとも 1 時間、少なくとも 2 時間、少なくとも 4 時間、または少なくとも 6 時間) 組み換え治療用タンパク質を含む流体を保持することができる。他の例では、生物学的製造システム内のリザーバ (例えば、ブレイクタンク) は、総時間として、例えば約 5 分と約 6 時間未満とを含めこれらの間、例えば、約 5 分と約 5 時間、約 4 時間、約 3 時間、約 2 時間、約 1 時間、または約 30 分とを含めこれらの間、治療用タンパク質を保持するに過ぎない。生物学的製造システム内のリザーバ (例えば、ブレイクタンク) は、組み換え治療用タンパク質を含む流体の保持および冷蔵 (例えば、25 未満、15 未満、または 10 未満の温度) の両方で使用可能である。リザーバは、円形シリンダー、楕円形シリンダー、またはほぼ長方形の封止されたおよび非透過性のバッグを含む任意の形状を有し得る。

【0088】

組み換え治療用タンパク質を含む流体を濾過する工程のユニット操作は、例えばフィルタ、または分子篩樹脂を含むクロマトグラフィカラムもしくはクロマトグラフ用メンブレ

10

20

30

40

50

ンを含むMCCSを用いて実施可能である。当技術分野において公知のように、多様なサブミクロンフィルタ（例えば、ポアサイズが1 μm 未満、0.5 μm 未満、0.3 μm 未満、約0.2 μm 、0.2 μm 未満、100 nm未満、80 nm未満、60 nm未満、40 nm未満、20 nm未満、または10 nm未満のフィルタ）が当技術分野において入手可能であり、これは、任意の析出物質および/または細胞（例えば、析出した、折り畳まれていないタンパク質；析出した望ましくない宿主細胞タンパク質；析出した脂質；細菌；酵母菌細胞；真菌細胞；および/またはマイコバクテリア）を除去する能力を有する。ポアサイズが約0.2 μm または0.2 μm 未満のフィルタは、組み換え治療用タンパク質を含む流体から細菌を除去するのに有効であることが公知である。当技術分野において公知のように、分子篩樹脂を含むクロマトグラフィカラムまたはクロマトグラフ用メンブレンは、組み換え治療用タンパク質を含む流体を濾過する工程のユニット操作を実施するのにMCCSでも使用可能である。

10

【0089】

組み換え治療用タンパク質を含む流体のイオン濃度および/またはpHを調整する工程のユニット操作は、MCCSを用いて実施可能であり、同MCCSは、組み換え治療用タンパク質を含む流体に、新規バッファ溶液を添加するバッファ調整リザーバ（例えば、インライン式バッファ調整リザーバ）を含み、利用する（例えば、単一のMCCS内のカラムの間、または最後から2番目のMCCS内の最後のカラムの後、および組み換え治療用タンパク質を含む流体が次のMCCS（例えば、第2のMCCS）の第1のカラムに供給される前）。当技術分野において認識可能なように、インライン式バッファ調整リザーバは、任意のサイズ（例えば、100 mLを上回る）であり得、また任意の緩衝液を収納し得る（例えば、下記事項のうち1つまたはそれ以上に該当する緩衝液：組み換え治療用タンパク質を含む流体と比較して、それよりもpHが高いもしくは低い、組み換え治療用タンパク質を含む流体と比較して、それよりもイオン（例えば、塩）濃度が高いもしくは低い、および/またはMCCS（例えば、第1または第2のMCCS）内の少なくとも1つのクロマトグラフ用カラム、もしくは少なくとも1つのクロマトグラフ用メンブレン中に存在する樹脂に結合する組み換え治療用タンパク質と競合する薬剤の濃度が高いもしくは低い）。

20

【0090】

MCCSは、2つまたはそれ以上のユニット操作を実施することができる。例えば、MCCSは少なくとも下記のユニット操作を実施することができる：組み換え治療用タンパク質を捕捉し、組み換え治療用タンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化する；組み換え治療用タンパク質を捕捉し、組み換え治療用タンパク質を含む流体中に存在するウイルスを不活性化し、組み換え治療用タンパク質を含む液体のイオン濃度および/またはpHを調整する；組み換え治療用タンパク質を精製し、組み換え治療用タンパク質をポリッシングする；組み換え治療用タンパク質を精製し、組み換え治療用タンパク質をポリッシングし、組み換え治療用タンパク質を含む流体を濾過する、または組み換え治療用タンパク質を含む流体から析出物および/または微粒子状の物体を除去する；ならびに組み換え治療用タンパク質を精製し、組み換え治療用タンパク質をポリッシングし、組み換え治療用タンパク質を含む流体を濾過し、または組み換え治療用タンパク質を含む流体から析出物および/または特定の物体を除去し、組み換え治療用タンパク質を含む液体のイオン濃度および/またはpHを調整する。

30

40

【0091】

本発明のデバイスおよび方法で使用可能である生物学的製造システムの追加の代表的な特徴は、2013年3月8日付け出願の米国特許出願第61/775,060号、および2013年7月19日出願の米国特許出願第61/856,390号に記載されている。

【0092】

本発明のシステムにより提供される利点

本明細書に記載するシステムは、下記の利点のうちの1つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、または7つ）を有する細胞培養物の連続濾過をもたらす：他の一方向

50

開回路濾過システム（例えば、一方向ＴＦＦシステム）または二方向閉回路濾過システム（閉回路ＡＴＦ（商標）システム）と比較したときの、細胞培養物の外部容積（リザーバの外部）の低減、交換分画（第１の導管、ＴＦＦユニット、および第２の導管内）の増加、細胞培養物の外部滞留時間（リザーバ外部）の短縮、細胞培養物濾過中の剪断応力の低下、細胞培養物の細胞生存率の改善、細胞培養物の生存細胞密度の向上、およびフィルタ汚損の減少。

【００９３】

本明細書に記載するシステムの交換分画および外部滞留時間は、下記の式１および２を用いて計算可能である。

$$\text{交換分画} = \text{交換容積} / \text{外部容積} \quad (\text{式１})$$

$$\text{外部滞留時間} = \text{外部容積} / (\text{交換速度} \times \text{交換分画}) \quad (\text{式２})$$

【００９４】

例えば、本発明のシステムの、リザーバ、第１の導管、第２の導管、およびＴＦＦユニット内の細胞培養物の総容積に対する、細胞培養物の総外部容積が占め得る割合は、約１％～約７％（例えば、約１．０％～約６．５％、約１％～約６．０％、約１％～約５．５％、または約１％～約５．０％）に過ぎない。本明細書に提示するシステムは、リザーバ外の細胞培養物の滞留時間も、約１秒～約６０秒（例えば、約１秒～約５５秒、約１秒～約５０秒、約１秒～約４５秒、約１秒～約３０秒、約１秒～約２５秒、約１秒～約２０秒、約１秒～約１５秒、約１秒～約１３秒、約１秒～約１０秒、約１秒～約８秒、約１秒～約５秒、または約１０秒～約１４秒）に短縮可能である（外部滞留時間の低下）。下記の表１は、実施例に記載されている代表的なシステムと閉じたシステムの交互タンジェント濾過（ＡＴＦ４）の外部滞留時間について比較する。

【００９５】

【表１】

表１.本明細書に提示する代表的なシステムと閉じたシステム
ATF4の外部滞留時間および外部分画の比較

	外部容積	外部分画	滞留時間
ATF4	0.756L	19%	71s
TFF	0.550L	78%	12s

【００９６】

本発明のシステムは、交換分画について、約５０％を上回る（例えば、約５５％を上回る、約６０％を上回る、約６５％を上回る、約７０％を上回る、約７５％を上回る、約８０％を上回る、または約８５％を上回る）改善をもたらすことができる。本明細書に記載するシステムは、細胞培養物中で高生存細胞密度を、例えば細胞約 3.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 3.2×10^6 個/mLを上回る、細胞約 3.4×10^6 個/mLを上回る、細胞約 3.6×10^6 個/mLを上回る、細胞約 3.8×10^6 個/mLを上回る、細胞約 4.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 4.2×10^6 個/mLを上回る、細胞約 4.4×10^6 個/mLを上回る、細胞約 4.6×10^6 個/mLを上回る、細胞約 4.8×10^6 個/mLを上回る、細胞約 5.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 5.2×10^6 個/mLを上回る、細胞約 5.4×10^6 個/mLを上回る、細胞約 5.6×10^6 個/mLを上回る、細胞約 5.8×10^6 個/mLを上回る、または細胞約 6.0×10^6 個/mLを上回る生存細胞密度をもたらすことができる。本明細書に記載するシステムは、細胞約 6.5×10^6 個/mLを上回る、細胞約 7.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 7.5×10^6 個/mLを上回る、細胞約 8.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 8.5×10^6 個/mLを上回る、細胞約 9.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 9.5×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.00×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.05×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.10×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.15×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.20×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.25×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.30×10^6

個/mLを上回る、細胞約 135×10^6 個/mLを上回る、細胞約 140×10^6 個/mLを上回る、細胞約 145×10^6 個/mLを上回る、細胞約 150×10^6 個/mLを上回る、細胞約 155×10^6 個/mLを上回る、細胞約 160×10^6 個/mLを上回る、細胞約 165×10^6 個/mLを上回る、細胞約 170×10^6 個/mLを上回る、細胞約 175×10^6 個/mLを上回る、細胞約 180×10^6 個/mLを上回る、細胞約 185×10^6 個/mLを上回る、細胞約 190×10^6 個/mLを上回る、細胞約 200×10^6 個/mLを上回る、細胞約 210×10^6 個/mLを上回る、細胞約 220×10^6 個/mLを上回る、細胞約 230×10^6 個/mLを上回る、細胞約 240×10^6 個/mLを上回る、または細胞約 250×10^6 個/mLを上回る生存細胞密度をもたらすことができる。

10

【0097】

本明細書に提示するシステムは、最適化された交換速度（本明細書では流速とも呼ばれる）も提供する。当業者なら理解できるように、交換速度が高すぎると、細胞増殖および細胞培養性能に悪影響を及ぼすレベルの剪断応力を引き起こすおそれがあり、交換速度が低すぎると、フィルタ汚損および細胞培養物の外部滞留時間の長期化を引き起こすおそれがある。本明細書に提示するシステムは、本明細書に記載する代表的な流速のいずれかを実現可能にする。

【0098】

本明細書に提示するシステムは、最適化された交換速度（XR）と灌流速度（PR）との比も提供する。当業者なら理解できるように、XR：PRの比が高いシステムおよび方法は、より効率的な細胞培養製造法をもたらす（例えば、灌流プロセス中に利用される細胞培養培地はより少ない）。いくつかの例では、本明細書の代表的なデバイスおよび方法は、約2を上回る（例えば、約3を上回る、約4を上回る、約5を上回る、約6を上回る、約7を上回る、約8を上回る、約9を上回る、約10を上回る、約11を上回る、約12を上回る、約13を上回る、約14を上回る、約15を上回る、約16を上回る、約17を上回る、約18を上回る、約19を上回る、約20を上回る、約21を上回る、約22を上回る、約23を上回る、約24を上回る、約25を上回る、約50を上回る、約75を上回る、約100を上回る、約125を上回る、約150を上回る、約175を上回る、約200を上回る、約225を上回る、約250を上回る、約275を上回る、約300を上回る、約325を上回る、約350を上回る、約375を上回る、約400を上回る、約425を上回る、約450を上回る、約475を上回る、約500を上回る、約525を上回る、約550を上回る、約575を上回る、または約600を上回る）、または約5～約600（例えば、約10～約550、約10～約500、約10～約450、約10～約400、約10～約350、約10～約300、約10～約250、約10～約200、約10～約150、約10～約100、または約10～約50）のXR：PR比をもたらす。

20

30

【0099】

細胞培養物処理法

細胞培養物を処理する方法であって、（a）開回路濾過システムを提供する工程（例えば、本明細書に記載する開回路濾過システムのいずれか）、（b）細胞培養物を、リザーバからTFFユニットを通じて、第1の流れの向きで第1の期間、流通させる工程、（c）第1の流れの向きを反転させ、細胞培養物を、TFFユニットを通じて、第2の流れの向きで第2の期間、流通させる工程、（d）第2の流れの向きを反転させ、そして培養物を、TFFユニットを通じて、第1の流れの向きで第3の期間、流通させる工程、（e）工程（c）～（d）を少なくとも2回（例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、または100回、または100回超）繰り返す工程、および（f）濾過液を収集する工程を含む方法も提供される。これらの方法の様々な代表的な態様を以下に記載する。

40

【0100】

細胞培養物

50

本明細書に提示する方法において処理される細胞培養物は、液体培養培地中に複数の任意の種類の哺乳動物細胞を含み得る。本明細書に記載するすべての方法のいくつかの例では、哺乳動物細胞は、懸濁培養で増殖する細胞である。他の例では、哺乳動物細胞は、接着細胞（例えば、灌流バイオリアクタ内で増殖するのに、マイクロキャリア等の固体基質を必要とする細胞）である。細胞培養物中に存在し得る哺乳動物細胞の非限定的な例として、下記の細胞が挙げられる：チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、CHO DG44細胞、CHO-K1細胞、Sp2.0、ミエローマ細胞（例えば、NS/O）、B細胞、ハイブリドーマ細胞、T細胞、ヒト胚性腎（HEK）細胞（例えば、HEK293EおよびHEK293F）、アフリカミドリザル腎上皮細胞（Verob）、およびMadin-Darbyイヌ（コッカー・スパニエル）腎上皮細胞（MDCK）。細胞培養物中に存在し得る追加の哺乳動物細胞は、当技術分野において公知である。

10

【0101】

本明細書に記載するいずれかの方法を用いて処理される細胞培養物は、細胞約 0.5×10^6 個/mLを上回る、細胞約 1.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 5.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 10.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 15.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 20.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 25.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 30.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 35.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 40.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 45.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 50.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 55.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 60.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 65.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 70.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 75.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 80.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 85.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 90.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 95.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 100.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 105.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 110.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 120.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 125.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 130.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 135.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 140.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 145.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 150.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 155.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 160.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 170.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 175.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 180.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 185.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 190.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 195.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 200.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 205.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 210.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 215.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 220.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 225.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 230.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 235.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 240.0×10^6 個/mLを上回る、細胞約 245.0×10^6 個/mLを上回る、または約細胞 250.0×10^6 個/mLを上回る生存細胞密度を含み得る。いくつかの例では、細胞培養物は、細胞約 30×10^6 個/mL～細胞約 100×10^6 個/mL（例えば、細胞約 30×10^6 個/mL～細胞約 95×10^6 個/mL、細胞約 30×10^6 個/mL～細胞約 90×10^6 個/mL、細胞約 30×10^6 個/mL～細胞約 85×10^6 個/mL、細胞約 35×10^6 個/mL～細胞約 80×10^6 個/mL、細胞約 40×10^6 個/mL～細胞約 80×10^6 個/mL、細胞約 40×10^6 個/mL～細胞約 60×10^6 個/mL、または細胞約 60×10^6 個/mL～細胞約 80×10^6 個/mL）の生存細胞濃度を有する。いくつかの例では、細胞培養物は、細胞約 110×10^6 個/mL～細胞約 250×10^6 個/mL（例えば、細胞約 110×10^6 個/mL～細胞約 240×10^6 個/mL、細胞約 110×10^6 個/mL～細胞約 230×10^6 個/mL、細胞約 110×10^6 個/mL～細胞約 220×10^6 個/mL、細胞約 110×10^6 個/mL～細胞約 210×10^6 個/mL、細胞約 110×10^6 個/mL～細胞

20

30

40

50

50

10^6 個 / mL ~ 細胞約 230×10^6 個 / mL、細胞約 180×10^6 個 / mL ~ 細胞約 220×10^6 個 / mL、細胞約 180×10^6 個 / mL ~ 細胞約 210×10^6 個 / mL、細胞約 180×10^6 個 / mL ~ 細胞約 200×10^6 個 / mL、細胞約 190×10^6 個 / mL ~ 細胞約 250×10^6 個 / mL、細胞約 190×10^6 個 / mL ~ 細胞約 240×10^6 個 / mL、細胞約 190×10^6 個 / mL ~ 細胞約 230×10^6 個 / mL、細胞約 190×10^6 個 / mL ~ 細胞約 220×10^6 個 / mL、細胞約 190×10^6 個 / mL ~ 細胞約 210×10^6 個 / mL、細胞約 200×10^6 個 / mL ~ 細胞約 250×10^6 個 / mL、細胞約 200×10^6 個 / mL ~ 細胞約 240×10^6 個 / mL、細胞

約 200×10^6 個 / mL ~ 細胞約 230×10^6 個 / mL、細胞約 200×10^6 個 / mL ~ 細胞約 220×10^6 個 / mL、細胞約 210×10^6 個 / mL ~ 細胞約 250×10^6 個 / mL、細胞約 210×10^6 個 / mL ~ 細胞約 240×10^6 個 / mL、細胞約 220×10^6 個 / mL ~ 細胞約 240×10^6 個 / mL、または細胞約 230×10^6 個 / mL ~ 細胞約 250×10^6 個 / mL) の生存細胞濃度を有する。

【0102】

システム内の細胞培養物の総量（濾過液導管および濾過液貯蔵タンクを例外とする）は、0.2 L ~ 約 10,000 L（例えば、約 0.2 L ~ 約 9,500 L、約 0.2 L ~ 約 9,000 L、約 0.2 L ~ 約 8,500 L、約 0.2 L ~ 約 8,000 L、約 0.2 L ~ 約 7,500 L、約 0.2 L ~ 約 7,000 L、約 0.2 L ~ 約 6,500 L、約 0.2 L ~ 約 6,000 L、約 0.2 L ~ 約 5,500 L、約 0.2 L ~ 約 5,000 L、約 0.2 L ~ 約 4,500 L、約 0.2 L ~ 約 4,000 L、約 0.2 L ~ 約 3,500 L、約 0.2 L ~ 約 3,000 L、約 0.2 L ~ 約 2,500 L、約 0.2 L ~ 約 2,000 L、約 0.2 L ~ 約 1,500 L、約 0.2 L ~ 約 1,000 L、約 0.2 L ~ 約 500 L、または約 0.2 L ~ 約 100 L）であり得る。

【0103】

細胞培養物中に存在する哺乳動物細胞は、組み換えタンパク質（例えば、哺乳動物細胞により分泌される組み換えタンパク質）をコードする組み換え核酸（例えば、哺乳動物細胞のゲノム内で安定的に一体化した核酸）を含み得る。組み換えタンパク質をコードする核酸は、分子生物学および分子遺伝学において公知の多様な方法を用いて、哺乳動物細胞に導入可能である。非限定的な例として、トランスフェクション（例えば、リポフェクション）、トランスダクション（例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、またはレトロウイルス感染）、およびエレクトロポレーションが挙げられる。いくつかの事例では、組み換えタンパク質をコードする核酸は、哺乳動物細胞の染色体に安定的に一体化されないが（一過性のトランスフェクション）、一方他の事例では、核酸は一体化される。二者択一的または付加的に、組み換えタンパク質をコードする核酸は、プラスミド中、および／または哺乳動物の人工染色体（例えば、ヒト人工染色体）中に存在し得る。二者択一的または付加的に、核酸は、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、またはアデノウイルスベクター）を用いて細胞に導入可能である。核酸は、プロモーター配列（例えば、強力なプロモーター、例えば - アクチンプロモーターおよび CMV プロモーター、または誘導性プロモーター）と作動可能に結合し得る。可溶性組み換えタンパク質をコードする核酸配列は、組み換えタンパク質の N - または C - 末端に位置する分泌シグナルペプチドをコードする配列を含み得るが、同ペプチドは、哺乳動物細胞中に存在する酵素により切断され、その後培養培地中に放出される。核酸を含むベクターは、所望の場合には、選択マーカーも含み得る（例えば、哺乳動物細胞にハイグロマイシン、ピュロマイシン、またはネオマイシン耐性を付与する遺伝子）。

【0104】

細胞培養物中の哺乳動物細胞により分泌されると考えられる組み換えタンパク質の非限定的な例として、免疫グロブリン（軽鎖および重鎖免疫グロブリンを含む）、抗体もしくは

10

20

30

40

50

は抗体フラグメント（例えば、本明細書に記載する抗体フラグメントのいずれか）、酵素（例えば、ガラクトシダーゼ（例えば、 β -ガラクトシダーゼ）、ミオザイム、もしくはセレザイム）、タンパク質（例えば、ヒトエリスロポエチン、腫瘍壊死因子（TNF）、もしくはインターフェロン もしくは γ ）、または免疫原性もしくは抗原性タンパク質もしくはタンパク質フラグメント（例えば、ワクチンで用いられるタンパク質）が挙げられる。いくつかの実施形態では、組み換えタンパク質は、少なくとも1つの多官能性組み換えタンパク質スキャフォールドを含む工学的に作出された抗原結合ポリペプチドである（例えば、Gebauerら、Current Opin. Chem. Biol. 第13巻：245～255頁、2009年；および米国特許出願公開第2012/0164066号（そのまま参照によって本明細書に組み入れる）に記載されている組み換え抗原結合タンパク質を参照）。抗体である組み換えタンパク質の非限定的な例として、以下のタンパク質が挙げられる：パニツムマブ、オマリズマブ、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アクトクスマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アフエリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブ、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブ、アマツキシマブ、アナツモマブ、アポリズマブ、アチヌマブ、トシリズマブ、バシリチマブ（basilizimab）、ベクツモマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ビシロマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、ダクリズマブ、デンスマブ（densemab）、エクリズマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エファングマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、ゴリムマブ、インフリキシマブ、ナタリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、およびトラスツズマブ。本明細書に記載する方法により製造可能な治療用抗体の追加の例は、当技術分野において公知である。細胞培養物中の哺乳動物細胞により分泌されると考えられる組み換えタンパク質の追加の非限定的な例として下記のタンパク質が挙げられる：アルグルコシダーゼ、ラロニダーゼ、アバタセプト、ガルスルファーズ、ルトロピン、抗血友病因子、アガルシダーゼ、インターフェロン γ -1a、ダルベポエチン、テネクテプラーゼ、エタネルセプト、凝固因子IX、卵胞刺激ホルモン、イミグルセラゼ、ドルナーゼ、エボエチン、およびアルテプラーゼ。

【0105】

液体培養培地は、当技術分野において公知である。液体培養培地には、哺乳動物の血清（例えば、ウシ胎仔血清およびウシ血清）、および/または成長ホルモンもしくは増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、および上皮増殖因子）を補充することができる。二者択一的または付加的に、液体培養培地は、化学的に定義された液体培養培地、動物由来成分を含まない液体培養培地、血清を含まない液体培養培地、または血清含有液体培養培地であり得る。化学的に定義された液体培養培地、動物由来成分を含まない液体培養培地、血清液を含まない液体培養培地、および血清含有液体培養培地の例は、商業的に入手可能である。

【0106】

液体培養培地は、エネルギー源（例えば、グルコース等の炭水化物）、必須アミノ酸（例えば、基本セットの20種類のアミノ酸とシステイン）、ビタミン、および/または低濃度の必要な他の有機化合物、遊離脂肪酸、および/または微量元素を一般的に含む。液体培養培地には、所望の場合には、例えば、哺乳動物のホルモンまたは増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子）、塩およびバッファー（例えば、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸の塩）、ヌクレオシドおよび塩基（例えば、アデノシン、チミジン、およびヒポキサンチン）、タンパク質および組織加水分解産物、ならびに/またはこれらの任意の組合せ、または他の添加剤を補充することができる。

【0107】

液体培養培地の非限定的な例として、例えばCD CHO、Opti CHO、およびForti CHO（Life Technologies；Grand Island、NYからすべて入手可能）、Hycell CHO培地（Thermo Fisher Scientific、Inc.；Waltham、MA）、Ex-cell CD CHO融合培地（Sigma-Aldrich Co.；St. Louis、MO）、お

10

20

30

40

50

よび PowerCHO 培地 (Lonza Group, Ltd.; Basel、スイス) が挙げられる。やはり液体培養培地中に存在し得る培地成分として、化学的に定義された (CD) 加水分解産物、例えば CD ペプトン、CD ポリペプチド (2 つまたはそれ以上の アミノ酸)、および CD 増殖因子が挙げられるが、これらに限定されない。液体組織培養 培地および培地成分の追加の例は、当技術分野において公知である。

【0108】

接着性哺乳動物細胞を含む細胞培養物は、例えばマイクロキャリアを用いて、灌流バイ オリアクタ内で増殖可能である。使用可能である非限定的な代表的マイクロキャリアとし て、CytoPore (商標) 1 および CytoPore (商標) 2 (GE Health care、Life Sciences、Piscataway、ニュージャージー州 から入手可能) が挙げられる。使用可能であるマイクロキャリアの追加の例は、公的に入 手可能および当技術分野において公知である。

【0109】

代表的な開回路濾過システムの使用

本明細書に記載するどの開回路濾過システムも、提供される細胞培養物処理法で使用可 能である。例えば、本明細書に記載する方法で用いられる開回路濾過システム内のバイオ リアクタは、バイオリアクタ (例えば、当技術分野において公知の任意の灌流バイオリア クタ) であっても冷蔵貯蔵タンクであってもよい。本方法で用いられる開回路濾過システ ムは、生体適合性チューブである 1 つまたはそれ以上の導管 (例えば、第 1 の導管、第 2 の導管、隣接した TFF ユニット間の 1 つもしくはそれ以上の導管、および / または濾過 液導管) を含み得る。いくつかの例では、開回路濾過システムは、リザーバおよび 2 つま たはそれ以上のサブシステム (本明細書に記載するような) を備える。

【0110】

本方法で用いられる開回路濾過システムは、本明細書に記載するように、単一のクロス フローフィルタ (例えば、管状クロスフローフィルタ) または 2 つもしくはそれ以上 (例 えば、2、3、4、または 5 つ) のクロスフローフィルタ (例えば、管状クロスフローフ ィルタ) を有する TFF ユニットを含み得る。他の例では、用いられる開回路濾過システ ムは、2 つまたはそれ以上 (例えば、2、3、または 4 つ) の TFF ユニットを含む場合 があり、この場合、隣接した TFF ユニットの各対は、流体導管により流体連結している 。TFF ユニットは、約 0.1 m^2 ~ 約 150 m^2 (例えば、約 0.1 m^2 ~ 約 145 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 140 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 135 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 130 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 125 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 120 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 115 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 110 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 105 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 100 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 95 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 90 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 85 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 80 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 75 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 70 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 65 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 60 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 55 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 50 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 45 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 40 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 35 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 30 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 25 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 20 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 15 m^2 、約 0.1 m^2 ~ 約 10 m^2 、または約 0.1 m^2 ~ 約 5 m^2) の総濾過面積を提供することができる。TFF ユニ ャット中に存在するフィルタは、本明細書に記載するポアサイズ (例えば、約 $0.2 \mu\text{m}$) 、形状、ファイバ内径、および / またはファイバ長さの任意の組合せを有し得る。

【0111】

本明細書で用いられる開回路濾過システムは、第 1 の導管または第 2 の導管、またはそ の両方に配置された少なくとも 1 つのポンプを含み得る。少なくとも 1 つのポンプは、シ ステム内の 1 つもしくはそれ以上の導管 (例えば、1 つまたはそれ以上の第 1 の導管、第 2 の導管、および / または隣接した TFF ユニット間の 1 つもしくはそれ以上の導管) 内 にも配置可能である。用いられるシステムは、リザーバ内で、第 1 または第 2 の導管の近 位 (例えば、ポンプから第 1 の導管または第 2 の導管がバイオリアクタと連結する位置ま での距離として、 0.01 cm ~ 5 cm (例えば、 0.01 cm ~ 4 cm 、 0.01 cm

10

20

30

40

50

～3 cm、0.01 cm～2 cm、または0.01 cm～1 cm)に配置された少なくとも1つのポンプを含み得る。いくつかのシステムは、細胞培養物を、第1の方向で第1の期間および第3の期間中流通させ、細胞培養物を第2の方向で第2の期間中流通させる単一のポンプのみを含む。他のシステムは、第1および第2のポンプを含み、この場合、第1のポンプは、細胞培養物を第1の方向で流通させ、第2のポンプは、細胞培養物を第2の方向で流通させる。

【0112】

本方法で用いられるどのシステムでも、少なくとも1つのポンプ(例えば、1、2、3、または4つのポンプ)は、LTP(例えば、蠕動ポンプ等の、本明細書に記載するLTPのいずれか)であり得る。本方法で用いられるシステム中に存在する少なくとも1つのポンプ(例えば、少なくとも1つのLTP)は、本明細書に記載するポンプ(例えば、LTP)の特徴または特性(例えば、ポンプヘッド容積、種類、および/またはチューブ)の任意の組合せを有し得る。方法の一部では、少なくとも1つのポンプが、約10RPM～約100RPM(例えば、約10RPM～約95RPM、約10RPM～約90RPM、約10RPM～約85RPM、約10RPM～約80RPM、約10RPM～約75RPM、約10RPM～約70RPM、約10RPM～約65RPM、約10RPM～約60RPM、約10RPM～約55RPM、約10RPM～約50RPM、約10RPM～約45RPM、約10RPM～約40RPM、約10RPM～約35RPM、約10RPM～約30RPM、約10RPM～約25RPM、または約10RPM～約20RPM)のポンプスピード(RPM)で用いられる。いくつかの例では、本方法は、約0.5L/m²/時間～約40L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約35L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約30L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約25L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約20L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約15L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約10L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約9L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約8L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約7L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約6L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約5L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約4L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約3L/m²/時間、約0.5L/m²/時間～約2L/m²/時間、または約0.8L/m²/時間～約1.2L/m²/時間の灌流フラックス速度をもたらす。いくつかの例では、少なくとも1つのポンプを使用すると、システム内の剪断速度は、約50s⁻¹～約1000s⁻¹(例えば、約50s⁻¹～約950s⁻¹、約50s⁻¹～約900s⁻¹、約50s⁻¹～約850s⁻¹、約50s⁻¹～約800s⁻¹、約50s⁻¹～約750s⁻¹、約50s⁻¹～約700s⁻¹、約50s⁻¹～約650s⁻¹、約50s⁻¹～約600s⁻¹、約50s⁻¹～約550s⁻¹、約50s⁻¹～約500s⁻¹、約50s⁻¹～約450s⁻¹、約50s⁻¹～約400s⁻¹、約50s⁻¹～約350s⁻¹、約50s⁻¹～約300s⁻¹、約50s⁻¹～約250s⁻¹、約50s⁻¹～約200s⁻¹、約50s⁻¹～約150s⁻¹、または約50s⁻¹～約100s⁻¹)となる。これらの方法で使用可能であるポンプの具体例として、16mmチューブを備えたWatson-Marlow 620蠕動ポンプ、または40mmチューブを備えたWatson-Marlow 800蠕動ポンプが挙げられる。

【0113】

当業者なら理解できるように、システム内の細胞培養物の総容積(濾過液導管および濾過液貯蔵タンク内の濾過液容積を除く)、少なくとも1つのTFFユニットにより提供される総濾過面積、および流速(例えば、第2および第3の期間中の)は、本発明において提供されるシステムおよび方法の1つまたはそれ以上の利点を可能にするしかるべき比(例えば、本明細書に記載する代表的な数値およびパラメータ)で実施される必要がある。

【0114】

フローサイクル

本明細書に記載する方法では、第1、第2、および/または第3の期間は、約20秒～

約 15 分（例えば、約 30 秒～約 15 分、約 20 秒～約 14 分、約 20 秒～約 13 分、約 20 秒～約 12 分、約 20 秒～約 11 分、約 20 秒～約 10 分、約 20 秒～約 9 分、約 20 秒～約 8 分、約 20 秒～約 7 分、約 20 秒～約 6 分、約 20 秒～約 5 分、約 20 秒～約 4 分、約 20 秒～約 3 分、約 20 秒～約 2 分、約 20 秒～約 115 秒、約 20 秒～約 110 秒、約 20 秒～約 105 秒、約 20 秒～約 100 秒、約 20 秒～約 95 秒、約 20 秒～約 90 秒、約 20 秒～約 85 秒、約 20 秒～約 80 秒、約 20 秒～約 75 秒、約 20 秒～約 70 秒、約 20 秒～約 65 秒、約 20 秒～約 60 秒、約 20 秒～約 55 秒、約 20 秒～約 50 秒、約 20 秒～約 45 秒、約 20 秒～約 40 秒、約 20 秒～約 35 秒、約 20 秒～約 30 秒、約 20 秒～約 25 秒、約 30 秒～約 90 秒、約 35 秒～約 85 秒、約 40 秒～約 80 秒、約 45 秒～約 75 秒、約 50 秒～約 70 秒、約 55 秒～約 65 秒、約 30 秒～約 14 分、約 30 秒～約 13 分、約 30 秒～約 12 分、約 30 秒～約 11 分、約 30 秒～約 10 分、約 30 秒～約 9 分、約 30 秒～約 8 分、約 30 秒～約 7 分、約 30 秒～約 6 分、約 30 秒～約 5 分、約 30 秒～約 4 分、約 30 秒～約 3 分、約 30 秒～約 2 分、約 30 秒～約 90 秒、約 30 秒～約 1 分、約 1 分～約 15 分、約 1 分～約 14 分、約 15 分～約 13 分、約 1 分～約 12 分、約 1 分～約 11 分、約 1 分～約 10 分、約 1 分～約 9 分、約 1 分～約 8 分、約 1 分～約 7 分、約 1 分～約 6 分、約 1 分～約 5 分、約 1 分～約 4 分、約 1 分～約 3 分、約 1 分～約 2 分、または約 1 分～約 90 秒）であり得る。いくつかの例では、第 1、第 2、および第 3 の期間は、ほぼ同一である。他の例では、第 1、第 2、および第 3 の期間は、同一でない。

10

【0115】

20

いくつかの例では、第 1 の期間の第 1 の流れの向きは、細胞培養物を、リザーバから少なくとも 1 つのポンプ（例えば、単一のポンプ）が配置された第 1 または第 2 の導管を通じて、次に少なくとも 1 つの TFF ユニットを通じて流通させ、次に他の導管を通じてリザーバに戻す（例えば、約 30 秒～約 60 分間、約 30 秒～約 50 分間、約 30 秒～約 40 分間、約 30 秒～約 30 分間、約 30 秒～約 20 分間、約 30 秒～約 15 分間、約 30 秒～約 10 分間、または約 30 秒～約 5 分間）。かかる例では、第 1 の期間中の流れは、システム内の少なくとも 1 つの TFF ユニット（およびその中の少なくとも 1 つのクロスフローフィルタ）を平衡化するのに用いられる。図 8 は、システム内の少なくとも 1 つの TFF ユニットの平衡化を目的とする、第 1 の流れの向きでの細胞培養物の流れを示す概略図である。

30

【0116】

図 9 は、細胞培養物を、第 1 の流れの向きで第 1 の期間（ t_1 ）、リザーバから TFF ユニットを通じて流通させ、期間（ t_{r1} ）において第 1 の流れの向きを反転させ、細胞培養物を、第 2 の流れの向きで第 2 の期間（ t_2 ）、TFF ユニットを通じて流通させ、期間（ t_{r2} ）において第 2 の流れの向きを反転させ、培養物を、第 1 の流れの向きで第 3 の期間（ t_3 ）、TFF ユニットを通じて流通させる工程の例を示す。例えば、 t_{r1} および / または t_{r2} は、約 1 秒～約 1 分間（例えば、約 1 秒～約 55 秒間、約 1 秒～約 50 秒間、約 1 秒～約 45 秒間、約 1 秒～約 40 秒間、約 1 秒～約 35 秒間、約 1 秒～約 30 秒間、約 1 秒～約 25 秒間、約 1 秒～約 20 秒間、約 1 秒～約 15 秒間、約 1 秒～約 10 秒間、約 1 秒～約 5 秒間、約 5 秒～約 60 秒間、約 5 秒～約 55 秒間、約 5 秒～約 50 秒間、約 5 秒～約 45 秒間、約 5 秒～約 40 秒間、約 5 秒～約 35 秒間、約 5 秒～約 30 秒間、約 5 秒～約 25 秒間、約 5 秒～約 20 秒間、約 5 秒～約 15 秒間、約 5 秒～約 10 秒間、または約 2 秒～約 10 秒間、約 2 秒～約 8 秒間、約 2 秒～約 6 秒間、または約 2 秒～約 4 秒間）であり得る。

40

【0117】

第 1 および / または第 2 の方向の流れ（例えば、第 1、第 2、および / または第 3 の期間のいずれか）は、約 0.5 L / 分～約 120 L / 分（例えば、約 0.5 L / 分～約 115 L / 分、約 0.5 L / 分～約 110 L / 分、約 0.5 L / 分～約 105 L / 分、約 0.5 L / 分～約 100 L / 分、約 0.5 L / 分～約 95 L / 分、約 0.5 L / 分～約 90 L / 分、約 0.5 L / 分～約 85 L / 分、約 0.5 L / 分～約 80 L / 分、約 0.5 L / 分

50

～約75 L / 分、約0.5 L / 分～約70 L / 分、約0.1 L / 分～約65 L / 分、約0.1 L / 分～約60 L / 分、約0.1 L / 分～約55 L / 分、約0.1 L / 分～約50 L / 分、約0.1 L / 分～約45 L / 分、約0.1 L / 分～約40 L / 分、約0.1 L / 分～約35 L / 分、約0.1 L / 分～約30 L / 分、約0.1 L / 分～約25 L / 分、約0.1 L / 分～約20 L / 分、約0.1 L / 分～約15 L / 分、約0.1 L / 分～約10 L / 分、または約0.1 L / 分～約5 L / 分)の流速をもたらし得る。

【0118】

(i)細胞培養物を第1の流れの向きで第1の期間において流通させる工程、および(ii)細胞培養物を第2の流れの向きで第2の期間において流通させる工程を1回繰り返すと、交換分画は約40%～約95%(例えば、約40%～約90%、約40%～約85%、約40%～約80%、約40%～約75%、約45%～約80%、約50%～約80%、約55%～約75%、約60%～約85%、約70%～約95%、または約70%～約85%)となり得る。

10

【0119】

本明細書に提示する方法では、システム内の細胞培養物の容積(濾過液導管、濾過液貯蔵タンク、および/または生物学的製造システムを除く)は、約0.1 L～約50 L(例えば、約0.1 L～約45 L、約0.1 L～約40 L、約0.1 L～約35 L、約0.1 L～約30 L、約0.1 L～約25 L、約0.1 L～約20 L、約0.1 L～約18 L、約0.1 L～約16 L、約0.1 L～約14 L、約0.1 L～約12 L、約0.1 L～約10 L、約0.1 L～約8 L、約0.1 L～約6 L、約0.1 L～約4 L、約0.1 L～約3 L、約0.1 L～約2 L、または約0.1 L～約1 L)であり得る。本明細書に記載する方法において、細胞培養物がリザーバ(例えば、灌流バイオリアクタ)外部で費やす時間は、5秒～45秒(例えば、約5秒～約40秒、約5秒～約35秒、約5秒～約30秒、約5秒～約25秒、約5秒～約20秒、約5秒～約15秒、約5秒～約10秒)であり得る。

20

【0120】

本明細書に提示する方法のいくつかの実施形態は、哺乳動物細胞を含まない濾過液を生成する。本明細書に提示する方法は、分泌型組み換えタンパク質を含む細胞培養物から分泌型組み換えタンパク質(例えば、抗体もしくはその抗原結合フラグメント、増殖因子、サイトカイン、または酵素)を含む濾過液も生成し得る。いくつかの実施形態では、細胞培養物および/または濾過液は滅菌状態にある。

30

【0121】

本発明の方法は、単位時間当たり、より大容積の細胞培養物を濾過するために、スケールアップまたはスケールダウン可能である。当業者なら理解できるように、より大型のポンプヘッド容積を有する少なくとも1つのポンプ、およびより大型のチューブ、および/またはTFFユニット内により多数のクロスフローフィルタ、またはより多数のTFFユニット(例えば、より広い総濾過面積)を組み込むことにより、より大容積の細胞培養物が単位時間当たりに処理可能である。これらの変更は、本明細書に記載する方法を実施するのに用いられる開回路濾過システムで実施可能であり、より大スケールのシステムが下記の利点のうちの1つまたはそれ以上(例えば、2、3、4、5、6、または7つ)を有することを保証するために、試験可能である：他の一方向開回路濾過システム(例えば、一方向TFFシステム)または二方向閉回路濾過システム(閉回路ATFTMシステム)と比較したときの、細胞培養物の外部容積(リザーバ外部)の減少、交換分画(例えば、第1の導管、TFFユニット、および第2の導管内)の増加、細胞培養物の外部滞留時間(リザーバ外部)の短縮、細胞培養物濾過中の剪断応力の低下、細胞培養物中の細胞生存率の改善、細胞培養物中の生存細胞密度の向上、およびフィルタ汚損の減少。3つの異なる代表的な方法および各方法を実施するのに用いられる開回路濾過システムに関する物理的および機能的パラメータの例を表2に示す(下記)。

40

【0122】

本明細書に記載するどの方法も、約14日間～約100日間(例えば、約14日間～約

50

90日間、約14日間～約80日間、約14日間～約70日間、約14日間～約60日間、約14日間～約50日間、約14日間～約40日間、約14日間～約30日間、約14日間～約20日間、約20日間～約100日間、約20日間～約90日間、約20日間～約80日間、約20日間～約70日間、約20日間～約60日間、約20日間～約50日間、約20日間～約40日間、約20日間～約30日間、約30日間～約100日間、約30日間～約90日間、約30日間～約80日間、約30日間～約70日間、約30日間～約60日間、約30日間～約50日間、約30日間～約40日間、約40日間～約100日間、約50日間～約90日間、約50日間～約80日間、約50日間～約70日間、約50日間～約60日間、約60日間～約100日間、約60日間～約90日間、約60日間～約80日間、または約60日間～約70日間)、連続的に実施可能である。

【0123】

【表 2】

表2. 3つの異なる代表的な方法および各方法を実行するのに用いたシステムのパラメータ

フィルタ	作動 容積 (L)	ファイバ 長さ (cm)	濾過 面積 (m^2)	Xv 目標値 (細胞E6個/ mL)	灌流 速度 (L/日)	交換 速度 (L/分)	外部 容積 (L)	交換 分画 (%)	外部滞留 時間 (秒)	剪断速度 (L/秒)	XR:PR	灌流 フラックス ($\text{L}/\text{m}^2/\text{時}$)	ポンプ	ポンプ スピード (RPM)
ATF4	10	30	0.77	40~80	20	3.5	0.55	78	12	716	252	1.08	16mmチューブを 備えたWatson- Marlow 620 蠕動ポンプ	68
2x ATF6 または ATF8	50	60	5	40~80	200	8	3.5	50	25	543	58	1.67	25mmチューブを 備えたWatson- Marlow 800 蠕動ポンプ	25
4x ATF10	500	60	40	40~80	2000	60	15	70	15	509	43	2.08	40mmチューブを 備えたWatson- Marlow 800 蠕動ポンプ	45

【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのTFFユニット内の1つもしくはそれ以上

10

20

30

40

50

のクロスフローフィルタ内のフィルタファイバに沿った圧力変化、および／または少なくとも1つのTFFユニットの1つもしくはそれ以上のクロスフローフィルタ内のフィルタメンブレンを横切る圧力変化は、およそ、例えば約1時間～約100日の期間（例えば、約1時間～約95日の期間、約1時間～約90日の期間、約1時間～約85日の期間、約1時間～約80日の期間、約1時間～約75日の期間、約1時間～約70日の期間、約1時間～約65日の期間、約1時間～約60日の期間、約1時間～約55日の期間、約1時間～約50日の期間、約1時間～約45日の期間、約1時間～約40日の期間、約1時間～約35日の期間、約1時間～約30日の期間、約1時間～約25日の期間、約1時間～約20日の期間、約1時間～約15日の期間、約1時間～約10日の期間、約1時間～約5日の期間、約1日～約100日の期間、約1日～約90日の期間、約1日～約85日の期間、約1日～約80日の期間、約1日～約75日の期間、約1日～約70日の期間、約1日～約65日の期間、約1日～約60日の期間、約1日～約55日の期間、約1日～約50日の期間、約1日～約45日の期間、約1日～約40日の期間、約1日～約35日の期間、約1日～約30日の期間、約1日～約25日の期間、約1日～約20日の期間、約1日～約15日の期間、約1日～約10日の期間、約5日～約100日の期間、約5日～約95日の期間、約5日～約90日の期間、約5日～約85日の期間、約5日～約80日の期間、約5日～約75日の期間、約5日～約70日の期間、約5日～約65日の期間、約5日～約60日の期間、約5日～約55日の期間、約5日～約50日の期間、約5日～約45日の期間、約5日～約40日の期間、約5日～約35日の期間、約5日～約30日の期間、約5日～約25日の期間、約5日～約20日の期間、約5日～約15日の期間、約5日～約10日の期間、約10日～約100日の期間、約10日～約95日の期間、約10日～約90日の期間、約10日～約85日の期間、約10日～約80日の期間、約10日～約75日の期間、約10日～約70日の期間、約10日～約65日の期間、約10日～約60日の期間、約10日～約55日の期間、約10日～約50日の期間、約10日～約45日の期間、約10日～約40日の期間、約10日～約35日の期間、約10日～約30日の期間、約10日～約25日の期間、約10日～約20日の期間、約15日～約100日の期間、約15日～約95日の期間、約15日～約90日の期間、約15日～約85日の期間、約15日～約80日の期間、約15日～約75日の期間、約15日～約70日の期間、約15日～約65日の期間、約15日～約60日の期間、約15日～約55日の期間、約15日～約50日の期間、約15日～約45日の期間、約15日～約40日の期間、約15日～約35日の期間、約15日～約30日の期間、約15日～約25日の期間、または約15日～約20日の期間）、本方法を実施している間、実質的に同一のままである（例えば、本方法開始時のフィルタファイバを横切る、またはフィルタメンブレンを横切る初期の圧力変化の約±20%以内、約±19%以内、約±18%以内、約±17%以内、約±16%以内、約±15%以内、約±14%以内、約±13%以内、約±12%以内、約±11%以内、約±10%以内、約±9%以内、約±8%以内、約±7%以内、約±6%以内、約±5%以内、約±4%以内、約±3%以内、約±2.5%以内、約±2.0%以内、約±1.5%以内、約±1.0%以内、または約±0.5%以内）。フィルタファイバまたはフィルタメンブレンを横切る圧力変化が有意に増加すれば、それはシステムの少なくとも1つのTFFユニット内の少なくとも1つのクロスフローフィルタの汚損を示す。

【0125】

リザーバ内の細胞培養物をインキュベーションする工程

いくつかの実施形態は、哺乳動物細胞が組み換えタンパク質を組織培養培地中に分泌できるようにする条件下で、リザーバ（例えば、灌流バイオリアクタ）内の細胞培養物をインキュベーションする工程をさらに含む。例えば、リザーバ中の細胞培養物は、約32～約39の温度でインキュベーション可能である。当業者は、温度は、インキュベーション中の特定の時点において（例えば、時間毎または日毎に）変更可能であると認識する。例えば、温度は、細胞培養物をリザーバ中に配置した後、約1日、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、14

10

20

30

40

50

日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、または約20日間以上経過した時点で、変更またはシフト可能である（例えば、上昇または低下）。例えば、温度は上方にシフト可能である（例えば、最大または約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、または10.0の変化）。例えば、温度は、下方にシフト可能である（例えば、最大または約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、または10.0の変化）。リザーバ内の細胞培養物をインキュベーションする工程は、最大でまたは約1%～15%のCO₂（例えば、最大でもしくは約14%のCO₂、12%のCO₂、10%のCO₂、8%のCO₂、6%のCO₂、5%のCO₂、4%のCO₂、3%のCO₂、2%のCO₂、または最大でもしくは約1%のCO₂）を含む雰囲気中でも実施可能である。さらに、本明細書に記載するどの方法も、加湿された雰囲気（例えば、少なくとももしくは約20%、30%、40%、50%、60%、70%、85%、80%、85%、90%、または少なくとももしくは約95%の湿度、または約100%の湿度）中で、細胞培養物をインキュベーションする工程を含み得る。

【0126】

第1、第2、および第3の期間を繰り返す間に、リザーバ（例えば、灌流バイオリアクタ）内の細胞培養物をインキュベーションする工程は、ある容積の液体培養培地をバイオリアクタに添加する工程を含み得る。例えば、その容積の液体培養培地をバイオリアクタに添加することは、濾過液としてシステムから除去される液体培養培地の損失分を補填し得る。液体培養培地をリザーバに添加する工程は、連続的または定期的に（例えば、3日毎に1回、1日おき、1日1回、1日2回、1日3回、1日4回、1日5回、もしくは1日6回以上）、または任意のこれらの組合せで実施可能である。リザーバにその容積の液体培養培地を添加する場合、かかる添加は、いくつかの事例では、システム内の細胞培養物の開始容積（濾過液導管および濾過液貯蔵タンク中に存在する濾過液の容積を除く）が24時間の各期間または本方法が実施される全期間にわたり、ほぼ同一であるように実施可能である。当技術分野において公知なように、液体培養培地が濾過液としてシステムから除去される速度（容積/単位時間）およびその容積の液体培養培地がリザーバに添加される速度（容積/単位時間）は、異なってもよい。液体培養培地が濾過液としてシステムから除去される速度（容積/単位時間）およびその容積の液体培養培地が添加される速度（容積/単位時間）は、ほぼ同一であってもよく、異なってもよい。

【0127】

あるいは、濾過液としてシステムから除去される容積、およびリザーバに添加される容積は、本方法の実施中に、24時間（あるいは、0.1時間～約24時間の増加期間、または24時間を上回る増加期間）の各期間において変更（例えば、漸増）可能である。例えば、本方法の実施において、24時間の各期間（あるいは、約1時間～24時間を超える増加期間、または24時間を上回る増加期間）内に濾過液としてシステムから除去される液体培養培地の容積、および添加される液体培養培地の容積は、例えばリザーバ容積または本方法の実施開始時の細胞培養物の総容積の0.5%～約20%の容積からリザーバ容積または本方法の実施開始時の細胞培養物の総容積の約25%～約150%まで増加可能である（例えば、漸増または千鳥式の増加により）。当業者なら理解できるように、24時間の各期間内に、濾過液としてシステムから除去される容積およびリザーバに添加される容積は、好ましくは、リザーバ容積または本方法の実施開始時の細胞培養物の総容積の約100%～約400%（例えば、約100%～約350%、約100%～約300%、約100%～約250%、約100%～約200%、約100%～約150%、約150%～約400%、約150%～約350%、約150%～約300%、約150%～約250%、約150%～約200%、約200%～約400%、約200%～約350%、約200%～約300%、または約200%～約250%）である。

【0128】

当業者は、濾過液としてシステムから除去される液体培養培地、およびリザーバに添加される液体培養培地は、同一種類の培地であり得ると認識する。他の事例では、濾過液としてシステムから除去される液体培養培地、およびリザーバに添加される液体培養培地は、実質的に異なってもよい。液体培養培地の容積は、手作業によりまたは自動化されたシステムを用いて、例えば灌流ポンプにより添加可能である。

【0129】

濾過液から組み換えタンパク質を単離する工程

本明細書に記載するどの方法も、濾過液から分泌型組み換えタンパク質（例えば、本明細書に記載する組み換えタンパク質のいずれか）を単離する工程をさらに含み得る。流体からポリペプチド（例えば、分泌型ポリペプチド）を単離するための多くの方法が、当技術分野において公知である。例えば、組み換えタンパク質を単離するための方法は、以下の1つまたはそれ以上の工程を含み得る：組み換えタンパク質を含む流体を捕捉する工程、精製する工程、ポリッシングする工程、および/または濾過する工程。当技術分野において周知のように、組み換えタンパク質を単離するのに用いられる具体的な方法は、組み換えタンパク質の生物物理学的な特性に依存する。例えば、組み換え抗体は、タンパク質A樹脂を用いて抗体を捕捉する工程を用い、ある程度精製可能である。

【0130】

いくつかの例では、濾過液中に存在する組み換えタンパク質は、少なくとも1つのマルチカラムクロマトグラフィシステム（MCCS）（例えば、本明細書に記載する1つまたはそれ以上のMCCSのいずれか）を通じて単離する工程を含む、一体化した連続的なプロセスを用いて単離される。一体化した連続的なプロセスは、本明細書に記載する代表的な生物学的製造システムのいずれかを用いて実施可能である。組み換えタンパク質を単離するための代表的な一体化した連続的なプロセス、およびかかるプロセスで用いられる生物学的製造システムは、2013年3月8日付け出願の米国特許出願第61/775,060号、および2013年7月19日付け出願の米国特許出願第61/856,390号に記載されている。

【0131】

その結果、単離された組み換えタンパク質は、少なくとももしくは約50重量%純粋、例えば少なくとももしくは約55重量%純粋、少なくとも60重量%純粋、少なくとも65重量%純粋、少なくとも70重量%純粋、少なくとも75重量%純粋、少なくとも80重量%純粋、少なくとも85重量%純粋、少なくとも90重量%純粋、少なくとも95重量%純粋、少なくとも96重量%純粋、少なくとも97重量%純粋、少なくとも98重量%純粋、または少なくとももしくは約99重量%純粋、または99重量%超純粋であり得る。

【0132】

いくつかの方法は、単離した組み換えタンパク質を薬学的に許容される賦形剤またはバッファーと混合することにより治療用原薬を処方する工程をさらに含む。混合は、単離した組み換えタンパク質を含む流体を緩衝液と混合することにより実施可能である。他の例では、混合は、固体緩衝剤を、緩衝液と共に、単離した組み換えタンパク質を含む流体に添加することにより実施可能である。本明細書に包含される混合の別の形態は、単離した組み換えタンパク質を含む固体組成物（例えば、凍結乾燥された粉末またはケーキ）を、緩衝液（例えば、注射用滅菌生理食塩水）と共に溶解することである。治療用原薬は、当技術分野において公知の任意の投与経路（例えば、経口投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与、髄腔内投与、または吸入）について処方可能である。

【0133】

実施例

本発明は、下記の実施例にさらに記載されるが、特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例 1】

【0134】

本明細書に提示する開回路濾過システムにより達成される処理と、A T F（商標）（R e f i n e T e c h n o l o g y）により達成される処理との比較

本明細書に提示する開回路濾過システムにより達成される細胞培養物処理と、A T F（商標）（R e f i n e T e c h n o l o g y）（閉回路流通方向切り替え型タンジェント濾過システム）により達成される細胞培養物処理とを比較するために、一連の実験を実施した。これらの実験を実施するのに用いたデバイスを、図 5 に一般的に示す。特に、開回路濾過システムで用いたりザーバは、B r o a d l y - J a m e s 15 Lパイオリアクタであり、第 1 の導管および第 2 の導管は、生体適合性、内径 0.5 インチの溶接可能な移送チューブであり、T F Fユニットは、単一の管状クロスフローフィルタ（長さ 30 cm および内径 1 mm であり、ならびに平均ポアサイズ 0.2 μ m、ファイバ密度 830 ファイバ/フィルタ、および濾過面積 0.77 m² を有するポリエーテルスルホンファイバから構成される）を含み、少なくとも 1 つのポンプは、第 1 および第 2 の流れの向きで流体を流通させる能力を有する単一の W a t s o n - M a r l o w 蠕動ポンプであり、そのポンプヘッド容積は 50 mL ~ 100 mL であり、内径 16 mm および壁直径 4 mm を有するツインチャンネル G O R E S t a - P u r e チューブを備えた。

10

【0135】

材料および方法

本発明において提供される開回路濾過システムと、R e f i n e T e c h n o l o g y 製 A T F（商標）により達成される処理工程の比較で用いられた実験パラメータの要約を表 3 および 4 にまとめる（下記）。これらの実験を実施するのに用いられた方法のさらに詳細な要約を下記に提示する。

20

【0136】

【表 3】

表3.実験パラメータ

パラメータ	詳細な説明	
	TFF	ATF4
細胞系統	GC2008クローンA61、高密度バンク「GC2008 A61 HD WAVE」、細胞 45×10^7 個/バイアル	
培地	グルタミン添加CD CHO	
バイオリアクタ	Broadly James 15Lバイオリアクタ	
作動容積	10L	
バイオリアクタの種菌	振盪フラスコシードトレイン	
接種密度	細胞 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個/mL	
目標細胞密度	2リアクタ容積(RV)/日で細胞 40×10^6 個/mLに到達するまで放置し、維持するように流出させる。	
細胞固有の灌流速度	0.05nL/細胞-日	
バイオマスの除去(必要に応じて)	キャパシタンス(Aber)と細胞密度の関係が良好の場合、流出速度を制御するのにキャパシタンスを使用。あるいは、O ₂ スパージを使用	
温度	37°C	
攪拌速度	120RPM	
DO	≥40%	
ベース	1M Na ₂ CO ₃ (炭酸ナトリウム)	
消泡剤	Invitrogen Foam Away、3%Simethicone(30,000PPM)作業用ストック:3000PPM(WFIで希釈)	
pCO ₂	<120mmHg、>120mmHgの場合、N ₂ でスパージ	
pH	6.95±0.1	
ガスの添加	スパージ:酸素、CO ₂ (必要に応じて)、N ₂ (必要に応じて)オーバーレイ:100ccpmの空気	
O ₂ スパージャー	20μm焼結式	
N ₂ スパージャー	1mmドリル穴	
細胞分離デバイス	ポンプヘッドが620LのWatson-Marlow 620Du蠕動ポンプ、ID16mmのGore sta-pureチューブ、ATF4フィルタ(0.2μm)を備えたTFF	Refine ATF4
ATF/TFF交換速度	3.5L/分(65~70rpm)、1分毎に反転	3.5L/分、7秒毎に反転

【 0 1 3 7 】

【表 4】

表4.パラメータの比較

	交換速度 (L/分)	移送チューブ ID (インチ)	外部容積 (L)	交換分画 (%)	外部滞留時間 (秒)	ポンプ回転速度 (RPM)	剪断速度 (1/秒)	交換速度: 灌流速度	ポンプ逆転時間 (秒)
ATF4	3.5	0.375	0.756	19	71	N/A	716	252	7
TFF	3.5	0.500	0.550	78	12.1	68.5	716	252	60

【 0 1 3 8 】

灌流バイオリアクタを稼働させるのに用いた条件を表3に列記する。バイオリアクタは、作動容積として10Lを用い、CD-CHO培養培地により2リアクタ容積/日で置き換えながら、細胞 40×10^6 個/mLに維持した。本明細書に提示する試験対象の開回

10

20

30

40

50

路濾過システムは、A T F 4 と同一のフィルタおよびハウジングを備えたが、本システム（図 5 に示す）および開回路システム（A T F 4 で用いた閉じたシステムではない）を通じて細胞培養物を反転可能に流通させるために、ポンプヘッド容積が 5 0 m L ~ 1 0 0 m L の W a t s o n - M a r l o w 蠕動ポンプ 6 2 0 D u を、培養再循環ポンプとして用いた。A T F 4 バイオリアクタの灌流速度を、培養 2 0 日目に、2 リアクタ容積 / 日から 1 リアクタ容積 / 日に変更し、一方、本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システムの灌流速度を、3 2 日目に、2 リアクタ容積 / 日から 1 リアクタ容積 / 日に変更し、1 0 % の E f f i c i e n t F e e d B (G i b c o , I n v i t r o g e n) も補給した。

【 0 1 3 9 】

結果

本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システムの生存細胞密度は、9 日目および 1 0 日目で細胞 $4 0 \times 1 0^6$ 個 / m L に到達したが、対応する A T F システムよりも早期に細胞 $4 0 \times 1 0^6$ 個 / m L の細胞密度に到達した（図 1 0）。本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システムの生存細胞の割合（%）は、培養が細胞 $4 0 \times 1 0^6$ 個 / m L に到達したとき約 9 0 % であったが、7 0 % で安定化するまで 3 週間にわたり継続的に減少した（図 1 1）。本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システム内の細胞培養物のキャパシタンスは、A T F システム内の細胞培養物と比較して上昇したが（図 1 2）、本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システムの細胞培養物および A T F システムの細胞培養物に由来する平均生存細胞直径は類似した（図 1 3）。

【 0 1 4 0 】

本明細書に提示する開回路濾過システム内の細胞培養物、および A T F システムの細胞培養物の生産性プロファイルを、図 1 4、図 1 5、図 1 6、および図 1 7 に示す。本明細書に提示する開回路濾過システム内の細胞培養物により産生される I g G の濃度は、A T F システムと比較して、より遅延した時点において増加した（図 1 4）。本明細書に提示する開回路濾過システム内の細胞培養物の容積生産性および比生産性は、A T F システム内の細胞培養物と比較して増加した（それぞれ図 1 5 および図 1 6）。本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システム内の細胞培養物の篩係数は、3 週間培養後、約 9 0 % に留まり、A T F システム内の細胞培養物の篩係数を上回った（図 1 7）。

【 0 1 4 1 】

試験対象となった各システムのグルコースおよび乳酸生成プロファイルを図 1 8、図 1 9、図 2 0、および図 2 1 に示す。本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システムの細胞培養物の比グルコース消費速度および比乳酸生成速度は、A T F システム内の細胞培養物の比グルコース消費速度および比乳酸生成速度を上回った（それぞれ図 1 8 および図 1 9）。さらに、比好気性グルコース消費速度およびグルコースからの乳酸収率については、A T F システム内の細胞培養物の比好気性グルコース消費速度およびグルコースからの乳酸収率よりも、本明細書に提示する試験対象の開回路濾過システム内の細胞培養物の方が高かった（それぞれ図 2 0 および図 2 1）。

【 0 1 4 2 】

これらのデータから、本発明において提供される開回路濾過システムは、別の閉回路タンジェント濾過システム（R e f i n e T e c h n o l o g y 製 A T F（商標）システム）と比較して、同等または改善した細胞培養物の特性、例えば同等または向上したキャパシタンス、同等または向上した容積生産性および比生産性、同等または向上した篩係数、ならびに同等または向上した比グルコース消費量を有する細胞培養物を提供することが示される。

【 実施例 2 】

【 0 1 4 3 】

開回路濾過システムに認められた生存細胞密度

本明細書に提示する開回路濾過システムを用いて達成される最高の生存細胞密度を決定するために、また場合により、決定された生存細胞密度を、A T F（商標）（R e f i n

10

20

30

40

50

e Technology) (閉回路流通方向切り替え型タンジェント濾過システム)を類似した条件下で用いて達成される生存細胞密度と比較するために、実験を実施した。これらの実験で用いたデバイスを、図5に一般的に示す。特に、閉回路濾過システムで用いたリザーバは、Broadly-James 15 Lバイオリアクタであり、第1の導管および第2の導管は、生体適合性、内径0.5インチの溶接可能な移送チューブであり、TFFユニットは、単一の管状クロスフローフィルタ(長さ30 cmおよび内径1 mmであり、ならびに平均ポアサイズ0.2 μm 、ファイバ密度830ファイバ/フィルタ、および濾過面積0.77 m^2 を有するポリエーテルスルホンファイバから構成された)を含み、少なくとも1つのポンプは、第1および第2の流れの向きで流体を流通させる能力を有する単一のWatson-Marlow蠕動ポンプであり、そのポンプヘッド容積は50 mL~100 mLであり、内径16 mmおよび壁直径4 mmを有するツインチャンネルGORE Sta-Pureチューブを備えた。

10

【0144】

材料および方法

本発明において提供される閉回路濾過システム(および、場合によりRefine Technology製ATF(商標))を用いて達成することができる最高細胞密度を決定するための実験パラメータの要約を表5に示す。これらの実験で用いられた方法のさらに詳細な要約を下記に提示する。

【0145】

【表 5】

表5.実験パラメータ

パラメータ	詳細な説明	
	TFF	ATF4
細胞系統	GC2008クローンA61、HDバンク「GC2008 A61 HD WAVE」、細胞 45×10^7 個/バイアル	
培地	グルタミン添加CD CHO	
バイオリアクタ	Broadly James 15Lバイオリアクタ	
作動容積	10L	
バイオリアクタの種菌	振盪フラスコシードトレイン	
接種密度	細胞 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個/mL	
細胞密度	CSPRが 0.05 nL/細胞-日 となるように、灌流速度を高めつつ、細胞を連続的に増殖させ、一定流出は低速で行うまたは全く行わず、細胞密度を維持する。	
細胞固有の灌流速度 (CSPR)	0.05 nL/細胞-日	
温度	37°C	
攪拌速度	120RPM	
DO	$\geq 40\%$	
ベース	1M Na_2CO_3 (炭酸ナトリウム)	
消泡剤	Invitrogen Foam Away、3%Simethicone(30,000PPM) 作業用ストック:3000PPM(WFIで希釈)	
pCO ₂	$<120 \text{ mmHg}$ 、 $>120 \text{ mmHg}$ の場合、 N_2 でスパージ	
pH	6.95 ± 0.1	
ガスの添加	スパージ:酸素、 CO_2 (必要に応じて)、 N_2 (必要に応じて) オーバーレイ:100ccpmの空気	
O ₂ スパージャー	20 μm 焼結式	
N ₂ スパージャー	1mmドリル穴	
細胞分離デバイス	ポンプヘッドが620LのWatson-Marlow 620Du蠕動ポンプ、ID16mmのGore sta-pureチューブ、ATF4フィルタ($0.2 \mu\text{m}$)を備えたTFF	Refine ATF4
ATF/TFF交換速度	3.5L/分($65 \sim 70 \text{ rpm}$)、1分毎に反転	3.5L/分、7秒毎に反転

【0146】

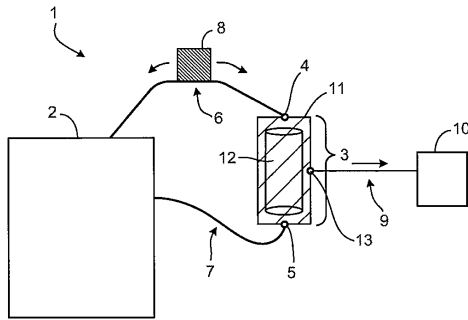
灌流バイオリアクタを稼働させるのに用いた条件を表5に列記する。作動容積として10Lを用いて、細胞をバイオリアクタ内で増殖させ、CD-CHO培養培地で十分置き換えて、細胞固有の灌流速度として 0.05 nL/細胞-日 を維持した。開回路濾過システムは、ATF4と同一のフィルタおよびハウジングを備えたが、本システム(図5に示す)および開回路システム(ATF4で用いた閉じたシステムではない)を通じて細胞培養物を反転可能に流通させるために、培養再循環ポンプとしてポンプヘッド容積が50mL \sim 100mLのWatson-Marlow蠕動ポンプ620Duを使用した。細胞培養物の生存細胞密度を、細胞培養物プロセスの稼働期間中、1日1回測定した。

【0147】

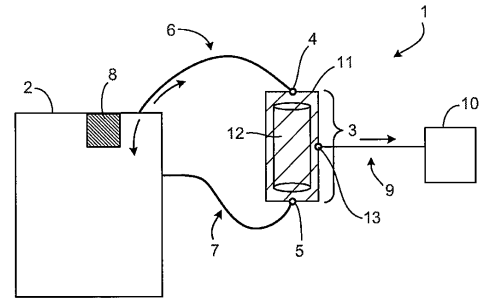
他の実施形態

本発明は、その詳細な説明と共に記載されてきたが、上記説明は、説明を目的としており、本発明の範囲を制限することを意図せず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲により定義されるものと理解されたい。他の態様、長所、および修正形態も、下記の特許請求の範囲に含まれる。

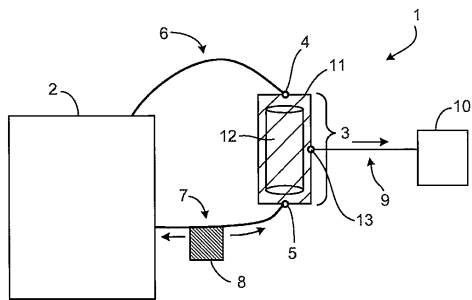
【図 1】



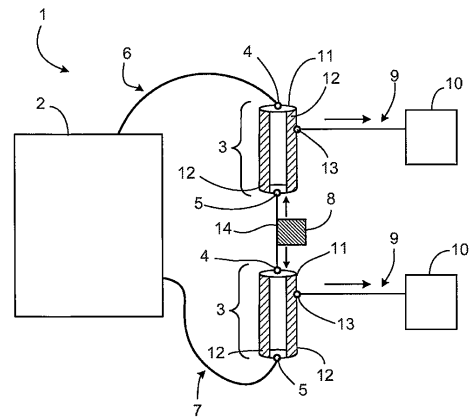
【図 3】



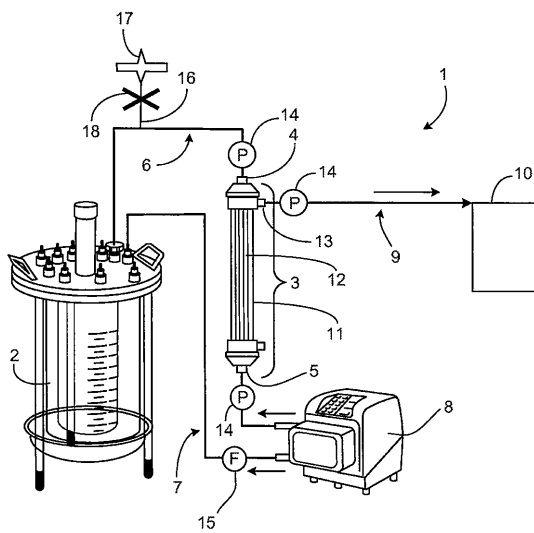
【図 2】



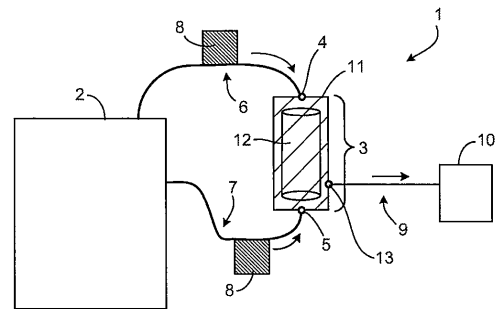
【図 4】



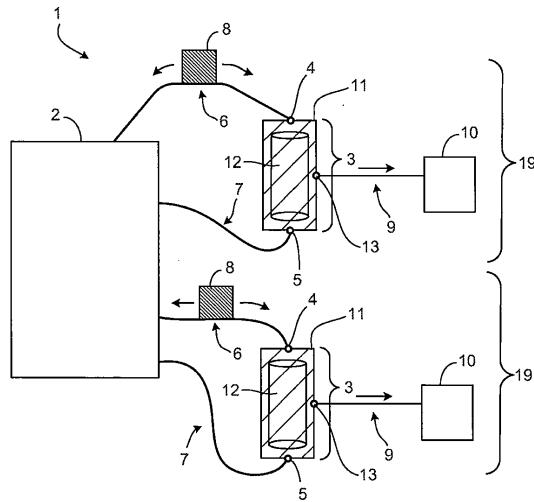
【図 5】



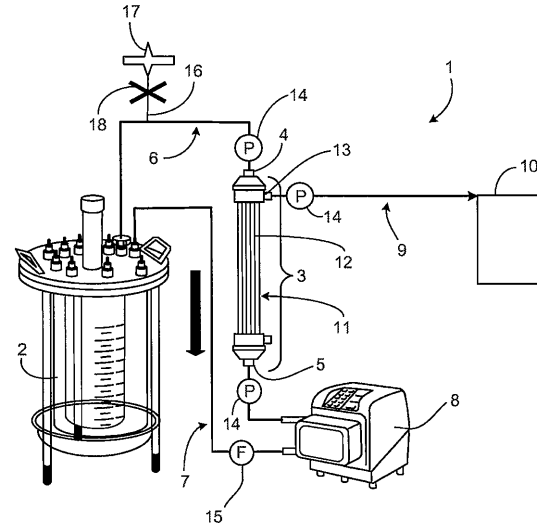
【図 6】



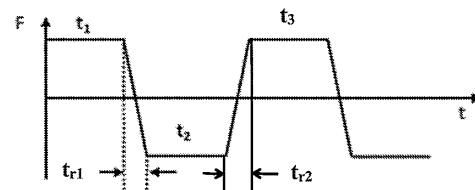
【図 7】



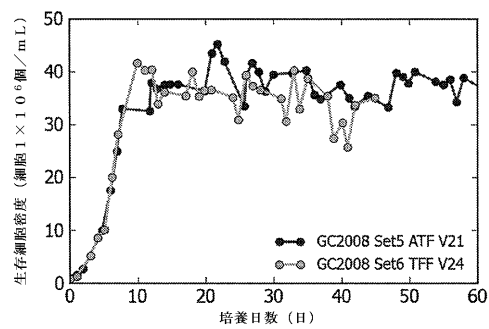
【図 8】



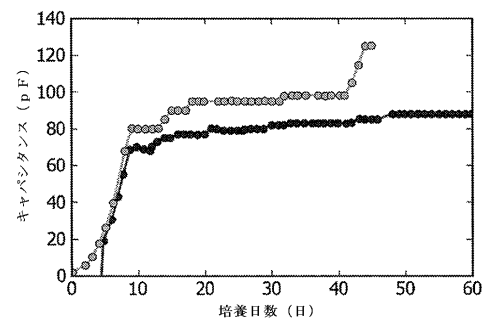
【図 9】



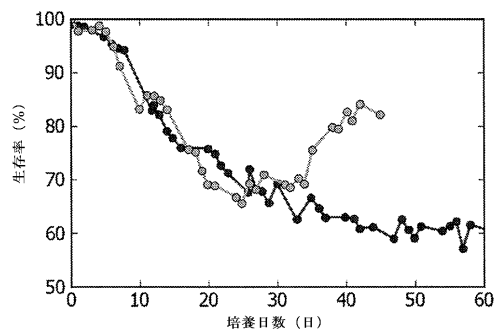
【図 10】



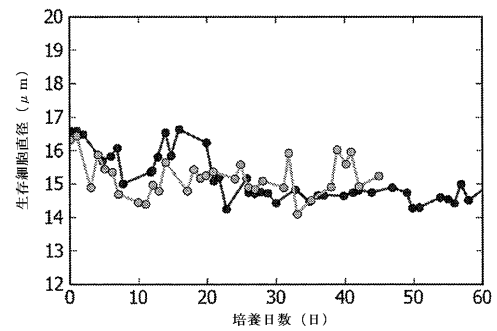
【図 12】



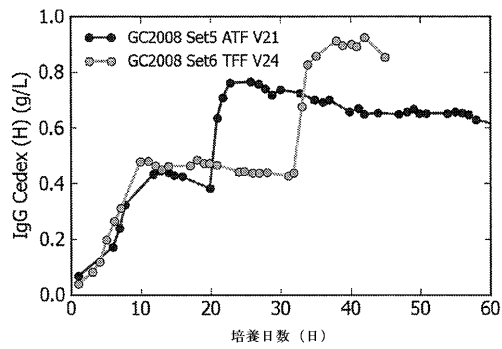
【図 11】



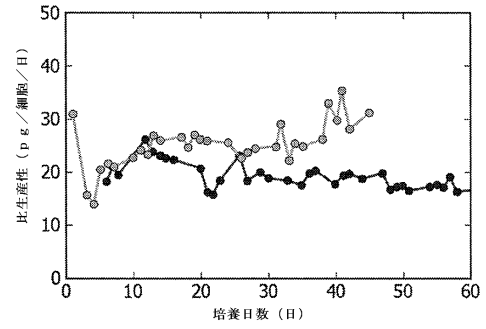
【図 13】



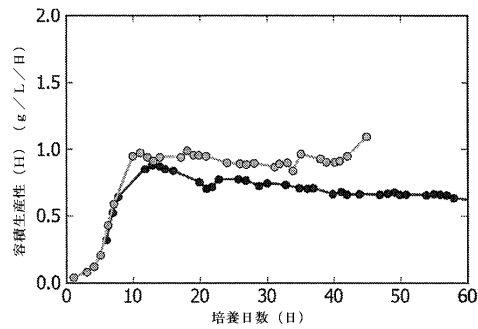
【図 14】



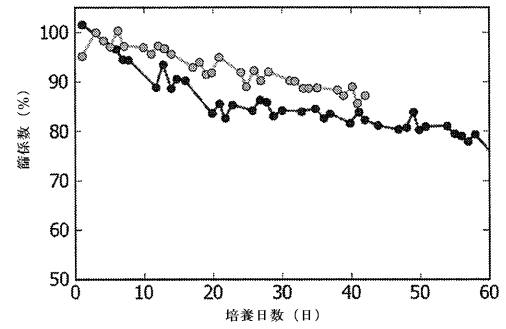
【図 16】



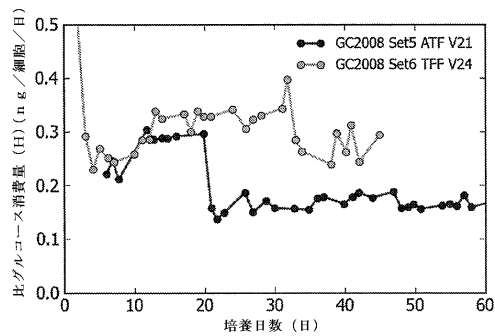
【図 15】



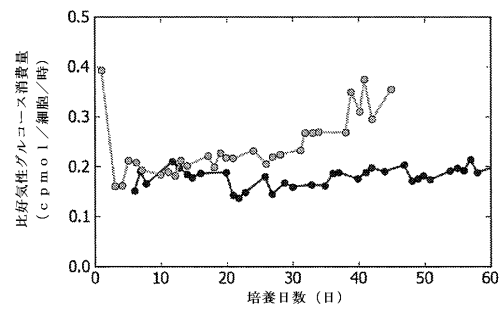
【図 17】



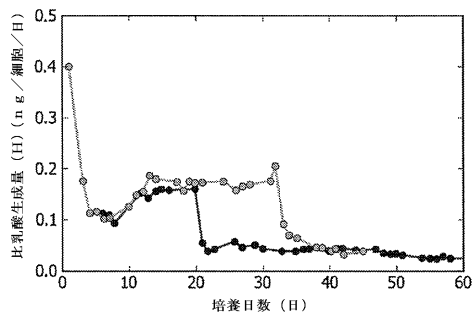
【図 18】



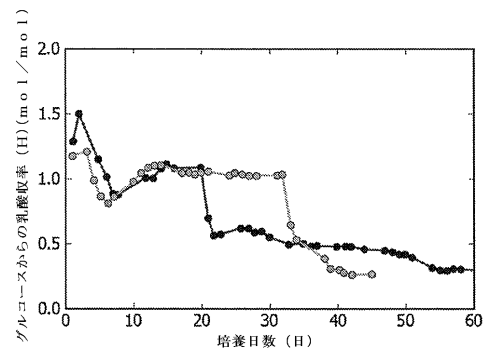
【図 20】



【図 19】



【図 21】



フロントページの続き

- (72)発明者 ベンジャミン・ライト
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー -
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ
- (72)発明者 マーシェラ・ユー
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー -
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ
- (72)発明者 ジン・イン
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー -
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ
- (72)発明者 コンスタンティン・コンスタンティノフ
アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー -
5 0 5 エー . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ

合議体

審判長 田村 聖子

審判官 中島 庸子

審判官 松野 広一

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 1 1 4 8 6 号明細書
米国特許第 4 8 8 5 0 8 7 号明細書
特開平 5 - 3 1 3 3 5 号公報
特開昭 6 0 - 0 0 0 8 0 4 号公報
国際公開第 2 0 1 3 / 1 2 4 3 2 6 号
Chemie Ingenieur Technik , 2 0 1 2 年 1 1 月 1 9 日 , Vol . 8 5
, No . 1 - 2 , p . 1 4 4 - 1 5 2

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

IPC C12M 1/00- 3/00

C12N 1/00- 7/08

B01D 53/22, 61/00-71/82

C02F 1/44

Google Scholar

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)