

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年10月5日(05.10.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/190829 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/013100

(22) 国際出願日: 2023年3月30日(30.03.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-058476 2022年3月31日(31.03.2022) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 黒澤 喬 (KUROSAWA Takashi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 稲田 淳史 (INADA Atsushi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 中居 真一 (NAKAI Shinichi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: PRODUCT MANUFACTURING METHOD AND PRODUCT

(54) 発明の名称: 生産物の製造方法、及び生産物

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a manufacturing method for a product of cell culturing, wherein membrane clogging is suppressed; and a product manufactured via said method. The present invention provides a product manufacturing method comprising cell culturing, wherein: perfusion culture is performed in which the cell density during production of the product is 80×10^6 cells/mL to 300×10^6 cells/mL; the period of the perfusion culture is 13-500 days; during a period of one or more days among the perfusion culture period, X [mol/L/day], which is the alkali addition speed per day, is controlled to the range $0 \leq X < 0.029$; and the pH of an added alkali aqueous solution is such that $7 < \text{pH} < 13$.

(57) 要約: 本発明の課題は、細胞培養による生産物の製造方法において、膜詰まりを抑制することができる方法、並びに上記方法により製造される生産物を提供することである。本発明によれば、細胞を培養することを含む、生産物の製造方法であって、生産物の生産時における細胞密度が 80×10^6 cells/mL 以上 300×10^6 cells/mL の灌流培養であり、灌流培養の期間は13日以上500日以下であり、上記灌流培養の期間のうち少なくとも1日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day] が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御され、添加されるアルカリ水溶液のpHは、 $7 < \text{pH} < 13$ である、生産物の製造方法が提供される。



WO 2023/190829 A1

明 細 書

発明の名称：生産物の製造方法、及び生産物

技術分野

[0001] 本発明は、細胞を培養することを含む、生産物の製造方法であって、アルカリ添加速度およびアルカリ水溶液のpHを制御した方法に関する。本発明はさらに、上記した製造方法により製造される生産物に関する。

背景技術

[0002] 細胞の培養は、有用な性質を有する細胞を増加させるため、細胞に生産物を生産させるため等の目的で行われている。例えば、特許文献1には、哺乳類細胞培養プロセスの間の、免疫グロブリンのFc領域を含有する組換えタンパク質の高マンノースグリコフォーム含量の調節方法であって、バイオリクター中の無血清培地において、組換えタンパク質を発現する哺乳類細胞培養を確立すること、産生フェーズの間、哺乳動物細胞を維持すること、及び細胞培養をモネンシンと接触させることを含む、方法が記載されている。

[0003] また、特許文献2には、pH設定点を使用してpHを制御することを含む、哺乳動物細胞を培養するための流加方法において、哺乳動物細胞を第一pHで培養培地中に播種し、細胞を第一pHで培養することを含む第一培養段階であって、pH設定点が第一pHに維持される第一培養段階と；第一pHより高い第二pHで細胞を培養することを含む第二培養段階であって、設定点が第二pHに維持される第二培養段階とを含み、第二pHが第一pHよりも少なくとも0.1pH単位高く、第二培養段階が少なくとも6時間の持続期間を有する、方法が記載されている。

[0004] さらに、特許文献3には、不死化ヒト血液細胞、好ましくは骨髓性白血病を起源とする細胞またはそれに由来する細胞の懸濁物を培養するための方法であって、高い生産性、高い細胞生存率および増殖速度ならびに高いバッチ間の一貫性を提供し、これらのパラメーターを変更することなくスケールアップすることができる方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特表2016-534732号公報
特許文献2：特表2021-503916号公報
特許文献3：特表2014-500032号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 灌流培養で一般的に用いられるATF (Alternating tangential flow filtration) 方式は、膜の2次側から1次側に液が逆流する逆洗効果により、TFF (Tangential flow filtration) 方式と比べて膜詰まりしにくい。しかし、生産性向上の開発が進むにつれて細胞密度の高密度化が進み、ATF方式においても膜詰まりが課題となっている。膜詰まりを抑制するための一般的な対策は、膜面積を増大することであるが、市販されている膜の面積は小さいこと、および装置が大型化するという問題がある。
- [0007] 本発明は、細胞培養による生産物の製造方法において、膜詰まりを抑制することができる方法を提供することを解決すべき課題とする。さらに、本発明は、上記方法により製造される生産物を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、pH制御に用いるアルカリ水溶液のpHおよび添加速度を制御することによって、膜詰まりを抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0009] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。
- <1> 細胞を培養することを含む、生産物の製造方法であって、
生産物の生産時における細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $300 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の灌流培養であり、灌流培養の期間は13日以上5

00日以下であり、

上記灌流培養の期間のうち少なくとも1日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day] が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御され、添加されるアルカリ水溶液のpHは、 $7 < \text{pH} < 13$ である、

生産物の製造方法。

<2> 上記灌流培養における細胞密度が $100 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $300 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下である、<1>に記載の生産物の製造方法。

<3> 上記灌流培養の期間が18日以上500日以下である、<1>又は<2>に記載の生産物の製造方法。

<4> 生産物の生産のための培養の期間が、5日以上450日以下である、<1>から<3>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<5> 上記灌流培養の期間のうち少なくとも13日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day] が、 $0 \leq X < 0.008$ の範囲で制御される、<1>から<4>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<6> 上記灌流培養の期間のうち少なくとも13日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day] が0である、<1>から<5>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<7> 上記灌流培養の期間のうち50%以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day] が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御される、<1>から<6>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<8> 上記灌流培養における細胞培養液の連続分離方法が、膜濾過である、<1>から<7>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<9> 上記膜濾過が、ATFと称される交接続線流濾過である、<1>から<8>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<10> 濾過時の流束である Y [$L/m^2/hour$] が、 $0 < Y \leq 10$ である、<8>又は<9>に記載の生産物の製造方法。

<11> 上記培養中の培養液の平均 pH が $6.7 \sim 7.2$ である、<1>から<10>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<12> 上記培養中の培養液の最低 pH が 6.6 以上である、<1>から<11>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<13> 上記培養中の培養液の pH が、培養液中の pH をインラインで測定しながら、自動でアルカリ水溶液を添加することにより制御される、<1>から<12>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<14> 上記灌流培養において、細胞密度が $80 \times 10^6 cells/mL$ 以上である目標細胞密度に到達した後に、細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、上記目標細胞密度 $\pm 40\%$ 以内に維持し、細胞密度が上記目標細胞密度 $\pm 40\%$ 以内に維持された期間において、生産物を回収する、<1>から<13>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<15> 上記灌流培養において、細胞密度が $80 \times 10^6 cells/mL$ 以上である目標細胞密度に到達した後に、1日につき少なくとも1度以上細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、上記目標細胞密度 $\pm 10\%$ 以内に調整することを含む、<1>から<13>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<16> 上記細胞密度が $80 \times 10^6 cells/mL$ 以上に維持される期間の溶存 CO_2 濃度が $60 \sim 180 mmHg$ である、<1>から<15>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<17> 上記アルカリが $NaHCO_3$ および/または Na_2CO_3 である、<1>から<16>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<18> 上記アルカリが $NaHCO_3$ である、<1>から<17>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<19> 上記アルカリ水溶液の濃度 Z [mol/L] が、 $0 < Z < 5$ である、<1>から<18>の何れか一に記載の生産物の製造方法。

<20> 灌流培養において添加される培地のpHが7.0~8.0である、<1>から<19>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<21> アルカリを添加せずに培養を行う場合において培養液のpHが低下する場合には、アルカリを追加した培地を供給することにより、培養液のpHを制御する、<1>から<20>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<22> 培養液のpHが6.85を下回ったときに、 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \text{ mol/L}$ のアルカリを追加した培地を供給することを含む、<1>から<21>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<23> 上記灌流培養においてジメチコンを含有する消泡剤が添加され、上記アルカリの添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ と、上記ジメチコンの添加速度である $B [\text{g/L/day}]$ とが、 $B < -0.79X + 0.0228$ を満たす、<1>から<22>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<24> 上記灌流培養の全期間において、アルカリ添加を行わない、<1>から<23>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<25> 上記細胞が動物細胞である、<1>から<24>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<26> 上記細胞がCHO細胞である、<1>から<25>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<27> 上記生産物が抗体である、<1>から<26>の何れかーに記載の生産物の製造方法。

<28> <1>から<27>の何れかーに記載の生産物の製造方法により製造される、生産物。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、灌流培養における膜詰まりを抑制することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、細胞培養装置を示す。図1に示す装置全体が、細胞培養装置で

ある。

[図2]図2は、アルカリ添加速度と培養開始からの膜詰まりまでの日数との関係を示す。

[図3]図3は、アルカリ添加速度と微粒子密度との関係を示す。

[図4]図4は、アルカリ添加速度とLDHとの関係を示す。

[図5]図5は、アルカリ添加速度とジメチコン添加速度と培養開始からの膜詰まりまでの日数との関係を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下において、本発明の内容について詳細に説明する。本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を意味する。

[0013] 本発明は、細胞を培養することを含む、生産物の製造方法であって、生産物の生産時における細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $300 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下の灌流培養であり、灌流培養の期間は13日以上500日以下であり、

上記灌流培養の期間のうち少なくとも1日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御され、添加されるアルカリ水溶液のpHは、 $7 < \text{pH} < 13$ である、

生産物の製造方法に関するものである。本発明によれば、灌流培養における膜詰まりを抑制することができる。本発明によれば、特にATF/TFF等の膜を用いた灌流培養において生産性を向上させることができる。

ここで1日あたりのアルカリ添加とは、培養液中にアルカリ水溶液として培地とは別に直接添加されるアルカリ添加のことを意味し、灌流培養時に培養槽に添加される培地中に仮にアルカリを含んでいたとしても、ここでいうアルカリ添加には該当しない。また本明細書において、培地に添加する等の記載がない場合、アルカリ添加は直接培養液中に添加することを意図する。

[0014] 本発明においては、生産物の生産時における細胞密度は、 $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$

111 s/mL以上であり、 $80 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mLであることが好ましく、 $90 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mLであることがさらに好ましく、 $100 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mLであることがさらに好ましく、 $110 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mLであることがさらに好ましく、 $120 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mLであることがさらに好ましい。10⁶の代わりにMと表記することもある。特に、細胞密度を $120 \times 10^6 \sim 300 \times 10^6$ cells/mLとすることで膜詰まりは顕著に表れるようになり、本発明の効果が顕著に得られる。

[0015] 好ましくは、本発明においては、後記する灌流培養において、細胞密度が 80×10^6 cells/mL以上である目標細胞密度に到達した後に、細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、上記目標細胞密度±40%以内に維持し、細胞密度が上記目標細胞密度±40%以内に維持された期間において、生産物を回収することができる。

好ましくは、上記灌流培養において、細胞密度が 80×10^6 cells/mL以上である目標細胞密度に到達した後に、1日につき少なくとも1度以上細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、上記目標細胞密度±10%以内に調整することができる。

[0016] 本発明において、細胞を培養する方法の様式は、灌流培養である。灌流培養は、新鮮な培地を細胞培養液中へ供給し、細胞を培養している培地の一部を除去する培養法である。この灌流培養を行うことによって細胞から排出される老廃物を培養槽から取り除くことができる。灌流培養としては、培養槽に培地を連続供給しながら、培養液内の細胞を連続分離した液を回収することができる。

[0017] 灌流培養によれば、一般的に、高い生細胞密度を達成することが可能である。典型的な灌流培養は、1日間又は2日間続くバッチ培養で始まり、その後、培養物に新鮮な供給培地を連続的、段階的、及び／又は断続的に添加し、使用済み培地を同時に除去する。灌流培養においては、沈降、遠心分離又

はろ過などの方法を用いて細胞を分離し、生細胞密度を維持しながら使用済み培地を除去することもできる。灌流培養の利点は、目的タンパク質が生産される培養が、バッチ培養法又はフェドバッチ培養よりも長期間維持されることである。

[0018] 灌流は、連続的、段階的、断続的又はこれらの組み合わせの何れの形態でもよい。好ましくは、連続的な形態がよい。動物細胞は、培養物中に保持され、除去される使用済みの培地は、細胞を実質的に含まないか、又は培養物よりもはるかに少ない細胞を有していてもよい。細胞培養によって発現される生産物は膜孔径の選択により、培養物中に保持又は回収することができる。

[0019] 灌流培養における細胞培養液の連続分離方法は、好ましくは膜濾過であり、より好ましくは交互接線流濾過 (Alternating Tangential Flow Filtration: ATF) である。

[0020] 濾過時の流束である Y [$L/m^2/hour$] は、好ましくは $0 < Y \leq 10$ であり、より好ましくは $0 < Y \leq 5$ であり、さらに好ましくは $0 < Y \leq 2$ である。

[0021] 濾過時の流束とは、単位時間、単位ろ過面積あたりに膜を透過する培養液量のことであり、以下式で定義される。

[0022] [数1]

$$\text{濾過時の流束} \quad [L/m^2/hour] = \frac{\text{濾過膜を通過する流量} \quad [L/hour]}{\text{濾過膜の面積} \quad [m^2]}$$

[0023] 灌流比は特に限定されないが、一般的には $0.3 vvd \sim 5.0 vvd$ であり、好ましくは $0.5 vvd \sim 2.0 vvd$ であり、より好ましくは $0.5 vvd \sim 1.4 vvd$ である。 vvd は、1日間の細胞培養液体積あたりの細胞培養液を新鮮培地へ交換する量を意味し、つまり供給培地の $volume / 培養液の volume / Day$ である。

[0024] 培養液から生産物を取り出すための方法は、ろ過膜の2次側からポンプで引き抜くことができるが、利用可能な他の送液手段を用いてもよい。抜き出

された培養液は、例えば、生産物の回収、死細胞の除去等の処理が行われる。また抜き出された培養液は、生産物の回収、死細胞の除去等の処理後に、一部廃却してもよいし、培養容器へ戻してもよい。上記処理により培養液のロスが発生した場合、例えば、培養容器に新鮮培地を供給することにより補うことができる。

[0025] 灌流培養において、細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上である目標細胞密度に到達した後に、1日につき少なくとも1度以上細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、上記目標細胞密度 $\pm 10\%$ 以内に調整することができる。

この培養中の生細胞密度が過剰にならないよう、培養液の一部を細胞ごと抜き取ることにより生細胞密度を減らすことをセルブリーディング（セルブリード）といい、抜き出した培養液と同量の新鮮な培地を加えることで培養液の量を維持することができる。1日に1度以上とは、連続的に自動的にセルブリードする場合も含む。

[0026] 灌流培養の期間（この期間は、灌流を開始し始めてからの培養期間であり、細胞が高密度になる前の期間も含む期間である。）は、特に限定されないが、一般的には1日以上1000日以下であり、好ましくは7日以上1000日以下であり、より好ましくは18日以上500日以下であり、さらに好ましくは25日以上200日以下であり、さらに好ましくは30日以上1000日以下である。灌流は、播種を0日目として、2日後から開始してもよい。

[0027] 細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上である生産物の生産のための培養の期間は、好ましくは5日以上990日以下であり、5日以上450日以下でもよく、より好ましくは10日以上450日以下であり、さらに好ましくは15日以上190日以下であり、さらに好ましくは20日以上90日以下である。

[0028] 本発明においては、灌流培養の期間のうち少なくとも13日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ が

、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御され、好ましくは $0 \leq X < 0.015$ の範囲で制御され、より好ましくは $0 \leq X < 0.0127$ 、より好ましくは $0 \leq X < 0.008$ の範囲で制御される。

[0029] 本発明においては、灌流培養の期間のうち少なくとも13日以上期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day]が0であってもよい。Xが0である場合とは、培地供給とは別のラインからのアルカリの添加を行わないことを意味する。

[0030] 本発明においては、好ましくは、灌流培養の期間のうち50%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは100%）の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である X [mol/L/day]が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御される。

[0031] アルカリとしては、特に限定されないが、好ましくは Na_2CO_3 、 NaOH または NaHCO_3 であり、より好ましくは NaHCO_3 および/または Na_2CO_3 であり、特に好ましくは NaHCO_3 である。アルカリは、水溶液（例えば、 Na_2CO_3 水溶液、 NaOH 水溶液または NaHCO_3 水溶液）として添加することができる。

[0032] Na_2CO_3 または NaHCO_3 をそれぞれ細胞培養液に添加する場合、 NaHCO_3 を添加した細胞培養液の方が粘度が低くなる傾向がある。即ち、 NaHCO_3 の方が Na_2CO_3 よりも培養液をゲル化させる作用が弱く、膜詰まりを抑制しやすいと言えることから、 NaHCO_3 を使用することが特に好ましい。

[0033] アルカリの添加開始時期は培養開始から7日以降であり、好ましくは6日以降であり、更に好ましくは5日以降である。

[0034] 添加されるアルカリ水溶液のpHは、 $7 < \text{pH} < 13$ であり、好ましくは $7.5 < \text{pH} < 12$ であり、より好ましくは $7.5 < \text{pH} < 10$ であり、さらに好ましくは $8 < \text{pH} < 10$ である。

[0035] アルカリ水溶液のpH測定は、アルカリが水に溶解した時点で測定する。

pHの測定は一般的に市販されているpHセンサで測定可能である。例えば、Mettler TOLEDO社のpHメータ（Seven Excellence、Seven Direct、Five Easy）がある。

[0036] 添加されるアルカリ水溶液の濃度 Z [mol/L] は、好ましくは $0 < Z < 5$ であり、より好ましくは $0 < Z < 3$ であり、さらに好ましくは $0 < Z < 2$ である。

[0037] 灌流培養の全期間において、アルカリを全く添加せずに培養することも可能である。しかしアルカリを添加しないことで培養液pHが低くなり産生物の品質が悪化することもある（表3）。このような場合、産生物の品質を維持しつつ、かつ膜詰まりを促進させないようにする手法が求められる。

[0038] 培養液pHがある値 M を下回ったときに、アルカリを培地に N [mol/L] 追加することで、膜詰まりを抑制しかつ抗体品質を良化することができる。即ち、アルカリを添加せずに培養を行う場合において培養液のpHが低下する場合には、アルカリを追加した培地を供給することにより、培養液のpHを制御することができる。 N の分母は調液後の培地体積である。このときアルカリを増やした培地を新規に調液し、旧培地（培養槽へ供給中の培地）が入った容器と培養槽に繋がるチューブを熱溶接機を使って、新培地が入った容器と無菌的に繋ぎかえて供給を開始する。または培養槽と接続されている培地が入った容器に、無菌的にアルカリを追加してもよい。培養液pHのある値 M は6.85であり、好ましくは6.80であり、更に好ましくは6.75である。

[0039] 培地に追加するアルカリの量である N [mol/L] は、 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \text{ mol/L}$ であり、好ましくは $2.0 \times 10^{-3} \sim 1.0 \text{ mol/L}$ であり、更に好ましくは $1.0 \times 10^{-2} \sim 2.0 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$ である。ここでの培地に追加するアルカリは、培養液中に直接添加するアルカリではなく、培養槽へ供給される前の培地に追加されるアルカリを意味する。一例としては、培養液のpHが6.85を下回ったときに、 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \text{ mol/L}$ のアルカリを追加した培地を供給することができる。

このようにアルカリを直接培養液中に添加せずに培養を行う場合において培養液のpHが低下する場合には、pHを高めた培地を供給することにより、培養液のpHを制御することができる。このpHを高めた培地は、事前に準備してもよいし、培養液のpHに変化がみられたときに準備を始めることもできる。pHがMを下回り始めて24時間以内に、供給培地をpHを高めた培地に切り替えて、灌流培養を行うことができる。好ましくは、12時間以内であり、より好ましくは6時間以内であり、更に好ましくは3時間以内であり、更に好ましくは1時間以内であり、更に好ましくは30分以内であり、更に好ましくは5分以内である。

[0040] 調液量は培養液量に対して、0.5～10倍量であることが好ましい。培地に追加するアルカリとしては、特に限定されないが、好ましくは Na_2CO_3 、 NaOH または NaHCO_3 であり、より好ましくは NaHCO_3 および／または Na_2CO_3 であり、特に好ましくは NaHCO_3 である。

[0041] 灌流培養において添加される培地のpHは、好ましくは7.0～8.0であり、より好ましくは、7.0～7.8であり、さらに好ましくは、7.0～7.6である。

培地のpHは5%CO₂かつ37℃インキュベート下で1日保管した後、一般的に市販されているpHセンサで測定可能である。例えば、Mettler TOLEDO社のpHメータ (Seven Excellence、Seven Direct、Five Easy) がある。

[0042] 好ましくは、培養中の培養液の平均pHは6.7～7.2であり、より好ましくは6.8～7.0である。

[0043] 好ましくは、培養中の培養液の最低pHは6.6以上であり、より好ましくは、6.7以上であり、さらに好ましくは、6.8以上である。

[0044] 好ましくは、培養中の培養液のpHは、培養液中のpHをインラインで測定しながら、自動でアルカリ水溶液を添加することにより制御することができる。

[0045] 好ましくは、灌流培養においては、消泡剤を添加することができる。消泡

剤の消泡成分としては、シリコン系が好ましく、ジメチコンが特に好ましい。消泡剤の消泡成分としては、ポリジメチルシロキサンを含むものが好ましく、より好ましくはポリジメチルシロキサンに微粉末シリカを含むものである。消泡剤としては、例えば、Cytiva社製 HyClone ADCF Antifoam Agentを使用することができる。さらに好ましくは、アルカリの添加速度である X [mol/L/day]と、1日あたりのジメチコンの添加速度である B [g/L/day]とは、好ましくは、 $B < -0.79X + 0.0228$ を満たす。このとき B は負の値にはならない。そのため $X \leq 0.0288$ となる。

B の分母は培養槽、ATFに含まれる培養液の体積である。

この関係を満たすことにより、膜詰まりを、より効果的に抑制することができるようになる。

[0046] 本発明における細胞の培養において用いることができる細胞培養装置の一例を図1に示す。図1においては、培養容器14は、細胞を含む培養液を収容する容器である。培養容器14の内部における培養液において細胞が培養される。

[0047] 培地供給配管1からは培地が、培養容器に供給される。

消泡剤供給配管2からは発泡を抑制するための消泡剤が、培養容器に供給される。

アルカリ供給配管3からはアルカリが、培養容器に供給される。アルカリ添加をしない場合は、アルカリ供給配管3はなくてもよい。

送気配管4からは二酸化炭素(CO₂)および空気が、培養容器の内部の培養液の上部に導入される。

スパージャー送気配管5からは酸素(O₂)及び/または空気が送られ、酸素及び/または空気は、孔径20 μmのスパージャー15を介して培養液に導入される。スパージャー15により、培養液内の溶存酸素濃度を調節することができる。スパージャーとしては、特に限定されないが、例えば、ガス放出部の平均孔径が1 μm以上300 μm以下であり(一例としては孔径2

0 μm)、酸素を30体積%以上含むガスを放出するスパージャーを使用することができる。

[0048] 排気管6は、排気のためのパイプであり、その末端には排気フィルター（図には示されていない）が接続していてもよい。

サンプリング管7は、培養液を採取（サンプリング）したり、培養液を抜き出す（セルブリード）ためのパイプである。自動で連続的にセルブリードする場合は別途配管設置してもよい（図示せず）。

pHセンサー8が、培養液に接触するように装着されている。

溶存酸素センサー9が、培養液に接触するように装着されている。

細胞培養装置には、圧力センサー10、11及び13を設けることができる。

細胞培養装置には、中空糸膜12が設置されている。

[0049] 培養容器14の内部には、攪拌羽根16を有する攪拌部材が設けられていてもよい。攪拌羽根16を回転させることで、培養容器14の内部の培養液が攪拌され、培養液の均質性が保たれる。攪拌羽根16により培養液が攪拌されることにより、スパージャーにより放出される泡も攪拌される。攪拌羽根を有する攪拌部材の位置、攪拌羽根のサイズ等は、特に限定されず、使用する細胞種、培養液の量、供給する酸素の量、スパージャーの位置、数、サイズ等に応じて設計すればよい。また、スパージャーから出る泡を素早く攪拌し、泡の合一を抑制させるためには、スパージャーから近い位置に攪拌羽根16が配置されることが好ましい。

[0050] 本発明においては、培養容器から抜き出した細胞懸濁液を分離膜に通過させて、細胞含有液と透過液とに分離してもよい。この操作は、細胞培養装置を用いて行うことができる。この操作においては、培養容器中から抜き出した細胞懸濁液は、上記細胞懸濁液よりも高い細胞濃度を有する細胞含有液と、上記細胞懸濁液よりも低い細胞濃度を有する透過液とに分離される。細胞濃度はBeckman Coulter製 生死細胞アナライザー Vi-CELL XRによって測定することができる。

[0051] 上記した膜分離処理工程は、タンジェンシャルフィルトレーションであることが好ましく、Alternating tangential flow (ATF) filtrationやTangential flow filtrationであることがより好ましく、Alternating tangential flow filtrationであることが最も好ましい。Alternating tangential flow filtrationを行えるフィルターとしては、Repligen社製のSuATF10-S02PESや、F2 RF02PES等がある。

[0052] 細胞培養に用いる培地としては、通常の動物細胞の培養で使用されている培地を用いることができる。例えば、CD OptiCHO (Thermo Fisher社製)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、イーグル最小必須培地 (MEM)、RPMI-1640培地、RPMI-1641培地、F-12K培地、ハムF12培地、イスコプ変法ダルベッコ培地 (IMDM)、マッコイ5A培地、ライボビッツL-15培地、及びEX-CELL (商標) 300シリーズ (JRH Biosciences社)、CHO-S-SFM11 (Invitrogen社)、CHO-SF (Sigma-Aldrich社)、CD-CHO (Invitrogen社)、ISCHO-V (Irvine Scientific社)、PF-ACF-CHO (Sigma-Aldrich社) などを使用することができる。又は自作培地を用いてもよい。

[0053] 培地には牛胎児血清 (FCS) 等の血清を添加してもよいし、血清を添加しなくてもよい。培地には、アミノ酸、塩、糖類、ビタミン、ホルモン、増殖因子、緩衝液、抗生物質、脂質、微量元素、植物タンパク質の加水分解物などの追加成分を補充してもよい。タンパク質不含培地を用いることもできる。

培養温度は、一般的には30℃~40℃であり、好ましくは32℃~39℃であり、より好ましくは36℃~38℃であり、培養中に培養温度を変更してもよい。

培養は、CO₂濃度が0～40体積%、好ましくは2～25体積%、さらに好ましくは3～20体積%の雰囲気下で行うことができる。

[0054] 培養液の量は、好ましくは0.5L以上であり、より好ましくは50L以上であり、さらに好ましくは200L以上である。

[0055] 培養においては、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加えることができる。培養液の攪拌を行う場合、攪拌回転数は特に限定されないが、単位体積当たりの攪拌動力は、一般的には10～300kW/m³であり、好ましくは20～200kW/m³であり、より好ましくは30～100kW/m³である。

[0056] 培養液における溶存酸素濃度は適宜設定することができ、特に限定されないが、一般的には10～100%であり、好ましくは30～90%である。

また、細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上に維持される期間の溶存CO₂濃度は、好ましくは60～180mmHgであり、より好ましくは、80～160mmHgであり、さらに好ましくは、100～140mmHgである。

[0057] 細胞培養は、本明細書において上記した構成を有する細胞培養装置を用いて行うことができる。細胞培養装置としては、発酵槽型タンク培養装置、エアリフト型培養装置、カルチャーフラスコ型培養装置、スピナーフラスコ型培養装置、マイクロキャリア型培養装置、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、又は充填槽型培養装置等のいずれでもよい。培養容器は、培養環境の均質化等の観点からは、シングルユース培養槽であることが好ましい。

[0058] 細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上である生産物の生産のための培養液の粘度は、好ましくは1.2mPa·s以上15mPa·s未満であり、より好ましくは1.4mPa·s以上12mPa·s未満であり、さらに好ましくは1.6mPa·s以上10mPa·s未満であり、特に好ましくは1.6mPa·s以上5mPa·s未満であり、最も好ましくは1.6mPa·s以上3mPa·s未満である。

- [0059] 本発明における細胞の種類は特に限定されないが、動物細胞、植物細胞、酵母などの真核細胞、枯草菌などの原核細胞及び大腸菌などが挙げられる。細胞は、好ましくは、動物細胞（より好ましくは哺乳類細胞）、又は昆虫細胞であり、哺乳類細胞が最も好ましい。細胞としては、初代細胞でも株化細胞でもよい。
- [0060] 細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HEK細胞（Human Embryonic Kidney 由来細胞）、BHK細胞、293細胞、C127細胞、ミエローマ細胞（NSO細胞など）、PerC6細胞、SP2/O細胞、ハイブリドーマ細胞、COS細胞（アフリカミドリザル腎臓由来細胞）、3T3細胞、HeLa細胞、Vero細胞（アフリカミドリザル腎臓上皮細胞）、MDCK細胞（イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞）、PC12細胞、WI38細胞などを挙げることができる。細胞は、胚性幹細胞（ES細胞）または人工多能性幹細胞（iPS細胞）などの幹細胞であってもよい。上記の中でも、CHO細胞、HEK細胞、BHK細胞、ハイブリドーマが好ましく、より好ましくは、CHO細胞、HEK細胞であり、最も好ましくはCHO細胞である。CHO細胞は、組換えタンパク質、例えば、サイトカイン、凝固因子、及び抗体の産生に広く使用されている。ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）を欠損したCHO細胞を使用することが好ましく、DHFR欠損CHO細胞としては、例えば、CHO-DG44を使用することができる。
- [0061] 細胞の生存率としては、高い方が好ましいが、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。
- [0062] これらの細胞は、発現させたいタンパク質（例えば、抗体など）をコードする外来遺伝子を導入した細胞であってもよい。細胞としては、抗体を産生する細胞であることが好ましい。発現させたいタンパク質をコードする外来遺伝子を細胞に導入するためには、発現ベクターを使用することができる。発現させたいタンパク質をコードするDNAと、発現調節配列（例えば、エ

ンハンサー、プロモーター及びターミネーターなど) と、所望により選択マーカー遺伝子とを含む発現ベクターを細胞に導入することにより、発現させたいタンパク質をコードする外来遺伝子を導入した細胞を作製することができる。発現ベクターとしては特に限定はなく、細胞の種類、用途などに応じて適宜選択して使用することができる。

[0063] プロモーターとしては、哺乳動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の I E (i m m e d i a t e e a r l y) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス (m o l o n e y m u r i n e l e u k e m i a v i r u s) のプロモーター及びエンハンサー等を挙げることができる。また、ヒトCMVの I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0064] 選択マーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子(ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクター (D H F R) 遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子など)、又は蛍光遺伝子(緑色蛍光タンパク GFP などをコードする遺伝子)などを用いることができる。

[0065] 細胞に発現ベクターを導入する方法は、特に限定はなく、例えば、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、ジーンガン法及びリポフェクション法などを用いることができる。

[0066] 本発明による生産物の製造方法は、細胞培養装置を用いて細胞を培養して上記細胞から生産物を産生させることを含む。

本発明によれば、本発明による生産物の製造方法により製造される生産物が提供される。

[0067] 本発明において、生産物の種類は特に限定されないが、好ましくはタンパク質であり、より好ましくは組み換えタンパク質である。生産物としては、

例えば、組み換えポリペプチド鎖、組み換え分泌ポリペプチド鎖、抗原結合タンパク質、抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、マウス抗体、バイスペシフィック抗体など）、Fc融合タンパク質、断片化免疫グロブリン、一本鎖抗体（scFv）などが挙げられる。また、他にもアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスなどであってもよい。

[0068] 生産物は、好ましくは抗体であり、より好ましくはヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、又はマウス抗体である。断片化免疫グロブリンとしては、Fab、F(ab')₂、Fvなどが挙げられる。抗体のクラスも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。

[0069] ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列から誘導される1つ又は複数の可変及び定常領域を有する全ての抗体を含む。一実施形態では、可変及び定常ドメインの全てが、ヒト免疫グロブリン配列から誘導される（完全ヒト抗体）。

[0070] ヒト化抗体は、ヒト対象に投与されたときに、非ヒト種抗体と比較して、ヒト化抗体が免疫反応を誘発する可能性が低くなるように、及び／又は重篤な免疫反応の誘発がより少なくなるように、1つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、及び／又は付加により非ヒト種から誘導された抗体の配列と異なる配列を有する。一例では、非ヒト種抗体の重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク及び定常ドメイン内のある特定のアミノ酸は、ヒト化抗体を産生するように変異している。別の例では、ヒト抗体からの定常ドメインは、非ヒト種の可変ドメインに融合される。

[0071] キメラ抗体とは、互いに由来の異なる可変領域と定常領域を連結した抗体である。例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域からなる抗体は、マウス・ヒト異種キメラ抗体である。マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結させ、これを発現ベクターに組み込むことによって、キメラ抗体を発

現する組換えベクターが作製できる。上記ベクターにより形質転換された組換え細胞を培養し、組み込まれたDNAを発現させることによって、培養中に生産されるキメラ抗体を取得できる。

[0072] バイスペシフィック抗体とは、2つの異なる抗原特異性を認識する抗体である。様々な形態のバイスペシフィック抗体が存在する。バイスペシフィック抗体を作製する方法としては、2つのイムノグロブリン分子をN-サクシニミジル 3-(2-ピリジルジチオール) プロピオネート又はS-アセチルメルカプトサクシニクアシッドアンハイドライドなどの架橋剤を用いて結合して作製する方法、イムノグロブリン分子のFabフラグメントどうしを結合して作製する方法などが報告されている。また、バイスペシフィック抗体をコードする遺伝子を細胞に導入することにより、発現させることも可能である。

[0073] Fc融合タンパク質とは、Fc領域を有するタンパク質を示し、抗体を含む。

Fabは、VL、VH、CL及びCH1ドメインを有する一価断片である。

F(ab')₂は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された2つのFab断片を有する二価断片である。

Fv断片は、抗体のシングルアームのVL及びVHドメインを有する。

一本鎖抗体(scFv)は、VL及びVH領域がリンカー(例えば、アミノ酸残基の合成配列)を介して接合して、連続したタンパク質鎖を形成する抗体であり、ここでリンカーは、タンパク質鎖をそれ自身に折り重ね、一価抗原結合部位を形成させるのに十分な長さである。

[0074] 抗体としては、特に限定されないが、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GP11b/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抗体及び抗VLA4抗体などが挙げられる。

- [0075] 生産物の回収は、単に培養液を回収してもよいし、例えば、フィルタ又は遠心分離機を用い、培養液から細胞の少なくとも一部を除いた液体を回収してもよく、公知の方法が特に制限なく用いられる。生産物の純度を向上したり、溶媒を変更したり、例えば粉末状にするなど形態を変更したい場合には、培養液又は上記液体をさらなる処理に供することができる。
- [0076] また、灌流しながら培養液の一部を回収する、又は、灌流しながら灌流中の培養液の一部に対してフィルター又は遠心分離機を用い、培養液から細胞の少なくとも一部を除いた液体を回収することも可能である。
- [0077] 生産物は、精製処理により精製することができる。得られた生産物は、高い純度にまで精製することができる。生産物の分離及び精製は通常のパック質で使用されている分離及び精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外ろ過、塩析、透析、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択及び組み合わせることにより、生産物を分離及び精製することができるが、これらに限定されるものではない。上記で得られた生産物の濃度測定は、吸光度測定又は酵素結合免疫吸着検定法（Enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA）等により行うことができる。また、生産物が抗体である場合、抗体の力価（Titer）は、Roche社のCedex Bioなどの市販の分析機器で測定することもできる。
- [0078] アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC（high performance liquid chromatography；高速液体クロマトグラフィー）又はFPLC（fast protein liquid chromatography）等の

液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

[0079] なお、生産物には、精製前又は精製後に適当なポリペプチド修飾酵素を作用させることにより、生産物を修飾したり、部分的にペプチドを除去することもできる。ポリペプチド修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

[0080] 本発明により製造される生産物は、例えばバイオ医薬品及び再生医療等において用いることができる。

[0081] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0082] <抗体産生細胞の樹立>

I g G 1 及び I g G 4 をコードする核酸配列を含むベクターを構築し、構築したベクターを CHO-DG44 細胞へ導入することにより、I g G 1 を発現させる CHO-DG44 細胞 (I g G 1 細胞) と I g G 4 を発現させる CHO-DG44 細胞 (I g G 4 細胞) を作製した。ベクターの構築及び細胞への導入は、特表 2016-517691 号公報の実施例 2 に準じて行った。上記により、モノクローナル抗体を産生する CHO 細胞を準備し、以下の実験において使用した。

[0083] <細胞培養>

実施例及び比較例においては、図 1 に示す細胞培養装置を用いて実験を行った。概要としては、灌流培養により抗体を産生する CHO 細胞を $120 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ まで増殖させ、 $120 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の細胞密度に到達した時点よりセルブリードを開始し、中空糸膜の詰まり日数等を評価した。詳細は以下の通りである。

[0084] 2 L ガラス培養槽 (製品名、ABLE 社製) に 1 L の培地を投入した。培地は CD OptiCHO (ThermoFisher Scientific 社製) で、この培地にポロキサマー (ポロキサマー-188) を 0.9 質

量%加えた。

0日目に細胞を $0.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ で播種した。

攪拌回転数 150 rpm 、上面からは空気 (Air) $38 \text{ mL/分} + \text{CO}_2$ 2 mL/分 、下面からは培養液中の酸素濃度が80%になるように培養槽に設置されたスパージャーから O_2 を自動制御により供給した。

培養槽中のpHが7.0になるよう培養槽中のpHを読み取って、pHが7.0を下回ったときに自動で $1.0 \text{ mol/L NaHCO}_3$ 水溶液を添加し、pH制御を開始した。

播種後2日目に培養した後、灌流比 0.8 vvd で培地を連続供給しながら、Repligen社製ATF2で細胞培養液を連続濾過し回収液を回収した。

更に5日目に灌流比 1.6 vvd に変更した。

更に6日目に消泡剤中のシメチコンの添加速度を 7.2 mg/day/L とした。

更に7日目に培養液のpHが下がり、培養液中にアルカリ水溶液が自動添加され始める。

更に9から11日目に、細胞密度が $120 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ に到達したら、細胞密度が $120 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ で維持されるよう培養液の一部を引き抜きながら、セルブリードを行った。

膜詰まりが発生し、ATFが動作できなくなるまで培養を継続した。

[0085] 使用する培地、シメチコンの添加速度、pH制御等を、下記表に記載の通り変更して複数の実験を行った。

[0086] <評価方法>

(1) 細胞密度、Viabilityの測定

培養槽内の培養液を抜き取り、Beckman Coulter社のCell Viability Analyzer Vi-cell XRを用い測定した。なおVi-cellソフトはVi-cell XR2.04を用い、測定時のパラメータは以下のように設定した。

[0087] Min diameter : 6 μm 、 Max diameter : 50 μm

Dilution : 細胞濃度が $10 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下のときは、サンプル希釈せず、Dilution を 1 とした。

細胞濃度が $10 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ より高いときは、サンプルを 10 倍希釈し、Dilution を 10 とした。

Cell brightness : 75%、 Cell sharpness : 100

Viable cell spot brightness : 75%

Viable cell spot area : 5%

Minimum circularity : 0

Decluster degree : Medium

[0088] (2) pH, 溶存 CO_2 の測定

培養槽内の培養液を抜き取り、SIEMENS 社の RAPID Lab 348 EX を用い測定した。生産期において溶存 CO_2 は 120 mmHg となるように、送気配管の二酸化炭素 (CO_2) 流量を調整した。

[0089] (3) 微粒子 (デブリ) 密度の測定

培養槽内の培養液を抜き取り、Beckman Coulter 社の ISOTON で 10000 倍希釈した。上記希釈培養液を Beckman Coulter 社の精密粒度分布測定装置 Multisizer 4e で 1.46 ~ 20 μm の粒度分布を測定した。

[0090] (4) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 測定

培養液を抜き取り、300G / 5分 で細胞と上清を分離した。上清を Roche 社の Cedex Bio で測定した。

[0091] (5) 抗体品質の測定

培養槽内の培養液を抜き取り、Cytiva 社の Whatman (Pore Size 0.2 μm , 25mm Diameter) で細胞を濾過する。pH 6.0 で平衡化した MabSelect Sure カラムに上記培

養上清を負荷し、pH 3.2で抗体を溶出させた。

[0092] 抗体電荷の評価は、上記の抗体回収液を陽イオン交換高速液体クロマトグラフィ（HPLC）で測定した。

マンノース5（M5）の評価は、得られた抗体回収液の抗体をペプチド-N-グリコシダーゼFで消化処理することでN型糖鎖を切り出し、2-アミノベンズアミドで蛍光標識した。

上記処理した抗体のM5をC18（ODS）逆相HPLCカラムで測定した。

[0093] （6）評価の基準

各々の評価の基準を以下に示す。

膜詰まりの評価：

S：培養開始からの詰まるまでの日数が30日以上であり、灌流開始からの詰まるまでの日数が28日以上であり、セルブリード開始から詰まるまでの日数が20日以上である場合。

A：培養開始からの詰まるまでの日数が20～29日であり、灌流開始からの詰まるまでの日数が18～27日であり、セルブリード開始から詰まるまでの日数が10～19日である場合。

B：培養開始からの詰まるまでの日数が15～19日であり、灌流開始からの詰まるまでの日数が13～17日であり、セルブリード開始から詰まるまでの日数が5～9日である場合。

C：培養開始からの詰まるまでの日数が14日以下であり、灌流開始からの詰まるまでの日数が12日以下であり、セルブリード開始から詰まるまでの日数が4日以下である場合。

[0094] 抗体電荷の評価：

A：Acidicピークの面積の割合Xが $14\% \leq X \leq 22\%$ 、Basicピークの面積の割合Xが $11\% \leq X \leq 19\%$ の両方を満たすこと。

B：Acidicピークの面積の割合Xが $10\% \leq X < 14\%$ あるいは $22\% < X \leq 26\%$ であること、およびBasicピークの面積の割合Xが6%

$\leq X < 11\%$ あるいは $19\% < X \leq 23\%$ であることのうちのいずれか1つ以上に該当すること。

C : A c i d i cピークの面積の割合Xが $X < 10\%$ あるいは $26\% < X$ であること、およびB a s i cピークの面積の割合Xが $X < 6\%$ あるいは $23\% < X$ であることのうちのいずれか1つ以上に該当すること。

ピーク面積の割合とは、全クロマトグラフィーのピーク面積の合計に対するA c i d i c成分のクロマトグラフィーのピーク面積あるいはB a s i c成分のクロマトグラフィーのピーク面積の割合のことである。

[0095] 抗体のM5の評価：

A : M5のピーク面積の割合Xが $0\% \leq X \leq 5\%$

B : M5のピーク面積の割合Xが $5\% < X \leq 6\%$

C : M5のピーク面積の割合Xが $6\% < X$

ピーク面積の割合とは、全クロマトグラフィーのピーク面積の合計に対するM5 (M a n n o s e 5) 成分のクロマトグラフィーのピーク面積の割合のことである。

[0096] <測定および評価の結果>

測定及び評価の結果を表2および表3に示す。

表3に示す通り、実施例5、10、11においては、製造される抗体の品質が良好であることが確認できた。

[0097] 実施例1～3、5及び7～9における、アルカリ添加速度と膜詰まりまでの日数との関係を図2に示す。図2の結果から、アルカリ添加速度を低くすることにより、膜詰まりを抑制できることが分かる。

[0098] 実施例1～3、5及び7～9における、アルカリ添加速度と微粒子密度との関係を図3に示す。微粒子密度は1～6 μm の細胞密度の累積個数とした。微粒子は、細胞(14 μm)由来のカス/破片であり、細胞ダメージの指標である。図3の結果から、アルカリ添加速度を低くすることにより、細胞ダメージを抑制できることが分かる。

[0099] 実施例1～3、5及び7～9における、アルカリ添加速度とLDHとの関

係を図4に示す。LDHは、ダメージを受けた細胞から漏洩する酵素成分であり、細胞ダメージの指標として一般的に用いられている。図4の結果から、アルカリ添加速度を低くすることにより、細胞ダメージを抑制できることが分かる。

[0100] また、実施例1～9、11及び比較例1における、アルカリ添加速度と消泡剤添加速度と膜詰まりまでの日数との関係を図5に示す。消泡剤添加速度が高く、アルカリ添加速度が高いほど、膜詰まりしやくすくなることが分かる。アルカリの添加速度である X [mol/L/day]と、消泡剤であるジメチコンの添加速度である B [g/L/day]とが、 $B < -0.79X + 0.0228$ を満たす領域が、膜詰まりの評価がSである領域である。

[0101]

[表1]

	細胞密度 X10 ⁶ cells /mL	培地				アルカリ			消泡剤 (ジメチコン) 添加速度 g/L/day	NaHCO ₃ 合計量 (mol/L/day)
		pH	NaHCO ₃ 濃 度(mol/L)	1日当たり培 地添加量 (vvd)	NaHCO ₃ (mol//L day)	pH	NaHCO ₃ 濃度 (mol/L)	NaHCO ₃ (mol/L/day)		
実施例1	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0	0.01488	0.028568028
実施例2	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.012704727	0.01488	0.041272755
実施例3	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.010335359	0.01488	0.038903387
実施例4	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0	0.00504	0.028568028
実施例5	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.006892854	0.012	0.035460882
実施例6	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.012650178	0.0312	0.041218206
実施例7	120	7.2	0.010201167	1.2	0.0122414	8.5	1	0.014804876	0.01488	0.027046276
実施例8	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.007366625	0.012	0.035934652
実施例9	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.00576506	0.00504	0.034333088
比較例1	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	8.5	1	0.035	0.01488	0.063568028

[0102] [表2]

	膜話まり				pH平均	pH最小	微粒子密度(1-6 μm 累計)(個/ mL)	Viability (%)	LDH (U/L)
	培養開始 から膜話 まりまで の日数	灌流開始か ら膜話まり までの日数	生産期から 膜話まりま での日数	評価					
実施例1	34	32	24	S	6.89	6.83	1.3E+08	95.9	1251.4
実施例2	16	14	6	B	6.96	6.92	2.1E+08	95.4	3100.614
実施例3	26	24	16	A	6.94	6.91	2.4E+08	95.3	3222.917
実施例4	32	30	22	A	6.88	6.82	—	—	—
実施例5	34	32	24	S	6.92	6.90	1.5E+08	96.2	1374.183
実施例6	23	21	13	A	6.93	6.90	—	—	—
実施例7	19	17	9	B	6.86	6.84	1.8E+08	92.4	5172.14
実施例8	34	32	24	S	6.91	6.89	2.0E+08	95.4	1867.038
実施例9	31	29	21	A	6.90	6.78	1.7E+08	95.7	1608.909
比較例1	14	12	4	C	7.02	6.95	—	—	—

[0103]

[表3]

	細胞密度		培地				培養液中のpH			抗体の品質			
	X10 ⁶ cells/mL	pH	NaHCO ₃ 濃 度(mol/L)	1日当たり培 地添加量 (L/day/L- WV)	NaHCO ₃ mol/day	pH平均	pH最小	電荷の 評価	糖鎖の評 価	電荷	糖鎖		
実施例10	120	7.2	0.010201167	1.2	0.0122414	6.75	6.70	B	B	11%	21%	5.5%	
実施例11	120	7.3	0.01700988	1.2	0.020411856	6.83	6.77	A	A	15%	18%	2.5%	
実施例5	120	7.4	0.02380669	1.2	0.028568028	6.92	6.90	A	A	14%	17%	1.5%	

符号の説明

- [0104] 1 培地供給配管
2 消泡剤供給配管
3 アルカリ供給配管
4 送気配管
5 スパージャー送気配管 6 排気管
7 サンプルング管
8 pHセンサー
9 溶存酸素センサー
10 圧力センサー
11 圧力センサー
12 中空糸膜
13 圧力センサー
14 培養容器
15 スパージャー
16 攪拌羽根

請求の範囲

- [請求項1] 細胞を培養することを含む、生産物の製造方法であって、
生産物の生産時における細胞密度が $80 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $300 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の灌流培養であり、灌流培養の期間は13日以上500日以下であり、
前記灌流培養の期間のうち少なくとも1日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御され、添加されるアルカリ水溶液のpHは、 $7 < \text{pH} < 13$ である、
生産物の製造方法。
- [請求項2] 前記灌流培養における細胞密度が $100 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以上 $300 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ 以下である、請求項1に記載の生産物の製造方法。
- [請求項3] 前記灌流培養の期間が18日以上500日以下である、請求項1又は2に記載の生産物の製造方法。
- [請求項4] 生産物の生産のための培養の期間が、5日以上450日以下である、請求項1から3の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項5] 前記灌流培養の期間のうち少なくとも13日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ が、 $0 \leq X < 0.008$ の範囲で制御される、請求項1から4の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項6] 前記灌流培養の期間のうち少なくとも13日以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ が0である、請求項1から5の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項7] 前記灌流培養の期間のうち50%以上の期間において、1日あたりのアルカリ添加速度である $X [\text{mol/L/day}]$ が、 $0 \leq X < 0.029$ の範囲で制御される、請求項1から6の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

- [請求項8] 前記灌流培養における細胞培養液の連続分離方法が、膜濾過である、請求項1から7の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項9] 前記膜濾過が、ATFと称される交接続線流濾過である、請求項1から8の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項10] 濾過時の流束である Y [$L/m^2/hour$] が、 $0 < Y \leq 10$ である、請求項8又は9に記載の生産物の製造方法。
- [請求項11] 前記培養中の培養液の平均pHが6.7～7.2である、請求項1から10の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項12] 前記培養中の培養液の最低pHが6.6以上である、請求項1から11の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項13] 前記培養中の培養液のpHが、培養液中のpHをインラインで測定しながら、自動でアルカリ水溶液を添加することにより制御される、請求項1から12の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項14] 前記灌流培養において、細胞密度が $80 \times 10^6 cells/mL$ 以上である目標細胞密度に到達した後に、細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、前記目標細胞密度 $\pm 40\%$ 以内に維持し、細胞密度が前記目標細胞密度 $\pm 40\%$ 以内に維持された期間において、生産物を回収する、請求項1から13の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項15] 前記灌流培養において、細胞密度が $80 \times 10^6 cells/mL$ 以上である目標細胞密度に到達した後に、1日につき少なくとも1度以上細胞を含む培養液を取り出すことにより、細胞密度を、前記目標細胞密度 $\pm 10\%$ 以内に調整することを含む、請求項1から13の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項16] 前記細胞密度が $80 \times 10^6 cells/mL$ 以上に維持される期間の溶存 CO_2 濃度が60～180mmHgである、請求項1から15の何れか一項に記載の生産物の製造方法。
- [請求項17] 前記アルカリが $NaHCO_3$ および/または Na_2CO_3 である、請求

項 1 から 1 6 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項18] 前記アルカリが NaHCO_3 である、請求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項19] 前記アルカリ水溶液の濃度 Z [mol/L] が、 $0 < Z < 5$ である、請求項 1 から 1 8 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項20] 灌流培養において添加される培地の pH が $7.0 \sim 8.0$ である、請求項 1 から 1 9 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項21] アルカリを添加せずに培養を行う場合において培養液の pH が低下する場合には、アルカリを追加した培地を供給することにより、培養液の pH を制御する、請求項 1 から 2 0 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項22] 培養液の pH が 6.85 を下回ったときに、 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0$ mol/L のアルカリを追加した培地を供給することを含む、請求項 1 から 2 1 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項23] 前記灌流培養においてジメチコンを含有する消泡剤が添加され、前記アルカリの添加速度である X [mol/L/day] と、前記ジメチコンの添加速度である B [g/L/day] とが、 $B < -0.79X + 0.0228$ を満たす、請求項 1 から 2 2 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項24] 前記灌流培養の全期間において、アルカリ添加を行わない、請求項 1 から 2 3 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項25] 前記細胞が動物細胞である、請求項 1 から 2 4 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

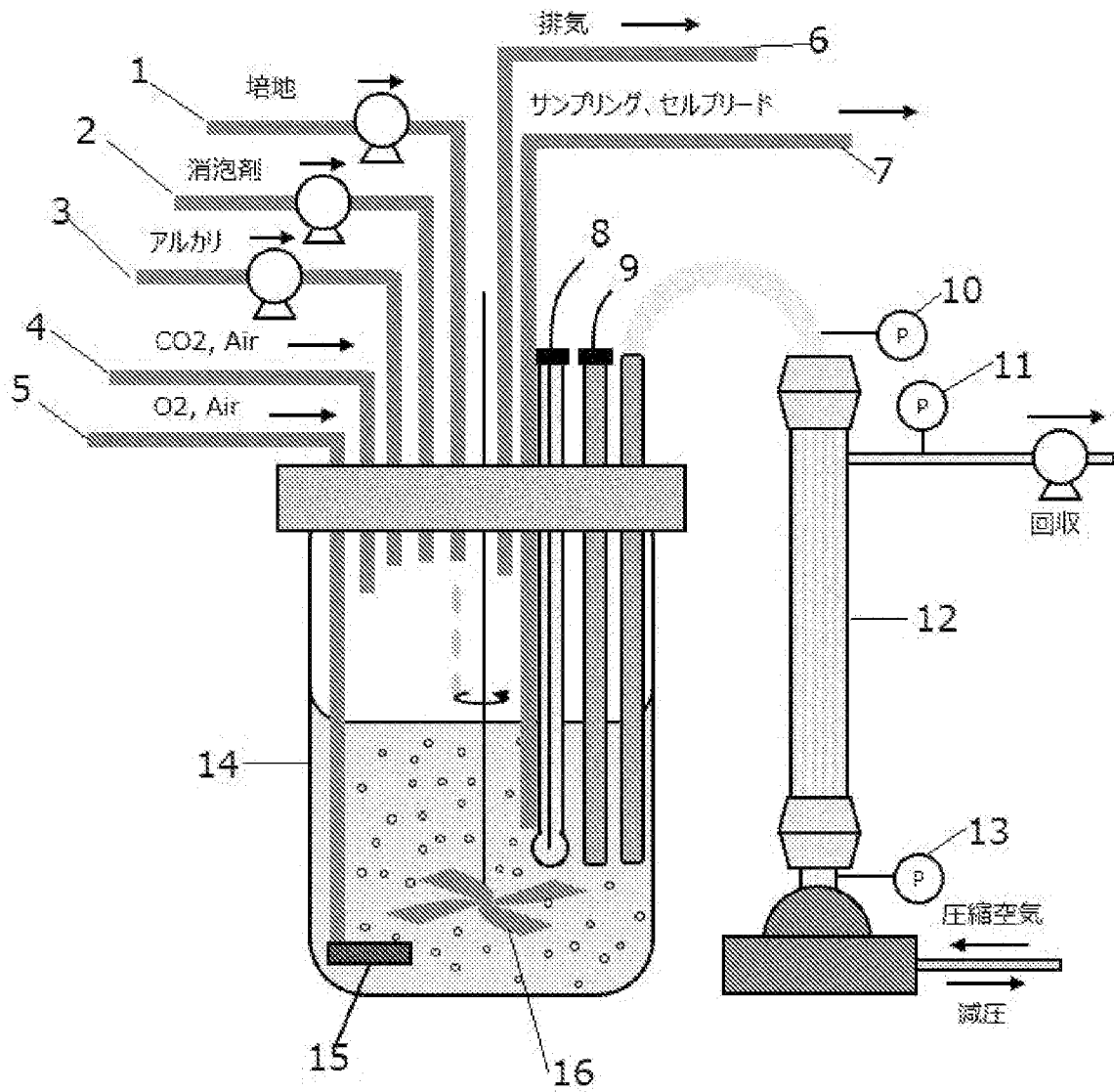
[請求項26] 前記細胞が CHO 細胞である、請求項 1 から 2 5 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

[請求項27] 前記生産物が抗体である、請求項 1 から 2 6 の何れか一項に記載の生産物の製造方法。

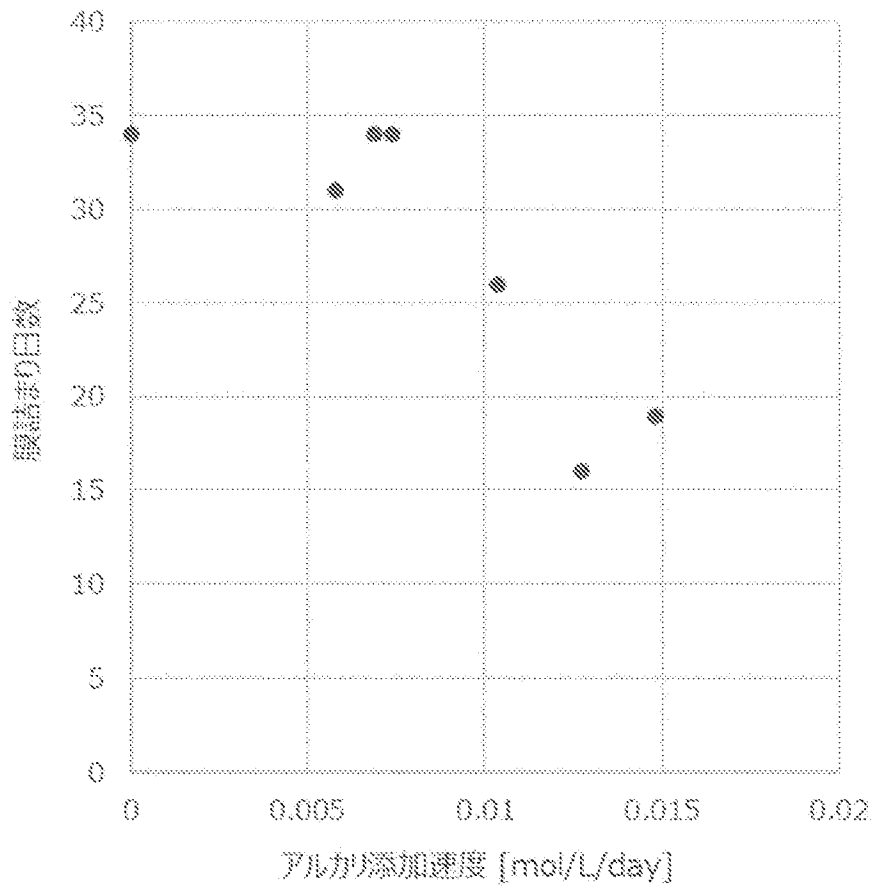
[請求項28] 請求項 1 から 2 7 の何れか一項に記載の生産物の製造方法により製造

される、生産物。

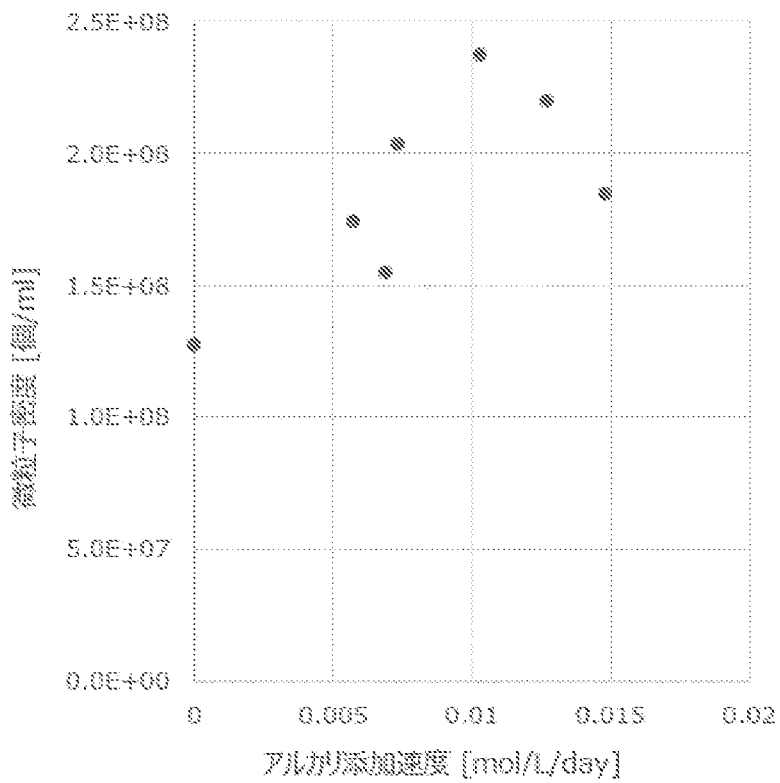
[図1]



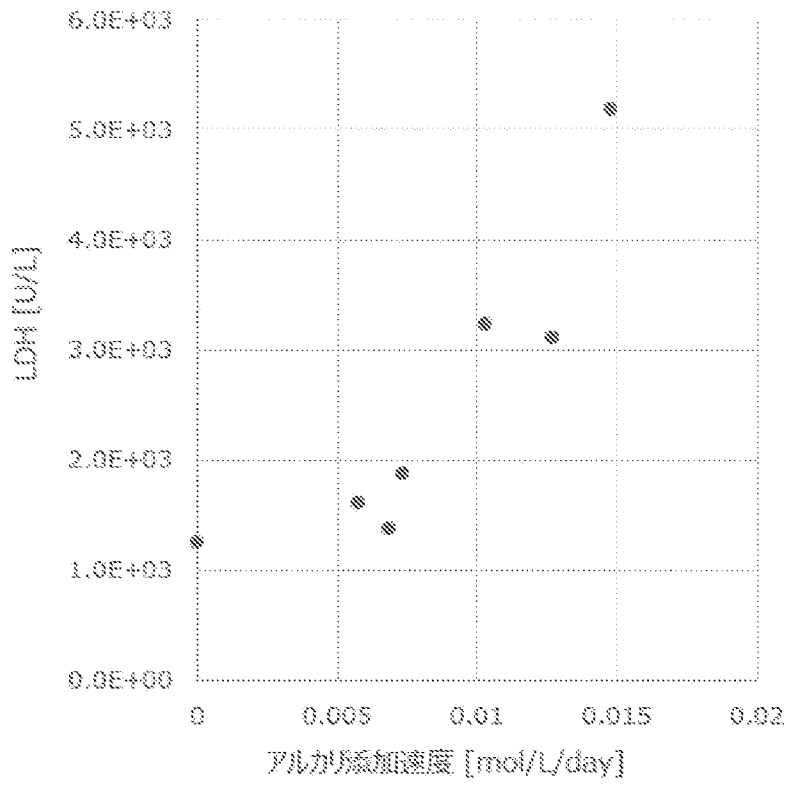
[図2]



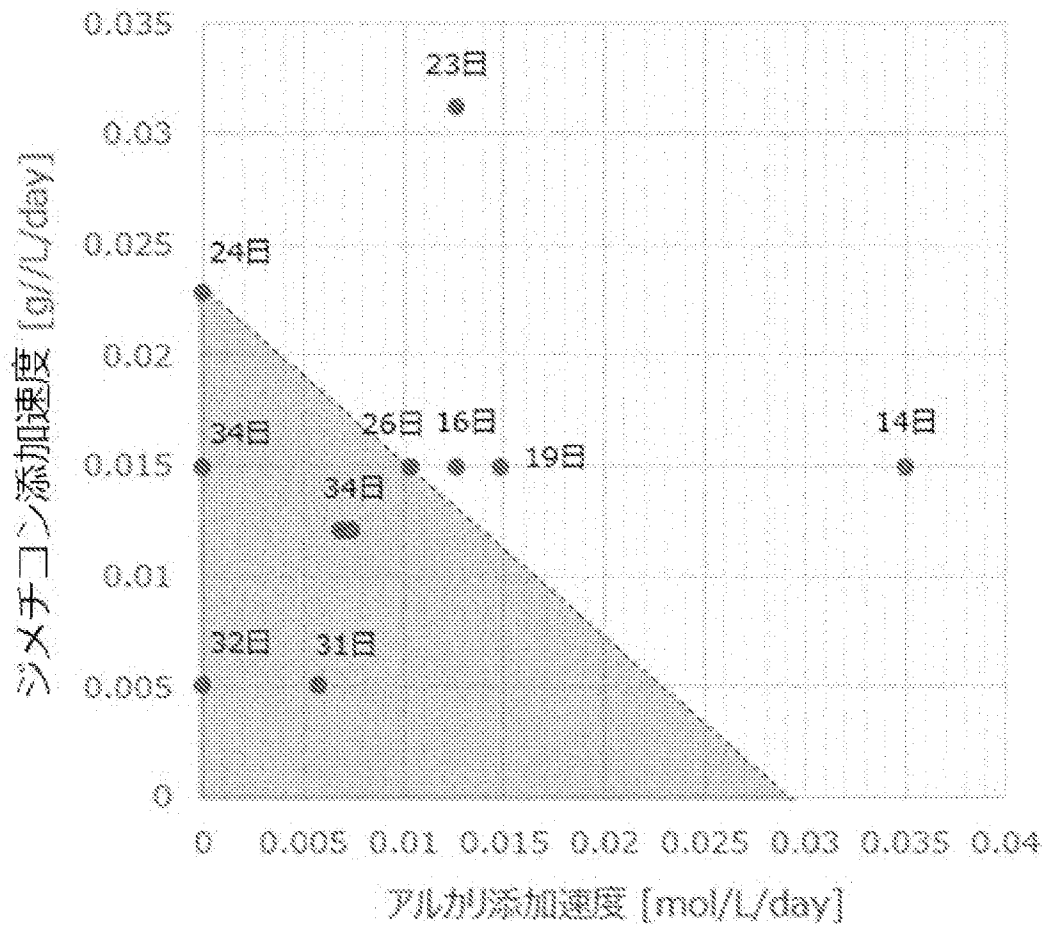
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/013100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/08</i> (2006.01)i FI: C12P21/08; C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/10; C12P21/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/181234 A1 (FUJIFILM CORP.) 26 September 2019 (2019-09-26) claims 1, 3-5, paragraphs [0024], [0028], [0037], [0075], examples	1-9, 11-15, 17-22, 24-28
Y	claims 1, 3-5, paragraphs [0024], [0028], [0037], [0075], examples	1-28
Y	JP 2019-523002 A (REPLIGEN CORP.) 22 August 2019 (2019-08-22) claims 1, 13, paragraph [0009]	1-28
Y	JP 2021-536262 A (MOMENTA PHARMACEUTICALS INC.) 27 December 2021 (2021-12-27) paragraph [0017]	1-28
Y	WO 2021/143699 A1 (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.) 22 July 2021 (2021-07-22) paragraph [0096]	1-28
Y	JP 3-117494 A (UNILEVER NAAMLOZE VENNOOTSCHAP) 20 May 1991 (1991-05-20) p. 6, lower right column, lines 6-10	1-28
Y	JP 2021-518148 A (SANOFI PASTEUR, INC.) 02 August 2021 (2021-08-02) paragraph [0036]	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 June 2023		Date of mailing of the international search report 20 June 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/013100

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019/181234	A1	26 September 2019	US 2020/0399585 A1 claims 1, 3-5, paragraphs [0057], [0063], [0080], [0146], examples	
JP	2019-523002	A	22 August 2019	US 2018/0148677 A1 claims 1, 13, paragraph [0010]	
JP	2021-536262	A	27 December 2021	US 2021/0222109 A1 paragraph [0017]	
WO	2021/143699	A1	22 July 2021	EP 4090731 A1	
JP	3-117494	A	20 May 1991	US 5789212 A column 5, lines 29-32	
JP	2021-518148	A	02 August 2021	US 2020/0407678 A1 paragraph [0038]	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/10(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i FI: C12P21/08; C12N5/10		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N5/10; C12P21/08 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2023年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2023年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2019/181234 A1 (富士フイルム株式会社) 26.09.2019 (2019 - 09 - 26) 請求項1, 3-5, 段落[0024], [0028], [0037], [0075], 実施例	1-9, 11-15, 17-22, 24-28
Y	請求項1, 3-5, 段落[0024], [0028], [0037], [0075], 実施例	1-28
Y	JP 2019-523002 A (レプリゲン・コーポレイション) 22.08.2019 (2019 - 08 - 22) 請求項1, 13, 段落[0009]	1-28
Y	JP 2021-536262 A (モメンタ ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 27.12.2021 (2021 - 12 - 27) 段落[0017]	1-28
Y	WO 2021/143699 A1 (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO. LTD.) 22.07.2021 (2021 - 07 - 22) 段落[0096]	1-28
Y	JP 3-117494 A (ユニリーバー・ナムローゼ・ベンノートシャープ) 20.05.1991 (1991 - 05 - 20) 第6頁右下欄第6-10行	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
08.06.2023	20.06.2023	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 市島 洋介 4N 5804 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2021-518148 A (サノフィ パスツール インコーポレイテッド) 02.08.2021 (2021 - 08 - 02) 段落[0036]	1-28
.....		

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2023/013100

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2019/181234	A1	26.09.2019	US	2020/0399585	A1	請求項1, 3-5, 段落[0057], [0063], [0080], [0146], 実施例
JP	2019-523002	A	22.08.2019	US	2018/0148677	A1	請求項1, 13, 段落[0010]
JP	2021-536262	A	27.12.2021	US	2021/0222109	A1	段落[0017]
WO	2021/143699	A1	22.07.2021	EP	4090731	A1	
JP	3-117494	A	20.05.1991	US	5789212	A	第5欄第29-32行
JP	2021-518148	A	02.08.2021	US	2020/0407678	A1	段落[0038]