(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-521615
(P2004-521615A)
(43)公表日　平成16年7月22日(2004.7.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 1/00	C12N 1/00	F	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 173 頁）

(21)出願番号	特願2002-539481(P2002-539481)
(86)(22)出願日	平成13年11月6日(2001.11.6)
(85)翻訳文提出日	平成15年5月6日(2003.5.6)
(86)国際出願番号	PCT/US2001/042982
(87)国際公開番号	WO2002/036735
(87)国際公開日	平成14年5月10日(2002.5.10)
(31)優先権主張番号	09/705,940
(32)優先日	平成12年11月6日(2000.11.6)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人　502221282
インヴィトロジェン　コーポレーション
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２００８，カールスバッド，ファラデイ　アベニュー　１６００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100108774
弁理士　橋本　一憲
(72)発明者　ファイク　リチャード　ミルトン
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　クラレンス　ハンティング　バレー　ロード　９３１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】乾燥粉末細胞および細胞培養試薬およびその生産の方法

(57)【要約】
本発明は、栄養（例えば細胞培養）培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方に広く関連する。特に、本発明は、粉末栄養培地、培地補足物および培地部分群の処方、特に細胞培養培地補足物（粉末ウシ胎児血清（ＦＢＳ）のような粉末血清を含む）、培地部分群の処方、および、細胞のインビトロの培養を促進する必須栄養素を含む細胞培養培地を提供する。本発明は、溶媒による再構成の際に、特定のまたは望ましい最終イオン条件および／またはｐＨ条件を生み出すような粉末処方をさらに提供する。本発明はまた、これらの処方の生産方法を意図し、これらの処方を用いた原核細胞および真核細胞の培養のためのキットおよび方法をも提供する。本発明はまた、滅菌処方を生産する方法、および、乾燥細胞粉末を生産するための方法にも関連する。本発明はまた、本発明の方法によって生産される、細胞、培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の粉末をも提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の段階を含む、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培養培地を作製するための方法：
（ａ）溶媒による該粉末の再構成の際に望ましい最終ｐＨを自動的に提供するために、該粉末に加えることを必要とされる、ｐＨ対抗形態の緩衝塩の比率を決定する段階；および
（ｂ）ある量のｐＨ対抗形態の緩衝塩を、段階（ａ）において決定される比率で該粉末に加える段階。
【請求項２】
乾燥粉末培地を包装する段階をさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
乾燥粉末培地を滅菌する段階をさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項４】
培地が滅菌状態になるまで乾燥粉末培地にγ線を照射することにより、滅菌が達成される、請求項３記載の方法。
【請求項５】
培地が、少なくとも１つの一塩基および／または二塩基の緩衝塩を含む、請求項１～３のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
一塩基および／または二塩基の緩衝塩が、一塩基および／または二塩基のリン酸塩である、請求項５記載の方法。
【請求項７】
一塩基および／または二塩基のリン酸塩の少なくとも１つがリン酸ナトリウム塩である、請求項６記載の方法。
【請求項８】
一塩基および／または二塩基のリン酸塩の少なくとも１つがリン酸カリウム塩である、請求項６記載の方法。
【請求項９】
乾燥粉末培地が炭酸水素ナトリウムを含むが、保存の際にCO_2を遊離しない、請求項１記載の方法。
【請求項１０】
請求項１～３または請求項９のいずれか一項記載の方法によって生産される、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培養培地。
【請求項１１】
いかなる補助的栄養成分も添加せずに、溶媒による培地の再構成の際に、インビトロの細胞の培養を支持する乾燥粉末完全培養培地。
【請求項１２】
培地が自動的にｐＨを調整する培地である、請求項１１記載の培地。
【請求項１３】
血清、１つもしくは複数の培養培地補足物、Ｌ－グルタミン、インスリン、トランスフェリン、１つもしくは複数のホルモン、１つもしくは複数の脂質、１つもしくは複数の成長因子、１つもしくは複数のサイトカイン、１つもしくは複数の神経伝達物質、動物の組織、器官もしくは腺の１つもしくは複数の抽出物、１つもしくは複数の酵素、１つもしくは複数のタンパク質、１つもしくは複数の微量元素、１つもしくは複数の細胞外マトリックス成分、１つもしくは複数の抗生物質、１つもしくは複数のウイルス阻害剤、および／または、１つもしくは複数の緩衝液からなる成分群より選択される、１つもしくは複数の成分を培地が含む、請求項１１記載の培地。
【請求項１４】
細胞を培養する方法であって、以下の段階を含む方法：
自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培地を溶媒によって再構成し、培養培地溶液を形成する段階；および、

細胞の培養に好都合な条件下にて該液体溶液と細胞を接触させる段階。
【請求項１５】
細胞を培養する方法であって、以下の段階を含む方法：
請求項１～３または請求項９のいずれか一項記載の方法に従って調製される、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培養培地を調製する段階；
少なくとも１つの溶媒によって培地を再構成し、培養培地溶液を形成する段階、および、
細胞の培養に好都合な条件下にて該溶液と細胞を接触させる段階。
【請求項１６】
細胞を培養する方法であって、以下の段階を含む方法：
溶媒によって請求項１０記載の培養培地を再構成し、培養培地溶液を形成する段階；および、
細胞の培養に好都合な条件下にて該溶液と細胞を接触させる段階。
【請求項１７】
細胞を培養する方法であって、以下の段階を含む方法：
溶媒によって請求項１１記載の培養培地を再構成し、培養培地溶液を形成する段階；および、
細胞の培養に好都合な条件下にて該溶液と細胞を接触させる段階。
【請求項１８】
細胞が細菌細胞である、請求項１４、１６または１７のいずれか一項記載の方法。
【請求項１９】
細胞が細菌細胞である、請求項１５記載の方法。
【請求項２０】
細胞が真核細胞である、請求項１４、１６または１７のいずれか一項記載の方法。
【請求項２１】
細胞が真核細胞である、請求項１５記載の方法。
【請求項２２】
真核細胞が、酵母細胞、植物細胞、もしくはそこから由来する細胞系である、請求項２０記載の方法。
【請求項２３】
真核細胞が、酵母細胞、植物細胞、もしくはそこから由来する細胞系である、請求項２１記載の方法。
【請求項２４】
真核細胞が、動物細胞もしくはそこから由来する細胞系である、請求項２０記載の方法。
【請求項２５】
真核細胞が、動物細胞もしくはそこから由来する細胞系である、請求項２１記載の方法。
【請求項２６】
動物細胞が、哺乳動物細胞もしくはそこから由来する細胞系である、請求項２４または請求項２５記載の方法。
【請求項２７】
哺乳動物細胞が、ヒト細胞もしくはそこから由来する細胞系である、請求項２６記載の方法。
【請求項２８】
請求項１～３または請求項９のいずれか一項記載の方法に従って調製される、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培養培地を含有する容器を、１つまたは複数含む、細胞を培養するためのキット。
【請求項２９】
請求項１０記載の、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培養培地を含有する容器を、１つまたは複数含む、細胞を培養するためのキット。
【請求項３０】
請求項１１記載の乾燥粉末完全培養培地を含有する容器を、１つまたは複数含む、細胞を

培養するためのキット。
【請求項３１】
少なくとも１つの成長因子、少なくとも１つの培養培地補足物、少なくとも１つの動物組織抽出物、少なくとも１つの動物器官抽出物、少なくとも１つの動物腺抽出物、少なくとも１つの酵素、少なくとも１つのタンパク質、少なくとも１つのビタミン、少なくとも１つのサイトカイン、少なくとも１つの脂質、少なくとも１つの微量元素、少なくとも１つの細胞外マトリックス成分、少なくとも１つの緩衝液、少なくとも１つの抗生物質、および少なくとも１つのウイルス阻害剤からなる群より選択される、少なくとも１つの付加的な成分を含有する付加的な容器を、１つまたは複数さらに含む、請求項２８記載のキット。
【請求項３２】
少なくとも１つの成長因子、少なくとも１つの培養培地補足物、少なくとも１つの動物組織抽出物、少なくとも１つの動物器官抽出物、少なくとも１つの動物腺抽出物、少なくとも１つの酵素、少なくとも１つのタンパク質、少なくとも１つのビタミン、少なくとも１つのサイトカイン、少なくとも１つの脂質、少なくとも１つの微量元素、少なくとも１つの細胞外マトリックス成分、少なくとも１つの緩衝液、少なくとも１つの抗生物質、および少なくとも１つのウイルス阻害剤からなる群より選択される、少なくとも１つの付加的な成分を含有する付加的な容器を、１つまたは複数さらに含む、請求項２９または請求項３０記載のキット。
【請求項３３】
請求項１０記載の、自動的にｐＨを調整する培養培地、および少なくとも１つの細胞を含む組成物。
【請求項３４】
組成物が粉末である、請求項３３記載の組成物。
【請求項３５】
請求項１１記載の完全培養培地および少なくとも１つの細胞を含む組成物。
【請求項３６】
細胞が、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞および動物細胞からなる群より選択される、請求項３３または請求項３５記載の組成物。
【請求項３７】
動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項３６記載の組成物。
【請求項３８】
哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項３７記載の組成物。
【請求項３９】
細胞が、株化された細胞系、もしくは形質転換された細胞系である、請求項３６記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の背景
発明の技術分野
本発明は、細胞、栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方に広く関連する。特に、本発明は、乾燥粉末栄養培地の処方、特に、細胞のインビトロの培養を促進する全ての必須栄養素を含む、細胞培養培地の処方、および、これらの培地の処方を生産する方法を提供する。本発明はまた、乾燥粉末血清（例えばウシ胎児血清）のような乾燥粉末培地補足物を生産する方法にも関連する。本発明はまた、再水和の際に、特定のイオン条件およびｐＨ条件を、使用前にそのような条件を調整する必要なく作り出すような、乾燥粉末培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方にも関連する。本発明はまた、原核細胞（例えば細菌細胞）および真核細胞（例えば真菌（特に酵母）細胞、動物（特に哺乳動物）細胞および植物細胞）のような、乾燥粉末細胞を生産する方法にも関連する。本発明はまた、滅菌乾燥粉末栄養培地、培地補足物（特に乾燥粉末血清）、培地部分群お

よび緩衝液の処方を調製する方法にも関連する。本発明はまた、これらの方法によって調製される、乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群、緩衝液の処方および細胞にも関連する。本発明はまた、これらの乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群、および緩衝液の処方を用いた、原核細胞および真核細胞の培養のためのキットおよび方法にも関連する。

【０００２】

関連技術分野

細胞培養培地

細胞培養培地は、調節された、人工の、およびインビトロの環境において細胞を維持および増殖させるために必要な栄養素を提供する。細胞培養培地の特性および組成は、特定の細胞の要求によって異なる。重要なパラメータには、重量オスモル濃度、ｐＨおよび栄養素の処方が含まれる。

【０００３】

培地の処方は、動物細胞、植物細胞および細菌細胞を含む、多くの細胞タイプを培養するために用いられてきた。培養培地において培養される細胞は、利用可能な栄養素を異化し、モノクローナル抗体、ホルモン、成長因子、ウイルスおよび同様のもののような、有用な生物学的物質を産生する。そのような産物には、治療的な適用があり、組換えＤＮＡ技術の出現によって、これらの産物を大量に生産するために細胞を操作することができる。したがって、インビトロにおいて細胞を培養できることは、細胞生理学の研究にとって重要なだけでなく、さもなければ費用効果的な手段で得ることのできない、有用な物質の生産のためにも必要である。

【０００４】

細胞培養培地の処方については、文献において十分に報告されており、数多くの培地が商品として入手可能である。細胞培養の初期の研究においては、培地の処方は、血液の化学的組成および物理化学的特性（例えば、重量オスモル濃度、ｐＨ等）に基づいており、「生理学的溶液」と呼ばれていた（Ｒｉｎｇｅｒ，Ｓ．，Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，３：３８０～３９３（１８８０）；Ｗａｙｍｏｕｔｈ，Ｃ．，「培養における細胞および組織（Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅｓ ｉｎ Ｃｕｌｔｕｒｅ）」，第１巻，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ，ｐｐ．９９～１４２（１９６５）；Ｗａｙｍｏｕｔｈ，Ｃ．，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ ６：１０９～１２７（１９７０））。しかし、哺乳動物の身体の異なる組織における細胞は、酸素／二酸化炭素分圧、ならびに、栄養素、ビタミン、および微量元素の濃度に関して異なる微小環境に曝露される；したがって、異なる細胞タイプについて好結果を得るようなインビトロの培養には、しばしば、異なる培地の処方の使用が必要となる。細胞培養培地の典型的な成分には、そのタイプおよび量が、与えられた細胞タイプもしくは組織タイプの特定の要求によって異なり得る、アミノ酸、有機塩および無機塩、ビタミン、微量金属、糖類、脂質および核酸が含まれる。特に、複合培地組成物においてはしばしば、安定性の問題によって、毒性産物、および／または、要求される栄養素のより低い有効濃度がもたらされ、それによって、培養培地の機能的な寿命が制限される。例えば、グルタミンは、哺乳動物細胞のインビトロの培養において使用される、ほとんど全ての培地の構成要素である。グルタミンは自然に、カルボン酸ピロリジンとアンモニアに分解する。分解速度は、ｐＨ条件およびイオン条件によって影響を受ける可能性があるが、細胞培養培地においては、これらの分解産物の形成は、しばしば避けることができないものである（Ｔｒｉｔｓｃｈら，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．２８：３６０～３６４（１９６２））。

【０００５】

ワン（Ｗａｎｇ）ら（Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ １４（８）：７１５～７２２（１９７８））は、ダルベッコの改良ＭＥＭ培地（ＤＭＥＭ）において、細胞にとっては致命的な、過酸化水素のような光分解生成物が産生されることを示した。リボフラビンおよびトリプトファンもしくはチロシンは、光への曝露期間における過酸化水素の形成に必要な成分である。ほとんどの哺乳動物の培養培地はリボフラビン、チロシンおよびトリプトファンを含むため

、ほとんどの細胞培養培地において毒性の光分解生成物が産生される可能性が高い。

【０００６】

これらの問題を回避するため、研究者らは、「必要に応じて」を基本として培地を作製し、培養培地の長期の保存を避ける。商品として入手可能な培地、典型的には乾燥粉末形態における培地は、全く初めから培地を作製すること、即ち各々の栄養素を個別に加えることに代わる、便利な代替としての役割を担うものであり、また、液体培地に関連する安定性の問題を幾らか回避するものである。しかし、製造業者によって提供される注文処方を例外として、商品としては限られた数の培養培地しか利用可能ではない。

【０００７】

乾燥粉末培地の処方は、ある培地の有効期間を増大させ得るが、乾燥粉末培地には、特に大規模適用において、関連する多くの問題がある。大容量の培地の生産では、栄養成分の混合および計量に必要な、特殊化された培地キッチンは言うまでもなく、乾燥粉末培地のための保存設備が必要とされる。乾燥粉末培地の腐食性の性質により、混合タンクは定期的に取り替えなければならない。

【０００８】

典型的には、細胞培養培地の処方は、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（１０～２０容量パーセント（％ ｖ／ｖ））または動物の胚、器官もしくは腺からの抽出物（０．５～１０％ ｖ／ｖ）のような、定義付けられていない成分を含む一連の添加剤によって補足される。動物細胞培養培地においては、ＦＢＳが最も一般的に適用される補足物であるが、新生仔ウシ、ウマおよびヒトを含む、他の血清供給源もまた定常的に使用される。培養培地の補足のための抽出物を調製するために使用されてきた器官もしくは腺には、顎下腺（Ｃｏｈｅｎ，Ｓ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３７：１５５５～１５６５（１９６１））、下垂腺（Ｐｅｅｈｌ，Ｄ．Ｍ．，およびＨａｍ，Ｒ．Ｇ．，Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ １６：５１６～５２５（１９８０）；米国特許第４，６７３，６４９号）、視床下部（Ｍａｃｉａｇ，Ｔ．ら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７６：５６７４～５６７８（１９７９）；Ｇｉｌｃｈｒｅｓｔ，Ｂ．Ａ．ら，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１２０：３７７～３８３（１９８４））、網膜（Ｂａｒｒｅｔａｕｌｔ，Ｄ．ら，Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ １８：２９～４２（１９８１））および脳（Ｍａｃｉａｇ，Ｔ．ら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２１１：１４５２～１４５４（１９８１））が含まれる。これらのタイプの、化学的に定義付けられていない補足物は、細胞培養培地において幾つか有用な機能を果たす（Ｌａｍｂｅｒｔ，Ｋ．Ｊ．ら，「動物細胞バイオテクノロジー（Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）」，第１巻，Ｓｐｉｅｒ，Ｒ．Ｅ．ら編，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．８５～１２２（１９８５））。例えば、これらの補足物は、不安定な、もしくは水不溶性の栄養素のための担体もしくはキレート化剤を提供する；毒性部分に結合し、中和する；ホルモンおよび成長因子、プロテアーゼ阻害剤、および必須の、しばしば同定されていないもしくは定義付けられていない、低分子量の栄養素を提供する；および、物理的ストレスおよび損傷から細胞を保護する。したがって、血清もしくは器官／腺抽出物は、動物細胞の培養のための最適な培養培地を提供するために、比較的低コストの補足物として一般的に使用される。

【０００９】

培養培地の生産方法

培養培地は典型的に、液体形態もしくは粉末形態において生産される。これらの形態の各々には、特有の利益および不利益がある。

【００１０】

例えば、液体培養培地は、（栄養素もしくは他の成分の補足が必要でない限り）すぐに使用できる状態にて提供されるという利益、および、処方が特定の細胞タイプについて最適化されているという利益がある。しかし、液体培地には、細胞培養において最適な性能を発揮するために補足物（例えば、Ｌ－グルタミン、血清、抽出物、サイトカイン、脂質等）の添加をしばしば必要とするという不利益がある。その上、液体培地は、成分の多くが

熱不安定であるため（したがって例えばオートクレーブの使用が除かれるため）、および、バルク液体は、γ線照射もしくは紫外線照射のような透過滅菌法を特に行うことができないため、しばしば、経済的に滅菌することが困難である；したがって、液体培養培地は、最も頻繁には、時間および費用のかかる工程となり得るろ過滅菌によって滅菌される。さらに、大バッチサイズ（例えば、１０００リットルまたはそれ以上）の液体培養培地の生産および保存は実用的ではなく、液体培養培地の成分はしばしば、比較的短い有効期間を有する。

【００１１】

これらの不利益を幾らか克服するため、液体培養培地を濃縮形態において処方することができる；これらの培地の成分は、その後、使用以前に、実用濃度にまで希釈することができる。このアプローチによって、標準の培養培地についてのものよりも大きい、および可変のバッチサイズを作製する可能性が提供される、および、濃縮培地の処方またはその成分は、しばしば、より長い有効期間を有する（培養培地濃縮技術が意図される、米国特許第５，４７４，９３１号を参照のこと）。しかし、これらの利点にも関わらず、濃縮液体培地にはなおも、補足物（例えば、ＦＢＳ、Ｌ－グルタミンもしくは器官／腺抽出物）を添加する必要性があるという不利益があり、経済的に滅菌するのが困難な可能性がある。

【００１２】

液体培地の代わりとして、粉末培養培地がしばしば使用される。粉末培地は典型的には、例えばボールミリング（本明細書においては、交換可能なように、「フィッツミリング（Ｆｉｔｚｍｉｌｌｉｎｇ）」とも呼ばれる）のような混合過程を経て、培養培地の乾燥成分を混合することによって、または、事前に作製された液体培養培地を凍結乾燥することによって生産される。このアプローチには、一層大きなバッチサイズを生産できる、粉末培地は典型的に、液体培地より長い有効期間を有する、および、処方後の照射（例えば、γ照射もしくは紫外線照射）または酸化エチレンの浸透によって培地を滅菌できるという利益がある。しかし、粉末培地には、明らかな不利益が幾つかある。例えば、粉末培地の成分の幾つかは、凍結乾燥の際に不溶性になり、または、集塊し、再可溶化が困難または不可能となる。その上、粉末培地は典型的に、微細な粉塵粒子を含み、それによって、材料を幾らか損失せずにそれらを再構成することが著しく困難となる、および、ＧＭＰ／ＧＬＰ、ＵＳＰもしくはＩＳＯ９０００の法規制下において稼動する多くのバイオテクノロジー生産設備における使用のためにそれらがさらに非実用的なものとなる。さらに、例えばＬ－グルタミンおよびＦＢＳのような、培養培地において使用される補足物の多くは、それらの不安定性、もしくは濃縮の際に集塊する傾向によって、もしくはボールミリングのような工程による剪断へのそれらの感受性によって、凍結乾燥もしくはボールミリング以前には培養培地に添加することができない。その上、これらの補足物の多くは、特にＦＢＳのような血清補足物は、凍結乾燥のような工程による粉末補足物の生産を試みた場合、活性の実質的な低下を示す、または完全に不活性に変えられる。最後に、粉末培地は典型的に、炭酸水素塩の緩衝系を含まず、再構成後のｐＨ調整を要する上、μｇ／ｍｌ量またはそれ以下の量で必要とされる成分は、均質性についての問題のために、典型的には、再構成後に加えられる。

【００１３】

したがって、現在、可変バルク量において調製できる、および、特に電離放射線照射もしくは紫外線照射により滅菌できるような、迅速に溶解する、栄養的に複合された安定な乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液が必要とされている。本発明の使用によって、細胞培養培地は、溶媒の添加および培地成分の溶解以外には、付加的な操作の必要がないように製造することができる。

【００１４】

発明の簡単な概要

本発明は、乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液を溶媒を用いて凝集させる段階を含む、栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の粉末の生産のための方法を提供する。本発明はまた、それらの乾燥粉末同等物を生産するために十分な条

件下において、液体栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液をスプレー乾燥する段階を含む、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の生産のための方法にも関連する。そのような条件は、例えば、粉末培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液が形成されるまで、熱および湿度を調節する段階を含み得る。本発明に従い、本方法は、粉末を包装する以前または以後に達成することができる、栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液の粉末の滅菌段階をさらに含み得る。特に好ましい方法においては、滅菌は粉末の包装後に、包装された粉末をγ線照射することによって達成される。

【００１５】

本発明に従って生産することができる特に好ましい栄養培地粉末は、細菌培養培地粉末、酵母培養培地粉末、植物培養培地粉末および動物培養培地粉末からなる群より選択される培養培地粉末を含む。

【００１６】

本発明の方法によって生産することができる特に好ましい培地補足物は、以下を含む：ウシ血清（例えばウシ胎児、新生仔ウシもしくは通常の仔ウシの血清）、ヒト血清、ウマ血清、ブタ血清、サル血清、類人猿血清、ラット血清、マウス血清、ウサギ血清、ヒツジ血清および同様のもののような粉末動物血清；サイトカイン（（ＥＧＦ、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦ、ＫＧＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２、ＮＧＦおよび同様のもののような）成長因子、インターロイキン、コロニー刺激因子およびインターフェロンを含む）；（コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチンおよび同様のもののような）接着因子または細胞外マトリックス成分；（リン脂質、コレステロール、ウシコレステロール濃縮物、脂肪酸、スフィンゴ脂質および同様のもののような）脂質；および（ウシ下垂体抽出物、ウシ脳抽出物、ニワトリ胚抽出物、ウシ胚抽出物、鶏肉抽出物、アキレス腱およびその抽出物のような）動物の組織、器官もしくは腺の抽出物および同様のもの。本方法によって生産することができる他の培地補足物は、（血清アルブミン、特にウシまたはヒトの血清アルブミン；免疫グロブリンおよびその断片もしくは複合体；アプロチニン；ヘモグロビン；ヘミンまたはヘマチン；（トリプシン、コラーゲナーゼ、パンクレアチニンまたはディスパーゼのような）酵素；リポタンパク質；フェリチン；等のような）、天然もしくは組換えであり得る様々なタンパク質；ビタミン（ビタミンＡ、B_1、B_2、B_3、B_6、B_{12}、Ｃ、Ｄ、Ｅ、ＫおよびＨ（ビオチン）を含むが限定はしない）；アミノ酸およびその変異体（Ｌ－グルタミンおよびシスチンを含むが、限定はしない）、酵素補因子；（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、ニッケル、カリウム、スズ、亜鉛、セレン、バナジウムおよび同様のもののような）微量元素、および、当業者にはよく知られる、インビトロの細胞の培養において有用な他の成分を含む。

【００１７】

本発明はまた、溶媒による培地の再構成の際に、使用前に培地にいかなる補助的栄養成分をも添加する必要なく、インビトロの細胞の培養を支持するような、乾燥粉末完全培養培地の処方をも提供する。本発明に従い、そのような完全培地は、自動的にｐＨを調整する培地が可能であり、血清、１つもしくは複数の培養培地補足物、Ｌ－グルタミン、インスリン、トランスフェリン、１つもしくは複数のホルモン、１つもしくは複数の脂質、１つもしくは複数の成長因子、１つもしくは複数のサイトカイン、１つもしくは複数の神経伝達物質、１つもしくは複数の動物組織、器官もしくは腺の抽出物、１つもしくは複数の酵素、１つもしくは複数のタンパク質、１つもしくは複数の微量元素、１つもしくは複数の細胞外マトリックス成分、１つもしくは複数の抗生物質、１つもしくは複数のウイルス阻害剤、および／または、１つもしくは複数の緩衝液のような、１つもしくは複数の成分を含み得る。

【００１８】

本発明によって調製される栄養培地および培地補足物は、血清（好ましくは上記に説明されるもの）、Ｌ－グルタミン、インスリン、トランスフェリン、１つもしくは複数の脂質（好ましくは１つもしくは複数のリン脂質、スフィンゴ脂質、脂肪酸もしくはコレステロ

ール）、１つもしくは複数のサイトカイン（好ましくは上記に説明されるもの）、１つもしくは複数の神経伝達物質、１つもしくは複数の動物組織、器官もしくは腺抽出物（好ましくは上記に説明されるもの）、１つもしくは複数のタンパク質（好ましくは上記に説明されるもの）または、１つもしくは複数の緩衝液（好ましくは炭酸水素ナトリウム）、もしくはその任意の組み合わせのような部分群をも含み得る。

【００１９】

本発明の方法に従った調製に特に適した緩衝液の粉末は、緩衝塩溶液粉末、とりわけ、リン酸緩衝溶液粉末もしくはトリス（Ｔｒｉｓ）緩衝塩溶液粉末を含む。特に、本発明は、溶媒によって再水和した際に自動的に望ましいｐＨとなる、「自動ｐＨ」緩衝液粉末を調製する方法を提供する。

【００２０】

本発明はまた、栄養培地粉末、培地補足物粉末（上記に説明される補足物の粉末を含む）および緩衝液粉末、特に、これらの方法に従って調製される、自動ｐＨ培地粉末、培地補足物粉末および緩衝液粉末をも提供する。

【００２１】

本発明はまた、乾燥させる細胞を得る段階、１つもしくは複数の安定剤（例えばトレハロースのような多糖類）と細胞を接触させる段階、細胞を含む水性懸濁液を形成させる段階、および、乾燥粉末の生産に好都合な条件下において細胞懸濁液をスプレー乾燥する段階を含む、原核細胞（例えば細菌細胞）および真核細胞（例えば真菌（特に酵母）細胞、動物（特にヒトを含む哺乳動物）細胞および植物細胞）を含む乾燥細胞を調製する方法にも関連する。本発明はまた、これらの方法によって生産される乾燥細胞粉末にも関連する。

【００２２】

本発明は、滅菌粉末培養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を調製する方法にさらに関連する。そのような方法の１つは、上記に説明される粉末培養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を、粉末中に在留する可能性のある細菌、真菌、胞子およびウイルスが複製不可能に変えられるように、γ照射に曝露する段階を含む。好ましいそのような方法においては、粉末培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、総線量約１０～１００キログレイ（ｋＧｙ）、好ましくは総線量約１５～７５ ｋＧｙ、１５～５０ ｋＧｙ、１５～４０ ｋＧｙもしくは２０～４０ ｋＧｙにて、より好ましくは、総線量約２０～３０ ｋＧｙにて、および最も好ましくは、総線量約２５ ｋＧｙにて、約１時間～約７日間、好ましくは約１時間～約５日間、より好ましくは約１時間～約３日間、約１時間～約２４時間もしくは約１～５時間、および最も好ましくは約１～３時間γ照射される。本発明はまた、これらの方法によって生産される滅菌粉末培養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液にも関連する。

【００２３】

本発明は、好ましくは血清もしくは水を含む溶媒によって、本発明の栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液を再構成する段階、および、細胞の培養に好都合な条件下において、再構成された栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液と細胞を接触させる段階を含む、細胞を培養する方法をさらに提供する。本方法に従って、任意の細胞を、特に細菌細胞、酵母細胞、植物細胞もしくは動物細胞を、培養することができる。本方法によって培養するために好ましい動物細胞には、昆虫細胞（最も好ましくはショウジョウバエ細胞、夜蛾科由来の（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ）細胞およびＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓａ細胞）、ネマトーダ細胞（最も好ましくは線虫細胞）および哺乳動物細胞（最も好ましくはＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＶＥＲＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＡＥ－１細胞、ＳＰ２／０細胞、Ｌ５．１細胞、ハイブリドーマ細胞もしくはヒト細胞）が含まれる。本発明の本局面に従って培養される細胞は、正常な細胞、病気の細胞、形質転換細胞、突然変異細胞、体細胞、生殖細胞、幹細胞、前駆細胞もしくは胚細胞が可能であり、そのいずれも、株化された細胞系、もしくは形質転換された細胞系であり得る、または、天然の供給源から得ることができる。

【００２４】

本発明はまた、本発明の１つもしくは複数の培養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液の粉末および少なくとも１つの細胞を含む組成物を提供する。そのような組成物は、例えば、自動的にｐＨが調整される本発明の培養培地粉末、または本発明の乾燥粉末完全培地、および、１つもしくは複数の細菌細胞、１つもしくは複数の植物細胞、１つもしくは複数の酵母細胞、および１つもしくは複数の動物細胞（１つもしくは複数のヒト細胞のような、１つもしくは複数の哺乳動物細胞を含むが限定はしない）のような、１つもしくは複数の細胞を含み得る。本発明の本局面に従った組成物は、溶媒による再構成の際に、組成物中に含有される１つもしくは複数の細胞の活性培養が作製されるような、粉末形態であってもよい。

【００２５】

本発明では、細胞の培養における使用のためのキットがさらに意図される。本発明に従ったキットは、本発明の１つもしくは複数の栄養培地粉末、培地補足物粉末、培地部分群粉末もしくは緩衝液粉末、またはその任意の組み合わせを含有する、１つもしくは複数の容器を含み得る。本キットはまた、本発明の乾燥細胞粉末を含む、１つもしくは複数の細胞もしくは細胞タイプをも含有し得る。

【００２６】

本発明の他の好ましい態様は、本発明の以下の図面および説明、および請求項を鑑みて、当業者には明らかとなる。

【００２７】

発明の詳細な説明

定義

続いての説明においては、細胞培養培地の技術分野において従来的に用いられる多くの用語が広く利用される。本明細書および請求項、および、そのような用語を与えられる範囲について、明らかな、かつ一貫性のある理解を与えるために、以下の定義が提供される。

【００２８】

本明細書において使用されるような「粉末」という用語は、水もしくは血清のような溶媒を用いて複合体化もしくは凝集することができる、またはできない、顆粒状の形態で存在する組成物を指す。「乾燥粉末」という用語は、「粉末」という用語と交換可能なように使用することができる。しかし、本明細書において使用されるような「乾燥粉末」という用語は、単に、顆粒化された材料の総体的な状況を指し、他に示されない限り、その材料が、複合体化または凝集された溶媒を完全に含まないと意味することは意図されない。

【００２９】

「原料」という用語は、細胞培養培地において細胞の増殖を維持もしくは促進するために使用することができる、化学的起源もしくは生物学的起源のいずれかに由来する、任意の化合物を指す。「成分」「栄養素」および「原料」という用語は、交換可能なように使用することができ、全てそのような化合物を指すように意図される。細胞培養培地において使用される典型的な原料には、アミノ酸、塩類、金属、糖類、脂質、核酸、ホルモン、ビタミン、脂肪酸、タンパク質および同様のものが含まれる。エクスビボの細胞の培養を促進もしくは維持する他の原料は、特定の必要性に従って、当業者によって選択されることが可能である。

【００３０】

「サイトカイン」という用語は、増殖、分化、老化、アポトーシス、細胞毒性もしくは抗体分泌のような、細胞における生理学的反応を誘導する化合物を指す。本定義の「サイトカイン」には、成長因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、インターフェロンおよびリンフォカインが含まれる。

【００３１】

「細胞培養」または「培養」によっては、例えばインビトロのような人工の環境における、細胞の維持が意図される。しかし、「細胞培養」という用語は総称的な用語であり、個々の原核細胞（例えば細菌細胞）または真核細胞（例えば動物細胞、植物細胞および真菌細胞）の培養のみならず、「組織培養」、「器官培養」、「器官系培養」または「器官型

培養」という用語が、「細胞培養」という用語と交換可能なように時折使用され得る、組織、器官、器官系または全生物体の培養をも含むように使用できることは理解される。

【００３２】

「培養」によっては、活性状態または休止状態における、細胞の増殖、分化または連続した生存能に好都合な条件下での、人工の環境におけるその細胞の維持が意図される。したがって、「培養」は、「細胞培養」または上記に説明されるその同義語の任意のものと交換可能なように使用することができる。

【００３３】

「培養容器」によっては、細胞を培養するための無菌環境を提供することができる、ガラス、プラスチック、または金属の容器が意図される。

【００３４】

「細胞培養培地」、「培養培地」（各々の場合複数形は「培地」）および「培地処方」という表現は、細胞の培養および／または増殖を支持する栄養溶液を指す；これらの表現は、交換可能なように使用することができる。

【００３５】

「抽出物」によっては、典型的には物質の機械的処理（例えば圧力処理）または化学的処理（例えば蒸留、沈降反応、酵素的作用または高塩濃度処理）のいずれかによって形成される、物質の部分群の濃縮された調製物を含む組成物が意図される。

【００３６】

「酵素的切断産物」によっては、特殊化されたタイプの抽出物、即ち、抽出される物質（例えば、植物成分または酵母細胞）を、物質の成分をより単純な形態に（例えば単糖類もしくは二糖類および／またはモノペプチド、ジペプチドもしくはトリペプチドを含む調製物にまで）分解することができるような酵素の、少なくとも１つを用いて処理することによって調製されるものを含む組成物が意図される。本文脈においては、および、本発明のためには、「加水分解産物」という用語は、「酵素的切断産物」という用語と交換可能なように使用することができる。

【００３７】

「接触させる」という用語は、細胞が培養される培地を含む培養容器に、培養される細胞を入れることを指す。「接触させる」という用語は、細胞を培地と混合すること、培養容器中の細胞上に培地をピペットで移すこと、および、細胞を培養培地中に沈めることを含む。

【００３８】

「組み合わせる」という用語は、細胞培養培地処方における原料を混ぜる、または混合することを指す。

【００３９】

「ピロー形成」という用語は、大気中の水分を含むいずれかの水分が容器に浸透し、そこに含まれる粉末を湿らせた場合に起こるイベントを指す。そのような湿潤は、容器内における酸性条件をもたらし得、それにより粉末からのCO_2ガスの遊離（「ガス発生」）が引き起こされる。密封容器中において乾燥粉末が「ピロー形成」する場合、ガス発生は破裂させる程度にまで容器の膨脹を引き起こす可能性がある。

【００４０】

「少量」という用語は、μｇ／ｍｌ、μｇ／Ｌまたはそれ以下の量で培地中に存在する成分を指す。

【００４１】

細胞培養培地は、多くの原料から構成され、これらの原料は培養培地によって異なる。「１×処方」は、細胞培養培地において実用濃度にて認められる原料の幾らかまたは全部を含む任意の水溶液を指すよう意図される。「１×処方」は、例えば、細胞培養培地、または、その培地についての任意の原料の部分群を指し得る。１×溶液におけるある原料の濃度は、インビトロにて細胞を維持または培養するために使用される細胞培養処方において認められるその原料の濃度とほぼ同じである。細胞のインビトロの培養のために使用され

る細胞培養培地は、定義上１×処方である。多くの原料が存在する場合、１×処方中の各原料は、細胞培養培地における原料の濃度とほぼ等しい濃度を有する。例えば、ＲＰＭＩ－１６４０培養培地は、原料の中でも特に、０．２ ｇ／ＬのＬ－アルギニン、０．０５ｇ／ＬのＬ－アスパラギン、および０．０２ ｇ／ＬのＬ－アスパラギン酸を含む。これらのアミノ酸の「１×処方」は、溶液中にほぼ同じ濃度のこれらの原料を含む。したがって、「１×処方」と言う場合、溶液中の各原料が、説明される細胞培養培地において認められるものと同じまたはほぼ同じ濃度であることが意図される。細胞培養培地の１×処方中における原料の濃度は、当業者にはよく知られている。その全体を参照として本明細書に組み入れられる、リス（Ａｌｌｅｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｎ．Ｙ．）（１９８４）の「血清を含まない動物細胞培養のための培地、補足物および基質の調製のための方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｆｏｒ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｅｄｉａ，Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔｓ ａｎｄ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ Ｆｏｒ Ｓｅｒｕｍ－Ｆｒｅｅ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ）」を参照のこと。しかし、特に、より少数の原料が１×処方に含まれる場合は、１×処方における重量オスモル濃度および／またはｐＨは、培養培地と比べて異なり得る。

【００４２】

「１０×処方」は、その溶液中の各原料が、細胞培養培地中における同じ原料よりも約１０倍濃縮されているような溶液を指すことを意図される。例えば、ＲＰＭＩ－１６４０培養培地の１０×処方は、原料の中でも特に、２．０ ｇ／ＬのＬ－アルギニン、０．５ ｇ／ＬのＬ－アスパラギン、および０．２ ｇ／ＬのＬ－アスパラギン酸を含み得る（上記の１×処方と比較する）。「１０×処方」は、多くの付加的な原料を、１×培養培地において認められるものの約１０倍の濃度にて含み得る。容易に明らかとなるように、「２０×処方」、「２５×処方」、「５０×処方」および「１００×処方」は各々、１×細胞培養培地と比較して、原料を約２０、２５、５０、または１００倍の濃度で含む溶液を指す。再度、培地処方と濃縮溶液の重量オスモル濃度およびｐＨは異なり得る。培養培地濃縮技術が意図される、米国特許第５，４７４，９３１号を参照のこと。

【００４３】

本発明の「自動ｐＨ」粉末（例えば自動ｐＨ培地、培地補足物または緩衝液粉末）は、溶媒による再水和の際に、結果として得られる培地、培地補足物または緩衝溶液が望ましいｐＨとなり、使用前に酸または塩基を用いたｐＨ調整を必要としないように処方された粉末である。例えば、ｐＨ ７．４において使用されるように処方された自動ｐＨ培養培地は、溶媒による再水和の際にｐＨ ７．４となるため、ｐＨの調整をせずに、即時の使用の準備ができている。本発明のそのような自動ｐＨ粉末は、本明細書においては、交換可能なように、「自動的にｐＨを調整する」粉末とも呼ばれ得る。

【００４４】

概観

本発明は、栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を生産する方法を意図する。本方法によって生産される栄養培地、培地補足物および培地部分群は、そのいずれも体細胞、生殖細胞、正常な細胞、病気の細胞、形質転換細胞、突然変異細胞、幹細胞、前駆細胞または胚細胞であり得るような、細菌細胞、真菌細胞（特に酵母細胞）、植物細胞または動物細胞（特に昆虫細胞、ネマトーダ細胞または哺乳動物細胞、最も好ましくはヒト細胞）であり得る細胞の増殖を支持するために使用することができる、（血清を含まない、または血清を含む）任意の培地、培地補足物または培地部分群である。好ましい、そのような栄養培地には、限定はしないが、細胞培養培地、最も好ましくは、細菌細胞培養培地、植物細胞培養培地または動物細胞培養培地が含まれる。好ましい培地補足物には、限定はしないが、細菌、動物または植物の細胞、腺、組織または器官の抽出物（特にウシ下垂体抽出物、ウシ脳抽出物およびニワトリ胚抽出物）；および生物学的液体（特に動物の血清、および最も好ましくはウシ血清（特にウシ胎児血清、新生仔ウシ血清または通常の仔ウシ血清）、ウマ血清、ブタ血清、ラット血清、マウス血清、ウサギ血清、サル血清、類人猿血清またはヒト血清、いずれも胎児血清であり得る）およびその抽出物（より好まし

くは血清アルブミンおよび最も好ましくはウシ血清アルブミンまたはヒト血清アルブミン）のような、定義付けられていない補足物が含まれる。培地補足物はまた、上記にて説明される、定義付けられていない培地補足物の代用品として使用することができる、ＬｉｐｏＭａｘ（登録商標）、ＯｐｔｉＭＡｂ（登録商標）、Ｋｎｏｃｋ－Ｏｕｔ（商標）ＳＲ（各々、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ, Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ, Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ, Ｍａｒｙｌａｎｄから入手可能）および同様のもののような、定義付けられた代用品をも含み得る。そのような補足物はまた、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、脂質、接着因子、タンパク質および同様のものを含むが限定はしない、定義付けられた成分をも含み得る。

【００４５】

栄養培地はまた、本発明の方法によって調製することができ、本発明の方法に従って使用することができる、様々な部分群に分けることができる（米国特許第５，４７４，９３１号を参照のこと）。そのような部分群は、本発明の栄養培地を作製するために組み合わせることができる。

【００４６】

本発明の方法により、任意の栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を、生物学的活性および生化学的活性の著しい低下をさせずに、生産および長期間保存することができる。「生物学的活性および生化学的活性の著しい低下をさせずに」によっては、新しく作製された同じ処方の栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液と比較した場合、栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の生物学的活性または生化学的活性が約３０％未満、好ましくは約２５％未満、より好ましくは約２０％未満、なおもより好ましくは約１５％未満、および最も好ましくは約１０％未満減少することが意味される。「長期間」によっては、ボールミリングのような従来法によって調製された場合の、栄養培地、補足物、部分群または緩衝液の保存期間より、長い期間が意味される。したがって、本明細書において使用されるように、「長期間」は、約－７０℃～約２５℃、約－２０℃～約２５℃、約０℃～約２５℃、約４℃～約２５℃、約１０℃～約２５℃、または約２０℃～約２５℃の温度における保存を含み得る、一定の保存条件下における、約１ヶ月～３６ヶ月間、約２ヶ月～３０ヶ月間、約３ヶ月～２４ヶ月間、約６ヶ月～２４ヶ月間、約９ヶ月～１８ヶ月間、または約４ヶ月～１２ヶ月間を意味する。栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の生物学的活性または生化学的活性を決定するためのアッセイは、当技術分野においてはよく知られており、当業者には熟知されている。

【００４７】

培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方

任意の栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、本発明の方法によって調製することができる。本発明に従って調製することができる、特に好ましい栄養培地、培地補足物および培地部分群は、動物細胞、植物細胞、細菌細胞または酵母細胞の増殖を支持する細胞培養培地、培地補足物および培地部分群を含む。本発明に従って調製することができる、特に好ましい緩衝液は、動物細胞、植物細胞、細菌細胞または酵母細胞に対して等張であるような均衡塩溶液を含む。

【００４８】

本発明に従って調製することができる動物細胞培養培地の例には、限定はしないが、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０、ＭＣＤＢ １３１、ＭＣＤＢ １５３、ＭＤＥＭ、ＩＭＤＭ、ＭＥＭ、Ｍ１９９、ＭｃＣｏｙ’ｓ ５Ａ、Ｗｉｌｌｉａｍｓ’培地Ｅ、Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚ’ｓ Ｌ－１５培地、Ｇｒａｃｅ’ｓ昆虫培地、ＩＰＬ－４１昆虫培地、ＴＣ－１００昆虫培地、Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ’ｓショウジョウバエ培地、ＷｏｌｆおよびＱｕｉｍｂｙ’ｓ両生類培養培地、ケラチノサイト、内皮細胞、肝細胞、メラノサイト等の培養を支持するよう設計されたもののような細胞特異的血清フリー培地（ＳＦＭ）、Ｆ１０栄養素混合物およびＦ１２栄養素混合物が含まれる。本発明による調製に適した他の培地、培地補足物および培地部分群は、商品として（例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ, Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ, Ｒｏｃｋｖｉｌｌ

e，Ｍａｒｙｌａｎｄ、および、Ｓｉｇｍａ；Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉから）入手可能である。これらの培地、培地補足物および培地部分群、および多くの他の一般に使用される動物細胞培養培地、培地補足物および培地部分群についての処方は、当技術分野においてよく知られており、例えばＧＩＢＣＯ／ＢＲＬカタログおよび参照ガイド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、およびシグマ（Ｓｉｇｍａ）動物細胞カタログ（Ｓｉｇｍａ；Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）において見出すことができる。

【００４９】

本発明に従って調製することができる植物細胞培養培地の例には、限定はしないが、Ａｎｄｅｒｓｏｎ’ｓ植物培養培地、ＣＬＣ基礎培地、Ｇａｍｂｏｒｇ’ｓ培地、Ｇｕｉｌｌａｒｄ’ｓ海洋植物培養培地、Ｐｒｏｖａｓｏｌｉ’ｓ海洋培地、ＫａｏおよびＭｉｃｈａｙｌｕｋ’ｓ培地、ＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ培地、ＭｃＣｏｗｎ’ｓ木本培地、Ｋｎｕｄｓｏｎラン培地、Ｌｉｎｄｅｍａｎｎラン培地、ならびに、ＶａｃｉｎおよびＷｅｎｔ培地が含まれる。商品として入手可能なこれらの培地、および、多くの他の一般に使用される植物細胞培養培地についての処方は、当技術分野においてはよく知られており、例えば、シグマ（Ｓｉｇｍａ）植物細胞培養カタログ（Ｓｉｇｍａ；Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）において見出すことができる。

【００５０】

本発明に従って調製することができる、細菌細胞培養培地の例には、限定はしないが、トリプチカーゼダイズ培地、脳心臓浸出液培地、酵母抽出物培地、ペプトン酵母抽出物培地、ウシ浸出液培地、チオグリコール酸培地、インドール－硝酸塩培地、ＭＲ－ＶＰ培地、Ｓｉｍｍｏｎｓ’クエン酸培地、ＣＴＡ培地、胆液エスクリン培地、Ｂｏｒｄｅｔ－Ｇｅｎｇｏｕ培地、炭酵母抽出物（ＣＹＥ）培地、マンニトール－塩培地、ＭａｃＣｏｎｋｅｙ’ｓ培地、エオシン－メチレンブルー（ＥＭＢ）培地、Ｔｈａｙｅｒ－Ｍａｒｔｉｎ培地、サルモネラ－赤痢菌培地、およびウレアーゼ培地が含まれる。商品として入手可能なこれらの培地、および、多くの他の一般に使用される細菌細胞培養培地についての処方は、当技術分野においてはよく知られており、例えばＤＩＦＣＯマニュアル（ＤＩＦＣＯ；Ｎｏｒｗｏｏｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）、および、臨床微生物学マニュアル（Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ）（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ）において見出すことができる。

【００５１】

本発明に従って調製することができる、真菌細胞培養培地、特に酵母細胞培養培地の例には、限定はしないが、Ｓａｂｏｕｒａｕｄ培地および酵母形態学培地（ＹＭＡ）が含まれる。商品として入手可能なこれらの培地、および、多くの他の一般に使用される酵母細胞培養培地についての処方は、当技術分野においてはよく知られており、例えばＤＩＦＣＯマニュアル（ＤＩＦＣＯ；Ｎｏｒｗｏｏｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）、および、臨床微生物学マニュアル（Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ）（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ）において見出すことができる。

【００５２】

当業者には理解されるように、本発明の上記の培地の任意のものは、指示物質または選択物質（例えば、色素、抗生物質、アミノ酸、酵素、基質および同様のもの）、フィルター（例えば炭）、塩類、多糖類、イオン、界面活性剤、安定剤および同様のもののような、１つもしくは複数の付加的な成分をも含み得る。

【００５３】

本発明の特に好ましい態様においては、上記に説明される培養培地は、１つもしくは複数の緩衝塩、好ましくは炭酸水素ナトリウムを、培養培地について最適な緩衝能を提供するために十分な濃度にて含み得る。本発明のある局面に従い、炭酸水素ナトリウムのような

緩衝塩を、培地の凝集以前、凝集中、または凝集後に、粉末培地に粉末形態において加えることができる。本発明の本局面のある実施例においては、凝集培地の再構成の際に、培養培地が様々な細胞タイプの培養について最適な、または実質的に最適なｐＨとなるように、（水、血清、または酸（例えば１～５ Ｍ、好ましくは１ Ｍの濃度におけるＨＣｌ）もしくは塩基 （例えば１～５ Ｍ、好ましくは１ Ｍの濃度におけるＮａＯＨ）などのｐＨ調整物質のような）適切な溶媒による凝集以前、凝集中、または凝集後に、炭酸水素ナトリウムを培養培地に加えることができる。例えば、本方法によって調製される細菌細胞培養培地は、再構成の際に、好ましくは、ｐＨがおよそ４～１０、より好ましくはおよそ５～９、またはおよそ６～８．５となる；本方法によって調製される真菌（例えば酵母）細胞培養培地は、再構成の際に、好ましくは、ｐＨがおよそ３～８、より好ましくはおよそ４～８、またはおよそ４～７．５となる；本方法によって調製される動物細胞培養培地は、再構成の際に、好ましくは、ｐＨがおよそ６～８、または７～８、より好ましくはおよそ７～７．５、またはおよそ７．２～７．４となる；および、本方法によって調製される植物細胞培養培地は、再構成の際に、好ましくは、ｐＨがおよそ４～８、好ましくは、およそ４．５～７、５～６もしくは５．５～６となる。当然のことながら、特定の細胞タイプについて使用される所定の培養培地についての最適ｐＨは、当業者によって、当技術分野にて既知の方法を用いて、経験的に決定されることも可能である。

【００５４】

その他の実施例においては、流動層装置を用いて、緩衝液を培地に凝集させることによって、または、緩衝液を乾燥粉末培地もしくは凝集粉末培地上にてスプレー乾燥する（下記に説明されるようにスプレー乾燥装置を用いる）ことによって、１つもしくは複数の緩衝塩、例えば炭酸水素ナトリウムを、粉末栄養培地に直接加えることができる。関連局面においては、流動層装置における、粉末栄養培地へのｐＨ調整物質の凝集によって、粉末栄養培地もしくは凝集栄養培地上へのｐＨ調整物質のスプレー乾燥によって、またはその組み合わせによって、酸（例えばＨＣｌ）または塩基（例えばＮａＯＨ）のようなｐＨ調整物質を、（炭酸水素ナトリウムのような）１つもしくは複数の緩衝塩を含み得る、粉末栄養培地に加えることができる；このアプローチは、粉末培地の再構成後に引き続くｐＨ調整物質の添加を不要のものとする。したがって、本発明は、溶媒（例えば水または血清）による再構成の際に、液体培地のｐＨを調整する必要なく、細胞の培養または増殖の支持のために最適なｐＨとなる、インビトロにおける細胞の培養または増殖において有用な粉末栄養培養培地を提供する。したがって、本明細書において「自動ｐＨ」培地または「自動的にｐＨを調整する」培地と交換可能なように呼ばれるこのタイプの培地は、再構成後に培地に緩衝液を加えて、緩衝液の溶解後に培地のｐＨを調整するという、時間のかかる、かつ誤りがちな段階を不要とする。例えば、これらの方法に従って調製される哺乳動物細胞培養培地は、再構成の際に、ｐＨが約７．１～約７．５の間、より好ましくは約７．１～約７．４の間、および最も好ましくは約７．２～約７．４または約７．２～約７．３となることが可能である。

【００５５】

本発明のある方法に従い、自動的にｐＨを調整する培地は、緩衝系またはｐＨ調整物質を全く加えずに、再構成培地を調製することによって作製することができる（本発明の「自動ｐＨ培地」）。好ましい、そのような局面においては、自動ｐＨ培地は、培地中に存在する緩衝系を調整することによって提供され得る。例えば、当業者には知られるように、培養培地は典型的に緩衝液または緩衝系を含む。培地においてそのような緩衝液のｐＨ対抗形態（ｐＨ－ｏｐｐｏｓｉｎｇ ｆｏｒｍ）を調整することによって、本発明は、培地の再構成以前または再構成の際に、および使用前に、適切なｐＨレベルに到達させるために付加的な緩衝液またはｐＨ調整物質を加える必要性を回避するような、自動ｐＨ培地の生産を提供する。そこで、そのような、本発明のある局面においては、粉末培地の再構成の際に望ましいｐＨを提供するため、ある培地成分のｐＨ対抗形態（特にリン酸または他の緩衝塩）が、培養培地において使用される。（成分のｐＨ対抗形態は、対の一方が、ｐＨを上げるか、または下げるかによって、溶液の望ましいｐＨに到達させることができる

、共役酸塩基対である。ナトリウムＨＥＰＥＳ（ｐＨを上げる）とＨＥＰＥＳ－ＨＣｌ（ｐＨを下げる）は、ｐＨ対立成分の例である。）例えば、４．５～７．２の間のｐＨを有する再構成培地が調製される場合、第一段階は、望ましいｐＨを与えるために、一塩基リン酸（ｐＨを下げる）対二塩基リン酸（ｐＨを上げる）の正確な平衡を決定することである。典型的には、一塩基リン酸塩および二塩基リン酸塩は、約０．１～約１０ｍＭ、約０．２～約９ｍＭ、約０．３～約８．５ｍＭ、約０．４～約８ｍＭ、約０．５～約７．５ｍＭ、約０．６～約７ｍＭ、または好ましくは約０．７～約７ｍＭの濃度にて使用される。処方において他の緩衝系が使用される場合、溶媒による再構成の際にその処方が望ましい最終ｐＨとなることを確証するため、塩基性（典型的にはナトリウムまたは一塩基）緩衝塩およびそれに対応する酸性（またはｐＨ対立；典型的にはＨＣｌもしくは二塩基）緩衝塩の適切な比率または平衡を、同様に決定する。塩基性（例えばナトリウムまたは一塩基）形態が加えられるにせよ、または酸性（例えばＨＣｌまたは二塩基）形態が加えられるにせよ、ある一定のｐＨにおいては、溶液中に存在する実際のリン酸分子種は同じであるため、この調整は緩衝能には影響を与えないことが予測される。適切な緩衝液のｐＨ対抗形態のある適切な比率が一旦決定されれば、再構成の際および使用前に適切なｐＨレベルを有するような培養培地（即ち、本発明の自動ｐＨ培地）を提供するために、これらの成分を培地（例えば乾燥粉末培地）に加えることができる。そのような、自動的にｐＨを調整する培養培地のある例の調製については、下記の実施例３、６および１７において、より詳細を説明される。

【００５６】

関連局面においては、本発明は、培地の安定性、可溶性、構造および／または性能に有害に影響を与える培地成分の相互作用を防ぐようにして培養培地を調製する方法を提供する。そのような好ましいある局面においては、本発明の方法は、培養培地中に存在する緩衝成分間の有害な相互作用を防ぐ。例えば、本発明のそのような方法は、使用前の乾燥形態における培地の保存の際の、１つもしくは複数の培地成分からのガスの放出である、培養培地におけるガス発生を防ぐために使用することができる。特に、本発明のこれらの方法は、典型的には培地中にて使用される炭酸水素塩（特に炭酸水素ナトリウム）緩衝液からの二酸化炭素の遊離から生じる、培地からの二酸化炭素のガス発生を防ぐために使用することができる。培地中にて使用されるリン酸緩衝液のタイプに依存して、著しい量の二酸化炭素ガスが炭酸水素ナトリウムのガス発生によって生じ、培地の密封容器を破裂させる程度にまで膨脹させる可能性があり、それにより、完成された生産物の保存安定性が低下するため、炭酸水素ナトリウムは一般に、粉末培地には含まれない。この望ましくない状態を最小限にするため、炭酸水素ナトリウムを含む処方においては、一塩基リン酸ナトリウム（NaH_2PO_4）の代わりに、二塩基リン酸ナトリウム（Na_2HPO_4）を使用することができる。しかし、培地の処方において一塩基リン酸ナトリウムが使用される場合は、一塩基リン酸ナトリウムと同一の緩衝能を有する一方、ガス形成をもたらさないゆえピロー形成を引き起こさない、一塩基リン酸カリウム（KH_2PO_4）を代わりに用いることができる。本発明の本局面に従い、培養培地において使用される（または存在する）一塩基リン酸塩対二塩基リン酸塩（または他の緩衝塩）の比率が決定され、その後、培地中の炭酸水素ナトリウムからの二酸化炭素のガス発生を防ぐために、一塩基リン酸ナトリウム（または他の一塩基緩衝塩）は等モル量の一塩基リン酸カリウムに置き換えられる。一塩基リン酸ナトリウムの緩衝能は一塩基リン酸カリウムのものと同一であるため、この置き換えは培地中に存在する緩衝系に影響を与えないことが予測される。したがって、本発明は、自動ｐＨ形態の培養培地をなおも提供する上に、培地の成分間の有害な相互作用、特にガス発生を防ぐような培養培地を提供する。ガス発生を最小限にする、または防ぐように培地の成分が調整されている、自動的にｐＨを調製するそのような培養培地のある例の調製については、実施例１７においてより詳細が説明される。

【００５７】

したがって、本明細書において提供される説明から当業者には認識されるように、本発明は、溶媒による培地の再構成の際に、使用前に培地に補助的栄養成分を全く加える必要な

く、インビトロにおける細胞の培養を支持する、乾燥粉末完全培養培地の処方をも提供する。ゆえに、本発明の本局面に従った培地は、好ましくは、付加的な栄養成分を、溶媒中に含む必要がないように、または、再構成の際および使用前に、培地に加える必要がないように、インビトロにおける細胞の培養に必要な栄養成分を含むものである。したがって、本発明のそのような完全培地は、水による、または緩衝塩溶液のような栄養素を含まない代替溶媒による再構成の際に、インビトロの細胞の培養における使用に適したものとなる。本発明に従い、そのような完全培地は自動的にｐＨを調整する培地であり、１つもしくは複数の培養培地補足物（血清を含むが限定はしない）、１つもしくは複数のアミノ酸（Ｌ－グルタミンを含むが限定はしない）、インスリン、トランスフェリン、１つもしくは複数のホルモン、１つもしくは複数の脂質、１つもしくは複数の成長因子、１つもしくは複数のサイトカイン、１つもしくは複数の神経伝達物質、１つもしくは複数の動物組織、器官もしくは腺の抽出物、１つもしくは複数の酵素、１つもしくは複数のタンパク質、１つもしくは複数の微量元素、１つもしくは複数の細胞外マトリックス成分、１つもしくは複数の抗生物質、１つもしくは複数のウイルス阻害剤、および／または、１つもしくは複数の緩衝液のような、１つもしくは複数の成分を含み得る。

【００５８】

本方法によって粉末として調製することができる、または本発明の培養培地に含むことができる、培地補足物の例には、限定はしないが、（ウシ血清（例えばウシ胎児血清、新生仔ウシ血清および仔ウシ血清）、ヒト血清、ウマ血清、ブタ血清、サル血清、類人猿血清、ラット血清、マウス血清、ウサギ血清、ヒツジ血清および同様のもののような）動物血清、ＬｉｐｏＭＡＸ（登録商標）、ＯｐｔｉＭＡｂ（登録商標）、Ｋｎｏｃｋ－Ｏｕｔ（商標）ＳＲ（各々Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄから入手可能）のような定義付けられた代用品、ホルモン（コルチコステロイド、エストロゲン、アンドロゲン（例えばテストステロン）のようなステロイドホルモン、およびインスリンのようなペプチドホルモンを含む）、サイトカイン（成長因子（例えばＥＧＦ、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２、ＮＧＦおよび同様のもの）、インターロイキン、コロニー刺激因子、インターフェロンおよび同様のものを含む）、神経伝達物質、脂質（リン脂質、スフィンゴ脂質、脂肪酸、コレステロールおよび同様のものを含む）、接着因子（フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、コラーゲン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンおよび同様のもののような細胞外マトリックス成分を含む）、および（ウシ下垂体抽出物、ウシ脳抽出物、ニワトリ胚抽出物、ウシ胚抽出物、鶏肉抽出物、アキレス腱およびその抽出物のような）動物組織、器官または腺の抽出物および同様のものが含まれる。本方法によって生産することができる、または、本発明の培養培地に含むことができる他の培地補足物には、天然または組換えであり得る、（血清アルブミン、特にウシまたはヒトの血清アルブミン；免疫グロブリンおよびその断片または複合体；アプロチニン；ヘモグロビン；ヘミンまたはヘマチン；（トリプシン、コラーゲナーゼ、パンクレアチニンまたはディスパーゼのような）酵素；リポタンパク質；フェチュイン；フェリチン；等のような）様々なタンパク質；ビタミン；アミノ酸およびその変異体（Ｌ－グルタミンおよびシスチンを含むが限定はしない）；酵素補因子；多糖類；塩類またはイオン（モリブデン、バナジウム、コバルト、マンガン、セレンおよび同様のものの塩類またはイオンのような微量元素を含む）；および、当業者によく知られる、インビトロにおける細胞の培養において有用な、他の補足物および組成物が含まれる。これらの血清および他の培地補足物は、商品として（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭａｒｙｌａｎｄおよびＳｉｇｍａ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉから）入手可能である；または、上記に説明される血清および他の培地補足物は、それらの天然供給源から単離することができる、または、当業者には常用される当技術分野にて既知の方法（Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，Ｒ．Ｉ．，「動物細胞の培養（Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ）」，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ａｌａｎ

Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．，７４～７８（１９８３）、およびそこに引用される参照を参照のこと；同様に、Ｈａｒｌｏｗ，Ｅ．，およびＬａｎｅ，Ｄ．，「抗体：実験マニュアル（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）」，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１１６～１２０（１９８８）を参照のこと）によって、組換え技術により生産することができる。

【００５９】

最終処方においてμｇ／ｍｌ量、またはそれどころかμｇ／Ｌ量で存在する成分は、典型的には、均質性および／または安定性の問題によって標準粉末培地からは除かれており、代わりに、典型的には濃縮物として再構成１×培地に加えられ、それによって保存コストは増大し、完成した培養培地の生産が、より費用のかかる、かつ効率が悪いものになってしまう。したがって、本発明のある好ましい局面においては、成分の濃縮物を最初に作製し、その後、濃縮物と共に顆粒化される粉末培地分にそれをスプレーすることによって、そのような低レベルの成分を標準粉末培地に加えることができる（その全体を参照として本明細書に組み入れられる、１９９８年２月１３日に出願された、米国特許出願第０９／０２３，７９０号を参照のこと）。これはその後、ブレンドのためのバルクのものと同じ一般的なサイズ範囲における粒子サイズにまで（例えばフィッツミリングによって）粉砕される。成分を少量にてスプレー添加できるということは、微量元素、ビタミン、ウイルス阻害剤、成長因子、サイトカインおよび同様のものを含む培地の開発においては、特に有益であり得る。中でも特に粉末培地に加えられる成分は、限定はしないが、カルシウム、コリンクロリド、葉酸、イノシトール、リポ酸、リボフラビン、チアミン塩酸塩、亜セレン酸ナトリウムおよびビタミンＡ、$Ｂ_{1}$、$Ｂ_{2}$、$Ｂ_{3}$、$Ｂ_{6}$、$Ｂ_{12}$、Ｃ、Ｄ、Ｅ、ＫおよびＨ（ビオチン）を含む。本発明の培養培地に低量にて加えられる付加的な成分には、例えば、成長因子（例えばＥＧＦ、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦ、ＫＧＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２、ＮＧＦ、インスリンおよび同様のもの）、インターロイキン、コロニー刺激因子、インターフェロン、接着因子、細胞外マトリックス成分（例えば、コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチンおよび同様のもの）、（リン脂質、コレステロール、ウシコレステロール濃縮物、脂肪酸、スフィンゴ脂質および同様のもののような）脂質；動物組織、腺または器官の抽出物；ジェネティシン（登録商標）、カルベニシリン、セフォタキシム、抗ＰＰＬＯ、ファンギゾン（登録商標）、ハイグロマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ナイスタチン、ペニシリン、またはストレプトマイシン等のような抗生物質；およびウイルス阻害剤（例えば、当技術分野においてよく知られる、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレオシド類似体、および同様のもの）が含まれ得る。

【００６０】

本発明に従って調製することができる、および／または、本発明の培養培地に含むことができる緩衝液の例には、限定はしないが、リン酸緩衝溶液（ＰＢＳ）処方、トリス緩衝塩溶液（ＴＢＳ）処方、ＨＥＰＥＳ緩衝塩溶液（ＨＢＳ）処方、Ｈａｎｋｓ均衡塩溶液（ＨＢＳＳ）、ダルベッコのＰＢＳ（ＤＰＢＳ）、Ｅａｒｌｅ’ｓ均衡塩溶液、Ｐｕｃｋ’ｓ塩溶液、ＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ植物基礎塩溶液、Ｋｅｌｌｅｒ’ｓ海洋植物基礎塩溶液、Ｐｒｏｖａｓｏｌｉ’ｓ海洋植物基礎塩溶液、ＫａｏおよびＭｉｃｈａｙｌｕｋ’ｓ 基礎塩溶液ならびに同様のもののような緩衝塩溶液が含まれる。商品として得られるこれらの緩衝液についての処方、および、多くの他の一般に使用される緩衝液についての処方は、当技術分野においてはよく知られており、例えばＧＩＢＣＯ／ＢＲＬカタログおよび参照ガイド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、ＤＩＦＣＯマニュアル（ＤＩＦＣＯ；Ｎｏｒｗｏｏｄ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）、およびシグマ（Ｓｉｇｍａ）動物および植物の細胞培養のための細胞培養カタログ（Ｓｉｇｍａ；Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，Ｍｉｓｓｏｕｒｉ）において見出すことができる。

【００６１】
粉末培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の調製
本発明の方法は、上記に説明される粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の調製を提供する。これらの粉末培地、補足物、部分群および緩衝液は、好ましくは、転動造粒を介した、および／または、スプレー乾燥を介した、流動層技術（即ち「凝集」）を用いて調製される。
【００６２】
本発明のある局面においては、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の溶液を凝集させることによりそれらの乾燥粉末形態を生産するために、流動層技術を用いて調製される。流動層技術は、開始材料から変化させられた特性（特に、例えば可溶性）を有する凝集粉末を生産する工程である。本技術の一般的な適用においては、粉末は上方移動空気カラムにおいて浮遊され、同時に、調節された、および、定義付けられた量の液体が粉末流に注入され、湿った状態の粉末が作製される；その後、材料を乾燥させるために穏やかな熱を使用し、凝集粉末が作製される。
【００６３】
流動層技術によって微粒子材料を生産する、および／または加工するための装置は、商品として（例えば、Ｎｉｒｏ，　Ｉｎｃ．／Ａｅｒｏｍａｔｉｃ－Ｆｉｅｌｄｅｒ；　Ｃｏｌｕｍｂｉａ，　Ｍａｒｙｌａｎｄから）入手可能であり、例えば、特許および特許出願の全ての開示がその全体を参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第３，７７１，２３７号；同第４，８８５，８４８号；同第５，１３３，１３７号；同第５，３５７，６８８号および同第５，３９２，５３１号において；および国際公開公報第９５／１３８６７号において説明されている。そのような装置は、乳漿（米国特許第５，００６，２０４号）、酸味を加えた肉エマルジョン（米国特許第４，５１１，５９２号）、プロテアーゼ（米国特許第４，６８９，２９７号）および他のタンパク質（ＤＫ１６７０９０Ｂ１）、および炭酸水素ナトリウム（米国特許第５，３２５，６０６号）を含む、様々な材料からなる凝集粉末を調製するために使用されてきた。
【００６４】
本発明の本局面に従い、バルク凝集栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を調製するために、流動層技術を使用することができる。本発明の本局面の実施においては、乾燥粉末栄養培地、培地補足物、または緩衝液は、流動層装置に入れられ、そこで凝集される。粉末栄養培地（特に粉末細胞培養培地）、粉末培地補足物（特に粉末動物血清）および粉末緩衝液（特に粉末緩衝塩溶液）は、商業的な供給元（例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，　Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，　Ｍａｒｙｌａｎｄ）から、事前に作製されたものを得られる。または、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液は、上記に説明される処方に従って個々の成分もしくは一連の成分を混合することによって作製することができる。そのような処方は、血清、Ｌ－グルタミン、シスチン、インスリン、トランスフェリン、脂質（特にリン脂質、スフィンゴ脂質、脂肪酸およびコレステロール）、サイトカイン（特に成長因子、インターロイキン、コロニー刺激因子およびインターフェロン）、神経伝達物質および緩衝液（特に炭酸水素ナトリウム）のような、それらの不安定性によって、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方中には典型的には存在しないような成分を含み得る。Ｌ－グルタミンが処方に加えられる場合、カルシウムまたはマグネシウムのような二価カチオンとの錯体形態にあることが可能である（米国特許第５，４７４，９３１号を参照のこと）。その他の実施例においては、２つまたはそれ以上の粉末成分を混合し、その後、凝集し、複合培地、複合培地補足物、複合培地部分群または複合緩衝液を生産することができる。例えば、粉末栄養培地は、約０．１％、０．２％、０．５％、１％、２％、２．５％、５％、７．５％、１０％、１５％、２０％、２５％、５０％またはそれ以上の血清濃度（粉末培地の重量パーセント（ｗ／ｗ）として）にて、ＦＢＳのような粉末血清（例えば、下記にて説明されるようにスプレー乾燥によって生産され

る）と混合することができる；その結果生じる粉末培地－血清混合物をその後凝集させ、再構成溶媒において容易に溶解するため、さらなる補助をせずに使用する用意ができているような、凝集培地－血清複合体を作製することができる。

【００６５】

粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液（またはその混合物）は、流動層装置に一旦入れられると、好ましくは大気または窒素のような不活性ガスであるガスを含む上方移動カラム中において浮遊され、１つもしくは複数の粒子フィルターを通過させられる。ほとんどの乾燥粉末非凝集栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は比較的小さな粒子サイズであるため、本発明において使用されるフィルターは、例えば約１～１００メッシュ、好ましくは約２～５０メッシュ、より好ましくは約２．５～３５メッシュ、なおもより好ましくは約３～２０メッシュまたは約３．５～１５メッシュ、および最も好ましくは約４～６メッシュのフィルターのような、空気を流すが粉末は保持するメッシュスクリーンであるべきである。

【００６６】

乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液（またはその混合物）は、流動層チェンバー内に入れられた後に、定義付けられた、および調節された量の溶媒の、好ましくは流動層装置上のスプレーノズルを用いた粉末への注入によって凝集され、湿気を含む粉末が作製される。本発明において使用するための好ましい溶媒は、栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の処方と適合性である任意の溶媒である。「適合性である」によっては、栄養培地の栄養成分の分解または集塊のような、栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の物理的特性または性能特性における不可逆的な有害変化、または、緩衝液のイオン特性における変化を、その溶媒が誘導しないことが意味される。本発明において使用するために特に好ましい溶媒は、そのいずれもが１つもしくは複数の付加的な成分（例えば塩類、多糖類、イオン、界面活性剤、安定剤等）を含み得る、水（とりわけ蒸留水および／または脱イオン水）、血清（特にウシ血清またはヒト血清およびとりわけウシ胎児血清または仔ウシ血清）、有機溶媒（特にジメチルスルホキシド、アセトン、エタノールおよび同様のもの）である。

【００６７】

上記にて言及されるように、本発明のある局面においては、最終生産物中に存在する成分が低濃度であることにより、ボールミリングのような他の方法では生産物に最適に組み入れることができない、１つもしくは複数の原料を、溶媒中に含むことが望ましい、または好都合である可能性がある。そのようなある局面においては、そのような低濃度の成分は、本発明の粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の凝集における溶媒の使用以前に、望ましい濃度にて溶媒に溶解することができる、懸濁することができる、コロイド化することができる、またはさもなくば、導入することができる。本発明の本局面に従って溶媒に好都合に組み入れることができる成分には、限定はしないが、１つもしくは複数の上記に説明される血清、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、脂質、接着因子、タンパク質、アミノ酸、ビタミン、酵素補因子、多糖類、塩類、イオン、緩衝液および同様のものが含まれる。

【００６８】

溶媒は、凝集される粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の質量に依存する容量にて乾燥粉末に導入されるべきである。栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液５００ ｇ当たりの、溶媒の好ましい容量は、約５～１００ ｍｌ、より好ましくは約１０～５０ ｍｌ、なおもより好ましくは約２５～５０ ｍｌ、および最も好ましくは約３５ ｍｌである。栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液５００ ｇ当たりの好ましい溶媒導入速度は、約１～１０ ｍｌ／分、好ましくは約２～８ ｍｌ／分、より好ましくは約４～８ ｍｌ／分、および最も好ましくは約６ ｍｌ／分の速度である。ある状況においては、凝集中に粉末が固まることを防ぐように、約１分間溶媒を加えた後、約１分間は溶媒を加えないというサイクルを繰り返す（装置のチェンバー内にて粉末を乾燥させる）ことが望ましい可能性がある。

【００６９】
元の非凝集粉末のものより大きな粒子サイズによって、および、凝集粉末中に微細な粉塵粒子が存在しないことによって実証されるように、粉末の凝集が一旦完了すると、粉末は装置中において完全に乾燥される。凝集粉末の乾燥のために好ましい装置の温度は、約５０～８０℃、より好ましくは約５５～７５℃、および最も好ましくは約６０～６５℃である；粉末は好ましくは、装置中において、粉末５００ ｇ当たり約３～１０分間、および最も好ましくは約５～７分間乾燥させられる。
【００７０】
代替の局面においては、本発明の粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、上記にて説明されるものに類似する凝集産物を生産する転動造粒によって調製することができる。そのような工程においては、乾燥粉末培地、培地補足物、培地部分群および／または緩衝液、またはその組み合わせは、ゲムコ社（Ｇｅｍｃｏ，Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ，ＮＪ）およびパターソンケリー社（Ｐａｔｔｅｒｓｏｎ Ｋｅｌｌｅｙ，Ｅａｓｔ Ｓｔｒｏｕｄｓｂｕｒｇ，ＰＡ）から商品として入手可能なもののような、転動造粒装置または回転ブレンダーに導入される。溶媒（例えば、水、緩衝塩溶液、または、本明細書において説明される、もしくは当業者によく知られる他の望ましい溶媒）をその後、転動造粒装置において、製造業者の使用説明書に従った調節条件下にて粉末に導入し、バッチをその後、製造業者の使用説明書に従って乾燥させ、凝集粉末について本明細書にて説明されるように、後に使用することができる顆粒化粉末（即ち、溶媒を含む粉末の顆粒）を形成させる。
【００７１】
本発明のその他の局面においては、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を、スプレー乾燥によって調製することができる。本発明の本局面においては、液体形態にある栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を、スプレー乾燥装置に入れる；これらの液体はその後、粉末が形成されるまで、調節された温度および湿度のような、粉末を生産するために適切な条件下において、溶液を装置中のチェンバーにスプレーすることによって、その対応する粉末に変換される。ある状況においては、上記に説明される培地、培地補足物、培地部分群および／または緩衝液の２つまたはそれ以上の複合混合物をスプレー乾燥するのが望ましい、または好都合である可能性がある。例えば、動物血清を望ましい濃度で含む液体栄養培地、または栄養培地成分を望ましい濃度で含む液体動物血清は、本発明の方法に従って混合し、その後、スプレー乾燥粉末として調製することができる。
【００７２】
典型的なスプレー乾燥アプローチにおいては、液体栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、装置に吸引され、回転型またはノズル型の噴霧器を用いてスプレー状に噴霧される。その結果生じる噴霧液体スプレーをその後、ガス（例えば窒素、またはより好ましくは空気）と混合し、粉末産物の生産を促進するために十分な条件下において乾燥チェンバーにスプレーする。本発明の好ましい局面においては、これらの条件は、産物の最終的な乾燥が促進されるような、チェンバー内の温度および湿度の電子的調節を含み得る。これらの条件下においては、液体中の溶媒は、調節された仕方で蒸発し、それにより、本発明の栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の自由流動粒子（即ち粉末）が形成される。粉末はその後、乾燥チェンバーから排出され、（流動層の調製について上記に説明されるメッシュスクリーンのような）１つもしくは複数のフィルターを通過させられ、さらなる処理（例えば、包装、滅菌等）のために収集される。ある適用においては、特に熱感受性処方の栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液から粉末を生産する場合、スプレー乾燥装置は、乾燥チェンバー内に組み込まれた流動層装置と組み合わせることができ、それにより、スプレー乾燥粉末に、上記にて説明されるもののような凝集溶媒が導入され、凝集スプレー乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液が生産される。
【００７３】

スプレー乾燥（組み込まれた流動層技術を含む、または含まない）によって液体材料から微粒子材料を生産するための装置は、商品として（例えばＮｉｒｏ，　Ｉｎｃ．／Ａｅｒｏｍａｔｉｃ－Ｆｉｅｌｄｅｒ；　Ｃｏｌｕｍｂｉａ，　Ｍａｒｙｌａｎｄから）入手可能である、および、例えば、その開示の全体が参照として本明細書に組み入れられる、ニロ社（Ｎｉｒｏ，　Ｉｎｃ．／Ａｅｒｏｍａｔｉｃ－Ｆｉｅｌｄｅｒ）の、「スプレー乾燥（Ｓｐｒａｙ－Ｄｒｙｉｎｇ）」「スプレー乾燥による粉末薬剤（Ｐｏｗｄｅｒｅｄ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ　ｂｙ　Ｓｐｒａｙ　Ｄｒｙｉｎｇ）」および「乾燥における新たな選択（Ｆｒｅｓｈ　Ｏｐｔｉｏｎｓ　ｉｎ　Ｄｒｙｉｎｇ）」技術パンフレットにおいて説明されている。この製造業者に従い、そのような装置は、乳製品、鎮痛薬、抗生物質、ワクチン、ビタミン、イースト、植物性タンパク質、卵、化学薬品、食品香味料および同様のものを含む、様々な材料からなる粉末を調製するために用いられてきた。本発明においては、スプレー乾燥は、血清、特に上記にて説明される血清、とりわけヒト血清および（ウシ胎児血清および仔ウシ血清のような）ウシ血清のような、粉末培地補足物の調製のために特に有用であることが見出された。

【００７４】

本発明の本局面の実施においては、液体栄養培地、培地補足物、培地部分群、緩衝液またはｐＨ調整物質を、およそ２５ｇ～１００ｇ／分のスプレー速度にて、好ましくはおよそ３０ｇ～９０ｇ／分、３５ｇ～８５ｇ／分、４０ｇ～８０ｇ／分、４５ｇ～７５ｇ／分、５０ｇ～７５ｇ／分、５５ｇ～７０ｇ／分、または６０ｇ～６５ｇ／分のスプレー速度にて、およびより好ましくはおよそ６５　ｇ／分のスプレー速度にて、噴霧器を通してチェンバーにスプレーすべきである。噴霧器における入口空気温度は、好ましくは約１００℃～３００℃、より好ましくは約１５０℃～２５０℃、および最も好ましくは約２００℃に設定され、出口温度は約５０℃～１００℃、より好ましくは約６０℃～８０℃、および最も好ましくは約７０℃に設定される。噴霧器における空気の流動は、好ましくは、ノズル圧約１～５　バール、より好ましくは約２～３バール、および最も好ましくは約２．０バールにおいて、約５０～１００　ｋｇ／時間、より好ましくは約７５～９０　ｋｇ／時間、および最も好ましくは約８０．０　ｋｇ／時間に設定される。これらの条件および設定は、本発明において、様々な栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液粉末のスプレー乾燥による生産、特に上記に説明される粉末血清の生産に好ましいことが見出された。乾燥に引き続き、スプレー乾燥された粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、１つもしくは複数のフィルター、好ましくは流動層技術について上記に説明されるようなものを通して、乾燥チェンバーにおいて収集することができる。

【００７５】

本調製に従い、上記に説明される流動層法またはスプレー乾燥法によって調製される本発明の粉末は、開始粉末から、または対応する液体を凍結乾燥することにより調製された粉末培地、補足物、部分群および緩衝液から、物理的特性を変化させられている。例えば、非処理の粉末、または凍結乾燥粉末はしばしば、用いられる場合に著しい粉塵を生み出し、様々な溶媒に不十分にまたはゆっくりと溶解する一方、凝集粉末またはスプレー乾燥粉末は、実質的に粉塵フリーであり、および／または、迅速に溶解する。典型的に、本発明の粉末培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、ボールミリングのような標準技術によって調製されたそれらの粉末同等物よりも、少ない粉塵形成かつより迅速な溶解の双方を示す。実質的に粉塵フリーであるが増強された溶解は示し得ないようなある粉末においては、機械的羽根車を使用するような粉末の迅速な機械的溶媒和によって、または、スプレー溶媒和によるように、最初に溶媒ミストを粉末上に与えることによって、その粉末を迅速に溶解することができる。

【００７６】

本発明のその他の局面においては、上記に説明されるスプレー乾燥および凝集アプローチは、凝集スプレー乾燥栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の粉末を生産するために組み合わせることができる。本局面においては、スプレー乾燥により調製された粉末培地、補足物、部分群または緩衝液は、結果的に生じる培地、補足物、部分群または緩

衝液の性能特性および物理的特性をさらに改善するために、スプレー乾燥された後に、（上記にて説明されるもののような）溶媒を用いて凝集されることが可能である。例えば、動物血清粉末は、上記に説明されるように液体動物血清をスプレー乾燥することによって調製することができ、このスプレー乾燥血清粉末はその後、乾燥粉末栄養培地（スプレー乾燥によって、またはボールミリングのような標準技術によって調製される）に混合することができる；この混合粉末はその後、上記にて説明されるように凝集することができる。または、スプレー乾燥栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液の粉末は、粉末の溶解特性を改善するために、上記のように凝集することができる。このアプローチは、液体動物血清のような、低量の（約１～１０％）固体含有物を含む液体をスプレー乾燥する場合に特に好都合となり得る。当業者には理解されるように、これらのアプローチは、上記に説明される凝集の便益を同様に得られる上に、粉末培地、補足物、部分群または緩衝液に望ましい濃度にて添加するためのストックとして使用される１つもしくは複数の成分（例えば血清または他の培地補足物）の大バッチでの調製を容易にするものである。その上、このアプローチは、ある培地補足物（特に動物血清）については問題となり得る、ロット間の変動性を減少させることができる。

【００７７】

本明細書において説明されるように調製される粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、その後、下記にて説明されるような滅菌以前または以後に、例えばバイアル、チューブ、瓶、袋、パウチ、箱、紙箱、ドラム缶および同様のもののような容器に包装することができる。本発明のそのようなある局面においては、粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、排出される際に密封される（袋またはパウチのような）フレキシブルコンテナに粉末が包装される、当技術分野においては「ブリックパック」として知られるもののような、圧密真空包装形態に包装することができる。そのような包装は、粉末の迅速な溶解を容易にするために、溶媒（例えば水、血清、培地または他の水性もしくは有機の溶媒もしくは溶液）の包装への直接的な導入をさせる、１つもしくは複数の（バルブ、ルアーロック口等のような）注入口を好都合に含み得る。関連局面においては、包装は、その１つもしくは複数の一方が、本発明の乾燥粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の１つまたは複数を含有し得る、および、その１つもしくは複数の他方が、滅菌状態であり得る水性溶媒または有機溶媒の１つまたは複数を含有し得るような、２つまたはそれ以上の近接小室を含み得る。本局面においては、粉末が溶解して滅菌栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液が望ましい濃度にて作製されるよう、粉末と溶媒を混合させるために、その後、理想的には滅菌状態を損なうことなく、小室間の障壁を単に除去するまたは壊すことによって、乾燥粉末を溶解することができる。

【００７８】

本発明の包装された培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、好ましくは、上記に言及される温度において長期間保存される、典型的には、およそ３０℃未満の温度で、より好ましくはおよそ２０℃～２５℃未満の温度で、約１ヶ月～２４ヶ月間、使用時まで保存される。従来的な粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液とは異なり、本方法によって調製される培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の性能特性の維持のためには、より低い温度（例えば０℃～４℃）における保存の必要はない。当然のことながら、包装が、１つもしくは複数の溶媒を含有する別個の小室をも含むような本発明の局面については、他の保存温度が必要とされる可能性がある；これらの場合においては、最適な保存条件は、当業者には知られるような、溶媒の保存の必要条件によって決定される。

【００７９】

滅菌および包装

本発明はまた、本発明の栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を滅菌するための方法、および、ボールミリングまたは凍結乾燥のような標準法により調製される粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を滅菌するための方法をも提供する。栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は通常、大量の溶液にて調製され、熱不安定な成分を頻繁に含むため、照射または熱によって滅菌することができない。したがって、

栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は一般に、そのような培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を製造するために必要とされる費用および時間を著しく増大させる、ろ過滅菌のような混入異物除去法によって滅菌される。

【００８０】

しかし、本発明の方法に従って（例えば液体培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液のスプレー乾燥により、または、粉末培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液の凝集により）調製される、または、（粉末成分の）ボールミリングもしくは（液体形態の培地、補足物、部分群もしくは緩衝液の）凍結乾燥のような標準法によって調製される、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、より費用のかからない、およびより効率のよい方法によって滅菌することができる。例えば、（上記にて説明されるように、培地、補足物、部分群または緩衝液の、液体形態をスプレー乾燥もしくは凍結乾燥することによって、または粉末形態を凝集することによって調製される）粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、これらの粉末の滅菌に好都合な条件下において照射することができる。好ましくは、この照射はバルクにおいて（即ち、栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の包装後に）達成される、および最も好ましくは、この照射は、粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液中に在留する可能性のある細菌、真菌、胞子またはウイルスが不活性化されるような（即ち、複製を妨げられるような）条件下における、本発明のバルク包装された培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の、γ線源への曝露によって達成される。または、包装以前に、粉末培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を、γ線源または紫外光源に曝露することによって、照射を達成することができる。または、本発明の培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、（栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の部分群が熱安定性である場合）、例えば閃光低温殺菌法または加圧滅菌によるような熱処理によって滅菌することができる。当業者には理解されるように、滅菌に必要とされる照射または熱の線量、および曝露する時間は、滅菌される材料のバルクに依存し、本明細書において説明されるもののような、当技術分野にて既知の技術を用いて、不適当な実験をせずに、当業者によって容易に決定されることが可能である。

【００８１】

本発明の特に好ましい局面においては、バルク粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、総線量およそ１０～１００ キログレイ（ｋＧｙ）、好ましくは総線量およそ１５～７５ ｋＧｙ、１５～５０ ｋＧｙ、１５～４０ ｋＧｙまたは２０～４０ ｋＧｙ、より好ましくは総線量およそ２０～３０ ｋＧｙ、および最も好ましくは総線量およそ２５ ｋＧｙで、約１時間～約７日間、より好ましくは約１時間～約５日間、１時間～約３日間、約１～２４時間または約１～５時間、および最も好ましくは約１～３時間、γ照射源に曝露される（「通常の線量率」）。または、本発明のバルク粉末は、総線量およそ２５～１００ ｋＧｙを約１～５日間に渡って照射する、「低線量率」にて滅菌することができる。照射中、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、好ましくは、およそ－７０℃～およそ室温（約２０～２５℃）、最も好ましくはおよそ－７０℃の温度にて保存される。当然のことながら、照射される材料のバルクおよび／または質量によって照射線量および曝露時間を調整できることは、当業者には理解される；照射または熱処理によるバルク粉末材料の滅菌に必要とされる典型的な最適照射線量、曝露時間および保存温度は、当技術分野においてはよく知られている。

【００８２】

滅菌に続き、例えばその培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を滅菌チューブ、バイアル、瓶、袋、パウチ、箱、紙箱、ドラム缶および同様のもののような容器に包装することによって、または、上記にて説明される真空包装もしくは統合された粉末／溶媒包装において包装することによって、未包装の栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を、無菌条件下にて包装することができる。滅菌包装された培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液はその後、上記に説明されるように長期間保存することができる。

【００８３】

栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の使用
したがって、本発明は、再水和溶媒中にて容易に溶解できる、および実質的に粉塵フリーである、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液を提供する。使用のためには、溶媒和された培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の特定の使用について必要とされる、望ましい栄養素、電解質、イオンおよびｐＨの条件を作り出すのに十分なある量の溶媒中において、凝集またはスプレー乾燥された培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を、水和（または「再構成」）させることができる。凍結乾燥またはボールミルされた栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液とは異なり、本培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、迅速に溶液中に入り、粉塵または不溶性の材料を、生み出したとしてもほとんど生み出さないため、本発明においては、この再構成は特に容易なものになっている。

【００８４】
本発明の粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の再構成において使用するための好ましい溶媒は、限定はしないが、そのいずれもが１つもしくは複数の付加的な成分（例えば、塩類、多糖類、イオン、界面活性剤、安定剤等）を含み得る、水（とりわけ蒸留水および／または脱イオン水）、血清（特にウシ血清またはヒト血清、および、とりわけウシ胎児血清または仔ウシ血清）、有機溶媒（特にジメチルスホキシド、アセトン、エタノールおよび同様のもの）、またはその任意の組み合わせを含む。例えば、（動物血清のような）粉末培地補足物および緩衝液は、好ましくは、ストック溶液の調製のために、または保存のために、水において、１×最終濃度に、または選択的に、より高い濃度（例えば、２×、２．５×、５×、１０×、２０×、２５×、５０×、１００×、５００×、１０００×等）に再構成される。または、粉末培養培地は、例えば水に対する容量パーセント（ｖ／ｖ）で０．５％、１％、２％、２．５％、５％、７．５％、１０％、１５％、２０％、２５％、５０％、またはそれ以上の濃度で培地補足物が存在する溶液のような、培地補足物（例えばＦＢＳのような血清）水溶液中において再構成することができる。

【００８５】
再水和に続き、再構成された培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、好ましくはろ過滅菌、または、当技術分野においてよく知られた他の滅菌法により、代替の仕方で滅菌することができるが、好ましくは、粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の再構成は、再構成された培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の滅菌状態を維持するために、無菌条件下にて達成される。それらの再構成に続き、培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、約１０℃未満の温度にて、好ましくは約０～４℃の温度にて使用時まで保存されるべきである。

【００８６】
再構成栄養培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液は、当業者によく知られる標準細胞培養技術に従って細胞を培養するために使用することができる。そのような技術においては、細胞の培養に好都合な（調節された温度、湿度、照明および大気条件のような）条件下において、本発明の再構成培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液と、培養される細胞を接触させる。そのような方法による培養を行うことが特に可能な細胞は、限定はしないが、細菌細胞、酵母細胞、植物細胞および動物細胞を含む。そのような細菌細胞、酵母細胞、植物細胞および動物細胞は、例えばアメリカンタイプカルチャーコレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）、インビトロゲン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）および当技術分野における当業者にはよく知られるその他のような、既知の培養保存機関から、商品として入手可能である。これらの方法による培養のために好ましい動物細胞には、限定はしないが、そのいずれも体細胞、生殖細胞、正常な細胞、病気の細胞、形質転換細胞、突然変異細胞、幹細胞、前駆細胞または胚細胞であり得るような、および、そのいずれも足場依存性細胞または足場非依存性（即ち「懸濁」）細胞であり得るような、昆虫細胞（最も好ましくはショウジョウバエ細胞、夜蛾科由来の（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ）細胞およびＴｒｉｃｈｏｐｌｕｓａ細胞）、ネマトーダ細

胞（最も好ましくは線虫細胞）および哺乳動物細胞（限定はしないが、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＶＥＲＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＡＥ－１細胞、ＳＰ２／０細胞、Ｌ５．１細胞、ハイブリドーマ細胞、および最も好ましくは、２９３細胞、ＰＥＲ－Ｃ６細胞およびＨｅＬａ細胞のようなヒト細胞を含む）が含まれる。

【００８７】

細胞

その他の局面においては、本発明は、１つもしくは複数の細胞を含む乾燥細胞粉末組成物を生産するための方法、および、これらの方法によって生産される乾燥細胞粉末に関連する。したがって、これらの方法では、細胞が保存される、および、使用時まで長期間保存されることが可能な、細胞を含む組成物が生産される。このようにして、本発明の方法は、凍結保存設備の必要性、および、細胞にとって毒性となり得る、ある凍結保存剤の使用のような、細胞の保存の従来的な方法（例えば凍結）の欠点の幾つかを克服する。

【００８８】

本発明の本局面に従った方法は、１つもしくは複数の段階を含み得る。例えば、そのような方法の１つは、乾燥させる１つもしくは複数の細胞を得る段階、１つもしくは複数の細胞を水溶液中にて懸濁することによって、水性細胞懸濁液を形成する段階、および、乾燥粉末の生産に好都合な条件下にて細胞懸濁液をスプレー乾燥する段階を含み得る。これらの方法は、１つもしくは複数の細胞を、１つもしくは複数の安定化化合物または保存化合物（例えば、限定はしないが、トレハロースを含む多糖類）と接触させる段階をさらに含み得る。細胞懸濁液を形成するために使用される水溶液は、好ましくは、１つもしくは複数の上記に説明される栄養培地、培地補足物、培地部分群、塩類または緩衝液のような、１つもしくは複数の成分、および特に、１つもしくは複数の、自動的にｐＨを調整する本発明の培養培地、培地部分群、培地補足物または緩衝液を含む。好ましくは、細胞懸濁液を形成するために使用される水溶液は、乾燥される細胞タイプについて最適または実質的に最適な、張度および重量オスモル濃度に調整される。水溶液は、選択的に、１つもしくは複数の多糖類、イオン、界面活性剤、安定化化合物または保存化合物（トレハロースを含む）および同様のもののような、１つもしくは複数の付加的な成分を含み得る。１つもしくは複数の細胞が１つもしくは複数の安定化化合物または保存化合物と接触させられる、本発明の局面においては、安定化化合物または保存化合物は、水性細胞懸濁液を形成するために使用される水溶液に組み入れることができる。または、安定化化合物もしくは保存化合物は、粉末の形成後、乾燥細胞粉末上にスプレーする、もしくは凝集することができる。

【００８９】

上記に説明される方法によって乾燥細胞粉末が一旦形成されれば、粉末は選択的に、乾燥粉末の凝集について上記に説明される方法に従い、溶媒によって凝集することができる。限定はしないが、水、栄養培地溶液、栄養培地補足物溶液（血清、特にウシ血清（とりわけウシ胎児血清および仔ウシ血清）およびヒト血清を含む）、緩衝溶液、塩溶液、およびその組み合わせを含む、乾燥される細胞タイプと適合性である任意の溶媒を、乾燥細胞粉末を凝集させるために使用することが可能である。

【００９０】

本発明の方法に従って、原核細胞（例えば細菌細胞）および真核細胞（例えば真菌（特に酵母） 細胞、動物（特に、ヒトを含む哺乳動物）細胞および植物細胞）、特に上記に説明されるような細胞、組織、器官、器官系、および生物体を含む、様々な細胞を乾燥することができる。乾燥細胞が一旦作製されれば、それらを無菌的に包装し、好ましくは約０～３０℃、４～２５℃、１０～２５℃、または２０～２５℃（即ち「室温」）の温度において、使用時まで長期間（例えば数ヶ月～数年間）保存することができる。生存能のある細胞の培養の調製において使用するために、乾燥細胞粉末は、水性溶媒（例えば滅菌水、緩衝溶液、培地補足物、培養培地、またはその組み合わせ）を用いて、１つもしくは複数の生存能のある細胞を含む細胞懸濁液に、無菌的に再構成することができ、標準的な、当技術分野において既知のプロトコールに従って培養することができる。または、乾燥細胞

粉末は、例えばある動物個体の免疫化に使用されるある免疫原の調製のためのように、細胞生存能が不可欠ではないような細胞懸濁液に再構成することができる。そのような場合は、乾燥細胞粉末は、１つもしくは複数の界面活性剤、アジュバント等を含み得る水性溶媒または有機溶媒のような、標準の免疫化プロトコールと適合性の任意の溶媒を用いて再構成することができる。

【００９１】

本発明はまた、そのような方法によって調製される組成物をも提供する。そのような組成物は、例えば、自動的にｐＨを調整する本発明の培養培地粉末、および、１つもしくは複数の細菌細胞、１つもしくは複数の植物細胞、１つもしくは複数の酵母細胞、および１つもしくは複数の動物細胞（限定はしないが、１つもしくは複数のヒト細胞のような、１つもしくは複数の哺乳動物細胞を含む）のような、１つもしくは複数の細胞を含み得る。本発明の本局面に従った組成物は、溶媒を用いた再構成の際に、組成物中に含まれる１つもしくは複数の細胞の活性な培養が作製されるような、粉末形態にあることが可能である。

【００９２】

キット

本発明によって提供される、乾燥粉末培地、培地補足物、培地部分群、緩衝液、細胞および細胞を含む組成物は、理想的には、キットの調製に適したものである。そのようなキットは、バイアル、試験管、瓶、包装、パウチ、ドラム缶および同様のもののような、１つもしくは複数の容器を含み得る。容器の各々は、上記にて説明される本発明の栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液、またはその組み合わせの、１つまたは複数を含み得る。そのような栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液は、水和または脱水され得るが、典型的には、本発明の方法によって生産される脱水調製物となる。そのような調製物は、本発明に従って滅菌状態であり得る。

【００９３】

第一の容器は、例えば、本発明の栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液、または、上記に説明される本発明の栄養培地、培地補足物、培地部分群もしくは緩衝液のいずれかのような、その任意の成分もしくは部分群を含み得る。本キットの中の付加的な容器中に、付加的な栄養培地、緩衝液、抽出物、補足物、成分または部分群を含むことができる。本キットはまた、１つもしくは複数の付加的な容器に、上記に説明される細菌細胞、酵母細胞、植物細胞または動物細胞のような、１つもしくは複数の細胞をも含み得る。そのような細胞は、凍結乾燥、乾燥、凍結もしくはさもなければ保存することができる、または、本発明の方法に従ってスプレー乾燥することができる。その上、本発明のキットは、例えばＬ－グルタミン、選択的に、１つもしくは複数の二価カチオンと錯体化されたＬ－グルタミン（米国特許第５，４７４，９３１号を参照のこと）を含有する、１つもしくは複数の付加的な容器をさらに含み得る。本キットは、乾燥粉末栄養培地、培地補足物、培地部分群および／または緩衝液の再構成において使用される溶媒を含有する、１つもしくは複数の付加的な容器をさらに含み得る；そのような溶媒は、水性溶媒（緩衝溶液、塩溶液、栄養培地溶液、栄養培地補足物溶液（ウシ血清（特にウシ胎児血清または仔ウシ血清）またはヒト血清のような血清を含む）、またはその組み合わせを含む）または有機溶媒であることが可能である。不適合性成分の混合を避けるために、本発明の栄養培地、緩衝液、抽出物、補足物、成分または部分群との混合について適合性ではない他の原料を、１つもしくは複数の付加的な容器に含むことができる。

【００９４】

栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を作製するための所定のキットにおいて含まれる容器の数およびタイプは、調製される培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液のタイプによって異なり得る。典型的には、キットは、特定の培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を作製するために必要な成分または補足物を含有するそれぞれの容器を含むものである。しかし、異なる培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の処方を作製するために、異なる量の様々な成分、補足物、部分群、緩衝液、溶媒等を混合することによって、異なる培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液を調製できるように、付

加的な容器を本発明のキットに含むことができる。

【００９５】

利益

意外なことに、本発明は、栄養培地、培地補足物、培地部分群、緩衝液および細胞の、削減されたコストでの調製を提供する。コスト削減は、幾つかの要因によるものである。例えば、本発明の培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方は、１×処方に必要な大きな撹拌タンクが必要とされないため、はるかに小さな生産設備を用いて生産することができる。その上、本発明の培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方は、在庫品、保存コストおよび労働コストを削減する「丁度間に合う（ｊｕｓｔ ｉｎ ｔｉｍｅ）」生産技術を用いて、必要性に基づいて調製することができる。培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方の調製および輸送に必要とされる時間は、６～８週間から１日にまでも削減され得る。自動的にｐＨを調整する本発明の培地は、コストおよび時間の著しい節約をも提供し、および、従来的な乾燥粉末培地またはバルク液体培地を用いての標準法に従ったｐＨ調整工程の間に生じ得る、再構成培地に異物混入が導入される傾向を減少させる。本発明はまた、一般的に使用される他の技術に従って生産される複数のバッチについて行われる複数回の品質管理試験と比較して、ただ１回の品質管理試験のみを必要とするような、非常に大量の１×培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液（例えば１００，０００リットルまたはそれ以上）を調製するために使用できるような、栄養培地、培地補足物、培地部分群または緩衝液の成分の調製を行わせるものである。重要なのは、個々の成分がより安定であるため、本発明の培地、培地補足物、培地部分群および緩衝液の処方は、バッチ間においてより一貫性があることである。本発明の乾燥細胞粉末はまた、実験室にて典型的に入手可能なもの以外に特殊化した設備の必要はほとんどなく、細胞を低容量にて長期間保存することができるため、技術的におよび経済的に有利である。その上、本方法によって調製される細胞は、細胞にとっては毒性であり得る凍結保存剤に曝露されずに保存される。

【００９６】

関連技術分野における当業者には、本明細書において説明される方法および適用への他の適切な改変および適応は明瞭であり、本発明の範囲またはその任意の態様から逸脱することなく行うことができることは容易に明らかとなる。本発明については今や詳細に説明されており、それによって例証するためにのみ含まれ、本発明を限定することは意図されない、以下の実施例を参照することにより、本発明はより明らかに理解される。

【００９７】

実施例１：典型的な乾燥粉末培地（ＤＰＭ）の凝集

１．ベンチトップ実験用流動層装置（Ｓｔｅｒａ－１；Ｎｉｒｏ，Ｉｎｃ．／Ａｅｒｏｍａｔｉｃ－Ｆｉｅｌｄｅｒ；Ｃｏｌｕｍｂｉａ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）を用い：１００ｇ～５００ｇのＤＰＭをチェンバー内に入れる。装置に配置し、レバーを用いてユニットを密封する。

２．ＤＰＭを流動化（浮揚）させるために空気流動を開始させる。従来的なＤＰＭは比較的細かい粒子サイズのものであるため、４～６に設定することが必要となる。上部フィルターを通過する、微細なＤＰＭ粒子を捕捉するために、真空装置をオンにする。流動化された粉末が、下部のメッシュスクリーンおよび上部のフィルターに関してチェンバー内のおよそ中央にあることを確認する。

３．最初に圧縮空気ラインを差し込み、その後、水源に連結されたポンプを始動させることにより、注入装置（スプレーユニット）を始動させる。目標は１分間当たり～６ｍｌの水を許容する（ＲＰＭに基づき、与えられたいかなるポンプについても、流速を知らなければならない、および、管の直径を知らなければならない）ものである。ＤＰＭの固まりを防ぐため、交互に、水を～１分間加えた後～１分間停止し、チェンバー内にて乾燥を起こさせる。

４．作動中にフィルターがＤＰＭで被覆され、逆噴出によって粉末が移動させられなくなった場合、全てのフィルターがきれいに吹き払われるまで、２～３の設定にまでファン速

度を落とす。その後、作動ファンの速度を以前のレベルにまで上げる。
５．各５００ ｇのＤＰＭに～３５ ｍｌの水が加えられた時点で、凝集は完了する。この容量は、ＤＰＭの処方によって異なる。作動終了に向かって、比較的大きな凝集顆粒の下向きの流動が、チェンバー（底部）において認められるようになる。明らかにより大きな粒子が認められること、および微細な粉塵がないことによって、工程が完了したことが示される。
６．凝集ＤＰＭを５～７分間完全に乾燥させる。
７．作動終了時に、フィルターを４回吹き払う。
８．ユニットをオフにし、水管の接続を断ち、気密容器に凝集ＤＰＭを収集する。
【００９８】
これらのアプローチは、ある工程規模または生産規模の流動層装置を使用する場合には調整されるべきである。例えば、ＭＰ－１（Ｎｉｒｏ， Ｉｎｃ．／Ａｅｒｏｍａｔｉｃ－Ｆｉｅｌｄｅｒ；Ｃｏｌｕｍｂｉａ， Ｍａｒｙｌａｎｄ）装置を用いた場合、以下のプロトコールが十分な結果を生み出した：
１．ユニットを密封する（ガスケットを膨脹させる）。
２．予熱のためにファンを始動させる。
３．入口空気温度が設定点と等しくなった時点でファンを停止させる。
４．ガスケットを収縮させ、材料を充填し、ガスケットを膨脹させる。
第５～８段階は全て、１分間以内に達成されるべきである：
５．バッチを始動させる。
６．ファンを始動させ、フィルター掃除をオンにする。
７．ノズル噴霧空気圧％をアウトプットに設定する（真空についてノズルを確認する）。
８．液体供給ラインを連結する。
９．スクリーン上およびポンプ位置にてポンプを始動させる。
１０．バッチ時間を設定し直す。
１１．全ての液体を設定速度（２６ ｇ／分）にてスプレーする。２ ｋｇの粉末に対し～２５０ ｍｌの水を用いる。
１２．全ての液体が加えられた時点で、ポンプをポンプ位置およびスクリーン上にて停止させる。
１３．乾燥値にまで（例えば１００から６０にまで）空気流動を減少させる。
１４．産物が望ましい温度（～４０℃）に達した時点で、「初期設定」スクリーンに戻り、現在の「バッチ時間」より２～３分大きな値について「バッチ持続」と設定する。
１５．バッチを停止させる。
１６．ガスケットを収縮させる。
【００９９】
（ベンチ規模、工程規模、および生産規模の装置についての）典型的な機器設定：
乾燥温度：６０～６５℃
出口空気温度：～３３℃
噴出圧：５ バール
噴霧圧：１．５～２．０ バール
逆噴出ドウェル：スプレー後１、スプレー中２
ファン容量：作動開始時５、凝集が明らかとなった後は６
Ｍａｇｎａｈｅｌｉｃｓ：フィルター抵抗１５０～２５０、多孔調節板の抵抗～５０、空気容量：５０未満
【０１００】
実施例２：ＤＰＭの統合された部分としての炭酸水素ナトリウムの添加
上記にて言及されるように、粉末培地の保存の際に遭遇する、潜在的なガス発生および緩衝能についての困難な問題によって、炭酸水素ナトリウムは典型的には、ボールミリングまたは凍結乾燥による製造中にはＤＰＭに加えられない。したがって、この標準的な生産工程では、培地の再構成の際に、炭酸水素ナトリウムの添加、およびｐＨ調整を必要とす

る。しかし、本方法を用いると、製造中に、粉末培地に炭酸水素ナトリウム（または任意の緩衝塩）を直接加えることにより、これらの付加的な段階を除くことができる。

【０１０１】

炭酸水素ナトリウム（または任意の緩衝塩）をＤＰＭ中に含むには、２つの方法がある：（ａ）注入装置を介して含む、および、（ｂ）ＤＰＭの部分として含む。

【０１０２】

（ａ）注入装置

炭酸水素ナトリウムの可溶性、および、典型的な哺乳動物細胞培養培地に加えることを一般に必要とされる量によって、相当に大容量の液体（上記に言及される３５ ｍｌの水より著しく多い）を粉末に注入することが必要となる。これはなおも可能であり、実際、例えば血清についての場合のように、ＤＰＭに加えるために比較的大容量の液体を同様に必要とするその他の成分を加える場合には好ましい可能性がある。この場合においては、ＤＰＭが装置内にて固まりにならないことを確実にするために、多数回連続的に液体を加え、乾燥させるなどすることに注意を払わねばならない。１分ごとに６ ｍｌを～１分間使用し、その後、さらに２分間乾燥させるのがほぼ適当である。

【０１０３】

加える液体の量は、以下のように決定される：炭酸水素ナトリウムを水に溶解し、７５ ｇ／Ｌに調製する。例：チェンバー内の２５０ ｇのＤＰＭを凝集させる。１ Ｌの１×液体培地について、１０．０ ｇのＤＰＭが必要だと仮定する。したがって、２５０ ｇは２５ Ｌの１×液体培地に相当する。液体の各リットルについて、（例えば）炭酸水素ナトリウム２ ｇが必要と仮定する。これは、５０ ｇの炭酸水素塩が必要であることを意味する。ここで、炭酸水素塩溶液は７５ ｇ／Ｌであるため、２５０ ｇのＤＰＭには、０．６７ Ｌの炭酸水素塩溶液を加えなければならない。

【０１０４】

炭酸水素ナトリウム溶液は、炭酸水素ナトリウム溶液のｐＨが～８．００であり、培地成分を分解し得るため、サイクル間のより長い乾燥時間が必要とされることを除いては、上記の「典型的なＤＰＭの凝集」のための工程と同様に加えられる。炭酸水素塩溶液をあまりに急速に加えることによって、サイクル間の炭酸水素塩粉末の完全な乾燥に十分な時間を与えずに、粉末を「浸った状態」に決してしないことが重要である。また、水分は二酸化炭素ガスの遊離をもたらし、その結果、緩衝能の低下が生じる、および、粉末がフォイルパケット中にある場合は、「ピロー」形成が生じることから、最終的に可能な限り低い含水率をもたせることが重要であるため、液体のより長い乾燥時間が必要となる。

【０１０５】

（ｂ）ＤＰＭの部分として

炭酸水素ナトリウムは、流動層処理以前に、他の培地成分についてのものと同様の仕方でＤＰＭに粉砕し込むことができる。しかし、粉砕工程においては、炭酸水素塩は、最終成分として加えるべきである。他の培地成分の全ては、通常通りに粉砕し、その後粉砕機を停止し、最後に炭酸水素塩を加え、さらに粉砕して適切なサイズの粒子に至らせるべきである。全ての粉砕後工程（容器に入れること等）は、操作上可能な限り低く（～２０％から４０％）設定された、湿度調節環境において行われることが重要である。流動層処理はその後、可能な限り粉砕直後に行われるべきである。（同じ日に処理されない場合、ＤＰＭは二重に包装し、湿度吸収剤を含む密封容器内に入れなければならない。）

【０１０６】

流動層工程自体は、水注入後の乾燥時間（～６ ｍｌ／分）を再度延長すべき点を除いては、上記にて与えられる実施例と同様に（ＤＰＭ５００ ｇ当たり３５ ｍｌを使用して）行われる： １分間水を注入、および２分間乾燥、というサイクル。フェノールレッドの存在により、ＤＰＭの色は濃い赤～薄い紫となることが注目される。ＤＰＭは本質的に水分を含まないため、これにより分解状況は示されない。それが、流動層処理が極めて重要である理由である。

【０１０７】

実施例３：緩衝塩（例えば炭酸水素ナトリウム）を含み、および、使用者がたやすく、再構成（１×）培地のｐＨが、自動的に望ましいｐＨとなるように処方される、ＤＰＭ－酸または塩基スプレー技術

上記に言及されるように、商品として入手可能な全ての哺乳動物細胞培養粉末培地は、１×液体を調製し、その後、溶液が適切なｐＨとなるようにｐＨを調整する場合には、１つもしくは複数の緩衝塩（例えば炭酸水素ナトリウム）の添加を必要とする。しかし、本方法は、（上記の実施例２において説明されるように）炭酸水素ナトリウムの添加、および、ｐＨ調整の必要性の双方を不要のものとするために、使用することができる。本発明の本局面においては、１つもしくは複数の緩衝塩を含む乾燥粉末培地に、酸または塩基（必要に応じる）を導入するために、流動層技術が使用される。本発明の本局面に従い、最終的に再構成された細胞培養培地において望ましいｐＨおよび緩衝能に応じて、任意の緩衝塩またはその組み合わせ、および任意の酸または塩基を使用することができる。

【０１０８】

ＤＰＭに炭酸水素ナトリウムが粉末として直接加えられる場合は、末端使用者は、単に水を加え、混合するだけで、既に炭酸水素塩を含む（上記を参照のこと）、適切なｐＨの溶液を得ることができる。最初に、どれほどのｐＨ調整が必要とされるのかを決定する必要がある。（１）１　Ｌの水をビーカーに入れる。液体にＤＰＭを加え、混合する。（リットル当たりに添加する量は、その粉末についての使用説明書により与えられる。例えば、１０　ｇ／Ｌ、１３　ｇ／Ｌ）。この場合、リットル当たりにどれほどを加えるべきかを決定するために、炭酸水素ナトリウムの重量も考慮に入れねばならない。（２）粉末が溶解された後、溶液を望ましいｐＨに調整するために、５Ｎ　ＨＣｌを加える。その量を記録する。（３）この数を１Ｎ　ＨＣｌの量に変換する。凝集される全部の粉末を調整するために、どれほどの１Ｎ　ＨＣｌが必要とされるかを計算する。（例：１　Ｌ　の１×培地Ａを未調整のｐＨ　７．９からｐＨ　７．２に調整するためには、５　ｍｌ　の１Ｎ　ＨＣｌが必要とされる。）その１　Ｌの１×培地は、例えば、ＤＰＭ　１３．０　ｇに相当する。したがって、ＤＰＭ各１３．０　ｇについて、５　ｍｌの１Ｎ　ＨＣｌが必要とされる。２５０　ｇのＤＰＭのｐＨを調整したい場合、自動的にｐＨ調整させるために、２５０÷１３．０　＝　１９．２×５　ｍｌまたは９６　ｍｌの１Ｎ　ＨＣｌを粉末に加えることが必要とされる。

【０１０９】

ここで、この１Ｎ　ＨＣｌをＤＰＭに加えなければならない。その最良の方法は、注入装置を使用し、水の代わりに１Ｎ　ＨＣｌを加えるものである。一般には、以下を除いて、プロトコールは上記と同様である：（１）１Ｎ　ＨＣｌは、炭酸水素ナトリウムを含む培地にゆっくりと加えなければならない。あまりに急速に加えた場合、二酸化炭素が放出され、その結果、最適以下の緩衝能が生じる可能性がある。一般に必要とされるような１Ｎ　ＨＣｌの容量のために、１分間オン、２分間オフするようなサイクルが数回必要となる。ＤＰＭが液体過程にあるような特性を有すが、実際には乾燥粉末であるような動的系が存在するように、乾燥粉末状態が各サイクルの最後に得られなければならない。（驚くべきことに、系内の連続的な蒸発によって、粉末は常に本質的に乾燥したままであるにも関わらず、ＨＣｌが粉末に加えられると、バルクの色は濃い赤紫から薄い黄橙色に変化する。）本質的に中性のｐＨを生じるように、ＨＣｌの総量は計算されているため、流動層が適切に調整される限り、粉末は実際には「酸」条件に決して曝露されない（上記；操作中のチェンバー内の粉末粒子の位置を参照のこと）。粉末の全てが系を通って移動する（即ち、連続的に引き上げられ、凝集され、固結される）こと、およびチェンバー内に「デッド」ゾーンがないことを確認することが重要である。

【０１１０】

実施後に粉末が一旦収集されれば、適切な「乾燥した」包装および場所に保たれる限り、いつでもそれを水に加え、再構成することができる。ｐＨの調整は必要ない。したがって、本発明は、乾燥粉末培地を再構成することにより作製される液体培地のｐＨがｐＨ調整を必要としない、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培地を提供する。

【０１１１】
実施例４：ＤＰＭ自体の中への、血清、アルブミン、Ｈｙ－Ｓｏｙ等のような大きな分子量の補足物の包含
これまで、血清を含む乾燥化粉末培地は、商品として入手可能ではなかった。（流動層技術およびスプレー乾燥技術を介して）本方法を用い、本発明者らは、機能性（細胞培養）が維持されるような仕方で粉末に血清を加えることに成功した。
【０１１２】
流動層装置の注入装置では、血清、および濃縮アルブミンを用いてミストを形成することができる。本発明者らは、このようにしてＤＰＭに加えられ、乾燥された血清が機能的かどうか調べることを試みた。
【０１１３】
血清を加えるための手順：（１）凝集される標準ＤＰＭの重量を決定する。（２）これから、特定の粉末についてのｇ／Ｌに基づき、粉末のｇ量から作製される１×培地の容量を計算する。（３）与えられたパーセンテージレベルの補足（例えば、１０ ｇ／Ｌにおいて使用される１００ ｇの粉末は、粉末１０Ｌ当量である）において必要とされる血清の容量を計算する。５％の血清の補足においては、注入装置によって５００ ｍｌの血清を加えることが必要とされる。
【０１１４】
血清を加えるためのプロトコール：血清およびアルブミンは非常に粘性である。小滴サイズおよびパターンについて、ノズルのスプレーパターンを調べなければならない。粉末に加えられる溶液においてサンプル管を用い、厚紙または他の背景に対してスプレーをテストする。均一性および微小な小滴サイズについて確認する。「ミスト」でない場合は、噴霧圧を０．５バール増加し、再度テストする。十分な圧力が微細なミストパターンをもたらすまで、これを行う。
【０１１５】
細胞培養適用において使用するため、１×培地１ Ｌ当たりに用いられる血清－ＤＰＭの重量／ｍｌを知ることが必要である。これを行うため、乾燥中血清を保持するバイアルまたは試験管の重さを正確に量る。一定の（既知の）量の血清を各バイアル中に入れる。その後、バイアルをＳｐｅｅｄ Ｖａｃまたは凍結乾燥機中に置く。乾燥状態になるまで水分を除去する。その後、今度は凍結乾燥血清を含むバイアルの重さを再度量る。血清の重量を計算し、もとの容量のｍｌ当たりの重量として表す。そこで、Ｌ当たりに使用する血清を含む凝集ＤＰＭの重量を、標準ＤＰＭ「使用」重量に与えられたレベルの血清重量を加えたものとする。
【０１１６】
例えば、培地Ａ（ＤＰＭ）が１０ ｇ／ｌにて使用されると仮定する。血清の補足は５％ｖ／ｖとする。これは、標準ＤＰＭの重量に加え、培地１Ｌ当たりに加える血清の重量が５％ ＝ ５０ｍｌと等しくなることを意味する。血清粉末重量が０．０６ ｇ／ｍｌであると仮定する。それなら、粉末血清の重量 ＝５０×０．０６ ｇ／ｍＬ ＝ ３ ｇである。したがって、１Ｌの水に加えられる、血清を含むＤＰＭの重量は、血清粉末の重量（３ ｇ）にリットル当たりの標準ＤＰＭ（１０ ｇ）の重量を加えた重量 ＝ １３ ｇ／Ｌである。
【０１１７】
実施例５：ＤＰＭを製造する場合の、粉砕技術（ミクロンサイズの粒子にまで成分を破砕する高エネルギーインプット系）の削減または排除
上記にて言及されるように、乾燥粉末培地は、典型的には、労力を要し、多くの問題がある、粉砕工程を介して製造される。本発明の方法は、これらの労力的および技術的制限を克服する、流動層技術を用いた乾燥粉末培地の生産を提供する。
【０１１８】
Ａ．外部装置において最初にブレンドし、その後流動層処理する
通常、粉砕されたＤＰＭは、炭酸水素ナトリウムと（供給者から受け取ったままの状態で

、付加的なボールミリングは必要とせずに）ブレンドされる。［炭酸水素ナトリウムを２ｇ／Ｌ当量で含むＲＰＭ１６４０］。この混合物は２０分間ブレンドする。粉末をその後、流動層チェンバー内に入れ、炭酸水素塩を含む培地、または、自動ｐＨ調節する炭酸水素塩を含む培地についての上記のように流動化させる。

【０１１９】

Ｂ．流動層チェンバー内において直接ブレンドし、その後凝集させる

炭酸水素ナトリウムを、粉砕されたＤＰＭと共にチェンバーに直接入れ、短時間ブレンド（混合）し、その後凝集させる。これにより別々のユニットにおいてブレンドする段階が除かれる。

【０１２０】

Ｃ．ボールミリング工程の完全な排除

ＤＰＭ化学物質のいずれをも、流動層チェンバーに直接加え、予備的に混合し、引き続き凝集させる、またはよりふさわしくは、より粗い「より粘着性」等の化学物質の幾つかに、回転摩砕機における簡単な摩砕処理を与え、その後、ブレンドおよび最終的な凝集のために流動層内に入れる。

【０１２１】

実施例６：この前述のＤＰＭ内に上記の全ての特性をもたせるための方法

本発明者らは、「在庫があってすぐ手に入る」炭酸水素ナトリウムの添加を、粉砕ＤＰＭおよび自動ｐＨ調節と組み合わせた。本発明者らはまた、血清をＤＰＭと組み合わせた。

【０１２２】

炭酸水素ナトリウムを含むＤＰＭと自動ｐＨ調節と血清を組み合わせるため、あるプロトコールでは：

１．炭酸水素ナトリウム（供給者からの粉末）をＤＰＭ（粉砕または摩砕されている）に加える。

２．原料をブレンドする（外部ユニットまたは流動層のいずれかにおいて混合する）。

３．別個の容器において、１ＬのＤＰＭ（炭酸水素塩を含む）を、水（１×）によって再構成し、溶液のｐＨを７．５にまで調整するために必要とされる１Ｎ ＨＣｌ、または１Ｎ ＮａＯＨの量を決定する。リットルベースにて、凝集される粉末の質量（およびしたがってＬ－当量）を知り、上記にて計算される量にて凝集される総粉末についての１Ｎ ＨＣｌまたは１Ｎ ＮａＯＨの量を計算する。流動層装置（注入ノズル）を介してこの量を加える。（ＤＰＭは「液体」ではないが、粉末をできる限り中性に近くし、工程に水蒸気が関与するために、血清を加えた際に炭酸水素塩が遊離されるような酸性ｐＨにしないことが重要である。ｐＨ ７．６またはそれ以上においては、炭酸水素ナトリウムの濃縮溶液はCO_2ガスを放出しないが、より低いｐＨにおいては、ガスを発生させる。）

４．補足パーセンテージおよび凝集されるｇに基づく、血清の添加（拡大凝集）。

５．上記の（３）からのものと同じ１×液体１Ｌを使用し、望ましいｐＨ（例えば７．２）にまでｐＨ調整するために必要とされる、１Ｎ ＨＣｌまたは１ Ｎ ＮａＯＨの量を決定する。この情報を用い、血清を用いて凝集された粉末の重量について使用される量を計算する（ｇ／Ｌでの仕様を知る）。流動層装置（注入ノズル）を介してこの量を加える。

６．粉末培地を滅菌するためにγ照射を使用する。

【０１２３】

同様の方法において、特定の量のＤＰＭを特定の量の粉末血清（例えば、下記の実施例８において説明されるように、スプレー乾燥によって調製される）と組み合わせ、その後、混合物を凝集させることによって、血清を含むＤＰＭを生産することができる。例えば、１０％の粉末ＦＢＳを含む培地の調製のためには、５５．５ ｇの粉末ＦＢＳを５００ ｇの粉末培養培地に加え、その粉末を撹拌することによって十分に混合することが可能である。この混合物はその後、上記にて説明されるように、水を用いて凝集することができ、再構成の際に、自動ｐＨ調整し得るような、１０％のＦＢＳを含む培養培地を生じる。

【０１２４】

実施例７：流動層処理（スプレー乾燥をシミュレートする）による１００％血清粉末の生産

方法論

１）本発明者らは、ベンチトップ実験用流動層装置（Ｓｔｒｅａ－１）を使用した。粉末血清の生産のためには、チェンバー内には何も入れない。レバーを用いてユニットを密封する。

２）注入装置（スプレーユニット）により、血清を加えた。粉末がチェンバー内にて直ちに形成されるように、チェンバーに血清が加えられるにつれ、空気流動を十分に増加させ、血清流動を十分遅くし、水分の蒸発が生じて血清が十分に乾燥されるようにした。湿性または液体の被覆物は、チェンバー内のどこにも存在しなかった。

３）ポンプ速度は、チェンバーに～１ ｍｌ／分で流入させるように設定された。

４）空気流動速度は～８から９に設定された。

５）断続的にフィルターを掃除するため、ファン速度を～２から３にまで下げた。これは、５分～１０分毎に定期的に行われた。（空気流動速度８～９の設定は非常に高いため、粉末を吹き払ってフィルター自体の掃除が行われない。）

６）フィルターを１通り吹き払った後、ファン速度を以前のレベルにまで上げ、ポンプをオンにした。（これらのパラメータが一旦設定されれば、指示されるようにフィルターを掃除する場合を除き、ポンプは連続的に作動された。）

７）全ての血清の液体が凝集機に加えられた後、最終的な乾燥を５分間に渡って行った。

８）できる限り多くの粉末を収集するため、フィルターをその後吹き払い、機械を止め、産物を除去した。粉末血清を気密容器に入れ、光から保護した。

【０１２５】

典型的な機器設定

乾燥温度：６０℃～６５℃

出口空気温度：～３３℃

噴出圧：５バール

噴霧圧：２．０バール～２．５バール

逆噴出ドウェル：スプレー間に２

ファン容量：作動中を通して８～９

Ｍａｇｎａｈｅｌｉｃｓ：フィルター抵抗 １５０～２５０、多孔調節板の抵抗 ～５０、空気容量 ５０未満。

【０１２６】

ＦＢＳの凝集が、タンパク質の構造または分布に影響を与えるかどうかを決定するため、凝集ＦＢＳおよび液体ＦＢＳのサンプルを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、タンパク質を染色し、デンシトメーターによってスキャンした。図１において示されるように、本方法に従って調製された凝集ＦＢＳ（図１Ａ）は、液体ＦＢＳ（図１Ｂ）にて認められるものとほとんど同一のタンパク質プロフィールを示した。これらの結果は、本方法による乾燥粉末ＦＢＳの調節された生産は、血清の主な成分の構造または分布に実質的に影響を与えないことを示す。

【０１２７】

ＦＢＳの凝集が、細胞の増殖および継代を支持するその能力に影響を与えるかどうかを決定するため、ＳＰ２／０細胞を、２％の凝集（「乾燥」）ＦＢＳまたは２％の液体ＦＢＳのいずれかを含むＤＭＥＭに植付け、増殖速度および継代回収を調べた。図２Ａにおいて示されるように、凝集ＦＢＳを含む培地に植付けられた細胞は、液体ＦＢＳを含む培地に植付けられた細胞と同様の増殖動態を示した。同様に、継代から回収された、凝集ＦＢＳを含む培地における細胞は、液体ＦＢＳを含む培地における細胞と実質的に同一の増殖速度を有していた（図２Ｂ）。これらの結果は、合せて、培養細胞の増殖および継代の支持において、本発明の凝集ＦＢＳが、液体ＦＢＳとおよそ同等に機能することを示す。

【０１２８】

実施例８：スプレー乾燥による、１００％血清粉末の生産

流動層処理の代替として、スプレー乾燥技術による乾燥粉末血清の生産の実現性を調べた。粉末血清を調製するため、直径３フィートの実験用スプレー乾燥機（Ｍｏｂｉｌｅ Ｍｉｎｏｒ Ｓｐｒａｙ Ｄｒｉｅｒ；Ｎｉｒｏ，Ｃｏｌｕｍｂｉａ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）を用いた。液体ＦＢＳをスプレー乾燥機に吸引し、空気ディスペンサーの中央に位置するＳｃｈｌｉｃｋ ９４０ノズルによって噴霧し、装置の最上部空気ディスペンサーによって噴霧器に乾燥用空気を導入した。以下の条件下において、スプレー乾燥を行った：入口空気温度 ＝ ２００℃；出口空気温度 ＝ ７０℃；ノズルについての噴霧空気圧 ＝ ２．０バール；空気流動 ＝ ８０．０ ｋｇ／時間；スプレー速度 ＝ ６５ ｇ／分。これらの方法の開発の間、初期出口空気温度６０℃を用いた；しかし、この温度は低すぎることが見出され、スプレー速度は、最適であることが見出された約７０℃の出口温度に達するレベルにまで逆調整された。スプレー乾燥に続き、粉末血清を装置のサイクロンにおいて収集し、処理用空気を装置内における再循環前に排出フィルターにかけた。

【０１２９】

生産後、同じロット源に由来する液体ＦＢＳと比較して、その物理的特性に関して、粉末血清を特徴付けた。生産ロットの異なる段階から採集されたサンプル（サンプル「Ａ」および「Ｂ」）を、エンドトキシンを含まない蒸留水（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）中において、６０．４４ ｇ／Ｌの濃度にて再構成し、カブトガニ変形細胞溶解物試験（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）を用いて、エンドトキシンレベルについて調べ、（５２５ ｎｍにおける吸光度を分光測光によって測定することにより、および、ＵＶ／可視光分光測光により）ヘモグロビンレベルについて調べた。結果は表１、および、図３Ａおよび図３Ｂにおいて示される。

【表１】粉末血清の物理的特性

被験材料	エンドトキシンレベル(EU/ml)	ヘモグロビン(mg/100 ml)
粉末FBS, サンプル"A"	0.6	7.7
粉末FBS, サンプル"B"	< 0.3	7.7
液体FBS (対照)	< 0.3	7.2

【０１３０】

表１において認められるように、粉末ＦＢＳは、粉末ＦＢＳの生産のための材料源としての役割を担った液体ＦＢＳのものと同様のエンドトキシンレベルおよびヘモグロビンレベルを示した。その上、生産工程の異なる段階から採集されたサンプルは、ほぼ同一のエンドトキシンレベルおよびヘモグロビンレベルを示し、本方法が、生産ロットに渡っておおよそ均一の物理的一貫性を有する物質の生産をもたらすことが示される。粉末ＦＢＳおよび液体ＦＢＳのサンプルをＵＶ／可視光分光測光によって調べた場合（図３）、粉末ＦＢＳについて（図３Ａ）認められる軌跡は、液体ＦＢＳ源について得られるもの（図３Ｂ）と見分けがつかない。これらの結果は合せて、本スプレー乾燥法によって調製された血清粉末は、その粉末が調製されたもとの液体血清のものとほぼ同一の物理的特性を有することを示す。上記の実施例７の結果（例えば図１を参照のこと）と合せると、これらの結果は、本発明によって提供される方法が、液体血清源のものから変化させられていない物理的特性を有するような、粉末血清の生産をもたらすことを示す。

【０１３１】

実施例９：自動的にｐＨを調整される粉末培養培地の生産

粉末培地に炭酸水素ナトリウムが決して含まれないある理由は、いかなる水分も、空気中

の水分でさえも、パウチ内に酸性条件を生じる可能性があり、それにより、CO_2ガスの遊離がもたらされるからである。パウチは膨脹し、「ピロー」と呼ばれてきたものが作製される。流動層処理を用い、工程終了以前に、装置内の湿度は、本質的に無視できるレベルにまで下げられる。本発明者らは、炭酸水素ナトリウムを含むＲＰＭＩ－１６４０粉末培地を作製しており、「ピロー」形成の証拠は認められていない。

【０１３２】

ｐＨ調整された粉末培地を作製するには、水に加えた際のｐＨをおよそ７．０～７．４にするため、ｐＨ調整化学物質（通常ＨＣｌまたはＮａＯＨ）を粉末に加えることが必要である。炭酸水素ナトリウムを粉末に一旦加えると、多くの粉末培地は、水中にて、中性の塩基性側において再構成し、ＨＣｌの添加が必要となる。炭酸水素ナトリウムを含む粉末にＨＣｌを添加することには、問題があることが予測される。しかし、添加される液体（この場合５Ｎ ＨＣｌ）は、流動層装置内に湿った状態または「液体」状態を決してもたらさないことから、炭酸水素ナトリウムはCO_2ガスを発せず、その緩衝能は完全に維持される。このことは、本研究において、ｐＨ滴定実験により調べられた：２つの別個の実験において（図４Ａおよび図４Ｂ）、等量の酸が、再構成時に液体に加えられた炭酸水素ナトリウムを含む標準培地についてのものと同一の量によって、凝集培地および自動ｐＨ調整される凝集培地のｐＨを下げることが見出された。これらの結果は、後にｐＨの調整を行う凝集、および、凝集工程中にｐＨの調整を伴う凝集の双方が、著しい緩衝能を有する粉末培養培地を作製するために、等しく十分に機能することを示す。

【０１３３】

実施例１０：培養培地の溶解速度に対する凝集の影響

培養培地の凝集の、培地の溶解速度に対する影響を調べるため、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ（商標）またはＤＭＥＭのサンプルを、水またはＦＢＳ（Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉについては２％のみ；ＤＭＥＭについては２％または１０％）を用いて凝集した。凝集された培地の水における再構成の際、凝集されたＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉの経時的溶解は、標準粉末Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉの溶解よりもはるかに迅速に起こった（図５Ａ）；水またはＦＢＳを用いて凝集されたＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉについて、結果は同一であった。しかし、興味深いことに、水を用いて凝集されたＤＭＥＭは、標準粉末ＤＭＥＭよりも、はるかに迅速に水に溶解した一方、ＦＢＳを用いて凝集されたＤＭＥＭはそうではなかった（図５Ｂ）。

【０１３４】

（従来的な粉末培地とは対照的に）、凝集された粉末培地の隙間のある構造により、毛管作用によって、水が、全ての粉末粒子について密接な近傍にまでもたらされる。これにより、ほとんどの標準粉末培地の再構成の際に認められる困難な問題であり、それによってより長い溶解時間が導かれる、粉末の「球」の出現が妨げられる。より迅速な溶解に加え、凝集された培地は、粉塵形成の減少も示した。これらの結果は、水を用いて凝集された培養培地、およびＦＢＳを用いて凝集された幾つかの培養培地は、従来的な粉末培養培地よりもはるかに迅速に溶解し、より少ない粉塵を生み出すことを示す。

【０１３５】

実施例１１：再構成された凝集培養培地における細胞増殖および継代培養

培養培地の多くの使用では、血清またはアルブミンのような、大きな分子量のタンパク質の添加が必要とされる。これらの分子は、溶液形態、またはアルブミンの場合はそれどころか粉末形態にあることが可能である。しかし、粉末培地の均一性を保証するために、これらのタンパク質は通常、バルク粉末培地の液体培地への再構成後に、粉末としてではなく、液体として加えられる。例えば、長時間に渡って性能を維持するため、血清をフリーザー中に保存しなければならないゆえに、これには幾らか不便がつきまとう。血清は培地に無菌的に加えなければならず、異物混入の機会が増加するため、費用および不便が増す。血清の添加後にろ過滅菌が行われる場合は、その他の処理段階が必要である。したがって、粉末培地の統合された部分として血清を提供できるということには利益がある。

【０１３６】

したがって、培養培地は、水によって、または様々な濃度のＦＢＳによって凝集された。

上記にて一般に概説されるように、空中に浮遊させられた乾燥粉末培地に高い蒸発乾燥速度で注入することによって、ＦＢＳは粉末培地に加えられた。血清の補足レベルは、Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ 培地において２％、および、ＤＭＥＭにおいて２％または１０％であった。これらの培地における様々な細胞系の増殖および継代の達成についてその後評価した。

【０１３７】

図６において示されるように、ＳＰ２／０細胞は、水またはＦＢＳのいずれかによって凝集されたＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉにおいて増殖させた場合（図６Ａ）、従来的な培養条件下（水によって再構成された粉末培地に液体血清を加えた）において増殖させた細胞と比較して、同様の増殖速度を示した。同様の結果が、２％のＦＢＳを補足された、水およびＦＢＳによって凝集されたＤＭＥＭにおいて培養されたＳＰ２／０細胞について（図６Ｂ）、および、１０％のＦＢＳを補足された、水およびＦＢＳによって凝集されたＤＭＥＭにおいて培養された、ＳＰ２／０細胞（図７Ａ）、ＡＥ－１細胞（図７Ｂ）およびＬ５．１細胞（図７Ｃ）について認められた。その上、ＳＰ２／０細胞は、２％のＦＢＳを補足された、水またはＦＢＳによって凝集されたＯｐｔｉ－ＭＥＭ ＩおよびＤＭＥＭにおいて培養された場合（各々図８Ａおよび図８Ｂ）、１０％のＦＢＳを補足された、水およびＦＢＳによって凝集されたＤＭＥＭにおいて培養されたＳＰ２／０細胞、ＡＥ－１細胞およびＬ５．１細胞（各々図９Ａ、９Ｂおよび９Ｃ）と、および、５％のＦＢＳを補足された、水によって凝集されたＤＭＥＭにおいて培養されたＳＰ２／０細胞（図１０）と、およそ同様の、継代からの回収率を示した。その上、ＳＰ２／０細胞は、大バッチにおいて生産された、水によって凝集された培地において、および、炭酸水素ナトリウムを含む、自動的にｐＨを調整する粉末ＤＭＥＭにおいて、５％のＦＢＳを補足された標準液体ＤＭＥＭにおいて示したものと同一の継代特性を示した（図１０）。

【０１３８】

合せて、これらの結果は、動物血清（例えばＦＢＳ）のような培養培地補足物を培養培地に直接凝集できること、および、このようにした凝集工程中の培養培地の補足によって、様々な培養細胞の増殖および継代の最適な支持を提供する培養培地が生産されることを示す。その上、これらの結果からは、炭酸水素ナトリウムを含有する、自動的にｐＨを調整する本発明の培地を含む、本培養培地粉末を、大バッチにおいて首尾よく生産できることが示される。

【０１３９】

実施例１２：スプレー乾燥された血清粉末によって補足された培養培地における細胞増殖

実施例７において示される実験に付随して、実施例８において説明されるように調製されたスプレー乾燥ＦＢＳを２％もしくは１０％のいずれか含む、または、液体ＦＢＳを２％もしくは１０％含むＤＭＥＭ に、ＡＥ－１細胞およびＳＰ２／０細胞を植付け、細胞の増殖速度および継代回収を調べた。培地１０ ｍｌ中に1×10^{5} 細胞数／ｍｌの密度で、３つの２５ cm^{2} フラスコに細胞を接種した。３日目～７日目に、生存能のある細胞の密度を決定し、各細胞系について２回テストした。結果は図１１～１３にて示される。

【０１４０】

図１１において示されるように、粉末ＦＢＳを含む培地において培養されたＡＥ－１細胞は、標準液体ＦＢＳを含む培地において培養された細胞と同様の増殖動態を示した。予測されるように、細胞は、２％のＦＢＳを含む培地におけるものよりも、１０％のＦＢＳを含む培養培地において、より高い密度に至るより迅速な増殖を示し、およそ４日目までに増殖のピークを示した。２つの別個の実験について同様の動態が認められ（図１１Ａおよび図１１Ｂ）、それにより、これらの結果が再現可能であることが示される。粉末ＦＢＳまたは液体ＦＢＳを含む培地においてＳＰ２／０細胞の増殖速度が測定された、２つの実験において、類似した結果が得られた（図１２Ａおよび図１２Ｂ）。その上、継代から回収された、５％の粉末ＦＢＳを含む培地において培養されたＡＥ－１細胞は、液体ＦＢＳを含む培地における細胞と同一の増殖速度を有していた（図１３）。

【０１４１】

これらの結果は、本発明のスプレー乾燥法によって調製された粉末ＦＢＳが、培養細胞の増殖および継代の支持において、液体ＦＢＳとおよそ同等に機能することを示す。実施例７および８の結果を合せて、これらの結果は、流動層技術またはスプレー乾燥技術によって、液体ＦＢＳのものとほぼ同一の物理的特性および性能特性を示すような粉末ＦＢＳを生産するために、本発明の方法を使用できることを示す。

【０１４２】

実施例１３：凝集培地の性能に対する照射の影響

近年、特にバイオテクノロジー産業において、バイオ生産に使用される培地および培地成分（補足物を含む）の生物学的純度についての問題が生じてきた。γ照射は、熱または毒性ガスへの曝露による滅菌を典型的には行うことができない、ある液体や粉末について、十分に作用することが知られた、１つの滅菌工程である。したがって、水またはＦＢＳによって凝集された培養培地のサンプルを、コバルト源を用いて、２５ ｋＧｙにて数日間までγ照射し、様々な細胞タイプの増殖速度を調べた。

【０１４３】

ある一連の実験においては、様々な培地にＳＰ２／０細胞を1×10^{5}細胞数／ｍｌで接種し、３７℃において培養した。様々な間隔においてサンプルを無菌的に得、コールター・カウンターにより細胞数を計測し、トリパンブルー排除試験により生存率を決定した。水１Ｌ中における１×溶液を作製するために、十分な粉末培地を溶解し、撹拌し、０．２２μｍフィルターを通してろ過することによって培地を調製した。結果は、図１４のグラフにおいて示される。グラフ上において「ｐｗｄｒＦＢＳ」と述べられるグラフ上の条件は、粉末ＦＢＳ（上記の実施例７または実施例８におけるように調製された）の、標準粉末培地または凝集培地（照射、または非照射）のいずれかから調製された再構成１×培地への添加を指す。「Ｉｒｒａｄｉａ．ａｇｇｌｏｍ．ＤＭＥＭ＋ＦＢＳ」と述べられるグラフ上の条件は、流動層を使用し、凝集培地を作製し、粉末培地（標準または凝集）にＦＢＳをスプレーすることにより、ＦＢＳ－凝集培地を作製したことを指す。

【０１４４】

図１４において示されるように、標準粉末基礎培地および凝集基礎培地のγ照射は、これらの培地の、ＳＰ２／０細胞の増殖を支持する能力に有害に影響を与えなかった。その上、照射は、粉末ＦＢＳを含む粉末培地、および粉末ＦＢＳ自体に負の影響を与えはしたが、この影響は血清濃度が上昇するにつれ減少した。

【０１４５】

これらのγ照射の影響をより広く調べるために、ＶＥＲＯ細胞のサンプルを、従来的に再構成された、または上記のように凝集されたＶＰ－ＳＦＭ（商標）に接種した。しかし、凝集チェンバー内の粉末培地には、この培地にとっては従来的な補足物である、上皮増殖因子（ＥＧＦ）およびクエン酸第二鉄キレートを、凝集中にスプレーノズルを介して加えた。培地をその後、直接使用した、または、上記にて説明されるようにγ照射した。Ｔ－２５フラスコに、3×10^{5}細胞／フラスコにて細胞を接種し、３７℃においてインキュベートした。細胞数および生存率は、上記に説明されるように決定された。結果は図１５において示される。

【０１４６】

図１５において認められるように、ＶＥＲＯ細胞は、γ照射された凝集培地において培養された場合、γ照射されていない凝集培地におけるものとおよそ同等の増殖および継代の達成を示した。その上、培地の照射は、培地中に存在していた、低レベルの培養補足物であるＥＧＦおよびクエン酸第二鉄キレートには影響を与えなかった。

【０１４７】

これらの結果は、本方法によって、血清、ＥＧＦ、または他の補足物を含有するものを含む、多くのバルク凝集培養培地の調製において、γ照射を滅菌技術として使用できることを示す。

【０１４８】

実施例１４：粉末培地補足物の性能に対する照射の影響

滅菌培地補足物の生産における本方法の有効性を示すために、－７０℃または室温において、コバルトγ源に２５ ｋＧｙにて約３日間曝露することによって、凍結乾燥ヒトホロトランスフェリンを照射した。その後、照射したトランスフェリン、または照射していない対照トランスフェリン（－７０℃または室温において保存された）を補足された培地において２９３細胞を培養し、標準のトランスフェリンを含む培養培地またはトランスフェリンを含まない培地のものと、細胞の増殖を比較した。

【０１４９】

血清を含まない２９３培地（２９３ ＳＦＭ）において増殖している、対数増殖期中の２９３細胞を採集し、２００×ｇにて５分間、１回洗浄し、細胞数計測および生存率の決定のために、トランスフェリンを含まない２９３ ＳＦＭに再懸濁した。２９３ ＳＦＭ（正の対照）、トランスフェリンを含まない２９３ ＳＦＭ（負の対照）、－７０℃または室温において保存された、非照射トランスフェリンを含む２９３ ＳＦＭにおいて、または、上記に説明されるように調製された、照射トランスフェリンを含む２９３ ＳＦＭにおいて、２０ ｍｌの容量中に3×10^{5}細胞数／ｍｌの密度で、３つの（ｔｒｉｐｌｉｃａｔｅ）１２５ ｍｌのＥｈｒｌｅｎｍｅｙｅｒフラスコに細胞を植付けた。フラスコを、８％CO_2／９２％空気で平衡させた３７℃のインキュベーター中において、約１２５ ｒｐｍに設定された回転振とう機内に置いた。コールター粒子カウンターを用いて細胞数を毎日計測し、標準法に従ったトリパンブルー排除試験によって生存率を決定した。細胞密度がフラスコ当たり約１．２～１．７$\times10^{6}$に達した時点で、各サンプルのフラスコのうち１つの含有物を採取し、遠心分離し、新しい培地に再懸濁し、３つの新たなフラスコに継代した。前のおよび次の継代の細胞数および生存率の決定を上記に説明されるように行った。上記の条件下においてインキュベートされた細胞の４回の連続した継代について調べた。

【０１５０】

図１６Ａ～図１６Ｄにおいて示されるように、－７０℃または室温のいずれかにおいてγ照射されたトランスフェリンを含む培地において培養された細胞は、第一継代（図１６Ａ）、第二継代（図１６Ｂ）、第三継代（図１６Ｃ）および第四継代（図１６Ｄ）において、標準２９３ ＳＦＭ、または、γ照射されていないトランスフェリンを含む２９３ ＳＦＭにおいて培養された細胞と、ほぼ同一の増殖動態および生存率を示した。しかし、トランスフェリンを含まない培地において培養された細胞は、第一継代（図１６Ａ）の間は十分に生存したが、継代培養の際には増殖を停止し、生存率の著しい低下を示した（図１６Ｂ）。

【０１５１】

これらの結果は、本発明の方法においては、トランスフェリンのようなバルク粉末培養培地補足物の調製における滅菌技術として、γ照射を使用できることを示す。さらに、これらのデータは、トランスフェリンのような培養培地補足物を、室温において、活性を著しく低下させずにγ照射できることを示す。

【０１５２】

実施例１５：粉末血清の生化学的特性に対する照射の影響

γ照射の血清に対する影響をさらに決定するため、スプレー乾燥された粉末ＦＢＳのサンプルを、－７０℃または室温（ＲＴ）において、２５ ｋＧｙにて照射し、血清中の様々な生化学的構成要素の濃度について商業的に分析した。対照として、非照射のスプレー乾燥ＦＢＳおよび液体ＦＢＳのサンプルも同様に分析した。結果は、表２において示される。

【表２】スプレー乾燥ＦＢＳ の化学分析

構成要素	乾燥 **FBS**, **-70°C** において照射	乾燥 **FBS**, 室温 において照射	非照射の乾燥 **FBS**	液体 **FBS**	単位	参照範囲
ナトリウム	139	137	139	140	mM	136-144
カリウム	13.2	13.2	13.0	13.2	mM	3.6-5.2
塩素	98	97	98	100	mM	98-108
尿酸	1.6	1.3	1.7	1.9	mg/dL	2.2-8.3
リン	10.1	10.1	9.6	10.2	mg/dL	2.2-4.6
カルシウム	14.9	14.8	14.8	14.5	mg/dL	8.6-10.2
イオン化可能なカルシウム	>5.5	>5.5	>5.5	>5.5	mg/dL	3.8-4.5
マグネシウム	2.77	2.76	2.75	2.76	meg/L	1.4-2.0
アルカリホスファターゼ	57	47	68	269	U/L	31-142
γ GT (GGTP)	3	5	<5	5	U/L	1-60
AST (SGOT)	7	5	5	33	U/L	1-47
ALT (SGPT)	5	<5	<5	7	U/L	1-54
LD	56	<50	50	510	U/L	110-250
総ビリルビン	0.19	0.24	0.22	0.13	mg/dL	0.2-1.4
直接ビリルビン	0.04	0.07	0.07	0.04	mg/dL	0.0-0.3
グルコース	67	38	39	88	mg/dL	65-125
BUN(血液尿素窒素)	15	15	15	15	mg/dL	6-23
クレアチニン	2.98	3.08	3.1	2.77	mg/dL	0.1-1.7
BUN/クレアチン比率	5.0	4.9	4.8	5.4	---	7.0-20.0
総タンパク質	3.6	3.6	3.5	3.7	gm/dL	6.4-8.1
アルブミン	2.7	2.7	2.8	2.8	gm/dL	3.7-5.1
グロブリン	0.9	0.9	0.7	0.9	gm/dL	2.1-3.6
アルブミン/グロブリン比率	3.0	3.0	4.0	3.1	---	1.1-2.3
コレステロール	30	30	32	30	mg/dL	<200
HDL コレステロール	28	30	30	27	mg/dL	39-90
コレステロール/HDL 比率	1.07	1.00	1.07	1.11	---	<4.5
トリグリセリド	72	74	72	73	mg/dL	30-200
鉄	213	217	214	186	meg/dL	40-175
血漿ヘモグロビン	13.3	11.5	13.7	22.6	mg/dL	3.4-20.5

【０１５３】

これらの結果は、γ照射工程が、ＦＢＳのほとんどの生化学的構成要素の濃度に、著しく影響を与えなかったことを示す。これらの結果はまた、スプレー乾燥の際に、ＦＢＳの成分の幾つか（アルカリホスファターゼ、ＡＳＴおよびＬＤ、および多分グルコース）の濃度が、開始液体ＦＢＳにおけるそれらの濃度と比較して、著しく減少させられることも示す。

【０１５４】

実施例１６：粉末血清の性能に対する照射の影響

乾燥粉末血清の細胞増殖を支持する能力に対するγ照射の影響を調べるため、様々な条件下において照射されたスプレー乾燥ＦＢＳのサンプルを、培養培地を補足するために使用し、これらの培地において付着細胞および懸濁細胞を第三継代まで増殖させた。モデル懸濁細胞として、ハイブリドーマ系列ＳＰ２／０およびＡＥ－１を用いた一方、典型的な付着細胞として、ＶＥＲＯおよびＢＨＫの培養を用いた。上記の実施例１４において概説される一般的手法に従い、被験血清または対照血清（スプレー乾燥されたが照射されていない）を含む培地において、細胞を第三継代まで培養した。各継代の時点において、細胞を採集し、継代培養した一方、生存能のある細胞数／ｍｌについて、上記のようにアリコートを計測した。各時点における結果は、液体ＦＢＳを補足された培地において得られた生存能のある細胞数に対するパーセンテージとして表され、図１７Ａ、図１７Ｂ、図１７Ｃおよび図１７Ｄにおいて示される。

【０１５５】

これらの研究結果から、幾つかの推論を引き出すことができる。第一に、ＦＢＳのγ照射は、懸濁細胞および付着細胞の増殖を支持する、スプレー乾燥ＦＢＳの能力を低下させないと考えられる（各図において、照射データセットを非照射データセットと比較する）。実際には、ＢＨＫ細胞（図１７Ｄ）は、－７０℃において照射された粉末ＦＢＳを含む培地において、照射されていない血清におけるものよりも優れた増殖を示した。第二に、おそらくＶＥＲＯ細胞を例外として、－７０℃において照射された血清は、室温において照射されたものよりも、細胞増殖を支持する能力において、より勝って機能すると考えられる（図１７Ｃ）。最後に、これらの研究の結果は、非常に細胞タイプ特異的であった：懸濁細胞（図１７Ａおよび図１７Ｂ）は、照射スプレー乾燥ＦＢＳおよび非照射スプレー乾燥ＦＢＳにおいて、付着細胞（図１７Ｃおよび図１７Ｄ）よりも、より優れた増殖を示した；および、付着細胞の中でも、ＢＨＫ細胞（図１７Ｄ）は、ＶＥＲＯ細胞（図１７Ｃ）よりも、スプレー乾燥ＦＢＳにおいてより優れた増殖を示した。

【０１５６】

これらの結果は、本発明の方法において、ＦＢＳのようなバルク粉末血清の調製における滅菌技術として、γ照射を使用できることを示す。さらに、上記の実施例１４においてトランスフェリンについて報告されたものとは異なり、これらのデータは、細胞の増殖を支持する血清の能力を維持するためには、血清の照射のための最適温度が室温未満である可能性が高いことを示唆する。

【０１５７】

実施例１７：リン酸平衡化により自動的にｐＨを調整される粉末培養培地の生産

上記にて言及されるように、商品として入手可能な典型的な哺乳動物細胞培養粉末培地は、１×液体を調製する時点で、１つもしくは複数の緩衝塩（例えば炭酸水素ナトリウム）の添加を必要とし、その後ｐＨを調整することによって、溶液が使用のために適切なｐＨとなる。しかし、本発明の方法は、（上記の実施例２において説明されるように）再構成後の炭酸水素ナトリウムの添加、および、ｐＨ調整の必要性のいずれをも除くために使用することができる。本発明の本局面においては、１つもしくは複数の緩衝塩を含む乾燥粉末培地に酸または塩基（必要に応じる）を導入するために、流動層技術を使用することができる。本発明の本局面に従い、任意の緩衝塩またはその組み合わせ、および任意の酸または塩基を、最終的な再構成細胞培養培地において望ましいｐＨおよび緩衝能に応じて使用することができる。

【０１５８】

本発明の方法に従って、乾燥粉末培地（ＤＰＭ）に炭酸水素ナトリウムが粉末として直接加えられる場合、末端使用者は、単に溶媒（例えば水）を加え、混合するだけで、既に炭酸水素塩（上記を参照のこと）を含む、および、即時の使用のために適切なｐＨである溶液－即ち、本発明の「自動ｐＨ」または「自動的にｐＨを調整する」培養培地を得ることができる。どれほどのｐＨ調整が必要とされるのかを決定するため、幾つかの段階を行うべきである：

（１）～９５０ ｍｌの溶媒（例えば水）をビーカー内に入れる。ＤＰＭを（製造業者の

使用説明書に従った量、または本明細書において言及されるような、当技術分野において知られる処方の仕様に従った量にて）溶媒に加え、十分に混合し１Ｌとする。この場合、リットル当たりにどれほどのＤＰＭを加えるべきかを決定する上で、炭酸水素ナトリウムの重量も考慮せねばならない。ＤＰＭが、滴定にて加えられるようなリン酸ナトリウム緩衝液もＨＥＰＥＳ緩衝液も含むべきではないとしても、炭酸水素ナトリウムは含むべきである。

（２）次の段階は、一塩基リン酸または二塩基リン酸が望ましい最終ｐＨを与えるかどうかを決定するものである。これは、必要とされるｐＨの調整がより塩基性のレベルに向かわせるのか（二塩基リン酸の必要性を示す）、または、より酸性のレベルに向かわせるのか（一塩基リン酸の必要性を示す）による。望ましいｐＨを得るために、ある量（最終濃度範囲約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、約０．２ｍＭ～約９ｍＭ、約０．３ｍＭ～約８．５ｍＭ、約０．４ｍＭ～約８ｍＭ、約０．５ｍＭ～約７．５ｍＭ、約０．６ｍＭ～約７ｍＭ、および好ましくは約０．７ｍＭ～約７ｍＭ）の、一塩基リン酸塩または二塩基リン酸塩を連続的に加える。リン酸ナトリウムの総モル量は一定に維持されるべきであるが、溶液中の分子種は、溶液の最終（望ましい）ｐＨにより決定されるものと同じであるため、一塩基または二塩基のいずれによる緩衝作用も、与えられたｐＨにおいては同様の緩衝作用動態をもたらす（図１８を参照のこと）。

（３）培地がＨＥＰＥＳ緩衝液系を含む場合、適切な（望ましい）最終ｐＨに到達させるため、酸形態（より酸性のｐＨのため）またはナトリウム形態（より塩基性のｐＨのため）のいずれかの、正確なモル量のＨＥＰＥＳを加える。

（４）次の段階は、モル重量ベースにおいて、一塩基リン酸ナトリウムを一塩基リン酸カリウムと交換するものである（リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムのいずれかの使用により、同一の緩衝特性がもたらされる）。この交換を行うために、上記の段階２において計算された一塩基リン酸ナトリウムの量を等量のリン酸カリウムに置き換え、その後、最終培地を処方するために使用する。したがって、本発明の本局面においては、上記の段階２において計算された量の一塩基リン酸ナトリウムは、実際には、ｐＨを調整するために培地に加えられない；その代わりに、この量は単に計算され、その後、最終培地のｐＨの調整には、計算された量のリン酸カリウムが使用される。これは、その後の二酸化炭素のガス発生が除かれるまたは最小化されるように行われる。（全体として、処方中に同じモル比率のカリウム対ナトリウムを存在させるために、最終１×モル量が同じになるように、処方中の塩化カリウム量を逆調整することが必要である。これによって、同一の重量オスモル濃度に達するように、少量の塩化ナトリウムを用いて調整する必要が生じる可能性もある。）溶液がその最終形態になった時点で、（実施例１において説明されるような）流動層技術を用いた凝集、スプレー乾燥（実施例８を参照のこと）、または当業者に知られる凍結乾燥技術のいずれかによって、それが粉末になるまで乾燥させる。

【０１５９】

上記は、炭酸水素ナトリウムを粉末培地に含むために推奨される基本的な操作であるが、さらなる考察も心に留めておくべきである：

１．培地成分の無水形態のみを使用すべきである

２．無水形態が入手可能でない場合、「イオン交換」を用いることを考える（例えば$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$または一水和物；$ZnCl_2$を硫酸ナトリウムと共に用い、処方において示されるように加えられるＮａＣｌの量から化学量論的に正確な量のＮａＣｌを減じることも考慮に入れる）；

３．化学物質の塩酸抱合体は使用しないこと：遊離塩基（例えば塩酸アルギニンの代わりに、真の望ましい重量に修正されたアルギニン）を使用する；

４．ピロー形成を引き起こし得るため、一塩基リン酸ナトリウムは全く用いるべきではない。代わりに、ピロー形成を引き起こさない一塩基リン酸カリウム（KH_2PO_4）を用いるべきである。これら双方の化学物質の緩衝反応は同一である。他の塩類形態において処方に加えられるカリウムの量は、ここにて加えられるKH_2PO_4量に対応して減じるべきである。同様に、リン酸ナトリウムを用いた式の重量オスモル濃度が、リン酸カリウ

ムを用いた式の重量オスモル濃度と等しくなるように、余分のＮａＣｌが必要とされる可能性もある。
５．二塩基リン酸ナトリウム（Na_2HPO_4）は、「ピロー形成」させず、処方における使用のために許容できる。
６．炭酸水素塩によって「ピロー形成する」傾向が増加するため、自動調整機構のために、流動層におけるＨＣｌの「スプレー添加」を使用しないこと。代わりに、ＤＰＭにおけるリン酸平衡によって再構成培地の最終ｐＨを調整する（Na_2HPO_4はｐＨを上げる一方、KH_2PO_4はｐＨを下げる。上記に示されるように、「イオン平衡」の使用により、同じイオン組成の１×培地がもたらされる。）
７．（ＣＤ－ＣＨＯのためのシステインのように）流動層のためのスプレー添加物としてアミノ酸を加える必要がある場合、可溶性の問題のため、アミノ酸を溶解するためにｐＨを下げずに、可溶化に必要とされる最低限までｐＨを上げる（例えば、システインのためにはｐＨ １０．６６）。
８．成分を無水物として得ることができない場合、または「イオン交換」が通用しない場合、化学物質を溶解し、凝集を介して培地にスプレーすることができる：結晶成分中の水分は、凝集中には乾燥しないが、溶解によってその水分が解離されれば、それはスプレー工程および蒸発乾燥工程によってその後ＤＰＭから除かれる。
９．加速有効期間試験（コリンクロリドのように湿性または粘性であると考えられる任意の化学物質について、等量の炭酸水素塩を含む、密封パウチにおいて３７℃）を用いて調べる。許容される有効期間試験プロトコールの一例は、以下の通りである：
（ａ）１０ ｇの被験化合物を乳鉢に置き、すり潰す；１０ ｇの$NaHCO_3$を加える；
（ｂ）混合物を摩砕し、粒子サイズを減少させ、約３０秒間ブレンドする；
（ｃ）ブレンドされた混合物をフォイルパックに加える；パックの開口端を密封する；
（ｄ）パックを３７℃のインキュベーターに入れ、２４時間に渡って、「ピロー」形成（即ち、$NaHCO_3$のガス発生によるパックの膨脹）について観察する。
ガスが発せられる場合は、その成分をスプレー添加溶液に溶解および添加する。
１０．コリンクロリドを中性可溶性スプレー添加物に入れる。
スプレー乾燥または凝集の実施後に粉末が一旦収集されれば、それが適切な「乾燥」包装および条件に維持されている限り、いつでもそれを溶媒（例えば水）によって再構成することができる。許容されるまたは「適切な」乾燥包装の例には、フォイル包装、ポリエチレン袋、密封プラスチック（特にポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）および同様のもの）のような、保存の際に、包装を通した水の浸透および／または水の蒸発を遅らせる、または防ぐ、任意の包装が含まれる。適切な保存条件の例には、低減された、または弱められた照明下での、約０～約２５℃、好ましくは約２～約２０℃、約２～約１５℃、約２～約１０℃、または約２～約８℃における保存が含まれる。そのような条件下においては、本発明の培地の最低限の有効期間は、およそ１年間（約２～約８℃において保存された）、またはおよそ６ヶ月間（約２０～約２５℃（室温）において保存された）である。

【０１６０】

使用のためには、粉末は、適切な溶媒（例えば水）によって簡単に再構成される；再構成の際直ちに、培地は適切なｐＨとなり、適切な緩衝作用動態を有するため、ｐＨの調整は必要ない（図１９Ａおよび図１９Ｂを参照のこと）。したがって、本発明は、乾燥粉末培地の再構成により作製される液体培地のｐＨがｐＨ調整を必要としない、自動的にｐＨを調整する乾燥粉末培地を提供する。

【０１６１】

実施例１８：μｇ／ｍｌまたはμｇ／Ｌ量における培地成分のスプレー添加
最初に化学物質の濃縮物を作製し、その後それらを粉末培地造粒にスプレーすることによって（その全体を参照として本明細書に組み入れられる、１９９８年２月１３日に出願された、米国特許出願第０９／０２３，７９０号を参照のこと）、（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、ニッケル、カリウム、スズ、および亜鉛のような）微量元素、

（Ａ、$Ｂ_1$、$Ｂ_2$、$Ｂ_6$、$Ｂ_{12}$、Ｃ、Ｄ、Ｅ、ＫおよびＨ（ビオチン）のような）ビタミン、（プロテアーゼ阻害剤、ヌクレオシド類似体および同様のもののような）ウイルス阻害剤、（ＥＧＦ、ａＦＧＦ、ｂＦＧＦ、ＨＧＦ、ＩＧＦ－１、ＩＧＦ－２およびＮＧＦのような）成長因子等のような化学物質を、標準粉末培地に加えることができる。その結果生じる粉末はその後、（計量およびフィッツミリング後に必要とされる）ブレンドのためにバルクのものと同じ一般サイズ範囲における粒子サイズにまで（例えばフィッツミルを用いて）粉砕することができる。この分は、その後、バルク粉末培地と組み合わせ、共に粉砕し、均質に混合された粉末培地を作製することができる。または、粉末培地の成分は、適合性の化合物または成分の混合物群に部分群化し、それをその後、処方の直前にブレンドすることができる、および、低レベルの成分の濃縮物を、ブレンドされた混合物にスプレーすることができる。このアプローチは、粉末培地処方において混合され、共に長期間保存された場合に、不適合性であり得る成分（例えば、長期間共に保存した際に不溶性の複合体を形成する、システインとグルタミン）を扱う場合に特に好都合である。（培養培地成分の部分群化の利益についてのより詳細な説明については、下記の実施例１９、および、その開示の全体が参照として本明細書に組み入れられる、共通して所有される米国特許第５，４７４，９３１号および同第５，６８１，７４８号を参照のこと）。少量にて化学物質をスプレー添加できることは、少量で存在し、別個に加えることが不都合であるような成分を含む培地の開発において特に役立つ。したがって、本乾燥粉末培地は使用の準備ができているものである。

【０１６２】

実施例１９：凝集中の有害な相互作用を避けるための、成分の部分群化

培地の成分の幾つかは、不適合性である可能性があり、粉砕および凝集以前に、それらが計量され、その後共に保持された場合、互いに有害に相互作用を引き起こし得る。例えば、システイン粉末とグルタミン粉末が混合された場合、リン酸塩がカルシウムまたはマグネシウムイオンを含む塩類と混合された場合、リン酸塩（特にその一塩基形態）がコリンクロリドと混合された場合、およびグルタチオンがアミノ酸と混合された場合に、有害反応が認められた。その上、酸性成分（例えばある緩衝塩、ビタミンおよび同様のものの酸性形態）は、成長因子または血清のようなタンパク質成分を変性させる可能性がある。したがって、これらの特定の成分は、部分群化することができる（培養培地、補足物および緩衝液の成分の部分群化の方法を説明する、およびその特許開示の全体が参照として本明細書に組み入れられる、共通して所有される米国特許第５，４７４，９３１号および同第５，６８１，７４８号を参照のこと）、および、部分群として共に凝集することができる。特定の部分群には、酸可溶性の部分群、弱酸－塩基可溶性の部分群、グルタミンを含む部分群、アルコール可溶性部分群、アルカリ可溶性部分群、および補足物を含む部分群が含まれる。別個の部分群の凝集後、少量の要素のスプレー添加について実施例１８において説明されるように、それらを共に混合することができる。

【０１６３】

または、濃縮物は、既に粉砕されたバルク粉末に直接スプレーすることができる。このアプローチにおいては、各部分群は（例えばフィッツミリングを介して）粉砕され、その後、他の部分群と同時に流動層装置内に入れられ、その結果、部分群が凝集中に共に混合される；そして、個々の不適合性成分が凝集される前の非常に短い時間のみ混合されるように、濃縮物を、バルク粉末に連続してスプレーすることができる。その後、凝集された粉末を、本明細書にて説明されるように収集し、個々の成分、さもなくば不適合性の成分間において生じる有害反応がないまま、再構成および使用時まで保存することができる。

【０１６４】

理解を明らかにさせるための例証および実施例によって、本発明については、これまでに幾らかの詳細を完全に説明されており、本発明の範囲またはそのいかなる特定の態様にも影響を与えることなく、条件、処方および他のパラメータの、広いおよび同等な範囲内において本発明を改変または変化させることによって、同じことが実行できること、および、そのような改変または変化が添付の特許請求の範囲内に包含されることが、当業者には

明白となる。

【０１６５】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明が属する技術分野における当業者の技術のレベルに相当し、各個別の刊行物、特許または特許出願が特定的におよび個々に、参照として組み入れられると示されたかのように、同程度に参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の方法によって粉末形態に調製されたウシ胎児血清（ＦＢＳ）サンプル（図Ａ）、および従来的な液体ＦＢＳサンプル（図Ｂ）の、ＳＤＳ－ＰＡＧＥのデンシトメーターによるスキャンのヒストグラムである。

【図２】本発明の凝集法によって粉末形態に調製された２％（ｗ／ｖ）のＦＢＳを補足した、ダルベッコの改良ＭＥＭ培地（ＤＭＥＭ）における、ＳＰ２／０細胞の増殖の折れ線グラフを合わせたもの（図Ａ）、および、継代の達成（図Ｂ）である。

【図３】本発明の方法に従ったスプレー乾燥によって調製された粉末ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（図Ａ）、または、標準液体ＦＢＳ（図Ｂ）の、分光測光スキャン（λ＝ ２００～３５０ ｎｍ）のヒストグラムを合わせたものである。

【図４】炭酸水素ナトリウムを添加して、または添加せずに、本発明の方法によって、またはボールミリングによって調製された、様々な乾燥粉末培地（ＤＰＭ）の、異なる２日間（図Ａおよび図Ｂ）における、ｐＨ滴定（緩衝能）を示す折れ線グラフを合わせたものである。

【図５】Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ（商標）（図Ａ）、またはＤＭＥＭ（図Ｂ）の、（水における）溶解速度に対する凝集の影響を示す棒グラフを合わせたものである。培地は、指示されるように、水またはＦＢＳによって凝集された。

【図６】共に２％のＦＢＳを含む、凝集Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ（商標）（図Ａ）またはＤＭＥＭ（図Ｂ）における、ＳＰ２／０細胞の７日間に渡る増殖を示す折れ線グラフを合わせたものである。

【図７】１０％のＦＢＳを含む、凝集ＤＭＥＭ における、ＳＰ２／０細胞（図Ａ）、ＡＥ－１細胞（図Ｂ）およびＬ５．１細胞（図Ｃ）の７日間に渡る増殖を示す折れ線グラフを合わせたものである。

【図８】２％のＦＢＳを補足した、水またはＦＢＳのいずれかにより凝集されたＯｐｔｉ－ＭＥＭ Ｉ（商標）（図Ａ）またはＤＭＥＭ（図Ｂ）における、ＳＰ２／０細胞の継代の達成を示す折れ線グラフを合わせたものである。

【図９】１０％のＦＢＳを補足した、ＦＢＳによって炭酸水素ナトリウムと共に凝集されたＤＭＥＭ における、ＳＰ２／０細胞（図Ａ）、ＡＥ－１細胞（図Ｂ）およびＬ５．１細胞（図Ｃ）の継代の達成を示す折れ線グラフを合わせたものである。

【図１０】水によって再構成された標準粉末培養培地（対照培地）における、または、本発明の方法に従って大規模量にて調製された凝集粉末培養培地における、４回の継代に渡る、ＳＰ２／０細胞の増殖を示す折れ線グラフである。結果は、対照培地（□）、水によって凝集された本発明の粉末培養培地（◆）、および、水によって凝集された本発明の自動ｐＨ粉末培養培地（炭酸水素ナトリウムを含む）（黒ぬり四角）について示される。

【図１１】２％（黒ぬり三角）または１０％（◆）の液体ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含む培地、または、本発明のスプレー乾燥法によって調製された２％（×）または１０％（黒ぬり四角）の粉末ＦＢＳを含む培地において、６日間または７日間に渡って培養されたＡＥ－１細胞の増殖を示す折れ線グラフである。重複実験について、図Ａおよび図Ｂにて示される。

【図１２】２％（黒ぬり三角）または１０％（◆）の液体ＦＢＳを含む培地、または、本発明のスプレー乾燥法によって調製された、２％（×）または１０％（黒ぬり四角）の粉末ＦＢＳを含む培地において、７日間に渡って培養された、ＳＰ２／０細胞の増殖を示す折れ線グラフである。重複実験について、図Ａおよび図Ｂにて示される。

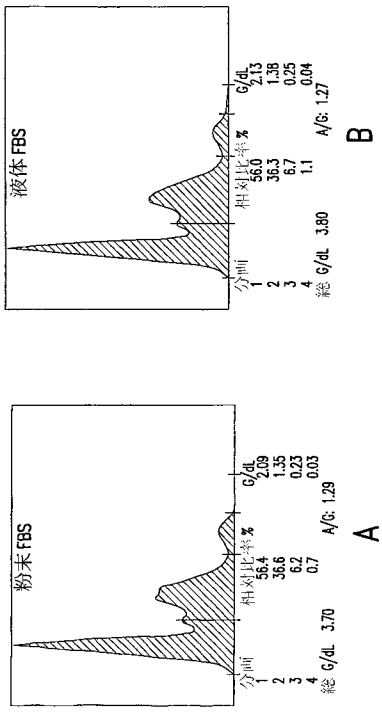
【図１３】５％の液体ＦＢＳを含む培地（◆）、または、本発明のスプレー乾燥法によっ

て調製された５％の粉末ＦＢＳを含む培地（黒ぬり四角）における、４回の継代に渡るＡＥ－１細胞の増殖の折れ線グラフである。
【図１４】５日間に渡るＳＰ２／０細胞の増殖に対する、γ照射および凝集の影響を示す折れ線グラフである。
【図１５】凝集培養培地におけるＶＥＲＯ細胞の増殖に対する、γ照射の影響を示す棒グラフである。
【図１６】４回の継代に渡る、２９３細胞の増殖を支持するトランスフェリンの能力に対する、γ照射の影響を示す一連の折れ線グラフである。各グラフにおいて、標準の血清フリーの２９３培地（黒塗りひし形）、トランスフェリンを含まない培地（黒ぬり四角）、－７０℃（▲）もしくは室温（＊）にてγ照射された粉末トランスフェリンを含む培地、または、γ照射されていないが－７０℃（×）もしくは室温（●）にて保存されていた粉末トランスフェリンを含む培地において、細胞は培養された。各データ計測点についての結果は重複フラスコの平均である。
図Ａ：継代１の細胞；
図Ｂ：継代２の細胞；
図Ｃ：継代３の細胞；
図Ｄ：継代４の細胞。
【図１７】第一（Ｐ×１）、第二（Ｐ×２）および第三（Ｐ×３）継代における、足場非依存性細胞（図Ａおよび図Ｂ）および足場依存性細胞（図Ｃおよび図Ｄ）の増殖を支持するＦＢＳの能力に対する、異なる照射条件下におけるγ照射の影響を示す一連の棒グラフである。
図Ａ：ＳＰ２／０細胞；
図Ｂ：ＡＥ－１細胞；
図Ｃ：ＶＥＲＯ細胞；
図Ｄ：ＢＨＫ細胞。
【図１８】様々な容量の５Ｎ ＨＣｌを加えた際の、二塩基形態（ｘ－－－ｘ）または一塩基形態（ｏ－－－ｏ）における、５．１ｍＭのリン酸ナトリウム溶液の緩衝作用動態を描く折れ線グラフである。
【図１９】$NaHCO_3$を添加した、または添加しない、様々な形態におけるＲＰＭＩ－１６４０培養培地についての緩衝作用動態を描く一連の折れ線グラフである。
図Ａ：液体培地対粉末培地。
◆－－－◆：$NaHCO_3$を含む液体ＲＰＭＩ－１６４０（この線は$NaHCO_3$を含む粉末ＲＰＭＩ－１６４０についてのものと重なることに注意する）；
■---■

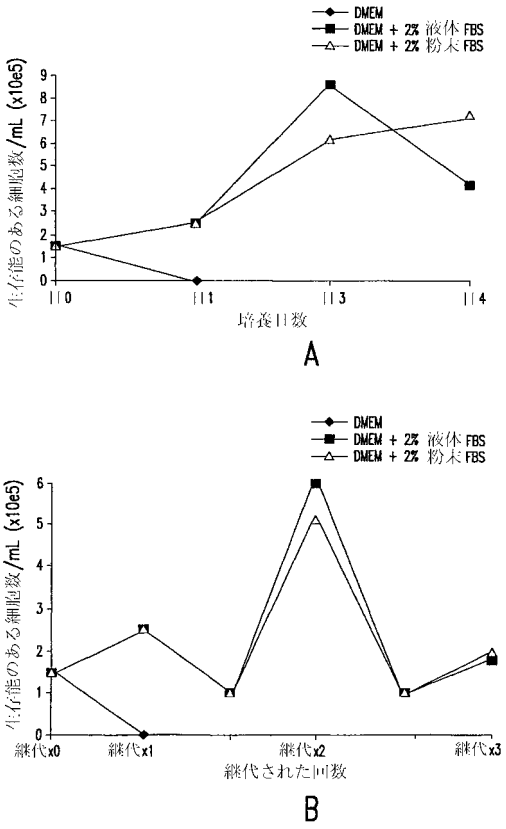
$NaHCO_3$を含まない液体ＲＰＭＩ－１６４０；
▲---▲
$NaHCO_3$を含む粉末ＲＰＭＩ－１６４０（この線は$NaHCO_3$を含む液体ＲＰＭＩ－１６４０についてのものと重なることに注意する）；
ｘ－－－ｘ：凝集されたが自動ｐＨではない、$NaHCO_3$を含む粉末ＲＰＭＩ－１６４０；
＊－－－＊：凝集された、自動ｐＨである、$NaHCO_3$を含む粉末ＲＰＭＩ－１６４０；
図Ｂ：粉砕された、または粉砕されていない粉末培地。
◆－－－◆：粉砕されていない$NaHCO_3$を含む粉砕されたＲＰＭＩ－１６４０（この線は、粉砕された$NaHCO_3$を含む、粉砕されていないＲＰＭＩ－１６４０についてのものと重なることに注意する）；
■---■
$NaHCO_3$を含まない、粉砕されたＲＰＭＩ－１６４０；
▲---▲

粉砕されたＮａＨＣＯ$_3$を含む、粉砕されていないＲＰＭＩ－１６４０（この線は、粉砕されていないＮａＨＣＯ$_3$を含む、粉砕されたＲＰＭＩ－１６４０についてのものと重なることに注意する）；
ｘ－－－ｘ：凝集されたが自動ｐＨではない 、粉砕されたＮａＨＣＯ$_3$を含む粉砕されていないＲＰＭＩ－１６４０；
＊－－－＊：凝集された、自動ｐＨである、粉砕されたＮａＨＣＯ$_3$を含む粉砕されていないＲＰＭＩ－１６４０。

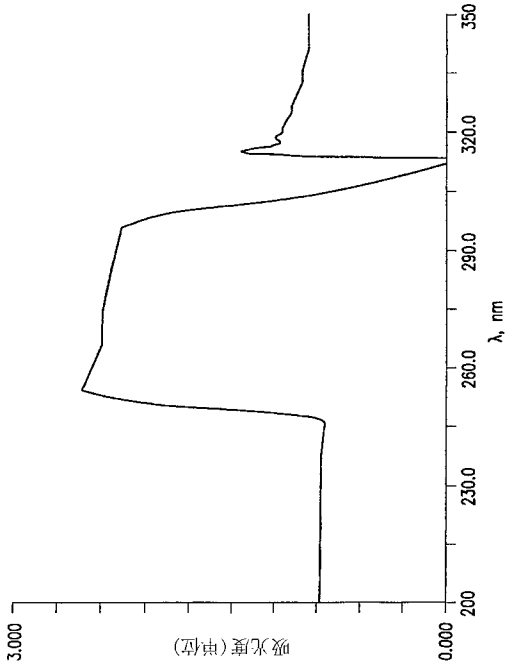
【図１】



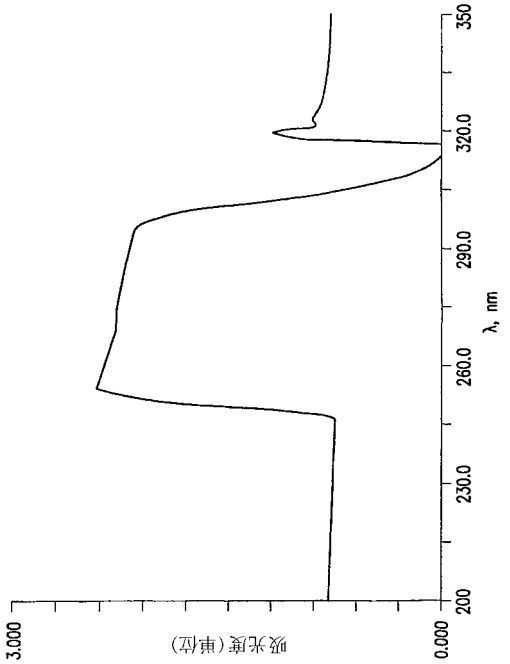
【図２】



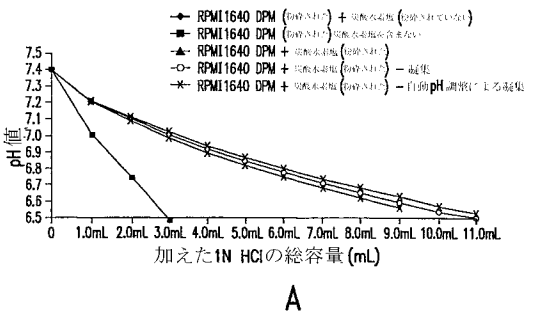
【図３Ａ】



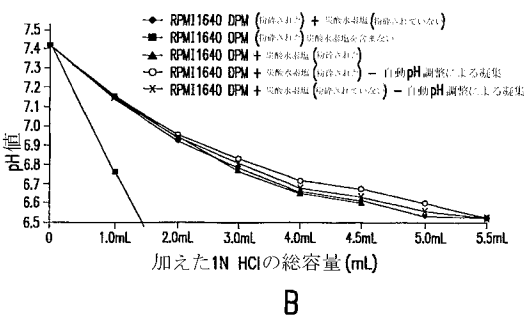
【図３Ｂ】



【図４】

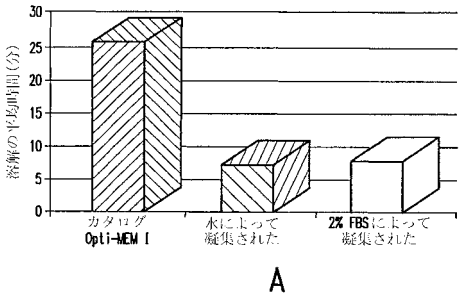


A

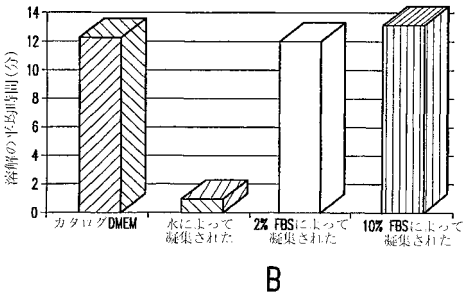


B

【図５】

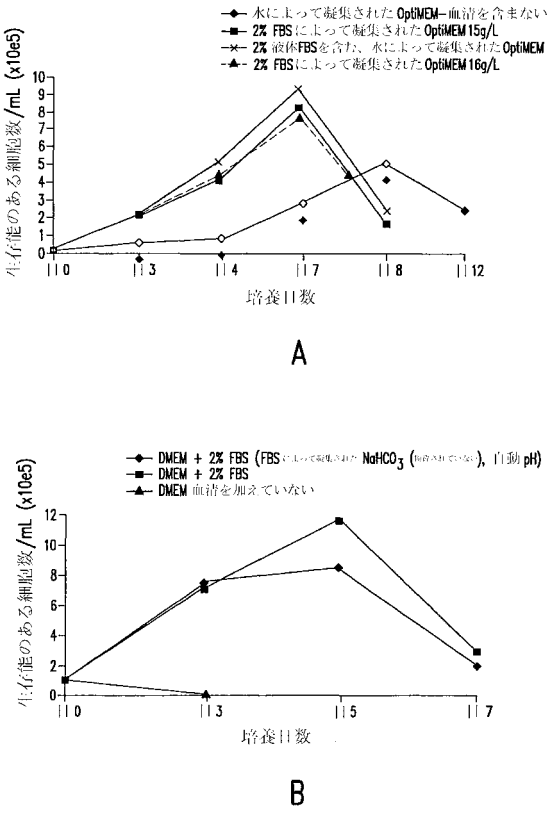


A

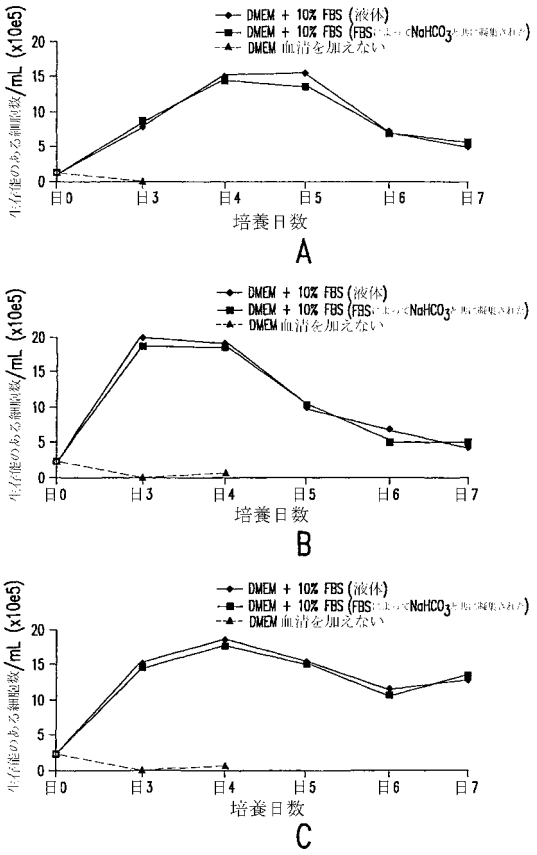


B

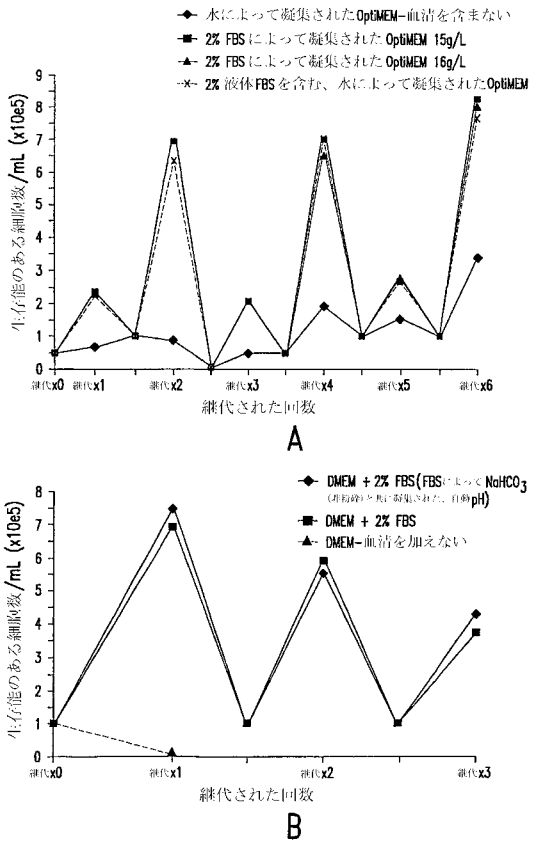
【図６】



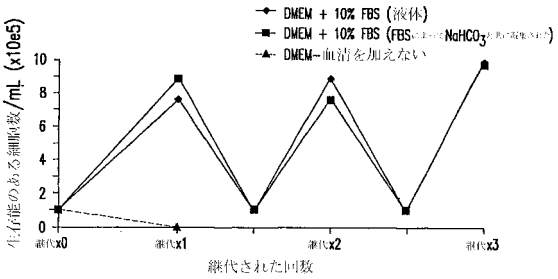
【図７】



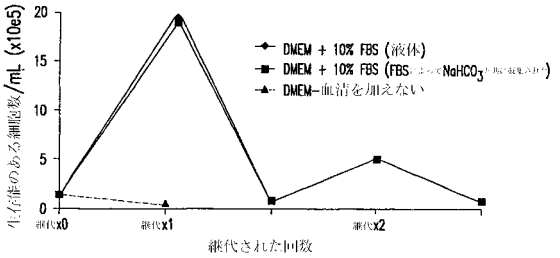
【図８】



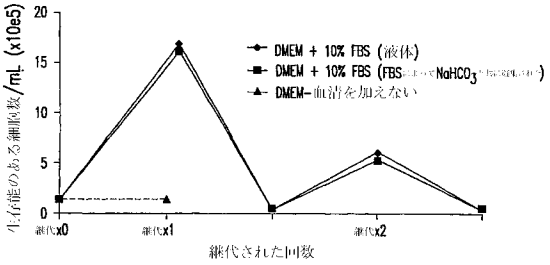
【図９Ａ】



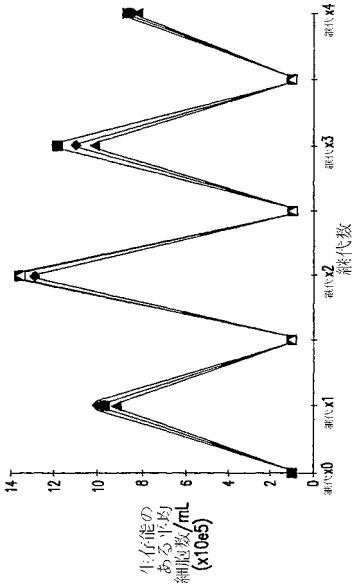
【図９Ｂ】



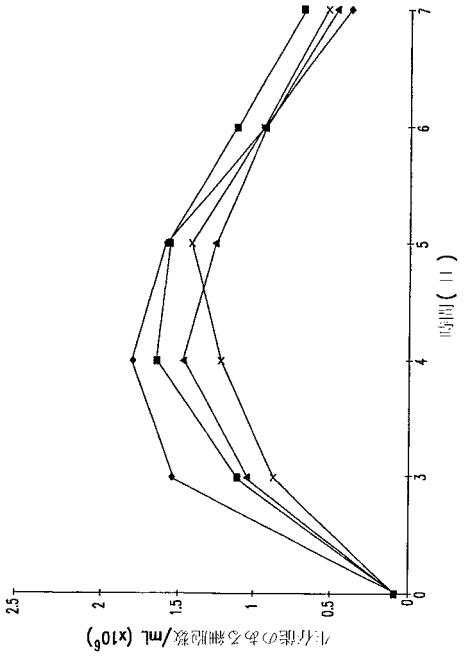
【図９Ｃ】



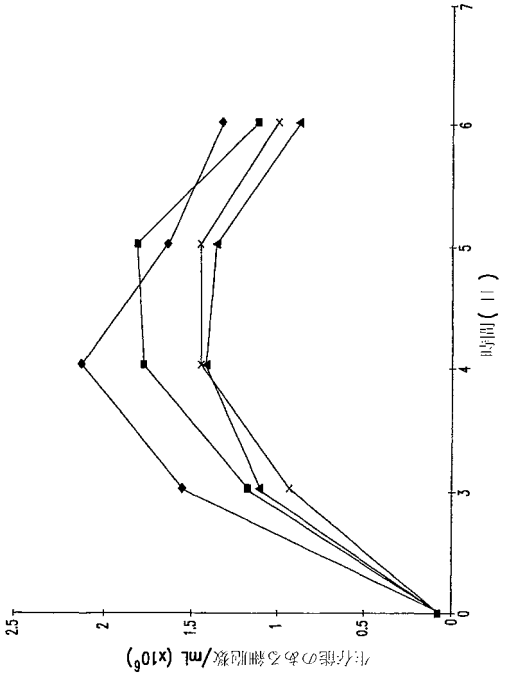
【図１０】



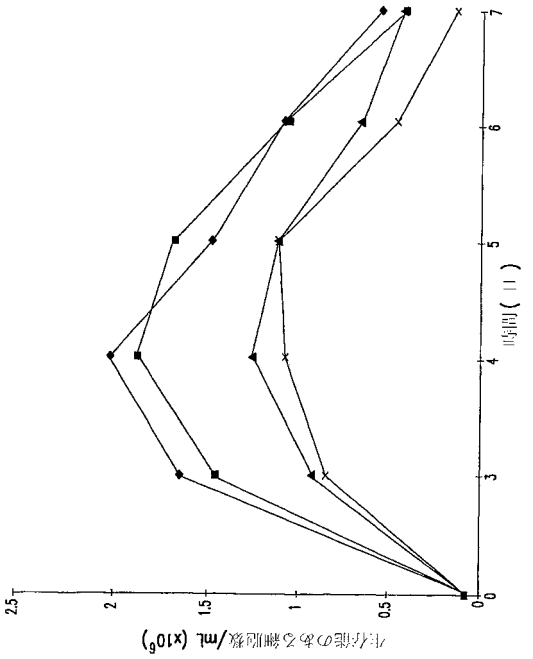
【図１１Ａ】



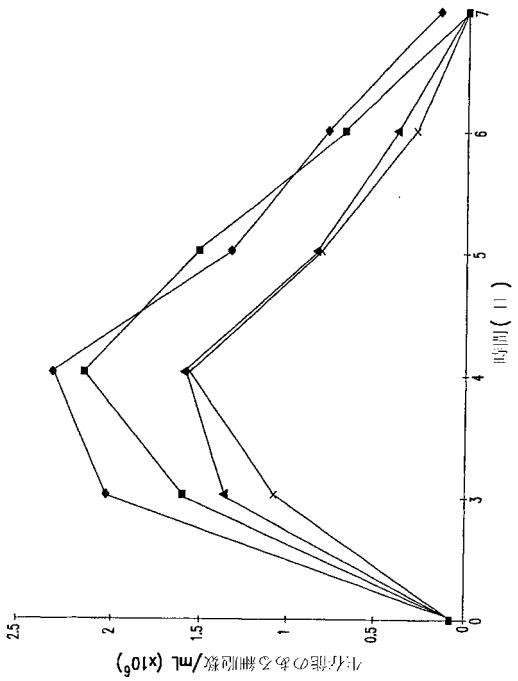
【図１１Ｂ】



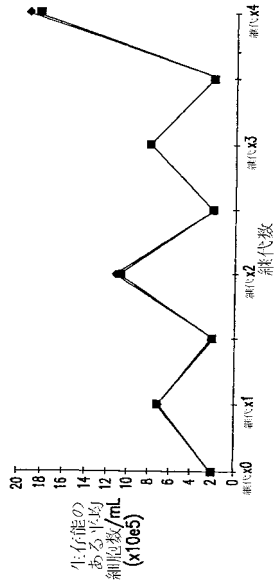
【図１２Ａ】



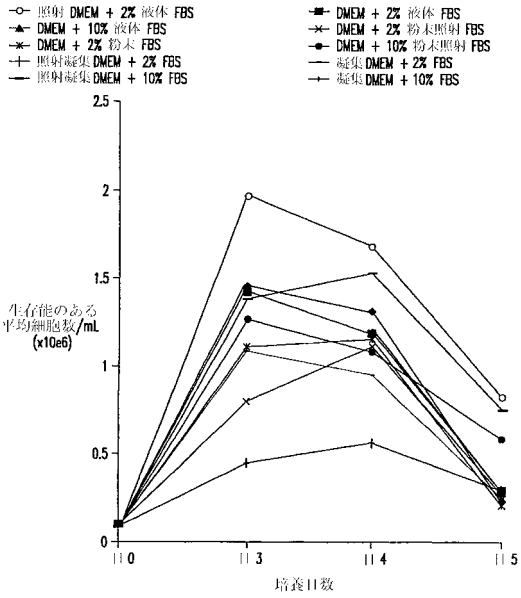
【図１２Ｂ】



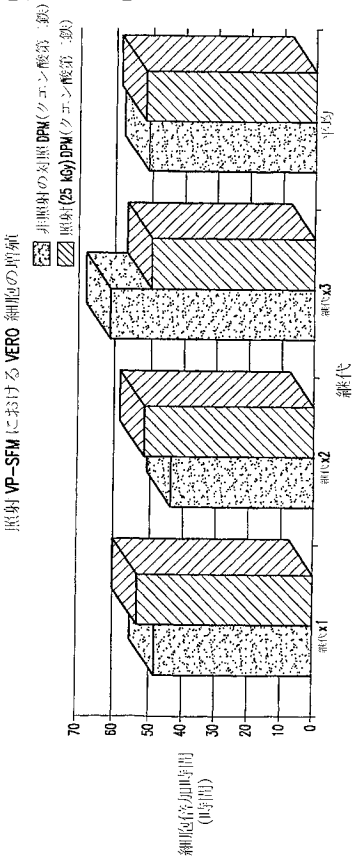
【図１３】



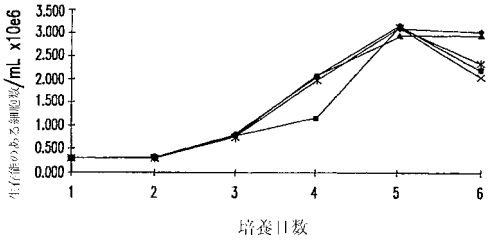
【図１４】



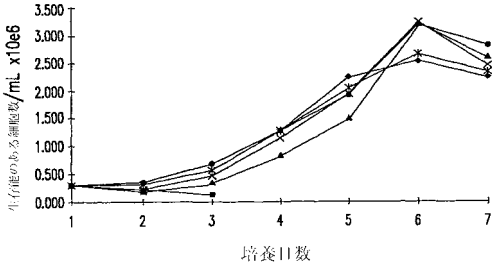
【図１５】



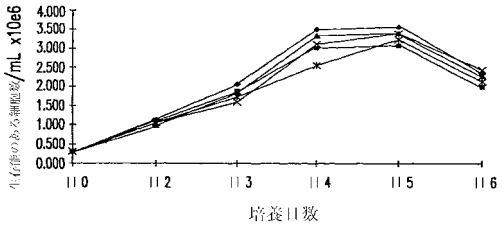
【図１６Ａ】



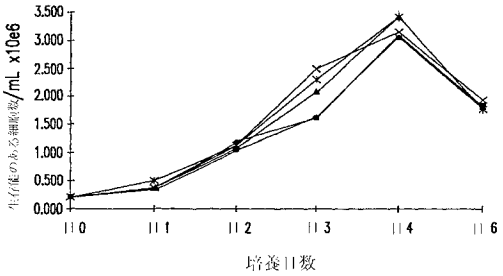
【図１６Ｂ】



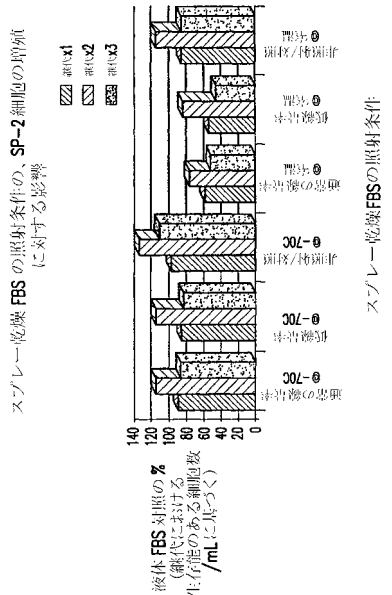
【図１６Ｃ】



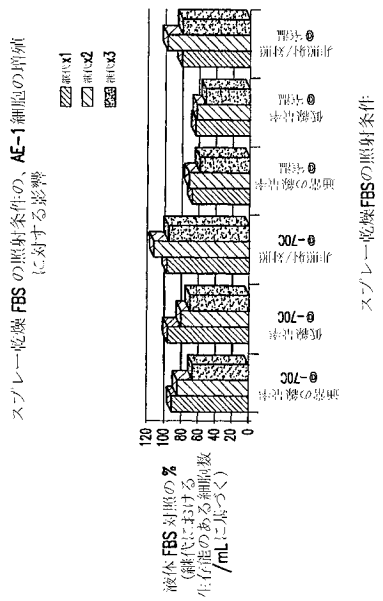
【図１６Ｄ】



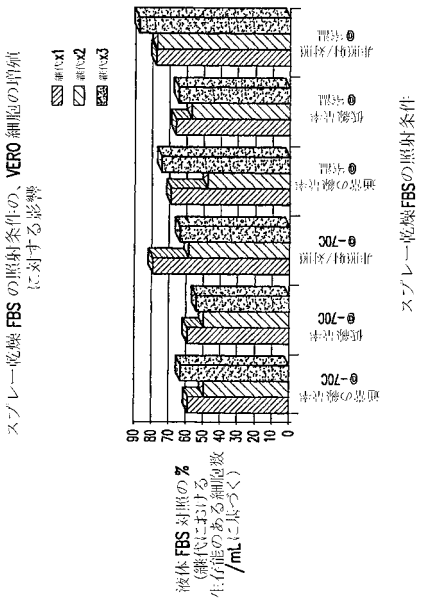
【図１７Ａ】



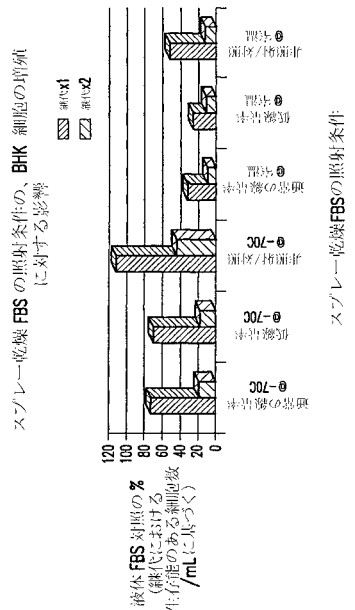
【図１７Ｂ】



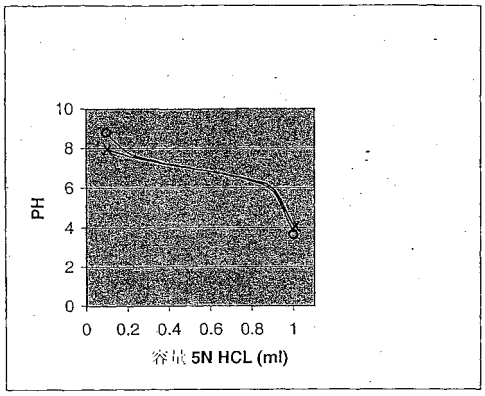
【図１７Ｃ】



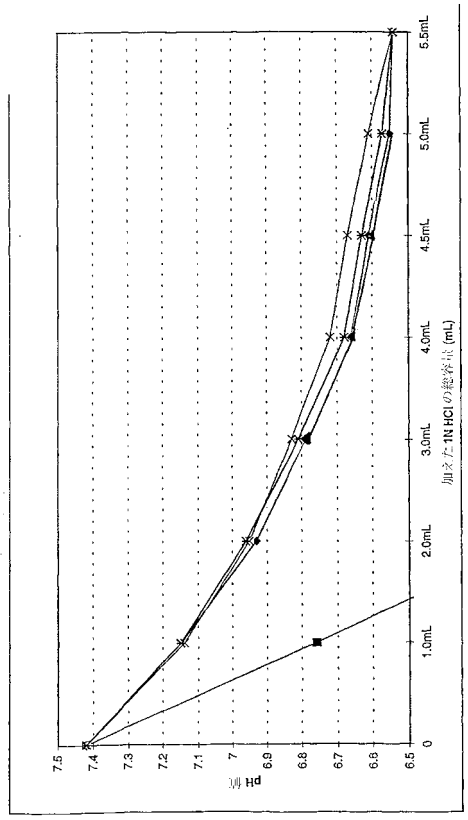
【図１７Ｄ】



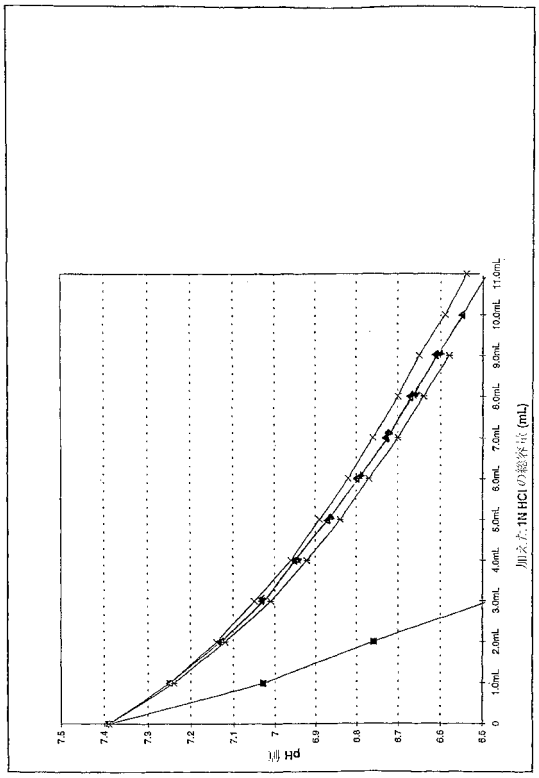
【図１８】



【図１９Ａ】


7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
pH 単位
0
1.0mL
2.0mL
3.0mL
4.0mL
4.5mL
5.0mL
5.5mL
加えた 1N HCl の総容量 (mL)

【図１９Ｂ】


7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
pH 単位
0
1.0mL
2.0mL
3.0mL
4.0mL
5.0mL
6.0mL
7.0mL
8.0mL
9.0mL
10.0mL
11.0mL
加えた 1N HCl の総容量 (mL)

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/36735 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12N

(21) International Application Number: PCT/US01/42982

(22) International Filing Date:
6 November 2001 (06.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/705,940 6 November 2000 (06.11.2000) US

(71) Applicant: **INVITROGEN CORPORATION** [US/US]; 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 (US).

(72) Inventors: **FIKE, Richard, Milton**; 9310 Hunting Valley Road, Clarence, NY 14031 (US). **HASSETT, Richard, Francis**; 32 Neumann Parkway, Tonawanda, NY 14223 (US). **DADEY, Barbara, Mary**; 143 Brooklea Drive, East Aurora, NY 14052 (US). **RADOMINSKI, Robert, Chester**; 756 Creekside Drive, Tonawanda, NY 14150 (US).

(74) Agents: **ESMOND, Robert, W.** et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Suite 600, Washington, DC 20005-3934 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/36735 A2

(54) **Title:** DRY POWDER CELLS AND CELL CULTURE REAGENTS AND METHODS OF PRODUCTION THEREOF

(57) **Abstract:** The present invention relates generally to nutritive (*e.g.*, cell culture) medium, medium supplement, media subgroup and buffer formulations. Specifically, the present invention provides powdered nutritive medium, medium supplement and medium subgroup formulations, particularly cell culture medium supplements (including powdered sera such as powdered fetal bovine seum (FBS)), medium subgroup formulations and cell culture media comprising necessary nutritive factors that facilitate the *in vitro* cultivation of cells. The invention further provides such powdered formulations that produce particular or desired final ionic and/or pH conditions upon reconstitution with a solvent. The invention si also directed to methods of roduction of these formulations, and also provides kits and methods for cultivation of prokaryotic and eukaryotic cells using these formulations. The invention also relates to methods of producing sterile formulations, and to methods for producing dry cell powders. The invention also provides cell, media, media supplement, media subgroup and buffer powders produced by the methods of the invention.

DRY POWDER CELLS AND CELL CULTURE REAGENTS AND METHODS OF PRODUCTION THEREOF

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

The present invention relates generally to cells, nutritive media, media supplements, media subgroups and buffer formulations. Specifically, the present invention provides dry powder nutritive medium formulations, particularly cell culture medium formulations, comprising all of the necessary nutritive factors that facilitate the *in vitro* cultivation of cells, and methods of production of these media formulations. The invention also relates to methods of producing dry powder media supplements, such as dry powder sera (*e.g.*, fetal bovine serum). The invention also relates to dry powder media, media supplement, media subgroup and buffer formulations that produce particular ionic and pH conditions upon rehydration, without the need for adjustment of such conditions prior to use. The invention also relates to methods of producing dry powder cells, such as prokaryotic (*e.g.*, bacterial) and eukaryotic (*e.g.*, fungal (especially yeast), animal (especially mammalian) and plant cells). The invention also relates to methods of preparing sterile dry powder nutritive media, media supplements (particularly dry powder sera), media subgroups and buffer formulations. The invention also relates to dry powder nutritive media, media supplements, media subgroups, buffer formulations and cells prepared by these methods. The invention also relates to kits and methods for cultivation of prokaryotic and eukaryotic cells using these dry powder nutritive media, media supplements, media subgroups and buffer formulations.

Related Art

Cell Culture Media

Cell culture media provide the nutrients necessary to maintain and grow cells in a controlled, artificial and *in vitro* environment. Characteristics and compositions of the cell culture media vary depending on the particular cellular requirements. Important parameters include osmolality, pH, and nutrient formulations.

Media formulations have been used to cultivate a number of cell types including animal, plant and bacterial cells. Cells cultivated in culture media catabolize available nutrients and produce useful biological substances such as monoclonal antibodies, hormones, growth factors, viruses and the like. Such products have therapeutic applications and, with the advent of recombinant DNA technology, cells can be engineered to produce large quantities of these products. Thus, the ability to cultivate cells *in vitro* is not only important for the study of cell physiology, but is also necessary for the production of useful substances which may not otherwise be obtained by cost-effective means.

Cell culture media formulations have been well documented in the literature and a number of media are commercially available. In early cell culture work, media formulations were based upon the chemical composition and physicochemical properties (*e.g.*, osmolality, pH, etc.) of blood and were referred to as "physiological solutions" (Ringer, S., *J. Physiol.*. *3*:380-393 (1880); Waymouth, C., In: *Cells and Tissues in Culture*, Vol. 1, Academic Press, London, pp. 99-142 (1965);Waymouth, C., *In Vitro 6*:109-127 (1970)). However, cells in different tissues of the mammalian body are exposed to different microenvironments with respect to oxygen/carbon dioxide partial pressure and concentrations of nutrients, vitamins, and trace elements; accordingly, successful *in vitro* culture of different cell types will often require the use of different media formulations. Typical components of cell culture media include amino acids,

organic and inorganic salts, vitamins, trace metals, sugars, lipids and nucleic acids, the types and amounts of which may vary depending upon the particular requirements of a given cell or tissue type. Often, particularly in complex media compositions, stability problems result in toxic products and/or lower effective concentrations of required nutrients, thereby limiting the functional life-span of the culture media. For instance, glutamine is a constituent of almost all media that are used in culturing of mammalian cells *in vitro*. Glutamine decomposes spontaneously into pyrolidone carboxylic acid and ammonia. The rate of degradation can be influenced by pH and ionic conditions but in cell culture media, formation of these breakdown products often cannot be avoided (Tritsch *et al., Exp. Cell Res. 28*:360-364(1962)).

Wang *et al.* (*In Vitro 14(8)*:715-722 (1978)) have shown that photoproducts such as hydrogen peroxide, which are lethal to cells, are produced in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Riboflavin and tryptophan or tyrosine are components necessary for formation of hydrogen peroxide during light exposure. Since most mammalian culture media contain riboflavin, tyrosine and tryptophan, toxic photoproducts are likely produced in most cell culture media.

To avoid these problems, researchers make media on an "as needed" basis, and avoid long term storage of the culture media. Commercially available media, typically in dry power form, serves as a convenient alternative to making the media from scratch, *i.e.*, adding each nutrient individually, and also avoids some of the stability problems associated with liquid media. However, only a limited number of commercial culture media are available, except for those custom formulations supplied by the manufacturer.

Although dry powder media formulations may increase the shelf-life of some media, there are a number of problems associated with dry powdered media, especially in large scale application. Production of large media volumes requires storage facilities for the dry powder media, not to mention the specialized media kitchens necessary to mix and weigh the nutrient components.

Due to the corrosive nature of dry powder media, mixing tanks must be periodically replaced.

Typically, cell culture media formulations are supplemented with a range of additives, including undefined components such as fetal bovine serum (FBS) (10-20% v/v) or extracts from animal embryos, organs or glands (0.5-10% v/v). While FBS is the most commonly applied supplement in animal cell culture media, other serum sources are also routinely used, including newborn calf, horse and human. Organs or glands that have been used to prepare extracts for the supplementation of culture media include submaxillary gland (Cohen, S., *J. Biol. Chem. 237*:1555-1565 (1961)), pituitary (Peehl, D.M., and Ham, R.G., *In Vitro 16*:516-525 (1980); U.S. Patent No. 4,673,649), hypothalamus (Maciag, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76*:5674-5678 (1979); Gilchrest, B.A., *et al.*, *J. Cell. Physiol. 120*:377-383 (1984)), ocular retina (Barretault, D., *et al.*, *Differentiation 18*:29-42 (1981)) and brain (Maciag, T., *et al.*, *Science 211*:1452-1454 (1981)). These types of chemically undefined supplements serve several useful functions in cell culture media (Lambert, K.J. *et al.*, In: *Animal Cell Biotechnology*, Vol. 1, Spier, R.E. *et al.*, Eds., Academic Press New York, pp. 85-122 (1985)). For example, these supplements provide carriers or chelators for labile or water-insoluble nutrients; bind and neutralize toxic moieties; provide hormones and growth factors, protease inhibitors and essential, often unidentified or undefined low molecular weight nutrients; and protect cells from physical stress and damage. Thus, serum or organ/gland extracts are commonly used as relatively low-cost supplements to provide an optimal culture medium for the cultivation of animal cells.

Methods of Production of Culture Media

Culture media are typically produced in liquid form or in powdered form. Each of these forms has particular advantages and disadvantages.

For example, liquid culture medium has the advantage that it is provided ready-to-use (unless supplementation with nutrients or other components is necessary), and that the formulations have been optimized for particular cell types. Liquid media have the disadvantages, however, that they often *do* require the addition of supplements (*e.g.*, L-glutamine, serum, extracts, cytokines, lipids, etc.) for optimal performance in cell cultivation. Furthermore, liquid medium is often difficult to sterilize economically, since many of the components are heat labile (thus obviating the use of autoclaving, for example) and bulk liquids are not particularly amenable to penetrating sterilization methods such as gamma or ultraviolet irradiation; thus, liquid culture media are most often sterilized by filtration, which can become a time-consuming and expensive process. Furthermore, production and storage of large batch sizes (*e.g.*, 1000 liters or more) of liquid culture media are impractical, and the components of liquid culture media often have relatively short shelf lives.

To overcome some of these disadvantages, liquid culture medium can be formulated in concentrated form; these media components may then be diluted to working concentrations prior to use. This approach provides the capability of making larger and variable batch sizes than with standard culture media, and the concentrated media formulations or components thereof often have longer shelf-life (*see* U.S. Patent No. 5,474,931, which is directed to culture media concentrate technology). Despite these advantages, however, concentrated liquid media still have the disadvantages of their need for the addition of supplements (*e.g.*, FBS, L-glutamine or organ/gland extracts), and may be difficult to sterilize economically.

As an alternative to liquid media, powdered culture media are often used. Powdered media are typically produced by admixing the dried components of the culture medium via a mixing process, *e.g.*, ball-milling (also referred to herein, and interchangeably, as "Fitzmilling"), or by lyophilizing pre-made liquid culture medium. This approach has the advantages that even larger batch sizes may be produced, the powdered media typically have longer shelf lives than liquid media,

and the media can be sterilized by irradiation (*e.g.*, gamma or ultraviolet irradiation) or ethylene oxide permeation after formulation. However, powdered media have several distinct disadvantages. For example, some of the components of powdered media become insoluble or aggregate upon lyophilization such that resolubilization is difficult or impossible. Furthermore, powdered media typically comprise fine dust particles which can make them particularly difficult to reconstitute without some loss of material, and which may further make them impractical for use in many biotechnology production facilities operating under GMP/GLP, USP or ISO 9000 settings. Additionally, many of the supplements used in culture media, *e.g.*, L-glutamine and FBS, cannot be added to the culture medium prior to lyophilization or ball-milling due to their instability or propensity to aggregate upon concentration or due to their sensitivity to shearing by processes such as ball-milling. Furthermore, many of these supplements, particularly serum supplements such as FBS, show a substantial loss of activity or are rendered completely inactive if attempts are made to produce powdered supplements by processes such as lyophilization. Finally, powdered media typically do not contain bicarbonate buffering systems and require post-reconstitution adjustment of pH, while components required in μg/ml amounts, or less, are typically added post-reconstitution because of homogeneity concerns.

Thus, there exists a current need for rapidly dissolving nutritionally complex stable dry powder nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers, which can be prepared in variable bulk quantities and which are amenable to sterilization particularly by ionizing or ultraviolet irradiation. By use of the present invention, cell culture media can be manufactured such that no additional manipulations are needed other than adding solvent and solubilizing the media components.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods for the production of nutritive media, media supplement, media subgroup and buffer powders comprising agglomerating a dry powder nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer with a solvent. The invention also relates to methods for the production of powdered nutritive media, media supplements, media subgroups, and buffers, comprising spray-drying a liquid nutritive medium, medium supplement, medium subgroup or buffer under conditions sufficient to produce their dry powder counterparts. Such conditions may, for example, comprise controlling heat and humidity until the powdered media, media supplement, media subgroup or buffer is formed. According to the invention, the method may further comprise sterilizing the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer powder, which may be accomplished prior to or after packaging the powder. In particularly preferred methods, the sterilization is accomplished after packaging of the powder by irradiation of the packaged powder with gamma rays.

Particularly preferred nutritive medium powders that may be produced according to the invention include culture medium powders selected from the group consisting of a bacterial culture medium powder, a yeast culture medium powder, a plant culture medium powder and an animal culture medium powder.

Particularly preferred media supplements that may be produced by the methods of the invention include: powdered animal sera, such as bovine sera (*e.g.*, fetal bovine, newborn calf or normal calf sera), human sera, equine sera, porcine sera, monkey sera, ape sera, rat sera, murine sera, rabbit sera, ovine sera and the like; cytokines (including growth factors (such as EGF, aFGF, bFGF, KGF, HGF, IGF-1, IGF-2, NGF and the like), interleukins, colony-stimulating factors and interferons); attachment factors or extracellular matrix components (such as collagens, laminins, proteoglycans, glycosaminoglycans, fibronectin, vitronectin and the like); lipids (such as phospholipids, cholesterol, bovine cholesterol concentrate, fatty acids, sphingolipids and the like); and extracts of

animal tissues, organs or glands (such as bovine pituitary extract, bovine brain extract, chick embryo extract, bovine embryo extract, chicken meat extract, achilles tendon and extracts thereof) and the like). Other media supplements that may be produced by the present methods include a variety of proteins (such as serum albumins, particularly bovine or human serum albumins; immunoglobulins and fragments or complexes thereof; aprotinin; hemoglobin; haemin or haematin; enzymes (such as trypsin, collagenases, pancreatinin or dispase); lipoproteins; ferritin; etc.) which may be natural or recombinant; vitamins (including but not limited to vitamins A, B_1, B_2, B_3, B_6 B_{12}, C, D, E, K and H (biotin)); amino acids and variants thereof (including, but not limited to, L-glutamine and cystine), enzyme co-factors, trace elements (such as calcium, copper, iron, magnesium, manganese, nickel, potassium, tin, zinc, selenium, vanadium and the like), and other components useful in cultivating cells *in vitro* that will be familiar to one of ordinary skill.

The invention also provides complete dry powder culture media formulations that support the cultivation of cells *in vitro* upon reconstitution of the medium with a solvent, without the need for the addition of any supplemental nutrient components to the medium prior to use. In accordance with the invention, such complete media may be automatically pH-adjusting media, and may comprise one or more components such as serum, one or more culture medium supplements, L-glutamine, insulin, transferrin, one or more hormones, one or more lipids, one or more growth factors, one or more cytokines, one or more neurotransmitters, one or more extracts of animal tissues, organs or glands, one or more enzymes, one or more proteins, one or more trace elements, one or more extracellular matrix components, one or more antibiotics, one or more viral inhibitors, and or one or more buffers.

The nutritive media and media supplements prepared by the invention may also comprise subgroups such as serum (preferably those described above), L-glutamine, insulin, transferrin, one or more lipids (preferably one or more phospholipids, sphingolipids, fatty acids or cholesterol), one or more cytokines

(preferably those described above), one or more neurotransmitters, one or more extracts of animal tissues, organs or glands (preferably those described above), one or more proteins (preferably those described above) or one or more buffers (preferably sodium bicarbonate), or any combination thereof.

Buffer powders particularly suitable for preparation according to the methods of the invention include buffered saline powders, most particularly phosphate-buffered saline powders or Tris-buffered saline powders. In particular, the invention provides methods of preparing "auto-pH" buffer powders which automatically are at a desired pH upon rehydration with a solvent.

The invention also provides nutritive medium powders, medium supplement powders (including powders of the above-described supplements) and buffer powders, particularly auto-pH medium, medium supplement and buffer powders, prepared according to these methods.

The invention also relates to methods of preparing dried cells, including prokaryotic (*e.g.*, bacterial) and eukaryotic (*e.g.*, fungal (especially yeast), animal (especially mammalian, including human) and plant) cells, comprising obtaining a cell to be dried, contacting the cell with one or more stabilizers (*e.g.*, a polysaccharide such as trehalose), forming an aqueous suspension comprising the cell, and spray-drying the cell suspension under conditions favoring the production of a dried powder. The invention also relates to dried cell powders produced by these methods.

The invention further relates to methods of preparing sterile powdered culture media, media supplements, media subgroups and buffers. One such method comprises exposing the above-described powdered culture media, media supplements, media subgroups and buffers to γ irradiation such that bacteria, fungi, spores and viruses that may be resident in the powders are rendered incapable of replication. In a preferred such method, the powdered media, media supplements, media subgroups and buffers are γ irradiated at a total dosage of about 10-100 kilograys (kGy), preferably a total dosage of about 15-75 kGy, 15-50 kGy, 15-40 kGy or 20-40 kGy, more preferably a total dosage of about 20-

30 kGy, and most preferably a total dosage of about 25 kGy, for about 1 hour to about 7 days, preferably for about 1 hour to about 5 days, more preferably for about 1 hour to about 3 days, about 1 hour to about 24 hours or about 1-5 hours, and most preferably about 1-3 hours. The invention also relates to sterile powdered culture media, media supplements, media subgroups and buffers produced by these methods.

The invention further provides methods of culturing a cell comprising reconstituting the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer of the invention with a solvent, which preferably comprises serum or water, and contacting the cell with the reconstituted nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer under conditions favoring the cultivation of the cell. Any cell may be cultured according to the present methods, particularly bacterial cells, yeast cells, plant cells or animal cells. Preferable animal cells for culturing by the present methods include insect cells (most preferably *Drosophila* cells, *Spodoptera* cells and *Trichoplusa* cells), nematode cells (most preferably *C. elegans* cells) and mammalian cells (most preferably CHO cells, COS cells, VERO cells, BHK cells, AE-1 cells, SP2/0 cells, L5.1 cells, hybridoma cells or human cells). Cells cultured according to this aspect of the invention may be normal cells, diseased cells, transformed cells, mutant cells, somatic cells, germ cells, stem cells, precursor cells or embryonic cells, any of which may be established or transformed cell lines or obtained from natural sources.

The invention also provides compositions comprising one or more of the culture media, media supplement, media subgroup or buffer powders of the invention and at least one cell. Such compositions may comprise, for example, an automatically pH-adjusting culture medium powder of the invention or a complete dry powder medium of the invention and one or more cells, such as one or more bacterial cells, one or more plant cells, one or more yeast cells, and one or more animal cells (including but not limited to one or more mammalian cells such as one or more human cells). Compositions according to this aspect of the

invention may be in powder form which, upon reconstitution with a solvent, produce an active culture of the one or more cells contained in the composition.

The invention is further directed to kits for use in the cultivation of a cell. Kits according to the invention may comprise one or more containers containing one or more of the nutritive media powders, media supplement powders, media subgroup powders or buffer powders of the invention, or any combination thereof. The kits may also comprise one or more cells or cell types, including the dried cell powders of the invention.

Other preferred embodiments of the present invention will be apparent to one of ordinary skill in light of the following drawings and description of the invention, and of the claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a histogram of a densitometric scan of SDS-PAGE of samples of fetal bovine serum (FBS) prepared in powdered form by the methods of the invention (Figure 1A) and conventional liquid FBS (Figure 1B).

Figure 2 is a composite of line graphs of growth (Figure 2A) and passage success (Figure 2B) of SP2/0 cells in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2% (w/v) FBS prepared in powdered form by the agglomeration methods of the invention.

Figure 3 is composite of histograms of spectrophotometric scans ($\lambda = 200$-350 nm) of powdered fetal bovine serum (FBS) prepared by spray-drying according to the methods of the invention (Figure 3A) or of standard liquid FBS (Figure 3B).

Figure 4 is a composite of line graphs showing the pH titration (buffer capacity), on two different dates (Figures 4A and 4B), of various dry powdered media (DPM) prepared by the methods of the invention or by ball-milling, with or without the addition of sodium bicarbonate.

Figure 5 is a composite of bar graphs showing the effect of agglomeration on dissolution rates (in water) of Opti-MEM I™ (Figure 5A) or DMEM (Figure 5B). Media were agglomerated with water or FBS as indicated.

Figure 6 is a composite of line graphs showing growth over seven days of SP2/0 cells in agglomerated Opti-MEM I™ (Figure 6A) or DMEM (Figure 6B), both containing 2% FBS.

Figure 7 is a composite of line graphs showing growth over seven days of SP2/0 cells (Figure 7A), AE-1 cells (Figure 7B) and L5.1 cells (Figure 7C) in agglomerated DMEM containing 10% FBS.

Figure 8 is a composite of line graphs showing passage success of SP2/0 cells in Opti-MEM I™ (Figure 8A) or DMEM (Figure 8B), agglomerated with either water or FBS, supplemented with 2% FBS.

Figure 9 is a composite of line graphs showing passage success of SP2/0 cells (Figure 9A), AE-1 cells (Figure 9B) and L5.1 cells (Figure 9C) in DMEM agglomerated with FBS and sodium bicarbonate and supplemented with 10% FBS.

Figure 10 is a line graph showing the growth of SP2/0 cells over four passages in standard water-reconstituted powdered culture media (control media), or in agglomerated powdered culture media prepared in large-scale amounts according to the methods of the invention. Results are shown for control media (□), water-agglomerated powdered culture media of the invention (◆) and water-agglomerated auto-pH powdered culture media (containing sodium bicarbonate) of the invention (■).

Figure 11 is a line graph of AE-1 cells cultured over six or seven days in medium containing 2% (▲) or 10% (◆) liquid fetal bovine serum (FBS), or 2% (✖) or 10% (■) powdered FBS prepared by the spray-drying methods of the invention. Duplicate experiments are shown in Figures 11A and 11B.

Figure 12 is a line graph of SP2/0 cells cultured over seven days in medium containing 2% (▲) or 10% (◆) liquid FBS, or 2% (✖) or 10% (■)

powdered FBS prepared by the spray-drying methods of the invention. Duplicate experiments are shown in Figures 12A and 12B.

Figure 13 is a line graph of AE-1 cell growth over four passages in media containing 5% liquid FBS (◆) or 5% powdered FBS prepared by the spray-drying methods of the invention (■).

Figure 14 is a line graph indicating the effect of γ irradiation and agglomeration on the growth of SP2/0 cells over five days.

Figure 15 is a bar graph indicating the effect of γ irradiation on the growth of VERO cells in agglomerated culture media.

Figure 16 is a series of line graphs indicating the effect of γ irradiation on the ability of transferrin to support the growth of 293 cells over four passages. In each graph, cells were cultured in standard serum-free 293 medium (◆), in medium without transferrin (■), in medium containing powdered transferrin that had been γ irradiated at -70°C (▲) or room temperature (✱), or in medium containing powdered transferrin that had not been γ irradiated but that had been stored at -70°C (✖) or at room temperature (●). Results for each data point are the averages of duplicate flasks.

Fig. 16A: passage 1 cells;

Fig. 16B: passage 2 cells;

Fig. 16C: passage 3 cells;

Fig. 16D: passage 4 cells.

Figure 17 is a series of bar graphs indicating the effect of γ irradiation, under different irradiation conditions, on the ability of FBS to support growth of anchorage-independent cells (Figures 17A and 17B) and anchorage-dependent cells (Figures 17C and 17D) at first (Px1), second (Px2) and third (Px3) passages.

Fig. 17A: SP2/0 cells;

Fig. 17B: AE-1 cells;

Fig. 17C: VERO cells;

Fig. 17D: BHK cells.

Figure 18 is a line graph depicting the buffering kinetics of solutions of 5.1 mM sodium phosphate in the dibasic (x---x) or monobasic (○---○) forms upon challenge with various volumes of 5N HCl.

Figure 19 is a series of line graphs depicting the buffering kinetics for RPMI-1640 culture media in various forms, with or without the addition of $NaHCO_3$.

Figure 19A: liquid vs. powder media.

◆---◆: liquid RPMI-1640 containing $NaHCO_3$ (note that this line is superimposed with that for powder RPMI-1640 containing $NaHCO_3$);

■---■: liquid RPMI-1640 with no $NaHCO_3$;

▲---▲: powder RPMI-1640 containing $NaHCO_3$ (note that this line is superimposed with that for liquid RPMI-1640 containing $NaHCO_3$);

x---x: powder RPMI-1640 containing $NaHCO_3$, agglomerated but without auto-pH;

✱---✱: powder RPMI-1640 containing $NaHCO_3$, agglomerated and with auto-pH.

Figure 19B: powder media, milled or non-milled.

◆---◆: milled RPMI-1640 containing non-milled $NaHCO_3$ (note that this line is superimposed with that for non-milled RPMI-1640 containing milled $NaHCO_3$);

■---■: milled RPMI-1640 with no $NaHCO_3$;

▲---▲: non-milled RPMI-1640 containing milled $NaHCO_3$ (note that this line is superimposed with that for milled RPMI-1640 containing non-milled $NaHCO_3$);

x---x: non-milled RPMI-1640 containing milled $NaHCO_3$, agglomerated but without auto-pH;

✱---✱: non-milled RPMI-1640 containing milled $NaHCO_3$, agglomerated and with auto-pH.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

In the description that follows, a number of terms conventionally used in the field of cell culture media are utilized extensively. In order to provide a clear and consistent understanding of the specification and claims, and the scope to be given such terms, the following definitions are provided.

The term "powder" as used herein refers to a composition that is present in granular form, which may or may not be complexed or agglomerated with a solvent such as water or serum. The term "dry powder" may be used interchangeably with the term "powder;" however, "dry powder" as used herein simply refers to the gross appearance of the granulated material and is not intended to mean that the material is completely free of complexed or agglomerated solvent unless otherwise indicated.

The term "ingredient" refers to any compound, whether of chemical or biological origin, that can be used in cell culture media to maintain or promote the growth of proliferation of cells. The terms "component," "nutrient" and ingredient" can be used interchangeably and are all meant to refer to such compounds. Typical ingredients that are used in cell culture media include amino acids, salts, metals, sugars, lipids, nucleic acids, hormones, vitamins, fatty acids, proteins and the like. Other ingredients that promote or maintain cultivation of cells *ex vivo* can be selected by those of skill in the art, in accordance with the particular need.

The term "cytokine" refers to a compound that induces a physiological response in a cell, such as growth, differentiation, senescence, apoptosis, cytotoxicity or antibody secretion. Included in this definition of "cytokine" are growth factors, interleukins, colony-stimulating factors, interferons and lymphokines.

By "cell culture" or "culture" is meant the maintenance of cells in an artificial, *e.g.*, an *in vitro* environment. It is to be understood, however, that the term "cell culture" is a generic term and may be used to encompass the cultivation not only of individual prokaryotic (*e.g.*, bacterial) or eukaryotic (*e.g.*, animal, plant and fungal) cells, but also of tissues, organs, organ systems or whole organisms, for which the terms "tissue culture," "organ culture," "organ system culture" or "organotypic culture" may occasionally be used interchangeably with the term "cell culture."

By "cultivation" is meant the maintenance of cells in an artificial environment under conditions favoring growth, differentiation or continued viability, in an active or quiescent state, of the cells. Thus, "cultivation" may be used interchangeably with "cell culture" or any of its synonyms described above.

By "culture vessel" is meant a glass, plastic, or metal container that can provide an aseptic environment for culturing cells.

The phrases "cell culture medium," "culture medium" (plural "media" in each case) and "medium formulation" refer to a nutritive solution that supports the cultivation and/or growth of cells; these phrases may be used interchangeably.

By "extract" is meant a composition comprising a concentrated preparation of the subgroups of a substance, typically formed by treatment of the substance either mechanically (*e.g.*, by pressure treatment) or chemically (*e.g.*, by distillation, precipitation, enzymatic action or high salt treatment).

By "enzymatic digest" is meant a composition comprising a specialized type of extract, namely one prepared by treating the substance to be extracted (*e.g.*, plant components or yeast cells) with at least one enzyme capable of breaking down the components of the substance into simpler forms (*e.g.*, into a

preparation comprising mono- or disaccharides and/or mono-, di- or tripeptides). In this context, and for the purposes of the present invention, the term "hydrolysate" may be used interchangeably with the term "enzymatic digest."

The term "contacting" refers to the placing of cells to be cultivated into a culture vessel with the medium in which the cells are to be cultivated. The term "contacting" encompasses mixing cells with medium, pipetting medium onto cells in a culture vessel, and submerging cells in culture medium.

The term "combining" refers to the mixing or admixing of ingredients in a cell culture medium formulation.

The term "pillowing" refers to the event which occurs when any moisture, including atmospheric water, infiltrates a container and moistens the powder contained therein. Such moistening may result in acidic conditions within the container that will cause the liberation of CO_2 gas from the powder ("off-gassing"). When dry powder "pillows" in a sealed container, the off-gassing may cause the container to swell to the point of bursting.

The term "small-quantity" refers to components present in the medium in μg/ml, μg/L, or lower amounts.

A cell culture medium is composed of a number of ingredients and these ingredients vary from one culture medium to another. A "1X formulation" is meant to refer to any aqueous solution that contains some or all ingredients found in a cell culture medium at working concentrations. The "1X formulation" can refer to, for example, the cell culture medium or to any subgroup of ingredients for that medium. The concentration of an ingredient in a 1X solution is about the same as the concentration of that ingredient found in a cell culture formulation used for maintaining or cultivating cells *in vitro*. A cell culture medium used for the *in vitro* cultivation of cells is a 1X formulation by definition. When a number of ingredients are present, each ingredient in a 1X formulation has a concentration about equal to the concentration of those ingredients in a cell culture medium. For example, RPMI-1640 culture medium contains, among other ingredients, 0.2 g/L L-arginine, 0.05 g/L L-asparagine, and 0.02 g/L L-aspartic acid. A "1X

formulation" of these amino acids contains about the same concentrations of these ingredients in solution. Thus, when referring to a "1X formulation," it is intended that each ingredient in solution has the same or about the same concentration as that found in the cell culture medium being described. The concentrations of ingredients in a 1X formulation of cell culture medium are well known to those of ordinary skill in the art. *See Methods For Preparation of Media, Supplements and Substrate For Serum-Free Animal Cell Culture* Allen R. Liss, N.Y. (1984), which is incorporated by reference herein in its entirety. The osmolality and/or pH, however, may differ in a 1X formulation compared to the culture medium, particularly when fewer ingredients are contained in the 1X formulation.

A "10X formulation" is meant to refer to a solution wherein each ingredient in that solution is about 10 times more concentrated than the same ingredient in the cell culture medium. For example, a 10X formulation of RPMI-1640 culture medium may contain, among other ingredients, 2.0 g/L L-arginine, 0.5 g/L L-asparagine, and 0.2 g/L L-aspartic acid (compare 1X formulation, above). A "10X formulation" may contain a number of additional ingredients at a concentration about 10 times that found in the 1X culture medium. As will be readily apparent, "20X formulation," "25X formulation," "50X formulation" and "100X formulation" designate solutions that contain ingredients at about 20-, 25-, 50- or 100- fold concentrations, respectively, as compared to a 1X cell culture medium. Again, the osmolality and pH of the media formulation and concentrated solution may vary. *See* U.S. Patent No. 5,474,931, which is directed to culture media concentrate technology.

An "auto-pH" powder of the invention (*e.g.*, auto-pH medium, medium supplement or buffer powder) is a powder which has been formulated such that, upon rehydration with a solvent, the resulting medium, medium supplement or buffer solution is at a desired pH and does not require adjustment of the pH with acid or base prior to use. For example, an auto-pH culture medium that is formulated to be used at pH 7.4 will, upon rehydration with a solvent, be at pH 7.4 and therefore will be ready for immediate use without adjustment of pH.

Such auto-pH powders of the invention may also be referred to herein interchangeably as "automatically pH-adjusting" powders.

Overview

The present invention is directed to methods of producing nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers. Nutritive media, media supplements and media subgroups produced by the present methods are any media, media supplement or media subgroup (serum-free or serum-containing) which may be used to support the growth of a cell, which may be a bacterial cell, a fungal cell (particularly a yeast cell), a plant cell or an animal cell (particularly an insect cell, a nematode cell or a mammalian cell, most preferably a human cell), any of which may be a somatic cell, a germ cell, a normal cell, a diseased cell, a transformed cell, a mutant cell, a stem cell, a precursor cell or an embryonic cell. Preferred such nutritive media include, but are not limited to, cell culture media, most preferably a bacterial cell culture medium, plant cell culture medium or animal cell culture medium. Preferred media supplements include, but are not limited to, undefined supplements such as extracts of bacterial, animal or plant cells, glands, tissues or organs (particularly bovine pituitary extract, bovine brain extract and chick embryo extract); and biological fluids (particularly animal sera, and most preferably bovine serum (particularly fetal bovine, newborn calf or normal calf serum), horse serum, porcine serum, rat serum, murine serum, rabbit serum, monkey serum, ape serum or human serum, any of which may be fetal serum) and extracts thereof (more preferably serum albumin and most preferably bovine serum albumin or human serum albumin). Medium supplements may also include defined replacements such as LipoMAX®, OptiMAb®, Knock-Out™ SR (each available from Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland), and the like, which can be used as substitutes for the undefined media supplements described above. Such supplements may also comprise defined components, including but not limited

to, hormones, cytokines, neurotransmitters, lipids, attachment factors, proteins and the like.

Nutritive media can also be divided into various subgroups (*see* U.S. Patent No. 5,474,931) which can be prepared by, and used in accordance with, the methods of the invention. Such subgroups can be combined to produce the nutritive media of the present invention.

By the methods of the present invention, any nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer may be produced and stored for an extended period of time without significant loss of biological and biochemical activity. By "without significant loss of biological and biochemical activity" is meant a decrease of less than about 30%, preferably less than about 25%, more preferably less than about 20%, still more preferably less than about 15%, and most preferably less than about 10%, of the biological or biochemical activity of the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer when compared to a freshly made nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer of the same formulation. By an "extended period of time" is meant a period of time longer than that for which a nutritive medium, supplement, subgroup or buffer is stored when prepared by traditional methods such as ball-milling. As used herein, an "extended period of time" therefore means about 1-36 months, about 2-30 months, about 3-24 months, about 6-24 months, about 9-18 months, or about 4-12 months, under a given storage condition, which may include storage at temperatures of about -70°C to about 25°C, about -20°C to about 25°C, about 0°C to about 25°C, about 4°C to about 25°C, about 10°C to about 25°C, or about 20°C to about 25°C. Assays for determining the biological or biochemical activity of a nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer are well-known in the art and are familiar to one of ordinary skill.

Formulation of Media, Media Supplements, Media Subgroups and Buffers

Any nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer may be prepared by the methods of the present invention. Particularly preferred nutritive media, media supplements and media subgroups that may be prepared according to the invention include cell culture media, media supplements and media subgroups that support the growth of animal cells, plant cells, bacterial cells or yeast cells. Particularly preferred buffers that may be prepared according to the invention include balanced salt solutions which are isotonic for animal cells, plant cells, bacterial cells or yeast cells.

Examples of animal cell culture media that may be prepared according to the present invention include, but are not limited to, DMEM, RPMI-1640, MCDB 131, MCDB 153, MDEM, IMDM, MEM, M199, McCoy's 5A, Williams' Media E, Leibovitz's L-15 Medium, Grace's Insect Medium, IPL-41 Insect Medium, TC-100 Insect Medium, Schneider's *Drosophila* Medium, Wolf & Quimby's Amphibian Culture Medium, cell-specific serum-free media (SFM) such as those designed to support the culture of keratinocytes, endothelial cells, hepatocytes, melanocytes, etc., F10 Nutrient Mixture and F12 Nutrient Mixture. Other media, media supplements and media subgroups suitable for preparation by the invention are available commercially (*e.g.*, from Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland, and Sigma; St. Louis, Missouri). Formulations for these media, media supplements and media subgroups, as well as many other commonly used animal cell culture media, media supplements and media subgroups are well-known in the art and may be found, for example in the GIBCO/BRL Catalogue and Reference Guide (Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland) and in the Sigma Animal Cell Catalogue (Sigma; St. Louis, Missouri).

Examples of plant cell culture media that may be prepared according to the present invention include, but are not limited to, Anderson's Plant Culture Media, CLC Basal Media, Gamborg's Media, Guillard's Marine Plant Culture Media, Provasoli's Marine Media, Kao and Michayluk's Media, Murashige and

Skoog Media, McCown's Woody Plant Media, Knudson Orchid Media, Lindemann Orchid Media, and Vacin and Went Media. Formulations for these media, which are commercially available, as well as for many other commonly used plant cell culture media, are well-known in the art and may be found for example in the Sigma Plant Cell Culture Catalogue (Sigma; St. Louis, Missouri).

Examples of bacterial cell culture media that may be prepared according to the present invention include, but are not limited to, Trypticase Soy Media, Brain Heart Infusion Media, Yeast Extract Media, Peptone-Yeast Extract Media, Beef Infusion Media, Thioglycollate Media, Indole-Nitrate Media, MR-VP Media, Simmons' Citrate Media, CTA Media, Bile Esculin Media, Bordet-Gengou Media, Charcoal Yeast Extract (CYE) Media, Mannitol-salt Media, MacConkey's Media, Eosin-methylene blue (EMB) media, Thayer-Martin Media, Salmonella-Shigella Media, and Urease Media. Formulations for these media, which are commercially available, as well as for many other commonly used bacterial cell culture media, are well-known in the art and may be found for example in the DIFCO Manual (DIFCO; Norwood, Massachusetts) and in the Manual of Clinical Microbiology (American Society for Microbiology, Washington, DC).

Examples of fungal cell culture media, particularly yeast cell culture media, that may be prepared according to the present invention include, but are not limited to, Sabouraud Media and Yeast Morphology Media (YMA). Formulations for these media, which are commercially available, as well as for many other commonly used yeast cell culture media, are well-known in the art and may be found for example in the DIFCO Manual (DIFCO; Norwood, Massachusetts) and in the Manual of Clinical Microbiology (American Society for Microbiology, Washington, DC).

As the skilled artisan will appreciate, any of the above media of the invention may also include one or more additional components, such as indicating or selection agents (*e.g.*, dyes, antibiotics, amino acids, enzymes, substrates and

the like), filters (*e.g.*, charcoal), salts, polysaccharides, ions, detergents, stabilizers, and the like.

In a particularly preferred embodiment of the invention, the above-described culture media may comprise one or more buffer salts, preferably sodium bicarbonate, at concentrations sufficient to provide optimal buffering capacity for the culture medium. According to one aspect of the invention, a buffer salt, such as sodium bicarbonate, may be added in powdered form to the powdered medium prior to, during or following agglomeration of the medium. In one example of this aspect of the invention, the sodium bicarbonate may be added to the culture medium prior to, during or following agglomeration with an appropriate solvent (such as water, serum or a pH-adjusting agent such as an acid (*e.g.*, HCl at a concentration of 1M to 5M, preferably at 1M) or a base (*e.g.*, NaOH at a concentration of 1M to 5M, preferably at 1M) such that, upon reconstitution of the agglomerated medium the culture medium is at the optimal or substantially optimal pH for cultivation of a variety of cell types. For example, bacterial cell culture media prepared by the present methods will, upon reconstitution, preferably have a pH of about 4-10, more preferably about 5-9 or about 6-8.5. fungal (*e.g.*, yeast) cell culture media prepared by the present methods will, upon reconstitution, preferably have a pH of about 3-8, more preferably about 4-8 or about 4-7.5; animal cell culture media prepared by the present methods will, upon reconstitution, preferably have a pH of about 6-8 or about 7-8, more preferably about 7-7.5 or about 7.2-7.4; and plant cell culture media prepared by the present methods will, upon reconstitution, preferably have a pH of about 4-8, preferably about 4.5-7, 5-6 or 5.5-6. Of course, optimal pH for a given culture medium to be used on a particular cell type may also be determined empirically by one of ordinary skill using art-known methods.

In another example, one or more buffer salts, *e.g.*, sodium bicarbonate, may be added directly to a powdered nutritive medium by agglomerating the buffer(s) into the medium using a fluid bed apparatus, or by spray-drying the buffer(s) onto a dry or agglomerated powdered medium (using a spray-drying

apparatus as described below). In a related aspect, a pH-adjusting agent such as an acid (*e.g.*, HCl) or a base (*e.g.*, NaOH) may be added to a powdered nutritive medium, which may contain one or more buffer salts (such as sodium bicarbonate), by agglomeration of the pH-adjusting agent into the powdered nutritive medium in a fluid bed apparatus, by spray-drying the pH-adjusting agent onto the powdered or agglomerated nutritive medium, or by a combination thereof; this approach obviates the subsequent addition of a pH-adjusting agent after reconstitution of the powdered medium. Thus, the invention provides a powdered nutritive culture medium useful in cultivation or growth of cells *in vitro* that, upon reconstitution with a solvent (*e.g.*, water or serum), has a pH that is optimal for the support of cell cultivation or growth without a need for adjustment of the pH of the liquid medium. This type of medium, referred to herein interchangeably as "auto-pH" or "automatically pH-adjusting" medium, therefore obviates the time-consuming and error-prone steps of adding buffer(s) to the medium after reconstitution and adjusting the pH of the medium after dissolution of the buffer(s). For example, a mammalian cell culture medium prepared according to these methods may, upon reconstitution, have a pH of between about 7.1 to about 7.5, more preferably between about 7.1 to about 7.4, and most preferably about 7.2 to about 7.4 or about 7.2 to about 7.3.

In accordance with certain methods of the present invention, automatically pH adjusting media can be produced by preparing reconstituted media without the addition of any buffering systems or pH-adjusting agents (an "auto-pH medium" of the invention). In a preferred such aspect, an auto-pH medium maybe provided by adjusting the buffering systems present in the medium. For example, as one of ordinary skill is aware, culture media typically contain buffers or buffering systems. By adjusting the pH-opposing forms of such buffers in the medium, the invention provides for production of an auto-pH medium, avoiding the requirement to add additional buffers or pH-adjusting agents to achieve a proper pH level prior to or upon reconstitution of the medium and prior to use. In one such aspect of the inventon, pH-opposing forms of certain media components

(particularly phosphate or other buffer salts) are then used in the culture medium to provide a desired pH upon reconsitution of the powdered media. (pH-opposing forms of components are conjugate acid-base pairs in which the members of the pair can either raise the pH or lower it to achieve the desired pH of the solution. Sodium HEPES (pH raising) and HEPES-HCl (pH lowering) are examples of pH opposing components.) For example, if a reconstituted media having a pH of between 4.5 and 7.2 is to be prepared, the first step is to determine the correct balance of monobasic (to lower the pH) to dibasic (to raise the pH) phosphate in order to yield the desired pH. Typically, mono- and dibasic phosphate salts are used at concentrations of about 0.1 mM to about 10 mM, about 0.2 mM to about 9 mM, about 0.3 mM to about 8.5 mM, about 0.4 mM to about 8 mM, about 0.5 mM to about 7.5 mM, about 0.6 mM to about 7 mM, or preferably about 0.7 mM to about 7 mM. If other buffer systems are used in the formulations, the proper ratio or balance of the basic (typically sodium or monobasic) buffer salt and the corresponding acidic (or pH-opposing; typically HCl or dibasic) buffer salt is similarly determined to ensure that the formulation will be at the desired final pH upon reconstitution with a solvent. Because the actual phosphate molecular species that is present in a solution is the same at a given pH whether the basic (*e.g.*, sodium or monobasic) or acidic (*e.g.*, HCl or dibasic) form is added, this adjustment would not be expected to impact buffering capacity. Once an appropriate ratio of pH-opposing forms of an appropriate buffer is determined, these components may be added to the medium (for example, a dry powder medium) to provide a culture medium that is of the appropriate pH level upon reconstitution and prior to use (*i.e.*, an auto-pH medium of the invention). The preparation of one example of such an automatically pH-adjusting culture medium is described in more detail below in Examples 3, 6 and 17.

In a related aspect, the invention provides for methods of preparing culture media in such a way as to prevent the interaction of media components that adversely affect the stability, solubility, structure and/or performance of the medium. In one such preferred aspect, the methods of the invention prevent the

adverse interaction between buffering components that are present in the culture medium. For example, such methods of the invention may be used to prevent off-gassing in the culture medium, which is the release of gas from one or more medium components upon storage of the medium in dry form prior to use. In particular, these methods of the invention may be used to prevent off-gassing of carbon dioxide from the medium, typically resulting from liberation of carbon dioxide from a bicarbonate (particularly sodium bicarbonate) buffer used in the medium. Sodium bicarbonate is generally not included in powdered media because, depending on the type of phosphate buffer used in the media, significant amounts of carbon dioxide gas may be generated by off-gassing of the sodium bicarbonate, which may swell a sealed container of the medium to the bursting point, thus reducing the storage stability of the finished product. To minimize this undesirable condition, dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) instead of monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4) may be used in the formulations comprising sodium bicarbonate. However, if monobasic sodium phosphate is used in the formulation of the medium, monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) can be used instead, which does not result in gas formation, and thus does not cause pillowing, while having the identical buffering capabilities as monobasic sodium phosphate. According to this aspect of the invention, the ratio of monobasic to dibasic phosphate (or other buffer) salts to be used (or present) in the culture medium is determined, and then the monobasic sodium phosphate (or other monobasic buffer salt) is replaced with equal molar amount of monobasic potassium phosphate, to prevent off-gassing of carbon dioxide from the sodium bicarbonate in the medium. Since the buffering capacity of monobasic sodium phosphate is identical to that of monobasic potassium phosphate, this replacement would not be expected to affect the buffering system present in the medium. Thus, the invention provides culture media that prevent the adverse interaction between components of the medium, particularly preventing off-gassing, while still providing for auto-pH forms of the culture media. The preparation of one example of such an automatically pH-adjusting

culture medium where the components of the medium have been adjusted to minimize or prevent off-gassing is described in more detail in Example 17.

Hence, as one of ordinary skill will recognize from the description provided herein, the present invention also provides complete dry powder culture media formulations that support the cultivation of cells *in vitro* upon reconstitution of the medium with a solvent, without the need for the addition of any supplemental nutrient components to the medium prior to use. Media according to this aspect of the invention thus will preferably comprise the nutritional components necessary for cultivation of a cell *in vitro*, such that no additional nutritional components need be included in the solvent or added to the medium upon reconstitution and prior to use. Accordingly, such complete media of the invention will be suitable for use in cultivating cells *in vitro* upon reconstitution with water or with an alternative non-nutrient-containing solvent such as a buffered saline solution. In accordance with the invention, such complete media may be automatically pH-adjusting media, and may comprise one or more components such one or more culture medium supplements (including but not limited to serum), one or more amino acids (including but not limited to L-glutamine), insulin, transferrin, one or more hormones, one or more lipids, one or more growth factors, one or more cytokines, one or more neurotransmitters, one or more extracts of animal tissues, organs or glands, one or more enzymes, one or more proteins, one or more trace elements, one or more extracellular matrix components, one or more antibiotics, one or more viral inhibitors, and or one or more buffers.

Examples of media supplements that may be prepared as powders by the present methods, or that may be included in the culture media of the invention, include, without limitation, animal sera (such as bovine sera (*e.g.*, fetal bovine, newborn calf and calf sera), human sera, equine sera, porcine sera, monkey sera, ape sera, rat sera, murine sera, rabbit sera, ovine sera and the like), defined replacements such as LipoMAX®, OptiMAb®, Knock-Out™ SR (each available from Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland),

hormones (including steroid hormones such as corticosteroids, estrogens, androgens (*e.g.*, testosterone) and peptide hormones such as insulin, cytokines (including growth factors (*e.g.*, EGF, aFGF, bFGF, HGF, IGF-1, IGF-2, NGF and the like), interleukins, colony-stimulating factors, interferons and the like), neurotransmitters, lipids (including phospholipids, sphingolipids, fatty acids, cholesterol and the like), attachment factors (including extracellular matrix components such as fibronectin, vitronectin, laminins, collagens, proteoglycans, glycosaminoglycans and the like), and extracts of animal tissues, organs or glands (such as bovine pituitary extract, bovine brain extract, chick embryo extract, bovine embryo extract, chicken meat extract, achilles tendon and extracts thereof) and the like). Other media supplements that may be produced by the present methods or that may be included in the culture media of the invention include a variety of proteins (such as serum albumins, particularly bovine or human serum albumins; immunoglobulins and fragments or complexes thereof; aprotinin; hemoglobin; haemin or haematin; enzymes (such as trypsin, collagenases, pancreatinin or dispase); lipoproteins; fetuin; ferritin; etc.), which may be natural or recombinant; vitamins; amino acids and variants thereof (including, but not limited to, L-glutamine and cystine), enzyme co-factors; polysaccharides; salts or ions (including trace elements such as salts or ions of molybdenum, vanadium, cobalt, manganese, selenium, and the like); and other supplements and compositions that are useful in cultivating cells *in vitro* that will be familiar to one of ordinary skill. These sera and other media supplements are available commercially (for example, from Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland, and Sigma Cell Culture, St. Louis, Missouri); alternatively, sera and other media supplements described above may be isolated from their natural sources or produced recombinantly by art-known methods that will be routine to one of ordinary skill (*see* Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells*, New York: Alan R. Liss, Inc., pp. 74-78 (1983), and references cited therein; *see also* Harlow, E., and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*,

Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 116-120 (1988)).

Components that are present in the final formulation in μg/ml or even μg/L amounts have typically been left out of standard powdered media due to homogeneity and/or stability concerns, and instead are typically added to the reconstituted 1X media as a concentrate, thereby increasing storage costs and causing production of a finished culture medium to become more costly and less efficient. Thus, in one preferred aspect of the present invention, such low-level components may be added to standard powdered media by first making a concentrate of the components and then spraying them into a portion of the powdered media that would be granulated with the concentrate (See U.S. Application No. 09/023,790, filed February 13, 1998, which is incorporated herein by reference in its entirety). This would then be milled (*e.g.*, via Fitzmilling) to a particle size in the same general size range as that of the bulk for blending. The ability to spray-in components in small amounts may be especially helpful in developing media that include trace elements, vitamins, viral inhibitors, growth factors, cytokines and the like. Specifically, among others, the components to be added to a powdered medium include but are not limited to calcium, choline chloride, folic acid, inositol, lipoic acid, riboflavin, thiamine hydrochloride, sodium selenite and vitamins A, B_1, B_2, B_3, B_6, B_{12}, C, D, E, K and H (biotin). Additional components to be added in low amounts to the culture media of the invention may include, for example, growth factors (*e.g.*, EGF, aFGF, bFGF, KGF, HGF, IGF-1, IGF-2, NGF, insulin, and the like), interleukins, colony-stimulating factors, interferons, attachment factors, extracellular matrix components (*e.g.*, collagens, laminins, proteoglycans, glysoaminoglycans, fibronectin, vitronectin, and the like), lipids (such as phospholipids, cholesterol, bovine cholesterol concentrate, fatty acids, sphingolipids and the like); extracts of animal tissues, glands or organs; antibiotics such as Geneticin®, carbenicillin, cefotaxime, anti-PPLO, Fungizone®, hygromycin, kanamycin, neomycin,

nystatin, penicillin, or streptomycin, etc.; and viral inhibitors (*e.g.*, protease inhibitors, nucleoside analogues, and the like, which are well-known in the art).

Examples of buffers that may be prepared according to the present invention and/or that may be included in the culture media of the present invention include, but are not limited to, buffered saline solutions such as phosphate-buffered saline (PBS) formulations, Tris-buffered saline (TBS) formulations, HEPES-buffered saline (HBS) formulations, Hanks Balanced Salt Solutions (HBSS), Dulbecco's PBS (DPBS), Earle's Balanced Salt Solutions, Puck's Saline Solutions, Murashige and Skoog Plant Basal Salt Solutions, Keller's Marine Plant Basal Salt Solutions, Provasoli's Marine Plant Basal Salt Solutions, Kao and Michayluk's Basal Salt Solutions, and the like. Formulations for these buffers, which are commercially available, as well as for many other commonly used buffers, are well-known in the art and may be found for example in the GIBCO/BRL Catalogue and Reference Guide (Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland), in the DIFCO Manual (DIFCO; Norwood, Massachusetts), and in the Sigma Cell Culture Catalogues for animal and plant cell culture (Sigma; St. Louis, Missouri).

Preparation of Powdered Media, Media Supplements, Media Subgroups and Buffers

The methods of the present invention provide for the preparation of the above-described powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers. These powdered media, supplements, subgroups and buffers are preferably prepared using fluid bed technology (*i.e.*, "agglomeration"), via tumble granulation, and/or via spray-drying.

In one aspect of the invention, the powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers are prepared using fluid bed technology to agglomerate the solutions of media, media supplements, media subgroups or buffers, thereby producing their dry powdered forms. Fluid bed technology is a process of producing agglomerated powders having altered

characteristics (particularly, for example, solubility) from the starting materials. In general applications of the technology, powders are suspended in an upwardly moving column of air while at the same time a controlled and defined amount of liquid is injected into the powder stream to produce a moistened state of the powder; mild heat is then used to dry the material, producing an agglomerated powder.

Apparatuses for producing and/or processing particulate materials by fluid bed technology are available commercially (*e.g.*, from Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland), and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 3,771,237; 4,885,848; 5,133,137; 5,357,688; and 5,392,531; and in WO 95/13867; the disclosures of all of the foregoing patents and applications are incorporated by reference herein in their entireties. Such apparatuses have been used to prepare agglomerated powders of various materials, including milk whey (U.S. Patent No. 5,006,204), acidulated meat emulsions (U.S. Patent No. 4,511,592), proteases (U.S. Patent No. 4,689,297) and other proteins (DK 167090 B1), and sodium bicarbonate (U.S. Patent No. 5,325,606).

According to this aspect of the invention, fluid bed technology may be used to prepare bulk agglomerated nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers. In the practice of this aspect of the invention, a dry powdered nutritive medium, medium supplement or buffer is placed into a fluid bed apparatus and is subjected to agglomeration therein. Powdered nutritive media (particularly powdered cell culture media), powdered media supplements (particularly powdered animal sera) and powdered buffers (particularly powdered buffered salines), may be obtained pre-made from commercial sources (*e.g.*, Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland). Alternatively, powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers may be made by admixing individual components or sets of components according to the formulations described above. Such formulations may include components which typically are not present in powdered nutritive media, media supplement, media subgroup and buffer formulations due to their

instability, such as serum, L-glutamine, cystine, insulin, transferrin, lipids (particularly phospholipids, sphingolipids, fatty acids and cholesterol), cytokines (particularly growth factors, interleukins, colony-stimulating factors and interferons), neurotransmitters and buffers (particularly sodium bicarbonate). If L-glutamine is added to the formulation, it may be in the form of a complex with divalent cations such as calcium or magnesium (*see* U.S. Patent No. 5,474,931). In another example, two or more powdered components may be admixed and then agglomerated to produce complex media, media supplements, media subgroups or buffers. For example, a powdered nutritive medium may be mixed with a powdered serum (produced, for example, by spray-drying as described below) such as FBS at a serum concentration of about 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 2%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50% or higher (w/w as a percentage of the powdered medium); the resulting powdered medium-serum mixture may then be agglomerated to produce an agglomerated medium-serum complex that will readily dissolve in a reconstituting solvent and thus be ready for use without further supplementation.

Once the powdered nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer (or mixture thereof) is placed into the fluid bed apparatus, it is subjected to suspension in an upwardly moving column of a gas, preferably atmospheric air or an inert gas such as nitrogen, and is passed through one or more particle filters. Since most dry powder, non-agglomerated nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers are of a relatively small particle size, filters to be used in the invention should be mesh screens that allow air to flow through but that retain the powders, for example filters of about 1-100 mesh, preferably about 2-50 mesh, more preferably about 2.5-35 mesh, still more preferably about 3-20 mesh or about 3.5-15 mesh, and most preferably about 4-6 mesh.

After placement within the fluid bed chamber, the dry powder nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer (or mixture thereof) is then subjected to agglomeration by injecting, preferably using a spray nozzle on the fluid bed apparatus, a defined and controlled amount of solvent into the powder,

to produce a moistened powder. Preferred solvents for use in the present invention are any solvent that is compatible with the formulation of the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer. By "compatible" is meant that the solvent does not induce irreversible deleterious changes in the physical or performance characteristics of the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer, such as breakdown or aggregation of the nutrient components of the nutritive medium or changes in the ionic characteristics of the buffer. Particularly preferred solvents for use in the invention are water (most particularly distilled and/or deionized water), serum (particularly bovine or human serum and most particularly fetal bovine serum or calf serum), organic solvents (particularly dimethylsulfoxide, acetone, ethanol and the like), any of which may contain one or more additional components (*e.g.*, salts, polysaccharides, ions, detergents, stabilizers, etc.).

As noted above, in some aspects of the invention, it may be desirable or advantageous to include in the solvent one or more ingredients that, due to the low concentrations of the components present in the final product, cannot be optimally incorporated into the product by other methods such as ball-milling. In one such aspect, such low-concentration components may be dissolved, suspended, colloided or otherwise introduced into the solvent at the desired concentration, prior to use of the solvent in agglomeration of the powdered media, media supplement, media subgroup or buffer of the invention. Components that may be advantageously incorporated into the solvent in accordance with this aspect of the invention include, but are not limited to, one or more of the above-described sera, hormones, cytokines, neurotransmitters, lipids, attachment factors, proteins, amino acids, vitamins, enzyme cofactors, polysaccharides, salts, ions, buffers and the like.

The solvent should be introduced into the dry powder in a volume that is dependent upon the mass of powdered media, media supplement, media subgroup or buffer to be agglomerated. Preferred volumes of solvent per 500 grams of nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer are about 5-100 ml,

more preferably about 10-50 ml, still more preferably about 25-50 ml, and most preferably about 35 ml. Preferred solvent introduction rates per 500 grams of nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer are a rate of about 1-10 ml/min, preferably about 2-8 ml/min, more preferably about 4-8 ml/min and most preferably about 6 ml/min. In some situations, it may be desirable to cycle between adding solvent for about one minute and then not adding solvent for about one minute (allowing drying of the powder within the apparatus chamber), so as to prevent clumping of the powder during agglomeration.

Once agglomeration of the powder is complete, as evidenced by a larger particle size than that of the original, unagglomerated powder and by the absence of fine dust particles in the agglomerated powder, the powder is thoroughly dried in the apparatus. Preferred apparatus temperatures for drying of the agglomerated powder are about 50-80°C, more preferably about 55-75°C, and most preferably about 60-65°C; powder is preferably dried in the apparatus for about 3-10 minutes and most preferably for about 5-7 minutes, per 500 grams of powder.

In an alternative aspect, powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers of the invention may be prepared by tumble granulation, which produces an agglomerated product analogous to that described above. In such a process, dry powder media, media supplements, media subgroups and/or buffers, or combinations thereof, are introduced into a tumble granulator or a tumble blender such as those that are commercially available from Gemco (Middlesex, NJ) and Patterson Kelley (East Stroudsburg, PA). A solvent (*e.g.*, water, buffered saline, or other desirable solvent that is described herein or that will be familiar to one of ordinary skill) is then introduced into the powder under controlled conditions according to manufacturer's specifications in the tumble granulator, and the batch is then dried according to manufacturer's specifications to form granulated powder (*i.e.*, granules of powder containing solvent), which may then be used as described herein for agglomerated powders.

In another aspect of the invention, powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers may be prepared by spray-drying. In

this aspect of the invention, the nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers in their liquid forms are placed into a spray-drying apparatus; these liquids are then converted into their corresponding powders by spraying the solution into a chamber in the apparatus under appropriate conditions to produce the powders, such as under controlled temperature and humidity, until the powders are formed. In some situations, it may be desirable or advantageous to spray-dry complex mixtures of two or more of the above-described media, media supplements, media subgroups and/or buffers. For example, liquid nutritive media containing animal sera at a desired concentration, or liquid animal sera containing nutritive media components at desired concentrations, may be mixed and then prepared as spray-dried powders according to the methods of the invention.

In a typical spray-drying approach, the liquid nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers are aspirated into the apparatus and are atomized into a spray with a rotary- or nozzle-type atomizer. The resulting atomized liquid spray is then mixed with a gas (*e.g.*, nitrogen or more preferably air) and sprayed into a drying chamber under conditions sufficient to promote production of a powdered product. In a preferred aspect of the invention, these conditions may comprise electronic control of the temperature and humidity within the chamber such that final drying of the product is promoted. Under these conditions, the solvent in the liquid evaporates in a controlled manner, thereby forming free-flowing particles (*i.e.*, powder) of the nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers of the invention. The powder is then discharged from the drying chamber, passed through one or more filters (such as the mesh screens described above for fluid bed preparation) and collected for further processing (*e.g.*, packaging, sterilization, etc.). In some applications, particularly when producing powders from heat-sensitive formulations of nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers, the spray-drying apparatus may be combined with a fluid bed apparatus integrated within the drying chamber, which allows the introduction of agglomerating solvents such

as those described above into the spray-dried powder to produce agglomerated spray-dried powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers.

Apparatuses for producing particulate materials from liquid materials by spray-drying (with or without integrated fluid bed technology) are available commercially (*e.g.*, from Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland), and are described, for example, in the "Spray Drying," "Powdered Pharmaceuticals by Spray Drying" and "Fresh Options in Drying" technical brochures of Niro, Inc./Aeromatic-Fielder, the disclosures of which are incorporated by reference herein in their entireties. According to this manufacturer, such apparatuses have been used to prepare powders of various materials, including dairy products, analgesics, antibiotics, vaccines, vitamins, yeasts, vegetable protein, eggs, chemicals, food flavorings and the like. In the present invention, spray-drying has been found to be particularly useful for the preparation of powdered media supplements, such as sera and in particular those sera described above, most particularly human and bovine sera (such as fetal bovine serum and calf serum).

In the practice of this aspect of the invention, the liquid nutritive media, media supplements, media subgroups, buffers or pH-adjusting agents should be sprayed into the chamber through the atomizer at a spray rate of about 25-100 g/min, preferably at a spray rate of about 30-90 g/min, 35-85 g/min, 40-80 g/min, 45-75 g/min, 50-75 g/min, 55-70 g/min, or 60-65 g/min, and more preferably at about 65 g/min. The inlet air temperature in the atomizer is preferably set at about 100-300°C, more preferably at about 150-250°C, and most preferably at about 200°C, with an outlet temperature of about 50-100°C, more preferably about 60-80°C, and most preferably about 70°C. Air flow in the atomizer is preferably set at about 50-100 kg/hr, more preferably about 75-90 kg/hr, and most preferably about 80.0 kg/hr, at a nozzle pressure of about 1-5 bar, more preferably about 2-3 bar, and most preferably about 2.0 bar. These conditions and settings have been found in the present invention to be preferable

for production of a variety of nutritive media, media supplements, media subgroups and buffer powders by spray-drying, particularly for the production of the above-described powdered sera. Following drying, the spray-dried powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers may be collected in the drying chamber through one or more filters, preferably such as those described above for fluid bed technology.

Following this preparation, the powders of the invention prepared by the above-described fluid bed or spray-drying methods have altered physical characteristics from the starting powders or from powdered media, supplements, subgroups and buffers prepared by lyophilizing the corresponding liquids. For example, non-processed or lyophilized powders often produce significant dust when used, and dissolve poorly or slowly in various solvents, while agglomerated or spray-dried powders are substantially dust-free and/or dissolve rapidly. Typically, the powdered media, media supplements, media subgroups and buffers of the invention will exhibit both reduced dusting and more rapid dissolution than their powdered counterparts prepared by standard techniques such as ball-milling. In some powders which are substantially dust-free but which may not demonstrate enhanced dissolution, the powders may be rapidly dissolved by rapid mechanical solvation of the powder, such as using a mechanical impeller, or by first providing a solvent mist over the powder such as by spray solvation.

In another aspect of the invention, the spray-drying and agglomeration approaches described above may be combined to produce agglomerated spray-dried nutritive media, media supplement, media subgroup and buffer powders. In this aspect, a powdered medium, supplement, subgroup or buffer that has been prepared by spray-drying may, after having been spray-dried, then be agglomerated with a solvent (such as those described above) to further improve the performance and physical characteristics of the resultant medium, supplement, subgroup or buffer. For example, an animal serum powder may be prepared by spray-drying liquid animal serum as described above, and this spray-dried serum powder may then be mixed into dry powder nutritive media (prepared by spray-

drying or by standard techniques such as ball-milling); this mixed powder may then be agglomerated as described above. Alternatively, a spray-dried nutritive medium, medium supplement, medium subgroup or buffer powder may be agglomerated as above, to improve the dissolution properties of the powder. This approach may be particularly advantageous when spray-drying liquids with low (about 1-10%) solids content, such as liquid animal sera. As one of ordinary skill will appreciate, these approaches will facilitate preparation of a large batch of one or more components (*e.g.*, sera or other media supplements) to be used as a stock for addition to a powdered medium, supplement, subgroup or buffer at a desired concentration, while also obtaining the above-described benefits of agglomeration. In addition, this approach may reduce inter-lot variability which may be a problem with certain media supplements (particularly animal sera).

The powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers prepared as described herein may then be packaged, for example into containers such as vials, tubes, bottles, bags, pouches, boxes, cartons, drums and the like, prior to or following sterilization as described below. In one such aspect of the invention, the powdered media, media supplements, media subgroups or buffers may be packaged into a compact, vacuum-packed form, such as that known in the art as a "brick-pack" wherein the powder is packaged into a flexible container (such as a bag or a pouch) that is sealed while being evacuated. Such packages may advantageously comprise one or more access ports (such as valves, luer-lock ports, etc.) allowing the introduction of a solvent (*e.g.*, water, sera, media or other aqueous or organic solvents or solutions) directly into the package to facilitate rapid dissolution of the powder. In a related aspect, the package may comprise two or more adjacent compartments, one or more of which may contain one or more of the dry powder media, media supplements, media subgroups or buffers of the invention and one or more other of which may contain one or more aqueous or organic solvents which may be sterile. In this aspect, the dry powder may then be dissolved by simply removing or breaking the barrier between the compartments, ideally without loss of sterility, to allow admixture of the powder

and the solvent such that the powder dissolves and produces a sterile nutritive medium, medium supplement, medium subgroup or buffer at a desired concentration.

Packaged media, media supplements, media subgroups and buffers of the invention are preferably stored for the extended times, and at the temperatures, noted above, typically for about 1-24 months at temperatures of less than about 30°C, more preferably at temperatures of less than about 20-25°C, until use. Unlike traditional powdered media, media supplements, media subgroups or buffers, storage at reduced temperatures (*e.g.*, 0-4°C) is not necessary for the maintenance of performance characteristics of the media, media supplements, media subgroups and buffers prepared by the present methods. Of course, other storage temperatures may be required for those aspects of the invention where the packages also comprise separate compartments containing one or more solvents; in these cases, the optimal storage conditions will be dictated by the storage requirements of the solvent(s) which will be known to the skilled artisan.

Sterilization and Packaging

The invention also provides methods for sterilizing the nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers of the invention, as well as for sterilizing powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers prepared by standard methods such as ball-milling or lyophilization. Since nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers are usually prepared in large volume solutions and frequently contain heat labile components, they are not amenable to sterilization by irradiation or by heating. Thus, nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers are commonly sterilized by contaminant-removal methods such as filtration, which significantly increases the expense and time required to manufacture such media, media supplements, media subgroups and buffers.

Powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers prepared according to the methods of the invention (*e.g.*, by spray-drying of liquid media, media supplements, media subgroups or buffers, or by agglomeration of powdered media, media supplements, media subgroups or buffers), or by standard methods such as ball-milling (of powdered components) or lyophilization (of liquid forms of the media, supplements, subgroups or buffers), however, can be sterilized by less expensive and more efficient methods. For example, powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers (prepared as described above by spray-drying or lyophilization of a liquid form, or by agglomeration of a powdered form, of the media, supplements, subgroups or buffers) may be irradiated under conditions favoring sterilization of these powders. Preferably, this irradiation is accomplished in bulk (*i.e.*, following packaging of the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer), and most preferably this irradiation is accomplished by exposure of the bulk packaged media, media supplement, media subgroup or buffer of the invention to a source of gamma rays under conditions such that bacteria, fungi, spores or viruses that may be resident in the powdered media, media supplements, media subgroups or buffers are inactivated (*i.e.*, prevented from replicating). Alternatively, irradiation may be accomplished by exposure of the powdered media, media supplement, media subgroup or buffer, prior to packaging, to a source of gamma rays or a source of ultraviolet light. The media, media supplements, media subgroups and buffers of the invention may alternatively be sterilized by heat treatment (if the subgroups of the nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer are heat stable), for example by flash pasteurization or autoclaving. As will be understood by one of ordinary skill in the art, the dose of irradiation or heat, and the time of exposure, required for sterilization will depend upon the bulk of the materials to be sterilized, and can easily be determined by the ordinarily skilled artisan without undue experimentation using art-known techniques, such as those described herein.

In a particularly preferred aspect of the invention, the bulk powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers are exposed to a source of γ irradiation at a total dosage of about 10-100 kilograys (kGy), preferably a total dosage of about 15-75 kGy, 15-50 kGy, 15-40 kGy or 20-40 kGy, more preferably a total dosage of about 20-30 kGy, and most preferably a total dosage of about 25 kGy, for about 1 hour to about 7 days, more preferably about 1 hour to about 5 days, 1 hour to about 3 days, about 1-24 hours or about 1-5 hours, and most preferably about 1-3 hours ("normal dose rate"). Alternatively, the bulk powders of the invention may be sterilized at a "slow dose rate" of a total dosage of about 25-100 kGy over a period of about 1-5 days. During irradiation, the powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers are preferably stored at a temperature of about -70°C to about room temperature (about 20-25°C), most preferably at about -70°C. One of ordinary skill will appreciate, of course, that radiation dose and exposure times may be adjusted depending upon the bulk and/or mass of material to be irradiated; typical optimal irradiation dosages, exposure times and storage temperatures required for sterilization of bulk powdered materials by irradiation or heat treatment are well-known in the art.

Following sterilization, unpackaged nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers may be packaged under aseptic conditions, for example by packaging the media, media supplements, media subgroups or buffers into containers such as sterile tubes, vials, bottles, bags, pouches, boxes, cartons, drums and the like, or in the vacuum packaging or integrated powder/solvent packaging described above. Sterile packaged media, media supplements, media subgroups and buffers may then be stored for extended periods of time as described above.

Use of the Nutritive Media, Media Supplements, Media Subgroups and Buffers

The present invention thus provides powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers that are readily soluble in a rehydrating solvent and that are substantially dust free. For use, the agglomerated or spray-dried media, media supplement, media subgroup or buffer may be hydrated (or "reconstituted") in a volume of a solvent sufficient to produce the desired nutrient, electrolyte, ionic and pH conditions required for the particular use of the solvated media, media supplement, media subgroup or buffer. This reconstitution is particularly facilitated in the present invention, since the present media, media supplements, media subgroups and buffers will rapidly go into solution and will produce little if any dust or insoluble material, unlike lyophilized or ball-milled nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers.

Preferred solvents for use in reconstituting the powdered nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers of the invention include, but are not limited to, water (most particularly distilled and/or deionized water), serum (particularly bovine or human serum and most particularly fetal bovine serum or calf serum), organic solvents (particularly dimethylsulfoxide, acetone, ethanol and the like), or any combination thereof, any of which may contain one or more additional components (*e.g.*, salts, polysaccharides, ions, detergents, stabilizers, etc.). For example, powdered media supplements (such as animal sera) and buffers are preferably reconstituted in water to a 1X final concentration, or optionally to a higher concentration (*e.g.*, 2X, 2.5X, 5X, 10X, 20X, 25X, 50X, 100X, 500X, 1000X, etc.) for the preparation of stock solutions or for storage. Alternatively, powdered culture media may be reconstituted in a solution of media supplements (*e.g.*, sera such as FBS) in water, such as those solutions wherein the media supplement is present at a concentration, for example, of 0.5%, 1%, 2%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, or higher, vol/vol in the water.

Reconstitution of the powdered nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers is preferably accomplished under aseptic conditions to maintain the sterility of the reconstituted media, media supplement, media subgroup or buffer, although the reconstituted media, media supplement, media subgroup or buffer may alternatively be sterilized, preferably by filtration or other sterilization methods that are well-known in the art, following rehydration. Following their reconstitution, media, media supplements, media subgroups and buffers should be stored at temperatures below about 10°C, preferably at temperatures of about 0-4°C, until use.

The reconstituted nutritive media, media supplements, media subgroups and buffers may be used to culture cells according to standard cell culture techniques which are well-known to one of ordinary skill in the art. In such techniques, the cells to be cultured are contacted with the reconstituted media, media supplement, media subgroup or buffer of the invention under conditions favoring the cultivation of the cells (such as controlled temperature, humidity, lighting and atmospheric conditions). Cells which are particularly amenable to cultivation by such methods include, but are not limited to, bacterial cells, yeast cells, plant cells and animal cells. Such bacterial cells, yeast cells, plant cells and animal cells are available commercially from known culture depositories, *e.g.*, American Type Culture Collection (Rockville, Maryland), Invitrogen (La Jolla, California) and others that will be familiar to one of ordinary skill in the art. Preferred animal cells for cultivation by these methods include, but are not limited to, insect cells (most preferably *Drosophila* cells, *Spodoptera* cells and *Trichoplusa* cells), nematode cells (most preferably *C. elegans* cells) and mammalian cells (including but not limited to CHO cells, COS cells, VERO cells, BHK cells, AE-1 cells, SP2/0 cells, L5.1 cells, hybridoma cells and most preferably human cells such as 293 cells, PER-C6 cells and HeLa cells), any of which may be a somatic cell, a germ cell, a normal cell, a diseased cell, a transformed cell, a mutant cell, a stem cell, a precursor cell or an embryonic cell,

and any of which may be an anchorage-dependent or anchorage-independent (*i.e.*, "suspension") cell.

Cells

In another aspect, the invention relates to methods for producing dry cell powder compositions comprising one or more cells, and to dry cell powders produced by these methods. These methods thus produce cell-containing compositions wherein the cells are preserved and may be stored for extended periods of time until use. In this way, the methods of the invention overcome some of the drawbacks of traditional methods of cell preservation (*e.g.*, freezing) such as the need for cyropreservation equipment and the use of certain cryopreservatives that may be toxic to the cells.

Methods according to this aspect of the invention may comprise one or more steps. For example, one such method may comprise obtaining one or more cells to be dried, forming an aqueous cell suspension by suspending the one or more cells in an aqueous solution, and spray-drying the cell suspension under conditions favoring the production of a dried powder. These methods may further comprise contacting the one or more cells with one or more stabilizing or preserving compounds (*e.g.*, a polysaccharide, including but not limited to trehalose). The aqueous solution used to form the cell suspension preferably comprises one or more components, such as one or more of the above-described nutritive media, media supplements, media subgroups, salts or buffers, and particularly one or more of the automatically pH-adjusting culture media, media subgroups, media supplements or buffers of the present invention. Preferably, the aqueous solution used to form the cell suspension is adjusted to optimal or substantially optimal tonicity and osmolality for the cell type being dried. The aqueous solution may optionally comprise one or more additional components, such as one or more polysaccharides, ions, detergents, stabilizing or preserving compounds (including trehalose), and the like. In aspects of the invention wherein the one or more cells are contacted with one or more stabilizing or

preserving compounds, the stabilizing or preserving compounds may be incorporated into the aqueous solution used to form the aqueous cell suspension. Alternatively, the stabilizing or preserving compounds may be sprayed or agglomerated onto the dry cell powder after formation of the powder.

Once the dry cell powder has been formed by the above-described methods, the powder may optionally be agglomerated with a solvent according to methods described above for agglomeration of dry powders. Any solvent that is compatible with the cell type being dried may be used to agglomerate the dry cell powder, including but not limited to water, a nutritive medium solution, a nutritive medium supplement solution (including sera, particularly bovine sera (most particularly fetal bovine and calf sera) and human sera), a buffer solution, a salt solution, and combinations thereof.

A variety of cells may be dried according to the methods of the invention, including prokaryotic (*e.g.*, bacterial) and eukaryotic (*e.g.*, fungal (especially yeast), animal (especially mammalian, including human) and plant) cells, particularly those cells, tissues, organs, organ systems, and organisms described above. Once the dried cells have been produced, they may be packaged aseptically and stored for extended periods of time (*e.g.*, several months to several years), preferably at temperatures of about 0-30 °C, 4-25 °C, 10-25 °C, or 20-25 °C (*i.e.*, "room temperature") until use. For use in preparing cultures of viable cells, the dry cell powder may be aseptically reconstituted, into a cell suspension comprising one or more viable cells, with an aqueous solvent (*e.g.*, sterile water, buffer solutions, media supplements, culture media, or combinations thereof) and cultured according to standard art-known protocols. Alternatively, the dry cell powder may be reconstituted into a cell suspension where cell viability is not essential, for example for preparation of an immunogen to be used for immunization of an animal. In such cases, the dry cell powder may be reconstituted with any solvent that is compatible with standard immunization protocols, such as aqueous or organic solvents that may comprise one or more detergents, adjuvants, etc.

The invention also provides compositions prepared by such methods. Such compositions may comprise, for example, an automatically pH-adjusting culture medium powder of the invention and one or more cells, such as one or more bacterial cells, one or more plant cells, one or more yeast cells, and one or more animal cells (including but not limited to one or more mammalian cells such as one or more human cells). Compositions according to this aspect of the invention may be in powder form which, upon reconstitution with a solvent, produce an active culture of the one or more cells contained in the composition.

Kits

The dry powder media, media supplements, media subgroups, buffers, cells and cell-containing compositions provided by the invention are ideally suited for preparation of kits. Such a kit may comprise one or more containers such as vials, test tubes, bottles, packages, pouches, drums, and the like. Each of the containers may contain one or more of the above-described nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers of the invention, or combinations thereof. Such nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers may be hydrated or dehydrated but are typically dehydrated preparations produced by the methods of the invention. Such preparations may, according to the invention, be sterile.

A first container may contain, for example, a nutritive media, media supplement, media subgroup or a buffer of the invention, or any component or subgroup thereof, such as any of those nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers of the invention that are described above. Additional nutritive media, buffers, extracts, supplements, components or subgroups may be contained in additional containers in the present kits. The kits may also contain, in one or more additional containers, one or more cells such as the above-described bacterial cells, yeast cells, plant cells or animal cells. Such cells may be lyophilized, dried, frozen or otherwise preserved, or may be spray-dried

according to the methods of the invention. In addition, the kits of the invention may further comprise one or more additional containers, containing, for example, L-glutamine, optionally complexed with one or more divalent cations (*see* U.S. Patent No. 5,474,931). The kits may further comprise one or more additional containers containing a solvent to be used in reconstituting the dry powder nutritive media, media supplements, media subgroups and/or buffers; such solvents may be aqueous (including buffer solutions, saline solutions, nutritive medium solutions, nutritive medium supplement solutions (including sera such as bovine sera (particularly fetal bovine sera or calf sera) or human sera), or combinations thereof) or organic. Other ingredients that are not compatible for admixture with the nutritive media, buffers, extracts, supplements, components or subgroups of the invention may be contained in one or more additional containers to avoid mixing of incompatible components.

The number and types of containers contained in a given kit for making a nutritive media, media supplement, media subgroup or buffer may vary depending on the type of media, media supplement, media subgroup or buffer to be prepared. Typically, the kit will contain the respective containers containing the components or supplements necessary to make a particular media, media supplement, media subgroup or buffer. However, additional containers may be included in the kit of the invention so that different media, media supplements, media subgroups or buffers can be prepared by mixing different amounts of various components, supplements, subgroups, buffers, solvents, etc., to make different media, media supplement, media subgroup or buffer formulations.

Advantages

Unexpectedly, the present invention provides for the preparation of nutritive media, media supplements, media subgroups, buffers and cells at reduced cost. The cost reductions are due to the several factors. For example, the media, media supplement, media subgroup and buffer formulations of the present

invention may be produced with much smaller production facilities since the large stir tanks required for 1X formulations are not required. In addition, the media, media supplement, media subgroup and buffer formulations of the present invention may be prepared on an as needed basis using "just in time" production techniques which reduce inventory, storage and labor costs. The time required for the preparation and shipping of the media, media supplement, media subgroup and buffer formulations may be reduced from 6-8 weeks to as little as one day. The automatically pH-adjusting media of the invention also provide significant cost and time savings, and reduce the tendency for introduction of contamination into reconstituted media that may occur during the pH adjustment process according to standard methods using traditional dry powder or bulk liquid media. The present invention also allows for the preparation of components of nutritive media, media supplements, media subgroups or buffers which may be used to prepare very large quantities of 1X media, media supplements, media subgroups or buffers (*e.g.*, 100,000 liters or more) which would require only one quality control test compared to multiple quality control tests for multiple batches produced according to other commonly used techniques. Importantly, the media, media supplement, media subgroup and buffer formulations of the present invention are more consistent between batches since the individual components are more stable. The dried cell powders of the invention are also technologically and economically advantageous, since the cells may be stored, in low volume, for extended periods of time with little need for specialized equipment beyond that typically available in the laboratory. In addition, the cells prepared by the present methods are preserved without being exposed to cryopreservative reagents which may be toxic to the cells.

It will be readily apparent to one of ordinary skill in the relevant arts that other suitable modifications and adaptations to the methods and applications described herein are obvious and may be made without departing from the scope of the invention or any embodiment thereof. Having now described the present invention in detail, the same will be more clearly understood by reference to the

following examples, which are included herewith for purposes of illustration only and are not intended to be limiting of the invention.

Example 1: Agglomeration of Typical Dry Powder Media (DPM)

1. With a benchtop laboratory fluid bed apparatus (Stera-1; Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland): Place 100-500 g of DPM within the chamber. Place onto apparatus and use the lever to seal the unit.

2. Start the airflow to fluidize (levitate) the DPM. Since traditional DPM is of relatively fine particle size, setting 4-6 will be needed. Turn on the vacuum device to catch fine DPM particles, passing through the upper filters. Make sure that the fluidized powder is approximately central within the chamber with respect to the lower mesh screen and the upper filters.

3. Start the injection device (spray unit) by first plugging in the compressed air line and then by starting the pump which is connected to a water source. The goal is to admit ~6 ml of water per minute (the flow rate for any given pump based upon RPM and tubing diameter must be known). In order to prevent clumping of DPM, alternatively add water for ~1 minute and then stop for ~1 minute, allowing drying to occur in the chamber.

4. If filters become coated with DPM during the run so that blowback does not dislodge powder, turn fan speed down to setting 2-3 until all filters have been blown clear. Then increase running fan speed to previous level.

5. Agglomeration will be complete when ~35 ml of water has been added for each 500 g of DPM. This volume will vary depending upon the DPM formulation. A downward flow of relatively large agglomerated granules will be seen in the chamber (bottom) toward the end of the run. Visibly larger particles and absence of fine dust indicates that the process is complete.

6. Allow agglomerated DPM to dry thoroughly for 5-7 minutes.

7. At end of run, blow off filters 4 times.

8. Turn unit off, disconnect water tube and collect agglomerated DPM into an airtight container.

These approaches should be adjusted when using a process-scale or production-scale fluid bed apparatus. For example, when the MP-1 (Niro, Inc./Aeromatic-Fielder; Columbia, Maryland) apparatus is used, the following protocol has yielded satisfactory results:

1. Seal unit (inflate gaskets).
2. Start fan for pre-heat.
3. Stop fan when inlet air temperature equals set point.
4. Deflate gaskets, load material, inflate gaskets.

Steps 5-8 should all be accomplished within one minute:

5. Start batch.
6. Start fan, and turn on filter cleaning.
7. Set nozzle atomizing air pressure % output (check nozzle for vacuum).
8. Connect liquid feed line.
9. Start pump on screen and at pump.
10. Reset batch time.
11. Spray all liquid at set rate (26g/min). Use ~ 250ml water for 2 kg powder.
12. Stop pump at pump and on screen when all liquid is added.
13. Reduce airflow to drying value (for example from 100 to 60).
14. When product reaches desired temperature (~40 °C), go to "initial set up" screen and set "batch duration" for a value of 2-3 minutes greater than the present "batch time".
15. Stop batch.
16. Deflate gaskets.

Typical instrument settings (for bench-, process- and production-scale apparatuses):

Drying temperature: 60-65°C

Outlet air temperature: ~33°C

Blow out pressure: 5 bar

Atomizing pressure: 1.5-2.0 bar

Blow back dwell: 1 after spraying, 2 while spraying

Capacity of fan: 5 at start of run, 6 after agglomeration is evident

Magnahelics: Filter resistance 150-250, Resistance of perforated control plate ~50, Air volume: less than 50.

Example 2: Addition of Sodium Bicarbonate as an Integral Part of DPM

As noted above, sodium bicarbonate is not typically added to DPM during manufacturing by ball-milling or lyophilization, due to potential off-gassing and buffering capacity complications encountered upon storage of the powdered media. This standard production process thus necessitates the addition of sodium bicarbonate, and pH adjustment, upon reconstitution of the media. With the present methods, however, these additional steps may be obviated by adding the sodium bicarbonate (or any buffering salt) directly to the powdered medium during manufacturing.

There are two ways of including sodium bicarbonate (or any buffering salt) within the DPM: (a) via the injection device and (b) as part of the DPM.

(a) Injection Device

Because of the solubility of sodium bicarbonate and the amounts that generally need to be added to a typical mammalian cell culture medium, fairly large volumes of liquid would need to be injected into the powder (significantly greater than the 35 ml of water mentioned above). This is still possible and in

fact may be preferable if adding another component that similarly requires a relatively large volume of liquid in order to be added to the DPM, as is the case with serum for example. In this case, care must be taken to sequentially add liquid, let dry etc. a number of times to insure that the DPM does not become clumped within the device. Using the 6 ml per minute for ~1 minute and then allowing drying for another 2 minutes is about right.

The amount of liquid to add is determined as follows: Prepare sodium bicarbonate at 75 g/L in water. Example: 250 g of DPM in the chamber to be agglomerated. Assume 10.0 g of DPM is required for 1 L of 1X liquid medium. Therefore, 250 g represents 25 L of 1X liquid medium. For each L of liquid, assume (for example) a requirement of 2 g of sodium bicarbonate. This means that 50 g of bicarbonate is needed. Now, since the bicarbonate solution is at 75 g/L, then 0.67 L of bicarbonate solution must be added to the 250 g of DPM.

The sodium bicarbonate solution would be added similarly to the process for "agglomeration of a typical DPM" above *except* that a longer drying time between cycles is needed since the pH of the sodium bicarbonate solution is ~8.00 which can degrade media components. It is important that the powder never become "soaked" by addition of bicarbonate solution too rapidly without allowing sufficient time for thorough drying of the bicarbonate powder between cycles. Also, longer fluid drying times are required since it is important to have as low a final moisture content as possible since moisture would result in liberation of carbon dioxide gas resulting in loss of buffering capacity and "pillow" formation if powder is in a foil packet.

(b) As part of the DPM

Sodium bicarbonate can be milled into the DPM in a similar fashion as for other media components prior to fluid bed treatment. However, in the milling process, the bicarbonate should be added as the final component. All of the other media components should be milled as usual and then the mill stopped and the

bicarbonate added last, with further milling to reach proper sized particles. It is important that all post-milling processing (placement into containers, etc.) be done in a humidity-controlled environment set as low as operationally possible (~20-40%. Fluid bed processing should then be performed as soon as possible after milling. (If not processed the same day, DPM must be double wrapped and placed within a sealed container with moisture absorbents.)

The fluid bed process itself is done similarly to the example given above (with use of 35 ml per 500 g of DPM) except that drying times after water injection (~6 ml/min) should again be extended: 1 min of injection of water and 2 minutes drying cycles. It will be noted that the color of the DPM will be deep red-light purple due to presence of phenol red. Since the DPM has essentially no moisture content, this does not represent a degradative situation, and is why fluid bed processing is essential.

Example 3: DPM that Includes Buffering Salts (e.g., Sodium Bicarbonate) and is Formulated so that pH of Reconstituted (1X) Medium is Automatically of Desired pH with No User Efforts - *Spraying of Acid or Base Technique*

As noted above, all commercially available mammalian cell culture powdered media require addition of one or more buffer salts (*e.g.*, sodium bicarbonate) when preparing 1X liquid, and then adjustment of pH, so that the solution will be at proper pH. The present methods, however, can be used to obviate both the addition of sodium bicarbonate (as described above in Example 2) and the need for pH adjustment. In this aspect of the invention, fluid bed technology is used to introduce acid or base (depending on the need) to a dry powder medium comprising one or more buffering salts. In accordance with this aspect of the invention, any buffering salts or combinations thereof, and any acid or base, may be used depending upon the desired pH and buffering capacity in the ultimately reconstituted cell culture medium.

If sodium bicarbonate is added directly to the DPM as a powder, it is possible for the end user to simply add water and mix to yield a solution already

containing bicarbonate (see above) and of proper pH. It is necessary first to determine how much of a pH adjustment is required. (1) Place 1 L of water in a beaker. Add DPM to the liquid and mix. (Amount to add/L is given by the specifications for that powder, e.g., 10 g/L, 13 g/L). In this case, the weight of the sodium bicarbonate must also be considered in determining how much to add per liter. (2) After the powder has dissolved, add 5N HCl to adjust the solution to the desired pH. Record the amount. (3) Convert this number to amount of 1N HCl. Calculate how much 1N HCl is needed for adjustment of the total powder to be agglomerated. (Example: 5 ml of 1N HCl is needed to adjust 1 L of 1X medium A to pH 7.2 from the unadjusted pH of 7.9. That 1 L of 1 X medium represents, for example, 13.0 g of DPM. Therefore, for each 13.0 g of DPM, 5 ml of 1N HCl is needed. If we want to adjust pH of 250 g of DPM, then 250 divided by 13.0 = 19.2 x 5 ml or 96 ml of 1N HCl is needed to be added to the powder to make it automatically pH-adjusted.

This 1N HCl must now be added to the DPM. The best way for that is to use the injection device, adding 1N HCl instead of water. In general, the protocol is similar to the above with the following exceptions: (1) the 1N HCl must be added slowly to the media which contains sodium bicarbonate. If it is added too quickly, carbon dioxide may be driven off, resulting in suboptimal buffering capacity. Because of the volume of 1N HCl generally required, several 1 minute on, 2 minute off cycles are needed. A dry powder state must be obtained at the end of each cycle so that a dynamic system exists where DPM has characteristics of a fluid process but in reality is a dried powder. (Amazingly, as HCl is added to the powder, the bulk color changes from dark reddish purple to light yellow-orange color even though the powder remains essentially dry at all times due to the continual evaporation within the system). Since the total amount of HCl has been calculated to yield an essentially neutral pH, the powder is never really exposed to "acid" conditions as long as the fluid bed is properly adjusted (see above; position of the powder particles within the chamber during operation). It is important to make sure that all of the powder is moving through the system

(i.e., being lifted, agglomerated and settled continuously) and having no "dead" zones within the chamber.

Once the powder is collected after the run, it can be added to water and reconstituted at any time as long as it has been kept in proper "dry" packaging and location. No adjustment of pH is needed. Thus, the invention provides an automatic pH-adjusting dry powdered medium, where the pH of the liquid medium made by reconstituting the dry powdered medium requires no adjustment of pH.

Example 4: Inclusion of Large Molecular Weight Supplements Such as Serum, Albumin, Hy-Soy, etc., within the DPM Itself

Heretofore, dried powder media containing serum have not been commercially available. Using the present methods (via fluid bed and spray-drying technologies), we have succeeded in adding serum to a powder in a manner where functionality (cell culture) is maintained.

The injection device of the fluid bed apparatus is able to form a mist with serum, and concentrated albumin. We attempted to see if serum added to the DPM and dried in this manner would be functional.

Procedure for addition of serum: (1) Determine the weight of standard DPM to be agglomerated. (2) From this, based upon the g/L for the particular powder, calculate the volume of 1 X medium that the g of powder will make. (3) Calculate the volume of serum that would be needed at a given percentage level of supplementation (*e.g.*, 100 g of powder to be used in 10 g/L yields 10 L-equivalents of powder). At 5% serum supplementation, 500 ml of serum would be required to be added by the injection device.

Protocol for addition of the serum: Serum and albumin are very viscous. The nozzle spray pattern must be checked for droplet size and pattern. With the sample tube in the solution to be added to the powder, test spray against a cardboard or other backdrop. Check for uniformity and small droplet size. If not

a "mist," increase atomizing pressure by 0.5 bar and test again. Do this until sufficient pressure results in a fine mist pattern.

For use in cell culture applications, it is necessary to know the weight/ml of serum-DPM to be used per L of 1 X medium. To do this, accurately weigh vials or test tubes that will hold the serum during drying. Place a constant (known) quantity of serum into each of the vials. Then place vials into a Speed Vac or lyophilizer. Remove water until dryness. Then weigh the vials again, this time containing lyophilized serum. Calculate the weight of serum and express as per ml of original volume. The weight of agglomerated DPM with serum to use per L will then be the standard DPM "use" weight plus the weight of the serum at a given level.

For example, assume that Medium A (DPM) is to be used at 10 g/l. Serum supplementation is to be at 5% v/v. This means that in addition to the weight of the standard DPM, the weight of the serum would equal 5% = 50 ml to add per L of medium. Assume that serum powder weighs 0.06 g/ml. Then the weight of the powdered serum = 50 x 0.06 g/L = 3 g. Therefore, the weight of serum-containing DPM that would be added to 1 L of water is the weight of serum powder (3 g) plus the weight of the standard DPM (10 g) per liter = 13 g/L.

Example 5: Reducing or Eliminating Milling Techniques (High Energy Input System That Break Components down to Micron-sized Particles) When Manufacturing a DPM

As noted above, dry powdered medium typically is manufactured via the milling process, which is laborious and has a number of problems. The methods of the present invention provide for the production of a dry powdered medium using fluid bed technology, which overcomes these labor and technical constraints.

A. Blending first in external device, then fluid bed treatment

Normally milled DPM is blended with sodium bicarbonate (directly as received from the supplier, additional ball milling not needed). [RPM 1640 with sodium bicarbonate at 2 g/L-equivalents]. This mixture is blended for 20 minutes. The powder is then placed within the fluid bed chamber and fluidized as above for bicarbonate-containing media or bicarbonate-containing media with automatic pH control.

B. Blending directly in fluid bed chamber, then agglomeration

Sodium bicarbonate is placed into the chamber directly with the milled DPM and blended (mixed) for a brief period of time, to be followed with agglomeration. This eliminates blending in a separate unit.

C. Total elimination of the ball-milling process

Either all of the DPM chemicals are added directly to the fluid bed chamber and mixed preliminarily followed by agglomeration or, more likely, some of the coarser, "stickier", etc. chemicals are given a brief grinding treatment in a rotary grinder and then placed within the fluid bed for blending and final agglomeration.

Example 6: A Method for Having All of the above Characteristics Within this Same DPM

We have combined addition of "off the shelf" sodium bicarbonate with milled DPM and automatic pH control. We have also combined serum with DPM.

To combine serum with DPM containing sodium bicarbonate with automatic pH control, one protocol is to:

1. Add sodium bicarbonate (powder, from supplier) to DPM (milled or ground).

2. Blend ingredients (mix, either external unit or fluid bed).

3. In a separate vessel, reconstitute 1 L of the DPM (containing bicarbonate) with water (1X) and determine the amount of 1N HCl, or 1N NaOH that is required to adjust the pH of the solution to 7.5. On a liter basis, knowing the mass of powder to be agglomerated (and thus the L-equivalents), calculate the amount of 1N HCl or 1N NaOH for the total powder to be agglomerated at the above-calculated amount. Add this amount via fluid bed device (injection nozzle). (Although DPM is not "liquid," it is important to have a powder as close to neutrality as possible but not of such an acid pH that bicarbonate would be liberated when adding serum, since moisture is involved in the process. At pH 7.6 or higher, a concentrated solution of sodium bicarbonate will not evolve CO_2 gas, but at lower pH gas will be given off.)

4. Addition of serum (extended agglomeration), based upon percentage supplementation and g to be agglomerated.

5. Using the same 1 L of 1 X liquid from (3) above, determine the amount of 1N HCl or 1N NaOH needed to adjust the pH to the desired pH (e.g., 7.2). Using this information, calculate the amount to be used for the weight of powder that has been agglomerated with serum (knowing g/L specifications). Add this amount via fluid device (injection nozzle).

6. Gamma irradiation is used to sterilize the powdered media.

In a similar method, a serum-containing DPM may be produced by combining a particular amount of DPM with a particular amount of powdered serum (prepared, *e.g.*, by spray-drying as described in Example 8 below) and then agglomerating the mixture. For example, for preparation of medium containing 10% powdered FBS, 55.5 g powdered FBS may be added to 500 g of powdered culture medium and the powders mixed well by agitation. This mixture may then be water-agglomerated as described above, and will yield, upon reconstitution, a culture medium containing 10% FBS which may be auto-pH-adjusting.

Example 7: Production of 100% Serum Powder by Fluid Bed Processing (To Simulate Spray-Drying)

METHODOLOGY

1) We used the benchtop laboratory fluid bed apparatus (Strea-1). For production of powdered serum, nothing is placed within the chamber. The lever is used to seal the unit.

2) Serum was added by way of the injection device (spray unit). As the serum was added into the chamber, the air flow was increased enough and the flow of serum slowed enough that evaporation of water occurred and the serum was dried sufficiently so that powder formed instantly within the chamber. No moist or fluid coating existed anywhere within the chamber.

3) Pump speed was set to allow for ~1ml/minute into the chamber.

4) Airflow speed was set to a setting of ~8-9.

5) To clean filters intermittently, fan speed was reduced to ~2-3. This was done routinely every 5-10 minutes. (The 8-9 airflow setting is so high that the filters will not blow off the powder and clean themselves).

6) After one round of filter blow-off, fan speed was increased to previous levels and the pump turned on. (Once these parameters were set, the pump was run continuously except when cleaning the filters as indicated).

7) After all of the serum liquid had been added into the agglomerator, final drying was performed over five minutes.

8) The filters were then blown off to collect as much powder as possible, and the machine shut off and product removed. Powdered serum was placed into an air-tight container and protected from light.

Typical instrument settings

Drying temperature: 60-65°C

Outlet air temperature: ~33°C

Blow out pressure: 5 bar

Atomizing pressure: 2.0-2.5 bar

Blow back dwell: 2, in between spraying

Capacity of fan: 8-9 throughout run

Magnahelics: Filter resistance-150-250, Resistance of perforated control plate--50, Air volume- less than 50.

To determine if agglomeration of the FBS affected the protein structure or distribution, samples of agglomerated FBS and liquid FBS were run on SDS-PAGE, stained for protein and scanned densitometrically. As shown in Figure 1, agglomerated FBS prepared according to the present methods (Figure 1A) demonstrated a nearly identical protein profile to that observed with liquid FBS (Figure 1B). These results indicate that the controlled production of dry powdered FBS by the present methods does not substantially affect the structure or distribution of the major components of the serum.

To determine if agglomeration of the FBS affected its ability to support cell growth and passage, SP2/0 cells were plated into DMEM containing either 2% agglomerated ("dry") FBS or 2% liquid FBS and growth rates and passage recovery examined. As shown in Figure 2A, cells plated into media containing agglomerated FBS demonstrated similar growth kinetics as did cells plated into media containing liquid FBS. Similarly, cells in media containing agglomerated FBS recovered from passage with practically identical growth rates as cells in media containing liquid FBS (Figure 2B). Together, these results indicate that the agglomerated FBS of the present invention performs approximately equivalently to liquid FBS in supporting growth and passage of cultured cells.

Example 8: Production of 100% Serum Powder by Spray-Drying

As an alternative to fluid bed processing, the feasibility of producing dry powdered serum by spray-drying technology was examined. A three foot diameter laboratory spray drier (Mobile Minor Spray Drier; NIRO, Columbia, Maryland) was used to prepare the powdered serum. Liquid FBS was aspirated into the spray-dryer and atomized through a Schlick 940 nozzle located in the

middle of the air dispenser, and the drying air was introduced into the atomizer through the top air dispenser of the apparatus. Spray drying was conducted under the following conditions: inlet air temperature = 200°C; outlet air temperature = 70°C, atomizing air pressure for the nozzle = 2.0 bar; air flow = 80.0 kg/hour; spray rate = 65 g/minute. During development of these methods, an initial outlet air temperature of 60°C was used; however, this temperature was found to be too low, and the spray rate was adjusted back to a level to achieve an outlet temperature of about 70°C which was found to be optimal. Following spray-drying, powdered serum was collected at the cyclone of the apparatus, and process air was filtered through an exhaust filter prior to recirculation within the apparatus.

Following production, the powdered serum was characterized with respect to its physical properties, compared to liquid FBS from the same source lot. Samples taken from different stages of the production lot (samples "A" and "B") were reconstituted at a concentration of 60.44 g/L in endotoxin-free distilled water (Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland), and were examined for endotoxin levels using a Limulus Amoebocyte Lysate test (Invitrogen Corporation, Life Technologies Division, Rockville, Maryland), for hemoglobin levels (by spectrophotometrically measuring absorbance at 525 nm), and by UV/Vis spectrophotometry. Results are shown in Table 1, and in Figures 3A and 3B.

Table 1. Physical Characterization of Powdered Serum.

Material Tested	Endotoxin Level (EU/ml)	Hemoglobin (mg/100 ml)
Powdered FBS, Sample "A"	0.6	7.7
Powdered FBS, Sample "B"	< 0.3	7.7
Liquid FBS (control)	< 0.3	7.2

As seen in Table 1, powdered FBS demonstrated endotoxin and hemoglobin levels similar to those of the liquid FBS that served as the source material for production of the powdered FBS. Moreover, samples taken from different stages of the production process demonstrated nearly identical endotoxin and hemoglobin levels, indicating that the present methods result in the production of material with approximately uniform physical consistency across the production lot. When samples of powdered and liquid FBS were examined by UV/visible spectrophotometry (Figure 3), the trace observed for powdered FBS (Figure 3A) was indistinguishable from that obtained for the source liquid FBS (Figure 3B). Together, these results indicate that serum powder prepared by the present spray-drying methods have nearly identical physical characteristics as those of liquid sera from which the powders are prepared. Taken together with those of Example 7 above (*see, e.g.*, Figure 1), these results demonstrate that the methods provided by the present invention result in the production of powdered sera with physical characteristics that are unaltered from those of the source liquid sera.

Example 9: Production of Automatically pH-Adjusted Powdered Culture Media

One reason that sodium bicarbonate is never included in powdered media is that any moisture, even that in the air, may result in an acidic condition within the pouch that will result in the liberation of CO_2 gas. The pouches will become swollen and produce what have been called "pillows." With fluid bed processing, the humidity within the apparatus is reduced essentially to negligible levels prior to the end of the process. We have made RPMI-1640 powdered media containing sodium bicarbonate and have not seen evidence of "pillow" formation.

In order to make a pH-adjusted powdered media, it is necessary to add the pH-adjusting chemical (usually HCl or NaOH) to the powder to bring the pH to about 7.0-7.4 upon addition to water. Once sodium bicarbonate is added to the powder, many powdered media reconstitute in water on the basic side of

neutrality and need HCl addition. Adding HCl to a powder containing sodium bicarbonate would be expected to be problematic. However, since the added liquid (5N HCl in this case) never results in a moistened or "liquid" state inside the fluid bed apparatus, the sodium bicarbonate does not give off CO_2 gas and fully retains its buffering capacity. This has been examined in the present studies by pH-titering experiments: equal amounts of acid, in two separate experiments (Figures 4A and 4B) were found to reduce the pH of agglomerated media and automatic pH-adjusted agglomerated media by an identical amount as that for a standard medium with sodium bicarbonate added to the liquid at the time of reconstitution. These results indicate that both agglomeration with subsequent adjustment of pH, and agglomeration with adjustment of pH during the agglomeration process, function equally well to produce powdered culture media with significant buffering capacity.

Example 10: Effect of Agglomeration on Dissolution Rates of Culture Media

To examine the effect of agglomeration of culture media on the rate of dissolution of the media, samples of Opti-MEM I™ or DMEM were agglomerated with water or with FBS (2% only for Opti-MEM I; 2% or 10% for DMEM). Upon reconstitution of the agglomerated media in water, the time dissolution of the agglomerated Opti-MEM I occurred much more quickly than did dissolution of standard powdered Opti-MEM I (Figure 5A); results were identical for water- and FBS-agglomerated Opti-MEM I. Interestingly, however, while water-agglomerated DMEM dissolved in water much more quickly than did standard powdered DMEM, the FBS-agglomerated DMEM did not (Figure 5B).

Due to the open structure of the agglomerated powdered media (as opposed to traditional powdered media), capillary action brings water into close proximity with all of the powder particles. This prevents the appearance of powder "balls," a complication observed upon reconstitution of most standard powdered media that leads to longer dissolution times. In addition to more rapid

dissolution, agglomerated media demonstrated reduced dusting as well. These results indicate that water-agglomerated culture media, and some FBS-agglomerated culture media, are much more rapidly dissolving and generate less dust than traditional powdered culture media.

Example 11: Cell Growth and Subculturing in Reconstituted Agglomerated Culture Media

Many uses of culture media require additions of large molecular weight proteins such as serum or albumin. These molecules may be in the form of solutions or even powder in the case of albumin. However, in order to insure uniformity of powdered media, these proteins are usually added not as a powder but as liquid after reconstitution of the bulk powdered media to a liquid medium. This presents some inconvenience since, for example, serum must be stored in the freezer to maintain performance over time. This adds expense and inconvenience since the serum must be added aseptically to the media, increasing chances of contamination. If filtration is done after addition of serum, another processing step is needed. There would therefore be advantages to being able to provide serum as an integral part of the powdered media.

Therefore, culture media were agglomerated with water or with various concentrations of FBS. FBS was added to the powdered media by injecting it into the air-suspended dry powdered media at high evaporation rates, as generally outlined above. The level of serum supplementation was 2% in Opti-MEM I media, and 2% or 10% in DMEM. The growth and passage success of various cell lines in these media were then assessed.

As shown in Figure 6, SP2/0 cells demonstrated similar growth rates when grown in Opti-MEM I agglomerated with either water or with FBS (Figure 6A), compared to cells grown under conventional culture conditions (liquid serum added to water-reconstituted powdered media). Similar results were observed with SP2/0 cells cultured in water- and FBS-agglomerated DMEM supplemented with 2% FBS (Figure 6B), and with SP2/0 cells (Figure 7A), AE-1

cells (Figure 7B) and L5.1 cells (Figure 7C) cultured in water- and FBS-agglomerated DMEM supplemented with 10% FBS. In addition, SP2/0 cells showed approximately similar recovery rates from passage when cultured in water- or agglomerated Opti-MEM I and DMEM supplemented with 2% FBS (Figures 8A and 8B, respectively), as did SP2/0 cells, AE-1 cells and L5.1 cells cultured in water- and FBS-agglomerated DMEM supplemented with 10% FBS (Figures 9A, 9B and 9C, respectively) and SP2/0 cells cultured in water-agglomerated DMEM supplemented with 5% FBS (Figure 10). Furthermore, SP2/0 cells demonstrated identical passage characteristics in water-agglomerated media produced in large batches and in automatically pH-adjusting powdered DMEM containing sodium bicarbonate as they did in standard liquid DMEM supplemented with 5% FBS (Figure 10).

Together, these results indicate that culture media supplements such as animal sera (*e.g.*, FBS) may be agglomerated directly into culture media, and that supplementation of culture media during the agglomeration process in this way produces a culture medium that provides optimal support of growth and passage of a variety of cultured cells. Furthermore, these results indicate that the present culture media powders may be successfully produced in large batches, including the automatically pH-adjusting media of the invention that contain sodium bicarbonate.

Example 12: Cell Growth in Culture Media Supplemented with Spray-Dried Serum Powder

As a corollary to the experiments shown in Example 7, AE-1 cells and SP2/0 cells were plated into DMEM containing either 2% or 10% spray-dried FBS prepared as described in Example 8, or containing 2% or 10% liquid FBS, and growth rates and passage recovery of the cells were examined. Cells were inoculated into triplicate 25 cm^2 flasks at a density of 1 x 10^5 cells/ml in 10 ml of media. Viable cell density was determined on days 3-7, and each cell line was tested twice. Results are shown in Figures 11-13.

As shown in Figure 11, AE-1 cells cultured in media containing powdered FBS demonstrated similar growth kinetics to those cells cultured in media containing standard liquid FBS. As expected, the cells demonstrated more rapid growth to a higher density in culture media containing 10% FBS than in media containing 2% FBS, and demonstrated peak growth by about day four. Similar kinetics were observed for two separate experiments (Figures 11A and 11B), indicating that these results were reproducible. Analogous results were obtained in two experiments in which the growth rates of SP2/0 cells were measured in media containing powdered or liquid FBS (Figures 12A and 12B). In addition, AE-1 cells cultured in media containing 5% powdered FBS recovered from passage with identical growth rates as cells in media containing liquid FBS (Figure 13).

These results indicate that the powdered FBS prepared by the spray-drying methods of the present invention performs approximately equivalently to liquid FBS in supporting growth and passage of cultured cells. Together with those from Examples 7 and 8, these results indicate that the methods of the present invention may be used to produce powdered FBS, by fluid bed or spray-drying technologies, that demonstrates nearly identical physical and performance characteristics as those of liquid FBS.

Example 13: Effect of Irradiation on Performance of Agglomerated Media

Recently, concerns have been raised about the biological purity of media and media components (including supplements) used for bioproduction, particularly in the biotechnology industry. Gamma irradiation is a sterilization process that is known to work well with certain liquids and powders that are not typically amenable to sterilization by heat or toxic gas exposure. Therefore, samples of water- or FBS-agglomerated culture media were γ irradiated with a cobalt source at 25 kGy for up to several days, and the growth rates of various cell types examined.

In one set of experiments, SP2/0 cells were inoculated into various media at 1 x 10^5 cells/ml and cultured at 37°C. At various intervals, samples were obtained aseptically and cell counts determined by Coulter counting and viability determined by trypan blue exclusion. Media were prepared by dissolving sufficient powdered media to make a 1X solution in 1L of water, stirring and filtering through a 0.22 μm filter. Results are shown in the graph in Figure 14. Those conditions on the graph that state "pwdr FBS" on the graph refer to the addition of powdered FBS (prepared as in Examples 7 or 8 above) to the reconstituted 1X medium prepared from either standard powdered media or from agglomerated media (irradiated or non-irradiated). Those conditions on the graph that state "Irradia. agglom. DMEM + FBS" refer to use of the fluid bed to make the agglomerated media by spraying FBS into the powdered media (standard or agglomerated) to make an FBS-agglomerated media.

As shown in Figure 14, γ irradiation of standard powdered basal media and agglomerated basal media did not deleteriously affect the ability of these media to support SP2/0 cell growth. In addition, while irradiation did negatively impact powdered media containing powdered FBS, and powdered FBS itself, this effect diminished with increasing serum concentration.

To more broadly examine these γ irradiation effects, samples of VERO cells were inoculated into VP-SFM™ that had been conventionally reconstituted or agglomerated as above. To the powdered media in the agglomeration chamber, however, epidermal growth factor (EGF) and ferric citrate chelate, traditional supplements for this media, were added via the spray nozzle during agglomeration. Media were then used directly or were γ irradiated as described above. Cells were inoculated at 3 x 10^5 cells/flask into T-25 flasks and incubated at 37°C. Cell counts and viability were performed as described above, with results shown in Figure 15.

As seen in Figure 15, VERO cells demonstrated approximately equivalent growth and passage success when cultured in agglomerated media that had been γ-irradiated as in agglomerated media that had not been γ-irradiated.

Furthermore, irradiation of the media had no effect on the low-level culture supplements EGF and ferric citrate chelate that were present in the media.

These results indicate that γ irradiation may be used as a sterilization technique in the preparation of many bulk agglomerated culture media, including those containing serum, EGF or other supplements, by the present methods.

Example 14: Effect of Irradiation on Performance of Powdered Media Supplements

To demonstrate the efficacy of the present methods in producing sterile media supplements, lyophilized human holo-transferrin was irradiated by exposure to a cobalt γ source at 25 kGy for about 3 days at -70°C or at room temperature. 293 cells were then cultured in media that were supplemented with irradiated transferrin or with control transferrin that had not been irradiated (stored at -70°C or at room temperature), and cell growth compared to that of standard transferrin-containing culture media or media that contained no transferrin.

Mid-log phase 293 cells that were growing in serum-free 293 medium (293 SFM) were harvested, washed once at 200 x *g* for 5 minutes and resuspended in transferrin-free 293 SFM for counting and viability determination. Cells were plated into triplicate 125 ml Ehrlenmeyer flasks at a density of 3×10^5 cells/ml in a volume of 20 ml in 293 SFM (positive control), transferrin-free 293 SFM (negative control), in 293 SFM containing non-irradiated transferrin stored at -70°C or at room temperature, or in 293 SFM containing irradiated transferrin prepared as described above. Flasks were placed into a rotary shaker set at about 125 rpm, in a 37°C incubator equilibrated with an atmosphere of 8% CO_2/92% air. Daily cell counts were determined using a Coulter particle counter and viabilities were determined by trypan blue exclusion according to standard procedures. When the cells reached a density of about 1.2 to 1.7×10^6 per flask, the contents of one of the flasks of each sample were harvested, centrifuged, resuspended into fresh medium and passaged into three new flasks. Cell counts

and viabilities of the previous and next passages were then performed as described above. Four consecutive passages of cells incubated under the above conditions were tested.

As shown in Figures 16A-16D, cells cultured in media containing transferrin that was γ irradiated at either -70°C or at room temperature demonstrated nearly identical growth kinetics and survival in the first passage (Figure 16A), second passage (Figure 16B), third passage (Figure 16C) and fourth passage (Figure 16D) as did cells cultured in standard 293 SFM or in 293 SFM containing transferrin that had not been γ irradiated. Cells cultured in transferrin-free media, however, survived well during the first passage (Figure 16A) but stopped growing and demonstrated a significant loss in viability upon subculturing (Figure 16B).

These results demonstrate that γ irradiation may be used as a sterilization technique in the preparation of bulk powdered culture media supplements, such as transferrin, in the methods of the present invention. Furthermore, these data indicate that culture media supplements such as transferrin may be γ irradiated at room temperature without significant loss of activity.

Example 15: Effect of Irradiation on Biochemical Characteristics of Powdered Sera

To further determine the impact of γ irradiation on sera, samples of spray-dried powder FBS were irradiated at 25 kGy at -70°C or at room temperature (RT), and were analyzed commercially for the concentrations of various biochemical constitutents in the sera. As controls, samples of non-irradiated spray-dried FBS and liquid FBS were also analyzed. Results are shown in Table 2.

Table 2. Chemical Analysis of Spray-Dried FBS

Constituent	Dried FBS, Irr. @ -70°C	Dried FBS, Irr. @RT	Non-irradiated Dried FBS	Liquid FBS	Units	Reference Range
Sodium	139	137	139	140	mM	136-144
Potassium	13.2	13.2	13.0	13.2	mM	3.6-5.2
Chloride	98	97	98	100	mM	98-108
Uric Acid	1.6	1.3	1.7	1.9	mg/dL	2.2-8.3
Phosphorus	10.1	10.1	9.6	10.2	mg/dL	2.2-4.6
Calcium	14.9	14.8	14.8	14.5	mg/dL	8.6-10.2
Ionizable Calcium	>5.5	>5.5	>5.5	>5.5	mg/dL	3.8-4.5
Magnesium	2.77	2.76	2.75	2.76	meg/L	1.4-2.0
Alkaline Phosphatase	57	47	68	269	U/L	31-142
Gamma GT (GGTP)	3	5	<5	5	U/L	1-60
AST (SGOT)	7	5	5	33	U/L	1-47
ALT (SGPT)	5	<5	<5	7	U/L	1-54
LD	56	<50	50	510	U/L	110-250
Total Bilirubin	0.19	0.24	0.22	0.13	mg/dL	0.2-1.4
Direct Bilirubin	0.04	0.07	0.07	0.04	mg/dL	0.0-0.3
Glucose	67	38	39	88	mg/dL	65-125
BUN	15	15	15	15	mg/dL	6-23
Creatinine	2.98	3.08	3.1	2.77	mg/dL	0.1-1.7
BUN/Creatine Ratio	5.0	4.9	4.8	5.4	---	7.0-20.0
Total Protein	3.6	3.6	3.5	3.7	gm/dL	6.4-8.1
Albumin	2.7	2.7	2.8	2.8	gm/dL	3.7-5.1
Globulin	0.9	0.9	0.7	0.9	gm/dL	2.1-3.6
Albumin/ Globulin Ratio	3.0	3.0	4.0	3.1	---	1.1-2.3
Cholesterol	30	30	32	30	mg/dL	<200
HDL Cholesterol	28	30	30	27	mg/dL	39-90
Chol/HDL Ratio	1.07	1.00	1.07	1.11	---	<4.5
Triglycerides	72	74	72	73	mg/dL	30-200
Iron	213	217	214	186	meg/dL	40-175
Plasma Hb	13.3	11.5	13.7	22.6	mg/dL	3.4-20.5

These results indicate that the γ irradiation process did not significantly affect the concentrations of most of the biochemical constituents of FBS. These results also indicate that upon spray-drying, several of the components of FBS (alkaline phosphatase, AST, and LD, and possibly glucose) undergo a significant reduction in concentration compared to their concentrations in the starting liquid FBS.

Example 16: Effects of Irradiation on Performance of Powdered Sera

To examine the impact of γ irradiation on the ability of dried powder sera to support cell growth, samples of spray-dried FBS irradiated under various conditions were used to supplement culture media, and adherent and suspension cells were grown for up to three passages in these media. As model suspension cells, the hybridoma lines SP2/0 and AE-1 were used, while VERO and BHK cultures were used as typical adherent cells. Cells were cultured in media containing test sera or control sera (spray-dried but not irradiated) for up to three passages according to the general procedures outlined in Example 14 above. At each passage point, cells were harvested and subcultured, while an aliquot was counted as above for viable cells/ml. Results at each point were expressed as a percentage of the viable cell count obtained in media supplemented with liquid FBS, and are shown in Figures 17A, 17B, 17C and 17D.

Several conclusions may be drawn from the results of these studies. First, γ irradiation of FBS does not appear to reduce the ability of spray-dried FBS to support the growth of suspension and adherent cells (compare the irradiated data sets to the non-irradiated data set in each figure). In fact, BHK cells (Figure 17D) actually grew better in media containing powdered FBS that had been irradiated at -70°C than they did in non-irradiated sera. Second, sera irradiated at -70°C appear to perform better than those irradiated at room temperature in their ability to support cell growth, except perhaps for VERO cells (Figure 17C). Finally, the results of these studies were very cell type-specific: suspension cells (Figures 17A and 17B) grew better in spray-dried FBS, irradiated and non-irradiated, than did

adherent cells (Figures 17C and 17D); and among adherent cells, BHK cells (Figure 17D) grew better in spray-dried FBS than did VERO cells (Figure 17C).

These results demonstrate that γ irradiation may be used as a sterilization technique in the preparation of bulk powdered sera, such as FBS, in the methods of the present invention. Furthermore, unlike those reported for transferrin in Example 14 above, these data suggest that the optimal temperature for irradiation of sera, in order to maintain the ability of the sera to support cell growth, is likely to be below room temperature.

Example 17: Production of Automatically pH-Adjusted Powdered Culture Media by Phosphate Balancing

As noted above, typical commercially available mammalian cell culture powdered media require addition of one or more buffer salts (e.g., sodium bicarbonate) when preparing a 1X liquid, followed by adjustment of pH, so that the solution will be at proper pH for use. The methods of the present invention, however, can be used to obviate both the post-reconstitution addition of sodium bicarbonate (as described above in Example 2) and the need for pH adjustment. In this aspect of the invention, fluid bed technology may be used to introduce acid or base (depending on the need) to a dry powder medium comprising one or more buffering salts. In accordance with this aspect of the invention, any buffering salts or combinations thereof, and any acid or base, may be used depending upon the desired pH and buffering capacity in the ultimately reconstituted cell culture medium.

If sodium bicarbonate is added as a powder directly to the dry powder medium (DPM) in accordance with the methods of the present invention, it is possible for the end user to simply add solvent (*e.g.*, water) and mix to yield a solution already containing bicarbonate (see above) and at the proper pH for immediate use -- *i.e.*, an "auto-pH" or "automatically pH-adjusting" culture medium of the invention. To determine how much of a pH adjustment is required, several steps should be undertaken:

(1) Place ~950 ml of solvent (*e.g.*, water) in a beaker. Add DPM (in an amount according to the manufacturer's specifications or according to

formulation specifications that are known in the art as referred to herein) to the solvent and mix *quantum sufficit* to 1L. In this case, the weight of the sodium bicarbonate must also be considered in determining how much DPM to add per liter. However the DPM should contain neither sodium phosphate buffer nor HEPES buffer, which will be titrated in, but should contain sodium bicarbonate.

(2) The next step is to determine whether monobasic or dibasic phosphate will give the desired final pH. This depends on the whether the adjustment of pH needed is to a more basic level (indicating the need for dibasic phosphate), or to a more acidic level (indicating the need for monobasic phosphate). Sequentially add amounts (at final concentration ranges of about 0.1 mM to about 10 mM, about 0.2 mM to about 9 mM, about 0.3 mM to about 8.5 mM, about 0.4 mM to about 8 mM, about 0.5 mM to about 7.5 mM, about 0.6 mM to about 7 mM, and preferably about 0.7 mM to about 7 mM) of monobasic or dibasic phosphate salts to obtain the desired pH. The total molar amounts of sodium phosphate should remain constant, but buffering due to either monobasic or dibasic results in similar buffering kinetics at a given pH (see Figure 18), because the molecular species in solution is the same as determined by the final (desired) pH of the solution.

(3) If the medium contains a HEPES buffer system, add the correct molar amount of either the acid form (for more acidic pH) or the sodium form (for more basic pH) of HEPES to arrive at the proper (desired) final pH.

(4) The next step is to exchange the monobasic sodium phosphate for monobasic potassium phosphate on a molar weight basis (identical buffering characteristics result from use of either sodium or potassium phosphate). To carry out this exchange, the amount of monobasic sodium phosphate calculated in step 2 above is substituted with an equal amount of potassium phosphate, which is then used to formulate the final medium. Hence, in this aspect of the invention, the amount of monobasic sodium phosphate calculated in step 2 above is not actually added to the medium to adjust the pH; instead, this amount is simply calculated, and then the calculated amount of potassium phosphate is used in adjusting the pH of the final medium. This is done so that subsequent off-gassing of carbon dioxide gas is eliminated or minimized. (In order to have the

same molar ratios of potassium to sodium in the formulation as a whole, it is necessary to back-adjust the amount of potassium chloride in the formulation so that the final 1X molar amounts are the same. This may also result in the need to adjust with a small amount of sodium chloride to reach identical osmolarities). When the solution is in its final form, it is dried into a powder by either agglomeration using fluid bed technology (as described in Example 1), spray-drying (see Example 8), or lyophilization techniques known to those skilled in the art.

While the above are the basic manipulations recommended for including sodium bicarbonate in powdered media, additional considerations should also be kept in mind:

1. Only anhydrous forms of media components should be used

2. If anhydrous forms are not available, consider using "ionic replacement" (*e.g.*, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ or monohydrous; also consider using $ZnCl_2$ with sodium sulfate and reducing stoichiometrically correct amounts of NaCl from the added amount of NaCl as indicated in the formulations);

3. Do not use HCl conjugates of chemicals: use free base (ex. arginine instead of arginine HCl, corrected for true desired weight);

4. Monobasic sodium phosphate should not be used at all since it can cause pillowing. Instead, monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), which does not cause pillowing should be used. The buffering responses of both of these chemicals is identical. The amount of potassium added to the formulation in the forms of other salts should correspondingly be reduced by the amount KH_2PO_4 added here. Also, extra NaCl may be needed so that the osmolarity of the formula with sodium phosphate is equal to the osmolarity of the formula with potassium phosphate.

5. Dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4) does not "pillow" and is acceptable for use in the formulation.

6. Do not use HCl "spray in" in the fluid bed for auto-adjust mechanism because this increases the propensity to "pillow" with the bicarbonate. Instead, adjust the final pH of reconstituted media by phosphate balance in the

DPM. (Na_2HPO_4 raises pH, while KH_2PO_4 reduces pH. As indicated above use "ionic balance" results in the same ionic composition of the 1X media).

7. If amino acid(s) need to be added as a spray-in for the fluid bed (such as cysteine for CD-CHO) because of solubility concerns, do not reduce pH to dissolve amino acids but raise pH to the minimum needed for solubilization (*e.g.*, pH 10.66 for cysteine).

8. If a component cannot be obtained anhydrous or "ionic replacement" does not apply, the chemical can be solubilized and sprayed into the media via agglomeration: water in the crystal component will not dry during agglomeration, but if the water is released by dissolution, then it will be eliminated from the DPM by the spraying and evaporation process.

9. Check with an accelerated shelf life test (37°C in a sealed pouch with equal amounts of bicarbonate for any chemicals that appear moist or gooey such as choline chloride. One example of an acceptable shelf life testing protocol is as follows:

(a) place 10 grams of the test compound into a mortar and pestle; add 10 grams of $NaHCO_3$;

(b) grind the mixture to reduce particle size and blend for about 30 seconds;

(c) add the blended mixture to a foil pack; seal the open end of the pack;

(d) place the pack into an incubator at 37°C, and observe for "pillow" formation (*i.e.*, swelling of the pack due to off-gassing of the $NaHCO_3$) over 24 hours.

If gas is given off, solubilize and add that component to the spray-in solution.

10. Place choline Cl in neutral solubles spray-in.

Once the powder is collected after the spray-dry or agglomeration run, it can be reconstituted with a solvent (*e.g.*, water) at any time, as long as it has been kept in proper "dry" packaging and conditions. Examples of acceptable or "proper" dry packaging include any packaging that retards or prevents the penetration of water and/or water vapor through the packaging upon storage, such as foil packaging, polyethylene bags, sealed plastic (particularly polypropylene, polycarbonate, polystyrene, polyethylene terephthalate (PET) and the like).

Examples of proper storage conditions include storage at about 0°C to about 25°C, preferably about 2°C to about 20°C, about 2°C to about 15°C, about 2°C to about 10°C, or about 2°C to about 8°C, under diminished or subdued lighting. Under such conditions, minimum shelf life of the media of the present invention is about one year (stored at about 2°C to about 8°C), or about six months (at about 20°C to about 25°C (room temperature)).

For use, the powder is simply reconstituted with an appropriate solvent (*e.g.*, water); no adjustment of pH is needed, since the media are at the appropriate pH and have appropriate buffering kinetics immediately upon reconstitution (see Figures 19A and 19B). Thus, the invention provides an automatic pH-adjusting dry powdered medium, where the pH of the liquid medium made by reconstituting the dry powdered medium requires no adjustment of pH.

Example 18: Spray in of Media Components in μg/ml or μg/L Quantities

Chemicals such as trace elements (such as calcium, copper, iron, magnesium, manganese, nickel, potassium, tin, and zinc, vitamins (such as A, B_1, B_2, B_6, B_{12}, C, D, E, K and H (biotin), viral inhibitors (such as protease inhibitors, nucleoside analogues, and the like), growth factors (such as EGF, aFGF, bFGF, HGF, IGF-1, IGF-2, and NGF), etc., may be added to standard powdered media by first making a concentrate of the chemicals and then spraying them into the powdered media granulation (*see* U.S. Patent Application No. 09/023,790, filed February 13, 1998, which is incorporated herein by reference in its entirety.) The resulting powder may then be milled (*e.g.*, with a Fitzmill) to a particle size in the same general size range as that of the bulk for blending (which is required after weighing and Fitzmilling). This portion may then be combined with the bulk powdered medium and milled together to create a homogeneously mixed powdered medium. Alternatively, the components of the powdered media may be subgrouped into mixtures of compatible compounds or components, which may then be blended immediately prior to formulation, and concentrates of the low-level components may be sprayed into the blend. This approach is

particularly advantageous when dealing with components that may be incompatible if they are admixed and stored together for extended times in a powdered media formulation (*e.g.*, cysteine and glutamine, which will form insoluble complexes upon storage together for extended periods of time). (For a more detailed description of the advantages of subgrouping culture medium components, *see* Example 19 below, and commonly owned U.S. Patent Nos. 5,474,931 and 5,681,748, the disclosures of which are incorporated by reference herein in their entireties). The ability to spray-in chemicals in small amounts is especially helpful in developing media that contains components present in small quantities and which are inconvenient to add separately. Thus, the dry powdered medium is ready to use.

Example 19: Subgrouping of Components to Avoid Harmful Interactions During Agglomeration

Some of the components of a medium may be incompatible and cause interact deleteriously to each other if they are weighed and then held together prior to milling and agglomeration. For example, adverse reactions have been observed when cysteine and glutamine powders are admixed, when phosphate salts are admixed with calcium- or magnesium ion-containing salts, when phosphate salts (particularly monobasic forms thereof) are admixed with choline chloride, and when glutathione is admixed with amino acids. In addition, acidic components (*e.g.*, acidic forms of certain buffer salts, vitamins, and the like) may denature protein components such as growth factors or serum. Therefore, these particular components can be subgrouped (*see* commonly owned U.S. Patent Nos. 5,474,931 and 5,681,748, which describe methods of subgrouping culture media, supplement and buffer components, and the disclosures of which patents are incorporated herein by reference in their entireties) and agglomerated together as a subgroup. Specific subgroups include, an acid soluble subgroup, a weak acid-base soluble subgroup, a glutamine-containing subgroup, an alcohol soluble subgroup, an alkali-soluble subgroup, and a supplement-containing subgroup. After agglomeration of the separate subgroups, they can then be mixed together, as described in Example 18 for spraying in of elements in small quantities.

Alternatively, the concentrates may be sprayed directly into already-milled bulk powder. In this approach, each subgroup is milled (*e.g.*, via Fitzmilling) and then placed into the fluid bed apparatus at the same time as other subgroups, so that the subgroups are mixed together during agglomeration; concentrates may then be sprayed into the bulk powder sequentially, such that individual incompatible components are only admixed for a very short period of time prior to being agglomerated. The agglomerated powder can then be collected and stored as described herein until reconstitution and use, without adverse reactions occurring among individual, otherwise incompatible, components.

Having now fully described the present invention in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious to one of ordinary skill in the art that the same can be performed by modifying or changing the invention within a wide and equivalent range of conditions, formulations and other parameters without affecting the scope of the invention or any specific embodiment thereof, and that such modifications or changes are encompassed within the scope of the appended claims.

All publications, patents and patent applications mentioned in this specification are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains, and are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for producing an automatically pH-adjusting dry powdered culture medium, comprising:

(a) determining the ratio of pH-opposing forms of buffer salts required to be added to said powder to automatically provide a desired final pH upon reconstitution of said powder with a solvent; and

(b) adding amounts of pH-opposing forms of buffer salts to said powder in the ratio determined in step (a).

2. The method of claim 1, further comprising packaging said dry powdered medium.

3. The method of claim 1, further comprising sterilizing said dry powdered medium.

4. The method of claim 3, wherein said sterilization accomplished by irradiating said dry powdered medium with gamma rays until said medium is sterile.

5. The method of any one of claims 1-3, wherein said medium comprises at least one monobasic and/or dibasic buffering salt.

6. The method of claim 5, wherein said monobasic and/or dibasic buffering salt is a monobasic and/or dibasic phosphate salt.

7. The method of claim 6, wherein at least one of said monobasic and/or dibasic phosphate salts is a sodium phosphate salt.

8. The method of claim 6, wherein at least one of said monobasic or dibasic phosphate salts is a potassium phosphate salt.

9. The method of claim 1, wherein said dry powder medium contains sodium bicarbonate but does not liberate CO_2 upon storage.

10. An automatically pH-adjusting dry powdered culture medium produced by the method of any one of claims 1-3 and 9.

11. A complete dry powder culture medium that supports the cultivation of a cell *in vitro* upon reconstitution of the medium with a solvent without the addition of any supplemental nutrient components to said medium.

12. The medium of claim 11, wherein said medium is an automatically pH-adjusting medium.

13. The medium of claim 11, wherein said medium comprises one or more components selected from the group of components consisting of serum, one or more culture medium supplements, L-glutamine, insulin, transferrin, one or more hormones, one or more lipids, one or more growth factors, one or more cytokines, one or more neurotransmitters, one or more extracts of animal tissues, organs or glands, one or more enzymes, one or more proteins, one or more trace elements, one or more extracellular matrix components, one or more antibiotics, one or more viral inhibitors, and or one or more buffers.

14. A method of cultivating a cell, comprising reconstituting an automatically pH-adjusting dry powdered medium with a solvent to form a culture medium solution, and contacting the cell with said liquid solution under conditions favoring the cultivation of the cell.

15. A method of cultivating a cell comprising preparing an automatically pH-adjusting dry powdered culture medium prepared according to the method any one of claims 1-3 and 9, reconstituting the medium with at least one solvent to form a culture medium solution, and contacting a cell with said solution under conditions favoring cultivation of the cell.

16. A method of cultivating a cell, comprising reconstituting the culture medium of claim 10 with a solvent to form a culture medium solution, and contacting the cell with said solution under conditions favoring the cultivation of the cell.

17. A method of cultivating a cell, comprising reconstituting the culture medium of claim 11 with a solvent to form a culture medium solution, and contacting the cell with said solution under conditions favoring the cultivation of the cell.

18. The method of any one of claims 14, 16 and 17, wherein said cell is a bacterial cell.

19. The method of claim 15, wherein said cell is a bacterial cell.

20. The method of any one of claims 14, 16 and 17, wherein said cell is a eukaryotic cell.

21. The method of claim 15, wherein said cell is a eukaryotic cell.

22. The method of claim 20, wherein said eukaryotic cell is a yeast cell, a plant cell, or a cell line derived therefrom.

23. The method of claim 21, wherein said eukaryotic cell is a yeast cell, a plant cell, or a cell line derived therefrom.

24. The method of claim 20, wherein said eukaryotic cell is an animal cell or a cell line derived therefrom.

25. The method of claim 21, wherein said eukaryotic cell is an animal cell or a cell line derived therefrom.

26. The method of claim 24 or claim 25, wherein said animal cell is a mammalian cell or a cell line derived therefrom.

27. The method of claim 26, wherein said mammalian cell is a human cell or a cell line derived therefrom.

28. A kit for culturing a cell, comprising one or more containers containing an automatically pH-adjusting dry powdered culture medium prepared according to the method of any one of claims 1-3 and 9.

29. A kit for culturing a cell, comprising one or more containers containing the automatically pH-adjusting dry powdered culture medium of claim 10.

30. A kit for culturing a cell, comprising one or more containers containing the complete dry powdered culture medium of claim 11.

31. The kit of claim 28, wherein said kit further comprises one or more additional containers containing at least one additional component selected from the group consisting of at least one growth factor, at least one culture medium supplement, at least one animal tissue extract, at least one animal organ extract, at least one animal gland extract, at least one enzyme, at least one protein, at least one vitamin, at least one cytokine, at least one lipid, at least one trace element, at least one extracellular matrix component, at least one buffer, at least one antibiotic, and at least one viral inhibitor.

32. The kit of claim 29 or claim 30, wherein said kit further comprises one or more additional containers containing at least one additional component selected from the group consisting of at least one growth factor, at least one culture medium supplement, at least one animal tissue extract, at least one animal organ extract, at least one animal gland extract, at least one enzyme, at least one protein, at least one vitamin, at least one cytokine, at least one lipid, at least one

trace element, at least one extracellular matrix component, at least one buffer, at least one antibiotic, and at least one viral inhibitor.

33. A composition comprising the automatically pH-adjusting culture medium of claim 10 and at least one cell.

34. The composition of claim 33, wherein said composition is a powder.

35. A composition comprising the complete culture medium of claim 11 and at least one cell.

36. The composition of claim 33 or claim 35, wherein said cell is selected from the group consisting of a bacterial cell, a yeast cell, a plant cell and an animal cell.

37. The composition of claim 36, wherein said animal cell is a mammalian cell.

38. The composition of claim 37, wherein said mammalian cell is a human cell.

39. The composition of claim 36, wherein said cell is an established or transformed cell line.

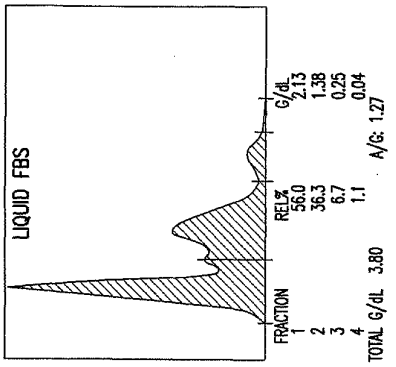

LIQUID FBS
FRACTION
1
2
3
4
TOTAL G/dL 3.80
REL%
56.0
36.3
6.7
1.1
G/dL
2.13
1.38
0.25
0.04
A/G: 1.27

FIG.1B

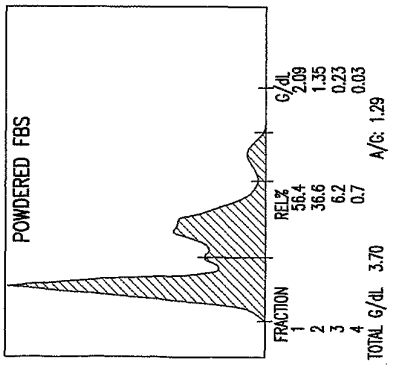

POWDERED FBS
FRACTION
1
2
3
4
TOTAL G/dL 3.70
REL%
56.4
36.6
6.2
0.7
G/dL
2.09
1.35
0.23
0.03
A/G: 1.29

FIG.1A

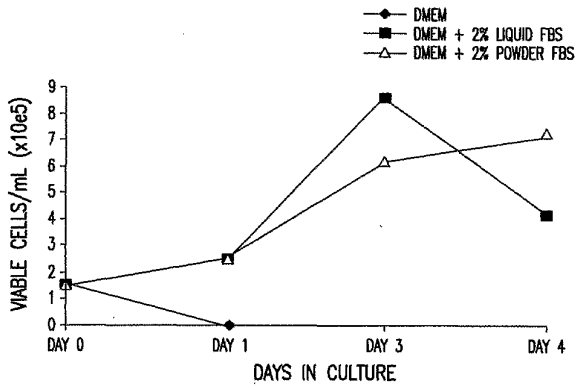

DMEM
DMEM + 2% LIQUID FBS
DMEM + 2% POWDER FBS
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
DAY 0
DAY 1
DAY 3
DAY 4
DAYS IN CULTURE

FIG.2A

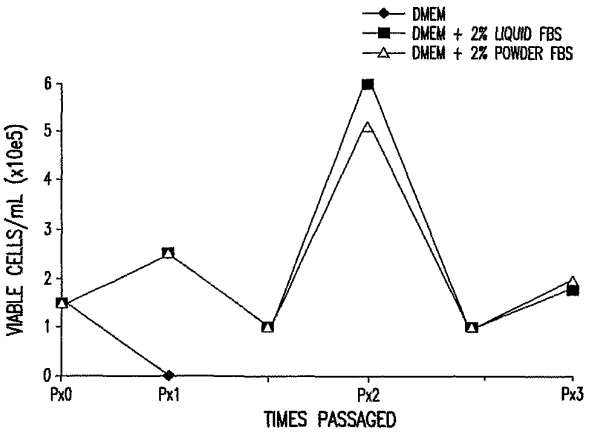

DMEM
DMEM + 2% LIQUID FBS
DMEM + 2% POWDER FBS
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
1
2
3
4
5
6
Px0
Px1
Px2
Px3
TIMES PASSAGED

FIG.2B

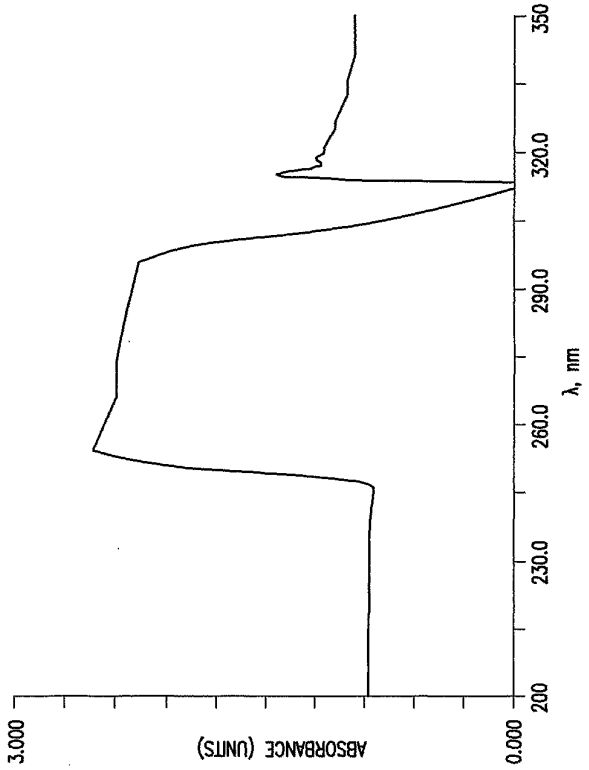


FIG.3A

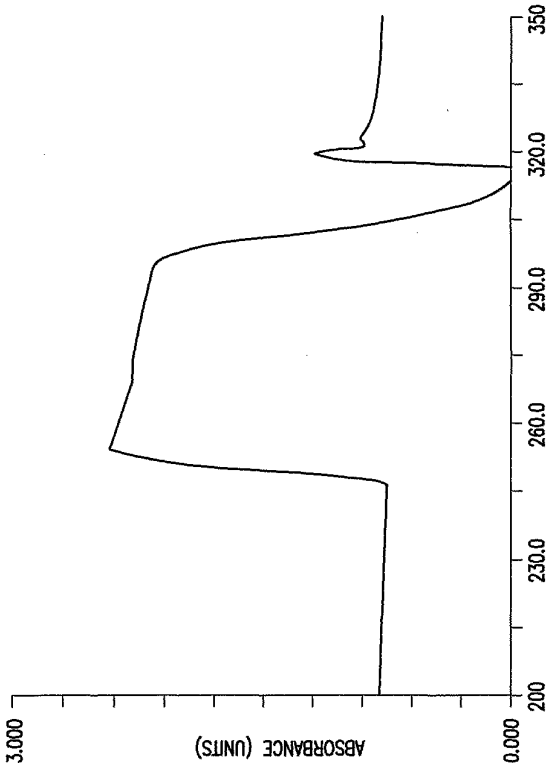


FIG.3B

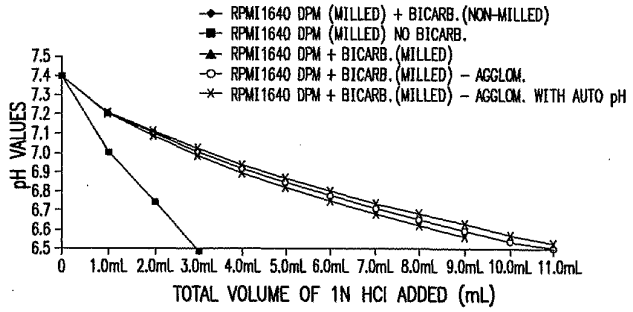

RPMI1640 DPM (MILLED) + BICARB.(NON-MILLED)
RPMI1640 DPM (MILLED) NO BICARB.
RPMI1640 DPM + BICARB.(MILLED)
RPMI1640 DPM + BICARB.(MILLED) – AGGLOM.
RPMI1640 DPM + BICARB.(MILLED) – AGGLOM. WITH AUTO pH
pH VALUES
7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7.0
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
0
1.0mL
2.0mL
3.0mL
4.0mL
5.0mL
6.0mL
7.0mL
8.0mL
9.0mL
10.0mL
11.0mL
TOTAL VOLUME OF 1N HCl ADDED (mL)

FIG.4A

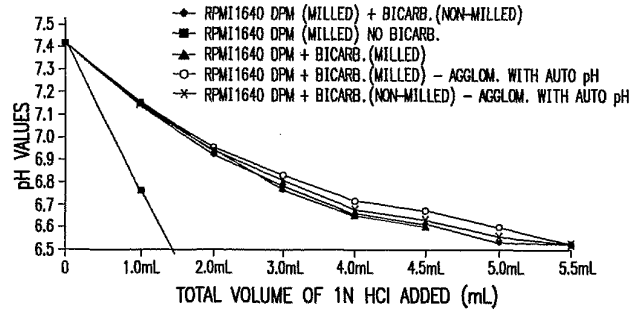

RPMI1640 DPM (MILLED) + BICARB.(NON-MILLED)
RPMI1640 DPM (MILLED) NO BICARB.
RPMI1640 DPM + BICARB.(MILLED)
RPMI1640 DPM + BICARB.(MILLED) – AGGLOM. WITH AUTO pH
RPMI1640 DPM + BICARB.(NON-MILLED) – AGGLOM. WITH AUTO pH
pH VALUES
7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7.0
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
0
1.0mL
2.0mL
3.0mL
4.0mL
4.5mL
5.0mL
5.5mL
TOTAL VOLUME OF 1N HCl ADDED (mL)

FIG.4B

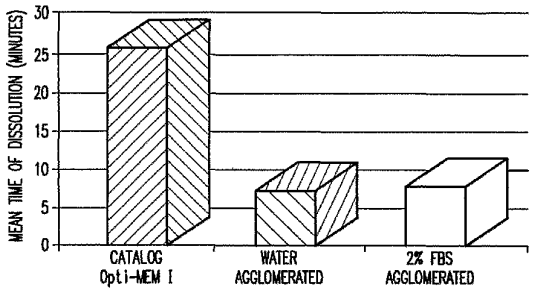

MEAN TIME OF DISSOLUTION (MINUTES)
30
25
20
15
10
5
0
CATALOG
Opti-MEM I
WATER
AGGLOMERATED
2% FBS
AGGLOMERATED

FIG.5A

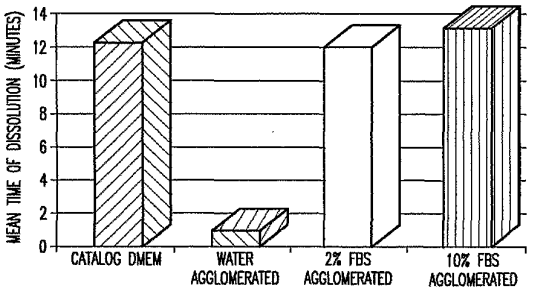

MEAN TIME OF DISSOLUTION (MINUTES)
14
12
10
8
6
4
2
0
CATALOG DMEM
WATER
AGGLOMERATED
2% FBS
AGGLOMERATED
10% FBS
AGGLOMERATED

FIG.5B

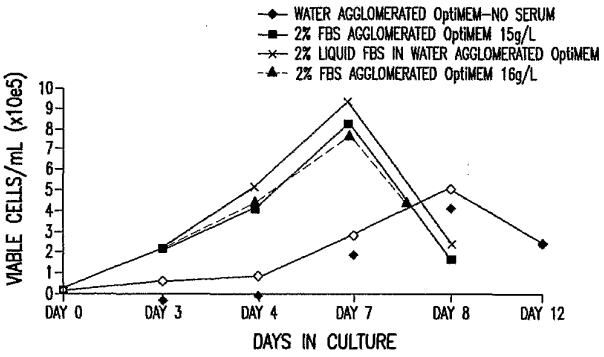

WATER AGGLOMERATED OptiMEM-NO SERUM
2% FBS AGGLOMERATED OptiMEM 15g/L
2% LIQUID FBS IN WATER AGGLOMERATED OptiMEM
2% FBS AGGLOMERATED OptiMEM 16g/L
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
DAY 0
DAY 3
DAY 4
DAY 7
DAY 8
DAY 12
DAYS IN CULTURE

FIG.6A

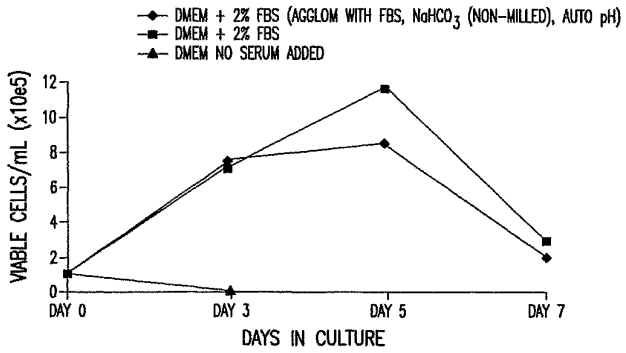

DMEM + 2% FBS (AGGLOM WITH FBS, NaHCO3 (NON-MILLED), AUTO pH)
DMEM + 2% FBS
DMEM NO SERUM ADDED
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
2
4
6
8
10
12
DAY 0
DAY 3
DAY 5
DAY 7
DAYS IN CULTURE

FIG.6B

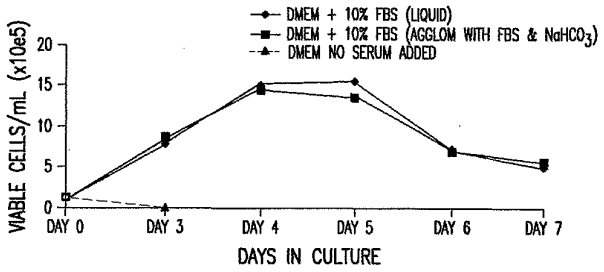


FIG.7A

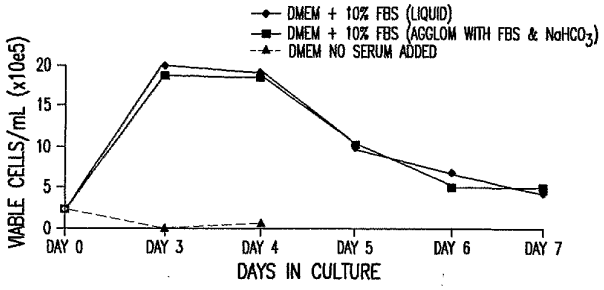


FIG.7B

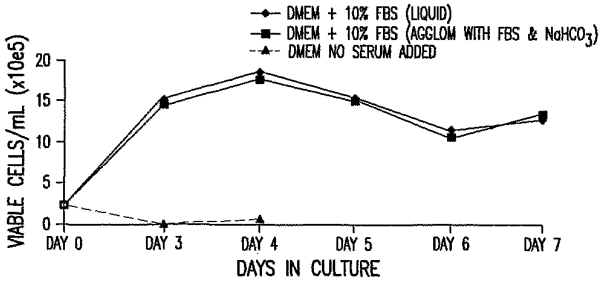


FIG.7C

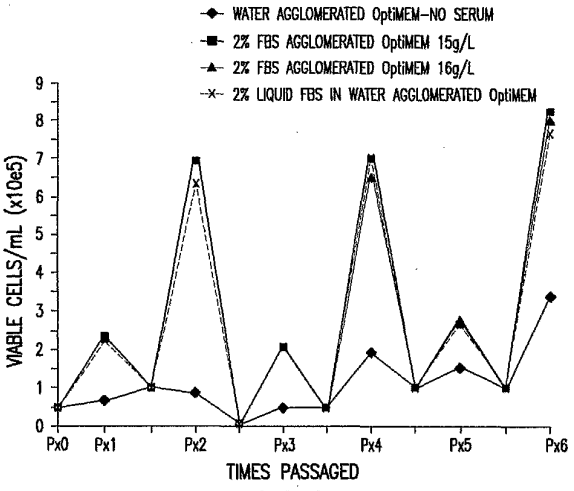

WATER AGGLOMERATED OptiMEM–NO SERUM
2% FBS AGGLOMERATED OptiMEM 15g/L
2% FBS AGGLOMERATED OptiMEM 16g/L
2% LIQUID FBS IN WATER AGGLOMERATED OptiMEM
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Px0
Px1
Px2
Px3
Px4
Px5
Px6
TIMES PASSAGED

FIG.8A

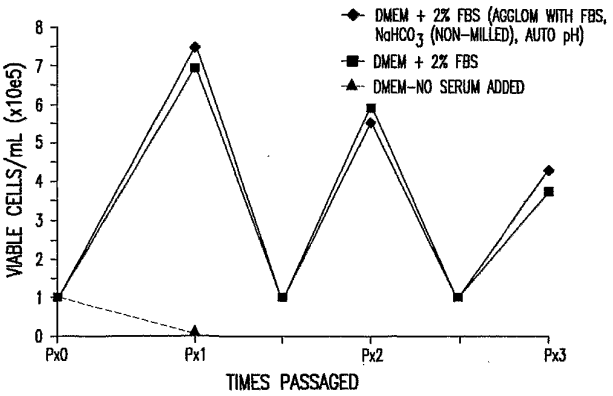

DMEM + 2% FBS (AGGLOM WITH FBS, NaHCO3 (NON–MILLED), AUTO pH)
DMEM + 2% FBS
DMEM–NO SERUM ADDED
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Px0
Px1
Px2
Px3
TIMES PASSAGED

FIG.8B

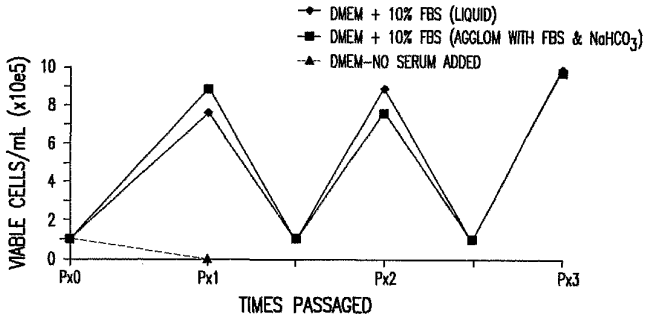

DMEM + 10% FBS (LIQUID)
DMEM + 10% FBS (AGGLOM WITH FBS & NaHCO3)
DMEM-NO SERUM ADDED
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
10
8
6
4
2
0
Px0
Px1
Px2
Px3
TIMES PASSAGED

FIG.9A

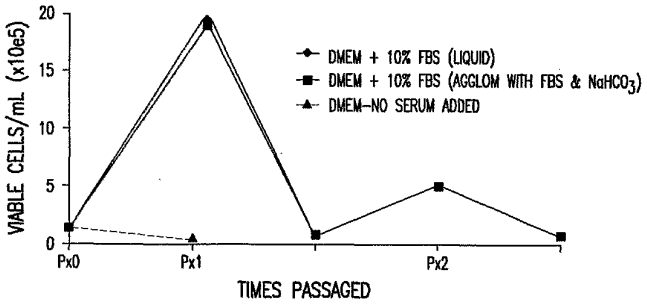

DMEM + 10% FBS (LIQUID)
DMEM + 10% FBS (AGGLOM WITH FBS & NaHCO3)
DMEM-NO SERUM ADDED
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
20
15
10
5
0
Px0
Px1
Px2
TIMES PASSAGED

FIG.9B

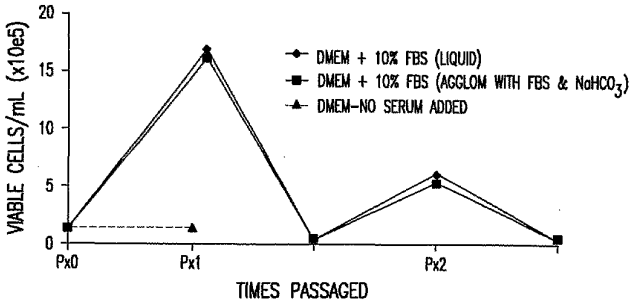

20
15
10
5
0
VIABLE CELLS/mL (x10e5)
Px0
Px1
Px2
TIMES PASSAGED
DMEM + 10% FBS (LIQUID)
DMEM + 10% FBS (AGGLOM WITH FBS & NaHCO3)
DMEM-NO SERUM ADDED

FIG.9C

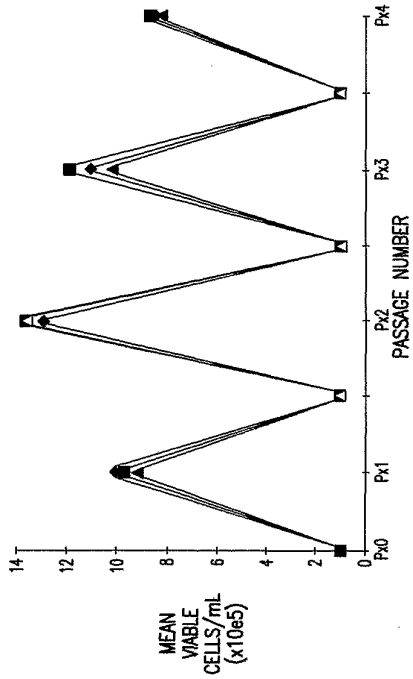

MEAN VIABLE CELLS/mL (x10e5)
0
2
4
6
8
10
12
14
Px0
Px1
Px2
Px3
Px4
PASSAGE NUMBER

FIG.10

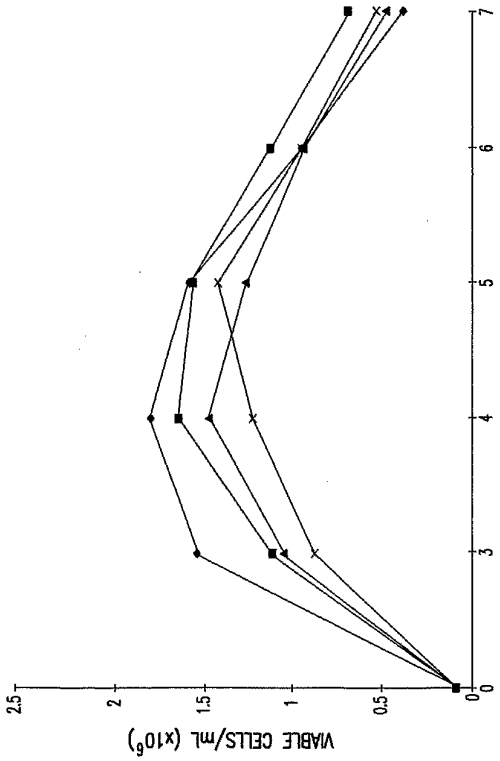


FIG.11A

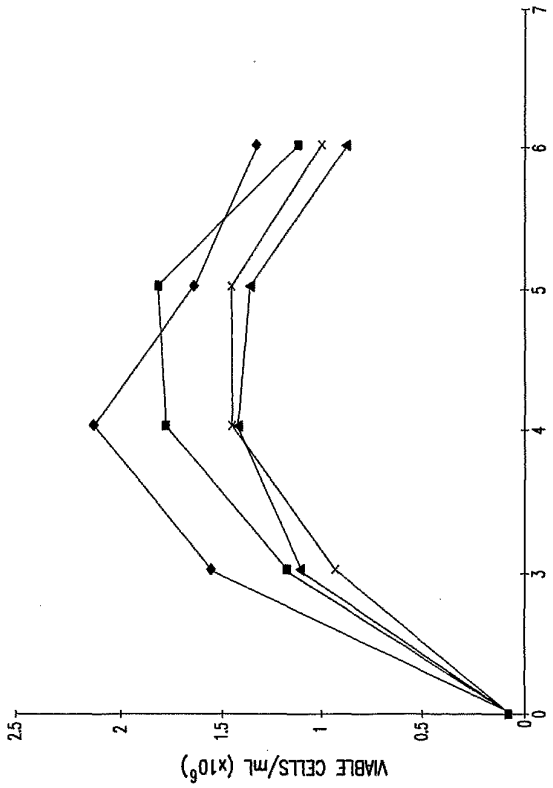


FIG.11B

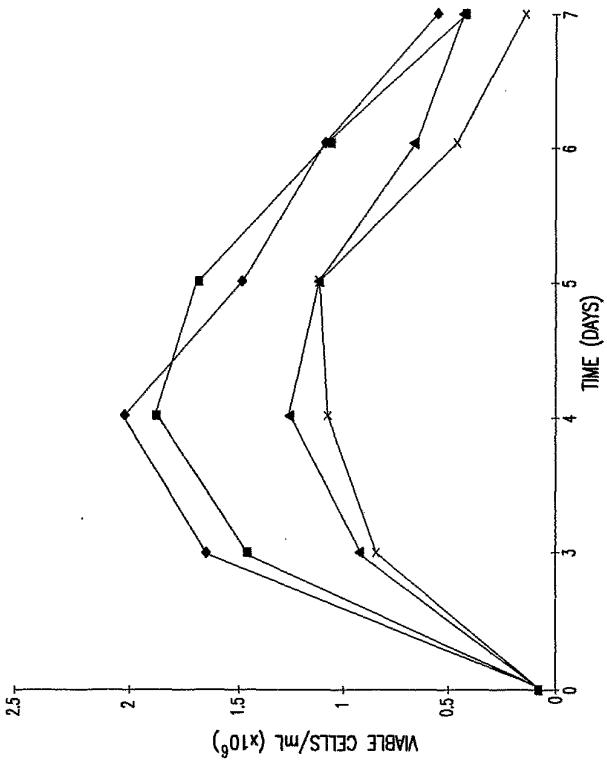


FIG.12A

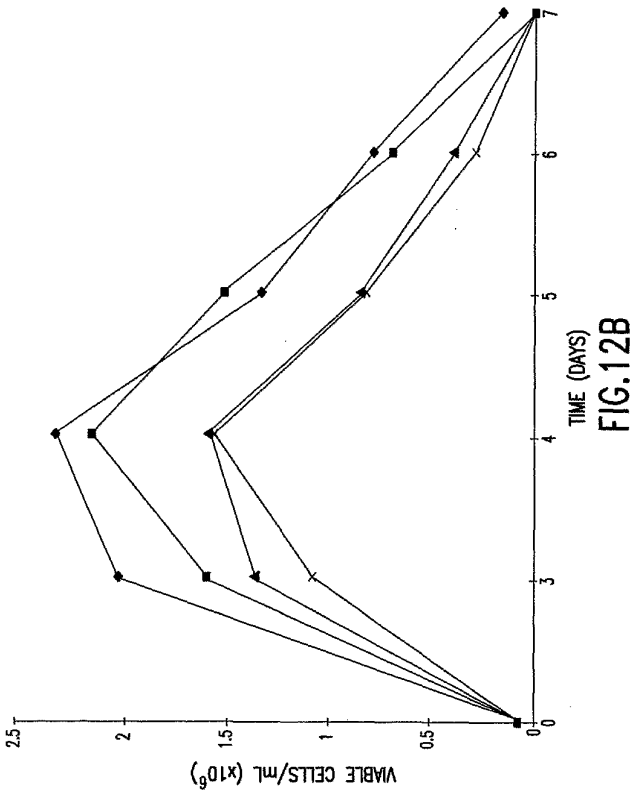


FIG.12B

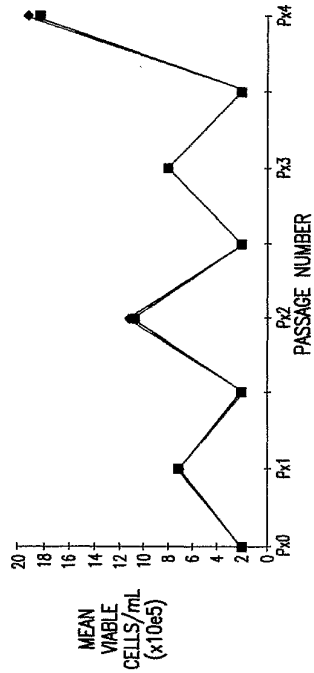

MEAN VIABLE CELLS/mL (x10e5)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Px0
Px1
Px2
Px3
Px4
PASSAGE NUMBER

FIG.13

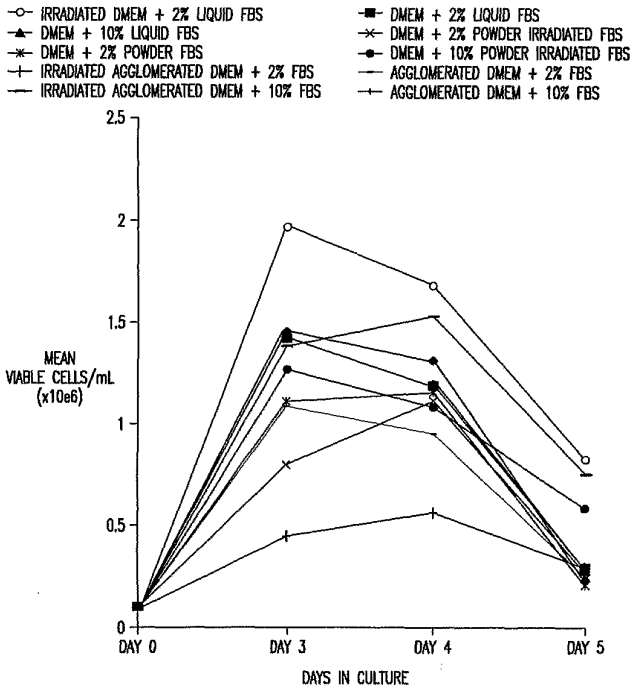

IRRADIATED DMEM + 2% LIQUID FBS
DMEM + 10% LIQUID FBS
DMEM + 2% POWDER FBS
IRRADIATED AGGLOMERATED DMEM + 2% FBS
IRRADIATED AGGLOMERATED DMEM + 10% FBS
DMEM + 2% LIQUID FBS
DMEM + 2% POWDER IRRADIATED FBS
DMEM + 10% POWDER IRRADIATED FBS
AGGLOMERATED DMEM + 2% FBS
AGGLOMERATED DMEM + 10% FBS
MEAN VIABLE CELLS/mL (x10e6)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
DAY 0
DAY 3
DAY 4
DAY 5
DAYS IN CULTURE

FIG.14

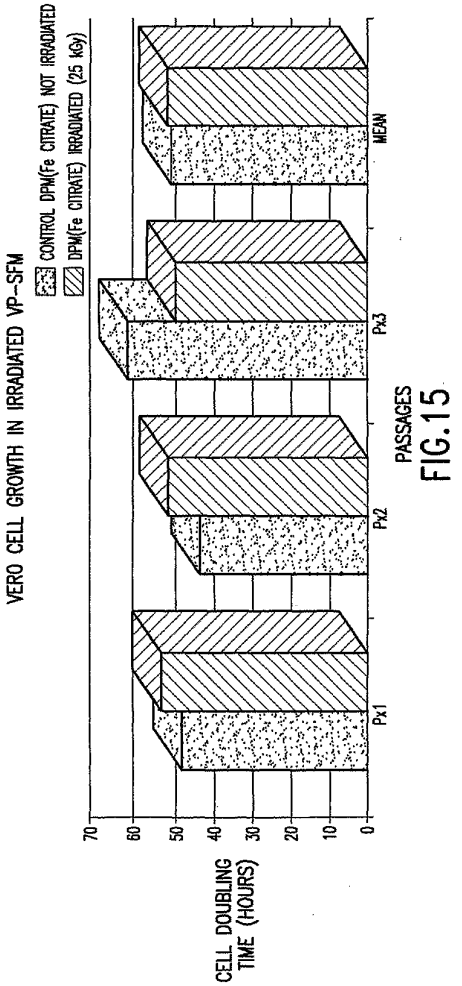

VERO CELL GROWTH IN IRRADIATED VP-SFM
CONTROL DPM(Fe CITRATE) NOT IRRADIATED
DPM(Fe CITRATE) IRRADIATED (25 kGy)
CELL DOUBLING TIME (HOURS)
70
60
50
40
30
20
10
0
Px1
Px2
Px3
MEAN
PASSAGES

FIG.15

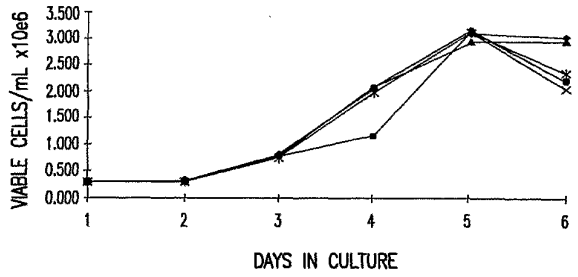


FIG.16A

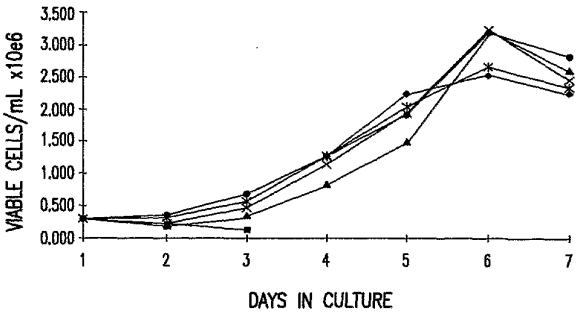


FIG.16B

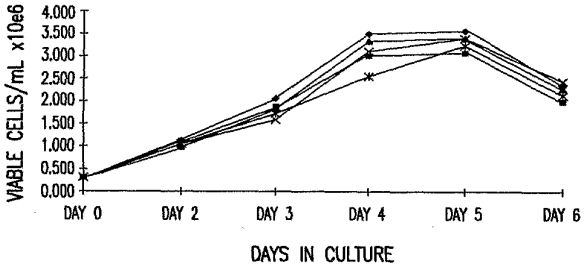


FIG.16C

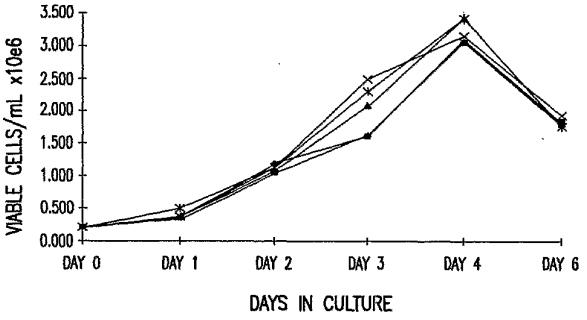


FIG.16D

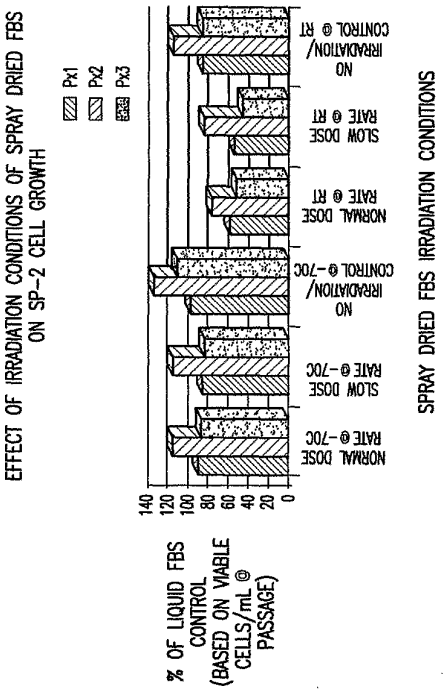

EFFECT OF IRRADIATION CONDITIONS OF SPRAY DRIED FBS ON SP-2 CELL GROWTH
Px1
Px2
Px3
% OF LIQUID FBS CONTROL (BASED ON VIABLE CELLS/mL @ PASSAGE)
140
120
100
80
60
40
20
0
NORMAL DOSE RATE @ -70C
SLOW DOSE RATE @ -70C
NO IRRADIATION/ CONTROL @ -70C
NORMAL DOSE RATE @ RT
SLOW DOSE RATE @ RT
NO IRRADIATION/ CONTROL @ RT
SPRAY DRIED FBS IRRADIATION CONDITIONS

FIG.17A

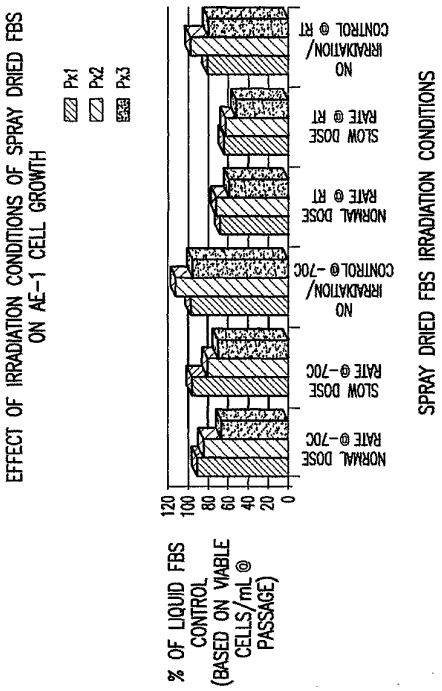

EFFECT OF IRRADIATION CONDITIONS OF SPRAY DRIED FBS ON AE-1 CELL GROWTH
Px1
Px2
Px3
% OF LIQUID FBS CONTROL (BASED ON VIABLE CELLS/mL @ PASSAGE)
120
100
80
60
40
20
0
NORMAL DOSE RATE @-70C
SLOW DOSE RATE @-70C
NO IRRADIATION/ CONTROL @-70C
NORMAL DOSE RATE @ RT
SLOW DOSE RATE @ RT
NO IRRADIATION/ CONTROL @ RT
SPRAY DRIED FBS IRRADIATION CONDITIONS

FIG.17B

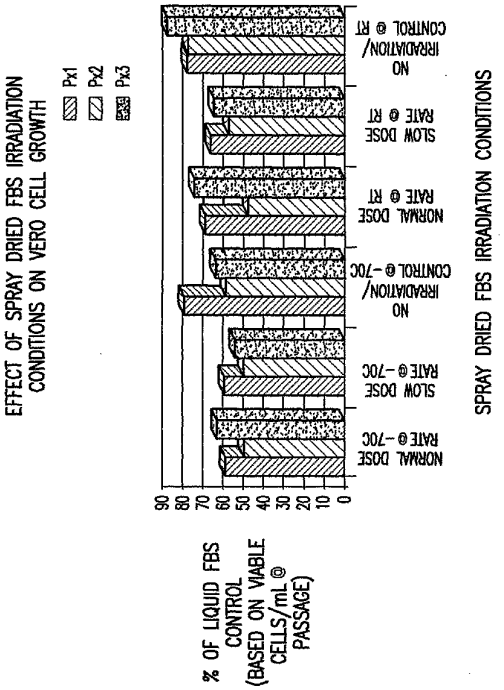

EFFECT OF SPRAY DRIED FBS IRRADIATION CONDITIONS ON VERO CELL GROWTH
Px1
Px2
Px3
% OF LIQUID FBS CONTROL (BASED ON VIABLE CELLS/mL @ PASSAGE)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NORMAL DOSE RATE @ -70C
SLOW DOSE RATE @ -70C
NO IRRADIATION/ CONTROL @ -70C
NORMAL DOSE RATE @ RT
SLOW DOSE RATE @ RT
NO IRRADIATION/ CONTROL @ RT
SPRAY DRIED FBS IRRADIATION CONDITIONS

FIG.17C

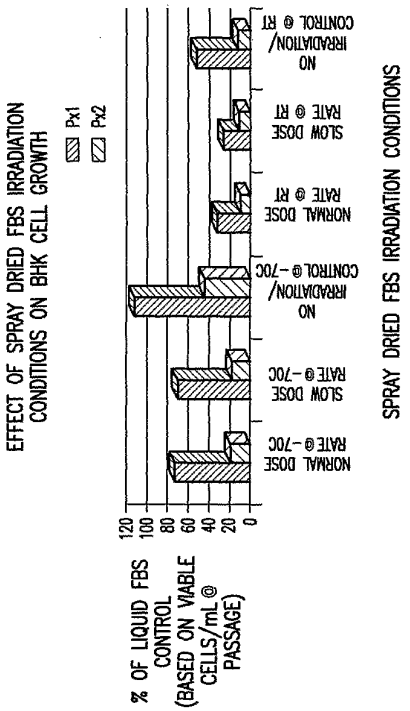

EFFECT OF SPRAY DRIED FBS IRRADIATION CONDITIONS ON BHK CELL GROWTH
Px1
Px2
% OF LIQUID FBS CONTROL (BASED ON VIABLE CELLS/mL @ PASSAGE)
120
100
80
60
40
20
0
NORMAL DOSE RATE @ -70C
SLOW DOSE RATE @ -70C
NO IRRADIATION/ CONTROL @ -70C
NORMAL DOSE RATE @ RT
SLOW DOSE RATE @ RT
NO IRRADIATION/ CONTROL @ RT
SPRAY DRIED FBS IRRADIATION CONDITIONS

FIG.17D

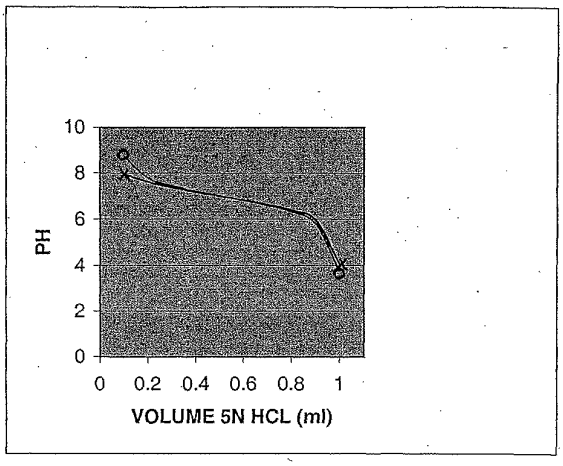


FIGURE 1B

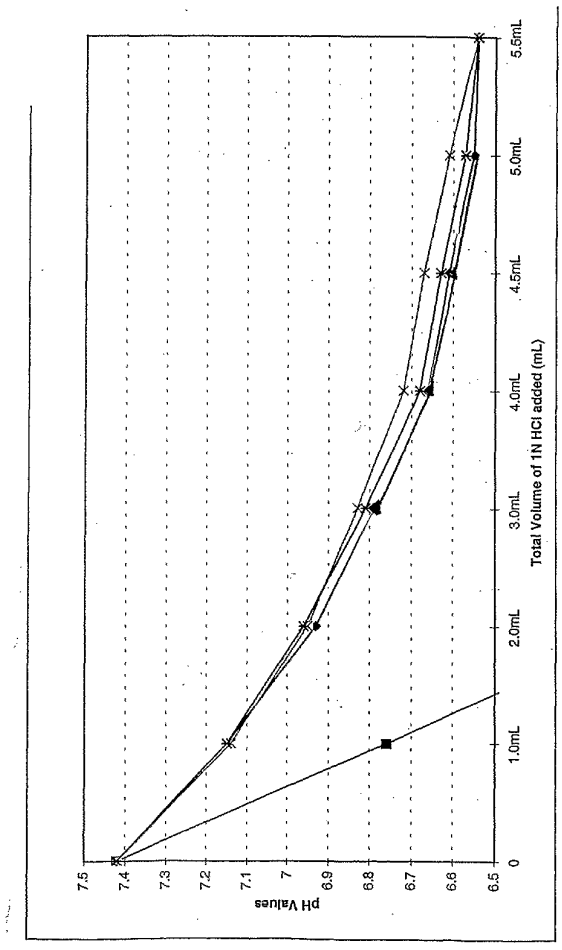

pH Values
7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
Total Volume of 1N HCl added (mL)
0
1.0mL
2.0mL
3.0mL
4.0mL
4.5mL
5.0mL
5.5mL

FIGURE 19A

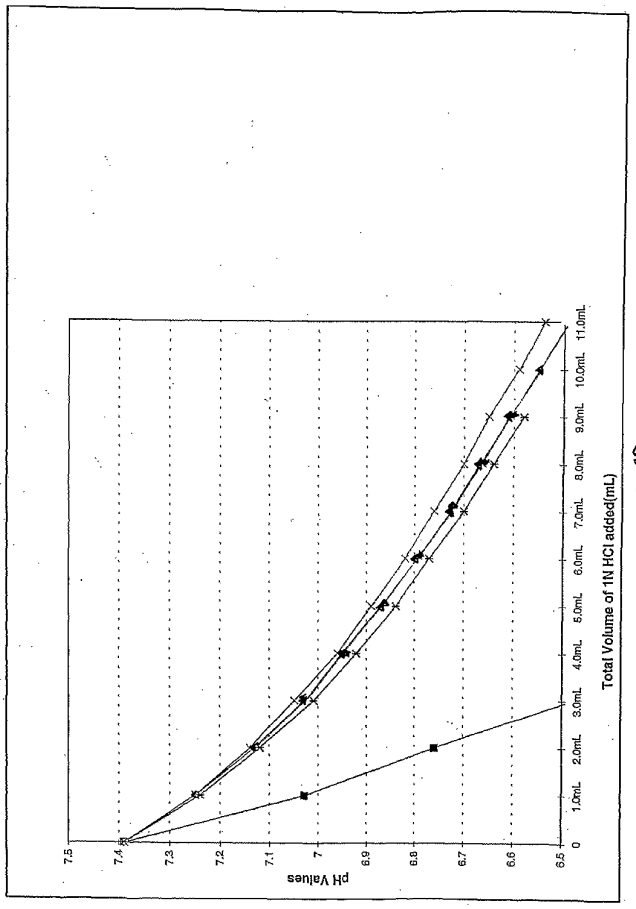

pH Values
7.5
7.4
7.3
7.2
7.1
7
6.9
6.8
6.7
6.6
6.5
Total Volume of 1N HCl added(mL)
0
1.0mL
2.0mL
3.0mL
4.0mL
5.0mL
6.0mL
7.0mL
8.0mL
9.0mL
10.0mL
11.0mL

FIGURE 18

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
10 May 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/36735 A3

(51) International Patent Classification[7]: C12N 5/00, 5/02, 5/04, 5/06

(21) International Application Number: PCT/US01/42982

(22) International Filing Date:
6 November 2001 (06.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/705,940 6 November 2000 (06.11.2000) US

(71) Applicant: INVITROGEN CORPORATION [US/US]; 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 (US).

(72) Inventors: FIKE, Richard, Milton; 9310 Hunting Valley Road, Clarence, NY 14031 (US). HASSETT, Richard, Francis; 32 Neumann Parkway, Tonawanda, NY 14223 (US). DADEY, Barbara, Mary; 143 Brooklea Drive, East Aurora, NY 14052 (US). RADOMINSKI, Robert, Chester; 756 Creekside Drive, Tonawanda, NY 14150 (US).

(74) Agents: ESMOND, Robert, W. et al.; Sterne, Kessler, Goldstein & Fox P.L.L.C., 1100 New York Avenue, N.W., Suite 600, Washington, DC 20005-3934 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
20 June 2002

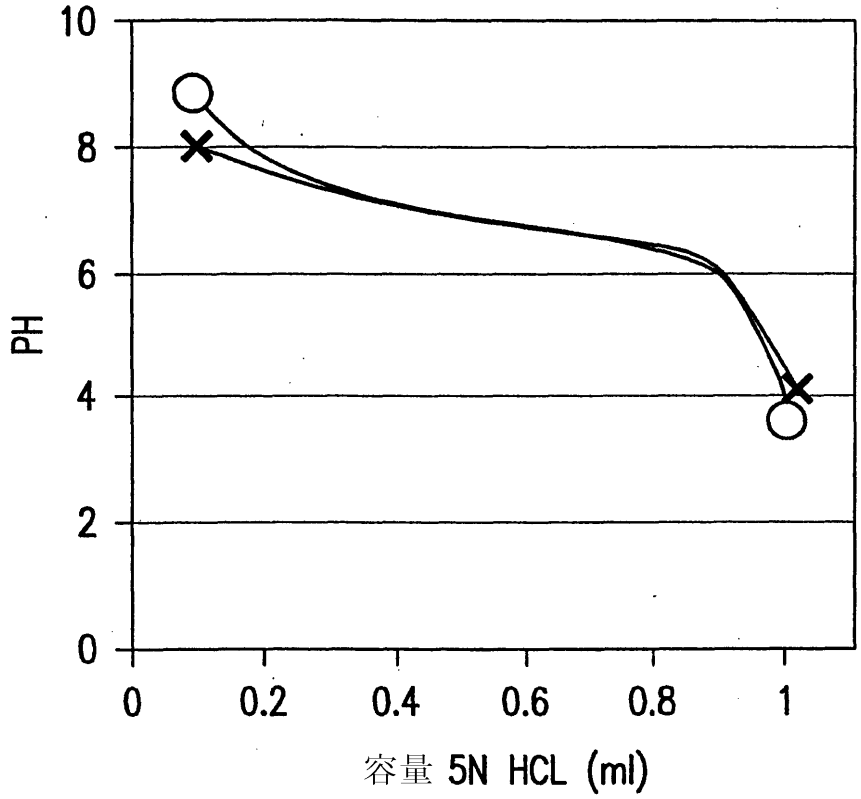
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/36735 A3

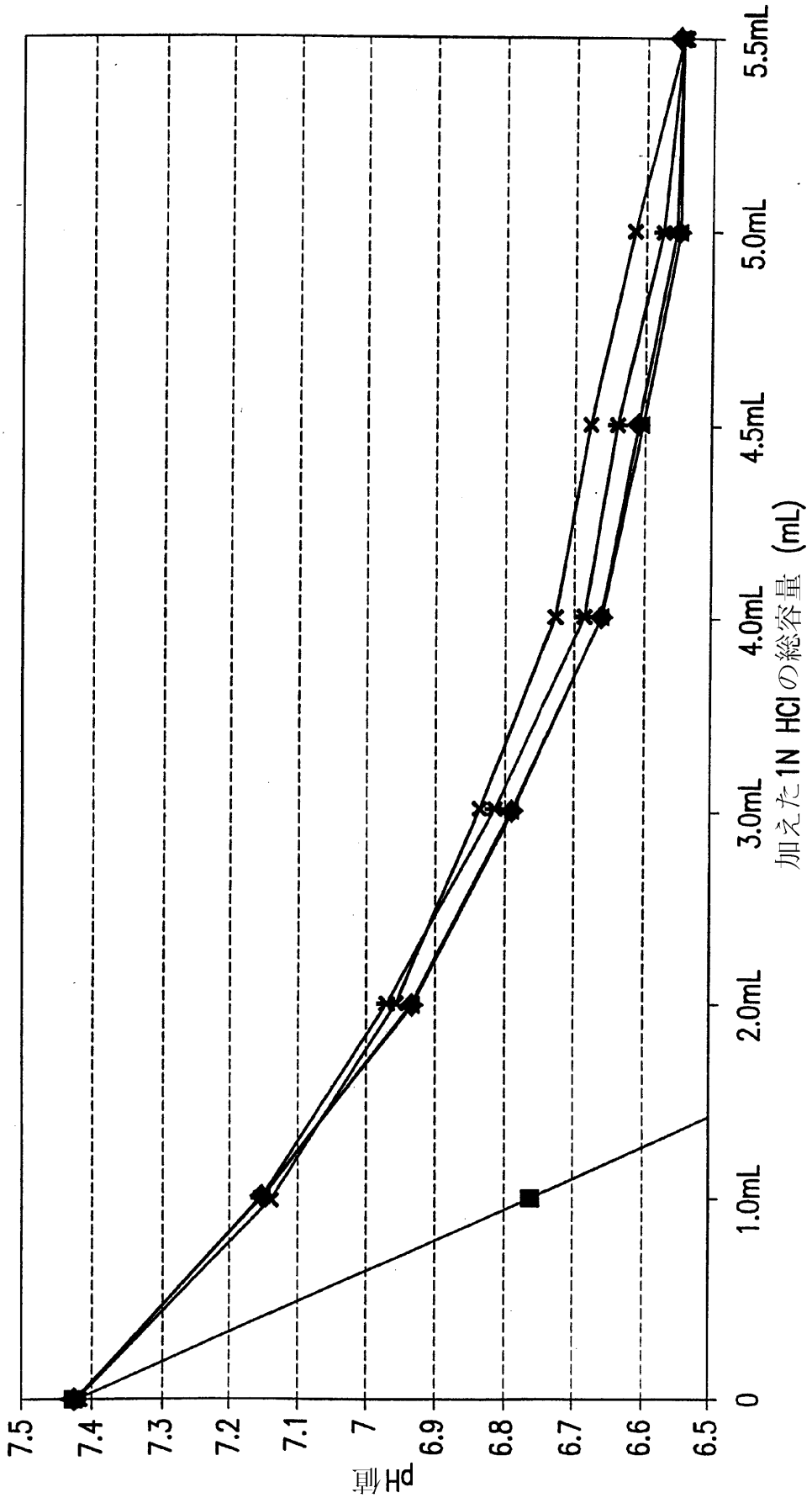
(54) Title: DRY POWDER CELLS AND CELL CULTURE REAGENTS AND METHODS OF PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates generally to nutritive (*e.g.*, cell culture) medium, medium supplement, media subgroup and buffer formulations. Specifically, the present invention provides powdered nutritive medium, medium supplement and medium subgroup formulations, particularly cell culture medium supplements (including powdered sera such as powdered fetal bovine seum (FBS)), medium subgroup formulations and cell culture media comprising necessary nutritive factors that facilitate the *in vitro* cultivation of cells. The invention further provides such powdered formulations that produce particular or desired final ionic and/or pH conditions upon reconstitution with a solvent. The invention si also directed to methods of roduction of these formulations, and also provides kits and methods for cultivation of prokaryotic and eukaryotic cells using these formulations. The invention also relates to methods of producing sterile formulations, and to methods for producing dry cell powders. The invention also provides cell, media, media supplement, media subgroup and buffer powders produced by the methods of the invention.

【手続補正書】
【提出日】平成14年6月6日(2002.6.6)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】図１８
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図１８】

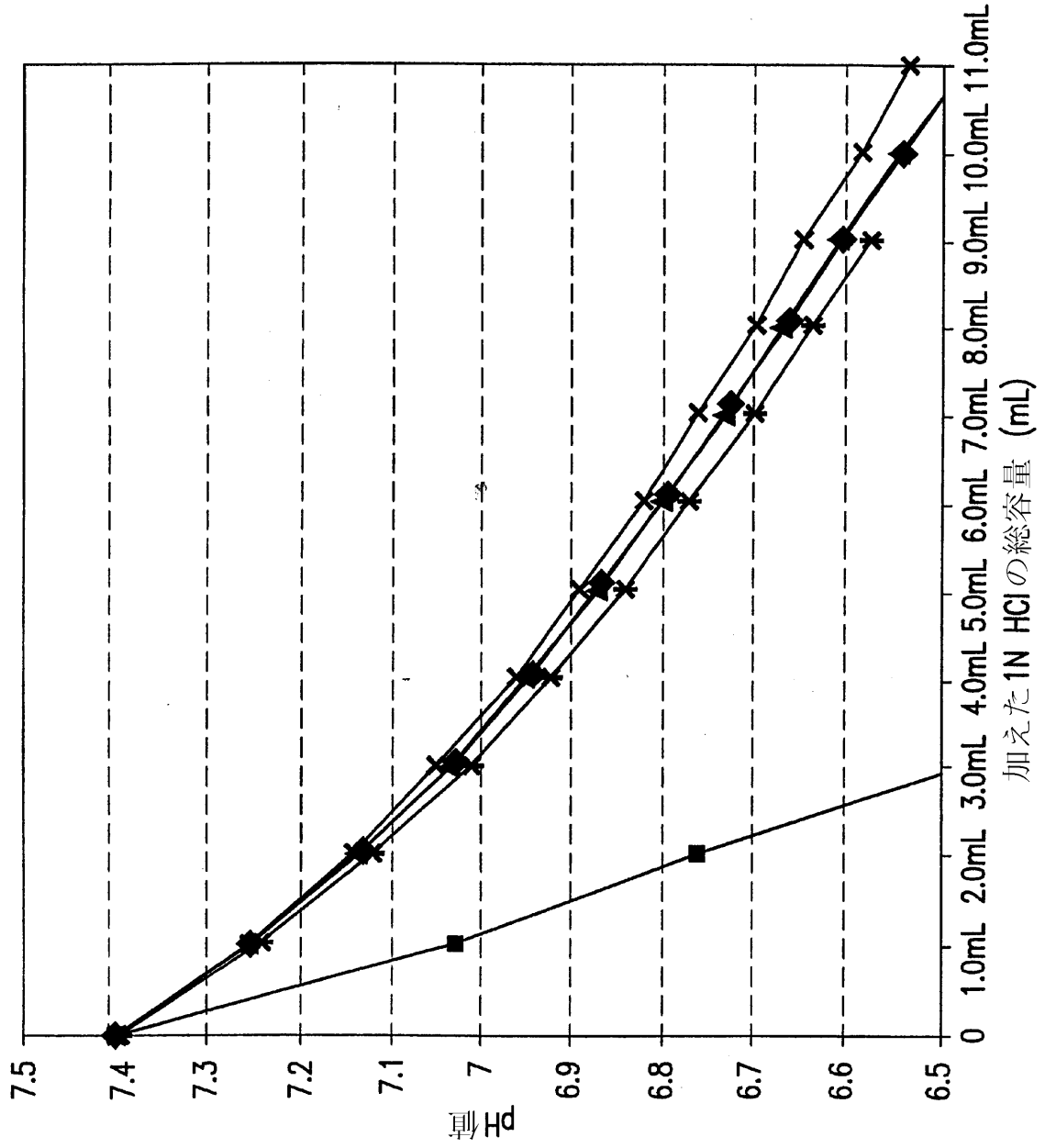


【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】図１９Ａ
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図１９Ａ】



【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】図１９Ｂ

【補正方法】変更
【補正の内容】
【図１９Ｂ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/42982

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12N 5/00, 5/02, 5/04, 5/06
US CL : 435/325, 404, 405, 406, 408
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)
U.S. : 435/325, 404, 405, 406, 408

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
GibcoBRL product catalog 1995-1996 and Invitrogen on-line catalog

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4,071,412 A (EISENBERG et al.) 31 January 1978, see entire document.	1-39
A	US 4,615,978 A (SANDINE et al.) 07 October 1986, see entire document.	1-39
A	US 5,474,931 A (DISORBO et al.) 12 December 1995, see entire document.	1-39
A	WO 94/27645 A1 (PORTON INTERNATIONAL PLC) 08 December 1994, see entire document.	2-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 document 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	Date of mailing of the international search report
07 APRIL 2002	07 MAY 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer KATHARINE DAVIS Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/42982

B. FIELDS SEARCHED
Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

WEST (patent documents and technical bulletins) and DIALOG databases: MEDLINE, SCISEARCH, BIOSIS

search terms: Richard Milton Fike, Richard Francis Hassett, Barbara Mary Dadey, Robert Chester Radominski, auto? near ph, ph near adjust?, cell culture media, cell growth media, complete near powder, rehydration

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ハセット リチャード フランシス
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 トナワンダ ニューマン パークウェイ ３２
(72)発明者 ダディ バーバラ マリー
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 イースト オーロラ ブルックリー ドライブ １４３
(72)発明者 ラドミンスキー ロバート チェスター
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 トナワンダ クリークサイド ドライブ ７５６

Ｆターム(参考) 4B065 BB02 BB04 BB38 CA46