(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2008-503218
(P2008-503218A)
(43)公表日　平成20年2月7日(2008.2.7)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 1/02	(2006.01)	C12N	1/02	4B065
B01D 61/16	(2006.01)	B01D	61/16	4D006
B01D 61/58	(2006.01)	B01D	61/58	
B01D 21/26	(2006.01)	B01D	21/26	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 26 頁）

(21)出願番号　特願2007-516819 (P2007-516819)
(86)(22)出願日　平成17年6月21日 (2005.6.21)
(85)翻訳文提出日　平成19年1月15日 (2007.1.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/021781
(87)国際公開番号　WO2006/007459
(87)国際公開日　平成18年1月19日 (2006.1.19)
(31)優先権主張番号　10/871,261
(32)優先日　平成16年6月21日 (2004.6.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　592221528
バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセッツ　０２１４２、ケンブリッジ、ケンブリッジ　センター　１４
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】哺乳動物細胞培養物を清澄化するための、連続遠心分離と連結したデプス濾過の使用

(57)【要約】
デプス濾過と組み合わせた遠心分離を使用する、細胞サンプルの清澄化のための方法を提供する。本発明はまた、哺乳動物細胞培養物または細菌細胞培養物から分泌されるタンパク質の大規模な工業規模の精製へ適用するために、遠心分離の回転流に適用されるストークスの法則の重要な構成要素を最適化することによって、遠心分離およびデプス濾過、ならびにそれらに続く濾過手段を使用する、細胞サンプルの清澄化のための方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
工業サイズの細胞サンプルの清澄化のための方法であって、該方法は、
（ａ）細胞サンプルを遠心分離し、約８，０００×ｇ～約１５，０００×ｇの範囲内の重力を使用することによって、細胞および残骸を含む固相が遠心分離物（ｃｅｎｔｒａｔｅ）を含む液相から分離される工程、および
（ｂ）該遠心分離物をデプス濾過手段に適用する工程
、を包含する方法。
【請求項２】
前記細胞サンプルが、細菌細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記細胞サンプルが、哺乳動物細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記哺乳動物細胞が、ＣＨＯ細胞である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記哺乳動物細胞が、ＮＳＯ細胞である、請求項３に記載の方法。
【請求項６】
前記細胞サンプルが、細胞懸濁物、細胞スラリーまたは細胞培養物を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記細胞サンプルが、少なくとも約２２００Ｌの体積を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記細胞サンプルが、少なくとも約１５０００Ｌの体積を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞サンプルが、消泡剤をさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記遠心分離が、約８，０００×ｇ～約１０，０００×ｇの範囲内の重力を使用して実行される、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記遠心分離工程後に、前記分離効率が少なくとも約９５％である、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記遠心分離物が、約２μｍより大きい細胞および残骸を実質的に含まない、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記デプス濾過手段が、１つ以上のフィルターを備える、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記デプス濾過手段が、デプスフィルターと仕上げフィルターとを備える、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
デプスフィルターまたは仕上げフィルターのいずれかが、工程（ｂ）における最終フィルターとして使用され得る、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記最終フィルターが、約０．１μｍ～約０．２μｍの孔径を有する、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記最終フィルターが、少なくとも約０．２μｍの孔径を有する、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】
前記最終フィルターが、少なくとも約０．１μｍの孔径を有する、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
約１×１０$^{-8}$ｍ／ｓのＱ／Σで前記細胞サンプルを負荷する工程をさらに包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
工業サイズの細胞サンプルを清澄化する方法であって、該方法は、
（ａ）剪断誘発性の細胞の損傷を低減する目的のために、式：
【化１】

$$\frac{Q_2}{\Sigma_2}=\frac{Q_1}{\Sigma_1}=2V_{gd}$$

を使用して、治療用タンパク質の工業規模の生産のために、細胞サンプルを遠心分離し、約８，０００×ｇ～約１５，０００×ｇの範囲内の重力を使用することによって、細胞および残骸を含む固相が遠心分離物を含む液相から分離される工程、および
（ｂ）該遠心分離物をデプス濾過手段に適用する工程、
を包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願）
２００４年６月２１日に出願された米国特許出願第１０／８７１，２６１号（この全体が、本明細書に援用される）への優先権が主張される。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、一般的に固体－液体分離のための方法（例えば、生物学的サンプル中の細胞および細胞残骸を分離し、それにより清澄化された細胞を含まないサンプルを調製すること）に関する。この方法は、培養物中の細胞により分泌されるタンパク質（例えば、分泌型治療用タンパク質）を単離する場合に精製工程として有用である。
【背景技術】
【０００３】
（背景）
遠心分離は、固体－液体分離のための、十分に確立された連続的に操作される方法である。細菌懸濁物および酵母懸濁物は、工業規模での遠心分離機を使用して分離される一方で、連続的な工業規模の遠心分離の使用は、最近になってやっと哺乳動物細胞培養物に適用された。
【０００４】
工業規模（例えば、２２００Ｌより多いサンプル）での遠心分離のための濾過装置は、かさ高く、そしてかなりの運転費用（フィルターの取り付け、洗浄および廃棄のための時間を含む）を示す。工業規模での連続的な遠心分離機による哺乳動物細胞の分離について、主要な問題点が３つ存在する。第一に、遠心分離機内の剪断力は細胞に損傷を与え得、そして小さな残骸粒子の生成をもたらし得る。細胞の損傷は、細胞内複合物（宿主細胞タンパク質、ＤＮＡ、プロテアーゼ）の放出をもたらし得、これらは生成物プールの不純物負荷を増加させ得る。第二に、哺乳動物細胞懸濁物は、粒子サイズの広範な分布（４０μｍ～サブミクロン）により特徴付けられる。遠心分離により効率的に除去され得る、最小の粒子サイズを決定する必要がある。下流の濾過工程（すなわち、遠心分離後の工程）は、クロマトグラフィーに適したレベルへ遠心分離物（ｃｅｎｔｒａｔｅ）の清澄度を増大させることが必要とされる。第三に、細胞培養懸濁物の清澄化のために、迅速なスループット（例えば、約３時間の合理的な収集時間）が必要とされる。

【０００５】
代表的な遠心分離装置および技術は公知である（例えば、非特許文献１、非特許文献２、非特許文献３、Ｂｕｉｌｄｅｒらによる特許文献１および非特許文献４を参照のこと）。より詳しくは、非特許文献４は、水密（ｈｙｄｒｏｈｅｒｍｅｔｉｃ）供給システムを備えるディスク積み重ね型（ｄｉｓｃ　ｓｔａｃｋ）遠心分離機を使用して、ハイブリドーマ哺乳動物細胞を遠心分離する最初の例の一つであった。非特許文献４は、１時間あたり９０ｋｇの低い体積スループットでの、２２００×ｇおよび５７００×ｇの比較的低い慣性力での細胞分離を実行した。しかしながら、非特許文献４は、遠心分離中に哺乳動物細胞の剪断を防止するために、どの程度の速さで細胞を回転させるか（特定の慣性力を生成するｒｐｍ）、または体積スループットの範囲についての上限を提供しなかった。非特許文献４は、遠心分離中に特定の体積スループットで哺乳動物細胞を遠心沈殿する場合に、単に慣性力を増加させることにより、工業規模の体積の精製の性能を増大し得るという直接的な相関を教示するにすぎない。哺乳動物細胞系の特性およびストークスの法則において使用される重要な構成要素（例えば、体積スループットおよびｇ）を考慮する必要性に起因して、より強い慣性力（７０００ｇ超；非特許文献４に開示されるものより強い）は剪断を増大し、細胞の損傷を引き起こす。したがって、非特許文献４は、哺乳動物細胞培養物から分泌されるタンパク質の工業規模の精製への適用に対する、遠心分離の回転流におけるストークスの法則：

【０００６】
【化２】

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g$$

の制限を教示しなかった。したがって、先行技術に教示される方法により作製される哺乳動物遠心分離物は、１．５μｍ未満の大量の残骸を含み、これは、これ以後続くあらゆる濾過工程の能力を低減させる。結果として、工業規模での精製タンパク質の生産のために、改善された方法に対する必要性が存在する。

【０００７】
この新規の方法論は、哺乳動物細胞の剪断を低減させるために、遠心分離工程におけるストークスの法則の概念的な各構成要素により説明される。さらに、特別なフィルターは、濾過した遠心分離物の全体的な濁度を低下させるために遠心分離工程と組み合わせて使用される。したがって、遠心分離および濾過により単離した分泌タンパク質を精製するために、重要な構成要素（例えば、細胞を回転させるために使用される慣性力および積み重ねた遠心分離ローターによる連続的な供給において使用される体積スループットおよびマイクロフィルターのサイズ）を決定することが、本発明の目的である。これらの実用的な考慮は、高容量の細胞懸濁物の固体－液体分離について開示される方法により取り組まれる。

【特許文献１】米国特許第５，４５１，６６０号明細書
【非特許文献１】Ｋｅｍｐｋｅｎら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｂｉｏｅｎｇ（１９９５）４６：１３２～１３８
【非特許文献２】Ｋｅｍｐｋｅｎら、Ｊ　Ｉｎｄｕｓ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ（１９９５）１４：５２～５７
【非特許文献３】Ｂｅｒｔｈｏｌｄら、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９４）１５：２２９～２４２
【非特許文献４】Ｔｅｂｂｅら、Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９６）２２：１１９～１２７

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
（発明の要旨）

本発明は、哺乳動物細胞培養物または細菌細胞培養物から分泌されるタンパク質の大規模な工業規模の精製へ適用するために、遠心分離の回転流に適用されるストークスの法則：

【０００９】

【化３】

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g$$

の重要な構成要素を最適化することによって、遠心分離およびデプス濾過、ならびにそれらに続く濾過手段を使用する、細胞サンプルの清澄化のための方法を提供する。哺乳動物細胞培養物または細菌細胞培養物は、最初、細胞懸濁物、細胞スラリーまたは細胞培養物（少なくとも約２，２００Ｌの培養物または少なくとも約１５，０００Ｌの培養物が挙げられる）を含み得る。大規模な細胞培養物の清澄化のために、消泡剤が使用され得る。開示される方法によると、遠心分離は、約８，０００×ｇ～約１５，０００×ｇの範囲内の重力と積み重ねた遠心分離ローターによる体積スループットとの間の均衡を使用して実行され、ストークスの法則では予測不可能な遠心分離条件の予測可能な範囲を提供する。これらの方法は、遠心分離工程後に少なくとも約９５％の分離効率、ならびに約２μｍより大きな細胞および残骸を実質的に含まない遠心分離物をもたらし得る。デプス濾過のために、濾過手段は１つ以上のフィルター（例えば、デプスフィルターおよび１つ以上の仕上げ（ｐｏｌｉｓｈｉｎｇ）フィルター）を含み得る。特定の使用において、最終フィルターは約０．１μｍまたは約０．２μｍの孔径を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１０】

（発明の説明）

本発明は、デプス濾過およびメンブレン濾過と組み合わせた遠心分離を使用する、固体－液体分離のための方法を提供する。この組み合わせアプローチは、工業的な適用および臨床的な適用に適する、大規模サンプルの迅速な分離を可能にする。

【００１１】

連続的な遠心分離による哺乳動物細胞の分離に特異的な主要な問題点としては、哺乳動物細胞培養物から分泌されるタンパク質の大規模な工業規模精製へ適用するために、遠心分離の回転流におけるストークスの法則の制限

【００１２】

【化４】

$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g$$

を理解することが挙げられる。第一に、遠心分離機内の剪断力は生存細胞または非生存細胞に損傷を与え得、そして小さな残骸粒子の生成をもたらし得る。細胞の損傷は、細胞内複合物（宿主細胞タンパク質、ＤＮＡ、プロテアーゼ）の放出をもたらし得、これらは生成物プールの不純物負荷を増加させ得る。第二に、哺乳動物細胞懸濁物は、粒子サイズの広範な分布（４０μｍ～サブミクロン）により特徴付けられる。遠心分離により効率的に除去され得る、最小の粒子サイズを決定する必要がある。下流の濾過工程（すなわち、遠心分離後の工程）は、クロマトグラフィーに適したレベルへ遠心分離物の清澄度を増大させることが必要とされる。第三に、細胞培養懸濁物の清澄化のために、迅速なスループット（例えば、約３時間の合理的な収集時間）が必要とされる。連続フロー遠心分離の特定の体積スループットで細胞を回転させる場合に、速度を増加させることにより単に慣性力を増加させることは、最終的に剪断および哺乳動物細胞培養物からの小さな残骸粒子の生成を生じる。開示される清澄化方法は、工業サイズのタンパク質精製の目的のために、哺乳動物細胞培養物または細菌細胞培養物の遠心分離についてのストークスの法則の関連性（すなわち、細胞濃度、供給物の密度および粘度、培養物の生存度、遠心分離の慣性力、

遠心分離機内の培養物の体積スループットならびにフィルターのサイズ）を決定するための方法論を提供する。

【００１３】

用語「固体－液体サンプル」は、分離可能な固相および液相を含むあらゆるサンプルをいい、ここで、目的の生成物は、実質的に固相中にあるか、または液相中にある。代表的な固体－液体サンプルとしては、懸濁物、スラリー、細胞培養物などが挙げられる。

【００１４】

本方法にしたがって、固体－液体サンプルは遠心分離され、固相と液相（遠心分離物とも呼ばれる）とに分離される。遠心分離工程は、実質的に濾過可能な遠心分離物を達成するためのパラメータを使用して実行される。代表的に、遠心分離工程は、固相の少なくとも約９５％（例えば、約９６％よりも大きい、約９７％よりも大きい、約９８％よりも大きい、約９９％よりも大きい）の分離を達成する。

【００１５】

本発明はさらに、清澄化サンプルが、遠心分離物を遠心分離により除去されない特定の物質を除去するデプス濾過手段へ引き続いて適用することにより調製されることを提供する。デプス濾過手段は、１つ以上のフィルター（例えば、メンブレンフィルター、プレートフィルター、カートリッジフィルター、バッグフィルター、加圧葉状（ｐｒｅｓｓｕｒｅ　ｌｅａｆ）フィルター、回転ドラムフィルターまたは真空フィルター）を備え得る。一例として、ＣＵＮＯ　１２０Ｍ１０等級フィルターは、遠心分離物から残骸を効率的に除去する。

【００１６】

開示される分離方法は、ストークスの法則を考慮して必要とされる適切な操作条件（例えば、正規化された負荷、慣性力、供給物の温度、フィルターの等級およびサンプルの体積）を決定することにより、特定の適用（すなわち、異なる細胞サンプル）に適合され得る。例えば、哺乳動物細胞の遠心分離は、約1×10^{-8}ｍ／ｓの正規化された負荷および約８，０００×ｇの重力を使用して効果的に実行される。重力はまた、約８，０００×ｇ～約１５，０００×ｇの範囲内（例えば、約８，０００×ｇ～約１２，０００×ｇの範囲内、または約８，０００×ｇ～約１０，０００×ｇの範囲内、または約１０，０００×ｇ～約１５，０００×ｇの範囲内、または約１２，０００×ｇ～約１５，０００×ｇの範囲内、または約１０，０００×ｇ～約１２，０００×ｇの範囲内）で有効である。正規化された負荷は、上記の操作条件を変更することにより、任意の特定の値で有効であり得る。

【００１７】

哺乳動物細胞または細菌細胞の工業規模の発酵または培養は、当該分野において周知である。これらの工業規模の生産の体積は、５００Ｌ～２０，０００Ｌの生産の範囲であり得るか、または１０００Ｌ～約１７，０００Ｌの範囲内、または２０００Ｌ～約１５，０００Ｌの範囲内、または４０００Ｌ～約１２，５００Ｌの範囲内、または約６０００Ｌ～約１０，０００Ｌの範囲内であり得る。工業的な適用および臨床的な適用のために、大きな体積のサンプル（好ましくは、１５，０００Ｌのサンプルおよび２，２００Ｌのサンプルが挙げられる）が使用され得る。

【００１８】

開示される方法はまた、細胞サンプル（例えば、動物細胞サンプルおよび細菌細胞サンプル）の清澄化に有用である。例えば、細胞培養物から生じる、分泌されるタンパク質生成物は、培養培地の収集（すなわち、培養物からの細胞および細胞の残骸の除去）による精製のために調製される。分泌されるタンパク質生成物は、天然タンパク質または組換え生成されるタンパク質であり得、これらとしては、生物学的な調節因子（「インターロイキン」または「サイトカイン」）および抗体（「免疫グロブリン」）が挙げられるが、これらに限定されない。細胞サンプルからの清澄される好ましい抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が挙げられ得る。本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の本発明の好ましい例示的な実施形態の詳細な説明を考察することから当業者に

明らかとなる。

【実施例】

【００１９】

以下の実施例は、本発明の様式を示すために含まれる。以下の実施例の特定の局面は、本発明者らにより、本発明の実施において良好に働くことが見出されるか、または意図される技術および手順に関して記載される。この実施例は、本発明者らの標準的な研究室での実施を示す。本開示および当業者の一般的なレベルを鑑みて、以下の実施例が例示するためのみに意図され、そして多くの変化、改変および変更が本発明の範囲から逸脱することなく使用され得ることを、当業者は認識する。この実施例で使用される略語を表１に定義する。

【００２０】

【表１】

表 1

記号および略語

A	対応する沈降面積	m^2
D	粒子の直径	M
E	固体の除去	
G	重力定数	m/s^2
G	遠心性の加速度	s^{-1}
L	ボウルの長さ	M
N	積み重ねたディスクの数	
η	粘度	kg/(m·s)
PCV	充填細胞体積	%
Q	流量	m^3/s
R	遠心分離機のボウルまたはディスクの半径	
Re_d	直径ｄの粒子のサイズの回収	
ρ_l	液体密度	kg/m^3
ρ_s	固体密度	kg/m^3
φ	ディスクの円錐形の先端角度の半分	
Σ	シグマ因数(対応する面積)	m^2
t	時間	S
u	流体の速度	m/s
V_{gd}	重力下での沈降速度	m/s
V_s	終末沈降速度	m/s
Ω	角速度	s^{-1}

（実施例１）

（連続操作型ディスク積み重ね型遠心分離機を使用する、ＣＨＯ細胞懸濁物の清澄化）

最初の可能性研究を、Ｗｅｓｔｆａｌｉａから借用したディスク積み重ね型遠心分離機（ＳＣ－６分離機）を使用して実行した。この機械は、１時間あたり６０Ｌ～１０００Ｌの流量で操作するような寸法になっており、それゆえ２００Ｌバイオリアクターにより精製される懸濁物を清澄化するのに良く適していた。以下の主要な目的によって、全部で３回の試運転を実行した：

（１）粒子の除去および細胞の損傷に関して、大規模な細胞懸濁物と連続ディスク積み重ね型遠心分離機との全体的な適合性を評価すること；
（２）第一のクロマトグラフィーカラムへ遠心分離物を適用する前に、遠心分離の下流にどの濾過工程が必要とされるかを決定すること；
（３）生産規模において細胞懸濁物を清澄化するのに必要とされる遠心分離機のサイズの推定ならびに２，２００Ｌおよび１５，０００Ｌの細胞懸濁物を清澄化するための遠心分離／濾過の併用構成の決定のための、適切な操作ウインドウを見出すこと。
【００２１】
（Ｉ．粘性流体中の粒子の沈降）
直径ｄの球状粒子が地球の重力ｇ下で粘性液体中で沈降する場合に、その終末沈降速度V_Sは、ストークスの法則にしたがって粒子の差し引き浮力および粒子上の粘性抵抗により決定される。
【００２２】
【化５】

$$(1) \qquad V_s = \frac{1}{18} \cdot \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g$$

遠心分離機の回転流において、式（１）は「遠心重力」$G = \Omega^2 \cdot r$により修正され、ここでΩは角速度（回転速度Ｎの２・π倍に等しい）、ｒは遠心分離機のボウルの半径、ηは流体粘度、ρ_sは懸濁物の密度そしてρは懸濁液（ｓ）および流体（ｌ）の密度を表す。
【００２３】
【化６】

$$(2) \qquad V_s = \frac{1}{18} \cdot \Omega^2 \cdot r \frac{(\rho_s - \rho_l) \cdot d^2}{\eta} \cdot g$$

遠心力場（ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｌ　ｆｉｅｌｄ）において粒子の良好な分離を達成するために、以下の条件のうちのいくつかの組合せが必要とされる：高い遠心速度、大きな粒子サイズ、固体と液体との間の大きな密度差、大きなボウル半径および低い粘度。これらの条件間の相互作用および上記の条件の各々の範囲を理解することが、細胞の剪断を減らし、続く濾過工程のための全体的な清澄化効率を増大させるために必要とされる。
【００２４】
ＣＨＯ細胞懸濁物を収集する特定の実施例において、数個の制限が同定され得る：哺乳動物細胞は細胞のサイズの広範な分布を示し、さらに数個のプロセスは比較的低い生存度で細胞を収集する可能性がある。したがって、清澄化されるべき懸濁物は、生存細胞（１０μｍ～２０μｍの直径）および非生存細胞（４μｍ～１０μｍの直径）ならびに細胞の残骸（サブミクロン～４μｍの直径）を含む。この広範なサイズの分布は、遠心分離により懸濁物から全ての粒子を除去することを妨げ、合理的なプロセス条件下で除去され得る最小の粒子について決定がなされなければならない。図１は、この問題の視覚的な表示である。１０３０ｋｇ／ｍ^{3}の哺乳動物細胞の平均密度、１０００ｋｇ／ｍ^{3}のＣＨＯ細胞懸濁物の密度および１．０５ｍＰａ・ｓの懸濁物の粘度により、異なる直径の細胞の沈降速度が、菱形が点在する線により示される。２０ｍｍの直径の非常に大きな細胞でさえも、０．４ｃｍ／分で沈降するにすぎない。１μｍの残骸粒子は、０．０００１ｃｍ／分で沈降する。１０，０００ＲＰＭで４０ｃｍ径ボウルの遠心分離機を使用することにより、沈降速度は劇的に増大するが、依然として、１μｍ未満の粒子は、非合理的に遅い速度で沈降する（円が点在する線により示される）。したがって、遠心分離は全ての粒子を除去せず、そして遠心分離の下流の濾過工程は、非常に小さな粒子を除去することが必要とされる。
【００２５】

図１は遠心速度が沈降を改善することを示すが、遠心速度はまた、遠心力場において細胞の強い加速を引き起こし、今度は、このことが細胞の損傷を導き得る。損傷した細胞は小さな残骸粒子に分解し得、上記に議論されるサイズ除去制限に起因して、分離をより問題のあるものにする。ボウル半径は無限に増大し得ない。なぜなら、維持された回転速度でのボウル直径の増大は、壁応力を増大させるからである。材料の安定性の理由のため、高速遠心分離機において使用され得る最大ボウル半径が存在する。ＣＨＯ懸濁物中の細胞の濃度は比較的低いので、密度差およびＣＨＯ懸濁物の粘度は好都合とみなされ得る。細胞培養物の温度（３５℃）で分離を行うことは有益である。なぜなら、このことは懸濁物の粘度を低下させるからである。

【００２６】

（ＩＩ．ディスク型遠心分離機）

図２に示されるように、最も一般的な浄化器付き遠心分離機の１つは、垂直に据付けたディスク型の機械である。供給物はボウルの軸に導入され、狭い間隔の円錐形ディスクの積み重ねを通って流れる。ボウルの垂直軸を有する、垂直に据付けた円錐形ディスクは、しばしば放射状の羽根アセンブリによって、速度に加速される。円錐形ディスクの間隔は、流体から沈降する粒子を分離するのに必要とされる距離を短くするために、しばしば０．５ｍｍ～３ｍｍである。ディスクの角度は、ディスク表面から固体保持空間への固体の輸送を促進するために、しばしば４０°～５０°である。

【００２７】

固体微粒子または細胞の分離機構は、図３に示される。固体は、遠心力の影響下でディスクの裏面に沈降し、ディスクを滑り、固体保持空間に落ちる。同時に、清澄化した流体は、ディスク間のチャネルを上昇し、求心性のポンプ処理により遠心分離機を出る。沈降した固体は、ノズルから連続的にか、またはボウルの周縁部のポートを介して間欠的にかのいずれかで排出される。

【００２８】

（ＩＩＩ．連続的な遠心沈降理論）

本発明はまた、ストークスの法則の沈降の誘導に基づいて、連続遠心分離機の性能をより良好に予測するための以下に説明されるモデルを提供する。連続遠心分離機の性能を予測するために、重力下で沈降することについてのストークスの関連性（式１）は、回転するプール内での沈降のために改変されなければならない。したがって、直径ｄの球状粒子の沈降速度は、式（３）により与えられる：

【００２９】

【化７】

$$V_s = \frac{dr}{dt} = crd^2 \tag{3}$$

プールを横切る流速の均質な分布でのピストン流れを想定すると、半径r_pの表面からボウル壁r_bへ移動する粒子の平均軸方向速度は、式（４）により計算される：

【００３０】

【化８】

$$u = \frac{dx}{dt} = \frac{Q}{\pi \cdot \left(r_b^2 - r_p^2\right)} \tag{4}$$

流量Ｑで動く流体によりボウルに沿って軸方向の距離ｘを移動する粒子の滞留時間は、式（５）にしたがう：

【００３１】

【化９】

$$t = \frac{\pi \cdot \left(r_b^2 - r_p^2\right) \cdot x}{Q} \tag{5}$$

バルクの流れＱで移動するのに必要な時間に、粒子が沈降するのにかかる時間を関連付けることにより、式（６）を得る：

【００３２】

【化１０】

$$\frac{r}{r_b}=\exp\left[-\frac{\pi cx\cdot\left(r_b^2-r_p^2\right)\cdot d^2}{Q}\right] \tag{6}$$

ボウル全体の長さＬを移動する粒子について、式（６）を、ｘ＝Ｌおよびｒ＝ｒ＊として式（７）に改変される：

【００３３】

【化１１】

$$\frac{r^*}{r_b}=\exp\left[-\frac{\pi cL\cdot\left(r_b^2-r_p^2\right)\cdot d^2}{Q}\right] \tag{7}$$

直径ｄ（Re_d）の粒子サイズの回収は、式（８）として与えられる：

【００３４】

【化１２】

$$\mathrm{Re}_d=\frac{\pi\left(r_b^2-r^{*2}\right)}{\pi\left(r_b^2-r_p^2\right)} \tag{8}$$

結果として、依然として特定のサイズの回収Re_dを可能にする最大体積スループットＱは式（９）にしたがって与えられる（ここで、V_{gd}は重力（１ｇ）下での沈降速度を表す）：

【００３５】

【化１３】

$$Q=V_s\cdot A=V_{gd}\cdot\left\{\frac{2\pi\Omega^2L}{g}\cdot\frac{r_p^2-r_b^2}{\ln\left[1-\mathrm{Re}_d\left(1-r_p^2/r_b^2\right)\right]}\right\} \tag{9}$$

ここで、Ａは、特定の操作条件下での遠心分離機の対応する沈降面積を表す。これは、ボウル半径、沈降の深さ、操作速度および必要とされるサイズの回収の関数である。懸濁物の物理的パラメータ（すなわち、粒子サイズ、密度および粘度）はＡに含まれないが、これらのパラメータは重力下での粒子の沈降速度（V_{gd}）に捕捉される。サイズの回収を５０％に設定する場合、式（９）はＡｍｂｌｅｒの式（式（１０））になる（$\Sigma_{50\%}$は５０％のサイズの回収に対応する面積を表す）：

【００３６】

【化１４】

$$\Sigma_{50\%}=\frac{1}{2}\cdot A_{\mathrm{Re}\,d=50\%}=\left\{\frac{\pi\Omega^2L}{g}\cdot\frac{r_p^2-r_b^2}{\ln\left[1-\mathrm{Re}_d\left(1-r_p^2/r_b^2\right)\right]}\right\} \tag{10}$$

近似により、Ａｍｂｌｅｒの式は式（１１）に単純化される：

【００３７】

【化１５】

$$\Sigma_{50\%}=\frac{\pi\Omega^2L}{g}\cdot\frac{r_b^2-r_p^2}{2\ln\left(r_b/r_p\right)} \tag{11}$$

ディスク積み重ね型遠心分離機のために、類似の式は$\Sigma_{50\%}$について展開され得る（式（１２））：

【００３８】

【化１６】

$$\Sigma_{50\%} = \frac{2\pi\Omega^2 \cdot (N-1)\left(r_o^3 - r_i^3\right)}{3g \cdot \tan\varphi} \quad (12)$$

ここでＮは、積み重ねたディスクの数であり、r_oは円錐形ディスクの外径、r_iは円錐形ディスクの内径であり、そしてφは円錐の半角である。Σは本質的に遠心分離機のサイズおよび速度に関する操作条件の組み合わせを表す。スケールアップのために、ｍ／ｓで測定されるΣと体積スループットとの関連性（Ｑ／Σ）は一定に維持される。規模で必要とされる体積スループットが既知であり、そして特定のΣが必要とされる清澄度を得るのに十分であることを小規模の実験が示した場合、大規模の遠心分離機に必要とされるΣは、式（１３）を使用して計算され得る。あるいはΣは、装置の所定の部分に関して式（１２）の後に計算され得、そしてこの機械に関して達成可能なスループットは、式（１３）を使用して計算され得る。

【００３９】

【化１７】

$$\frac{Q_2}{\Sigma_2} = \frac{Q_1}{\Sigma_1} = 2V_{gd} \quad (13)$$

式１２および式１３は、合理的な量の時間（すなわち、５時間未満）で大規模な工業規模の体積の哺乳動物細胞培養物または細菌細胞培養物の遠心分離に対して特定の慣性力で、達成可能なスループットを決定するための出発点を提供する。それにも関わらず、式（１３）を使用してのスケールアップはいくつかの制限を有する。なぜなら、スループットの式を誘導することにより、多くの仮定をなしたからである：

１．遠心分離機中の流れはピストン流れになり得ず、速度の勾配が存在し得る；

２．供給物は、供給ポートにおいてすぐには十分なｇに加速されず、慣性力の曝露の低下および分離効率の低下を導く；

３．Σは５０％のサイズの回収に対応するにすぎない；

４．入り口における非均一な供給物の分布；および

５．懸濁物中に沈降する粒子は高い粒子濃度において妨げられ得、分離効率の低下を導き得る。

【００４０】

スケールアップの間、これらの制限は、特定の補正因数を満たすことにより通常考慮される。大規模な遠心分離機のために、式（９）にしたがってスループットを推測するために使用される補正因数は、０．４と０．７との間である（すなわち、機械の現実の性能は、理想化された式（９）にしたがって予測された性能の４０％～７０％であると推測される）。

【００４１】

（ＩＶ．レンタルのＳＣ－６分離機の技術的な仕様）

レンタルのＳＣ－６分離機の技術的な詳細は以下の通りである：

ボウルの全体積	１．８Ｌ
沈殿物を保持する体積	０．７Ｌ
ボウルの最高速度	１２，０００ＲＰＭ
積み重ねたディスクの数	７５
ディスクの角度	４０°
ディスクの外径	０．０６８ｍ
ディスクの内径	０．０１２５ｍ

これらのデータから、遠心分離の加速Ｇ（ｇの倍数）は、式（１４）にしたがってボウル

速度の関数として計算され得る：
【００４２】
【化１８】

$$(14)\quad G=\frac{r\cdot\Omega^2}{g}\qquad \text{ここで}\quad \Omega=2\pi\cdot\text{ボウル速度}\left(s^{-1}\right)$$

ディスク積み重ね型遠心分離機のために、Ｇは、積み重ねたディスクの外径（０．０６８ｍ）に基づいてか、または固体を保持する空間の半径（０．０９３ｍ）を使用して計算され得る。図４は、両方の場合についてのボウル速度の関数としての慣性力の発生を示す。円が点在する線は、積み重ねたディスクの半径を使用することに基づくボウル速度の関数としての慣性力の発生を示す。四角形が点在する線は、固体を保持する空間の半径を使用することに基づくボウル速度の関数としてのＧの発生を表す。図４の結果に示されるように、慣性力は、固体を保持する空間の半径を使用して計算され得、これは１２，０００ＲＰＭのボウルの最高速度に対して約１５，０００×ｇである。
【００４３】
（Ｖ．レンタルのＳＣ－６分離機の操作）
（Ｖ．Ａ．理論上の考察）
ＳＣ－６分離機の試運転の前に、この機械の性能を、図５に示される操作条件の範囲について推定した。図５は、ＳＣ－６分離機のボウル速度（ｒｐｍ）の関数としてΣの関連性を示す。式（１３）から、５０％のサイズの回収で特定の粒子の直径が分離されるスループットは、$\Sigma_{50\%}$および重力V_{gd}下での沈降速度から計算され得る。ディスク積み重ね型遠心分離機について、Q_{max}は式（１５）にしたがって計算される：
【００４４】
【化１９】

$$(15)\qquad Q_{\max}=\frac{d^2\cdot\left(\rho_s-\rho_l\right)\cdot g}{18\eta}\cdot\left\{\frac{2\pi\Omega^2}{g}\cdot\frac{(N-1)\left(r_o^3-r_i^3\right)}{3\tan(\varphi)}\right\}$$

特定のサイズの群からの全ての粒子の好ましい分離を考慮する０．５の補正因数を使用して、ＳＣ－６分離機の最大のスループットは、除去されるべき最小の粒子サイズの関数としてプロットされ得る。図６は、広範な範囲の粒子サイズに対する、８，８００ＲＰＭおよび１２，０００ＲＰＭのボウル速度についてのプロットを示す（８８００ｒｐｍは、円が点在する線により示され、１２，０００ｒｐｍは、四角形が点在する線により示される）。１μｍ未満の粒子を除去する試みが非合理的に低い体積スループットをもたらすことが明らかである。遠心分離操作の目的は、細胞懸濁物から全ての粒子を除去することではなく、むしろ粒子の多数を除き、そして絶対的な濾過の前の最終的な仕上げ（ｐｏｌｉｓｈｉｎｇ）のために小さなデプスフィルターアセンブリを使用することである。２μｍより大きな全ての粒子を除去することが最終仕上げフィルターに必要とされる面積を実質的に減らすのに十分であることを想定すると、８，０００×ｇ（８，８００ＲＰＭ）において、４．９Ｌ／分のスループットが可能であることを計算した。１２，０００ＲＰＭ（１５，０００×ｇ）のボウルの最高速度で分離機を運転することは、スループットを９Ｌ／分にまで増大させることを可能にする。これらの条件下で、分離機は２．５・１０$^{-8}$ｍ／ｓのＱ／Σで操作され得る。Ｑ／Σは操作条件を決定するために有意な因数であるので、ＳＣ－６分離機の実験的な評価を、０．９・１０$^{-8}$ｍ／ｓと２．８・１０$^{-8}$ｍ／ｓとの間の範囲のＱ／Σを試験するように設定した。哺乳動物細胞が分離機で使用される慣性力の変化に応答し得ることを考慮して、Ｑ／Σを、流量または慣性力を調整することによって変動させた。一般的な沈降理論は、慣性力を増大させることがΣを増大させ、このことは、今度は分離の改善を導くことを予測する。哺乳動物細胞のような剪断感受性の粒子の場合に、慣性力を増大させることは、剪断損傷の増大、そして選択された操作条件下でもはや分離され得ない、より小さな粒子の生成を導き得る。

【００４５】
（Ｖ．Ｂ．実験１）
ＳＣ－６分離機の性能の最初の評価は、表２に示される試験条件を含んだ。２８０ＬのＩＤＥＣ－１１４細胞の培養懸濁物が利用可能であり、そして各々約３０Ｌの懸濁物を、８つの実験目的に適用した。ＳＣ－６分離機のボウル体積が１．８Ｌであることを仮定すると、１８Ｌの供給（１０液体滞留時間）の適用は、定常状態を得るのに十分であるはずである。しかしながら、沈降した細胞は固体貯蔵（ｈｏｌｄ－ｕｐ）空間（０．７Ｌ）に蓄積し、したがって、この空間を部分的な排出発射（ｓｈｏｔ）または全面的な排出発射により空にしなければならない。この発射は平衡を乱し、数回の排出発射をわたっての実験条件を観察することが重要である。３％（３０ｇ／Ｌ）の推定される充填細胞体積において、そして固体保持空間内で細胞が約５０％の湿潤体積に圧縮されることを想定して、排出前に３５０ｇの細胞が保持され得、これは約１２Ｌの供給体積に一致する。１０Ｌの供給物の適用後に、固体を４００ｍＬの発射により部分的に排出した。このことは、３回の固体の排出についての系の観察を可能にした。供給物のサンプルおよび遠心分離物のサンプルを採取し、充填細胞体積および粒子サイズの分布について分析した。さらに、遠心分離機内の熱の生成が分離機のボウルの冷却システムの冷却能力を超えるか否かを調べるために、供給物の温度および遠心分離物の温度を測定した。全ての実験において、流出液の温度は、供給物の温度から１℃より大きく上回らなかった。

【００４６】
【表２】

表　2

最初の試験条件

試行番号	1	2	3	4	5	6	7	8
慣性力 (X 1000 *g*)	12	15	15	8	8	9.6	9.6	9.6
Q (L/分)	5.3	10.3	3.3	1.8	5.1	6.4	4.3	2.1
Σ (m^2)	4950	6172	6172	3400	3400	3960	3960	3960
Q/Σ (10^{-3} m/s)	1.8	2.8	0.9	0.9	2.6	2.7	1.8	0.9

８つの試験条件の結果を図７にまとめる。固体－液体分離の性能は、通常固体を除去する能力に特徴付けられる。固体の除去Ｅは、式（１６）にしたがって規定される：

【００４７】
【化２０】

$$E = \frac{\left(PCV_{\text{供給物}} - PCV_{\text{遠心分離物}}\right)}{PCV_{\text{供給物}}} \cdot 100 \qquad (16)$$

ここで、ＰＣＶは充填細胞体積のパーセンテージを表す。図７は、除去効率が、遠心分離（Ｑ／Σ）への試みの増大とともに減少すること（すなわち、所定の面積での遠心分離と一致するスループットが増大される場合、分離性能が減少すること）を実証する。この挙動は、沈降理論（式（１５））により予期および予測される。哺乳動物細胞系の特性が、適用される慣性力が検討される場合に明らかになる。低い試みにおいて、慣性力は分離性能に顕著には影響しない（固体の除去　対　８０００ｒｐｍの慣性力の適用に対するＱ／Σの関連性（三角形が点在する線）を参照のこと）。しかしながら、強い慣性力での性能はかなり低下する（固体の除去　対　１５，０００ｒｐｍの慣性力の適用に対するＱ／Σの関連性（菱形が点在する線）を参照のこと）。このことは、微粒子の生成および付随する小粒子の分離の低下をもたらす、高いｇでの細胞の剪断損傷の増大により説明され得る

。したがって、図７におけるデータは、８，０００×ｇでのＳＣ－６の操作が好ましい選択肢であることを示す。なぜなら、このことは、より高い試みにおいて分離機を運転することを可能にするからである。

【００４８】

分離効率についての代替的な測定を検討するために、遠心分離物の濁度を、異なる操作条件について測定した。図９は、慣性力および試み（Ｑ／Σ）の関数として遠心分離物の濁度をプロットする。濁度は、遠心分離の性能の、非常により洗練された図を示す。なぜなら、濁度は懸濁物中の全ての粒子によって生じ、それゆえ、これは遠心分離物中の全ての粒子の集団を代表するからである。図９は、低い試みにおいてさえも、慣性力を増大させることが、より大きな粒子と同じようには効果的に除去されない微粒子（遠心分離の間の剪断または細胞の操作に起因する細胞の残骸）の生成をもたらすことを示す。剪断に誘発される細胞の破壊に起因する、この分離性能の低下は、性能基準として充填細胞密度を使用すると検出されない。

【００４９】

このことは、異なる遠心分離物の粒子サイズの分布の結果により確かめられ、これは図１０に示される。より単純にするために、４μｍ未満の粒子のみを示す。供給物は、全てのサイズの粒子を含む一方で、遠心分離は、２μｍより大きな粒子を首尾よく除去する。サイズの分布におけるわずかな違いを、異なる操作条件について検出し得る。８，０００ｇおよび低い試みで操作した試行４は、１μｍと２μｍとの間の粒子の実質的な除去を示すが、強い慣性力および高い試みでの操作（試行１および試行２）は、分布のより大きな粒子への顕著な変化をもたらす。したがって、これらのデータはまた、低い慣性力（好ましくは、８，０００×ｇ）および低い試み（０．９・１０$^{-8}$ｍ／ｓ）での操作が、最適な分離性能のために好ましいことを示す。

【００５０】

これらの結果と上記になされた予測とを比較することが興味深い。沈降理論を使用して、本発明者らは、２μｍより大きな全ての粒子のうちの５０％が２・１０$^{-8}$ｍ／ｓの試みおよび８，０００ＲＰＭ（約８，０００×ｇに対応する）で除去されることを予測した。１・１０$^{-8}$ｍ／ｓのＱ／Σにおいて、２μｍより大きな全ての粒子を除去し、推定が本明細書の上記で説明された理論をなしたことを確かめた。理論は、強い慣性力においてなお良好な性能を予測したが、実際にはこのことを達成しなかった。むしろ、性能は慣性力とともに低下した。この予測不能性は、哺乳動物細胞系の特性を反映する。哺乳動物細胞系において、剪断に誘発される細胞の損傷は、単純化された理論に正確に収まらない粒子サイズの分布の変化をもたらす。

【００５１】

遠心分離は、粒子を含まない遠心分離物を送達し得ないので、仕上げフィルターおよび絶対フィルターが、さらなる下流に設置される必要がある。ＣＵＮＯ　６０　ＳＰデプスフィルター、それに続くＰａｌｌ　Ｕｌｔｉｐｏｒ　０．２μｍフィルターおよびＰａｌｌ　Ｕｌｔｉｐｏｒ　０．１μｍフィルターからなるフィルターの列を、異なる実験条件からもたらされる遠心分離物に対するフィルター容量について調べた。この研究の結果を、表３に示す。

【００５２】

【表３】

表　3

フィルターの列を試験する実験の結果

試行番号	15,000	15,000	8,000	9600
Q/Σ (m/s)	$2.8 \cdot 10^{-8}$	$0.9 \cdot 10^{-8}$	$0.9 \cdot 10^{-8}$	$0.9 \cdot 10^{-8}$
CUNO 60 SP デプスフィルター後の濁度(NTU)	22	11.5	11.8	18
Ultipor 0.2 μm 容量 (L/m^2)	116	438	265	159
Ultipor 0.1 μm 容量 (L/m^2)	197	178	195	110

これらの実験からの最も重要な知見は、絶対フィルターの容量は非常に低い（特に、０．２μｍフィルター）ことであった。明らかに、ＣＵＮＯ　６０　ＳＰデプスフィルターは、下流の絶対フィルターに対して十分な保護を提供しなかった。このことは、デプスフィルターの濾液のかなりの濁度により支持される。フィルター容量の絶対数が、遠心分離機の下流に大型のフィルター要素の設置を必要とする。これらのデータに基づいて、１５，０００Ｌの培養物は、遠心分離機の下流に、６５個の直径１０インチの０．２μｍフィルター要素と１５０個の直径１０インチの０．１μｍフィルター要素との設置を必要とする。操作条件（Ｑ／Σ、慣性力）の影響に関して、フィルター性能に対して決定的な影響は存在しなかった。

【００５３】

濾過実験と並行して、「従来の」デプスフィルターの列（ＣＵＮＯ　１０　ＳＰ、ＣＵＮＯ　６０　ＳＰ、Ｐａｌｌ　Ｕｌｔｉｐｏｒ　０．２μｍ、Ｐａｌｌ　Ｕｌｔｉｐｏｒ　０．１μｍ）を使用して清澄化した同一のＩＤＥＣ－１１４細胞懸濁物を使用して、コントロール実験を行った。２つの絶対フィルターの容量は、最良の操作条件下での遠心分離機の遠心分離物の容量に匹敵した。コントロールの０．２μｍフィルターの容量は４９７Ｌ／ｍ^{2}であった一方、０．１μｍフィルターの容量は１８２Ｌ／ｍ^{2}であった。このことは、結果として、ＩＤＥＣ－１１４細胞培養懸濁物が低いフィルター能力を有し、遠心分離が、このような複雑かつ単調な作業の下流で絶対的な濾過をなさないことを実証する。

【００５４】

（Ｖ．Ｂ．実験２）

実験１からの知見に基づいて、第二の設定の遠心分離実験を実行し、改善された濾過性を有するフィルターの列を同定した。実験条件および対応する分離性能を、表４に示す。

【００５５】

【表４】

表　4

異なるフィルターの列を試験する実験の結果

試行番号	9	10	11
慣性力	8,000	8,000	15,000
Q (L/分)	1.8	5.1	10.3
Σ (m^2)	3400	3400	6174
Q/Σ (10^{-8} m/S)	0.9	2.5	2.8
固体の回収(%)	99.4	99.7	99.6
遠心分離物の濁度(NTU)	63	111	344

再び、固体の回収は全体にわたって優れているようだが、遠心分離物の濁度は分離性能における違いを明らかにする。第一の設定の実験のように、低い慣性力および低減されたＱ／Σで遠心分離機を操作することは、剪断損傷による微粒子の生成を回避し、全体的な濁度における良好な低下を可能にする。次いで、元のＣＵＮＯ　６０　ＳＰフィルターよりも微細な等級である種々のデプスフィルターを使用して、遠心分離物を濾過した。全体的な意図は、絶対フィルターの良好な保護を可能にした。それぞれの濾液の濁度（ＮＴＵ）を、表５に示す。

【００５６】

【表５】

表　5

濾液の濁度

試行番号	9	10	11
CUNO 60-120 SP	9.2	8.1	21.3
CUNO 90 SP ZA	14.2	10.6	
CUNO 120M10 等級	8.6		7.5
Millipore 75 DE	20.5		
Millipore 60DE-75DE-RW01	8.3	6.6	14.5

元のＣＵＮＯ　６０ＳＰの濾液の濁度が１０ＮＴＵよりも高いことに留意すると、より微細な等級のフィルターを使用することは、絶対フィルターへの濁度負荷を低下させた。この効果にもかかわらず、遠心分離機の操作条件は、デプスフィルターの性能に決定的な影響を与える。異なる遠心分離機の操作条件から生じるデプスフィルターの濾液から、低いｇおよび低いＱ／Σで操作することが有益であることが明らかである。

【００５７】

異なるデプスフィルターの濾液のＵｌｔｉｐｏｒ　０．２μｍフィルター容量およびＵｌｔｉｐｏｒ　０．１μｍフィルター容量を表６に示す。より微細な等級のデプスフィルターは、０．２μｍフィルターの改善された保護を提供する。最良の場合において、５個より多い要因により、容量を増大させた。しかしながら、０．１μｍフィルター容量は低いままであった。コントロールとして、従来技術および同一の供給懸濁物を使用して、ＩＤＥＣ－１１４懸濁物もまた濾過した。コントロールについても同様に、０．１μｍフィルターの低い容量を観察した。これらの結果は、０．１μｍの濾過をそのように厳しくしているのは培養懸濁物であること、すなわち、良好に操作された遠心分離機は、コントロールと比較して絶対フィルターの容量を悪化させないことを示す。

【００５８】

【表６】

表　6

フィルター容量

試行番号	9	10	11	コントロール
CUNO 60-120 SP 0.2 μm 容量	1996		339	2251
CUNO 90 SP ZA 0.2 μm 容量	600	706		
CUNO 120M10 等級　0.2 μm 容量	2649		1364	
Millipore 75 DE 0.2 μm 容量	157			
Millipore 60DE-75DE-RW01 0.2 μm 容量		1154	218	
CUNO 60-120 SP 0.1 μm 容量	140		173	291
CUNO 90 SP ZA 0.1 μm 容量	78	96		
CUNO 120M10 等級　0.1 μm 容量	164		178	
Millipore 75 DE 0.1 μm 容量	168			
Millipore 60DE-75DE-RW01 0.1 μm 容量		212		

（Ｖ．Ｄ．実験３）

０．１μｍフィルターの要求量を減らすために、第三の系列の実験を実行した。考慮した２つの系統を追求した。第一に、固体保持空間内の圧縮された細胞に発揮される入り口の剪断または剪断力のいずれかによって、遠心分離機中で生成される微粒子によって、０．１μｍフィルターがブロックされることを推測した。後者の細胞の損傷の可能性を、４００ｍＬおよび２５０ｍＬの排出体積による、２つの異なる固体を使用することによって調べた。より小さな排出体積は、より頻繁な発射を必要とし、このことは今度は固体保持空間内で沈降した細胞の滞留時間を減らし、圧縮ストレスへの全体的な暴露を減少させる。圧縮が細胞の損傷を引き起こすのなら、発射体積の減少は、微粒子の生成を減らし、０．１μｍの濾過性を改善することが予測された。さらに操作条件の一設定において、供給物を１０℃に冷却した。温度を下げることは、哺乳動物細胞を剪断損傷に対して影響を受け難くすることが公知である。それゆえ、微粒子の生成が低下された温度において回避され得ることが予測された。全ての試行を８，０００×ｇおよび０．９・１０$^{-8}$ｍ／ｓのＱ／Σで操作し、全ての場合において固体の除去は９９．８％であり、これは先の結果に良く一致した。３７℃での試行について、発射体積に関係なく遠心分離物の濁度は３２ＮＴＵであり、このことは、固体保持空間における滞留時間が微粒子の生成に影響しないことを示した。１０℃で操作された試行の遠心分離物の濁度は、ほんの２４ＮＴＵにすぎず、このことは、低下された温度における細胞の安定性の増大に起因して、より少ない微粒子しか生成されなかったことを示し得た。遠心分離物に対して、ＣＵＮＯ　９０－１２０ＳＰデプスフィルターのフィルター容量を、４４１Ｌ／ｍ^{2}と決定した。同一のＩＤＥＣ－１１４培養物に対して、９０－１２０ＳＰの前にＣＵＮＯ　１－１０ＳＰデプスフィルターを使用する従来のデプス濾過の列において、９０－１２０ＳＰ容量を４００Ｌ／ｍ^{2}であると見出した。したがって、遠心分離は、最初のデプス濾過を時代遅れのもの（ｏｂｓｏｌｅｔｅ）にするだけではなく、二次的な仕上げデプスフィルターに対する要求量を１０％減らす。絶対フィルターについての濾過性研究の結果を表７に示す。

【００５９】

【表７】

表　7

濾過性アッセイ

試行番号	12	13	14	コントロール
慣性力	8,000	8,000	8,000	
Q (L/分)	1.8	1.8	1.8	
Q/Σ (10^{-8} m/s)	0.9	0.9	0.9	
排出体積 (mL)	250	400	400	
温度(°C)	37	37	10	
CUNO 120M10等級　濾液の濁度 (NTU)	5.8	5.9	6.2	
Ultipor 0.2 μm 容量(L/m^2)	2751	2021	889	>2800
Ultipor 0.1 μm 容量(L/m^2)	157	141	16	217

いかなる改変も０．１μｍの濾過性を改善し得ず、それは従来濾過されたコントロールに匹敵した。これらの問題は、ＩＤＥＣ－１１４細胞培養物プロセスに特異的であり得、代替的な単位操作としての遠心分離には特異的ではあり得ない。対照的に、より低い温度は、濾過性を実質的に低下させた。

【００６０】

本開示に基づいて、濁度または粒子濃度（粒子サイズの分布から見出される）のいずれかから、０．２μｍの濾過性を推定することが可能である。合理的なフィルター容量を可能にするために、濁度は好ましくは１０ＮＴＵ未満であるか、または粒子濃度は好ましくはｍＬあたり５・１０^{6}個未満の粒子である。図１１および図１２を参照のこと。

【００６１】

これらの実験結果は、低い慣性力（８，０００×ｇ）および約０．９・１０$^{-8}$ｍ／ｓのＱ／Σでのディスク積み重ね型遠心分離機の操作を指し示す。これらのデータに基づいて、本発明者らは、ＮＩＭＯ（１５，０００Ｌの培養体積）およびＮＩＣＯ（２，２００Ｌの培養体積）のための遠心分離機のサイズを推定し得る。比較性のために、Ｗｅｓｔｆａｌｉａから入手可能な装置を使用して得られた結果のみを使用した。ＮＩＭＯスケールについては、装置の適切な部品はＣＳＤ　１３０浄化器であり、これは８，０００×ｇでの１３０，０００ｍ^{2}のΣに一致する最大面積を有する。式（１３）を使用して、この機械のスループットを、一時間当たり４２００Ｌの体積スループットおよび約４時間の総収集時間をもたらす０．９・１０$^{-8}$ｍ／ｓであると推定した。同様に、ＣＳＣ　２０浄化器をＮＩＣＯスケールで使用し得る。８，３００ＲＰＭのその最大ボウル速度において、これは約８，４００×ｇで操作し、２２，０００ｍ^{2}に一致する面積を有する。式（１３）は，ＳＣ－６分離機の最適な運転条件について、一時間当たり７１０Ｌの体積スループットおよび３時間の収集時間を予測する。これらの計算は、最初の評価において確立された遠心分離条件がＮＩＭＯおよびＮＩＣＯスケールの生産の予定の要求量を完全に満たすことを実証する。

【００６２】

さらなる関心のある点は、大規模収集手順への遠心分離の実行が、濾過のみのアプローチと比較して固体－液体分離の全体的なコストを低下させ得るか否かである。このような分析に向けた第一の段階は、両方のシナリオに伴うフィルターのコストの推定である。ＩＤＥＣ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｒｏｃｅｓｓ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓは、ＩＤＥＣ－１１４の清澄化に対する濾過の要求量の最初の分析を実行した。濾過の列を、表８に示されるように確立した。

【００６３】

【表８】

表　8

濾過の列

フィルター	容量 (L/m^2)	NIMOでの フィルター面積 (m^2)	NICOでの フィルター面積 (m^2)
CUNO 01-10 SP	80	187.5	27.5
CUNO 60-120 SP	400	37.4	5.5
Pall Ultipor 0.2 μm	2000	7.5	1.1
Pall Ultipor 0.1 μm	217	68	10

遠心分離機についての最適な操作条件は、表９に示されるフィルターの要求量をもたらした。

【００６４】

【表９】

表　9

フィルターの要求量

フィルター	容量 (L/m^2)	NIMOでのフィルター面積 (m^2)	NICOでのフィルター面積 (m^2)
CUNO 90-120 SP	441	34	5
Pall Ultipor 0.2 μm	2000	7.5	1.1
Pall Ultipor 0.1 μm	160	93.8	13.8

提唱されるフィルターの列を使用する場合に、総濾過面積は実質的に低下する。コストの比較について、以下の仮定を使用した：使用した等級にかかわりなく、デプスフィルターのコストを８６＄／ｍ^{2}と仮定し、０．２μｍフィルターのコストを３２０＄／ｍ^{2}と推定し、そして０．１μｍフィルターのコストを３４０＄／ｍ^{2}に設定した。これらの推定を使用して、コストの推定を、表１０に示されるように計算した。

【００６５】

【表１０】

表　10

0.1 μm最終フィルターについてのフィルターのコストの推定

	遠心分離あり		濾過のみ	
フィルターのコスト($)	NIMO	NICO	NIMO	NICO
CUNO 01-10 SP	-	-	16125	2365
CUNO 60-120 SP (濾過のみ) CUNO 90-120 SP (遠心分離)	2925	430	3217	472
Pall Ultipor 0.2 μm	2400	352	2400	352
Pall Ultipor 0.1 μm	31875	4675	23181	3400
総フィルター	37200	5457	44923	6589
遠心分離による節約	17 %			

濾過コストの大幅な比率は、０．１μｍ絶対フィルターから生じ、このフィルターは、

フィルターの列から排除されるべきであることが提唱されている。このような密な等級のフィルターの使用は、第一のクロマトグラフィーカラムを保護するために必ずしも必要ではあり得ない。実際に、産業において、収集の間に０．１μｍ濾過を使用しない数多くの企業が存在する。このような決定の経済上の利益を実証するために、最終等級としての０．２μｍ濾過についてのコストの推定を繰り返した。

【００６６】

【表１１】

表 11

0.2 μm最終フィルターについてのフィルターのコストの推定

	遠心分離あり		濾過のみ	
フィルターのコスト($)	NIMO	NICO	NIMO	NIMO
CUNO 01-10 SP	-	-	16125	2365
CUNO 60-120 SP (濾過のみ) CUNO 90-120 SP (遠心分離)	2925	430	3217	472
Pall Ultipor 0.2 μm	2400	352	2400	352
総フィルター	5325	782	21742	3189
遠心分離による節約	76 %			

０．１μｍ最終フィルターの除去は、実質的に濾過コストを減らし、それにより遠心分離のかなりの利益を増大する。

【００６７】

（実施例２）

（分泌抗体の精製のためのＮＳＯ細胞培養物の清澄化）

デプスフィルターと組み合わせて遠心分離機を使用して、ＮＳＯ細胞培養物の清澄化をもたらした。細胞培養物の細胞は目的の抗体を分泌し、その結果、清澄化プロセスは、抗体精製の最初の工程として使用され得る。清澄化は、遠心分離機の使用、それに続く一連のデプスフィルター、プレフィルターおよびメンブレンフィルターの使用を包含し、その結果、不溶物（細胞、細胞残骸および細胞培養物中の全ての他の不溶物が挙げられる）が除去され、抗体を含む液体の遠心分離物は実質的に透明である。清澄度は、代表的に０．２μｍの清澄度として記載され、これは、連続的なアセンブリ内の最終フィルターの孔径の格付けをいう。

【００６８】

約１％（湿潤重量／体積）の固体および３％～１００％の範囲内の生存度を有するＮＳＯ細胞培養物の清澄化に適応させるために、清澄化プロセスを開発した。遠心分離を、８０００×ｇ～１５０００×ｇ（ｇは重力に起因する加速）の範囲内で包括的に実行し、これは遠心分離物の２５ＮＴＵ以上の濁度を提供した。このレベルの濁度において、デプスフィルター容量は約４０Ｌ／ｍ^2～４００Ｌ／ｍ^{2}より大きい範囲内であった。デプスフィルターの濾液の濁度は約１～１５ＮＴＵの範囲内であり、下流のプレフィルターおよびメンブレンフィルターに対する１０Ｌ／ｍ^2～１４０００Ｌ／ｍ^{2}の範囲内のフィルター負荷をもたらした。

【００６９】

さらに当業者は、本発明が、本発明の意図または中心の特性から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化され得ることを認識する。本発明の上記の説明が本発明の例示的な実施形態を開示するにすぎない点に関して、他の改変が本発明の範囲内にあるように意図されることが理解されるべきである。したがって、本発明は、本明細書に詳細に記載された特定の実施形態に限定されない。むしろ、参照が、本発明の範囲および内容を示す添付の特許請求の範囲に対してなされるべきである。

【図面の簡単な説明】

【００７０】

【図１】図１は、重力下および遠心力場中での種々のサイズのＣＨＯ細胞の沈降速度を示す線グラフである。

【図２】図２は、ディスク積み重ね型遠心分離機の断面を示す略図である。

【図３】図３は、ディスク積み重ね型遠心分離機の分離原理を示す略図である。

【図４】図４は、ボウル速度の関数としてのＳＣ－６分離機内の慣性力を示す線グラフである。

【図５】図５は、ＳＣ－６分離機のボウル速度の関数としてのΣを示す線グラフである。

【図６】図６は、５０％のサイズの回収で除去される最小の粒子サイズの関数としての、８，０００×ｇおよび１５，０００×ｇ（８，８００ＲＰＭおよび１２，０００ＲＰＭ）でのＳＣ－６分離機の達成可能なスループットを示す線グラフである。

【図７】図７は、Ｑ／Σおよび慣性力の関数としての固体の除去を示す線グラフである。

【図８】図８は、ＩＤＥＣ－１１４培養物の粒子サイズの分布のプロットであり、この培養物を遠心分離実験への供給原料として使用した。１０ｍｍと３５ｍｍとの間の集団は生存細胞を示し、４ｍｍ未満の集団は細胞残骸を示す。この方法の分解能は０．６μｍであり、このサイズより小さな粒子は、記録しなかった（対数スケールでのＸ軸）。

【図９】図９は、第一の設定の遠心分離実験（実施例１）についての操作条件の関数としての遠心分離物の濁度を示す線グラフである。

【図１０】図１０は、第一の遠心分離実験の間に得られる遠心分離物の粒子サイズの分布のプロットである（試行の番号は実施例１に詳述される操作条件に一致する）。

【図１１】図１１は、負荷濁度に対するｕｌｔｉｐｏｒ　０．２μｍフィルター容量を示す線グラフである。

【図１２】図１２は、負荷粒子濃度に対するｕｌｔｉｐｏｒ　０．２μｍフィルター容量を示す線グラフである。

【図１】

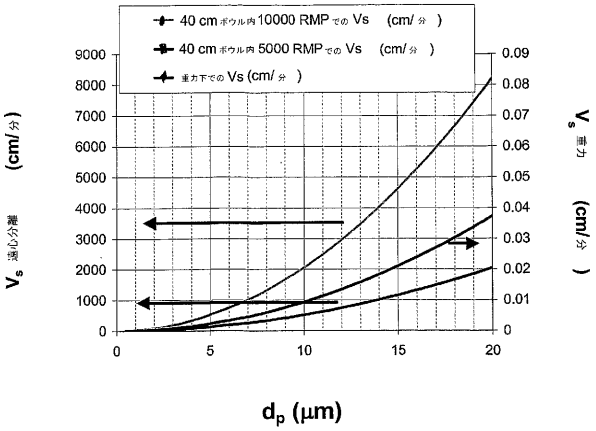


FIG. 1

【図２】

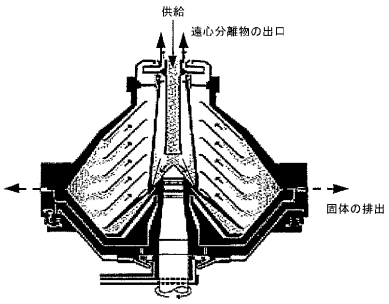


FIG. 2

【図３】

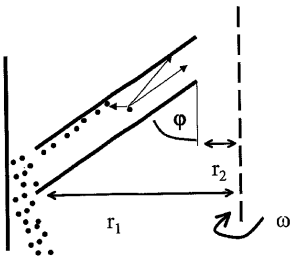


FIG. 3

【図４】

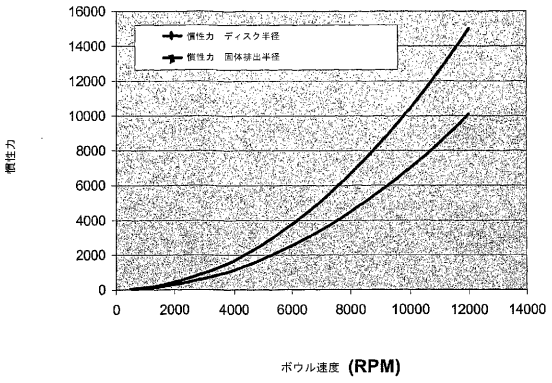


FIG. 4

【図５】

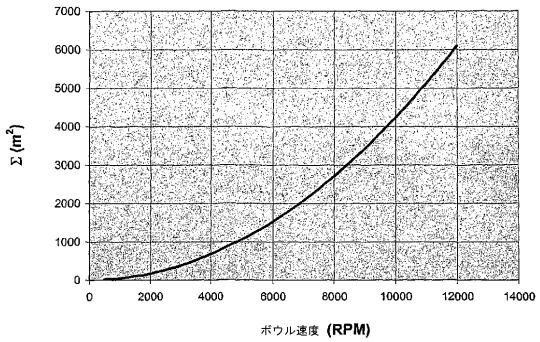


FIG. 5

【図６】

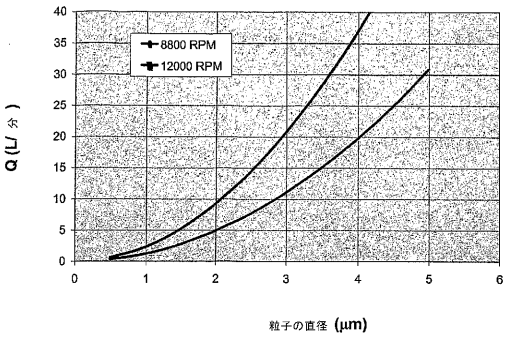


FIG. 6

【図７】

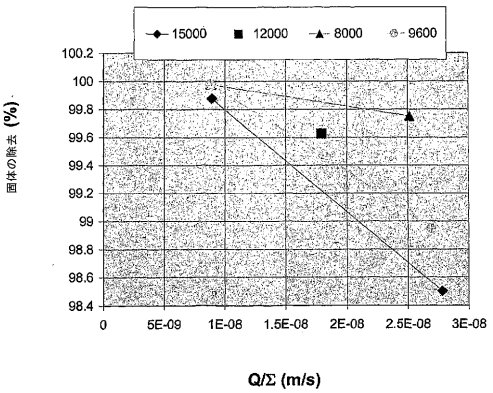


FIG. 7

【図８】

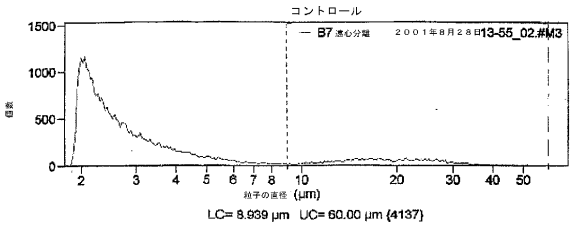


FIG. 8

【図９】

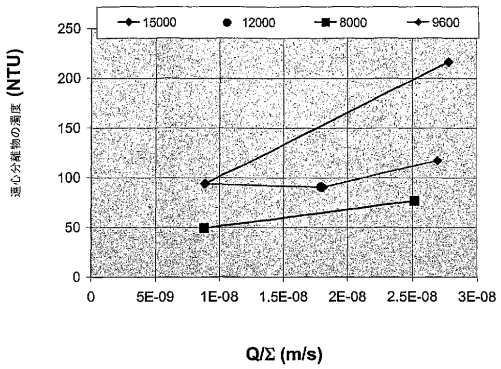


FIG. 9

【図１０】

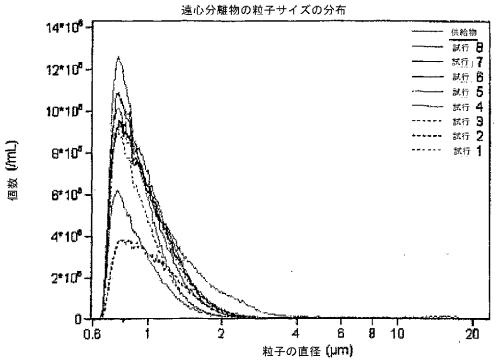


FIG. 10

【図１１】

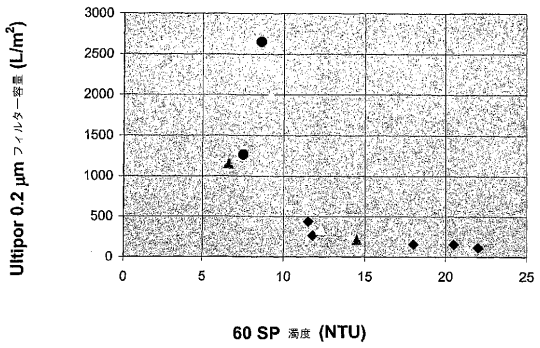


FIG. 11

【図１２】

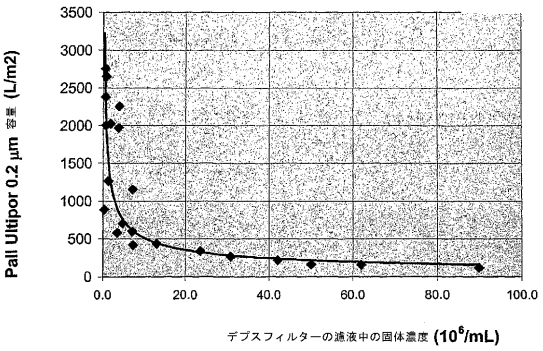


FIG. 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/21781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : B01D 61/00; C12N 1/00
US CL : 210/767, 787; 435/325, 358, 243, 803
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. : 210/767, 787; 435/325, 358, 243, 803

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Medline, Embase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,451,660 A (BUILDER et al) 19 September 1995(19.09.1995), see entire document.	1, 2, 6, 19, 20
Y	TEBBE, H. et al. Lysis-free separation of hybridoma cells by continuous disk stack centrifugation. Cytotechnology. 1996, Vol. 22, pages 119-127, see entire document.	1-20
X,P	US 2005/0069979 A1 (ZENG et al.) 31 March 2005(31.03.2005), see entire document.	1, 3, 4, 6,10, 13-20
— Y,P		2, 5
Y	RBODER et al. Current Protocols in Cell Biology, John Wiley & Sons, Inc. July 2000, pages 1-25 (available online at http/www.mrw. *interscince.wiley/com/cp/cpcb/articles/cb03/sect2-fs.html*).	1-20
Y	SINGHVI et al. Biopharm: Clarification of Animal cell Culture Process Fluids Using Depth Microfiltration. 1996, Vol. 1996, pages 1-8, see entire document.	1-20

☐ 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 application or patent 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
31 October 2005 (31.10.2005)

Date of mailing of the international search report
10 NOV 2005

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer
Michael Wityshyn
Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ファム, クリスティン ワイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２７, サンディエゴ, アロヨ ホンド １４５３９
(72)発明者 トーメズ, イェルク
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１３０, サンディエゴ, コルテ ドゥ ソーサリト ４２９９

Ｆターム(参考) 4B065 AA91X BD15 BD18 CA44
4D006 GA07 KA01 KA52 KA55 KA57 KB20 MA22 PA04 PB70