(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-545791
(P2024-545791A)
(43)公表日　令和6年12月11日(2024.12.11)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A23L 13/00 (2016.01)		A23L	13/00	Z	4B042
C12N 5/071(2010.01)		C12N	5/071		4B065
A23J 1/00 (2006.01)		A23J	1/00	A	
A23J 3/00 (2006.01)		A23J	3/00	502	
C12N 1/00 (2006.01)		C12N	1/00	F	

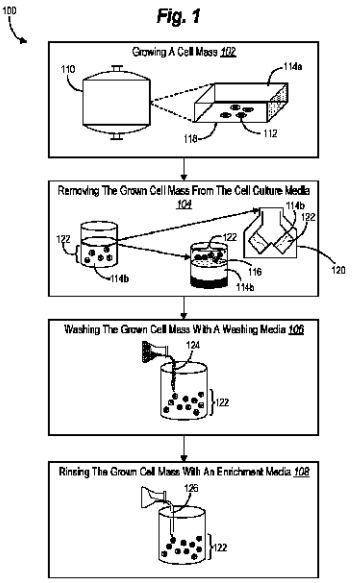
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全36頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-539732(P2024-539732)
(86)(22)出願日　令和4年12月28日(2022.12.28)
(85)翻訳文提出日　令和6年8月28日(2024.8.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/082482
(87)国際公開番号　WO2023/129971
(87)国際公開日　令和5年7月6日(2023.7.6)
(31)優先権主張番号　63/294,700
(32)優先日　令和3年12月29日(2021.12.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/294,703
(32)優先日　令和3年12月29日(2021.12.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　18/146,541
最終頁に続く

(71)出願人　521286293
アップサイド フーズ， インコーポレイテッド
UPSIDE FOODS， INC.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94710， バークレー， ハインツ アベニュー 804
804 Heinz Avenue， Berkeley， California 94710， U.S.A.
(74)代理人　110003281
弁理士法人大塚国際特許事務所
(72)発明者　ミュラーーアウフェルマン， コンラッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94710， バークレー， ハインツ アベニ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　増殖した細胞塊を洗浄及び仕上げするための方法

(57)【要約】
本開示は細胞培養培地を除去し、仕上げ培地で細胞を濃縮するために、増殖した細胞塊から細胞を洗浄する方法に関する。開示される方法は、細胞培養培地中で細胞塊を増殖させ、次いで、増殖した細胞塊を、経時的に変化する一連の洗浄緩衝液又は勾配洗浄緩衝液で収集及び洗浄することを含む。細胞培養培地は細胞増殖に有益な栄養素及び構成要素を含有するが、細胞培養培地中で増殖細胞は多くの場合、異臭、異臭、低色、低塩分／無機質組成物、及び他の欠点を有する。したがって、開示される方法は、単一又は一連の洗浄培地を使用して、増殖した細胞塊から細胞培養培地残余物を除去することを含む。増殖した細胞塊は増殖した細胞塊の感覚的側面及び栄養組成をさらに改善するために、仕上げ又は濃縮緩衝液でさらに洗浄される。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
培養肉製品を濃縮するための方法であって、
細胞培養培地中で細胞塊を増殖することと、
前記増殖した細胞塊の少なくとも一部を前記細胞培養培地から除去すること、
残りの細胞培養培地を洗い流すために、前記増殖した細胞塊を洗浄培地で洗浄することと、
栄養素を含む濃縮培地で前記増殖した細胞塊を洗い流すことと、を含む、
方法。
【請求項２】
前記洗浄培地及び前記濃縮培地は、増殖させるために前記増殖した細胞塊を刺激するための増殖因子を含まない、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記増殖した細胞塊を、
前記増殖した細胞塊と前記洗浄培地の両方を撹拌することと、
前記増殖した細胞塊及び前記洗浄培地をポンプを用いて循環させることと、
前記増殖した細胞塊及び前記洗浄培地をガスを用いて均質化することと、によって前記洗浄培地で洗浄することを更に含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記洗浄培地で前記増殖した細胞塊を洗浄することは、前記増殖した細胞塊の上に前記洗浄培地を流すことと、前記濃縮培地の濃度を経時的に増加させることを含む中間培地を流すこととを含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項５】
閾値増殖段階を完了する前記増殖した細胞塊に基づいて、前記細胞培養培地から前記増殖した細胞塊の少なくとも一部を除去することを更に含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記閾値増殖段階は、前記増殖した細胞塊が１ミリリットル当たり３００万細胞の生存細胞密度又は１％～２５％の充填細胞体積のうちの少なくとも１つに達した場合に完了する、
請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記増殖した細胞塊を外因性調節因子に曝露することによって、前記閾値増殖段階の前記完了を刺激することを更に含む、
請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記増殖した細胞塊を洗浄することは、前記増殖した細胞塊の上に前記洗浄培地を流すことと、前記洗浄培地及び前記増殖した細胞塊の両方を撹拌することを更に含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記洗浄培地は、－５Ｃ～４５Ｃの温度である、
請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
培養肉製品を濃縮するための方法であって、
細胞培養培地中で細胞塊を増殖することと、
前記細胞培養培地から前記増殖した細胞塊を除去することと、
洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を経時的に増加させることによって、勾配

洗浄培地で前記増殖した細胞塊を洗浄することと、を含む、
方法。
【請求項１１】
前記濃縮培地は、ビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、タンパク質、炭水化物、又は脂肪のうちの少なくとも１つを含む栄養素を含む、
請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
細胞ベースの可食性食品を濃縮するための方法であって、
細胞培養培地中で細胞塊を増殖することと、
前記細胞塊を第１の交換培地で洗い流すことと、
前記細胞塊を第２の交換培地で洗い流すことと、を含む、
方法。
【請求項１３】
前記第１の交換培地で前記細胞塊を洗浄することは、第１の組の膜透過性溶質を前記細胞塊の細胞の細胞内空間から拡散させ、
前記第２の交換培地で前記細胞塊を洗浄することは、第２の組の膜透過性溶質を前記細胞の前記細胞内空間に拡散させる、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記第１の交換培地は、前記細胞培養培地に対して低張性である、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
前記第１の交換培地が減少する溶質勾配を含み、前記第１の交換培地が、より高い濃度の溶質を有する溶液からより低い濃度の溶質を有する溶液に遷移する、
請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記細胞塊を横切る前記減少する溶質勾配を含む前記第１の交換培地を流すことが、溶質濃度の漸進的変化を提供し、それによって、前記細胞塊の細胞に対する浸透圧ストレスが減少する、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記溶質勾配の減少は、前記細胞培養培地の溶質濃度と実質的に同様の溶質濃度で開始する、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
前記第２の交換培地は、前記第１の交換培地に対して高張性である、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１９】
前記第２の交換培地は増加する溶質勾配を含み、前記第２の交換培地は、より低い濃度の溶質を有する溶液からより高い濃度の溶質を有する溶液に遷移する、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２０】
前記増加する溶質勾配を含む前記第２の交換培地を前記細胞塊にわたって流すことが、溶質濃度の漸進的変化を提供し、それによって、前記細胞塊の細胞に対する浸透圧ストレスが低減される、
請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記増加する溶質勾配が、前記第１の交換培地の溶質濃度と実質的に同様の溶質濃度で開始する、
請求項１９に記載の方法。

【請求項２２】
前記増加する溶質勾配が、栄養素の濃度を増加することを含む、
請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
栄養素の少なくとも一部は前記細胞塊の細胞内に拡散し、
前記栄養素の少なくとも第２の部分は、前記細胞の外部表面に接着する、
請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
第１の流出液が前記第１の交換培地と実質的に同様の組成を有するまで、前記第１の交換培地で前記細胞塊を洗浄することを更に含む、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２５】
第２の流出液が前記第２の交換培地と実質的に同様の組成を有するまで、前記第２の交換培地で前記細胞塊を洗浄することを更に含む、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２６】
洗浄時間の間、前記細胞塊を洗浄することを更に含む、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２７】
培養肉調製のための細胞塊を仕上げるための装置であって、
細胞培養培地中で前記細胞塊を増殖させるための培養タンクと、
前記細胞培養培地、洗浄培地、又は濃縮培地のうちの少なくとも１つから増殖した細胞塊を除去するための分離器と、
前記増殖した細胞塊を貯蔵し、前記増殖した細胞塊の上に前記洗浄培地又は前記濃縮培地のうちの少なくとも１つを流すための洗浄タンクと、を含む、
装置。
【請求項２８】
前記分離器が、遠心分離機又はフィルタのうちの少なくとも１つを備える、
請求項２７に記載の装置。
【請求項２９】
前記増殖した細胞塊をその最適な成長温度未満に冷却するための熱交換器を更に含む、
請求項２７に記載の装置。
【請求項３０】
前記増殖した細胞塊と、前記細胞培養培地、前記洗浄培地、又は前記濃縮培地のうちの少なくとも１つとを撹拌するための撹拌器を更に備える、
請求項２７に記載の装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は２０２２年１２月２７日に出願された「Method for Washing and Finishing a Grown Cell Mass,」と題された米国特許出願第１８／１４６，５４１号の優先権を主張し、２０２１年１２月２９日に出願された「Method for Washing and Finishing a Grown Cell Mass,」と題された米国特許仮出願第６３／２９４，７０３号の利点及び優先権を主張する。本出願はまた、２０２１年１２月２９日に出願された「Method for Pressurizing Cells Grown in Hydrogel to Induce Hypertrophy」と題する米国仮出願第６３／２９４，７００号の利点及び優先権を主張する。前述の出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】

世界の人口が成長し続けるにつれて、消費のための細胞ベース又は培養肉製品が、動物由来の従来の肉に対する魅力的な代替物（又は補足物）として出現してきた。例えば、細胞ベースの、培養された、又は培養された肉は、人間の特定の食事の必要性に対処することができる技術を表す。細胞ベースの肉のための細胞は実験室で増殖されるので、細胞ベースの肉を調製する実験室方法は必須アミノ酸及び脂肪のプロファイルを改変することができ、ならびにビタミン、ミネラル、及び生物活性化合物中で肉を濃縮することができる。いくつかの場合において、細胞ベースの肉製品は、そのような改変及び濃縮を促進する、非ヒト動物に由来する培養された接着及び懸濁細胞の組合せから調製され得る。

【０００３】

食事の必要性に対処することに加えて、細胞ベースの肉製品は、ヒト、家畜、及び環境のための従来の肉製品に関連するいくつかの欠点を軽減するのに役立つ。例えば、従来の肉の生産は、畜産及び　　殺に関連する議論の余地のある慣行を伴う。従来の肉生産に関連する他の欠点としては、食用栄養素へのカロリー投入量の低い変換、製品の微生物汚染、獣医学的及び人畜共通疾患の発生及び伝播、相対的天然資源要件、ならびに温室効果ガス排出物及び窒素廃棄物流などの結果として生じる産業汚染物質を含む。

【０００４】

細胞ベースの肉製品を作製することにおける進歩にもかかわらず、細胞ベースの肉製品を培養及び処理するための既存の方法は、従来の肉の香味及び栄養組成物を模倣するための課題又は障害などのいくつかの欠点に直面する。既存の方法は、多くの場合、動物から採取された　　殺肉に特徴的でない（又はそれとは異なる）香味、芳香、又は色を有する最終的な細胞ベースの肉製品をもたらす。一例として、既存の方法は、肉細胞の風味プロファイルに悪影響を及ぼす化合物を用いて、成長培地中で肉細胞を成長させることを含み得る。増殖培地はしばしば、アルデヒド、アルコール、及びケトンを含む第一級及び第二級化合物の複合混合物に分解又は酸化し得る芳香族アミノ酸を含有する。アルデヒド、ケトン、及びアルコールは、望ましくない芳香（例えば、「ウェットドッグ」臭）又は風味、例えば、酸敗臭又は風味をもたらし得る。異なる芳香又は風味の他に、既存の方法は、時々、自然な赤又は他の食肉の色合いの一部を欠く、一貫した、ほぼ均質なピンク色を有する細胞ベースの肉製品を生成する。

【０００５】

さらに、既存の方法を用いて培養された肉細胞は、多くの場合、従来の肉と比較して栄養組成物を欠いている。従来の肉は、典型的にはアミノ酸、ビタミン、及びミネラルを含む高度に消化可能なタンパク質を有する。一部には血液が栄養素を提供しないため、既存の方法は、従来の肉に存在する多くの栄養素を欠く細胞ベースの肉製品を作り出すことが多い。さらに、成長培地に浸漬された細胞ベースの肉製品はまた、　　殺された肉に特徴的ではない過度に高い浸透圧又は塩－鉱物性組成を示し得る。

【０００６】

これらは、さらなる問題及び問題とともに、細胞ベースの肉製品を培養するための既存の方法に存在する。

【発明の概要】

【０００７】

簡単な概要

本開示は一般に、細胞培養培地を除去し、仕上げ培地で細胞を濃縮するために、増殖した細胞塊から細胞を洗浄する方法を記載する。特に、開示された方法は、細胞培養培地中で細胞塊を増殖させ、次いで、増殖した細胞塊を、経時的に変化する一連の洗浄緩衝液又は勾配洗浄緩衝液で収集及び洗浄することを含む。１つのそのような洗浄緩衝液は、細胞培養培地を置換又は除去することができる。別の洗浄緩衝液は、生育細胞塊の細胞の質感及び栄養組成を改善する仕上げ緩衝液の形態をとってもよい。追加的に又は代替的に、開示された方法は、洗浄培地の濃度を減少させ、時間とともに仕上げ媒体の濃度を増加させることによって、勾配洗浄緩衝液を使用することができる。別々に、又は勾配混合物として適用されるかにかかわらず、開示された方法は、増殖した細胞塊を洗浄培地で洗浄し、

増殖した細胞塊を仕上げ媒体で洗浄して、細胞培養培地残留物を除去又は希釈し、不適切な香味及び芳香を酸化し、色を改善し、及び／又は栄養素で増殖した細胞塊を濃縮することができる。

【図面の簡単な説明】

【０００８】

詳細な説明は、以下に簡単に説明される図面を参照する。

【０００９】

【図１】図１は、本開示の１つ以上の実施形態による、洗浄培地及び濃縮培地を使用して、増殖細胞塊を洗浄及び濃縮する概要図を図示する。

【００１０】

【図２】図２は、本開示の１つ以上の実施形態による、細胞閾値増殖段階の完了の例示的な特性を図示する。

【００１１】

【図３】図３は、本開示の１つ以上の実施形態による、複数洗浄法及び勾配洗浄法を図示する。

【００１２】

【図４】図４は、本開示の１つ以上の実施形態による、増殖細胞塊を洗浄及び濃縮するための様々な構成要素を含む例示的なシステムを示す。

【００１３】

【図５】図５は、本開示の１つ以上の実施形態による、例示的な洗浄培地組成物及び例示的な濃縮培地組成物を図示する。

【００１４】

【図６】図６は、本開示の１つ以上の実施形態による、細胞塊の細胞上に第１の交換培地及び第２の交換培地を流すことを図示する。

【００１５】

【図７】図７は、本開示の１つ以上の実施形態による、洗浄培地及び濃縮培地を使用して、増殖細胞塊を洗浄及び濃縮するための一連の動作を図示する。

【００１６】

【図８】図８は、本開示の１つ以上の実施形態による、勾配洗浄培地を使用して、増殖細胞塊を洗浄及び濃縮するための一連の動作を図示する。

【００１７】

【図９】図９は、本開示の１つ以上の実施形態による、交換培地を用いて細胞塊を洗浄するための一連の動作を図示する。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

本開示は細胞ベースの肉製品の質感、風味、及び香りを改善するために、増殖細胞塊を洗浄及び調製するための方法の１つ又は複数の実施形態を説明する。開示される方法は、細胞塊を増殖させることと、増殖細胞塊が閾値増殖段階を完了した後に、増殖細胞塊を採取することとを含む。増殖細胞塊を回収し、細胞培養培地から分離することができる。別個洗浄培地中で適用されるか、又は洗浄培地の勾配として適用されるかにかかわらず、開示される方法は、残留細胞培養培地を置換する第１の洗浄緩衝組成物で増殖細胞塊を洗浄し、次いで、増殖細胞を濃縮するために栄養素を含有する仕上げ緩衝液で増殖細胞塊を洗浄することができる。

【００１９】

例示すると、開示される方法は、細胞培養培地中で細胞塊を増殖させることと、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去することと、洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄して残りの細胞培養培地を洗い流すことと、ヒトの消費に好ましい栄養素を含む濃縮培地で増殖細胞塊を洗浄することを含む。いくつかの実施態様では、別個の洗浄培地及び別個の濃縮培地を使用するのではなく、開示される方法は、洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を増加させることによって、勾配洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄することを含む。

【００２０】
上述のように、開示された方法は、細胞塊を増殖させることを含む。細胞は、バイオリアクターなどの増殖環境内で増殖させることができる。より具体的には、懸濁細胞及び／又は接着細胞が、細胞培養培地の存在下で増殖させることができる。以下にさらに説明するように、細胞培養培地は、細胞を増殖させるためのエネルギー源及び化合物を含む。
【００２１】
細胞塊を増殖させた後、開示された方法は、閾値増殖段階を完了したときに細胞を洗浄することをさらに含む。一般に、細胞は、細胞が指数関数的な増殖を遅延又は停止したときに、閾値増殖段階を完了する。閾値増殖段階を完了した細胞は、異なる特性を有し得る。例えば、開示される方法は、細胞密度、細胞代謝、細胞培養培地内に存在する化合物、及び他要因を評価して、細胞が閾値増殖段階又は閾値増殖段階を完了し、増殖細胞塊になったかどうかを決定することを含み得る。
【００２２】
上記のように、増殖細胞塊は、洗浄培地を用いて洗浄することができる。いくつかの実施形態では、開示される方法が、一連の洗浄培地を使用することを含む。別個洗浄培地中で適用されるか、又は洗浄培地の勾配として適用されるかにかかわらず、洗浄培地は例えば、洗浄培地を増殖細胞塊の上に流すもしくは噴霧すること、増殖細胞塊を洗浄培地中に浸漬すること、又は何らかの他の適切な洗浄アプローチを使用することによって、増殖細胞塊から細胞培養培地を置換又は除去することができる。
【００２３】
洗浄後又は洗浄の一部として、開示される方法は、増殖細胞塊及び洗浄培地をさらに撹拌することができる。増殖細胞塊を洗浄した後又は洗浄の一部として、開示された方法はまた、濃縮培地を使用して増殖細胞塊を濃縮してもよい。一般に、濃縮培地はビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、脂肪（例えば、油又は脂肪細胞）、及び／又は細胞ベースの肉製品の品質を改善するための他の化合物を含有する。場合によっては、濃縮培地はまた、増殖細胞塊の色を追加又は変化させる。濃縮培地は、増殖細胞塊中の増殖細胞に対する最終又は仕上げ処理として作用し、洗浄された増殖細胞塊中の成分をバランスさせながら、増殖細胞の栄養価を増加させる。
【００２４】
洗浄培地及び／又は濃縮培地で洗浄する場合、増殖細胞塊を、一連の媒体又は勾配洗浄培地を用いて洗浄することができる。例えば、開示された方法は、洗浄培地で細胞を洗浄することと、洗浄培地を除去することと、濃縮培地を添加することを含むことができる。他の実施形態では、開示される方法は、勾配洗浄培地を用いて細胞を洗浄することを含み、勾配洗浄培地は設定時間の間、細胞上を流れ、勾配洗浄培地の組成は時間と共に変化する。例えば、勾配洗浄培地は、洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を経時的に増加させることによって適用され得る。
【００２５】
開示された方法は、未処理細胞培養物又は他の既存の及び未処理の細胞ベースの肉と比較して、いくつかの利益を提供する。洗浄培地を使用して増殖細胞塊を洗浄することによって、開示された方法は、細胞培養培地、及び　殺された肉に特徴的でない（又は　殺された肉とは異なる）細胞に風味又は芳香を付与する化合物を除去する。洗浄培地はまた、増殖細胞塊内のイオン及びｐＨバランスを調整して、濃縮培地のための増殖細胞塊を調製することができる。
【００２６】
細胞ベースの肉の風味又は芳香を改善することに加えて、開示される方法はまた、既存の及び未加工の細胞ベースの肉と比較して、細胞ベースの肉製品の栄養組成物を改善する。特に、開示された方法は、細胞が細胞培養培地中で増殖され、細胞培養培地の一部又は全部が洗い流された後に、栄養素を含む濃縮培地で増殖細胞塊を洗浄することを含む。いくつかの実施形態では、増殖細胞塊が、ビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、脂肪、及び／又は他の有益な化合物を濃縮培地から取り込む。濃縮培地の使用は、完成した細胞ベースの

肉製品の栄養組成物を改善する。

【００２７】

前述の議論によって示されるように、本開示は、開示される方法の特徴及び利点を説明するために様々な用語を利用する。ここで、そのような用語の意味に関してさらなる詳細が提供される。例えば、本明細書で使用される場合、用語「細胞塊」は、肉の細胞を含む塊を指す。特に、細胞塊は、集合塊に集められた培養肉の細胞を指す。以下で論じるように、細胞塊は、筋芽細胞、間葉芽細胞、筋線維芽細胞、間葉系幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、周皮細胞、脂肪細胞、上皮、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、多能性細胞、体性幹細胞、内皮細胞、又は他の同様の細胞型のうちの１つ又は複数などの異なる細胞種を含むことができる。例えば、細胞塊は、チャンバー、ハウジング、容器などの囲い内で成長する培養肉の細胞シートを含むことができる。

【００２８】

関連して、「増殖細胞塊」という用語は、１つ以上の増殖細胞を含む細胞塊を指す。例えば、増殖細胞塊は、成長期間中に成長するために成長培地（例えば、細胞培養培地）によって栄養補給された細胞のグループを含む。いくつかの場合において、増殖細胞塊は、増殖期間を終えた細胞塊を含む。

【００２９】

本明細書でさらに使用される場合、「細胞」という用語は、肉の個々の細胞を指す。特に、細胞は、筋芽細胞、血管管膜芽細胞、筋線維芽細胞、間葉系幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、周皮細胞、脂肪細胞、上皮、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、多能性細胞、体性幹細胞、内皮細胞、又は他の同様の細胞種のうちの１つ又は複数など、異なる細胞種を含み得る。さらに、細胞は、筋原性前駆細胞、脂肪原性前駆細胞、間葉系前駆細胞、又は他のタイプの前駆細胞を含む、異なるタイプの前駆細胞を含み得る。

【００３０】

本明細書でさらに使用される場合、「細胞培養培地」又は「増殖培地」という用語は、細胞の増殖をサポートする化合物を含む液体又はゲルを指す。特に、細胞培養培地は、エネルギー源及び細胞周期を調節する化合物を含む。例えば、細胞培養培地は、アミノ酸、ビタミン、無機塩、グルコース、溶解ガス、血清、成長因子、ホルモン、及び付着因子を含有することができる。細胞培養培地はまた、細胞成長及び増殖の間、ｐＨ及び浸透圧を維持するのを助けることができる。

【００３１】

本明細書で使用される場合、「洗浄培地」という用語は、細胞が増殖細胞塊に増殖した後に細胞を洗浄するための液体を指す。特に、洗浄培地は、増殖細胞塊から細胞培養培地を洗浄するために、利用され得る。例えば、洗浄培地は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、クエン酸、クエン酸／二塩基性カリウム緩衝液、又は増殖細胞塊をすすぎもしくは洗浄するための他の溶液を含むことができる。

【００３２】

対照的に、「濃縮培地」という用語は、細胞が増殖細胞塊に増殖した後に細胞を濃縮するための液体を指す。特に、濃縮培地は、栄養組成物を改善するために、又はそうでなければ、消費のために増殖細胞塊の品質を改善するために、増殖細胞塊に添加され得る成分を含有する。例えば、濃縮培地は、ビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、脂肪、又は健康的又は栄養的な食事に重要な他の化合物などの栄養素を含むことができる。場合によっては、濃縮培地が細胞増殖に必要な栄養素を含まなくてもよい。

【００３３】

本明細書で使用される場合、「栄養素」という用語は、生存、成長、又は繁殖するために細胞又は生物によって使用される物質を指す。栄養素はまた、動物細胞又は生物が生存、成長、又は繁殖するために必要とされる物質を指し得る。例えば、栄養素は、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、抗酸化剤、又は細胞、生物、又はヒトが生存、成長、及び繁殖するために必要な細胞に添加される脂肪を含むことができる。

【００３４】

本明細書で使用する場合に、用語「勾配洗浄培地」は、洗浄培地及び濃縮培地の勾配を有する液体を指す。特に、勾配洗浄培地は、洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を増加させるように変化する動的勾配を含む液体を指すことができる。例えば、勾配洗浄培地は初めて１００％の洗浄培地を含み、中間時間の間に洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を増加させる液体、及び後に１００％の濃縮培地を含む液体を指すことができる。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「培養タンク」という用語は、細胞を培養するために使用される容器を指す。特に、培養タンクは、細胞及び細胞培養培地を保持することができる環境を指す。例えば、培養タンクは、バイオリアクターシステムを含むことができる。

【００３６】

本明細書でさらに使用される場合、「分離器」という用語は、物質を分離するための装置又は方法を指す。特に、分離器は細胞培養培地、洗浄培地、濃縮培地、及び他の培地を含む液体又はゲルから、増殖細胞塊を分離するための装置を指す。例えば、分離器は、沈降に使用される遠心分離機、フィルタ、篩、又は凝集剤を含むことができる。

【００３７】

本明細書で使用するとき、用語「洗浄タンク」は、細胞を洗浄するための容器を指す。特に、洗浄タンクは、増殖細胞塊及び洗浄培地又は濃縮培地のうちの少なくとも１つを保持する容器を指す。例えば、洗浄タンクは、洗浄又は濃縮培地を追加及び除去するための１つ以上の開口部を有するタンクを含むことができる。

【００３８】

本明細書でさらに使用される場合、用語「交換培地」は、細胞内及び／又は細胞外への物質の拡散を刺激する化合物を含む液体又はゲルを指す。特に、交換培地は、様々な濃度の膜透過性溶質を含むことができる。細胞が交換培地に曝露されると、膜透過性溶質は、高濃度の領域から低濃度の領域まで細胞膜を通過することができる。例えば、交換培地は、細胞の細胞内空間に拡散する高濃度の栄養素を含んでもよい。別の例では、交換培地が細胞内からの物質を細胞から排出させる低濃度の溶質を含む。

【００３９】

本明細書でさらに使用される場合、「低張性」という用語は、別の溶液又は細胞中の溶質の濃度と比較して比較的低い濃度の溶質を有する溶液の特性を指す。特に、低張溶液は、別の溶液と比較してより低い濃度の膜透過性溶質を含む。いくつかの例では、低張溶液は、交換培地又は細胞培養培地内に見出されるよりも低い濃度の膜透過性溶質を含有する。例えば、第１の交換培地は、膜透過性溶質が細胞を出るように刺激する低張溶液を含むことができる。

【００４０】

本明細書でさらに使用される場合、「高張性」という用語は、別の溶液又は細胞中の溶質の濃度と比較して比較的高い濃度の溶質を有する溶液の特性を指す。特に、高張溶液は、細胞培養培地又は交換培地と比較して、より高い濃度の膜透過性溶質を含む。例えば、高張交換培地は、細胞塊内の細胞の細胞内空間に入る比較的高濃度の膜透過性溶質を含むことができる。

【００４１】

ここで、開示された方法の例示的な実施形態及び実装を描写する例示的な図に関連して、開示された方法に関して、さらなる詳細が提供される。例えば、図１は１つ以上の実施形態による、洗浄培地中で細胞を洗浄し、濃縮培地中で細胞を洗浄するための、開示された方法における動作の概要を図示する。特に、図１は、細胞塊を増殖させる動作１０２と、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去する動作１０４と、洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄する動作１０６と、濃縮培地で増殖細胞塊を洗浄する動作１０８とを含む、一連の動作１００を示す。

【００４２】

図１に示すように、一連の動作１００は、細胞塊を成長させる動作１０２を含む。場合

によっては、動作１０２が細胞培養培地１１４ａ中で細胞１１２を増殖させることを含む。例えば、いくつかの例では、細胞１１２がバイオリアクター１１０内で増殖される。細胞１１２は、細胞培養培地１１４ａに懸濁された懸濁細胞を含むことができる。加えて、又は代わりに、細胞１１２は、基材１１８に付着した接着細胞を含む。いくつかの実施形態では、動作１０２は、細胞が閾値成長又は閾値増殖段階を完了するまで、細胞を増殖させることを含む。図２及び対応する段落は、１つ又は複数の実施形態による、閾値成長段階を完了した細胞の特性を詳細に示す。

【００４３】

一例では、細胞塊を成長させる動作１０２が、バイオリアクター１１０を細胞及び細胞培養培地で２０％の体積まで充填することを含む。例証すると、バイオリアクター１１０が１キロリットルタンクである場合、動作１０２は、２００Ｌの細胞及び細胞培養培地を添加することを含む。開示される方法は、増殖期間の開始時に比較的高濃度の細胞（例えば、１５～３０％）を含むことができる。細胞を増殖させ、指数関数的な増殖に到達させる。指数関数的な増殖が達成された後、開示された方法は、バイオリアクター１１０をその体積の１００％まで細胞培養培地で満たすことを含む。他の実施形態では、開示される方法が、バイオリアクター１１０を異なる体積の細胞及び細胞培養培地で充填することを含む。

【００４４】

一連の動作１００は、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去する動作１０４をさらに含む。特に、動作１０４は、細胞培養培地１１４ｂから増殖細胞１２２を分離することを含む。増殖細胞１２２は、一緒に収集されるか、又は環境全体に分散する増殖細胞塊からの細胞を含み得る。図示されるように、開示される方法は、遠心分離機１２０又はフィルタ１１６の利用を含むことができる。例えば、動作１０４は、細胞培養培地１１４ｂから増殖細胞１２２を単離するために、遠心分離機１２０を使用することを含むことができる。１つ以上の実施形態において、遠心分離によって細胞培養培地から細胞塊を除去することは、細胞培養培地から懸濁細胞を分離するための好ましい方法である。懸濁細胞は、溶液中で増殖するため、追加の液体を分離するためにより多くの遠心分離を必要とすることが多い。したがって、開示される方法は、懸濁細胞である増殖細胞に基づいて、遠心分離時間又はサイクルを追加することを含み得る。同様に、凝集体の試料、又は懸濁液中で組織の部分シートとして増殖細胞は、接着細胞の試料と比較して、多くの場合、より高い割合の細胞培養培地を含む。したがって、開示される方法は、細胞が凝集体であることに基づいて、遠心分離時間又はサイクルを追加することを含み得る。

【００４５】

図示のように、遠心分離機１２０は、連続遠心分離機又はバッチ遠心分離機を含むことができる。連続フロー遠心分離では、バッチ遠心分離の場合のように、多数の遠心分離管を充填し、デカントする必要なく、大量の物質が遠心分離される。遠心分離機を使用する場合、場合によっては、増殖細胞と細胞培養培地との混合物が、選択された動作速度で動作するローターに絶えず流入する。細胞は、細胞培養培地を細胞から運び去る流れから沈殿する。好ましい実施形態では、遠心分離機が細胞溶解及び細胞死のリスクが低い速度で操作され、それによって、細胞は細胞培養培地から分離された後、主に完全に無傷のままである。

【００４６】

連続遠心分離とは対照的に、場合によっては、バッチ遠心分離が、比較的高い細胞濃度を有する細胞ペレットを形成するという利点を有し得る。例えば、バッチ遠心分離は、細胞培養培地を伴わない（又はほとんど残らない）ほぼ１００％の充填細胞体積をもたらし得る。しかしながら、バッチ遠心分離は、より多くの時間を消費し得るという点で、連続遠心分離と比較して非効率的である。

【００４７】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去する動作１０４が、フィルタ１１６を利用して、増殖細胞１２２を細胞培養培地１１４ｂから分離することを含む

ことができる。特に、フィルタ１１６は、細胞培養培地１１４ｂを通過させながら、増殖細胞１２２を保持するバリアとして作用する半透膜である。いくつかの実施形態では、開示される方法が、細胞培養培地から懸濁細胞を分離するために膜濾過を使用する。

【００４８】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去する動作１０４が、洗浄培地で細胞培養培地を希釈又は置換する動作と置き換えられる。例えば、増殖細胞塊は、細胞培養培地を希釈及び／又は置換するために、洗浄培地で単純に満たされ得る。これは、細胞培養培地と洗浄培地との分離を単一動作に組み合わせることによって、（例えば、遠心分離による）分離工程の数を有益に減少させることができる。

【００４９】

フィルタに加えて、又はフィルタの実施形態として、動作１０４は、ふるい分け及び／又は沈殿の使用を含むことができる。ふるい分けは、ふるいの穴を通過するには大きすぎる細胞が保持されるという点で、ろ過のようなものである。開示される方法は、インライン及び／又は振とうふるいの使用を含むことができる。開示される方法は、組織及び微粒子を分離するために、篩のいくつかの層をさらに含むことができる。

【００５０】

濾過に加えて、又は濾過の代わりに、動作１０４は、凝集又は沈降をさらに含んでもよい。凝集又は沈降は、細胞培養培地から細胞の凝集体又はクラスターを分離するための好ましい方法であり得る。凝集／沈降では、凝集剤を添加して、細胞を凝集体に集める。例えば、開示される方法は、ポリマー、多価カチオン、金属塩、又は他の化合物を添加して、増殖細胞１２２を凝集させることを含むことができる。細胞を凝集させた後又は凝集させている間に、開示される方法は、細胞培養培地を排出又は濾過することができる。

【００５１】

１つ以上の実施形態では、開示される方法が、細胞培養培地から細胞塊を除去するための１つ以上の上述の方法を利用する。例えば、開示される方法は、凝集、遠心分離、及び／又は濾過の組合せを利用して、細胞培養培地から増殖細胞１２２を単離することによって、動作１０４を実施することができる。

【００５２】

いくつかの実施形態では、動作１０４は任意であり、開示される方法は細胞培養培地から細胞塊を除去する動作を含まない。例えば、いくつかの実施形態では、増殖細胞塊が、シートとして増殖した組織又は細胞を含む。組織は、成長中に基材に付着した接着細胞を含むことができる。このような場合、増殖段階の後、細胞培養培地は、タンクから単純に排出され、基材に付着した細胞組織が比較的乾燥した形態で残され、その後、洗浄の準備が整う。したがって、開示された方法は、細胞塊を成長させる動作１０２から、増殖細胞塊を洗浄培地で洗浄する動作１０６に進むことができる。そのような実施形態では、開示される方法が、細胞組織が捕捉された細胞培養培地を保持するポケットを形成しないことを確実にするために、増殖細胞塊及び洗浄培地のさらなる撹拌（例えば、混合又は反転）を含み得る。

【００５３】

図１に示すように、一連の動作１００は、増殖細胞塊を洗浄培地で洗浄する動作１０６をさらに含む。特に、洗浄培地１２４は、増殖細胞１２２を横切って流されるか、又は噴霧される。洗浄培地１２４は、細胞培養培地１１４ｂの残りの媒体を増殖細胞１２２から置換又は除去する。洗浄培地１２４の例示的な組成物を、図５に関して以下に説明する。

【００５４】

いくつかの実施形態では、動作１０６が、洗浄培地１２４を増殖細胞１２２上に注ぎ、洗浄培地１２４及び増殖細胞１２２を撹拌することを含む。いくつかの例では、洗浄培地１２４及び増殖細胞１２２が、増殖細胞１２２及び洗浄培地１２４を保持する遠心分離機又は容器を穏やかに旋回させることによって撹拌される。いくつかの実施形態では、洗浄培地１２４及び増殖細胞１２２が、混合機構を利用することによって撹拌される。例示的な混合機構は、電動撹拌機又はインペラを含むことができる。いくつかの実施形態では、

開示された方法が、細胞保持フィルタを使用して、増殖細胞１２２が洗浄培地１２４で洗浄されている間、それらを保持することを含む。

【００５５】

上述のように、動作１０６は、様々な洗浄方法を含む。例えば、動作１０６は、複数洗浄法又は勾配洗浄法を含むことができる。図３及び対応する段落は、１つ又は複数の実施形態による例示的な多重洗浄方法及び例示的な勾配洗浄法を説明する。

【００５６】

図１にさらに示すように、一連の動作１００は、増殖細胞塊を濃縮培地で洗浄する動作１０８を含む。図示のように、動作１０８は、増殖細胞１２２を濃縮培地１２６で洗浄することを含む。濃縮培地１２６は、増殖細胞１２２の塩分を減少させることができる。濃縮培地１２６は、増殖細胞１２２を濃縮するための最終処理としても作用し得る。増殖細胞１２２を濃縮するために、例えば、濃縮培地１２６は、ビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、又は脂肪などの栄養素を含むことができる。栄養素は、食用食品として増殖細胞１２２の栄養組成を改善する。濃縮培地１２６の例示的な組成物は、図５に関して以下に記載される。

【００５７】

前述のように、開示された方法は、閾値増殖段階が完了すると、増殖細胞塊を洗浄することを含む。図２及び対応する段落は、閾値増殖段階２０２の完了のための例示的な特性を説明する。図２は、細胞密度２０４、充填細胞体積２０６、タイミング２０８、細胞代謝２１０、及びタンパク質含有量２１２を含む様々な特性に基づいて、閾値増殖段階が完了したことを決定することを示す。加えて、又は代替的に、いくつかの実施形態では、開示される方法が、完了を誘導すること２１４を含む。

【００５８】

図２に示すように、閾値増殖段階の完了を示す１つの特性は、細胞密度２０４である。図２は、細胞がバイオリアクターに最初に注入されたときに対応する開始細胞密度２１６を示す。細胞が成長して増殖することにつれて、細胞密度が増加する。例えば、細胞は、標的細胞密度２１８に達したときに増殖期を完了したと考えることができる。いくつかの実施形態では、標的細胞密度２１８が、２００万細胞／ミリリットル、３００万細胞／ミリリットル、又はこれらの値の中間のある密度である。いくつかの実施形態では、細胞密度２０４の特性が、接着細胞ではなく懸濁細胞に適用される。

【００５９】

閾値増殖段階の完了を示す別の特徴は、充填細胞体積（ＰＣＶ）２０６である。一般に、ＰＣＶは、試料中の細胞の体積を指す。図２は、開始ＰＣＶ２２０及び標的ＰＣＶ２２２を示す。開始ＰＣＶ２２０は、増殖期の開始時の試料中の細胞の体積を反映する。標的ＰＣＶ２２２は細胞が増殖し、より大きな体積を占有することを示す。いくつかの実施形態では、標的ＰＣＶ２２２が少なくとも１％のＰＣＶに等しい。他の実施形態では、標的ＰＣＶ２２２が１％～２５％ＰＣＶの範囲内の任意の値に等しい。いくつかの実施形態では、充填細胞体積２０６の特性が、接着細胞ではなく懸濁細胞を評価することに適用される。

【００６０】

ＰＣＶに加えて、又はＰＣＶの代わりに、いくつかの実施形態では、細胞が、タイミング２０８に基づいて閾値増殖段階を完了したと考えられる。例えば、開示された方法は、細胞が増殖期間にわたって増殖された後に、増殖された細胞を洗浄することに進むことができる。成長期間は、任意の長さの時間を含むことができる。いくつかの実施形態では、例えば、増殖期間は６日～１４０日である。

【００６１】

図２によってさらに示されるように、細胞はまた、細胞代謝２１０による閾値増殖段階の完了を示し得る。一般に、細胞が成長することにつれて、細胞は集合的に、より多くのグルコース及び酸素を消費する。指数関数的な成長の間、グルコース及び酸素消費も指数関数的に増加することが予想される。細胞が閾値増殖段階を出た後、グルコース及び酸素

消費は、よりゆっくりと上昇し、それによって増殖が減速していることを示す。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法が、グルコース吸収及び／又はO_2利用を分析して、細胞が閾値増殖段階を完了したかどうかを決定することを含む。一例では、酸素消費安定化、例えば、経時的に変化していないか、又は最小限に変化している酸素消費は、細胞が採取、したがって洗浄及び仕上げの準備ができていることを示す。

【００６２】

さらに、いくつかの実施形態では、開示される方法が、タンパク質含有量２１２に基づいて閾値増殖段階の完了を決定する。一般に、細胞培養培地及び細胞混合物中の異なるタンパク質の濃度は、増殖の遅延を示すことができる。例えば、細胞培養培地中の乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）含有量の増加は、細胞死を示す。特に、ＬＤＨは、細胞膜障害時に細胞培養培地中に迅速に放出される細胞質酵素である。したがって、ＬＤＨ含有量の増加は、閾値増殖フェーズの完了の完了をシグナリングし得る。別の例では、ビシンコニン酸（ＢＣＡ）を使用して、細胞培養培地中のタンパク質の総レベルを分析することができる。特に、ＢＣＡアッセイを利用して、細胞培養培地中のタンパク質含有量を測定することができる。タンパク質レベルのピーク及びプラトーは、細胞が閾値増殖段階を完了したことを示し得る。

【００６３】

開示される方法は、閾値増殖段階の完了をさらに誘導することができる。図２に示されるように、開示される方法は、細胞を外因性調節因子に曝露することによって、完了２１４を誘導することができる。外因性調節因子は、細胞の分化転換を引き起こし、又は促進して、細胞を閾値増殖段階から、筋線維及びミオシン重鎖などの成熟筋線維を形成する段階に移行させることができる。例えば、外因性調節因子は、細胞増殖を遅らせ、及び／又は分化転換を刺激する分化転換因子を含むことができる。

【００６４】

外因性調節因子に加えて、又はその代わりに、別の例では、開示される方法が、細胞培養培地から細胞を除去することによって完了２１４を誘導することを含む。一般に、細胞が培養器から除去されると、細胞は、持続的な増殖に必要な栄養素を提供する細胞培養培地から除去されるため、増殖を停止又は遅延させる。

【００６５】

前述のように、開示された方法は、残りの細胞培養培地を洗い流すために、増殖細胞塊を洗浄培地で洗浄することを含む。一般に、洗浄培地は、増殖細胞塊から細胞培養培地を置換又は除去する。図３及び対応する議論は、１つ以上の実施形態による、増殖細胞塊を洗浄するための２つの異なる方法を詳述する。図３は、複数洗浄法３０２及び勾配洗浄法３０４を示す。

【００６６】

一般に、複数洗浄法３０２は、別個の異なる培地を使用して、増殖細胞塊を洗浄することを含む。概略として、一例では、開示される方法が細胞を増殖させること、増殖細胞塊を収集すること、細胞を冷却すること、細胞培養培地を除去すること、及び細胞培養培地のバルク希釈を提供し、浸透圧ストレスからの細胞破裂を制限するために等張食塩水を含む第１の洗浄培地を適用することを含む。第１の洗浄培地は、遠心分離され得るか、又はそうでなければ、増殖細胞塊から除去され得る。第２の濃縮培地を使用して、残留洗浄培地を除去する一方で、塩濃度も減少させる。第２の濃縮培地はさらに、遠心分離されるか、又はそうでなければ、増殖細胞塊から除去され得る。図３に示すように、複数洗浄法３０２は、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流す動作３０６と、洗浄培地を除去する動作３０８と、増殖細胞塊の上に濃縮培地を流す動作３１０とを含む。図３は増殖細胞塊の上に洗浄培地を流す１サイクルを示すが、いくつかの実施形態では開示された方法が、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流す数サイクルを含む。

【００６７】

複数洗浄法３０２は、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流す動作３０６を含む。図３に示すように、洗浄培地３１６を増殖細胞３１４に添加する。増殖細胞３１４は、遠心分離又は

細胞培養培地からの濾過によって任意に分離された後の濃縮細胞を含む。いくつかの実施形態では、増殖細胞３１４が、１：１～１：４の細胞対洗浄培地の比で洗浄培地３１６で洗浄される。例えば、増殖細胞３１４が４０Ｌの体積である場合、開示された方法は、洗浄培地３１６の１６０Ｌに４０Ｌを添加することを含む。さらに、いくつかの実施形態では、洗浄培地３１６が洗浄タンク３１８内の増殖細胞３１４に添加される。洗浄タンク３１８は、汚染のリスクを低減するために加圧されてもよい。

【００６８】

増殖細胞３１４に添加される洗浄培地３１６の量は、増殖細胞３１４から細胞培養培地の残余物を効率的に除去するように最適化され得る。例えば、洗浄培地３１６が多く添加されすぎると、処理時間が増加し、増殖細胞３１４を処理するのに必要な物質が増加する。洗浄培地３１６が少なく使用されすぎると、増殖細胞３１４が洗浄培地３１６で十分に被覆されず、残留細胞培養培地が増殖細胞３１４内に残存する可能性がある。

【００６９】

洗浄培地３１６は、洗浄期間の間、増殖細胞３１４の上を流れるか、又はそれに曝露され得る。洗浄期間は、５分～８時間のいずれかで持続することができる。洗浄期間が長すぎる場合、及び浸透圧が高すぎる場合、増殖細胞３１４は破裂し得る。洗浄期間が短すぎる場合、洗浄培地３１６は平衡化し、必要なイオン交換を行うのに必要な時間を有さなくてもよい。

【００７０】

開示される方法はまた、洗浄培地３１６の温度を制御することを含んでもよい。特に、洗浄培地３１６は、－５Ｃ～４５Ｃであり得る。より温かい温度は、細胞膜を横切るより速い質量移動の利点を有するが、より低い温度はより良好な細胞生存に対応する。

【００７１】

いくつかの実施形態では、動作３０６が洗浄培地３１６と増殖細胞３１４との混合物を撹拌することをさらに含む。一般に、洗浄培地３１６と増殖細胞３１４との混合物を撹拌することにより、増殖細胞３１４の洗浄培地３１６への曝露が最大化される。増加した曝露は、増殖細胞３１４と洗浄培地３１６との間の転移及び平衡化処理を増強する。これを達成するために、混合物は、洗浄タンク３１８内で撹拌されてもよい。細胞は、撹拌され、ポンプを介して循環され、又は空気もしくはガスを使用して均質化され得る。攪拌は、細胞を保存するための強度及び時間において制限され得る。過度に又は過度に激しい撹拌は、せん断力によって増殖細胞３１４を乱し、細胞損傷をもたらす可能性がある。

【００７２】

図３にさらに示すように、複数洗浄法３０２は、洗浄培地を除去する動作３０８も含む。特に、開示された方法は、洗浄培地３１６から洗浄された増殖細胞３２２を分離することを含む。１つ又は複数の実施形態では、動作１０６が、洗浄された増殖細胞３２２を洗浄培地３１６から分離するために、増殖細胞塊を細胞培養培地から分離するために使用される方法を利用する。例えば、動作３０８は、遠心分離機３２０、濾過、ふるい分け、又は凝集／沈降を利用して、洗浄された増殖細胞３２２を洗浄培地３１６から分離することを含むことができる。

【００７３】

図３にさらに示すように、複数洗浄法３０２は、増殖細胞塊の上に濃縮培地を流す動作３１０を含む。特に、開示された方法は、洗浄された増殖細胞３２２の上に濃縮培地３２４を流すことを含む。増殖細胞塊の上に濃縮培地を流す方法は、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流す方法と同様である。より具体的には、洗浄手順、濃縮培地に対する細胞の比、温度、濃度、撹拌、及びタイミングは、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流す動作３０６に関して上述したものと同じ又は同様である。

【００７４】

例示のために、濃縮培地を、増殖細胞塊の上に流し、撹拌することができる。例えば、増殖細胞塊及び濃縮培地は、撹拌され、ポンプを介して循環され、又は空気／ガスで均質化され得る。いくつかの実施形態において、増殖細胞塊は、１：１～１：４の細胞対濃縮

培地の比で、濃縮培地３２４で覆われる。いくつかの実施形態では、濃縮培地３２４の温度が１Ｃ～４０Ｃである。より具体的には、濃縮培地３２４が４Ｃの温度であってもよい。開示される方法は、洗浄された増殖細胞３２２を濃縮培地３２４に濃縮期間の間、曝露することをさらに含むことができる。濃縮期間は、洗浄期間と同じであってもよく、洗浄期間よりも長くても短くてもよい。特に、濃縮期間は、５分～８時間であり得る。

【００７５】

いくつかの実施形態では、複数洗浄法３０２が、濃縮培地を除去する追加の動作をさらに含む。特に、濃縮され洗浄された増殖細胞は、過剰な濃縮培地を除去するために、濃縮培地３２４から分離され得る。いくつかの例では、開示される方法が、増殖細胞塊と濃縮培地３２４との混合物を遠心分離することを含む。加えて、又は代替的に、細胞は凝集されてもよい。

【００７６】

さらに、複数洗浄法３０２は、増殖細胞塊を乾燥させる追加の動作を含むことができる。一般に、増殖細胞塊は例えば、細胞ベースの肉製品の質感を改善することによって、消費の準備ができた細胞ベースの肉製品への増殖細胞塊の移行を促進するために、乾燥され得る。例えば、増殖細胞塊は、従来の肉の水分含量を模倣するために、５０％～８０％の水分含量を有するように乾燥され得る。例えば、増殖細胞塊は、真空、噴霧、又は強制乾燥システム下で乾燥させることができる。

【００７７】

複数洗浄法３０２の代わりに、開示された方法は、勾配洗浄法を使用して、増殖細胞塊を洗浄することができる。一般に、勾配洗浄培地を、増殖細胞塊の上に流す。勾配洗浄培地の組成は経時的に変化する。例えば、洗浄培地を、設定時間の間、増殖細胞塊の上に流し、濃縮培地に徐々に移行させることができる。

【００７８】

図３は、１つ以上の実施形態による勾配洗浄法３０４を示す。概略として、勾配洗浄法３０４は、細胞を増殖させること、増殖細胞塊を収集すること、増殖細胞塊から細胞培養培地を遠心分離又は除去すること、細胞を冷却すること、及び勾配洗浄培地で細胞を洗浄することを含み得る。勾配洗浄法３０４は２つのタンクを利用することができ、一方は洗浄培地３２６を保持し、他方は濃縮培地３２８を保持する。２つのタンクはそれぞれ、ガウン細胞塊３３０を収容する洗浄タンク３３２に接続される。勾配洗浄培地の濃度は、洗浄培地３２６の１００％として開始し、より多くの濃縮培地３２８をゆっくりと含むことができる。勾配洗浄培地は、濃縮培地３２８から構成される１００％（又はほぼ１００％）になるまで、移行し続ける。勾配洗浄培地が経時的に変化することにつれて、開示される方法は、洗浄タンク３３２から媒体を排出することを含むことができる。例えば、洗浄タンク３３２は、媒体が洗浄タンク３３２に流入されているのと同じ速度で媒体を排出することができる。複数洗浄法３０２に対する勾配洗浄法３０４の利点には、洗浄培地を除去する必要性を除去することによる効率の改善が含まれる。

【００７９】

開示される方法は、洗浄培地３２６及び／又は濃縮培地３２８が、ガウン細胞塊３３０に曝露される時間を調整することを含むことができる。例えば、図３に示されるように、勾配洗浄法３０４は、２４時間の期間内に実行される。最初の３時間（又は５分～８時間の最適な洗浄期間内の任意の時間）において、勾配洗浄培地は、洗浄培地３２６から構成される１００％（又はほぼ１００％）の流入を特徴とする。３時間から２１時間までの中間期間にわたって、勾配洗浄培地は、より高い濃度の洗浄培地３２６を有する流入から、より高い濃度の濃縮培地３２８を有する流入に徐々に移行する。最後の３時間（又は５分～８時間の最適な濃縮期間内の任意の時間）において、勾配洗浄培地流入は、濃縮培地３２８から構成される１００％（又はほぼ１００％）である。代替の実施形態では、流入が、１００％未満の洗浄培地（例えば、９５％洗浄培地及び５％濃縮培地の開始比）から１００％未満の濃縮培地（例えば、５％洗浄培地及び９５％濃縮培地の終了比）に移行する。

【００８０】
勾配洗浄法３０４の一例では、洗浄培地３２６が、高濃度の塩、糖などを含有する高浸透圧溶液を含む。洗浄培地３２６は、ガウン細胞塊３３０からイオンを除去するためにクエン酸塩をさらに含むことができる。さらに、洗浄培地３２６は、ガウン細胞塊３３０のｐＨをさらに変化させることができる。上記で示唆したように、場合によっては、勾配洗浄法３０４が、塩濃度が低く、クエン酸塩がほとんど又は全くなく、ビタミンＢなどの追加の栄養素を有する濃縮培地３２８に徐々に変化させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、開示された方法が、洗浄培地３２６及び濃縮培地３２８から、タンパク質の変性の危険性があり、かつ、粘り気のある質感をもたらす酸（クエン酸塩など）を除外する。

【００８１】
図４は、１つ又は複数の実施形態による、開示された方法を実行するための例示的なシステムを示す。一般に、図４は、増殖細胞塊を洗浄するためのシステムの一部であり得る様々な構成要素を含む。例えば、図４は、培養タンク４０２、バッファータンク４０６、洗浄タンク４０８、及び様々な他の構成要素を含むシステム４００を示す。開示された方法は、図４に示されたものよりも多い又は少ない構成要素の使用を含むことができる。さらに、いくつかの実施形態では、図４の構成要素が異なる順序で編成される。

【００８２】
図４に示すように、システム４００は、培養タンク４０２を備える。培養タンク４０２は、細胞が増殖し、閾値増殖段階を完了して、増殖細胞塊になることができる環境を提供する。より具体的には、培養タンク４０２が、細胞増殖のための栄養素を有する細胞培養培地を含む。いくつかの実施形態では、培養タンク４０２がバイオリアクターシステムを含む。培養タンク４０２内の細胞４１０は、成長温度に保たれる。例えば、細胞培養培地及び細胞４１０は、哺乳動物細胞については４０℃に、水生種についてはより低い温度に保つことができる。いくつかの実施形態では、培養タンク４０２はまた、撹拌器４１２を含む。撹拌器４１２は、細胞培養培地への細胞４１０の曝露を増加させるために、細胞を混合するか、又はそうでなければ攪拌する。

【００８３】
図４にさらに示すように、増殖細胞塊及び細胞培養培地４１４を回収し、バッファータンク４０６に移すことができる。いくつかの例では、増殖細胞塊の一部が、培養タンク４０２から回収又は排出され、別の部分は次のバッチの成長のために培養タンク４０２内に残される。例えば、８０％の増殖細胞塊を、洗浄のために培養タンク４０２から抽出することができ、これは培養タンク４０２中に増殖細胞塊の２０％を残す（例えば、その後の増殖及び増殖段階のために）。

【００８４】
上述のように、増殖細胞塊及び細胞培養培地４１４は、排液中及び洗浄前に増殖細胞を貯蔵するために、中間タンクとしてバッファータンク４０６に移される。バッファータンク４０６は、分離前に細胞を格納する滅菌容器である。バッファータンク４０６は、効率の利点を提供することができる。より具体的には、いくつかの培養タンクが同期して動作している場合、培養タンクは一定の間隔で排出される。８つのバイオリアクターが同期して動作している一例では、それらのうちの１つは典型的には２時間ごとに排出される。いくつかの実施形態では、バッファータンク４０６が、下流プロセスが排出スケジュールに追いつくにつれて、培養タンクから増殖細胞のための保管スペースを提供する。

【００８５】
図４にさらに示すように、システム４００は、熱交換器４０４ａをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞を洗浄することの一部として、開示される方法は増殖細胞塊を冷却する。哺乳動物細胞の場合、細胞は、３６Ｃ－４２Ｃ～１Ｃ－２０Ｃの成長温度から冷却される。いくつかの場合において、増殖細胞塊は、増殖細胞を死滅又は凍結させることなく、可能な限り最低の温度に冷却される。

【００８６】

細胞を冷却することは、いくつかの利点を提供する。例えば、冷却細胞は、細胞内の代謝プロセスを遅らせて、溶解及び他の形態の細胞死を遅らせる。冷却された細胞はまた、より活性が低く、これは、さらなる処理が行われ得る時間量を延長する。さらに、増殖細胞塊を冷却することにより、流体粘度が増加し、細胞膜が強化され得、これにより、以下のステップにおいて、増殖細胞が、撹拌及び遠心力により良好に耐えることが可能になる。

【００８７】

熱交換器４０４ａは、増殖細胞塊を冷却する。図４に示す例では、熱交換器４０４ａが、増殖細胞塊と細胞培養培地４１４とが分離器４２２によって分離される前に、増殖細胞塊と細胞培養培地４１４との両方を冷却する。増殖細胞塊及び細胞培養培地４１４を一緒に冷却することは、細胞培養培地から遠心分離又はそうで無ければ分離される前に、細胞膜を強化し得る。しかしながら、増殖細胞塊及び細胞培養培地４１４の両方を冷却することは、増殖細胞塊のみのより少ない体積を冷却することとは対照的に、追加のエネルギーを必要とする。

【００８８】

いくつかの実施形態では、熱交換器４０４ａが分離器４２２によって細胞培養培地から分離された後に、増殖細胞塊を冷却する。そのような実施形態では、細胞培養培地が冷却されないので、システム４００はエネルギーを節約する。しかしながら、増殖細胞塊中の細胞は分離前に冷却されないので、細胞はよりセンシティブであり得る。したがって、増殖温度で細胞培養培地から増殖細胞塊を分離することは、細胞死を防ぐために、より遅い速度での遠心分離が必要となり得る。

【００８９】

図４にさらに示すように、分離器４２２は、（図１の動作１０４に関して前述したように）増殖細胞塊４２６を細胞培養培地４２４から除去する。分離器４２２は、増殖細胞塊及び細胞培養培地４１４を重位相及び軽位相の遠心分離に分離する連続遠心分離器を含む。重位相は増殖細胞塊４２６を含有又は収集し、軽位相は細胞培養培地４２４を含有又は収集する。いくつかの実施形態では、連続遠心分離機が、細胞壁構造の完全性が遠心分離中に維持されることを確実にする、毎分回転数（ＲＰＭ）又は相対遠心力（Ｇ）で操作される。過度に高いＲＰＭ又はＧでは、細胞は破裂し得る。より低いＲＰＭ及びＧでは、分離は不十分であり、重位相は過剰な増殖培地を含有する。

【００９０】

図４にさらに示すように、増殖細胞塊４２６を洗浄タンク４０８に移すことができ、細胞培養培地４２４を熱交換器４０４ｂに流すことができる。熱交換器４０４ａ～４０４ｂは、エネルギー貯蔵タンク４２０と協働して、システム４００のエネルギー効率を改善する。一般に、熱交換器４０４ａ～４０４ｂは、増殖細胞塊を冷却するために使用されるエネルギーを回収する。

【００９１】

上述のように、さらに図４に示されるように、熱交換器４０４ａは増殖細胞塊（及びいくつかの実施形態では細胞培養培地）を成長温度（例えば、４０Ｃ）から冷却温度（例えば、１Ｃ）まで冷却する。いくつかの実施態様では、冷却温度が、増殖細胞塊中の細胞のための最適成長温度未満の任意の温度を含む。熱交換器４０４ａ内の細胞を冷却することは、冷却流入４１８（例えば、１Ｃ）を利用し、加温流出４１６（例えば、３６Ｃ）をもたらす。

【００９２】

加熱及び冷却を容易にするために、システム４００は、エネルギー貯蔵タンク４２０を任意に含む。特に、エネルギー貯蔵タンク４２０は、冷却された温度での細胞培養培地４２４と成長温度での増殖細胞塊との間のエネルギーの効率的な交換を促進する。より具体的には、いくつかの実施形態では、エネルギー貯蔵タンク４２０が、底部に沈む冷却された液体と、エネルギー貯蔵タンク４２０の頂部に上昇する加温された液体とを含む。一例では、エネルギー貯蔵タンク４２０が葉巻形状のエネルギー貯蔵タンクである。エネルギ

ー貯蔵タンク４２０に流出入する線の異なるパターンによって示されるように、加温流出４１６は液体を加温し、熱交換器４０４ｂからの冷却流出部４３８は培養タンク４０２内の液体を冷却する。

【００９３】

上述のように、増殖細胞塊４２６は、洗浄タンク４０８に移送される。洗浄タンク４０８において、システム４００は増殖細胞塊４２６の上に洗浄培地４２８及び／又は濃縮培地４３０を流し、噴霧し、又は浸漬する。洗浄タンク４０８はまた、洗浄プロセス中に増殖細胞塊を撹拌するか、又はそうでなければ撹拌するための撹拌器４４０を含むことができる。撹拌器４４０は、増殖細胞塊及び洗浄培地又は濃縮培地を攪拌する。図４は、撹拌器４４０を示しているが、細胞は洗浄タンク４０８内で撹拌されるか、ポンプを介して循環されるか、又はエア／ガスで均質化されてもよい。

【００９４】

図４にさらに示されるように、開示される方法は、システム４００において上述された複数洗浄法を利用することができる。特に、洗浄培地４２８は、洗浄タンク４０８内の増殖細胞塊の上を流れることができる。洗浄培地は、遠心分離機４３２によって、増殖細胞塊から除去される。より具体的には、洗浄培地が（ｉ）第２の遠心分離機、又は（ｉｉ）細胞培養培地４２４と増殖細胞塊４２６とを分離するために使用される分離器４２２を使用して除去することができる。

【００９５】

開示される方法はまた、凝集４３４によって、増殖細胞塊から洗浄培地を除去することを含むことができる。凝集４３４において、増殖細胞塊は、多価カチオン、金属塩、又はポリマーの添加によって凝集体に収集される。凝集は、高い含水量が許容される細胞ベースの肉製品にとってより望ましい場合がある。除去方法にかかわらず、洗浄培地が除去されたとき、システム４００は、洗浄された細胞塊４３６と共に残される。

【００９６】

上記のように、複数洗浄法を使用する場合、濃縮培地が、洗浄された細胞塊４３６に添加されるか、流されるか、又は浸漬される。いくつかの実施形態では、濃縮培地が洗浄タンク４０８内の洗浄された細胞塊４３６に添加される。他の実施形態では、濃縮培地が別個の濃縮タンク内で洗浄された細胞塊４３６に添加される。

【００９７】

複数洗浄法に加えて、図４は、システム４００における上述の勾配洗浄法も示す。特に、洗浄タンク４０８は、洗浄培地４２８及び濃縮培地４３０の両方に接続される。上述のように、開示される方法は、洗浄培地４２８及び濃縮培地４３０の濃度を経時的に変化させることによって、勾配洗浄培地を流す（又は浸漬する）ことを含むことができる。勾配洗浄培地が洗浄タンク４０８内の増殖細胞塊の上を流れた後、細胞は、最終的な細胞ベースの肉製品に形成され得る。

【００９８】

上述のように、洗浄培地及び濃縮培地は、望ましくない芳香、味覚、及び質感を除去する一方で、細胞ベースの肉製品の栄養組成も改善する。図５は、１つ以上の実施形態による、質感、香味、芳香、及び栄養上の利益を提供するための洗浄培地及び濃縮培地の組成物の概要を提供する。

【００９９】

上記のように、洗浄培地は細胞培養培地を置換／除去し、増殖細胞塊を洗浄し、及び／又は細胞溶解を減少させる。濃縮培地は、栄養素、保存剤（例えば、抗酸化剤）、香味料、芳香、着色料、及び／又はテクスチャライザーを用いて、増殖細胞塊を濃縮する。しかし、洗浄培地も濃縮培地も細胞培養培地ではない。例えば、いくつかの実施形態では、洗浄培地も濃縮培地も、細胞を増殖させる増殖因子、細胞培養培地が含み得る増殖因子を含有しない。図５は、洗浄培地組成物５０２の例及び濃縮培地組成物５０４の例を示す。洗浄培地組成物５０２のこのような一例では、洗浄培地が希釈リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）及びクエン酸である。クエン酸は、コレステロールを有益に低下させることができる

。別の例では、洗浄培地はクエン酸／二塩基性カリウム緩衝液である。等張生理食塩水で作られた洗浄培地はまた、細胞破裂を制限する浸透圧を有し、費用効率の高いバルク希釈を提供する。

【０１００】

対照的に、濃縮培地組成物５０４の例では、濃縮培地が低塩含有量を有する低張食塩水を含む。濃縮培地はまた、増殖細胞塊によって取り込まれる化合物を含有することができる。特に、濃縮培地は、タンパク質／アミノ酸、抗酸化剤、脂肪、脂肪酸、油、及びビタミンを含有することができる。いくつかの実施形態では、濃縮培地が食用化合物を含有する。濃縮培地はまた、Ｂ－ビタミン、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）などの抗酸化剤、又はサクランボ、アルファトコフェロール、及び他の抽出物などの抗酸化特性を有する植物からの他の天然抽出物を含有することができる。これらの酸化防止剤は、乾燥プロセス中の脂肪の酸化を防止する。

【０１０１】

さらに、いくつかの実施形態では、増殖細胞塊を処理して、濃縮培地からの栄養素の細胞取り込みを改善する。例えば、細胞塊は、熱ショック又はエレクトロポレーションされ得、それによって、細胞壁を通る物質移動が増加される。開示された方法は続いて、熱ショック又はエレクトロポレーション後に、増殖細胞塊を濃縮培地で洗浄することができる。

【０１０２】

洗浄培地及び／又は濃縮培地は、細胞ベースの肉製品の感覚的側面を制御するデータを含有することができる。感覚的側面には、芳香、味覚、外観、口当たり、及び質感が含まれる。特に、洗浄培地及び／又は濃縮培地は、不適切な芳香に関連する揮発性物質の除去を容易にすることができる。例えば、多くの脂質酸化生成物は揮発性であり、　　殺された肉の特徴ではない細胞ベースの肉製品に不適切な芳香及び不適切な香味を付与するアルデヒド、ケトン、及びアルコールを含む、一次及び二次化合物の形成をもたらす。より具体的には、潜在的に望ましくない細胞培養培地成分及び分解物が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、トレオニン、メチオニン、イソロイシン、コリン、アンモニウムイオンなどを含み得る。特に、メチオニンは、分解されない場合、最終製品に煮物キャベツのような臭い及び風味を与えることができる。イソロイシンは、分解しないとクッキーのようなにおいや味がする。システインは、分解されない場合、腐った卵のような臭い及び風味を最終製品に付与することができる。培地中のアンモニアは、尿又は汗のような臭いを与えることができる。洗浄及び／又は濃縮培地はまた、異臭源であり得る鉄及び鉄錯体を除去することができる。

【０１０３】

さらに、濃縮培地中にＢ－ビタミン抗酸化剤を添加すると、芳香を発生させる酸化経路が最小限に抑えられる。特に、脂質過酸化は、従来の肉及び肉製品を劣化させ、肉製品に望ましくない臭い及び食感を与える。典型的には、リノール酸などの多価不飽和脂肪酸が活性酸素種（ＲＯＳ）による過酸化を受ける。濃縮培地中のＢ－ビタミンの添加はＲＯＳをクエンチし、それによって脂質の過酸化を防止する。

【０１０４】

上述のように、洗浄培地及び／又は濃縮培地中の添加剤は、細胞ベースの肉製品の味を改善することもできる。特に、洗浄培地は、細胞ベースの肉製品に異臭を付与する望ましくない細胞培養培地成分及び分解剤を除去する。一例では、メチオニン、イソロイシン、システイン、及びアンモニアはすべて、洗浄培地を使用して増殖細胞塊から洗浄され得る細胞培養培地の成分である。オフフレーバーは、本質的に金属であってもよく、増殖細胞中に存在する鉄の特定の種に起因し得る。金属成分は鉄を結合するか、又は本鉄種（例えば、鉄結合タンパク質）を、より好ましい香味及び／又は芳香を有する異なる鉄種と置き換える洗浄培地中の成分によって除去され得る。上述のように、洗浄培地及び濃縮培地中のＢ－ビタミン抗酸化剤は、不適切な香味をもたらす酸化経路を最小限にすることができる。

【０１０５】
洗浄培地及び／又は濃縮培地の成分はまた、最終的な細胞ベースの肉製品の外観を改善する。例えば、色は、色促進又は色抑制特性を有する構成要素によって導入され得る。そのような構成要素の例としては、ビートジュース、ニンジンジュース、他の植物ベースのジュース、加水分解物又は他のペプトン、及び他の着色剤が挙げられる。色は、鉄を添加することによって、又は洗浄及び濃縮工程を通して酸化を防止することによって、灰色化を防止するために保持され得る。さらに、色は、キレート特性を有する構成要素によって除去されてもよい。そのような構成要素の例としては、クルコン酸ナトリウム、クエン酸塩、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、及び他の化合物が挙げられる。
【０１０６】
洗浄培地及び／又は濃縮培地はまた、細胞ベースの肉製品の質感を改善する成分を含んでもよい。特に、濃縮培地は質感を改善するために、架橋剤などの酵素を含むことができる。例えば、濃縮培地は、架橋のためのトランスグルタミナーゼを含むことができる。さらに、洗浄培地及び濃縮培地は平衡濃度のＮａＣｌ塩緩衝液を含むことができ、これは、タンパク質を平衡質感のために安定化させる。
【０１０７】
細胞ベースの肉製品の感覚的態様を制御すること以外に、洗浄培地及び濃縮培地を使用して、浸透圧を制御することができる。一般に、細胞増殖培地は浸透圧が非常に高く（例えば、細胞はしばしば、塩分条件でよく増殖する）、洗浄培地に適切な浸透圧を選択し、濃縮培地は、様々な考慮を払って作製されなければならない。媒体が細胞よりも高い浸透圧を有する場合、媒体成分は、より迅速に細胞によって取り込まれ得る。しかしながら、細胞取り込みを増加させるために高浸透圧に依存する濃縮培地を後に利用するために、最初に洗浄培地で細胞の浸透圧を（例えば、より味の良い塩含量に）減少させることが必要であり得る。一般に、開示される方法は塩（塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）、カリウム（Ｋ）、カルシウム（Ｃａ）、マグネシウム（Ｍｇ）、鉄（Ｆｅ）、及び他の要素を含む）を、栄養素の取り込みを促進するために、浸透圧の標的閾値に達するように調整することを含み得る。
【０１０８】
洗浄培地及び濃縮培地はまた、増殖細胞塊内の化学を変化させるために使用され得る。特に、従来の肉タンパク質の等電点（ｐｌ）は、約５～５．５である傾向がある。開示された方法は、ｐＨに基づいてｐｌを変更すること（又はその逆）を含んで、イオン保持及び水分含有量などの増殖細胞塊の挙動を調整することを含むことができる。より具体的には、ｐＨがｐｌよりも低い場合、タンパク質は全体的に正の正味電荷を有し、（Ｒ－ＮＨ$_3$＋及びＲ－ＣＯＯＨ）グループが豊富に存在する。ｐＨがｐｌよりも大きい場合、タンパク質は全体的に負の電荷を有し、（Ｒ－ＮＨ$_2$及びＣＯＯ）グループが豊富に存在する。ｐＨがｐｌに等しい場合、増殖細胞塊のタンパク質は、全体的に中性の電荷を有する。
【０１０９】
さらに、開示される方法は、洗浄培地及び／又は濃縮培地内の塩濃度を最適化することを含むことができる。塩濃度は、最適なタンパク質安定性のために選択することができる。適切な範囲の塩濃度はタンパク質を安定化し、より望ましい肉質の質感にも寄与する。例えば、培地の塩含量は、洗浄培地及び／又は濃縮培地中のナトリウムカチオン（Ｎａ＋）及び／又は塩化物アニオン（Ｃｌ－）の量を増加させることによって変更することができる。洗浄培地及び濃縮培地中の塩含有量は、最終的な細胞ベースの肉製品において所望の比率を達成するように比例させることができる。例えば、適切な塩濃度に達するための方法は、Ｎａ＋又はＣｌ－の濃度の洗浄及び／又は濃縮培地を含み、これは、従来の肉の範囲内にあるか、又は少なくともより肯定的な感覚経験をもたらす最終生成物中のＮａ＋又はＣｌ－値をもたらす。細胞へのＮａＣｌの吸収を最大にするために露光を増加させるために、より高い洗浄培地／濃縮培地対細胞比を使用することができる。さらに、撹拌は、吸収を増加させることができる。
【０１１０】

さらに、洗浄培地及び／又は濃縮培地のカリウム含量は、媒体中のカリウムカチオン（Ｋ＋）の量を増加又は減少させることによって変更することができる。細胞ベースの肉製品中のＮａ＋及びＣｌ含量を調整するための方法と同様である。特に、洗浄培地及び濃縮培地中のカチオンは、最終生成物中の所望の比を達成するように配合される。再度、吸収を最大にするために露光を増加させるために、より高い洗浄培地／濃縮培地対細胞比又は撹拌を使用することができる。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、洗浄培地及び／又は濃縮培地が細胞種に基づいて特定される。例えば、培地は牛肉、鶏肉、アヒル、豚肉、魚類、及び他の種に対応する異なる感覚品質を維持するために、キレート剤、着色剤、香料、及び抗酸化剤を含むことができる。濃縮培地はまた、細胞ベースの肉製品の全体的な多量栄養素含有量（例えば、タンパク質、脂肪、水分、炭水化物など）及びｐＨを調整して、従来の肉の多量栄養素含有量及びｐＨを模倣することができる。

【０１１２】

前述のように、場合によっては、開示された方法が、一連の培地及び緩衝液を流して、増殖細胞塊の感覚的側面及び栄養組成を改善する。いくつかの実施形態では、記載される方法が細胞塊内の細胞間空間を洗浄し、栄養素を添加するために使用される。さらに、いくつかの実施態様では、開示される方法が、細胞塊の細胞内の細胞内空間における膜透過性溶質の濃度を変化させるために交換培地を使用する。１つ又は複数の実施形態によれば、図６及び対応する段落は、細胞内の溶質を除去及び／又は添加するために交換培地を利用することを説明する。

【０１１３】

いくつかの例では、開示される方法が様々な濃度の溶質及び栄養素を有する交換培地を流して、個々の細胞内及び／又は細胞外へのそのような溶質及び栄養素の拡散を刺激することを含む。拡散において、粒子は、平衡に達するまで、より高い濃度の領域からより低い濃度の領域に移動する。高い粒子濃度で培地を交換すると、細胞は粒子を取り込む。細胞と比較してより低い粒子濃度を有する交換培地は、膜透過性粒子を細胞から放出させる。そのような交換培地を使用することによって、開示される方法は、細胞内の様々な溶質及び栄養素の濃度を変化させることができる。細胞内の粒子の濃度を変化させることに加えて、交換培地を使用して、細胞の表面から粒子を洗い流すか、又は細胞の表面に粒子を付着させることもできる。

【０１１４】

図６は、本開示の１つ又は複数の実施形態による、例示的な一連の交換培地を図示する。概略として、細胞は、細胞培養培地内で増殖される。細胞培養培地を除去し、第１の交換培地を細胞に添加する。いくつかの例では、第１の交換培地が細胞培養培地に対して低張性である。より具体的には、第１の交換培地が細胞培養培地と比較してより低い濃度の溶質を含む。第２の交換培地を細胞に添加する。第２の交換培地は、高張性であってもよく、細胞内に経時的に拡散するより高い濃度の溶質を含んでもよい。

【０１１５】

図６に示されるように、細胞は、細胞培養培地中で増殖される。例えば、細胞６０２ａは、接着細胞又は懸濁液中で増殖細胞を表す。いずれの場合も、細胞６０２ａは、細胞培養培地６０４と接触して成長する。前述のように、細胞培養培地６０４は、細胞増殖を刺激する様々な溶質又は構成要素を含む。細胞培養培地６０４内のいくつかの膜透過性溶質は、細胞６０２ａに入って平衡に達する。上述のように、これらの膜透過性溶質のいくつかは細胞増殖を刺激するが、細胞の感覚的側面又は栄養にも悪影響を及ぼす。開示される方法は、細胞６０２ａ内から望ましくない膜透過性溶質を除去するステップを含んでもよい。

【０１１６】

図６にさらに示されるように、開示される方法は、第１の交換培地６０６で細胞を洗い流すことを含み得る。いくつかの実施形態では、第１の交換培地６０６が細胞培養培地に

対して低張性である。したがって、いくつかの実施態様では、第１の交換培地が細胞培養培地と比較してより低い濃度の溶質を含む。経時的に、膜透過性溶質は細胞６０２ｂ内の細胞内空間から細胞６０２ｃの外部に移動し、平衡に達する。図示のように、細胞６０２ｂは、膜透過性溶質６０８を含む。いくつかの例では、膜透過性溶質６０８が細胞増殖段階中に拡散によって細胞に入った溶質を含む。膜透過性溶質６０８は、望ましくない濃度の望ましくない細胞培養培地成分又は細胞培養培地成分、例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、トレオニン、メチオニン、イソロイシン、コリン、アンモニウムイオン、塩などを含み得る。

【０１１７】

第１の交換培地６０６での洗浄の間、膜透過性溶質６０８の少なくとも一部は、第１の交換培地６０６との平衡に達するために細胞を離れる。図６に示されるように、細胞６０２ｃは、細胞６０２ｂ及び細胞培養培地６０４に対して、より低い濃度の膜透過性溶質６０８を有する。いくつかの例では、第１の交換培地６０６が細胞に対する浸透圧ストレスを低減するための異なる成分を含む。

【０１１８】

いくつかの例では、第１の交換培地が細胞塊内の細胞に対する浸透圧ストレスを低減するために、減少する溶質勾配を含む。より具体的には、溶質勾配の減少が細胞培養培地６０４の溶質濃度と同様の溶質濃度で開始することができる。溶質濃度は、細胞の浸透圧ショックを最小限に抑えるために、経時的に減少する。溶質濃度は、目標濃度に達するまで徐々に減少する。いくつかの実施態様では、開示された方法が溶質濃度を低下させながら、一連の中間の第１の交換培地で細胞を洗浄することを含む。

【０１１９】

図６にさらに示されるように、開示される方法は、第２の交換培地６１０を利用することができる。いくつかの例では、第２の交換培地が第１の交換培地に対して高張性である。他の例では、第２の交換培地が細胞培養培地に対して高張性である。いくつかの実装形態では、第２の交換培地６１０が、細胞内への拡散のための栄養素又は他の溶質を含む膜透過性溶質を含む。図６は、第２の交換培地６１０にさらされた細胞６０２ｄを示す。経時的に、第２の交換培地６１０からの栄養素６１２は、拡散によって細胞６０２ｅに入る。栄養素６１２は、膜透過性物質又は膜不透過性物質を含んでもよい。いくつかの例では、栄養素６１２がビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、タンパク質、炭水化物、又は脂肪を含む。さらに、いくつかの例では、栄養素６１２の少なくとも一部が、細胞６０２ｅの外部表面に接着する。

【０１２０】

いくつかの例では、浸透圧ストレスから細胞塊中の細胞を保護するために、開示される方法は増加する溶質勾配を利用することによって、第２の交換培地６１０で細胞塊を洗浄することを含む。特に、第２の交換培地６１０は溶質のより低い濃度を有する溶液から、溶質のより高い濃度を有する溶液に移行する。例えば、溶質の濃度がより低い溶液は、前の溶液（例えば、第１の交換培地６０６又は細胞培養培地６０４）の溶質濃度と同様の溶質濃度を有することができる。溶質濃度を増加させた一連の第２の交換培地を、目標の第２の溶質濃度まで添加する。いくつかの例では、開示された方法が、一連の中間の第２の交換培地で、徐々に高い溶質濃度で、細胞塊を洗浄する。

【０１２１】

開示される方法は細胞上の交換培地の流れをいつ停止するかを決定するために、異なる方法を利用し得る。例えば、開示された方法は、第１の交換培地（及び／又は減少する溶質勾配）を、洗浄時間の間、細胞塊にわたって流すことができる。第１の交換培地は洗浄期間後に除去され、第２の交換培地は細胞に添加される。第２の交換培地（及び／又は増加する溶質勾配）は、同じ洗浄時間の間、細胞上に流され得る。いくつかの例では、第２の交換培地が異なる第２の洗浄期間の間、細胞上に流される。

【０１２２】

追加的に、又は代替的に、開示された方法は、流出物組成に基づいて交換培地間を移行

させることを含む。特に、流出物の組成は一般に、細胞の中又は外に通過した溶質を示す。例えば、最初に第１の交換培地に曝露された細胞は、より大量の溶質を第１の交換培地に排出することができる。この初期曝露からの流出物は、より高い濃度の溶質を有し得る。第１の交換培地は、流出液組成物が第１の交換培地の組成物と実質的に同様になるまで、細胞上に流すことができる。開示される方法は、第１の流出物が第１の交換培地の組成物と実質的に類似するまで、第１の交換培地を流すことを含んでもよい。同様に、開示された方法は第２の流出液が第２の交換培地と実質的に同様の組成を有するとき、第２の交換培地の流れを停止することができる。

【０１２３】

いくつかの実装形態では、開示される方法が単一の交換培地を使用することを含む。特に、交換培地は、低濃度の望ましくない細胞透過性溶質及び高濃度の栄養素の両方を含むことができる。低濃度の望ましくない細胞透過性溶質は溶質を細胞外に拡散させ、一方、高濃度の栄養素は同時に栄養素を細胞内に拡散させる。第１の交換培地及び第２の交換培地と同様に、開示される方法は、細胞培養培地と同様の組成物から標的組成物にゆっくりと移行する単一の勾配交換培地を利用し得る。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、開示される方法が洗浄培地及び濃縮培地を利用することに加えて、交換培地で細胞を洗浄することを含む。例えば、開示される方法は、洗浄培地、濃縮培地、第１の交換培地、及び第２の交換培地で細胞を洗浄することを含み得る。別の実施形態では、洗浄培地及び濃縮培地がそれぞれ、第１の交換培地及び第２の交換培地を含む。より具体的には、洗浄培地が細胞内から望ましくない溶質を引き出すために、低濃度の微粒子を含んでもよい。濃縮培地は、細胞に入る高濃度の膜透過性栄養素を含有する可能性がある。

【０１２５】

図１～６、対応する本文、及び実施例は、１つ又は複数の実施形態による、増殖細胞塊の洗浄及び濃縮に関するいくつかの異なるシステム、方法、技術、構成要素、及び／又はデバイスを提供する。上記の説明に加えて、１つ又は複数の実施形態は、特定の結果を達成するための動作を含むフローチャートに関して説明することもできる。図７～図８は、そのような動作のフローチャートを示す。本明細書に記載される動作は、互いに並行して、又は同じもしくは同様の動作の異なるインスタンスと並行して、繰り返され得るか、又は実行され得る。

【０１２６】

図７は、一連の動作７００のフローチャートを示す。概略として、一連の動作７００は、細胞培養培地中で細胞塊を増殖させる動作７０２と、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去する動作７０４と、洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄する動作７０６と、濃縮培地で増殖細胞塊を洗浄する動作７０８とを含む。

【０１２７】

一連の動作７００は、細胞培養培地中で細胞塊を増殖させる動作７０２を含む。

【０１２８】

図７に示すように、一連の動作７００は、増殖細胞塊を細胞培養培地から除去する動作７０４を含む。特に、動作７０４は、細胞培養培地から増殖細胞塊の少なくとも一部を除去することを含む。いくつかの実施形態では、動作７０４が閾値増殖段階を完了する増殖細胞塊に基づいて、細胞培養培地から増殖細胞塊の少なくとも一部を除去することをさらに含む。いくつかの実施形態では、閾値増殖段階は、増殖細胞塊が１ミリリットル当たり３００万細胞の生存細胞密度又は１％～２５％の充填細胞体積のうちの少なくとも１つに達したときに完了する。さらに、いくつかの実施形態では、動作７０４が、増殖細胞塊を外因性調節因子に曝露することによって、閾値増殖段階の完了を刺激することをさらに含む。

【０１２９】

一連の動作７００は、増殖細胞塊を洗浄培地で洗浄する動作７０６をさらに含む。特に

、動作７０６は、残りの細胞培養培地を洗い流すために、洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄することを含む。いくつかの実施形態では、洗浄培地が増殖細胞塊を刺激して増殖させるための増殖因子を含まない。さらに、いくつかの実施形態では、動作７０６が増殖細胞塊及び洗浄培地の両方を撹拌すること、増殖細胞塊及び洗浄培地をポンプを用いて循環させること、ならびに増殖細胞塊及び洗浄培地をガスを用いて均質化することによって、増殖細胞塊を洗浄培地で洗浄することをさらに含む。いくつかの実施形態では、増殖細胞塊を洗浄培地で洗浄することは、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流すことと、濃縮培地の濃度を経時的に増加させることを含む中間媒体を流すこととを含む。いくつかの実施形態では、増殖細胞塊を洗浄することは、増殖細胞塊の上に洗浄培地を流すことと、洗浄培地及び増殖細胞塊の両方を撹拌することとをさらに含む。いくつかの実施形態では、洗浄培地が－５Ｃ～４５Ｃを含む温度である。

【０１３０】

図７に示す一連の動作７００は、増殖細胞塊を濃縮培地で洗浄する動作７０８をさらに含む。特に、動作７０８は、栄養素を含む濃縮培地で増殖細胞塊を洗浄することを含む。いくつかの実施形態では、濃縮培地が、増殖細胞塊を刺激して増殖させるための増殖因子を含まない。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、一連の動作７００が洗浄された増殖細胞塊を乾燥させる追加の動作を含む。

【０１３２】

図８は、一連の動作８００を示す。概略として、一連の動作８００は、培養培地中で細胞塊を増殖させる動作８０２と、培養培地から増殖細胞塊を除去する動作８０４と、勾配洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄する動作８０６とを含む。

【０１３３】

一連の動作８００は、培養培地中で細胞塊を増殖させる動作８０２を含む。特に、動作８０２は、細胞培養培地中で細胞塊を増殖させることを含む。

【０１３４】

図８に示すように、一連の動作８００は、培養培地から増殖細胞塊を除去する動作８０４を含む。動作８０４は、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去することを含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去することは、遠心分離を介して細胞培養培地から増殖細胞塊を分離することを含む。

【０１３５】

図８にさらに示されるように、一連の動作８００は、勾配洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄する動作８０６を含む。動作８０６は、経時的に洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を増加させることによって、勾配洗浄培地で増殖細胞塊を洗浄することを含む。いくつかの実施形態では、濃縮培地がビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、又は脂肪のうちの少なくとも１つを含む栄養素を含む。さらに、いくつかの実施形態では、栄養素が、タンパク質、脂肪、水分、又は炭水化物のうちの少なくとも１つを含む多量栄養素を含む。いくつかの実施形態では、濃縮培地が増殖細胞塊のｐＨを変更させる。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、一連の動作８００が、細胞培養培地から増殖細胞塊を除去する前又は後に、増殖細胞塊を冷却することをさらに含む。

【０１３７】

図９は、１つ又は複数の実施形態による、第１及び第２の交換培地で細胞塊を洗浄するための一連の動作９００を示す。特に、一連の動作９００が細胞培養培地中で細胞塊を増殖させる動作９０２を含む。

【０１３８】

図９は、第１の交換培地で細胞塊を洗浄する動作９０４をさらに示す。いくつかの実施形態では、細胞塊を第１の交換培地で洗い流すことにより、第１の組の膜透過性溶質が細胞塊中の細胞の細胞内空間から拡散する。いくつかの例では、第１の交換培地が細胞培養

培地に対して低張性である。いくつかの実施態様では、第１の交換培地が細胞培養培地と比較してより低い濃度の膜透過性溶質を有する。さらに、いくつかの例では、第１の交換培地が減少する溶質勾配を含み、第１の交換培地はより高い濃度の溶質を有する溶液からより低い濃度の溶質を有する溶液に遷移する。加えて、いくつかの場合において、細胞塊を横切る減少する溶質勾配を含む第１の交換培地を流すことは、溶質濃度の漸進的変化を提供し、それによって、細胞塊の細胞に対する浸透圧ストレスが低減される。いくつかの実施態様では、溶質勾配の減少が、細胞培養培地の溶質濃度と実質的に同様の溶質濃度で開始する。

【０１３９】

一連の動作９００は、細胞塊を第２の交換培地で洗い流す動作９０６を含む。いくつかの実施形態では、細胞塊を第２の交換培地で洗い流すことにより、第２の組の膜透過性溶質を細胞の細胞内空間に拡散させる。いくつかの実施形態では、第２の交換培地が第１の交換培地に対して高張性である。いくつかの例では、第２の交換培地が第１の交換培地と比較してより高い濃度の膜透過性溶質を有する。さらに、第２の交換培地は増加する溶質勾配を含むことができ、第２の交換培地は、より低い濃度の溶質を有する溶液からより高い濃度の溶質を有する溶液に遷移する。さらに、特定の実施形態では、増加する溶質勾配を含む第２の交換培地を細胞塊にわたって流すことは、溶質濃度の漸進的変化を提供し、それによって、細胞塊の細胞に対する浸透圧ストレスが低減される。さらに、場合によっては、溶質勾配の増加が、第１の交換培地の溶質濃度と実質的に同様の溶質濃度で開始する。特定の実施形態では、溶質勾配の増加が栄養素の濃度の増加を含む。いくつかの実施形態では、栄養素の少なくとも一部が細胞塊の細胞内に拡散し、栄養素の少なくとも第２の部分は細胞の外部表面に接着する。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、一連の動作９００が、第１の流出物が第１の交換培地と実質的に同様の組成を有するまで、細胞塊を第１の交換培地で洗い流す動作を含む。いくつかの例では、一連の動作９００が、第２の流出液が第２の交換培地と実質的に同様の組成を有するまで、細胞塊を第２の交換培地で洗い流す動作を含む。さらに、いくつかの例では、一連の動作９００が細胞塊を洗浄期間にわたって洗浄することを含む。

【０１４１】

図７～図９に示す一連の動作に加えて、又はその代わりに、本開示は、追加の動作のセットを含む。いくつかの実施態様では、追加の動作セットが、培養肉製品を濃縮するための方法を含み、この方法は細胞培養培地中で細胞塊を増殖させること；増殖細胞塊を細胞培養培地から除去すること；及び、洗浄培地の濃度を低下させ、濃縮培地の濃度を経時的に増加させることによって、増殖細胞塊を勾配洗浄培地で洗浄することを含む。いくつかの実施形態では、濃縮培地がビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、タンパク質、炭水化物、又は脂肪のうちの少なくとも１つを含む栄養素を含む。

【０１４２】

さらに、図７～図９に示される一連の動作に加えて、又はその代わりに、本開示は、培養肉調製のための細胞塊を仕上げるための装置を含む。いくつかの実装形態では、装置が細胞培養培地中で細胞塊を増殖させるための培養タンクと、細胞培養培地、洗浄培地、又は濃縮培地のうちの少なくとも１つから増殖細胞塊を除去するための分離器と、増殖細胞塊を貯蔵し、洗浄培地又は濃縮培地のうちの少なくとも１つを増殖細胞塊の上に流すための洗浄タンクとを備える。いくつかの実装形態では、分離器が遠心分離機又はフィルタのうちの少なくとも１つを備える。いくつかの例では、装置が増殖細胞塊をその最適な成長温度未満に冷却するための熱交換器をさらに備える。いくつかの実施形態では、装置が増殖細胞塊と、細胞培養培地、洗浄培地、又は濃縮培地のうちの少なくとも１つとを撹拌するための撹拌機をさらに含む。

【０１４３】

慣例に従って、図面に示される様々な特徴は、一定の縮尺で描かれていない場合がある。本開示で提示される例示は任意の特定の装置（たとえば、デバイス、システムなど）又

は方法の実際の図であることを意味するものではなく、本開示の様々な実施形態を説明するために使用される理想化された表現にすぎない。したがって、様々な特徴の寸法は、明確にするために任意に拡大又は縮小され得る。加えて、図面のいくつかは、明確にするために簡略化され得る。したがって、図面は所与の装置（たとえば、デバイス）の構成要素のすべて、又は特定の方法のすべての動作を描写しない場合がある。

【０１４４】

本明細書及び特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本体）で使用される用語は一般に、「開いた」用語として意図される（例えば、「含む」という用語は「含むが、限定されない」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む」という用語は「含むが、限定されない」などと解釈されるべきである）。

【０１４５】

加えて、導入されたクレームの特定の数が意図される場合、そのような意図は、クレームにおいて明示的に列挙され、そのような列挙がない場合、そのような意図は存在しない。例えば、理解を助けるために、以下の添付の特許請求の範囲は、特許請求の範囲の記載を導入するための導入句「少なくとも１つ」及び「１つ又は複数」の使用を含むことができる。しかしながら、そのような語句の使用は不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」による請求項の引用の導入が同じ請求項が導入語句「１つ以上」又は「少なくとも１つ」及び「ａ」又は「ａｎ」などの不定冠詞（例えば、「ａ」及び／又は「ａｎ」は「少なくとも１つ」又は「１つ以上」を意味すると解釈されるべきである）を含む場合であっても、そのような引用を含むいずれかの特定の請求項がそのような引用を１つのみ含む実施形態に限定することを意味すると解釈されるべきではなく、同じことが、請求項の引用を導入するために使用される確定冠詞の使用にも当てはまる。

【０１４６】

加えて、導入されたクレームの具体的な数が明示的に列挙されたとしても、当業者はそのような列挙が少なくとも列挙された数を意味すると解釈されるべきであることを認識するのであろう（例えば、他の修飾語、手段少なくとも２つの列挙、又は２つ以上の列挙を伴わない、「２つの列挙」の素の列挙）。さらに、「Ａ、Ｂ、及びＣなどのうちの少なくとも１つ」又は「Ａ、Ｂ、及びＣなどのうちの１つ又は複数」に類似する慣例が使用される場合、一般に、そのような構成はＡのみ、Ｂのみ、Ｃのみ、ＡとＢとが一緒に、ＡとＣとが一緒に、ＢとＣとが一緒に、又はＡ、Ｂ、及びＣとが一緒になどを含むことが意図される。例えば、用語「及び／又は」の使用は、このように解釈されることが意図される。

【０１４７】

さらに、説明、特許請求の範囲、又は図面に関わらず、２つ以上の代替用語を提示する任意の選言語又は句は、用語のうちの１つ、用語のうちのいずれか、又は両方の用語を含む可能性を企図するものと理解されたい。例えば、語句「Ａ又はＢ」は、「Ａ」又は「Ｂ」又は「Ａ及びＢ」の可能性を含むと理解されるべきである。

【０１４８】

しかしながら、そのような語句の使用は不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」による請求項の引用の導入が同じ請求項が導入語句「１つ以上」又は「少なくとも１つ」及び「ａ」又は「ａｎ」などの不定冠詞（例えば、「ａ」及び／又は「ａｎ」は「少なくとも１つ」又は「１つ以上」を意味すると解釈されるべきである）を含む場合であっても、そのような引用を含むいずれかの特定の請求項がそのような引用を１つのみ含む実施形態に限定することを意味すると解釈されるべきではなく、同じことが、請求項の引用を導入するために使用される確定冠詞の使用にも当てはまる。

【０１４９】

加えて、用語「第１」、「第２」、「第３」などの使用は、特定の順序又は数の要素を意味するために本明細書で必ずしも使用されない。一般に、用語「第１の」、「第２の」、「第３の」などは、異なる要素を一般識別子として区別するために使用される。「第１の」、「第２の」、「第３の」などの用語が特定の順序を意味することを示していない場

合、これらの用語は、特定の順序を意味すると理解されるべきではない。さらに、「第１の」、「第２の」、「第３の」などの用語が特定の個数の要素を意味することを示すことがないが、これらの用語は特定の個数の要素を意味すると理解されるべきではない。たとえば、第１のウィジェットは第１の側を有するものとして説明され得、第２のウィジェットは第２の側を有するものとして説明され得る。第２のウィジェットに関する用語「第２の側」の使用は、第２のウィジェットのそのような側を第１のウィジェットの「第１の側」から区別することであってもよく、第２のウィジェットが２つの側を有することを意味するものではない。

【０１５０】

本明細書に列挙されるすべての例及び条件付き言語は本発明及び本発明者によって当該技術分野を促進するために寄与される概念を読者が理解するのを助けるための教育的目的を意図しており、そのような具体的に列挙された例及び条件に限定されないと解釈されるべきである。本開示の実施形態を詳細に説明してきたが、本開示の趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な変更、置換、及び変更を行うことができることを理解されたい。

【０１５１】

本発明の思想及び基本的特徴から逸脱することなく、他の特定の形で本発明を具体化することができる。実際、記載された実施形態は、全ての点において、例示的なものに過ぎず、限定的なものではないと考えられるべきである。たとえば、本明細書で説明する方法はより少ない又はより多いステップ／動作で実行され得るか、又はステップ／動作は異なる順序で実行され得る。加えて、本明細書に記載されるステップ／動作は、同じ又は同様のステップ／動作の異なるインスタンスに対して、互いに並行して、又は並行して、繰り返されるか、又は実行され得る。したがって、本発明の範囲は、前述の説明によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示される。特許請求の範囲の均等物の意味及び範囲内に入るすべての変更は、それらの範囲内に包含されるべきである。

【図面】

【図１】

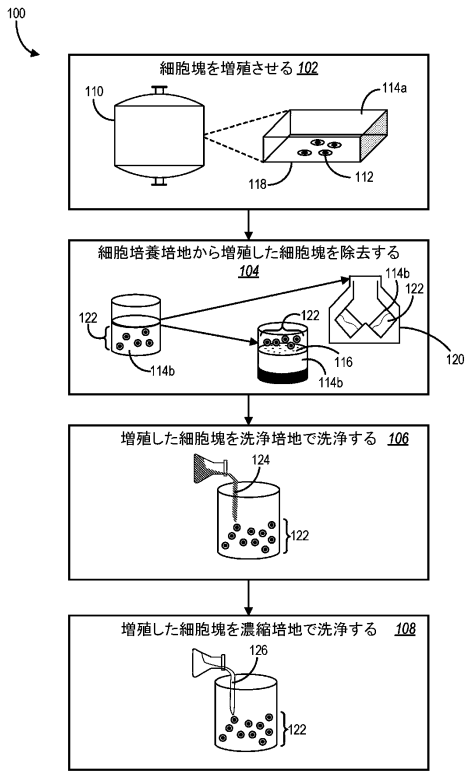


Fig. 1

【図２】

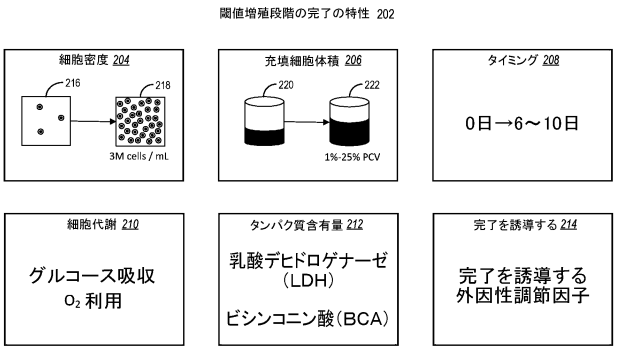


Fig. 2

【図３】

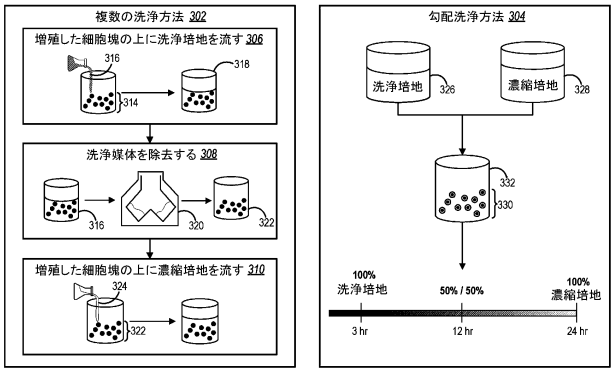


Fig. 3

【図４】

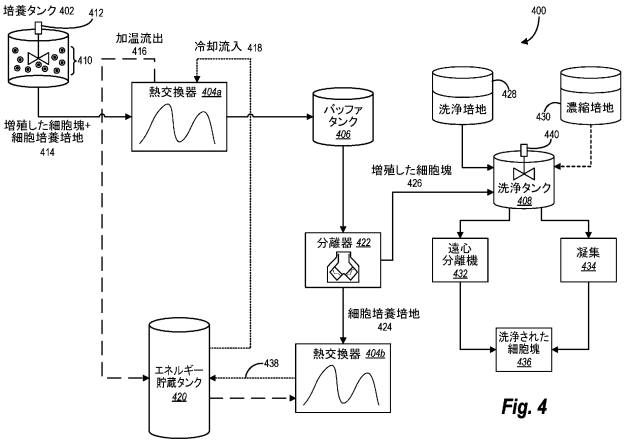


Fig. 4

【図５】



Fig. 5

【図６】

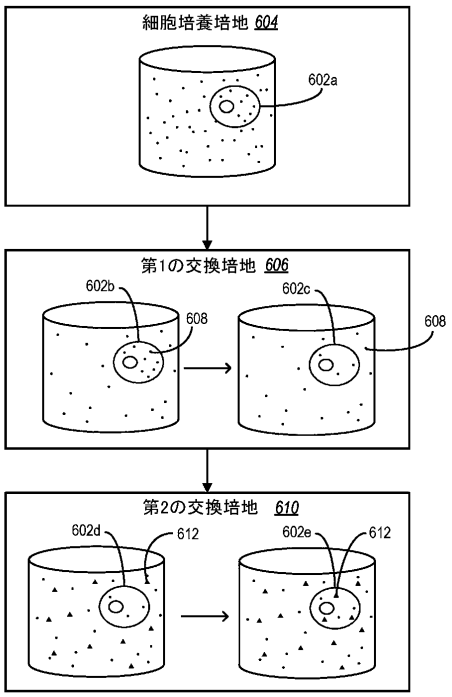


Fig. 6

【図７】

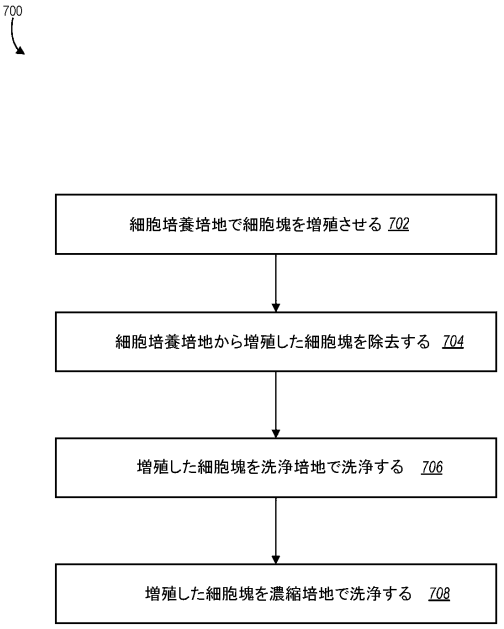


Fig. 7

【図８】

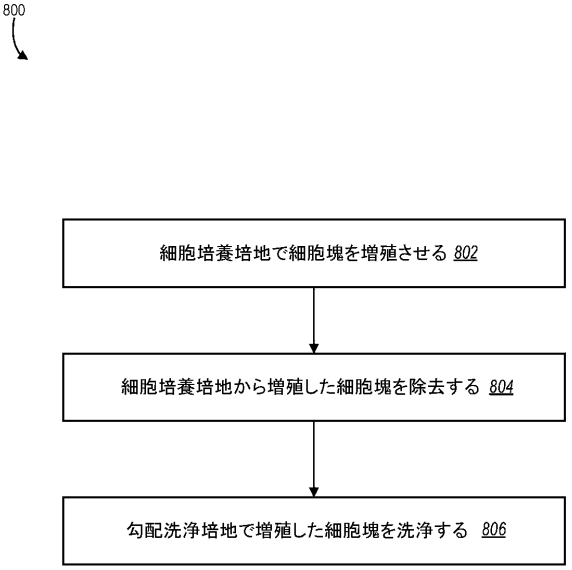


Fig. 8

【図９】

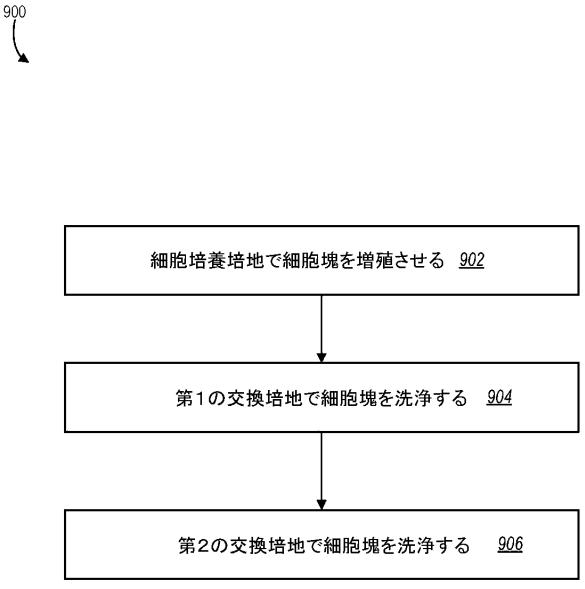


Fig. 9

【手続補正書】
【提出日】令和6年9月17日(2024.9.17)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
培養肉製品を濃縮するための方法であって、
細胞培養培地中で細胞塊を増殖させることと、
前記増殖した細胞塊の少なくとも一部を前記細胞培養培地から除去すること、
残りの細胞培養培地を洗い流すために、前記増殖した細胞塊を洗浄培地で洗浄することと、
栄養素を含む濃縮培地で前記増殖した細胞塊を洗浄することと、を含む、
方法。
【請求項２】
前記洗浄培地及び前記濃縮培地は、前記増殖した細胞塊を刺激して増殖させるための増殖因子を含まない、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記増殖した細胞塊を、
前記増殖した細胞塊と前記洗浄培地の両方を撹拌することと、
前記増殖した細胞塊及び前記洗浄培地をポンプを用いて循環させることと、
前記増殖した細胞塊及び前記洗浄培地をガスを用いて均質化することと、によって前記洗浄培地で洗浄することを更に含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記洗浄培地で前記増殖した細胞塊を洗浄することは、前記増殖した細胞塊の上に前記洗浄培地を流すことと、前記濃縮培地の濃度を経時的に増加させることを含む中間培地を流すこととを含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記増殖した細胞塊が閾値増殖段階を完了したことに基づいて、前記細胞培養培地から前記増殖した細胞塊の少なくとも一部を除去することを更に含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記閾値増殖段階は、前記増殖した細胞塊が１ミリリットル当たり３００万細胞の生存細胞密度又は１％～２５％の充填細胞体積のうちの少なくとも１つに達した場合に完了する、
請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記増殖した細胞塊を外因性調節因子に曝露することによって、前記閾値増殖段階の前記完了を刺激することを更に含む、
請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記増殖した細胞塊を洗浄することは、前記増殖した細胞塊の上に前記洗浄培地を流すことと、前記洗浄培地及び前記増殖した細胞塊の両方を撹拌することを更に含む、
請求項１に記載の方法。
【請求項９】

前記洗浄培地は、－５℃～４５℃の温度である、
請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
培養肉製品を濃縮するための方法であって、
細胞培養培地中で細胞塊を増殖させることと、
前記細胞培養培地から前記増殖した細胞塊を除去することと、
経時的に洗浄培地の濃度を減少させ、濃縮培地の濃度を増加させることによって、勾配洗浄培地で前記増殖した細胞塊を洗浄することと、を含む、
方法。
【請求項１１】
前記濃縮培地は、ビタミン、アミノ酸、抗酸化剤、タンパク質、炭水化物、又は脂肪のうちの少なくとも１つを含む栄養素を含む、
請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
細胞ベースの可食性食品を濃縮するための方法であって、
細胞培養培地中で細胞塊を増殖させることと、
前記細胞塊を第１の交換培地で洗浄することと、
前記細胞塊を第２の交換培地で洗浄することと、を含む、
方法。
【請求項１３】
前記第１の交換培地で前記細胞塊を洗浄することは、第１の組の膜透過性溶質を前記細胞塊の細胞の細胞内空間から拡散させ、
前記第２の交換培地で前記細胞塊を洗浄することは、第２の組の膜透過性溶質を前記細胞の前記細胞内空間に拡散させる、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記第１の交換培地は、前記細胞培養培地に対して低張性である、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１５】
前記第１の交換培地が減少する溶質勾配を含み、前記第１の交換培地が、より高い濃度の溶質を有する溶液からより低い濃度の溶質を有する溶液に遷移する、
請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記細胞塊にわたって前記減少する溶質勾配を含む前記第１の交換培地を流すことが、溶質濃度の漸進的変化を提供し、それによって、前記細胞塊の細胞に対する浸透圧ストレスが減少する、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記溶質勾配の減少は、前記細胞培養培地の溶質濃度と実質的に同様の溶質濃度で開始する、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
前記第２の交換培地は、前記第１の交換培地に対して高張性である、
請求項１２に記載の方法。
【請求項１９】
前記第２の交換培地は増加する溶質勾配を含み、前記第２の交換培地は、より低い濃度の溶質を有する溶液からより高い濃度の溶質を有する溶液に遷移する、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２０】
前記増加する溶質勾配を含む前記第２の交換培地を前記細胞塊にわたって流すことが、

溶質濃度の漸進的変化を提供し、それによって、前記細胞塊の細胞に対する浸透圧ストレスが低減される、
請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記増加する溶質勾配が、前記第１の交換培地の溶質濃度と実質的に同様の溶質濃度で開始する、
請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
前記増加する溶質勾配が、栄養素の濃度を増加することを含む、
請求項１９に記載の方法。
【請求項２３】
栄養素の少なくとも一部は前記細胞塊の細胞内に拡散し、
前記栄養素の少なくとも第２の部分は、前記細胞の外部表面に接着する、
請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
第１の流出液が前記第１の交換培地と実質的に同様の組成を有するまで、前記第１の交換培地で前記細胞塊を洗浄することを更に含む、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２５】
第２の流出液が前記第２の交換培地と実質的に同様の組成を有するまで、前記第２の交換培地で前記細胞塊を洗浄することを更に含む、
請求項１２に記載の方法。
【請求項２６】
洗浄時間の間、前記細胞塊を洗浄することを更に含む、
請求項１２に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 5/077, A23L 13/00 (2023.01)
ADD. C12N 5/10, A23L 13/60 (2023.01)

CPC - INV. C12N 5/0658
ADD. A23V 2002/00

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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2020/222239 A1 (ALEPH FARMS LTD.) 05 November 2020 (05.11.2020) pg 4, ln 7-13; pg 6, ln 8-11; pg 15, ln 23-24; pg 21, ln 7-8; pg 23, ln 15-17, 19-23; pg 24, ln 3-6; pg 28, ln 1-3; pg 29, ln 2, 14-15; pg 34, ln 1-6; pg 35, ln 25-26, 28-29	1-2, 4-7, 9-13, 18-26 --- 3, 8, 14-17
Y	US 2017/0015972 A1 (CARNEGIE INSTITUTE OF WASHINGTON) 19 January 2017 (19.01.2017) abstract; para [0013], [0028]	3, 8
Y	WO 2015/118153 A1 (HYGLOS INVEST GMBH) 13 August 2015 (13.08.2015) abstract; pg 6, para 6	14-17

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 May 2023	AUG 08 2023
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. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82482

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—See Supplemental Box —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-26

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/82482

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-26, directed to a method for enriching cultured meat products.

Group II, claims 27-30, directed to an apparatus for finishing a cell mass for cultured meat preparation.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a method for enriching cultured meat products, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of an apparatus for finishing a cell mass for cultured meat preparation, that is not required by Group I.

Common Technical Features:

Groups I-II share the common technical feature of:
growing a cell mass in cell culture media;
removing at least a portion of the grown cell mass from the cell culture media;
flowing at least one of the washing media or the enrichment over the grown cell mass.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is obvious over WO 2021/248141 A1 to Upside Foods, Inc. (hereinafter 'Upside'), in view of WO 2020/222239 A1 to Aleph Farms Ltd. (hereinafter 'Aleph').

Upside teaches a method for producing cultured meat products, the method comprising:
growing a cell mass in cell culture media (para [0139] - "may be used in a cell culture medium to grow cell-based chicken, beef, livestock, poultry, avian, game, or aquatic species");
removing the grown cell mass from the cell culture media (para [0051] - "the meat may be harvested by physical methods (such as scraping), enzymatic methods, and/or chemical methods. In some embodiments the meat may be harvested by any of the above-mentioned methods and subsequently rinsed with buffered solutions (or other aqueous solutions)"); and
washing the grown cell mass (para [0051] - "In some embodiments the meat may be harvested by any of the above-mentioned methods and subsequently rinsed with buffered solutions (or other aqueous solutions)"), but does not explicitly teach washing the mass with a gradient washing media by decreasing concentrations of washing media and increasing concentrations of enrichment media over time. Aleph teaches washing cultured food products with a solution to remove growth medium and using solutions to enrich the nutritional value of the food product (pg 23, ln 19-23 - "When culturing is completed the obtained food product may be washed with a water-based solution, e.g., in saline, to remove the growth medium and optionally add additives to the cultured food product, for example, additives that increase its vitamin content and/or additives that affect its appearance and/or taste"). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to wash the harvested food product mass with decreasing concentrations of washing media and increasing concentrations of enrichment media over time in order to prevent the contamination of cell culture media into the enrichment media and to enrich the nutritional content of the cultured meat product.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	ＦＩ	テーマコード（参考）
	Ｃ１２Ｎ　1/00　K	

(32)優先日　令和4年12月27日(2022.12.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ユー　８０４
(72)発明者　スー，　スティーブン　ケー．
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７１０，　バークレー，　ハインツ　アベニュー　８０４
(72)発明者　ジョンソン，　カレ　ルキヤン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７１０，　バークレー，　ハインツ　アベニュー　８０４
(72)発明者　レオン，　マシュー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７１０，　バークレー，　ハインツ　アベニュー　８０４
(72)発明者　ラッキーレディー，　ジャヤンティ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７１０，　バークレー，　ハインツ　アベニュー　８０４
(72)発明者　リース，　モーガン　ローレンス
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７１０，　バークレー，　ハインツ　アベニュー　８０４
(72)発明者　ジョスリン，　ジェシカ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４７１０，　バークレー，　ハインツ　アベニュー　８０４

Ｆターム（参考）　4B042　AC09 AD36 AP30
4B065　AA90X AC14 BB01 BB20 BB40 BD50 CA24 CA41