

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成23年4月14日(2011.4.14)

【公表番号】特表2007-525984(P2007-525984A)
 【公表日】平成19年9月13日(2007.9.13)
 【年通号数】公開・登録公報2007-035
 【出願番号】特願2007-501239(P2007-501239)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 B

【誤訳訂正書】

【提出日】平成23年2月22日(2011.2.22)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞培養物中の、凝集細胞の凝集度合いを減少させる方法であって、細胞培養培地及び凝集体を形成する固有の傾向を有する細胞の懸濁液を含む細胞培養物が、連続的灌流培養システム内に維持され、前記細胞培養培地が前記細胞培養物に添加され、前記細胞培養物が、中空繊維を含むフィルタモジュールにわたって循環され、結果として前記細胞培養物よりも低い細胞密度を有する液体の流出が生じ、前記フィルタモジュール内の流れが、フィルタモジュールの膜表面に対して接線方向の流れ及び前記膜表面に対して垂直方向の、中空繊維の内側と中空繊維の外側との間の流れである、交迎接線流であり、

培養を所望の細胞密度に達するまで継続する、方法。

【請求項2】

前記凝集細胞が哺乳類細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記凝集細胞がPER.C6(登録商標)細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

バイオマスが少なくとも1回、前記細胞培養物から除去され、かつ追加の細胞培養培地が前記細胞培養物に添加される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記バイオマスの除去が、前記細胞が定常状態に達する直前または直後に開始される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記交迎接線流が、前記連続的灌流培養システムから、前記中空繊維を含むフィルタモジュールにわたって前記細胞培養物を往復させるように動かす1つのポンプを使用し、かつ前記中空繊維の外側から液体を除去する別のポンプを使用することにより達成される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記細胞が生物学的物質を産生する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記生物学的物質が、治療的または診断的タンパク質である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物学的物質がさらに下流処理で精製される、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0002

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0002】

本発明は、細胞培養培地および細胞を含む細胞培養物の灌流培養による細胞の培養のための方法を開示するが、ここで細胞培養培地は細胞培養物に添加され、ここで細胞培養物は中空繊維を含むフィルタモジュールにわたって循環され、結果として細胞培養物よりも低い細胞密度を有する液体の流出が生じ、ここでフィルタモジュール内の流れは交互接流である。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0003

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0003】

意外にも、本発明による動物細胞、具体的には哺乳類細胞、または酵母細胞の灌流培養によって、きわめて高い生存細胞密度を得ることができるが、細胞培養物はさらにきわめて高い細胞生存率を提示することが見出されている。さらに、本発明の灌流方法が培養物における少ない細胞凝集、および可視凝集体なしに単一細胞の懸濁液である培養物さえもたらしることが見出された。これは、灌流細胞培養など低い剪断条件の使用が、一般的には細胞の解離をもたらすことがないので、驚くべき所見である。灌流細胞培養時の細胞凝集は、例えば、細胞凝集体内の細胞の代謝プロフィールにおける不均一性により、方法の制御がより困難であるため不利である。これは特に、細胞が 5 個の細胞もしくはそれ以上の凝集体を形成する場合、かつその凝集体が全体で細胞の総量の 5 % もしくはそれ以上を構成する場合に厄介である。

【誤訳訂正 4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0004

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0004】

灌流方法が米国特許第 6,544,424 号明細書に記載されている。この文書は、この方法が動物細胞の灌流培養に使用できることに言及してはいるが、本発明において見出されたきわめて高い細胞密度を開示も示唆もしていない。さらに、米国特許第 6,544,424 B1 号明細書は、灌流方法が中空繊維の膜表面上の障害物の付着および増殖を減少させることを開示しているが、細胞培養物そのものにおける細胞が凝集しないことを開示も示唆もしていない。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0005

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0005】

ボアジュ (Voisier) ら (Biotechnol. Bioeng. 82 (2003 年)、751~765 頁) は、懸濁哺乳類細胞の高密度灌流培養物におけるさまざまな

細胞保持法を検討している。検討された細胞保持系のうち、本発明のきわめて高い細胞生存率と相まってきわめて高い生存細胞密度を提供できるものはない。

【誤訳訂正 6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0006

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0006】

細胞の灌流培養は、当技術分野におけるその従来の意味を有し、すなわち、培養時に細胞が分離デバイスによって保持されることを意味するが、ここで分離前よりも低い細胞密度を有する液体の流出があり、かつ細胞培養培地の流入がある。本発明の方法においては、分離デバイスは中空繊維を含むフィルタモジュールである。

【誤訳訂正 7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0009

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0009】

中空繊維を含むフィルタモジュールは、例えば、ジェネラル・エレクトリック (General Electric) (旧アマシャム (Amersham)) から市販されている。

【誤訳訂正 8】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0010

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0010】

「フィルタモジュール内の交接続線流」により、中空繊維の膜表面と (すなわち、その接続と) 同じ方向での1つの流れがあり、中空繊維をその流れが往復し、かつ前記フィルタ表面に対して実質的に垂直の方向で別の流れがあることが意味される。接続流は、当業者に周知の手法に従って達成されうる。例えば、米国特許第6,544,424号明細書においては、交接続線流が、中空繊維を含むフィルタモジュールにわたって細胞培養物を循環させる1つのポンプを使用し、かつ細胞培養物より低い細胞密度をフィルタ分離前に有する液体を除去する別のポンプを使用することにより達成されることが記載されている。

【誤訳訂正 9】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0019

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0019】

本発明の方法はさらに、培養時、特に灌流培養時に凝集体 (いわゆる凝集細胞) を容易にかつ本質的に形成する細胞の培養に特に適している。意外にも、本発明の方法は、フィルタ膜上の凝集体除去を減少させるだけでなく、灌流培養方法時の細胞の凝集、凝集体を形成する固有の傾向を有する細胞の凝集も減少させる。本発明による凝集細胞の培養は、結果として、少なくとも5個の細胞の凝集体が最大でも細胞の総量の5%、好ましくは、最大でも4%、より好ましくは、最大でも3%、さらにより好ましくは、最大でも細胞の総量の2%を含む、培養をもたらす。特に好ましくは、本発明による凝集細胞の培養は、結果として、真の単一細胞懸濁液である培養をもたらす。

【誤訳訂正 10】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0024

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0024】

細胞培養培地の培養物への添加速度（流入量または灌流量）は、細胞の生存率および密度に影響を及ぼす。

【誤訳訂正11】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0025

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0025】

本発明の1つの実施形態においては、細胞培養培地は、以下の式1

灌流量 = $SPR \times \text{総細胞培養容積} \times \text{生存細胞密度} (1)$

（式中、前記灌流量はリットル/日で表され、SPRは比灌流量、すなわち細胞培養培地が、生存細胞/時間単位当たりで添加される培地の容積で表される細胞培養物に供給される速度であり、生存細胞密度は生存細胞/容積単位の数である）に従って計算される灌流量で添加される。生存細胞の数は、当業者によって、例えば、トリバンプルー排除法によって判定されうる。

【誤訳訂正12】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0027

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0027】

灌流量を調節する際の追加のパラメータ、例えば、培養物に供給されるグルコースの量および/または酸素濃度を考慮することは有利でありうる。例えば、PER.C6（登録商標）では、グルコース灌流量は、好ましくは、培地灌流量の一環として、3~20 mmol/L、より好ましくは、5~15 mmol/Lで選択される。

【誤訳訂正13】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0030

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0030】

本発明の別の実施形態においては、バイオマス（すなわち、細胞培養物における細胞）が細胞培養物から少なくとも1回除去され、追加の細胞培養培地が細胞培養物に添加され、バイオマス除去を相殺する。バイオマス除去は高い細胞密度をもたらさうる。バイオマスは連続的または段階的に除去されうる。

【誤訳訂正14】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0035

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0035】

追加の細胞培養培地の添加は、バイオマス除去を相殺するために行われる。追加の細胞培養培地が細胞培養物に添加される供給は、灌流供給に合流されうるが、分離供給でも添加されうる。当業者は、どのくらいの追加の細胞培養培地がバイオマス除去を相殺するために必要であるかを承知している。一般に、追加の細胞培養培地の細胞培養物への追加の

速度は、バイオマス除去速度と同じとなる。

【誤訳訂正 15】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0039

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0039】

流出における生物学的物資はさらに、いわゆる下流処理で精製されうる。下流処理は通常、さまざまな組合せおよび順序でいくつかの精製ステップを含む。下流処理における精製ステップの例は分離ステップ（例えば、親和性クロマトグラフィーおよび/またはイオン交換クロマトグラフィーによって）、生物学的物質の濃縮のためのステップ（例えば、限外ろ過またはダイアフィルトレーションによって）、緩衝剤を交換するステップおよび/またはウイルスを除去または不活性化するステップ（例えば、ウイルスろ過、pHシフト、または溶媒界面活性剤処理によって）である。

【誤訳訂正 16】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0041

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0041】

実施例 1：生物製剤の製造のためのヒト細胞系 PER.C6（登録商標）の方法最適化序論

多くの発現プラットフォームが現在、生物製剤の製造のために存在する。新しい製品の大部分は、哺乳類系を選択する必要がある、それは、これらの細胞が含有し、その他の細胞は欠いているグリコシル化機構によるところが大きい。しかし今日まで、これらの細胞の細胞量および結果として得られるこれらの細胞の生産性は、そのような製品を製造する機構を細胞が有した場合に対応する微生物系の 10 ~ 100 倍低い要因である。