

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7105694号
(P7105694)

(45)発行日 令和4年7月25日(2022.7.25)

(24)登録日 令和4年7月14日(2022.7.14)

(51)国際特許分類

| | | | | | |
|--------|----------------|-----|--------|------|---|
| C 12 N | 1/00 (2006.01) | F I | C 12 N | 1/00 | F |
| C 12 N | 5/00 (2006.01) | | C 12 N | 5/00 | |
| C 12 M | 3/00 (2006.01) | | C 12 M | 3/00 | Z |

請求項の数 15 (全29頁)

(21)出願番号 特願2018-534664(P2018-534664)
 (86)(22)出願日 平成28年12月30日(2016.12.30)
 (65)公表番号 特表2019-500046(P2019-500046)
 A)
 (43)公表日 平成31年1月10日(2019.1.10)
 (86)国際出願番号 PCT/US2016/069564
 (87)国際公開番号 WO2017/117559
 (87)国際公開日 平成29年7月6日(2017.7.6)
 審査請求日 令和1年12月17日(2019.12.17)
 (31)優先権主張番号 62/272,828
 (32)優先日 平成27年12月30日(2015.12.30)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 502221282
 ライフテクノロジーズコーポレーション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 08, カールズバッド, ニュートン
 ドライブ 5823
 (74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74)代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74)代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】層状の細胞培養粒子およびその製造方法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法であつて、
 (i) 流動床装置中の気体が移動するカラム中での懸濁に乾燥粉末を供する工程と、
 (ii) 層状のベース粒子を形成するために、工程(i)の乾燥粉末に、噴霧機を用いて
 少なくとも1種類の溶媒を導入する工程と、
 (iii) 層状のベース粒子を乾燥させる工程と
 を含み、
 ここで、

各溶媒が1つの構成要素を有するか、または各溶媒が異なる構成要素を有するか、または
 各溶媒が構成要素の混合物を有し、

反応性種および感受性種を含む複数の構成要素を有する場合、複数の溶媒を導入して
層状のベース粒子を生じるために別個に噴霧される、反応性種と感受性種とに、該構成要
素が隔離されており、かつ

該反応性種および該感受性種が互いに有害に相互作用する構成要素である、方法。

【請求項2】

細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法であつて、
 (i) 流動床装置中の気体が移動するカラム中での懸濁に乾燥粉末を供する工程と、
 (ii) ベース顆粒を形成するために、工程(i)の乾燥粉末上に、第1の噴霧機を用い
 て第1の溶媒を導入する工程と、

(i i i) 層状のベース顆粒を形成するために、工程 (i i) のベース顆粒上に、第 2 の噴霧機を用いて少なくとも 1 種類の第 2 の溶媒を導入する工程と、

(i v) 層状のベース顆粒を乾燥させる工程と

を含み、

ここで、

各溶媒が 1 つの構成要素を有するか、または各溶媒が異なる構成要素を有するか、または各溶媒が構成要素の混合物を有し、

層状のベース顆粒を生じるために別個に噴霧される、反応性種と感受性種とに、該構成要素が隔離されており、かつ

該反応性種および該感受性種が互いに有害に相互作用する構成要素である、方法。

10

【請求項 3】

前記噴霧機が、トップ型噴霧器 (top sprayer) 、ボトム型噴霧機 (bottom sprayer) および接線方向型噴霧機 (tangential sprayer) からなる群より選択される第 1 の噴霧機であり、かつ/または多層ベース粒子を形成するためにベース粒子上に複数の溶媒を噴霧する、第 2 の噴霧機をさらに含む、

請求項 1 に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 4】

前記第 1 または第 2 の噴霧機が、トップ型噴霧器、ボトム型噴霧機および接線方向型噴霧機からなる群より選択され、かつ/または

前記第 2 の噴霧機がボトム型噴霧機であり、かつ/または

20

多層ベース顆粒を形成するために、前記第 2 の噴霧機が、ベース顆粒上に複数の溶媒を噴霧する、

請求項 2 に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 5】

それぞれの噴霧工程の間に断続的な乾燥工程を伴って、前記第 2 の噴霧機が、複数の溶媒を連続して噴霧し、かつ/または

それぞれの噴霧工程の間に断続的な乾燥工程を伴わずに、前記第 2 の噴霧機が、複数の溶媒を連続して噴霧する、

請求項 2 または 4 に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

30

【請求項 6】

前記乾燥粉末が、基本培地粉末、完全培地粉末、細胞培養供給物、細胞培養補助物質、細胞培養培地もしくは供給物濃縮物、またはアミノ酸混合物であるか、または、

前記乾燥粉末が、ビタミン、塊状の無機塩および糖類からなる群より選択される、

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 7】

前記反応性種が、1 種類以上の微量元素、1 種類以上の反応性アミノ酸、1 種類以上の反応性アミノ酸、1 種類以上の金属塩、1 種類以上の酸可溶性反応性基、1 種類以上のアルコール可溶性反応性基および1 種類以上の pH 調整基からなる群より選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記感受性種が、1 種類以上のポリアミン、1 種類以上のビタミン、1 種類以上の成長因子および1 種類以上の不安定なアミノ酸からなる群より選択され、該ビタミンが、ビタミン B₁₂、ビオチン、コリン、葉酸、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、アスコルビン酸およびパラ - アミノ安息香酸 (PABA) からなる群より任意で選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記方法で使用される投入気体が約 20 ~ 30 の温度にあるか、または任意で約 25 の温度にある、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地

50

または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 10】

乾燥工程が約 50 ~ 60 の温度にある、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 11】

前記ベース粒子またはベース顆粒が、含水量が約 0.5 % ~ 10 % になるまで乾燥される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 12】

前記溶媒が反応性種を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。 10

【請求項 13】

前記溶媒が、少なくとも 1 種類の酸化防止剤をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【請求項 14】

不活性な構成要素および / または失活剤（例えば、酸化防止剤）が、感受性構成要素および / または反応性構成要素と混合されるか、あるいは不活性な構成要素および / または失活剤（例えば、酸化防止剤）が、反応性層と感受性層との間に層形成される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。 20

【請求項 15】

顆粒中の構成要素が、例えば、その化学反応性 / 化学的特性；熱による損傷もしくは放射線による損傷、または光化学的な損傷の受けやすさに従って、あるいはその溶媒溶解度などに従って、隔離されるか、またはグループ分けされる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の、細胞を培養するための層状の培地または供給物組成物を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2015年12月30日に出願された米国仮出願第 62/272,828 号の米国特許法第 119(e) 条に基づく恩典を主張する。上述の出願の内容全体が本明細書に参照により組み込まれる。 30

【0002】

発明の分野

本発明は、細胞の培養および他のこのような用途に有用な層状粒子を含む、乾燥細胞培養培地、供給物、補助物質または濃縮物に関する。本発明は、このような層状組成物を調製するためのプロセス、および安定な、例えば熱的に、光化学的に、および / または線照射に安定な細胞培養組成物を製造する方法に関する。本発明は、タンパク質およびポリペプチドを生成し、それによって細胞成長およびタンパク質力価を増加させるための、このような層状の粒子調製物の使用にも関する。 40

【発明の概要】

【0003】

本発明は、一部には、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法であって、(i) 流動床装置中の気体が移動するカラム中の懸濁に乾燥粉末を供する工程と、(ii) 層状のベース粒子を形成するために、工程 (i) の乾燥粉末に、噴霧機を用いて少なくとも 1 種類の溶媒を導入する工程と、(iii) 層状のベース粒子を乾燥させる工程とを含む、方法に関する。

【0004】

また本発明は、一部には、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法であって、(i) 流動床装置中の気体が移動するカラム中の懸濁に乾燥粉末を供する工 50

程と、(i i)ベース顆粒を形成するために、工程(i)の乾燥粉末上に、第1の噴霧機を用いて第1の溶媒を導入する工程と、(i i i)層状のベース顆粒を形成するために、工程(i i)のベース顆粒上に、第2の噴霧機を用いて少なくとも1種類の第2の溶媒を導入する工程と、(i v)層状のベース顆粒を乾燥させる工程とを含む、方法に関する。

【0005】

本発明の上述の第1の態様によれば、乾燥粉末は、基本培地粉末、完全培地粉末、細胞培養供給物、細胞培養補助物質、細胞培養培地もしくは供給物濃縮物、またはアミノ酸混合物であってもよい。

【0006】

第2の態様において、第1の噴霧機は、トップ型噴霧器(*top sprayer*)、ボトム型噴霧機(*bottom sprayer*)および接線方向型噴霧機(*tangential sprayer*)からなる群より選択されてもよい。または、第1または第2の噴霧機は、トップ型噴霧器、ボトム型噴霧機および接線方向型噴霧機からなる群より選択されてもよい。好ましい実施形態において、第2の噴霧機は、ボトム型噴霧機であってもよい。

10

【0007】

第3の態様において、それぞれ多層ベース顆粒または多層ベース粒子を形成するために、第2の噴霧機が、複数の溶媒をベース顆粒に噴霧してもよい。または、第2の噴霧機は、各噴霧工程の間に断続的な乾燥工程を伴うように、複数の溶媒を連続して噴霧してもよい。または、各噴霧工程の間に断続的な乾燥工程を伴わずに、第2の噴霧機が、複数の溶媒を連続して噴霧してもよい。

20

【0008】

第4の態様において、複数の溶媒のうちの各溶媒は、1つの構成要素を含んでいてもよい。または、同じ構成要素を含んでいてもよい。または、各溶媒は、異なる構成要素を含んでいてもよい。例えば、各溶媒は、構成要素の混合物を有していてもよい。さらなる態様において、溶媒は、反応性種を含む。別の態様において、溶媒は、感受性種を含む。

【0009】

第5の態様において、溶媒を介して噴霧される構成要素は、反応性種と感受性種とに隔離される。

【0010】

30

さらなる態様において、層状の顆粒を生じるために、反応性種および感受性種が別個に噴霧される。特定の態様において、反応性種は、1種類以上の微量元素、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の金属塩、1種類以上の酸可溶性反応性基、1種類以上のアルコール可溶性反応性基および1種類以上のpH調整基からなる群より選択されてもよい。

【0011】

別のさらなる態様において、感受性種は、1種類以上のポリアミン、1種類以上のビタミン、1種類以上の成長因子および1種類以上の不安定なアミノ酸からなる群より選択されてもよい。

【0012】

40

第6の態様において、投入気体が本方法で使用されてもよく、それは約20～30の温度であってもよい。さらなる態様において、本方法で使用される投入気体は、約25の温度であってもよい。

【0013】

第7の態様において、感受性であり得るビタミンは、ビタミンB12、ビオチン、コリン、葉酸、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、アスコルビン酸およびパラ-アミノ安息香酸(PABA)からなる群より選択される。

【0014】

第8の態様において、乾燥工程は、約50～60の温度であってもよい。

【0015】

50

第9の態様において、ベース粒子またはベース顆粒は、含水率が約0.5%~10%になるまで乾燥されてもよい。

【0016】

さらに別のさらなる態様において、溶媒は、少なくとも1種類の酸化防止剤または少なくとも1種類の中性種、またはこれらを両方ともを追加で含む。

【0017】

第10の態様において、層状のベース粒子または層状のベース顆粒は、上述の任意の方法によって得られる。

【0018】

第11の態様において、本方法は、栄養培地の層状粒子、栄養培地補助物質の層状粒子、栄養培地サブグループの層状粒子を生産することに関し、当該方法は、上述のいずれかの方法に従って層状の培地粒子を製造することを含み、ベース粒子またはベース顆粒上の少なくとも1つの層が反応性種を含み、かつ/またはベース粒子またはベース顆粒上の少なくとも1つの層が、感受性種を含む。さらなる態様において、反応性種は、1種類以上の微量元素、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の金属塩、1種類以上の酸可溶性反応性基、1種類以上のアルコール可溶性反応性基および1種類以上のpH調整基からなる群より選択されてもよい。または、感受性種は、1種類以上のポリアミン、1種類以上のビタミン、1種類以上の成長因子および1種類以上の不安定なアミノ酸からなる群より選択されてもよい。いくつかの実施形態において、乾燥粉末は、ビタミン、塊状の無機塩および糖類からなる群より選択されてもよい。

10

【0019】

第12の態様において、本方法は、上述のように製造された層状培地から再構築された液体中で細胞を培養することに関し、この方法は、(i)適切な液体またはバッファー中で層状の培地粒子を再構築する工程であって、この層状の培地粒子が、細胞培養培地、供給物、補助物質または濃縮物であってもよい、工程と、(ii)細胞の増殖にとって望ましい条件下で、再構築された液体であってもよい細胞を培養する工程とを含む。さらなる態様において、増加した量のポリペプチドを產生するために、本細胞培養を使用してもよい。なおさらなる態様において、ポリペプチドは、組換えポリペプチドであってもよい。または、層状の培地粒子から製造されていない液体培地を用いた培養と比較して、本培養によって、産物の產生が増え、細胞増殖が増える。

20

【0020】

第13の態様は、(i)上述の請求項のいずれか一項に記載の層状粒子または顆粒を含む第1の容器であって、この層状粒子または顆粒が、細胞培養培地、供給物、補助物質または濃縮物であってもよい、第1の容器と、(ii)細胞培養のために前記層状粒子または顆粒を使用するための指示書とを含む、キットを提供する。

30

【0021】

第14の態様は、上述の方法に従って層状の培地粒子から再構築された液体培地と、細胞とを含む、システムを提供する。さらなる態様において、再構築された液体培地を使用し、組換えポリペプチド、ウイルス、分泌タンパク質を产生する細胞を培養するか、または懸濁物中で細胞を培養するか、または接着し得る細胞を培養してもよい。

40

【0022】

第15の態様は、上述の細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法、または上述のキット、または上述のシステムを提供し、ここで、アミノ酸が使用され、アミノ酸が、20種類のアミノ酸、それらの塩または誘導体のうち1種類以上から選択される。さらなる態様において、アミノ酸は、グリシン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、バリン、チロシン、システインおよびリシンのうち1種類以上から選択される。

【0023】

第16の態様は、細胞を培養するために使用される上述の方法によって得られる層状粒子

50

または顆粒を提供する。さらなる態様において、細胞は、哺乳動物細胞であってもよい。特定の態様において、細胞は、C H O 細胞、B H K 細胞、H E K 細胞、2 9 3 細胞およびV E R O 細胞からなる群より選択されてもよい。別の態様において、細胞は、植物細胞、動物細胞、真核細胞、真核細胞、藻類細胞、真菌細胞および細菌細胞であってもよい。

【0024】

参照による組み込み

本明細書で述べられる全ての刊行物、特許および特許明細書は、それぞれの個々の刊行物、特許または特許明細書が具体的かつ個々に示され、参照により組み込まれるのと同程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

[本発明1001]

細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法であって、

(i) 流動床装置中の気体が移動するカラム中での懸濁に乾燥粉末を供する工程と、

(ii) 層状のベース粒子を形成するために、工程(i)の乾燥粉末に、噴霧機を用いて少なくとも1種類の溶媒を導入する工程と、

(iii) 層状のベース粒子を乾燥させる工程と

を含む、方法。

[本発明1002]

細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法であって、

(i) 流動床装置中の気体が移動するカラム中での懸濁に乾燥粉末を供する工程と、

(ii) ベース顆粒を形成するために、工程(i)の乾燥粉末上に、第1の噴霧機を用いて第1の溶媒を導入する工程と、

(iii) 層状のベース顆粒を形成するために、工程(ii)のベース顆粒上に、第2の噴霧機を用いて少なくとも1種類の第2の溶媒を導入する工程と、

(iv) 層状のベース顆粒を乾燥させる工程と

を含む、方法。

[本発明1003]

前記乾燥粉末が、基本培地粉末、完全培地粉末、細胞培養供給物、細胞培養補助物質、細胞培養培地もしくは供給物濃縮物、またはアミノ酸混合物である、本発明1001または1002の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1004]

前記第1の噴霧機が、トップ型噴霧器(t o p s p r a y e r)、ボトム型噴霧機(b o t t o m s p r a y e r)および接線方向型噴霧機(t a n g e n t i a l s p r a y e r)からなる群より選択される、本発明1001の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1005]

前記第1または第2の噴霧機が、トップ型噴霧器、ボトム型噴霧機および接線方向型噴霧機からなる群より選択される、本発明1002または1003の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1006]

前記第2の噴霧機がボトム型噴霧機である、本発明1002または1003または1005の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1007]

多層ベース顆粒を形成するために、前記第2の噴霧機が、ベース顆粒上に複数の溶媒を噴霧する、本発明1002～1003または1005～1006のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1008]

多層ベース粒子を形成するために、前記第2の噴霧機が、ベース粒子上に複数の溶媒を噴霧する、本発明1001または1003～1004のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1009]

10

20

30

40

50

それぞれの噴霧工程の間に断続的な乾燥工程を伴って、前記第2の噴霧機が、複数の溶媒を連続して噴霧する、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1010]

それぞれの噴霧工程の間に断続的な乾燥工程を伴わずに、前記第2の噴霧機が、複数の溶媒を連続して噴霧する、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1011]

複数の溶媒のうちの各溶媒が、各溶媒中に1種類の構成要素を含む、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

10

[本発明1012]

複数の溶媒のうちの各溶媒が、同じ構成要素を含む、本発明1011の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1013]

複数の溶媒のうちの各溶媒が、異なる構成要素を含む、本発明1011の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1014]

各溶媒が、構成要素の混合物を有する、本発明1001～1011および1013のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1015]

前記構成要素が、反応性種と感受性種とに隔離されている、本発明1014の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

20

[本発明1016]

層状の顆粒を生じるために、反応性種および感受性種が別個に噴霧される、本発明1015の、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1017]

前記反応性種が、1種類以上の微量元素、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の金属塩、1種類以上の酸可溶性反応性基、1種類以上のアルコール可溶性反応性基および1種類以上のpH調整基からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法。

30

[本発明1018]

前記感受性種が、1種類以上のポリアミン、1種類以上のビタミン、1種類以上の成長因子および1種類以上の不安定なアミノ酸からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記方法で使用される投入気体が約20～30℃の温度にある、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1020]

前記方法で使用される投入気体が約25℃の温度にある、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

40

[本発明1021]

ビタミンが、ビタミンB12、ビオチン、コリン、葉酸、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、アスコルビン酸およびパラ-アミノ安息香酸(PABA)からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1022]

乾燥工程が約50～60℃の温度にある、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1023]

前記ベース粒子またはベース顆粒が、含水量が約0.5%～10%になるまで乾燥される、

50

前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1024]

前記溶媒が反応性種を含む、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1025]

前記溶媒が、少なくとも1種類の酸化防止剤をさらに含む、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法。

[本発明1026]

前記本発明のいずれかにおいて得られる、層状のベース粒子または層状のベース顆粒。

[本発明1027]

前記本発明のいずれかの層状の培地粒子を製造することを含む、栄養培地の層状粒子、栄養培地補助物質の層状粒子、栄養培地サブグループの層状粒子を生産する方法であって、ベース粒子またはベース顆粒上の少なくとも1つの層が、反応性種を含み、かつ／またはベース粒子またはベース顆粒上の少なくとも1つの層が、感受性種を含む、方法。

[本発明1028]

前記反応性種が、1種類以上の微量元素、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の反応性アミノ酸、1種類以上の金属塩、1種類以上の酸可溶性反応性基、1種類以上のアルコール可溶性反応性基および1種類以上のpH調整基からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1029]

前記感受性種が、1種類以上のポリアミン、1種類以上のビタミン、1種類以上の成長因子および1種類以上の不安定なアミノ酸からなる群より選択される、本発明1027の方法。

[本発明1030]

前記乾燥粉末が、ビタミン、塊状の無機塩および糖類からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1031]

前記本発明のいずれかの層状の培地粒子から再構築された液体中で、細胞を培養する方法であって、以下の工程を含む、方法：

(i) 適切な液体またはバッファー中に層状の培地粒子を再構築する工程であって、この層状の培地粒子が、細胞培養培地、供給物、補助物質または濃縮物である、工程、および、

(ii) 前記細胞の増殖にとって望ましい条件下で、前記再構築された液体中で細胞を培養する工程。

[本発明1032]

前記培養が、増加した量のポリペプチドを産生するために使用される、本発明1031の、細胞を培養する方法。

[本発明1033]

前記ポリペプチドが組換えポリペプチドである、本発明1031～1032のいずれかの、細胞を培養する方法。

[本発明1034]

層状の培地粒子から作られていない液体培地を用いた培養と比較して、前記培養によって、産物の産生が増え、細胞増殖が増える、本発明1031～1033のいずれかの、細胞を培養する方法。

[本発明1035]

(i) 前記本発明のいずれかの層状粒子または顆粒を含む第1の容器であって、層状粒子または顆粒が、細胞培養培地、供給物、補助物質または濃縮物である、第1の容器と、

(ii) 細胞培養のために前記層状粒子または顆粒を使用するための指示書とを含む、キット。

[本発明1036]

10

20

30

40

50

前記本発明のいずれかの層状の培地粒子から再構築された液体培地と、細胞とを含む、システム。

[本発明1037]

組換えポリペプチド、ウイルス、分泌タンパク質を産生する細胞を培養するか、または懸濁物中で細胞を培養するか、または接着した細胞を培養するために、前記再構築された液体培地を使用する、本発明1036のシステム。

[本発明1038]

アミノ酸が、20種類のアミノ酸、それらの塩または誘導体のうち1種類以上から選択される、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法、または本発明1035のキット、または本発明1036～1037のいずれかのシステム

10

—

[本発明1039]

前記アミノ酸が、グリシン、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、バリン、チロシン、システインおよびリシンのうち1種類以上から選択される、前記本発明のいずれかの、細胞を培養するための培地または供給物組成物を製造する方法、または本発明1035のキット、または本発明1036～1037のいずれかのシステム。

[本発明1040]

細胞を培養するための、前記本発明のいずれかの方法から得られる層状粒子または顆粒の使用。

20

[本発明1041]

前記細胞が哺乳動物細胞である、本発明1040の使用。

[本発明1042]

前記細胞が、C H O 細胞、B H K 細胞、H E K 細胞、293細胞およびV E R O 細胞からなる群より選択される、本発明1040～1041のいずれかの使用。

[本発明1043]

前記細胞が、植物細胞、動物細胞、真核細胞、真核細胞、藻類細胞、真菌細胞および細菌細胞である、本発明1040～1041のいずれかの使用。

【図面の簡単な説明】

30

【0025】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に具体的に記載されている。本発明の特徴および利点のよりよい理解は、本発明の原理を利用する実例となる実施形態を示す下記の詳細な記載および添付の図面を参照することによって得られる。

【0026】

【図1】培養培地の層状の顆粒配合物を製造するための方法の模式図。6インチのW u r s t e r インサート、2リットルの顆粒製造機／乾燥機／コーナーを備えるG P C G 1 . 1 を用い、ボトム型噴霧コーティングを行った。ボトム型噴霧による層形成 - 層の組成は、それぞれの顆粒化ごとに変動する。

【図1A】例示的な単一層、単一成分の層状の細胞培養培地顆粒（層状顆粒プロトタイプA）の模式図。

40

【図1B】層状の細胞培養培地顆粒の各層における、例示的な多層、単一成分の細胞培養培地（層状顆粒プロトタイプB）の模式図。

【図2A】層状の細胞培養培地顆粒プロトタイプA（単一層、単一成分）のS E M 画像。

【図2B】層状の細胞培養培地顆粒プロトタイプB（多層、単一成分）のS E M 画像。

【図3A】プロトタイプAの層状供給物の細胞生存率アッセイ。

【図3B】プロトタイプAの層状供給物の細胞増殖アッセイ。

【図4】細胞培養のための層状の培地／供給顆粒の生産のための例示的な方法。

【図5A】配合物1の層状の細胞培養培地顆粒の模式図。

【図5B】配合物2の層状の細胞培養培地顆粒の模式図。

50

【図 6 A】コーティングされておらず、層形成されていない顆粒の配合物 1 の粒径分析（青色の棒グラフ）およびコーティング（層形成）された顆粒の配合物 1 の粒径分析（赤色の棒グラフ）。

【図 6 B】コーティングされておらず、層形成されていない顆粒の配合物 2 の粒径分析（青色の棒グラフ）およびコーティング（層形成）された顆粒の配合物 2 の粒径分析（赤色の棒グラフ）。

【図 7 A】ボトム型噴霧コーティングの前後の配合物 1 の累積的な粒径（ふるい分け）分析。層形成工程前の顆粒化ベース粉末のふるい分けフラクション分析。コーティングされておらず、層形成されていない顆粒の粒径分析（青色の四角）およびコーティング（層形成）された顆粒の粒径分析（赤色のひし形）。

【図 7 B】ボトム型噴霧コーティングの前後の配合物 2 の累積的な粒径（ふるい分け）分析。層形成工程前の顆粒化ベース粉末のふるい分けフラクション分析。

【図 8 A】左パネル（上面図、100倍）、右パネル（断面、1500倍）の倍率での配合物 1 (F1) のコーティング（層形成）された顆粒の配合物 1 の SEM 画像。

【図 8 B】左パネル（上面図、100倍）、右パネル（断面、1500倍）の倍率での配合物 2 (F2) のコーティング（層形成）された顆粒の配合物 2 の SEM 画像。

【図 9 A】配合物 1、2、3。顆粒化ベース粉末の粒径分析。累積的なふるい分けフラクション分析。3インチのふるいを用い、3～5g の顆粒化材料を用いて、ベース粉末顆粒化のふるい分け分析を行った。

【図 9 B】配合物 1、2、3。顆粒化ベース粉末の粒径分析。3インチのふるいを用い、3～5g の顆粒化材料を用いて、ベース粉末顆粒化のふるい分け分析を行った。

【図 10 A】配合物 1、2、3。粉碎された顆粒化ベース粉末の粒径分析。顆粒化後に粉碎したベース粉末についての累積的なふるい分けフラクション分析。

【図 10 B】配合物 1、2、3。粉碎された顆粒化ベース粉末の粒径分析の棒グラフ。8インチのふるいを用い、95～105g の材料を用いて、ベース粉末（顆粒化後に粉碎）のふるい分け分析を行った。

【図 11】層状顆粒化における、放射線によって誘発される栄養物の分解。この図からわかるように、層形成戦略を、線を照射された乾燥形態の培地に適用すると（線量範囲は 20 kGy～70 kGy）、未照射 (0 kGy) の対照培地と比較して、感受性構成要素および / または反応性構成要素の安定性が向上した。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、層状のベース粒子または層状のベース顆粒を含む乾燥粉末培地組成物を生産する方法に関する。乾燥粉末培地は、本開示で述べられる場合、乾燥粉末培地（基本培地または完全培地）、乾燥濃縮細胞培養培地、乾燥粉末供給物または補助物質、乾燥粉末濃縮供給物または補助物質、乾燥バッファー粉末を指していてもよく、細胞を培養するために、これらを組み合わせて使用してもよく、または部分的に使用してもよく、またはそれ自身を使用してもよい（完全培地であり得る場合）。一般的に、培養とは、*in vitro* で細胞を培養することを指す。層状の培地または供給物粒子または顆粒を製造するための生産方法を本明細書で以下に記載する。

【0028】

細胞培養培地、供給物または補助物質配合物は、配合物自体の中の感受性構成要素と反応性構成要素との間の有害な相互作用に起因して、時間が経過すると不安定になる（すなわち、分解する、酸化するなど）か、または不安定な化学物質を含有する場合がある。例えば、グルコースは、ある種のアミノ酸またはポリアミンと反応し、溶液に溶解すると析出するような望ましくないメイラード反応生成物を生成する場合があり、このような反応は、高エネルギーまたは電離放射線、熱による損傷、光、環境に存在する化学物質、長期間の保存、機械的な攪拌などのうち 1 つ以上が存在する状態でさらに高まる場合がある。したがって、細胞培養培地は、もっと低温で保存または運搬されなければならず、商品のコ

10

20

30

40

50

ストが上がり、扱いにくくなる場合がある。このような課題を克服するために、そうしなければ有害な相互作用を起こし得る細胞培養培地の構成要素を保護するための方法が必要であり、この方法は、例えば、反応性構成要素と感受性構成要素を別個の層になるように層形成することによって、いくつかの実施形態において、感受性構成要素の層および／または反応性構成要素と、遊離ラジカルまたは反応性種の失活剤（酸化防止剤などの失活構成要素）および／または中性構成要素とを混合することによって、細胞培養培地の成分を隔離するか、またはグループ分けすることによって達成されてもよい（例えば、以下の実施例3の表を参照）。したがって、上述の問題にとって望ましい解決策は、細胞培養システムにおいて栄養補助のための細胞培養培地または供給物（基本または完全）を提供することであろう。その結果、配合物中の感受性構成要素および／または配合物の反応性構成要素を、層形成によって互いに空間的に分離する。場合により、不活性な構成要素および／または失活剤（例えば、酸化防止剤）を感受性構成要素および／または反応性構成要素と混合してもよく、または不活性な構成要素および／または失活剤（例えば、酸化防止剤）を、反応性層と感受性層との間に層形成してもよい。このような層状の粉末細胞培養培地の適用により、例えば、熱、照射または光化学放射線に対する生成物の安定性が長く続き、および／または安定性が高まり得る。

【0029】

複数構成要素の細胞培養培地、供給物または補助物質の層状の顆粒を調製することは、完全培地が、例えば80～100の構成要素を含み、生存可能な細胞増殖を維持し、安定したタンパク質力価を維持するために、それぞれが正確な量で必要となるため、課題となり得る。

【0030】

層状の顆粒を調製するために、噴霧機（例えば、ボトム型噴霧機）を使用し、顆粒化されていないベース粉末または顆粒化または凝集したベース粉末に溶媒を噴霧してもよい。広範囲の粒径を層形成することができる。例示的な顆粒化粉末としては、限定されないが、噴霧／湿式顆粒化、流動床噴霧乾燥によって製造されるものが挙げられる（Srivastavaら、International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 2010；2(4)：236-246を参照。その全体が、本明細書に参照により援用される）。したがって、顆粒の上に第1の層が形成されてもよい。溶媒は、1種類以上の化学物質／構成要素を含有してもよく、または1種類以上の化学物質／構成要素の微小懸濁物を含有してもよい。特定の実施形態において、制御された厚さを有する異なる化学物質の層が、顆粒の上に作られてもよい。特定の実施形態において、顆粒を生成するか、または顆粒の層形成を行うために、溶媒中、または任意の段階でバインダーは使用されない。言い換えると、顆粒生成のためのバインダーまたはさらなる構成要素の添加に起因して、細胞培養培地、供給物または濃縮物の配合を変える必要はない。顆粒は、配合物中にすでに存在する構成要素を用い、層形成されてもよい。その代わり、配合物の構成要素は、以下に記載するように、隔離されるか、またはグループ分けされる。

【0031】

化学物質／構成要素の隔離と層形成層状の顆粒中の化学物質／構成要素は、例えば、その化学物質の反応性／特性、熱による損傷または放射線による損傷または光化学的な損傷の受けやすさに従って、またはその溶媒溶解度などに従って隔離されてもよく、またはグループ分けされてもよい。

【0032】

例えば、顆粒のコア（ベース顆粒とも呼ばれる）は、1種類以上の感受性構成要素（時々、内部コア／層と呼ばれる）を含んでいてもよい。他の場合において、ベース顆粒は、感受性構成要素と酸化防止剤構成要素の混合物を含んでいてもよい。さらに他の場合において、ベース顆粒は、感受性構成要素、酸化防止剤および／または中性構成要素の混合物を含んでいてもよい。例えば、特定の実施形態において、顆粒のコアは、最も感受性の高い構成要素、または最も感受性の高い構成要素の混合物、1種類以上の中性（不活性）構成

10

20

30

40

50

要素および／または1種類以上の酸化防止剤構成要素の混合物を含んでいてもよい。他の場合において、感受性構成要素および／または中性化学物質および／または酸化防止剤構成要素が1つずつ、互いの上に層形成され得るように、ベース顆粒自体が、層形成されてもよい。例えば、最も感受性の高い構成要素が、ベース顆粒の中心コアを形成し、次いで、次の層に次に感受性の高い構成要素を形成し、混合されるか、またはその後に、中性／不活性構成要素および／または酸化防止剤層がベース顆粒の最外層として形成されてもよい。または、中性構成要素は、コアにあってもよく、その後に感受性構成要素があってもよく、またはその逆であってもよい。顆粒の感受性／中性／酸化防止剤の層形成は、細胞培養培地、供給物または濃縮物の成分に従い、細胞培養培地または供給物の構成要素の特性に基づいて当業者が決定するように、任意の順序に従っていてもよい。

10

【0033】

次に、反応性化学物質を、感受性構成要素のベース顆粒（内部のコアまたは層）の上に適用してもよい。いくつかの例において、反応性化学物質と一緒に混合し、ベース顆粒の上に1つの層として適用してもよい。この分離によって、同じ顆粒の中で、感受性化学物質と反応性化学物質との間の空間的な分離をいくらか与えることができる。他の場合には、反応性化学物質を、1つずつ、ある層の上に別の層を適用してもよく、最も反応性が低い化学物質が、（感受性の）ベース顆粒と接触し、最も反応性の高い化学物質が、ベース顆粒から空間的に離れている（最外層）。または、介在する中性／不活性化学層が、内部の感受性層を、外部の顆粒の反応性層／複数の反応性層から分離してもよい。

20

【0034】

好ましい実施形態において、AGT凝集した細胞培養培地を、流動床顆粒化方法を用いて生産してもよい。所与のベース粒子に対し、さらなる流動床コーティング技術は、例えば、Wurster法などのボトム型噴霧による層形成方法を用いて適用されてもよい。AGT細胞培養配合物において、ボトム型噴霧法によって、最終的なAGT生成物中で反応性化学構成要素を分離／隔離するために、化学基を特定の順序で付加し、塊状の顆粒化構成要素の周囲に制御された層を形成することができる（すなわち、活性な層形成と呼ばれる）。いくつかの態様において、コーティングされた粒子は、構成要素を徐放するように改質することができ、他の態様において、活性な層形成されたAGTは、線照射、環境による分解、水分に起因する分解などに対して不安定な配合物の構成要素を保護することができた。保護効果を与えるために、反応性化学物質構成要素を酸化防止剤と混合してもよい。1種類以上の活性層をAGT粒子に噴霧し、配合物を完成させてよい。各層は、さらなる安定性のために1種類以上の酸化防止剤を含んでいてもよく、または含んでいなくてもよい。この方法は、二次的な反応条件（例えば、噴霧乾燥、マイクロカプセル化）を必要とすることなく、最終的に滅菌された完全AGT培地（すなわち、單一部分の乾燥形態）を与える能力を有する。安定性試験は、層状の粒子培地を37、RT、4、0などで保存しつつ、1週間後、3週間後、またはもっと後に行うことができる。通常のアッセイを用いてビタミン、エタノールアミンなどの感受性構成要素の保存についてアッセイすることによって、照射および／または環境による分解、温度変動または数週間の安定性に対する分析試験を行った。

30

【0035】

感受性であるか、または安定性が低い例示的な化学物質／構成要素としては、限定されないが、ビタミン、ポリアミン、成長因子、ホルモンなどが挙げられる。例示的な反応性化学物質／構成要素としては、限定されないが、微量金属または塩、ある種の反応性アミノ酸、ある種の糖類（例えば、特定のアミノ酸、ポリアミンを含む他の構成要素との付加物を形成し得るグルコース）、金属イオンなどが挙げられる。例示的な中性化学物質／構成要素としては、限定されないが、中性アミノ酸、中性糖類などが挙げられる。

40

【0036】

定義：

本明細書で使用される「粉末」または「乾燥粉末」という用語は、乾燥形態で存在する細胞培養のための培地粉末または粉末状培地組成物を指し、その肉眼での外観は、自由に流

50

動するものであってもよい。「粉末」との用語は、凝集した粉末を含む。「ベース粉末」または「乾燥ベース粉末」または「乾燥粉末」という用語は、相互に置き換え可能に使用されてもよく、本明細書で使用される場合、一般的には、層形成され得る前の出発物質の乾燥粉末組成物を指す。「ベース粉末」または「乾燥ベース粉末」または「乾燥粉末」という用語は、任意の手段によって、例えば、流動床処理機によって顆粒化され、「ベース顆粒」または「凝集した顆粒」を生産してもよく、次いでこれを、溶媒を用いたさらなる「層形成」によって、層形成することができる。しかし、このことは、層状粒子（または顆粒）が、ベース顆粒から出発しなければならないことを意味しない。層状粒子は、単純な顆粒化されていない粉末状物から出発してもよく、これを同様に噴霧技術を用いて層形成してもよい。簡便さのために、層形成する前の顆粒化または凝集した出発粒子を、「ベース顆粒」と呼んでもよい。これに対応して、乾燥粉末であり、顆粒化していない出発粒子は、時には、層形成する前には「ベース粒子」と呼ばれることがある。任意の出発物質が、乾燥粉末または凝集した顆粒を全く含まない場合があることを意味しない場合がある。出発物質は、時に、溶媒を用いた層形成の前に、乾燥粉末と凝集した顆粒との混合物を含んでいてもよい。乾燥粉末または凝集した粉末は（適用可能な場合）、基本培地粉末、完全培地粉末、細胞培養供給物、細胞培養補助物質、細胞培養培地もしくは供給物濃縮物、またはアミノ酸混合物であってもよい。

【0037】

「細胞培養培地組成物」または「粉末状培地組成物」または「培地粉末」または「乾燥粉末配合物」または「培地配合物」との用語は、相互に置き換え可能に使用されてもよく、例えば、本発明の培地、培地補助物質、培地サブグループまたはバッファーを広く含み、基本培地、完全培地、培地供給物、培地補助物質、培地添加剤、濃縮培地、濃縮補助物質および供給物、アミノ酸またはアミノ酸群、短いペプチド、ビタミン、バッファー、塩、微量構成要素などに限定されなくてもよい。これらの用語は、一般的に、細胞培養中に添加される構成要素を指し、当業者は、これらの用語をいつ、またはどのように使用するかを明確に理解している。

【0038】

培地の「構成要素」または「成分」という用語は、化学物質であるか、または生体由来であるかによらず、細胞の成長および増殖を維持するか、または促進するために細胞培養に使用することができる任意の化合物を指す。「構成要素」、「栄養物」、「成分」、「種」との用語は、相互に置き換え可能に使用することができ、全て、このような化合物を指すことを意味している。細胞培養培地に使用される典型的な成分としては、アミノ酸、塩、金属イオン、微量元素、ポリアミン、糖類、炭水化物、脂質、核酸、ホルモン、ビタミン、脂肪酸、バッファー塩、タンパク質などが挙げられる。細胞の培養を *e x v i v o* で促進または維持する他の成分は、特定の必要性に従って、当業者が選択することができる。

【0039】

噴霧：特定の実施形態において、層形成のための「構成要素」を、ベース粒子またはベース顆粒に噴霧してもよい。特定の実施形態において、単一の「構成要素」を、ベース粒子またはベース顆粒に噴霧してもよい。他の実施形態において、複数の「構成要素」が噴霧される。複数の「構成要素」が噴霧される場合、これらの構成要素は、例えば、その反応性、その溶解度、その特性（例えば、アミノ酸対糖）に従って一緒にグループ分けされてもよく、混合物として一緒に噴霧されてもよい。または、構成要素を次々と連続して噴霧してもよい。

【0040】

「溶媒」との用語は、層形成することが必要な1つ以上の「構成要素」を溶解し得る任意の液体、例えば、水、任意の水和剤（*h y d r a n t*）、任意のバッファー、またはエタノールなどの有機液体を指す。層形成は、溶解した「構成要素」または「構成要素の混合物」を含む液体の「噴霧」によって行われてもよい。溶媒は、1種類以上の「同様の」構成要素を溶解してもよい。例えば、エタノールは、脂質、脂肪酸、コレステロールなどを

溶解してもよく、またはおそらく、酸化防止剤または他のこののような分子 / 構成要素が、反応性種または反応性基の分解工程を安定化するか、または遅らせるのに役立つため、溶媒は、「反応性構成要素」および「酸化防止剤」などの1種類以上の「非類似の」構成要素と一緒に溶解してもよい。溶媒は、連続して噴霧されてもよく、または全てが一度に噴霧されてもよい。連続して噴霧される場合、噴霧される各溶媒は、同じ組成を有していてもよく、または異なる組成を有していてもよい。特定の場合には、複数の溶媒を同じベース粒子または顆粒に噴霧し、多層ベース粒子または顆粒を形成することができる。特定の場合には、多層ベース粒子または顆粒は、活性種または反応性種（または成分）を感受性種から空間的に分離する。一実施形態において、溶媒導入速度は、約1g m / 分から約30g m / 分まであってもよい。別の実施形態において、溶媒導入速度は、約5g m / 分であってもよい。

10

【0041】

「噴霧機」との用語は、1種類以上の構成要素を含む液体をベース粒子またはベース顆粒に噴霧する装置を指す。噴霧機は、トップ型噴霧器、ボトム型噴霧機および接線方向型噴霧機からなる群より選択されてもよい。顆粒化粒子（すなわち、凝集した粒子）を製造するために、ある噴射機を使用してもよく、一方、第2の噴霧機（一実施形態において、ボトム型噴霧機）を使用し、所望な場合、上に記載したように、溶媒および構成要素を層形成してもよい。

20

【0042】

「反応性種」は、培地または供給物の中の他の構成要素と容易に反応し、それによって、望ましくない生成物（例えば、付加物、架橋した生成物、沈殿など）を生成する構成要素を指す。反応性種は、高温、照射、他の化学物質または反応性種の存在などにさらされることに起因して、自己反応してもよく、または活性化され、反応してもよい。例示的な反応性種としては、限定されないが、金属イオン、付加物を生成する糖類、微量金属構成要素、反応性アミノ酸などが挙げられる。

20

【0043】

「感受性種」は、培地または供給物に由来するもっと反応性の高い種または基との望ましくない反応に起因して容易に破壊される構成要素を指す。感受性（または不安定な）種は、高温、照射、他の化学物質または反応性種の存在などにさらされることに起因して、自己反応してもよく、または活性化し、他の構成要素、特に、反応性種と反応してもよい。例示的な感受性種としては、限定されないが、ビタミン、特定のアミノ酸、ポリアミン（例えば、エタノールアミンなど）、成長因子などの生物学的構成要素が挙げられ、これらは、時間経過に伴って、または高温で、または照射にさらされると、またはこれらの因子の1つ以上の組み合わせに起因して破壊される。

30

【0044】

「細胞培養培地」、「培養培地」および「培地配合物」（それぞれの場合に、複数の「培地」）との句は、細胞の培養および／または増殖を補助する栄養溶液を指す。これらの句は、相互に置き換え可能に使用されてもよい。

30

【0045】

「組み合わせる」との用語は、細胞培養培地配合物中の成分を混合するか、または混ぜることを指す。液体または粉末の形態で、または1種類以上の粉末および1種類以上の液体を用いて、組み合わせてもよい。別の例において、2種類以上の粉末状構成要素を混ぜ、次いで、凝集させ、培地、培地補助物質、培地サブグループまたはバッファーなどの複雑な混合物を生成してもよい。

40

【0046】

「粒径」との用語は、「ふるい分け」測定によって決定される層状粒子の大きさ（分布であってもよい）を指す。ある実施形態において、層状粒子またはベース顆粒の粒径は、約0.05mm～7mmであってもよい。好みの実施形態において、層状粒子またはベース顆粒の粒径は、約0.05mm～約0.5mm、約0.05mm～約1mm、約0.05mm～約2mm、約0.05mm～約3mm、約0.05mm～約4mm、約0.05mm～約5mmであってもよい。

50

mm～約5mm、約0.05mm～約6mm、約0.05mm～約0.1mm、約0.05mm～約0.2mm、約0.05mm～約0.3mm、約0.05mm～約0.4mm、約0.1mm～約1mm、約0.1mm～約2mm、約0.1mm～約3mm、約0.1mm～約4mm、約0.5mm～約1mm、約0.5mm～約2mm、約0.5mm～約3mm、約0.5mm～約4mm、約0.5mm～約5mm、約0.5mm～約6mm、約0.5mm～約7mm、約1mm～約2mm、約1mm～約3mm、約1mm～約4mm、約1mm～約5mm、約1mm～約6mm、約1mm～約7mmであってもよい。さらに別の実施形態において、層状粒子または顆粒の粒径は、約0.5mmより大きくてよく、約0.4mmより大きくてよく、約0.3mmより大きくてよく、約0.2mmより大きくてよく、約0.6mmより大きくてよく、約0.7mmより大きくてよく、約0.8mmより大きくてよく、約0.9mmより大きくてよく、約1mmより大きくてよい。

【実施例】

【0047】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書に示され、記載されているが、当業者にとって、このような実施形態が、単なる例として与えられていることは明らかであろう。多くの改変、変形および置き換えが、本発明から逸脱することなく、当業者によってなされるだろう。本発明を実施する際に、本明細書に記載する本発明の実施形態に対する種々の変更を使用してもよいことが理解されるべきである。添付の特許請求の範囲は、本発明の範囲を規定し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造、およびこれらの等価物が、特許請求の範囲に包含されることを意図している。

【0048】

実施例1：層状の細胞培養培地顆粒 - プロトタイプAおよびBを製造するための例示的なプロセス（ボトム型噴霧機を用いる）

顆粒化のためのトップ型噴霧機と、コーティングのためのボトム型噴霧機（例えば、Wurster）との組み合わせを用いた層形成方法によって、顆粒配合物を設計し、生産した。一例では、6インチのWursterインサート、2リットルの顆粒生成機／乾燥機／コーチャーを備えたGPCG 1.1を用い、ボトム型噴霧コーティングを行った。ボトム型噴霧による層形成について、それぞれの顆粒化について層組成が変動し得る。例えば、プロトタイプAおよびBについて（図1a、1b、2a、2b、3a、3bを参照）。プロトタイプAおよびBのための顆粒化ベース培地は、SKU PL003021、Lot 1024MER1601を使用した。ベース培地は、トップ型噴霧顆粒化によって生産した。

【0049】

プロトタイプAは、以下のように層形成された。溶液1番（ビタミンB-12）、SKU PL003023、Lot 1101MER1601。

【0050】

噴霧1番を適用する（200倍濃縮をバッチあたり約95ml使用する）。プロトタイプBは、以下のように層形成された。溶液2番（塩溶液NaCl）について、SKU PL003024、Lot 1101MER1602。溶液3番（チアミンHCl溶液）について、SKU PL003029、Lot 1109MER1601。噴霧2番を適用し（500倍濃縮をバッチあたり約38ml使用する）、その後、噴霧3番を適用する（500倍濃縮をバッチあたり約38ml使用する）。最後に噴霧2番を適用し（500倍濃縮をバッチあたり約38ml使用する）、終了する。プロトタイプAおよびBのSEM画像を図2aおよび図2bに示す。乾燥した層状生成物のSEMは、プロトタイプA（ボトム型噴霧）が、顆粒化ベース粉末（トップ型噴霧）と比較して、平滑な表面を有することを示す。プロトタイプBのSEMは、おそらく最外層が塩層（NaCl）であるために、顆粒化ベース粉末（トップ型噴霧）と比較して、粗いコーティング表面を示す。

【0051】

実施例2：再構築された層状の供給培地のアッセイにおける、細胞の生存率および増殖の

10

20

30

40

50

比較

陽性対照の一般的な供給培地に対する、再構築された層状の供給培地のアッセイにおける、細胞の生存率および増殖の比較（試験 = 試験したプロトタイプ A）（図 3 a および 3 b を参照）。このアッセイのために、D G 4 4 - I g G 細胞株を、E f f i c i e n t F e e d B (補助物質) A 2 5 3 0 番（陽性対照）を含む C D - C H O (培地) 1 2 4 9 0 番の中で培養した。一方、試験物は、再構築された層状の供給培地（プロトタイプ A）であり、陰性対照は、グルコースを供給した培地であった。

【 0 0 5 2 】

全ての細胞を以下のように継代培養した。3日間で第3継代まで、次いで、各継代由来の細胞を、 3×10^5 個の生存可能な細胞 / m¹ に分けた。3日以降、第4継代において、細胞数計測を毎日行った。全ての試験供給培地および対照供給培地を、液体を用いて再構築し、次いで、滅菌濾過した。図 3 a および 3 b からわかるように、プロトタイプ A は、層形成されていない陽性対照供給培地を追加した細胞培養物に匹敵する高い生存率 % を示した。細胞増殖に関して、プロトタイプ A は、約 6.6×10^6 細胞 / m¹ (増殖) の生存可能な細胞数を示し、すなわち、陽性対照供給物を追加した細胞培養物 (約 7.5×10^6) と比較してわずかに数が少ない。比較のために、補助物質を追加していない細胞培養アッセイをグルコース供給物（陰性対照）としてラベリングしてもよい。

10

【 0 0 5 3 】

実施例 3：細胞培養のための層状の培地 / 供給物顆粒の生産のための例示的なプロセス
顆粒化のためのトップ型噴霧機と、コーティングのためのボトム型噴霧機（例えば、W u
r s t e r）との組み合わせを用いた層形成方法によって、顆粒配合物を設計し、生産した。図 4、5 a および 5 b を参照。ベース粉末は、アミノ酸、d - グルコース、塩バッファーおよび選択ビタミン (S K U 1 2 6 8 1) を含有する。例えば、ブレンダー (4 q
t) を用いて粉末をブレンドし、溶媒（例えば、水）を用い、トップ型噴霧方法（表 1 を
参照）、限定されないが、例えば、N i r o M P - 1、P e r i s t a l t i c P u m
p、Q u a d r o C o m i l U 5 を含む装置を用いて顆粒化し、次いで、例えば、F i
t z m i l l L 1 A を用いて粉碎した。ここでは、層形成の前にベース粉末を顆粒化したが、ベース粉末の顆粒化は、必須工程でなくてもよい。顆粒化は、トップ型噴霧、ボトム型噴霧または接線方向型噴霧を使用してもよい。層形成は、通常、ボトム型層形成を用いて行われてもよく、層組成は、各顆粒化について変動し得る。トップ型噴霧顆粒化パラ
メータについては以下の表 1 を参照、また、図 4 ~ 1 1 を参照。

20

【 0 0 5 4 】

(表 1) 例示的なトップ型噴霧顆粒化パラメータ

| 配合物 | バッチサイズ {g} | 当初 顆粒化 パラメータ | 7分 顆粒化 パラメータ | 20分 顆粒化 パラメータ | 30分 顆粒化 パラメータ |
|-----|---------------|---|--|--|--|
| 1 | 13±2 | 床温度:44°C、 気体流量:20CMH、 出口T _d :5°C、 床LOD:0.7重量% | 床温度:30°C、 気体流量:75CMH、 出口T _d :13.5°C、 床LOD:2.2重量% | 床温度:34.5°C、 気体流量:60CMH、 出口T _d :14.7°C、 床LOD:2.2重量% | 床温度:39°C、 気体流量:60CMH、 出口T _d :10°C、 床LOD:1.7重量% |
| 2 | 14±2 | 床温度:44°C、 気体流量:20CMH、 出口T _d :3°C、 床LOD:0.7重量% | 床温度:31°C、 気体流量:75CMH、 出口T _d :13.5°C、 床LOD:2.8重量% | 床温度:34°C、 気体流量:60CMH、 出口T _d :11°C、 床LOD:2.3重量% | 床温度:36°C、 気体流量:60CMH、 出口T _d :6°C、 床LOD:1.9重量% |

30

【 0 0 5 5 】

顆粒化ベース粉末に対し、粒径分析および S E M 分析を行った（図 6 a および 6 b、7 a および 7 b、8 a および 8 b を参照）。顆粒を製造するために使用可能な例示的なプロセスパラメータは、以下の通りである。表 2 を参照。

40

【 0 0 5 6 】

(表 2)

50

| プロセスパラメータ | 値 | 単位 |
|-------------|-----------|-------|
| 流動化空気の流速 | 45 | CFM |
| 入口温度 (プロセス) | 50 | °C |
| 入口露点 | <5 | °C |
| 液体噴霧速度 | 5 +/- 0.5 | g/min |
| 霧化空気圧 | 1.1 | bar |
| 床温度 | 35 +/- 2 | °C |
| 排気露点 | <10 | °C |
| 産物パラメータ | 値 | 単位 |
| 産物温度目標 | <40 | °C |
| 最終水分% | <2.5 | % |

10

20

30

【0057】

表2(上)において、6インチの改変したボウル、Schlick 970ノズルおよび1.2mm液体先端(0.5~4.0mmの範囲)を備えたNiro MP-1を用い、ボトム型噴霧コーティングを行った。上述のノズルは、カラムエアギャップ20mm(範囲)を用い、ベースから上に4cmのところに固定した。配合物1について7コーティング、配合物2について8コーティングが存在した。均一なコーティングを確保するために、全てのコーティングの実施を少なくとも20分間行った。各コーティングの間に、水5mLをラインに流して洗浄した。実施終了時に、アトマイザをオフにし、入口温度を40に設定した10分間の乾燥工程を行った。

【0058】

配合物1について7つのコーティング、配合物2について8コーティングが存在した。配合物1および2について噴霧した各層の模式図を図5aおよび5bに示し、その説明は、以下の表3にも与えられる。

【0059】

(表3) 配合物1および2の記載：噴霧されたベース顆粒およびコーティングの内容物Thermo Fisherカタログ(カタログブレンド)CD OptiCHO AGT SKU A11222-05番に対する記載である。

40

50

| | 配合物 1 | | 配合物 2 | |
|------|--|---------|---|---------|
| | 説明 | 合計重量% | 説明 | 合計重量% |
| ベース | * cys、シスチン(cys ₂)、metを除去する ・脂肪族アミノ酸 ^a を除去する | 82% | * cys、metを除去する ・顆粒化後にNaClを添加する | 94% |
| 噴霧 1 | * グルタチオン、cys、metと共にビタミンを噴霧する * 19% cys、34% met(固形分重量) * 水中で、11%(w/v)固形分 | 0.7% | * グルタチオン、cys、metと共にビタミンを噴霧する * 26% cys、39% met(固形分重量) * 水中で、11%(w/v)固形分 | 0.7% |
| 噴霧 2 | * 硫酸デキストラン、cys、metと共に中性物質を噴霧する * 3.1% cys、5.7% met(固形分重量) * 水中で、8.8%(w/v)固形分 | 0.6% | * アルコール溶液 * 60%EtOH/水中、0.11%(w/v)固形分 | 0.01% |
| 噴霧 3 | * cys、metと共にアルコールを噴霧する * 12% cys、22% met(固形分重量) * 60%EtOH/水中、0.16%(w/v)固形分 | 0.01% | * 硫酸デキストラン、cys、metと共に中性物質を噴霧する * 水中で、8.8%(w/v)固形分 | 0.5% |
| 噴霧 4 | * 脂肪族アミノ酸 * 水中で、4.9%(w/v)固形分 | 3.5% | * cysおよびmetを含むアミン ^b * 20% cys、36% met(固形分重量) * 水中で、11%(w/v)固形分 | 0.7% |
| 噴霧 5 | * 鉄キレートを噴霧する * 水中で、0.31%(w/v)固形分 | 0.02% | * 鉄キレートを噴霧する * 水中で、0.31%(w/v)固形分 | 0.02% |
| 噴霧 6 | * 微量元素噴霧A * 水中で、0.15%(w/v)固形分 | 0.01% | * 微量元素噴霧A * 水中で、0.15%(w/v)固形分 | 0.01% |
| 噴霧 7 | * 微量元素噴霧B * 水中で、5e-3%(w/v)固形分 | 0.0002% | * 微量元素噴霧B * 水中で、5e-3%(w/v)固形分 | 0.0002% |
| 噴霧 8 | * cysおよびmetを含む脂肪族アミノ酸 * 3.7% cys、6.7% met(固形分重量) * 水中で、5.5%(w/v)固形分 | 3.9% | | -- |
| ブレンド | * カタログブレンド | 9.5% | * Pluronic F68 のみ | 3.5% |

【 0 0 6 0 】

配合物 1 について：コンセプト設計 1 番：ボトム型噴霧による層形成（コーティング）法を用い、以下の層からなる感受性基の保護を達成するため（多層、多成分）。

【 0 0 6 1 】

酸化防止剤の第 1 の層でコーティングされた、ベース顆粒化成分（例えば、D - グルコース、塩、アミノ酸、バッファーおよびある種のビタミン）（「コア」）。次いで、酸化防止剤特性を有する栄養物の第 2 の層でコーティングした。その後、酸化防止剤栄養物と混合した、感受性栄養物（すなわち、線照射の結果として濃度が減少する）を含む第 3 の層。次いで、第 4 の層を障壁として適用し、塩層、さらなる分離障壁層、外側酸化防止剤層といった残りの 3 層から感受性成分を分離してもよい（「シェル」）。

【 0 0 6 2 】

配合物 1 は、8 コートを含んでおり、コーティングの全厚さは約 10 μm であり、D 50 = 180 μm であった。ボトム型噴霧コーティングの前後のふるい分け分析を行った（図 6 a および 7 a を参照）。この方法の間の顆粒の摩耗に起因して、コーティングされた顆粒は、出発物質のコーティングされていない顆粒よりも小さな平均粒径を有する。ふるい分け分析は、例えば、R e t s c h ふるいシェーカーを使用したが、任意のシェーカーを使用することができる。詳細：8 インチのふるい、振幅 6、パルス状態、持続時間 6 分。

【 0 0 6 3 】

例示的な層状 A G T プロトタイプまたは「オニオンスキン」層状 A G T を、ボトム型噴霧方法を用いて生産した。反応性基が隔離 / 層形成された層状 A G T プロトタイプを製造した。この方法は、1 ~ 2 kg までプロセスのスケールアップが可能であった。層形成が特定され、分析方法によって確認された。例示的なプロトタイプ産物は、以下の 3 層からなっていた。塊状の顆粒化構成要素、溶液 A = ビタミン、溶液 B（または懸濁物）* = 酸化

10

20

30

40

50

防止剤アミノ酸層（例えば、システインおよびメチオニン）、溶液C = 微量元素（または他の酸素反応性構成要素）。*注 - システインは、1つの顆粒化において溶液として配合することができる。システインは、溶液中でシスチン（二量化）を生成する可能性を有する。シスチンの生成を避けるための1つの手法は、第2の顆粒化において、システインを微小懸濁物として配合することであってもよい。

【0064】

配合物2について：コンセプト設計2番：ボトム型噴霧による層形成（コーティング）法を用い、以下の層からなる反応性基の隔離を達成するため（多層、多成分）。

【0065】

ベース顆粒化成分（例えば、d - グルコース、塩、アミノ酸、バッファーおよびある種のビタミン）。溶液Aは、感受性栄養物を含有する（すなわち、線照射の結果として濃度が減少する）。溶液Bは、酸化防止特性を有する栄養物を含有する。溶液Cは、顆粒化されたベース構成要素に対して反応性であり得る栄養物を含有する。

10

【0066】

配合物2は、7コートを含んでおり、コーティングの全厚さは約5 μmであり、D50 = 180 μmであった。「オニオンスキン」が層形成された（薄層）。ボトム型噴霧コーティングの前後のふるい分け分析を行った（図6bおよび7bを参照）。

【0067】

例示的な層状培地である配合物2を、記載のように調製した。塊状の顆粒化構成要素 - 顆粒化工程のための培地化学物質のリスト；1番目の内部層；（ビタミン + 酸化防止剤）= 例えれば、ビタミン + システイン - HCl - H2O + メチオニン = 2番目の層；（ポリアミン + 酸化防止剤）* = 例えれば、システインおよびメチオニン + ポリアミン + エタノールアミン = 3番目の層；塩1番 =（鉄キレート溶液）、例えれば、EDTA + 硫酸第一鉄7H2O = 4番目の層；塩2番（微量元素溶液A（0116031））= 5番目の層；塩3番（微量元素溶液B（0116026））= 6番目の層。

20

【0068】

配合物3について：例示的な層状培地である配合物3（F3）を、本明細書に記載のように調製した。「コア - シェル」層状AGTを、ボトム型噴霧方法を用いて生産した（「コア - シェル」層形成）。微小懸濁層形成法を実施するための減少（すなわち、1 ~ 2 kgまでスケールアップ可能な方法）。配合物3（F3）が、本明細書に記載される。塊状の顆粒化構成要素、1番目の内部層、コーティング2番（ビタミン + 酸化防止剤）= ビタミン + システイン - HCl - H2O + メチオニン = 2番目の層；（酸化防止剤微小懸濁物）* = （Pluronic / 水担体溶液またはPEG / 水担体溶液中、システインおよびメチオニンを微小粉末化 / 懸濁した）= 3番目の層；塩1番 =（鉄キレート溶液）= EDTA + 硫酸第一鉄、7H2O = 4番目の層；塩2番（微量元素溶液A（0116031））= 5番目の層；塩3番（微量元素溶液B（0116026））= 6番目の層。または、層4、5および6を組み合わせてもよい。*注：システインは、溶液中でシスチン（二量化）を生成する可能性を有する。シスチンの生成を避けるための1つの手法は、第2の顆粒化において、システインを微小懸濁物として配合することであってもよい。PluronicまたはPEGを微小懸濁物のための溶媒として使用する実現可能性を試験する。これらのポリマーは、水溶性化合物と水不溶性化合物に相溶性だからである。

30

【0069】

ボトム型噴霧溶液のための配合方法：「オニオンスキン」層状AGTを、ボトム型噴霧方法を用いて生産した。配合物2（F2）または配合物3（F3）を調製するための工程を本明細書に記載する。塊状の顆粒化構成要素（内部コア）。*注 - ポリアミン + 酸化防止剤を溶液として配合することができる。以下を参照。工程1。ポリアミン溶液（pH範囲 = 6.4 ~ 6.6）をあらかじめ配合し、滅菌濾過した（0.2 μm）。工程2。工程1で調製したポリアミン溶液に酸化防止剤を添加し、溶解する（透明溶液が生成する）まで、この溶液を攪拌する（磁気攪拌プレート）。工程3。透明溶液のpHを測定し、記録する（pH範囲は2.0 ~ 3.0）。工程4。5N NaOHを用い、溶液pHを6.5 ~

40

50

7 . 5 に調節する。この溶液は、透明性を維持すべきであり、これを使用し、ボトム型噴霧による層状顆粒化を行うことができる。

【 0 0 7 0 】

配合物 1 および 2 の物理特性

【 0 0 7 1 】

(表 4)

| 配合物 1 物理特性 | |
|------------|-------|
| コート厚さ | 約10μm |
| タップ密度 | 0.89 |
| バルク密度 | 0.82 |
| Carr 指数 | 7.9 |

10

【 0 0 7 2 】

(表 5)

| 配合物 2 物理特性 | |
|------------|------|
| コート厚さ | 約5μm |
| タップ密度 | 0.84 |
| バルク密度 | 0.75 |
| Carr 指数 | 10.7 |

20

30

【 0 0 7 3 】

比較のために、ベース顆粒化粒径（図 9 a および b ）および粉碎したベース顆粒化粒径（図 10 a および b ）も行った。

【 0 0 7 4 】

実施例 4 : 線照射の前後の配合物 1 および 2 の分析試験

上述の方法によって調製した乾燥した層状の細胞培養培地（配合物 1 および 2 ）を、 照射安定性についてさらに試験した。この実験の目標は、処理条件のみを変え、培地 / 供給物構成要素を層形成することによって（すなわち、細胞培養培地の配合を変えずに）、放射線に耐性の培地を調製することができるかどうかを決定することであった。層状培地を、以下の表に示すように、約 20 kGy ~ 約 70 kGy の範囲の線量の 照射で処理した。 線照射の前後に感受性化学マーカー（例えば、チアミン、ビタミン B - 12 などのビタミン）の濃度を測定することによって、得られた層状の顆粒化培地の 線照射耐性を分析した。各配合物（F 1 および F 2 ）および 線照射の条件について、M i l l i Q 水を用い、2 バッチの 1 リットル培地を調製した。トリプトファン、ナイアシンアミド、葉酸、チアミンおよびビタミン B 12 について、各サンプルも試験した（HPLC による）。線量の行に、この試験のために配合物が曝露される 線照射の平均線量を列挙する。結果を以下の表 6 および図 11 に示す。これに加え、得られた顆粒の物理特性の決定を行った（表 4 および 5 ）。ボトム型噴霧による層形成技術を用いて調製した複数構成要素の細胞培養培地が、内容物の優れた均一性を与えることを発見した。ベース顆粒化粉末の周囲の

40

50

それぞれの層の制御された配置が、同じ配合物内で反応性化学物質および感受性化学物質を物理的に分離する方法を与えることも注目された。グループ分けされた層は、さらに、熱による反応性または分解、光化学的な反応性または分解、放射線によって誘発される反応性または分解を引き起こす条件にさらされている間の化学安定性を向上させた。

【 0 0 7 5 】

(表 6) 放射線分析の表 (k G y 単位での線量)

| サンプル | 線量 | 残留% | | | | B12 |
|---------|----|-----------|----------|------|---------|------|
| | | L-トリプトファン | ナイアシンアミド | 葉酸 | チアミンHCl | |
| 配合物 1-0 | 0 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 配合物 1-2 | 25 | 100% | 97% | 95% | 94% | 78% |
| 配合物 1-1 | 35 | 100% | 99% | 96% | 96% | 73% |
| 配合物 1-3 | 65 | 99% | 101% | 96% | 95% | 64% |
| 配合物 2-0 | 0 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 配合物 2-1 | 25 | 102% | 97% | 94% | 95% | 73% |
| 配合物 2-2 | 35 | 101% | 98% | 95% | 94% | 69% |
| 配合物 2-3 | 65 | 99% | 98% | 94% | 91% | 56% |
| カタログ-0 | 0 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| カタログ-1 | 25 | 100% | 100% | 99% | 96% | 72% |
| カタログ-2 | 35 | 101% | 99% | 100% | 96% | 67% |
| カタログ-3 | 65 | 100% | 99% | 99% | 93% | 51% |

【 0 0 7 6 】

配合物 1 および 2 についての表 6 および他のアッセイのまとめ：チアミンは、線量に依存する様式で 9 %まで分解し、ビタミン B 1 2 は、線量に依存する様式で 4 9 %程度まで多く分解した。チアミンおよびビタミン B 1 2 の分解を図 1 1 に示す。6 0 ~ 7 0 k G y でのビタミン B 1 2 の分解は、配合物 1 および 2 のカタログ対照と比較して、それぞれ 1 8 % および 2 6 % 減少した（層状顆粒化における 線照射に感受性の栄養物の保護）。線処理 - カタログ C D O p t i C H O A G T 対照、配合物 1 および配合物 2 を、例えば、

線処理のために S t e r i s へと運んだ。全てのサンプルを 5 ° で保存し、ドライアイス温度 (- 7 8 °) で運搬し、照射した。各配合物を 4 つのバッチに分け、(a) 5 ° に維持するか、または (b) 2 0 ~ 3 0 k G y 、(c) 3 0 ~ 4 0 k G y または (d) 6 0 ~ 7 0 k G y の合計線量で照射した。

【 0 0 7 7 】

トリプトファンおよびナイアシンアミドのアッセイレベルは、試験した全ての放射線レベルについて、照射していない培地の 3 %以内であった。葉酸含有量は、全ての放射線線量について、照射していない培地の 6 %以内であった。線処理 - カタログ C D O p t i C H O A G T 対照、配合物 1 および配合物 2 を、例えば、線処理のために S t e r i s へと運んだ。全てのサンプルを 5 ° で保存し、ドライアイス温度 (- 7 8 °) で運搬し、照射した。各配合物を 4 つのバッチに分け、(a) 5 ° に維持するか、または (b) 2 0 ~ 3 0 k G y 、(c) 3 0 ~ 4 0 k G y または (d) 6 0 ~ 7 0 k G y の合計線量で照射した。

【 0 0 7 8 】

上に記載した方法は、本明細書全体に記載した、再構築された乾燥形態の層状の細胞培養培地に由来する栄養物を誘導する、哺乳動物、細菌、昆虫、真菌など任意の細胞型の培養に適用可能である。上のいくつかの実施形態に記載するように、微小懸濁物として、または細胞培養顆粒化培地のためのコーティングとして配合される成分で構成される層の適用も、本発明の範囲に包含される。任意の粉末状細胞培養培地 / 供給物、または顆粒化細胞培養培地 / 供給物の層の中に細胞培養培地の成分をグループ分けし、分離し、または他の形式で組織化することができる多数の配置によって、この方法論は、当業者によって容易

10

20

30

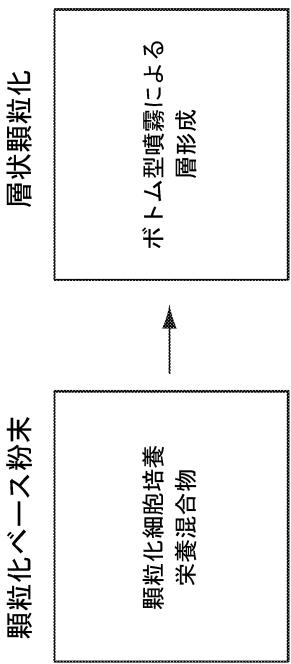
40

50

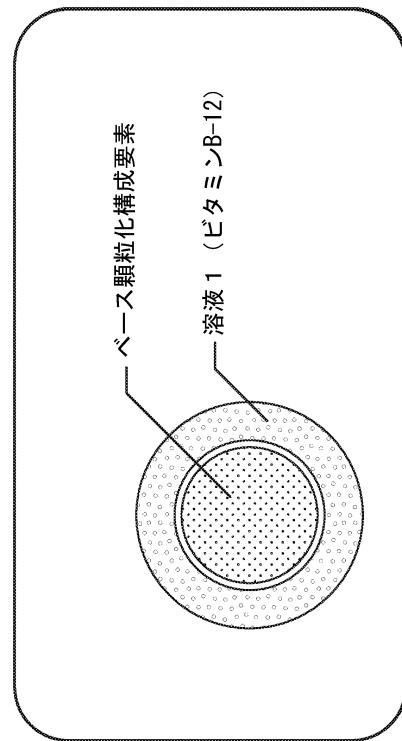
に理解されるように、例えば、熱安定性、放射線耐性、改変された分解プロフィールなどを高めるための多種多様な用途に有用になる。

【図面】
【図 1】

培養培地の層状顆粒配合物を製造するための
例示的な方法 1



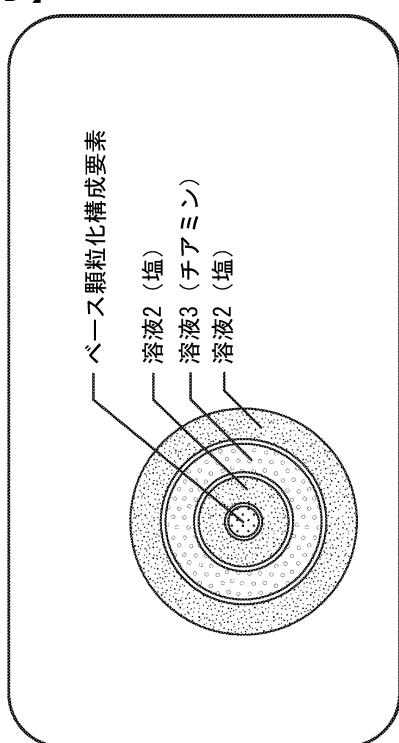
【図 1 A】



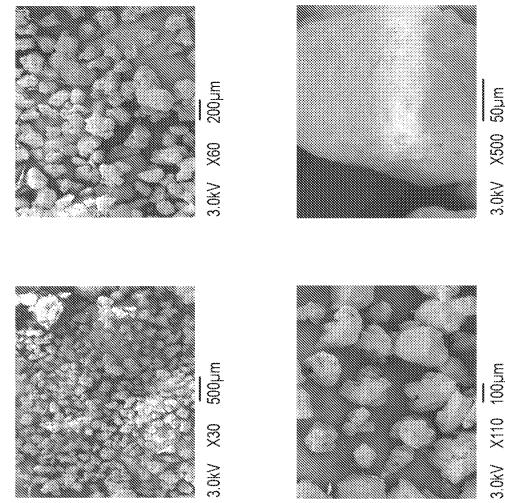
10

【図 1 B】

層状顆粒プロトタイプB
(各層において多層、単一成分)



【図 2 A】



20

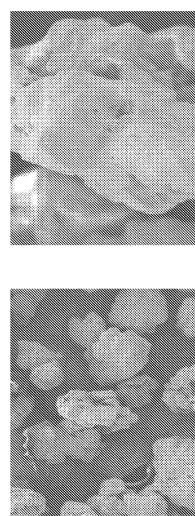
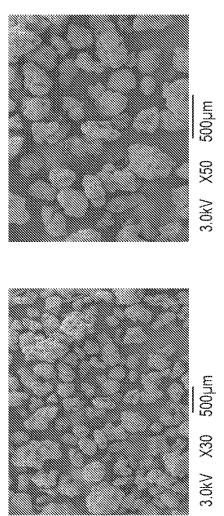
30

40

50

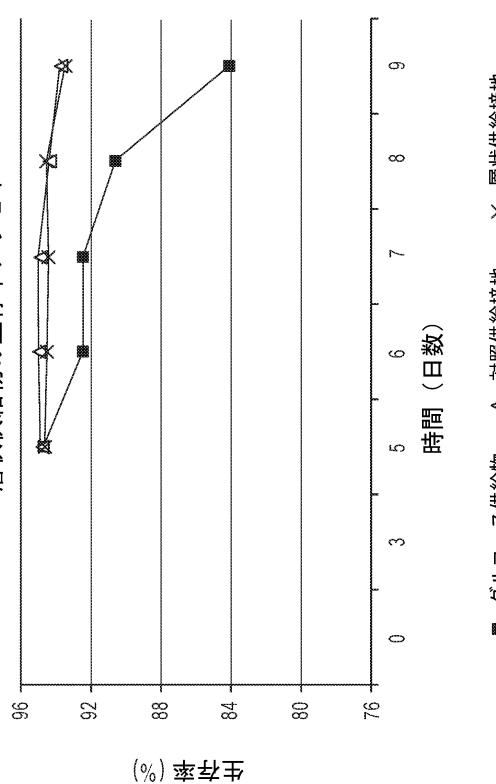
【図 2 B】

層状顆粒プロトタイプB
(多層、単一成分) のSEM画像



【図 3 A】

プロトタイプAの層状供給物の細胞増殖アッセイ

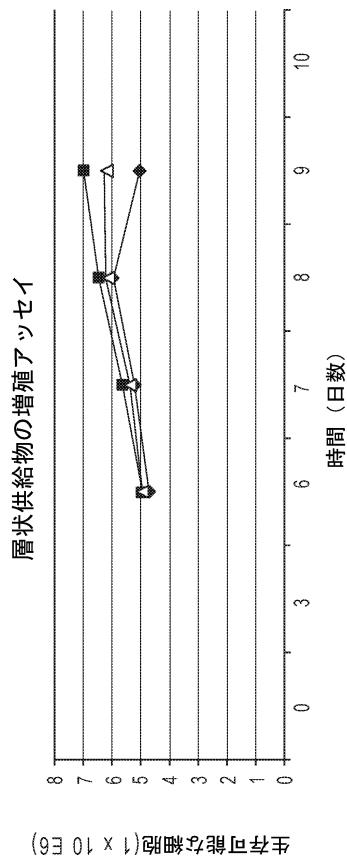


10

20

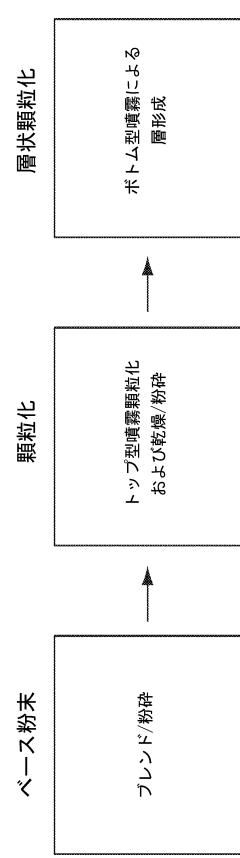
【図 3 B】

プロトタイプAの層状供給物の細胞増殖アッセイ



【図 4】

細胞培養のための層状培地/
供給物顆粒の生産のための例示的な方法2

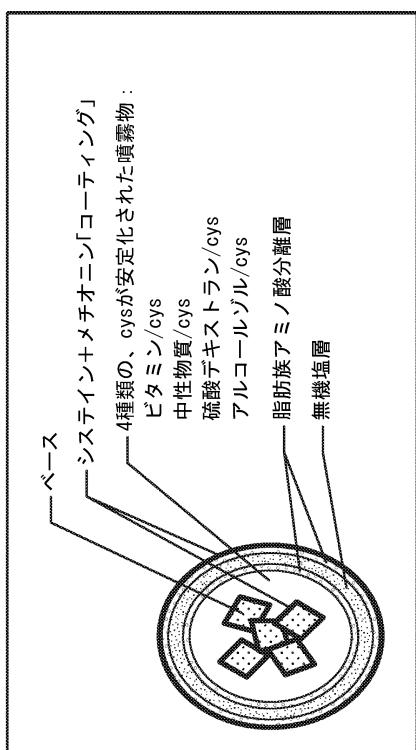


30

40

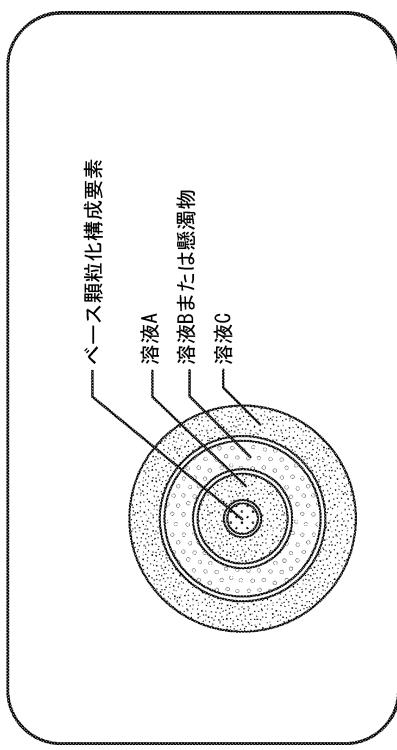
50

【図 5 A】



細胞培養培地の層状顆粒一配合物1

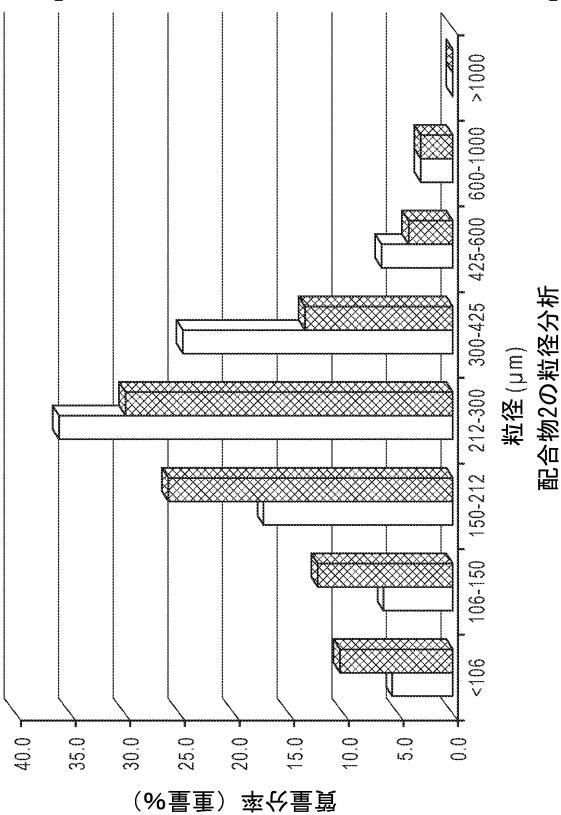
【図 5 B】



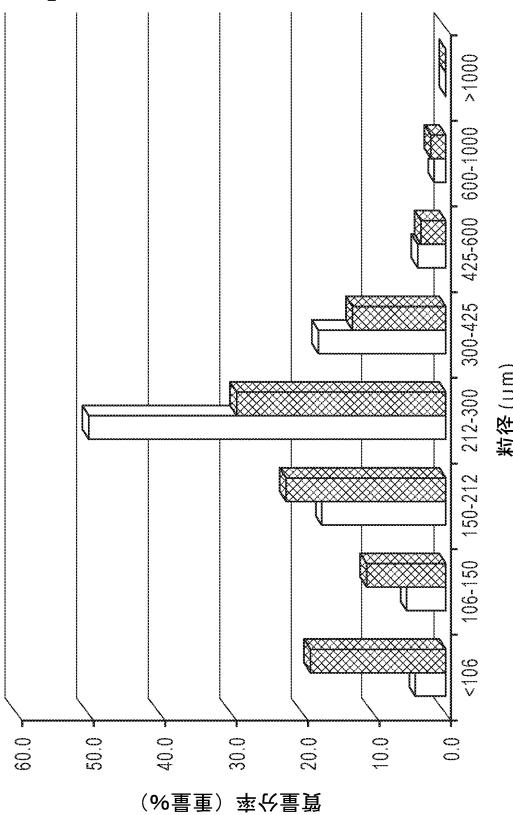
10

20

【図 6 A】



【図 6 B】



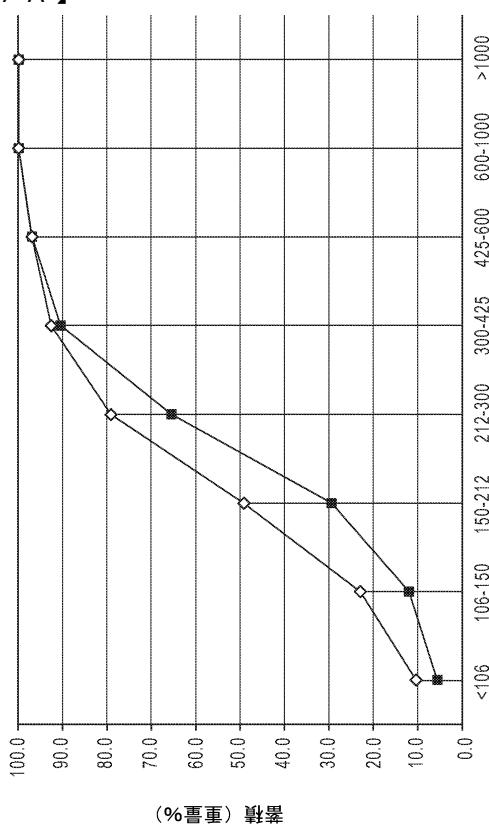
30

40

50

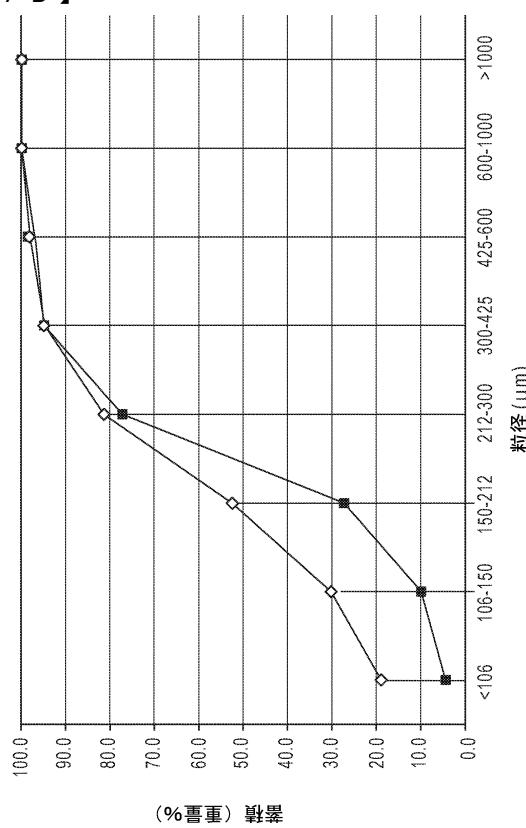
【図 7 A】

配合物1の累積的な粒径分析



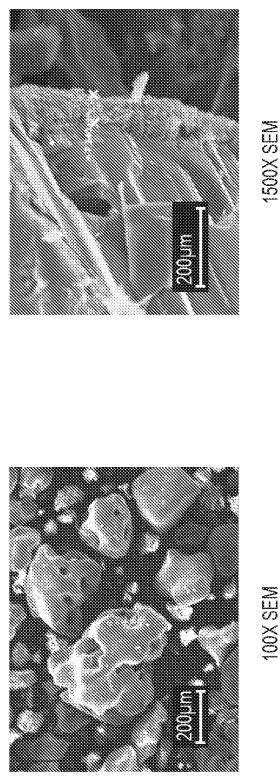
【図 7 B】

配合物2の累積的な粒径分析



【図 8 A】

配合物1のSEM



【図 8 B】

配合物2のSEM



10

20

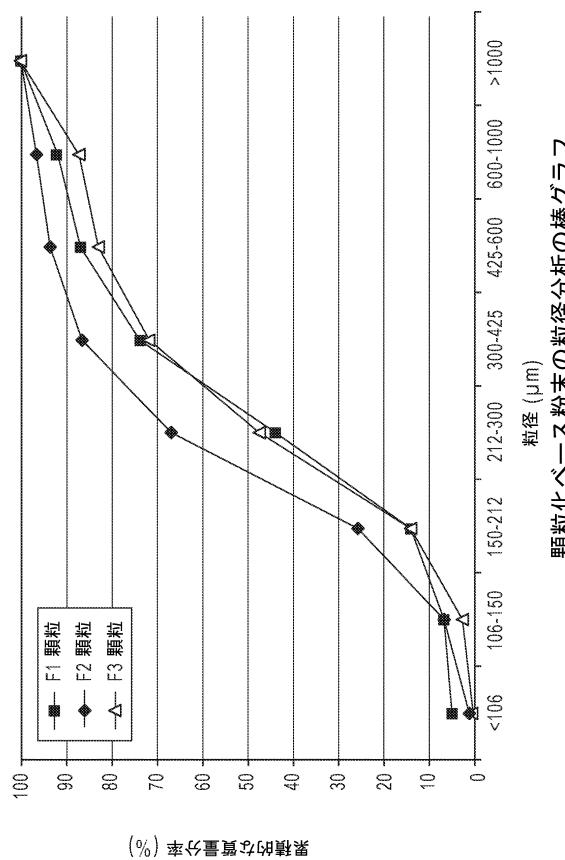
30

40

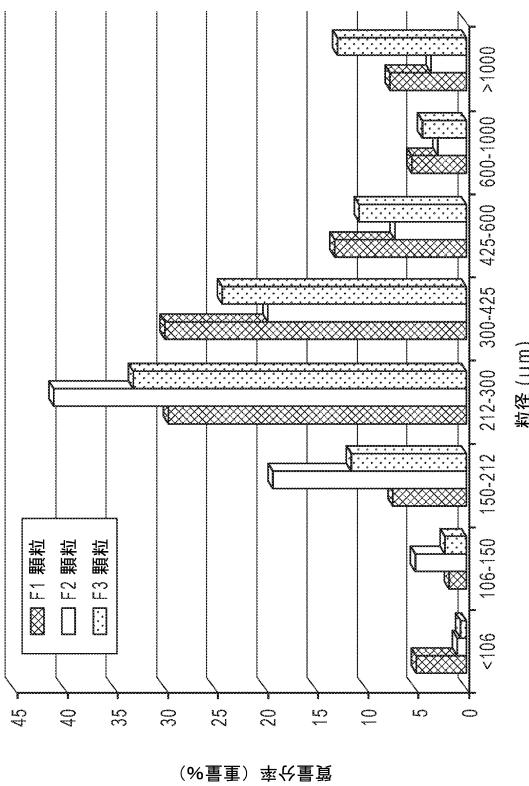
50

【図 9 A】

顆粒化ベース粉末の粒径分析

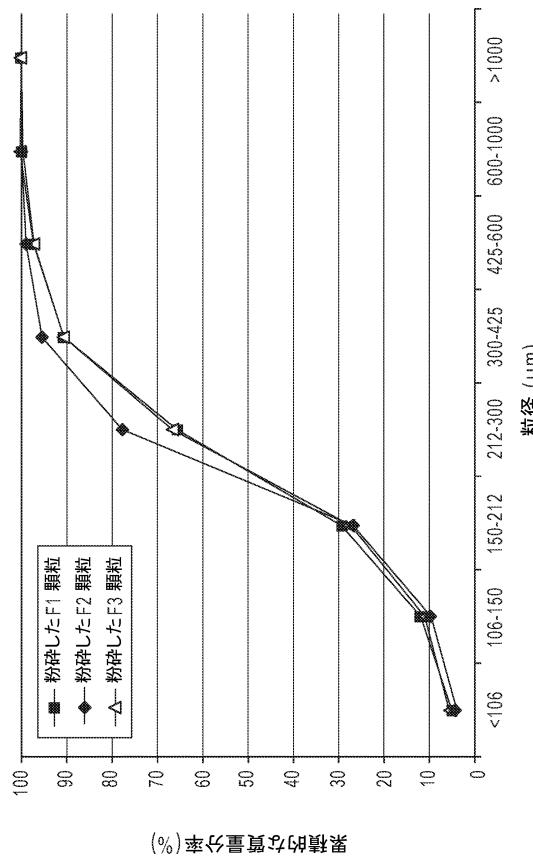


【図 9 B】

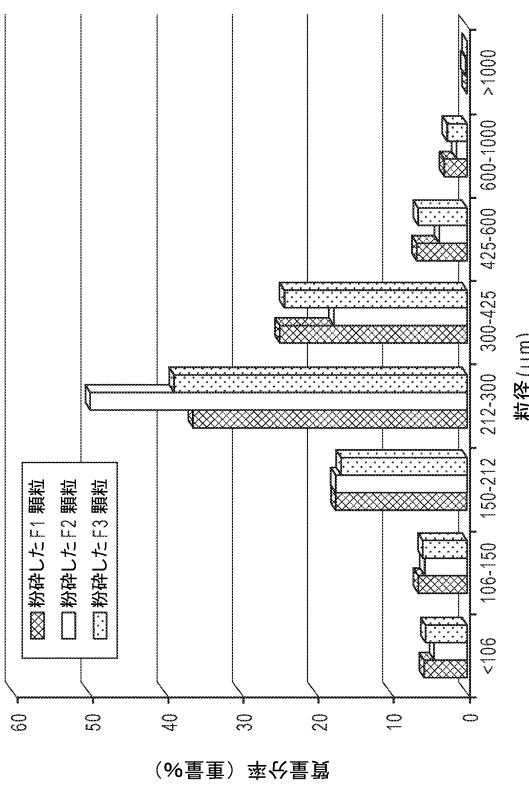


【図 10 A】

粉碎した顆粒化ベース粉末の粒径分析



【図 10 B】



10

20

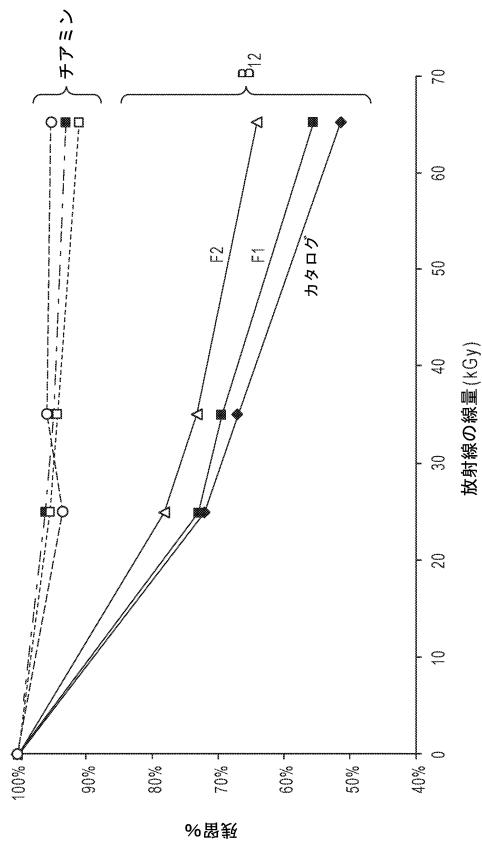
30

40

50

【図 1 1】

層状顆粒化における、放射線によって誘発される栄養物の分解



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フエルプス ムウィタ
アメリカ合衆国 92008 カリフォルニア州 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823

(72)発明者 グルデ ポール
アメリカ合衆国 92008 カリフォルニア州 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823

(72)発明者 ファイク リチャード
アメリカ合衆国 14031 ニューヨーク州 クラレンス ハンティング バレー ノース 9310

(72)発明者 レイノルズ メアリー
アメリカ合衆国 92008 カリフォルニア州 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823

(72)発明者 ハセット リチャード
アメリカ合衆国 92008 カリフォルニア州 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献
国際公開第2013/096858 (WO, A1)
特開昭55-043378 (JP, A)
特開2006-131548 (JP, A)
特開昭61-209589 (JP, A)
国際公開第2001/045677 (WO, A1)
特表2002-515758 (JP, A)
欧州特許出願公開第02281873 (EP, A1)
特開平08-252087 (JP, A)
特表2004-521615 (JP, A)
Cytotechnology, 2001年, Vol.36, p.33-39
Innovative Technologies for Granules and Pellets, 2011年10月17日, http://www.glatt.com/fileadmin/user_upload/content/pdf_downloads/AB_innovative_technologies_en_111017.pdf
Process & Plant Engineering + Innovative Process Technology, 2015年03月16日, http://www.ingredientsnetwork.com/Glatt_BRO_PTFFF_116_Funktionalisierung-Granulate-Pellets_2016-03_EN_160315_web-file069503.pdf
International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 2010年, Vol.2, No.4, p.236-246
Applied Microbiology and Biotechnology, 2015年, Vol.99, p.4645-4657
CHO CD EfficientFeedTM B AGTTM Nutrient Supplement, 2012年01月01日, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/CHO_CD_EfficientFeed_B_AGT_PI.pdf
Advanced Granulation TechnologyTM (AGTTM) Media for Bioproduction, 2002年01月01日, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/332_-21646_AGT_Bro.pdf

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
C 12 N 1 / 0 0
C 12 N 5 / 0 0

C 1 2 M 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)