

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-514327
(P2024-514327A)

(43)公表日 令和6年4月1日(2024.4.1)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/071(2010.01)	C 1 2 N	5/071	4 B 0 6 3	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 B 0 6 4
C 1 2 Q	1/06 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06	4 B 0 6 5	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全58頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-562946(P2023-562946)			(71)出願人	500034653
(86)(22)出願日	令和4年4月14日(2022.4.14)				ジェンザイム・コーポレーション
(85)翻訳文提出日	令和5年11月22日(2023.11.22)				アメリカ合衆国02141マサチューセ
(86)国際出願番号	PCT/US2022/024781				ッツ州ケンブリッジ・ウォーター・スト
(87)国際公開番号	WO2022/221511				リート450
(87)国際公開日	令和4年10月20日(2022.10.20)			(74)代理人	100127926
(31)優先権主張番号	63/174,900				弁理士 結田 純次
(32)優先日	令和3年4月14日(2021.4.14)			(74)代理人	100140132
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 竹林 則幸
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(74)代理人	100216105
					弁理士 守安 智
				(72)発明者	シャウン・エル・バレット
					アメリカ合衆国ニュージャージー州08
					807.ブリッジウォーター・メーラー
					コード:55エー-525.コーポレー 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳類細胞の灌流培養方法

(57)【要約】

本明細書では、哺乳類細胞の灌流培養方法であって：約270mOsm/kgから約380mOsm/kgの浸透圧を有する第1の液体培地中に配置された哺乳類細胞を含む容器を用意することと；約32℃から約39℃で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを含む、方法が提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳類細胞の灌流培養方法であって：

約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg の浸透圧を有する第 1 の液体培地中に配置された哺乳類細胞を含む容器を用意することと；

約 32°C から約 39°C で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；

その期間の間、連続的または定期的に、第 1 の液体培地の第 1 の体積を除去し、第 1 の液体培地に第 2 の液体培地の第 2 の体積を添加することであって、第 1 および第 2 の体積はほぼ等しく、容器内の第 1 および第 2 の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることとを含む、方法。

10

【請求項 2】

第 1 の液体培地は、約 270 mOsm/kg から約 320 mOsm/kg の浸透圧を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 2 の液体培地は、 8 g/L 超のポロキサマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

第 2 の液体培地は、 10 g/L 超のポロキサマーを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

第 2 の液体培地は、 12 g/L 超のポロキサマーを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ポロキサマーは、Pluronic F68 である、請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

第 2 の液体培地は、約 6.8 から約 7.1 の pH を有する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

第 2 の液体培地は塩化ナトリウムを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

第 2 の液体培地は、約 800 mOsm/kg から約 $2,500\text{ mOsm/kg}$ の浸透圧を有する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

第 2 の液体培地は、約 $1,200\text{ mOsm/kg}$ から約 $1,800\text{ mOsm/kg}$ の浸透圧を有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

添加する第 2 の液体培地の第 2 の体積を、その期間にわたって増加させる、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

添加する第 2 の液体培地の第 2 の体積を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

容器内の第 1 および第 2 の液体培地の浸透圧を維持することは、第 2 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で調整することを含む、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 14】

調整する工程は、第 2 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

容器内の第 1 および第 2 の液体培地の pH および pCO_2 の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

50

調整する工程は、第 2 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

その期間にわたって、容器内の第 1 および第 2 の液体培地の pCO_2 を増加させ、 pH を増加させることを更に含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

容器内の第 1 および第 2 の液体培地の pCO_2 および pH を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

第 1 および第 2 の液体培地における 60×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 20】

第 1 および第 2 の液体培地における 100×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

第 1 および第 2 の液体培地における 120×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

容器内の第 1 および第 2 の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む、請求項 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 23】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、および第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加は同時に行われる、請求項 1 ～ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、および第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加は連続的に行われる、請求項 1 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

その期間にわたって、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、および第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加は定期的に行われる、請求項 1 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

その期間の間、定期的に、容器内の第 1 および第 2 の液体培地に水溶液の第 3 の体積を添加することであって、第 1 の体積と、第 2 および第 3 の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることを更に含む、請求項 1 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 27】

水溶液は塩溶液である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

塩溶液は塩化ナトリウム溶液または塩化カリウム溶液である、請求項 27 に記載の方法。 40

【請求項 29】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は同時に行われる、請求項 26 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加および第 3 の体積の添加は連続的に行われる、請求項 26 ～ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

その期間にわたって、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体 50

積の添加、および第3の体積の添加は定期的に行われる、請求項26～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

連続的または定期的に、第1の液体培地に第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270mOsm/mgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを更に含む、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

第3の液体培地は、約270mOsm/kgから約380mOsm/kgである浸透圧を有する、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第2の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む、請求項32または33に記載の方法。

【請求項35】

調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む、請求項32～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む、請求項32～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

第3の液体培地は、約10mOsm/kgから約270mOsm/kgの浸透圧を有する、請求項32に記載の方法。

【請求項38】

第3の液体培地は、約50mOsm/kgから約200mOsm/kgの浸透圧を有する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む、請求項37または38に記載の方法。

【請求項40】

調整する工程は、第3の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む、請求項37～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

調整する工程は、第3の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む、請求項37～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpHおよびpCO₂の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む、請求項32～41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

その期間にわたって、容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpCO₂を増加させ、pHを増加させることを含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpCO₂およびpHを、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

第1、第2、および第3の液体培地における60×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項32～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

第1、第2、および第3の液体培地における100×10⁶細胞/mL超の生細胞密度

10

20

30

40

50

は、その期間の間に達成される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

第 1、第 2、および第 3 の液体培地における 120×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む、請求項 3 2 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は同時に行われる、請求項 3 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5 0】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は連続的に行われる、請求項 3 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

その期間にわたって、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は定期的に行われる、請求項 3 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

哺乳類細胞は、CHO 細胞である、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5 3】

容器はバイオリアクターである、請求項 1 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

バイオリアクターは灌流バイオリアクターである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

組換えタンパク質の産生方法であって：

約 $270 \text{ mOsm} / \text{kg}$ から約 $380 \text{ mOsm} / \text{kg}$ の浸透圧を有する第 1 の液体培地中に配置された、組換えタンパク質をコードする核酸を含む哺乳類細胞を含む容器を用意することと；

30

約 32°C から約 39°C で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；

その期間の間、連続的または定期的に、第 1 の液体培地の第 1 の体積を除去し、第 1 の液体培地に第 2 の液体培地の第 2 の体積を添加することであって、第 1 および第 2 の体積はほぼ等しく、容器内の第 1 および第 2 の液体培地の浸透圧は約 $270 \text{ mOsm} / \text{kg}$ から約 $380 \text{ mOsm} / \text{kg}$ にその期間にわたって維持されることと；

組換えタンパク質を、哺乳類細胞から、または第 1 の液体培地および／もしくは第 2 の液体培地から回収することを含む、方法。

【請求項 5 6】

第 1 の液体培地は、約 $270 \text{ mOsm} / \text{kg}$ から約 $320 \text{ mOsm} / \text{kg}$ の浸透圧を有する、請求項 5 5 に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

第 2 の液体培地は、 $8 \text{ g} / \text{L}$ 超のポロキサマーを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

第 2 の液体培地は、 $10 \text{ g} / \text{L}$ 超のポロキサマーを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

第 2 の液体培地は、 $12 \text{ g} / \text{L}$ 超のポロキサマーを含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

ポロキサマーは、Pluronic F68 である、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

50

第2の液体培地は、約6.8から約7.1のpHを有する、請求項55～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】

第2の液体培地は塩化ナトリウムを含む、請求項55～61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項63】

第2の液体培地は、約800mOsm/kgから約2,500mOsm/kgの浸透圧を有する、請求項55～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項64】

第2の液体培地は、約1,200mOsm/kgから約1,800mOsm/kgの浸透圧を有する、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

添加する第2の液体培地の第2の体積を、その期間にわたって増加させる、請求項55～64のいずれか1項に記載の方法。

【請求項66】

添加する第2の液体培地の第2の体積を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧を維持することは、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で調整することを含む、請求項55～66のいずれか1項に記載の方法。

【請求項68】

調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

容器内の第1および第2の液体培地のpHおよびpCO₂の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む、請求項67に記載の方法。

【請求項71】

その期間にわたって、容器内の第1および第2の液体培地のpCO₂を増加させ、pHを増加させることを更に含む、請求項55～70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項72】

容器内の第1および第2の液体培地のpCO₂およびpHを、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

第1および第2の液体培地における60×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項55～72のいずれか1項に記載の方法。

【請求項74】

第1および第2の液体培地における100×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

第1および第2の液体培地における120×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを含む、請求項55～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項77】

その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体

10

20

30

40

50

積の添加は同時に行われる、請求項 55～76 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 78】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、および第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加は連続的に行われる、請求項 55～77 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 79】

その期間にわたって、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、および第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加は定期的に行われる、請求項 55～77 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

組換えタンパク質は第 1 および／または第 2 の液体培地中に分泌される、請求項 55～79 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 81】

組換えタンパク質は、第 1 および／または第 2 の液体培地から回収される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

その期間の間、連続的または定期的に、容器内の第 1 および第 2 の液体培地に水溶液の第 3 の体積を添加することであって、第 1 の体積と、第 2 および第 3 の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることを更に含む、請求項 55～81 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 83】

20

水溶液は塩溶液である、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

塩溶液は塩化ナトリウム溶液または塩化カリウム溶液である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は同時に行われる、請求項 82～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 86】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は連続的に行われる、請求項 82～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 87】

その期間にわたって、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は定期的に行われる、請求項 82～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 88】

連続的または定期的に、第 1 の液体培地に第 3 の液体培地の第 3 の体積を添加することであって、第 1 の体積と、第 2 および第 3 の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることを更に含む、請求項 55～81 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 89】

第 3 の液体培地は、約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg である浸透圧を有する、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧を維持することは、第 2 の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む、請求項 88 または 89 に記載の方法。

【請求項 91】

調整する工程は、第 2 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを

50

含む、請求項 88～90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 92】

調整する工程は、第 2 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む、請求項 88～90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

第 3 の液体培地は、約 0 mOsm/kg から約 270 mOsm/kg の浸透圧を有する、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 94】

第 3 の液体培地は、約 50 mOsm/kg から約 200 mOsm/kg の浸透圧を有する、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧を維持することは、第 3 の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む、請求項 93 または 94 に記載の方法。

【請求項 96】

調整する工程は、第 3 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む、請求項 93～95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

調整する工程は、第 3 の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む、請求項 93～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 98】

容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の pH および pCO_2 の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む、請求項 88～97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

その期間にわたって、容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の pCO_2 を増加させ、pH を増加させることを含む、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の pCO_2 および pH を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

第 1、第 2、および第 3 の液体培地における 60×10^6 細胞/mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 88～100 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 102】

第 1、第 2、および第 3 の液体培地における 100×10^6 細胞/mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

第 1、第 2、および第 3 の液体培地における 120×10^6 細胞/mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

容器内の第 1、第 2、および第 3 の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む、請求項 88～103 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 105】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は同時に行われる、請求項 88～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

その期間の間、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は連続的に行われる、請求項 88～104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 107】

その期間にわたって、第 1 の液体培地の第 1 の体積の除去、第 2 の液体培地の第 2 の体積の添加、および第 3 の体積の添加は定期的に行われる、請求項 88 ～ 104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 108】

組換えタンパク質は第 1、第 2、および／または第 3 の液体培地中に分泌される、請求項 88 ～ 107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

組換えタンパク質は、第 1、第 2、および／または第 3 の液体培地から回収される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

哺乳類細胞は、CHO 細胞である、請求項 55 ～ 109 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 111】

容器はバイオリアクターである、請求項 55 ～ 110 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 112】

バイオリアクターは灌流バイオリアクターである、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

組換えタンパク質は、免疫グロブリン、酵素、増殖因子、タンパク質断片、または操作されたタンパク質である、請求項 55 ～ 112 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 114】

組換えタンパク質は、哺乳類細胞から回収される、請求項 55 ～ 113 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 115】

組換えタンパク質を単離することを更に含む、請求項 55 ～ 114 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 116】

単離された組換えタンパク質を製剤化することを更に含む、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

請求項 55 ～ 114 のいずれか 1 項に記載の方法によって産生される、組換えタンパク質。

【請求項 118】

請求項 117 に記載の組換えタンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項 119】

請求項 118 に記載の医薬組成物を含む、キット。

【請求項 120】

請求項 118 に記載の医薬組成物の治療上有効な量をそれを必要とする対象に投与することを含む、対象の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 4 月 14 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 174, 900 号の優先権を主張する；本出願の全内容は参照によって本明細書に組み入れる。

【0002】

本発明は、バイオテクノロジーの方法および組換えタンパク質の製造に関する。

【背景技術】

【0003】

組換えタンパク質をコードする核酸を含む哺乳類細胞は、治療上または商業上重要なタンパク質を産生するのによく使用される。バイオテクノロジー企業は、製品パイプラインが多様である現在の状況においては、高柔軟性かつ高対費用効果の治療用タンパク質原薬

10

20

30

40

50

製造のための革新的な解決策を開発する必要に迫られている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、以下の発見に少なくとも部分的に基づいている：哺乳類細胞の灌流培養方法であって：約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg の浸透圧を有する第1の液体培地中に配置された哺乳類細胞を含む容器を用意することと；約 32°C から約 39°C で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1の液体培地の浸透圧および第2の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることとを含む、方法は、浸透圧が約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されない他の灌流細胞培養方法と比較して、培養の増殖および健全性の改善を達成する。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書では、哺乳類細胞の灌流培養方法であって：約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg （例えば、その中のいずれかの部分範囲）の浸透圧を有する第1の液体培地中に配置された哺乳類細胞を含む容器を用意することと；約 32°C から約 39°C （例えば、その中のいずれかの部分範囲）で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg （例えば、その中のいずれかの部分範囲）にその期間にわたって維持されることとを含む、方法が提供される。

20

【0006】

いくつかの実施形態では、第1の液体培地は、約 270 mOsm/kg から約 320 mOsm/kg の浸透圧を有する。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、 8 g/L 超のポロキサマーを含む。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、 10 g/L 超のポロキサマーを含む。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、 12 g/L 超のポロキサマーを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ポロキサマーは、Pluronic F68である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約 6.8 から約 7.1 のpHを有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、塩化ナトリウムを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約 800 mOsm/kg から約 $2,500\text{ mOsm/kg}$ の浸透圧を有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約 $1,200\text{ mOsm/kg}$ から約 $1,800\text{ mOsm/kg}$ の浸透圧を有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、添加する第2の液体培地の第2の体積を、その期間にわたって増加させる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、添加する第2の液体培地の第2の体積を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧を維持することは、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で調整することを含む。

30

40

【0007】

いくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む。

【0008】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1および第2の液体培地のpHおよび pCO_2 の一方または両方を、その期間の間のある時点

50

で調整することを含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む。

【0010】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、その期間にわたって、容器内の第1および第2の液体培地の pCO_2 を増加させ、 pH を増加させることを更に含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、容器内の第1および第2の液体培地の pCO_2 および pH を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる。

10

【0012】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1および第2の液体培地における 60×10^6 細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1および第2の液体培地における 100×10^6 細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1および第2の液体培地における 120×10^6 細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。

【0013】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む。

20

【0014】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体積の添加は同時に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体積の添加は連続的に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間にわたって、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体積の添加は定期的に行われる。

【0015】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、その期間の間、定期的に、容器内の第1および第2の液体培地に水溶液の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることを更に含む。

30

【0016】

いくつかの実施形態では、水溶液は塩溶液である。いくつかの実施形態では、塩溶液は塩化ナトリウム溶液または塩化カリウム溶液である。

【0017】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は同時に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は連続的に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間にわたって、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は定期的に行われる。

40

【0018】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、連続的または定期的に、第1の液体培地に第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3

50

の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm/mg から約 380 mOsm/kg にその期間にわたって維持されることを更に含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、約 270 mOsm/kg から約 380 mOsm/kg である浸透圧を有する。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第2の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む。

10

【0020】

いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、約 10 mOsm/kg から約 270 mOsm/kg の浸透圧を有する。いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、約 50 mOsm/kg から約 200 mOsm/kg の浸透圧を有する。

【0021】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。

【0022】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、調整する工程は、第3の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む。

20

【0023】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、調整する工程は、第3の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む。

【0024】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の pH および pCO_2 の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、その期間にわたって、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の pCO_2 を増加させ、pH を増加させることを含む。いくつかの実施形態では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の pCO_2 および pH を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる。

30

【0025】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、第1、第2、および第3の液体培地における 60×10^6 細胞/mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1、第2、および第3の液体培地における 100×10^6 細胞/mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1、第2、および第3の液体培地における 120×10^6 細胞/mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。

【0026】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は同時に行われる。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は連続的に行われる。本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態では、その期間にわたって、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は定期的に行われる。

40

【0027】

50

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、哺乳類細胞はCHO細胞である。

【0028】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器はバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは灌流バイオリアクターである。

【0029】

本明細書ではまた、組換えタンパク質の産生方法であって：約270mOsm/kgから約380mOsm/kg（例えば、その中のいずれかの部分範囲）の浸透圧を有する第1の液体培地中に配置された、組換えタンパク質をコードする核酸を含む哺乳類細胞を含む容器を用意することと；約32℃から約39℃（例えば、その中のいずれかの部分範囲）で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kg（例えば、その中のいずれかの部分範囲）にその期間にわたって維持されることと；組換えタンパク質を、哺乳類細胞から、または第1の液体培地および／もしくは第2の液体培地から回収することを含む、方法も提供される。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、第1の液体培地は、約270mOsm/kgから約320mOsm/kgの浸透圧を有する。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、8g/L超のポロキサマーを含む。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、10g/L超のポロキサマーを含む。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、12g/L超のポロキサマーを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、ポロキサマーは、Pluronic F68である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約6.8から約7.1のpHを有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、塩化ナトリウムを含む。

20

【0031】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約800mOsm/kgから約2,500mOsm/kgの浸透圧を有する。いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約1,200mOsm/kgから約1,800mOsm/kgの浸透圧を有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、添加する第2の液体培地の第2の体積を、その期間にわたって増加させる。いくつかの実施形態では、添加する第2の液体培地の第2の体積を、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる。

30

【0032】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧を維持することは、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で調整することを含む。いくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1および第2の液体培地のpHおよびpCO₂の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む。いくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む。

40

【0033】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、その期間にわたって、容器内の第1および第2の液体培地のpCO₂を増加させ、pHを増加させることを更に含む。いくつかの実施形態では、容器内の第1および第2の液体培地のpCO₂およびpHを、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる。

【0034】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1および第2の液体培

50

地における 60×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1および第2の液体培地における 100×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1および第2の液体培地における 120×10^6 細胞 / mL 超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。

【0035】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体積の添加は同時に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体積の添加は連続的に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間にわたって、第1の液体培地の第1の体積の除去、および第2の液体培地の第2の体積の添加は定期的に行われる。

10

【0036】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は第1および／または第2の液体培地中に分泌される。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、第1および／または第2の液体培地から回収される。

【0037】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、その期間の間、連続的または定期的に、容器内の第1および第2の液体培地に水溶液の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm / kg から約 380 mOsm / kg にその期間にわたって維持されることを更に含む。いくつかの実施形態では、水溶液は塩溶液である。いくつかの実施形態では、塩溶液は塩化ナトリウム溶液または塩化カリウム溶液である。

20

【0038】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は同時に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は連続的に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間にわたって、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は定期的に行われる。

30

【0039】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、連続的または定期的に、第1の液体培地に第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約 270 mOsm / kg から約 380 mOsm / kg にその期間にわたって維持されることを更に含む。

40

【0040】

いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、約 270 mOsm / kg から約 380 mOsm / kg である浸透圧を有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第2の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、調整する工程は、第2の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む。いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、約 0 mOsm / kg から約 27

50

0 mOsm/kgの浸透圧を有する。いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、約50 mOsm/kgから約200 mOsm/kgの浸透圧を有する。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、調整する工程は、第3の液体培地の流量をその期間の間のある時点で増加させることを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、調整する工程は、第3の液体培地の流量をその期間の間のある時点で減少させることを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpHおよびpCO₂の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、方法は、その期間にわたって、容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpCO₂を増加させ、pHを増加させることを含む。いくつかの実施形態では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpCO₂およびpHを、生細胞密度に基づいてその期間にわたって増加させる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1、第2、および第3の液体培地における60×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1、第2、および第3の液体培地における100×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。いくつかの実施形態では、第1、第2、および第3の液体培地における120×10⁶細胞/mL超の生細胞密度は、その期間の間に達成される。

20

【0042】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧をその期間の間モニタリングすることを更に含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は同時に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間の間、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は連続的に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、その期間にわたって、第1の液体培地の第1の体積の除去、第2の液体培地の第2の体積の添加、および第3の体積の添加は定期的に行われる。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は第1、第2、および/または第3の液体培地中に分泌される。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、第1、第2、および/または第3の液体培地から回収される。

30

【0043】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、哺乳類細胞はCHO細胞である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器はバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは灌流バイオリアクターである。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、免疫グロブリン、酵素、増殖因子、タンパク質断片、または操作されたタンパク質である。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、組換えタンパク質は、哺乳類細胞から回収される。

40

【0044】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、組換えタンパク質を単離することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、単離された組換えタンパク質を製剤化することを更に含む。

【0045】

本明細書では、本明細書に記載の方法のいずれかによって産生される組換えタンパク質が提供される。本明細書ではまた、本明細書に記載の組換えタンパク質のいずれかを含む医薬組成物、および本明細書に記載の医薬組成物のいずれかを含むキットも提供される。

【0046】

50

本明細書ではまた、本明細書に記載の医薬組成物のいずれかの治療上有効な量をそれを必要とする対象に投与することを含む、対象の治療方法も提供される。

【0047】

本明細書で使用する場合、名詞の前の単語「a」は、特定の名詞の1つまたはそれ以上を表す。例えば、「哺乳類細胞」という句は、「1つまたはそれ以上の哺乳類細胞」を表す。

【0048】

用語「哺乳類細胞」は、任意の哺乳類（例えば、ヒト、ハムスター、マウス、ミドリザル、ラット、ブタ、ウシ、またはウサギ）からの任意の細胞またはそれに由来する任意の細胞を意味する。例えば、哺乳類細胞は不死化細胞であり得る。いくつかの実施形態では、哺乳類細胞は、分化または未分化細胞である。哺乳類細胞の非限定的な例が、本明細書に記載される。哺乳類細胞の追加の例は、当技術分野で知られている。

10

【0049】

用語「培養」または「細胞培養」は、制御された一連の物理的条件下での哺乳類細胞の維持または増殖を意味する。

【0050】

用語「哺乳類細胞の培養物」、「培養物」、または「細胞培養物」は、制御された一連の物理的条件下で維持または増殖させる複数の哺乳類細胞を含む液体培地を意味する。

【0051】

用語「液体培地」または「液体培地」は、細胞（例えば、哺乳類細胞）がインビトロで成長または増殖するのに十分な栄養素を含む液体を意味する。例えば、液体培地は、以下の1つまたはそれ以上を含み得る：アミノ酸（例えば、20アミノ酸）、プリン（ヒポキサンチン）、ピリミジン（例えば、チミジン）、コリン、イノシトール、チアミン、葉酸、ピオチン、カルシウム、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チミジン、シアノコバラミン、ビルビン酸塩、リボ酸、マグネシウム、グルコース、ナトリウム、カリウム、鉄、銅、亜鉛、および重炭酸ナトリウム。いくつかの実施形態では、液体培地は、哺乳類からの血清を含み得る。いくつかの実施形態では、液体培地は、哺乳類からの血清または別の抽出物を含まない（定義された液体培地）。いくつかの実施形態では、液体培地は、微量金属、哺乳類成長ホルモン、および／または哺乳類増殖因子を含み得る。液体培地の別の例は、最少培地（例えば、無機塩、炭素源、および水のみを含む培地）である。液体培地の非限定的な例が本明細書に記載される。液体培地の追加の例は、当技術分野で知られており、市販されている。液体培地は、任意の密度の哺乳類細胞を含み得る。例えば、本明細書で使用する場合、バイオリアクターから除去される一定量の液体培地は、哺乳類細胞を実質的に含まない場合がある。

20

30

【0052】

用語「無動物由来成分液体培地」は、哺乳類に由来する成分（例えば、タンパク質または血清）を含まない液体培地を意味する。

【0053】

用語「無血清液体培地」は、哺乳類血清を含まない液体培地を意味する。

【0054】

用語「血清含有液体培地」は、哺乳類血清を含む液体培地を意味する。

40

【0055】

用語「化学的に定義された液体培地」は、専門用語であり、全ての化学成分が既知である液体培地を意味する。例えば、化学的に定義された液体培地では、ウシ胎仔血清、ウシ血清アルブミン、またはヒト血清アルブミンは、これらの調製物が通常アルブミンおよび脂質の複雑な混合物を含むために含まれない。

【0056】

用語「無タンパク質液体培地」は、タンパク質（例えば、任意の検出可能なタンパク質）を含まない液体培地を意味する。

【0057】

50

用語「清澄化液体培地」は、細菌または酵母細胞を実質的に含まない（例えば、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、または99%含まない）細菌または酵母細胞培養から得られる液体培地を意味する。

【0058】

用語「攪拌」は、バイオリアクター内の液体培地の一部をかき混ぜるか、または他の方法で移動させることを意味する。これは、例えば、バイオリアクター内の液体培地の溶存O₂濃度を増加させるために行われる。攪拌は、当技術分野で知られている任意の方法、例えば、装置またはプロペラを使用して行い得る。バイオリアクター内の液体培地の一部を攪拌するのに使用できる例示的な器具および方法は、当技術分野で知られている。

【0059】

用語「免疫グロブリン」は、免疫グロブリンタンパク質（例えば、可変ドメイン配列、フレームワーク配列、または定常ドメイン配列）の少なくとも15アミノ酸のアミノ酸配列（例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、または100アミノ酸）を含むポリペプチドを意味する。免疫グロブリンは、例えば、軽鎖免疫グロブリンの少なくとも15アミノ酸を含み得、例えば、重鎖免疫グロブリンの少なくとも15アミノ酸を含み得る。免疫グロブリンは、単離された抗体（例えば、IgG、IgE、IgD、IgA、またはIgM）であってもよい。免疫グロブリンは、抗体断片、例えば、Fab断片、F(ab')₂断片、またはscFv断片であってもよい。免疫グロブリンはまた、二重特異性抗体もしくは三重特異性抗体、または2量体、3量体、多量体抗体、またはダイアボディ、Affibody（登録商標）、もしくはNanobody（登録商標）であってもよい。免疫グロブリンはまた、少なくとも1つの免疫グロブリンドメイン（例えば、融合タンパク質）を含む操作されたタンパク質であってもよい。免疫グロブリンの非限定的な例は本明細書に記載され、免疫グロブリンの追加の例は当技術分野で知られている。組換え免疫グロブリンは、本明細書に記載の方法のいずれかを使用して産生される。

【0060】

用語「操作されたタンパク質」は、生物（例えば、哺乳類）内に存在する内因性核酸では天然にはコードされていないポリペプチドを意味する。操作されたタンパク質の例としては、酵素（例えば、操作された酵素の安定性および／または触媒活性の増加をもたらす、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換、欠失、挿入、または付加を有する）、融合タンパク質、抗体（例えば、二価抗体、三価抗体、またはダイアボディ）、ならびに少なくとも1つの組換え足場配列を含む抗原結合タンパク質が挙げられる。

【0061】

用語「分泌されるタンパク質」または「分泌される組換えタンパク質」は、哺乳類細胞内で翻訳されるときに、少なくとも1つの分泌シグナル配列を元々含んでいたタンパク質（例えば、組換えタンパク質）を意味し、該タンパク質は、少なくとも部分的に、哺乳類細胞内で分泌シグナル配列が酵素的に切断されることを通して、細胞外空間（例えば、液体培地）に少なくとも部分的に分泌される。当業者は、「分泌される」タンパク質が分泌されるタンパク質とみなされるために細胞から完全に分離する必要はないことを理解するであろう。

【0062】

用語「灌流バイオリアクター」は、第1の液体培地内の複数の細胞（例えば、哺乳類細胞）を含むバイオリアクターを意味し、バイオリアクター内に存在する細胞を培養することは、第1の液体培地を定期的または連続的に除去すること、ならびに同時に、またはその直後に、実質的に同じ体積の第2の液体培地をバイオリアクターに添加することを含む。いくつかの例では、培養期間の間、第1の液体培地の体積を漸増的な期間（例えば、約24時間の期間、約1分間と約24時間との間の期間、または24時間超の期間）にわたって除去および添加して漸進的に変化（例えば、増加または減少）させる（例えば、1日当たりの液体培地の再供給量）。1日に除去および置換される培地の割合は、培養する特定の細胞、初期播種密度、および特定の時点での細胞密度に応じて異なり得る。「RV」

10

20

30

40

50

または「リアクター体積」は、培養処理の開始時に存在する液体培地の体積（例えば、播種後に存在する液体培地の合計体積）を意味する。

【0063】

「比生産性」または「SP」は、専門用語であり、本明細書で使用する場合、1哺乳類細胞毎に1日当たり産生される組換え治療用タンパク質の質量または酵素活性を指す。組換え治療用抗体のSPは、通常、質量／細胞／日として測定する。組換え治療用酵素のSPは、通常、単位／細胞／日または（単位／質量）／細胞／日として測定する。

【0064】

「体積生産性」または「VP」は、専門用語であり、本明細書で使用する場合、培養の体積毎（例えば、バイオリアクター、容器、またはチューブの体積の1L毎）に1日当たり産生される組換え治療用タンパク質の質量または酵素活性を指す。組換え治療用抗体のVPは、通常、質量／L／日として測定する。組換え治療用酵素のVPは、通常、単位／L／日または質量／L／日として測定する。

【0065】

「ある濃度のポロキサマー」および「ポロキサマー濃度」という句は、本明細書では互換的に使用される。「Xg／Lまたはそれ以上のポロキサマー」および「Xg／LまたはXg／L以上の濃度のポロキサマー」という句は、本明細書では互換的に使用される。

【0066】

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書では、本発明で使用するための方法および材料が記載されるが；他の適切な当技術分野で知られている方法および材料を使用することもできる。材料、方法、および実施例は、単なる例示であり、限定することを意図するものではない。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、および他の参考文献は、その全体を参照によって組み入れる。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が優先する。

【0067】

本発明の他の機能および利点は、以下の詳細な説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1A】振とうフラスコで異なる浸透圧（mOsm／kg）で行うバッチ細胞培養実行（n＝2）における経時的な生細胞密度（VCD）（100万細胞／mL）のグラフである。0、4、および7日目の平均浸透圧をmOsmで示す。

【図1B】Ambr15マイクロバイオリアクターで異なる浸透圧（mOsm／kg）で行うバッチ細胞培養実行（n＝2）における経時的な生細胞密度（VCD）（100万細胞／mL）のグラフである。0、2、5、7、および9日目の平均浸透圧をmOsmで示す。

【図2A】振とうフラスコでの4日目の浸透圧（mOsm／kg）に対する平均細胞直径（μm）のグラフである。

【図2B】Ambr15マイクロバイオリアクターでの5日目の浸透圧（mOsm／kg）に対する平均細胞直径（μm）のグラフである。

【図3A】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な浸透圧（mOsm／kg）のグラフである。実行V22（「V22」）は、バイオリアクターでの高い浸透圧をもたらす水供給に対する濃縮細胞培地供給の比を有した。

【図3B】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な生細胞密度（VCD）（100万細胞／mL）（実線）および生細胞平均直径（μm）（破線）のグラフである。実行V22（「V22」）は、高い浸透圧を経験したことで、増殖速度が低下し、また、生存率が減少した。

【図3C】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な回収体積生産性（VP）（g／L／日）（実線）および回収力価（g／L）（破線）のグラフである。

10

20

30

40

50

実行V22（「V22」）は、高い浸透圧を有し、生産性が減少した。

【図3D】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な生存率（%）（実線）および乳酸脱水素酵素（LDH）産生量（U/L/day）（破線）のグラフである。実行V22（「V22」）は、高い浸透圧を有し、培養の健全性が悪いことを示すLDH産生量が高くなった。

【図3E】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的なグルコース濃度（g/L）（実線）および乳酸濃度（g/L）（破線）のグラフである。実行V22（「V22」）は、高い浸透圧を有し、乳酸産生の上昇につながった。

【図4A】Protein 3 バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な生細胞密度（VCD）（100万細胞/mL）（実線）および生存率（%）（破線）のグラフである。高い浸透圧のために、VCDおよび培養生存率が減少した。

【図4B】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な乳酸濃度（g/L）（実線）および乳酸浸透圧（mOsm/kg）（破線）のグラフである。高い浸透圧は乳酸産生の上昇につながった。

【図5A】1セットの灌流細胞培養バイオリアクターでの経時的な浸透圧（mOsm/kg）のグラフであり、異なる浸透圧プロファイルを示すグラフである。

【図5B】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な生細胞密度（VCD）（100万細胞/mL）（実線）および生細胞平均直径（μm）（破線）のグラフである。VCDプロファイルの違いは、培養浸透圧の違いに対応する。

【図6A】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における導電率（mS/cm）に対する浸透圧（mOsm/kg）のグラフであり、全てのデータを使用したグラフである。

【図6B】バイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における導電率（mS/cm）に対する浸透圧（mOsm/kg）のグラフであり、リアクタースケールおよび培養の相（低または高バイオマス）によって特徴付けられるデータを使用したグラフである。

【図7】自動化導電率フィードバック制御を有するバイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な導電率（mS/cm）（実線）および浸透圧（mOsm/kg）のグラフ（個々のデータ点）である。

【図8A】自動化導電率フィードバック制御を有する10Lバイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な浸透圧（mOsm/kg）のグラフである。

【図8B】10Lバイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な生細胞密度（VCD）（100万細胞/mL）（実線）および生細胞平均直径（μm）（破線）のグラフであり、一貫したVCDプロファイルを示すグラフである。

【図9】異なるプローブの種類を用いて測定した浸透圧標準物質の浸透圧（mOsm/kg）に対する導電率（mS/cm）のグラフである。

【図10】100Lバイオリアクターで行った灌流細胞培養の実行における経時的な浸透圧（mOsm/kg）のグラフであり、ラマン分光法測定から予測される浸透圧を用いたグラフである。

【図11】10Lバイオリアクターでの、60日間の灌流細胞培養処理の30日目の浸透圧（mOsm/kg）に対する生細胞密度（VCD）（100万細胞/mL）のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0069】

本明細書では、哺乳類細胞の灌流培養方法であって：約270mOsm/kgから約380mOsm/kgの浸透圧を有する第1の液体培地中に配置された哺乳類細胞を含む容器を用意することと；約32℃から約39℃で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることとを含む、方法が

提供される。これらの方法のいくつかの実施形態は、その期間の間、連続的または定期的に、容器内の第1および第2の液体培地に水溶液の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを更に含む。これらの方法のいくつかの実施形態は、連続的または定期的に、第1の液体培地に第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを更に含む。いくつかの例では、第3の液体培地は、塩化ナトリウム(NaCl)または塩化カリウム(KCl)を含む。いくつかの例では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。他の例では、浸透圧は、第3の液体培地の流量によって制御する。他の例では、第3の液体培地は、約0mOsm/kgから約270mOsm/kgの浸透圧を有し得る。例えば、第2の液体培地が380mOsm/kg超の浸透圧を有する場合、約0mOsm/kgから約100mOsm/kgの浸透圧を有する第3の液体培地を使用できる。いくつかの例では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地における浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。

10

【0070】

本明細書ではまた、組換えタンパク質の産生方法であって：約270mOsm/kgから約380mOsm/kgの浸透圧を有する第1の液体培地中に配置された、組換えタンパク質をコードする核酸を含む哺乳類細胞を含む容器を用意することと；約32℃から約39℃で哺乳類細胞をある期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることと；組換えタンパク質を、哺乳類細胞から、または第1の液体培地および／もしくは第2の液体培地から回収することを含む、方法も提供される。これらの方法のいくつかの実施形態は、その期間の間、連続的または定期的に、容器内の第1および第2の液体培地に水溶液の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを更に含む。これらの方法のいくつかの実施形態は、連続的または定期的に、第1の液体培地に第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270mOsm/kgから約380mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを更に含む。いくつかの例では、第3の液体培地は、塩化ナトリウム(NaCl)または塩化カリウム(KCl)を含む。いくつかの例では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。他の例では、第3の液体培地は、約0mOsm/kgから約270mOsm/kgの浸透圧を有し得る。例えば、第2の液体培地が380mOsm/kg超の浸透圧を有する場合、約0mOsm/kgから約100mOsm/kgの浸透圧を有する第3の液体培地を使用できる。いくつかの例では、容器内の第1、第2、および第3の液体培地における浸透圧を維持することは、第3の液体培地の流量をその期間の間調整することを含む。

20

30

40

【0071】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、第1および第2の液体培地における、または第1、第2、および第3の液体培地における 60×10^6 細胞/mL超の生細胞密度を有する細胞培養を、その期間の間に達成し得る。細胞培養の生細胞密度を決めるための方法は、当技術分野でよく知られている。

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、少なくとも5日間（例えば、少なくとも10日間、少なくとも15日間、少なくとも20日間、少なくとも25日間、少なくとも30日間、少なくとも35日間、少なくとも40日間、少なくとも45日間、少なくとも50日間、少なくとも55日間、少なくとも60日間、少なくとも65日間、または少なくとも70日間）の培養期間にわたって75%超（例えば、80%超、85%超、または90%超）である細胞生存率パーセンテージを有する細胞培養を提供する。

培養体積（10 L～10,000 L 流加バッチ、50～500 L～2000 L、50 L、500 L、1000 L、2000 L）

[illegible]

50

000Lとの間、約7,000Lと約8,000Lとの間、または約8,000Lと約10,000Lとの間、あるいは、10L、20L、50L、100L、500L、1,000L、または2,000L)の体積(その期間の開始時)を有する第1の液体培地内の哺乳類細胞(例えば、本明細書に記載の哺乳類細胞のいずれか)を含む容器(例えば、本明細書に記載の容器のいずれか)を提供する。哺乳類細胞をインキュベートする工程は、細胞の維持および増殖を可能とする条件下で行う。

【0074】

第1の液体培地は、約270mOsm/kgから約320mOsm/kg(例えば、約270mOsm/kgから約315mOsm/kg、約270mOsm/kgから約310mOsm/kg、約270mOsm/kgから約305mOsm/kg、約270mOsm/kgから約300mOsm/kg、約270mOsm/kgから約295mOsm/kg、約270mOsm/kgから約290mOsm/kg、約270mOsm/kgから約285mOsm/kg、約270mOsm/kgから約280mOsm/kg、約270mOsm/kgから約275mOsm/kg、約275mOsm/kgから約320mOsm/kg、約275mOsm/kgから約315mOsm/kg、約275mOsm/kgから約310mOsm/kg、約275mOsm/kgから約305mOsm/kg、約275mOsm/kgから約300mOsm/kg、約275mOsm/kgから約295mOsm/kg、約275mOsm/kgから約290mOsm/kg、約275mOsm/kgから約285mOsm/kg、約275mOsm/kgから約280mOsm/kg、約280mOsm/kgから約320mOsm/kg、約280mOsm/kgから約315mOsm/kg、約280mOsm/kgから約310mOsm/kg、約280mOsm/kgから約305mOsm/kg、約280mOsm/kgから約300mOsm/kg、約280mOsm/kgから約295mOsm/kg、約280mOsm/kgから約290mOsm/kg、約280mOsm/kgから約285mOsm/kg、約285mOsm/kgから約320mOsm/kg、約285mOsm/kgから約315mOsm/kg、約285mOsm/kgから約310mOsm/kg、約285mOsm/kgから約305mOsm/kg、約285mOsm/kgから約300mOsm/kg、約285mOsm/kgから約295mOsm/kg、約285mOsm/kgから約290mOsm/kg、約290mOsm/kgから約320mOsm/kg、約290mOsm/kgから約315mOsm/kg、約290mOsm/kgから約310mOsm/kg、約290mOsm/kgから約305mOsm/kg、約290mOsm/kgから約300mOsm/kg、約290mOsm/kgから約295mOsm/kg、約295mOsm/kgから約320mOsm/kg、約295mOsm/kgから約315mOsm/kg、約295mOsm/kgから約310mOsm/kg、約295mOsm/kgから約305mOsm/kg、約295mOsm/kgから約300mOsm/kg、約300mOsm/kgから約320mOsm/kg、約300mOsm/kgから約315mOsm/kg、約300mOsm/kgから約310mOsm/kg、約300mOsm/kgから約305mOsm/kg、約305mOsm/kgから約320mOsm/kg、約305mOsm/kgから約315mOsm/kg、約305mOsm/kgから約310mOsm/kg、約310mOsm/kgから約320mOsm/kg、約310mOsm/kgから約315mOsm/kg、または約315mOsm/kgから約320mOsm/kg)の浸透圧を有し得る。第1の液体培地の非限定的な態様および例が本明細書に記載される。

【0075】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1の液体培地(例えば、本明細書に記載の例示的な第1の液体培地のいずれか)に添加する第2の液体培地(例えば、本明細書に記載の例示的な第2の液体培地のいずれか)の第2の体積(および場合により第3の液体培地)を、その期間の間のより早い時点で添加する第2の液体培地の第2の体積と比較して、その期間の間、少なくとも10%(例えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも45%、少なくとも

50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、
少なくとも400%、または少なくとも500%、あるいは約10%から約500%、
約10%から約400%、約10%から約300%、約10%から約200%、約10%
から約100%、約10%から約50%、約10%から約20%、約20%から約500
%、約20%から約400%、約20%から約300%、約20%から約200%、約20
%から約100%、約20%から約50%、約20%から約40%、約20%から約30
%、約30%から約500%、約30%から約400%、約30%から約300%、約3
0%から約200%、約30%から約100%、約30%から約50%、約30%から約
40%、約40%から約500%、約40%から約400%、約40%から約300%、約4
0%から約200%、約40%から約100%、約40%から約50%、約50%から約
500%、約50%から約400%、約50%から約300%、約50%から約200%
、約50%から約100%、約50%から約60%、約60%から約500%、約60%
から約400%、約60%から約300%、約60%から約200%、約60%から約1
00%、約60%から約80%、約60%から約70%、約70%から約500%、約7
0%から約400%、約70%から約300%、約70%から約200%、約70%から
約100%、約70%から約80%、約80%から約500%、約80%から約400%
、約80%から約300%、約80%から約200%、約80%から約100%、約80
%から約90%、約90%から約500%、約90%から約400%、約90%から約3
00%、約90%から約200%、約90%から約100%、約100%から約500%
、約100%から約400%、約100%から約300%、約100%から約200%、
約100%から約150%、約200%から約500%、約200%から約400%、約
200%から約300%、約200%から約250%、約300%から約500%、約3
00%から約400%、約400%から約500%、または約450%から約500%)
増加させる。

10

20

30

40

50

【0076】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1の液体培地（例えば、
本明細書に記載の第1の液体培地のいずれか）に添加する第2の液体培地（例えば、本
明細書に記載の例示的な第2の液体培地のいずれか）の第2の体積（および場合により第
3の液体培地に対して）を、その期間の間のより早い時点で添加する第2の液体培地の第
2の体積と比較して、生細胞密度に基づいてその期間にわたって、少なくとも10%（例
えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少
なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも
55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、
少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくと
も100%、少なくとも120%、少なくとも140%、少なくとも160%、少なくと
も180%、少なくとも200%、少なくとも220%、少なくとも240%、少なくと
も260%、少なくとも280%、少なくとも300%、少なくとも320%、少なくと
も340%、少なくとも360%、少なくとも380%、少なくとも400%、少なくと
も420%、少なくとも440%、少なくとも460%、少なくとも480%、または少
なくとも500%、あるいは約10%から約500%（または例えば、本明細書に記載の
この範囲のいずれかの部分範囲）増加させる。

【0077】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1の液体培地に添加す
る第2の液体培地（および場合により第3の液体培地）の流量を、その期間の間のより早
い時点での第2の液体培地の流量と比較して、その期間の間、少なくとも10%（例
えば、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少
なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55
%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少
なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくと
も100%、少なくとも120%、少なくとも140%、少なくとも160%、少なくと

80%、少なくとも200%、少なくとも220%、少なくとも240%、少なくとも260%、少なくとも280%、または少なくとも300%、あるいは約10%から約300%、約10%から約250%、約10%から約200%、約10%から約150%、約10%から約100%、約10%から約90%、約10%から約80%、約10%から約70%、約10%から約60%、約10%から約50%、約10%から約40%、約10%から約30%、約10%から約20%、約20%から約300%、約20%から約250%、約20%から約200%、約20%から約150%、約20%から約100%、約20%から約90%、約20%から約80%、約20%から約70%、約20%から約60%、約20%から約50%、約20%から約40%、約20%から約30%、約30%から約300%、約30%から約250%、約30%から約200%、約30%から約150%、約30%から約100%、約30%から約90%、約30%から約80%、約30%から約70%、約30%から約60%、約30%から約50%、約30%から約40%、約40%から約300%、約40%から約250%、約40%から約200%、約40%から約150%、約40%から約100%、約40%から約90%、約40%から約80%、約40%から約70%、約40%から約60%、約40%から約50%、約50%から約300%、約50%から約250%、約50%から約200%、約50%から約150%、約50%から約100%、約50%から約90%、約50%から約80%、約50%から約70%、約50%から約60%、約60%から約300%、約60%から約250%、約60%から約200%、約60%から約150%、約60%から約100%、約60%から約90%、約60%から約80%、約60%から約70%、約70%から約300%、約70%から約250%、約70%から約200%、約70%から約150%、約70%から約100%、約70%から約90%、約70%から約80%、約80%から約300%、約80%から約250%、約80%から約200%、約80%から約150%、約80%から約100%、約80%から約90%、約90%から約300%、約90%から約250%、約90%から約200%、約90%から約150%、約90%から約100%、約100%から約300%、約100%から約250%、約100%から約200%、約100%から約150%、約150%から約300%、約150%から約250%、約150%から約200%、約200%から約300%、約200%から約250%、または約250%から約300%)増加させる。

10

20

30

40

50

【0078】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1の液体培地に添加する第2の液体培地（および場合により第3の液体培地）の流量を、その期間の間のより早い時点での第2の液体培地の流量と比較して、その期間の間、少なくとも10%（例えば、少なくとも12%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも18%、少なくとも20%、少なくとも22%、少なくとも24%、少なくとも25%、少なくとも26%、少なくとも28%、少なくとも30%、少なくとも32%、少なくとも34%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも38%、少なくとも40%、少なくとも42%、少なくとも44%、少なくとも45%、少なくとも46%、少なくとも48%、少なくとも50%、少なくとも52%、少なくとも54%、少なくとも55%、少なくとも56%、少なくとも58%、少なくとも60%、少なくとも62%、少なくとも64%、少なくとも65%、少なくとも66%、少なくとも68%、少なくとも70%、少なくとも72%、少なくとも74%、少なくとも76%、少なくとも78%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%、あるいは約1%から約100%、約1%から約90%、約1%から約80%、約1%から約70%、約1%から約60%、約1%から約50%、約1%から約45%、約1%から約40%、約1%から約35%、約1%から約30%、約1%から約25%、約1%から約20%、約1%から約15%、約1%から約10%、約1%から約5%、約5%から約100%、約5%から約90%、約5%から約80%、約5%から

20

30

40

50

との間、約 10 日間と約 35 日間との間、約 10 日間と約 30 日間との間、約 10 日間と約 25 日間との間、約 10 日間と約 20 日間との間、約 10 日間と約 15 日間との間、約 15 日間と約 100 日間との間、約 15 日間と約 95 日間との間、約 15 日間と約 90 日間との間、約 15 日間と約 85 日間との間、約 15 日間と約 80 日間との間、約 15 日間と約 75 日間との間、約 15 日間と約 70 日間との間、約 15 日間と約 65 日間との間、約 15 日間と約 60 日間との間、約 15 日間と約 55 日間との間、約 15 日間と約 50 日間との間、約 15 日間と約 45 日間との間、約 15 日間と約 40 日間との間、約 15 日間と約 35 日間との間、約 15 日間と約 30 日間との間、約 15 日間と約 25 日間との間、約 15 日間と約 20 日間との間、約 30 日間と約 100 日間との間、約 30 日間と約 90 日間との間、約 30 日間と約 80 日間との間、約 30 日間と約 70 日間との間、約 30 日間と約 60 日間との間、約 30 日間と約 50 日間との間、約 30 日間と約 40 日間との間、約 40 日間と約 100 日間との間、約 40 日間と約 90 日間との間、約 40 日間と約 80 日間との間、約 40 日間と約 70 日間との間、約 40 日間と約 60 日間との間、約 40 日間と約 50 日間との間、約 50 日間と約 100 日間との間、約 50 日間と約 90 日間との間、約 50 日間と約 80 日間との間、約 50 日間と約 70 日間との間、約 50 日間と約 60 日間との間、約 60 日間と約 100 日間との間、約 60 日間と約 90 日間との間、約 60 日間と約 80 日間との間、約 60 日間と約 70 日間との間、約 70 日間と約 100 日間との間、約 70 日間と約 90 日間との間、約 70 日間と約 80 日間との間、約 80 日間と約 100 日間との間、約 80 日間と約 90 日間との間、または約 90 日間と約 100 日間との間、あるいは 7 日間、21 日間、28 日間、30 日間、31 日間、45 日間、60 日間、または 90 日間) である。

10

20

【0080】

哺乳類細胞

本明細書で提供される方法で培養した (例えば、灌流培養した) 哺乳類細胞は、浮遊状態で増殖する細胞または付着細胞であり得る。本明細書に記載の方法のいずれかで培養できる哺乳類細胞の非限定的な例としては以下が挙げられる: チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (例えば、CHO DG44 細胞または CHO-K1s 細胞)、Sp2.0、骨髓腫細胞 (例えば、NS/O)、B 細胞、ハイブリドーマ細胞、T 細胞、ヒト胎児腎臓 (HEK) 細胞 (例えば、HEK 293E および HEK 293F)、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞 (ペロ) 細胞、NSO 細胞、仔ハムスター腎臓 (BHK) 細胞、PerC6 細胞、ペロ細胞、HT-1080 細胞、ならびにメイディン・ダービー・イヌ (コッカースパニエル) 腎臓上皮細胞 (MDCK) 細胞。付着細胞が培養されるいくつかの例では、培養はまた、複数のマイクロキャリア (例えば、1 つまたはそれ以上の細孔を含むマイクロキャリア) も含み得る。本明細書に記載の方法のいずれかで培養できる追加の哺乳類細胞は、当技術分野で知られている。

30

【0081】

哺乳類細胞は、組換えタンパク質 (例えば、本明細書に記載の例示的な組換えタンパク質のいずれか) をコードする組換え核酸 (例えば、哺乳類細胞のゲノムに安定に組み込まれた核酸) を含み得る。例示的な組換えタンパク質をコードする組換え核酸の非限定的な例は、本明細書に記載の方法を使用して産生できる組換えタンパク質と同様に、以下に記載される。いくつかの例では、バイオリアクター (例えば、本明細書に記載のバイオリアクターのいずれか) 内で培養する哺乳類細胞は、より大規模な培養に由来する。

40

【0082】

組換えタンパク質をコードする核酸は、分子生物学および分子遺伝学で知られている多様な方法を使用して哺乳類細胞に導入できる。非限定的な例としては、トランスフェクション (例えば、リポフェクション)、形質導入 (例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、またはレトロウイルス感染)、およびエレクトロポレーションが挙げられる。いくつかの例では、組換えタンパク質をコードする核酸は、哺乳類細胞の染色体に安定に組み込まれない (一過性トランスフェクション) が、他の例では、核酸は組み込まれる。あるいはまたは更に、組換えタンパク質をコードする核酸は、プラスミド中に、および/または

50

10

20

30

40

50

任意の本明細書に記載の方法における培養工程は、容器、例えば、バイオリアクター（例えば、灌流バイオリアクター）を使用して行うことができる。バイオリアクター（例えば、灌流バイオリアクター）は、約１０Ｌと約１０，０００Ｌとの間（例えば、約１０Ｌと約８，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約７，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約６，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約５，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約４，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約３，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約２，５００Ｌとの間、約１０Ｌと約２，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約１，５００Ｌとの間、約１０Ｌと約１，０００Ｌとの間、約１０Ｌと約５００Ｌとの間、約１０Ｌと約２００Ｌとの間、約１０Ｌと約１００Ｌとの間、約２０Ｌと約１０，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約８，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約７，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約６，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約５，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約４，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約３，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約２，５００Ｌとの間、約２０Ｌと約２，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約１，５００Ｌとの間、約２０Ｌと約１，０００Ｌとの間、約２０Ｌと約５００Ｌとの間、約２０Ｌと約２００Ｌとの間、約２０Ｌと約１００Ｌとの間、約１００Ｌと約１０，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約８，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約７，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約６，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約５，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約４，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約３，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約２，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約１，５００Ｌとの間、約１００Ｌと約１，０００Ｌとの間、約１００Ｌと約８００Ｌとの間、約１００Ｌと約７００Ｌとの間、約１００Ｌと約６００Ｌとの間、約１００Ｌと約５００Ｌとの間、約１００Ｌと約４００Ｌとの間、約１００Ｌと約３００Ｌとの間、約１００Ｌと約２００Ｌとの間、約５００Ｌと約１０，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約８，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約７，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約６，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約５，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約４，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約３，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約２，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約１，５００Ｌとの間、約５００Ｌと約１，０００Ｌとの間、約５００Ｌと約７５０Ｌとの間、約１，０００Ｌと約１０，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約８，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約７，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約６，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約５，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約４，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約３，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約２，０００Ｌとの間、約１，０００Ｌと約１，５００Ｌとの間、約２，０００Ｌと約１０，０００Ｌとの間、約２，０００Ｌと約８，０００Ｌとの間、約２，０００Ｌと約７，０００Ｌとの間、約２，０００Ｌと約６，０００Ｌとの間、約２，０００Ｌと約５，０００Ｌとの間、約２，０００Ｌと約４，００

0 Lとの間、約 2, 000 Lと約 3, 000 Lとの間、約 3, 000 Lと約 10, 000 Lとの間、約 3, 000 Lと約 8, 000 Lとの間、約 3, 000 Lと約 7, 000 Lとの間、約 3, 000 Lと約 6, 000 Lとの間、約 3, 000 Lと約 5, 000 Lとの間、約 3, 000 Lと約 4, 000 Lとの間、約 4, 000 Lと約 10, 000 Lとの間、約 4, 000 Lと約 8, 000 Lとの間、約 4, 000 Lと約 7, 000 Lとの間、約 4, 000 Lと約 6, 000 Lとの間、約 4, 000 Lと約 5, 000 Lとの間、約 5, 000 Lと約 10, 000 Lとの間、約 5, 000 Lと約 8, 000 Lとの間、約 5, 000 Lと約 7, 000 Lとの間、約 5, 000 Lと約 6, 000 Lとの間、約 6, 000 Lと約 10, 000 Lとの間、約 6, 000 Lと約 8, 000 Lとの間、約 6, 000 Lと約 7, 000 Lとの間、約 7, 000 Lと約 10, 000 Lとの間、約 7, 000 Lと約 8, 000 Lとの間、または約 8, 000 Lと約 10, 000 Lとの間、あるいは約 10 L、約 20 L、約 50 L、約 100 L、約 500 L、約 1, 000 L、または約 2, 000 L)の内部体積(容量)を有し得る。

10

【0085】

培養システム

本明細書に記載の方法のいくつかは、容器、および容器(例えば、本明細書に記載の培地のいずれか)内に配置された第1の液体培地を含むシステム(例えば、灌流培養システム)を使用する。容器は、約10 Lから約25, 000 Lの間(または、例えば、本明細書に記載のこの範囲のいずれかの部分範囲)の内部体積(容量)を有し得る。容器は、金属(例えば、ステンレス鋼)、プラスチック、もしくはガラス、またはその任意の組み合わせから作製できる。

20

【0086】

システムは、容器内に配置された液体培地を攪拌するための器具(例えば、羽根車および羽根車を回転させるモーター)を含み得る。容器は、容器内に配置された液体培地への物質(例えば、液体培地、ポロキサマー188、(随時、pHを調整するために)塩基または酸)の添加、および/または液体培地(例えば、清澄化液体培地または細胞培養の試料)の除去を可能とする、1つまたはそれ以上のポート(および場合によりポンプ)を含み得る。

【0087】

培養システムはまた、液体培地におけるpH、dO₂、温度、およびpCO₂を培養期間の間モニタリングするための1つまたはそれ以上のセンサーも含むことができる。いくつかの実施形態では、培養システムは、静電容量センサー、導電率センサー、および/またはラマンセンサーをはじめとする1つまたはそれ以上のセンサーを含み得る。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、静電容量センサー、導電率センサー、および/またはラマンセンサーをはじめとする1つまたはそれ以上のセンサーを含み得る。いくつかの実施形態では、フィルター透過は、静電容量センサー、導電率センサー、および/またはラマンセンサーをはじめとする1つまたはそれ以上のセンサーを含み得る。培養システムは、一定量の細胞培養物を処理して、細胞を実質的に含まない清澄化液体培地を提供するろ過器具(例えば、交互接線ろ過または接線ろ過を行う器具)を含み得る。培養システムは、容器内に配置された液体培地の温度の調整を可能とする加熱/冷却器具を含み得る。細胞培養システムの追加の構成は、当技術分野でよく知られている。

30

40

【0088】

灌流培養

いくつかの例では、灌流培養は、ある期間の間、容器(例えば、バイオリアクター)からの第1の液体培地の第1の体積を除去し、バイオリアクターへの第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1の体積および第2の体積がほぼ等しいことを含む。

【0089】

他の例では、灌流培養は、容器(例えば、バイオリアクター)からの第1の液体培地の第1の体積の除去、ならびに容器への第2の液体培地の第2の体積および第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とが

50

ほぼ等しいことを含む。

【0090】

哺乳類細胞は、何らかの細胞保持器具によって、または沈降コーンでの細胞沈降などの手法によって、バイオリアクター内に保持する。

【0091】

灌流培養における培地の除去および添加は、同時にまたは逐次、あるいはその2つのある組み合わせで行うことができる。更に、除去および添加は、連続的に、例えば、0.1%から400%の間、約25%から400%の間、約25%から約300%の間、約25%から約200%の間、約25%から約100%の間、約25%から約50%の間、約50%から約400%の間、約50%から約100%の間、約50%から約200%の間、約50%から約300%の間、約50%から約400%の間、約100%から約400%の間、約100%から約300%の間、約100%から約200%の間の体積、あるいはバイオリアクターの体積の約25%、約50%、約75%、約100%、約150%、約200%、約250%、約300%、約350%または約400%を除去および置換する割合で行うことができる。

10

【0092】

除去する第1の液体培地の第1の体積、ならびに添加する第2の液体培地の第2の体積（および場合により、添加する第3の液体培地）は、いくつかの例では、それぞれ24時間の期間にわたって、ほぼ同じに保持される。当技術分野で知られているように、第1の液体培地の第1の体積を除去する割合（体積／単位時間）、ならびに第2の液体培地の第2の体積を添加する割合（体積／単位時間）（および場合により、第3の液体培地の第3の体積を添加する割合（体積／単位時間））は、変化させることができ、特定の細胞培養システムの条件に依存する。

20

【0093】

第1の液体培地の第1の体積を除去する割合（体積／単位時間）、ならびに第2の液体培地の第2の体積を添加する割合（体積／単位時間）（および場合により、第3の液体培地の第3の体積を添加する割合（体積／単位時間））は、ほぼ同じであってもよいし、異なってもよい。

【0094】

あるいは、除去および添加する体積は、それぞれ24時間の期間にわたって徐々に増加させることによって変化させ得る。例えば、それぞれ24時間の期間内に除去する第1の液体培地の体積、ならびに添加する第2の液体培地の体積（および場合により、添加する第3の液体培地の体積）は、培養期間にわたって増加し得る。体積は、バイオリアクター体積の0.5%から約20%の間である体積から、培養期間にわたって増加できる。体積は、バイオリアクター容量または培養期間開始時の細胞培養体積の約25%から約150%まで、培養期間にわたって増加できる。

30

【0095】

本明細書に記載の方法のいくつかの例では、培養期間の最初の48から96時間後に、それぞれ24時間の期間（培養期間内）において、除去する第1の液体培地の第1の体積、ならびに添加する第2の液体培地の第2の体積（および場合により、添加する第3の液体培地の第3の体積も）は、培養期間開始時の細胞培養体積の約10%から約95%、約10%から約20%、約20%から約30%、約30%から約40%、約40%から約50%、約50%から約60%、約60%から約70%、約70%から約80%、約80%から約90%、約85%から約95%、約60%から約80%、または約70%である。

40

【0096】

当業者は、第1の液体培地と第2の液体培地とが、同じ種類の培地であってもよいことを理解するであろう。他の例では、第1の液体培地と第2の液体培地とが、違う種類の液体培地または違う濃度の液体培地であってもよい。第2の液体培地は、1つまたはそれ以上の培地成分に関して、第1の液体培地および第3の液体培地と比較してより濃縮されていてもよい。

50

【0097】

第1の液体培地の第1の体積は、任意の自動化システムを使用することによって除去できる。例えば、交接続線流ろ過を使用できる。あるいは、第1の液体培地の第1の体積は、哺乳類細胞を排除する分子量カットオフを有する滅菌膜を通した第1の液体培地の第1の体積の滲出または重力による流れによって除去できる。あるいは、第1の液体培地の第1の体積は、少なくとも1分間、少なくとも2分間、3分間、4分間、5分間、10分間、15分間、20分間、25分間、30分間、40分間、50分間、または1時間の期間の攪拌を停止しまたは速度を顕著に低下させ、バイオリアクターの上部から第1の液体培地の第1の体積を除去または吸引することによって除去できる。

【0098】

第2の液体培地の第2の体積（および場合により、第3の液体培地の第3の体積）は、ポンプによって第1の液体培地に添加できる。第2の液体培地（および場合により、第3の液体培地）は、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積（および場合により、第3の液体培地の第3の体積）を、第1の液体培地に直接ピペティングもしくは注入することで、または自動化された様式で添加できる。

【0099】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態は、約32℃から約39℃の間の温度で容器を攪拌しながら少なくとも約7日間の期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約270 mOsm/kgから約380 mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを含む。

【0100】

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態は、約32℃から約39℃の間の温度で容器を攪拌しながら少なくとも約7日間の期間インキュベートすることと；その期間の間、連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積の除去、ならびに第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積および第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270 mOsm/kgから約380 mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを含む。

【0101】

灌流培養のいくつかの例は、約32℃から約39℃の間の温度で第1の液体培地を含む培養システムを攪拌しながら少なくとも約7日間の培養期間インキュベートすることと；連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積を除去し、第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積を添加することであって、第1および第2の体積はほぼ等しく、容器内の第1および第2の液体培地の浸透圧は約270 mOsm/kgから約380 mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを含む。

【0102】

灌流培養のいくつかの例は、約32℃から約39℃の間の温度で第1の液体培地を含む培養システムを攪拌しながら少なくとも約7日間の培養期間インキュベートすることと；連続的または定期的に、第1の液体培地の第1の体積の除去、ならびに第1の液体培地に第2の液体培地の第2の体積および第3の液体培地の第3の体積を添加することであって、第1の体積と、第2および第3の体積の合計とはほぼ等しく、容器内の第1、第2、および第3の液体培地の浸透圧は約270 mOsm/kgから約380 mOsm/kgにその期間にわたって維持されることを含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、第1の液体培地は、約260 mOsm/kgから約400 mOsm/kg（例えば、約260 mOsm/kgから約380 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約360 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約350 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約340 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約330 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約320 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約310 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約300 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約290 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約280 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約270 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約260 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約250 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約240 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約230 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約220 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約210 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約200 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約190 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約180 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約170 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約160 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約150 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約140 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約130 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約120 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約110 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約100 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約90 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約80 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約70 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約60 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約50 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約40 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約30 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約20 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約10 mOsm/kg、約260 mOsm/kgから約0 mOsm/kg）を含む。

k g から約 3 2 0 m O s m / k g、約 2 6 0 m O s m / k g から約 3 0 0 m O s m / k g
 、約 2 8 0 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 2 7 0 m O s m / k g から約
 4 0 0 m O s m / k g、約 2 7 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 2 7 0
 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g、約 2 7 0 m O s m / k g から約 3 5 0 m O
 s m / k g、約 2 7 0 m O s m / k g から約 3 4 0 m O s m / k g、約 2 7 0 m O s m /
 k g から約 3 2 0 m O s m / k g、約 2 7 0 m O s m / k g から約 3 0 0 m O s m / k g
 、約 2 8 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 2 8 0 m O s m / k g から約
 3 6 0 m O s m / k g、約 2 8 0 m O s m / k g から約 3 5 0 m O s m / k g、約 2 8 0
 m O s m / k g から約 3 4 0 m O s m / k g、約 2 8 0 m O s m / k g から約 3 2 0 m O
 s m / k g、約 2 8 0 m O s m / k g から約 3 0 0 m O s m / k g、約 2 9 0 m O s m /
 k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 2 9 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g
 、約 2 9 0 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g、約 2 9 0 m O s m / k g から約
 3 5 0 m O s m / k g、約 2 9 0 m O s m / k g から約 3 4 0 m O s m / k g、約 2 9 0
 m O s m / k g から約 3 2 0 m O s m / k g、約 2 9 0 m O s m / k g から約 3 0 0 m O
 s m / k g、約 3 0 0 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 3 0 0 m O s m /
 k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 3 0 0 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g
 、約 3 0 0 m O s m / k g から約 3 5 0 m O s m / k g、約 3 0 0 m O s m / k g から約
 3 4 0 m O s m / k g、約 3 0 0 m O s m / k g から約 3 2 0 m O s m / k g、約 3 1 0
 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 3 1 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O
 s m / k g、約 3 1 0 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g、約 3 1 0 m O s m /
 k g から約 3 5 0 m O s m / k g、約 3 1 0 m O s m / k g から約 3 4 0 m O s m / k g
 、約 3 1 0 m O s m / k g から約 3 2 0 m O s m / k g、約 3 2 0 m O s m / k g から約
 4 0 0 m O s m / k g、約 3 2 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 3 2 0
 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g、約 3 2 0 m O s m / k g から約 3 5 0 m O
 s m / k g、約 3 2 0 m O s m / k g から約 3 4 0 m O s m / k g、約 3 3 0 m O s m /
 k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 3 3 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g
 、約 3 3 0 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g、約 3 3 0 m O s m / k g から約
 3 5 0 m O s m / k g、約 3 3 0 m O s m / k g から約 3 4 0 m O s m / k g、約 3 4 0
 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 3 4 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O
 s m / k g、約 3 4 0 m O s m / k g から約 3 6 0 m O s m / k g、約 3 4 0 m O s m /
 k g から約 3 5 0 m O s m / k g、約 3 5 0 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g
 、約 3 5 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 3 5 0 m O s m / k g から約
 3 6 0 m O s m / k g、約 3 6 0 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 3 6 0
 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 3 7 0 m O s m / k g から約 4 0 0 m O
 s m / k g、約 3 7 0 m O s m / k g から約 3 8 0 m O s m / k g、約 3 8 0 m O s m /
 k g から約 4 0 0 m O s m / k g、約 3 8 0 m O s m / k g から約 3 9 0 m O s m / k g
 、または約 3 9 0 m O s m / k g から約 4 0 0 m O s m / k g) の浸透圧を有し得る。

【0104】

いくつかの実施形態では、第1の液体培地は、約 2 6 0 m O s m / k g、約 2 7 0 m O
 s m / k g、約 2 8 0 m O s m / k g、約 2 9 0 m O s m / k g、約 3 0 0 m O s m / k
 g、約 3 1 0 m O s m / k g、約 3 2 0 m O s m / k g、約 3 3 0 m O s m / k g、約 3
 4 0 m O s m / k g、約 3 5 0 m O s m / k g、約 3 6 0 m O s m / k g、約 3 8 0 m O
 s m / k g、約 3 9 0 m O s m / k g、または約 4 0 0 m O s m / k g の浸透圧を有し得

【0105】

いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約 2 6 0 m O s m / k g から約 2 , 5 0
 0 m O s m / k g (例えば、約 2 6 0 m O s m / k g から約 2 , 4 0 0 m O s m / k g、
 約 2 6 0 m O s m / k g から約 2 , 2 0 0 m O s m / k g、約 2 6 0 m O s m / k g から
 約 2 , 0 0 0 m O s m / k g、約 2 6 0 m O s m / k g から約 1 , 8 0 0 m O s m / k g
 、約 2 6 0 m O s m / k g から約 1 , 6 0 0 m O s m / k g、約 2 6 0 m O s m / k g か

50

約 800mOsm/kg から約 1, 800mOsm/kg、約 800mOsm/kg から約 1, 600mOsm/kg、約 800mOsm/kg から約 1, 500mOsm/kg、約 800mOsm/kg から約 1, 400mOsm/kg、約 800mOsm/kg から約 1, 200mOsm/kg、約 800mOsm/kg から約 1, 000mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 2, 000mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 1, 800mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 1, 600mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 1, 500mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 1, 400mOsm/kg、約 1, 000mOsm/kg から約 1, 200mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 2, 000mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 1, 800mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 1, 600mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 1, 500mOsm/kg、約 1, 200mOsm/kg から約 1, 400mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 2, 000mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 1, 800mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 1, 600mOsm/kg、約 1, 400mOsm/kg から約 1, 500mOsm/kg、約 1, 500mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 1, 500mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 1, 500mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 1, 500mOsm/kg から約 2, 000mOsm/kg、約 1, 500mOsm/kg から約 1, 800mOsm/kg、約 1, 500mOsm/kg から約 1, 600mOsm/kg、約 1, 600mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 1, 600mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 1, 600mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 1, 600mOsm/kg から約 2, 000mOsm/kg、約 1, 800mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 1, 800mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 1, 800mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 2, 000mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 2, 000mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、約 2, 000mOsm/kg から約 2, 200mOsm/kg、約 2, 200mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg、約 2, 200mOsm/kg から約 2, 400mOsm/kg、または約 2, 400mOsm/kg から約 2, 500mOsm/kg) の浸透圧を有し得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、第 2 の液体培地は、約 260mOsm/kg、約 280mOsm/kg、約 300mOsm/kg、約 320mOsm/kg、約 340mOsm/kg、約 350mOsm/kg、約 360mOsm/kg、約 380mOsm/kg、約 400mOsm/kg、約 420mOsm/kg、約 440mOsm/kg、約 450mOsm/kg、約 460mOsm/kg、約 480mOsm/kg、約 500mOsm/kg、約 520mOsm/kg、約 540mOsm/kg、約 550mOsm/kg、約 560mOsm/kg、約 580mOsm/kg、約 600mOsm/kg、約 620mOsm/kg、約 640mOsm/kg、約 650mOsm/kg、約 660mOsm/kg、約 680mOsm/kg、約 700mOsm/kg、約 72mOsm/kg、約 740mOsm/kg、約 750mOsm/kg、約 760mOsm/kg、約 780mOsm/kg、約 800mOsm/kg、約 820mOsm/kg、約 840mOsm/kg、約 850mOsm/kg、約 860mOsm/kg、約 880mOsm/kg、約 90

10

20

30

40

50

50

いくつかの例では、第3の液体培地は、約0mOsm/kgから約12,000mOsm/kg（例えば、約0mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約0mOsm/kgから約800mOsm/kg、約0mOsm/kgから約600mOsm/kg、約0mOsm/kgから約500mOsm/kg、約0mOs

50

50

m/kg、約60mOsm/kgから約150mOsm/kg、約60mOsm/kgから約100mOsm/kg、約60mOsm/kgから約80mOsm/kg、約80mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、

約80mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約80mOsm/kgから約800mOsm/kg、約80mOsm/kgから約600mOsm/kg、約80mOsm/kgから約500mOsm/kg、約80mOsm/kgから約400mOsm/kg、約80mOsm/kgから約350mOsm/kg、約80mOsm/kgから約300mOsm/kg、約80mOsm/kgから約250mOsm/kg、約80mOsm/kgから約200mOsm/kg、約80mOsm/kgから約150mOsm/kg、約80mOsm/kgから約100mOsm/kg、約100mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約100mOsm/kgから約800mOsm/kg、約100mOsm/kgから約600mOsm/kg、約100mOsm/kgから約500mOsm/kg、約100mOsm/kgから約400mOsm/kg、約100mOsm/kgから約350mOsm/kg、約100mOsm/kgから約300mOsm/kg、約100mOsm/kgから約250mOsm/kg、約100mOsm/kgから約200mOsm/kg、約100mOsm/kgから約150mOsm/kg、約150mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約150mOsm/kgから約800mOsm/kg、約150mOsm/kgから約600mOsm/kg、約150mOsm/kgから約500mOsm/kg、約150mOsm/kgから約400mOsm/kg、約150mOsm/kgから約350mOsm/kg、約150mOsm/kgから約300mOsm/kg、約150mOsm/kgから約250mOsm/kg、約150mOsm/kgから約200mOsm/kg、約200mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約3,000mOsm/kg

10

20

30

40

50

g、約200mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約200mOsm/kgから約800mOsm/kg、約200mOsm/kgから約600mOsm/kg、約200mOsm/kgから約500mOsm/kg、約200mOsm/kgから約400mOsm/kg、約200mOsm/kgから約350mOsm/kg、約200mOsm/kgから約300mOsm/kg、約200mOsm/kgから約250mOsm/kg、約250mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約250mOsm/kgから約800mOsm/kg、約250mOsm/kgから約600mOsm/kg、約250mOsm/kgから約500mOsm/kg、約250mOsm/kgから約400mOsm/kg、約250mOsm/kgから約350mOsm/kg、約250mOsm/kgから約300mOsm/kg、約300mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約300mOsm/kgから約800mOsm/kg、約300mOsm/kgから約600mOsm/kg、約300mOsm/kgから約500mOsm/kg、約300mOsm/kgから約400mOsm/kg、約300mOsm/kgから約350mOsm/kg、約350mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約350mOsm/kgから約800mOsm/kg、約350mOsm/kgから約600mOsm/kg、約350mOsm/kgから約500mOsm/kg、約350mOsm/kgから約400mOsm/kg、約400mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約4,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約3,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約2,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約1,000mOsm/kg、約400mOsm/kgから約800mOsm/kg、約400mOsm/kgから約600mOsm/kg、約400mOsm/kgから約500mOsm/kg、約500mOsm/kg

10

20

30

40

50

50

ら約11,000mOsm/kg、約4,000mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約4,000mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約4,000mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約4,000mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約4,000mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約4,000mOsm/kgから約5,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約5,000mOsm/kgから約6,000mOsm/kg、約6,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約6,000mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約6,000mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約6,000mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約6,000mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約6,000mOsm/kgから約7,000mOsm/kg、約7,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約7,000mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約7,000mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約7,000mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約7,000mOsm/kgから約8,000mOsm/kg、約8,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約8,000mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約8,000mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約8,000mOsm/kgから約9,000mOsm/kg、約9,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、約9,000mOsm/kgから約11,000mOsm/kg、約9,000mOsm/kgから約10,000mOsm/kg、約10,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg、または約11,000mOsm/kgから約12,000mOsm/kg)の浸透圧を有し得る。いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、塩化ナトリウム(NaCl)または塩化カリウム(KCl)を含む。

10

20

30

40

50

【0111】

いくつかの実施形態は、容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpHおよびpCO₂の一方または両方を、その期間の間のある時点で調整することを更に含む。いくつかの例では、方法は、その期間にわたって、容器内の第1、第2、および第3の液体培地のpCO₂を増加させ、pHを増加させることを含む。いくつかの例では、第1、第2、および第3の液体培地のpCO₂およびpHは、容器においてその期間にわたって測定する。

【0112】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1および/または第2の液体培地の浸透圧は、以下の1つまたはそれ以上によって制御する：第1および/または第2の液体培地と、水溶液（例えば、水）との比、第1および/または第2の液体培地と、濃度オスモライト（例えば、塩化ナトリウム）との比、容器（例えば、本明細書に記載の容器（例えば、バイオリアクター）のいずれか）における生細胞密度、第1および/または第2の液体培地のpH、容器（例えば、本明細書に記載の容器（例えば、バイオリアクター）のいずれか）における溶存CO₂（dCO₂）のレベル、容器（例えば、本明細書に記載の容器（例えば、バイオリアクター）のいずれか）への炭素（例えば、グルコース）投与量。

【0113】

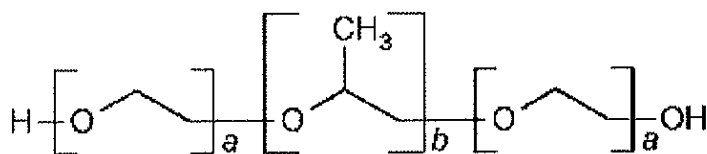
Pluronic（登録商標）F-68（ポロキサマー-188）

ポロキサマー-188は、当技術分野で知られている分子である。ポロキサマー-188は、エチレンオキシドおよびプロピレンオキシドの非イオン性合成ブロックコポリマーである。ポロキサマー-188は、7680から約9510の間の平均分子量を有し、その組成の約81.8重量%（1.9重量%）がオキシエチレンに相当する。例えば、ポロ

キサマー-188は、以下の式I（式中、aは80であり、bは27である）に示す構造を有する。ポロキサマー-188は、CAS番号9003-11-6を有する。

【0114】

【化1】



式 I

10

【0115】

ポロキサマー-188は、例えば、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、Mediatech, Inc. (Manassas, VA)、MAST Therapeutics, Inc. (San Diego, CA)、EMD Millipore (Billerica, MA)、BASF (Ludwigshafen, Germany)、Pluronic (登録商標) F-68 Life Technologies (Carlsbad, CA)、およびPhytoTechnology Laboratories, LLC (Shawnee Mission, KS)を含む多くの異なる販売会社から市販されている。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、約8 g/L超の濃度（例えば、約9.0 g/Lの濃度もしくは9.0 g/L超の濃度、約10.0 g/Lの濃度もしくは10.0 g/L超の濃度、約12.0 g/Lの濃度もしくは12.0 g/L超の濃度、約14.0 g/Lの濃度もしくは14.0 g/L超の濃度、または約16.0 g/Lの濃度もしくは16.0 g/L超の濃度）を含み得る。

【0117】

いくつかの実施形態では、第2の液体培地は、ポロキサマー-188を、約8 g/Lと約16 g/Lとの間（例えば、約8.0 g/Lと約14.0 g/Lとの間、約8.0 g/Lと約12.0 g/Lとの間、約8.0 g/Lと約10.0 g/Lとの間、約10.0 g/Lと約16.0 g/Lとの間、約10.0 g/Lと約12.0 g/Lとの間、約12.0 g/Lと約16.0 g/Lとの間、約12.0 g/Lと約14.0 g/Lとの間、約14.0 g/Lと約16.0 g/Lとの間、または約15.0 g/Lと約16.0 g/Lとの間）の濃度で含むことができる。

30

【0118】

いくつかの実施形態では、第3の液体培地は、ポロキサマー-188を、約0 g/Lと約8 g/Lとの間（例えば、約0 g/Lと約6 g/Lとの間、約0 g/Lから約4 g/L、約0 g/Lから約2 g/L、約0 g/Lから約1 g/L、約0.5 g/Lと約8 g/Lとの間、約0.5 g/Lと約6.0 g/Lとの間、約0.5 g/Lと約4.0 g/Lとの間、約0.5 g/Lと約2.0 g/Lとの間、約1.0 g/Lと約8 g/Lとの間、約1.0 g/Lと約6.0 g/Lとの間、約1.0 g/Lと約4.0 g/Lとの間、約2.0 g/Lと約8 g/Lとの間、約2.0 g/Lと約6.0 g/Lとの間、約2.0 g/Lと約4.0 g/Lとの間、約5.0 g/Lと約8 g/Lとの間、約5.0 g/Lと約6.0 g/Lとの間、約6.0 g/Lと約8 g/Lとの間、または約7.0 g/Lと約8 g/Lとの間）の濃度で含むことができる。

40

【0119】

本明細書で提供される方法のいずれかのいくつかの実施形態は、培養におけるポロキサマー-188濃度を経時的に増加させることを含む。いくつかの実施形態では、培地は、以下の群から選択される1つまたはそれ以上の要因に基づいて選択されるポロキサマー-

50

188濃度を含む：培地における気体流量および生細胞密度。これらの方法では、選択された培地中のポロキサマー188濃度は、培養工程の前に培地にポロキサマー188を添加すること、および／または培養工程の間に培地にポロキサマー188を添加することによって達成できる。選択されたポロキサマー188濃度は、本明細書に記載のポロキサマー188の例示的な濃度または範囲のいずれかであり得る。

【0120】

培地

液体培地は当技術分野で知られている。液体培地（例えば、第1、第2、および／または第3の液体培地）は、哺乳類血清（例えば、ウシ胎児血清およびウシ血清）、ならびに／または成長ホルモンもしくは増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、および上皮増殖因子）を添加できる。あるいはまたは更に、液体培地（例えば、第1、第2、および／または第3の液体培地）は、化学的に定義された液体培地、無動物由来成分液体培地、無血清液体培地、または血清含有液体培地であり得る。化学的に定義された液体培地、無動物由来成分液体培地、無血清液体培地、および血清含有液体培地の非限定的な例は、市販されている。

10

【0121】

液体培地は、通常、エネルギー源（例えば、グルコースなどの炭水化物）、必須アミノ酸（例えば、20種類のアミノ酸の基本セットおよびシステイン）、低濃度の必要とされるビタミンおよび／もしくは他の有機化合物、遊離脂肪酸、ならびに／または微量元素を含む。液体培地（例えば、第1、第2、および／または第3の液体培地）は、所望により、例えば、哺乳類のホルモンもしくは増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、もしくは上皮増殖因子）、塩および緩衝剤（例えば、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、ヌクレオシドおよび塩基（例えば、アデノシン、チミジン、およびヒポキサンチン）、タンパク質および組織加水分解物、ならびに／またはこれらの添加物の任意の組み合わせを添加できる。

20

【0122】

本明細書に記載の方法のいずれかで細胞（例えば、哺乳類細胞）を培養するのに使用できる多種多様な液体培地が当技術分野で知られている。本処理においても有用であり得る培地成分としては、CD（chemically-defined）加水分解物、例えば、CDペプトン、CDポリペプチド（2種類以上のアミノ酸）、およびCD増殖因子が挙げられるが、しかし、これらに限定されない。液体培地および培地成分の追加の例は、当技術分野で知られている。

30

【0123】

当業者は、本明細書に記載の第1の液体培地と第2の液体培地と第3の液体培地とが同じ種類の培地であっても異なる培地であってもよいことを理解するであろう。

【0124】

細胞培養から得られる液体培地は、ろ過または清澄化して、細胞および／またはウイルスを実質的に含まない液体培地を得ることができる。細胞を除去するために液体培地をろ過または清澄化するための方法は、当技術分野で知られている（例えば、0.2 μm ろ過、および交接続線流（ATFTM）システムを使用するろ過）。哺乳類細胞はまた、遠心分離を使用することと、細胞を実質的に含まない液体培地である上清を取ることとによって、あるいは細胞を、液体培地を含む容器またはバイオリアクターの重力上の底に沈降させることと、沈降した組換え細胞から離れた液体培地（細胞を実質的に含まない液体培地）を取ることとによって、液体培地から除去することもできる。

40

【0125】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1、第2、および／または第3の液体培地は、約6.0から約6.8（例えば、その中のいずれかの部分範囲）のpHを有する。

【0126】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1、第2および／また

50

は第3の液体培地は、塩化ナトリウムまたは塩化カリウムを含む。本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、第1、第2および／または第3の液体培地は、以下の1つまたはそれ以上を更に含む：L-アルギニン、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、ヒドロキシ-L-プロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-バリン、コリン、イノシトール、ビオチン、カルシウム、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、ビタミンB12、リボ酸、グルタチオン、リノール酸、ピルビン酸塩、H E P E S、第一鉄、クエン酸、亜鉛、銅、亜セレン酸塩、エタノールアミン、プトレッシン、スペルミン、カリウム、リン酸塩、マグネシウム、アルミニウム、バナジン酸塩、モリブデン酸塩、マンガン、ニッケル、ケイ酸塩、およびスズ。

10

【0127】

pH（6～8、6.5～7.5）

本明細書に記載の方法は、約6.8から約7.1のpHで行う。

【0128】

第1、第2、および／または第3の液体培地は、約6.8から約7.1（例えば、約6.8から約7.0、約6.8から約6.9、約6.9から約7.1、約6.9から約7.0、または約7.0から約7.2）のpHを有し得る。

【0129】

いくつかの実施形態では、第1、第2、および／または第3の液体培地は、約6.8、約6.9、約7.0、または約7.1のpHを有し得る。

20

【0130】

温度（30℃～40℃；37℃）

哺乳類細胞をインキュベートする工程は、約32℃から約39℃（例えば、約32℃から約38℃、約32℃から約36℃、約32℃から約35℃、約32℃から約34℃、約34℃から約39℃、約34℃から約38℃、約34℃から約36℃、約35℃から約39℃、約35℃から約38℃、約35℃から約37℃、約36℃から約39℃、約36℃から約38℃、または約37℃から約39℃）の温度で行うことができる。

【0131】

いくつかの実施形態では、哺乳類細胞をインキュベートする工程は、約32℃、約33℃、約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、または約39℃の温度で行う。

30

【0132】

当業者は、温度を培養工程の間の特定の時点で、例えば、1時間毎にまたは1日毎に変更できることを理解するであろう。例えば、温度は、細胞（例えば、哺乳類細胞）をバイオリアクターに最初に播種してから約1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後、7日後、8日後、9日後、10日後、11日後、12日後、14日後、15日後、16日後、17日後、18日後、19日後、または約20日以上後に変化またはシフト（例えば、増加または減少）することができる。例えば、温度は上方にシフトすることができる（例えば、最大または約セ氏0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5度、あるいは最大セ氏約10度の変化）。例えば、温度は下方にシフトすることができる（例えば、最大または約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19℃、あるいは最大または約20℃の変化）。

40

【0133】

CO₂（溶存CO₂を20～200mmHg；80～140mmHgの範囲の分圧に制御

50

する)

インキュベートする工程は、バイオリアクター内の液体培地を、多くともまたは約 15 %のCO₂ (例えば、多くともまたは約 14 %のCO₂、12 %のCO₂、10 %のCO₂、8 %のCO₂、6 %のCO₂、5 %のCO₂、4 %のCO₂、3 %のCO₂、2 %のCO₂、あるいは多くともまたは約 1 %のCO₂) を含む雰囲気に曝露することを含むことができる。

【0134】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、その期間の間のある時点で、容器 (例えば、本明細書に記載の容器のいずれか (例えば、バイオリアクター)) 内の第1および第2の液体培地のpCO₂を少なくとも10 % (例えば、少なくとも12 %、少なくとも14 %、少なくとも15 %、少なくとも16 %、少なくとも18 %、少なくとも20 %、少なくとも22 %、少なくとも24 %、少なくとも25 %、少なくとも26 %、少なくとも28 %、少なくとも30 %、少なくとも32 %、少なくとも34 %、少なくとも35 %、少なくとも36 %、少なくとも38 %、少なくとも40 %、少なくとも42 %、少なくとも44 %、少なくとも45 %、少なくとも46 %、少なくとも48 %、少なくとも50 %、少なくとも52 %、少なくとも54 %、少なくとも55 %、少なくとも56 %、少なくとも58 %、少なくとも60 %、少なくとも62 %、少なくとも64 %、少なくとも65 %、少なくとも66 %、少なくとも68 %、少なくとも70 %、少なくとも72 %、少なくとも74 %、少なくとも76 %、少なくとも78 %、少なくとも80 %、少なくとも82 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも88 %、少なくとも90 %、少なくとも92 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、または少なくとも99 %) 増加させることと、容器 (例えば、本明細書に記載の容器のいずれか (例えば、バイオリアクター)) 内の第1および第2の液体培地のpHを少なくとも8 % (例えば、少なくとも10 %、少なくとも12 %、少なくとも14 %、少なくとも15 %、少なくとも16 %、少なくとも18 %、少なくとも20 %、少なくとも22 %、少なくとも24 %、少なくとも25 %、少なくとも26 %、少なくとも28 %、少なくとも30 %、少なくとも32 %) 増加させることとを更に含む。

【0135】

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、容器 (例えば、本明細書に記載の容器のいずれか (例えば、バイオリアクター)) 内の第1、第2、および／または第3の液体培地のpCO₂およびpHを、生細胞密度に基づいてその期間にわたって、(例えば、少なくとも12 %、少なくとも14 %、少なくとも15 %、少なくとも16 %、少なくとも18 %、少なくとも20 %、少なくとも22 %、少なくとも24 %、少なくとも25 %、少なくとも26 %、少なくとも28 %、少なくとも30 %、少なくとも32 %、少なくとも34 %、少なくとも35 %、少なくとも36 %、少なくとも38 %、少なくとも40 %、少なくとも42 %、少なくとも44 %、少なくとも45 %、少なくとも46 %、少なくとも48 %、少なくとも50 %、少なくとも52 %、少なくとも54 %、少なくとも55 %、少なくとも56 %、少なくとも58 %、少なくとも60 %、少なくとも62 %、少なくとも64 %、少なくとも65 %、少なくとも66 %、少なくとも68 %、少なくとも70 %、少なくとも72 %、少なくとも74 %、少なくとも76 %、少なくとも78 %、少なくとも80 %、少なくとも82 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも88 %、少なくとも90 %、少なくとも92 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、または少なくとも99 %) 増加させる。

【0136】

組換えタンパク質

本明細書で提供される方法によって産生できる組換えタンパク質の非限定的な例としては、免疫グロブリン (軽鎖および重鎖免疫グロブリン、抗体、または抗体断片 (例えば、本明細書に記載の抗体断片のいずれか) を含む)、酵素 (例えば、ガラクトシダーゼ (例

えば、 α -ガラクトシダーゼ)、Myozyme、またはCerezyme)、タンパク質(例えば、ヒトエリスロポエチン、腫瘍壊死因子(TNF)、またはインターフェロン α もしくは β)、あるいは免疫原性タンパク質もしくは抗原タンパク質またはタンパク質断片(例えば、ワクチンで使用するためのタンパク質)が挙げられる。組換えタンパク質は、少なくとも1つの多機能組換えタンパク質足場を含む操作された抗原結合ポリペプチド(例えば、Gebauerら、Current Opin. Chem. Biol. 13: 245~255、2009; および米国特許出願公開第2012/0164066号(その全体を参照によって本明細書に組み入れる)に記載される組換え抗原結合タンパク質を参照)であり得る。

【0137】

抗体である組換えタンパク質の非限定的な例としては：パニツムマブ、オマリズマブ、アバゴボマブ、アブシキシマブ、アクトクスマブ、アダリムマブ、アデカツムマブ、アフエリモマブ、アフツズマブ、アラシズマブ(alacizumab)、アラシズマブ(alacizumab)、アレムツズマブ、アリロクマブ、アルツモマブ、アマツキシマブ、アマツキシマブ、アナツモマブ、アンルキンズマブ、アポリズマブ、アルシツモマブ、アチヌマブ、トシリズマブ、バシリジマブ(basilizumab)、ベクツモマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ベシレソマブ、ベズロトクスマブ、ビシロマブ、カナキヌマブ、セルトリズマブ、セツキシマブ、シクスツムマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、デンスマブ、エクリズマブ、エドレコロマブ、エファリズマブ、エフングマブ(efungumab)、エブラツズマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ(etaracizumab)、フィギツムマブ、ゴリムマブ、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ(igovomab)、イムガツズマブ(imgatuzumab)、インフリキシマブ、イノリモマブ、イノツズマブ、ラベツズマブ、レブリキズマブ、モキセツモマブ、ナタリズマブ、オビヌツズマブ、オレゴボマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、トシツモマブ、トラロキヌマブ、ツコツズマブ、トラスツズマブ、ベルツズマブ、ザルツムマブ、およびザツキシマブ(zatuximab)が挙げられる。

【0138】

本明細書に記載の方法によって産生できる組換え抗体の追加の例は、当技術分野で知られている。本発明の方法によって産生できる組換えタンパク質の追加の非限定的な例としては：アルグルコシダーゼアルファ、ラロニダーゼ、アバタセプト、ガルスルファーズ、ルトロピンアルファ、抗血友病因子、アガルシダーゼベータ、インターフェロン β -1a、ダルベポエチンアルファ、テネクテプラーゼ、エタネルセプト、凝固因子IX、卵巣刺激ホルモン、インターフェロン β -1a、イミグルセラーズ、ドルナーゼアルファ、エポエチンアルファ、インスリンまたはインスリン類似体、メカセルミン、第VII因子、第VIIa因子、抗トロンピンIII、プロテインC、ヒトアルブミン、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-11、ラロニダーゼ、イズルスファーズ(idursuphase)、ガルスルファーズ、 α -1-ブロテアーゼ阻害剤、ラクターゼ、アデノシンデアミナーゼ、組織プラスミノゲン活性化因子、サイトロロピン α (例えば、Thyrogen(登録商標))およびアルテプラーゼが挙げられる。本発明の方法によって産生できる組換えタンパク質の追加の例としては、酸性 α -グルコシダーゼ、アルグルコシダーゼアルファ(例えば、Myozyme(登録商標)およびLumizyme(登録商標))、 α -L-イズロニダーゼ(例えば、Aldurazyme(登録商標))、イズロン酸スルファターゼ、ヘパランN-スルファターゼ、ガラクトース-6-スルファターゼ、酸性 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコニダーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、 α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ、酸性リパーゼ、リソソームの酸性セラミダーゼ、酸性スフィンゴミエリナーゼ、 β -グルコシダーゼ(例えば、Cerezyme(登録商標)およびCeredase(登録商標))、ガラクトシルセラミダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ-A(例えば、Fabrazyme(登録商標))、酸性 β -ガラクトシダ

10

20

30

40

50

ーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ノイラミニダーゼ、ヘキササミニダーゼ A、ならびにヘキササミニダーゼ B が挙げられる。

【0139】

分泌される可溶性組換えタンパク質は、液体培地（例えば、第 1、第 2、および第 3 の液体培地の 1 つまたはそれ以上）から、液体培地を細胞（例えば、哺乳類細胞）から除去するかさもなければ物理的に分離することによって回収し得る。液体培地を細胞（例えば、哺乳類細胞）から除去するための様々な異なる方法は、当技術分野で知られており、例えば、遠心分離、ろ過、ピペッティング、および／または吸引が挙げられる。次いで、分泌される組換えタンパク質は、様々な生化学的手法を使用して液体培地からの回収および更なる精製を行うことができるが、該手法としては、様々な種類のクロマトグラフィー（例えば、親和性クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、もしくは陰イオン交換クロマトグラフィー）および／またはろ過（例えば、分子量カットオフろ過）が挙げられる。

10

【0140】

組換えタンパク質の回収

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態は、組換えタンパク質（例えば、本明細書に記載の組換えタンパク質のいずれか）を哺乳類細胞ならびに／または第 1、第 2、および第 3 の液体培地の 1 つもしくはそれ以上から回収することを更に含む。いくつかの例では、回収することは、哺乳類細胞を溶解することを含む。他の例では、回収することは、組換えタンパク質を、培地（例えば、第 1、第 2、および第 3 の液体培地の 1 つまたはそれ以上）から集めることを含む得る。

20

【0141】

集めることは、例えば、約 60×10^6 細胞/mL 超、 62×10^6 細胞/mL、 64×10^6 細胞/mL、 66×10^6 細胞/mL、 68×10^6 細胞/mL、 70×10^6 細胞/mL、 72×10^6 細胞/mL、 74×10^6 細胞/mL、 76×10^6 細胞/mL、 78×10^6 細胞/mL、 80×10^6 細胞/mL、約 82×10^6 細胞/mL 超、約 84×10^6 細胞/mL 超、約 86×10^6 細胞/mL 超、約 88×10^6 細胞/mL 超、約 90×10^6 細胞/mL 超、約 92×10^6 細胞/mL 超、約 94×10^6 細胞/mL 超、約 96×10^6 細胞/mL 超、約 98×10^6 細胞/mL 超、約 100×10^6 細胞/mL 超、約 102×10^6 細胞/mL 超、約 104×10^6 細胞/mL 超、約 106×10^6 細胞/mL 超、約 108×10^6 細胞/mL 超、約 110×10^6 細胞/mL 超、約 112×10^6 細胞/mL 超、約 114×10^6 細胞/mL 超、約 116×10^6 細胞/mL 超、約 118×10^6 細胞/mL 超、約 120×10^6 細胞/mL 超、約 122×10^6 細胞/mL 超、約 124×10^6 細胞/mL 超、約 126×10^6 細胞/mL 超、約 128×10^6 細胞/mL 超、約 130×10^6 細胞/mL 超、約 132×10^6 細胞/mL 超、約 134×10^6 細胞/mL 超、約 136×10^6 細胞/mL 超、約 138×10^6 細胞/mL 超、約 140×10^6 細胞/mL 超、約 142×10^6 細胞/mL 超、約 144×10^6 細胞/mL 超、約 146×10^6 細胞/mL 超、約 148×10^6 細胞/mL 超、約 150×10^6 細胞/mL 超、約 152×10^6 細胞/mL 超、約 154×10^6 細胞/mL 超、約 156×10^6 細胞/mL 超、約 158×10^6 細胞/mL 超、約 160×10^6 細胞/mL 超、約 162×10^6 細胞/mL 超、約 164×10^6 細胞/mL 超、約 166×10^6 細胞/mL 超、約 168×10^6 細胞/mL 超、約 170×10^6 細胞/mL 超、約 172×10^6 細胞/mL 超、約 174×10^6 細胞/mL 超、約 176×10^6 細胞/mL 超、約 178×10^6 細胞/mL 超、約 180×10^6 細胞/mL 超、約 182×10^6 細胞/mL 超、約 184×10^6 細胞/mL 超、約 186×10^6 細胞/mL 超、約 188×10^6 細胞/mL 超、約 190×10^6 細胞/mL 超、約 192×10^6 細胞/mL 超、約 194×10^6 細胞/mL 超、約 196×10^6 細胞/mL 超、約 198×10^6 細胞/mL 超、または約 200×10^6 細胞/mL 超) の生細胞密度を達成する培養の後に行うことができる。

30

40

【0142】

50

組換えタンパク質の製剤化

本明細書に記載の方法のいずれかのいくつかの実施形態は、組換えタンパク質（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかによって產生される組換えタンパク質、例えば、回収された組換えタンパク質または回収および精製された組換えタンパク質）を医薬組成物へと製剤化する工程を更に含む。例えば、製剤化することは、薬学的に許容される賦形剤を、組換えタンパク質（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかによって產生される組換えタンパク質、例えば、回収された組換えタンパク質または回収および精製された組換えタンパク質）に添加することを含み得る。製剤化することは、薬学的に許容される賦形剤を、組換えタンパク質（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかによって產生される組換えタンパク質、例えば、回収された組換えタンパク質または回収および精製された組換えタンパク質）と混合することを含み得る。薬学的に許容される賦形剤（例えば、非天然の薬学的に許容される賦形剤）の例は当技術分野でよく知られている。いくつかの実施形態では、組換えタンパク質（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかによって產生される組換えタンパク質、例えば、回収された組換えタンパク質または回収および精製された組換えタンパク質）は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内投与のために製剤化する。

10

【0143】

医薬組成物およびキット

本明細書ではまた、（例えば、本明細書に記載の方法のいずれかによって產生される）本明細書に記載の組換えタンパク質のいずれかの少なくとも1つを含む医薬組成物も提供される。医薬組成物は、当技術分野で知られている任意の様式で製剤化できる。医薬組成物は、意図された投与経路（例えば、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内投与に適合するように製剤化する）。

20

【0144】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体（例えば、リン酸緩衝食塩水）を含み得る。製剤の単回または複数回の投与は、例えば、対象によって必要とされ、許容される投薬量および頻度に応じて行うことができる。

【0145】

本明細書ではまた、医薬組成物（例えば、本明細書に記載の医薬組成物のいずれか）を含むキットも提供される。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法のいずれかを行うための説明書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の医薬組成物のいずれかの少なくとも1つの用量（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10）の用量を含み得る。

30

【0146】

治療方法

本明細書では、以下を含む、それを必要とする対象の治療が提供される：（本明細書に記載の方法のいずれかによって產生される）本明細書に記載の組換えタンパク質のいずれかの少なくとも1つを含む本明細書に記載の医薬組成物のいずれかの治療上有効な量を対象に投与すること。

【0147】

投与することは、例えば、1週間に少なくとも1回（例えば、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回、少なくとも8回、少なくとも9回、少なくとも10回、少なくとも11回、または少なくとも12回）行うことができる。

40

【0148】

本発明は、以下の実施例で更に説明されるが、特許請求の範囲に記載された発明の範囲を限定するものではない。

実施例

【実施例1】

【0149】

50

浸透圧制御方法

灌流培養を含む方法は、多くの液体培地を使用し、各バッチの調製に多大な費用が必要とされる。液体培地のほとんどは水である。しかし、単一の液体培地は、細胞密度が高いときに栄養素の消費により浸透圧が顕著に低下するために、高細胞密度灌流処理全体には使用できない。例えば、 12 g/L のグルコース消費により、 67 mOsm/kg 減少する。

【0150】

典型的な浸透圧 (290 mOsm/kg から 320 mOsm/kg) を有する単一の液体培地を使用すると、細胞密度が高いときに浸透圧が低くなる。低浸透圧条件では、細胞の健康状態が悪くなり、生産性が低下する。しかし、細胞培養 (例えば、灌流細胞培養) の開始時から単一の高浸透圧液体培地を使用すると、乳酸産生の急上昇および細胞培養の低下がもたらされる可能性がある。

10

【0151】

本明細書に記載の第2の液体培地 ($4\times$ 液体培地配合物) (第1の液体培地に添加) は、比較的高い浸透圧 (流加培養のための供給液体培地と比較して) を有し得、沈殿を防ぐために7未満のpHを有し得る。この第2の液体培地は、pH6からpH7であっても室温で1週間未満安定であり得る。少なくとも2つの代替手段を第2の液体培地の安定性を増加させるのに使用できる: 1) システインおよびチロシンを除去すること、または2) システインおよびチロシンの代替形態 (例えば、それぞれピルビン酸塩/システインおよびグリシン-チロシン) を使用すること。

20

【0152】

灌流細胞培養における浸透圧を制御するために、濃縮された第2の液体培地を使用でき、様々な量の第3の低浸透圧液体 (例えば、水) を用いて希釈できる。濃塩化ナトリウム (NaCl) 溶液もまた、浸透圧の上昇が必要な場合には、随意に添加することもできる。更に、培養の溶存 CO_2 濃度およびpHは、浸透圧を調整するために変化させることができる。

【実施例2】

【0153】

細胞培養能力に対する浸透圧の影響

細胞培養能力 (例えば、生細胞密度) に対する浸透圧の影響を決めるために、哺乳類細胞は、約 290 mOsm/kg と約 400 mOsm/kg との間の浸透圧を有する液体培地で増殖させた。図1Aおよび1Bは、それぞれタンパク質1およびタンパク質2を発現する哺乳類細胞における経時的な生細胞密度を示す。図1Aおよび1Bのデータにより示されるのは、哺乳類細胞は、 380 mOsm/kg 超の浸透圧を有する液体培地において哺乳類細胞を増殖する場合、増殖の遅延が観察されたことである。

30

【0154】

それぞれ4日目および5日目での試験した浸透圧における平均細胞直径が示された (図2Aおよび2B)。図2Aおよび2Bのデータは、浸透圧が高いほど細胞の大きさの平均が大きくなることを示し、浸透圧が細胞形態に影響することを示している。

【0155】

図3Aおよび3Bは、濃縮細胞培地 (1320 mOsm/kg の浸透圧) および水をそれぞれ供給した2つのバイオリアクターの浸透圧および細胞培養増殖を示している。水供給に対する濃縮培地供給の比は、培養の増殖相で変化させた。容器22 (「V22」) は、培地に対する水の比が容器27 (「V27」) よりも低く、その結果、10日目から培養物の浸透圧が高くなった (図3A)。この結果、V22は、V27と比較して増殖速度が低下した (図3B)。浸透圧が高いとまた、生産性が減少し (図3C)、培養の健全性の低下を示す乳酸脱水素酵素産生量が高くなった (図3D)。高い浸透圧に対する反応の1つは、V22での乳酸産生の上昇であり (図3E)、次いで、これは乳酸を更に高くし続ける (「乳酸産生の急上昇」)。

40

【0156】

50

図 4 A および 4 B では、培養物は、乳酸産生量が高く、その結果、浸透圧が上昇することが示される。浸透圧が 400 mOsm/kg 超に達すると、乳酸産生量は増加し、細胞増殖および生存率が低下した。

【実施例 3】

【0157】

浸透圧制御の選択肢

安全な操作の灌流培養のための浸透圧閾値は、上限で $360 \sim 420 \text{ mOsm/kg}$ の範囲であった。浸透圧は、例えば、以下のような様々な手段によって制御できる：1) フィードバック制御と連動して、濃縮細胞培地を供給すること、および水希釈率を調整することによる手段、2) 基礎となる添加方法に影響を与える処理パラメーター（例えば、浸透圧が高い場合に高い pH および pCO_2 が必要とされる）を変化させる手段、3) バイオリアクターキャンペーン内で、少なくとも 2 つの異なる液体培地、例えば、低い浸透圧を有する増殖液体培地、および高い浸透圧を有する産生液体培地を使用する手段、4) 浸透圧を上昇させるために、フィードバック制御を用いて高い細胞密度で、塩、例えば、 NaCl および／または KCl を添加する手段。浸透圧を制御するための処理変更は、無細胞培養透過液のオフライン浸透圧測定に基づいて手動で行うことができる。あるいは、自動化フィードバック制御は、オンライン浸透圧予測に基づいて行うことができる。オンライン浸透圧は、適切なモデルと共に、オンライン静電容量測定、オンライン導電率測定、またはラマン分光法測定から予測できる。

【0158】

図 5 A および 5 B は、増殖相から産生相に至る供給培地の浸透圧の段階的变化を示した。各バイオリアクターに対して、 NaCl 添加は所定の時点で手動でオンとし、次いで、 NaCl 流は実験期間の間一定に保った。図 5 A および 5 B のデータは、同じ静電容量設定点にも関わらず、異なる浸透圧で異なる VCD プロファイルを示した。これは、浸透圧を制御するために一定の NaCl 供給速度を使用することの限界を示している。

【0159】

図 6 A および 6 B は、浸透圧と導電率との相間が、浸透圧制御が必要な回収相の間、高い細胞密度で良好であることを示した。

【0160】

導電率は ABER プローブで測定し、2 つの測定の平均を図 7 にプロットした。設定点を維持するために、5 M の NaCl を、導電率フィードバック制御に基づいてバイオリアクターに供給した。図 7 に示すように、制御は 5 日目に開始し、塩添加は培養期間の初期には必要なかった。 NaCl 添加は、10 日目頃から開始した。導電率フィードバック制御に基づく NaCl 添加により、培養の回収相を通じて一貫した導電率および浸透圧が得られた。更に、導電率フィードバック制御に基づく NaCl 添加は、一定の NaCl 添加を使用する処理と比較して、処理の不調の間の浸透圧の逸脱を低下させるのに役立つ。

【0161】

図 8 A および 8 B のデータは、自動化導電率制御により同様の浸透圧の傾向がもたらされた 4 つの実験実行全てについて同じ静電容量設定点で同様な生細胞密度プロファイルを示した。

【0162】

図 9 は、導電率と浸透圧との間の相間が、2 つの異なるプロブの種類を用いた場合で良好であることを示した。

【0163】

図 10 により、浸透圧はラマン分光法を用いて正確に予測できること、およびラマンプロブはバイオリアクターにおいてまたは無細胞灌流回収において配置できることが示された。

【0164】

図 11 に示されるように、灌流細胞培養処理における生細胞密度が処理の中頃で最低点に達する傾向が観察された。これは、バイオリアクターにおいて静電容量センサーを用い

10

20

30

40

50

て測定したときに、バイオマス濃度を一定の静電容量値を維持するように制御した場合に、細胞の大きさが増加するために生じた。これらの培養の後半では、細胞の大きさが減少し、生細胞密度が上昇した。

【0165】

複数バッチからのデータを集計したところ、浸透圧と培養で到達した最低生細胞密度との間には相間があり、より高い浸透圧とより低い細胞密度とが相関することが判明した。この発見は図に示されており、60日間の処理の30日目のVCDが30日目の培養浸透圧に対してプロットされている。浸透圧を所望のレベルに制御できることで、処理の間のVCDの変化を最小限にでき、処理内の一貫性が向上した。

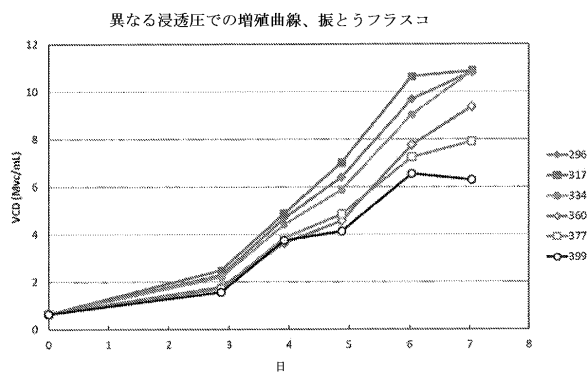
【0166】

他の実施形態

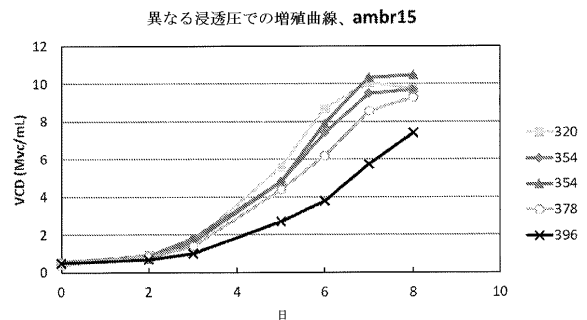
本発明をその詳細な説明と共に説明してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を例示することを意図するもので、限定することを意図しないことを理解されたい。他の態様、利点、および変更は、以下の特許請求の範囲に含まれる。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

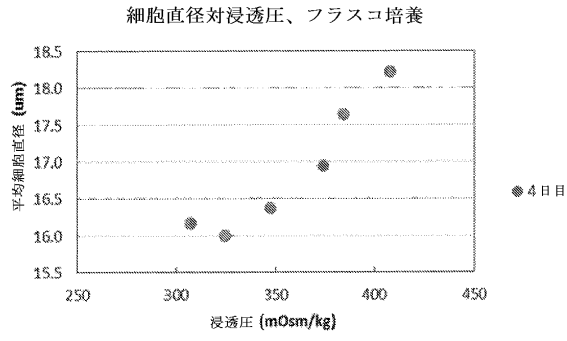
20

30

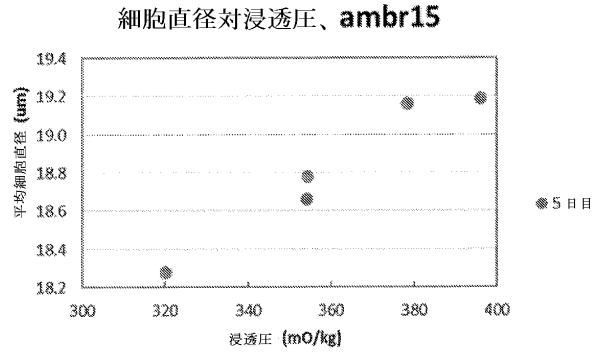
40

50

【図 2 A】

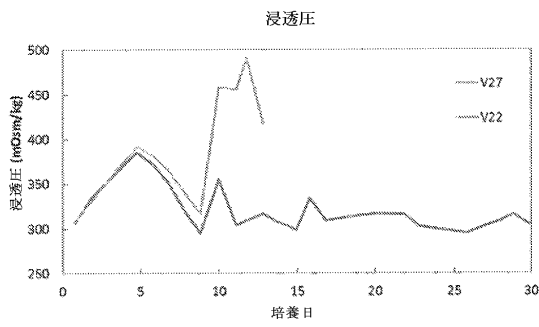


【図 2 B】

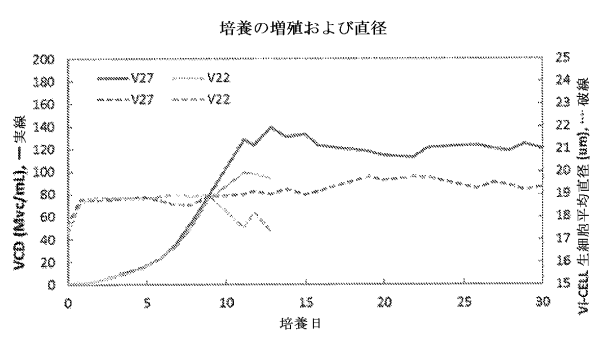


10

【図 3 A】

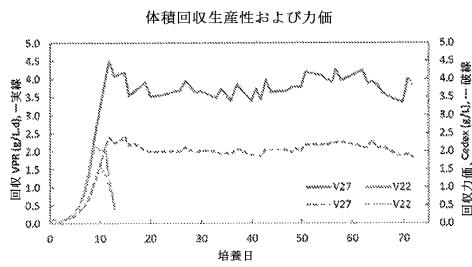


【図 3 B】

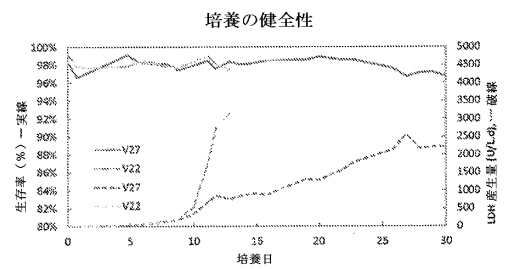


20

【図 3 C】



【図 3 D】

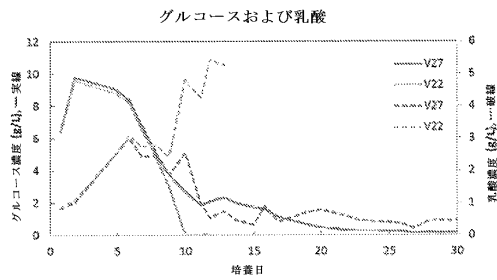


30

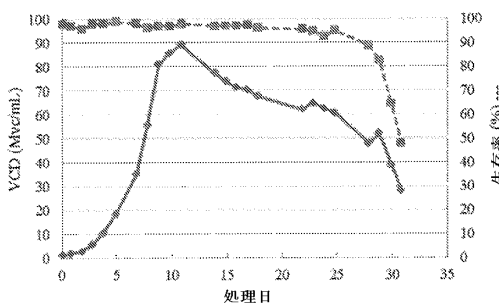
40

50

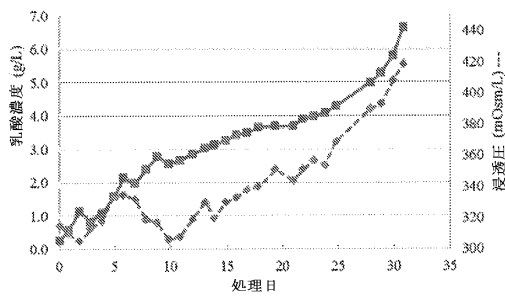
【図 3 E】



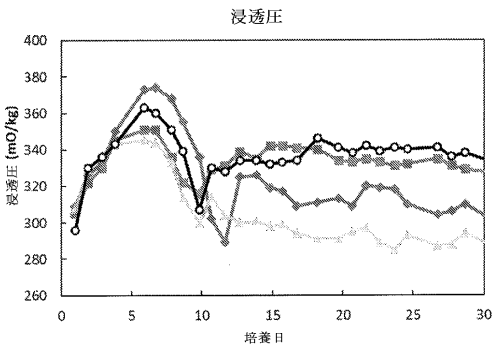
【図 4 A】



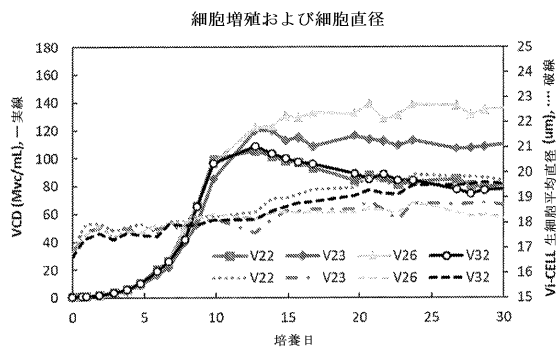
【図 4 B】



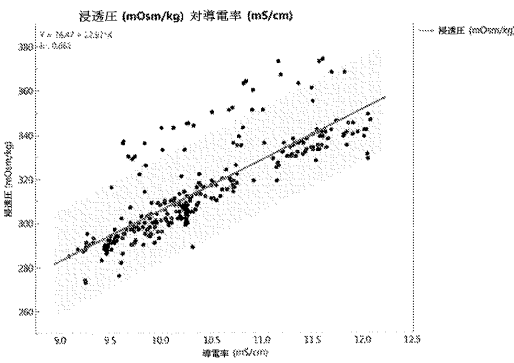
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 6 A】



10

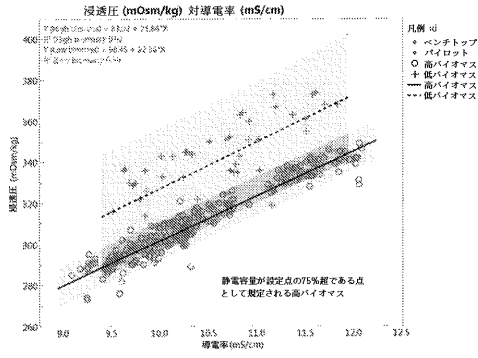
20

30

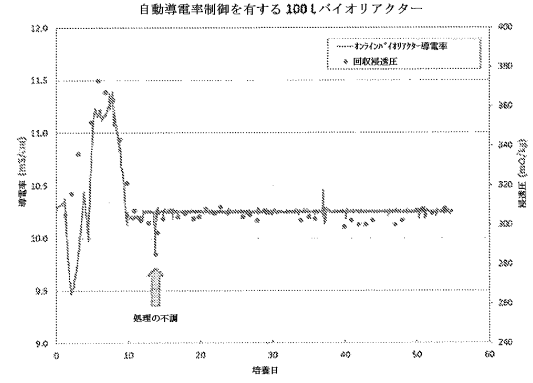
40

50

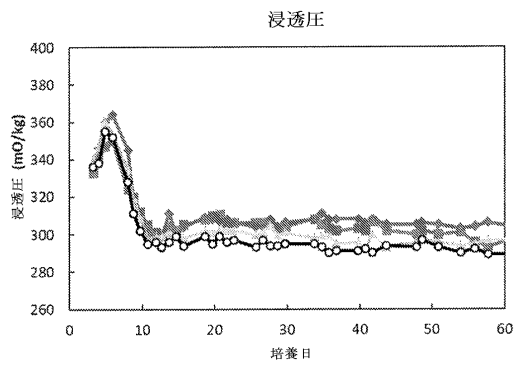
【図 6 B】



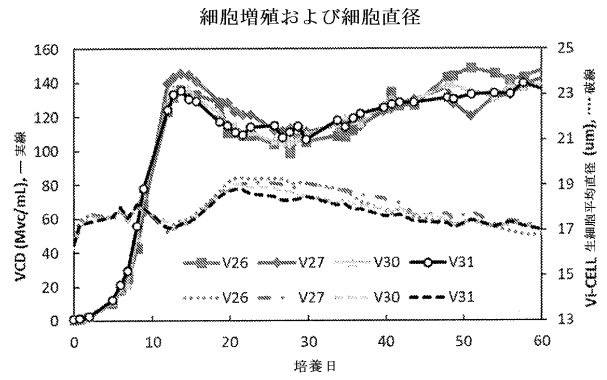
【図 7】



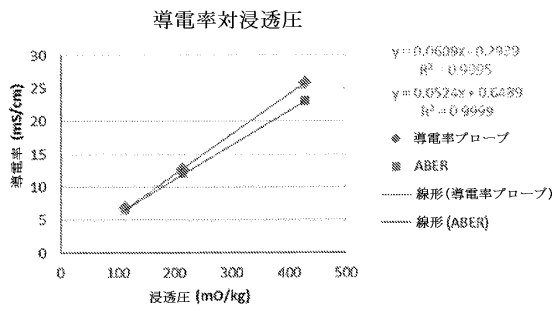
【図 8 A】



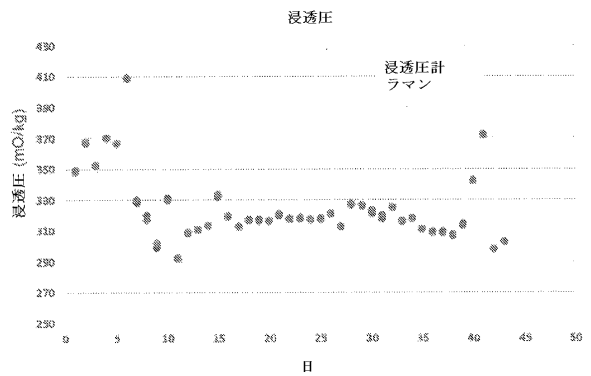
【図 8 B】



【図 9】



【図 10】



10

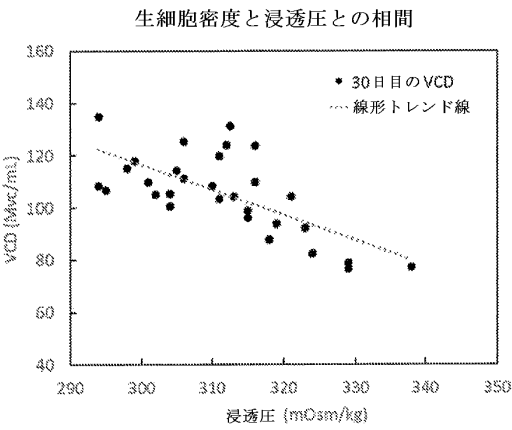
20

30

40

50

【図 1 1】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/024781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/071
ADD.

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)
C12N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 721 121 A (ETCHEVERRY TINA [US] ET AL) 24 February 1998 (1998-02-24) column 10, line 29 - line 44; claims; figures -----	117-120
X	US 8 911 964 B2 (ABBVIE INC [US]) 16 December 2014 (2014-12-16) claims; table 9 -----	117-120
X	WO 2021/058713 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]) 1 April 2021 (2021-04-01) paragraph [0028]; claims; figures -----	117-120
X	WO 02/101019 A2 (GENENTECH INC [US]; DELACRUZ NESLIHAN [US] ET AL.) 19 December 2002 (2002-12-19) page 11; claim 8 ----- -/--	117-120

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent 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

1 July 2022

Date of mailing of the international search report

11/07/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, Elena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/024781

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIMURA R ET AL: "Effects of elevated pCO2 and/or osmolality on the growth and recombinant tPA production of CHO cells", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 52, no. 1, 5 October 1996 (1996-10-05), pages 152-160, XP002536930, ISSN: 0006-3592 page 156 - page 157 -----	117-120
X	VIVIAN M DEZENGOTITA ET AL: "Effects of CO2 and osmolality on hybridoma cells: growth, metabolism and monoclonal antibody production", CYTOTECHNOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 28, no. 1-3, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 213-227, XP019236586, ISSN: 1573-0778, DOI: 10.1023/A:1008010605287 the whole document -----	117-120

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No PCT/US2022/024781	
Information on patent family members					
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5721121	A	24-02-1998	NONE		

US 8911964	B2	16-12-2014	US	2014234905 A1	21-08-2014
			US	2015093784 A1	02-04-2015

WO 2021058713	A1	01-04-2021	AU	2020352651 A1	24-03-2022
			CA	3154940 A1	01-04-2021
			KR	20220066970 A	24-05-2022
			WO	2021058713 A1	01-04-2021

WO 02101019	A2	19-12-2002	AU	2002316230 A1	23-12-2002
			CA	2447791 A1	19-12-2002
			EP	1404813 A2	07-04-2004
			JP	2004532642 A	28-10-2004
			US	2003087372 A1	08-05-2003
			WO	02101019 A2	19-12-2002

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

テーマコード (参考)

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,N
E,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,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,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,N
A,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

トドライブ 5 5 . サノフィ

- (72)発明者
- チャールズ・ブッデ
- アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー
- ー 5 2 5 . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ
- (72)発明者
- ダリル・パワーズ
- アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 8 0 7 . ブリッジウォーター . メールコード : 5 5 エー
- ー 5 2 5 . コーポレートドライブ 5 5 . サノフィ

F ターム (参考)

4B063 QA01 QQ08 QQ13 QX01

4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CC06 CC07 CC10 CC22 CC24 CD16

DA01

4B065 AA90X AB01 AC14 BC20 BC25 BD27 CA44

4C084 AA02 AA03 BA44 CA53 DB52 DC01 NA20 ZC02