



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115485363 A

(43) 申请公布日 2022.12.16

(21) 申请号 202080098424.X

(22) 申请日 2020.12.22

(30) 优先权数据

2020-043974 2020.03.13 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/047981 2020.12.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/181819 JA 2021.09.16

(71) 申请人 昭和电工材料株式会社

地址 日本国东京都千代田区

(72) 发明人 陈尚武 中川史子 多田靖彦

冈野定雅弘 佐藤优至 铃木悠午

中岛克彦 高桥亮介

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理

有限公司 11444

专利代理师 龚敏 王刚

(51) Int.Cl.

C12N 5/071 (2006.01)

C12N 5/0775 (2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54) 发明名称

细胞悬液的制造方法和黏附细胞的制造方法

(57) 摘要

本发明的一个实施方式涉及一种细胞悬液的制造方法,其包括下述(A)、(B)和(C), (A)在含有黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为0.3L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序; (B)在含有经过所述(A)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为5L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;以及(C)在含有经过所述(B)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为10L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序。

1. 一种细胞悬液的制造方法,包括下述(A)、(B)和(C):

(A) 在含有黏附细胞、微载体和培养基、且体积为0.3L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;

(B) 在含有经过所述(A)得到的黏附细胞、微载体和培养基、且体积为5L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;以及

(C) 在含有经过所述(B)得到的黏附细胞、微载体和培养基、且体积为10L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序。

2. 根据权利要求1所述的细胞悬液的制造方法,其中,

所述(A)包括:得到含有黏附细胞、新鲜的微载体和培养基、且体积为0.3L以上的细胞悬液的工序,以及培养所述黏附细胞的工序,

所述(B)包括:得到含有经过所述(A)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基、且体积为5L以上的细胞悬液的工序,以及培养所述黏附细胞的工序,

所述(C)包括:得到含有经过所述(B)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基、且体积为10L以上的细胞悬液的工序,以及培养所述黏附细胞的工序。

3. 根据权利要求1或2所述的细胞悬液的制造方法,其中,

经过所述(A)得到的黏附细胞和经过所述(B)得到的黏附细胞包含黏附在微载体上的细胞群体。

4. 根据权利要求2或3所述的细胞悬液的制造方法,其中,

所述(B)包括:至少将经过所述(A)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和新鲜的培养基混合而得到细胞悬液的工序,

所述(C)包括:至少将经过所述(B)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和新鲜的培养基混合而得到细胞悬液的工序。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的细胞悬液的制造方法,其中,

所述(B)中的细胞悬液的体积比所述(A)中的细胞悬液的体积大,所述(C)中的细胞悬液的体积比所述(B)中的细胞悬液的体积大。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的细胞悬液的制造方法,其中,

所述(C)中的细胞悬液的体积为30L以上。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的细胞悬液的制造方法,其中,

选自所述(A)、(B)和(C)中的至少一个工序包括:对所述细胞悬液进行间歇搅拌的工序。

8. 一种黏附细胞的制造方法,包括:

准备通过权利要求1至7中任一项所述的制造方法得到的细胞悬液的工序;以及从所述细胞悬液得到黏附细胞的工序。

9. 一种有用物质含有液的制造方法,包括:

准备通过权利要求1至7中任一项所述的制造方法得到的细胞悬液的工序;以及从所述细胞悬液得到有用物质含有液的工序。

10. 一种有用物质的制造方法,包括:

准备通过权利要求1至7中任一项所述的制造方法得到的细胞悬液、或通过权利要求9所述的制造方法得到的有用物质含有液的工序;以及

从所述细胞悬液或所述有用物质含有液得到有用物质的工序。

11. 根据权利要求9或10所述的制造方法, 其中, 所述有用物质包含选自细胞外囊泡和功能性蛋白质中的至少1种。

细胞悬液的制造方法和黏附细胞的制造方法

技术领域

[0001] 本公开涉及细胞悬液的制造方法、黏附细胞的制造方法、有用物质含有液的制造方法和有用物质的制造方法。

背景技术

[0002] 黏附细胞是在增殖中需要支架的细胞。一般而言,在黏附细胞的培养中使用作为支架的培养载体。在将这样的黏附细胞用于细胞制剂、有用物质生产等的情况下,需要大量增殖。在Biochemical Engineering Journal,120(2017) pp.49-62中,研究了使用微载体作为培养载体大量培养人间充质细胞的方法。

[0003] 另一方面,作为从细胞分泌的物质,已知有外泌体等细胞外囊泡。在国际公开第2009/105044号中,研究了包括将包含间充质干细胞的至少一种生物学性质的颗粒从间充质干细胞驯化培养基(MSC-CM)中分离的工序的颗粒制造方法。

发明内容

发明要解决的技术问题

[0004] 由于干细胞具有增殖能力和分化能力,因此期待其在再生医疗领域中的临床应用。在临床应用中需要非常多数量的干细胞。另外,从干细胞中分离出的外泌体由于含有各种生理活性物质,因此期待用于疾病的治疗法和诊断法。为了得到足够量的外泌体,仍然需要大量的干细胞。但是,关于大规模培养干细胞的技术,现状是仍有改善的余地。

[0005] 因此,本公开提供一种高效且大量制造细胞悬液的方法。另外,本公开提供一种高效且大量制造黏附细胞的方法。进而,本公开提供高效且大量制造有用物质含有液的方法和高效且大量制造有用物质的方法。

用于解决技术问题的手段

[0006] 在本公开中包括了本发明的各种实施方式。实施方式的例子可举出以下例子。

[0007] 一个实施方式涉及细胞悬液的制造方法,其包括下述(A)、(B)和(C),

(A) 在含有黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为0.3L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;

(B) 在含有经过所述(A)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为5L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;以及

(C) 在含有经过所述(B)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为10L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序。

[0008] 另一个实施方式涉及细胞悬液的制造方法,其包括:得到含有黏附细胞、新鲜的微载体和培养基的细胞悬液,并对所述细胞悬液进行间歇搅拌的工序;以及在经过所述间歇搅拌后,对所述细胞悬液进行连续搅拌的工序。

[0009] 另一个实施方式涉及黏附细胞的制造方法,其包括:准备通过基于上述任一实施方式的制造方法得到的细胞悬液的工序;以及从所述细胞悬液得到黏附细胞的工序。

[0010] 再另一个实施方式涉及有用物质含有液的制造方法,其包括:准备通过基于上述任一实施方式的制造方法得到的细胞悬液的工序;以及从所述细胞悬液得到有用物质含有液的工序。

[0011] 再另一个实施方式涉及有用物质的制造方法,其包括:准备通过基于上述任一实施方式的制造方法得到的细胞悬液或通过基于上述实施方式的制造方法得到的有用物质含有液的工序;以及从所述细胞悬液或所述有用物质含有液得到有用物质的工序。

发明效果

[0012] 根据本公开,提供了一种高效且大量制造细胞悬液的方法。另外,根据本公开,提供了一种高效且大量制造黏附细胞的方法。进而,根据本公开,提供了高效且大量制造有用物质含有液的方法和高效且大量制造有用物质的方法。

附图说明

[0013] 图1是表示实施例中的细胞悬液的制造方法的示意图。

具体实施方式

[0014] 对本发明的实施方式进行说明。本发明不限于以下的实施方式。以下的实施方式能够单独或组合实施。

[0015] <细胞悬液的制造方法>

[包括工序(A)、(B)和(C)的制造方法]

根据本公开的实施方式,细胞悬液的制造方法包括下述(A)、(B)和(C),

(A)在含有黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为0.3L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;

(B)在含有经过所述(A)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为5L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序;以及

(C)在含有经过所述(B)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为10L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序。

[0016] 在本公开中,有时将上述(A)、(B)和(C)分别称为工序(A)、工序(B)和工序(C)。但是,“工序”不仅包括独立的工序,还包括即使是在无法与其他工序明确区分的情况下,只要实施在该“工序”中规定的操作就无法与其他工序明确区分的工序。

[0017] 根据包括工序(A)、(B)和(C)的细胞悬液的制造方法,能够容易地大量培养黏附细胞,在大量培养后,以良好的存活率得到了均质的细胞群体。在黏附细胞的大量培养中,有时使用将黏附细胞从作为支架的培养载体剥离、传代、培养的方法。但是,伴随着通过剥离等而进行的黏附细胞与微载体的分离的传代操作有时会引起黏附细胞的污染、损伤等。根据本公开,通过一边对包含新鲜的微载体的用于培养的细胞悬液进行特定体积管理,一边依次执行工序(A)、(B)和(C)的简单方法,促进了黏附细胞在微载体之间的移动,使得能够实现黏附细胞的高效传代培养,并且实现了黏附细胞的大量培养。

[0018] 细胞悬液是指包含细胞的液体,此处的细胞可以是黏附在微载体上的状态或未黏附的状态中的任一种。

[0019] [黏附细胞]

作为黏附细胞,只要是已知对所选择的基材显示出黏附性的细胞即可,没有特别限制,例如,可举出:体细胞、干细胞等。作为体细胞,例如,可举出:内皮细胞、表皮细胞、上皮细胞、心肌细胞、成肌细胞、神经细胞、骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、肝细胞、肾细胞、胰细胞、肾上腺细胞、牙周膜细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、树突细胞、巨噬细胞等。

[0020] 黏附细胞优选为动物来源的细胞,更优选为哺乳动物来源的细胞。作为哺乳动物,例如,可举出:人、猴子、黑猩猩、牛、猪、马、绵羊、山羊、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、狗、猫等。黏附细胞例如可以是来源于皮肤、肝脏、肾脏、肌肉、骨、血管、血液、神经组织等组织的细胞。细胞通常将1种单独供于培养,也可以将两种以上组合供于培养。细胞可以是来源于组织的原代细胞,也可以是通过永生化建立的细胞株。进而,细胞可以是人工建立的细胞。

[0021] 在一个实施方式中,黏附细胞可以是干细胞。作为干细胞,能够举出:间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞、骨髓干细胞、生殖干细胞等体干细胞等,能够设为间充质干细胞或骨髓间充质干细胞。间充质干细胞广义上是指存在于人体的各种组织中,能够分化为成骨细胞、软骨细胞以及脂肪细胞等间充质细胞的全部或其中的几种的体干细胞。在干细胞中,可以进一步包括人工多能性干细胞(Induced pluripotent stem cells;iPS细胞)、胚胎干细胞(Embryonic stem cell;ES细胞)。在一个实施方式中,基于本公开的细胞悬液的制造方法是适于大量生产间充质干细胞的方法。

[0022] [微载体]

微载体是在黏附细胞的培养中作为细胞增殖的支架的载体。能够使用已知的微载体作为细胞培养用的载体。微载体的材质可以是有机物、无机物或这些的复合材料,也可以是溶解性或不溶解性。作为有机物,例如,可举出:聚苯乙烯、聚酯、聚氨酯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙烯醇、(甲基)丙烯酸系聚合物、(甲基)丙烯酰胺系聚合物、硅酮系聚合物、环氧树脂、聚氨酯树脂等合成高分子;纤维素、葡聚糖、胶原、聚半乳糖醛酸、聚藻酸、明胶等天然高分子等。作为无机物,例如,可举出:玻璃、陶瓷、金属、合金、金属氧化物等。从细胞适应性的观点出发,微载体的材质优选含有有机物,更优选含有天然高分子。从操作性的观点出发,优选溶解性的微载体,但不限于此。在本公开中“溶解性的微载体”是指能够通过酶等方法分解至所黏附的细胞能够从微载体游离的程度的微载体。

[0023] 从促进细胞的附着的观点出发,也可以在微载体的表面导入阳离子性官能团。作为阳离子性官能团,可举出:含有二甲基氨基、二乙基氨基、氨基等取代或非取代的氨基的基团。另外,从促进细胞的附着的观点出发,也可以在微载体的表面配置细胞黏附性聚合物。作为细胞黏附性聚合物,可以是显示出细胞黏附性的多肽或多糖,可举出:胶原、明胶、藻酸、Matrigel(商标)基质胶(BD Biosciences)、透明质酸、层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、玻连蛋白、弹性蛋白、硫酸乙酰肝素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、硫酸软骨素等。细胞黏附性聚合物可以是显示出细胞黏附性的部分肽或寡糖。

[0024] 作为微载体的形状,例如,可举出:球状、扁平状、圆柱状、板状、棱柱状等。微载体优选包含球状微载体。微载体可以是在内部具有细孔的多孔质微载体,也可以是在内部不具有细孔的微载体。

[0025] 从促进细胞增殖的观点出发,微载体的平均粒径(D50)例如为50~1000 μm ,优选为100~500 μm ,更优选为150~250 μm 。微载体的平均粒径是作为生理盐水或培养基中的中值

粒径(D50)测定的值。微载体的平均粒径能够通过激光衍射散射式的粒径分布测定装置进行测定。

[0026] 作为微载体,可以使用新鲜的微载体或使用过的微载体,优选使用新鲜的微载体。在本公开中,“新鲜的微载体”是指未被用作细胞培养用的载体(支架)的微载体,即未使用的微载体。在本公开中,“使用过的微载体”是指已经作为细胞培养的载体使用过的微载体。

[0027] 悬液中的微载体的浓度能够根据微载体的形状、大小、表面积等适当调整,例如能够设为0.01~100g/L、0.5~50g/L或1~20g/L。

[0028] [培养基]

作为培养基,在基于本公开的制造方法中使用液体培养基。培养基优选含有无机盐、氨基酸、糖和水。培养基还可以含有血清、核苷和/或核苷酸、维生素、激素、抗生素、生长因子、黏附因子等任选成分。作为培养基,能够使用作为细胞培养用的基础培养基而公知的培养基。

[0029] 作为培养基,只要是已知的用于培养所选择的细胞的培养基,就能够没有特别限制地使用,例如,可举出:DMEM(达尔伯克改良伊格尔培养基)、MEM(伊格尔最小必须培养基)、 α MEM培养基(伊格尔最小必须培养基 α 改良型)、GMEM(Glasgow最小必须培养基)、IMDM(Iscove改良达尔伯克培养基)、Ham's F12(营养混合物F-12Ham)、RPMI-1640(RPMI-1640培养基)、McCoy's 5A(McCoy's 5A培养基)、MSC growth medium 2(Promocell公司制造)、Prime XV XSFM(Irvine Scientific公司制造)以及包含从这些中选择出的两种以上的混合物。除此之外,还能够使用公知的培养基,特别是能够使用已知用于干细胞的培养的培养基。用于培养的培养基能够不含有异源成分。不含有异源成分的培养基能够代替动物来源的血清而含有血清的代替添加物(例如Knockout Serum Replacement(KSR)(Invitrogen公司制造)、Chemically-defined Lipid concentrated(Gibco公司制造)、Glutamax(Gibco公司制造)等)。

[0030] 从促进细胞增殖的观点出发,培养基优选含有核苷和/或核苷酸,更优选含有核苷。核苷可以是核糖核苷、脱氧核糖核苷或这些的混合物。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或这些的混合物。作为核苷和核苷酸中所含有的碱基,可举出:腺嘌呤、鸟嘌呤等嘌呤碱基、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶等嘧啶碱基等。在培养基含有核苷和/或核苷酸的情况下,培养基中的这些的浓度能够设为1~20mg/L或5~10mg/L。

[0031] [培养]

培养黏附细胞的条件可以根据细胞的种类调整为适合细胞增殖的条件。培养温度例如能够设为20~45℃,优选为30~40℃。二氧化碳浓度例如能够设为1~20体积%,优选为3~15体积%。在哺乳类细胞的情况下,一般使用37℃的温度、5%(v/v)的二氧化碳浓度。作为培养容器,例如,可举出:烧瓶、生物反应器、罐和培养袋等。

[0032] 培养能够通过搅拌或振荡细胞悬液来进行。在各工序中,也可以包括停止搅拌或振荡的时间。搅拌可以是仅间歇搅拌、仅连续搅拌、或者间歇搅拌和连续搅拌的组合。能够将后述的间歇搅拌和连续搅拌的说明、方式、例子、条件等分别独立地应用于工序(A)、(B)和/或(C)。

[0033] 培养优选在搅拌或振荡放入培养容器内的细胞悬液、使微载体在细胞悬液中悬浮的状态下进行。作为搅拌方法,能够根据后述的根据细胞悬液的体积选择的培养容器的种

类、大小等适当选择,例如,可举出:使用磁力搅拌器、机械搅拌器、均相混合机、均质器、维氏(vortex)混合机等的方法。作为振荡方法,例如,可举出:使用振荡机的方法。根据一个实施方式,从得到微载体良好地分散在细胞悬液中的悬液的观点出发,优选搅拌细胞悬液。

[0034] 能够使微载体良好地分散在细胞悬液中的搅拌速度依赖于培养容器的形状和容量,但一般在1~50L搅拌槽生物反应器(Stirred Tank Bioreactor)的情况下,能够设为30~200rpm,优选为40~100rpm。也可以根据微载体或细胞的悬浮状态在培养过程中改变搅拌速度。

[0035] [工序(A)]

在工序(A)中,在含有黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为0.3L以上的细胞悬液中培养黏附细胞。通过培养,黏附细胞附着在微载体上并增殖,由此,得到含有黏附在微载体上的黏附细胞的细胞悬液。即,经过工序(A)得到的黏附细胞包含黏附在微载体上的黏附细胞群体。培养能够持续进行规定时间。从均匀且高效地大量培养黏附细胞的观点出发,所述细胞悬液的体积例如能够设为0.3L以上、0.5L以上或1L以上。作为所述细胞悬液的体积的上限值,没有特别限制,从效率性和经济性的观点出发,例如能够设为10L以下或5L以下。

[0036] 例如,在工序(A)中,得到含有黏附细胞、新鲜的微载体和培养基,并且体积为0.3L以上的细胞悬液,培养黏附细胞。在本公开中,有时将在工序(A)中得到的、培养前的细胞悬液称为细胞悬液(A1)。另外,在本公开中,有时将在工序(A)中培养后的细胞悬液称为细胞悬液(A2)。

[0037] 细胞悬液(A1)例如能够通过至少混合黏附细胞、新鲜的微载体和培养基而得到。更具体地说,细胞悬液(A1)能够通过至少将未与微载体黏附的黏附细胞、新鲜的微载体以及新鲜的培养基混合而得到。从均匀且高效地大量培养黏附细胞的观点出发,细胞悬液(A1)的体积例如能够设为0.3L以上、0.5L以上或1L以上。作为细胞悬液(A1)的体积的上限值,没有特别限制,但从效率性和经济性的观点出发,例如能够设为10L以下或5L以下。

[0038] 细胞悬液(A1)中的黏附细胞的浓度例如为 $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/mL,优选为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 细胞/mL,更优选为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 细胞/mL。细胞悬液(A1)中的新鲜的微载体的浓度例如为0.1~50g/L,优选为0.5~10g/L,更优选为1~5g/L。

[0039] 作为工序(A)中的培养时间,根据细胞的播种密度、细胞的种类、培养条件等而不同,但一般能够设为达到细胞充分生长的状态、例如以微载体的细胞可黏附区域(黏附细胞可黏附的区域)为基准达到80%以上、90%以上、95%以上或100%汇合为止的时间。在本公开中,能够通过荧光显微镜(KEYENCE株式会社制造)观察细胞可黏附区域中的细胞的生长状态。具体地说,通过求出以微载体表面积为基准的黏附在微载体表面上的细胞的伸展面积的百分率(汇合的程度),能够确认细胞的生长状态。培养时间例如能够设为2~14天。

[0040] 在工序(A)中,从效率性的观点出发,黏附细胞的培养能够通过调整了温度、二氧化碳浓度等的适当的培养条件下搅拌细胞悬液(A1)来进行。搅拌可以是仅间歇搅拌、仅连续搅拌或者间歇搅拌和连续搅拌的组合。在一个实施方式中,工序(A)包括对细胞悬液(A1)进行间歇搅拌的工序和对经过间歇搅拌得到的细胞悬液进行连续搅拌的工序。关于间歇搅拌和连续搅拌将在后面叙述。在连续搅拌之后,可以进行间歇搅拌,也可以反复进行间歇搅拌和连续搅拌的组合。在另一实施方式中,工序(A)中的搅拌仅由对细胞悬液(A1)进行

间歇搅拌的工序构成。

[0041] 通过工序(A)得到的细胞悬液(A2)的体积能够设为0.3L以上、0.5L以上或1L以上。在工序(A)中,能够在培养中途的细胞悬液(A1)中添加培养基,和/或将培养中途的细胞悬液(A1)中所含有的培养基的一部分或全部交换为新鲜的培养基。在工序(A)的中途,也可以组合两个以上培养中途的细胞悬液(A1)。根据情况,也可以在培养中途的细胞悬液(A1)中加入不与微载体黏附的黏附细胞。作为细胞悬液(A2)的体积的上限值,没有特别限制,但从效率性和经济性的观点出发,例如能够设为10L以下或5L以下。

[0042]

[工序(B)]

在工序(B)中,在含有经过工序(A)得到的黏附细胞、微载体和培养基,并且体积为5L以上的细胞悬液中培养黏附细胞。通过培养,通过工序(A)得到的与微载体黏附的黏附细胞游走、附着在其他微载体上并增殖,优选游走、附着到新鲜的微载体上并增殖,由此,得到了含有与微载体黏附的黏附细胞的细胞悬液。即,经过工序(B)得到的黏附细胞包含黏附在微载体上的黏附细胞群体。培养能够持续进行规定时间。所述细胞悬液的体积例如能够设为5L以上、8L以上或10L以上。从高效且大量培养黏附细胞的观点出发,所述细胞悬液的体积例如能够设为50L以下、40L以下或30L以下。

[0043] 例如,在工序(B)中,得到含有经过工序(A)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基,并且体积为5L以上的细胞悬液,培养黏附细胞。在本公开中,有时将在工序(B)中得到的、培养前的细胞悬液称为细胞悬液(B1)。另外,在本公开中,有时将在工序(B)中的培养后的细胞悬液称为细胞悬液(B2)。

[0044] 细胞悬液(B1)例如能够通过至少将经过工序(A)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基混合而得到。更具体地说,细胞悬液(B1)能够通过至少混合细胞悬液(A2)的一部分或全部、新鲜的微载体以及新鲜的培养基而得到。在混合中,也可以组合使用通过实施另外独立的工序(A)而得到的两个以上的细胞悬液(A2)。在该情况下,细胞悬液(B1)包含来源于两个以上的细胞悬液(A2)的黏附细胞。

[0045] 在工序(B)中,可以继续使用在工序(A)中使用并包含细胞悬液(A1)的培养容器,也可以使用与在工序(A)中使用的培养容器不同的培养容器。在前者中,通过在培养容器中加入新鲜的微载体和培养基,能够得到细胞悬液(B1)。在后者中,通过在培养容器中加入细胞悬液(A1)、新鲜的微载体和培养基,能够得到细胞悬液(B1)。在任何情况下,添加的顺序没有特别限定。

[0046] 从高效且大量培养黏附细胞的观点出发,细胞悬液(B1)的体积例如能够设为5L以上、8L以上或10L以上。从高效且大量培养黏附细胞的观点出发,细胞悬液(B1)的体积例如能够设为50L以下、40L以下或30L以下。优选地,细胞悬液(B1)的体积比细胞悬液(A2)的体积大。从由细胞悬液(A2)向细胞悬液(B1)高效地规模扩大的观点出发,细胞悬液(B1)的体积与细胞悬液(A2)的体积之比([细胞悬液(B1)的体积]/[细胞悬液(A2)的体积])例如为1.5~20,优选为2~10,更优选为3~6。特别是,在通过将细胞悬液(A2)的一部分或全部、新鲜的微载体和新鲜的培养基混合而得到细胞悬液(B1)的情况下,从使细胞悬液(A2)向细胞悬液(B1)高效地规模扩大的观点出发,细胞悬液(B1)的体积与混合中使用的细胞悬液(A2)的总体积之比([细胞悬液(B1)的体积]/[混合中使用的细胞悬液(A2)的总体积])例如为1.5

~20, 优选为2~10, 更优选为3~8。在本公开中, “规模扩大”是指使培养环境的体积增大。

[0047] 细胞悬液(B1)中的黏附细胞的浓度例如为 $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/mL, 优选为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 细胞/mL, 更优选为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 细胞/mL。细胞悬液(B1)中的新鲜的微载体的浓度例如为0.1~50g/L, 优选为0.5~10g/L, 更优选为1~5g/L。

[0048] 作为工序(B)中的培养时间, 根据细胞的播种密度、细胞的种类、培养条件等而不同, 但一般能够设为达到细胞充分生长的状态、例如以微载体的细胞可黏附区域为基准达到80%以上、90%以上、95%以上或100%汇合为止的时间。培养时间例如能够设为2~10天。

[0049] 在工序(B)中, 从效率性的观点出发, 黏附细胞的培养能够通过调整了温度、二氧化碳浓度等的适当的培养条件下搅拌细胞悬液(B1)来进行。搅拌可以是仅间歇搅拌、仅连续搅拌或者间歇搅拌和连续搅拌的组合。在一个实施方式中, 工序(B)包括对细胞悬液(B1)进行间歇搅拌的工序和对经过间歇搅拌得到的细胞悬液进行连续搅拌的工序。关于间歇搅拌和连续搅拌将在后面叙述。在连续搅拌之后, 可以进行间歇搅拌, 也可以反复进行间歇搅拌和连续搅拌的组合。在另一实施方式中, 工序(B)中的搅拌仅由对细胞悬液(B1)进行间歇搅拌的工序构成。

[0050] 通过工序(B)得到的细胞悬液(B2)的体积能够设为5L以上、8L以上或10L以上。在工序(B)中, 能够在培养中途的细胞悬液(B1)中添加培养基, 和/或将培养中途的细胞悬液(B1)中所含有的培养基的一部分或全部交换为新鲜的培养基。在工序(B)的中途, 也可以组合两个以上培养中途的细胞悬液(B1)。根据情况, 也可以在培养中途的细胞悬液(B1)中加入不与微载体黏附的黏附细胞。作为细胞悬液(B2)的体积的上限值, 没有特别限制, 但从效率性和经济性的观点出发, 例如能够设为50L以下、40L以下或30L以下。

[0051] [工序(C)]

在工序(C)中, 在含有经过工序(B)得到的黏附细胞、微载体和培养基, 并且体积为10L以上的细胞悬液中培养黏附细胞。通过培养, 通过工序(B)得到的与微载体黏附的黏附细胞游走、附着到其他微载体上并增殖, 优选游走、附着到新鲜的微载体上并增殖, 由此, 得到含有与微载体黏附的黏附细胞的细胞悬液。即, 经过工序(C)得到的黏附细胞包含黏附在微载体上的黏附细胞群体。培养能够持续进行规定时间。从高效且大量培养黏附细胞的观点出发, 所述细胞悬液的体积例如能够设为10L以上、20L以上或30L以上。从高效且大量培养黏附细胞的观点出发, 所述细胞悬液的体积例如能够设为500L以下、300L以下、150L以下、100L以下或80L以下。

[0052] 例如, 在工序(C)中, 得到含有经过工序(B)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基, 并且体积为10L以上的细胞悬液, 培养黏附细胞。在本公开中, 有时将在工序(C)中得到的、培养前的细胞悬液称为细胞悬液(C1)。另外, 在本公开中, 有时将在工序(C)中的培养后的细胞悬液称为细胞悬液(C2)。

[0053] 细胞悬液(C1)例如能够通过至少将经过工序(B)得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基混合而得到。更具体地说, 细胞悬液(C1)能够通过至少混合细胞悬液(B2)的一部分或全部、新鲜的微载体以及新鲜的培养基而得到。在混合中, 也可以组合使用通过实施另外独立的工序(B)而得到的两个以上的细胞悬液(B2)。在该情况下, 细胞悬液(C1)包含来源于两个以上的细胞悬液(B2)的黏附细胞。

[0054] 从高效且大量培养黏附细胞的观点出发,细胞悬液(C1)的体积例如能够设为10L以上、20L以上或30L以上。从高效且大量培养黏附细胞的观点出发,细胞悬液(C1)的体积例如能够设为500L以下、300L以下、150L以下、100L以下或80L以下。优选地,细胞悬液(C1)的体积比细胞悬液(B2)的体积大。从由细胞悬液(B2)向细胞悬液(C1)高效地规模扩大的观点出发,细胞悬液(C1)的体积与细胞悬液(B2)的体积之比([细胞悬液(C1)的体积]/[细胞悬液(B2)的体积])例如为1.5~20,优选为2~10,更优选为2~6。特别是,在通过将细胞悬液(B2)的一部分或全部、新鲜的微载体和新鲜的培养基混合而得到细胞悬液(C1)的情况下,从使细胞悬液(B2)向细胞悬液(C1)高效地规模扩大的观点出发,细胞悬液(C1)的体积与混合中使用的细胞悬液(B2)的总体积之比([细胞悬液(C1)的体积]/[混合中使用的细胞悬液(B2)的总体积])例如为1.5~10,优选为1.8~6,更优选为2~3。

[0055] 细胞悬液(C1)中的黏附细胞的浓度例如为 $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 细胞/mL,优选为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 细胞/mL,更优选为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 细胞/mL。细胞悬液(C1)中的新鲜的微载体的浓度例如为0.1~50g/L,优选为0.5~10g/L,更优选为1~5g/L。

[0056] 作为工序(C)中的培养时间,根据细胞的播种密度、细胞的种类、培养条件等而不同,但一般能够设为达到细胞充分生长的状态、例如以微载体的细胞可黏附区域为基准达到80%以上、90%以上、95%以上或100%汇合为止的时间。培养时间例如能够设为3~20天。

[0057] 在工序(C)中,从效率性的观点出发,黏附细胞的培养能够通过调整了温度、二氧化碳浓度等的适当的培养条件下搅拌细胞悬液(C1)来进行。搅拌可以是仅间歇搅拌、仅连续搅拌或者间歇搅拌和连续搅拌的组合。在一个实施方式中,工序(C)包括对细胞悬液(C1)进行间歇搅拌的工序和对经过间歇搅拌得到的细胞悬液进行连续搅拌的工序。关于间歇搅拌和连续搅拌将在后面叙述。在连续搅拌之后,可以进行间歇搅拌,也可以反复进行间歇搅拌和连续搅拌的组合。在另一实施方式中,工序(C)中的搅拌仅由对细胞悬液(C1)进行间歇搅拌的工序构成。

[0058] 通过工序(C)得到的细胞悬液(C2)的体积例如能够设为10L以上、20L以上或30L以上。在工序(C)中,能够在培养中途的细胞悬液(C1)中添加培养基,和/或将培养中途的细胞悬液(C1)中所含有的培养基的一部分或全部交换为新鲜的培养基。在工序(C)的中途,也可以组合两个以上培养中途的细胞悬液(C1)。根据情况,也可以在培养中途的细胞悬液(C1)中加入不与微载体黏附的黏附细胞。作为细胞悬液(C2)的体积的上限值,没有特别限制,但从经济性的观点出发,例如能够设为500L以下、300L以下、150L以下、100L以下或80L以下。

[0059] [包括工序(A)、(B)和(C)的制造方法的例子]

在本公开中,细胞悬液的制造方法包括工序(A)、(B)和(C)。通过实施工序(A)、(B)和(C),得到含有黏附细胞的细胞悬液(例如,细胞悬液(C2))。在各工序中,黏附细胞进行传代培养。细胞悬液的制造方法可以分别独立地包括两次以上各工序。在各工序之间也可以包括任选工序。在一个实施方式中,细胞悬液的制造方法中所包含的工序(A)、工序(B)和工序(C)的总计次数优选为6次以下,更优选为5次以下,进一步优选为3次或4次。在一个实施方式中,包含在细胞悬液的制造方法中的“由细胞悬液(A2)向细胞悬液(B1)的规模扩大”和“由细胞悬液(B2)向细胞悬液(C1)的规模扩大”的总计次数优选为5次以下,更优选为4次以下,进一步优选为2次或3次,特别优选为2次。

[0060] 作为制造方法,例如可举出:包括1次工序(A)、1次工序(B)和1次工序(C)的制造方法;包括彼此独立的多个工序(A)、将在上述中得到的两个以上的细胞悬液(A2)组合使用的1次工序(B)和1次工序(C)的制造方法(总计4次以上的工序);包括1次工序(A)、1次工序(B)、使用在上述中得到的细胞悬液(B2)的第2次工序(B)和1次工序(C)的制造方法(总计4次工序)等。

[0061] 作为在细胞悬液的制造方法中包括的任选工序,例如,可举出以下工序:解冻冻结的细胞、清洗细胞、接种细胞、追加微载体、将培养基或培养基中包含的至少一种成分追加到细胞悬液中、交换细胞悬液中包含的至少一部分培养基、静置细胞悬液、分离细胞与微载体、在工序(A)之前或工序(C)之后进行培养基交换、细胞培养、或进行培养基交换和细胞培养等。在一个实施方式中,细胞悬液的制造方法不包括从微载体剥离黏附细胞等分离微载体与黏附细胞的工序。在不包含微载体与黏附细胞的分离工序的情况下,能够抑制黏附细胞的污染、损伤等,良好地保持黏附细胞所具有的功能,另外,能够提高细胞培养的经济效率及时间效率。

[0062] [包括间歇搅拌和连续搅拌的细胞悬液的制造方法]

根据本公开的另一个实施方式,细胞悬液的制造方法包括:得到包含黏附细胞、微载体和培养基的细胞悬液,并对所述细胞悬液进行间歇搅拌的工序和对通过所述间歇搅拌得到的细胞悬液进行连续搅拌的工序。作为此处的细胞悬液的例子,可举出上述的细胞悬液(A1)、细胞悬液(B1)、细胞悬液(C1)等,但不限于此。黏附细胞、微载体和培养基等如上所述。细胞悬液的制造方法可以包含以下的任选工序:解冻冻结的细胞、清洗细胞、接种细胞、将培养基或培养基中包含的至少一种成分追加到细胞悬液中、交换细胞悬液中包含的至少一部分培养基、静置细胞悬液、分离细胞与微载体等。

[0063] 根据本公开,能够通过包括间歇搅拌和连续搅拌的制造方法来实现黏附细胞的大量培养。一般而言,在使用微载体的黏附细胞的培养中,为了在培养用的细胞悬液中得到微载体的良好的分散状态,进行连续搅拌。另一方面,在本公开中,通过组合执行间歇搅拌和连续搅拌的简单方法,能够得到微载体的良好悬浮状态,并且实现黏附细胞的大量培养。如果对其进一步进行说明,则认为在连续搅拌时以及间歇搅拌时产生的微载体的沉淀是由黏附细胞的黏附量引起的微载体的重量的偏差,黏附细胞未黏附的微载体的聚集等引起的。可推测:通过组合进行间歇搅拌和连续搅拌这样的简便方法来消除这样的沉淀,可以得到微载体的良好的悬浮状态,实现了黏附细胞的大量培养。另外,在本公开中,通过在该搅拌方式的基础上组合将新鲜的微载体加入到培养系统中而使黏附细胞从所黏附的微载体游走到可黏附面积大的其他微载体上、从而高效地增殖的所谓的“bead to bead”方式的培养方法,能够进行更大规模的培养。但是,不受该理论约束。

[0064] 在本公开中,间歇搅拌是指每隔预定时间进行搅拌或不进行搅拌。例如,间歇搅拌是指交替地实施在规定时间内持续进行搅拌和在规定时间内持续不进行搅拌。交替地实施可以是进行搅拌和不进行搅拌的组合重复两次以上(将“‘进行搅拌’和其后的‘不进行搅拌’”计作1次组合。)。进行搅拌的时间和不进行搅拌的时间可以相同也可以不同。另外,在两次以上的重复中,在各次之间进行搅拌的时间和/或不进行搅拌的时间可以相同也可以不同。不进行搅拌的时间可以是静置细胞悬液的时间。

[0065] 进行搅拌的时间例如为0.5~60分钟,优选为1~20分钟,更优选为3~10分钟。不

进行搅拌的时间例如为0.1~10小时,优选为0.5~6小时,更优选为1~3小时。作为组合的例子,可举出“‘搅拌0.5~60分钟’和其后的‘不搅拌0.1~10小时’”,优选“‘搅拌1~20分钟’和其后的‘不搅拌0.5~6小时’”,更优选“‘搅拌3~10分钟’和其后的‘不搅拌1~3小时’”。

[0066] 进行间歇搅拌的时间(进行两次以上的“‘搅拌’和其后的‘不搅拌’”的总计时间)例如为1~80小时,优选为10~40小时,更优选为20~30小时。

[0067] 经过间歇搅拌后进行的连续搅拌是指持续规定时间进行搅拌。进行搅拌的时间例如为1~14天,优选为2~10天,更优选为3~7天。在细胞的培养中,例如有时为了向细胞悬液追加培养基、交换培养基等而暂时停止搅拌的情况。此处所称的暂时停止通常不是单纯地静置细胞悬液的时间。所述进行搅拌的时间可以不是暂时停止前的进行搅拌的时间和暂时停止后的进行搅拌的时间的总计。即,也可以通过停止搅拌来划分、测定进行搅拌的时间。

[0068] 间歇搅拌和连续搅拌可以连续进行,或者也可以在间歇搅拌和连续搅拌之间包含在规定的时间内持续不进行搅拌的情况。规定的时间例如为0.1~24小时,优选为0.5~5小时,更优选为1~2小时。不进行搅拌可以是将细胞悬液静置。在连续搅拌之后,可以进行间歇搅拌,也可以反复进行间歇搅拌和连续搅拌的组合。

[0069] 包含间歇搅拌和连续搅拌的培养时间的总计能够根据培养的黏附细胞的种类、目的、培养的条件而适当设定。

[0070] <黏附细胞的制造方法>

根据本公开的实施方式,黏附细胞的制造方法包括准备通过所述任一个实施方式得到的细胞悬液的工序、以及从细胞悬液得到黏附细胞的工序。黏附细胞的制造方法可以包含任选工序。由所述细胞悬液的制造方法得到的细胞悬液中包含有黏附在微载体上的黏附细胞。

[0071] 能够通过使用上清的去除、离心分离等公知的分离方法从细胞悬液回收细胞悬液中的与微载体黏附的黏附细胞,在黏附于微载体的状态下得到黏附细胞。然后,能够通过酶处理等公知的剥离方法从微载体上剥离黏附细胞,并通过回收而得到黏附细胞。或者,能够通过用公知的溶解方法使微载体溶解,并通过回收黏附细胞而得到黏附细胞。

在另一实施方式中,在包含黏附在微载体上的黏附细胞的细胞悬液中加入规定的酶等,使黏附细胞从微载体上剥离,或者使微载体溶解,或者进行这两者,从而能够成为能够仅回收黏附细胞的状态。然后,能够通过使用过滤器等公知的分离器回收可回收状态的黏附细胞,从而得到黏附细胞。

[0072] <有用物质含有液的制造方法和有用物质的制造方法>

通过所述细胞悬液的制造方法得到的细胞悬液中能够包含微载体、与微载体黏附的黏附细胞和有用物质。有用物质可以由黏附细胞分泌的物质,例如外泌体、微囊泡、凋亡小体等细胞外囊泡;细胞因子、激素、抗体等功能性蛋白质等。

[0073] 根据本公开的实施方式,有用物质含有液的制造方法包括准备通过所述任一个实施方式得到的细胞悬液的工序、以及从细胞悬液得到有用物质含有液的工序。有用物质含有液的制造方法可以进一步包含任选工序。

[0074] 作为有用物质含有液的制造方法中的任选工序,例如,可举出:用于回收有用物质

的追加培养工序。在追加培养工序中,也可以使用回收用培养基,该回收用培养基用于高效地回收通过所述细胞悬液的制造方法在细胞内生成的有用物质。作为回收用培养基,例如,可举出:不含有FBS等包含外泌体的添加物而能够维持细胞的生长的培养基,能够根据有用物质的种类、细胞的种类等适当选择。例如,在有用物质包含外泌体的情况下,可举出:含有FGF-2、胰岛素、转铁蛋白和硒的DMEM/F12等。

[0075] 通过将有用物质与细胞悬液中的微载体及黏附细胞分离,并回收含有有用物质的液体,能够得到有用物质含有液。在分离中能够使用上清的回收、离心分离等公知的分离方法。例如,能够通过从细胞悬液中去除微载体和黏附细胞,得到有用物质含有液。可以使有用物质含有液实质上不含微载体和黏附细胞。在本说明书中,“有用物质含有液实质上不含微载体和黏附细胞”是指例如每100mL有用物质含有液中,细胞为两个以下,具有50 μ m以上的粒径的微载体为1个以下。

[0076] 根据本公开的实施方式,有用物质的制造方法包括:准备通过上述任一实施方式得到的细胞悬液或通过上述的实施方式得到的有用物质含有液的工序、以及从所述细胞悬液或所述有用物质含有液得到有用物质的工序。有用物质的制造方法可以进一步包含任选工序。

[0077] 通过将有用物质含有液中的有用物质与其他成分分离并回收有用物质,可以得到有用物质。分离能够使用上清的除去、离心分离等公知的分离方法。例如,能够通过从细胞悬液分离有用物质来得到有用物质。

[0078] 在一个实施方式中,有用物质包含外泌体。外泌体是包含脂质双层的囊泡。外泌体的直径例如为50~1000nm、50~300nm或50~200nm。外泌体由于含有蛋白质、核酸、糖质、脂质等各种生理活性物质,因此期待用于疾病的治疗法以及诊断法、医药品、化妆品等。

[0079] 黏附细胞存在于细胞悬液中的情况下,外泌体从黏附细胞分泌到细胞悬液中。作为来源于黏附细胞的外泌体,只要是由上述的黏附细胞得到的外泌体即可,没有特别限制。例如,可举出国际公开第2009/105044号中记载的外泌体。

[0080] 可以将有用物质含有液过滤、浓缩,或者过滤以及浓缩。例如,能够使用具有尺寸或分子量截止值的膜来过滤有用物质含有液。或者,能够使用切向流动过滤或超滤来过滤或浓缩有用物质含有液。

[0081] 有用物质含有液中的有用物质能够从有用物质含有液中分离出来使用。此时,有用物质含有液中的有用物质例如能够通过将有用物质含有液供给于喷雾干燥、冷冻干燥处理等公知的处理而从有用物质含有液中分离。

[0082] 当有用物质含有液为外泌体含有液时,能够根据外泌体的性质将外泌体含有液中的外泌体与其他成分分离。外泌体能够基于外泌体的性质而从外泌体含有液中分离出来。

[0083] 例如,外泌体能够基于分子量、大小、形状、组合物或生物活性来分离。具体而言,可举出利用超速离心分离的沉降物的分取、利用密度梯度超速离心的分级的分取、使用尺寸排除色谱的分取、使用离子交换色谱(例如,CIMmultus™ EV(BIA separations制造)的分取、使用基于蛋白质(例如,MagCapture™外泌体提取试剂盒PS(富士胶片和光纯药制造))的捕捉的分取、基于使用抗体的捕捉分离的分取、使用聚乙二醇等聚合物的沉淀物的分取等。这些方法能够实施一个或组合多个实施。

[0084] 外泌体的性质能够用于在外泌体含有液的制造方法以及外泌体的制造方法中追

踪外泌体的活性。例如，外泌体的活性能够使用静态光散射、动态光散射、紫外可见检测器、荧光检测器或差示折射率检测器来确认。

[0085] <实施方式的例子>

在以下举出本发明的实施方式。本发明的实施方式并不限于以下。

[1] 一种细胞悬液的制造方法，其包括下述 (A)、(B) 和 (C)，

(A) 在含有黏附细胞、微载体和培养基，并且体积为0.3L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序；

(B) 在含有经过所述 (A) 得到的黏附细胞、微载体和培养基，并且体积为5L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序；以及

(C) 在含有经过所述 (B) 得到的黏附细胞、微载体和培养基，并且体积为10L以上的细胞悬液中培养所述黏附细胞的工序。

[2] 根据上述 [1] 所述的细胞悬液的制造方法，其中，

所述 (A) 包括：得到含有黏附细胞、新鲜的微载体和培养基，并且体积为0.3L以上的细胞悬液的工序；以及培养所述黏附细胞的工序，

所述 (B) 包括：得到含有经过所述 (A) 得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基，并且体积为5L以上的细胞悬液的工序；以及培养所述黏附细胞的工序，

所述 (C) 包括：得到含有经过所述 (B) 得到的黏附细胞、新鲜的微载体和培养基，并且体积为10L以上的细胞悬液的工序；以及培养所述黏附细胞的工序。

[3] 根据上述 [1] 或 [2] 所述的细胞悬液的制造方法，其中，

经过所述 (A) 得到的黏附细胞和经过所述 (B) 得到的黏附细胞包含黏附在微载体上的细胞群体。

[4] 根据上述 [2] 或 [3] 所述的细胞悬液的制造方法，其中，

所述 (B) 包括至少将经过所述 (A) 得到的黏附细胞、新鲜的微载体和新鲜的培养基混合而得到细胞悬液的工序，

所述 (C) 包括至少将经过所述 (B) 得到的黏附细胞、新鲜的微载体和新鲜的培养基混合而得到细胞悬液的工序。

[5] 根据上述 [1]～[4] 中任一项所述的细胞悬液的制造方法，其中，

所述 (B) 中的细胞悬液的体积比所述 (A) 中的细胞悬液的体积大，所述 (C) 中的细胞悬液的体积比所述 (B) 中的细胞悬液的体积大。

[6] 根据上述 [1]～[5] 中任一项所述的细胞悬液的制造方法，其中，

所述 (C) 中的细胞悬液的体积为30L以上。

[7] 根据上述 [1]～[6] 中任一项所述的细胞悬液的制造方法，其中，

选自由所述 (A)、(B) 和 (C) 组成的组中的至少一个工序包括：对所述细胞悬液进行间歇搅拌的工序，或者，

根据上述 [1]～[6] 中任一项所述的细胞悬液的制造方法，其中，

选自由所述 (A)、(B) 和 (C) 组成的组中的至少一个工序包括：对所述细胞悬液进行间歇搅拌的工序、以及连续搅拌经过所述间歇搅拌得到的细胞悬液的工序。

[8] 一种细胞悬液的制造方法，其包括：得到含有黏附细胞、微载体和培养基的细胞悬液，并对所述细胞悬液进行间歇搅拌的工序；以及对经过所述间歇搅拌得到的细胞悬

液进行连续搅拌的工序。所述含有黏附细胞、微载体和培养基的细胞悬液可以是选自所述(A)、(B)和(C)组成的组中的至少一个工序的细胞悬液。

[9]一种黏附细胞的制造方法,其包括:准备通过上述[1]~[8]中任一项所述的制造方法得到的细胞悬液的工序;以及

从所述细胞悬液得到黏附细胞的工序。

[10]一种有用物质含有液的制造方法,其包括:准备通过上述[1]~[8]中任一项所述的制造方法得到的细胞悬液的工序;以及

从所述细胞悬液得到有用物质含有液的工序。

[11]一种有用物质的制造方法,其包括:准备通过上述[1]~[8]中任一项所述的制造方法得到的细胞悬液或通过上述[10]所述的制造方法得到的有用物质含有液的工序;以及

从所述细胞悬液或所述有用物质含有液得到有用物质的工序。

[12]根据上述[10]或[11]所述的制造方法,其中,所述有用物质包含选自由细胞外囊泡和功能性蛋白质组成的组中的至少一种。

实施例

[0086] 通过实施例具体说明本发明的实施方式。本发明的实施方式不受以下的实施例限定。

[0087] [实施例1细胞悬液和黏附细胞的制造]

<hMSC的平面培养>

准备从Lonza, Inc.获得的第二次传代人骨髓来源的间充质干细胞(hMSC)。将含有核苷和10体积%胎牛血清(FBS,由Biological Industries公司制造)的伊格尔最小必需培养基 α -改良型(MEM α , nucleosides (Gibco公司制造)用作培养基。将hMSC以3000细胞/ cm^2 的密度接种于组织培养烧瓶中,在37℃及5体积%CO₂的培养箱内培养7天。使用酶溶液(TrypLE Select, Thermo Fisher Scientific公司制造),将细胞从烧瓶中剥离,得到第三次传代的hMSC。将第三次传代的hMSC以3000细胞/ cm^2 的密度播种到多层细胞培养容器(10-layer Nunc EasyFill Cell Factory, Thermo Fisher Scientific公司制造)中,培养7天后,进行酶处理,得到第四次传代的细胞。将得到的第四次传代的hMSC在液氮中冷冻保存。

[0088] <hMSC的大量培养(细胞悬液的制造)>

进行以下的工序(A)、(B)和(C),依次提高培养规模,大量培养hMSC。图1表示包含工序(A)、(B)和(C)的细胞悬液的制造方法的概况。工序(B)和(C)的下部的图表示微载体间的黏附细胞游走,所谓的bead-to-bead cell transfer的状况。

此外,在实施例中,作为新鲜的微载体使用了未使用的微载体即在细胞可黏附区域的面积的100%中未黏附黏附细胞的微载体。Cytodex 1的细胞可黏附区域(表面积/质量)为4,400 cm^2/g 。

[0089] [工序(A)]

在hMSC的培养中使用两个一次性2L生物反应器(UniVessel (R) SU, Sartorius Stedim Biotech公司制造)。在各生物反应器中加入与上述相同的培养基1L,使用控制器(BIOSTAT (R) B, Sartorius Stedim Biotech公司制造),持续4小时控制温度(37℃)、pH(7.4)和溶解氧浓度DO(100%)。将上述冷冻保存的hMSC在37℃的水浴中解冻、洗涤。在各生

物反应器中接种2.27g新鲜的微载体 (Cytodex 1, GE Healthcare Bio-Sciences公司制造) 和 3×10^7 细胞的第四次传代的hMSC, 得到细胞悬液。间歇地搅拌得到的细胞悬液。间歇搅拌的条件是将“‘持续搅拌5分钟’和接着进行的‘持续25分钟不搅拌(静置)’”作为1个循环, 将其进行6个循环。接着, 将细胞悬液静置过夜(不搅拌)。向各生物反应器中加入1L新鲜的培养基, 使细胞悬液的体积增加至2L。然后, 从培养第1天到第8天, 使搅拌速度从70rpm增加到85rpm, 进行连续搅拌。培养第8天进行50体积%的培养基交换, 培养至第9天。

[0090] 在工序(A)中, 对体积1L的细胞悬液进行3小时的间歇搅拌, 经过一晚(15小时)的静置后, 对体积2L的细胞悬液进行7天的连续搅拌。

[0091] [工序(B)]

将50L的培养袋(Flexsafe STR, Sartorius Stedim Biotech公司制造)设置在袋保持器中, 在培养袋中加入与上述相同的培养基15L。培养基的温度、pH以及溶解氧浓度DO使用控制塔(BIOSTAT (R) STR, Sartorius Stedim Biotech公司制造)控制一夜。在50L培养袋中加入在培养基中分散有18.2g新鲜的微载体的悬液1L和通过所述工序(A)得到的培养第9天的细胞悬液4L, 得到体积20L的细胞悬液。将得到的细胞悬液间歇搅拌25小时。间歇搅拌的条件是, 将“‘持续搅拌5分钟’和接着进行的‘持续两小时不搅拌(静置)’”作为1个循环, 将其进行12个循环。接着, 将细胞悬液连续搅拌4天。

[0092] 在工序(B)中, 对体积20L的细胞悬液进行25小时的间歇搅拌, 在间歇搅拌之后进行4天的连续搅拌。

[0093] [工序(C)]

然后, 在第13天, 在培养袋中加入在培养基中分散有34.1g新鲜的微载体的悬液1L和加温后的新鲜的培养基29L。细胞悬液的体积增加到50L。与工序(B)同样地, 持续25小时间歇地搅拌细胞悬液。接着, 持续7天连续地搅拌细胞悬液, 在第20天进行50体积%的培养基交换。培养基交换后, 持续7天连续地搅拌细胞悬液。

[0094] 在工序(C)中, 对体积50L的细胞悬液进行25小时的间歇搅拌, 在间歇搅拌之后总计进行14天的连续搅拌。

[0095] [细胞密度、存活率和总细胞数的评价]

在工序(A)~(C)中, 每天从细胞培养中的细胞悬液采集样品。使用采集的样品进行细胞密度(细胞(cells)/mL)、存活率(viability)以及总细胞数(细胞(cells))的评价。评价结果示于表1。在表中的工序(A)一栏中, 示出了总计的体积4L的细胞悬液的结果。对于“0天”的细胞密度, 也视为总计的体积为4L而计算出。

[0096] [表1]

工序	培养天数 [days]	细胞密度 [cells/mL]	存活率 [%]	总细胞数 [cells]
(A)	0	1.50E+04	99.0	6.00E+07
	1	2.11E+04	98.6	8.44E+07
	2	1.99E+04	94.5	7.96E+07
	3	1.96E+04	84.8	7.85E+07
	5	3.15E+04	83.7	1.26E+08
	6	3.63E+04	89.2	1.45E+08
	7	6.12E+04	93.9	2.45E+08
	8	7.43E+04	96.1	2.97E+08
	9	1.11E+05	94.1	4.43E+08
(B)	10	3.31E+04	98.8	6.62E+08
	12	6.57E+04	98.8	1.31E+09
	13	1.06E+05	98.0	2.12E+09
(C)	14	5.16E+04	98.5	2.58E+09
	15	5.38E+04	85.7	2.69E+09
	16	5.59E+04	90.5	2.80E+09
	18	8.31E+04	91.4	4.16E+09
	19	1.11E+05	92.5	5.54E+09
	20	1.31E+05	96.5	6.57E+09
	21	1.70E+05	97.0	8.49E+09
	22	2.16E+05	98.2	1.08E+10
	23	2.44E+05	97.7	1.22E+10
	26	2.89E+05	98.1	1.45E+10
	27	2.91E+05	98.1	1.46E+10

表中, [aE+b] 是 $[a \times 10^b]$ 的意思。

[0097] 在各工序中细胞密度随时间增加, 第27天达到 2.9×10^5 细胞/mL。细胞的存活率在细胞悬液中加入新鲜的微载体后暂时降低, 但在整个培养期间维持在83.7%以上, 在第27天达到98.1%。总细胞数从 6.00×10^7 细胞增加到 1.46×10^{10} 细胞, 在27天培养中总细胞数增加至243倍。

[0098] [利用荧光显微镜法的观察]

使用在表1中的第0、9、10、13、14以及27天采取的样品, 用荧光显微镜 (KEYENCE株式会社制造) 观察黏附在微载体上的细胞。在第0、10以及14天采集的样品中, 能够确认到抑制了微载体的聚集体的形成, 细胞与大部分的微载体黏附。在第9、13以及27天采集的样品中, 能够确认到细胞在微载体表面增殖至汇合。

[0099] <hMSC的回收 (黏附细胞的制造)>

从搅拌下的第27天的细胞悬液中, 将用于回收细胞的样品采集到培养容器内。将样品静置, 在微载体沉淀后除去上清, 使用不含镁和钙离子的磷酸缓冲食盐水 (PBS) 将微载体洗涤两次。将酶溶液 (TrypLE Select, Thermo Fisher Scientific公司制造) 加入微载体中, 使用小型恒温振荡培养机 (生物振荡器, TAITEX株式会社制造) 使培养容器持续振荡12分钟。用相位差显微镜 (OLYMPUS株式会社制造) 确认细胞从微载体上剥离。在含有已剥离的细胞和微载体的悬液中加入培养基, 用筛网过滤器 (Falcon (TM) mesh, 孔尺寸: $50 \mu\text{m}$),

Corning公司制造),从微载体中分离并回收细胞。

[0100] 确认到回收的细胞具有增殖能力,表达表面标记物(CD73、CD90和CD105),并且维持向脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞的三系统分化能力。

[0101] [实施例2有用物质含有液的制造]

〈外泌体含有液(有用物质含有液)的制造〉

将成为培养对象的细胞设为脂肪来源间充质干细胞(Lonza公司制造),在工序(C)中,对体积50L的细胞悬液进行25小时的间歇搅拌,在间歇搅拌之后进行总计12天的连续搅拌,除此以外,使用实施例1的工序(A)、工序(B)和工序(C)中记载的方法,培养脂肪来源干细胞,得到含有脂肪来源干细胞系干细胞的体积50L的细胞悬液。

在工序(C)开始起第12天结束工序(C),回收培养结束后的细胞后,添加50L的PBS,洗涤细胞。除去PBS后,添加含有10ng/mL的FGF-2(BioVision制造)和1×ITS(胰岛素/转铁蛋白/硒:Invitria制造)的50L的DMEM/F12(Gibco制造),边以适当的转速搅拌边培养48小时,得到细胞悬液。

对于细胞悬液,使用切向流动过滤装置(Repligen公司制造),用0.65μm的模块除去悬浮的黏附细胞、微载体和细胞碎片,得到外泌体含有液。

[0102] 〈外泌体浓缩液(有用物质含有液)的制造〉

使用切向流动过滤装置(Repligen公司制造),用0.2μm的模块从在上述中得到的外泌体含有液50L中除去粒径200nm以上的颗粒。接着,使用截留分子量(MWCO)500kDa的模块,浓缩至体积为50mL,得到外泌体浓缩液。

[0103] 〈外泌体纯化液(有用物质含有液)的制造1〉

使用超速离心机XE-90和摆动转子SW 41 Ti(均为Beckmann Coulter公司制造),以35,000rpm、70分钟对在上述中得到的外泌体浓缩液50mL进行离心分离,使外泌体沉降。除去上清后,在沉降的外泌体中添加PBS10mL,用维氏混合机搅拌后,用35,000rpm、70分钟使外泌体沉降。除去上清后,添加PBS30μL进行移液,由此回收外泌体。

[0104] 〈外泌体纯化液(有用物质含有液)的制造2〉

对于在上述得到的外泌体浓缩液50mL,使用MagCaptureTM外泌体提取试剂盒PS(富士胶片和光纯药株式会社制造),按照试剂盒附带的方案纯化外泌体。

[0105] 〈外泌体纯化液(有用物质含有液)的制造3〉

使用色谱系统FPLC AKTA pure 150(AKTA公司制造)和1mL体积整体式色谱柱(BIA separations公司制造)对上述得到的外泌体浓缩液50mL进行纯化。作为流动相,使用50mM HEPES缓冲液和20mM NaCl水溶液(pH7.0),在按照方案进行了前处理的整体柱上担载外泌体,使流动相流动1小时而洗涤柱。洗涤后,将流动相变更为50mM HEPES缓冲液和2.0M NaCl水溶液,以1mL/分钟使流动相流入,由此回收担载的外泌体。

[0106] 〈外泌体的粒度分布及浓度测定〉

使用纳米颗粒跟踪装置Zeta View(Particle Metrix公司制造),按照附属于软件的EV测定方法测定在上述中纯化的外泌体纯化液中的外泌体的粒度分布和浓度。测定条件设定为Sensitivity为82,Shutter为100。

由此,可以确认外泌体的粒度分布和浓度,例如,得到了粒度分布(散射光强度基准)为20~500nm,浓度为 10^{10} ~ 10^{11} 个颗粒/mL的结果。

[0107] <外泌体的蛋白质表达的评价>

使用在上述中纯化的外泌体纯化液20 μ L,使用DC分析(Bio-Rad公司制造)对外泌体的总蛋白量进行定量。量取外泌体纯化液使外泌体纯化液的蛋白量为0.5 μ g,混合4 μ L的4 \times SDS-PAGE样品缓冲液(东京化成工业株式会社制造)。在得到的混合液中进一步加入蒸馏水,制备成总量为16 μ L后,在37 $^{\circ}$ C下加热5分钟。接着,将混合液应用于10%聚丙烯酰胺凝胶(ATT0公司制造),利用电泳装置(ATT0公司制造),在蛋白量500ng/泳道、150V、30分钟条件下对蛋白质进行电泳分离。泳动后,使用转印装置(均为ATT0公司制造),以100V、15分钟将凝胶中的蛋白质转印到聚偏氟乙烯(PVDF)膜(ATT0公司制造)上。将膜用封闭缓冲液(NACALAI TESQUE公司制造)封闭后,与1 μ g/mL的抗人CD9小鼠IgG、抗人CD63小鼠IgG、抗人CD81小鼠IgG抗体(均为COSMOBIO公司制造)在4 $^{\circ}$ C下分别反应18小时。将反应后的膜用TBS缓冲液洗涤后,使0.2 μ g/mL的小鼠-HRP抗体在室温下分别反应1小时。将反应后的膜用TBS缓冲液洗涤后,用免疫试验机LD(富士胶片和光纯药株式会社制造)使其发光,使用化学发光成像系统(富士胶片和光纯药株式会社制造),分别确认CD9、CD63和CD81的表达。

由此,能够确认外泌体的CD9、CD63和CD81的表达。另外,通过使用其他各种抗体,能够评价外泌体的蛋白质表达。例如,能够确认Hsp70、TSG101、微管蛋白等的表达。

[0108] 本申请的公开内容与2020年3月13日申请的日本特愿2020-43974号中记载的主题相关联,其全部公开内容通过引用而援用于此。另外,本说明书中记载的文献中的所有公开内容通过引用而援用于此。

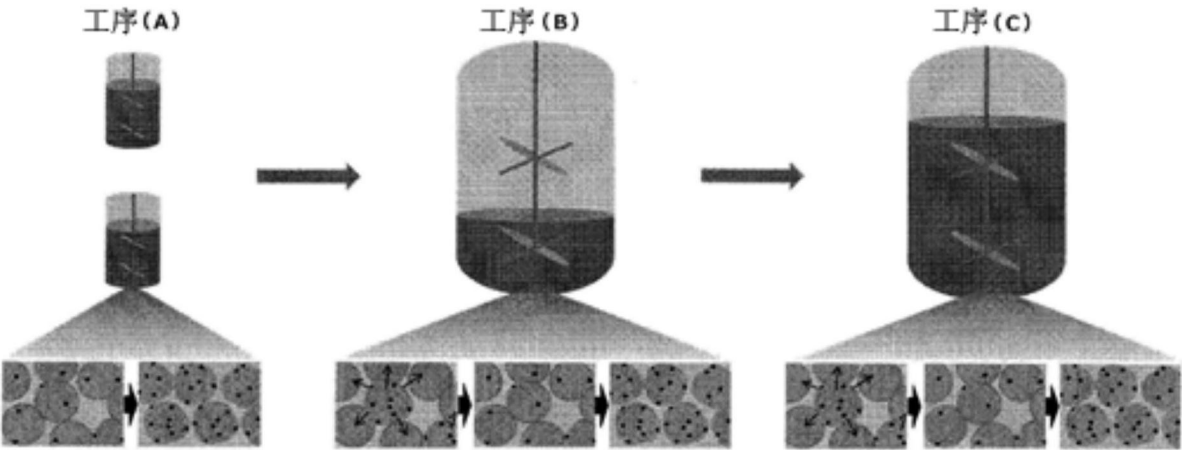


图1