

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4723862号

(P4723862)

(45) 発行日 平成23年7月13日(2011.7.13)

(24) 登録日 平成23年4月15日(2011.4.15)

| (51) Int.Cl. | | | F I | | |
|----------------|--------------|------------------|---------|-------|---------|
| C 1 2 N | 5/071 | (2010.01) | C 1 2 N | 5/00 | 2 0 2 A |
| C 1 2 M | 3/00 | (2006.01) | C 1 2 M | 3/00 | Z |
| C O 7 K | 14/78 | (2006.01) | C O 7 K | 14/78 | Z N A |

請求項の数 11 (全 11 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2004-562120 (P2004-562120) | (73) 特許権者 | 505232782 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年12月23日(2003.12.23) | | フジフィルム マニュファクチャリング |
| (65) 公表番号 | 特表2006-511219 (P2006-511219A) | | ユーロブ ビー. ブイ. |
| (43) 公表日 | 平成18年4月6日(2006.4.6) | | オランダ国 ティルバーグ ティーケイ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/NL2003/000922 | | エヌエルー5047 アウデンスタールト |
| (87) 国際公開番号 | W02004/056976 | | 1 |
| (87) 国際公開日 | 平成16年7月8日(2004.7.8) | (74) 代理人 | 100107984 |
| 審査請求日 | 平成18年12月5日(2006.12.5) | | 弁理士 廣田 雅紀 |
| (31) 優先権主張番号 | 02080539.6 | (72) 発明者 | ボウストラ ヤン バスティアーン |
| (32) 優先日 | 平成14年12月23日(2002.12.23) | | オランダ国 ビルトホーフエン エイジェ |
| (33) 優先権主張国 | 欧州特許庁 (EP) | | イ エヌエルー3721 ソエストダイク |
| | | | セヴェーク ゼット 202 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養支持体を被覆する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゼラチン様タンパク質を用いて、50～500 μmの大きさのマイクロキャリアビーズを被覆するステップを含む、細胞培養支持体を調製する方法であって、前記ゼラチン様タンパク質が、40 kDa～200 kDaの分子量を有し、少なくとも95%のGly-Xaa-Yaaトリプレットからなるとともに少なくとも15%のプロリン残基及び5%未満のヒドロキシプロリン残基を含み、プロリン残基を有せずに20個を超えるアミノ酸ストレッチを含まない、方法。

【請求項2】

マイクロキャリアビーズが非多孔性ビーズである、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

マイクロキャリアビーズが多孔性ビーズである、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ゼラチン様タンパク質が、60 kDa超の分子量を有する、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

ゼラチン様タンパク質が、150 kDa未満の分子量を有する、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

ゼラチン様タンパク質をマイクロキャリアに固定するステップを更に含む、請求項1～

20

5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

ゼラチン様タンパク質の75%超が、同分子量を有する、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

ゼラチン様タンパク質が組換え生成される、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

ゼラチン様タンパク質が、1%未満のヒドロキシプロリン残基を含む、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

ゼラチン様タンパク質が、pH7～7.5にて正味の正電荷を有する、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

50～500μmの大きさを有するマイクロビーズに、40kDa～200kDaの分子量を有し、少なくとも95%のGly-Xaa-Yaaトリプレットからなるとともに少なくとも15%のプロリン残基及び5%未満のヒドロキシプロリン残基を含み、プロリン残基を有せずに20個を超えるアミノ酸ストレッチを含まないゼラチン様タンパク質が被覆されてなる、細胞支持体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞を培養するための支持体に関し、特にゼラチン又はゼラチン様タンパク質で被覆されたマイクロキャリアに関する。このようなマイクロキャリアは接着依存性細胞を培養する支持体となる。

【背景技術】

【0002】

動物細胞、特に哺乳類細胞の細胞培養は、ワクチン、酵素、ホルモン、及び抗体のような多くの重要な（遺伝子組換え）生体物質の生成に重要である。動物細胞の大部分は接着依存性であり、その生存及び増殖には表面への接着を必要とする。

【0003】

通常、接着依存性細胞は、例えば組織培養フラスコ及びローラーボトルの壁で培養されている。ある種の抗ウイルスワクチン、遺伝子組換えタンパク質や他の細胞由来の産物を大量に提供する必要性が生じてきたため、より大規模に細胞を生成する新しいシステムを開発するための改良がなされている。

【0004】

そのような改良の1つが1967年のVan Wezelによるマイクロキャリアの開発から始まった（Van Wezel, A.L. Nature 216:64-65(1967)）。Van Wezelは三級アミン基（DEAE）で荷電された交差結合デキストランビーズからなるマイクロキャリアを作製した。Van Wezelは攪拌した容器の中で培地に懸濁された、これら正に帯電したDEAE-デキストランビーズにおける細胞の接着及び増殖を実証した。従って、マイクロキャリア細胞培養において、細胞は懸濁液中に浮遊した小球体において単層として増殖する。マイクロキャリアを用いることにより、1ミリリットル当たり数百万個の細胞の収量を達成することが可能である。過去何年間の間に多様なマイクロキャリアが開発されてきた。交差結合デキストランは、最初のマイクロキャリアと同様に、現在でも最もよく知られているビーズ材料である。

【0005】

他の大規模培養法に対するマイクロキャリア培養の利点は、i)高表面積対体積率を達成することが可能であり、これはマイクロキャリア濃度を変化させることによって変えることができ、高濃縮の細胞産物を得る可能性を有する、単位体積当たりの高細胞濃度をもたらすことになり、ii)細胞増殖は多くの低生産性ユニットを使用する代わりに1つの高

10

20

30

40

50

生産性容器において実施可能であり、従ってより良い利用法とかなりの培地の節約を達成し、iii) マイクロキャリア培養では混合状態が良いため、pH、 pO_2 、 pCO_2 などの異なる環境条件を監視・制御することが容易であり、iv) 細胞サンプリングが容易であり、v) ビーズが容易に定着するため、細胞採取と産物の後処理プロセスが容易であり、vi) マイクロキャリア培養は、好適に改変された発酵槽のような従来の装置を用いることにより、比較的容易に拡大可能であることである。

【0006】

更なる改良を開発する際、最適マイクロキャリアに対する次の必要条件を満たす必要がある。i) ビーズの表面特性は、細胞が迅速に接着・増殖できるようにする必要があり、好ましくは外形が平坦である必要がある。ii) 分離を容易にするためにビーズの濃度は培地の濃度より僅かに高くなるようにする。従来の培地は本質的に水性であり、 $1.03 \sim 1.09 \text{ g/cc}$ の範囲の濃度を有するが、濃度は一定の限度を超えないように、最適範囲を $1.03 \sim 1.045 \text{ g/ml}$ にする必要がある。剪断感受性細胞を損傷しない程度の軽度の攪拌で、ビーズを浮遊状態に維持するのに十分であり、ビーズが定着すれば細胞増殖は阻止される。iii) 全マイクロキャリアの均一な懸濁液が得られ、細胞がほぼ同時に密集度を達成するように、ビーズの粒度分布は狭くする必要がある。また、マイクロキャリアの溶液内クラスタリングを阻止する必要がある。iv) 光学的性質によって顕微鏡観察を容易にする必要がある。v) ビーズは細胞の生存及び良好な増殖のためだけでなく、獣医学又は臨床医学目的に使用される細胞培養産物のためにも非毒性である必要がある。vi) ビーズの基質は、培養液の攪拌中に生じる衝突がビーズの断片化を起こさないようにする必要がある。

【0007】

改良マイクロキャリアの開発における重要な改変は、コラーゲンによるコア粒子の被覆である。コラーゲンを用いる利点は、コラーゲンが細胞接着及び細胞増殖のプロモーターであることである。加えて、タンパク質分解酵素により細胞を容易に脱離することができる。例えば、Amersham Biosciences社製のSoloHill(商標)コラーゲン被覆マイクロキャリア及びCytodex3(商標)のようなコラーゲン被覆マイクロキャリアが幾つか市販されている。しかし、上記に概説した最適マイクロキャリアの必要条件を満たすには、マイクロキャリアを更に改良する必要性が高い。

【0008】

コラーゲン被覆マイクロキャリアの調製方法は米国特許第4,994,388号に記載されている。コアビーズにコラーゲン被覆を施すことは2ステップで、即ち被覆と固定で実施される。コアビーズを酸性水溶性コラーゲン溶液($0.001 \sim 0.1 \text{ N}$ 酢酸)に懸濁し、溶液を蒸発乾固する。次に、グルタルアルデヒドのようなタンパク質架橋剤を含み、従ってコラーゲン被覆を架橋結合する溶液に乾燥コラーゲン被覆ビーズを懸濁する。または、コラーゲン溶液で湿ったコアビーズは固定ステップの開始前に完全には乾燥させない。

【0009】

当該技術分野ではコラーゲン又は変性コラーゲンという用語が頻繁に用いられるが、本明細書では以降、ゼラチン又はゼラチン様タンパク質という用語を用いることにする。ゼラチンという用語は一本鎖ポリペプチドであるタンパク質の外観をより正確に示すが、通常、コラーゲンはらせん状束に配向した三本鎖ポリペプチド構造を示すのに用いられる。

【特許文献1】米国特許第4,994,388号

【非特許文献1】Van Wezel, A.L. Nature 216:64-65(1967)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、ゼラチン又はゼラチン様タンパク質でマイクロキャリアを被覆し、細胞培養物中のマイクロキャリア粒子間のクラスタリングを阻止する方法の改良を提供することである。

【 0 0 1 1 】

本発明の更なる目的は、大規模細胞培養に用いられ、改良された性質を有するゼラチン被覆マイクロキャリア又はゼラチン様タンパク質で被覆されたマイクロキャリアを提供することである。

【 0 0 1 2 】

本発明の更なる目的は、マイクロキャリアに対して機能性が向上した新規の組換えゼラチンを開発することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

本発明は、ゼラチン又はゼラチン様タンパク質でコアビーズを被覆するステップを含む、細胞培養支持体の調製方法により、これら目的に極めて適うものであり、前記ゼラチン又はゼラチン様タンパク質は約40kDa～約200kDaの選択分子量を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 4 】

本発明の方法において、コアビーズを被覆するのに約40kDa～約200kDaのゼラチン又はゼラチン様タンパク質を用い、マイクロキャリア形状の細胞培養支持体が生じる。

【 0 0 1 5 】

ゼラチン又はゼラチン様タンパク質の選択分子量範囲は、マイクロキャリアを調製する方法において著しい利点を提供し、その結果、有利な性質を有するマイクロキャリアを提供する。被覆プロセスにおける主たる問題はビーズの凝集である。特に、そのような凝集は細胞接着に利用可能な表面積を減少させ、マイクロキャリアの粒度分布を乱し、使用不可能にしてしまう。自然源から単離されたゼラチンは分子量サイズの幅が広く、20kDa未満のペプチド断片から400kDaを上回る分子量を有するマクロポリマーまで及び。

【 0 0 1 6 】

天然ゼラチンバッチ内の比較的小さい分画の高分子量(MW)のゼラチンポリマー分子が、殆どの場合にマイクロキャリア生成プロセス中におけるビーズの凝集の原因となることを見出した。そのような高分子量ゼラチンポリマーがコアビーズに接着すると、ペプチド鎖の一部がコアビーズの表面から離れて向くようになり、そうして他のビーズの足場となることによって凝集を誘発し得ると結論づけた。

【 0 0 1 7 】

従って、本発明によれば、200kDa未満、より好ましくは150kDa未満、最も好ましくは100kDa未満の分子量を有するゼラチンでコアビーズを被覆することが好ましい。

【 0 0 1 8 】

更に、小分子量分画の天然ゼラチンが好ましくないマイクロキャリア被覆特性を示すことを見出した。この小分子量分画はマイクロキャリアビーズに対して比較的弱い吸着力を示し、従って、吸着されていないときには化学的架橋結合ステップ後にマイクロキャリアの凝集を促進する。加えて、マイクロキャリア被覆プロセスにおいて凝集を阻止するために比較的低い濃度のゼラチンを使用する場合、小分子量分画はまずマイクロキャリアに吸着されるが、マイクロキャリアの多孔性コアビーズの小孔に浸入するという好ましくない特性を有する。このため、細胞培養ステップにおけるマイクロキャリアへの細胞接着には貢献しない。従って、ゼラチンの分子量は、コアビーズの凝集を阻止し、ゼラチンの喪失を阻止すべく、実際の被覆プロセスを効果的に実施して効率的な被覆となるほどに大きい必要がある。従って、ゼラチンの分子量は40kDa超、より好ましくは60kDa超、最も好ましくは70kDa超である必要がある。

【 0 0 1 9 】

使用するゼラチン又はゼラチン様タンパク質の分子量は均一であることが好ましく、75%超、好ましくは85%超、より好ましくは95%超、更には少なくとも98%のゼラチン又はゼラチン様タンパク質が、選択分子量から2%以内の均一な分子量を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

そのような均一な分子量を得るには、組換え生成法を用いることが好ましい。組換えゼラチン又はゼラチン様タンパク質の利点は、常に何らかの変異を含む、自然源から単離されたゼラチンに比し、物質の組成が一定であることである。

【 0 0 2 1 】

プリオンや他のウイルスが従来のゼラチンバッチの一部になり得ることが知られている。しかし、細胞培養に用いるために従来のゼラチンが現在もマイクロキャリアの用途に供されているため、これまでリスクは十分に認識されていない。しかし、従来のゼラチンでマイクロキャリアのコアビーズを被覆することにより、存在可能性のあるプリオンがビーズに化学的架橋結合されないことを見出した。この驚くべき新所見の結果は、プリオンが従来のゼラチンバッチに存在すれば、ヒトに使用することを目的とする細胞培養産物と混合されるということである。BSEのようなプリオンによる汚染リスクを阻止するため、マイクロキャリアに用いるのに好ましいゼラチンは組換えゼラチンである。

10

【 0 0 2 2 】

本発明の範囲内で分子量を選択することにより、ゼラチン又はゼラチン様タンパク質被覆溶液の粘度を正確に調節することが可能である。できる限り高濃度のゼラチン又はゼラチン様タンパク質を選択することが可能である一方、そのようなゼラチン溶液の完全な、より重要には部分的なゲル化を阻止することができる。均一なゼラチン又はゼラチン様タンパク質により、同一に被覆されたマイクロキャリアのプロセスが確実になる。均一被覆プロセスにより、最小量のゼラチン又はゼラチン様タンパク質を用いることができ、最小量のゼラチン又はゼラチン様タンパク被覆溶液を用いることができる。これら全てによって、当該技術分野で知られているよりも遥かに効率的な被覆プロセスとなる。

20

【 0 0 2 3 】

本発明の一実施形態において、非多孔性コアビーズがゼラチン又はゼラチン様タンパクで被覆される。好適には非多孔性コアビーズはポリスチレン又はガラス製である。他の好適な非多孔性材料は当業者には周知である。

【 0 0 2 4 】

特に有利な実施形態は本発明の方法であり、修飾デキストラン又は架橋結合セルロース、又は(多孔性)ポリスチレン、特にDEAE-デキストラン由来のビーズのような多孔性コアビーズが、ゼラチン又はゼラチン様タンパクで被覆される。他の好適な多孔性材料は当業者には周知であり、例えば他の化学的に修飾された、又は修飾されない多糖類を含む。分子量の下限値により、ゼラチン又はゼラチン様タンパクが多孔性コアビーズの孔に浸入することが阻止され、従って、ビーズの非効率的被覆及びゼラチン又はゼラチン様タンパクの不要な喪失が阻止される。

30

【 0 0 2 5 】

更に好ましい実施形態において、ゼラチン又はゼラチン様タンパクは本質的にヒドロキシプロリン残基を含まない。ヒドロキシ化はコラーゲンにおける三重らせんの形成に必要な条件であり、ゼラチンのゲル化に關与する。

【 0 0 2 6 】

更なる実施形態において、本発明の方法はゼラチン又はゼラチン様タンパク質をマイクロキャリアに固定するステップを含む。そのような固定法自体は周知である。好ましい方法は、米国特許第4,994,388号に記載されているように、ゼラチン又はゼラチン様タンパク質をグルタルアルデヒドに架橋結合することである。

40

【 0 0 2 7 】

ゼラチン(又はコラーゲン)でコアビーズを被覆する方法自体は周知である。例えば、米国特許第4,994,388号に記載されている方法を用いることができる。要するに、コアビーズは被覆及び固定の2ステップにてゼラチンで被覆される。コアビーズは酸性水溶性コラーゲン溶液(0.01~0.1N酢酸)に懸濁され、該溶液は蒸発乾固される。次に、グルタルアルデヒドのようなタンパク質架橋剤を含み、従ってゼラチン被覆を架橋結合する溶液に乾燥ゼラチン被覆ビーズは懸濁される。または、ゼラチン溶液で湿った

50

コアビーズは固定ステップの開始前に完全には乾燥させない。被覆条件の変動及び別の被覆プロセスは十分に当業者の力量の範囲内である。

【0028】

ゼラチンマイクロキャリアに正電荷を結合させると、これらマイクロキャリアに接着する細胞の割合が非常に高まることは当該分野では周知である。米国特許第5,512,474号を参照されたい。ゼラチンの組換え生成により、正に帯電したアミノ酸の数を容易に操作することができ、つまり生成されるタンパク質において細胞培養物のpHにて正に帯電するということである。特に、アルギニン、リジン、及びヒスチジンは正電荷を有する。目的とする特定の細胞培養物のpHにて正味の正電荷を有するゼラチンを設計することは、十分に当業者の理解の範囲内である。通常、細胞はpH7~7.5にて培養される。従って、本発明の更なる実施形態において、pH7~7.5にて正味の正電荷を有するゼラチン又はゼラチン様タンパク質が用いられる。正味の正電荷は+2、+3、+4、+5、+10、又はそれ以上であることが好ましい。

10

【0029】

タンパク質中の正に帯電したアミノ酸の数を調節するために、化学的修飾を用いることもできる。その方法はThe Practice of Peptide Synthesis, M.Bodansky, Springer-Verlag, Berlin 1984に記載されている。

【0030】

アミノ酸一次配列における天然ゼラチン分子は、基本的にGly-Xaa-Yaaトリプレットの反復からなり、従って、総アミノ酸数の約3分の1はグリシンである。通常、ゼラチンの分子量は大きく、分子量値は10,000~300,000ダルトン以上までの幅がある。超高分子量分画は比較的小さいと思われるが、ビーズの不利な凝集の点から被覆プロセスにおいて非常に有害である。天然ゼラチン分子の主分画は約90,000ダルトンの分子量を有する。平均分子量は90,000ダルトンを上回る。

20

【0031】

更に、ゼラチンの特徴として異常に高含量のプロリン残基がある。更に特徴的なことは、天然ゼラチンにおいて多くのプロリン残基がヒドロキシル化されることである。ヒドロキシル化の最も顕著な部位は4位であり、ゼラチン分子中に異常なアミノ酸4-ヒドロキシプロリンが存在することになる。トリプレットにおいて4-ヒドロキシプロリンは常にYaa位置に見出される。3位でヒドロキシル化されるプロリン残基は非常に少ない。4-ヒドロキシプロリンに対し、3-ヒドロキシプロリンは常にグリシン残基のカルボキシル側に、従って、トリプレットのXaa位置に見出される。3-又は4-ヒドロキシプロリンの形成には異なる酵素が関与している。

30

【0032】

既知のアミノ酸組成に基づき、哺乳類由来のゼラチン分子において、約22%のアミノ酸がプロリン又はヒドロキシプロリン残基であると推定される。しかし、魚、特に冷水魚において比較的低含量のプロリン又はヒドロキシプロリンが見出される。概算ではプロリン残基とヒドロキシプロリン残基はほぼ同量で存在し、従って、哺乳類由来のゼラチン分子において、約11%のアミノ酸がプロリンであり、約11%がヒドロキシプロリンである。ほぼ全てのヒドロキシプロリンがYaa位置に見出されるため、ゼラチン分子における全トリプレットの約3分の1はヒドロキシプロリンであると推定される。ヒドロキシプロリン残基の存在が、ゼラチン分子がその二次構造においてらせん構造をとり得るという事実の原因となっている。従って、本発明に基づいて使用されるゼラチンは、3-又は4-ヒドロキシプロリンに関わらず、5%未満、好ましくは3%未満、最も好ましくは1%未満のヒドロキシプロリン残基を含むことが好ましい。

40

【0033】

本発明に従って用いるゼラチン様タンパク質は、総アミノ酸数の少なくとも5%がプロリン残基であるタンパク質として理解される。この割合により、本発明を目的として、ゲル化の性質としてではなく、好ましくない三次元球状ドメインの非存在として規定されている、ゼラチン様特性が確実なものになる。ゼラチン様タンパク質において、総アミノ酸

50

数の少なくとも10%、より好ましくは少なくとも15%がプロリン残基であることが好ましい。タンパク質のプロリン含量が少ないほど、タンパク質中のプロリン残基の分布の関連性が高くなる。従って、総アミノ酸数の5%がプロリン残基であるタンパク質において、これら残基は均一に分布することが好ましい。当業者は、好適なタンパク質を設計する際に、例えばコンピュータ・モデリング・システムを利用し、球状ドメインを生じないプロリン残基を含む配列を設計することができる。球状ドメインの形成を阻止すべく、指針として、本発明に用いるゼラチン様タンパク質は、好ましくはプロリン残基を有せずに20個を上回るアミノ酸ストレッチを含むことがないようにする必要がある。

【0034】

ゼラチンの特色はGly - Xaa - Yaaトリプレットの存在である。そのようなトリプレットは、本発明において用いられるゼラチン様タンパク質にも存在することが好ましい。しかし、Gly - Xaa - Yaaトリプレット又はGly - Xaa - Yaaトリプレットのストレッチが、1個以上のアミノ酸により分離されたタンパク質を設計することが可能である。そのような「分断化された」トリプレット又はトリプレットのストレッチを有するゼラチン様タンパク質において、上記のゼラチン様特性の規定は有用である。完全にGly - Xaa - Yaaトリプレットからなるタンパク質に対し、本発明において用いるゼラチン様タンパク質の上記規定は、少なくとも15%のトリプレットがプロリン残基を含むタンパク質として説明できる。そのようなゼラチン様タンパク質は、プロリン残基を有せずに6個を上回るトリプレットのストレッチを含むことがないことが好ましい。本発明において用いるゼラチン様タンパク質は、Gly - Xaa - Yaaトリプレットの連続反復数が少なくとも10、好ましくは少なくとも20、より好ましくは30を上回るストレッチを含むことが好ましい。

【0035】

本発明に従って用いるゼラチン様タンパク質は、欧州特許公開第0926543号及び欧州特許公開第1014176号に開示されている。本発明による組成物において好適に使用可能なゼラチン様タンパク質の生成及び精製を可能にするため、欧州特許公開第0926543号及び欧州特許公開第1014176号における実施例を特に参照する。従って、ゼラチン様タンパク質は、好適な微生物による、そのようなポリペプチドをコードする核酸配列の発現によって生成可能である。該プロセスは真菌細胞又は酵母細胞を用いて好適に実施することができる。宿主細胞はハンゼヌラ、トリコデルマ、アスペルギルス、アオカビ、パンカビ、又はピキアのような高発現宿主細胞が好適である。真菌及び酵母細胞は、反復配列を不適切に発現しにくいいため、細菌より好ましい。宿主細胞は、発現されたコラーゲン構造を攻撃するプロテアーゼを高レベルに有しないことが最も好ましい。この点で、ピキアは非常に好適な発現系の例を提供する。欧州特許公開第0926543号及び欧州特許公開第1014176号に開示されているように、特にピキア・パストリスが発現系として用いられる。また、一実施形態において、微生物はプロリル - 4 - ヒドロキシラーゼ1を発現する遺伝子を含むように形質転換される。実施形態において、微生物は、特にプロリンのヒドロキシ化のような能動的翻訳後プロセッシング機序がない。

【0036】

ビーズの大きさは50 µm ~ 500 µmまで多岐にわたる場合がある。通常のマикроキャリアビーズの平均サイズは、生理食塩水において約100、約150、又は約200 µmである。この範囲内にあるビーズの少なくとも90%のサイズ範囲は、80 ~ 120 µm、100 ~ 150 µm、125 ~ 175 µm、又は150 ~ 200 µmまで多岐にわたる場合がある。

【0037】

マクロキャリアでは広範な細胞が培養されることがある。例えば、無脊椎動物、魚、鳥由来の細胞、及び哺乳類起源の細胞がマクロキャリアで培養され得る。形質転換細胞株及び正常細胞株、線維芽細胞及び上皮細胞、更には遺伝子組換え細胞が、インターフェロン、インターロイキン、成長因子などの免疫療法剤の生成のような様々な生物製剤用としてマクロキャリアで培養され得る。マクロキャリアで培養される細胞は、口蹄疫又

10

20

30

40

50

は狂犬病のようなワクチンとして使用される種々のウイルスの宿主となる。

【0038】

マイクロキャリア培養には大量培養以外の多くの用途がある。マイクロキャリアで増殖する細胞は、細胞間又は細胞-基質相互作用のような細胞生物学の異なる様相を研究するための優れた道具となる。マイクロキャリアを用いて細胞の分化及び成熟、代謝の研究も行うことができる。そのような細胞は、電子顕微鏡検査又は細胞膜のような細胞小器官の分離に用いることもできる。また、このシステムは本質的に三次元システムであり、優れた三次元モデルとなる。同様に、このシステムを用いることにより細胞の共培養を行うことができる。従って、用途には、大量の細胞、ウイルス、及び細胞産物（例えば、インターフェロン、酵素、核酸、ホルモン）の生成、細胞の接着、分化及び細胞機能に関する研究、灌流カラム培養系、顕微鏡研究、有糸分裂細胞の採取、細胞の分離、膜研究、細胞の貯蔵及び輸送、細胞輸送に関わるアッセイ、並びに標識化合物の摂取に関する研究が含まれる。

10

【0039】

マイクロキャリアは脾臓細胞群からマクロファージを減少させるためにも用いることができる。DEAE-デキストランマイクロキャリアは、コンカナバリンA (Con A) によってリンパ球刺激を増強することができる。同種異系腫瘍細胞によりコンフルエントなマイクロキャリアビーズをマウスに注入し、体液性及び細胞性免疫を増強することができる。DEAE-デキストランマイクロキャリアに植物プロトプラストを固定できる。

【0040】

マイクロキャリアによって付与される高表面積対体積率により、マイクロキャリアは、例えば4000リットルもの実験室及び産業規模で種々の生物製剤にうまく用いることが可能である。

20

【0041】

発現産物の大規模生産はゼラチン被覆マイクロキャリアによって達成できる。通常、生産規模のバイオリクターにおけるマイクロキャリアの投入は、20g/lであるが、40g/lまで増加可能である。マイクロキャリアはバッチ及び灌流システム、攪拌培養、及びウェーブバイオリクターにて使用でき、また、従来の静置単層・ローラー培養の表面積を増大させるためにも使用できる。

【実施例1】

30

【0042】

[マイクロキャリアビーズの調製]

欧州特許公開第0926543号又は欧州特許公開第1014176号に開示されている組換え法により、約54kDaの分子量を有するヒト組換えゼラチン様ポリペプチドHu-3を生成した。

【0043】

Hu-3のアミノ酸配列（配列番号1）：

1 GPPGEPGPTGLPGPPGERGGPGRGFPAD
 31 GVAGPKGPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRP
 61 GEAGLPGAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGPA
 91 GQDGRPGPPGPPGARGQAGVMGFPPGPKGAA
 121GEPGKAGERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGA Q
 151 GPPGPAGPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPA
 181 GPPGEAGKPGEQGVPGDLGAPGPSGPAGEP
 211 GPTGLPGPPGERGGPGRGFPADGVAGPK
 241 GPAGERGSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLP
 271 GAKGLTGSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRP
 301 GPPGPPGARGQAGVMGFPPGPKGAAGEPGKA
 331 GERGVPGPPGAVGPAGKDGEAGA QGPPGPA
 361 GPAGERGEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEA
 391 GKPGEQGVPGDLGAPGPSGPAGEPGPTGLP
 421 GPPGERGGPGRGFPADGVAGPKGPAGER
 451 GSPGPAGPKGSPGEAGRPGEAGLPGAKGLT
 481 GSPGSPGPDGKTGPPGPAGQDGRP GPPGPP
 511 GARGQAGVMGFPPGPKGAAGEPGKAGERGV P
 541 GPPGAVGPAGKDGEAGA QGPPGPAGPAGER
 571 GEQGPAGSPGFQGLPGPAGPPGEAGKPGEQ
 601 GVPGD LGAPGPSGPAGG

10

20

30

【0044】

平均径100マイクロメートルのポリスチレンビーズを使用する。異種生物機能性架橋剤BBA-EAC-NOSを用い、ポリスチレンビーズにゼラチンを共有結合的に固定する。BBA-EAC-NOSをポリスチレンビーズに加え、吸着させる。次に、ゼラチンHu-3を加えてNOS合成ポリマーと反応させ、スパーサに対する共有結合を生成する。次に、ビーズを光活性化させ(320nmにて)、ポリスチレンビーズにスパーサ(及び共有結合ゼラチン)を共有結合的に固定する。最後に、リン酸緩衝食塩水(pH7.2)中、中性界面活性剤Tween20にて一晚洗浄し、軽く接着したゼラチンを除去する。

【実施例2】

40

【0045】

[ゼラチン又はゼラチン様タンパク質にて被覆されるマイクロキャリアに対する細胞接着及び細胞培養プロトコル]

マイクロキャリアを用いて細胞培養を行う方法に関する実際的な情報は、Amersham Biosciences社からコード番号18-1140-62にて入手可能なハンドブック“Microcarrier cell culture - principles and methods”中に見出すことができる。

【0046】

以下はスピナフラスコにおいて懸濁培養液200mlを作製するために使用可能なプロトコルである。1リットルあたり5~40グラムのビード投入での細胞培養は、見事に実証された。1リットルあたり20グラムが起点として示唆される。従って、この培養液2

50

00 ml はビーズ 4 グラムを必要とする。マイクロキャリアビーズの計量及び懸濁を除き、プロトコル全体に渡って無菌法を使用する必要がある*。

【0047】

1. ガラス製品をシリコン処理することで処理ガラス製品に対する細胞接着が阻止される。本発明者らはシリコン処理に Prosil-28 を使用するが、他の任意の市販剤でもよい。ガラス製品及びピペットを全て洗浄し、シリコン処理し、オートクレーブする。

【0048】

2. 脱イオン水若しくは蒸留水又はカルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝食塩水 (CMF-PBS) 中にマイクロキャリアビーズ 4 グラムを懸濁し、121 又は 131 にて 15 分間、液化サイクルでオートクレーブする。

10

【0049】

3. オートクレーブ液を処分し、少量の培養液にて 4 グラムのビーズを洗浄する。使用する培養液の種類は単層培養で用いたもの、及び、この 200 ml 培養液と同一である必要がある。その意図はオートクレーブ液を洗い流し、且つ、培養液によってビーズを調整することである。通常、洗浄は複数回行われ、残渣又は沈殿剤が存在すればこれを除去する。

【0050】

4. マイクロキャリア / 培養液を CO₂ インキュベータ中に最低 30 分間、配置する。この培養液を処分し、温かい新鮮培養液 90 ml 中に再懸濁する。

【0051】

5. 通常、細胞接種は 1×10^5 細胞 / ml である。200 ml 培養液の総培養体積に対し、 2×10^7 細胞が必要である。温かいマイクロキャリア / 培養液のビーズ懸濁液に細胞を加え、温かい培養液を加えて、100 ml にする (細胞は最適な接着及び増殖のために対数期にある必要がある)。スピナ培養の接着相は、細胞・ビーズ相互作用を促進するために 1 / 2 体積にて生じる必要がある。ビード / 細胞スラリーが攪拌フラスコの底部に静的層を形成しないように、可能な限り緩徐に攪拌する。より緩慢に接着する面倒な細胞では、断続的攪拌プロトコルが必要となり得る。細胞が接着して単層にて拡散するのに緩慢であれば、マイクロキャリアに接着するのも緩慢になる。

20

【0052】

6. インキュベートされたスピナフラスコを 18 ~ 21 rpm にて最低 6 時間、攪拌する。スピナフラスコを一晩中動かすのは、よくあることである (即ち、12 ~ 14 時間使用する場合が多い)。断続的攪拌が可能なスピナシステムであれば、これを利用する。攪拌サイクルを 1 分間オンにし、20 ~ 30 分間オフに設定するのが有用だと思える。温かい新鮮培養液により体積を 200 ml にする。

30

【0053】

7. 細胞をその増殖及び代謝が必要とするように維持する。通常、隔日に培養液の半分を交換する必要がある。本細胞接着プロトコルは種々の細胞株に巧く使用されている。本発明者らは Bellco、Corning、Kontes、Techne、及び Wheaton 攪拌システムを巧く使用し、他のマイクロキャリア攪拌機も容認できるものとする。

* ビーズ水和は必要としない。

40

【配列表】

0004723862000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ファン エス アンドリース ヨハネス ヨセフ
オランダ国 ドースト ビーイー エヌエル - 4 8 4 9 デンネンラーン 6 6
- (72)発明者 戸田 雄三
日本国埼玉県朝霞市泉水3 - 1 - 17 - 1104

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 特開平08 - 163979 (JP, A)
特開平11 - 332585 (JP, A)
特表2002 - 520103 (JP, A)
国際公開第01 / 034646 (WO, A1)
特開平04 - 360677 (JP, A)
特開平11 - 338090 (JP, A)
特開2001 - 087782 (JP, A)
特許第4515707 (JP, B2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/78
C12N 1/00-7/08
C12M 1/00-3/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)