

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5548207号  
(P5548207)

(45) 発行日 平成26年7月16日(2014.7.16)

(24) 登録日 平成26年5月23日(2014.5.23)

(51) Int.Cl.

C 12 N 7/02 (2006.01)

F 1

C 12 N 7/02

請求項の数 7 (全 111 頁)

(21) 出願番号	特願2011-529214 (P2011-529214)
(86) (22) 出願日	平成21年9月24日 (2009.9.24)
(65) 公表番号	特表2012-503489 (P2012-503489A)
(43) 公表日	平成24年2月9日 (2012.2.9)
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/058174
(87) 國際公開番号	W02010/036774
(87) 國際公開日	平成22年4月1日 (2010.4.1)
審査請求日	平成24年8月27日 (2012.8.27)
(31) 優先権主張番号	61/222,131
(32) 優先日	平成21年7月1日 (2009.7.1)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/104,933
(32) 優先日	平成20年10月13日 (2008.10.13)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	504333972 メディミューン、エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーラン ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ ューン ウェイ
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ウイルスの精製方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ウイルス感染細胞から呼吸器合胞体ウイルスを精製する方法であつて、

a ) ウイルス回収物を清澄化して清澄化されたウイルス回収物を形成すること(ここで、  
清澄化は、i . ウイルス回収物を、 3マイクロメートル ~ 10マイクロメートルの孔径を有する少  
なくとも1つの清澄化フィルターを介したダイレクトフロー濾過( D F F )により濾過す  
ること;

i i . ウイルス回収物を非特異的エンドヌクレアーゼで処理すること; および

i i i . ウイルス回収物を、 0 . 45マイクロメートル ~ 3マイクロメートルの孔径を 10  
有する少なくとも1つの清澄化フィルターを介した D F F により濾過すること  
を含む);b ) 清澄化されたウイルス回収物を、スクロース、リン酸または T r i s を塩( N a C l  
または K C l )とともに含んでなる安定化バッファーで安定化して、安定化されたウイル  
ス回収物を形成すること;c ) 安定化されたウイルス回収物をタンジェントフロー濾過( T F F )により濃縮し、 5  
0 0 k D aの分子量カットオフ( M W C O )を有する中空纖維カートリッジを用いたダイ  
アフィルトレーション( D F )によりバッファー交換を行つて、濃縮されたウイルス回収  
物を形成すること; ならびにd ) 濃縮されたウイルス回収物を、 0 . 8マイクロメートル ~ 0 . 45マイクロメートル 20

の孔径を有する少なくとも 1 つの清澄化フィルターを介した D F F により濾過して、除菌されたウイルス回収物を形成することを含み、それにより、呼吸器合胞体ウイルスがウイルス感染細胞から精製され、少なくとも 5 . 7 1 0 g 1 0 F F U / m L の最終ウイルス感染力値を有する、方法。

**【請求項 2】**

イオン交換クロマトグラフィーによる精製の工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

工程 (c) の交換バッファーが 1 0 ~ 2 5 % w / v のスクロース、1 5 0 m M ~ 1 0 m M のリン酸カリウムおよび 1 7 5 m M ~ 5 0 m M の K C l 、 pH 7 . 0 ~ 7 . 4 を含んでなる、請求項 1 または 2 に記載の方法。 10

**【請求項 4】**

呼吸器合胞体ウイルスが ( r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H ) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

ウイルス回収物が、1 5 0 m M ~ 5 0 m M のリン酸カリウム、2 5 0 m M ~ 1 7 5 m M のスクロース、および 1 7 5 m M ~ 1 2 5 m M の N a C l または K C l 、 pH 7 . 0 ~ 7 . 4 を含んでなるバッファーで安定化される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

**【請求項 6】**

工程 (c) の結果 5 倍濃縮が起こり、少なくとも 5 ダイアボリュームのバッファーが交換される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 7】**

非特異的ヌクレアーゼがウイルス回収物に 1 2 0 分 ~ 2 1 0 分 の間曝される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

本発明は、ワクチンの開発のためにバイオリアクターで増殖される接着細胞から細胞隨伴性ウイルスを精製する方法を提供する。 30

**【背景技術】**

**【0 0 0 2】**

予防接種はウイルス感染により引き起こされる疾患を予防するために最も重要な公衆衛生手段である。ワクチンの有効な使用は、安定かつ培養の容易な供給源から大量のワクチン材料（例えば、ウイルス）を速やかに得ることができるかどうかにかかっている。ワクチンを迅速に開発し、それらを大量に利用できることは、多くのヒトおよび動物疾病に対抗する上で極めて重要である。ワクチン生産の遅れやそれらの量の不足は疾病の大発生に取り組む際に問題となる。例えば、最近の研究では、パンデミックインフルエンザに対するワクチンを生産するのに必要な長いリードタイムに関する懸念の理由があることを示唆している。例えば Wood, J. M., 2001, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 356:1953 参照。よって、ウイルスを生産するための最近の試みでは、細胞培養におけるワクチン用のウイルスの増殖に焦点が当てられている。 40

**【0 0 0 3】**

**3 . 1 インフルエンザウイルス**

特に、メイディン・ダービー・イヌ腎臓 ( M D C K ) 細胞が多くのグループにもって用いられている。例えば、米国特許第 6 , 4 5 5 , 2 9 8 号；米国特許出願第 2 0 0 5 / 0 1 1 8 1 4 0 号；米国特許出願第 2 0 0 5 / 0 1 1 8 6 9 8 号；米国特許第 6 , 8 2 5 , 3 0 6 号； W O 2 0 0 5 / 1 1 3 7 5 8 ；および Radaeva, I. F., et al. Vopr. Virusol. (2005) 50: 43-6 参照。しかしながら、既存の M D C K 細胞系統の多くは、腫瘍形成性、細胞培養に動物血清を必要とすること、およびワクチンにおける使用に好適なインフル

エンザウイルスの収量が少ないことを含む、1以上の欠点がある。さらに、これらの細胞系統からワクチン材料を生産するために開発されている細胞培養プロセスの多くは、培地交換の工程や多量の接種用ウイルスの使用を含む多くの操作を必要とする場合が多い。さらに、違うインフルエンザ株が絶えず出現（または再出現）するために、シーズンごとに流行しているインフルエンザ株に基づいて新たなインフルエンザワクチンが作製される。残念なことに、インフルエンザワクチン株によっては高収量まで増殖させることが困難なものがある。細胞培養により得られる材料の各バッチの収量は生産能を規定するだけでなく、製品の製造コストにも影響するので、ウイルス収量（（すなわち、ピークウイルス力価）向上させることが望ましい。

## 【0004】

10

最近、極めて高い力価までワクチン株を増殖させることができる新規な無血清培地および非腫瘍形成性細胞系統、ならびにディスポーザブルのバイオリアクターでウイルス材料を生産するプロセスが開発された（米国特許出願第2006/0188977号；および2007年9月14日出願のU.S.S.N.11/855,769）。本発明はこの研究を拡張し、新規な細胞培養培地、MDCK細胞、特に、非腫瘍形成性細胞系統から、培地交換の必要なく、バイオリアクターで大量のワクチン材料を生産するための再現性の高い、効率的でスケーラブルなプロセス、および純度の高い生弱毒ウイルスを生産するためのロバストな下流精製プロセスを提供する。本発明により提供される方法は最小限の操作を必要とするだけのロバストなものであり、コスト効率が良い。

## 【0005】

20

## 3.2 呼吸器合胞体ウイルス（RSV）

ヒト呼吸器合胞体ウイルス（RSV）は、乳児および小児における重篤な下気道感染（LRTI）の主因であり、相当な罹患率と死亡率の原因となっている。7大市場（米国、日本、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、UK）で、成人300万人と未熟児ほぼ400,000人を含む年間合計1800万人が感染している。米国だけでも年間70,000~125,000件の入院がRSV LRTIに属すと推測される。ヒト集団では、抗原の異なる2つのRSVサブグループAとBが存在する。RSVはまた、免疫不全成人および高齢者において重要な感染病原体として認識されている。自然感染により誘導されるRSV再感染に対する耐性が不完全なため、RSVは小児期そして生涯にわたって何回も感染する場合がある。RSV免疫予防の目標は、RSV感染に関連し得る重篤な疾病を回避するのに十分な耐性を誘導することである。RSVワクチンを開発するための現行の戦略は主として、精製ウイルス抗原の投与または鼻腔投与用の弱毒した生RSVの開発を行ったり来たりしている。しかしながら、これまでに認可されたワクチンすなわちRSV用のワクチンは無い。

30

## 【0006】

ウイルスゲノムRNAは裸のRNAとしては感染力は無い。RSVのRNAゲノムは主要なヌクレオキヤプシド（N）タンパク質でしっかりと封入され、リンタンパク質（P）およびラージ（L）ポリメラーゼサブユニットと会合している。これらのタンパク質は核タンパク質コアを形成しており、感染性の最小単位と認識されている（Brown et al., 1967, J. Virol. 1: 368-373）。

40

## 【0007】

何十年という研究にもかかわらず、RSV感染に関連する重大な罹患率および死亡率の予防のために開発された商業的に入手可能で、安全かつ有効なRSVワクチンは無い。ホルマリンで不活性化したウイルスワクチンはRSV感染からの保護を提供することができず、実際には、乳児において野生型ウイルスによるその後の感染の際に症状の増悪をもたらした（Kapikian et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:405-21; Chin et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:449-63）。以来、組換え法、化学的突然変異誘発および温度感受性突然変異体を得るために野生型RSVの低温継代培養により得られた生きた弱毒突然変異体の開発に努力が向けてきた（Gharpure et al., 1969, J. Virol. 3: 414-21; Crowe et al., 1994, Vaccine 12: 691-9）。しかしながら、RSV感染の効果的な予防的処置の

50

ための規制指針を満たす、それらの細胞隨伴性タンパク質からの生弱毒ウイルスの精製は捕らえどころが無かった。

#### 【0008】

インフルエンザウイルスと同様、RSVは、ウイルスが宿主細胞と緊密に隨伴していて、感染性の最小単位を維持しつつ細胞隨伴性タンパク質からのウイルスを精製することを困難にする安定な細胞系統で増殖される。この複雑性に加え、RSVは脆弱（例えば、剪断感受性）である。ウイルスが主として宿主細胞に隨伴し、脆弱であるというこれらの要因は、宿主細胞抽出物（例えば、DNAおよびタンパク質）からウイルスを精製すること、ならびに生弱毒ウイルスを含んでなる臨床上許容される免疫原性組成物を得ることを困難にしてきた。なぜRSVのワクチンが市販されていないかは、1つにはこうした理由である。よって、免疫原性組成物の作製および処方のためにRSVおよび他の細胞隨伴性ウイルスを精製するために使用可能な精製プロセスの必要がある。10

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

##### 【0009】

【特許文献1】米国特許第6,455,298号

【特許文献2】米国特許出願第2005/0118140号

【特許文献3】米国特許出願第2005/0118698号

【特許文献4】米国特許第6,825,306号

【特許文献5】WO 2005/113758

【特許文献6】米国特許出願第2006/0188977号

【特許文献7】U.S.S.N.11/855,769(2007年9月14日出願)20

##### 【非特許文献】

##### 【0010】

【非特許文献1】Wood, J. M., 2001, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 356:1953

【非特許文献2】Radaeva, I. F., et al. Vopr. Virusol. (2005) 50: 43-6

【非特許文献3】Brown et al., 1967, J. Virol. 1: 368-373

【非特許文献4】Kapikian et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:405-21

【非特許文献5】Chin et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:449-6330

【非特許文献6】Gharpure et al., 1969, J. Virol. 3: 414-21

【非特許文献7】Crowe et al., 1994, Vaccine 12: 691-9

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0011】

本発明は、少なくとも5%の総ウイルス回収率が得られる、細胞培養（例えば、 vero細胞培養）で増殖された接着細胞から生細胞隨伴性ウイルス（例えば、RSV）を精製する方法を提供し、ここで、精製されたウイルスは、ウイルス用量（4-6log<sub>10</sub>F/F）当たり、100ng未満の宿主細胞DNA（HCD）、40μg未満の宿主細胞タンパク質（HCP）および0.1ng未満の非特異的ヌクレアーゼを含んでなる。40

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0012】

【図1】4×2Lバイオリアクターにおける培養0日目～4日目の生細胞密度（VCD）および細胞生存率（V%）をプロットしたものである。これらのバイオリアクターは、表6に詳細に示されたシードリアクター（SR）法の条件を用いて培養した。SR4の2dpsのデータは利用できない。

【図2】B2Bトリプシン処理中、実験1、3および4の3×2Lシードリアクター（SR）について、0～40分の間の中間サンプリング時間に撮影した写真（10倍で撮影）を示す。トリプシン処理はビーズ間移動プロトコールによりバイオリアクター内で行った。

【図3】 $12 \times 2$  L最終生産リアクター(FPR)における生細胞密度(VCĐ)および細胞生存率(V%)をプロットしたものである。実験3のバイオリアクター(FPR3.X.X)は5dps(~120hps)において感染させ、他の実験のバイオリアクターは4dpsにおいて感染させた。実施例4の感染後VCĐと細胞生存率のデータは利用できない。

【図4】全ての実験に関して $12 \times 2$  L最終生産リアクターで4dpsにおいて撮影した写真(100倍で撮影)を示す。

【図5】全ての実験に関して $9 \times 2$  L最終生産リアクター(FPR)で3dpiにおいて撮影した写真(100倍で撮影)を示す。

【図6】全ての実験に関してまず $4 \times 2$  Lシードリアクターで増殖させ、次に $12 \times 2$  L最終生産リアクター(FPR)で培養し、その後、感染させた細胞について、ca A / ウルグアイ(A/U)、ca A / サウスダコタ(A/S)およびca B / フロリダ(B/F)ウイルス力価を経時にプロットしたものを示す。注：各データ点は3回繰り返したアッセイの平均を表す。検出限界(<6.410g<sub>10</sub>FFU/mL)または希釈された場合は<2.410g<sub>10</sub>FFU/mL)を下回るウイルス力価は記録されていない。

【図7A】67%培地交換プロセス(67%MX)と非培地交換プロセス(0%MX)を用いて生産した株の経時的ウイルス生産プロフィールを示す。ca A / ウィスコンシン/67/05株およびca A / ウルグアイ株のプロットを7Aに示し、ca A / サウスダコタ株およびca B / フロリダ株のプロットを7Bに示す。

【図7B】67%培地交換プロセス(67%MX)と非培地交換プロセス(0%MX)を用いて生産した株の経時的ウイルス生産プロフィールを示す。ca A / ウィスコンシン/67/05株およびca A / ウルグアイ株のプロットを7Aに示し、ca A / サウスダコタ株およびca B / フロリダ株のプロットを7Bに示す。

【図8】キレート剤(EDTA)および30分以内に細胞の解離を果たすわずか0.05倍の終濃度のプロテアーゼ(TrypLE(商標))を含んでなる緩衝塩溶液(DPBS)をそれぞれ利用する2回の洗浄工程を用いる、ビーズ間移動プロセスのフローチャートを表す。

【図9A】ダイレクト・フロー・フィルトレーション(DFF1)フィルターリグ(パネルA、上)、GE Healthcare Unifluxスキッド・チューピングリグ(パネルA、下)、GE Healthcare AKTAプロセス・スキッド・チューピングリグ(パネルB、上)およびダイレクト・フロー・フィルトレーション2(DIF2)フィルターリグ(パネルB、下)に用いるフィルターおよびチューピングリグの図を示す。

【図9B】ダイレクト・フロー・フィルトレーション(DFF1)フィルターリグ(パネルA、上)、GE Healthcare Unifluxスキッド・チューピングリグ(パネルA、下)、GE Healthcare AKTAプロセス・スキッド・チューピングリグ(パネルB、上)およびダイレクト・フロー・フィルトレーション2(DIF2)フィルターリグ(パネルB、下)に用いるフィルターおよびチューピングリグの図を示す。

【図10A】パネルAに最初の精製プロセス1aのスキームを、改良型の精製プロセス1bと並行して示す。付加的改变をパネルBに示すスキームに詳細に示す。

【図10B】パネルAに最初の精製プロセス1aのスキームを、改良型の精製プロセス1bと並行して示す。付加的改变をパネルBに示すスキームに詳細に示す。

【図11】TFF1実施番号8のフラックストレース曲線を示す。

【図12】BPG 100およびBPG 200 CSカラム圧流特性を示す。

【図13】実施番号9のCSカラム溶出クロマトグラムを示す。

【図14】実施番号8 TFF2 8XDFプロセスのフラックストレース曲線を示す。

【図15】10および30-L規模でのRSVの異なる製造ロットの工程力価回収率の概要を示す。

【図16】RSVの異なる製造ロット間の510g FFUの用量当たりの総DNAおよび

10

20

30

40

50

総タンパク質（最終精製製剤）の概要を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、接着細胞（例えば、M D C K 細胞、特に、非腫瘍形成性細胞系統またはV e r o 細胞）からバイオリアクターにおいて、予防的、診断的、免疫療法的または治療的使用のための大量のウイルス（例えば、インフルエンザウイルスまたはR S V）またはウイルス抗原を生産する、再現性が高く、効率的でスケーラブルなプロセスを提供する。特に本発明は、培地交換を必要とせず、低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型インフルエンザまたは呼吸器合胞体ウイルスを高力価まで生産するロバストな方法を提供する。

10

【0014】

さらに本発明は、培地交換の必要なく高力価まで、M D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）の培養を助け、また、限定されるものではないが、インフルエンザウイルス（例えば、低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型インフルエンザウイルス）を含むウイルスの複製を助ける培養培地を提供する。

【0015】

さらに本発明はまた、M D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）からワクチン材料（例えば、インフルエンザウイルス）を製造する方法およびM D C K 細胞において生産されたワクチン材料を用いてインフルエンザ感染を予防する方法も提供する。細胞隨伴性ウイルス（例えば、インフルエンザおよびR S V）は、本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ／または本明細書に記載されている免疫原性組成物に含まれ得る。本明細書において「細胞隨伴性ウイルス」とは、当業者に知られた任意の技術によって決定した場合に、およそ60%以上のウイルス力価がウイルスに感染した接着細胞に隨伴して見られるウイルスを表す。本発明の方法は低温適応／温度感受性／弱毒型（c a / t s / a t t）インフルエンザ株（例えば、F l u M i s t（登録商標）におけるもの）およびR S V（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）の生産に特に有用である。

20

【0016】

非腫瘍形成性M D C K 細胞および／またはV e r o 細胞で増殖可能なウイルスとしては、限定されるものではないが、マイナス鎖R N A ウィルス、限定されるものではないが、インフルエンザ、R S V、パラインフルエンザウイルス1、2および3、ならびにヒトメタニューモウイルス、ならびにD N A ウィルス、レトロウィルス、プラス鎖R N A ウィルス、マイナス鎖R N A ウィルス、二本鎖R N A ウィルス（限定されるものではないが、パポーバウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ワクシニアウイルス、コクサッキーウィルス、レオウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス、灰白脊髄炎(poliomyelitis)ウイルス、麻疹ウイルス、狂犬病ウイルスおよびヘルペスウイルスを含む）を含む他のウイルスが挙げられる。

30

【0017】

7.1 定義

本明細書において腫瘍形成性は、当業者がこの用語に帰属させている通常の意味を有する。腫瘍形成性は、一実施形態において、成体ヌードマウスマodelにより決定される（例えば、Stiles et al., 1976, Cancer Res, 36:1353および下記の実施例5）。腫瘍形成性はまた、例えば、ニワトリ胚への注射および／または漿尿膜への局所適用による、他のアクセイによっても試験することができる(Leighton et al., 1970, Cancer, 26:1024)。

40

【0018】

「組換え」とは、材料（例えば、核酸またはタンパク質）がヒトの介入によって人工的または合成的に（非天然的に）変更されていることを示す。これらの変更は、その天然の環境または状態内の材料またはそこから取り出された材料に対して行うことができる。特に、ウイルス、例えば、インフルエンザウイルスに関して、ウイルスは組換え核酸の発現により生産される場合にはそのウイルスは組換え型である。組換えウイルスはさらに、ゲ

50

ノムに導入された 1 以上の突然変異を組み込んでいてもよい。組換えウイルスはまた、 1 を超える親ウイルス株に由来する成分を含んでなる場合には合併結合ウイルスであり得る。

#### 【 0 0 1 9 】

「合併結合」とは、ウイルスに関して、そのウイルスが 1 を超える親ウイルス株または供給源に由来する遺伝子成分および / またはポリペプチド成分を含むことを示す。例えば、7 : 1 合併結合は、第一の親ウイルスに由来する 7 つのウイルスゲノムセグメント（または遺伝子セグメント）と、第二の親ウイルスに由来する、例えば血球凝集素またはノイラミダーゼをコードする 1 つの相補的ウイルスゲノムセグメントを含む。6 : 2 合併結合は、第一の親ウイルスに由来する 6 つのゲノムセグメント、最も一般的には 6 つの内部遺伝子と、異なる親ウイルスに由来する 2 つの相補的セグメント、例えば、血球凝集素とノイラミダーゼを含む。10

#### 【 0 0 2 0 】

本明細書において「約」とは、特に断りのない限り、10 % を超えるまたは下回らない値を表し、その値はこの用語により修飾されない。例えば、「約 5 μg / kg」とは、4 . 5 μg / kg ~ 5 . 5 μg / kg の範囲を意味する。別の例としては、「約 1 時間」とは、54 分 ~ 66 分の範囲を意味する。

#### 【 0 0 2 1 】

「温度感受性」、「低温適応型」および「弱毒型」とは、当技術分野で周知である。例えば、「温度感受性」（「t s」）とは、インフルエンザ A 株では、ウイルスが、低温、20 例えば、33 に比べて高温、例えば、39 で 100 倍以上の力価の低下を示し、インフルエンザ B 株では、ウイルスが、低温、例えば、33 に比べて高温、例えば、37 で 100 倍以上の力価の低下を示すことを示す。例えば、「低温適応型」（「c a」）とは、ウイルスが、低温、例えば、25 で、高温、例えば、33 でのその増殖の 100 倍以内で高い増殖率を示すことを示す。例えば、「弱毒型」（「a t t」）とは、ウイルスがフェレットの上気道で複製するが、肺組織では検出できず、その動物においてインフルエンザ様の病状を引き起こさないことを示す。中間の表現型を有するウイルス、すなわち、39（ウイルス A 株の場合）または 37（ウイルス B 株の場合）で 100 倍未満の力価減少を示す、33 でのその増殖よりも 100 倍高い（例えば、200 倍、500 倍、1000 倍以内、10,000 倍未満の）25 での増殖を示す、および / またはフェレットの上気道における増殖よりも低い肺での増殖（すなわち、部分的弱毒）および / または動物においてインフルエンザ様病状の軽減を示すウイルスもまた本発明により意図される有用なウイルスであると理解される。増殖は、力価、プラーカサイズまたは形態学、粒子密度または当業者に知られている他の指標により示されるようなウイルス量を示す。30

#### 【 0 0 2 2 】

##### 7 . 2 細胞

本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスは、ウイルスをそのウイルスの収穫、回収および使用を可能とする力価まで増殖させる任意の接着細胞で増殖させることができる。一実施形態では、接着細胞は、細胞隨伴性ウイルスを対応する野生型ウイルスに関して求められたものに匹敵する力価まで増殖させる。特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスは、そのウイルスによる感染に感受性のある細胞内で増殖される。40

#### 【 0 0 2 3 】

一実施形態において、本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスは哺乳類細胞において増殖される。本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスが増殖可能な代表的な哺乳類細胞としては、限定されるものではないが、Vero 細胞、CHO 細胞、Hep - 2 細胞、M B C K 細胞、M D C K 細胞、M R C - 5 細胞、HeLa 細胞および L L C - M K 2 細胞が挙げられる。特定の実施形態では、呼吸器合胞体ウイルスを含め本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスは Vero 細胞で増殖される。別の特定の実施形態では、50

インフルエンザウイルスを含む細胞隨伴性ウイルスはM D C K 細胞で増殖される。

【0024】

6.2.1 M D C K 細胞

M D C K 細胞は、限定されるものではないが、種々のウイルス（限定されるものではないが、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルスおよびフラボウイルスを含む）を含む多くのウイルスの単離および複製を助けることが知られている。特に、M D C K 細胞はインフルエンザウイルスの生産のために広く用いられている。しかしながら、上記のように、M D C K 細胞系統のいくつかは腫瘍形成性である。腫瘍形成性が規制上の問題であれば、本発明は非腫瘍形成性M D C K 細胞を増殖させ、それをインフルエンザウイルスの生産に用いる方法を提供する。よって、一実施形態では、本発明の方法は非腫瘍形成性M D C K 細胞を用いる。別の実施形態では、本発明の方法は腫瘍形成性にかかわらずM D C K 細胞を用いる。10

【0025】

本発明の方法において使用可能な非腫瘍形成性M D C K 細胞系統としては、限定されるものではないが、2005年1月5日アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209)に寄託され、A T C C 寄託番号P T A - 6 5 0 0 およびP T A - 6 5 0 3 (それぞれM D C K - S およびM D C K - S F 1 0 3と呼ばれる)を割り当てられたもの；2006年10月5日に寄託され、A T C C 寄託番号P T A - 7 9 0 9 およびP T A - 7 9 1 0 (それぞれサブクローン1 - A および1 - Bと呼ばれる)を割り当てられたものが挙げられる。20

【0026】

使用可能な他のM D C K 細胞としては、限定されるものではないが、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、A T C C 寄託番号P T A - 6 5 0 1 およびP T A - 6 5 0 2 (それぞれM D C K - S F 1 0 1 およびM D C K - S F 1 0 2と呼ばれる)を割り当てられたもの；A T C C 寄託番号C R L - 1 2 0 4 2 (M D C K . 5 F 1と呼ばれる)を割り当てられたもの；A T C C 寄託番号A T C C C C L 3 4 を割り当てられたもの；C R L - 2 2 8 6 ；およびC R L - 2 2 8 5 が挙げられる。

【0027】

特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性M D C K 細胞は、成体ヌードマウスモデルにおいて非腫瘍形成性である(Stiles et al.参照)。別の特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性M D C K 紹介は、ニワトリ胚に注射および／または漿尿膜に局所適用される場合に非腫瘍形成性である(Leighton et al., Id参照)。さらに別の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性M D C K 紹介は成体ヌードマウスモデルにおいては非腫瘍形成性であるが、ニワトリ胚に注射および／または漿尿膜に局所適用される場合にはそうではない。なお別の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性M D C K 紹介は、成体ヌードマウスモデルにおいても、ニワトリ胚に注射および／または漿尿膜に局所適用される場合にも非腫瘍形成性である。さらに別の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性M D C K 紹介は、少なくとも20継代後または少なくとも30継代後または少なくとも40継代後または少なくとも50継代後または少なくとも60継代後または少なくとも70継代後または少なくとも80継代後または少なくとも90継代後または少なくとも100継代後にも非腫瘍形成性である。さらに他の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性M D C K 紹介は、本発明の無血清培地(例えば、M e d i V S F M 1 0 5 + T E、M e d i V S F M 1 0 9 、およびM e d i V S F M 1 1 0 )中で少なくとも20継代後または少なくとも30継代後または少なくとも40継代後または少なくとも50継代後または少なくとも60継代後または少なくとも70継代後または少なくとも80継代後または少なくとも90継代後または少なくとも100継代後も非腫瘍形成性である。3040

【0028】

腫瘍形成性は当業者に知られている多くの方法で定量することができる。一般に用いら50

れる1つの方法は、被験動物の50%に腫瘍を誘導するのに必要な細胞の数として定義される「 $TD_{50}$ 」値を求めることがある（例えば、Hill R. The TD50 assay for tumor cells. In: Potten C, Hendry J, editors. Cell clones. London: Churchill Livingston e; 1985. p. 223参照）。一実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性MDCK細胞は、約 $10^{10}$ ～約 $10^1$ の間、または約 $10^8$ ～約 $10^3$ の間、または約 $10^7$ ～約 $10^4$ の間の $TD_{50}$ 値を有する。特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性MDCK細胞は、約 $10^{10}$ を超えるまたは約 $10^9$ を超えるまたは約 $10^8$ を超えるまたは約 $10^7$ を超えるまたは約 $10^6$ を超えるまたは約 $10^5$ を超えるまたは約 $10^4$ を超えるまたは約 $10^3$ を超えるまたは約 $10^2$ を超えるまたは約 $10^1$ を超える $TD_{50}$ 値を有する。特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性MDCK細胞は $10^7$ 以上の $TD_{50}$ 値を有する。  
10

#### 【0029】

さらに、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性MDCK細胞はまた非発癌性であると考えられる。細胞が発癌性であるかどうかを決定する方法は一般に、新生齧歯類種に細胞溶解液および/またはDNAを接種し、腫瘍形成を経時的に評価することを含む（例えば、Nowinski and Hays, 1978, J. Virol., 27: 13-8; Peepoer, et al., 2002, Nat Cell Biol., 4:148-53; Code of Federal Regulation (CFR), “Oncogenicity”, Title 40, Vol. 8, Chapter 1, section 798.330, pp. 160-164参照）。例えば、少なくとも $10^7$ 細胞当量からの細胞溶解液および/またはDNAを、一般に4日齢未満の新生齧歯類（例えば、ハムスター、ヌードマウス、ラット）に注射し、その後これを最大5か月以上モニタリングする。発癌性アッセイは商業的試験会社によって通常行われている（例えば、BioReliance、プロトコール#001031および#001030参照）。一実施形態では、少なくとも $10^5$ または少なくとも $10^6$ または少なくとも $10^7$ の、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性MDCK細胞からの細胞溶解液および/またはDNAは、新生齧歯類種に注射される場合、2か月または3か月または4か月または5か月または6か月またはそれ以上腫瘍形成を誘導しない。別の実施形態では、0.01mgまたは0.02mgまたは0.03mgまたは0.04mgまたは0.05mgまたは0.06mgまたは0.07mgまたは0.08mgまたは0.09mgまたは0.10mgまたはそれを超える、本発明の方法において用いられる非腫瘍形成性MDCK細胞からのDNAは、新生齧歯類種に注射される場合、2か月または3か月または4か月または5か月または6か月またはそれ以上腫瘍形成を誘導しない。  
20  
30

#### 【0030】

本発明の方法において用いられるMDCK細胞（例えば、非腫瘍形成性MDCK細胞）は、限定されるものではないが、オルトミクソウイルス（インフルエンザAおよび/またはB株を含む）、パラミクソウイルス（RSV Aおよび/またはB、ヒトメタニューモウイルスならびにパラインフルエンザ1、2および/または3を含む）、ラブドウイルスおよびフラボウイルスを含むウイルスの複製を助けると考えられる。

#### 【0031】

特定の実施形態では、本発明の方法において用いられるMDCK細胞（例えば、非腫瘍形成性MDCK細胞）は、例えば、Flumist（登録商標）(Belsho et al., 1998, N Engl J Med 338:1405; Nichol et al., 1999, JAMA 282:137; Jackson et al., 1999, Vaccine, 17:1905)および/またはこれらのウイルスの骨格（例えば、残りの遺伝子セグメント）を含んでなるか、または以下の特徴：低温適応、弱毒および温度感受性の1以上を有するインフルエンザウイルスの骨格（または1以上のvRNAセグメント）を含んでなる合併結合ウイルスに見られるものなどの低温適応、温度感受性、弱毒型インフルエンザウイルスの複製を助ける。  
40

#### 【0032】

ウイルス複製を助ける細胞の能力の1つの指標が、感染細胞培養から得られた感染性ウイルスの収量である。ウイルス収量は、ウイルス感染および/または増殖を測定するために設計された多くのアッセイによって求めることができる。例えば、ウイルス収量は、感  
50

染性ビリオンを測定する 50% 細胞培養感染量 (T C I D<sub>50</sub>) アッセイ、細胞培養単層の感染細胞内でウイルス抗原を検出する蛍光フォーカスアッセイ (F F A) (例えば、米国特許第 7,262,045 号) に従ってサンプル中に存在するウイルスの濃度を測定することにより定量することができる。T C I D<sub>50</sub> 値は 10<sup>g<sub>10</sub></sup> T C I D<sub>50</sub> / mL として報告される場合が多く、F F A 値は 10<sup>g<sub>10</sub></sup> F F U / mL (蛍光フォーカス単位 / mL) として報告される場合が多い。インフルエンザウイルスの生産に有用な方法としては、限定されるものではないが、特許公報 WO 08/105931 (特に、実施例 12 参照) に開示されているものが挙げられる。

### 【0033】

特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる M D C K 細胞 (例えば、非腫瘍形成性 M D C K 細胞) は、インフルエンザウイルス ((例えば、c a / t s 株) の複製を少なくとも約 7.6、少なくとも約 7.8、少なくとも約 8.0、少なくとも約 8.2、少なくとも約 8.4、少なくとも約 8.6、少なくとも約 8.8、少なくとも約 9.0、少なくとも約 9.2、少なくとも約 9.4、少なくとも約 9.6、少なくとも約 9.8、少なくとも約 10.0 の 10<sup>g<sub>10</sub></sup> T C I D<sub>50</sub> / mL および / または 10<sup>g<sub>10</sub></sup> F F U / mL まで助ける。別の特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる M D C K 細胞は、インフルエンザウイルス ((例えば、c a / t s 株) の複製を少なくとも約 7.6、少なくとも 7.8、少なくとも 8.0、少なくとも 8.2、少なくとも 8.4、少なくとも 8.6、少なくとも 8.8、少なくとも 9.0、少なくとも 9.2、少なくとも 9.4、少なくとも 9.6、少なくとも 9.8、少なくとも 10.0 の 10<sup>g<sub>10</sub></sup> T C I D<sub>50</sub> / mL および / または 10<sup>g<sub>10</sub></sup> F F U / mL まで助ける。ある特定の実施形態では、本発明の方法において用いられる M D C K 細胞は非腫瘍形成性である。

### 【0034】

流行インフルエンザに対する毎年の予防接種用のワクチン株の製造に用いられる野生型インフルエンザウイルスは毎年ワクチンならびに関連の生物製剤に関する諮問委員会 (Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee) により、生物製剤評価研究センター (Centers for Biologics Evaluation and Research) (C B E R) または世界保健機関 (World Health Organization) (W H O) および欧州医薬品庁 (European Medicines Evaluation Agency) (E M E A) に対して推奨され、F D A または疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention) (C D C) により生産者に提供される。これらの株は次に、一般に野生型ウイルスの N A および / または H A 遺伝子と特定の望ましい特徴を有するドナーウイルス (しばしばマスター・ドナーウイルスまたは M D V と呼ばれる) に由来する残りの遺伝子セグメントを組み合わせる合併結合ワクチン株の生産に使用することができる。例えば、M D V 株は低温適応および / または温度感受性および / または弱毒型であり得、かつ / または高い増殖率を有する。すぐ次に続く実施形態は、低温適応および / または温度感受性および / または弱毒型の異なるインフルエンザ株 (例えば、1 以上の保健機関により推奨された野生型株) に関する。このような低温適応および / または温度感受性および / または弱毒型インフルエンザウイルスは、目的株に由来する H A および N A 遺伝子セグメントと好適な低温適応および / または温度感受性および / または弱毒型インフルエンザ株に由来する残りの遺伝子セグメント (本明細書では「低温適応、温度感受性、弱毒骨格」とも呼ぶ) を含んでなる組換えおよび / または合併結合インフルエンザウイルス、例えば、F l u M i s t (登録商標) に見られる低温適応、温度感受性、弱毒型インフルエンザウイルス (c a A / A n n A r b o r / 6 / 6 0 および c a B / A n n A r b o r / 1 / 6 6) を得ることにより作出することができる。本明細書において、野生型インフルエンザウイルス株に由来する H A および N A 遺伝子セグメントと低温適応および /

または温度感受性および / または弱毒型インフルエンザであるウイルスに由来する残りの遺伝子セグメントを含んでなる組換えおよび / または合併結合ウイルス。合併結合および / または組換えウイルスはまた「c a」、「a t t」、「t s」の 1 以上の識別子で始まる野生型株表記によっても呼ばれ、例えば、A / ニューカレドニア / 2 0 / 9 9 に由来す

10

20

30

40

50

るH A およびN A 遺伝子セグメントと低温適応、温度感受性、弱毒型インフルエンザウイルス（例えば、A / Ann Arbor / 6 / 60）に由来する残りのセグメントを含んでなる組換えおよび／または合併結合ウイルスは簡単に「ca A / ニューカレドニア／20 / 99」と呼ぶことができる。

#### 【0035】

ある実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）は、限定されるものではないが、C B E R 、W H O 、E M E A 、F D A およびC D C を含む1以上の保健機関によって毎年推奨および／または提供される少なくとも1つのインフルエンザ株（例えば、インフルエンザA株、インフルエンザB株）の低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型（例えば、合併結合）の複製を10 、少なくとも約7.6、少なくとも約7.8、少なくとも約8.0、少なくとも約8.2、少なくとも約8.4、少なくとも約8.6、少なくとも約8.8、少なくとも約9.0、少なくとも約9.2、少なくとも約9.4、少なくとも約9.6、少なくとも約9.8、少なくとも約10.0の $\log_{10}$ T C I D<sub>50</sub> / m L および／または $\log_{10}$ F F U / m L まで助ける。別の特定の実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）は、限定されるものではないが、C B E R 、W H O 、E M E A 、F D A およびC D C を含む1以上の保健機関により毎年推奨および／または提供される少なくとも1つのインフルエンザ株（例えば、インフルエンザA株、インフルエンザB株）の低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型（例えば、合併結合）の複製を、少なくとも約7.6、少なくとも7.8、少なくとも8.0、20 少なくとも8.2、少なくとも8.4、少なくとも8.6、少なくとも8.8、少なくとも9.0、少なくとも9.2、少なくとも9.4、少なくとも9.6、少なくとも9.8、少なくとも10.0の $\log_{10}$ T C I D<sub>50</sub> / m L および／または $\log_{10}$ F F U / m L まで助ける。ある特定の実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞は非腫瘍形成性である。

#### 【0036】

ある特定の他の実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）は、少なくとも1つのインフルエンザA株の低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型の複製を助ける。インフルエンザA株はいずれのサブタイプ（例えば、H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>、H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>、H<sub>7</sub>N<sub>7</sub>、H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>、H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>、H<sub>1</sub>N<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>）のものであってもよいと考えられる。現在、インフルエンザAウイルスにおいて、少なくとも16の異なるH A と9つの異なるN A サブタイプが同定されている。よって、インフルエンザA株は、これまでに知られているまたは今後同定されるH A サブタイプとN A サブタイプの組合せのいずれを含んでもよく、かつ／または合併結合であってもよい。ある特定の実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞は非腫瘍形成性である。

#### 【0037】

ある特定の他の実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）は、少なくとも1つのインフルエンザB株の低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型の複製を助ける。インフルエンザBウイルスは現在のところそれらの血球凝集素およびノイラミダーゼタンパク質に基づいたサブタイプに分けられておらず、むしろそれらは系統により分類されている。現在、インフルエンザBウイルス株は、B / 山形系統とB / ピクトリア系統という2つの系統に分けられ、多くのサブ系統が存在する。よって、インフルエンザB株はこれまでに知られているまたは今後同定されるいずれの系統および／またはサブ系統に由来してもよく、かつ／または合併結合であってもよい。ある特定の実施形態では、本発明の方法において用いられるM D C K 細胞は非腫瘍形成性である。

#### 【0038】

##### 6.3 細胞培養培地および方法

本発明は、1回使用バイオリアクター、標準的な再利用バイオリアクター（例えば、ス

10

20

30

40

50

テンレス鋼、ガラス容器バイオリアクター)を含むバイオリアクターで大量のワクチン材料を生産するための無血清細胞培養培地および再現性が高く、効率的でスケーラブルなプロセスを提供する。特に、本発明は、インフルエンザウイルス(例えば、低温適応および/または温度感受性および/または弱毒型)を高力価、例えば、少なくとも約7.4または少なくとも約7.6または少なくとも約7.8または少なくとも約8.0または少なくとも約9.0または少なくとも約10.0の $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/mLおよび/または $\log_{10}$ FFU/mLまで複製する方法を提供する。一態様において、本発明は、MDCK細胞(例えば、非腫瘍形成性MDCK細胞)の増殖を高い細胞密度まで助け、高いウイルス力価を得るための培地交換工程の必要を無くす富化無血清細胞培養培地を提供する。培地交換工程の排除は、プロセス時間および培地の使用的の軽減などのいくつかの利点を与える。さらに、製造中に必要とされる操作数が減り、これによって汚染の機会も減る。別の態様において、本発明は、ビーズ間移動法を含む微小担体上での非腫瘍形成性細胞の増殖のための改良法を提供する。別の態様において、本発明の富化無血清細胞培養培地は非腫瘍形成性MDCK細胞の非腫瘍形成的特徴を維持する。

#### 【0039】

##### 6.3.1 富化無血清

当業者ならば 細胞を増殖させるのに用いられる細胞培養培地が、限定されるものではないが、非腫瘍形成性であること、非発癌性であること、接着細胞として増殖すること、非接着細胞として増殖すること、上皮様形態を有すること、培養した際に種々のウイルスの複製を助けること、および本明細書に記載されているようにインフルエンザウイルスの複製を高力価まで助けることを含む1以上の細胞の特徴に影響を及ぼし得ることが分かるであろう。外来病原体(例えば、マイコプラズマ、ウイルスおよびブリオン)による汚染のリスクを軽減するため、治療(例えば、ワクチン)材料の生産のための組織培養適用における血清または動物抽出物の使用は最小限にするか、またはさらには無くすべきである。さらに、細胞培養プロセス中に必要とされる操作の数を最小化することも汚染の機会を著しく軽減することができる。よって、本発明は、バッチ培養法を用いるMDCK細胞(例えば、非腫瘍形成性MDCK細胞)の増殖およびワクチン材料の生産に有用な富化無血清培養培地を提供する。特に、本発明の富化無血清培養培地(「本発明の無血清培地」および「本発明の培地」とも呼ばれる)は、培地交換または補給を用いないバッチ培養法で使用可能である。よって、本発明の無血清培地の開発および使用は、ワクチン材料(例えば、インフルエンザウイルス)の、細胞培養に基づく生産において最も興味深い操作上の問題の1つである培地交換/補給の必要性を克服する。

#### 【0040】

一実施形態では、本発明の無血清培地は、非腫瘍形成性MDCK細胞の増殖を助け、この場合、その細胞は該培地での増殖後(すなわち、継代培養後)も非腫瘍形成性を維持する。特定の実施形態では、MDCK細胞は、本発明の無血清培地中で、少なくとも20継代後または少なくとも30継代後または少なくとも40継代後または少なくとも50継代後または少なくとも60継代後または少なくとも70継代後または少なくとも80継代後または少なくとも90継代後または少なくとも100継代後も非腫瘍形成性である。

#### 【0041】

別の実施形態では、本発明の無血清培地はMDCK細胞(例えば、非腫瘍形成性MDCK細胞)の増殖を高密度まで助ける。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、MDCK細胞の増殖を少なくとも $5 \times 10^5$ 細胞/mL、少なくとも $6 \times 10^5$ 細胞/mL、少なくとも $7 \times 10^5$ 細胞/mL、少なくとも $8 \times 10^5$ 細胞/mL、少なくとも $9 \times 10^5$ 細胞/mL、少なくとも $1 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $1.2 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $1.4 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $1.6 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $1.8 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $2.0 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $2.5 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $5 \times 10^6$ 細胞/mL、少なくとも $7.5 \times 10^6$ 細胞/mLまたは少なくとも $1 \times 10^7$ の密度まで助ける。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地は非腫瘍形成性MDCK細胞の増殖を助ける。

10

20

30

40

50

## 【0042】

さらに別の実施形態では、本発明の無血清培地は、培地交換工程を必要とせずに、M D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性 M D C K 細胞）の増殖を高密度まで助け、その後のインフルエンザウイルスの複製を高力価まで助ける。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、培地交換工程を必要とせずに、M D C K 細胞の増殖を高密度まで助け、その後のインフルエンザウイルス（例えば、c a / t s 株）の複製を少なくとも 6 . 0 または少なくとも 6 . 2 または少なくとも 6 . 4 または少なくとも 6 . 6 または少なくとも 6 . 8 または少なくとも 7 . 0 または少なくとも 7 . 2 または少なくとも 7 . 4 または少なくとも 7 . 6 または少なくとも 7 . 8 または少なくとも 8 . 0 または少なくとも 8 . 2 または少なくとも 8 . 4 または少なくとも 8 . 6 または少なくとも 8 . 8 または少なくとも 9 . 0 または少なくとも 9 . 2 または少なくとも 9 . 4 または少なくとも 9 . 6 または少なくとも 9 . 8 または少なくとも 10 . 0 の  $\log_{10}$  T C I D<sub>50</sub> / mL および / または  $\log_{10}$  F F U / mL まで助ける。他の特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、非腫瘍形成性 M D C K 細胞の増殖を高密度まで助け、その後の、限定されるものではないが前記のインフルエンザウイルスを含むインフルエンザウイルスの複製を助ける。

## 【0043】

一実施形態では、本発明の無血清培地は植物加水分解物を含んでなる。植物加水分解物としては、限定されるものではないが、以下のもの：トウモロコシ、綿実、エンドウ、ダイズ、麦芽、ジャガイモおよびコムギの 1 以上からの加水分解物が挙げられる。植物加水分解物は酵素的加水分解により生産可能であり、一般にペプチド、遊離アミノ酸および増殖因子の混合物を含む。植物加水分解物は、例えば、Marcor Development、HyClone および Organo Technique を含むいくつかの商業ソースから容易に得られる。また、植物加水分解物の代わりに、または植物加水分解物と組み合わせて酵母加水分解物も使用可能であると考えられる。酵母加水分解物は、例えば、Sigma - Aldrich、USB Corp、Gibco / BRL およびその他を含むいくつかの商業ソースから容易に得られる。ある実施形態では、植物または酵母加水分解物に加えて、または植物または酵母加水分解物の代わりに合成加水分解物を使用することができる。ある実施形態では、本発明の無血清培地は、約 0 . 1 g / L ~ 約 5 . 0 g / L の間、または約 0 . 5 g / L ~ 約 4 . 5 g / L の間、または約 1 . 0 g / L ~ 約 4 . 0 g / L の間、または約 1 . 5 g / L ~ 約 3 . 5 g / L の間、または約 2 . 0 g / L ~ 約 3 . 0 g / L の間の終濃度で植物加水分解物を含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、終濃度 2 . 5 g / L の植物加水分解物を含んでなる。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、終濃度 2 . 5 g / L の加水分解物を含んでなる。

## 【0044】

別の実施形態では、本発明の無血清培地は、脂質補給物を含んでなる。培養培地の補給に使用可能な脂質としてが、限定されるものではないが、化学的に定義された動物および植物由来脂質補給物ならびに合成により誘導された脂質が挙げられる。脂質補給物中に存在し得る脂質としては、限定されるものではないが、コレステロール、飽和および / または不飽和脂肪酸（例えば、アラキドン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸およびステアリン酸）が挙げられる。コレステロールは脂質補給物の 100 倍保存液中に 0 . 10 mg / ml ~ 0 . 40 mg / ml の間の濃度で存在し得る。脂肪酸は脂質補給物の 100 倍保存液中に 1  $\mu$ g / ml ~ 20  $\mu$ g / ml の間の濃度で存在し得る。培地処方に好適な脂質は、例えば、HyClone、Gibco / BRL および Sigma - Aldrich を含むいくつかの商業ソースから容易に得られる。ある実施形態では、本発明の無血清培地は、化学的に定義された脂質濃縮物を約 0 . 1 倍 ~ 約 2 倍の間、または約 0 . 2 倍 ~ 約 1 . 8 倍の間、または約 0 . 3 倍 ~ 約 1 . 7 倍の間、または約 0 . 4 倍 ~ 約 1 . 6 倍の間、または約 0 . 5 倍 ~ 約 1 . 5 倍の間、または約 0 . 6 倍 ~ 約 1 . 4 倍の間、または約 0 . 7 倍 ~ 約 1 . 3 倍の間、または約 0 . 8 倍 ~ 約 1 . 2 倍の間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、化学的に定義された脂質濃縮物（CDC-L）溶液を終濃度 1 倍で含んでなる。別の特定の実施形態で

10

20

30

40

50

は、本発明の無血清培地は、化学的に定義された脂質濃縮物（C D C L）溶液（表4）を終濃度1倍で含んでなる。

#### 【0045】

別の実施形態では、本発明の無血清培地は微量元素を含んでなる。使用可能な微量元素としては、限定されるものではないが、 $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Selenite} \cdot 2\text{Na}$ 、クエン酸鉄、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、モリブデン酸-アンモニウム塩、 $\text{NH}_4\text{VO}_3$ 、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{SnCl}_2$ （無水）、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 、 $\text{KBr}$ 、 $\text{CdCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CrCl}_3$ （無水）、 $\text{NaF}$ 、 $\text{GeO}_2$ 、 $\text{KI}$ 、 $\text{RbCl}$ 、 $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ が挙げられる。微量元素の濃縮保存溶液は、例えば、 $\text{CeI}_{11}\text{Grow}$ を含むいくつかの商業ソースから容易に得られる（カタログ番号99-182、99-175および99-176参照）。ある実施形態では、本発明の無血清培地は、微量元素溶液A、BおよびC（表3）を約0.1倍～約2倍の間、または約0.2倍～約1.8倍の間、または約0.3倍～約1.7倍の間、または約0.4倍～約1.6倍の間、または約0.5倍～約1.5倍の間、または約0.6倍～約1.4倍の間、または約0.7倍～約1.3倍の間、または約0.8倍～約1.2倍の間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、微量元素溶液A、BおよびC（表3）を終濃度1倍で含んでなる。

#### 【0046】

別の実施形態では、本発明の無血清培地は、1以上のホルモン、増殖因子および/または他の生体分子を含んでなる。ホルモンとしては、限定されるものではないが、トリヨードチロニン、インスリンおよびヒドロコルチゾンが挙げられる。増殖因子としては、限定されるものではないが、上皮細胞増殖因子（EGF）、インスリン増殖因子（IGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）および纖維芽細胞増殖因子（FGF）が挙げられる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は上皮細胞増殖因子（EGF）を含んでなる。他の生体分子としては、サイトカイン（例えば、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン、インターロイキン、TNF）、ケモカイン（例えば、Rantes、エオタキシン、マクロファージ炎症性タンパク質（MIP））およびプロスタグランジン（例えば、プロスタグランジンE1およびE2）が挙げられる。一実施形態では、本発明の無血清培地は、増殖因子を約0.0001～約0.05mg/Lの間、または約0.0005～約0.025mg/Lの間、または約0.001～約0.01mg/Lの間、または約0.002～約0.008mg/Lの間、または約0.003mg/L～約0.006mg/Lの間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、EGFを終濃度0.005mg/Lで含んでなる。一実施形態では、本発明の無血清培地は、トリヨードチロニンを約 $1 \times 10^{-1.2}$ M～約 $10 \times 10^{-1.2}$ Mの間、または約 $2 \times 10^{-1.2}$ M～約 $9 \times 10^{-1.2}$ Mの間、または約 $3 \times 10^{-1.2}$ M～約 $7 \times 10^{-1.2}$ Mの間、または約 $4 \times 10^{-1.2}$ M～約 $6 \times 10^{-1.2}$ Mの間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、トリヨードチロニンを終濃度 $5 \times 10^{-1.2}$ Mで含んでなる。一実施形態では、本発明の無血清培地は、インスリンを約1mg/L～約10mg/Lの間、または約2.0～約8.0mg/Lの間、または約3mg/L～約6mg/Lの間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、インスリンを終濃度5mg/Lで含んでなる。ある実施形態では、本発明の無血清培地は、プロスタグランジンを約0.001mg/L～約0.05mg/Lの間、または約0.005mg/L～約0.045mg/Lの間、または約0.01mg/L～約0.04mg/Lの間、または約0.015mg/L～約0.035mg/Lの間、または約0.02mg/L～約0.03mg/Lの間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、プロスタグランジンを終濃度0.025mg/Lで含んでなる。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、プロスタグランジンE1を終濃度0.025mg/Lで含んでなる。

#### 【0047】

10

20

30

40

50

さらに別の実施形態では、本発明の無血清培地は、プロレッシン、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸およびヌクレオシドからなる群から選択される1以上の培地成分で強化される。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、成分の濃度が例えばダルベッコの変形イーグル培地／ハムのF12培地(DMEM/F12)などの増殖細胞用に通常用いられている培地に一般に見られるものよりも約1倍または約2倍または約3倍または約4倍または約5倍またはそれを超える高さになるように、1以上の培地成分で強化される。参考のため、DMEM/F12の標準的な組成を下記表1に示す。特定の実施形態では、本発明の無血清培地はプロレッシンで強化される。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地はプロレッシンで、プロレッシン濃度がDMEM/F12に一般にみられるものよりも約5倍またはそれを超える高さになるように強化される。

10

#### 【0048】

強化可能な脂肪酸としては、限定されるものではないが、リノール酸および-リノレン酸(必須脂肪酸とも呼ばれる)ならびにミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルシン酸、ドコサヘキサン酸を含む不飽和脂肪酸;限定されるものではないが、ブタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ドデカン酸、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、エイコサン酸、ドコサン酸、テトラコサン酸および硫黄含有脂肪酸(リポ酸を含む)を含む飽和脂肪酸が挙げられる。ある実施形態では、本発明の無血清培地は、上記のような脂質補給物により提供されるものに加え、付加的脂肪酸で強化される。特定の実施形態では、本発明の無血清培地はリノール酸およびリノレン酸で強化される。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地はリノール酸およびリノレン酸で、リノール酸およびリノレン酸の濃度がDMEM/F12に一般に見られるものよりも約5倍またはそれを超える高さになるように強化される。

20

#### 【0049】

強化可能なアミノ酸としては、12の標準アミノ酸(アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン)ならびにシスチンおよび非標準アミノ酸が挙げられる。ある実施形態では、非腫瘍形成性MDCK細胞によっては合成されない、一般に「必須アミノ酸」と呼ばれる1以上のアミノ酸が強化される。例えば、一般に、8つのアミノ酸、すなわち、フェニルアラニン、バリン、トレオニン、トリプトファン、イソロイシン、メチオニン、ロイシンおよびリシンがヒトに必須であると考えられる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、シスチンおよび、グルタミン以外の全ての標準アミノ酸(DMEM/F12はグルタミン無しで処方され、グルタミンは別途加える場合が多い)で、シスチンおよび標準アミノ酸の濃度がDMEM/F12に一般に見られるものよりも約5倍またはそれを超える高さになるように強化される。ある特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、グルタミンを約146mg/L~約1022mg/Lの間、または約292mg/L~約876mg/Lの間Lまたは約438mg/L~約730mg/Lの間の濃度で含んでなる。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、グルタミンを584mg/mLの濃度で含んでなる。

30

#### 【0050】

強化可能なビタミンとしては、限定されるものではないが、アスコルビン酸(vit A)、d-ビオチン(vit B<sub>7</sub>およびvit H)、D-カルシウムパントテン酸、コレカルシフェロール(vit D<sub>3</sub>)、塩化コリン、シアノコバラミン(vit B<sub>1</sub><sub>2</sub>)、エルゴカルシフェロール(vit D<sub>2</sub>)、葉酸(vit B<sub>9</sub>)、メナキノン(vit K<sub>2</sub>)、ミオイノシトール、ナイアシンアミド(vit B<sub>3</sub>)、p-アミノ安息香酸、パントテン酸(vit B<sub>5</sub>)、フィロキノン(vit K<sub>1</sub>)、ピリドキシン(vit B<sub>6</sub>)、レチノール(vit A)、リボフラビン(vit B<sub>2</sub>)、-トコフェロール(vit E)およびチアミン(vit B<sub>1</sub>)が挙げられる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、areで強化されるd-ビオチン、D-カルシウ

40

50

ム、パントテン酸、塩化コリン、シアノコバラミン、葉酸、ミオイノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビンおよびチアミンで、示されたビタミンの濃度がD M E M / F 1 2 に一般に見られるものよりも約5倍またはそれを超える高さになるように強化される。

#### 【0051】

強化可能なヌクレオシドとしては、限定されるものではないが、シチジン、ウリジン、アデノシン、グアノシン、チミジン、イノシンおよびヒポキサンチンが挙げられる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、ヒポキサンチンおよびチミジンで、ヒポキサンチンおよびチミジンの濃度がD M E M / F 1 2 に一般に見られるものよりも約5倍またはそれを超える高さになるように強化される。

10

#### 【0052】

細胞培養培地に添加可能なさらなる成分としては、限定されるものではないが、重炭酸ナトリウム、炭素源（例えば、グルコース）および鉄結合剤が挙げられる。一実施形態では、本発明の無血清培地は重炭酸ナトリウムを約1200mg/L～約7200mg/Lの間、または約2400mg/Lおよび約6000mg/mLの間、または約3600mg/mLおよび約4800mg/mLの間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は重炭酸ナトリウムを終濃度4400mg/mLで含んでなる。一実施形態では、本発明の無血清培地は炭素源としてグルコースを含んでなる。別の実施形態では、本発明の無血清培地はグルコースを、約1g/L～約10g/Lまたは約2g/L～約10g/Lまたは約3g/L～約8g/Lまたは約4g/L～約6g/Lまたは約4.5g/L～約9g/Lの間の終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地はグルコースを終濃度4.5g/Lで含んでなる。特に、非腫瘍形成性M D C K細胞を高密度まで増殖させ、その後、インフルエンザウイルスの複製するために用いる本発明の無血清培地には、炭素源の枯渇を避けるためにグルコースを追加することができると考えられる。よって、ある実施形態では、本発明の無血清培地は、約5.5g/L～約10g/Lの間の最終グルコース濃度となるように1～5g/Lのグルコース追加を含んでなる。

20

#### 【0053】

使用可能な鉄結合剤としては、トランスフェリンなどのタンパク質およびトロポロンなどの化学化合物（例えば、米国特許第5,045,454号、同第5,118,513号、同第6,593,140号およびPCT国際公開公報第W O 0 1 / 1 6 2 9 4号参照）が挙げられる。一実施形態では、本発明の無血清培地は、トランスフェリンの代わりにトロポロン（2-ヒドロキシ-2,4,6-シクロヘパトリエン-1）および鉄源（例えば、クエン酸アンモニウム鉄、硫酸アンモニウム鉄）を含んでなる。例えば、トロポロンまたはトロポロン誘導体は、培地中に存在する鉄よりも過剰なモル濃度で、約5対1～約1対1の間のモル比で存在する。ある実施形態では、本発明の無血清培地は、トロポロンまたはトロポロン誘導体を、培地中に存在する鉄よりも過剰なモル濃度で、約5対1または約3対1または約2対1または約1.75対1または約1.5対1または約1.25対1のモル比で含んでなる。特定の実施形態では、本発明の無血清培地は終濃度0.25mg/Lのトロポロンおよび終濃度0.20mg/Lのクエン酸アンモニウム鉄（F A C）を含んでなる（表2参照）。

30

#### 【0054】

培地处方物への前記のような成分の添加は浸透圧を変化させ得る。よって、ある実施形態では、所望の浸透圧を維持するためにD M E M / F 1 2 に一般に見られる1以上の成分の量を低減する。一実施形態では、本発明の無血清培地において塩化ナトリウム（N a C 1）の濃度を低減する。別の実施形態では、本発明の無血清培地中のN a C 1濃度は、D M E M / F 1 2 に一般に見られるものの約10%～約90%または約20%～約80%または約30%～約70%または約40%～約60%の間である。特定の実施形態では、本発明の無血清培地中のN a C 1終濃度はD M E M / F 1 2 に一般に見られるものの50%である。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地中のN a C 1濃度は3500mg

40

50

/ L である。

【 0 0 5 5 】

ある実施形態では、本発明の無血清培地中に存在する動物由来成分の数は最小限にするか、またはさらには無くす。例えば、非動物源由来のインスリンおよびトランスフェリンなどの市販の組換えタンパク質（例えば、それぞれ Biological Industrial Industries カタログ番号 01 - 818 - 1 および Millipore カタログ番号 9701）を動物源由来のタンパク質の代わりに使用することができる。特定の実施形態では、化学的に定義された脂質混合物の一成分であり得るコレステロール以外の全ての動物由来成分を非動物由来製品に置き換える。一般に動物由来製品に関連するリスクを最小化するためには、コレステロールを限定されるものではないがプリオンを含む外来病原体に関連しない領域にあるヒツジの毛から得ることができる。10

【 0 0 5 6 】

特定の実施形態では、本発明の無血清培地は、表 2 に挙げられている Med i V SFM 110 培地の全ての成分を示されている終濃度で含んでなる。別の特定の実施形態では、本発明の無血清培地は表 2 に挙げられている、示された濃度の Med i V SFM 110 培地の全ての成分から本質的になる。さらに別の特定の実施形態では、表 2 に挙げられている成分からなる Med i V SFM 110 培地は本発明の無血清培地である。

【 0 0 5 7 】

表 1

## DMEM/F12培地処方物

成分	mg/L	成分	mg/L
塩		アミノ酸	
塩化カルシウム、無水	116.6	L-アラニン	4.45
塩化マグネシウム	28.64	L-アルギニンHCl	147.5
硫酸マグネシウム、無水	48.84	L-アスパラギンH <sub>2</sub> O	7.5
塩化カリウム	311.8	L-アスパラギン酸	6.65
塩化ナトリウム	6999.5	L-システインHCl H <sub>2</sub> O	17.56
リン酸ナトリウム、第一、一水和物	62.5	L-시스チン2HCl	31.29
リン酸ナトリウム、第二、無水	71.02	L-グルタミン酸	7.35
		グリシン	18.75
微量金属		L-ヒスチジンHCl H <sub>2</sub> O	31.48
硫酸銅(II)、五水和物	0.0013	L-イソロイシン	54.47
硝酸鉄(III)、九水和物	0.05	L-ロイシン	59.05
硫酸第一鉄、七水和物	0.417	L-リシンHCl	91.25
硫酸亜鉛、七水和物	0.432	L-メチオニン	17.24
		L-フェニルアラニン	35.48
その他		L-プロリン	17.25
プロレッシン、2HCl	0.081	L-セリン	26.25
重炭酸ナトリウム	2200	L-トレオニン	53.45
ピルビン酸ナトリウム	55	L-トリプトファン	9.02
		L-チロシン2Na	55.79
ビタミン		L-バリン	52.85
d-ビオチン(vit B7およびvit H)	0.0035		
パントテン酸D-カルシウム	2.24	ヌクレオシド	
塩化コリン	8.98	ヒポキサンチン、Na塩	2.39
シアノコバラミン(vit B12)	0.68	チミジン	0.365
葉酸	2.65		
ミオイノシトール	12.6	脂肪酸	
ナイアシンアミド	2.02	αリノール酸	0.042
ピリドキシンHCl(vit B6)	2.031	αDL-リボ酸	0.105
リボフラビン(vit B2)	0.219		
チアミンHCl(vit B1)	2.17		

## 6.3.2 ビーズ間移動

一実施形態では、非腫瘍形成性MDCK細胞は、それらが接着している表面上で接着細胞として培養される。組織培養細胞が増殖可能な接着表面としては、限定されるものではないが、表面改質ポリスチレンプラスチック、タンパク質コーティング表面（例えば、フィブロネクチンおよび/またはコラーゲンコーティングガラス/プラスチック）ならびに多種の市販微小担体（例えば、Dormacell、Pfeifer & LangeなどのDEAE-デキストラン微小担体ビーズ；Superbead、Flow Laboratories；Hilllex、SoloHill、Ann Arborなどのスチレンコポリマー-トリ-メチルアミンビーズ；CytodexおよびCytodex3（GE Healthcare Life Science）が挙げられる。微小担体ビーズは、細胞培養容量当たりに接着細胞増殖のための大きな表面積を与える小球（直径1

10

20

30

40

50

00～200ミクロンの範囲)である。例えば、1リットルの培地は、8000平方センチメートルを超える増殖表面を提供する2000万を超える微小担体ビーズを含み得る。接着表面の選択は非腫瘍形成性M D C K細胞の培養に用いる方法によって決定される。

#### 【0058】

一実施形態では、微小担体は約1～約4g/Lの間の濃度で用いられる。別の実施形態では、微小担体は約2～約3g/Lの間の濃度で用いられる。ある実施形態では、培養容器(例えば、バイオリアクター)に被培養M D C K細胞を約0.5～約 $2 \times 10^5$ 細胞/mLの播種密度で播種する。特定の実施形態では、播種密度は約0.7～約1.8×10<sup>5</sup>細胞/mLの間、または約0.8～約 $1.6 \times 10^5$ 細胞/mLの間、または約0.9～約 $1.4 \times 10^5$ 細胞/mLの間、または約1.0～約 $1.2 \times 10^5$ 細胞/mLの間である。あるいは、播種密度は微小担体当たりで計算することもできる。よって、ある実施形態では、培養容器(例えば、バイオリアクター)に被培養M D C K細胞を約10～約40細胞/微小担体、約12～約38細胞/微小担体、または約14～約36細胞/微小担体、または約16～約34細胞/微小担体、または約18～約32細胞/微小担体、または約20～約30細胞/微小担体の播種密度で播種する。

#### 【0059】

接着細胞を継代培養する(すなわち、細胞を増殖させる、細胞培養を拡張する)過程では、細胞を密集した支持体表面(例えば、フラスコ表面、微小担体など)から新しい支持体表面へ移動させなければならない。このような細胞移動を行うためにはいくつかの方法を使用することができる。例えば、トリプシン、T r y p L E およびコラゲナーゼを含むプロテアーゼを用いて細胞をフラスコまたは微小担体から取り出し、次にこれらの細胞を所望により洗浄し、拡張のためにより大きなフラスコまたはより大容量の微小担体含有培地へ希釈することができる。このプロセスは一般に培養物を「分割する」と言われ、元の培養物と最終培養物の比として定量することができる。例えば、分割比1：8は1部の元の(例えば、10mL)培養物を7部の新鮮培養培地(例えば、70mL)に加えて80mLにすることを示す。あるいは、元の培養物中の細胞数を求め、所望の播種密度と最終培養物の容量に基づき希釈率を計算する。このような適用にはT r y p L E (Invitrogen, Carlsbad, CA)などの非動物由来プロテアーゼを使用するのが好ましい。あるいは、微小担体培養においては、細胞を解離させた後に新鮮な培地および/または微小担体ビーズを培養物に加えればよい。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ処理培養物を、新鮮な培地および/または微小担体の添加前、添加中または添加後に、より大きな培養容器に移す。

#### 【0060】

特定の実施形態では、微小担体上で接着細胞として増殖するM D C K細胞(例えば、非腫瘍形成性M D C K細胞)の細胞培養物をプロテアーゼ(例えば、T r y p L E)で処理する。このプロテアーゼを必要に応じて不活性化(例えば、ライマメトリップシン阻害剤などのプロテアーゼ阻害剤の添加による)することができ、その後、新鮮な培地および/または微小担体ビーズをその培養物に加えることができる。いくつかの実施形態では、このプロテアーゼ処理培養物を、新鮮な培地および/または微小担体の添加前、添加中または添加後に、より大きな培養容器に移す。

#### 【0061】

このビーズ間移動法におけるプロテアーゼの使用により、細胞の拡散が不十分となり、細胞総数が少なくなる場合がある。よって、本発明はまた、限定されるものではないが、第8.2節の実施例に示されている(第8.1節の実施例にも用いられている)方法を含む、ビーズ間移動を助長するのに必要なプロテアーゼの量を最小限にする、またはさらには無くすビーズ間移動を行う方法も提供する。特に、本発明者らは細胞を微小担体から遊離させるのに必要なプロテアーゼの量がキレート剤での前処理により、特に、細胞の増殖に用いるものよりも高いpHでの前処理により、少なくとも20倍低減可能であると確定した。

#### 【0062】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、ビーズ間移動は、プロテアーゼ（例えば、T r y p L E）の添加前に細胞をキレート剤で前処理することにより助長される。他の実施形態では、ビーズ間移動は、キレート剤（例えば、E D T A）を添加すること、および細胞増殖に用いるものよりも高いp Hでインキュベートすることにより助長される。特定の実施形態では、微小担体上で接着細胞として増殖する非腫瘍形成性M D C K細胞の細胞培養を、プロテアーゼの添加前に、細胞増殖の際に用いるものよりも高いp Hで、キレート剤（例えば、E D T A）で処理する。ある実施形態では、微小担体基質からの細胞の解離を助長するため、必要に応じてp Hをモニタリングし、調整する。細胞が解離された後、その培養物に新鮮な培地および／または微小担体ビーズを加えることができる。いくつかの実施形態では、元の微小担体を含む、または含まない培養物を、新鮮な培地および／または微小担体の添加前、添加中または添加後に、より大きな培養容器に移す。

10

#### 【0063】

ある実施形態では、これらの細胞を、解離する前に洗浄培地（例えば、緩衝塩溶液）で洗浄する。細胞の洗浄に有用な媒体としては、限定されるものではないが、H e p e s緩衝溶液、リン酸緩衝生理食塩水、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、ハンクスの平衡塩溶液、アールの平衡塩溶液が挙げられる。細胞洗浄プロセスは、培地（増殖および／または洗浄培地）の一部または全部を新鮮な洗浄培地（すなわち、緩衝塩溶液）に置き換えることを含む。このプロセスは複数回繰り返すことができる。一般に、微小担体ビーズを一定時間（例えば、10～40分）沈降させ、増殖培地を容器から除去する。所望により、細胞培養物からの培地の除去は、交互低剪断型タンジェントフローデバイスを用いて行うことができる（例えば、米国特許第6,544,424号参照）。ある実施形態では、洗浄工程の際に約50%～約90%の間の培地（増殖および／または洗浄培地）を除去する。ある実施形態では、培地を、除去された培地の容量よりも少ない、同じまたは多い容量の洗浄培地（すなわち、緩衝塩溶液）に置き換える。一実施形態では、洗浄培地は、細胞培養容量が元の細胞培養作業容量の約25%～約100%の間となるように加える。特定の実施形態では、洗浄培地は、元の細胞培養作業容量の約40%～約60%となるように加える。別の特定の実施形態では、洗浄培地は、元の細胞培養作業容量の約90%～約100%となるように加える。ある実施形態では、細胞を2回以上洗浄する。

20

#### 【0064】

ある実施形態では、洗浄培地はキレート剤を含んでなる。使用可能なキレート剤としては、限定されるものではないが、エチレンジアミン四酢酸（E D T A）、ジエチレントリアミン五酢酸（D T P A）、エチレンビス（オキシエチレン-トリニトリロ）四酢酸（E G T A）が挙げられる。特定の実施形態では、キレート剤はE D T Aである。ある実施形態では、洗浄培地はキレート剤を約0.25mM～約0.75mMの間の濃度で含んでなる。ある特定の他の実施形態では、洗浄培地はキレート剤を約0.4mM～約0.6mMの間の濃度で含んでなる。特定の実施形態では、洗浄培地はキレート剤を約0.5mMの濃度で含んでなる。

30

#### 【0065】

一実施形態では、キレート剤を含んでなる洗浄培地のp Hは約7.6および約8.4の間である。特定の実施形態では、キレート剤を含んでなる洗浄培地のp Hは約7.8および約8.2の間である。別の特定の実施形態では、キレート剤を含んでなる洗浄培地のp Hは約7.9および約8.1の間である。細胞培養物にキレート剤を含んでなる洗浄培地を添加すると、結果としての洗浄培地中の細胞培養物のp Hが変更される場合がある。よって、ある実施形態では、キレート剤を含んでなる洗浄培地で洗浄される細胞培養のp Hを、細胞培養物に洗浄培地を添加した後に必要に応じて約7.6および約8.4の間に調整する。特定の実施形態では、キレート剤を含んでなる洗浄培地で洗浄される細胞培養のp Hを、細胞培養物に洗浄培地を添加した後に必要に応じて約7.8および約8.2の間に調整する。別の特定の実施形態では、キレート剤を含んでなる洗浄培地で洗浄される細胞培養のp Hを、細胞培養物に洗浄培地を添加した後に必要に応じて約7.9および約8.1の間に調整する。

40

50

## 【0066】

ある実施形態では、細胞培養物を、キレート剤を含んでなる洗浄培地の添加後、および付加的な洗浄工程および／またはプロテアーゼ添加の前に攪拌する(agitated)。培養物の攪拌(agitation)は、限定されるものではないが、攪拌(stirring)、振盪、回転などを含む当技術分野で周知の手段と用いて行うことができる。攪拌の速度および時間は培養物の容量、洗浄培地の成分および細胞培養物中の細胞のタイプによって決定される。ある実施形態では、細胞培養物は、細胞増殖に用いるものと同様の速度で攪拌する。他の実施形態では、細胞培養物は、細胞増殖に用いるものよりも速い速度で攪拌する。より速い攪拌速度を用いる場合には、その速度を約10%～約90%の間、または約20%～約80%の間、または約30%～約70%の間、または約40%～約65%の間に引き上げる。特定の実施形態では、用いる攪拌速度は約40%～約65%の間である。ある実施形態では、細胞培養物を約5分～約60分の間攪拌する。特定の実施形態では、細胞培養物を約20～約40分間攪拌する。

## 【0067】

ある実施形態では、プロテアーゼ（例えば、セリンプロテアーゼ）は、洗浄中、攪拌を行った後に細胞培養物に添加する。特定の実施形態では、細胞を2回以上洗浄し、プロテアーゼを最後の洗浄中、攪拌を行った後に添加する。プロテアーゼは、本発明のある態様では、セリンプロテアーゼまたはシステインプロテアーゼまたはアスパラギンプロテアーゼである。特定の実施形態では、プロテアーゼはセリンプロテアーゼ（例えば、トリプシン、T r y p L Eなど）である。別の実施形態では、米国特許出願第11/455,818号に記載されているストレプトミセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*)由来のプロテアーゼが用いられる。トリプシンは動物供給源からのものであってよく、あるいはより好ましくは組換え供給源からのものである。これらの条件下で解離を行うために添加されるプロテアーゼの量は、それらの細胞がキレート剤で前処理されなかった場合に必要とされるものの少なくとも5倍少ないものであり、培養物の容量およびプロテアーゼの濃度によって決定される。例として、10倍保存液として提供される市販のT r y p L E（商標）E x p r e s sは一般に、M D C K 細胞などの接着性の高い細胞を解離するために約1倍の終濃度で用いられる（例えば、I n v i t r o g e n（商標）T r L E S e l e c t P r o d u c t N e w s参照）。本明細書に示されているように（第8.2節参照）、微小担体から細胞を解離させるのに必要なT r y p L E（商標）の終濃度は、20分の1減の0.05倍である。よって、ある実施形態では、細胞培養物に添加されるプロテアーゼの終濃度は、約0.5倍、または約0.1倍、または約0.09倍、または約0.08倍、または約0.07倍、または約0.06倍、または約0.05倍、または約0.04倍、または約0.02倍（ここで、1倍は、同じ解離条件下、キレート剤で前処理しなかった細胞を解離させるのに必要なプロテアーゼの終濃度を表す）である。

## 【0068】

一実施形態では、M D C K 細胞は培養系で接着細胞として培養する。M D C K 細胞を培養するのに使用可能な培養系としては、例えば、バッチ培養系、および増殖を高細胞密度まで促進するために出発培地から栄養素が消耗されるにつれさらなる栄養素（例えば、炭素源、アミノ酸など）を追加する流加培養系が挙げられる。あるいは、または任意選択で、培地交換および／または消耗された栄養素の補給を助けるために灌流培養系（例えば、遠心分離、濾過、スピンドルフィルターなどの細胞保持系を使用）を使用してもよい。特定の実施形態では、非腫瘍形成性M D C K 細胞は、本発明の無血清培地（例えば、M e d i V S F M 110）を用い、培地交換／補給（例えば、摂食または灌流）を行わずにバッチ培養系で接着細胞として培養される。M D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）の接着細胞としての培養に関するさらなる指針は、例えば、米国特許出願公開第2003/0108860号；同第2005/0118140号；およびP C T国際公開公開第W O 2008/105931号に見出せる。M D C K 細胞の培養に有用な慣用の培養系としては、攪拌容器バイオリアクターが挙げられる。

## 【0069】

10

20

30

40

50

### 6.3.3 インフルエンザウイルス培養条件

本発明は、上記で示されたような無血清培地処方物でM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）および他の動物細胞を培養する方法を提供する。特に、さらなる培養条件も、非腫瘍形成性であること、非発癌性であること、接着細胞として増殖すること、非接着細胞として増殖すること、上皮様形態を有すること、種々のウイルスの複製を助けること、およびインフルエンザウイルス（例えば、低温適応および／または温度感受性および／または弱毒型）の増殖を高力価、例えば、少なくとも約7.8または少なくとも約8.0または少なくとも約9.0の $10g_{10}TCID_{50}/mL$ および／または $10g_{10}FFU/mL$ まで助けることを含むM D C K 細胞の特性の維持に役割を果たし得ると考えられる。これらの培養条件としては、限定されるものではないが、接着表面の選択、細胞密度、温度、CO<sub>2</sub>濃度、培養方法、攪拌速度、溶存酸素含量およびpHが挙げられる。10

#### 【0070】

特に、培養条件はM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）の増殖を至適化するためにいくつかの方法で適合可能であると考えられる。このような適合はまた、例えば、米国特許出願公開第2005/0118698号に記載されているように、ウイルス材料（例えば、ウイルス）の生産にも増大をもたらし得る。あるいは、培養条件は、細胞の増殖に関わらず、M D C K 細胞からのワクチン材料の生産を至適化するよう適合させることができる。これらの培養条件としては、限定されるものではないが、接着表面、細胞密度、温度、CO<sub>2</sub>濃度、培養方法、溶存酸素含量およびpHが挙げられる。20

#### 【0071】

一実施形態では、M D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）は、少なくとも1%、または少なくとも2%、または少なくとも3%、または少なくとも4%、または少なくとも5%、または少なくとも6%、または少なくとも7%、または少なくとも8%、または少なくとも9%、または少なくとも10%、または少なくとも20%のCO<sub>2</sub>濃度で培養する。

#### 【0072】

一実施形態では、溶存酸素（DO）濃度（pO<sub>2</sub>値）は有利にはM D C K の培養中に調節され、5%～100%（空気飽和に基づく）または10%～60%の間の範囲である。特定の実施形態では、溶存酸素（DO）濃度（pO<sub>2</sub>値）は少なくとも10%または少なくとも20%または少なくとも30%または少なくとも50%または少なくとも60%である。特定の実施形態では、DO濃度は50%に維持される。特定の実施形態では、DOは50%に落ちた後、そのレベルで維持される。DOレベルを維持する方法としては、例えば、純粋な酸素の散布が挙げられる。30

#### 【0073】

別の実施形態では、非腫瘍形成性M D C K 細胞の培養に用いる培養培地のpHは培養中に調節され、pH 6.4～pH 8.0の範囲またはpH 6.8～pH 7.4の範囲である。特定の実施形態では、培養培地のpHは約6.4または約6.6または約6.8または約7.0または約7.2または約7.4または約7.6または約7.8または少なくとも8.0である。特定の実施形態では、培養培地のpHは約7.4である。40

#### 【0074】

さらなる実施形態では、M D C K 細胞は本発明の無血清培地中、25～39の温度で培養する。特に、培養温度は所望のプロセスによって異なり得ると考えられる。例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞は細胞増殖のためには37±2で、そしてワクチン材料（例えばウイルス）の生産のためにはより低い温度（例えば、25～35）で増殖させることができる。別の実施形態では、ワクチン材料の生産のために、細胞を30未満または31未満または32未満または33未満または34未満の温度で培養する。別の実施形態では、ワクチン材料の生産のために、細胞を30または31または32または33または34の温度で培養する。特定の実施形態では、ワクチン材料の生産のために、細胞を33±2の温度で培養する。50

## 【0075】

ある実施形態では、M D C K 細胞は攪拌容器バイオリアクター（例えば、プラスチック1回使用、ガラスまたはステンレス鋼再利用バイオリアクター）にて本発明の無血清培地中で培養し、温度、攪拌速度、p H、溶存酸素（D O）、O<sub>2</sub>およびC O<sub>2</sub>流速からなる群から選択される1以上のパラメーターをモニタリングし、かつ／または制御する。一実施形態では、温度は約30～約42の間、または約33～約39の間、または約35～約38の間に維持する。特定の実施形態では、温度は約36～約38の間に維持する。一実施形態では、攪拌速度は約100～200r p mの間に維持する。特定の実施形態では、1回使用バイオリアクターを用い、攪拌速度を約80～約120r p mの間、または約90～約100r p mの間に維持する。別の特定の実施形態では、再利用バイオリアクターを用い、攪拌速度を約150～約200r p mの間、または約160～約180r p mの間に維持する。攪拌速度は当技術分野で周知の手段によって制御する。使用するバイオリアクターのタイプおよび大きさならびに使用する回転翼のタイプおよび数は細胞増殖を最大限とし、かつ／または細胞損傷を最小限とするために攪拌速度を調整するのに必要であり得る。10

## 【0076】

別の実施形態では、M D C K 細胞培養物のp Hは約6.4～p H8.0の間に維持される。特定の実施形態では、出発培養物のp Hは約6.8～約7.6の間であり、培養物のp Hは培養プロセス中、約7.0～約7.5に維持される。最初のp Hは所望の範囲よりも低くても高くてもよく、そのp Hを所望のレベル（例えば、7.4）まで引き上げるか、または引き下げ、それを維持すればよい。特定の実施形態では、p Hは約7.4に維持される。p HはC O<sub>2</sub>を散布することにより、かつ／または必要に応じて酸（例えば、H C l）または塩基（例えば、N a O H、N a H C O<sub>3</sub>、N a<sub>2</sub> C O<sub>3</sub>）を添加することにより制御することができる。20

## 【0077】

さらに別の実施形態では、D Oの許容範囲は約100～約35%の間である。特定の実施形態では、M D C K 細胞培養物のD Oは約35%～約50%または約50%の間に維持される。別の特定の実施形態では、D Oは、約35%未満に落とすべきである。ある実施形態では、最初のD Oは100%であってもよく、D Oは所定のレベル（例えば、50%）まで引き下げ、それを維持する。D Oは例えばO<sub>2</sub>を散布することによって維持される。ある実施形態では、O<sub>2</sub>流速は約2.0L / 分未満に維持する。ある実施形態では、C O<sub>2</sub>流速は約0.4L / 分未満に維持する。さらに他の実施形態では、一定の全流速を維持し（例えば、40m L / 分）、流速を維持するためにN<sub>2</sub>ガスを供給する。よって、N<sub>2</sub>ガスの供給はD Oおよびp Hを維持するために用いられるO<sub>2</sub>ガスとC O<sub>2</sub>ガスから算出することができる。30

## 【0078】

グルコース、グルタミン、乳酸、その他の培地成分の含量、ならびに培地のp Hおよびp O<sub>2</sub>値および攪拌などの他のパラメーターは、非腫瘍形成性M D C K 細胞の培養中に細胞密度および／またはウイルス生産が至適化されるように容易に維持することができる。40

## 【0079】

## 6.3.4 呼吸器合胞体ウイルス培養条件

特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスに感染させる前に、一定の生細胞総数に到達するよう細胞を培養する。例えば、V e r o 細胞は、4m M L - グルタミンおよび1% C D L Cを添加したV P - S F M中、およそ37で培養し、生細胞総数および細胞生存率を測定する。特定の実施形態では、細胞が一定の平均生細胞数に達した際に細胞隨伴性ウイルスに感染させる。細胞をR S Vなど本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスに感染させる前に、例えば、およそ1.5×10<sup>8</sup>細胞／組織培養容器以上の平均生細胞数に到達させることができる。一実施形態では、細胞を本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスに感染させる前に、例えばV i - c e l l カウンターを用いて測定されるように、平均生細胞数およそ1×10<sup>6</sup>細胞／組織培養容器～お50

よそ  $1 \times 10^{1\sim 4}$  細胞 / 細胞培養容器に到達させる。別の実施形態では、細胞を本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスに感染させる前に、例えば V i - セルカウンターを用いて測定されるように、およそ  $1 \times 10^6$  細胞 / 細胞培養容器、およそ  $5 \times 10^6$  細胞 / 紡織培養容器、およそ  $1 \times 10^7$  細胞 / 紡織培養容器またはおよそ  $5 \times 10^7$  細胞 / 紡織培養容器の平均生細胞数に到達させる。別の実施形態では、細胞を本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルスに感染させる前に、例えば V i - セルカウンターを用いて測定されるように、およそ  $1 \times 10^8$  細胞 / 紡織培養容器、およそ  $5 \times 10^8$  細胞 / 紡織培養容器、およそ  $1 \times 10^9$  細胞 / 紡織培養容器、およそ  $5 \times 10^9$  細胞 / 紡織培養容器またはおよそ  $1 \times 10^{10}$  細胞 / 紡織培養容器の平均生細胞数に到達させる。

## 【0080】

10

選択された細胞に最適であると確定された多重感染度 (MOI) を細胞の感染に用いる。特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞を感染させるのに、およそ 0.0001 ~ 様よそ 1、またはおよそ 0.0005 ~ 0.005 の MOI を用いる。別の実施形態では、本明細書に記載されている細胞を感染させるのに、およそ 0.0001、およそ 0.0005 またはおよそ 0.00075 の MOI を用いる。別の実施形態では、本明細書に記載されている細胞を感染させるのに、およそ 0.001、およそ 0.005、およそ 0.0075 またはおよそ 0.01 の MOI を用いる。なお別の実施形態では、本明細書に記載されている細胞を感染させるのに、およそ 0.05、およそ 0.075、およそ 0.1 またはおよそ 0.5 の MOI を用いる。特定の実施形態では、Vero 細胞を感染させるのに、およそ 0.01 の r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 SH の MOI を用いる。

## 【0081】

20

細胞隨伴性ウイルス感染細胞は、選択された細胞系統に適當な培地および条件（例えば、温度、CO<sub>2</sub> 条件および pH）下で一定時間インキュベートすると、至適収量のウイルス力値が得られる。例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 SH などの RSV に感染した Vero 細胞を、4 mM L-グルタミンを添加した S F 4 M e g a V i r 培地 (Invitrogen Corp., Carlsbad CA) でインキュベートし、ウイルスを回収する前におよそ 30 でおよそ 10 日間インキュベートすればよい。いくつかの実施形態では、RSV 感染細胞（例えば、RSV 感染 Vero 細胞）を、ウイルスを回収する前におよそ 7 ~ 14 日間インキュベートする。特定の実施形態では、RSV 感染細胞を、ウイルスを回収する前におよそ 8 日、好ましくは、およそ 9 日、およそ 10 日、およそ 11 日またはおよそ 12 日間インキュベートする。

30

## 【0082】

30

本明細書に記載されている細胞隨伴性ウイルス感染細胞は、当業者に知られている任意の組織培養容器で培養することができる。いくつかの実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞は T - 75 フラスコまたは T - 225 フラスコで培養する。他の実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞は 1 リットル、2 リットル、3 リットル、4 リットルまたは 5 リットル組織培養容器で培養する。特定の実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞は、作業容量 500 ml の回転瓶少なくとも 40 本で培養する。特定の実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞を、回転瓶などの 4 リットルの組織培養容器で培養する。他の実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞を、10 リットル、15 リットル、20 リットルまたは 25 リットルの組織培養容器で培養する。他の実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞を 50 リットル、75 リットルまたは 100 リットルの組織培養容器で培養する。他の実施形態では、細胞隨伴性ウイルス感染細胞を 250 リットル、500 リットルまたは 1000 リットルの組織培養容器で培養する。使用可能な組織培養容器としては、フラスコ、回転瓶、バイオリアクターおよび当業者に知られている他のいずれかの組織培養容器が含まれる。

40

## 【0083】

## 6.4 ワクチン材料の生産

本発明は、細胞培養物中でウイルスを生産するロバストな方法を提供し、ここで、ウイ

50

ルスの生産にはM D C K 細胞（例えば、非腫瘍形成性M D C K 細胞）が用いられる。特に、本発明は、培地交換または補給を行わずに、インフルエンザウイルスを高力価まで生産する方法を提供する。

#### 【0084】

一実施形態において、インフルエンザウイルスを生産する方法は、以下の工程：

(a) M D C K 細胞を無血清培養培地中で、約100および200 rpmの間の攪拌速度、約6.0～約7.8の間のpH、約33および約42の間の温度、および約35%～約100%の間の溶存酸素(DO)からなる群から選択される1以上の培養条件を維持しながら増殖させる工程；

(b) 増殖させたM D C K 細胞を、培養培地を交換することなくインフルエンザウイルスに感染させる工程；および

(c) 感染させた増殖M D C K 細胞をインフルエンザウイルスの複製を可能とする条件下でインキュベートする工程  
を含んでなる。

#### 【0085】

本発明の方法により生産され得るインフルエンザウイルスは本明細書に記載されており（例えば、第7.2節および6.7節参照）、限定されるものではないが、弱毒、温度感受性、低温適応型(c a / t s / a t t)マストードナーウィルスに関して、選択された血球凝集素および/またはノイラミダーゼ抗原を組み込んだ合併結合ウイルスが挙げられる。例えば、ウイルスは、例えば、温度感受性(t s)、低温適応(c a)、または弱毒型(a t t)（例えば、A / Ann Arbor / 6 / 60、B / Ann Arbor / 1 / 66、PR8、B / レニングラード / 14 / 17 / 55、B / 14 / 5 / 1、B / USSR / 60 / 69、B / レニングラード / 179 / 86、B / レニングラード / 14 / 55、B / イングランド / 2608 / 76など）の1以上であるマストードナーウィルスの骨格（または1以上のv R N Aセグメント）を含んでなる。卵または細胞系統のいずれかで合併結合インフルエンザワクチン株を生産する方法としては、例えば、Kilbourne, E.D. in Vaccines (第2版), Plotkin and Mortimer編, WB Saunders Co. (1988)に開示されているものならびにPCT出願PCT特許公報WO05/062820およびWO03/091401、および米国特許第6,951,754号、同第6,887,699号、同第6,649,372号、同第6,544,785号、同第6,001,634号、同第5,854,037号、同第5,824,536号、同第5,840,520号、同第5,820,871号、同第5,786,199号および同第5,166,057号および米国特許出願公開第20060019350号、同第20050158342号、同第20050037487号、同第20050266026号、同第20050186563号、同第20050221489号、同第20050032043号、同第20040142003号、同第20030035814号および同第20020164770号に開示されているものが挙げられる。本発明の方法により生産可能な他のインフルエンザウイルスとしては、異種遺伝子産物を発現し得る組換えインフルエンザウイルスが挙げられる（例えば、米国特許公開第2004/0241139号および同第2004/0253273号参照）。ある実施形態では、この方法は低温適応および/または温度感受性および/または弱毒型インフルエンザウイルスを生産するために用いられる。

#### 【0086】

特定の実施形態では、インフルエンザウイルスは、少なくとも約8.0のピークウイルス力価 $10^g_{10} T C I D_{50} / mL$ および/または $10^g_{10} F F U / mL$ まで生産される。他の実施形態では、インフルエンザウイルスは、少なくとも約8.1、または少なくとも8.2、または少なくとも8.3、または少なくとも8.4、または少なくとも8.5、または少なくとも8.6、または少なくとも8.7、または少なくとも8.8、または少なくとも8.9、または少なくとも9.0のピークウイルス力価 $10^g_{10} T C I D_{50} / mL$ および/または $10^g_{10} F F U / mL$ まで生産される。

#### 【0087】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、M D C K 細胞は接着細胞として増殖される。特定の実施形態では、M D C K 細胞は非腫瘍形成性M D C K 細胞であり、接着細胞として増殖される。別の特定の実施形態では、M D C K 細胞はA T C C 寄託番号 P T A - 6 5 0 0 、 P T A - 6 5 0 1 、 P T A - 6 5 0 2 、 P T A - 6 5 0 3 、 P T A - 7 9 0 9 および P T A - 7 9 1 0 からなる群から選択され、接着細胞として増殖される。接着細胞の増殖に有用なバイオリアクターおよび方法は前記に記載されている（第0節および0節参照）。他の実施形態では、M D C K 細胞は非接着細胞として増殖される。非接着M D C K 細胞を増殖させる方法は当技術分野で公知である（例えば、米国特許第6,455,298号参照）。例えば、温度、攪拌速度、p H、p O<sub>2</sub>、C O<sub>2</sub>濃度および細胞播種密度などのさらなる培養条件は前記に詳説されている（第0節および0節参照）。

10

#### 【0088】

特定の実施形態では、M D C K 細胞は、攪拌容器バイオリアクターにて接着細胞として増殖される。この方法のある実施形態では、細胞を培養するための温度、攪拌速度、p H、p O<sub>2</sub> 値、C O<sub>2</sub> 濃度および培養培地の他のパラメーターは培養中に前記のように（第0節および0節参照）調節される。ある実施形態では、M D C K 細胞は5 × 1 0<sup>5</sup> ~ 約3 × 1 0<sup>6</sup> の間の細胞密度まで増殖される。あるいは、または所望により、M D C K 細胞は、設定された時間増殖される。最初の播種密度、倍加時間および所望の最終細胞密度は増殖時間を決定する。このような実施形態では、細胞は、例えば、1 ~ 1 0 日間、または2 ~ 8 日間、または3 ~ 7 日間増殖させることができる。いくつかの実施形態では、M D C K 細胞は約3 ~ 約5日間増殖される。

20

#### 【0089】

ある実施形態では、無血清培地は本明細書に記載されているような富化無血清培地である（第0節参照）。一実施形態では、無血清培地は植物加水分解物、脂質補給物、微量元素を含んでなり、プロレッシン、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸およびヌクレオシドからなる群から選択される1以上の培地成分で強化される。別の実施形態では、無血清培地は表2に挙げられているM e d i V S F M 1 1 0 培地の全成分を含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は表2に挙げられているM e d i V S F M 1 1 0 培地の全成分から本質的になる。別の特定の実施形態では、無血清培地は、示されている終濃度で表2に挙げられている成分からなる。ある実施形態では、無血清培地は終濃度約4.5 g / L のグルコースを含んでなる。他の実施形態では、無血清培地は終濃度約9.0 g / L のグルコースを含んでなる。

30

#### 【0090】

細胞を感染させるのに使用可能なインフルエンザウイルス（工程（b））としては、限定されるものではないが、本明細書に記載されているものが挙げられる（例えば、第7.2節およびエラー！参照元が見つかりません。参照）。細胞を感染させるために添加するウイルスの量（本明細書では「ウイルス投入量」と呼ばれる）は、細胞当たりに添加されるウイルスの数（一般に、多重感染度またはMOIとも呼ばれる）として計ることができる。いくつかの実施形態では、細胞のウイルス感染は、約0.00001 F F U / 細胞 ~ 約10 F F U / 細胞または約0.00001 F F U / 細胞 ~ 約1 F F U / 細胞または約0.00001 F F U / 細胞 ~ 約0.1 F F U / 細胞または約0.00001 F F U / 細胞 ~ 約0.001 F F U / 細胞のウイルス投入量を用いて行う。一実施形態では、細胞のウイルス感染は、約0.00001 F F U / 細胞 ~ 約0.0001 F F U / 細胞または約0.00002 F F U / 細胞 ~ 約0.0002 F F U / 細胞のウイルス投入量を用いて行う。特定の実施形態では、細胞のウイルス感染は0.00001 F F U / 細胞 ~ 0.00005 F F U / 細胞の間のウイルス投入量を用いて行う。別の特定の実施形態では、細胞のウイルス感染は、0.0001 F F U / 細胞 ~ 0.0005 F F U / 細胞の間のウイルス投入量を用いて行う。下式を用いてウイルスの添加量を求めることができる。

40

#### 【0091】

ウイルス量 (μL) = 全細胞 × ウィルス投入量 (F F U / 細胞) / 10<sup>Virus FFA Titer</sup>  
(F F U / m L) × 1 0 0 0

50

あるいは、細胞の感染に用いるウイルス量（すなわち、ウイルス投入量）は、培養物中のウイルスの終濃度により決定される。例えば、ウイルスは約  $1 \times 10^3$  F F U / mL ~ 約  $0.001 \times 10^3$  F F U / mL または約  $0.1 \times 10^3$  F F U / mL ~ 約  $0.01 \times 10^3$  F F U / mL の終濃度で添加することができる。下式を用いて、所望の終濃度を達成するために添加するウイルスの量を求めることができる。

#### 【0092】

$$\text{ウイルス量} (\mu\text{L}) = \text{培養容量} (\text{mL}) \times \text{終濃度} (\text{FFU/mL}) / 10^{\text{Virus FFA Tite}} \\ [(\text{FFU/mL}) \times 1000]$$

所望により、血球凝集素の前駆体タンパク質 [ H A<sub>0</sub> ] の切断、従って細胞へのウイルスの吸着を行うプロテアーゼを加えることもできる。プロテアーゼの添加は本発明に従い、細胞のインフルエンザウイルス感染のすぐ前、同時またはすぐ後に行うことができる。  
添加を感染と同時に進行の場合には、プロテアーゼは感染させる細胞培養物に直接加えることができるか、またはウイルス接種物とともに濃縮物として加えることができる。プロテアーゼは、本発明のある態様では、セリンプロテアーゼまたはシステインプロテアーゼまたはアスパラギンプロテアーゼである。一実施形態では、トリプシンを用いる。特定の実施形態では、T P C K 処理トリプシンを用いる。一実施形態では、トリプシンは細胞培養物に 1 ~ 5 0 0 0 mU / mL または 5 ~ 1 0 0 0 mU / mL または 1 0 0 ~ 5 0 0 mU / mL の終濃度まで加える。別の実施形態では、トリプシンは細胞培養物に培養培地中、1 ~ 2 0 0 μg / mL または 5 ~ 5 0 μg / mL または 5 ~ 3 0 μg / mL の終濃度まで加える。

10

20

#### 【0093】

プロテアーゼは動物供給源に由来してもよく、またはより好ましくは、組換え供給源に由来する。使用に好適な組換えプロテアーゼは、例えば Invitrogen ( TrypLE (商標) ) および Sigma - Aldrich ( TrypZean (商標) ) を含むいくつかの商業ソースから保存溶液（例えば 1 X - 1 0 0 X ）として容易に得られる。ある実施形態では、組換えプロテアーゼは約 0.01 倍 ~ 約 1 倍の間、または約 0.02 倍 ~ 約 0.8 倍の間、または約 0.03 倍 ~ 約 0.7 倍の間、または約 0.04 倍 ~ 約 0.6 倍の間、または約 0.05 倍 ~ 約 0.5 倍の間、または約 0.06 倍 ~ 約 0.4 倍の間、または約 0.07 倍 ~ 約 0.3 倍の間、または約 0.08 倍 ~ および約 0.2 倍の間の終濃度で用いる。特定の実施形態では、組換えプロテアーゼは約 0.02 倍 ~ 約 0.06 倍の間の終濃度で用いる。別の実施形態では、プロテアーゼは、限定されるものではないが、TrypLE (商標) ( Invitrogen ) を含む組換えトリプシン様プロテアーゼである。さらに別の実施形態では、プロテアーゼは、米国特許出願第 1 1 / 4 5 5 , 8 1 8 号に記載されているようなストレプトミセス・グリセウス (Streptomyces griseus) 由来のものである。

30

#### 【0094】

感染後、感染細胞培養物は、特に、最大細胞変性効果または最大量のウイルスまたは抗原が検出できるまで、さらに培養してウイルスを複製させる。一実施形態では、感染後、細胞を 3 0 ~ 3 7 の間の温度で培養する。ある実施形態では、ウイルス感染後、細胞を 3 9 未満または 3 8 未満または 3 7 未満または 3 6 未満または 3 5 未満または 3 4 未満または 3 3 未満または 3 2 未満または 3 1 未満または 3 0 未満の温度で培養する。感染細胞を 3 3 未満の温度、特に、示された温度範囲で培養すると、例えば B 株（例えば、米国特許公開 2 0 0 6 / 0 1 5 3 8 7 2 参照）などのある特定のインフルエンザウイルスのより高い収量生産がもたらされる。さらに、温度感受性、低温適応型 ( t s / c a ) インフルエンザウイルスの生産のためには、感染細胞を 3 5 未満の温度で培養することが意図される。 t s / c a ウィルスは弱毒 ( a t t ) でもあり得ると考えられる。別の実施形態では、 t s / c a インフルエンザ株の生産のために、細胞を 3 0 未満または 3 1 未満または 3 2 未満または 3 3 未満または 3 4 未満の温度で培養する。特定の実施形態では、インフルエンザウイルス B 株の生産のために、細胞を 3 1 の温度で培養する。さらに別の実施形態では、感染後、細胞を 3 1 ± 2 の温度で培養す

40

50

る。

#### 【0095】

ある実施形態では、細胞のインキュベーション（工程（c））は、感染後2～10日または所望により3～7日など、好適なウイルス収量を生産するのに十分な期間行う。この方法の一実施形態では、細胞のインキュベーション（工程（c））は、感染後2日間または3日間または4日間または5日間または6日間または7日間行う。他の実施形態では、細胞のインキュベーション（工程（c））は感染後40～96時間行う。特定の実施形態では、細胞のインキュベーション（工程（c））は感染後約48～約72時間行う。

#### 【0096】

この方法のある実施形態では、ウイルス感染（工程（b））後、細胞を例えば攪拌速度、pH、pO<sub>2</sub>値、CO<sub>2</sub>濃度および他のパラメーターが前記（第0節および0節）のように維持されるようにインキュベートする。

#### 【0097】

ある実施形態では、この方法は工程（c）の後に、複製ウイルス含有培養培地（すなわち、感染細胞が増殖された培養培地）を回収する工程をさらに含んでなる。この回収された複製ウイルス含有培養培地はまた本明細書において「ウイルス回収物」とも呼ばれる。

#### 【0098】

一実施形態では、M D C K 細胞の増殖に用いた微小担体は、複製ウイルス含有培養培地を回収する前に沈降させる。所望により、またはあるいは、複製ウイルス含有培養培地は交互低剪断型タンジェントフロー（A T F）デバイス（例えば米国特許第6,544,424号参照）を用いて回収することができる。A T F デバイスを用いることで、回収前に微小担体を沈降させるのに必要な時間を短縮されるか、またはさらには無くなる。別の実施形態では、ウイルス回収物は好適なバッファーで安定化させる。

#### 【0099】

特定の実施形態では、ウイルス回収物は、限定されるものではないが、スクロースリン酸（S P）バッファー（安定化されるウイルス回収物中、約218 mMスクロース、11 mMリン酸バッファー pH 7.0～7.4の終濃度が得られるように加えればよい）を含む濃バッファーを加えることによって安定化させる。

#### 【0100】

別の特定の実施形態では、複製ウイルス含有培養培地を回収する工程を複製ウイルスの精製と組み合わせる。例えば、交互タンジェントフロー（A T F）を用いて複製ウイルス含有培養培地を回収してもよく、回収された材料に対して直接、以下に詳説される1以上の精製工程を行ってもよい。

#### 【0101】

##### 6.5 ワクチン材料の精製

本発明は、ウイルス、特に、細胞培養で複製された臨床用の生ウイルスの精製のためのロバストな方法を提供する。本発明の精製方法は、限定されるものではないが、ヒト二倍体肺纖維芽細胞系統（例えば、M R C - 5 およびW I - 3 8）、ヒト網膜芽細胞腫細胞系統、ヒト腎臓細胞系統（例えば、P E R . C 6 および2 9 3）、アカゲザル胎児肺細胞系統（例えば、F R h L 2）、アフリカミドリザル腎臓細胞系統（例えば、V e r o）およびイヌ腎臓細胞系統（例えば、M D C K）を含む哺乳類細胞の培養物からウイルスを精製するために使用可能である。本発明の精製方法はウイルス、特に、生ウイルスの高い総回収率を与える、規制機関により要求される明細を下回る宿主細胞D N A（H C D）、宿主細胞タンパク質（H C P）および非特異的エンドヌクレアーゼ（例えば、ベンゾナーゼ）レベルが得られる。

#### 【0102】

ウイルス調製物からH C D量を低減することは、動物（ヒトを含む）における臨床使用が意図されるウイルスには特に重要である。さらに、発癌の可能性を軽減するためには、残留H C Dのサイズは癌遺伝子の平均サイズ（1,925塩基対）よりも小さくなければならないと考えられる。よって、一態様において本発明は、残留H C Dの量およびサイズ

10

20

30

40

50

を注射用ワクチンに許容されるレベル（WHOの推奨は非経口投与ワクチンでは1用量当たり10ngである；Griffiths, 1999, Dev Biol Stand. Basel, Karger, vol 98, pp 153-157）を下回るレベルにまで低減するインフルエンザウイルスまたはRSVの精製方法を提供する。一様において、吸入ウイルスを精製するための本発明方法は、残留HCDの量およびサイズを1用量当たり150ng下回るレベルにまで低減する。

#### 【0103】

ある実施形態では、含まれる精製ウイルスは、約10ngHCD／用量未満、または約9ngHCD／用量未満、または約8ngHCD／用量未満、または約7ngHCD／用量未満、または約6ngHCD／用量未満、または約5ngHCD／用量未満、または約4ngHCD／用量未満、または約3ngHCD／用量未満、または約2ngHCD／用量未満、または約1ngHCD／用量未満、または約0.8ngHCD／用量未満、または約0.6ngHCD／用量未満、または約0.4ngHCD／用量未満、または約0.2ngHCD／用量未満を含んでなる。<sup>10</sup> 特定の実施形態では、精製ウイルスは、約1ngHCD／用量未満、または約0.8ngHCD／用量未満、または約0.6ngHCD／用量未満、または約0.4ngHCD／用量未満、または約0.2ngHCD／用量未満を含んでなる。

#### 【0104】

ある実施形態では、精製ウイルスは、約200ngHCD／用量未満、または約190ngHCD／用量未満、または約180ngHCD／用量未満、または約170ngHCD／用量未満、または約160ngHCD／用量未満、または約150ngHCD／用量未満、または約140ngHCD／用量未満、または約130ngHCD／用量未満、または約120ngHCD／用量未満、または約110ngHCD／用量未満、または約100ngHCD／用量未満、または約90ngHCD／用量未満、または約80ngHCD／用量未満、または約70ngHCD／用量未満を含んでなる。<sup>20</sup> 特定の実施形態では、精製ウイルスは、約120ngHCD／用量未満、または約105ngHCD／用量未満、または約100ngHCD／用量未満、または約90ngHCD／用量未満、または約75ngHCD／用量未満を含んでなる。

#### 【0105】

他の実施形態では、含まれる精製ウイルスはインフルエンザウイルスであり、約10ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約9ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約8ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約7ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約6ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約5ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約4ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約3ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約2ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約1ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.8ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.6ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.4ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.2ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満を含んでなる。<sup>30</sup> 特定の実施形態では、精製ウイルスは約1ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.8ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.6ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.4ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満、または約0.2ngHCD／ $7.0 \pm 0.5 \log_{10}$ FFU未満を含んでなる。<sup>40</sup>

#### 【0106】

一実施形態では、HCDの量はPicogreenアッセイを用いて測定する。別の実施形態では、HCDの量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(rtPCR)を用いて測定する。これらのアッセイは第8.3節に示される実施例に例示されている方法を用いて行えればよい。

#### 【0107】

50

ある実施形態では、精製ウイルス中に存在するHCDの少なくとも約50%または少なくとも約60%または少なくとも約70%または少なくとも約80%が約1000塩基対(bp)未満の長さである。特定の実施形態では、精製ウイルス中に存在する少なくとも約80%のHCDが約1000bp未満の長さである。別の特定の実施形態では、精製ウイルス中に存在する約90%のHCDが約1000bp未満の長さである。他の実施形態では、精製ウイルス中に存在するHCDの少なくとも約40%または少なくとも約50%または少なくとも約60%または少なくとも約70%または少なくとも約80%が約500bp未満の長さである。特定の実施形態では、精製ウイルス中に存在するHCDの少なくとも約60%が約500bp未満の長さである。

## 【0108】

10

いくつかの実施形態では、精製ウイルスは、約100μg HCP / 用量未満、または約90μg HCP / 用量未満、または約80μg HCP / 用量未満、または約70μg HCP / 用量未満、または約60μg HCP / 用量未満、または約50μg HCP / 用量未満、または約40μg HCP / 用量未満、または約30μg HCP / 用量未満、または約20μg HCP / 用量未満、または約10μg HCP / 用量未満、または約9μg HCP / 用量未満、または約8μg HCP / 用量未満、または約7μg HCP / 用量未満、または約6μg HCP / 用量未満、または約5μg HCP / 用量未満、または約4μg HCP / 用量未満、または約3μg HCP / 用量未満、または約2μg HCP / 用量未満、または約1μg HCP / 用量未満、または約0.8μg HCP / 用量未満、または約0.6μg HCP / 用量未満、または約0.4μg HCP / 用量未満、または約0.2μg HCP / 用量未満を含んでなる。特定の実施形態では、精製ウイルスは、約1ng HCP / 用量未満、または約0.8μg HCP / 用量未満、または約0.6μg HCP / 用量未満、または約0.4μg HCP / 用量未満、または約0.2μg HCP / 用量未満を含んでなる。

## 【0109】

20

他の実施形態では、精製ウイルスはインフルエンザウイルスであり、約10μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約9μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約8μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約7μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約6μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約5μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約4μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約3μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約2μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約1μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.8μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.6μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.4μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.2μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満を含んでなる。特定の実施形態では、精製ウイルスは約1ng HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.8μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.6μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.4μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満、または約0.2μg HCP / 7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU未満を含んでなる。

30

## 【0110】

40

一実施形態では、HCPの量は、検出のためのHCPに対する抗体を用い、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により測定する。このアッセイは第8.3節に示される実施例に例示されている方法を用いて行えばよい。

## 【0111】

ワクチン組成物用の不活性/非統合型ウイルス粒子の調製方法は当業者に周知であり、40年以上用いられている。しかしながら、これらの方法には洗剤またはホルムアルデヒドによる処理などの過酷な工程が組み込まれており、完全なウイルス粒子、特に生きている弱毒ウイルスの調製には一般に使用できない。よって、本発明は、ウイルス回収物からHCDおよびHCPを十分分離する膜および条件を用いて完全な生ウイルス(例えば、イ

50

ンフルエンザウイルスまたはRSV)を精製する方法を提供する。本発明の方法は生ウイルスの高い総回収率を与える。一実施形態では、精製ウイルスの総回収率は少なくとも3%、または少なくとも5%、または少なくとも10%または少なくとも15%または少なくとも20%または少なくとも25%または少なくとも30%または少なくとも40%または少なくとも50%または少なくとも60%または少なくとも70%である。精製生ウイルスの回収率をモニタリングする方法としては、ウイルス感染および/または増殖を測定すべく設計されたアッセイが含まれる。精製生インフルエンザウイルスの回収率をモニタリングするために、例えば、フォーカル蛍光アッセイおよび50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)アッセイを使用することができる。ある実施形態では、本発明のウイルス精製方法は少なくとも30%の総ウイルス回収率を与え、精製ウイルスは、ウイルス7.0±0.510g<sub>10</sub>FFU当たり0.1ng未満のHCD、0.3μg未満のHCPおよび0.0050ng未満の非特異的ヌクレアーゼを含んでなる。  
10

#### 【0112】

ウイルス回収物の精製には複数の工程が含まれ、ウイルスおよび精製条件に応じて至適化することができる。ある実施形態では、精製プロセスは、a)ウイルス回収物の清澄化；b)濃縮および/またはバッファー交換；c)クロマトグラフィーによる精製、およびd)無菌濾過のいずれかを単独でまたは組み合わせて含んでなり得る。これらの工程は非特異的エンドヌクレアーゼによる処理およびウイルス回収率またはウイルス量の安定化などのさらなる工程を含んでなってもよい。これらの工程は精製プロセスにおいて複数回、上記のようにHCPおよびHCDを十分除去しつつウイルス回収率を最大にする順序で行うことができる。  
20

#### 【0113】

ウイルス回収物の清澄化に有用な方法としては、限定されるものではないが、遠心分離、透析および膜濾過(限定されるものではないが、シングルパス、デッドエンド、濾過媒体に直接液体が流れるダイレクトフロー濾過(DFF)、および膜表面の接線に(沿って)液体が流れるクロスフローまたはタンジェントフロー濾過(TFF)などの方法が含まれる)が挙げられる。TFF系は、一定の濾液流速(しばしば単に「フラックス」と呼ばれ、時間当たりの、膜1平方メートル当たりの透過液のリットル(LMH)として測定することができる)を維持するよう、または一定の膜間差圧('TMP'と略され、1平方インチ当たりのポンド(psi)として測定することができる)を維持するようを行うことができる。しかしながら、膜の汚損を防ぐためには、一定のフラックスおよびTMPのいずれかを調節すればよい。濾過適用に用いる膜は商業ソースから入手可能である。  
30

#### 【0114】

当技術分野では、担体液から除去する材料のサイズによって定義される膜のカテゴリーとして4つのものが一般に認知されている。それらには最小孔径から最大孔径まで、逆浸透圧膜、ナノフィルトレーション膜、限外濾過膜および精密濾過膜がある。上述の膜による濾過は、特定の孔径を有する膜を用いることで分子をそれらの分子量に従って分離する。例えば、0.001マイクロメートル未満の孔径を有する逆浸透圧膜を用いた分離は、200ダルトン未満の分子量を有する分子を分離するために意図される。0.001~0.008マイクロメートルの孔径を有するナノフィルトレーション膜を用いた濾過は、200ダルトン~15キロダルトン(kDa)(含む)の分子量を有する分子を分離するために意図される。0.005~0.1マイクロメートル(含む)の孔径を有する限外濾過膜を用いた濾過は、5kDa~300kDa(含む)の分子量を有する分子を分離するために意図される。0.05~3.0マイクロメートル(含む)の孔径を有する精密濾過膜を用いた濾過は、100kDa~3000kDa、またそれを超える分子量を有する分子を分離するために意図される。よって、膜濾過は、膜の孔径により決定される特定の分子量カットオフ(MWCO)を有する膜を使用することによるサイズ排除に基づいて目的の分子(例えばウイルス)を他の細胞成分から分離することができる。MWCO(公称分子量限界(NMWL)または公称分子量カットオフ(NMWCO)とも呼ばれる)は、膜による濾過に関するキロダルトンサイズ表示である。MWCOは膜によって90%保持され  
40  
50

る分子の分子量として定義される。例えば、同じ分子量の分子でも形状が著しく異なる場合があるので、M W C O は厳密な尺度ではないが、やはり有用な尺度であり、フィルター生産業者によって一般に用いられている。膜はフラットシートとして用いてもよいし、またはらせん状に巻いた形で用いてもよい。また、濾過方法のタイプに応じて中空纖維を用いてもよい。限定されるものではないが、再生セルロース、ポリエーテルスルホン（その固有の疎水性を変えるために修飾されていてもされてもよい）、フッ化ポリビニリデン（P V D F）およびセラミックと金属酸化物の凝集物、ならびにポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレンおよびP T F E（テフロン（登録商標））を含む、可能性のあるいくつの膜材料を用いてもよい。分離において濾過方法と膜のタイプの組合せを用いてもよく、分離膜を含んでなるフィルター、カラムなどの能力は処理する材料の容量および／または濃度に応じて調整されると考えられる。10

#### 【 0 1 1 5 】

濃縮および／またはバッファー交換に有用な方法としては、限定されるものではないが、透析、限外濾過（U F）およびダイアフィルトレーション（D F）が挙げられる。T F Fには、濃縮に使用可能なU Fとバッファー交換に使用可能なD Fの双方を組み込むことができる。さらに、U Fおよび／またはD Fを使用することで、膜を通して、夾雑物であり得るより小さな分子を洗浄し、保持液中により大きな目的分子を残す分画プロセスによるさらなる精製が得られる。よって、U Fおよび／またはD Fを組み込んだT F Fは、濃縮および／またはバッファー交換および／または精製に使用可能である。濾過適用に用いる膜の選択は上記されている。本発明によれば、D Fは不連続または連続D Fのいずれであってもよい。不連続D Fでは、溶液が濃縮され、失われた容量が新しいバッファーに置き換わる。連続D Fでは、古いバッファー溶液が除去されるとともに新しいバッファー溶液が流入することで溶液量が維持される。20

#### 【 0 1 1 6 】

ある実施形態では、清澄化されたウイルスは約2倍または約3倍または約4倍または約5倍または約6倍または約7倍または約8倍または約9倍または約10倍またはそれを超えて濃縮される（ここで、「倍」は操作に加えられた総出発容量／最終保持液容量に相当する）。特定の実施形態では、清澄化されたウイルスは約3倍～約5倍の間に濃縮される。別の特定の実施形態では、清澄化されたウイルスは約4倍に濃縮される（ここで、「倍」は操作に加えられた総出発容量／最終保持液容量に相当する）。ある実施形態では、清澄化されたウイルスは、その後の全ての精製工程の付加量を増すために約10倍以上濃縮される。ある実施形態では、濃縮後に約1ダイアボリュームまたは約2ダイアボリュームまたは約3ダイアボリュームまたは約4ダイアボリュームまたは約5ダイアボリュームまたは約6ダイアボリュームまたは約7ダイアボリュームまたは約8ダイアボリュームまたは約9ダイアボリュームまたは約10ダイアボリュームまたはそれを超えるダイアボリュームのバッファーがD Fにより交換される（ここで、ダイアボリュームは、D F中に操作に導入された総バッファー容量／保持液容量である）。特定の実施形態では、約4ダイアボリューム～約6ダイアボリュームの間のバッファーが交換される（ここで、ダイアボリュームは、D F中に操作に導入された総バッファー容量／保持液容量である）。別の特定の実施形態では、約5ダイアボリュームのバッファーが交換される（ここで、ダイアボリュームは、D F中に操作に導入された総バッファー容量／保持液容量である）。3040

#### 【 0 1 1 7 】

ある実施形態では、ウイルス（例えば、インフルエンザ、R S V）を含んでなる保持液は、所望の容量のバッファーが交換された後に収集される。保持液の収集後、いくらかのウイルスが膜に弱く結合したままとなる場合がある。よって、いくつかの実施形態では、収集された保持液にさらなる交換バッファーを加えて膜をすぐ。収集された保持液はまた、本発明において「馴化ウイルス負荷(conditioned viral load)」または「# X U F # X D F」（ここで、「#」は、それぞれU FプロセスおよびD Fプロセスに関する濃縮倍率または交換されたバッファーのダイアボリューム数を示す）とも呼ばれる。特定の実施形態では、5 0 0 k D a のM W C O を有する膜を濃縮およびバッファー交換に用いる。50

くつかの実施形態では、プロセスの後に膜を洗浄して再利用することができる。他の実施形態では、清澄化ウイルスのバッチごとに新しい膜を用いる。別の特定の実施形態では、清澄化された回収物を、第8.3節および8.4節に示される実施例に例示されているように濃縮およびバッファー交換する。

#### 【0118】

ウイルス（例えば、インフルエンザまたはRSV）の精製に有用なクロマトグラフィーのタイプとしては、限定されるものではないが、アフィニティークロマトグラフィーならびにイオン交換クロマトグラフィーおよび／またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが挙げられる。ある実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーを用いる。一実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いる。別の実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーを高pHで行う。一実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いる。特定の実施形態では、強力な第四級アンモニウム（Q）陰イオン交換体を用いる（例えば、Capt o（商標）Q、GE Health care）。別の実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーを低pHで行う。イオン交換クロマトグラフィーに有用な陰イオン媒体としては、限定されるものではないが、陰イオン膜吸収体（例えば、Sartobind（登録商標）Q15、D15）および陽イオン膜吸収体（例えば、Sartobind（登録商標）S15およびC15）が挙げられる。別の実施形態では、不純物が陰イオンまたは陽イオン交換により結合され、その後、ウイルスが宿主細胞タンパク質および／または核酸などの不純物から分離または精製されるネガティブクロマトグラフィーを用いる。クロマトグラフィーはバッチプロセスで行うこともできるし、あるいはカラムプロセスを用いて行うこともできると考えられる。ある実施形態では、馴化ウイルス負荷はカラムクロマトグラフィーにより精製される。

10

20

#### 【0119】

夾雜HCDの効率的除去に有用な方法は、精製プロセスの他の工程とともに、非特異的エンドヌクレアーゼ（例えば、ベンゾナーゼ（登録商標））による処理を含む。しかしながら、動物（ヒトを含む）における臨床使用を意図するウイルスでは、最終精製ウイルス中の非特異的エンドヌクレアーゼの量が最小であることが望ましい。よって、別の態様において、本発明は、本方法で用いられる残留非特異的エンドヌクレアーゼの量を注射用ワクチンに許容されるレベルを下回るレベルに低減するウイルス精製方法を提供する。

#### 【0120】

30

一実施形態では、精製ウイルスは、1用量当たり約0.0060ng未満、または約0.0055ng未満、または約0.0050ng未満、または約0.0045ng未満、または約0.0040ng未満、または約0.0035ng未満、または約0.0030ng未満、または約0.0025ng未満、または約0.0020ng未満、または約0.0015ng未満、または約0.0010ng未満の非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなる。特定の実施形態では、精製ウイルスは、1用量当たり約0.0040ng未満、または約0.0035ng未満、または約0.0030ng未満、または約0.0025ng未満の非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなる。

#### 【0121】

40

他の実施形態では、精製ウイルスはインフルエンザウイルスまたはRSVであり、7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU当たり約0.0060ng未満、または約0.0055ng未満、または約0.0050ng未満、または約0.0045ng未満、または約0.0040ng未満、または約0.0035ng未満、または約0.0030ng未満、または約0.0025ng未満、または約0.0020ng未満、または約0.0015ng未満、または約0.0010ng未満の非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなる。特定の実施形態では、精製ウイルスはインフルエンザウイルスまたはRSVであり、7.0±0.5log<sub>10</sub>FFU当たり約0.0040ng未満、または約0.0035ng未満、または約0.0030ng未満、または約0.0025ng未満の非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなる。別の特定の実施形態では、精製ウイルスはRSVであり、5.0±0.5log<sub>10</sub>FFU当たり約0.009ng未満、または約0.01ng未満、ま

50

たは検出レベルを下回るレベル(ELISAにて0.1 ng/mL)の非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなる。さらに別の特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼはベンゾナーゼ(登録商標)である。

#### 【0122】

無菌性は、動物(ヒトを含む)における臨床使用を意図するウイルスおよび/またはウイルス成分では特に重要である。よって、本発明のウイルス(例えば、インフルエンザまたはRSV)精製方法には、最終濾過工程として行うことができる(例えば、RSV)、または既知の除菌を用いた(例えば、インフルエンザウイルス)、除菌が組み込まれている。ワクチン成分(例えばウイルス、送達デバイスなど)の除菌に有用な方法としては、限定されるものではないが、照射、濾過、化学処理および他の好適な手順が含まれる。一実施形態では、処方されたウイルスバルクは濾過により除菌される。除菌に有用な濾過方法としては、限定されるものではないが、上記されているシングルパス、デッドエンド、ダイレクトフロー濾過(DFF)およびタンジェントフロー濾過(TFF)が挙げられる。しかしながら、RSVは脆弱であるため、このウイルスは除菌グレードのフィルターを用いて除菌することができない。10

#### 【0123】

本明細書では、ワクチン処方物用のHインフルエンザウイルスおよびRSVを精製するための特定の方法を提供する。

#### 【0124】

##### 6.5.1 インフルエンザウイルスの精製

ある実施形態では、精製されるウイルスはインフルエンザウイルス(例えば、低温適応および/または温度感受性および/または弱毒型)である。20

#### 【0125】

一実施形態において、細胞培養物からウイルスを精製する方法は以下の工程:

- (a) ウイルス回収物の清澄化;
- (b) 工程(a)後の濃度および/またはバッファー交換;
- (c) 工程(b)後のクロマトグラフィーによる精製;
- (d) 工程(c)後の濃縮および/またはバッファー交換;
- (e) 工程(d)後の除菌

を含んでなる。30

#### 【0126】

一実施形態では、ウイルスはインフルエンザウイルスである。特定の実施形態では、インフルエンザウイルスは低温適応および/または温度感受性および/または弱毒型インフルエンザウイルスである。

#### 【0127】

特定の実施形態では、工程(a)、(b)、(d)および(e)は膜濾過により行う。別の特定の実施形態では、工程(b)および(d)はタンジェントフロー濾過により行う。さらに別の特定の実施形態では、工程(a)および(e)はダイレクトフロー濾過により行う。さらに別の特定の実施形態では、工程(b)は限外濾過による濃縮およびダイアフィルトレーションによるバッファー交換の双方を含む。さらに別の特定の実施形態では、工程(d)は濃縮のみを含む。ウイルス精製方法のさらなる実施形態は以下に詳説する。40

#### 【0128】

特定の一実施形態では、工程(c)はアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより行う。別の特定の実施形態では、工程(c)にはさらに非特異的ヌクレアーゼによる処理が組み込まれる。

#### 【0129】

上記のように、細胞培養物から得られたウイルスは、回収後に安定化させることができる(例えば、スクロースリン酸(SP)の添加による)。よって、本発明の精製方法は安定化されたウイルス回収物の清澄化を包含する。あるいは、回収および清澄化工程を組み50

合わせることができる。例えば、A T F を用いれば、ウイルスが複製された細胞培養物を回収し、ウイルスの清澄化に用いる媒体および／またはデバイスに直接ウイルス回収物を送り込むことができる。

#### 【 0 1 3 0 】

例えは、まず、感染培養物からの未精製培地を、例えは  $1000 \sim 2000 \times g$  で、細胞残渣および他の大きな粒子物質を除去するのに十分な時間、例えは、10 ~ 30 分の間遠心分離することにより清澄化することができる。あるいは、培地を、完全な細胞および他の大きな粒子物質を保持しつつウイルスを通すのに十分な大きなの所定の孔径範囲の半透膜で濾過する。

#### 【 0 1 3 1 】

一実施形態では、ウイルス回収物は、ウイルスを通すのに十分大きく、完全な細胞および細胞残渣を保持するのに十分小さい孔径を有する M F 膜を用いた D F F および／または T F F により清澄化される。一実施形態では、ウイルス回収物は、約 1 . 2 マイクロメートル以下の孔径を有する少なくとも 1 つの膜を通過させる D F F および／または T F F により清澄化される。特定の実施形態では、ウイルス回収物は、約 1 . 2 マイクロメートル～約 0 . 45 マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも 1 つの膜を通過させる D F F により清澄化される。別の特定の実施形態では、ウイルス回収物は、1 . 2 マイクロメートルの孔径を有する第一の膜と 0 . 45 マイクロメートルの孔径を有する第二の膜を通過させる D F F により清澄化される。ある実施形態では、ポリプロピレンおよび／または P V D F 膜を用いる。さらに別の特定の実施形態では、ウイルス回収物は、第 8 . 3 節に示される実施例に例示されている D F F により清澄化される。さらに別の特定の実施形態では、ウイルスが複製された細胞培養物の回収を D F F 工程と組み合わせる。例えは、ウイルスが複製された細胞培養物を回収し、D F F に用いる媒体およびデバイスに直接適用する。回収工程と清澄化工程を組み合わせることで、操作数が減り、回収タンクの必要が無くなり、総プロセス時間が短縮される。

#### 【 0 1 3 2 】

一実施形態では、清澄化された回収物を濃縮し、かつ／またはバッファー交換を行う。一実施形態では、濃縮および／またはバッファー交換は U F および D F により行う。別の実施形態では、U F および D F の双方に T F F を用いる。なお別の実施形態では、ウイルスが複製された細胞培養物の回収は、T F F 工程と組み合せた D F F 工程と組み合わせる。回収、清澄化および濃縮／バッファー交換工程を組み合わせることで、操作数が減り、総プロセス時間が短縮される。ある実施形態では、一定の濾液流速を維持するために T F F を行う。他の実施形態では、一定の T M P を維持するために T F F を行う。ある実施形態では、清澄化されたウイルスはまず U F により濃縮し、その後、D F によりバッファー交換を行う。交換バッファーはウイルス回収物中に存在するものと同じであっても異なっていてもよいと考えられる。一実施形態では、交換バッファーは中性 p H の S P バッファーである。特定の実施形態では、交換バッファーは、( 1 以上の成分について 10 % の変動の範囲内で ) 2 1 8 m M スクロース、1 1 m M リン酸バッファー p H 7 . 0 ~ 7 . 4 を含んでなる。別の特定の実施形態では、交換バッファーは ( 1 以上の成分について 10 % の変動の範囲内で ) 2 1 8 m M スクロース、1 1 m M リン酸バッファー p H 7 . 0 ~ 7 . 4 からなる。ある実施形態では、ウイルス（例えは、インフルエンザ）を含んでなる保持液は、所望の容量のバッファーが交換された後に収集される。保持液の収集物後、いくらかのウイルスが膜に弱く結合したままとなる場合がある。よって、いくつかの実施形態では、収集された保持液にさらなる交換バッファーを加えて膜をすすぐ。収集された保持液はまた、本発明において「馴化ウイルス負荷」または「# X U F # X D F 」（ここで、「#」は、それぞれ U F プロセスおよび D F プロセスに関する濃縮倍率または交換されたバッファーのダイアボリューム数を示す）とも呼ばれる。特定の実施形態では、5 0 0 k D a の M W C O を有する膜を濃縮およびバッファー交換に用いる。いくつかの実施形態では、プロセスの後に膜を洗浄して再利用することができる。他の実施形態では、清澄化ウイルスのバッチごとに新しい膜を用いる。別の特定の実施形態では、清澄化された回収物

10

20

30

40

50

を、第8.3節および8.4節に示される実施例に例示されているように濃縮およびバッファー交換する。

#### 【0133】

ある実施形態では、馴化ウイルス負荷をクロマトグラフィーにより精製する。いくつかの実施形態では、馴化ウイルス負荷をアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。類似の分離特性を有する種々のアフィニティークロマトグラフィー媒体が利用可能であり、例えば、いくつかのウイルスおよびウイルスタンパク質の濃縮および精製のために、限定されるものではないが、N(p-アミノフェニル)オキサム酸アガロース、セルファイン(商標)サルフェイトを含む多くのアフィニティークロマトグラフィー媒体が利用可能である。特定の実施形態では、セルファイン(商標)サルフェイト(Chisso Corp.)アフィニティー媒体をアフィニティークロマトグラフィーに用いる。別の実施形態では、FluSelect(商標)(GE Healthcare)をアフィニティークロマトグラフィーに用いる。ある実施形態では、馴化ウイルス負荷をアフィニティー媒体上に直接付加する。ある実施形態では、さらなるウイルスの結合を促進するために、結合していない材料をアフィニティー媒体に通してもよい。

#### 【0134】

一実施形態では、アフィニティー媒体1mL当たり約 $10^{9.0}$ ～約 $10^{10}$ の間、または約 $10^{9.2}$ ～約 $10^{9.8}$ の間、または約 $10^{9.4}$ ～約 $10^{9.6}$ の間のウイルス粒子が付加される。別の実施形態では、アフィニティー媒体1mL当たり少なくとも約 $10^{9.0}$ 、または少なくとも約 $10^{9.1}$ 、または少なくとも約 $10^{9.2}$ 、または少なくとも約 $10^{9.3}$ 、または少なくとも約 $10^{9.4}$ 、または少なくとも約 $10^{9.5}$ 、または少なくとも約 $10^{9.6}$ 、または少なくとも約 $10^{9.7}$ 、または少なくとも約 $10^{9.8}$ 、または少なくとも約 $10^{9.9}$ のウイルス粒子が付加される。ある実施形態では、ウイルス粒子は生ウイルスである。サンプル中の生ウイルス数を求める方法は本明細書に記載されている。

#### 【0135】

別の実施形態では、アフィニティー媒体1mL当たり約 $9.01\log_{10}FFU$ ～約 $10.01\log_{10}FFU$ の間、または約 $9.21\log_{10}FFU$ ～約 $9.81\log_{10}FFU$ の間、または約 $9.41\log_{10}FFU$ ～約 $9.61\log_{10}FFU$ の間のウイルスが付加される。別の実施形態では、アフィニティー媒体1mL当たり少なくとも約 $9.01\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.11\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.21\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.31\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.41\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.51\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.61\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.71\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.81\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.91\log_{10}FFU$ のウイルスが付加される。特定の実施形態では、セルファイン(商標)サルフェイト(Chisso Corp.)アフィニティー媒体が用いられ、セルファイン(商標)サルフェイト1mL当たり $9.21\log_{10}FFU$ ～ $9.81\log_{10}FFU$ の間のウイルスが付加される。

別の特定の実施形態では、セルファイン(商標)サルフェイト(Chisso Corp.)アフィニティー媒体が用いられ、セルファイン(商標)サルフェイト1mL当たり $9.41\log_{10}FFU$ ～ $9.61\log_{10}FFU$ の間のウイルスが付加される。さらに別の特定の実施形態では、セルファイン(商標)サルフェイト(Chisso Corp.)アフィニティー媒体が用いられ、セルファイン(商標)サルフェイト1mL当たり少なくとも約 $9.41\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.51\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.61\log_{10}FFU$ 、または少なくとも約 $9.71\log_{10}FFU$ のウイルスが付加される。

#### 【0136】

一実施形態では、アフィニティー媒体を、ウイルスがアフィニティー媒体に結合したままとなる十分な容量のバッファー(例えば、SPバッファー)で洗浄して、結合していない、また結合の弱い夾雑物をアフィニティー媒体から除去する。ある実施形態では、洗浄

バッファーは(1以上の成分について10%の変動の範囲内で)218 mMスクロース、11mMリン酸バッファーpH7.0~7.4を含んでなる。別の特定の実施形態では、洗浄バッファーは(1以上の成分について10%の変動の範囲内で)218 mMスクロース、11mMリン酸バッファーpH7.0~7.4からなる。ある実施形態では、洗浄後に、ウイルスがアフィニティー樹脂に結合しない十分な容量のバッファーを用いてアフィニティーから溶出させ、カラムに結合している夾雑物を遊離させずにウイルスを溶出させ、収集する。ある実施形態では、溶出バッファーは塩を含んでなる。ウイルス(例えば、インフルエンザ)をアフィニティーカラムから溶出させるのに有用な塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウムが挙げられる。一般に、溶出バッファーは、0~1.0Mの濃度範囲で勾配としてまたは段階的に樹脂に適用される。溶出バッファー中で塩として用いられる陽イオンおよび陰イオンの有効性はホフマイスター・シリーズ(Hofmeister series)と相関し、慣用陽イオンの脱離順序は $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$ であり、慣用陰イオンの脱離有効性の順序は $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{COO}^- > \text{Cl}^-$ である。一実施形態では、溶出バッファーは(10%の変動の範囲内で)塩化ナトリウムを終濃度1Mで含んでなる。別の実施形態では、溶出バッファーは(1以上の成分について10%の変動の範囲内で)1M塩化ナトリウム、218 mMスクロース、および11mMリン酸バッファーpH7.0~7.4を含んでなる。収集された溶出ウイルスはまた、本明細書において「精製ウイルス溶出液」とも呼ばれる。ウイルスの溶出は、紫外線(UV)吸光度をモニタリングすること、特に、280ナノメートルでの吸光度をモニタリングすることによりモニタリングすることができる。いくつかの実施形態では、馴化ウイルス負荷はカラムクロマトグラフィーにより精製し、ウイルスの溶出をモニタリングし、ウイルスを含んでなる特定の画分を収集する。このようなアプローチは、溶出されたウイルスの容量を最小限とすることが望ましい場合に有用であり得る。別の特定の実施形態では、馴化ウイルス負荷は、第8.3節に示される実施例に例示されているようにクロマトグラフィーにより精製する。

### 【0137】

ある実施形態では、ウイルス(例えば、インフルエンザ)の精製方法は、非特異的エンドヌクレアーゼ(例えば、ベンゾナーゼ(登録商標))による処理を含む。ある実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼ処理はウイルス精製の初期に行う。一実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼ処理は工程(a)の後、工程(b)の前に行う。別の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼ処理は工程(b)の後、工程(c)の前に行う。あるいは、工程(c)の際に、ウイルスを非特異的エンドヌクレアーゼで処理する。このアプローチの利点は、第8.3節に示される実施例に例示されている。特定の実施形態では、馴化ウイルス負荷をアフィニティー媒体に結合させ、その後、非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなるバッファーに曝す。いくつかの実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼはバッファー中に約10U/mL~約100U/mLの間の濃度で存在する。他の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは、バッファー中に約40U/mL~約60U/mLの間の濃度で存在する。一実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼはスクロースを含んでなるバッファー中に存在する。特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは、218 mMスクロース、11mMリン酸バッファーpH7.0~7.4を含んでなるバッファー中に存在する。別の特定の実施形態では、特定のエンドヌクレアーゼが、(1以上の成分について10%の変動の範囲内で)218 mMスクロース、11mMリン酸バッファーpH7.0~7.4からなるバッファー中に約40U/mL~約60U/mLの間の終濃度で存在する。ある実施形態では、付加および洗浄条件を、結合したウイルスが約10分~約120分の間非特異的エンドヌクレアーゼに確実に曝されるように調整する。一実施形態では、付加および洗浄条件を、結合したウイルスが約40分~約80分の間非特異的エンドヌクレアーゼに確実に曝されるように調整する。さらに他の実施形態では、付加および洗浄条件を、結合したウイルスが少なくとも10分、または少なくとも20分、または少なくとも30分、または少なくとも40分、または少なくとも50分、または少なくとも60分、または少なくとも70分、または少なくとも80分、または少

10

20

30

40

50

なくとも 90 分、または少なくとも 100 分、または少なくとも分、または少なくとも 110 分、または少なくとも 120 分、非特異的エンドヌクレアーゼに確実に曝されるように調整する。本発明のある態様では、非特異的エンドヌクレアーゼへの曝露時間、非特異的エンドヌクレアーゼの濃度および非特異的エンドヌクレアーゼ含有バッファーの容量は調整可能である。例えば、DNA 夾雜物を切断するのに必要な時間を最短にするためには、非特異的エンドヌクレアーゼの濃度を高めればよく；あるいは、非特異的エンドヌクレアーゼの使用量を最小とするためには、曝露時間を長くすればよい。非特異的エンドヌクレアーゼ処理の後、ウイルスがアフィニティー媒体に結合したままとなる十分な容量のバッファー（例えば、SP バッファー）でアフィニティー媒体を洗浄して、消化された DNA 夾雜物の残渣を除去することが望ましい場合がある。よって、ある実施形態では、アフィニティー樹脂を、非特異的エンドヌクレアーゼ処理の前および／または後に前記のように洗浄する。別の特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼはベンゾナーゼ（登録商標）である。さらに別の特定の実施形態では、馴化ウイルス負荷は、第 8.3 節に示される実施例に例示されているように、アフィニティークロマトグラフィーによる精製と同時にベンゾナーゼ（登録商標）で処理する。  
10

#### 【 0138 】

本発明のある態様では、クロマトグラフィーによる精製後に、精製ウイルス溶出液を濃縮し、かつ／またはバッファーを交換する。濃縮および／またはバッファー交換に有用な方法は上記されている。ある実施形態では、精製ウイルス溶出液のバッファーを、DF を用いて交換する。一実施形態では、約 5 ダイアボリュームを超えるバッファーが DF により交換される（ここで、ダイアボリュームは、DF 中に操作に導入された総バッファー容量／保持液容量である）。約 5 ダイアボリュームを超える交換の利点は、第 8.3 節に示される実施例に詳説されている。別の実施形態では、約 6 ダイアボリューム、または約 7 ダイアボリューム、または約 8 ダイアボリューム、または約 9 ダイアボリューム、または約 10 ダイアボリューム、またはそれを超えるダイアボリュームのバッファーが DF により交換される（ここで、ダイアボリュームは、DF 中に操作に導入された総バッファー容量／保持液容量である）。特定の実施形態では、約 8 ダイアボリュームまたは以上のダイアボリュームのバッファーが DF により交換される（ここで、ダイアボリュームは、DF 中に操作に導入された総バッファー容量／保持液容量である）。特定の実施形態では、交換バッファーは（1 以上の成分について 10 % の変動の範囲内で）200 mM スクロース、100 mM リン酸バッファー pH 7.0 ~ 7.4 を含んでなる。別の特定の実施形態では、交換バッファーは（1 以上の成分について 10 % の変動の範囲内で）200 mM スクロース、100 mM リン酸バッファー pH 7.0 ~ 7.4 からなる。ある実施形態では、ウイルスを含んでなる保持液は、所望の容量のバッファーが交換された後に収集される。保持液の収集後、いくらかのウイルスが膜に弱く結合したままとなる場合がある。よって、いくつかの実施形態では、収集された保持液にさらなる交換バッファーを加えて膜をすぐ。収集された保持液はまた、本発明において「馴化ウイルスバルク (conditioned viral bulk)」または「# XUF」（ここで、「#」は、DF プロセス中に交換されたバッファーのダイアボリューム数を示す）とも呼ばれる。特定の実施形態では、500 kDa の MWCO を有する膜を濃縮および／またはバッファー交換に用いる。いくつかの実施形態では、プロセスの後に膜を洗浄して再利用することができる。他の実施形態では、清澄化ウイルス溶出液のバッチごとに新しい膜を用いる。別の特定の実施形態では、精製ウイルス溶出液のバッファーを、第 8.3 節に示される実施例に例示されているように交換する。さらに他の実施形態では、前記のように、清澄化されたウイルスを UF により濃縮し、バッファーを DF により交換する。UF 工程を組み込むことで、結果として得られる処方ウイルスバルクの容量が低減される。ある実施形態では、ウイルス溶出液は約 2 倍または約 3 倍または約 4 倍または約 5 倍またはそれを超えて濃縮される（ここで、「倍」は操作に加えられた総出発容量／最終保持液容量に相当する）。他の実施形態では、ウイルス溶出液は 2 倍 ~ 4 倍の間に濃縮される。特定の実施形態では、ウイルス溶出液は約 2 倍に濃縮され、その後、バッファーが前記のように DF により交換される。特定の実施形態では  
20  
30  
40  
50

、精製ウイルス溶出液のバッファーは、第8.4節に示される実施例に例示されているように濃縮され、バッファー交換される。

#### 【0139】

一実施形態では、処方ウイルスバルクはDFFおよび/またはTFFにより除菌される。別の実施形態では、処方ウイルスバルクは、ウイルスを通すのに十分大きく、他の夾雑物を保持するのに十分小さい孔径を有するMFM膜を用いて除菌される。一実施形態では、処方ウイルスバルクは、約0.45マイクロメートルの孔径を有する少なくとも1つの膜を通過させるDFFおよび/またはTFFにより除菌される。ある実施形態では、ポリブロピレンおよび/またはPVDF膜が用いられる。一実施形態では、除菌前の処方ウイルスバルクに付加的成分を加える。ある実施形態では、除菌前の処方ウイルスバルクに、アミノ酸賦形剤（例えば、グルタミン酸、アルギニン）、タンパク質加水分解物（例えば、コラーゲン、ゼラチン）、キレート剤（例えば、EDTA）および保存剤からなる群から選択される少なくとも1つの成分を加える。特定の実施形態では、除菌前の処方ウイルスバルクにグルタミン酸、アルギニンおよびゼラチンを加える。別の特定の実施形態では、精製ウイルスバルクにcGAG（200mMスクロース、100mMリン酸、12.1%w/vアルギニン、10%ゼラチンおよび54mMまたは0.9%グルタミン酸）を1:9v/vの比率で加える。別の特定の実施形態では、除菌前の処方ウイルスバルクにグルタミン酸ナトリウム、アルギニンおよびゼラチンをそれぞれ（10%の変動の範囲内で）5.4mMまたは0.09%、1.21%w/vおよび1.%w/vの終濃度で加える。さらに別の特定の実施形態では、処方ウイルスバルクは、第8.3節に示される実施例に例示されているようにDFFにより除菌される。

10

#### 【0140】

特定の実施形態では、細胞培養物からインフルエンザウイルスを精製する方法は、以下の工程：

(a) 約1.2マイクロメートル～約0.45マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも1つの膜を通過させるダイレクトフロー濾過（DFF）によるウイルス回収物の清澄化；

(b) 工程(a)後の、500kDa分子量カットオフ（MWCO）を有する膜を用いた、タンジェントフロー限外濾過（UF）による濃縮およびダイアフィルトレーション（DF）によるバッファー交換；

30

(c) 工程(b)後のアフィニティーカラムクロマトグラフィーによる精製；

(d) 工程(c)後の、500kDa分子量カットオフ（MWCO）を有する膜を用いDFによるバッファー交換；および

(e) 工程(d)後の、約0.45マイクロメートル～約0.22マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも1つの膜を通過させるDFFによる除菌

（ここで、精製ウイルスの総回収率は少なくとも30%であり、精製ウイルスは、7.0±0.510g<sub>10</sub>FFUのウイルス当たり0.1ng未満のHCD、0.3μg未満のHCPを含んでなる）

を含む。

40

#### 【0141】

細胞培養からウイルス、特に、インフルエンザウイルスを精製する方法に組み込むことができるさらなるパラメーターは、第8.3節に示される実施例に例示されている。

#### 【0142】

##### 6.5.2 RSVの精製

特定の実施形態では、精製されるウイルスは呼吸器合胞体ウイルス（RSV）（例えば、rA2cp248/404/1030 SH）である。

#### 【0143】

一実施形態において、細胞培養物からウイルスを精製する方法は以下の工程：

(a) ウイルス回収物の清澄化；

(b) 工程(a)後の安定化および/またはバッファー交換；

50

(c) 工程 (b) 後の濃縮および / またはバッファー交換 ;  
 (d) 工程 (c) 後のクロマトグラフィーによる精製 ; および  
 (e) 工程 (d) 後の最終濾過  
 を含む。

#### 【0144】

特定の実施形態では、工程 (a) は複数の濾過工程を含む。別の特定の実施形態では、工程 (a) には非特異的エンドヌクレアーゼによる処理がさらに組み込まれている。別の特定の実施形態では、工程 (a) および (c) はダイレクトフロー濾過により行う。別の特定の実施形態では、工程 (c) はタンジェントフロー濾過により行う。さらに別の特定の実施形態では、工程 (c) はタンジェントフロー濾過による濃縮およびダイアフィルトレーションによるバッファー交換の双方を含む。特定の一実施形態では、工程 (d) はイオン交換クロマトグラフィー (例えば、陽イオン交換) により行う。さらに別の実施形態では、工程 (c) は濃縮のみを含む。ウイルス (例えば、RSV) を精製する方法のさらなる実施形態は以下に詳説される。10

#### 【0145】

本発明の精製方法は、ウイルス回収物の清澄化 (工程 (a)) を包含する。まず、感染培養物からの未精製培地を、例えば 1000 ~ 2000 × g で、細胞残渣および他の大きな粒子物質を除去するのに十分な時間、例えば、10 ~ 30 分の間遠心分離することにより清澄化することができる。あるいは、ウイルスを含有する上清を、完全な細胞および他の大きな粒子物質を保持しつつウイルスを通すのに十分な大きなの定義された孔径範囲の、一連の半透膜で濾過する。精製プロセスのこの清澄化工程は、細胞宿主 DNA を分解するための非特異的エンドヌクレアーゼ (例えば、ベンゾナーゼ) による処理を含んでもよく、ここで、ウイルス回収物は、i) ダイレクトフロー濾過 (DFF) により濾過され ; ii) 非特異的エンドヌクレアーゼで処理され ; iii) 再び DFF により濾過される。20

#### 【0146】

一実施形態では、ウイルス回収物は、ウイルスを通すのに十分大きく、完全な細胞および細胞残渣を保持するのに十分小さい孔径を有する MF 膜を用い、DFF および / または TFF により清澄化される。ある実施形態では、ウイルス回収物は非特異的エンドヌクレアーゼの処理と組み合わせて DFF により清澄化される。特定の実施形態では、ウイルス回収物は、約 10 マイクロメートル以下の孔径を有する少なくとも 1 つの膜で濾過した後、非特異的エンドヌクレアーゼで処理し、その後、約 3.0 マイクロメートル以下の孔径を有する少なくとも 1 つの膜で再び濾過する。特定の実施形態では、清澄化プロセスにおける第一のフィルター工程は、約 5.0 マイクロメートル ~ 約 1.0 マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも 1 つの膜による。特定の実施形態では、清澄化プロセスにおける第二のフィルター工程は、約 3.0 マイクロメートル ~ 約 0.45 マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも 1 つの膜による。ある実施形態では、第一または第二のフィルター工程は、単独または組み合わせて、より小さい孔径のフィルターの目詰まりを防ぐためにサイズの異なる 2 つのフィルターを積層した二重膜フィルターを用いる。一実施形態では、この二重フィルターは約 3/0.8 マイクロメートルのサイズであり、3 マイクロメートルのフィルターは大きな細胞残渣を除去するためのプレフィルターとして働く。別の特定の実施形態では、ウイルス回収物は、約 3.0 マイクロメートルの孔径を有する第一の膜と約 3/0.8 または約 0.65 マイクロメートルの孔径を有する第二の膜を通過させる DFF により清澄化される。30

#### 【0147】

ある実施形態では、ウイルス (例えば、RSV) を精製する方法は、宿主細胞 DNA (HCD) を分解するための非特異的エンドヌクレアーゼ (例えば、ベンゾナーゼ (登録商標)) による処理を含む。ある実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼ処理はウイルス精製の初期に行う。一実施形態では、ウイルスは工程 (a) の間に非特異的エンドヌクレアーゼで処理される。特定の実施形態では、濾過されたウイルス回収物は、非特異的エンドヌクレアーゼを含んでなるバッファーと混合される。いくつかの実施形態では、非特4050

異的エンドヌクレアーゼはバッファー中に約 5 U / mL ~ 約 100 U / mL の間の濃度で存在する。他の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは、バッファー中に約 5 U / mL ~ 約 60 U / mL の間の濃度で存在する。特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは約 50 U / mL で存在する。特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは約 10 U / mL で存在する。一実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは、約 1 . 0 mM ~ 約 10 mM の MgCl<sub>2</sub> を含んでなるバッファー中に存在する。特定の実施形態では、バッファーは 50 U / mL の非特異的エンドヌクレアーゼと 5 mM の MgCl<sub>2</sub> を含んでなる。別の特定の実施形態では、MgCl<sub>2</sub> は 2 mM で存在する。さらに別の実施形態では、バッファーは 10 U / mL の非特異的エンドヌクレアーゼと 5 mM の MgCl<sub>2</sub> を含んでなる。

10

#### 【0148】

清澄化プロセスにおける第一のフィルター工程の後、非特異的エンドヌクレアーゼは、濾過されたウイルス回収物とともに約 32 ± 3 にて約 1 時間 ~ 約 4 時間インキュベートされる。特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは、ウイルス回収物とともに 32 にて約 3 時間インキュベートされる。さらに他の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼは、ウイルスが特異的エンドヌクレアーゼに少なくとも 10 分間、または少なくとも 20 分間、または少なくとも 30 分間、または少なくとも 40 分間、または少なくとも 50 分間、または少なくとも 60 分間、または少なくとも 70 分間、または少なくとも 80 分間、または少なくとも 90 分間、または少なくとも 100 分間、または少なくとも 110 分間、または少なくとも 120 分間、または少なくとも 150 分間、または少なくとも 180 分間、または少なくとも 210 分間、または少なくとも 240 分間確実に曝されるように調整された条件下でインキュベートされる。本発明のある態様では、非特異的エンドヌクレアーゼへの曝露時間、非特異的エンドヌクレアーゼの濃度および非特異的エンドヌクレアーゼ含有バッファーの容量は調整可能である。例えば、DNA 夾雜物を切断するのに必要な時間を最短にするためには、非特異的エンドヌクレアーゼの濃度を高めればよく；あるいは、非特異的エンドヌクレアーゼの使用量を最小とするためには、曝露時間を長くすればよい。特定の実施形態では、非特異的エンドヌクレアーゼはベンゾナーゼ（登録商標）である。非特異的エンドヌクレアーゼ処理の後、処理された濾過ウイルス回収物を、DNA 夾雜物が消化された残渣および残留する宿主細胞残渣を除去するために再び濾過する。

20

#### 【0149】

ある実施形態では、ベンゾナーゼ処理された清澄化ウイルス回収物を、スクロースリン酸 (SP)、トリススクロース (TS) またはスクロースリン酸グルタミン酸 (SPG) バッファーの添加により安定化させる。これらのバッファーはさらに塩化ナトリウムまたは塩化カリウムなどの塩を含んでもよい。ある実施形態では、安定化バッファーは SP バッファーであり、このバッファーはスクロース、リン酸カリウム（第一と第二の組合せ）および塩化カリウムを含んでなる。特定の実施形態では、SP バッファーは約 250 mM ~ 約 200 mM のスクロース、100 mM のリン酸カリウムおよび約 150 mM の塩化カリウム、pH 7.2 を含んでなる。特定の実施形態では、SP は、214 mM のスクロースを含んでなる。ある実施形態では、安定化バッファーは TS バッファーであり、このバッファーは 約 2.5 mM ~ 約 7.5 mM、pH 7.2 の TrisCl および約 250 mM ~ 約 150 mM のスクロースを含んでなる。特定の実施形態では、安定化バッファーは 50 mM の pH 7.2 TrisCl および 218 mM のスクロースを含有する。TS バッファーはさらに、単独または組み合わせて、NaCl、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> または K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を含有する。一実施形態では、NaCl または KCl の濃度は約 125 mM ~ 約 175 mM である。特定の実施形態では、安定化バッファーは 5 mM の pH 7.2 TrisCl、175 mM のスクロースおよび 150 mM の NaCl または 150 mM の KCl を含有する。別の特定の実施形態では、安定化バッファーは 36 mM の pH 7.2 TrisCl、214 mM のスクロースおよび 150 mM の NaCl または KCl を含有する。一実施形態では、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> または K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> が約 10 mM ~ 約 2.5 mM で存

30

40

50

在する。特定の実施形態では、安定化バッファーは5 mMのpH 7.2 Tris C1、175 mMのスクロース、150 mMのNaClおよび5 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を含有する。特定の実施形態では、安定化バッファーはSPGであり、バッファーは218 mMのスクロース、3.8 mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、7.2 mMのK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>および5 mMのグルタミン酸ナトリウムを含有する。当業者ならば、安定化バッファーの濃度がウイルス、ウイルス回収物および最大収量の安定化されたウイルス回収物を得るための精製条件に応じて変更可能であることが分かるであろう。

#### 【0150】

ある実施形態では、清澄化された回収物を濃縮し、かつ／またはバッファー交換を行う。一実施形態では、濃度および／またはバッファー交換はUFおよびDFにより行う。別の実施形態では、UFおよびDFの双方のためにTFFを用いる。ある実施形態では、一定の濾液流速を維持するためにTFFを行う。他の実施形態では、一致のTMPを維持するためにTFFを行う。特定の実施形態では、UF工程は500 kDaの中空纖維カートリッジ(GE Health care)を用いて行い、ウイルス回収物は操作TMP 15 psiおよび剪断速度12000／秒を用いて5倍濃縮される。これらのパラメーターは、ウイルスおよび最終ワクチン処方物の最終ウイルス収量を最大にするための精製条件に応じて変更可能である。

#### 【0151】

ある実施形態では、清澄化されたウイルスをまずUFにより濃縮し、その後、1または2つのDFバッファーでバッファー交換を行う。例としては、限定されるものではないが、清澄化された回収物をまずUFにより濃縮し、その後、スクロースおよび塩の濃度が異なる交換バッファーで2回のDF工程を施す。したがって、交換バッファーはウイルス回収物中に存在するものと同じであっても異なっていてもよいと考えられる。さらに、交換バッファーは、付加的バッファー交換工程に応じて最終処方バッファーと同じであっても異なっていてもよい。一実施形態では、交換バッファーは中性pHのSP、TSまたはスクロースクエン酸バッファーである。特定の実施形態では、交換バッファーは約7～25%w/vのスクロースを含んでなり、従って、約100 mM～約800 mMの低スクロースから高スクロースの範囲を提供する。一実施形態では、交換バッファーはNaClまたはKC1を約1 mM～約150 mMの濃度で含んでなる。別の実施形態では、交換バッファーはTris C1を約2.5 mM～約50 mMの濃度で含んでなる。なお別の実施形態では、交換バッファーはクエン酸ナトリウムまたはカリウムを約5.0 mM～約50 mMの濃度で含んでなる。一実施形態では、交換バッファーはリン酸カリウムを約20 mM～約150 mMの濃度で含んでなる。ある実施形態では、リン酸カリウムの濃度は、高濃度または低濃度のスクロースと一致する低濃度または高濃度の第一と第二の組合せである。特定の実施形態では、交換バッファーは、約5 mM～約30 mMの第一リン酸カリウムを含んでなる。別の特定の実施形態では、交換バッファーは、約10 mM～約80 mMの第二リン酸カリウムを含んでなる。特定の交換バッファーの例としては、限定されるものではないが、5 mMのTris C1；7～25%w/vのスクロース；1 mM～150 mMのNaCl；20 mMのクエン酸ナトリウムまたはカリウム、7～25%w/vのスクロース、150 mMのNaClまたはKC1；および100 mMのリン酸カリウム、7～25%w/vのスクロース、150 mMのKC1を含有する。特定の実施形態では、交換バッファーは25%w/vのスクロース、約100 mMのリン酸カリウムバッファーおよび約150 mMのKC1 pH 7.2を含んでなる。さらなる実施形態では、このような交換バッファー中のリン酸カリウムの濃度は、第一と第二の組合せであり、例えば、第一28.5 mMと第二71.2 mMである。別の特定の実施形態では、交換バッファーは、25%w/vのスクロース、約5 mMのTris C1および約150 mMのNaCl、pH 7.2を含んでなる。さらに別の特定の実施形態では、交換バッファーは、10%w/vのスクロース、約20 mMのリン酸カリウムバッファーおよび約100 mMのKC1、pH 7.0を含んでなる。さらなる実施形態では、このような交換バッファー中のリン酸カリウムの濃度は、第一と第二の組合せであり、例えば、第一7.7 mMと第二12.3 mM

10

20

30

40

50

である。交換バッファー成分は、ウイルスおよびクロマトグラフィー工程および最終濾過工程のウイルス収量を最大にするための精製条件に応じて改変することができ、また精製したウイルスを最終処方物と共にバッファーに入れることができる。

#### 【0152】

ある実施形態では、安定化されたウイルス回収物は前記のようにクロマトグラフィーによりさらに精製される。いくつかの実施形態では、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオンまたは陽イオン）を用いる。特定の実施形態では、処理された清澄化ウイルス回収物のUFによる容量減およびダイアフィルトレーションによるバッファー交換の後、ウイルスはイオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製される。このクロマトグラフィー工程または仕上げ工程は、一実施形態では、ネガティブクロマトグラフィーを用いて行われる。この実施形態において、表面（例えば、ポリマービーズ）は、ウイルス粒子の結合を排除しつつHCDまたはHCPと結合し、従って、ウイルスその表面を素通りさせるように誘導体化される。この概念はまた、ウイルス粒子を含んでなるバッファーが誘導体化された表面を通り越すまたは素通りすることができるよう他の表面にも適用することができる。完全なクロマトグラフィープロセスは添加物を含まず、ワクチン処方のためのウイルスの大規模生産に用いるために容易に拡大縮小ができる。クロマトグラフィーはバッチプロセスで、あるいはまたカラムプロセスを用いて行うことができると考えられる。ある実施形態では、馴化ウイルス負荷はカラムクロマトグラフィーにより精製される。

#### 【0153】

行われる場合、クロマトグラフィー工程またはバッファー交換のいずれかの後、濃縮されたウイルス回収物に対して除菌工程を行う。一実施形態では、除菌工程は最終濾過工程である。一実施形態では、最終濾過は3マイクロメートル以下の孔径を有する少なくとも1つの膜によるDFDである。特定の実施形態では、フィルターは二重3/0.8マイクロメートル膜である。別の特定の実施形態では、フィルターは約1mM以下である。一様では、フィルターは0.8、0.65または0.45マイクロメートルである。

#### 【0154】

特定の実施形態では、ウイルス感染細胞から呼吸器合胞体ウイルスを精製する方法は以下の工程：

a.

i. 約10マイクロメートル～約3マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも1つの清澄化フィルターを介したダイレクトフロー濾過（DFD）によりウイルス回収物を濾過すること；

ii. ウイルス回収物を非特異的エンドヌクレアーゼで処理すること；

iii. ウイルス回収物を約3マイクロメートル～約0.45マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも1つの清澄化フィルターを介したDFDにより濾過すること；を含んでなるウイルス回収物の清澄化；

b. 清澄化されたウイルス回収物をスクロース、リン酸、または塩（NaClまたはKCl）を含むTrisバッファーで安定化させること；

c. 500kDa～0.1μmの間の分子量カットオフ（MWC）を有する中空纖維カートリッジを用い、安定化されたウイルス回収物をタンジェントフロー濾過（TFF）により濃縮し、かつ、ダイアフィルトレーション（DF）によりバッファー交換を行うこと；

d. 濃縮されたウイルス回収物を、約0.8マイクロメートル～約0.45マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも1つの清澄化フィルターを介したDFDにより濾過すること

を含み、それにより、呼吸器合胞体ウイルスがウイルス感染細胞から精製され、最終的なウイルス感染性力価が少なくとも5.7log<sub>10</sub>FFU/mLである。

#### 【0155】

別の特定の実施形態では、この精製方法はウイルス回収物の濃縮およびバッファー交換

10

20

30

40

50

後に陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製工程を含む。

#### 【0156】

さらに別の特定の実施形態では、ウイルス感染細胞から呼吸器合胞体ウイルスを精製する方法は、以下の工程：

a .

i . ウィルス回収物を約 3 ~ 8 マイクロメートルの間の孔径を有する少なくとも 1 つの清澄化フィルターを介したダイレクトフロー濾過 ( D F F ) により濾過すること；

i i . ウィルス回収物を非特異的エンドヌクレアーゼで処理すること；

i i i . ウィルス回収物を、約 0 . 65 マイクロメートルの孔径を有する少なくとも 1 つの清澄化フィルターを介した D F F により濾過すること

10

を含む、ウィルス回収物を清澄化する工程；

b . 清澄化されたウィルス回収物を、塩 ( N a C l または K C l ) を含むスクロース、リン酸または T r i s バッファーで安定化する工程；

c . 安定化されたウィルス回収物を、5 0 0 k D a ~ 0 . 1  $\mu$ m の間の分子量カットオフ ( M W C O ) を有する中空纖維カートリッジを用い、タンジェントフロー濾過 ( T F F ) により濃縮し、ダイアフィルトレーション ( D F ) により 2 回のバッファー交換を行う工程；

d . 濃縮されたウィルス回収物を、約 3 / 0 . 8 マイクロメートルの孔径を有する少なくとも 1 つの二重清澄化フィルターを介した D F F により濾過する工程；

を含み、それにより、呼吸器合胞体ウイルスがウイルス感染細胞から精製され、最終的に少なくとも 5 . 710 g<sub>10</sub> F F U / m L のウイルス感染力値を有する。

20

#### 【0157】

さらなる実施形態では、工程 c の 2 回のバッファー交換が同じ交換バッファーで行われる。あるいは、2 回のバッファー交換は異なる交換バッファーで行われる。特定の実施形態では、D F は、約 25 % w / v のスクロース、約 100 mM のリン酸カリウムバッファーおよび約 150 mM の K C l 、 pH 7 . 2 を含んでなる第一の交換バッファーで行われる。さらなる特定の実施形態では、D F は、約 10 % w / v のスクロース、約 20 mM のリン酸カリウムバッファーおよび約 100 mM の K C l 、 pH 7 . 0 を含んでなる第二の交換バッファーで行われる。

#### 【0158】

30

#### 6 . 6 ワクチン組成物および使用方法

本発明はさらに、本発明の方法によって得ることができるウイルス（例えば、インフルエンザまたは R S V ）に関する。これらのウイルスは、ヒトまたは動物へ投与するためのワクチンを提供するための既知の方法によって処方することができる。ウイルスは完全なウイルス粒子（例えば、生弱毒ウイルス）または不活性／非統合型ウイルス（例えば、ホルムアルデヒドの洗剤で処理）として存在することができる。所望により、定義されたウイルス成分（例えば、タンパク質）を当業者に既知の方法によりウイルスから単離し、ワクチンの製造に用いてもよい。ワクチン組成物用の不活性／非統合型ウイルス粒子の作製および処方の方法は当技術分野で周知であり、40 年以上用いられている。

#### 【0159】

40

#### 6 . 6 . 1 インフルエンザウイルスワクチン

完全なウイルス粒子（例えば、生弱毒ウイルス）の処方物は、バッファー、アミノ酸賦形剤（例えば、グルタミン酸、アルギニン）、タンパク質加水分解物（例えば、コラーゲン、ゼラチン）、キレート剤（例えば、E D T A ）および保存剤を含み得る。このような処方物に有用なバッファーは pH 7 . 0 ~ 7 . 4 の 200 mM スクロースおよびリン酸またはヒスチジンバッファーを含み得る。ある実施形態では、完全なウイルス粒子の処方物はグルタミン酸およびアルギニンなどのアミノ酸賦形剤を含んでなる。ある特定の他の実施形態では、完全なウイルス粒子の処方物は、コラーゲンまたはゼラチン（例えば、ブタ、魚類、鳥類ゼラチン）などの安定化されたタンパク質加水分解物を含んでなる。いくつかの実施形態では、完全なウイルス粒子の処方物は、インフルエンザ予防接種シーズン（

50

例えば、北半球では一般にほぼ9月～月)中、「現場で」(例えば、2～8、4、5などで冷蔵した場合に販売および流通中)貯蔵を可能とするに十分な期間、液体形態で安定である生ウイルスを含んでなる。よって、ウイルス/ワクチン組成物は貯蔵期間中、それらの効力を保持するか、またはそれらの効力を許容される速度で失うことが望ましい。他の実施形態では、このような溶液/ワクチンは約2～約8、例えば、冷蔵温度にて、液体形態で安定である。例えば、冷蔵で安定な弱毒インフルエンザワクチンを処方するための方法および組成物はPCT特許公報第WO/2006/041819号に記載されている(また、PCT国際公開公報第WO/2005/014862号も参照)。

#### 【0160】

よって、ある実施形態では、本発明は、最終処方物中に以下(1以上の成分について10%の変動の範囲内で):1～5%アルギニン;1～4%ゼラチン;5～10%スクロース(所望により、リン酸バッファー中);0.01～0.1%グルタミン酸(一ナトリウム、一水和物);10～150mMリン酸カリウムおよび80～150mMヒスチジンの1以上を含んでなる冷蔵で安定なワクチン処方物を提供する。

#### 【0161】

特定の一実施形態では、ワクチン処方物は、以下(1以上の成分について10%の変動の範囲内で):1～2%アルギニン;2%ゼラチン;7～10%スクロース(所望により、リン酸バッファー中);および100mMヒスチジンの1以上を含んでなる。別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下(1以上の成分について10%の変動の範囲内で):リン酸バッファー中、0.01～0.1%グルタミン酸(一ナトリウム、一水和物);1～2%アルギニン;1%ゼラチン;および7～10%スクロースの1以上を含んでなる。

#### 【0162】

ある特定の他の実施形態では、本発明は、最終処方物中に以下:スクロース6～8%重量/容量(w/v);アルギニン-塩酸塩1～2%w/v;グルタミン酸、一ナトリウム-水和物0.05～0.1%w/v;ゼラチン加水分解物、ブタA型(または魚類もしくは鳥類などの他の供給源)0.5～2%w/v;リン酸二カリウム1～2%;およびリン酸一カリウム0.25～1%w/vの1以上を含んでなる冷蔵で安定なワクチン処方物を提供する。

#### 【0163】

特定の一実施形態では、ワクチン処方物は、以下:スクロース6.84%重量/容量(w/v);アルギニン-塩酸塩1.21%w/v;グルタミン酸、一ナトリウム-水和物0.094w/v;ゼラチン加水分解物、ブタA型(または他の供給源)1%w/v;リン酸二カリウム1.13%;およびリン酸一カリウム0.48%w/vの1以上を含んでなる。別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下:スクロース6.84%重量/容量(w/v);アルギニン-塩酸塩1.21%w/v;グルタミン酸、一ナトリウム-水和物0.094%w/v;ゼラチン加水分解物、ブタA型(または他の供給源)1%w/v;リン酸二カリウム1.13%;およびリン酸一カリウム0.48%w/vの全てを含んでなる。

#### 【0164】

別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下(1以上の成分について10%の変動の範囲内で):スクロース6.84%重量/容量(w/v);アルギニン-塩酸塩1.21%w/v;グルタミン酸、一ナトリウム-水和物0.094%w/v;ゼラチン加水分解物、ブタA型(または他の供給源)1%w/v;リン酸二カリウム1.13%;およびリン酸一カリウム0.48%w/vの全てを含んでなる。別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下(1以上の成分について10%の変動の範囲内で):スクロース6.84%重量/容量(w/v);アルギニン-塩酸塩1.21%w/v;ゼラチン加水分解物、ブタA型(または他の供給源)1%w/vの全てを含んでなる。このような実施形態では、処方物はバッファー(例えば、リン酸カリウムバッファー(pH7.0～7.2))中である。別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下(1以上の成分につ

10

20

30

40

50

いて 20 % の変動の範囲内で) : スクロース 6 . 84 % 重量 / 容量 (w / v) ; アルギニン一塩酸塩 1 . 21 % w / v ; グルタミン酸、一ナトリウム一水和物 0 . 094 % w / v ; ゼラチン加水分解物、ブタ A 型 (または他の供給源) 1 % w / v ; リン酸二カリウム 1 . 13 % ; およびリン酸一カリウム 0 . 48 % w / v の全てを含んでなる。

#### 【0165】

さらに別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下 (1 以上の成分について 30 % の変動の範囲内で) : スクロース 6 . 84 % 重量 / 容量 (w / v) ; アルギニン一塩酸塩 1 . 21 % w / v ; グルタミン酸、一ナトリウム一水和物 0 . 094 % w / v ; ゼラチン加水分解物、ブタ A 型 (または他の供給源) 1 % w / v ; リン酸二カリウム 1 . 13 % ; およびリン酸一カリウム 0 . 48 % w / v の全てを含んでなる。さらに別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下 (1 以上の成分について 40 % の変動の範囲内で) : スクロース 6 . 84 % 重量 / 容量 (w / v) ; アルギニン一塩酸塩 1 . 21 % w / v ; グルタミン酸、一ナトリウム一水和物 0 . 094 % w / v ; ゼラチン加水分解物、ブタ A 型 (または他の供給源) 1 % w / v ; リン酸二カリウム 1 . 13 % ; およびリン酸一カリウム 0 . 48 % w / v の全てを含んでなる。

10

#### 【0166】

別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下 (1 以上の成分について 1 % の変動の範囲内で) : スクロース 6 . 84 % 重量 / 容量 (w / v) ; アルギニン一塩酸塩 1 . 21 % w / v ; グルタミン酸、一ナトリウム一水和物 0 . 094 % w / v ; ゼラチン加水分解物、ブタ A 型 (または他の供給源) 1 % w / v ; リン酸二カリウム 1 . 13 % ; およびリン酸一カリウム 0 . 48 % w / v の全てを含んでなる。別の特定の実施形態では、ワクチン処方物は、以下 (1 以上の成分について 3 % の変動の範囲内で) : スクロース 6 . 84 % 重量 / 容量 (w / v) ; アルギニン一塩酸塩 1 . 21 % w / v ; グルタミン酸、一ナトリウム一水和物 0 . 094 % w / v ; ゼラチン 加水分解物、ブタ A 型 (または他の供給源) 1 % w / v ; リン酸二カリウム 1 . 13 % ; およびリン酸一カリウム 0 . 48 % w / v の全てを含んでなる。特定の実施形態では、ワクチン処方物は、例えば、バッファーとしてリン酸カリウム (例えば、少なくとも 50 mM または少なくとも 100 mM または少なくとも 200 mM または少なくとも 250 mM ) 、あるいはまたヒスチジン (例えば、少なくとも 50 mM または少なくとも 100 mM または少なくとも 200 mM または少なくとも 250 mM ) を含み得る。

20

#### 【0167】

所望により、ワクチン処方物の貯蔵期間を延長するために、処方物液体供給流を乾燥加熱ガス流下で微細な液滴へと噴霧化する急速乾燥プロセスである噴霧乾燥を用いてよい。この微細な液滴の蒸発により、溶解していた溶質からなる乾燥粉末が得られる (例えば、米国特許公開第 2004 / 0042972 号参照)。

30

#### 【0168】

一般に、ウイルスまたはウイルス成分は、1 以上のウイルス株に特異的な免疫応答を刺激するために、適当な担体または賦形剤中で予防的に投与することができる。一般に、担体または賦形剤は、無菌水、生理食塩水溶液、緩衝生理食塩水溶液、デキストロース水溶液、グリセロール水溶液、エタノールまたはその組合せなどの製薬上許容される担体または賦形剤である。無菌性、pH、等張性および安定性を保証するこのような溶液の調製は当技術分野で確立されているプロトコールに従って行われる。一般に、担体または賦形剤は、アレルギーおよびその他の望ましくない作用を最小とし、例えば、皮下、筋肉内、鼻腔内などの特定の投与経路に適するように選択される。

40

#### 【0169】

所望により、ウイルスまたはその成分の予防的投与用の処方物はまた、インフルエンザ抗原に対する免疫応答を増強するための 1 以上のアジュバントも含む。好適なアジュバントとしては、サポニン、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、フルロニックポリオール、ポリ陰イオン、ペプチド、オイルまたは炭化水素エマルション、カルメット・グラン桿菌 (Bacille Calmette-Guerin) (BCG) 、コリネバク

50

テリウム・パルブム(*Corynebacterium parvum*)、および合成アジュバントQS-21およびMF59が挙げられる。

#### 【0170】

一般に、ワクチン処方物は1以上のインフルエンザウイルス株に特異的な免疫応答を刺激するのに十分な量で投与する。好ましくは、ウイルスの投与は防御免疫応答を惹起する。1以上のウイルス株に対して防御免疫応答を惹起するための用量および方法は当業者に知られている。例えば、不活性化インフルエンザウイルスを投与用量当たり約1～1000HID<sub>50</sub>(ヒト感染量)、すなわち、約10<sup>5</sup>～10<sup>8</sup>pfu(plaques forming units)の範囲で与える。あるいは、アジュバント無しで約10～50μg、例えば、約15μgのHAを投与する(アジュバントを用いる場合にはより少量を投与する)。一般に、用量は、例えば、年齢、健康状態、体重、性別、食生活、投与時間および他の臨床因子に基づいてこの範囲で調整する。予防用ワクチン処方物は、ニードルおよびシリンジまたは無針注射デバイスを用い、例えば、皮下または筋肉内注射により全身投与する。あるいは、ワクチン処方物は、液滴、大粒子エアゾール(約10ミクロンを超える)のいずれかにより鼻腔内に、または上気道へのスプレーにより投与される。上記の送達経路はいずれも防御的全身免疫応答をもたらすが、鼻腔内投与はインフルエンザウイルスの侵入部位の粘膜免疫性を惹起するという付加的利益を与える。鼻腔内投与には、多くの場合、生弱毒ウイルスワクチンが好ましく、例えば、弱毒、低温適応および/または温度感受性組換えまたは合併結合インフルエンザウイルスがある。単回用量での防御免疫応答の刺激が好ましいが、所望の予防効果を達成するためにさらなる用量を同じまたは異なる経路で投与することができる。これらの方法は、限定されるものではないが、オルトミクソウイルス(インフルエンザAおよびB株を含む)、パラミクソウイルス(RSV、ヒトメタニューモウイルスおよびパラインフルエンザを含む)、ラブドウイルスおよびフラボウイルスを含むいずれのウイルスにも適合可能である。10

#### 【0171】

##### 6.6.2 RSVワクチン

本発明では、一実施形態において、それを必要とする対象に、生弱毒精製ウイルス(例えば、RSV)を含んでなる本明細書に記載されている有効量の免疫原性組成物を投与することを含む、対象において免疫応答を惹起する方法が提供される。いくつかの実施形態では、弱毒ウイルスはキメラウイルスである。30

#### 【0172】

本発明では、特定の実施形態において、それを必要とする哺乳類に、弱毒RSVを含んでなる本明細書に記載されている有効量の免疫原性組成物を投与することを含む、哺乳類(例えば、ヒト)において免疫応答を惹起する方法が提供される。特定の実施形態では、弱毒RSVはrA2cp248/404/1030SHである。

#### 【0173】

生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は対象の能動免疫であり得る。本発明では、一実施形態において、対象に生弱毒精製ウイルスを含んでなる有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物、すなわちワクチンを投与することを含む、ウイルス感染を予防する方法が提供される。いくつかの実施形態では、生弱毒ウイルスはキメラウイルスである。40

#### 【0174】

本発明では、特定の実施形態において、哺乳類(例えば、ヒト)に、生弱毒精製RSVを含んでなる有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物、すなわちワクチンを投与することを含む、RSV感染を予防する方法が提供される。特定の実施形態では、生弱毒RSVはrA2cp248/404/1030SHである。

#### 【0175】

生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物はウイルス感染の阻害に使用可能である。本発明では、一実施形態において、それを必要とする対象に、生弱毒精製ウイルスを含んでなる有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物50

を投与することを含む、ウイルス感染を阻害する方法が提供される。いくつかの実施形態では、弱毒ウイルスはキメラウイルスである。本発明では、特定の実施形態において、哺乳類（例えば、ヒト）に、生弱毒精製RSVを含んでなる有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物を投与することを含む、RSV感染を阻害する方法が提供される。特定の実施形態では、弱毒RSVはrA2cp248/404/1030 SHである。

#### 【0176】

生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、対象においてウイルス力価の低減をもたらす免疫応答を誘導するために使用可能である。本発明では、一実施形態において、生弱毒細胞隨伴性ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を投与することを含む、対象においてウイルス力価を低減する方法が提供される。いくつかの実施形態では、弱毒ウイルスはキメラである。本発明では、特定の実施形態において、哺乳類（例えば、ヒト）に、生弱毒RSVを含んでなる有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物を投与することを含む、RSV力価を低減する方法が提供される。特定の実施形態では、弱毒RSVはrA2cp248/404/1030 SHである。

10

#### 【0177】

いくつかの実施形態では、有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物は、ウイルスを投与した対象において、非処理対象に比べ、およそ2倍、好ましくはおよそ5倍以上、およそ10倍以上またはおよそ20倍以上ウイルス力価を低減する。ある実施形態では、有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物は、その後細胞隨伴性ウイルスに感染した対象において、非処理対象に比べ、細胞隨伴性ウイルス感染に関連する1以上の症状の持続期間sおよび/または重篤度を軽減する。いくつかの実施形態では、有効量の本明細書に記載されている免疫原性組成物は、非処理対象に比べ、その後精製ウイルスに感染した対象の生存率を高める。

20

#### 【0178】

生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、ナイーブ対象、すなわち、着目するウイルスに感染したことなく、その時点でも感染していない対象に投与することができる。一実施形態では、生弱毒細胞隨伴性ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、ウイルス感染を起こすリスクのあるナイーブ対象に投与することができる。特定の実施形態では、生弱毒RSVを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、RSV感染を起こすリスクのあるナイーブ対象に投与することができる。特定の実施形態では、弱毒RSVはrA2cp248/404/1030 SHである。

30

#### 【0179】

生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、着目するウイルスの異なるグループ、サブグループまたは株に過去に感染したことがある対象に投与することができる。一実施形態では、免疫原性組成物を、着目するウイルス以外の異なるグループ、サブグループまたは株のウイルスに過去に感染したことがあり、着目するウイルスに感染を起こすリスクのある対象に投与する。

40

#### 【0180】

一実施形態では、生弱毒RSV（例えば、rA2cp248/404/1030 SH）を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をヒト小児またはヒト未熟児に投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV（例えば、rA2cp248/404/1030 SH）を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を、囊胞性纖維症、気管支肺異形成症、先天性心疾患、先天性免疫不全症または後天性免疫不全を有するヒトに投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV（例えば、rA2cp248/404/1030 SH）を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をヒト幼児に投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV（例えば、rA2cp248/404/1030 SH）を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をヒト小児に投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV（例えば、rA2cp248/404/1030 SH）を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をヒト小児に投与する。

50

)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をヒト学童に投与する。

**【0181】**

特定の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を1~24か月齢のヒトに投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を1~3か月齢のヒトに投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を6~24か月齢のヒトに投与する。

**【0182】**

別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を、骨髄移植を受けたヒトに投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をヒト高齢者に投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物を老人ホームのヒトに投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物をグループホーム(すなわち、15人以上のヒト対象が居住しているホーム)に居住しているヒトに投与する。

**【0183】**

特定の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる免疫原性組成物を、RSVシーズン、一般に北半球では11月から4月、の前にヒト対象(特定の実施形態では、ヒト対象はヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児である)に投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる免疫原性組成物を、RSVシーズン中、一般に北半球では11月から4月にヒト対象(特定の実施形態では、ヒト対象はヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児である)に投与する。別の実施形態では、生弱毒RSV(例えば、rA2cp248/404/1030SH)を含んでなる免疫原性組成物を、RSVシーズン、一般に北半球では11月から4月の前と期間中に、ヒト対象(特定の実施形態では、ヒト対象はヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児である)に投与する。

**【0184】**

ある実施形態では、生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、ウイルス感染からの完全な保護をもたらさず、ウイルスを投与した際に非処理対象に比べて低いウイルス力価をもたらす。ある実施形態では、生弱毒精製ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物の投与は、ウイルスを投与した際に非処理対象に比べて、ウイルス力価に0.5倍、1倍、2倍、4倍、6倍、8倍、15倍、25倍、50倍またはそれを超える低減をもたらす。いくつかの実施形態では、生弱毒ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物の投与は、ウイルスを投与した際に非処理対象に比べて、ウイルス力価に10%、好ましくは、25%、50%、75%またはそれを超える低減をもたらす。ウイルス力価の低減の利益としては、限定されるものではないが、ウイルス感染の症状の重篤度の軽減、ウイルス感染の症状の減少およびウイルス感染の長さの短縮が含まれる。

**【0185】**

生弱毒キメラ細胞隨伴性ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、非ウイルス抗原に対する免疫応答を誘導するために使用することができる。生弱毒キメラ細胞隨伴性ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、疾患を予防および/または治療するために対象に着目するタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを送達するために使用することができる。

**【0186】**

本明細書に記載されている免疫原性組成物、例えば、ワクチン処方物を導入するために

10

20

30

40

50

は多くの方法が使用可能であり、これらには、限定されるものではないが、鼻腔内、気管内、経口、肺、皮内、腹腔内および非経口（例えば、筋肉内、静脈内および皮下）経路が含まれる。いくつかの実施形態では、生弱毒細胞隨伴性ウイルスを含んでなる本明細書に記載されている免疫原性組成物は、ウイルスの本来の感染経路を介して投与される。特定の実施形態では、生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる免疫原性組成物は鼻腔内投与される。

#### 【0187】

免疫手順では、免疫原性組成物の使用量および免疫計画は当技術分野の熟練医師により決定され、対象の免疫応答および抗体力価を参考に投与される。特定の実施形態では、ヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児に、生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる、一定用量の免疫原性組成物を投与し、この免疫原性組成物用量はおよそ125～200FFUの弱毒RSVを含んでなる。別の実施形態では、ヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児に生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる、一定用量の免疫原性組成物を投与し、この免疫原性組成物用量はおよそ125FFU、およそ150FFU、およそ175FFUまたはおよそ200FFUの弱毒RSVを含んでなる。

#### 【0188】

いくつかの実施形態では、およそ125～200FFUの生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる免疫原性組成物2～6用量をヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児に投与する。いくつかの実施形態では、この用量の免疫原性組成物を1～6か月おいてまたは2～12か月おいて投与する。特定の実施形態では、およそ125～200FFUの生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる免疫原性組成物3用量を2か月おいてヒト小児、ヒト未熟児またはヒト幼児に投与する。例えば、150FFUの生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる免疫原性組成物の1回目の用量を1か月齢未満の小児に投与し、150FFUの生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる免疫原性組成物の2回目の用量をおよそ2か月齢のヒト小児に投与し、150FFUの生弱毒RSV（例えば、r A 2 c p 2 4 8 / 4 0 4 / 1 0 3 0 S H）を含んでなる免疫原性組成物の3回目の用量をおよそ4か月齢のヒト小児に投与する。

#### 【0189】

### 7.7 ウィルス

細胞隨伴性ウイルスは天然ウイルス、突然変異誘発ウイルス（例えば、UV照射、突然変異誘発物質曝露および／または継代培養により変異誘発されたウイルス）、合併結合（セグメント化されたゲノムを有する細胞隨伴性ウイルスの場合）、および／または遺伝子操作ウイルスであり得る。細胞隨伴性RNAウイルスの限定されない例としては、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス、ヒト泡沫状ウイルス、レトロウイルス（HTLVなど）、レンチウイルス（HIVおよびSIVなど）およびレオウイルスが挙げられる。あるいは、細胞隨伴性ウイルスはヘルペスウイルスなどのDNAウイルスである。細胞隨伴性DNAウイルスの限定されない例としては、ヘルペスウイルス、EBV、CMVおよびマレック病ウイルスが挙げられる。ある実施形態では、本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ／または本明細書に記載されている免疫原性組成物中に含有される細胞隨伴性ウイルスは複製欠陥型である。特定の実施形態では、複製欠陥細胞隨伴性ウイルスにおいて、ウイルスゲノム複製および／または合成に必須の1以上の機能が欠損している。別の実施形態では、複製欠陥細胞隨伴性ウイルスにおいて、ウイルス粒子の組み立てに必須の1以上の機能が欠損している。別の実施形態では、複製欠陥細胞隨伴性ウイルスにおいて、ウイルスゲノム複製または合成およびウイルス粒子の組み立てに必須の1以上の機能が欠損している。

#### 【0190】

特定の実施形態では、ある実施形態では、本明細書に記載されているプロセスにより精

10

20

30

40

50

製され、かつ／または本明細書に記載されている免疫原性組成物中に含有される細胞隨伴性ウイルスは弱毒ウイルスである。特定の実施形態では、細胞隨伴性ウイルスは生弱毒ウイルスである。弱毒細胞隨伴性ウイルスは、野生型細胞隨伴性ウイルスに比べて、例えば、ウイルスゲノム複製能の低下、意図される宿主内での複製能の低下、感染性ウイルス粒子を組み立てる能力の低下、および／または宿主細胞感染能の低下を示し得る。細胞隨伴性ウイルスの弱毒化は当業者に既知の任意の方法によって試験することができる。例えば、2004年4月2日付けの米国特許出願第10/831,780号(2005年1月27日に米国特許出願公開第2005/0019891号として公開)、特に「組換えウイルスの弱毒化」と題された第5.7節を参照。いくつかの実施形態では、弱毒ウイルスは、ウイルスの低温継代培養またはUV照射および／または突然変異誘発物質曝露などの周知の突然変異誘発技術を用いて作出される。他の実施形態では、弱毒ウイルスは遺伝子操作される。

10

#### 【0191】

細胞隨伴性ウイルスはキメラウイルスであり得る。特定の実施形態では、キメラウイルスは複製欠陥ウイルスである。特定の実施形態では、キメラウイルスは弱毒ウイルスである。

#### 【0192】

##### 6.7.1 インフルエンザウイルス

本明細書において培養培地、方法、プロセスおよび組成物はワクチン用のインフルエンザウイルスの生産および精製に特に有用である。インフルエンザウイルスはセグメント化された一本鎖RNAゲノムを含む内部リボ核タンパク質と基質タンパク質により裏打ちされた外部リボタンパク質エンベロープから構成される。インフルエンザAおよびインフルエンザBウイルスはそれぞれ一本鎖ネガティブセンスRNAの8つのセグメントを含む。インフルエンザAゲノムは11のポリペプチドをコードする。セグメント1～3は、RNA依存性RNAポリメラーゼを構成している3つのポリペプチドをコードする。セグメント1は、ポリメラーゼ複合体タンパク質PB2をコードする。残りのポリメラーゼタンパク質PB1およびPAは、それぞれセグメント2およびセグメント3によりコードされる。さらに、いくつかのインフルエンザ株のセグメント1は、PB1コード領域内の選択的リーディングフレームから產生される小型のタンパク質PB1-F2をコードする。セグメント4は、感染の際の細胞接着および侵入に関与する血球凝集素(HA)表面糖タンパク質をコードする。セグメント5は、ウイルスRNAに関連する主要な構造成分であるヌクレオキアブシド核タンパク質(NP)ポリペプチドをコードする。セグメント6は、ノイラミダーゼ(NA)エンベロープ糖タンパク質をコードする。セグメント7は、スプライシングの異なるmRNAから翻訳される、M1およびM2と呼ばれる2つの基質タンパク質をコードする。セグメント8は、選択的にスプライシングされるmRNA変異体から翻訳される2つの非構造タンパク質NS1およびNS2をコードする。

20

#### 【0193】

インフルエンザBの8つのゲノムセグメントは11のタンパク質をコードする。最も大きな3つの遺伝子は、RNAポリメラーゼの成分PB1、PB2およびPAをコードする。セグメント4は、HAタンパク質をコードする。セグメント5は、NPをコードする。セグメント6は、NAタンパク質とNBタンパク質をコードする。NBおよびNAの両タンパク質は、ニシストロン性mRNAの重複するリーディングフレームから翻訳される。インフルエンザBのセグメント7もM1およびM2の2つのタンパク質をコードする。最も小さなセグメントは、全長RNAから翻訳されるNS1と、スプライシングされたmRNA変異体から翻訳されるNS2の2つの産物をコードする。

30

#### 【0194】

合併結合ウイルスは、マスターードナーウイルス(MDV)とも呼ばれる認可されたマスター株について、臨床単離物から選択された血球凝集素および／またはノイラミダーゼ抗原を組み込むように作出される。例えば、FluMist(登録商標)は、認可された低温適応、弱毒、温度感受性MDV株(例えば、A/Ann Arbor/6/60およびB

40

50

/ Ann Arbor / 1 / 66) を用いている。マスタードナーウイルスとして使用可能な他の株としては、限定されるものではないが、ca A / Ann Arbor / 6 / 60、ca B / Ann Arbor / 1 / 66、ca A / レニングラード / 134 / 17 / 57、A / Puerto Rico / 8 / 34 (PR8)、ca B / Ann Arbor / 1 / 94、B / レニングラード / 14 / 17 / 55、B / USSR / 60 / 69、およびB / レニングラード / 179 / 86 が挙げられる。

#### 【0195】

合併結合ウイルスの作出には、卵に基づく方法およびより最近では細胞培養物法を含むいくつかの方法が有用である。例えば、PCT国際公開公報WO03/091401; WO05/062820および米国特許第6,544,785号、同第6,649,372号；同第6,951,75号、および米国特許出願第11/455,818号、同第11/455,734号、および同第11/501,067号参照。本発明の培地および方法は、限定されるものではないが、本明細書に開示されているインフルエンザ株および合併結合ウイルスマスターNAウイルスの遺伝子を含んでなる（例えば、ca A / Ann Arbor / 6 / 60、ca B / Ann Arbor / 1 / 66、PR8など）を含むインフルエンザウイルスの生産に有用であると考えられる。さらに、本発明の培地および方法は、以下の表現型：温度感受性、低温適応、弱毒型の1以上を有する合併結合ウイルスを含むインフルエンザウイルスの生産に有用であると考えられる。合併結合は、例えば、同時感染法または所望によりプラスミドレスキュー技術などの従来の合併結合技術によって作出することができる（例えば、PCT国際公開公報WO03/091401およびWO05/062820；米国特許第6,544,785号、同第6,649,372号、同第6,951,754号、同第6,887,699号、同第6,001,634号、同第5,854,037号、同第5,824,536号、同第5,840,520号、同第5,820,871号、同第5,786,199号および同第5,166,057号；米国特許出願公開第20060019350号、同第20050158342号、同第20050037487号、同第20050266026号、同第20050186563号、同第20050221489号、同第20050032043号、同第20040142003号、同第20030035814号および同第20020164770号；ならびにNeumann et al. (1999) Generation of influenza A virus entirely from cloned cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA 96:9345-9350; Fodor et al. (1999) Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. J. Virol 73:9679-9682; Hoffmann et al. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids Proc Natl Acad Sci USA 97:6108-6113; WO01/83794; Hoffmann and Webster (2000), Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids, 81:2843-2847; and Hoffmann et al. (2002), Rescue of influenza B viruses from 8 plasmids, 99(17): 11411-11416参照）。最近、合併結合はMDCK細胞においてプラスミドレスキューにより作出された（例えば、PCT国際公開公報第WO2007/124327号；Wang and Duke; 2007 Oct 23, J. Virol., 4:102参照）。

#### 【0196】

##### 6.7.2 呼吸器合胞体ウイルス

本明細書における方法、プロセスおよび組成物は、ワクチン用のRSVの生産および精製に特に有用である。RSVのグループ、サブグループまたは株（例えば、グループAまたはグループB）は、本明細書に記載されているプロセスにより精製し、かつ／または本明細書に記載されている免疫原性組成物に含有することができる。RSVのグループおよびサブグループに関する考察は、例えば、Sato et al., 2005, Journal of Clinical Microbiology 43: 36-40を参照）。一実施形態では、RSVはグループAに属す。別の実施形態では、RSVはグループBに属す。

#### 【0197】

本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ／または本明細書に記載され

10

20

30

30

40

40

50

ている免疫原性組成物中に含有される RSV は、天然 RSV 株、突然変異誘発 RSV ( 例えば、UV 照射、突然変異誘発物質曝露および / または継代培養により変異誘発されたウイルス ) 、および / または遺伝子操作 RSV であり得る。一実施形態では、RSV ゲノムは、F、G、NS1、NS2、M1 ( オープンリーディングフレーム ( 「 ORF 」 ) 1 ) 、M2 ( ORF 2 ) 、SH2、N、P または L 遺伝子などの 1 以上のウイルス遺伝子に 1 以上の突然変異を含んでなる。いくつかの実施形態では、置換、欠失および / または挿入の組合せが RSV ゲノムに導入される。いくつかの実施形態では、RSV ゲノムは、F、G、NS1、NS2、M1 ( ORF 1 ) 、M2 ( ORF 2 ) 、SH2、N、P または L 遺伝子などの 1 以上のウイルス遺伝子に 1 以上のミスセンス突然変異を含んでなる。いくつかの実施形態では、RSV ゲノムは、NS1、NS2、M1 ( ORF 1 ) 、M2 ( ORF 2 ) 、SH2、N、P または L 遺伝子などの 1 以上のウイルス遺伝子に 1 以上の全欠失または部分的欠失を含んでなる。

#### 【 0198 】

一実施形態では、本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ / または本明細書に記載されている免疫原性組成物中に含有され得る RSV は複製欠陥型である。特定の実施形態では、本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ / または本明細書に記載されている免疫原性組成物中に含有され得る RSV は弱毒型である。ウイルスを弱毒するために RSV ゲノムに導入可能な突然変異の限定されない例としては、例えば、2004年4月2日付けの米国特許出願第 10/831,780 号 ( 2005 年 1 月 27 日に米国特許出願公開第 2005/0019891 号として公開 ) および 2006 年 3 月 24 日出願の米国特許出願第 11/389,618 号 ( 2006 年 6 月 20 日に米国特許出願公開第 2006/0160130 号として公開 ) を参照。弱毒 RSV としては、限定されるものではないが、低温継代培養 ( c p ) 変異株 ( 例えば、参照により本明細書にそのまま組み込まれる Kim et al., 1971, Pediatrics 48: 745-755 に記載されている c p RSV など ) 、温度感受性 ( t s ) 変異株 ( 例えば、Crowe et al., 1993, Vaccine 11: 1395-1404; Crowe et al., 1995, Vaccine 13:847-855; Mills et al., 1971, J Immunol. 107:123-130; and Pringle et al., Vaccine 1993 11:473-478 に記載されている RSV t s - 1 、 RSV t s - 2 、 t s 1 A 、 t s 19 A 、および t s 1 C など ) 、低温継代培養温度感受性 ( c p t s ) 変異株 ( 例えば、 c p t s 248/404 、 c p t s 248/255 、 c p t s 248/955 および c p t s 530/1009 ; 例えば、Karron et al., 1997, J Infect Dis. 176:1428-1436 参照 ) 、および遺伝子操作変異株 ( 例えば、Karron et al., J. of Infect. Diseases 191: 1093-1140; Whitehead et al., 1999, J. Virol. 73: 3438-3442; and Collins et al., 2005, Proc. Am. Thorac. Soc. 2: 166-173 に記載されている r A 2 c p 248/404 SH 、 r A 2 c p 248/404/1030 SH 、 r NS1 、 r M2 - 2 、および r 248 NS2 など ) が挙げられる。

#### 【 0199 】

特定の実施形態では、本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ / または本明細書に記載されている免疫原性組成物中に含有され得る RSV は r A 2 c p 248/404/1030 SH である。この弱毒 RSV は、( i ) 低温継代培養 RSV を弱毒する N 、 F および L タンパク質における 5 つのミスセンス突然変異のセット ; ( i i ) 制限温度を低くし、温度感受性表現型を付与し、ウイルスを弱毒する L タンパク質における独立したミスセンス突然変異である 248 および 1030 修飾 ; ( i i i ) ともにさらなる温度感受性を付与する M2 遺伝子の遺伝子開始転写シグナルにおけるヌクレオチド置換と L タンパク質におけるミスセンス突然変異の組合せである ; および ( i v ) 弱毒表現型を付与する SH 遺伝子全体の欠失である SH を含め、その温度感受性と弱毒特性を担う、複数の弱毒遺伝エレメントを含む。 RSV ゲノムに導入されたアミノ酸置換の位置については下表 1 を参照。

10

20

30

40

## 【表1】

RSVゲノムに導入されたアミノ酸置換

ヌクレオチド置換	アミノ酸置換*	遺伝子	表現型
G1939A	V~I	N	Att
A5895C	E~A	F	Att
C6810T	T~I	F	Att
T7187C	T~C	M2 遺伝子開始	Ts
G9035A, T9036C	C~Y	L	Att
C10570T, A10571T	Q~L	L	ts
T11628G	D~E	L	Ts
T12040A	Y~N	L	Ts
C13147T, T13149C	H~Y	L	Att

\*野生型RSV A2に対するアミノ酸置換

## 【0200】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているプロセスにより精製され、かつ／または本明細書に記載されている免疫原性組成物中に含有され得るRSVは、1以上の異種配列を発現するように操作されている（すなわち、RSVはキメラウイルスである）。異種配列は、例えば、F、G、NS1、NS1、M1（ORF1）、M2（ORF2）、N、P、SH2および／またはLコード配列に導入することができる。RSVが発現するように操作され得る異種配列の限定されない例としては、抗原（例えば、ウイルス抗原、細菌抗原、腫瘍抗原（Robbins and Kawakawi, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 628-636に記載されているものなど）、真菌抗原および寄生虫抗原）、マーカーまたはタグ（例えば、flagタグおよびHisタグ）、キメラタンパク質（例えば、2つの異なるRSV株に由来するRSV Gタンパク質のハイブリッド）、および所望の生物学的特性または活性を有するタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド（例えば、インターフェロン（IFN）-、IFN-、IFN-、IL-2、IL-7、IL-9、IL-15およびIL-22などのサイトカイン）が挙げられる。特定の実施形態では、キメラRSVは弱毒型である。キメラRSVの限定されない例としては、例えば、2004年4月23日付けの米国特許出願第10/831,780号（2005年1月27日に米国特許出願公開第2005/0019891号として公開）および2006年3月2日出願の米国特許出願第11/389,618号（2006年7月20日に米国特許出願公開第2006/0160130号として公開）を参照。

## 【0201】

一実施形態では、RSVは、RSVベクターとは異なるグループ、サブグループまたは株のRSVに属すウイルスに由来する1以上のウイルス抗原を発現するように操作される。例えば、限定されるものではないが、RSVベクターはグループB RSVに由来してもよく、異種配列はグループA RSVに由来してもよい。

## 【0202】

別の実施形態では、RSVはRSV以外のウイルスから得られる、または由来する1以上のウイルス抗原を発現するように操作される。ウイルス抗原の限定されない例としては、アデノウイルス科（例えば、マストアデノウイルスおよびアビアデノウイルス）、ヘルペスウイルス科（例えば、単純ヘルペスウイルス1、単純ヘルペスウイルス2、単純ヘルペスウイルス5、単純ヘルペスウイルス6、エプスタイン-バーウイルス、HHV6-HHV8およびサイトメガロウイルス）、レビウイルス科（例えば、レビウイルス、MS2期エンテロバクター、アロレウイルス）、ポックスウイルス科（例えば、コードポックスウイルス亜科、パラポックスウイルス、アビポックスウイルス、カプリポックスウイルス、レポリポックスウイルス、スイポックスウイルス、モルシポックスウイルスおよびエントモポックスウイルス亜科）、パポバウイルス科（例えば、ポリオーマウイルスおよび乳頭腫ウイルス）、パラミクソウイルス科（例えば、パラミクソウイルス、パラインフルエ

10

20

30

40

50

ンザウイルス1、モビリウイルス(例えば、麻疹ウイルス)、ルプラウイルス(例えば、流行性耳下腺炎ウイルス)、ニューモウイルス亞科(例えば、ニューモウイルス、ヒト呼吸器合胞体ウイルス)、ヒト呼吸器合胞体ウイルスおよびメタニューモウイルス(例えば、鳥類ニューモウイルスおよびヒトメタニューモウイルス)、ピコルナウイルス科(例えば、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス(例えば、ヒトA型肝炎ウイルス)、カルジオウイルス、およびアフトウイルス)、レオウイルス科(例えば、オルトレオウイルス、オルビウイルス、ロタウイルス、シポウイルス、フィジウイルス、フィトレオウイルス、およびオリザウイルス)、レトロウイルス科(例えば、哺乳類B型レトロウイルス、哺乳類C型レトロウイルス、鳥類C型レトロウイルス、D型レトロウイルスグループ、B<sub>L</sub>V-H<sub>T</sub>L<sub>V</sub>レトロウイルス、レンチウイルス(例えば、ヒト免疫不全ウイルス1およびヒト免疫不全ウイルス2(例えば、HIV-gp160)、スマーマウイルス)、フラビウイルス科(例えば、C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルス、西ナイルウイルス)、ヘパドナウイルス科(例えば、B型肝炎ウイルス)、トガウイルス科(例えば、ウイルス(例えば、シンドビスウイルス)およびルビウイルス(例えば、風疹ウイルス))、ラブドウイルス科(例えば、ベシクロウイルス、リッサウイルス、エフェメロウイルス、シトラブドウイルス、およびネクレオラブドウイルス)、アレナウイルス科(例えば、アレナウイルス、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス、イッピーウィルス、およびラッサ熱ウイルス)、およびコロナウイルス科(例えば、コロナウイルスおよびトロウイルス)由来の抗原が挙げられる。特定の実施形態では、ウイルス抗原は、インフルエンザ抗原(例えば、血球凝集素H5およびH7)、メタニューモウイルス抗原、パラインフルエンザウイルス抗原、ニューカッスル病ウイルス抗原、センダイウイルス抗原、および伝染性喉頭気管炎ウイルス抗原(ILV)などの呼吸器疾患をもたらすウイルスに由来する。ある実施形態では、ウイルス抗原は、ヒト1型パラインフルエンザウイルス、ヒト2型パラインフルエンザウイルス、ヒト3型パラインフルエンザウイルスまたはセンダイウイルスに由来する。別の実施形態では、ウイルス抗原は、HIV-gp120、HIV-nef、インフルエンザウイルスノイラミダーゼ、インフルエンザウイルス血球凝集素、H<sub>T</sub>L<sub>V</sub>tax、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質(例えば、gB、gC、gDおよびgE)またはB型肝炎表面抗原、C型肝炎ウイルスEタンパク質またはコロナウイルススパイクタンパク質である。

## 【0203】

別の実施形態では、RSVは、1以上の細菌抗原(例えば、細菌コートタンパク質または細菌に関連する保護抗原)を発現するように操作される。細菌抗原の限定されない例としては、アクワスピリルム科(Aquaspirillum family)、アゾスピリルム科(Azospirillum family)、アゾトバクター科(Azotobacteraceae family)、バクテロイデス科(Bacteroidaceae family)、バルトネラ種(Bartonella species)、デロビブリオ科(Bdellovibrio family)、カンピロバクター種(Campylobacter species)、クラミジア種(Chlamydia species)(例えば、肺炎クラミジア(Chlamydia pneumoniae) )、腸内細菌科(Enterobacteriaceae family)(例えば、シトロバクター種(Citrobacter species)、エドワードシエラ(Edwardsiella)、エンテロバクター・エロゲネス(Enterobacter aerogenes)、エルウィニア種(Erwinia species)、大腸菌(Escherichia coli)、ハフニア種(Hafnia species)、クレブシエラ種(Klebsiella species)、モーガネラ種(Morganella species)、プロテウス・ブルガリス(Proteus vulgaris)、プロビデンシア(Providencia)、サルモネラ菌種(Salmonella species)、レイ菌(Serratia marcescens)、および赤痢菌(Shigella flexneri)、ガードネラ科(Gardinella family)、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、ハロバクテリウム科(Halobacteriaceae family)、ヘリコバクター科(Helicobacter family)、レジオネラ科(Legionellaceae family)、リステリア種(Listeria species)、メチロコッカス科(Methylococcaceae family)、マイコバクテリア(mycobacteria)(例えば、結核菌(Mycobacterium tuberculosis)、ナイセリア科(Neisseriaceae family)、海洋らせん菌科(Oceanospirillum family)、パストレラ科(Pasteurellaceae family)、肺炎球菌種(Pneumococcus species)、シュードモナス種(Pseudomonas species)、リゾビウム科(Rhizobiaceae family)50

y)、スピリルム科(Spirillum family)、スピロソマ科(Spirosomaceae family)、ブドウ状球菌(Staphylococcus)（例えば、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)）およびスタフィロコッカス・ピロゲネス(Staphylococcus pyogenes)）、連鎖球菌(Streptococcus)（例えば、腸炎連鎖球菌(Streptococcus enteritidis)、糞便連鎖球菌(Streptococcus fasciae)、および肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)）、バムピロビブル・ヘリコバクター科(Vampirovibr Helicobacter family)、エルシニア科(Yersinia family)、炭疽菌(Bacillus anthracis)およびバンピロビブリオ科(Vampirovibrio family)に由来する抗原が挙げられる。特定の実施形態では、細菌抗原は、肺炎球菌種(Pneumococcus species)、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、連鎖球菌(Streptococcus)および肺炎クラミジア(Chlamydia pneumoniae)などの呼吸器系疾患を引き起こすか、または関連する細菌に由来する。

#### 【0204】

別の実施形態では、RSVは、病原真菌から得られる、または由来する1以上の真菌抗原を発現するように操作される。真菌抗原の限定されない例としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(Cryptococcus neoformans)；プラストミセス・デルマティティディス(Blastomyces dermatitidis)；アイエロミセス・デルマティティディス(Aielomyces dermatitidis)；ヒストプラズマ・カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)；コクシジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis)；C.アルビカンス(C. albicans)、C.トロピカリス(C. tropicalis)、C.パラブシリシス(C. parapsilosis)、C.ギリエルモンディ(C. guilliermondii)およびC.クルセイ(C. krusei)を含むカンジダ種(Candida species)；煙色コウジ菌(A. fumigatus)、黄色コウジ菌(A. flavus)および黒色コウジ菌(A. niger)を含むアスペルギルス種(Aspergillus species)、クモノスカビ種(Rhizopus species)；リゾムコール種(Rhizomucor species)；カニングハメラ種(Cunninghamella species)；A.サクセナエ(A. saksenaea)、A.ムコール(A. mucor)およびA.アブシディア(A. absidia)を含むアポフィソミセス種(Apophysomyces species)；スプロトリックス・シェンキー(Sporothrix schenckii)、パラコクシジオイデス・ブラシリエンシス(Paracoccidioides brasiliensis)；シードアレシェリア・ボイディー(Pseudallescheria boydii)、トルロプシス・グラプラタ(Torulopsis glabrata)；トリコフィトン種(Trichophyton species)、小胞子菌種(Microsporum species)および皮膚糸状菌種(Dermatophytes species)に由来する抗原が挙げられる。特定の実施形態では、真菌抗原は呼吸器系疾患を引き起こすか、または関連する細菌に由来する病原真菌に由来する。

#### 【0205】

別の実施形態では、RSVは1以上の寄生虫抗原を発現するように操作される。寄生虫抗原の限定されない例としては、アピコンプレクサ門のメンバー、例えば、バベシア(Babesia)、トキソプラズマ(Toxoplasma)、プラスモジウム(Plasmodium)、アイメリア(Eimeria)、イソスボラ(Isospora)、アトキソプラズマ(Atoxoplasma)、シストイソスボラ(Cystoisospora)、ハモンジア(Hammondia)、ベスニオチア(Besniotia)、サルコシスチス(Sarcocystis)、ブレンケリア(Frenkelia)、ヘモプロテウス(Haemoproteus)、ロイコシトゾーン(Leucocytozoon)、タイレリア(Theileria)、パーキンサス(Perkinsus)およびグレガリナ種(Gregarina spp.)など；ニューモシスチス・カリニイ(Pneumocystis carinii)；微胞子虫亜門のメンバー、例えば、ノセマ(Nosema)、エンテロシトゾーン(Enterocytozoon)、エンセファリトゾーン(Encephalitozoon)、セプタタ(Septata)、ムラゼキア(Mrazekia)、アンブリオスボラ(Amblyospora)、アメゾン(Ameson)、グルゲア(Glugea)、ブレイストフォラ(Pleistophora)およびミクロスボリジウム種(Microsporidium spp.)など；およびアスセトスボラ門のメンバー、例えば、ハプロスロビジウム種(Haplosporidium spp.)、ならびに熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)、三日熱マラリア原虫(P. vivax)、卵形マラリア原虫(P. ovale)、四日熱マラリア原虫(P. malaria)を含む種など；トキソプラズマ(Toxoplasma gondii)；メキシコリーシュマニア(Leishmania mexicana)、熱帯リーシュマニア(L. tropica)、大型リーシュマニア(L. major)、エチオピアリーシュマニア(L. aethiopica)、ドノバンリーシュマニア(L. donovani)、クルーズトリパノソーマ(Trypanosoma

10

20

30

40

50

cruzi)、ブルーストリパノソーマ(*T. brucei*)、マンソン住血吸虫(*Schistosoma mansoni*)、ビルハルツ住血吸虫(*S. haematobium*)、日本住血吸虫(*S. japonium*)；旋毛虫(*Trichinella spiralis*)；バンクロフト糸状虫(*Wuchereria bancrofti*)；マレー糸状虫(*Brugia malayi*)；赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)；蟻虫(*Enterobius vermicularis*)；有鉤条虫(*Taenia solium*)、無鉤条虫(*T. saginata*)、脛トリコモナス(*Trichomonas vaginalis*)、腸トリコモナス(*T. hominis*)、口腔トリコモナス(*T. tenax*)；ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)；クリプトスピリジウム・パルヴム(*Cryptosporidium parvum*)；ニューモシティス・カリニイ(*Pneumocytis carinii*)、バベシア・ボビス(*Babesia bovis*)、*B.ダイバージェンス*(*B. divergens*)、*B.ミクロティ*(*B. microti*)、イソスピラ・ベリ(*Iospora bellii*)、*L.ホミニス*(*L. hominis*)；二核アメーバ(*Dientamoeba fragilis*)；回旋糸状虫(*Onchocerca volvulus*)；回虫(*Ascaris lumbricoides*)；アメリカ鉤虫(*Necator americanus*)；十二指腸鉤虫(*Ancylostoma duodenale*)；糞線虫(*Strongyloides stercoralis*)；フィリピン毛頭虫(*Capillaria philippinensis*)；広東住血線虫(*Angiostrongylus cantonensis*)；矮小条虫(*Hymenolepis nana*)；広節裂頭条虫(*Diphyllobothrium latum*)；単包条虫(*Echinococcus granulosus*)、多包条虫(*E. multilocularis*)；ヴェステルマン肺吸虫(*Paragonimus westermani*)、*P.カリエンシス*(*P. caliensis*)；クロノルキス・シネンシス(*Chlonorchis sinensis*)；オピストルキス・フェリネウス(*Opisthorchis felineas*)、*G.ビベリニ*(*G. Viverini*)、肝蛭(*Fasciola hepatica*)、疥癬虫(*Sarcoptes scabiei*)、ヒトジラミ(*Pediculus humanus*)；ケジラミ(*Phthirus pubis*)；およびヒトヒフバエ(*Dermatobia hominis*)に由来する抗原が挙げられる。

10

20

### 【実施例】

#### 【0206】

##### 8. 実施例

以下、本発明を下記の実施例を参照して説明する。これらの実施例は単に例示のための提供されるものであり、本発明はこれらの実施例に何ら限定されず、本明細書に提供される教示の結果として明白となるいずれの、またあらゆる変形を包含するものと解釈されるべきである。当然のことながら、用いられる特定の器具および試薬、サイズ、製造業者などの具体的な列挙または記載は、特に断りのない限り、本発明に対する限定とみなされないと考えられる。さらに、類似の性能を有する他の器具および試薬は容易に置き換える可能であると考えられる。

30

#### 【0207】

##### 8.1 実施例1. 培地および細胞培養プロセス

M D C K 細胞、特に、非腫瘍形成性 M D C K 細胞を高密度まで増殖させるのに有用な無血清培地処方物（例えば、MediV SFM 107、MediV SFM 105）はすでに記載されている（例えば、FL410US および G - FL414US 参照）。しかしながら、これらの無血清培地処方物を、無血清培地に順応させた非腫瘍形成性 M D C K 細胞（例えば、ATCC 受託番号 PTA - 7909 または PTA - 7910）とともに用いた研究では、培地交換を行わなくても合併結合インフルエンザウイルスの妥当なピークウイルス力価（一般に  $10^g_{10}$  FFU / mL として評価される）を得ることができたが、それらのピーク力価は、培地交換（細胞増殖後と感染前（または同時に）増殖培地の一部（例えば、~67%）を除去して感染培地に置き換える）を行った場合に得られたものよりもなお低かったことが明らかになった。さらに、これらのピーク力価を得るには、さらなるプロテアーゼ（TrypLE）が必要であった。培地交換の必要および/またはさらなるプロテアーゼの必要を克服するために、強化培地 MediV SFM 110 を開発した。MediV SFM 110 は 5 倍濃度のビタミン、リノール酸、リポ酸、又クレオシド、ブトレッシンおよび従前に記載されている培地に存在するほとんど全てのアミノ酸を含んでなる（表2 参照）。MediV SFM 110 を用いても、MediV SFM 105 + TE で得られるもの以上には細胞密度は向上されなかった（データは示されていない）。しかしながら、MediV SFM 110 を用いると、0% と 67% の培地交換が同等のウイルス力価を示した。

40

50

## 【0208】

非培地交換（M X）プロセスと、4台のシードリアクターからビーズ間移動（以下の第8.2節に示されている実施例参照）により調製され、MediV SFM 110培地で増殖された細胞を用いた12回の実施の性能を以下に記載する。野生型株A / ウルグアイ由来のH AおよびN Aを含んでなる3つの低温適応（c a）、温度感受性（t s）、弱毒（a t t）型合併結合インフルエンザウイルス株（識別子「c a」で始まる野生型株の表記で表される）を2 L規模で生産したところ、3つ全ての株が少なくとも $8.41 \log_{10}$  FFU / mLの力価でウイルスを生産した。 $1 \times DPBS$ 洗浄を用いたビーズ間移動およびTrypLE selectおよびEDTA（pH 8.0）を用いたトリプシン処理の後には、シードリアクター中の細胞の適切な解離と最終生産リアクター（FPR）中での細胞の接着が見られた。感染の際、最適な回収時間を決定するためにこれらの細胞を定期的にサンプリングした。ピークウイルス力価は全てのウイルス種で感染3日後（d p i）に見られることが分かった。これらの各株について4回の実験を行って結果の再現性を確認し、これらのデータは互いに一致した。c a A / ウルグアイ / 716 / 2007は感染3日後（d p i）に $8.7 \pm 0.05 \log_{10}$  FFUの最大力価をもたらし、c a A / サウスダコタ / 6 / 2007およびc a B / フロリダ / 4 / 2006のピーク力価は3 d p iにおいてそれぞれ $8.8 \pm 0.01 \log_{10}$  FFU / mLおよび $8.45 \pm 0.25 \log_{10}$  FFU / mLであった。

## 【0209】

これらの実験からのデータの再現性は、非培地交換プロセスがロバストなプロセスであることを示す。よって、強化培地は培地または成分の交換または添加のいずれを行わなくても生産性を維持した。従って、強化培地の開発および使用により、培地交換 / 補給の必要という、細胞培養に基づくインフルエンザワクチンの生産における最も興味深い操作上の問題の1つが克服された。

## 【0210】

## 8.1.1 材料および方法

材料、試薬および器具：類似の性能を有する他の材料、器具および試薬は容易に置き換えが可能である。

## 【0211】

1. ダルベッコの改変イーグル培地（D MEM）/ Ham F 12 (Gibco, Grand Island, NY, カタログ番号ME080012)
2. MilliQまたはWFI Water
3. MediV SFM 110 塩基粉末(Gibco, Grand Island, NY, カタログ番号ME080045)
4. グルコース(Invitrogen, Carlsbad, California, カタログ番号15023-021)
5. 亜セレン酸ナトリウム(Sigma, St. Louis, MO, カタログ番号6607-31) ?
6. L - グルタミン(Gibco, Grand Island, NY, カタログ番号25030-081)
7. CD脂質（100X）(Gibco, Grand Island, NY, カタログ番号11905-031)
8. コムギペプトン(Organotechnie, SAS, La Courneuve, France, カタログ番号19559)
9. インスリン(Serological, Norcross, GA, カタログ番号 4506)
10. T3 (Sigma, St. Louis, MO, カタログ番号T5516)
11. ヒドロコルチゾン(Mallinckrodt, Phillipsburg, NY, カタログ番号8830(-05))
12. プロスタグラジンE1 (Sigma, St. Louis, MO, カタログ番号P7527)
13. EG F (Sigma, St. Louis, MO, カタログ番号E9644)
14. クエン酸鉄（III）アンモニウム(J T Baker, Phillipsburg, NJ, カタログ番号1980-01)
15. トロポロン(Sigma, St. Louis, MO, カタログ番号T89702-5G)
16. 微量元素A (Cellgro/Mediatech, Manassas, VA, カタログ番号99-182-cl)
17. 微量元素B (Cellgro/Mediatech, Manassas, VA, カタログ番号99-175-cl)
18. 微量元素C (Cellgro/Mediatech, Manassas, VA, カタログ番号99-176-cl)

19. 重炭酸ナトリウム(Invitrogen, Carlsbad, California, カタログ番号91425/87-50  
67)
20. ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水( D P B S ) pH - 7 . 4 (Invitrogen, Carls  
bad, California, カタログ番号14190-367) )
21. E D T A - D P B S 溶液バッグ(Gibco カタログ番号14190-367)
22. 0 . 5 M E D T A pH 8 (Gibco, Grand Island, NY, カタログ番号15575-038)
23. 0 . 2 μm s t e r i c u p フィルター(Millipore, Bedford, MA, カタログ  
番号SCGPU05RE)
24. T r y p L E S e l e c t (Gibco, Grand Island, NY, カタログ番号12563)
25. リママメ阻害剤(Worthington, Lakewood, NJ, カタログ番号LS002829) 10
26. C y t o d e x 3 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, カタログ番号17-0485  
-03)
27. スクロースリン酸(Hyclone, Logan, UT, カタログ番号SH3A1578-01)
28. 1 0 - 2 0 L 無菌バッグ(SAFC Biosciences JRH, Lenexa, Kansas, 1329B)
29. 回転瓶(Corning, Corning, NY, カタログ番号 3907)
30. N a O H 1 M 溶液(EMD, Darmstadt, Germany, カタログ番号 1071)
31. 0 . 2 μm無菌フィルター(Corning, Corning, NY, カタログ番号 430320, 430767  
)
32. 1 m L 、 5 m L 、 1 0 m L 、 2 5 m L 、 5 0 m L ピペット(それぞれVWR, Brisbane  
, CA, カタログ番号53284-700, 53283-704, 708,710) 20
33. 5 m L 吸引ピペット(VWR, Brisbane, CA, カタログ番号 53392-044)
34. 1 . 8 m L エッペンドルフ管(USA Scientific, Ocala FL, カタログ番号 1415-551  
0)
35. マイクロピペットチップ(Art Molecular Bioproducts, San Diego CA, カタログ番  
号 20E, 200Eおよび1000E)
36. スクロースリン酸 1 0 ×(Hyclone, Logan, UT, カタログ番号SH3A1578-01)
37. A p p l i k o n コントローラーユニット(Applikon Biotechnology, Foster City  
, CA Models: ADI 1010, ADI 1025)
38. 3 L ガラス容器およびヘッドプレート(Biotechnology, Foster City, CA)
39. 2 . 5 " A 3 1 0 回転翼(Lightnin, Rochester, NY) 30
40. 6 0 m m マリンインペラー(Applikon Biotechnology, Foster City, CA)
41. 4 5 m m マリンインペラー(Applikon Biotechnology, Foster City, CA)
42. 蠕動ポンプ(Watson Marlow Bredel Pump, Wilmington, MA, Model 520S/R)
43. バイオセーフティーキャビネット(The Baker Company, Sanford, ME, SG-600)
44. 回転瓶インキュベーター(Bellco Biotechnology, Vineland, NJ, Model 7630-8058  
9)
45. 水浴(Boekel Grant, West Chester, PA, PB-1400)
46. ヌクレオカウンター(New Brunswick Scientific, Edison, NJ, M1293-0000)
47. B i o p r o f i l e 4 0 0 (Nova Biomedical, Waltham, MA, Bioprofile 400)
48. 顕微鏡(Zeiss, Thornwood, NY, Axiovert 25) 40
49. デジタルカメラ(Nikon, Melville, NY, Model E5400)
50. マイクロピペット(Labsystem, Boston, MA, 型番P2-20, P100, P200, P1000)
51. ピペットエイド(Drummond, Broomall, PA, カタログ番号 4-000-100)
52. C O<sub>2</sub> 振盪フラスコインキュベーター(ATR Biotech, Laurel, MD, Model AJ118)
- 細胞供給源 : Process Development Bank ( P D B ) 由來の無  
血清M D C K クローン I D 9 B 9 - 1 E 4 細胞を回転瓶にて、微量元素 A 、 B および C  
または M e d i V S F M 1 0 9<sup>4</sup> を含む M e d i V S F M 1 0 5 を用いて培養した。  
微量元素 A 、 B および C を含む M e d i V S F M 1 0 5 の組成は、 M e d i V S F M  
1 0 5 は液体から作製され、 M e d i V S F M 1 0 9 は粉末から作製されること以外は  
、 M e d i V S F M 1 0 9 培地と同様である。細胞を通常、 2 回の D P B S 洗浄を行 50

わなかつこと以外はS O P D 0 2 0 0<sup>5</sup>通りに播種後3～4日おきに継代培養した。

【0212】

ウイルスシード：このプロセスは2008/2009 Flumist（登録商標）季節性株：A / ウルグアイ / 716 / 2007（ロット番号nb3903pg94、141900675A）、A / South Dakota / 6 / 2007（ロット番号141900666）、およびB / フロリダ / 4 / 2006（141900641A）を用いて開発した。これらのシードは全て卵で生産した。プラスミドレスキュー法（例えば、Wang and Duke; 2007 Oct 23, J. Virol., 4:102; Hoffmann, et al., 2000, PNAS, 97(11):6108-13; およびHoffmann, et al., 2002, PNAS, 99(17):11411-6参照）を用いた細胞培養物で生産されたシードウイルスでも同様の結果が得られている。10

【0213】

培養培地：これらの実施では、1倍微量元素A、BおよびCおよび計4.5g/LのD-グルコースを含むMediV SFM 105または計4.5もしくは9.0g/LのD-グルコースを含むMediV SFM 109をそれぞれ回転瓶およびシードリアクター（SR）実施に関する全ての通常細胞継代培養に用いた。最終生産リアクター（FPR）実施には計9.0g/LのD-グルコースを含むMediV SFM 110培地を用いた。播種条件および予想に応じて、D-グルコース濃度は約4.5～約9.0g/Lの間に調整すればよい。各培養培地の組成を表2に詳細に示す。

【表2】

MediV SFM培地の処方

	MediV SFM 105 + TE <sup>d</sup>	MediV SFM 109	MediV SFM 110
成分 <sup>a</sup>	mg/L	mg/L	mg/L
塩化カルシウム、無水	116.6	116.6	116.6
塩化マグネシウム	28.64	28.64	28.64
硫酸マグネシウム、無水	48.84	48.84	48.84
塩化カリウム	311.8	311.8	311.8
塩化ナトリウム <sup>c</sup>	6999.5	6999.5	3500
リン酸ナトリウム、第一、一水和物	62.5	62.5	62.5
リン酸ナトリウム、第二、無水	71.02	71.02	71.02
微量元素			
<i>NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub></i>	0.00065	0.00065	0.00065
<i>AgNO<sub>3</sub></i>	0.00017	0.00017	0.00017
塩化アルミニウム $6H_2O$	0.0012	0.0012	0.0012
<i>Ba (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub></i>	0.00255	0.00255	0.00255
塩化カドミウム ( <i>CdCl<sub>2</sub></i> )	0.00228	0.00228	0.00228
塩化クロム ( <i>CrCl<sub>3</sub></i> 、無水) 化	0.00032	0.00032	0.00032
塩化コバルト $6H_2O$	0.00238	0.00238	0.00238
硫酸銅 ( <i>II</i> )、五水和物	0.0029	0.0029	0.0029
クエン酸鉄 ( <i>III</i> )	1.1551	1.1551	1.1551
硝酸鉄 ( <i>III</i> )、九水和物	0.05	0.05	0.05
クエン酸鉄 ( <i>III</i> ) アンモニウム ( <i>FAC</i> )	0.2	0.2	0.2
硫酸第一鉄、七水和物	0.417	0.417	0.417
<i>GeO<sub>2</sub></i>	0.00053	0.00053	0.00053
<i>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</i>	0.00017	0.00017	0.00017
モリブデン酸アンモニウム塩	0.00124	0.00124	0.00124
硫酸ニッケル ( <i>NiSO<sub>4</sub> 6H<sub>2</sub>O</i> )	0.00013	0.00013	0.00013
臭化カリウム	0.00012	0.00012	0.00012
ヨウ化カリウム	0.00017	0.00017	0.00017
塩化ルビジウム	0.00121	0.00121	0.00121
亜セレン酸ナトリウム	0.0173	0.0173	0.0173
亜セレン酸ナトリウム、五水和物	0.00263		
フッ化ナトリウム	0.0042	0.0042	0.0042
メタケイ酸ナトリウム $9H_2O$	0.14	0.14	0.14
塩化スタンナン (塩化スズ- <i>SnCl<sub>2</sub></i> )	0.00012	0.00012	0.00012
硫酸亜鉛、七水和物	1.295	1.295	1.295
<i>ZrOCl<sub>2</sub> 8H<sub>2</sub>O</i>	0.00322	0.00322	0.00322

【0214】

ヌクレオシド <sup>a</sup>			
ヒポキサンチン、Na 塩	2.39	2.39	11.95
チミジン	0.365	0.365	1.825
アミノ酸 S <sup>b</sup>			
L-アラニン	4.45	4.45	22.25
L-アルギニン HC1	147.5	147.5	737.5
L-アスパラギン H <sub>2</sub> O	7.5	7.5	37.5
L-アスパラギン酸	6.65	6.65	33.25
L-システイン HC1 H <sub>2</sub> O	17.56	17.56	87.8
L-シスチン 2HC1	31.29	31.29	156.45
L-グルタミン酸	7.35	7.35	36.75
L-グルタミン	584	584	584
グリシン	18.75	18.75	93.75
L-ヒスチジン HC1 H <sub>2</sub> O	31.48	31.48	157.4
L-イソロイシン	54.47	54.47	272.35
L-ロイシン	59.05	59.05	295.25
L-リシン HC1	91.25	91.25	456.25
L-メチオニン	17.24	17.24	86.2
L-フェニルアラニン	35.48	35.48	177.4
L-プロリン	17.25	17.25	86.25
L-セリン	26.25	26.25	131.25
L-トレオニン	53.45	53.45	267.25
L-トリプトファン	9.02	9.02	45.1
L-チロシン 2Na	55.79	55.79	278.95
L-バリン	52.85	52.85	264.25
ビタミン <sup>b</sup>			
d-ビオチン (vit B <sub>7</sub> および vit H)	0.0035	0.0035	0.0175
パントテン酸D-カルシウム	2.24	2.24	11.2
塩化コリン	8.98	8.98	44.9
シアノコバラミン (vit B <sub>12</sub> )	0.68	0.68	3.4
葉酸	2.65	2.65	13.25
ミオイノシトール	12.6	12.6	63
ナイアシンアミド	2.02	2.02	10.1
ピリドキシン HC1 (vit B <sub>6</sub> )	2.031	2.031	10.155
リボフラビン (vit B <sub>2</sub> )	0.219	0.219	1.095
チアミン HC1 (vit B <sub>1</sub> )	2.17	2.17	10.85
脂肪酸 S <sup>b</sup>			
α リノール酸	0.042	0.042	0.21
α DL-α リポ酸	0.105	0.105	0.525

その他			
ブトレッシン <sup>b</sup> 、2HCl	0.081	0.081	0.405
重炭酸ナトリウム	2200	2200	4400
ピルビン酸ナトリウム	55	55	55
トロポロン	0.25	0.25	0.25
グルコース <sup>c</sup>	≥4500	≥4500	≥4500
インスリン	5	5	5
T3	0.000003367	0.000003367	3.367E-06
PGE1	0.025	0.025	0.025
ヒドロコルチゾン	0.01812	0.01812	0.01812
EGF	0.005	0.005	0.005
コムギペプトン	2500	2500	2500
CDLC保存溶液(成分は下記)	1X	1X	1X
アラキドン酸	0.02	0.02	0.02
コレステロール	2.2	2.2	2.2
酢酸DL- $\alpha$ -トコフェロール	0.7	0.7	0.7
リノール酸	0.1	0.1	0.1
リノレン酸	0.1	0.1	0.1
ミリスチン酸	0.1	0.1	0.1
オレイン酸	0.1	0.1	0.1
パルミチン酸	0.1	0.1	0.1
パルミトレイン酸	0.1	0.1	0.1
プロロニックF68	1000	1000	1000
ステアリン酸	0.1	0.1	0.1
Tween 80	22	22	22
最終pH			7.3

<sup>a</sup> DMEM/F12に見られない成分は斜体で示す。<sup>b</sup> DMEM/F12に見られ、MediV SFM 110において強化された成分<sup>c</sup> 浸透圧を維持するためにMediV SFM 110では濃度を低減<sup>d</sup> 微量元素A、BおよびC<sup>e</sup> グルコースは少なくとも4.5g/Lの終濃度で存在し、最大約9.0g/Lの終濃度まで補給可能である。

【表3】

1000倍微量元素溶液A、BおよびC

微量元素溶液A		微量元素溶液C	
成分	mg/L	成分	mg/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.60	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.20
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	863.00	AgNO <sub>3</sub>	0.17
亜セレン酸・2Na	17.30	Ba(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	2.55
クエン酸鉄(III)	1155.10	KBr	0.12
微量元素溶液B		CdCl <sub>2</sub>	2.28
成分	mg/L	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.38
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.17	CrCl <sub>3</sub> (無水)	0.32
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	140.00	NaF	4.20
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.65	GeO <sub>2</sub>	0.53
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.13	KI	0.17
SnCl <sub>2</sub> (無水)	0.12	RbCl	1.21
モリブデン酸、アンモニウム塩	1.24	ZrOCl <sub>2</sub> ·8H <sub>2</sub> O	3.22

10

20

30

40

50

【表4】

化学的に定義された脂質(CDCL)100倍溶液

成分	FW	mg/L
アラキドン酸	304.5	2
コレステロール	387	220
酢酸DL- $\alpha$ -トコフェロール	473	70
リノール酸	280	10
リノレン酸	278.43	10
ミリスチン酸	228.37	10
オレイン酸	282.46	10
パルミチニン酸	256.42	10
パルミトレイン酸	254.41	10
ブルロニック F68		100000
ステアリン酸	284.48	10
Tween 80		2200

10

## 【0216】

バイオリアクター条件および方法： 全ての実験で、シードリアクター(SR)からの1 : 8分割内容物を用い、FPRに接種し、2008/2009季節性ウイルスの合併結合体ca A / ウルグアイ、ca A / サウスダコタおよびca B / フロリダに感染させた。プロセスのロバスト性を保証し、変動を取り込むため、同じ条件でいくつかのFPRを実施した。最初に、培地交換(MX)と非培地交換(No-MX)プロセスを並行して比較するため、各実験に2008/2009ウイルスの1つを用いて3つの実験を行った。最初の3つの実験ではそれぞれ、2回の2L FPRを同じ条件で反復して行い、感染時に培地交換を行わず、プロセスの変動を取り込むために同じウイルス株に感染させた。このようにして、計6×2LのバイオリアクターにSRからの1 : 8分割細胞培養内容物を接種し、非培地交換プロセスで3種類の2008/2009季節性ウイルス株の全てに感染させた。

20

## 【0217】

最後の2つの実験は、08/09株での非培地交換プロセスの性能についてさらなるデータを作製するために行った。第4の実験では、1×2L SRから3×2L FPRに接種し、3つ全ての季節性ウイルス合併結合型に感染させた。実験5は、同じ条件を用いて実験

30

を繰り返したものである。この実験は、非培地交換プロセスの性能評価を目的にプロセスの変動を取り込むために繰り返した。

## 【0218】

各実験で感染に用いたウイルス株およびFPRの接種に用いた細胞供給源を表5に示す。

40

## 【表5】

最終生産リアクター(FPR)感染に用いたウイルス株および細胞供給源

実験	細胞供給源 (SR)	FPR	感染ウイルス		
実験1	SR1	FPR1.1.1	A/ウルグアイ	10	
		FPR1.1.2	A/ウルグアイ		
実験2	SR2	FPR2.2.1	A/サウスダコタ		
		FPR2.2.2	A/サウスダコタ		
実験3		FPR3.2.1	B/フロリダ		
		FPR3.2.2	B/フロリダ		
		FPR4.3.1	A/ウルグアイ		
実験4	SR3	FPR4.3.2	A/サウスダコタ		
		FPR4.3.3	B/フロリダ		
		FPR5.4.1	A/ウルグアイ		
実験5	SR4	FPR5.4.1	A/サウスダコタ		
		FPR5.4.3	B/フロリダ		

## 【0219】

20

シードリアクター(SR)：全ての実験で、細胞をシードバイオリアクターにて、微量元素A、BおよびCを含有するMediV SFM 105培地(MediV SFM 105 + TE)またはMediV SFM 109培地中、2g/LのCytoode × 3微小担体を用い、2Lまたは5Lのいずれかで増殖させた。微量元素A、BおよびCを含むMediV SFM 105の組成は、MediV SFM 105が液体から作製され、MediV SFM 109が粉末から作製され、含む亜セレン酸ナトリウムが少ないこと以外は、MediV SFM 109培地とほぼ同じである。グルコースおよびグルタミン濃度はそれぞれ9.0g/Lおよび4mMであった。これらの容器に実験1～3では $1.35 \times 10^5$ 細胞/mLを、実験4および5では $1.8 \times 10^5$ 細胞/mLを接種した。SRの溶存酸素(D.O.)は、純粋な酸素とN<sub>2</sub>の組合せを一定合計流0.02vvmで用い、50%に維持した。pH制御は、全てのSRについて、CO<sub>2</sub>と1N NaOHの双方を用いて両側で行った。実験1および実験2では、SRの作業容量はそれぞれ2Lおよび5Lであった。双方ともマリンインペラーや1枚を備え、175RPMで攪拌した。実験3および4では、SRの作業容量は2Lであった。双方ともライトニンインペラーや2機を備え、175RPMで攪拌した。細胞増殖および代謝に対する回転翼および作業容量の影響はこの試験範囲では無視できるものである。最初の3つの実験では、SRに22.5細胞/MCを接種した。より良い細胞増殖を達成するために、実験4および5のSRには30細胞/MCを接種した。各FPRをその個々のSRとともに示す実験計画を表5に示し、各SRについて作業条件を表6に示す。播種4日後、SRの攪拌機、ガス流およびD.O.および温度制御をオフにし、微小担体を沈降させ、細胞を洗浄し、本質的に以下の第8.2節に示される実施例に詳説されているように、バイオリアクターの作業容量の2分の1に、10×TryptpLE pH 8を添加してトリプシン処理を施した。SRの内容物に、表7に明示されているようなB2B移行プロトコールを用いてトリプシン処理を施した。

30

## 【0220】

最終生産リアクター(FPR)：次に、シードリアクター内容物をフィードボトルに汲み入れ、この細胞の125mLを用いて、1:8分割にてFPRに接種した。FPR中の細胞は、9.0g/Lグルコース濃度を含有するMediV SFM 110培地で増殖させた。2L FPRガラス容器は2機のライトニンインペラーを備えており、175RPMで攪拌した。D.O.は、0.02vvmの合計流方式で50%空気飽和に制御した

40

50

(O<sub>2</sub>ガスとCO<sub>2</sub>ガスからN<sub>2</sub>ガスの供給量を算出し(N<sub>2</sub> = 40 - O<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub>)、一定合計流40mL/分を維持した)。pH制御は、全てのFPRについて、CO<sub>2</sub>と1N NaOHの双方を用いて両側で行った。増殖期および感染期の温度はそれぞれ37および33に制御した。FPR用のウイルス株を表5に示し、FPRの増殖期および感染期のプロセス条件を表8に示す。

【表6】

## シードリアクター(SR)のプロセス条件

パラメーター設定点	制御量				10
	SR1	SR2	SR3	SR4	
グルコース(g/L)	9.0	9.0	9.0	9.0	
最初の細胞/微小担体(λ)	22.5	22.5	30	30	
最終作業容量(L)	2	5	2	2	
微小担体(MC)濃度(g/L)	2	2	2	2	
溶存酸素	50	50	50	50	
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	
増殖温度(℃)	37	37	37	37	
攪拌翼の数/タイプ	1/マリン	1/マリン	2/ライトニン	2/ライトニン	
攪拌(RPM)	175	175	175	175	
pH制御	1N NaOHおよびCO <sub>2</sub> を使用				
合計流(実施中一定)(mL/分)	40	40	40	40	20
使用培地	微量元素A, B, Cを含むSFM105	SFM109	SFM109	SFM109	

【表7】

## ビーズ間プロトコールを用いる場合のトリプシン処理条件

工程	明細および設定点	値	単位
1.	培地の除去	80	%
2.	初期作業容量に0.5mMのEDTA/DPBS洗浄溶液を添加	80	%
3.	初期設定への攪拌の開始	15 ± 5	分
4.	MCを沈降させるために攪拌を停止	15 ± 5	分
5.	培地およびDBPSの除去	80	%
6.	初期作業容量の半分に0.5mMのEDTA/DPBS洗浄溶液を添加	50	%
7.	攪拌速度の設定	250	RPM
8.	初期設定へのDOおよび温度制御の開始	50, 37	%, °C
9.	コントローラーでpH設定を調節	8.0	pH
10.	10倍TrypLE Selectの添加(残量に対する倍率)	0.05	X
11.	トリプシン処理の時間	50 ± 10	分

## 【表8】

最終生産リアクター(FPR)のプロセス条件	
パラメーター設定点	FPRs
最終作業容量(L)	2
最終微小担体(MC)濃度(g/L)	2
細胞供給源	B2B SR
分割比	1:8
ビーズ間移動後のSR内容物の容量(mL) <sup>#</sup>	125
溶存酸素	50
pH	7.4
pH制御	1N NaOHおよびCO <sub>2</sub> を使用
攪拌(RPM)	175
最終増殖培地グルコース濃度(g/L)	9.0
増殖温度(°C)	37
培地	SFM110
感染温度(°C)	33
10倍TrypLE select濃度(X)	0.03

<sup>#</sup>ビーズ間移動プロセスの際に細胞内容物は2倍に濃縮される。よって、postビーズ間移動後の125mLは、ビーズ間移動前の250mLに相当する。

## 【0221】

10

分析手順：容器のサンプリングを毎日行った。スクレオカウンターを用いて細胞を数え、細胞の形態を調べるたまに顕微鏡を用いて10倍で写真を撮影した。pH、pO<sub>2</sub>、pCO<sub>2</sub>およびグルコース濃度、乳酸、グルタミンおよびアンモニウムを、Nova Bioprofile 400 Analyzerを用いて毎日モニタリングした。オンライン値とオフライン値の差が0.03pH単位よりも大きくなった場合には、バイオリアクターのpH再較正を行った。感染したサンプルを10倍スクロースリン酸(SP)で安定化させ、分析まで-80で冷凍した。ウイルス複製の進行は、本質的に下記のように、フォーカル蛍光アッセイ(FFA)によりウイルス感染度を測定することによって分析した。

30

## 【0222】

フォーカル蛍光アッセイ(FFA)：MDCK細胞を96ウェルプレートにて、MEM/EBSS+1倍非必須アミノ酸+2mMグルタミン+PEN/Strep(VGM)中、36±1、5±2%CO<sub>2</sub>で密集するまで(~4日)増殖させる。次に、VGMを除去し、細胞を新鮮なVGMで洗浄した後、VGMで連続希釈した(例えば10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>...10<sup>-7</sup>)100μLのウイルス接種物(例えば、ca A/ウルグアイ、ca A/サウスダコタおよびca B/フロリダ)に感染させ、33±1、5±2%CO<sub>2</sub>でおよそ19~20時間インキュベートする。各ウイルス希釈液を3反復で細胞に接種する。33±1、5±2%CO<sub>2</sub>でおよそ19~20時間インキュベートした後、以下の手順に従い、サンプルのウイルス力価を求めるため、細胞を抗インフルエンザ抗体で免疫染色する。ウイルスを含有する細胞培養培地を各プレートから除去し、200μl/ウェルのDPBSで洗浄した後、100μLの冷4%パラホルムアルデヒド中、室温で15±3分固定する。次に、これらのプレートを250μl/ウェルの1倍リン酸緩衝生理食塩水+0.05%Tween 20(TPBS)で2回洗浄した後、細胞をA株またはB株のいずれかに特異的な一次抗体とともにインキュベートする。一次抗体を1倍PBS中、0.1%サポニン、1%BSAおよび0.1%アジ化ナトリウム(SBSA)で所望の希釈率まで希釈する。37±1で60±5分インキュベートした後、一次抗体を除去する。細胞を250μL TPBSで3回洗浄し、SBSAで所望の希釈率に調製した蛍光色素コンジュゲート二次抗体(例えば、FITCで標識されたウサギ抗ヒツジ)をウェルに加える。37±1で60±5分インキュベートした後、二次抗体を除去し、プレ-

40

50

トを上記のように2回、ナノウォーターで2回洗浄した後、ペーパータオルでプロットドライ(blot-drying)する。次に、暗所、室温で少なくとも10分間、蓋を外してプレートを風乾する。倒立蛍光顕微鏡を用い、総倍率100倍で蛍光シグナルを可視化する。S P O Tプログラムなどの画像ソフトウェアを用いて画像を採取する。一般に、各ウェルの中央バンドを調べ、全ての感染巣を数え、8~120個の感染巣を持つウェルのみを数える。計数した各ウェルについて $10g_{10} \text{ FFU/mL}$ を算出し、3つのウェルの平均値および標準偏差を算出する。

### 【0223】

#### 8.1.2 結果および考察

最初の3つの実験と後の2つの実験のシードバイオリアクターについてそれぞれ22.5および30細胞/微小担体(MC)を細胞に接種した。図1は、全ての実験のSRについて、生細胞密度(VCD)と細胞生存率(V%)をプロットしたものである。播種4日後、シードリアクターの細胞密度は94万~114万細胞/mLの範囲となった。この細胞密度の差はおそらく接種細胞濃度22.5と30細胞/MCの差のためであった。22.5および30細胞/MCを接種したSRにおける播種4日後(dps)の細胞密度はそれぞれ $0.95 \pm 0.01$ および $1.12 \pm 0.024$  100万細胞/mLであった。全てのバイオリアクターの細胞生存率は90%を超えていた。培養4日後、シードリアクターにおいて $1 \times 0.5 \text{ mM EDTA-DPBS}$ 洗浄および10倍TrypLE selectを用いたビーズ間移動を行い、細胞をトリプシン処理した。トリプシン処理は、間にサンプリングして顕微鏡下で細胞の解離を観察しながら、30+/-10分続けた。約30~40分トリプシン処理を行った後、およそ90%の細胞がMCから解離し、図2に示されるように単細胞として見られた。これらのトリプシン処理細胞を用い、全ての実験について分割比1:8で最終バイオリアクターに接種を行った。全てのFPRの細胞増殖を図3にプロットした。実験2では全てのFPRのVCDが播種4日目に $0.6 \times 10^6$ 細胞/mL未満であり、これらのFPRの細胞培養は遅滞期が長かったことから、これらの細胞は播種4日後ではなく播種5日後に感染させた。さらに、実験4のFPRでは感染後のVCDデータが得られなかった。最後に、実験5では、 $0.5 \times 10^6$ 細胞/mL未満の低いVCDであったにもかかわらず、播種4日後にFPRを感染させた。FPRでは、細胞増殖期中、生存率は90%を超えた。

### 【0224】

全てのFPRについて感染時点の細胞密度を表9に記録する。生細胞密度には大きなならつきが見られた。それは $0.44 \sim 1.12 \times 10^6$ 細胞/mLの範囲であった。この差は細胞計数の誤差に関連するものであった。SRおよびFPR双方の平均VCDを表10に記録する。播種4日後、SRおよびFPRの平均VCDはそれぞれ約 $1.12 \times 10^6$ 細胞/mLおよび $0.73 \times 10^6$ 細胞/mLである。

10

20

30

【表9】

全てのFPR bについての感染時の生細胞密度（単位： $\times 10^6$ 細胞/mL）		
実施	感染時のVCD ( $\times 10^6$ 細胞/mL)	播種後日数
FPR1. 1. 1	1.12	4
FPR1. 1. 2	0.98	4
FPR2. 2. 1	0.56	4
FPR2. 2. 2	0.66	4
FPR3. 2. 1	0.68	5
FPR3. 2. 2	0.44	5
FPR4. 3. 1	1.09	4
FPR4. 3. 2	0.69	4
FPR4. 3. 3	1.07	4
FPR5. 4. 1	0.51	4
FPR5. 4. 2	0.51	4
FPR5. 4. 3	0.44	4

10

【表10】

## 全てのSRおよびFPRについての平均生細胞密度

20

播種 22.5 細胞/ MC の SRs w/λ 0.95 ± 0.01

播種4日後の平均 VCD  
( $\times 10^6$ 細胞/mL) 30 細胞/ MC の SRs w/λ 1.12 ± 0.024感染時の平均 VCD  
( $\times 10^6$ 細胞/mL) 非MXプロセスを用いたFPR 0.73 ± 0.026

【0225】

30

トリプシン処理後、FPR内の細胞は播種0日後に微小担体ビーズに接着し、その後、微小担体ビーズの表面で増殖を始めた。微小担体の大部分が細胞で覆われ、播種4日後にはいくつかのビーズだけが空白で残った（細胞に覆われていないビーズ）。細胞の形態は全ての実験で同様であった。播種3日後と感染4日後の典型的な細胞形態を示す写真をそれぞれ図4および図5に示す。

【0226】

播種4日または5日後、実験1、2および3のFPRをそれぞれc a A / ウルグアイ、c a A / サウスダコタおよびc a B / フロリダに感染させた。感染前に、細胞培養培地に10倍T r p L E s e l e c t の0.03倍を加えた。実験4および5では、個々のFPRを季節性株c a A / ウルグアイ、c a A / サウスダコタおよびc a B / フロリダの1つに20FFU/mLで感染させた。図6は、感染68時間後～74時間後(h p i)の間にピークウイルス力値に達したことを示す。さらに、ウイルス力値はその後感染92時間後まで高いままであった。

40

【0227】

各ウイルス株のタイプの平均ウイルス力値を表11にまとめる。それらはc a A / ウルグアイ、c a A / サウスダコタおよびc a B / フロリダに関してそれぞれ8.7、8.8および8.45log<sub>10</sub>FFU/mLであった。これは67%培地交換を用いた場合にこれらのウイルスで見られたものに一致するか、またはそれを超えるものである。

【0228】

67%培地交換プロセス（本質的に国際特許公開WO08/105931に記載のよう

50

に実施、実施例 1 2 参照) と非培地交換プロセス(本質的に上記のように実施)を用いて生産された 4 つの株(c a A / ウィスコンシン / 6 7 / 0 5、A c a A / ルグアイ、c a A / サウスダコタおよび c a B / フロリダ)のウイルス力価を比較するためにさらなる実験を行った。各プロセスと株で少なくとも 2 回実施した。図 7 から、各株のピークウイルス力価は 6 7 % 培地交換プロセスと非培地交換プロセスとで匹敵するものであることが分かる。

## 【表 1 1】

F P R の各ウイルス株についての平均ピークウイルス力価	平均ピークウイルス力価(log <sub>10</sub> FFU/mL)	ピーク回収日(dpi)	FPR の数	
ウイルス株				10
A / ルグアイ / 716/2007	8.7 ± 0.05	3	4x2L	
A / サウスダコタ / 6/2007	8.8 ± 0.0	3	4x2L	
B / フロリダ / 4/2006	8.45 ± 0.25	3	4x2L	

## 【0 2 2 9】

培地交換は、現行の細胞培養に基づくインフルエンザワクチン製造プロセスにおける主要な操作工程である。培地交換をしなければ、微生物汚染の可能性が減り、操作上都合の良いプロセスが実施できることから、感染前の培地交換を無くすために多大な努力がされてきた。新たなワクチン生産プロセスの変動と、新たなビーズ間移動手順を用いて S R から直接採取した細胞を F P R に接種することの実現可能性を評価するため、一連の 1 2 のバイオリアクター実験から、培地交換を用いないプロセスの性能データ、より具体的には、細胞の解離 / 接着、細胞増殖およびウイルス力価を収集した。3 つのウイルス株、すなわち、c a A / ルグアイ、c a A / サウスダコタおよび c a B / フロリダはそれぞれ、感染前に培地交換をせずに 4 倍に生産された。S R において V C D は播種 4 日後では最大  $1 \times 10^6$  細胞 / mL に到達することができ、また、 $1 \times$  D P B S、T r y p L E S e l e c t および E D T A を用いた B 2 B 移動は、トリプシン処理 3 0 ~ 4 0 分後のシードリアクターにおいて、有効 (> 9 0 %) な細胞解離を伴って首尾よく達成できたことが確認された。F P R 内の細胞は微小担体ビーズの表面上で増殖し、感染時には平均 V C D 約  $0 . 7 3 \times 10^6$  細胞 / mL に達した。非 M X プロセスを用いた全ての F P R 実施で、A / ルグアイ、c a A / サウスダコタおよび c a B / フロリダのピークウイルス力価は感染 3 日後にそれぞれ  $8 . 7 \pm 0 . 0 5$ 、 $8 . 8 \pm 0 . 0$  および  $8 . 4 5 \pm 0 . 2 5 1$  log<sub>10</sub> F F U / mL であった。これは 6 7 % 培地交換を用いた場合のウイルス株で一般に見られたものよりもよいかまたは同等であった(図 8 参照)。全てのウイルス型のピークウイルス力価は、 $8 . 4 1$  log<sub>10</sub> F F U / mL より高かった。これらの結果は明らかに、本明細書に記載される B 2 B 移動および非 M X プロセスが極めてロバストなプロセスであることを示した。それらはコスト的に培地試薬の使用を最小とし、汚染の可能性を軽減することができる。

## 【0 2 3 0】

## 8 . 2 低濃度のプロテアーゼを用いる迅速ビーズ間移動プロセス

この実施例では、スピナーフラスコ、振盪フラスコまたは攪拌タンクバイオリアクターにて D P B S / 0 . 5 mM E D T A p H 8 洗浄溶液と低濃度のプロテアーゼ(例えば、0 . 0 5 倍 T r y p L E )を用いる M D C K 細胞の迅速かつ効率的ビーズ間移動のためのプロセスおよびパラメーターを記載する。プロセスフローの全体像を図 8 に示す。このプロセスに使用可能な代表的な器具および試薬を表 1 2、表 1 3 および表 1 4 に示す。当然のことながら、本発明では類似の性能を有する他の器具および試薬は所望により置き換えが可能であり、器具および試薬の特定の銘柄またはタイプの具体的記載は、特に断りのない限り、限定として解釈されるべきではない。

## 【0 2 3 1】

このプロセスを上記の 1 2 の実施に用いた。記載したように、E D T A による 1 回の 1

20

30

40

50

xDPBS洗浄を用いたビーズ間移動プロトコールおよびpH8においてTrypLE selectを用いるトリプシン処理を用いたところ、シードリアクターにおける適切な細胞解離およびFPRにおける細胞の接着が見られた。よって、ビーズ間移動プロセスは迅速で効率的かつロバストである。

【表12】

## 器具一覧

器具	生産者	モデル	
バイオセーフティーキャビネット	Baker	SG-600	
コントローラー/コンソール	Applikon	ADI1030/ADI1035	10
攪拌タンクバイオリアクター(5L, 10L, 15L)	Applikon	Z611000010	
顕微鏡	Zeiss or Nikon	Axiovert25	
Cedex細胞カウンター	Innovatis	G007D00138	
蠕動ポンプ	Cole Parmer	7553-70 または同等物	

【表13】

## 材料および試薬

成分	提案販売者	カタログ番号	
10倍TrypLE Select	Invitrogen	04-0090DG	
エチレンジアミン四酢酸(EDTA、二ナトリウム塩一水和物) FW 372.2	Sigma または同業者	E5134-500G	
0.5M EDTA pH8	Gibco	15575-038	
0.5M EDTA pH8	In-House	NA	
ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(20Lバッグ); Ca <sup>2+</sup> およびMg <sup>2+</sup> 不含	Gibco または同業者	14190-367	
ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水粉末10倍; Ca <sup>2+</sup> およびMg <sup>2+</sup> 不含	Gibco または同業者	21600-069	30

【表14】

## DPBS/0.5mM EDTA-pH8洗浄溶液の調製

成分	濃度	容量(mL)	
DPBS	N/A	1000	
0.5M EDTA pH8 (Gibco または自家製)	0.5mM	1	
pH	8.0 ±0.1	NA	40

【0232】

10倍DPBS粉末からの1倍液体培地DPBSの調製: 室温の水に穏やかに攪拌しながら粉末培地を加える(水を加熱しないこと)。容器内をすすいで全ての粉末痕跡を取り除く。水で所望の容量に希釈する。熔解するまで攪拌する(混ぜすぎないこと)。培地のpHを7.8±0.1に調整する(最終作業pHは8.0)。pH単位は濾過すると通常0.1~0.3上昇する。pHを調整した後、培地が濾過されるまで容器を閉じたままにする。0.1ミクロン膜を用いてすぐに除菌する。

【0233】

10

20

30

40

50

0.5M EDTA 保存液の調製： 186.1g の EDTA (二ナトリウム、二水和物) を 800mL の脱イオン水に加える。約 20g の NaOH ベレットまたは 10N NaOH を攪拌しながら加え、pH を 8.0 とする。注：pH の超過を避けるため、最後の数グラムはゆっくり加える。EDTA は pH が 8 前後になるまで溶解しない。容量を脱イオン水で 1L に調整する。0.1ミクロンフィルターで濾過する。より小さい容量に分注し (ボトルに 200mL ずつ)、室温で保存する。

## 【0234】

DPBS / 0.5M EDTA 保存液の調製： DPBS 1リットルにつき 1mL の 0.5M EDTA 保存液 pH 8 を加える。必要であれば、培地の pH を 7.8 ± 0.1 に調整する (最終作業 pH は 8.0)。注：pH 単位は濾過すると通常 0.1 ~ 0.3 上昇する。0.1ミクロンフィルターで濾過する。

10

## 【0235】

1倍 DPBS / 0.5mM EDTA - pH 8.0 洗浄手順： 適用可能であれば、攪拌、pH、DO、温度制御を停止する。微小担体ビーズを 15 ± 5 分間沈降させる。排出口から 80 ± 10 % の使用済み増殖培地を除去する。表 15 参照。注：この手順は交互タンジェントフロー (ATF) を用いて行うことができる。代わりに、培養容器に等量の 1 倍 DPBS / 0.5mM EDTA - pH 8.0 洗浄溶液を入れる。表 15 参照。初期設定に対して攪拌を開始し、細胞を 25 ± 5 分間洗浄する。攪拌を停止し、微小担体ビーズを 15 ± 5 分沈降させる。排出口から 80 ± 10 % の洗浄溶液を除去する。表 16 参照。注：この手順は ATF を用いて行うことができる。この容器に 1 倍 DPBS / 0.5mM EDTA - pH 8.0 洗浄溶液を作業培養容量の 50 % まで加える。表 15 参照。攪拌速度を所望の rpm に設定する。表 16 参照。攪拌、pH、DO および温度制御を開始する。pH 設定を 8.0 に調整する。表 16 参照。

20

## 【表 15】

DPBS / 0.5mM EDTA - pH 8.0 洗浄容量および攪拌速度  
バイオリアクター作業容量

	2L	5L	10L	15L
除去容量(L)	1.6 ± 0.2	4 ± 0.5	8 ± 1	12 ± 1.5
添加容量(L)	1.6 ± 0.2	4 ± 0.5	8 ± 1	12 ± 1.5
攪拌(rpm)	175	175	134	134

30

## 【表 16】

1倍 DPBS / 0.5mM EDTA - pH 8.0 洗浄容量、攪拌速度、pH、温度およびDO 設定

バイオリアクター作業容量

	2L	5L	10L	15L
除去容量(L)	1.6 ± 0.2	4 ± 0.5	8 ± 1	12 ± 1.5
添加容量(L)	0.6 ± 0.2	1.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	4.5 ± 1.5
攪拌(rpm)	250	250	220	220
pH	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
温度	37 ± 0.1°C	37 ± 0.1°C	37 ± 0.1°C	37 ± 0.1°C
DO	50%	50%	50%	50%

40

## 【0236】

細胞解離手順： 培養 pH が 8 ± 0.1 に達した際に算出された容量の 10 倍 TrypLE を注入口または培地口から終濃度 0.05 倍まで加える。表 17 参照。注：所望の作業容量に対して 10 倍 TrypLE の 1 : 200 希釀も行わなければならない。サンプリング口からサンプルアリコートを 15 ± 2 分ごとに、完全に解離するまで採取する。注：細

50

胞解離は60分以内に完了するべきである。培養容器の初期作業容量まで基本培地を加える。攪拌機およびpH制御を除く全ての制御ループを停止する。

## 【0237】

ビーズ間手順：所望の容量の解離細胞を最終生産リアクターに移す。表18参照。

## 【表17】

## 10倍TrypLE容量

	バイオリアクター作業容量			
	2L	5L	10L	15L
10X TrypLE (mL)	5	12.5	25	37.5

10

## 【表18】

## 最終生産リアクターへのビーズ間移動プロセス

1:8分割	バイオリアクター作業容量			
	2L	5L	10L	15L
トリプシン処理細胞の容量	0.250L	0.625L	1.25L	1.875L
完全増殖培地	1.725L	4.375L	8.75L	13.125L
Cytodex3 微小担体	3.45g	8.75g	17.5g	26.25g

## 【0238】

20

## 8.3. 実施例.3 細胞培養により生産されたインフルエンザの精製プロセス

細胞培養において生産されたインフルエンザのロバストな大規模精製プロセスの開発には、包括的な開発が必要であった。最初の段階では、プロセス was developed where theウイルス回収物（感染60～65時間後）をバッグに汲み取り、ウイルスを安定化するために、このウイルス回収物（VH）バッグに10倍スクロースリン酸（SP）バッファーを1/10(v/v)希釈で加えた。安定化されたウイルス回収物（SVH）をまず、2 mM MgCl<sub>2</sub>とともに50単位/mLのベンゾナーゼで32にて時間処理してMDCK宿主細胞DNA（HCD）を除去し、5 mM EDTAを加えることにより反応を停止させた。ベンゾナーゼは、マグネシウムイオンの存在下でDNAをオリゴヌクレオチドへと分解する操作された組換えエンドヌクレアーゼである。次に、このベンゾナーゼで処理したウイルス回収物を1.2 μmポリプロピレン（PP）および0.45 μm PVDFカプセルフィルターにより清澄化した。清澄化されたVHを、500 kDa分子量カットオフ中空纖維カートリッジでSPバッファーを用いた、5倍(5×)限外濾過および5倍ダイアfiltrationにより馴化した。ウイルス粒子は保持側に保持され、宿主細胞タンパク質（HCP）、宿主細胞DNA（HCD）およびベンゾナーゼは中空纖維の透過側にダイアfiltrationされる。濃縮およびダイアfiltrationされたウイルスをセルファインサルフェイト（CS）クロマトグラフィカラムを用いて精製し、HCD、HCPおよびベンゾナーゼ不純物をさらに除去した。CSは、カラム上でウイルスと結合するアフィニティ樹脂であり、結合したウイルスはSP高塩バッファーを用いて溶出される。カラム溶出液からの精製ウイルスを500 kDa分子量カットオフ中空纖維カートリッジにて、5ダイアボリュームのSP100(200 mMスクロースおよび100 mMリン酸カリウム、pH 7.2)バッファーによりダイアfiltrationして高塩溶出バッファーを除去し、精製ウイルスを調製する。ダイアfiltrationされたウイルス産物を次に、1/9(v/v)希釈のGAGを加えることにより安定化させ、0.22 μmフィルターを用いて濾過除菌し、最終バルク製品を作製する。

30

## 【0239】

最初のプロセスにスケーラビリティー、プロセスの効率および最終製品の品質を改良した実質的な変更がなされた。プロセスになされた変更は回収率および不純物（HCD、H

50

C P およびベンゾナーゼ) のレベルの評価に基づくものであり、元々確立されていたプロセスに付与されたものである。スケーラビリティに取り組むため、また、プロセスの効率および最終製品の品質を高めるために、全部で 5 つのプロセス工程が付け加えられた。第一に、ウイルス投入量 2 0 0 0 F F U / m L を用いて感染させた細胞に関して、ウイルス回収が感染 4 8 時間後(この時間はピークウイルス力値に相当する)に変更された。第二に、H C D 除去工程がバッチ形式のベンゾナーゼ処理からカラム上のベンゾナーゼ処理に変更された。これらの 2 つの工程はともに、出発材料および最終バルクの H C D レベルを有意に引き下げるによる最終製品の品質を向上させる。第三に、C S 樹脂の添加濃度を 9 . 0 1 o g 1 0 F F U / m L から 9 . 5 1 o g 1 0 F F U / m L に引き上げ、これにより生産カラムサイズが 4 L から 1 . 4 L に縮小し、プロセス効率が向上する。第四に、第二のバッファー交換容量が、ベンゾナーゼクリアランスを高めるために . 5 から 8 ダイアボリュームに増やされた。第五に、最終フィルターフラックスが C T M 実施の際の最終濾過中の目詰まりを回避するために、平均 2 5 L / m<sup>2</sup> の半分まで引き下げられた。最終的な方法(以下に詳細に示される)は、平均総回収率 4 3 . 4 % を与えるプロセスを提供し、0 . 7 2 n g / 用量(P i c o G r e e n による)および 0 . 1 n g / 用量(P C R による)の H C D 、0 . 2 1 μ g / 用量の H C P 、および 0 . 0 0 3 5 n g / 用量のベンゾナーゼを含み、その全てが規制機関により要求された明細を下回るものである。図 10 10 は最初の精製プロセスと改良型の精製プロセスの概要を示す。

## 【 0 2 4 0 】

## 8 . 3 . 1 材料および方法

20

材料、試薬および器具：類似の性能を有する他の材料、器具および試薬は容易に置き換えが可能である。

## 【 0 2 4 1 】

1 . 1 . 2 μ m Polygard CN Opticap X L 5 フィルター(Millipore Corporation, Billerica, MA, カタログ番号KN12A05HH1)

2 . 0 . 4 5 μ m Durapore Opticap X L 4 フィルター(Millipore Corporation, Billerica, MA, カタログ番号KPHLA04HH3)

3 . 5 0 L バッグ(Hyclone, Ltd, Logan, UT, カタログ番号SH30712.04)

4 . 1 0 L バッグ(Hyclone, Ltd, Logan, UT, カタログ番号SH30712.12)

5 . 中空纖維、5 0 0 K D 、4 , 8 0 0 c m<sup>2</sup>(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号UFP-500-C-6A)

6 . 中空纖維、5 0 0 K D 、2 9 0 c m<sup>2</sup>(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号UFP-500-C-3X2MA)

7 . セルファインサルフェイト樹脂(Chisso Corporation, Tokyo, Japan, カタログ番号19847)

8 . フランジOリング(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-8494-01)

9 . アダプターOリング(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-8475-01)

1 0 . ベッドサポート、2 3 μ m、エンドピース(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-9252-01)

1 1 . ベッドサポート、2 3 μ m、アダプター(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-1103-08)

1 2 . ガスケット 2 5 mm 6 mm 径、E P D M(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-0019-27)

1 3 . 4 ポート 2 方向バルブ(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-5757-01)

1 4 . S a r t o p o r e 2 3 0 0 フィルターカプセル、0 . 4 5 μ m / 0 . 2 2 μ m 、3 0 0 c m<sup>2</sup>(Satorius, MA, カタログ番号5441307H5--00--B)

1 5 . S a r t o p o r e 2 1 5 0 フィルターカプセル、0 . 4 5 μ m / 0 . 2 2 μ m 、1 5 0 c m<sup>2</sup>(Satorius, MA, カタログ番号5441307H4--00--B)

1 6 . 1 L P E T G ボトル(Nalgene, Rochester, NYU, カタログ番号2019-1000)

50

- 17 . 2 L P E T G ボトル(Nalgene, Rochester, NYU, カタログ番号2019-2000)  
18 . Master Flex × 白金硬化シリコンチューブ L / S サイズ 24 (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, カタログ番号96410-24)  
19 . Master Flex × 白金硬化シリコンチューブ L / S サイズ 36 (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, カタログ番号96410-36)  
20 . 1倍スクロースリン酸バッファー(Hyclone, Ltd, Logan, UT, カタログ番号SH3A1577) - 218 mMスクロースおよび11 mMリン酸カリウム、pH 7バッファー  
21 . 1倍SP / 1M NaClバッファー(Hyclone, Ltd, Logan, UT, カタログ番号SH3A2034)  
22 . SP100バッファー(Hyclone, Ltd, Logan, UT, カタログ番号SH3A1796) - 200 mMスクロースおよび100 mMリン酸カリウム、pH 7.2バッファー  
23 . cGAGバッファー(Hyclone, Ltd, Logan, UT, カタログ番号SH3A1795)  
24 . ベンゾナーゼ(EMD, Darmstadt, Germany, カタログ番号1.01697.0002)  
25 . 1M MgCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, Missouri, カタログ番号M1028, lot # 085K 8920)  
26 . Quant-iT Picogreen dsDNAキット(Invitrogen, Eugene, Oregon, カタログ番号P11496, lot # 22987)  
27 . 0.5N NaOH、10N NaOHから希釈 (VWR, West Chester, Pennsylvania, カタログ番号VW3247-7)  
28 . 蠕動ポンプ(Watson Marlow Inc., Wilmington, MA, Models 520U, 520S and 520Di )  
29 . Wave Mixer(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号Mixer20/50EH)  
30 . AKTA プロセスクロマトグラフィースキッド(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号28409334)  
31 . Uniflux 10 濾過スキッド(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号28920799)  
32 . BPG 100クロマトグラフィーカラム(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-1103-01)  
33 . BPG 200クロマトグラフィーカラム(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号18-1103-11)  
34 . Flexstat(GE Healthcare, Uppsala, Sweden, カタログ番号56-4107-54)

【表19】

1回使用バイオリアクター(67%培地交換)からのウイルス回収ロット

株	細胞培養物ロット番号	精製ロット実施番号	感染後の回収時間
A／ニューカレドニア／20／99	Sub 08012007-PP	1	60-65 時間
A／ウィスコンシン67／05	Sub 05012007-PD	2	60-65 時間
A／ウィスコンシン67／05	Sub 15012007-PP	3	60-65 時間
A／ニューカレドニア／20／99	Sub 19012007-PD	4	60-65 時間
B／マレーシア2506／04	Sub 22012007-PP	5	60-65 時間
B／マレーシア2506／04	Sub 26012007-PD	6	60-65 時間
A／ニューカレドニア／20／99	Sub 05022007-PP	7	60-65 時間
A／ウィスコンシン67／05	Sub 16022007-PD	8	48 時間
B／マレーシア2506／04	Sub 26022007-PP	9	48 時間

## 【0242】

細胞培養ウイルス回収物(VH)： M D C K 細胞増殖およびウイルス生産の詳細は国際特許公開 W O 0 8 / 1 0 5 9 3 1 (特に、実施例 1 2 参照) に示されている。ウイルス生産の実施は全て、1回使用バイオリアクター(S U B)にて~67%培地交換プロセスを用いて行い、ウイルス投入量 2 0 0 0 F F U / m L を用いて細胞を感染させた。M D C K 細胞の感染後およそ 6 0 ~ 6 5 時間(実施 1 ~ 7 )または 4 8 時間(実施 8 ~ 9 )にウイルスを回収した。S U B 中の微小担体はウイルス回収(VH)前に 4 5 分以上沈降させた。およそ 1 8 L のウイルスを 5 0 L バッグによよそ 0 . 2 L / 分で汲み入れ、ウイルス回収物の安定化(S V H)のために同じバッグに 2 L の 1 0 倍 S P バッファーを汲み入れた。混合後、F F A、H C D および H C P アッセイで感染度を調べるため、S V H 段階でサンプルを採取した。

## 【0243】

ダイレクト・フロー・フィルトレーション 1 (D F F 1)： フィルターリグを準備し、ウイルス回収の前日にオートクレーブにかける。1 . 2 μm の Poly g ard CN ポリプロピレンフィルター カプセルおよび 0 . 4 5 μm の Durap ore PVDF フィルター カプセルを示すフィルターリグの図を図 9 A の一番上のパネルに詳細に示す。およそ 2 0 L の S V H を閉じられたリゲアセンブリを経て 1 . 5 リットル / 分 (L P M) で送り、S V H がそれらを通過した際にフィルターがプライミングされた。全膜表面積は、1 . 2 μm の Poly g ard CN ポリプロピレンフィルター カプセルでは 1 8 0 0 c m<sup>2</sup> 、0 . 4 5 μm の Durap ore PVDF フィルター カプセルでは 1 9 0 0 c m<sup>2</sup> であった。1 . 5 L P M の濾過流速では、1 . 2 μm および 0 . 4 5 μm フィルターのフラックスはそれぞれ 5 0 0 リットル / 面積 m<sup>2</sup> / 時間 (L M H) および 4 7 4 L M H であった。1 . 2 μm および 0 . 4 5 μm フィルターの実際の負荷量はそれぞれ 1 1 1 および 1 0 5 L / m<sup>2</sup> であった。清澄化された濾液は D F F 1 として 2 0 L バッグに収集した。D F F 1 濾液をサンプリングし、F F A により感染度を、また残留 H C D および H C P を調べた。

10

20

30

40

50

## 【0244】

タンジェントフロー濾過1、5倍限外濾過(UF) / 5倍ダイアフィルトレーション(DF)(TFF1) : Unifluxスキッドにチューピングリグを準備し、ウイルス回収の前日にオートクレーブにかかる。全チューピングリグの図を図9Aの下のパネルに詳細に示す。Uniflux(商標)スキッドを用い、以下の操作パラメーターを用いてTFF1工程を行った。Unifluxスキッドは、中空纖維カートリッジを作動させるために構成された自動膜分離濾過システムである。管腔サイズ0.5mm、全膜表面積4,800cm<sup>2</sup>および流路長60cmの500kDaの分子量カットオフ(MWCO)中空纖維を用いた。このプロセスにより最終TFF1負荷量41.7L/m<sup>2</sup>膜表面積が得られたが、これは従前に評価されているように、TFF1プロセスの最適範囲40~150L/m<sup>2</sup>内である。<sup>10</sup> 実施1~6では、同じ中空纖維カートリッジをプロセス後に洗浄し、再利用した。実施7~9では、実施ごとに新しい中空纖維を準備して用いた。新しい中空纖維カートリッジは、脱イオン(DI)水で90分間すすいでグリセロール保存剤を除去し、0.5N NaOHで1時間殺菌し、各実施前におよびpHが7.0となるまで1倍SPバッファーで平衡化することにより準備した。全5XUF / 5XDFプロセスは、16000/秒の一定剪断速度および20psiの一定TMPでプログラムされたUnifluxスキッドを用いて作動させた。

## 【0245】

全容量のTFF1をUnifluxスキッドで処理した。まず、およそ5LのTFF1をUnifluxプロセスタンクに汲み取った。最初に透過液ラインを閉じて、8.6L/分の再循環(保持液)流速を確立した(16,000/秒の剪断速度に相当する)。再循環5分後に、5XUFプロセスを開始した。透過液ラインを開けて、HCPおよびDNAなどの500kDaより小さい不純物に膜を通過させ、一方、保持液制御バルブを段階的に閉じ、膜間差圧(TMP)を1.4バール(20.3psi)の設定点に到達させた。残りのTFF1濾液を絶えずプロセスタンクに送り込み、全容量のTFF1がタンクに供給されるまで、5±0.1Lの一定タンクレベルに維持した。全てのTFF1材料が供給された後に、フィードポンプを停止し、最終保持液容量が4Lとなるか、または16Lの透過液が収集されるまで保持液を濃縮し続けた。5倍ダイアボリュームの1倍SPバッファー(20L)でバッファー交換を行うことにより4Lの保持液(5XUF)をダイアフィルトレーションし、プロセスを上記の場合と同じ剪断速度およびTMPで作動させた。<sup>20</sup> ダイアフィルトレーションバッファーラインを開け、フィードポンプを再開し、1倍SPバッファー中に送り込んだ。5XDFプロセスは、20Lのダイアフィルトレーション透過液が収集された後に終了した。5XDFの終了時に、保持液制御バルブを全開し、透過液ラインを再び閉じて、プロセス中に中空纖維膜の表面に弱く結合した回収可能なウイルスをシステムの再循環に一掃させる。濃縮およびおよびダイアフィルトレーションされたウイルス産物を含んだ保持液を排出し、10Lの製品バッグに収集する。最後の2つの精製実施(8および9)では、保持液収集の後にさらなるバッファーすすぎ工程を導入した。およそ1.5Lの1倍SPをプロセスタンクに送り込み、透過液ラインを閉じた状態でさらに5分間再循環させた。このバッファーすすぎ液もまた同じ10L製品バッグに収集し、このバッグに5XUF 5XDF TFF1製品のラベル表示をし、全容量はおよそ5.5Lであった。<sup>30</sup> このTFF1製品をFFAによる感染度、ならびにHCDおよびHCPに関して調べるためにサンプリングした。各プロセス実施の後に、中空纖維カートリッジおよびUnifluxシステムを0.5N NaOHを用い、8.6L/分の再循環流速で1時間洗浄した。

## 【0246】

BPG 100 / 200 セルファインサルフェイト(CS)カラムの充填およびカラム評価 : CS樹脂は20%エタノール中、およそ50%スラリーで保存した。BPG 100またはBPG 200カラムの充填に必要な樹脂の量を、圧縮比1.1を用いて計算した。計算されたような樹脂の量を、1倍SPバッファーでバッファー交換を2回行つた後に、1倍SP / 1M NaClバッファーでバッファー交換を1回行うことにより準<sup>40</sup>

備した。

**【0247】**

BPG 100およびBPG 200カラムを生産者の説明書に従って組み立てた。空のカラムを準備し、0.5N NaOHで殺菌し、使用前にDI水ですすいだ。AKTAプロセス(商標)スキッドを用い、1倍SPバッファーを用いてCS樹脂をBPG 100カラムに500cm<sup>3</sup>/時で流動充填し、カラムベッド高を15~20cm(目標17.5cm)とした。AKTAプロセスは自動液体クロマトグラフィーシステムである。

**【0248】**

1倍SP/1M NaClバッファーで準備した樹脂スラリーを空のカラムに側壁に沿って注ぎ、壁面に残った残留樹脂を水で噴射ボトル(squirt bottle)にすすぎ落とした。  
樹脂を、樹脂ベッド高が液体レベルより少なくとも10cm低くなるように沈降させた。上部のアダプターを樹脂ベッドを乱さないようにカラム内に挿入した後、ネジとナットで固定した。4ポート2方向バルブ(4-2バルブ)をカラムの入口に取り付けた。この4つの異なるポートは次のように接続した。

**【0249】**

- 1 AKTAプロセスシステムカラムの入口
- 2 カラムマニュアルページ(廃棄ラインまたは再循環ラインに接続)
- 3 スパイクテストコネクター(HETP試験のための高塩溶液を注入するために用いる雌型ルアーロック)
- 4 BPG 100 / 200 カラムの入口

次に、BPG 100カラムの下の出口をAKTAシステムカラムの出口に接続した。カラムアダプターを下げる前に、4-2バルブの接続部のポート3および4を確認した。上のアダプターを樹脂ベッド中へゆっくり降ろし、少量のバッファーを4-2バルブのポート3からページした。これにより、上のアダプターの入口が確実にバッファーでページされるようにした。

**【0250】**

次に、4-2バルブを切り換え、ポート1と2を接続した。1倍SPバッファーをAKTAシステムの入口に接続し、まず、500cm<sup>3</sup>/時で流し始め、この地点でカラムページポート(4-2バルブのポート2)を介してカラムをバイパスした。流速がフローメーターで500cm<sup>3</sup>/時に達した際に、すぐにポート1と4が接続されるように4-2バルブを調節した。樹脂ベッドが目標ベッド高に達したところで、アダプタークローザーを樹脂ベッドへ降ろす。これらの工程を、樹脂ベッド高に変化が無くなり、アダプターが樹脂ベッドに達するまで繰り返した。アダプターと樹脂ベッドの間のヘッドスペースが無くなるよう、アダプターをさらに1~3mm降ろして樹脂ベッドを圧縮した。

**【0251】**

充填評価を行う前に、CSカラムを1倍SPで平衡化し、安定な導電率ベースラインを確立した。カラム充填は、スパイクテストコネクター(4-2バルブのポート3~4)を用い、1倍SP/1M NaClをカラム容量(CV)の2%注入することにより評価した。カラムを、1倍SPを用い、流速50cm<sup>3</sup>/時で平衡化した(4-2バルブのポート1~4)。導電率ピークはおよそ1/2CVで見られた。Unicornソフトウェアにて得られた導電率ピークを用い、カラムプレート高(HETP)およびピークの対称性を評価した。所望のカラムHETPが達成されたところで、カラムを殺菌し、0.5N NaOH中で使用まで保存した。

**【0252】**

セルファインサルフェイトクロマトグラフィー(CS) : AKTAプロセススキッド用のチューピングリグを準備し、ウイルス回収前にオートクレーブにかけた。全チューピングリグの図を図9Bの上のパネルに詳細に示す。全クロマトグラフィープロセスはプログラムされた方法により自動であった。

**【0253】**

AKTAプロセススキッドの全流路を、各実施の前に手作業で1倍SPを用いて平衡化

10

20

30

40

50

した。プロセスの開始時、カラムをまず、3カラム容量(CV)の1倍SPを用い、1 linear直線流速150cm/時で平衡化した。次に、全容量の5XUF 5XDF TFF1をカラムにローディングし、結合していないを流出液として収集した。ローディング後、カラムを1CVの1倍SPを用いて150cm/時、次いで、カラム上ベンゾナーゼ処理のために50U/mlベンゾナーゼおよび2mM MgCl<sub>2</sub>(1倍SPB)を含有する2.5CVの1倍SPを用いて50cm/時で洗浄した。直線的流速を引き下げ、1倍SPB洗浄容量を計算することで、カラム樹脂のベンゾナーゼ接触時間を50分とした。次に、カラムを1CVの1倍SPを用いて50cm/時で洗浄して、前のCVの1倍SPBカラム上ベンゾナーゼ処理を置換し、さらに1CVの1倍SPを用いて150cm/時で洗浄した。結合したウイルスを、3CVの1倍SP/1M NaClバッファーを用いてカラムから溶出させた。このCS溶出液を10Lバッグに収集し、この溶出ピークの収集は、UV吸光度(5mm光路長のUVフローセルを用いた50mA U~50mA U(0.1 O.D.~0.1 O.D.)までのA<sub>280</sub>読み取り)に基づいた。BPG 100カラムからのCS溶出容量はおよそ0.6~0.9Lである。各プロセス実施の後にカラムおよびAKTAプロセスシステムを0.5N NaOHで殺菌した。カラムロード、流出液、洗浄液および溶出液をサンプリングしてFFAによる感染度、ベンゾナーゼ、HCDおよびHCPを調べた。

## 【0254】

タンジェントフロー濾過2、8倍DF(TFF2)： Flexstandのセットアップおよび使用は生産者の説明書に従って行った。管腔サイズ0.5mm、流路長60cmおよび全膜表面積290cm<sup>2</sup>の500kDa MWCO中空纖維を用いた。このサイズの膜面積および上記のCS溶出量では、最終ローディングは20~50L/m<sup>2</sup>膜表面積の範囲となり、従前に評価したTFF2プロセスの最適範囲である。ウイルス回収の前日に新しい中空纖維をFlexstandでセットアップした。中空纖維をDI水で90分間すすいでグリセロール保存剤を除去し、0.5N NaOHで1時間殺菌し、pHが7.2となるまでSP 100バッファーで平衡化した。

## 【0255】

CS溶出液の全容量をFlexstandシステムで処理した。まず、透過流ラインを閉じ、供給流速0.5L/分でCS溶出液を再循環させ、16,000/秒の剪断速度とした。5分間再循環させた後、透過流ラインを開けてダイアフィルトレーションを開始した。同時に、SP100バッファーをダイアフィルトレーションラインから送り出し、保持液制御バルブを段階的に閉じ、膜間差圧(TMP)を20~21psiとした。プロセス全体で、SP100ダイアフィルトレーションラインのポンプ流速を制御することにより、保持液リザーバーの容量を、CS溶出容量(0.4~0.8Lの範囲)に相当する容量で一定に維持した。実施8の前に、CS溶出液を5倍ダイアボリュームのSP 100バッファーでダイアフィルトレーションした。精製実施8~9では、このCS溶出液を8倍ダイアボリュームのSP100バッファーでバッファー交換した。ダイアフィルトレーションの終了時、製品回収前に、保持液バルブを全開し、透過流ラインを再び閉じ、システムを5分間再循環させた。ダイアフィルトレーション製品を10L製品バッグへと排出した。このダイアフィルトレーション製品をサンプリングして、FFAによる感染度、ベンゾナーゼ、HCDおよびHCPを調べた。中空纖維カートリッジおよびシステムを、0.5N NaOHを用い、再循環流速0.5L/分で1時間洗浄した。

## 【0256】

ダイレクト・フロー・フィルトレーション2(DFF2)： フィルターリグを準備し、ウイルス回収前にオートクレーブにかけた。フィルターリグの図を図9Bの下のパネルに詳細に示す。用いた0.22μmポリエーテルスルホン膜カプセルの全表面積は、実施1~5では150cm<sup>2</sup>、実施6~9では300cm<sup>2</sup>であった。最終無菌濾過DFF2工程はバイオセーフティーキャビネットで行った。

## 【0257】

濃Glu-tamateアルギニンゼラチン(cGAG)を8倍DF製品に1:9(v/v)で混合した。

v) 希釀で加え、精製ウイルスの最終的な処方物を作製した。処方されたウイルスを、 $300 \text{ cm}^2$  カプセルではおよそ  $0.38 \text{ LPM}$  で閉系リグアセンブリを経て送り、最終製品を用いてフィルターをプライミングした。濾液を無菌の  $2 \text{ L}$  ボトルに最終バルク製品として収集した。濾過流速  $0.38 \text{ LPM}$  で、 $300 \text{ cm}^2$  フィルターのフラックスは  $760 \text{ LMH}$  であった。膜面積に対する処方さバルク負荷は  $20 \sim 150 \text{ L/m}^2$  の範囲であった。 $0.22 \mu\text{m}$  で濾過された最終バルク製品をサンプリングし、FFAによる感染性、ベンゾナーゼ、HCDおよびHCPレベルを調べた。最終バルク製品を  $1 \text{ mL}$ 、 $10 \text{ mL}$  および  $100 \text{ mL}$  の数アリコートに分注し、急速冷凍し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

#### 【0258】

サンプル分析および計算： 分析に送った全てのサンプルを急速冷凍し、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。HCPアッセイは本質的に下記のように行なった。HCDアッセイは、本質的に下記のように、PicogreenおよびPCR法を用いて行なった。HCDサイジングは、ブソラレン-ビオチンの直接標識法（プロット）およびアガロースゲルにおける直接染色により分析した。ベンゾナーゼ定量アッセイは本質的に下記のように行なった。用量当たりのngまたは $\mu\text{g}$ で計算された全ての値は、力価、すなわち、用量当たりの $710 \text{ g}_{10}\text{FFFU}$ （1用量はまた一般に  $10^7 \text{ FFFU}$ とも呼ぶ）に基づく。

10

#### 【0259】

残留宿主細胞DNAの測定： 残留MDCK宿主細胞DNAを、マイクロウェル形式のリアルタイムPCR法を用いて定量する。アッセイの対象は、イヌのシトクロムオキシダーゼサブユニットI（Cox I）遺伝子内の特異な配列である。至適化されたオリゴヌクレオチドプライマーセットを用い、MDCK Cox I特異的PCR産物を鋳型から生成し、SYBR（登録商標）緑色色素で検出する。マイクロウェル形式は、広い動的範囲（ $1000 \sim 0.1 \text{ ng/mL}$ ）のDNA較正品に便宜である。各アッセイには適当な陽性対照および陰性対照を含める。試験サンプルDNAを、DNA抽出キットを用いて誘導する。定量下限  $0.1 \text{ ng/mL}$  を超えるサンプルDNA量が標準曲線から算出される。精度は、スパイクコントロールの回収に基づき  $75 \sim 125\%$  内である。報告される結果は、 $50 \sim 150\%$  のスパイク回収率が得られるサンプル抽出反復の平均DNA量である。

20

#### 【0260】

残留宿主細胞タンパク質の測定： 残留宿主細胞（MDCK）タンパク質（HCP）は、HCP（非感染MDCK培養から）に対して作製された一次ビオチン化ウサギ抗体およびストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRPO）コンジュゲートを用いて、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）により測定する。MDCK細胞溶解液に対する抗体をポリスチレンマイクロプレートに吸着させる。ウシ血清アルブミンを含有するブロッキング溶液を加えて、余分な結合部位を飽和させる。試験品サンプルの希釈液をコーティングプレートに加えると、MDCK HCPが存在すれば、コーティング抗体と結合する。ウサギで作製されたMDCK溶解液に対する、一次ビオチン標識抗体、次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRPO）標識ストレプトアビジンコンジュゲートをプレートに加える。最後に、HRPO基質を加え、ELISAプレートリーダーを用いて、形成された有色の最終産物の強度を測定する。発色強度は試験品に存在するMDCK HCPに比例する。既知のタンパク質濃度のMDCK細胞溶解液較正品から標準曲線を作成する。標準曲線から、MDCK細胞溶解液のタンパク質濃度を決定する。

30

#### 【0261】

残留ベンゾナーゼの測定： ベンゾナーゼ活性は、そのニシン精子DNAを切断する能力により測定する。試験品を二反復でベンゾナーゼ標準曲線と比較する（読み取りは分光光度計にて  $260 \text{ nm}$  で行う）。スパイク回収率%（ベンゾナーゼ活性）を算出し、正味のベンゾナーゼU/ $\text{mL}$ を決定する。スパイク参照標準の正味のベンゾナーゼ活性は  $1.1 \sim 1.9 \text{ U/mL}$  の間になければならず、相関係数は  $0.995$  でなければならず、定量可能な活性については、非スパイクサンプル希釈液の活性が  $0.7 \text{ U/mL}$  でなければならず、スパイク回収率%は  $80 \sim 120\%$  の間になければならない。

40

#### 【0262】

50

### 8 . 3 . 2 結果および考察

S U B 実施は全て、 $8 . 0 \sim 8 . 6 \text{ l o g}_{10} \text{FFU/mL}$  の範囲の回収力値を示した。各精製実施の性能を評価するために用いた回収率、H C D および H C P の結果を表 2 0 、表 2 1 および表 2 2 にまとめる。以下の節では、プロセス効率および最終製品の品質を向上させるために行った変更についてまとめ、考察する。最初の精製スキームと最終の精製スキームのプロセス開発を図 1 0 にまとめ、最初の精製実施から最後の精製実施への主な変更を示す。

【表20】

精製実施	1	2	3	4	5	6	7	8	9
株	A/NC	A/Wis	A/Wis	A/NC	B/Mal	B/Mal	A/NC	A/Wis	B/Mal
回収(時間)	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	48	48
C S カラム	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100
C S 負荷量 (10 g <sub>10</sub> /mLゲル)	N/A	8.3	8.7	8.7	8.4	9.2	9.1	9.3	9.0
プロセス*	1a	1a	1a	1a	1b	1b	1b	1b	1b
力価 (VH-C) C)	8.3	8.4	8.4	8.4	8.3	8.6	8.4	8.6	8.0
力価 (VH-P)	7.9 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>	8.4	8.6	8.1	8.3	8.3	8.4	7.9
DFF1	99.1%	154.6%	79.4%	52.7%	124.1%	124.3%	124.2%	78.3%	123.1%
TFF1	107.2%	73.8%	50.9%	53.4%	30.3%	42.2%	74.5%	80.0%	76.1%
C S 滲出	N/A	54.9%	81.4%	19.0%	60.8%	40.0%	37.0%	96.8%	60.5%
TFF2	N/A	110.1%	73.9%	106.9%§	125.9%§	150.8%	94.0%	64.0%†	92.0%†
DFF2	N/A	88.3%#	111.1%#	110.8%#	88.3%#	69.8%	65.8%	78.4%	108.0%
最終力価	N/A	8.3	8.5	8.5	8.5	8.9	8.6	9.2	9.0
全収率	N/A	60.9%	27.0%	6.3%	25.4%	22.0%	21.2%	30.4%	56.3%

VH-CCD：ウイルス回収細胞培養、VH-PD：ウイルス回収精製

\* 1<sup>a</sup> : SVHバッグにおけるベンゾナーゼ処理; 1 b : カラム上のベンゾナーゼ処理

- 抗HAの代わりに抗NAに基づくFFAアッセイ

§ 1400 cm<sup>2</sup>中空纖維 (これは290 cm<sup>2</sup>中空纖維)# 150 cm<sup>2</sup>フィルター (実施6 ~ 9では300 cm<sup>2</sup>フィルター)

† 8倍DF (これは5倍DF)

いくつかのプロセス変更を太字で示す。

【表 2 1】

精製実施に関するHCDの概要

実施 株 回収(時間) カラム プロセス*	2 A/Wis 60-65 BPG200 1a	3 A/Wis 60-65 BPG200 1a	4 A/NC 60-65 BPG200 1a	5 B/Mal 60-65 BPG200 1a	6 B/Mal 60-65 BPG200 1b	7 A/NC 60-65 BPG100 1b	8 A/Wis 60-65 BPG100 1b	9 B/Mal 48 BPG100 1b
DNA レベル SVH	ng/mL 3228.8	ng/mL 644.2	ng/mL 286.6	ng/mL 5480	ng/mL 137.7	ng/mL 303.5	ng/mL 5720	ng/mL 286.7
DFF1	ng/mL 2910	ng/mL 366.3	ng/mL 196.5	ng/mL 1720	ng/mL 86.2	ng/mL 5328	ng/mL 4120	ng/mL 164
TFF1	ng/mL 2520	ng/mL 126.3	ng/mL 1940	ng/mL 38.7	ng/mL 1610	ng/mL 32.1	ng/mL 14000	ng/mL 557.4
CS 溶出 TFF2 (5X)	ng/mL 1204.9	ng/mL 47.97	ng/mL 537.4	ng/mL 10.72	ng/mL 146.1	ng/mL 14.6	ng/mL 37.8	ng/mL 1.2
TFF2 (8X)	ng/mL 928.3	ng/mL 36.96	ng/mL 385.9	ng/mL 12.2	ng/mL 144	ng/mL 4.56	ng/mL 57.1	ng/mL 1.43
DFF2	ng/mL 807.8	ng/mL 40.49	ng/mL 365.6	ng/mL 11.56	ng/mL 102.9	ng/mL 29 <sup>a</sup>	ng/mL 0.92 <sup>a</sup>	ng/mL 1.21

\* 1 a : バックグラウンドナーゼ処理；1 b : カラム上でベンゾノーネー処理

<sup>a</sup> リアルタイムPCRに基づくHCDアッセイ、実施2～9ではPicoGreenアッセイも行った。  
いくつかのプロセス変更を太字で示す。

【表 2 2】

実施 株 回収(時間) カラム プロセス*	精製実施 2 ~ 9 に関する HCP の概要			精製実施 6 ~ 9 に関する HCP の概要		
	2 A/Wis 60-65 BPG200	3 A/Wis 60-65 BPG200	4 A/NC 60-65 BPG200	5 B/Mal 60-65 BPG200	6 B/Mal 60-65 BPG100	7 A/NC 60-65 BPG100
DNA レベル μg/mL	μg/用量	μg/mL	μg/用量	μg/mL	μg/mL	μg/mL
SVH	278	55.5	392	15.6	269	6.76
DFF1			369	18.5	329	20.76
TFF1	82.3	4.12	382	7.62	68.2	1.36
CS 溶出	15.7	0.63	258	5.15	46.6	4.66
TFF2 (5X)	51	2.56	142	4.49	69.1	2.19
TFF2 (8X)						
DFF2	22	1.1	17.6	0.56	32.7	1.03

\* 1 a : パッケージにおけるベンゾナーゼ処理 ; 1 b : カラム上でベンゾナーゼ処理

【表23】

## 精製実施2～9に関する全DNAクリアランス

SVH バッヂミックス			CS カラム上						
実施#	使用カラム	残留DNA%	最終パルクのDNAレベル(ng/用量)	50 U/mL ベンゾナーザの用量	実施#	使用カラム	残留DNA%	最終パルクのDNAレベル(ng/用量)	50 U/mL ベンゾナーザの用量
2	BPG 200	3.36%	40.49	20 L	5	BPG 200	0.10%	1.21	13 L
3	BPG 200	1.09%	11.56	20 L	6	BPG 100	0.07%	0.88	3.5 L
4	BPG 200	0.15%	3.25	20 L	7	BPG 100	0.02%	1.42	3.5 L
					8	BPG 100	0.11%	0.59	3.5 L
					9	BPG 100	0.15%	0.84	3.5 L

10

20

30

40

【表 2 4】

精製実施 2 ~ 9 に関する残留ベンゾナーゼの概要									
実施 株	2	3	4	5	6	7	8	9	
	A/Wis	A/Wis	A/NC	B/Mal	B/Mal	A/NC	A/Wis	B/Mal	
回収(時間)	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	60-65	48	48	
カラム	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100	
プロセス*	1a	1a	1a	1b	1b	1b	1b	1b	
ベンゾナーゼ レベル	ng/ml	ng/用量	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/用量	ng/ml	
SVH		0.35	0.014	0.06	0.002	0.18	0.009	ND	0.12
DFF1	70.9	8.926	50	2.506	46	2.306	ND	ND	0.09
TFF1		2	0.04	9	0.18	0.07	0.003	ND	0.12
SPB 洗浄後 1CV					0.078				0.002
SPB 洗浄後 2CV					0.12				0.11
SPB 洗浄後 3CV					0.26				0.15
SPB 洗浄後 4CV					0.28				0.21
CS 滲出			7.8	0.78	89	2.814	>75	>0.944	0.2
TFF2 (5X DF)		0.54	0.017	0.66	0.021	5.1	0.128	6.6	0.052
TFF2 (8X DF)									0.6
DFF2	0.9	0.045	0.21	0.007	0.69	0.022	2.1	0.066	6.6

\* 1 a : バッジにおけるベンゾナーゼ処理 ; 1 b : カラム上でのベンゾナーゼ処理  
いくつかのプロセス変更を太字で示す。

【表25】

精製実施 株	2	3	4	5	6	7	8	9
A/Wis	A/Wis	A/NC	B/Mal	B/Mal	A/NC	A/Wis	B/Mal	
回収(時間)	60 - 65	60 - 65	60 - 65	60 - 65	60 - 65	60 - 65	48	48
カラム	BPG200	BPG200	BPG200	BPG200	BPG100	BPG100	BPG100	BPG100
負荷量 (10 g <sub>10</sub> /mLグル)	8.3	8.7	8.7	8.4	9.2	9.1	9.3	9
プロセス*	1a	1a	1a	1b	1b	1b	1b	1b
VH力価(CCD)	8.4	8.4	8.4	8.3	8.6	8.4	8.6	8.0
VH力価(PD)	7.7 <sup>§</sup>	8.4	8.6	8.1	8.3	8.3	8.4	7.9
最終バルク力価	8.3	8.5	8.5	8.5	8.9	8.6	9.2	9.0
全収率§	60.9%	27.0%	6.3%	25.4%	22.0%	21.2%	30.4%	56.3%
VH HCD(ng/mL)	3229	7200	5480	3821	5720	10800	3440	2070
バルク HCD(ng/用量)	PicoGreen	40.49	11.56	3.25	1.21	0.88	1.42	0.59
バルク HCD(ng/用量)	RT-PCR	n/a	n/a	0.92	n/a	0.23	0.18	0.032
VH HCP(ng/mL)		278	392	269	231	250	233	135
バルク HCP(ng/用量)		1.1	0.56	1.03	0.86	0.63	0.6	0.13
ベンゾナーゼ(ng/用量)		0.045	0.007	0.022	0.066	0.083	0.09	0.002

\* 1a : SVHバッグにおけるベンゾナーゼ処理; 1b : カラム上でベンゾナーゼ処理

^ 抗HAの代わりに抗NAに基づくFFAアッセイ

§ VH-PD力価に基づく  
いくつかのプロセス変更を太字で示す。

【0263】

S V H - S V H からカラム上ベンゾナーゼ処理へのベンゾナーゼ処理の変更： 最初のプロセスでは、ベンゾナーゼ処理は、宿主細胞DNAを除去するためにS V H工程で行われた。このプロセス工程には、D F F 1工程の実施前に20 LのS V Hと50 U / mLのベンゾナーゼを32 ℃で3時間混合することを含む。精製実施1～4では、S V H工程にベンゾナーゼを加えたが、精製実施5～9では、S V H工程からベンゾナーゼ処理を除き、50 U / mLのベンゾナーゼを含んだクロマトグラフィーバッファーおよび樹脂接触時間50分を用い、C Sクロマトグラフィー工程中のカラム上ベンゾナーゼ処理プロセスとして行った。表21に示されるように、精製実施2～4のH C DレベルはS V HとD F F 1の間で用量当たりのngとして顕著には減少しなかったが、精製実施5～9では、ベンゾナーゼ - カラム上C Sクロマトグラフィー工程の後のH C Dレベルは目に見えて減少した。P C RおよびP i c o G r e e nの双方により分析された最終バルク製品のH C Dレベルは、精製実施5～9(0.84～1.42 ng / 用量)では、精製実施1～4(3.25～40.49 ng / 用量)に比べてはるかに低いことが分かった。この変更は、最終バルクH C Dを1 ng / 用量以下に引き下げるにより最終製品の品質を改良しただけでなく、ベンゾナーゼ処理時間および必要なベンゾナーゼ総量を低減することによりプロセス効率を高めた。カラム上ベンゾナーゼ処理の効果は、C Sクロマトグラフィーの節でさらに考察する。

## 【0264】

D F F 1 : 表20に示されるように、D F F 1工程は実施4(52.7%)を除いて良好な回収率(78.3～154.6%)を示した。D F F 1工程は細胞と細胞残渣を除去し、通常力価の損失を示さなかった。この工程は、若干のH C D(表21)も除去したがH C P(表22)は除去しなかった。20 LのS V Hを濾過するために使用される両方のフィルター(1.2および0.45 μm)膜面積は、両方のフィルターの能力に基づき、スケールダウンV m a x / P m a x研究からそれぞれ安全係数2.6および1.5を用いて予め決定された。濾過流速1.5 L P Mでは、1.2 μmおよび0.45 μmフィルターのフラックスはそれぞれ500 L M Hおよび474 L M Hであった。1.2 μmおよび0.45 μmフィルターの実際のS V Hローディングはそれぞれ111および105 L / m<sup>2</sup>であった。

## 【0265】

T F F 1 - T F F 1 の工程回収率を高めるための装備および回収方法の変更： 最初の6精製ランは、各ランのT F F 1工程における効力回収率において107.2%から30.3%への緩やかな低下を示した(表20)。精製実施1～6では、T F F 1中空纖維カートリッジを0.5 N NaOHで洗浄し、そのプロセス後に再使用した。中空纖維カートリッジの洗浄効率が、各実施後にゲル層を完全除去するのに十分であるかどうかは分からぬが、これによりこのプロセス工程後のウイルス回収率が低下する可能性がある。より一貫した工程回収率を得るために、精製実施7から始まる既存のプロトコールに対して3つの主要な変更を行った。第一に、中空纖維の洗浄不足の可能性を排除するために、各実施に対して新しい中空纖維を使用した。第二に、T F F 1産物を収集する前に保持液バルブを開け透過液バルブを閉じて濃縮保持液を中空纖維カートリッジ中で5分間再循環させた。これにより、濃縮およびダイアフィルトレーションプロセス中に膜の表面に形成した可能性があるゲル層が除去され、回収が可能となった。第三に、中空纖維カートリッジ中の残留ウイルスを回収するために、同じ再循環流速および時間(5分)を用いて追加のバッファー洗い流し工程を実施し、そのバッファー洗い流し液を産物と一緒に収集した。これらの変更を行った後、精製実施7～9ではT F F 1の工程回収率は一貫して高いままであった、およそ75～80%(表20)。図11は、16000 / 秒の剪断速度および20 p s iでの一定のT M Pで実施したT F F 1プロセスの典型的なフラックス曲線を示している(精製実施8)。ウイルス溶液がより濃縮される(5 X U F)につれてフラックスは減少した、フラックスは、ダイアフィルトレーション工程開始時には減少し続けたがダイアフィルトレーション工程(5 X D F)の終わり頃にわずかに増加した。フラックスは、

精製実施全てで、70～100LMHの範囲に及び、ウイルス力価およびFFF1濾液の濁度と関係があるように思われた。ダイアフィルトレーション工程終了時のフラックスのわずかな増加は、5XDF終了時のHCPおよびHCD不純物の追加除去が理由であると思われる。表22に示されるように、HCP不純物の大部分(80～90%)は第1回目のTFF(TFF1)工程で除去された。これは、500kDaより小さいHCPが透過液で除去されているはずであるためである。ウイルス回収物の1XSPへのバッファー交換の完了は、5XDFプロセス終了時に12.5mS/cmから1mS/cmへと減少した導電率トレースにより示された(図11)。

#### 【0266】

HCD除去を増加させるためのCSオンカラムベンゾナーゼ処理：初期実験は、小規模CSカラム(ベッド高さ10cmおよびウイルス負荷濃度樹脂1mL当たりおよそ9.010g<sub>10</sub>FFFUを用いる)を使用して設計された。プロセスが改善されたため、樹脂1mL当たりのウイルス負荷濃度、線流速およびカラムベッド高さは直線的にスケーリングした。負荷力価樹脂1mL当たり9.010g<sub>10</sub>FFFUにおいて、20Lの安定化したウイルス回収物(回収物力価は8.310g<sub>10</sub>FFFU/mLである)を処理するには、CSベッド容量4Lが必要である。展開実施1～5では、4LのCS樹脂をBPG200カラム(20cm内径(i.d.))に最終ベッド高さ12.5cmまで充填した。BPG200カラムへの200cm<sup>2</sup>/時間での充填中に、背圧が推奨充填圧2.5バル圧を超えた(図12)。動的結合能研究を実施し、それによりCS樹脂は実際には、上記の充填条件下では樹脂1mL当たりおよそ9.710g<sub>10</sub>FFFUまで結合することができる事が示された。そのようなものとして、ウイルス負荷樹脂1mL当たり9.510g<sub>10</sub>FFFUにおいて、20Lの安定化したウイルス回収物(回収物力価は8.310g<sub>10</sub>FFFU/mLである)を処理するのにCS樹脂は1.3Lしか必要でない。

#### 【0267】

1.3LのCS樹脂が充填されたBPG200カラムは最終カラムベッド高さ4.5cmとなる。カラムベッド高さの大幅な減少により、ベッド高さ15～20cmの充填カラム(大規模プロセスに典型的)と比べてより低い分解能となる。精製実施6から、BPG100カラムに目標のベッド高さ17.5cm+/-2.5cmまで充填してCSカラム容量を1.4Lにした。BPG100カラムでは、充填流速500cm<sup>2</sup>/時間を用い、結果として生じた充填圧は樹脂の推奨充填圧限界を超えていた。この充填圧は、BPG200カラムの場合の充填圧とは異なる(図12)。

#### 【0268】

精製実施6～9(BPG100)と精製実施2～5(BPG200)との比較、実負荷を樹脂1mL当たり8.4から8.910g<sub>10</sub>FFFUへ(BPG200カラム)および樹脂1mL当たり9から9.310g<sub>10</sub>FFFUへ(BPG100カラム)と増加した場合、それぞれ平均して54%および59%になる類似のCS溶出液工程回収率(表20)。オンカラムベンゾナーゼ処理を用いて実施したHCD除去についてのカラム性能に関し、精製実施6～9(BPG100)は、精製実施5(BPG200)でのCS溶出液HCDレベル(1.2ng/用量)と同程度のCS溶出液HCDレベル(0.3～1.5ng/用量)を示した(表21)。カラム性能は類似していたが、カラムサイズの減少は、CS溶出液およびバッファー調製物の容量が減少することによりプロセス効率が高まったため、より大規模の生産へと移行する際に重要になるであろう。図13は、CSBPG100カラム(実施9)から溶出された単一ウイルスピーカーに典型的なクロマトグラムを示している。

#### 【0269】

表23に示されるように、オンカラムベンゾナーゼ処理(実施5～9)での総HCDクリアランスは、バッチ式ベンゾナーゼ処理(実施2～4)よりも良好であった。ベンゾナーゼ処理でのウイルス精製後に残留するHCDの割合は、0.15～3.4%の範囲に及んだ(実施2～4)が、オンカラムベンゾナーゼ処理でのウイルス精製後に残留するHCDの割合は、0.02～0.15%の範囲に及んだ(実施5～9)。CS工程でのオンカ

ラムベンゾナーゼ処理は、S V H 工程でのバッチ式ベンゾナーゼ処理よりも総 H C D 除去が高率であり、そのため、最終バルクの D N A レベルがより低いことが示された。

#### 【 0 2 7 0 】

オンカラムベンゾナーゼ処理の利用には、バッチ式ベンゾナーゼ処理と比べていくつかの利点がある。第一に、2つのプロセス工程を組み合わせて1つにし、S V H 工程でのベンゾナーゼ処理の3時間をC S オンカラム工程での1時間のベンゾナーゼ処理に置き換えることによりプロセス効率が増加する。第二に、精製プロセスに必要なベンゾナーゼの総量が減少する。バッチ式ベンゾナーゼ処理は20 - L ウイルス回収物に対して100万単位のベンゾナーゼが必要であるが、一方、オンカラムベンゾナーゼ処理は20万単位のベンゾナーゼしか必要でない。よって、オンカラムベンゾナーゼ処理では、必要なベンゾナーゼ総量が5倍減少する。

#### 【 0 2 7 1 】

T F F 2 - ベンゾナーゼクリアランスを増加させるために T F F 2 におけるダイアフィルトレーション容量を増加させる : 表20に示されるように、全9精製実施でのT F F 2 の工程回収率は一貫して64%を上回った(64 ~ 150.8%)。実施3では、C S 溶出容量は3.2Lであった。290 cm<sup>2</sup> 中空纖維を使用し、中空纖維膜にローディングするC S 溶出液は110 L / m<sup>2</sup>まで増加し、総プロセス時間は6時間であった。その後の2連続実施では、長いプロセス時間を避けるためおよびローディング濃度を、小規模研究で立証されたおよそ20 ~ 50 L / m<sup>2</sup>に維持するために1400 cm<sup>2</sup> 中空纖維膜を使用した。しかしながら、実施6から、カラムサイズを4Lから1.4Lへと変更し、溶出容量も0.9L以下まで減少した。溶出液容量のこの減少はカラムサイズに正比例した。実施6 ~ 9では、C S 溶出液ローディング濃度を20 ~ 50 L / m<sup>2</sup>に維持するために290 cm<sup>2</sup> 中空纖維カートリッジを使用した。図14は、16000 / 秒の剪断速度および21 p s i の一定のT M Pで実施した、精製実施8でのT F F 2 プロセスの典型的なフラックストレース曲線を示している。T F F 2 フラックスはダイアフィルトレーションプロセスを通して適度に安定し、作業条件により汚損が生じなかつたことが分かる。フラックスは、精製実施全てで、80 ~ 110 L M H の範囲に及んだ。

#### 【 0 2 7 2 】

ベンゾナーゼのクリアランスを向上させるために、T F F 2 バッファー交換容量も5ダイアボリュームから8ダイアボリュームへと増加させた。表24に示されるように、プロセスをオンカラムベンゾナーゼ処理工程へと変更した場合(実施5)、C S 溶出液のベンゾナーゼレベルは>75 n g / mL であり、ベンゾナーゼはC S カラムと結合しウイルス産物と共に溶出されることが分かる。また、1 X S P B 後の1 C V ~ 4 C V の通過サンプルを評価することによりC S カラムへのベンゾナーゼ結合も確認された。通過サンプルはベンゾナーゼレベルが低いことが分かった(表24)。よって、精製実施8および9では、検出限界(L O D)を下回るレベルまでベンゾナーゼクリアランスを増加させるためにT F F 2 バッファー交換容量を5ダイアボリュームから8ダイアボリュームへと増加させた。結果として、ベンゾナーゼレベルは、ダイアフィルトレーションを5 X D F から8 X D F へと増加させることによりさらに4 ~ 5倍低下した。この変更により最終バルクのベンゾナーゼレベルはL O Dを下回るまで低下した(0.1 n g / 用量未満)(表24)。

#### 【 0 2 7 3 】

D F F 2 - 最終バルクの最終無菌濾過のためにフィルターサイズを増大する : 表20に示されるように、150 cm<sup>2</sup> および300 cm<sup>2</sup> の0.22 μm 最終フィルターを使用した平均工程回収率はそれぞれ88.3 ~ 111.1% および65.8 ~ 108%である。C T M キャンペーン実施での最終無菌濾過中の供給流の閉塞を避けるために最終フィルターサイズとして300 cm<sup>2</sup> のフィルターを選択した。0.6 ~ 1 L の最終バルクを濾過するために使用した膜面積は、ローディングが20 ~ 150 L / m<sup>2</sup> の範囲であることを事前に立証した小規模研究に基づいた。300 cm<sup>2</sup> フィルターでは濾過流速は0.38 L P M であり、そのフィルターでのフラックスは760 L M H であった。そのフィルターでの実ローディングは20 ~ 33 L / m<sup>2</sup> であった(小規模研究から決定された範囲内

10

20

30

40

50

である)。

**【0274】**

3 d p i から 2 d p i への上流 (S U B) プロセス回収時間の変更 : 精製実施 8 から、ウイルス回収時間を 3 d p i (60 ~ 65 時間回収) から 2 d p i (48 時間回収) へと変更した。ウイルス投入量 0.001 ~ 0.003 F F U / 細胞を用いた場合、ピークウイルス力価は 48 時間 d p i の時点において観察された。回収時間を変更することにより、精製実施 8 および 9 での S V H 工程に示されるように(表 21 および表 22) 出発 H C D および H C P レベルが低下した。また、この変更により最終バルク製品(表 21 および表 22) 中の H C D および H C P の不純物レベルも低下し、そのため、最終製品の品質も向上した。

10

**【0275】**

精製プロセスの実施により良好なウイルス回収率および純度を得た : 精製実施 8 および 9 において全実施プロセスを実証した。これらの 2 つの実施の平均総力価回収率は 43.4 % であり、平均 H C D 不純物レベルは 0.72 n g / 用量 (P i c o G r e e n による) および 0.1 n g / 用量 (P C R による) であり、H C P 不純物レベルは 0.21 μ g / 用量であり、ベンゾナーゼ不純物レベルは 0.0035 n g / 用量であった。これらは全て精製バルク仕様を下回る。

**【0276】**

要するに、プロセス効率および最終製品品質を向上させるために初期精製プロセスに対して以下を含むいくつかの変更を行った、1) S V H 中の H C D および H C P 不純物レベルを低下させるためにウイルス回収を 3 d p i から 2 d p i へと変更し、2) 総 H C D 分解および除去を増進するために H C D 処理工程を S V H でのバッチ式ベンゾナーゼ処理から C S オンカラムベンゾナーゼ処理へと変更し、3) C S 樹脂の目標ローディング濃度を 9.010 g<sub>10</sub> F F A / m L から 9.510 g<sub>10</sub> F F A / m L へと高め(それによりカラムサイズを 4 L から 1.4 L へと減少する)、4) ベンゾナーゼ除去増進するために T F F 2 での最終調剤バッファー交換容量を 5 ダイアボリュームから 8 ダイアボリュームへと増加させ、5) C T M 実施での最終濾過中の閉塞を避けるために最終無菌濾過ローディングを平均 25 L / m<sup>2</sup> の半分減少させた。

20

**【0277】**

最終精製プロセスを図 10 に示し、精製実施全てのデータを表 25 に要約する。改良型の精製プロセスでの力価に基づく平均総ウイルス回収率は 43.4 % であり、平均不純物レベルはベンゾナーゼについては 0.0035 n g / 用量であり、H C D については 0.72 n g / 用量 (P i c o G r e e n ) および 0.1 n g / 用量 (P C R ) であり、H C P については 0.19 μ g / 用量であった。これらの不純物レベルは仕様を下回る。精製実施 6 ~ 9 での最終バルクを、直接標識式(ソラレン - ビオチン)プロットおよび直接染色法(アガロースゲル)を用いた D N A サイズ分析により分析した。これらの分析での主要なシグナルは D N A サイズ分布は 500 b p 以下を示した(データは示されていない)。

30

**【0278】**

8.4 実施例 4. 細胞培養生産したインフルエンザの改良精製プロセス

40

第 8.3 節に記載するロバストな大規模精製プロセスに対して行うことができるさらなる改良を図 10 b に概略を示し、下に詳細に記載する。特に、回収タンクの必要をなくし、操作数を減らし、総処理時間を改善するために、回収工程、清澄化工程および T F F 1 工程を結合してよい。よりスマーズな結合作業のために、T F F 1 作業を一定の T M P から一定のフラックスへと変更してよい。加えてまたはあるいは、より低い T M P を利用する(20 p s i 未満、例えば、約 10 p s i (12,000 / 秒) ~ 約 14.5 p s i (16,000 / 秒) の間)。バルク容量を減少させるために、T F F 2 工程に 2 X U F 工程を加えてよい。所望により、その後の全ての精製工程におけるローディングを潜在的に 2 倍にするために、T F F 1 に 10 X U F を用いる。

**【0279】**

50

表26に、いくつかの精製実施についてのパラメーターの変更、回収率、およびHCDを要約している。これらの実施では、本質的には上記のように培地交換を行わないMediV SFM 110において生産されたウイルスを利用した（第8.1節に示す実施例参照）。精製実施全てを、下に示す場合を除き、本質的には1bプロセスについて記載されるように実施した（第8.3節に示す実施例参照）。実施番号25番、27番および30番は、回収工程、DFF工程およびTFF1工程を結合することにより実施した。これらの実施では、TFF1を一定のフラックス（50LMH、剪断速度12,000／秒）で行った。実施番号24番、26番および31番は、回収工程、DFF工程およびTFF1工程を結合しないで実施した。これらの実施では、TFF1をより低いTMP（10psi、剪断速度16,000／秒）で行った。馴化ウイルス負荷物をCS工程用に分割し、2mM MgCl<sub>2</sub>または10mM MgCl<sub>2</sub>のいずれかで処理した。DNA分析では、MgCl<sub>2</sub>濃度を高めることによってDNAサイズが減少しないことが示された（データは示されていない）。しかしながら、収率が低下した例もある（表26参照）。

#### 【0280】

表27に、培地交換を行うMediV SFM 105において生産されたウイルスのいくつかの精製実施についてのパラメーターの変更、回収率、およびHCDを要約している。これらの実施では、本質的には国際特許公報WO 08/105931に記載されるように生産されたウイルスを利用した（特に、実施例12参照）。精製実施全てを、下に示す場合を除き、本質的には1bプロセスについて記載されるように実施した（第8.3節に示す実施例参照）。実施番号40番、41番および42番は、回収工程、DFF工程およびTFF1工程を結合することにより実施した。これらの実施では、TFF1を一定のフラックス（35LMH、剪断速度12,000／秒）または一定のTMP（10psi、剪断速度12,000／秒）のいずれかで行った。一定のフラックスを用いた実施は小規模で実施し、CS工程のためだけに処理した。実施番号43番は、回収工程、DFF工程およびTFF1工程を結合しないで実施した。

#### 【0281】

総合して、これらの研究は、MediV SFM 110（MXを行わない）およびMediV SFM 105（MXを行う）プロセスからの材料は類似のフラックス/TMPの特徴を示すことを示している。より低い剪断（12,000／秒）、より低いTMP（10psi）、およびより低いフラックス（35LMH）を用いることにより工程TFFプロセス時間は長くなるが、回収工程、DFF工程およびTFF工程の結合を行う場合には総プロセス時間が短くなる可能性がある。これらの精製実施でのHCDの終濃度は0.01～0.6ng／用量の間であると思われた（上記の1bプロセスで得られたものと同程度である）。総収率は一般に30%を上回った。

【表 26】

MXを行わない追加のパラメーター変更に関するHCDおよび収率の概要

実施番号	#24	#25	#26	#27	#30	#31
株	B/Flo	B/Flo	A/SD	A/SD	A/Uru	A/Uru
SVH 容量(L)	14.5	10	12.5	15	11	14.5
TFF 結合	なし	あり	なし	あり	あり	なし
TFF 方式	TMP	Flux	TMP	Flux	Flux	TMP
TFF1 パラメーター	16k s-1, 10 psi	12k s-1, 50 LMH	16k s-1, 10 psi	16k s-1, 50 LMH	12k s-1, 50 LMH	16k s-1, 10 psi
力価(SVH) ( $\log_{10}$ FFU/mL)	8.5	8.5	8.9	8.9	8.8	9.1
DNA(SVH) (ng/mL)	277	2048	1672	2667	3649	1266
最終 バルク DNA (ng/用量)	0.23	0.39	0.07	0.09	0.59	0.05
最終 バルク DNA (ng/用量) (10mM MgCl <sub>2</sub> )	0.18	0.31	0.07	0.07	0.57	0.04
PB 力価 (2mM MgCl <sub>2</sub> )	10	10	10	9.9	9.9	10.8
PB 力価 (10mM MgCl <sub>2</sub> )	10.1	10	9.9	10	9.8	10.6
総収率(%) (2mM MgCl <sub>2</sub> )	43	36	13	23	42	69
総収率(%) (10mM MgCl <sub>2</sub> )	46	40	8	21	15	59

10

20

30

## 【表27】

MXを行う追加のパラメーター変更に関するHCDおよび収率の概要

実施番号	#40**		#41		#42		#43
株	A/UR		A/SD		A/UR		A/UR
回収 (d p i)	3		3		3		3
ATF/DFF 結合	あり		あり		あり		なし
一定フラックス/TMP	TMP	Flux*	TMP	Flux*	TMP	Flux*	TMP
TFF1 パラメーター	12k 10 psi	s-1, 35 LMH	12k 10 psi	s-1, 35 LMH	12k 10 psi	s-1, 35 LMH	12k 10 psi
CS ローディング (log <sub>10</sub> FFU/mL)	9.51	9.03	9.88	9.82	9.41	9.23	9.18
回収力価 (log <sub>10</sub> FFU/mL)	8.7	8.7	8.8	8.8	8.4	8.4	8.2
回収 DNA (ng/mL)	395	395	1105	1105	2923	2923	2362
最終バルク DNA (ng/用 量)	0.2	0.41*	0.12	0.21*	0.2	0.77*	0.4
最終バルク力価 (log <sub>10</sub> FFU/mL)	9.7	9.0*	10*	10.0	9.7*	9.4*	9.5
総収率	17%	22**	26%	45**	32%	43**	40%

\* 一定のフランクスでの実施は小規模で実施し、CSカラム工程のためだけに処理した

\*\* 40番は金曜日回収のためTFF1後週末にかけて保持した

## 【0282】

8.5 実施例5：RSVの生産のための下流製造プロセス細胞に基づくRSVワクチンのロバストかつスケーラブルな製造プロセスの開発には、スクリーニングおよび種々のプロセスパラメーターの最適化が必要であった。最初の下流プロセス開発は10L規模を行い、製造プロセスは30L規模とした。ウイルス回収物(VH)はバイオリアクターで生産し、感染7日後(dpi)に回収した。VHをHyQtainerに送り込み、3μmダイレクトフロー濾過を用いて清澄化した。最初の濾過で、細胞残渣、微小担体、40~70%の宿主細胞DNA、およびVH中に存在していた他の粒子を除去する。この工程の後に、残留する宿主細胞DNAを、非特異的エンドヌクレアーゼであるベンゾナーゼ10U/ウイルス回収物mLで酵素的に消化した。反応を5mM EDTAで停止した。ベンゾナーゼ処理の後、VHを0.65μm濾過により清澄化し、安定化バッファー(安定化バッファーの組成については、材料の節を参照)で1/6(v/v)希釈することにより安定化した。安定化されたVHは室温で(21±2)12~16時間保存することができる。翌日、安定化されたVH材料で、流路長60cmおよび纖維内径1mmの500kDa中空纖維カートリッジを用いてタンジェントフロー濾過(TFF)を行った。このTFF工程は、安定化されたVHを濃縮し、外因性のエンドヌクレアーゼ、宿主細胞DNAおよび宿主細胞タンパク質などの夾雑物を除去する。TFF工程はまた、濃縮されたVHを選択された処方バッファーに交換するためにも用いられる。TFF工程は、安定化されたVHの5倍濃縮およびSPP2バッファー(バッファーの組成については、材料の節を参照)で7倍のバッファー交換を含んだ。SPP2バッファーによる7倍ダイアフィルトレーションの後、SPP3バッファー(バッファーの組成については、材料の節を参照)で4倍ダイアフィルトレーションを行った。次に、保持液を、最終的にSartorius Sartocleanセルロースアセテート3/0.8μmフィルターを用いて清澄化した。10L3回および30L2回のバイオリアクター実施に関する精製プロセスの力価回収率ならびに精製RSVバルクの力価および不純物特性を以下に例として示す。

## 【0283】

## 8.5.1 材料および方法

10

20

30

40

50

材料、試薬および器具：類似の性能を有する他の材料、器具および試薬は容易に置き換えが可能である。

## 【0284】

- 1) 10倍SPG; 2180 mMスクロース、1100 mMリン酸カリウムおよび540 mMグルタミン酸一ナトリウム、pH 7.3 (HyClone, Ltd., Logan, UT, カタログ番号SH3A2025.01)
- 2) SPP1; 1498 mMスクロース、200 mM第一リン酸カリウム、500 mM第二リン酸カリウム、1050 mM KCl、pH 7.2 (HyClone, Ltd., Logan, UT, カタログ番号SH3A2559.01)
- 3) SPP2; 730 mMスクロース、28.5 mM第一リン酸カリウム、71.2 mM第二リン酸カリウム、150 mM KCl、pH 7.2 (HyClone, Ltd., Logan, UT, カタログ番号SH3A2560.03) 10
- 4) SPP3; 292 mMスクロース、7.7 mM第一リン酸カリウム、12.3 mM第二リン酸カリウム、100 mM KCl、pH 7.0 (HyClone, Ltd., Logan, UT, カタログ番号SH3A2561.03)
- 5) 注射水(WFI)、10 L / バッグ(HyClone, Ltd., Logan, UT, カタログ番号SH302 21.24)
- 6) 実験用全般に好適な水(VWR, West Chester, PA, カタログ番号BDH1168-4LP)
- 7) ベンゾナーゼエンドヌクレアーゼ、純度等級I(EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, カタログ番号1.01697.00021, Lot# K38894897) 20
- 8) 1 M 塩化マグネシウム(Sigma, St Louis, MO, カタログ番号M-1028)
- 9) 0.5 M エチレンジアミン四酢酸(EDTA)二ナトリウム塩溶液(Sigma, St Louis, MO, カタログ番号E-7889)
- 10) 10 N 水酸化ナトリウム(VWR, West Chester, PA, カタログ番号VW3247-7)
- 11) 0.5 N 水酸化ナトリウム(VWR, West Chester, PA, カタログ番号VW3221-4)
- 12) 8 N 水酸化カリウム(VWR, West Chester, PA, カタログ番号200056-170)
- 13) 無水エチルアルコール(VWR, West Chester, PA, カタログ番号BJAH090-4)
- 14) スクロース(VWR, West Chester, PA, カタログ番号EM 1.07653.9028)
- 15) リン酸一カリウム(VWR, West Chester, PA, カタログ番号JT3248-7)
- 16) リン酸二カリウム(VWR, West Chester, PA, カタログ番号JT3250-7) 30
- 17) 塩化カリウム(VWR, West Chester, PA, カタログ番号EM-PX1405-5)
- 18) Sartopure PP2、3 μm、2000 cm<sup>2</sup> フィルター(Sartorius, Edgewood, NY, カタログ番号5595302P9-00-A)
- 19) Sartopure PP2、0.65 μm、1000 cm<sup>2</sup> フィルター(Sartorius, Edgewood, NY, カタログ番号5595305P8-00-A)
- 20) Sartopure PP2、0.65 μm、500 cm<sup>2</sup> フィルター(Sartorius, Edgewood, NY, カタログ番号5595305P7-00-A)
- 21) Sartoclean CA、3.0 + 0.8 mm、500 cm<sup>2</sup> フィルター(Sartorius, Edgewood, NY, カタログ番号5625304E7-00-A)
- 22) Acro 50 0.2 μm PTFEベントフィルター(Pall Corporation, East Hills, NH, カタログ番号4251) 40
- 23) 500 kDa 中空纖維カートリッジ(膜面積: 850 cm<sup>2</sup>、管腔径: 1 mm)(GE Healthcare, Piscataway, NJ, カタログ番号UFP-500-E-4X2MA)
- 24) 500 kDa 中空纖維カートリッジ(膜面積: 2800 cm<sup>2</sup>、管腔径: 1 mm)(GE Healthcare, Piscataway, NJ, カタログ番号UFP-500-E-6A)
- 25) 3/8" ポリスルホンインラインホース取り付け口(VWR, West Chester, PA, カタログ番号16001-592)
- 26) 3/8" ポリスルホンシリコンシール(VWR, West Chester, PA, カタログ番号1600 1-600)
- 27) Masterflex 白金硬化シリコンチューブ、L/S 36 (Cole-Parmer, Vernon 50

- on Hills, IL, カタログ番号EW-96410-36)  
 28) Masterflex白金硬化シリコンチューブ、L/S 24 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, カタログ番号EW-96410-24)  
 29) Masterflex precision Pharmedチューブ、L/S 16 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, カタログ番号06485-16)  
 30) 白金硬化シリコンチューブ、1/2" ID x 3/4" OD (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, カタログ番号EW-95802-23)  
 31) Dow Corning Pharma強化チューブ、1/2" ID (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, カタログ番号EW-96108-10)  
 32) Quant-iT Picogreen dsDNAキット(Invitrogen, Eugene, OR, カタログ番号P11496) 10  
 33) クーマシープラス - The Better Bradfordアッセイキット(The Thermo Scientific, Rockford, IL, カタログ番号23236)  
 34) ベンゾナーゼ ELSAキットII (EMD Chemicals, Inc, Gibbstown, NJ, カタログ番号1.01681.0002)  
 35) 1M MgCl<sub>2</sub> (Sigma, St. Louis, Missouri, Cat. No. M1028, lot # 085K892 0)  
 36)  
 37) 96ウェルマイクロプレート(Greiner Bio-one, New York, NY, カタログ番号6550 90) 20  
 38) 125mLポリエチレンテレフタレートグリコール修飾(PETG)スクエア培地ボトル(VWR, West Chester, PA, カタログ番号16159-130)  
 39) 1L PETGスクエア培地ボトル(VWR, West Chester, PA, カタログ番号16159-136)  
 40) 2L PETGスクエア培地ボトル(VWR, West Chester, PA, カタログ番号16159-138)  
 41) 10L Flexiboyアセンブリ(Sartorius Stedim Biosystem, Edgewood, NY, カタログ番号SH30712.02) 30  
 42) 20L Flexiboyアセンブリ(Sartorius Stedim Biosystem, Edgewood, NY, カタログ番号SH30712.03)  
 43) 50L Flexiboyアセンブリ(Sartorius Stedim Biosystem, Edgewood, NY, カタログ番号SH30712.04))  
 44) 10Lポリプロピレンカーボイ(VWR, West Chester, PA, カタログ番号36494-090)  
 45) 20-L ポリプロピレンカーボイ(VWR, West Chester, PA, カタログ番号36494-092)  
 46) 2mL低温用ポリプロピレンバイアル、滅菌(VWR, West Chester, PA, カタログ番号66008-728)  
 47) pH試験紙4~9デュアルディスペンサー(VWR, West Chester, PA, カタログ番号60777-049) 40  
 器具  
 1) ポンプ、520S (Watson Marlow, Wilmington, MA, Catalog# 050.7131.10A)  
 2) ポンプ、620DI N/R (Watson Marlow, Wilmington, MA, Catalog# 060.417N.02A)  
 3) ポンプ、720SN/R (Watson Marlow, Wilmington, MA, Catalog# 070.413N.E0A)  
 4) サニタリーフィッティングを備えた12mm Sta-Pure 620 Load Sureエレメント(Watson Marlow, Wilmington, MA, Catalog# 960.0120.PFT)  
 5) サニタリーフィッティングを備えた19mm Sta-Pure 720 Load Sureエレメント(Watson Marlow, Wilmington, MA, Catalog# 960.0190.PFT)  
 6) バイオロジカルセーフティーキャビネット、純度クラスII (Labconco, San Ramon, 50

CA, Model# 96212042726)

- 7 ) ウエーブミキサー(Wavebiotech, LLC, Somerset, NJ, Part# MIXER20/50EH)  
 8 ) 秤、最大 : 3100 g (Sartorius Mechatronics, Catalog# BL3100)  
 9 ) 秤、最大 : 60 kg (Sartorius Mechatronics, Catalog# EB60EDE-I))  
 10 ) 秤、最大 : 150 kg (Sartorius Mechatronics, Catalog# E150EDE-I))  
 11 ) 圧力ゲージを備えた標準FlexStand (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Catalog# FS-01S-30)  
 12 ) 圧力ゲージを備えた低ボイド容量FlexStand (GE Healthcare, Piscataway, NJ, Catalog# FS-03LVS-30)  
 13 ) SciPres 耐圧フローセル(Scilog, Middleton, WI, Part# 080-699PS-5) 10  
 14 ) Molecular Dynamics SpectraMax GEMINIマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Part# EM))  
 15 ) SoftMax Pro プログラム、バージョン4.8 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Part# SMP53-GXP-SITE)  
 16 ) Winwedge、標準的版(TAL Technologies, Philadelphia, PA, Part# Winwedge Std)

#### 10 Lバイオリアクター回収物からのRSVの精製

10 Lバイオリアクター実施から得られたRSV VH (~8 L)を、3.0 μm フィルター (Sartopure PP2、2000 cm<sup>2</sup>) を用い、フラックス 0.41 mL / 分 / cm<sup>2</sup> で清澄化した。得られた濾液を、ウェーブミキサー上の 10 L HyQtainer アセンブリにて 32 ± 3 で 3 時間、10 U のベンゾナーゼ / ウイルス回収物 mL および 5 mM の MgCl<sub>2</sub> とともにインキュベートし、宿主細胞DNAを分解した。EDTAを終濃度 5 mMまで添加して反応を停止させた。ベンゾナーゼ処理した回収物を、0.65 μm (Sartopure PP2、500 cm<sup>2</sup>) フィルターを用い、フラックス 3.0 mL / 分 / cm<sup>2</sup> で清澄化した。次に、この濾液を、SPP1バッファー 7 倍濃縮溶液を用い、終濃度 1倍 SPPまで安定化し、室温 (21 ± 2) で一晩 (12 ~ 16 時間) 保存した。安定化されたウイルス回収物を 5 倍濃縮し、SPP2バッファーを用いて 7 倍ダイアフィルトレーションした後、SPP3バッファーを用いて 4 倍ダイアフィルトレーションした。FFFプロセスは 850 cm<sup>2</sup> 中空纖維カートリッジを用いて行った。ロード比率 (膜面積当たりのウイルス供給の重量)、剪断速度、および膜間差圧 (TMP) はそれぞれ 10 g 供給 / cm<sup>2</sup>、12,000 / 秒および 15 psi であった (FFFパラメーターについては表1参照)。保持液を、3 / 0.8 μm (Sartoclean CA、500 cm<sup>2</sup>) フィルターを用いて、フラックス 3.8 mL / 分 / cm<sup>2</sup> で清澄化した。次に、このフィルターを、保持液の 3 分の 1 容量の SPP3 で洗浄した。得られた濾液を合わせ、125 mL PETGボトルで 100 mL アリコートとして急速冷凍または速度制御冷凍を行い、-80 で保存した。また、各精製工程の後、分析用にサンプル (1 または 10 mL) を収集した。それらを急速冷凍し、-80 で保存した。

#### 【0285】

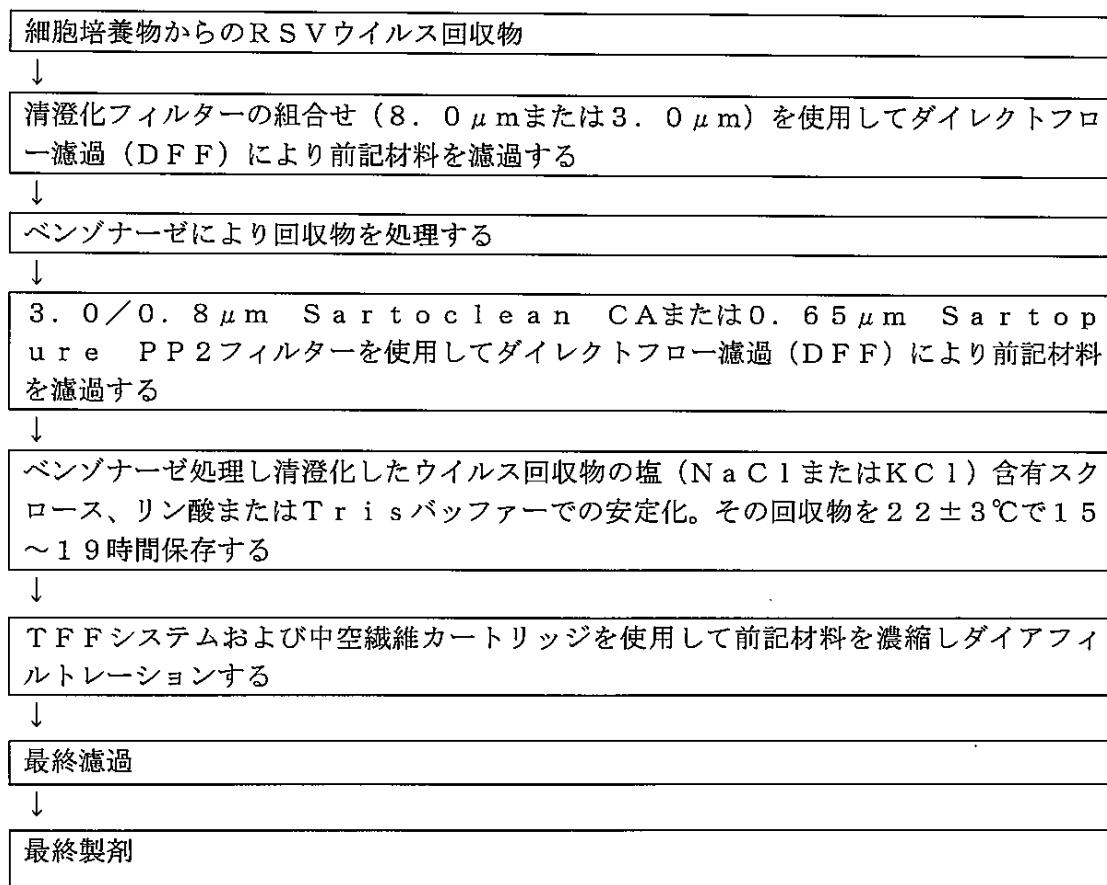
#### 30 Lバイオリアクター回収物からのMED1-559の精製

30 Lバイオリアクター実施から得られたRSVウイルス回収物 (~25 L)を、平行に配置した 3.0 μm フィルター (Sartopure PP2、2000 cm<sup>2</sup>) を用い、フラックス 0.41 mL / 分 / cm<sup>2</sup> で清澄化した。得られた濾液を、ウェーブミキサー上の 50 L HyQtainer アセンブリにて 32 で 3 時間、10 U のベンゾナーゼ / ウイルス回収物 mL および 5 mM MgCl<sub>2</sub> とともにインキュベートし、宿主細胞DNAを分解した。EDTAを終濃度 5 mMまで添加して反応を停止させた。ベンゾナーゼ処理回収物を、0.65 μm (Sartopure PP2、1000 cm<sup>2</sup>) フィルターを用い、フラックス 3.0 mL / 分 / cm<sup>2</sup> で清澄化した。次に、この濾液を、SPP1バッファー 7 倍濃縮溶液を用い、終濃度 1倍 SPPまで安定化し、室温 (21 ± 2) で一晩 (12 ~ 16 時間) 保存した。FFFプロセスは 2800 cm<sup>2</sup> 中空纖維カートリッジを用いて行った。ロード比率 (膜面積当たりのウイルス供給の重量)、剪断速度 40  
50

、および膜間差圧（T M P）はそれぞれ10 g供給 / cm<sup>2</sup>、12,000 / 秒および15 psiであった（TFFパラメーターについては表28参照）。保持液を、3/0.8 μm（Sartoclean CA、500 cm<sup>2</sup>または1000 cm<sup>2</sup>）フィルターを用いて、フラックス3.8 mL / 分 / cm<sup>2</sup>で清澄化した。次に、このフィルターを、保持液の3分の1容量のSPP3で洗浄した。得られた濾液を合わせ、125 mL PET Gボトルで100 mLアリコートとして急速冷凍または速度制御冷凍を行い、-80°で保存した。また、各精製工程の後、分析用にサンプル（1または10 mL）を収集した。それらを急速冷凍し、-80°で保存した。

## 【0286】

10 および30 LスケールにおけるRSV製造のための製造プロセスフローチャート



10

20

30

【表28】

【0287】		例	ウイルス回収物	ウイルスシード	HFカートリッジ	供給流速(L/分)	FFFプロセス	FFFシステム
1	BR09-068	V559-2a	UFP-500-E-4X2MA	3.53	5X UF ⇌ SPP2 で 7 倍 DF ⇌ SPP3 で 4 倍 DF	低ボイド容量 Flexstand	低ボイド容量 Flexstand	
2	BR09-069	V559-2a	UFP-500-E-4X2MA	3.53	5X UF ⇌ SPP2 で 7 倍 DF ⇌ SPP3 で 4 倍 DF	低ボイド容量 Flexstand	低ボイド容量 Flexstand	
3	BR09-073	V559-2a	UFP-500-E-4X2MA	3.53	5X UF ⇌ SPP2 で 7 倍 DF ⇌ SPP3 で 4 倍 DF	低ボイド容量 Flexstand	低ボイド容量 Flexstand	
4	SUB 090529	V559-1b	UFP-500-E-6A	12.0	5X UF ⇌ SPP2 で 7 倍 DF ⇌ SPP3 で 4 倍 DF	標準Flexstand	標準Flexstand	
5	SUB 09-005	V559-2a	UFP-500-E-6A	12.0	5X UF ⇌ SPP2 で 7 倍 DF ⇌ SPP3 で 4 倍 DF	標準Flexstand	標準Flexstand	

蛍光フォーカスアッセイによる感染力の測定

サンプルのウイルス力価はV A S ( V a c c i n   A n a l y t i c a l   S c i e n c e ) グループにより評価された。このアッセイは、試験サンプル中のウイルスの定量に

Fタンパク質特異的モノクローナル抗体を用いる。

**【0288】**

Quant-iT PicoGreen dsDNAアッセイによる総DNAの定量

サンプル中の総DNA濃度は、Quant-iT PicoGreen dsDNAアッセイキットを生産者の説明書に従って用いて測定した。サンプルの4連続希釈液(1:2)を2反復で作製した。1.95~1000ng/mLの範囲の標品を3反復で作製した。希釈は全て、96ウェルマイクロプレートにて、1倍SPGバッファーを用いて行った。蛍光強度を標準DNA濃度に対してプロットした。サンプルの総DNA濃度は、標準曲線の線形回帰への当てはめから推定した後、適当な希釈倍率で調整することにより求めた。低DNA濃度に対する推定値の精度を上げるために、当てはめた直線のy切片は(0,0)に設定した。各サンプルについて報告された総DNA濃度はこの連続希釈に対して求められた濃度の平均である。10

**【0289】**

リアルタイムPCRによる残留Vero宿主細胞DNAの定量

サンプル中のVero宿主細胞DNAの濃度はVASグループにより測定された。このアッセイでは、ワクチンウイルスを含む細胞基質を含有するサンプルにおいて、アフリカミドリザル(Vero細胞由来)特異的DNAをリアルタイムPCRにより検出する。

**【0290】**

Bradfordタンパク質アッセイによる総タンパク質の定量

サンプルの総タンパク質濃度は、SOP Q0169に従い、ウシ血清アルブミン(BSA)を標品として、クーマシープラス(Bradford)アッセイキットを用いて測定した。2.5~25μg/mLの範囲の標品を3反復で作製した。まず、各サンプルの10倍希釈を行った。各希釈サンプルの3連続希釈液(1:2)を3反復で作製した。希釈は全て、96ウェルマイクロプレートにて、1倍SPGバッファーを用いて行った。標準BSA濃度に対して595nmの吸光度をプロットした。サンプルの総DNA濃度を適当な希釈倍率により求めた。各サンプルについて報告された総DNA濃度はこの連続希釈に対して算出された濃度の平均である。20

**【0291】**

ELISAによる残留Vero宿主細胞タンパク質の定量

サンプル中の残留Vero宿主細胞タンパク質の濃度はVASグループにより測定された。このアッセイでは、酵素結合免疫吸着アッセイを用いてアフリカミドリザル(Vero細胞由来)特異的タンパク質を定量する。用いる抗体は、ヤギでVero細胞溶解液に対して生成された精製ポリクローナル抗体である。30

**【0292】**

ELISAによるベンゾナーゼの定量

サンプルのベンゾナーゼ濃度は、ベンゾナーゼエンドヌクレアーゼELISAキットを用いて測定した。このアッセイでは、酵素結合免疫吸着アッセイを用いてベンゾナーゼを定量する。一次抗体はベンゾナーゼと結合し、二次抗体はベンゾナーゼおよび一次抗体複合体と結合し、450nmでの比色定量により検出される。標準曲線は、ベンゾナーゼ保存液を用いて作成する。40

**【0293】**

RSV-Fタンパク質発現の測定

SV-Fタンパク質の存在に関する同定試験は、ウエスタンプロットにより判定する。このアッセイでは、サンプルをSDS-PAGE上にマーカー、陽性対照および陰性対照とともに流す。転写装置および転写バッファーを用いて、タンパク質バンドをSDS-PAGEからナイロン膜に転写する。このナイロン膜をRSV-Fモノクローナル抗体とともにインキュベートし、これが次に二次抗体の結合により検出される。

**【0294】**

キャピラリー電気泳動によるDNAのサイジング

DNAのサイジングはVAS(Vaccin Analytical Science50

) グループにより行われた。サンプルをキャピラリー電気泳動にローディングし、DNAを分離する。異なるサイズのDNA断片が、相対的蛍光単位を読み取ることにより定量される。

#### 【0295】

##### 浸透圧の測定

サンプルの浸透圧は、Advanced Instrumentsからのオスモメーターを用いて測定した。まず、標品をオスモメーターに流し、次に、サンプルをサンプルチューブに入れ、圧の測定値を記録する。

#### 【0296】

##### 8.5.2 結果および考察

30L 規模 (SUB 092529 および SUB 09-005) でのRSV 製造プロセスの性能は 10L 規模 (BR09-068、BR09-069 および BR09-73) に匹敵するものであった。総回収率は 6 ~ 14% の間であり、5 回の実施で一貫していた (表 29)。ウイルス回収物の感染力は 6.5 ~ 7.0 log<sub>10</sub> FFU / mL の範囲であり、精製バルクの感染力は 6.0 ~ 6.7 log<sub>10</sub> FFU / mL の範囲であった (表 30)。SUB 090529 のウイルス回収物の力価は特に低かったが、これはこの培養物をウイルスシード V559-2b ではなく V559-1b に感染させたためである。結果的に、得られた精製バルクの力価もまた 5 つのロットのうち最低であった。V559-1b は T- フラスコで細胞の搔き取りにより生産されたので、高い程度のヘテロ性を示し、その使用は回転瓶で生産され、ガラスピーブに接着した細胞を引き剥がすことにより作製された V559-2b を用いた場合よりも大きな力価変動と低い感染力をもたらし得る。SUB 09-005 VH および最終バルクの力価も、感染時の細胞密度が低かったために低かった。

#### 【0297】

精製バルクの残留ベンゾナーゼ、宿主細胞 DNA および宿主細胞タンパク質濃度は全て、RSV バルクに関して提案されている仕様を満たした (表 31)。300 bp 未満の残留 DNA 断片のパーセンテージは 80% を超え、1000 bp を超えるもののパーセンテージは 5% 以下であった (表 32)。RSV - F タンパク質の発現は精製バルクの 5 つのロット全てで検出され、RSV が存在することが確認された (表 31)。

#### 【0298】

##### 結論

バイオリアクター由来の回収物からの RSV 向けに開発された精製プロセスを 10L および 30L 規模で評価し、このプロセスのロバスト性と最終バルクの品質を評価した。両規模における、これらのウイルス回収物の感染力、精製バルクの感染力、および総力価回収率はそれぞれ 6.5 ~ 7.0 log<sub>10</sub> FFU / mL、6.0 ~ 6.7 log<sub>10</sub> FFU / mL、および 6 ~ 14% の範囲であった。精製バルクの残留ベンゾナーゼ、宿主細胞タンパク質、および宿主細胞 DNA 濃度は全て、RSV バルクに関して提案されている仕様を満たした。さらに、80% を超える残留 DNA 断片が 300 bp 未満のサイズであった。

10

20

30

【表29】

10および30L規模でのRSV製造プロセスの力価回収率

工程の力価回収率 (%)	BR09-068 (10-L)	BR09-069 (10-L)	BR09-073 (10-L)	SUB (30-L)	090529	SUB (30-L)	09-005
3 μm濾過	97	87	91	93		87	
ベンゾナーゼ処理 (10U/mL、32°C、3時間)	56	63	64	53		40	
0.65μm濾過	79	67	65	63		63.1	
安定化	186	186	125	59		77.4	
一晩保存後の安定化	54	71	61	99		316.2	
5倍UF ⇌ SPP2で7倍DF ⇌ SPP 3で4倍DF	32	43	59	74		21.6	
3/0.8μm濾過+フィルター洗浄	53	67	46	85		40	
全体	7	14	8	11		6	

【表30】

10Lおよび30L RSVハイオリアクター実施からのウイルス回収物および精製バーレクの感染力、総DNA濃度、および総タンパク質濃度

特性	製造プロセス仕様	BR09-068 (10-L)	BR09-069 (10-L)	BR09-073 (10-L)	SUB (30-L)	092529 (30-L)	SUB (30-L)
ウイルス回収物	感 染 力 ( $10^{\text{FFU}}$ / mL)	-	6.95	7.02	6.83	6.50	6.65
	総DNA (ng/mL)	-	587	807	454	627	692.4
	総タンパク質 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	-	153	134	156	115	103.5
精製バーレク	感 染 力 ( $10^{\text{FFU}}$ / mL)	$\geq 6.0 \log_{10} \text{FFU/mL}$	6.31	6.65	6.27	6.01	6.0
	総DNA (ng/mL)	-	71	79	26	48	35.1
	総タンパク質 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	-	106	120	84	36	58.3

【表3-1】

特性	製造プロセス仕様	BR09-068 (10-L)	BR09-069 (10-L)	BR09-073 (10-L)	SUB (30-L)	090529 (30-L)	SUB 09-005
残留宿主細胞DNA (ng/10 <sup>5</sup> 用量)	<100 ng/10 <sup>5</sup> 用量	0.30	0.19	0.12	0.89	—*	—*
残留宿主細胞タンパク質 (μg/10 <sup>5</sup> 用量)	<40 μg/10 <sup>5</sup> 用量	1.02	0.54	0.35	—*	—*	—*
残留ベンゾナーゼ (ng/10 <sup>5</sup> 用量)	<0.1 ng/10 <sup>5</sup> 用量	0.01	BLD	0.01	BLD	BLD	BLD
浸透圧 (mOs/kg)	結果の報告	607	596	595	600	597	—
pH	結果の報告	7.14	7.13	7.12	7.11	7.12	7.12
RSV-Fタンパク質発現	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
* 分析中							

【表32】

精製バルクにおける0.65 μm濾過後の残留DNA断片のサイズ分布

ロット番号	工程	<300 bp	300 - 500 bp	500 - 1000 bp	>1000 bp
BR09-06 8 (10-L)	0.65 μm濾過後	74.6	10.8	7.1	7.6
	精製バルク	83.4	8.5	4.1	3.9
BR09-06 9 (10-L)	0.65 μm濾過後	72.4	10.2	7.9	9.5
	精製バルク	81.8	8.6	4.8	4.7
BR09-07 3 (10-L)	0.65 μm濾過後	72.5	10.2	7.5	9.9
	精製バルク	87.9	6.6	2.8	2.6
SUB 090 520 (30 -L)	0.65 μm濾過後	68.9	13.2	8.3	9.7
	精製バルク	83.2	7.8	4.1	5.0
SUB 09- 005 (30-L)	0.65 μm濾過後	68.7	9.5	9.1	12.7
	精製バルク	82.9	8.9	4.4	3.8

## 【0299】

明瞭にし理解するために上述の発明を多少詳しく記載してきたが、この開示を読むことにより本発明の真の範囲を逸脱することなく、形式および細部における種々の変更を行うことができることは当業者には明らかであろう。例えば、上記の全ての技術および装置は種々の組合せで用いてよい。本願において引用される全ての刊行物、特許、特許出願または他の文書は、各個別の刊行物、特許、特許出願または他の文書があらゆる目的のために参照により組み入れられることが個別に示されたのと同じようにあらゆる目的のために参考によりそれらの全体が組み入れられる。加えて、次の米国仮特許：2006年9月16日出願の第60/845,121号；2006年12月22日出願の第60/871,721号；2007年5月9日出願の第60/917,008号；2007年7月25日出願の第60/951,813号；2008年9月24日出願の第61/099,749号；および2007年9月14日出願の米国特許出願第11/855,769号は、参考によりそれらの全体が組み入れられる。

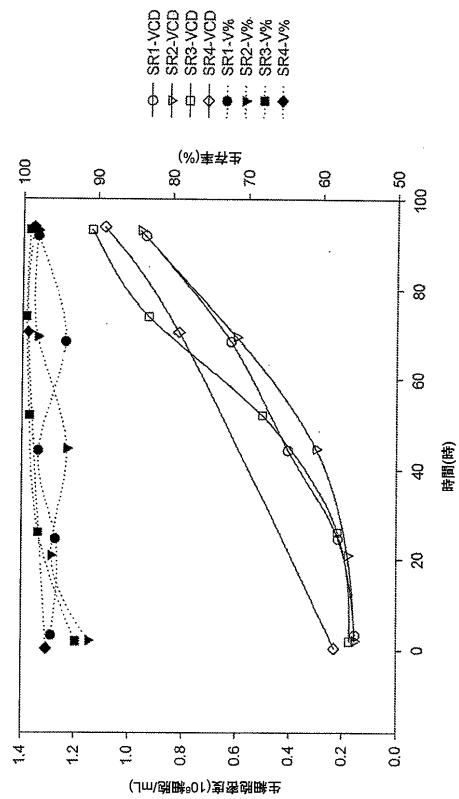
10

20

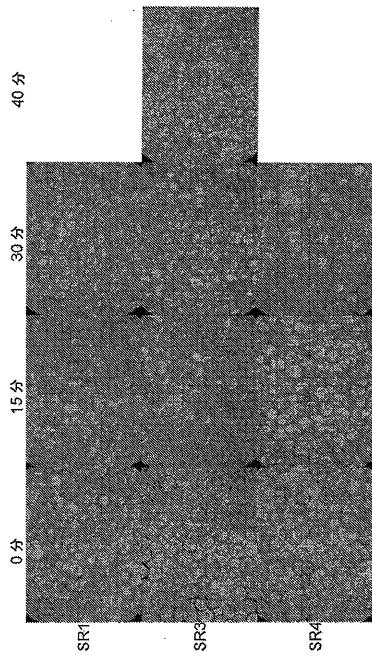
30

40

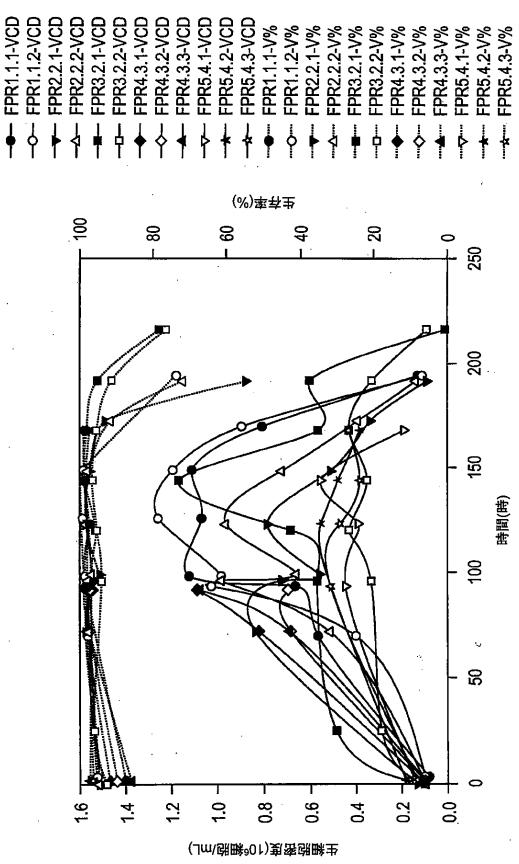
【図1】



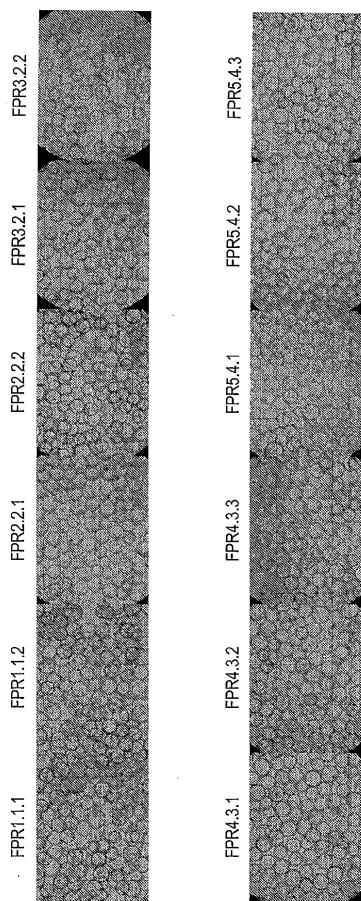
【図2】



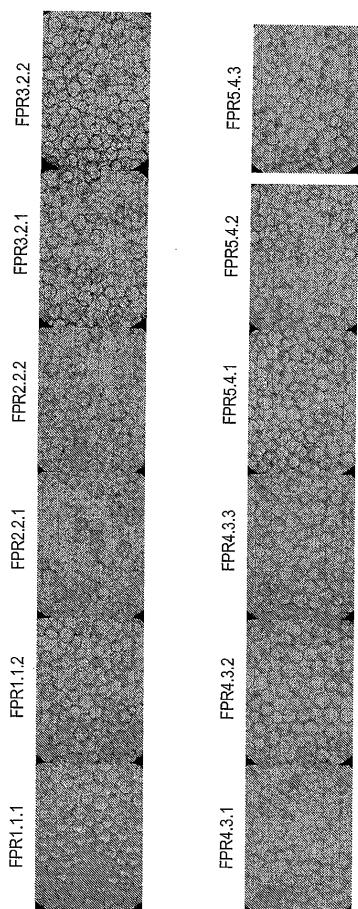
【図3】



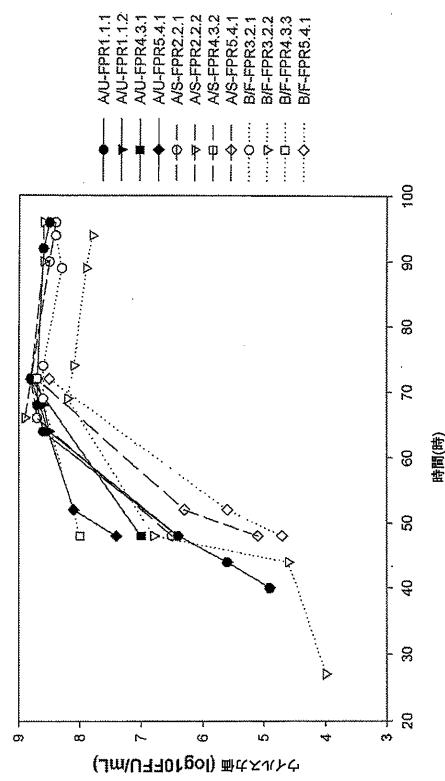
【図4】



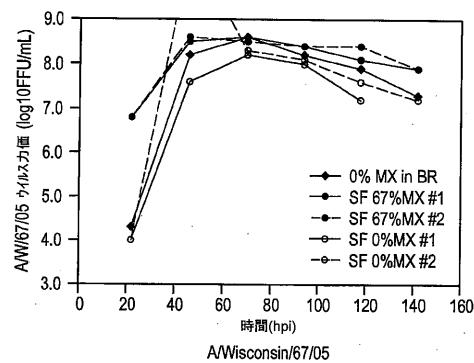
【図5】



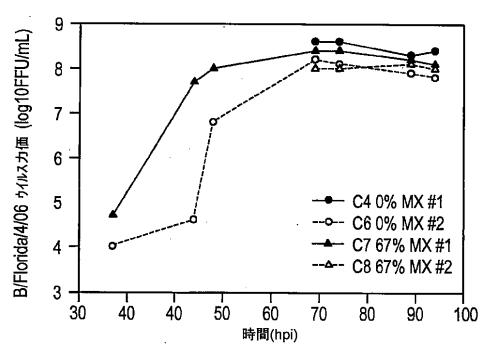
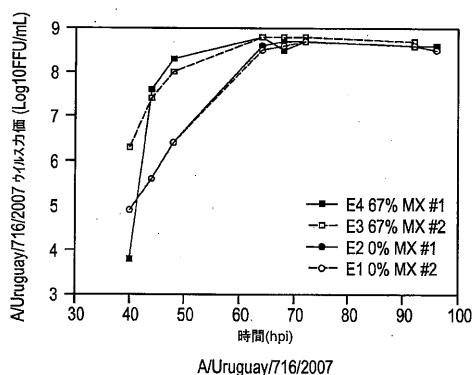
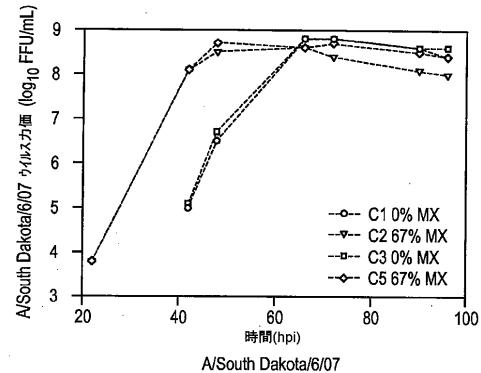
【図6】



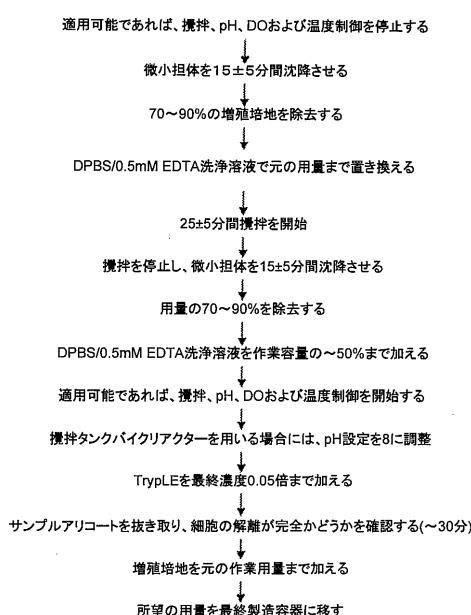
【図7 A】



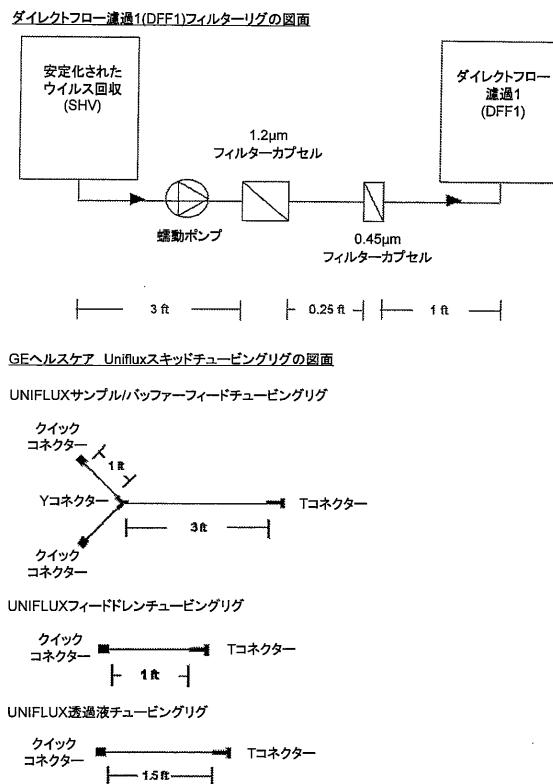
【図7 B】



【図8】

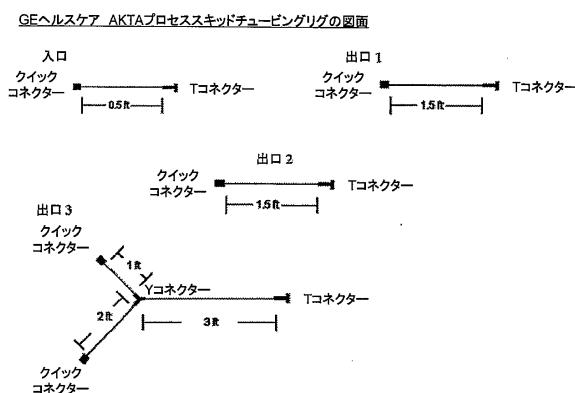


【図9 A】



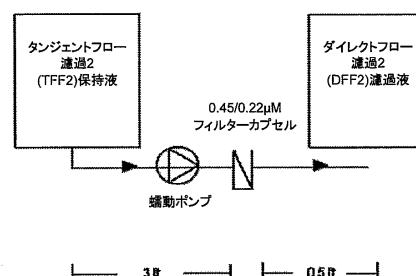
注:全てのチューピングリグは3/8"径のシリコンチューブで作製

【図9 B】



注:全てのチューピングリグは3/8"径のシリコンチューブで作製

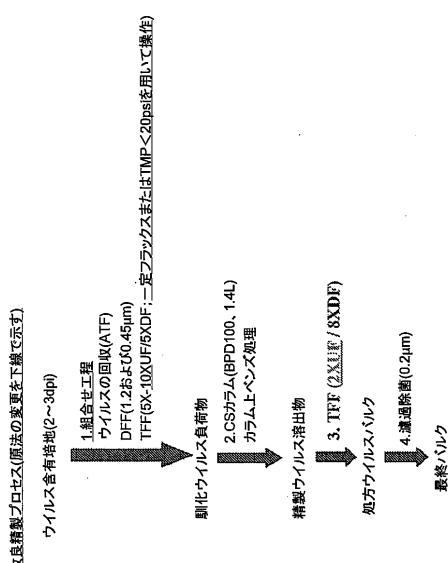
ダイレクトフロー通過2(DFF2)フィルターリングの図面



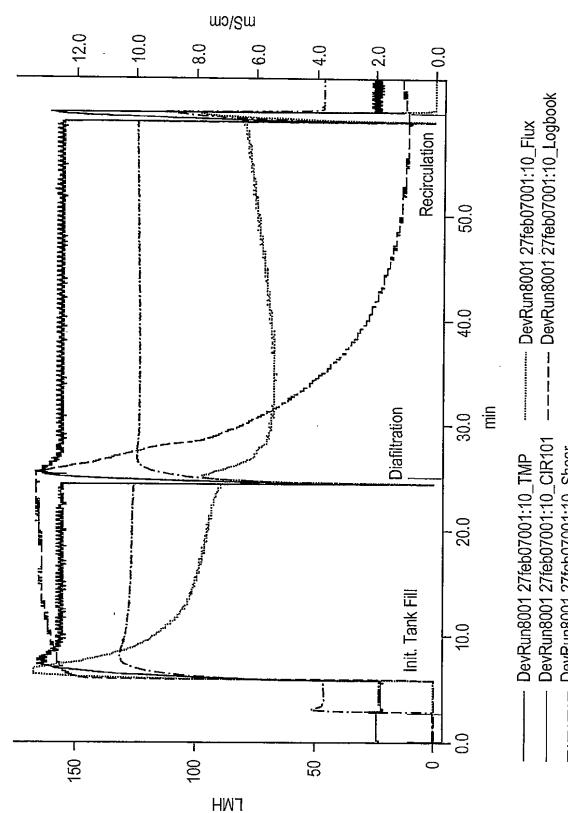
【図10 A】



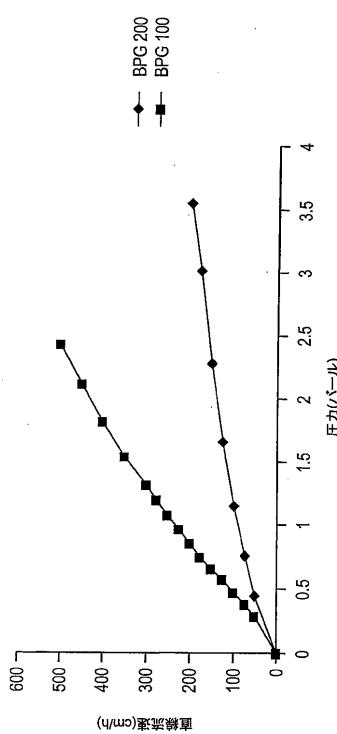
【図 10B】



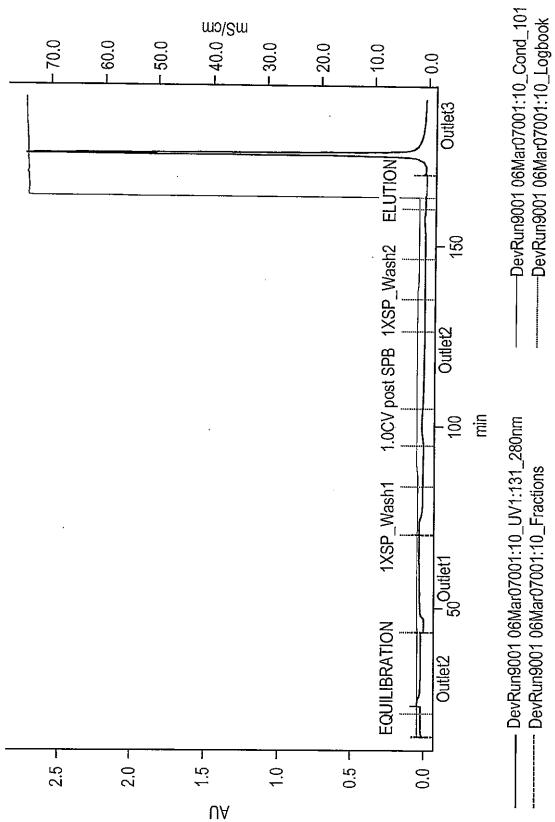
【図 11】



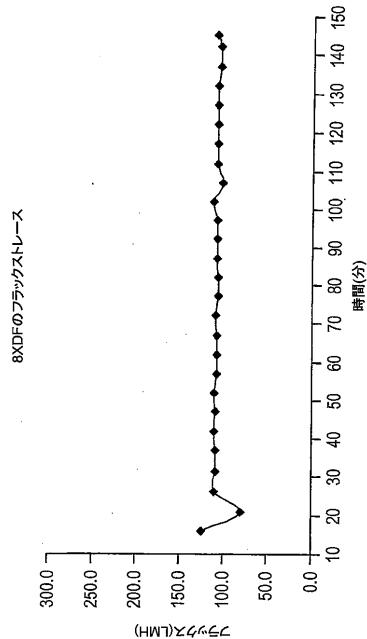
【図 12】



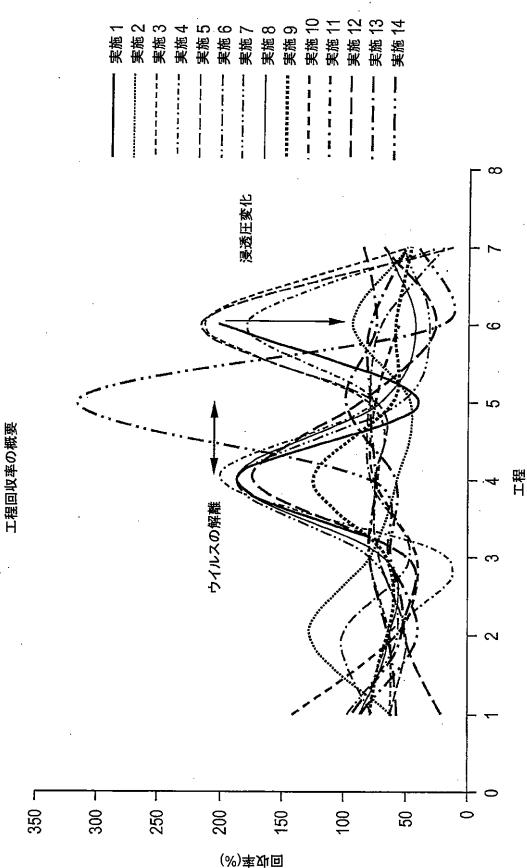
【図 13】



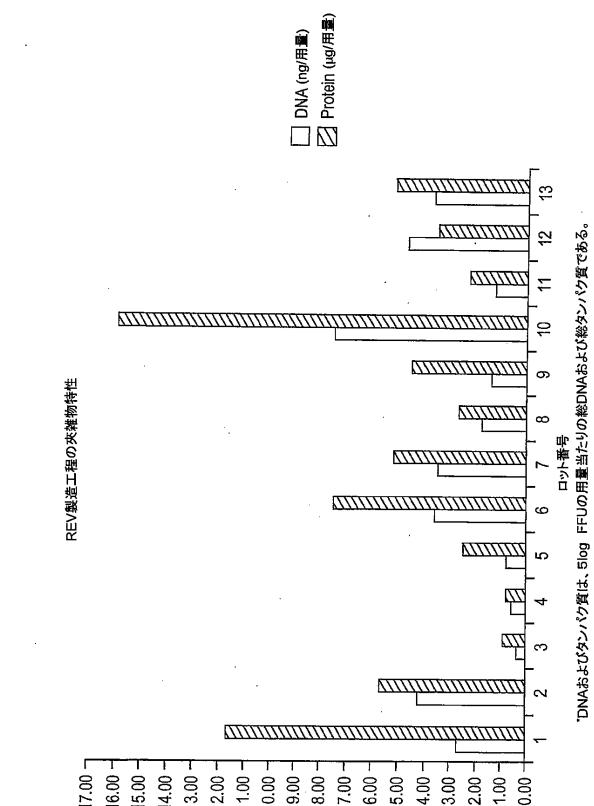
【図14】



【図15】



【図16】



---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/187,721  
(32)優先日 平成21年6月17日(2009.6.17)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/122,456  
(32)優先日 平成20年12月15日(2008.12.15)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/099,749  
(32)優先日 平成20年9月24日(2008.9.24)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 トンプソン , マーク  
アメリカ合衆国 95037 カリフォルニア州 , モーガン ヒル , セレーヌ ドライブ 174  
70  
(72)発明者 ウィー , ジャニス  
アメリカ合衆国 94403 カリフォルニア州 , サン マテオ , デル レイ ストリート 30  
17  
(72)発明者 ナグバル , アカンクシャ  
アメリカ合衆国 95129 カリフォルニア州 , サン ホセ , アパートメント 127 , アルバ  
ニー サークル 4691

審査官 幸田 俊希

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0171955(US, A1)  
米国特許出願公開第2006/0188977(US, A1)  
米国特許出願公開第2007/0249019(US, A1)  
国際公開第2005/080556(WO, A1)  
特開2004-135665(JP, A)  
国際公開第2003/093463(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 7/00  
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
Thomson Innovation  
PubMed