

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4283544号
(P4283544)

(45) 発行日 平成21年6月24日(2009.6.24)

(24) 登録日 平成21年3月27日(2009.3.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 5/06 (2006.01)

C 1 2 N 5/00

E

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00

請求項の数 36 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-588913 (P2002-588913)	(73) 特許権者	591011502
(86) (22) 出願日	平成14年5月3日(2002.5.3)		ワイス
(65) 公表番号	特表2005-508139 (P2005-508139A)		W y e t h
(43) 公表日	平成17年3月31日(2005.3.31)		アメリカ合衆国〇794〇-〇874ニュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014271		ージャージー州 マディソン、ファイブ・
(87) 国際公開番号	W02002/091994		ジラルダ・ファームズ
(87) 国際公開日	平成14年11月21日(2002.11.21)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成17年3月23日(2005.3.23)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	60/290,096	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成13年5月10日(2001.5.10)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100116311
			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レンチウイルスで感染した細胞培養物において細胞密度を増すための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネオマイシンまたは生物学的に許容される塩の存在下において、少なくとも20%の増殖の促進を示す細胞培養物であって、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)感染宿主細胞、およびネオマイシンまたは生物学的に適合可能な塩から成る $5 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 60 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗生物質を含む細胞培養物。

【請求項 2】

宿主細胞が、リンパ球細胞から成る群から選択される少なくとも1つのメンバーである、請求項1記載の細胞培養物。

【請求項 3】

リンパ球細胞がT細胞リンパ球である、請求項2記載の細胞培養物。

【請求項 4】

リンパ球細胞が、IL-2非依存性FetJおよびFL6リンパ球細胞から成る群から選択される、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項 5】

ネオマイシンまたは生物学的に許容される塩が、細胞培養物の密度を増すのに有効である、請求項1記載の細胞培養物。

【請求項 6】

ネオマイシンまたは生物学的に許容される塩が、細胞培養物の細菌増殖を阻害するのに有効である、請求項1記載の細胞培養物。

【請求項 7】

ネオマイシンが $30 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 60 \mu\text{g} / \text{mL}$ の量で存在する、請求項 6 記載の細胞培養物。

【請求項 8】

細胞培養物が血清不含有培地中に存在するものである、請求項 1 記載の細胞培養物。

【請求項 9】

細胞を $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個生存細胞 / mL 細胞培養物の範囲内の密度で蒔く、請求項 1 記載の細胞培養物。

【請求項 10】

細胞を 3×10^5 個生存細胞 / mL の密度で蒔く、請求項 9 記載の細胞培養物。

10

【請求項 11】

ネオマイシンまたは生物学上許容される塩の存在下において、少なくとも 20 % の増殖の促進を示す細胞培養物であって、ネコ免疫不全ウイルス (FIV) 感染宿主細胞およびネオマイシンまたは生物学的に適合可能な塩を含み、該ネオマイシンが、他の抗生物質を実質上含まずに、細菌の増殖を阻害し、細胞培養物の密度を増すのに有効な $5 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 60 \mu\text{g} / \text{mL}$ の範囲の量で存在しているところの細胞培養物。

【請求項 12】

細胞培養物がゲンタマイシンまたはポリミキシン B を実質上含まない、請求項 11 記載の細胞培養物。

【請求項 13】

ネオマイシンが細胞培養物中に、少なくとも $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ の量で存在する、請求項 11 記載の細胞培養物。

20

【請求項 14】

宿主細胞が、リンパ球細胞から成る群から選択される少なくとも 1 つのメンバーである、請求項 11 記載の細胞培養物。

【請求項 15】

宿主細胞が T - リンパ球細胞である、請求項 14 記載の細胞培養物。

【請求項 16】

宿主細胞が、IL - 2 非依存性 Fe t J および FL 6 T リンパ球細胞から成る群から選択される少なくとも 1 つのメンバーである、請求項 15 記載の細胞培養物。

30

【請求項 17】

細胞を $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個生存細胞 / mL の範囲内の密度で蒔く、請求項 11 記載の細胞培養物。

【請求項 18】

細胞を 3×10^5 個生存細胞 / mL の密度で蒔く、請求項 17 記載の細胞培養物。

【請求項 19】

細胞を ネコ免疫不全ウイルス (FIV) で感染させた細胞培養物の密度を増す方法であって、 $5 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 60 \mu\text{g} / \text{mL}$ の範囲の濃度のネオマイシンまたは生物学的に適合可能な塩から成る抗生物質を該細胞培養物に添加することを含む、方法。

【請求項 20】

ネオマイシンを、細胞培養物中の細菌の増殖を阻害するのに有効な量で添加する、請求項 19 記載の方法。

40

【請求項 21】

さらに細胞培養物を $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 生存細胞 / mL の範囲内の密度まで蒔くことを含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

細胞培養物を 3×10^5 生存細胞 / mL の密度で蒔く、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

さらに少なくとも 1 つの培養サプリメントを細胞培養物へ添加することを含む、請求項 19 記載の方法。

50

【請求項 24】

細胞サプリメントがウシ血清アルブミン（BSA）である、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

ネオマイシンが、抗生物質を全く添加しない場合と比較して少なくとも 20% まで細胞密度を増すのに有効である、請求項 19 記載の方法。

【請求項 26】

ネオマイシンが、抗生物質を全く添加しない場合と比較して少なくとも 33.3% まで細胞密度を増すのに有効である、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

FIV 感染細胞の細胞培養物を培養するための方法であって、ポリキシミン B またはゲンタマイシンを実質上用いずに、5 μ g / mL ~ 60 μ g / mL の範囲の濃度のネオマイシンまたは生物学的に適合可能な塩を培養に添加することを含む、方法。

10

【請求項 28】

ネオマイシンの量が、細胞培養物中の細菌の増殖を阻害するのに有効である、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

ネオマイシンの量が少なくとも 20 μ g / mL 細胞培養物である、請求項 27 記載の方法。

【請求項 30】

ネオマイシンの量が少なくとも 30 μ g / mL 細胞培養物である、請求項 27 記載の方法。

20

【請求項 31】

さらに少なくとも 1 つの細胞培養サプリメントの有効量を培養に添加することを含む、請求項 27 記載の方法。

【請求項 32】

細胞培養サプリメントがウシ血清アルブミン（BSA）である、請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

FIV で感染した細胞培養に適した組成物であって、

a) 5 μ g / mL ~ 60 μ g / mL の範囲の濃度のネオマイシンまたは生物学的に適合可能な塩から成る抗生物質；および、

30

b) 少なくとも 1 つの細胞培養サプリメントを含む、組成物。

【請求項 34】

細胞培養サプリメントがウシ由来の血清である、請求項 33 記載の組成物。

【請求項 35】

細胞培養サプリメントがウシ血清アルブミンである、請求項 34 記載の組成物。

【請求項 36】

a) $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個生存細胞 / mL の、ネコ免疫不全ウイルスで慢性的に感染させた Fet-J 細胞；および、

b) 5 μ g / mL ~ 60 μ g / mL の範囲の濃度のネオマイシンまたは生物学的に適合可能な塩から成る抗生物質を含む、細胞培養組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、新規細胞培養物に関する。特に、本発明は、細胞密度を増し、および培養物の増殖を高めるための適当な抗生物質を含む、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）などのレンチウイルスで感染した新規細胞培養物に関する。本発明はまた、所定の抗生物質を用いて細胞培養物の密度を増すための新規方法にも関する。

50

【 0 0 0 2 】

発明の背景

レンチウイルスは、ヒトおよび動物の両方において様々な疾患を導き得るウイルスのクラスを構成する。これらの疾患は数ヶ月または数年もの潜伏により進行することが多い。例えば、AIDSに伴う病理は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)により引き起こされ、そして該疾患の慢性的進行から生じ、しばしば感染数年後に患者にカヘキシーおよび死を引き起こす。

【 0 0 0 3 】

レンチウイルスはまた、無尾猿およびサルなどの種、ならびにウマ、ロバ、ウシ、ヤギ、およびヒツジなどの家畜化された動物における様々な病理と関連している。これらの中で、ウマの感染性貧血症(EIA)は、世界中で生じているウマの最も主要感染性疾患として特徴づけられている。ヒツジのレンチウイルスは、世界のほとんどの地域における比較的一般的な病因であり、そして2つの優勢型としてマエジ-ビスナウイルスおよび進行性肺炎ウイルスが含まれる。ウシ免疫不全ウイルスは、ウシの病気の主要な原因である。

【 0 0 0 4 】

他のレンチウイルスは、ネコなどの動物における病理の生きた指標である。HIVに構造上類似するネコ免疫不全ウイルスは、飼いネコにおいて死を引き起こし得る。医師、獣医師、および研究者らはますます、これらのウイルスにより引き起こされる疾患を予防および治療するために多量の時間と資源を費やしつつある。

【 0 0 0 5 】

研究の要素には、公知のレンチウイルスの1つまたはそれ以上で感染した細胞、例えばリンパ球を含んでいる組織培養物を増殖させることが含まれる。リンパ球培養物またはネコ腎臓組織培養物などの足場依存性上皮様細胞をT-フラスコ、ローラーボトル、スピナーフラスコ、およびバイオリアクター中で、約20%までのウシ血清、および約5%までのウシ血清アルブミン(BSA)を追加した最小必須培地(MEM)、Roswell Park Memorial Institute(RPMI)、ダルベッコのMEM(DMEM)、およびAIM V(Gibco/LTI, Grand Island, NY)などの培地を用いて増殖させてよい。大規模培養物を巨大スピナー、発酵器、およびバイオリアクターにて、剪断予防化学物質、濃化剤、乳化剤、またはメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの化合物、およびブルロニックシリーズ、例えば、Wyandotte, MichiganのBASFコーポレーションにより製造されたPLURONIC(登録商標)F-68などの界面活性剤の存在下で増殖させてよい。

【 0 0 0 6 】

ウイルスを含んでいる組織培養物を維持するにつき、研究者らは、ウイルスを含んでいる細胞が生育および増殖し得るように、培養物内の有害な細菌を殺そうと努める。同時に相伴う目的は、細胞培養物の増殖を最大にすることである。増殖を促進し、および細菌を殺すために、抗生物質、通常はその組み合わせを細胞培養物に添加することが一般に認められている慣例である。例えば、U.S.第5,958,423号は、30mcg/mlのポリミキシンBおよびネオマイシン、および2.5mcg/mlまでのアンフォテリシンBを用いるMadin-Darbyウシ腎臓(MDBK)細胞の細胞培養物を記載する。

【 0 0 0 7 】

当該分野で今必要とされているものは、レンチウイルスで感染した細胞を含んでいる新規細胞培養組成物である。特に必要とされているのは、細胞の増殖を拡大し、同時に細菌などの有害な生物の存在を最少に抑え得る新規細胞培養物である。さらに必要とされているのは、その密度を組織増殖の増進により増すことができる、細胞培養物を増殖させる新規方法である。さらに必要とされるのは、培養物を構成する細胞の増殖を可能とし、および高めることにより細胞培養物の密度を最適化することができる新規添加剤である。

【 0 0 0 8 】

発明の概要

1つの具体例では、本発明は、少なくとも1つのレンチウイルス感染宿主細胞、および本質的にネオマイシンまたは生物学的に適合可能なその塩から成る増殖促進量の抗生物質

10

20

30

40

50

を含む細胞培養物に関する。

【0009】

本発明はさらに、少なくとも1つのレンチウイルス感染宿主細胞およびネオマイシンまたは生物学的に適合可能なその塩を、ネオマイシンが他の抗生物質を実質上含まず、細菌の増殖を阻害するのに、および培養細胞の密度を増すのに有効な量で存在するように含む細胞培養物に関する。

【0010】

本発明の部分として、細胞培養における細胞がレンチウイルスで感染している細胞培養物の密度を増すための方法であって、本質的にネオマイシンまたは生物学的に許容されるその塩から成る抗生物質を細胞培養物に添加することを含む方法である。

10

【0011】

本発明により、レンチウイルスで感染した細胞培養物への添加に適した組成物がさらに提供される。組成物は、本質的にネオマイシンまたは生物学的なその塩から成る抗生物質の細胞密度を高める量を、少なくとも1つの細胞培養サプリメントとともに含む。細胞培養サプリメントは、望ましくはウシ由来の血清である。

前記および他の態様および本発明の利点は、以下に示す本発明の好ましい具体例の詳細な記載からより明らかとなる。

【0012】

好ましい具体例の詳細な記載

本発明は細胞培養物に関する。本明細書中における使用のために意図されるものは、レンチウイルスを潜伏させる可能性のある、およびその増殖を許容し得る研究および試験に適したものである。そのような細胞培養物にはそれゆえ、1つまたはそれ以上のレンチウイルスで感染されることができ、リンパ球細胞および他のタイプの細胞が含まれる。他の適当な細胞培養物には、ネコリンパ球、繊維芽細胞様および上皮様細胞、ネコ腎臓細胞、Crandellネコ腎臓またはCRFK細胞、FL6、FL72、およびFL74（ネコリンパ球）細胞などが含まれる。T細胞リンパ球、ならびにIL-2非依存性FetJおよびFL6リンパ球が本明細書中の使用に好ましい。

20

【0013】

「レンチウイルス」なる用語は、本明細書中、制限するものではなく、ウマ感染性貧血ウイルス、マエジ-ビスナウイルス、進行性肺炎ウイルス、ヤギ関節炎-脳炎ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)、マカーク、およびアフリカモンキー、およびヒヒなどの種を感染するサル免疫不全ウイルス、およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)タイプIおよびIIを含む全ての公知の、および未知のレンチウイルスを包含するべく使用される。「レンチウイルス」なる用語はまた、前記のいずれかの類似体、誘導體、およびペプチド配列を含む。本明細書中の使用に好ましいのは、非ヒトレンチウイルス、および特に、ネコ免疫不全ウイルス(FIV)である。

30

【0014】

本発明の細胞培養物は、当該分野で公知の方法を用いて培養してよい。例えば、リンパ球などの宿主細胞を1つまたはそれ以上の前記レンチウイルスで、許容されている方法を用いて慢性的に感染させ、次いで適当な培地中で増殖させてよい。好ましくは、培地は実質上液体の培地である。よりいっそう好ましくは、培地は実質上血清を含まない培地としてまず提供される。宿主細胞は、例えば液体培地に懸濁してよい。培養した細胞培養物の細胞密度は、特定の宿主細胞、培地、および増殖チャンバーにより変化してよいが、細胞培養物（培地を含む）1ミリリットル(mL)当たり約 1×10^4 ~ 約 1×10^6 個の範囲内の適当な細胞であり得る。より好ましくは、細胞密度は、1ミリリットル当たり約 2×10^5 ~ 約 5×10^5 個の細胞である。

40

【0015】

本発明のさらなる部分として、細胞培養物は、培地内の細菌の増殖を阻害するのに、そして一方で同時に細胞の増殖を増し、それにより細胞培養物の密度を増すのに有効な適当な抗生物質を含む。本明細書中の使用に好ましいのは、全ての生物学的に適合可能なその

50

塩およびその誘導体、例えばネオマイシンスルフェートなどを含む抗生物質ネオマイシンである。「生物学的に適合可能な」により、細胞に有害な生物学的影響を実質上持たないその塩または誘導体を意味する。

【 0 0 1 6 】

細胞培養物に含まれるネオマイシンの量は、当業者の必要に応じて変化してよいが、典型的には、細胞培養物の密度を増す量で含まれる。約 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ 細胞培養物 ~ 約 $60 \mu\text{g} / \text{mL}$ 細胞培養物 (培地を含む) の範囲内のネオマイシンの量が通常好ましい。より好ましい具体例では、ネオマイシンは、細胞培養物中、少なくとも約 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、およびより好ましくは少なくとも約 $20 \mu\text{g} / \text{mL}$ の量で培養細胞中に含まれる。いっそうより好ましくは、ネオマイシンの量は、約 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ ~ 約 $60 \mu\text{g} / \text{mL}$ の範囲内である。

10

【 0 0 1 7 】

細胞培養物の増殖および密度を増すために、例えばポリミキシン B およびゲンタマイシンなどの他の抗生物質を含めることなく、ネオマイシンを利用することが好ましい。ポリミキシン B は、バチラス ポリミキサ (*Bacillus polymyxa*) (Prozmowski) Migula (Fam. Bacillaceae) の増殖により作製される、ポリミキシン B₁ および B₂ から誘導されてよい。ネオマイシンおよびポリミキシン B 両方を細胞培養物に含めることにより、多くの場合、ネオマイシン単独の使用と比較した場合に、細胞密度の有意に少ない増加が生じ得ることが今回見出された。

【 0 0 1 8 】

20

本発明の細胞培養物の他の成分には、典型的には少なくとも 1 つの培養サプリメントが含まれる。培養サプリメントは、ウシ由来のもの、例えばウシ血清からのものであってよく、ウシ血清およびウシ血清アルブミン (B S A) を含めることができる。培養サプリメントは、約 0 . 1 ~ 約 10 % 体積の最終細胞培養物の量で含まれてよい。

【 0 0 1 9 】

本明細書に記載するネオマイシンの使用は、いずれの抗生物質も含まない同一のレンチウイルス感染宿主細胞細胞培養物に対して少なくとも約 20 %、およびより好ましくは少なくとも約 33 1/3 % まで細胞密度を増し得る。細胞密度は、ヘマサイトメーターにおけるトリパンブルーエクスクルージョンの使用を含む、許容される方法により評価してよい。

30

以下の実施例は、本発明の 1 つの好ましい態様を示すべく提供するが、その範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。

【 0 0 2 0 】

実施例

この実施例では、ネコ免疫不全ウイルス (F I V) で慢性的に感染させた F e t - J 細胞を、B S A から誘導された $2.5 \text{ mg} / \text{mL}$ の A L B U M A X (登録商標) を追加した変更 D M E M : F 1 2 培地または A I M V 培地などの血清不含培地中で増殖させた。細胞を、Erlenmeyer フラスコにて、ロータリーシェーカー上、 150 rpm にて 37 にて懸濁して増殖させた。細胞を 3×10^5 個の生存細胞 / mL の細胞密度で蒔いた。細胞密度をヘマサイトメーターにてトリパンブルーエクスクルージョンにより測定した。G p 1 20 の発現の測定を酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) により、抗 - F I V G p 1 20 モノクローナル抗体を用いて行った。F I V の追加に関して評価される抗生物質には、ゲンタマイシン、ネオマイシン、およびポリミキシン B が含まれる。培地を、 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度の個々の抗生物質でスパイクした。細胞密度を、前記の方法により 24 時間基準にて決定した。結果を表 1 に示す。

40

【 0 0 2 1 】

【表 1】

表 1

実験群	抗生物質 濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0日 (細胞/mL)	1日	2日	3日	4日	5日
対照	N/A	3.0×10^5	3.6×10^5	5.5×10^5	1.0×10^6	1.2×10^6	1.2×10^6
ゲンタマイシン	30 $\mu\text{g/mL}$	3.0×10^5	2.4×10^5	3.2×10^5	6.5×10^5	1.1×10^6	1.1×10^6
ネオマイシン	30 $\mu\text{g/mL}$	3.0×10^5	4.7×10^5	7.8×10^5	1.2×10^6	1.3×10^6	1.8×10^6
ポリミキシンB	30 $\mu\text{g/mL}$	3.0×10^5	2.9×10^5	4.6×10^5	5.8×10^5	6.6×10^5	6.6×10^5
ポリミキシンB +ネオマイシン	30 $\mu\text{g/mL}$ +30 $\mu\text{g/mL}$	3.0×10^5	2.9×10^5	5.0×10^5	7.0×10^5	7.7×10^5	7.8×10^5

10

【0022】

表 1 からの結果は、ネオマイシンを追加した細胞培養物懸濁液が最良の全体的増殖および細胞密度の増加を有したことを示す。ゲンタマイシンは有意な効果を持たず、毎日の細胞密度は対照と実質上同じであった。ポリミキシン B、またはポリミキシン B と共にネオマイシンを追加した培養物は、抗生物質を用いなかった培養物と比較して細胞密度が抑制され、つまり、ネオマイシンだけを用いたものよりもより少ない密度であった。

20

【0023】

本発明はその特定の具体例を引用して記載したが、本発明の意図または範囲を離れることなく多くの変化および変更をなし得ることが認識されるべきである。従って、本発明は前記の記載により制限されるものとして考慮されるべきではないが、添付の請求の範囲の範囲によって制限されるのみである。

フロントページの続き

- (72)発明者 アン・クリスティーン・トーマス
アメリカ合衆国 0 3 8 6 7 ニューハンプシャー州ロチェスター、フランクリン・ハイツ 7 1 番
- (72)発明者 テリー・カレウン・ン
アメリカ合衆国 5 0 5 0 1 アイオワ州フォート・ドッジ、ノース・3 0 コート 2 0 2 7 番

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 Cell, 1993, Vol. 74, No. 6, p. 969-978

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 1/00-7/08

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

JMEDPlus(JDreamII)

JST7580(JDreamII)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)