

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6971994号
(P6971994)

(45) 発行日 令和3年11月24日 (2021. 11. 24)

(24) 登録日 令和3年11月5日 (2021. 11. 5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/071 (2010. 01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 7/00 (2006. 01)	C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 1/00 (2006. 01)	C 1 2 N 1/00 F
	C 1 2 N 1/00 B

請求項の数 23 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2018-541595 (P2018-541595)	(73) 特許権者	518148216
(86) (22) 出願日	平成28年10月31日 (2016. 10. 31)		ナショナル ヘルス リサーチ インステ イチューツ
(65) 公表番号	特表2018-533374 (P2018-533374A)		台湾, ミアオリ カウンティ 350, ズ ナン タウン, ケヤン ロード, ナンバー
(43) 公表日	平成30年11月15日 (2018. 11. 15)		35, アール1-7エフ, ルーム 701 5
(86) 国際出願番号	PCT/IB2016/056567	(73) 特許権者	516008497
(87) 国際公開番号	W02017/072744		フジフィルム アーバイン サイエнти フィック, インコーポレイテッド
(87) 国際公開日	平成29年5月4日 (2017. 5. 4)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92 705, サンタ アナ, イースト ワーナ ー 1830
審査請求日	令和1年10月21日 (2019. 10. 21)	(74) 代理人	100114775
(31) 優先権主張番号	62/248, 954		弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成27年10月30日 (2015. 10. 30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
微生物の受託番号	DSMZ DSM ACC3309		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン生産のための無血清合成培地中のMDC K浮遊細胞株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有限会社ライブニッツ研究所のDSMZ - ドイツ微生物細胞培養コレクション (Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikro - organismen und Zellkulturen GmbH) でDSMZ ACC3309として寄託された適応メイディン・ダービー・イヌ腎 (MDC K) 細胞および合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地を含み、前記適応MDC K細胞が、マイクロキャリアを含まない浮遊培養物中にある、組成物。

【請求項 2】

前記合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地が、約20 mM ~ 約30 mMのグルコース、約25 mM ~ 約30 mMのグルコース、または約26 mM ~ 約28 mMのグルコースを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地が、セリン、アルギニン、ロイシン、チロシン、イソロイシン、スレオニン、バリン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、フェニルアラニン、ヒスチジン、メチオニン、アラニン、およびトリプトファンを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記適応MDC K細胞が、ワクチン用のウイルスを生産するのに適している、請求項1 ~ 3のいずれか1項に記載の組成物。

10

20

【請求項 5】

前記ウイルスが、抗原性を維持している、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記ウイルスが、インフルエンザウイルスである、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記適応 M D C K 細胞が、培養の間培地交換を必要としない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

有限会社ライプニッツ研究所の D S M Z - ドイツ微生物細胞培養コレクション (L e i b n i z - I n s t i t u t D S M Z - D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o - o r g a n i s m e n u n d Z e l l k u l t u r e n G m b H) で D S M A C C 3 3 0 9 として寄託された適応メイディン・ダービー・イヌ腎 (M D C K) 細胞においてワクチン生産用のウイルスを生産する方法であって、前記適応 M D C K 細胞が、マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養することができ、前記方法が、合成培地でありかつ動物性成分を含まない増殖培地と前記適応 M D C K 細胞をマイクロキャリアを含まない浮遊状態で接触させることと、前記適応 M D C K 細胞にウイルスを感染させることと、前記ウイルスを回収することとを含む、方法。

10

【請求項 9】

前記培地が、約 2 0 m M ~ 約 3 0 m M のグルコース濃度をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 0】

前記グルコース濃度が、前記培養の間中維持される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地が、セリン、アルギニン、ロイシン、チロシン、イソロイシン、スレオニン、バリン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、フェニルアラニン、ヒスチジン、メチオニン、アラニン、およびトリプトファンを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 2】

合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地中、マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養できる適応メイディン・ダービー・イヌ腎 (M D C K) 細胞を産生する方法であって、前記合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地が血清を含まず、前記方法が、

30

a) 攪拌されたバイオリアクターへ接着 M D C K 細胞を準備することと、

b) 前記 M D C K 細胞を浮遊培養に適応させるために十分な時間、攪拌されたバイオリアクター中、マイクロキャリアの非存在下で、約 1 % ~ 約 1 0 % の血清を含む増殖培地中で前記接着 M D C K 細胞を培養することと、

c) ステップ b) の前記増殖培地から前記適応 M D C K 細胞を分離することおよび前記分離された M D C K 細胞を前記攪拌されたバイオリアクターへ戻すことと、

d) 約 2 0 m M ~ 約 3 0 m M のグルコースを含みかつ血清を含まない合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地中の浮遊培養中の前記適応 M D C K 細胞を培養することを含む、方法。

40

【請求項 1 3】

前記増殖培地が、約 5 % 血清を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ステップ b) ~ d) で、前記 M D C K 細胞を 5 % C O ₂ の存在下で培養する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記グルコースの濃度が、約 2 5 m M ~ 約 3 0 m M、または約 2 6 m M ~ 約 2 8 m M である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地が、セリン、アルギニン、ロイシン、

50

チロシン、イソロイシン、スレオニン、バリン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、フェニルアラニン、ヒスチジン、メチオニン、アラニン、およびトリプトファンを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記適応 M D C K 細胞が、約 3 0 時間～約 3 5 時間の平均倍化時間を有する、請求項 1 2 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記適応 M D C K 細胞が、ヒト用ワクチンのためのウイルスを生産するのに適している、請求項 1 2 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

ウイルスが生産され、前記ウイルスが抗原性を維持している、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ウイルスが、インフルエンザウイルスである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記適応 M D C K 細胞が、培養の間培地交換を必要としない、請求項 1 2 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ステップ d) の浮遊培養中の前記浮遊培養適応 M D C K 細胞の 9 0 % 超が、生存可能である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記攪拌されたバイオリアクターへ前記接着 M D C K 細胞を準備する前に、前記接着 M D C K 細胞が、5 % の血清を含む増殖培地中で接着培養でさらに増殖される、請求項 1 2 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、概して、ワクチンウイルス生産の分野、特に無血清合成培地でのメイディン・ダービー・イヌ腎 (M D C K) 細胞株の生育および浮遊培養に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

現在ワクチンは、鶏卵、初代培養細胞または細胞株での培養を含む様々な方法を使用して生産されている。これらの方法は、費用、リスク、および大規模な工業生産レベルを維持する能力に関する様々な問題を含んでいる。

【0 0 0 3】

メイディン・ダービー・イヌ腎 (M D C K) 細胞は、ワクチン生産、特にインフルエンザのワクチンの生産に使用されている細胞株の 1 つである。細胞培養は鶏卵の利用能に依存しておらず、より大規模に行うことができるため、ワクチン生産に関する細胞培養は、鶏卵より有利である。しかしながら、M D C K 細胞の培養にはいくつかの欠点がある。M D C K 細胞は、培養のため血清などの定義されていない補充物質を必要としており、これはヒトで使用するための医薬品を作製する場合には高価であり、望ましくない。また M D C K 細胞は、頻繁な培地交換を必要としており、これもさらにコストを上げている。さらに、M D C K 細胞は、かなりの表面積を必要とする培養容器；またはマイクロキャリアのいずれかにおける接着培養で生育しており、費用効果は不良で、人手がかかり、細胞にダメージを与えるリスクを呈する。

【0 0 0 4】

米国特許第 6 , 8 2 5 , 0 3 6 号および同 8 , 8 4 6 , 9 3 2 号、ならびに米国特許出願公開公報第 2 0 1 3 / 0 1 8 3 7 4 1 号は、無血清浮遊培養およびワクチン生産のための方法および M D C K 細胞に記載している。しかしながら、これら無血清培地中の細胞の

10

20

30

40

50

生育は、定義されていない培地成分である加水分解物または他の動物由来成分を必要とし、これらは費用および制御しやすさの点で不利益を呈する。

【 0 0 0 5 】

よって、効率的なワクチン生産のための無血清合成培地での浮遊培養が可能なM D C K細胞が、なおも必要とされている。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本明細書中に記載される技術は、適応M D C K細胞および同細胞を生育させるための培養培地に関する。さらに本技術は、同細胞を培養する方法および同適応細胞を使用してワクチンを生産する方法に関する。本明細書中に記載される適応M D C K細胞は、マイクロキャリアを使用することなく無血清浮遊培養に適応している。さらに適応M D C K細胞は、本明細書中に記載される合成培地の存在下で培養されている。

10

【 0 0 0 7 】

M D C K細胞株は、健常な雌性成体コッカースパニエルの腎臓に由来する接着性細胞株である。M D C K細胞は、ウイルスの生産、たとえばワクチンの生産に使用されている。現在M D C K細胞は、接着培養として血清含有培地で培養されている。商業生産に適した密度までM D C K細胞を生育させるため、M D C K細胞生育の表面積を大きくするために、マイクロキャリア（たとえばマイクロビーズ）またはローラーボトルが使用されている。マイクロキャリアまたはローラーボトルでのM D C Kの培養は、費用の増大および規模拡大の限界を含む多くの欠点を有する。

20

【 0 0 0 8 】

M D C K細胞を含む細胞株は、通常、細胞の生育および増殖を助けるために血清含有培地で生育させる。しかしながら、血清は、高コスト、コンタミネーションのリスク、定義されていない性質、およびばらつきがあるため、特に大規模な商業生産において有益ではない。このような不利益は、一部の細胞株を培養するための無血清培地の使用に拍車をかけている。しかしながら、無血清培地はなおも、動物性成分、たとえばトランスフェリン、および他の定義されていない生成物、たとえば加水分解物を含んでおり、このことは当該培地を使用する際に、あるレベルのリスクおよび不確実性をもたらす。

【 0 0 0 9 】

合成培地とは、組み換えタンパク質および/またはホルモンのみを含み、正確な培地の構成成分および濃度が既知であり、ワクチン用のウイルスの商業生産で使用される細胞株を生育させるための改善されたシステムを提供する。合成培地は、動物由来の成分を全く含まない。

30

【 0 0 1 0 】

所定の細胞株が無血清の合成培地中で生育する能力は予測不能である。同様に、特に所定の培地中での細胞株の浮遊培養での生育への適応も予測不能である。たとえば、細胞は、表面に接着する機会がなければ、浮遊培養で生育させると死滅する場合があります；細胞は、血清が培地から除去されている際に死滅する場合があります；合成培地は、細胞の生育を維持するためには十分ではない場合があります；細胞の生育および/または増殖に（たとえば倍化時間が延びることにより）負の影響を与える場合があります；細胞の形態および/または遺伝子発現が変化することにより、当該細胞が意図した目的に適さない場合があります；細胞の特徴が変化することにより、当該細胞により作製されたウイルスが、ワクチンで使用するには抗原性が不十分である場合がある、などのことがあり得る。

40

【 0 0 1 1 】

本明細書中の開示は、M D C K細胞を、無血清の合成培地中で浮遊培養での生育に適応することができ、適応M D C K細胞が、接着性で血清の存在下で培養される親細胞株よりも高力価のワクチン生産用ウイルスを生産し、当該適応細胞により生産されたウイルスが抗原性を維持しているとの、驚くべき発見に部分的に基づくものである。

【 0 0 1 2 】

50

一態様では、本開示は、適応M D C K細胞および増殖培地を含む組成物であって、上記増殖培地が、合成培地でありかつ動物性成分を含まない培地を含み、上記適応M D C K細胞が、マイクロキャリアを含まない浮遊培養で維持されている、組成物に関する。

【0013】

一態様では、本開示は、マイクロキャリアを含まない浮遊培養適応M D C K細胞株を培養する方法であって、上記方法が、合成培地でありかつ動物性成分を含まない増殖培地と上記適応M D C K細胞株を接触させることを含み、上記適応M D C K細胞株が、マイクロキャリアを含まない浮遊培養で生育できる、方法に関する。一実施形態では、当該細胞は、5%CO₂の存在下で生育する。好ましい実施形態では、培地は、細胞培養段階の間、交換されない。

10

【0014】

一態様では、本開示は、適応M D C K細胞株でワクチンを生産する方法であって、上記M D C K細胞株が、マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養することができ、上記方法が、合成培地でありかつ動物性成分を含まない増殖培地とM D C K細胞株を接触させることを含む、方法に関する。一実施形態では、M D C K細胞を 2×10^5 細胞/mlの濃度で接種し、細胞が定常期に近づいて細胞密度が約 2×10^6 細胞/mlに達すると、ウイルス感染を行う。一実施形態では、ウイルス感染の前に、培地を遠心分離により100%新鮮なものと交換し、次いでトリフルオロアラルニルクロロメチルケトン(T P C K) - トリプシンおよびウイルス菌株を添加する。一実施形態では、ウイルス感染段階の間、細胞を32~34℃でインキュベートする。一実施形態では、細胞を、スピナーフラスコで生育させる。一実施形態では、C P Eが全体的に起こる際に上清を回収する。一実施形態では、追加のグルコースを、培地に添加しない。一実施形態では、培地は、約20mM~約30mMのグルコース、好ましくは約25mM~約30mMのグルコース、より好ましくは約26mM~約28mMのグルコースを含む。

20

【0015】

一態様では、本開示は、血清を含まない合成培地中でマイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養できる適応M D C K細胞株を産生させる方法であって、上記方法が、

a) 接着性M D C K細胞株を準備することと、

b) M D C K細胞株を浮遊培養に適応させるために十分な時間、マイクロキャリアの非存在下で、攪拌しながら、5%(体積/体積、v/v)血清を含む増殖培地中で、上記接着性M D C K細胞株を培養することと、

30

c) 血清を含まない合成培地中の浮遊培養で浮遊培養適応M D C K細胞を培養することにより、血清を含まない合成培地中、マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養できる適応M D C K細胞を提供することと

を含む、方法に関する。

【0016】

一実施形態では、ステップc)は、合成培地が培養物中の実質的にすべての培地を表し、かつ実質的にすべての血清が除去されるまで、合成培地の量を増加させ、および血清の量(v/v)を減少させて浮遊培養適応M D C K細胞株を浮遊状態で培養することにより、血清を含まない合成培地中、マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養できる適応M D C K細胞株を提供することを含む。

40

【0017】

一実施形態では、適応M D C K細胞株は、ステップb)およびc)において、5%CO₂の存在下で培養されている。

【0018】

特定の実施形態では、適応M D C K細胞は、約30時間~約35時間の平均倍化時間を有する。

【0019】

特定の実施形態では、適応M D C K細胞は、ヒト用ワクチンのためのウイルスを生産するのに適している。特定の実施形態では、適応M D C K細胞により生産されたウイルスは

50

、抗原性である。好ましい実施形態では、ウイルスはインフルエンザウイルスである。

【0020】

ある特定の実施形態では、適応MDCK細胞は、2016年10月21日に寄託番号DSMAACC3309として有限会社ライプニッツ研究所のDSMZ - ドイツ微生物細胞培養コレクション (Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikro - organismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, ドイツ)) で寄託された細胞である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

10

【図1】無血清合成培地での浮遊培養にMDCK細胞を適応させるために使用するプロトコルの概要である。

【図2A】マイクロキャリアに付着した接着性MDCK (aMDCK) 細胞の顕微鏡写真である。細胞は、無血清培地で培養した。

【図2B】マイクロキャリアを用いずに生育させた適応MDCK (sMDCK) 細胞の顕微鏡写真である。細胞は、動物性成分を含まない合成培地で培養した。

【図3】aMDCK細胞 () 対sMDCK細胞 (▲) の培養時間に対する生細胞密度を示す。

【図4】10回の継代におけるsMDCK細胞の生育試験の結果を示す。

【図5】sMDCK細胞の数回の継代 (3回 ~ 10回) の間で実施したH7N9インフルエンザウイルス生産試験の結果を示す。

20

【図6】sMDCK細胞の数回の継代 (3回 ~ 10回) の間で実施したH5N1インフルエンザウイルス生産試験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本明細書を読了した後では、様々な代替的な実施形態および代替的な応用で本発明を実施する方法は当業者にとって明白である。しかしながら、本発明の様々な実施形態のすべてが本明細書中に記載されるものではない。当然のことながら、本明細書中提示される実施形態は、単に例示を目的として提示されており、限定されるものではない。このように、様々な代替的な実施形態の詳細な説明は、以下に記載される本発明の範囲または幅を限定すると解釈すべきではない。

30

【0023】

本発明を開示および説明する前に、以下に記載される態様は、特定の組成物、当該組成物を調製する方法、またはそれらの使用が、当然それ自体が変動し得ることから、それらに限定されるものではないと理解されるものである。また、本明細書中使用される用語は、単に特定の態様を説明する目的のためのものであり、限定するように意図されないと理解すべきである。

【0024】

本発明の詳細な説明は、読み手の簡便性のためにのみ様々なセクションに分割されており、いずれかのセクションで見いだされた開示を、別のセクションと組み合わせられてもよい。特段他の意味で定義されない限り、本明細書中使用されるすべての科学技術用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解される意味と同じ意味を有する。

40

【0025】

本明細書および続く特許請求の範囲では、以下の意味を有すると定義されるいくつかの用語を参照するものとする。

【0026】

本明細書中使用される用語は、単に特定の実施形態を説明する目的のためのものであり、本発明を限定するよう意図されていない。本明細書中使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈に特段他の意味で明確に示されていない限りは複数形をも含むように意図されている。

50

【 0 0 2 7 】

「任意の」または「任意に」は、続いて記載される事象または状況が起こり得る、または起こり得ないことを意味し、およびこの記載は、事象または状況が起こる場合および起こらない場合を含むことを意味する。

【 0 0 2 8 】

用語「含む」は、組成物および方法が列挙される要素を含むが、他を排除しないことを意味するように意図されている。組成物および方法を定義するために使用される場合の「～から本質的になる」は、何らかの本質的に重要な他の要素を組み合わせから排除することを意味するものである。たとえば、本明細書中に定義される要素から本質的になる組成物は、請求される発明の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を与えない他の要素を排除しない。「～からなる」は、微量を超える他の成分を排除することを意味し、列挙される実質的な方法ステップを意味するものである。これらの移行句のいずれかにより提示される実施形態は、本発明の範囲内にある。

10

【 0 0 2 9 】

数字表記、たとえばある範囲を含む温度、時間、量、濃度、および他の数字表記の前で使用される際の使用用語「約」は、(+) または (-) 1 0 %、5 %、または 1 % 変動し得る近似値を示す。

【 0 0 3 0 】

本明細書中使用されるように、「メイディン・ダービー・イヌ腎細胞」または「M D C K 細胞」は、1 9 5 8 年に明らかに健常な雌性成体コッカースパニエルの組織由来の細胞株からの細胞を表す。M D C K 細胞は、多くの場合、ワクチン生産、特にインフルエンザのために使用される。M D C K 細胞は、たとえば B C R C (A T C C C C L - 3 4 由来、カタログ番号 6 0 0 0 4) から、市販されている。市販の M D C K 細胞は、培養物中で接着性であり、最適な生育のためには血清を必要とする。

20

【 0 0 3 1 】

本明細書中使用されるように、用語「適応 M D C K 細胞」は、血清を含まない合成培地中浮遊培養（マイクロキャリアを含まない）で生育するように適応している細胞を指す。

【 0 0 3 2 】

本明細書中使用されるように、用語「合成培地」は、成分のすべてが既知であり、同様にそれらの正確な濃度も既知である細胞培養培地を表す。合成培地は動物由来成分を全く含まない。

30

【 0 0 3 3 】

本明細書中使用されるように、用語「接着培養」は、ある面、たとえば組織培養プレートまたはマイクロキャリアに細胞が接着する細胞培養を表す。「マイクロキャリア」は、何らかのキャリア、たとえば細胞が培養容器の面以外に接着するための面を提供するビーズである。

【 0 0 3 4 】

本明細書中使用されるように、用語「浮遊培養」は、マイクロキャリアを使用することのない、接着培養とは対照的な、浮遊状態の細胞培養を表す。

【 0 0 3 5 】

本明細書中使用されるように、たとえば培養物中の血清および / または増殖培地の減少を表す場合の使用用語「実質的にすべて」は、望ましくない成分が、培養培地の約 0 . 1 % 未満、好ましくは約 0 . 0 5 % 未満、およびより好ましくは約 0 . 0 1 % 未満を構成することを意味する。最も好ましい実施形態では、望ましくない成分のすべてが、培養培地から除去されている。同様に、望ましい成分は、約 9 9 . 9 0 % 超、好ましくは約 9 9 . 9 5 % 超、およびより好ましくは約 9 9 . 9 9 % 超を構成する。最も好ましい実施形態では、望ましい成分（たとえば合成培地）は、培地の 1 0 0 % を構成する。

40

【 0 0 3 6 】

組成物

本開示は、適応 M D C K 細胞および合成増殖培地を含む組成物に関する。本組成物は、

50

血清または他の動物由来成分を含まない。

【0037】

適応MDCK細胞株

一態様では、本開示は、合成培地を含む浮遊培養で、血清を用いずに生育および／または増殖できる適応MDCK細胞に関する。適応MDCK細胞は、浮遊培養での生育または増殖のために、ある面（たとえばマイクロキャリア）を必要とするものではない。この細胞は、ワクチン生産用のウイルスを生産するために使用できる。

【0038】

一部の実施形態では、適応MDCK細胞は、約20時間～約40時間の平均倍化時間を有する。一部の実施形態では、適応MDCK細胞は、約25時間～約40時間の平均倍化時間を有する。一部の実施形態では、適応DCK細胞は、約30時間～約40時間の平均倍化時間を有する。一部の実施形態では、適応MDCK細胞は、約35時間～約40時間の平均倍化時間を有する。一部の実施形態では、適応MDCK細胞は、約20時間～約35時間の平均倍化時間を有する。一部の実施形態では、適応MDCK細胞は、約20時間～約30時間の平均倍化時間を有する。好ましい実施形態では、適応MDCK細胞は、約30時間～約35時間の平均倍化時間を有する。

10

【0039】

一部の好ましい実施形態では、適応MDCK細胞は、ヒト用ワクチンのためのウイルスを生産するのに適している。適応MDCK細胞で生産できるウイルスとして、限定するものではないが、A/Vietnam/1194/04(H5N1)ウイルス(NIBRG-14)およびA/Anhui/1/2013(H7N9)ウイルス(NIBRG-268)が挙げられており、これらは例示として使用される。特に好ましい実施形態では、ウイルスはインフルエンザウイルスである。特に好ましい実施形態では、ワクチンはヒト用ワクチンである。

20

【0040】

一実施形態では、適応MDCK細胞により生産されたウイルスは抗原性を保持している。一実施形態では、ウイルスは、宿主の細胞または生物で免疫応答を引き起こすことができる。好ましい実施形態では、宿主の細胞または生物は、ヒトの細胞またはヒトである。

【0041】

特定の実施形態では、適応MDCK細胞は、2016年10月21日に寄託番号DSMACC3309として有限会社ライブニッツ研究所のDSMZ-ドイツ微生物細胞培養コレクションで寄託された細胞である。細胞は寄託のために2016年10月19日に提出された。

30

【0042】

浮遊培養適応MDCK細胞株の培養のための合成培地

合成培地は、血清、加水分解物、または他の動物由来成分を含まないいずれかの合成培地とすることができる。好ましい実施形態では、合成培地は、BALANCED(登録商標) Simple MDCK(Irvine Scientific, catalog ID: 91136)である。一部の実施形態では、合成培地は、表1に記載されているアミノ酸のうちの1つまたは複数を含む。一部の実施形態では、アミノ酸は、表1に記載されている範囲内の濃度で培地に存在する。この濃度は、終点を含む所定の範囲内のいずれかの部分範囲または値であってもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸は、表1に提示されている好ましい濃度で培地に存在する。

40

【表 1】

合成培地のアミノ酸の構成成分の例

説明	濃度範囲 (mM)	好ましい濃度 (mM)
L-セリン	0.1 -5	1.1114
L-アルギニン HCL	0.1 -5	1.1193
L-ロイシン	0.05 -4	0.7192
L-チロシン 2Na.2H2O	0.05 -4	0.3419
L-イソロイシン	0.05 -4	0.6632
L-スレオニン	0.05 -4	0.7194
L-バリン	0.05 -4	0.7196
L-システイン HCl.H2O	0.05 -4	0.4555
L-アスパラギン酸	0.05 -4	0.5770
L-グルタミン酸	0.05 -4	0.4894
L-アスパラギン	0.05 -4	0.4050
L-フェニルアラニン	0.05 -4	0.3437
L-ヒスチジン HCl H2O	0.02 -2	0.2403
L-メチオニン	0.02 -2	0.1848
L-アラニン	0.02 -2	0.2694
L-トリプトファン	0.02 -2	0.0707

10

20

30

【0043】

一部の実施形態では、合成培地はグルコースを含む。一部の実施形態では、グルコースの濃度は、約20 mM～約30 mMである。好ましい実施形態では、グルコースは約25 mM～約30 mMの濃度で存在する。特に好ましい実施形態では、グルコースは、約27.75 mMの濃度で存在する。濃度は、エンドポイントを含む本明細書中に列挙される範囲内のいずれかの範囲または値であってもよい。

【0044】

浮遊培養適応MDCK細胞の作製方法および培養方法

本開示は、無血清合成培地でのMDCK細胞/細胞株の作製および/または培養の方法に関する。MDCK細胞は浮遊状態で培養され、培養容器またはマイクロキャリアへの接着を必要としない。

40

【0045】

浮遊培養適応MDCK細胞株の作製

一態様では、本開示は、合成培地での生育および/または増殖を行うことができる浮遊培養適応MDCK細胞株(MDCK細胞)を作製する方法に関する。

【0046】

一部の実施形態では、本開示は、血清を含まない合成培地中マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養できる適応MDCK細胞(細胞株)を産生させる方法であって、上記方法が、

50

a) 接着性MDC K細胞を準備することと、
b) MDC K細胞を浮遊培養に適応させるために十分な時間、マイクロキャリアの非存在下、血清を含む増殖培地中で上記接着MDC K細胞を培養することにより、浮遊培養適応MDC K細胞を産生させることと、
c) 血清を含まない合成培地中、浮遊培養で浮遊培養適応MDC K細胞を培養することにより、合成培地中マイクロキャリアを含まない浮遊培養で培養できるMDC K細胞を提供することと
を含む、方法に関する。

【0047】

一実施形態では、ステップb)の増殖培地は合成培地ではない。一実施形態では、合成培地はBALANCED(登録商標)Simple MDC K培地である。

【0048】

一実施形態では、細胞は、攪拌されたバイオリアクターで増殖される。

【0049】

一実施形態では、ステップc)は、合成培地が培養物中の実質的にすべての培地を表し、実質的にすべての血清が除去されるまで、合成培地の量を増加させ、血清(v/v)の量が減少させて、浮遊培養で浮遊培養適応MDC K細胞株を培養することにより、血清を含まない合成培地中、マイクロキャリアを含まない浮遊状態で培養できる適応MDC K細胞株を提供することを含む。

【0050】

一実施形態では、MDC K細胞を、ステップb)において約1%~約20%の血清中で培養する。一実施形態では、MDC K細胞を、ステップb)において約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、または約20%の血清中で培養する。範囲は、本明細書中に列举される、部分範囲を含むいずれか2つの値の間のいずれかの範囲または値を含む。好ましい実施形態では、MDC K細胞を、ステップb)において約2%~約10%の血清中で培養する。特に好ましい実施形態では、MDC K細胞を、ステップb)において約2%~約5%の血清中で培養する。

【0051】

一実施形態では、ステップc)は、細胞培養物から培地の一部を除去することと、除去した培地を合成培地と交換することとを伴う。一実施形態では、ステップc)は、除去した培地からMDC K細胞を分離することと、分離した細胞をMDC K培養物に戻すこととを伴う。一実施形態では、ステップc)は、継代によって合成培地部分を増大させることを伴う。一実施形態では、ステップc)は、細胞を無血清合成培地に直接適応させることを伴う。

【0052】

好ましい実施形態では、無血清合成培地はBALANCED(登録商標)Simple MDC K培地である。

【0053】

浮遊培養適応MDC K細胞株の培養

一態様では、本開示は、マイクロキャリアを含まない浮遊状態でメイディン・ダービー・イヌ腎(MDC K)細胞を培養する方法に関する。一実施形態では、本方法は、合成培地と浮遊培養適応MDC K細胞を接触させることを含む。好ましい実施形態では、血清または他の動物由来成分は増殖培地に存在しない。一実施形態では、細胞は、5%CO₂で生育する。一実施形態では、細胞を、約3~5日ごとに継代する。好ましくは細胞を、約4日ごとに継代する。特に好ましい実施形態では、培地は培養の間(たとえば細胞が培養において確立された後)、交換しない。

【0054】

好ましい実施形態では、浮遊培養適応MDC K細胞を、浮遊状態で細胞を維持する条件(たとえば攪拌)下で生育させる。このような条件は、当該分野で知られている。非限定

10

20

30

40

50

的な例として、使い捨ての攪拌タンク反応器、ウェーブバイオリアクター、スピナーフラスコ、および振盪フラスコが挙げられる。

【0055】

ワクチンを調製する方法

MDC K細胞からのウイルスの生産性が最適化される場合、当該細胞から生産されたウイルスが、改変されていない細胞またはプロトコルにより生産されたウイルスと類似の抗原性を維持しているかどうかは予測することができない。本開示は、本明細書中記載される組成物および培養方法を使用したワクチン用のウイルスを生産する方法に関する。好ましい実施形態では、ウイルスの抗原性は維持されている。一実施形態では、本開示は、MDC K細胞でワクチンを生産する方法であって、上記MDC K細胞を、マイクロキャリアを用いず血清を含まない浮遊状態で培養することができる、方法に関する。好ましい実施形態では、細胞を、合成培地中で培養する。一実施形態では、合成培地はBALANC D (登録商標) Simple MDC K培地である。

10

【0056】

一の実施形態では、ワクチン生産の間、追加のグルコースを培地に添加しない。

【0057】

一の実施形態では、培地は、細胞培養段階の間（たとえば細胞が培養において確立された後）、交換されない。現在、細胞培養段階の間に使用されるMDC K細胞の増殖培地の少なくとも一部は、細胞培養段階の間、毎日除去され、交換されている。このステップを排除することは、使用される培地量（およびプロセス全体のコスト）の減少、処理ステップの減少などを含む有意な利点を提供する。

20

【0058】

一の実施形態では、MDC K細胞により生産されたウイルスの抗原性を評価する。好ましい実施形態では、ウイルスは抗原性を維持している。一の実施形態では、ウイルスは、接着MDC K細胞により生産されたウイルスと比較して抗原性を維持している。一の実施形態では、ウイルスは、所望のワクチンの生産に必要とされる抗原性に関して抗原性を維持している。一の実施形態では、ウイルスは、細胞または生物に関する抗原性を維持している。一の実施形態では、細胞はヒトの細胞である。一の実施形態では、生物はヒトである。

【0059】

「抗原性を維持すること」は、たとえば細胞または生物において、MDC K細胞により生産されたウイルス（またはウイルスの一部）が免疫応答を誘導する能力を表す。抗原性は、任意の方法、例えばH Iアッセイによって測定することができる。

30

【0060】

実施例

追加の実施形態を、以下の実施例でさらに詳細に開示するが、これは特許請求の範囲を限定する意図は全くない。

【0061】

実施例1：無血清合成培地での浮遊培養へのMDC K細胞の適応

接着MDC K細胞を無血清浮遊培養に適応させるための1つの非限定的な例のプロトコルの概略を、図1に提供する。簡単に述べると、接着MDC K細胞(aMDC K)(1)を、5%(v/v)ウシ胎児血清(FBS)を含む培地を使用して浮遊培養に段階的に適応させた(2)。次に、浮遊培養適応MDC K細胞(sMDC K)を、無血清のBALANC D (登録商標) Simple MDC K培地(Irvine Scientific)に適応させた(3)。また、CYTODEX(商標)1ビーズ(GE Life Sciences)上で生育させたaMDC K細胞を、浮遊培養に適応させることなく、無血清培地に適応させた。各条件でのウイルスの生産性および倍化時間を提供する。

40

【0062】

aMDC K細胞を浮遊培養に適応させる前に、MDC K細胞を、5%FBSを含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で生育させた細胞の凍結ワーキングセルバンク由来

50

の接着性培養物として、(培養を)開始した。細胞をTフラスコで数回継代し、5% FBSを含む培地に段階的に適応させた。すなわち、Tフラスコ中の増殖培地の実質的にすべてをBALANCED(登録商標) Simple MDC K培地が構成するまで経時的に、増殖培地中のDMEMの濃度をゆっくりと減少させ、BALANCED(登録商標) Simple MDC K培地の濃度をゆっくりと増加させた。

【0063】

Tフラスコ中の細胞を、トリプシン-E D T Aを使用してトリプシン処理し、次いで細胞を1000 rpm (200 g)で遠心分離してトリプシンを除去した。細胞を、5% FBSを含む新鮮な培地に再度浮遊させ、全量60 ml、 5×10^5 細胞/mlで、125 mlのスピナーフラスコに播種した。スピナーフラスコを、5% CO₂、37 °Cの湿潤インキュベーターの攪拌プレート(45 ~ 55 rpm)に配置した。MDC K浮遊培養物に、3 ~ 4日ごとに、5% FBSを含む33%のBALANCED(登録商標) Simple MDC K培地に交換した。1週間以内に細胞密度は、約 1×10^5 ~ 約 2×10^5 細胞/mlに減少し、生存率は50%超であった。MDC K細胞は第2週または第3週に生育を開始した。MDC K浮遊培養での倍化時間は、接着マイクロキャリア培養物で見られた時間(30 ~ 40時間)と同様であり、細胞は、単細胞浮遊状態(すなわち、最少の凝集)で生育した。浮遊培養中のMDC K細胞の最大密度は、生存率90%超で 2×10^6 細胞/mlであった。これらの浮遊培養適応MDC K細胞を、マスターセルバンクとして、10%のDMSOを含む無血清培地中で凍結した。

【0064】

凍結したマスターセルバンク由来の浮遊適応MDC K細胞を融解し、5% FBSを含むBALANCED(登録商標) Simple MDC K培地中での浮遊培養として直接(培養を)開始した。融解後の2回目の継代で、細胞を直接、完全に無血清のBALANCED(登録商標) Simple MDC K培地に適応させた。融解後3回目の継代で、細胞を、10% DMSOを含む無血清培地中で凍結し、ワーキングセルバンクを作製した。

【0065】

凍結したワーキングセルバンク由来の、浮遊培養に適応させ、無血清に適応させたMDC K細胞(s MDC K)を融解し、血清を含まないBALANCED(登録商標) Simple MDC K中の浮遊培養として直接(培養を)開始した。浮遊培養でのs MDC K細胞の最大密度は、生存率90%超で約 2×10^6 細胞/mlであった。s MDC Kの倍化時間は30 ~ 40時間であった。細胞は、5% CO₂中、約50 ~ 70 rpmでの攪拌培養で生育させた。

【0066】

実施例2：MDC K細胞の凝集

図2Aは、無血清培養物中のCytodex 1ビーズに付着したa MDC K細胞の顕微鏡写真を示す。図2Bは、無血清のBALANCED(登録商標) Simple MDC K中の遊離浮遊培養でのs MDC K細胞の顕微鏡写真を示す。

【0067】

ピペティングまたは細胞を機械的に分散させる他の方法(細胞の培養に必要とされる50 rpmの攪拌速度以外)を用いなければ、このレベルの凝集が起こった。理論に拘束されるものではないが、細胞の凝集が減少すると、曝露される細胞の表面積がより大きくなり、細胞をより良好に感染させることができることにより、ウイルス力価がより高くなると考えられる。

【0068】

実施例3：MDC K細胞の生育の比較

MDC K細胞の生育速度を評価した。MDC K細胞を、 0.2×10^6 細胞/ml ~ 0.25×10^6 細胞/mlの密度で125 mlのスピナーフラスコに播種し、37 °Cおよび5% CO₂のインキュベーター中、50回転/分(rpm)の攪拌速度で生育させた。細胞を4日ごとに継代培養した。s MDC K細胞を、マイクロキャリアを用いることなく、4 mMのL-グルタミンを補充したBALANCED(登録商標) Simple MDC

K 培地 (I r v i n e S c i e n t i f i c) で培養した。a M D C K 細胞は、4 m M の L - グルタミンを補充した O P T I P R O (商標) S F M (L i f e T e c h n o l o g i e s) で生育させ、5 g / L の C Y T O D E X (登録商標) 1 ビーズ (G E H e a l t h c a r e) に付着させた。培養の 2 日目から、a M D C K 細胞から培養培地の 7 0 % を除去し、新鮮な培地と交換した。s M D C K 細胞では培地交換を行わなかった。

【0069】

図 3 は、12 日間の培養にわたる 2 つの細胞株の生育速度を示す。生存細胞密度は、マイクロキャリア培養と比較して同様の生育パターンで、4 日以内に $\sim 2 \times 10^6$ 細胞 / m l に達した。生育速度に有意差は観察されなかった。

【0070】

浮遊培養では培地交換は必要ではなかった。対照的にマイクロキャリア培養は、高い細胞密度に達するために、培養の 2 日目から開始する 7 0 % の培地交換を毎日必要とした。

【0071】

実施例 4 : s M D C K 細胞でのインフルエンザウイルスの生産

s M D C K 細胞のウイルスを生産する能力を決定した。M D C K 細胞を、 0.2×10^6 細胞 / m l $\sim 0.25 \times 10^6$ 細胞 / m l の密度で 125 m l のスピナーフラスコに播種し、実施例 3 に記載されるように生育させた。培地に追加のグルコースは添加しなかった。

【0072】

細胞が 2×10^6 細胞 / m l の密度に達した時点で、培地を、最初に遠心分離により 100 % 新鮮な培地と交換した。T P C K - トリプシンを培養培地に添加し、次に細胞に、低い感染多重度 (M O I) で H 7 N 9 インフルエンザウイルスを感染させた。ウイルス培養段階の間、スピナーフラスコを 34 でインキュベートした。全細胞変性効果 (C P E) が起こった際に上清を回収した。

【0073】

浮遊培養での s M D C K 細胞の最大密度は、生存率 9 0 % 超で約 2×10^6 細胞 / m l である。s M D C K の倍化時間は 30 ~ 40 時間であり、細胞は、凝集した細胞浮遊状態で生育する (図 4)。各試料に関して、2 つの 1 : 2 の段階希釈物 (それぞれ $1.2 \times 10^0 \mu l$) を、丸底の 96 ウェルのマイクロタイタープレートで調製した。段階希釈物を、ウェルからウェルに、 $1 : 2^{0.5}$ の希釈倍率をもたらすよう、 $1 : 2^{0.5}$ の係数で移した。 0.25% シチメンチョウ赤血球 (2×10^7 R B C / m l) $100 \mu l$ を各ウェルに添加し、プレートを、室温で少なくとも 2 時間から最大 1 日までインキュベートした。その後、プレートを、700 n m で吸光度を測定するプレート用光度計でスキャンした。(無視できるウイルスの存在下での) 赤血球のカーペット様沈降物からの移行を、吸光レベルの増加として検出することができた。ボルツマンのシグモイドを各データセットにフィットさせ、感染時点での希釈度 (パラメーターのうちの 1 つ) を、滴定終点として定義した。希釈度の逆数を、単位 1 H A U ($100 \mu l$) $^{-1}$ の H A 比活性として定義した。内部標準を使用して、シチメンチョウ赤血球の様々な品質により引き起こされる変動を補正した。同一の実験に属する試料は、可能な限り常に、同じアッセイ試行で分析した。複数回決定した試料の統計解析は、測定に関して 15 % 未満の分析誤差 (信頼区間、 $\alpha = 0.05$) を予測した。

【0074】

感染性ウイルスの力価を、M D C K 細胞の 50 % を感染させるのに必要とされる組織培養感染用量を決定することにより測定した。ウイルス試料の 10 倍の段階希釈物 ($10^{-1} \sim 10^{-8}$) を、T P C K - トリプシンを含む培地で調製し、M D C K 細胞をコンフルエンスとなるまで生育させた 96 ウェルプレートに接種した (希釈物あたり 6 回の反復実験)。プレートを、34 で 4 ~ 7 日間インキュベートした。生存細胞を含むまたは C P E を伴うウェルを、各希釈度で計算した。T C I D 50 力価を、さらにリードミュンヒ法により計算した。

【0075】

10

20

30

40

50

この結果を表 2 にまとめる。sMDCK 細胞は、aMDCK 細胞より高い力価を提供した。

【表 2】

表 2：H7N9 の生産：ウイルス増殖期におけるピークウイルス力価

	HA (単位/100 μ l)	TCID ₅₀ /mL
aMDCK マイクロキャリア培養	574.9 $\pm$ 113.54	7.6 $\pm$ 0.10
sMDCK 浮遊培養	996.3 $\pm$ 113.88	7.91 $\pm$ 0.52

10

【0076】

BALANCED (登録商標) Simple MDCK 培地で培養した aMDCK 細胞は、OPTIPRO (商標) SFM で培養した aMDCK 細胞よりもわずかに高い力価 (512.0 HA 単位/100 μ l) を有したが、それでもなお BALANCED (登録商標) Simple MDCK で培養した sMDCK 細胞よりも有意に力価が低かった。同様の結果が、H5N1 インフルエンザウイルスで観察された。

20

【0077】

H7N9 生産試験を、3 回から 10 回の継代の間に行った。sMDCK のウイルスの生産性は、3 回から 10 回の継代まで、高レベルを維持した (図 5)。HA の力価の平均値は 989.87 HA 単位/100 μ l であり、TCID₅₀ の力価は 8.6 TCID₅₀/mL であった (表 3)。同様の結果が、H5N1 インフルエンザウイルスで観察された (図 6)。

【表 3】

表 3：H7N9 の生産 ウイルス増殖期におけるピークウイルス力価

	HA (単位/100 μ l)	TCID ₅₀ /mL
aMDCK マイクロキャリア培養	612.72	8.6
sMDCK 浮遊培養	989.87 $\pm$ 115.89	8.63 $\pm$ 0.44

30

【0078】

実施例 5：抗原性試験

実施例 4 由来のインフルエンザウイルスの抗原性の分析を、国立生物製品基準規制機構 (NIBSC) から購入した標準抗体を使用した血液凝集 (HI) アッセイにより行った。HI アッセイは、1:40 の血清希釈物で開始した。各試料を 3 回の反復実験で行った。

【0079】

インフルエンザウイルスを希釈して、50 μ l あたり 8 HAU の調製物を得た。抗体を、V 字型のマイクロタイタープレートで数回希釈し、次に 25 μ l のウイルスの試料をマイクロプレートに添加した。ゆっくりと攪拌した後、プレートを室温で 15 分間インキュ

40

50

べートした。0.5%シチメンチヨウ赤血球の浮遊液50μlを各ウェルに添加し、プレートをさらに30分間放置した後に、読み取りを行った。血液凝集を完全に阻害した抗体の最も高い希釈度の逆数値を、HI力価であると決定した。結果を表4に提供する。

【表4】

表4：HI試験

ウイルス株	HI力価	ウイルス株	HI力価
NIBRG14	320	NIBRG268	640
スピナーフラスコ (sMDCKの10回の継代)	320	スピナーフラスコ (sMDCKの10回の継代)	640

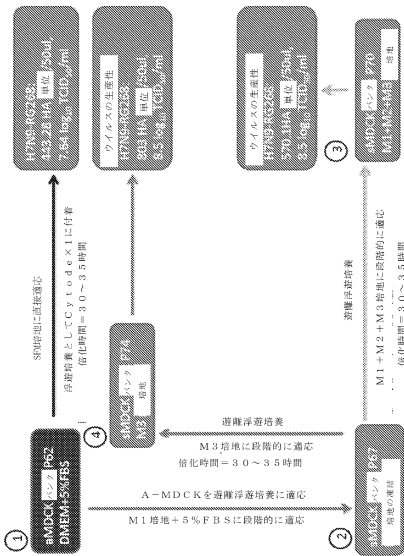
10

【0080】

多くの様々な修正を本開示の趣旨から逸脱することなく行うことができることは、当業者に理解されている。よって、本明細書中開示される形態は単なる例示であり、本開示の範囲を限定するよう意図していないことが、明確に理解されるものである。

20

【図1】



【図2A】

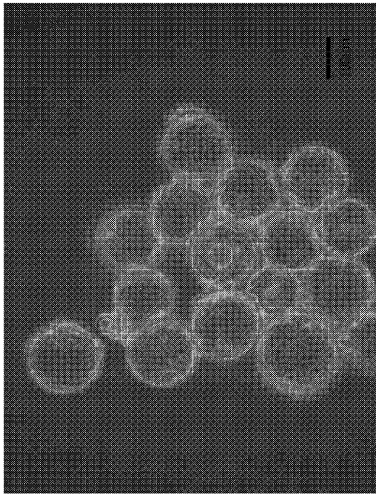


FIGURE 2A

【図 2 B】

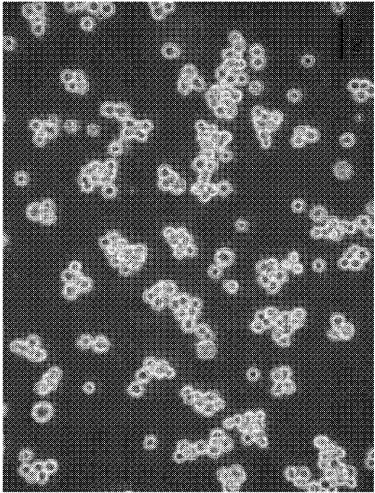
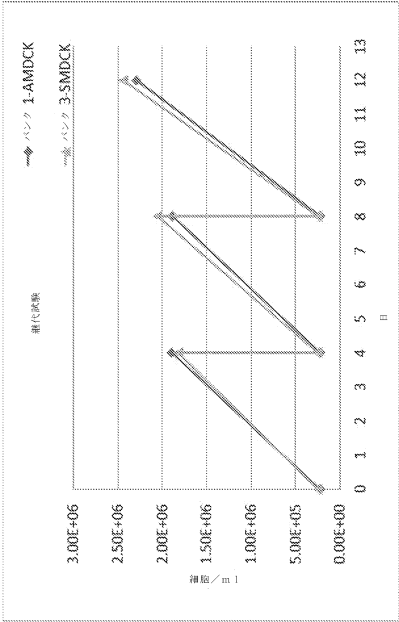
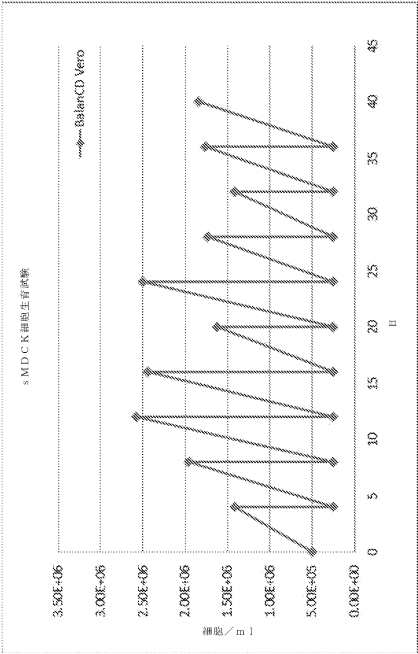


FIGURE 2B

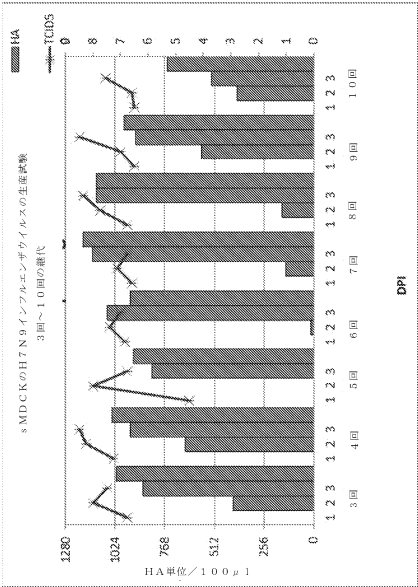
【図 3】

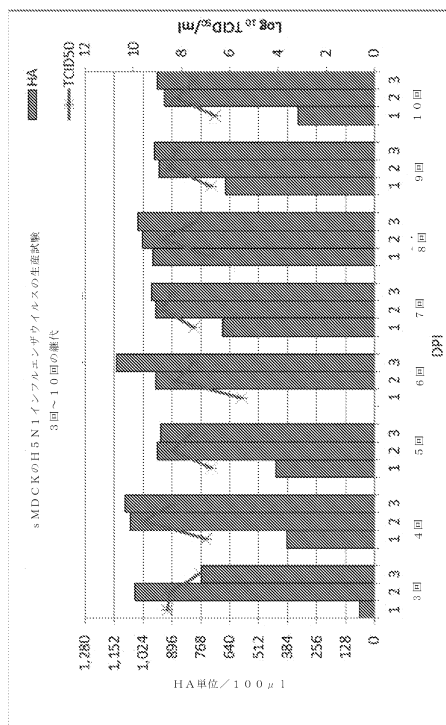


【図 4】



【図 5】





フロントページの続き

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 バン, ジェニー

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92705, サンタ アナ, 1830 イースト ワーナー
アベニュー, アーバイン サイエнтиフィック セールス カンパニー インコーポレイテッ
ド内

(72)発明者 ニー, シャオ - ツ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92705, サンタ アナ, 1830 イースト ワーナー
アベニュー, アーバイン サイエнтиフィック セールス カンパニー インコーポレイテッ
ド内

(72)発明者 フー, アラン ユン - チー

台湾, ミアオリ カウンティ 350, ズナン タウン, ケヤン ロード, ナンバー35, アール
1-7エフ, ルーム 7015, ナショナル インスティテュート オブ インフェクシャス デ
ィジージズ アンド ヴァクシノロジー, ナショナル ヘルス リサーチ インスティテューツ内

(72)発明者 ウエン, ツァイ - チュアン

台湾, ミアオリ カウンティ 350, ズナン タウン, ケヤン ロード, ナンバー35, アール
1-7エフ, ルーム 7015, ナショナル インスティテュート オブ インフェクシャス デ
ィジージズ アンド ヴァクシノロジー, ナショナル ヘルス リサーチ インスティテューツ内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第01/064846 (WO, A1)

特表2000-507448 (JP, A)

国際公開第2014/196795 (WO, A1)

中国特許出願公開第102816732 (CN, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00

C12N 7/00

C12N 1/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)