



## 新しいラドウイルス陰性 Sf9 細胞株 (Sf-RVN®) と Chemically Defined のコンパニオン培地の開発

Sandy McNorton, Sr. Scientist Process Solutions Upstream R&D Media Development

### 序文

バキュロウイルス-昆虫細胞系 (BICS) はその柔軟性、スピード、簡便さ及び真核生物タンパク質プロセッシング能により、組換えタンパク質の生産に広く使用されています。本プラットフォームは、承認済みのヒト用生物学的医薬品 (サーバリックス®、プロベンジ®、グリベラ® 及びフルブロック®) 及び動物用バイオ医薬品 (ポルシリス®、ペスティ、サーカムベント® PCV、インゲルバック サーコフレックス® 及びポルシリス® PCV) の生産に利用されています。BICS はワクチン用ウイルス様粒子 (VLP) や遺伝子治療用アデノ随伴ウイルス (AAV) の生産にも利用されています。

バキュロウイルスは昆虫だけに感染する桿状ウイルスであるため、安全性の懸念は大きくありません。154 のオープンリーディングフレームを含む 134kb のゲノムを有し、組換えタンパク質、アデノ随伴ウイルス (AAV) 及びウイルス様粒子 (VLP) を生産するのに必要な遺伝子を挿入できる十分なスペースがあります。

ヨトウガ (Spodoptera frugiperda、以下「Sf」) 卵巣組織由来の細胞株が組換えタンパク質、ウイルス様粒子 (LVP) 及び AAV などのウイルスベクターの宿主として広く用いられています。最初の Sf 細胞株 IPLB-SF-21 (Sf21) は、1977 年に蛹卵巣から樹立されました。この他に多く使用されている Sf 細胞株には Sf21 のサブクローンである Sf9 があります。

Sf-ラドウイルスという新規ラドウイルスが、Sf9 細胞株の一般的で持続的な汚染ウイルスとして発見されました。Sf-ラドウイルスは桿状であり、一本鎖 RNA を有します。正確な宿主範囲は不明ですが、Sf-ラドウイルスは哺乳類細胞内で複製できないためヒトに害を及ぼす可能性は低いと考えられています。そうだとした場合、ヒト用生物製剤の製造プロセスにおけるこの外来性感染性物質の混入に対し、何らかの対処が必要です。下流工程に適切な方法を応用してウイルスを除去するこ

とは可能ですが、バリデーション済みのアッセイによりウイルス除去を確認しなければなりません。

このホワイトペーパーでは、新しいラドウイルス陰性 Sf9 細胞株 (Sf-RVN® と命名) 及び Chemically Defined (CD) のコンパニオン培地 (EX-CELL® CD Insect Cell Medium) の開発について記載します。この2つの製品を組み合わせた Sf-RVN® プラットフォームは、Sf-ラドウイルスフリーの BICS 生物製剤生産系です。

最適化した CD 培地の EX-CELL® CD Insect Cell Medium で培養した Sf-RVN® Insect Cell Line は良好に増殖し、分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP)、ルドルフ・レッド、エリスロポエチン (EPO) 及びブタバルボウイルス (RRV) の産生性も高いことがデータで示されています。

### Sf-RVN® Insect Cell Line の特徴

ラドウイルスフリーの Sf9 細胞株は 2016 年、Dr. Jarvis と GlycoBac ラボによって初めて報告されました (Maghodia et al. 2016)。ラドウイルスに感染した Sf9 細胞株と比較して、Sf-RVN® Insect Cell Line は同様の細胞密度、細胞径、倍加時間及び形態であることが示されています (図 1)。

Sf-RVN® Insect Cell Line にはラドウイルスなどのウイルス配列が含まれないことが、大量並列シーケンスアセンブリを検索する TBLASTN プログラムを用いて確認されています (Geisler et al. 2018)。このシーケンス研究に加え、増殖及び形態特性がほぼ一致することからも、Sf-RVN® Insect Cell Line は Sf9 細胞株の中で最もよく特徴付けられた細胞株です。Sf-RVN® Insect Cell Line はラドウイルス陰性であるだけでなく、標準的な Sf9 細胞株の他の特徴を保持していることも実証されています。

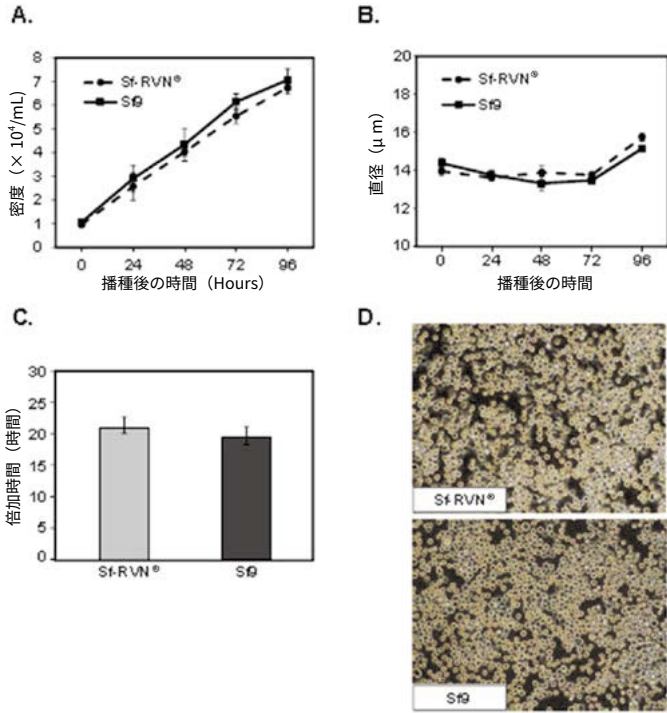


図1. Sf-RVN<sup>®</sup> Insect Cell Line とラドウィルス感染 Sf9 細胞の比較による、密度 (A)、直径 (B)、倍加時間 (C) 及び形態 (D) の類似性 (出典: Maghodia et al. 2016)。

## 最適化 EX-CELL<sup>®</sup> CD Insect Cell Medium の開発

血清添加 Grace 培地は、昆虫細胞培養用に開発された最も初期の処方です。無血清培地への移行を可能にするため、ペプトン、酵母エキスなどの加水分解物、脂質及びポロキサマー 188 が添加されました。これらの培地は CD 培地ではなく、加水分解物のばらつきにより培地及び培養がロット間で不均一となります。

当社では、昆虫細胞培養用の CD 培地 (EX-CELL<sup>®</sup> CD Insect Cell Medium) を開発しました。細胞培養の最適化技術を用いて、望ましい細胞増殖と生産性が得られる最良の成分バランスを決定しました。専用培地の開発で特に考慮したのは細胞密度の影響でした。Sf9 細胞は最高で  $10^7$  cells/mL の密度に達しますが、密度が  $4 \times 10^6$  cells/mL を超えるとタンパク質収量が著しく低下します。理想的には、最高のタンパク質収量を得るには細胞が  $2 \sim 3 \times 10^6$  cells/mL の時に感染させる必要があります。

開始点として複数の培地処方を使用し、さまざまな成分及び濃度を評価しました。次に、これらの処方に昆虫細胞培地固有の成分を添加しました。開始処方の 1 つは、当社の昆虫細胞用 EX-CELL<sup>®</sup> 420 無血清培地から酵母エキスを除いたものでした。実験計画法 (DOE) のアプローチを用いて、Sf-RVN<sup>®</sup> Insect Cell Line の増殖と生産性を促す生化学的成分を特定しました。

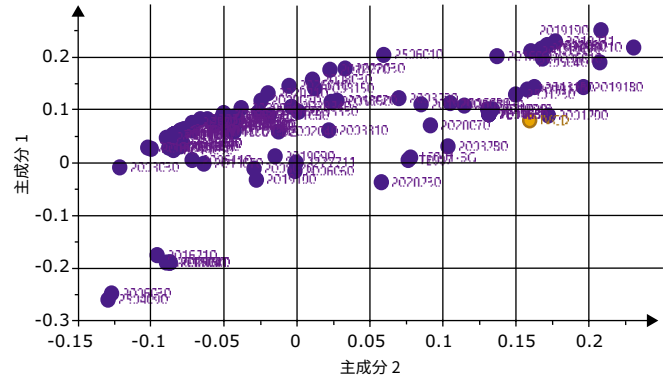


図2. 細胞培養性能の二次元マッピングによる重要な生化学的成分の特定。

図2は、成分に関する多変量分析の一例です。四分割の右上区画内にある黄色の点は細胞増殖を示し、紫色の点は培地中の個々の成分です。黄色の点に近い成分は応答に正の影響があります。例えば、成分 2001200 は黄色の点に隣接しているため増殖に必要です。左下区画内にある成分は増殖に負の影響を及ぼしました。左下区画内の成分は明らかに削除できると思われませんが、生産性に必要な可能性もあるため評価がさらに必要でした。この統計的マッピングは成分の重要性を示す良い指標と考えられますが、成分の中にはソフトウェアがそれを重要成分として検出するために十分な統計的分散がないものもあるため確認が必要です。

同じ実験から、各成分が Sf-RVN<sup>®</sup> Insect Cell Line の増殖に及ぼす影響を判断することが可能です。射影における変数重要度 (VIP) の応答は、成分の影響度に基づいて成分をランク付けします。ランクが 1 よりも大きい成分はすべて重要です (図3)。ただし、このグラフからは重要成分が増殖に正の影響を持つのか負の影響を持つのかは分かりません。また、右端に近い成分はいずれもランクが低く、増殖に対する影響が少ないか影響しないため、やはり培地から除くことを考慮します。上述したとおり、これらの成分は次に生産性に対する影響を評価しなければなりません。

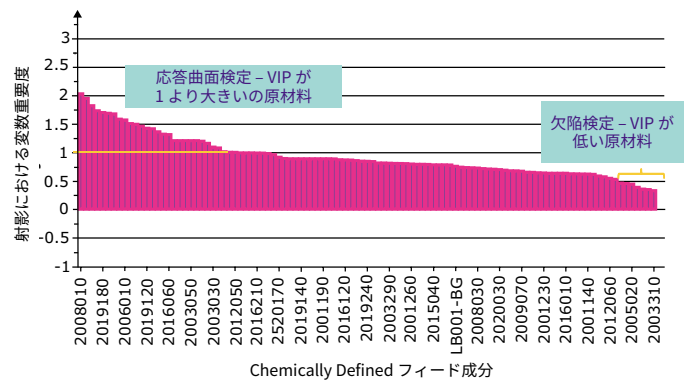


図3. 変数重要度による重要な生化学的成分の特定。

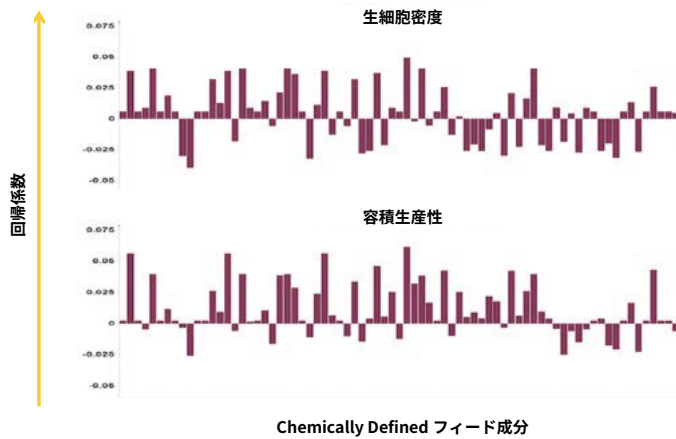


図 4. 個々の応答に対する生化学的成分の正と負の相関を示す回帰係数。

回帰成分のグラフから、各成分がその他すべての成分と比較して個々の応答に対し正の相関を示すか負の相関を示すかが示されました（図 4）。ゼロより上側にあるバーは正の影響、ゼロより下側にあるバーは負の影響を示します。上のグラフは細胞増殖に重要な成分、下のグラフは生産性に重要な成分を示します。増殖には重要でも生産性には重要でない成分もあれば、その逆の成分もあります。

上記の 3 セットのグラフから、培地に含めるべき成分や培地から除くことを検討できる成分が示されました。EX-CELL® CD Insect Cell Medium を開発するために増殖と生産性の両方について検討すべき濃度範囲も示されました。EX-CELL® CD Insect Cell Medium は Sf-RVN® Insect Cell Line に最適化されていますが、この培地は Sf9、Sf21、Tni、S2 及び C636 など他の昆虫細胞株にもお使いいただけます。

### Sf-RVN® プラットフォームの性能

Sf-RVN® Insect Cell Line とコンパニオン培地の EX-CELL® CD Insect Cell Medium からなる Sf-RVN® プラットフォームの性能を、複数のアッセイを用いて評価しました。

- 細胞増殖アッセイ
- 分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) の産生
- ルドルフ・レッド及びヒトエリスロポエチン (EPO) の産生
- ブタパルボウイルス (PPV) の産生

### 細胞増殖アッセイ

図 5 に、Sf-RVN® Insect Cell Line を EX-CELL® CD Insect Cell Medium、他社の培地、EX-CELL® 420 無血清培地（酵母エキス含有）のそれぞれで培養した増殖性を示しました。CD 培地では、 $0.7 \sim 1 \times 10^6$  cells/mL で接種すると 4 日目までに一貫して  $6 \sim 8 \times 10^6$  cells/mL に達し、 $0.5 \times 10^6$  cells/mL で接種すると 7 日目までに  $10 \times 10^6$  cells/mL を超えました。生存率は培養期間を通し一貫して高く維持されました。他社の培地では、継代中に  $3 \sim 5 \times 10^5$  cells/mL の間で変動し、最大生細胞密度は増殖曲線の 7 日目に  $5 \times 10^6$  cells/mL でした。

EX-CELL® CD Insect Cell Medium、他社の培地及び EX-CELL® 420 無血清培地中での Sf-RVN® Insect Cell Line の継代培養

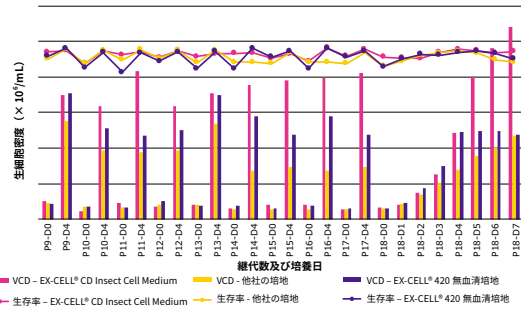


図 5. 複数回の継代を通じた Sf-RVN® Insect Cell Line の安定した細胞増殖性

EX-CELL® 420 無血清培地での増殖は他社の培地よりもやや良好でしたが、CD 培地ほど十分ではありませんでした。EX-CELL® 420 無血清培地は加水分解物を含み、継代ごとにある程度変動しました。この変動をみても、CD 培地は細胞培養プロセスの一貫性が向上するため優れていると考えられます。

### 分泌型アルカリホスファターゼの産生

図 6 に、同じ 3 種類の培地で培養した Sf-RVN® Insect Cell Line による SEAP の産生を示します。SEAP を産生するバキュロウイルスは包埋体を形成せず、これは上清中に直接分泌されることを意味します。増殖曲線は未感染細胞を表しており、細胞を  $1 \times 10^6$  cells/mL でプレートに播種し（0 日目）、1 日目に約  $2 \times 10^6$  cells/mL となった細胞に感染させました。感染多重度 (MOI) が 5 となるよう Sf-RVN® Insect Cell Line に感染させ、その 3 日後にハーベストしました。これらの実験で使用したバキュロウイルスはすべて、最終的な感染の前に EX-CELL® CD Insect Cell Medium で 2 回継代されています。

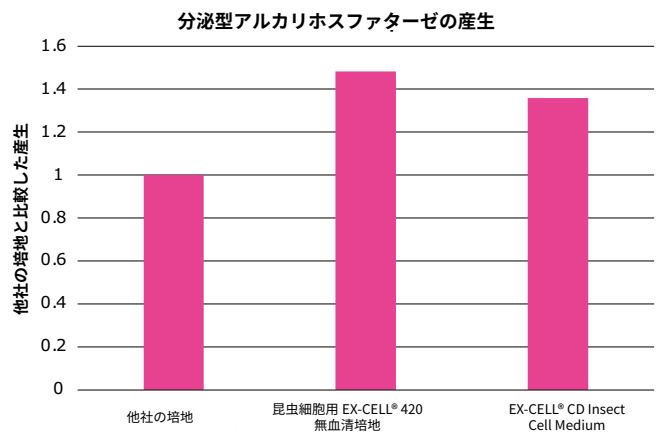


図 6. 3 種類の培地処方中での Sf-RVN® Insect Cell Line による SEAP 産生の比較。

図 6 に示すとおり、EX-CELL® CD Insect Cell Medium では他社の培地よりも 36% 高く SEAP が産生されました。EX-CELL® 420 無血清培地では、さらに高い値 (48%) が示されました。

## ルドルフ・レッド及びヒト EPO の産生

この試験では、バキュロウイルスをルドルフ・レッド及びヒトエリスロポエチン (hEPO) と同時に感染させました。ヒト EPO は上清中に分泌され直接測定できるのに対し、ルドルフ・レッドは細胞内に留まり、細胞外に放出されれば蛍光プレートリーダーで定量できます。MOI が 5 となるよう細胞に感染させ、その 3 日後にハーベストしました。

図 7 に示すとおり、EX-CELL® CD Insect Cell Medium では他社の培地よりも 45% 高くルドルフ・レッドが産生されました。

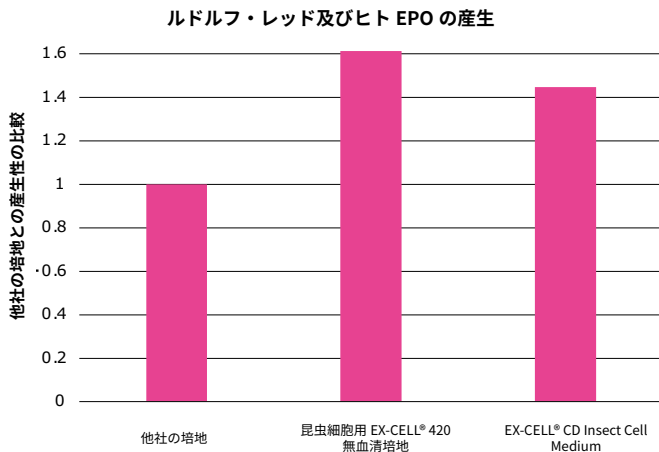


図 7. 3 種類の培地処方中での Sf-RVN® Insect Cell Line によるルドルフ・レッド産生の比較。

## ブタパルボウイルスの産生性

AAV と同じく PPV はカプシドウイルスで、多面体核カプシドは細胞内に留まります。AAV と PPV はいずれも小型でエンベロープがない一本鎖 DNA ウィルスで、VP1、VP2、VP3 の 3 種類のウィルスタンパク質から組み立てられます。

先の試験と同じく、培養 1 日目に約  $2 \times 10^6$  cells/mL となった細胞に MOI が 5 となるよう感染させ、その 3 日後にハーベストしました。EX-CELL® CD Insect Cell Medium のでの産生性は、他社の培地と EX-CELL® 420 無血清培地の両方を 22% 上回りました (図 8)。

## ブタパルボウイルスの産生性

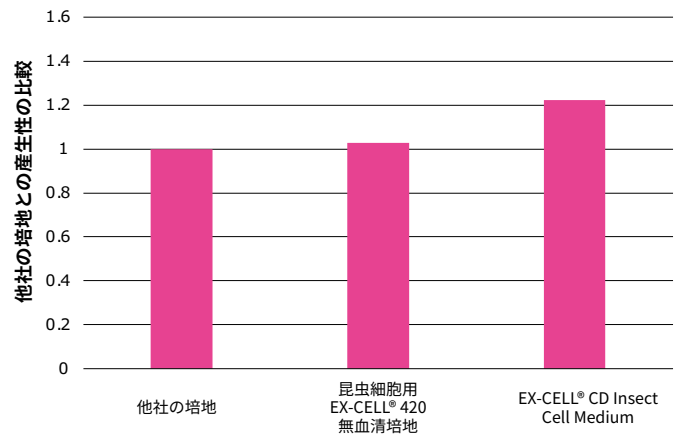


図 8. 3 種類の培地中での Sf-RVN® Insect Cell Line による PPV 産生の比較。

## 結論

Sf9 細胞は Sf- ラドウイルスに汚染していることが判明しましたが、これらの細胞株は組換えタンパク質、ウィルス様粒子 (VLP) 及び遺伝子治療用アデノ随伴ウィルス (AAV) を生産するための宿主として広く用いられています。このウィルスがヒトに害を及ぼす可能性は低いと考えられますが、他の外来性感染性物質と同様に、患者の安全性を保証するためラドウィルスを除去することが求められます。

EX-CELL® CD Insect Cell Medium は Sf-RVN® Insect Cell Line の堅牢な増殖性を達成するだけでなく、加水分解物を含む EX-CELL® 420 無血清培地と同等以上の産生性を示すことがデータで確認されています。

Sf-RVN® Insect Cell Line はウィルス汚染がなく、バイオプロセスの安全性プロファイルを向上させることが示されています。この細胞株と EX-CELL® CD Insect Cell Medium を組み合わせた Sf-RVN® プラットフォームにより、堅牢な増殖性と生産性が得られます。

## References:

- Maghodia AB, Geisler C, Jarvis DL.Characterization of an Sf-rhabdovirus-negative Spodoptera frugiperda cell line as an alternative host for recombinant protein production in the baculovirus-insect cell system. Protein Expr Purif. 2016 Jun; 122:45-55.
- Geisler, C. A new approach for detecting adventitious viruses shows Sf-rhabdovirus-negative Sf-RVN® cells are suitable for safe biologicals production. BMC Biotechnology, 2018, 18:1, Page 1

Facebookもチェック

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2022 年 2 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK\_WP6017EN Ver 2.0

## メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら [www.merckmillipore.jp](http://www.merckmillipore.jp)

製品・技術に関するお問合せ: PStechservice\_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ: PScommercialservice\_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143

PSM270-2202-PDF-MA

