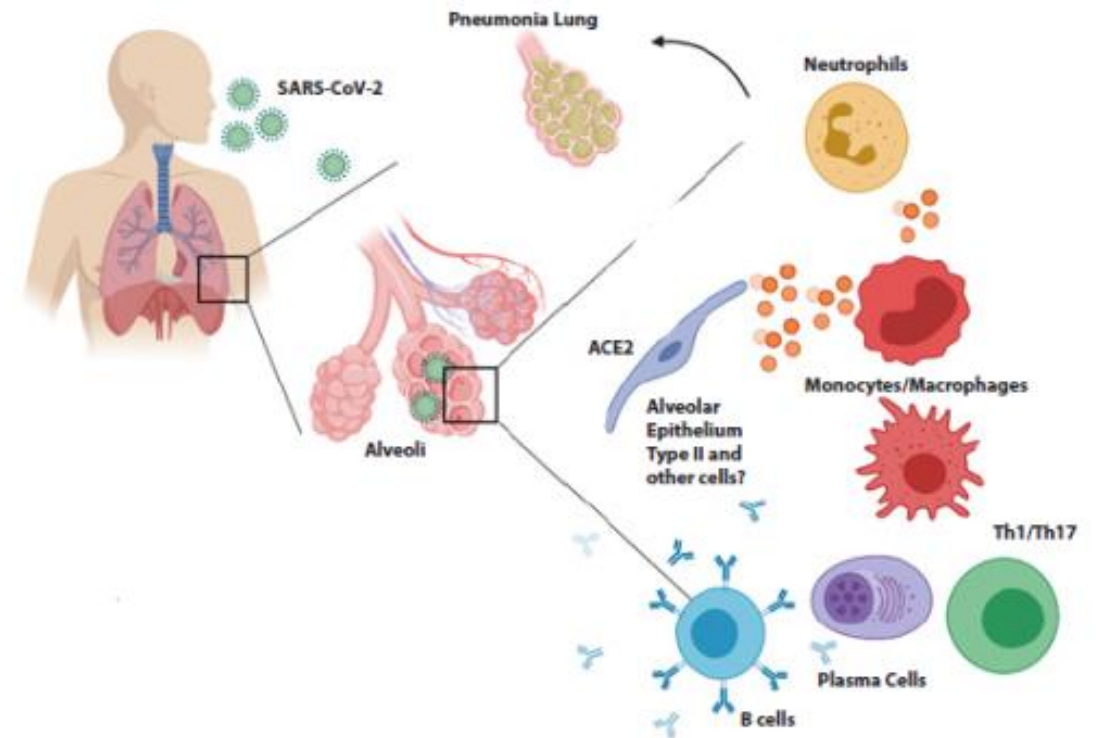


COVID-19の研究

統合ソリューション-医薬品/ワクチン開発の行程

COVID-19疾患の発症

- COVID-19はSARS-CoV-2ウイルスによって引き起こされる疾患です
- SARS-CoV-2は(アンジオテンシン変換酵素)ACE2受容体を介して標的細胞に侵入します。
- ACE2は2型肺胞細胞で高発現します
- ACE2のより低レベルの発現は、他の肺血管内皮細胞、腸上皮細胞ならびに舌および鼻組織において観察されます
- これらの受容体の発現は、年齢、性別、およびドナーの疾患状態に基づいて変動する可能性があります
- ACE2は免疫応答の重要な調節因子です
- 制御されていないウイルス複製は、過剰な炎症反応を引き起こし、最も重篤な場合には肺炎に至ることがあります



薬剤/ワクチン開発の行程全体にわたる応用

疾患研究

- ・ 新しい標的を同定するためのSARS-CoV-2感染と免疫応答の研究
- ・ 人的資源が限られた中、継続的なワークフローを可能にするためのカスタムサービス (CellBio Services)

セラピューティクス/ ワクチンの開発

- ・ 生物学的に関連のあるCOVID-19疾患モデルを開発します
- ・ Nucleofector™トランスフェクション技術を用いてin vitroでSARS-CoV-2ウイルス粒子を作製
- ・ タンパク質、ハイブリドーマおよびワクチン研究のための無血清培地

前臨床

- ・ in vitroで既存の薬物をスクリーニングし、感染または炎症を軽減する効果を調べます
- ・ 潜在的な新規COVID-19治療薬の安全性および毒性試験の実施

製造

- ・ GMP培地を用いた新たなワクチン・治療戦略の開発
- ・ 製造ワクチンの出荷試験の実施

薬剤/ワクチン開発の行程を横断する統合ソリューション

疾患研究

- ・ 正常、疾患、ALI分化
- ・ 小型気道上皮細胞 (SAEC)
 - ・ ヒト気管支上皮細胞 (HBE)
- ・ 肺由来のヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC-L)
- ・ 他の細胞型: 心臓、腸上皮、内皮、平滑筋および線維芽細胞、ACE2を発現する細胞
- ・ 全ての初代細胞に対する専用の増殖培地
- ・ FlashGel System
- ・ カスタム細胞キャラクタリゼーション、細胞アッセイ、培養、増殖、不死化およびプロトコル開発

開発治療薬/ワクチン

- ・ 凍結保存免疫細胞 (PBMC、T細胞、B細胞、単球等)
- ・ 骨髄、CD34+細胞
- ・ 2D共培養、RAFT3Dモデル
- ・ X-Vivo™およびTheraPEAK™X-VIVO™培地シリーズ
- ・ クラシカル培地および試薬
- ・ Hybridomaスクリーニング用無血清培地
- ・ 血清遊離蛋白・ワクチン製造培地
 - ・ Vero, 293, MDCK, Insect Media
- ・ eCHO™、GS-CHO™、PowerCHO™、ProCHO™などのリコンビナント・プロテイン・メディア
- ・ ウイルス粒子を昆虫細胞株にトランスフェクトするNuceloFector™技術

前臨床

- ・ 安全性と毒性
 - ・ 気道と免疫細胞
 - ・ 腸上皮
 - ・ 心臓
 - ・ 肝臓細胞/肝細胞 (Hepatocyte)
 - ・ 腎臓
 - ・ その他の細胞種
- ・ 培地
- ・ 3D培養モデル
- ・ カスタム細胞キャラクタリゼーション、細胞アッセイ、培養、増殖、不死化およびプロトコル開発
- ・ カスタム CellBio Services

製造

- ・ GMP無血清培養培地
- ・ エンドトキシン試験 (LAL)
- ・ エンドトキシン検出組換えC因子キット PyroGene™ rFc
- ・ MODA™

ヒト初代培養細胞

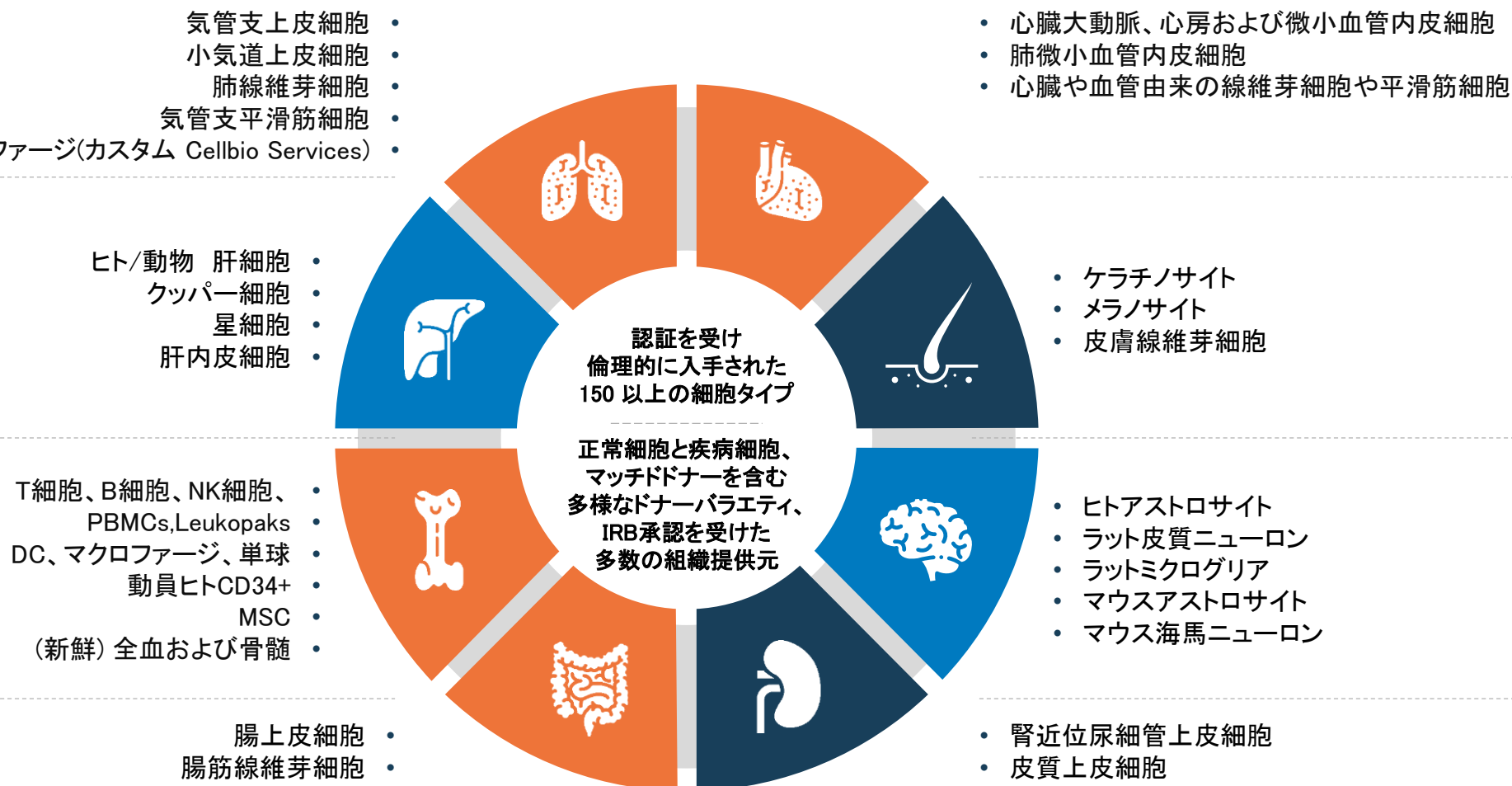
COVID-19を研究するための生物学的モデル系

Lonza Bioscience|2020年4月



COVID-19研究に関連する細胞種

正常ドナーおよび疾患ドナー由来の多様な製品群



正常ドナーおよび疾病ドナー由来の様々な初代細胞は リスク研究を可能にします

以下の詳細なドナー情報はサイエンティフィックサポートから入手可能です:



- ➔ 喘息、COPD、嚢胞性線維症などの気道細胞疾患の状態について
- ➔ 心臓細胞型については、糖尿病、BMI、高血圧についてのドナー情報が入手可能です
- ➔ HLA表現型
- ➔ 喫煙者、喫煙期間、喫煙量(箱/日)
- ➔ 同じ適合ドナーからの異なる細胞型(ケースバイケース)
- ➔ 病気の細胞に推奨される培地は正常細胞と同じです

COVID-19研究に関連する気道細胞

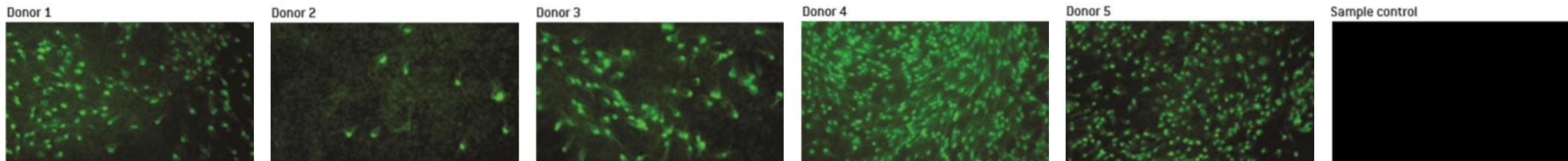
適切な生物学的モデルを開発するために重要な製品特徴とドナーバラエティ

ALI分化肺胞細胞は、ドナーによって様々なACE2発現を示し、感染能の変動を評価するための生物学的に妥当性のある in vitroモデルを提供します

- 小気道上皮細胞 (SAEC) および気管支／気管上皮細胞 (NHBE) では、多数のロットを提供しています
- ALI培養系において分化が保証されているスクリーニング済み製品が利用可能です
- ALI細胞は、TEER、ムチンおよび繊毛形成などで示されるような強いバリア形成で特徴づけられます

- 通常のSAECおよびNHBEは、必要に応じてALI分化培養をサポートできる可能性があります
- 喘息、COPDなどの疾患ドナー由来の細胞が利用可能です
- カスタムサービスとして利用可能なHLAタイピングとACE特性評価
- 専用の気道増殖培地: SAGM™、BEGM™、ALI培地

SAEC in air-liquid interface culture exhibit a ciliated phenotype (β -tubulin staining by day 20). Control is day 0 in airlifted conditions.



COVID-19研究に関連する気道細胞型

細胞種別／型番	由来組織	利用可能な疾病型	推奨培地／型番
気道由来の正常および疾患細胞型			
小気道上皮細胞(SAEC)/CC-2547	肺遠位部(細気管支1mm部分)	喘息、COPD、嚢胞性線維症	SAGM™BulletKit™/CC-3118
気管支/気管上皮細胞(NHBE)/CC-2540	肺分岐上の気道上皮層		BEGM™BulletKit™/CC-3170
Air Liquid Interface (ALI) 細胞			
小気道上皮細胞(SAEC) for S-ALI/CC-2547S	肺遠位部(細気管支1mm部分)		S-ALI™-BulletKit™/CC-4539
気管支上皮細胞(NHBE) for B-ALI/CC-2540S	肺分岐上の気道上皮層		B-Ali™BulletKit™/00193514
他の関連する肺細胞型			
肺線維芽細胞/CC-2512	成人の肺組織	喘息、COPD、嚢胞性線維症、iPF	FGM™-2BulletKit™/CC-3132
肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L) /CC-2527	肺内の小血管	高血圧、糖尿病、リクエストに応じて喫煙歴を提供可能	EGM™-2MV BulletKit™/CC-3202

凍結保存された血液および免疫細胞

COVID-19に対する免疫応答の検討

PBMCs

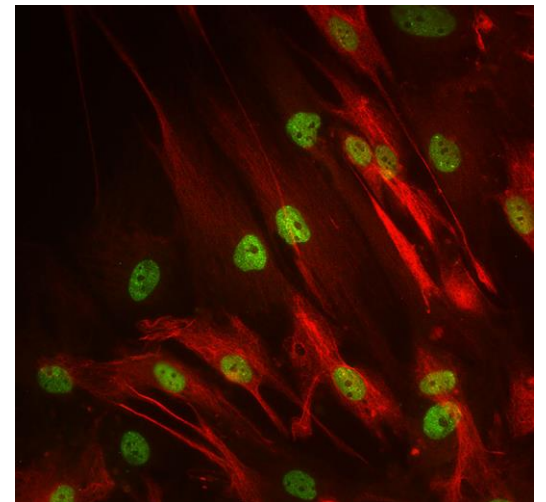
- 多種多様な正常ドナーを在庫
- 気道細胞との共培養
- サイトカイン/ケモカインと免疫細胞活性化の検討
- 全血の簡便な代替法

間葉系幹細胞(hMSC)

- 既知の免疫調節作用
- COVID-19を治療するための移植療法の検討

単離された免疫細胞

- T細胞(CD3+、CD8+、CD4+、ナイーブ、記憶)
- B細胞 (ポジティブ選択／ネガティブ選択)
- CD14+単球 (ポジティブ選択／ネガティブ選択)
- 樹状細胞
- NK細胞
- マクロファージ



2Dおよび3D培養における免疫細胞および肺細胞の適用

In vivo状態を模倣するin vitroアッセイ

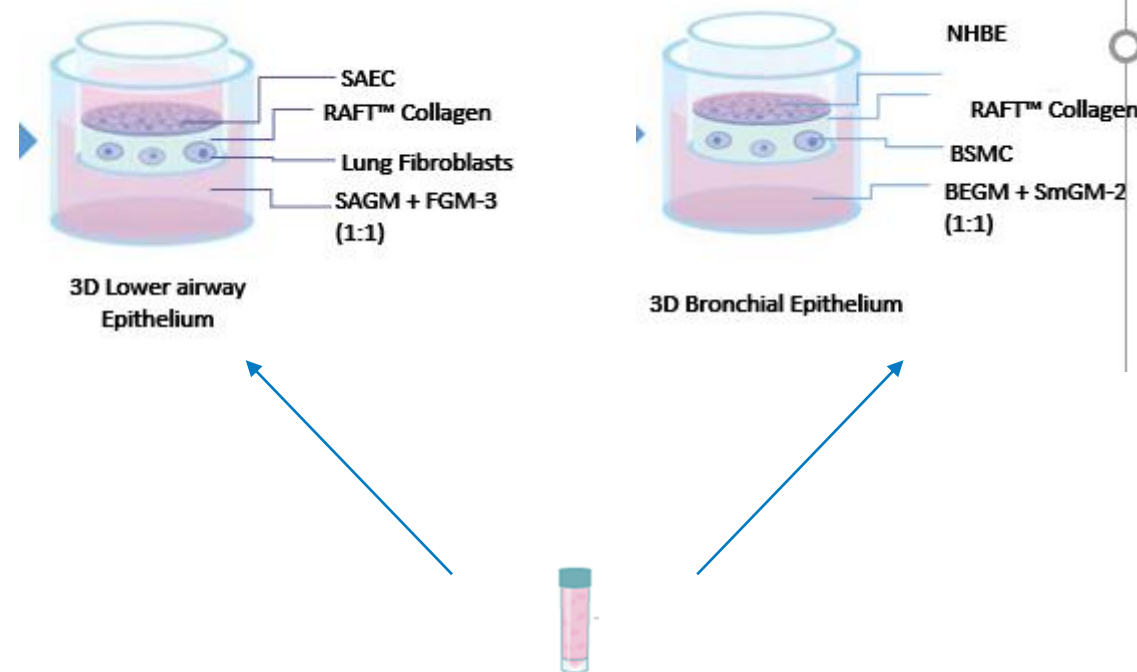
特定のHLA遺伝子座が抗SARS-CoV-2免疫の発達と関連しているかどうか研究されています

Lonzaが提供する幅広い免疫細胞ポートフォリオとドナーバリエティにより以下のことが可能です:

- PBMCと初代肺上皮細胞との共培養などによるサイトカイン応答の測定。
- ワクチン研究におけるT細胞活性化の測定
- 抗体反応の測定
- HLA適合ドナーが利用可能であり、PBMCとの共培養実験を可能にします

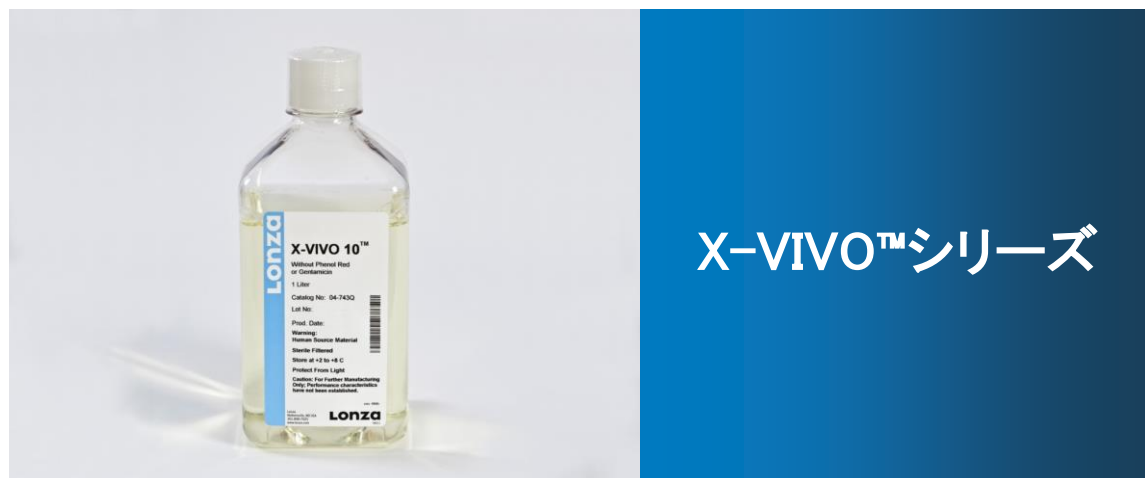
HLA情報は適合ドナー共培養実験に利用可能です

免疫細胞SAECs NHBEのRAFT3D共培養



免疫細胞(PBMC、DC、肺マクロファージなど)を加えます

免疫細胞およびhMSCの培養培地



X-VIVO™シリーズ

- 種々の造血細胞および免疫細胞を培養するための無血清培地
- 特定の細胞型にも適合可能な多様な組成を準備
- 基礎研究から製薬製造など多様な段階の600以上のお客様にご利用いただいています



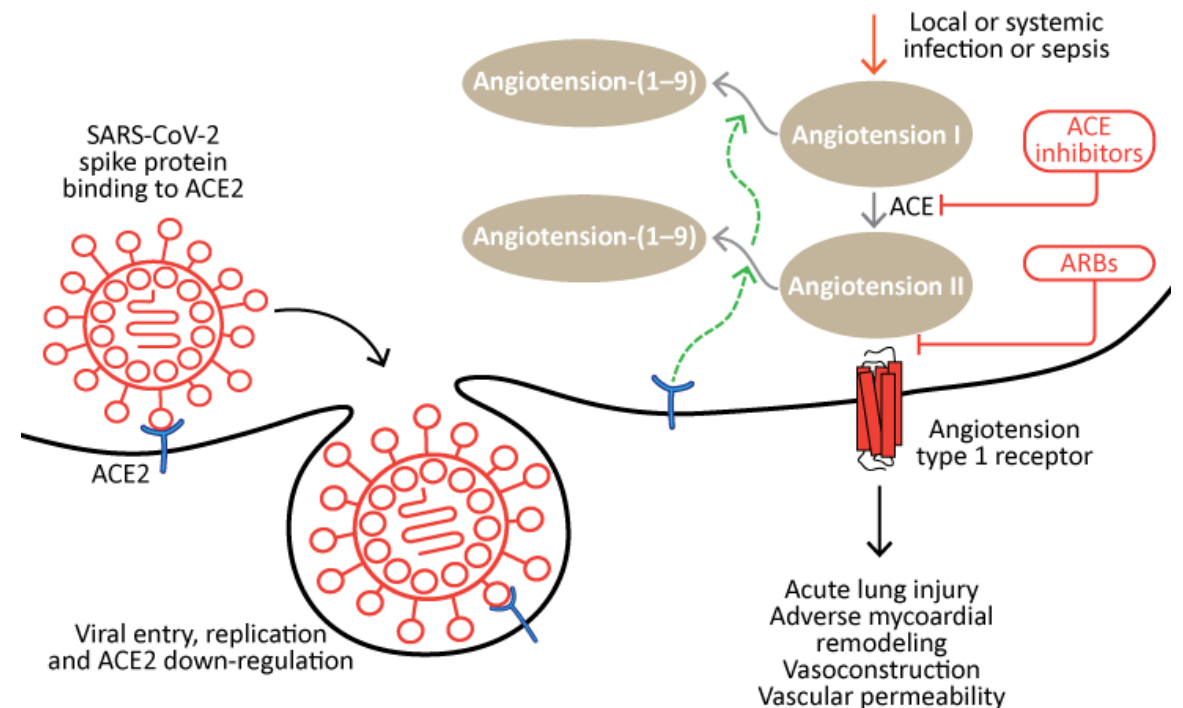
hMSC media

- 基礎培地とサプリメントがセットになった便利なBulletKit™
- 増殖培地と分化培地の両方のBulletKit™が利用可能
- 無血清製品と血清含有製品のどちらも利用可能

ACE2発現を有するその他の初代細胞

ACE2の発現は性別、年齢および民族的な由来によって異なります

- ACE2は胃および腸上皮に高発現しています。COVID-19患者の50%以上で消化器症状が起こります。悪心および下痢がよくみられ、糞便中へのウイルス排泄と関連します
 - 腸上皮細胞が利用可能です
- 心臓細胞型はACE2を発現し、ACE2は血圧調節に関与します。高血圧患者はCOVID-19による死亡リスクが高いです
 - 利用可能な心臓大動脈、心房および微小血管内皮、線維芽細胞および平滑筋細胞
- 複数の細胞型については、糖尿病、BMI、高血圧およびその他の病態に関するドナー情報が入手可能です



Nucleofector™技術

Nucleofector は、SARS-CoV-2 を研究するための複数のアプリケーションに対応します

- ➔ ウイルス複製の重要な因子の解析
 - 完全長のSARS-CoV-2ウイルスRNAは、ヌクレオフェクションによってBHKまたはVero細胞のような宿主細胞にエレクトロポレーション可能です
- ➔ ウイルスの感染と複製を阻害するためのRNA干渉 (RNAi) の効果を調べる
- ➔ ハイブリドーマで産生される抗体の特異性の選択のために、HEK293細胞上にACE2受容体を人工的に発現させる
- ➔ CRISPR/Cas9RNPのアレイヌクレオフェクションについて
 - 宿主因子の効率的なマルチプレックス編集のためのハイスループットプラットフォーム
 - ウイルス耐性をもたらす遺伝子改変を同定することを可能にする、候補因子を除去された同質遺伝子(アイソジェニック)ヒト細胞の迅速生成



FlashGel™ System:

数分というリアルタイムで結果の出る迅速なDNA/RNA電気泳動

FlashGel™システムは、ロンザの提供するDNA/RNA分離・DNA回収のための超高速・簡便な電気泳動装置です。プレキャストゲルや関連試薬も併せてご提供しています。

- どこにでも携帯可能、ゲルの準備いらずで簡単に使用できます



FlashGel™システムはどのようなことができるのでしょうか？

- 5分間でDNA分離終了
- DNAサンプルの回収も10分で可能！カセットから直接回収できるのでバンドの切り出しや精製が不要
- RNAの分離も危険な試薬やRNase汚染なしで30分で可能です

References

- ➔ I Hamming, W. Timens et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. J Pathol 2004; 203: 631–637

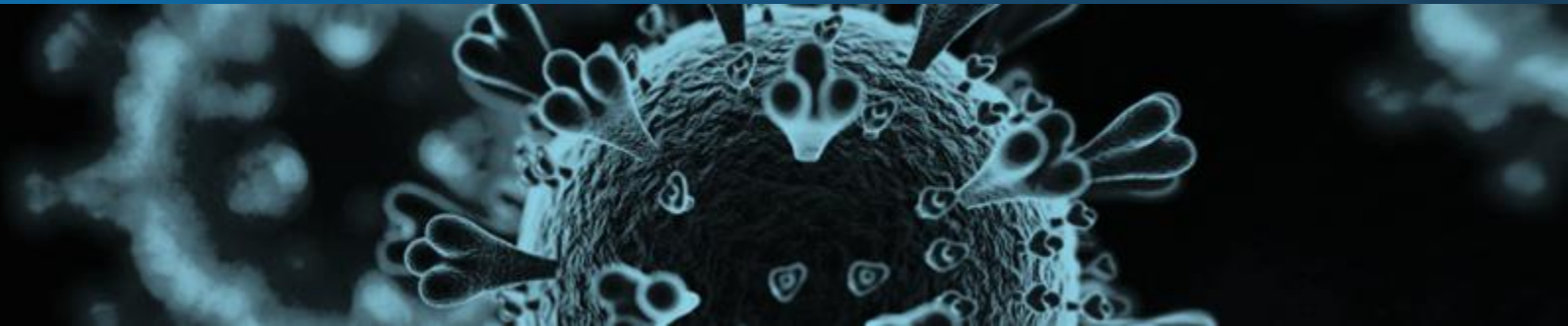
- ➔ Z. Leng *et al.* (2020) Transplantation of ACE2⁺ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. Aging and Disease. 11. pp 216–228

- ➔ Lin L, Jiang X, Zhang Z, et al Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection Gut Published Online First: 02 April 2020. doi: 10.1136/gutjnl-2020-321013

- ➔ Hultquist et al., 2016, Cell Reports17, 1438–1452

ロンザのカスタムサービス CellBio Services

Your extended workbench



COVID-19 研究用 CellBio Services

カスタム細胞単離

CellBio Servicesは、提供するカタログ製品以外にも、COVID-19関連の研究において重要な様々な細胞型を単離することができます:



- ➔ 鼻粘膜上皮細胞
- ➔ COVID-19により潜在的に影響を受ける疾患(呼吸器疾患、糖尿病、高血圧/心疾患を含みます)を有するドナー由来の疾患気道上皮細胞
- ➔ 同一ドナー由来の気道細胞型
- ➔ 肺胞上皮細胞
- ➔ PBMCなどのCOVID-19回復期ドナー由来の細胞型

COVID-19 研究用 CellBio Services

Extended workbench

COVID-19のため、多くの検査室は閉鎖されているか、またはキャパシティが低下した状態で運営されています。ラボ業務は、日常業務と専門的業務の両方で、ロンザ・セルバイオ・サービスに委託することができます。このようなサービスには、以下のものが含まれます:

気相-液相界面(ALI)研究

ラット/マウス由来のニューロン分離

細胞検査サービス

- 顧客が提供するプロトコルを実行する能力



細胞拡大サービス

(初代培養細胞及び細胞株)

- 2×10^{10} cells までの接着細胞バッチ
- 5×10^{10} cells までの浮遊細胞バッチ
- 1,500バイアルまでのロットサイズ

COVID-19 研究用 CellBio Services

カタログ製品のカスタムテストと構成

CellBio Servicesは、カタログ製品の追加テストおよびカスタムフォーマットを提供し、あなたのCOVID-19研究の効率を向上させることができます:

- 現行カタログロットの細胞スクリーニングサービス
- HLAタイピング
- 遺伝子型タイピング
- ACE2および他の関連マーカー (TMPRSS2、SP-C、HT2-280など) の FACS分析



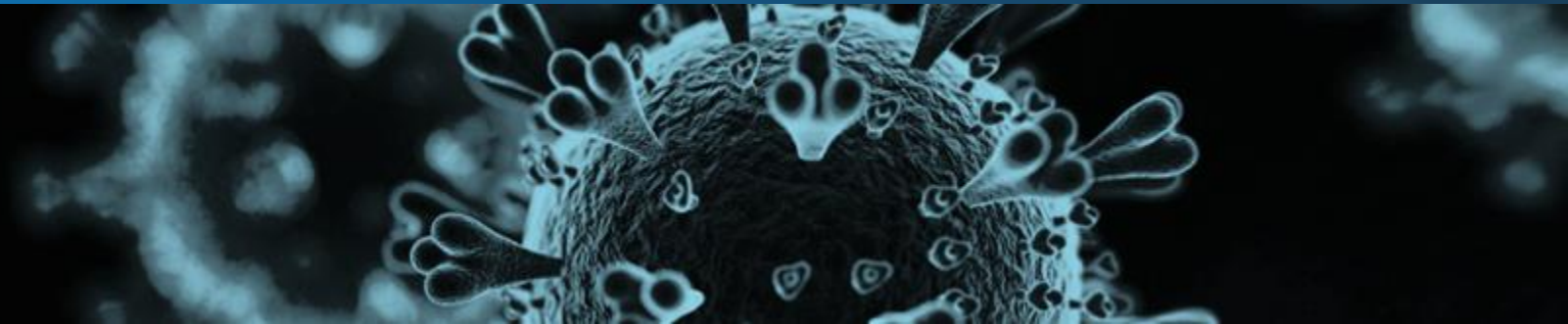
SAGM™またはBEGM™培地、クラシカル培地、無血清培地および緩衝液のカスタムサイズ/包装:

- ボトルまたはバッグ(様々なサイズ)に入れた500mlから10,000Lまでの液体オプション
- 1kg~7,000kg の粉体オプション
- カスタムサイズ/combined SingleQuots™

培地ソリューション

研究からGMPまで

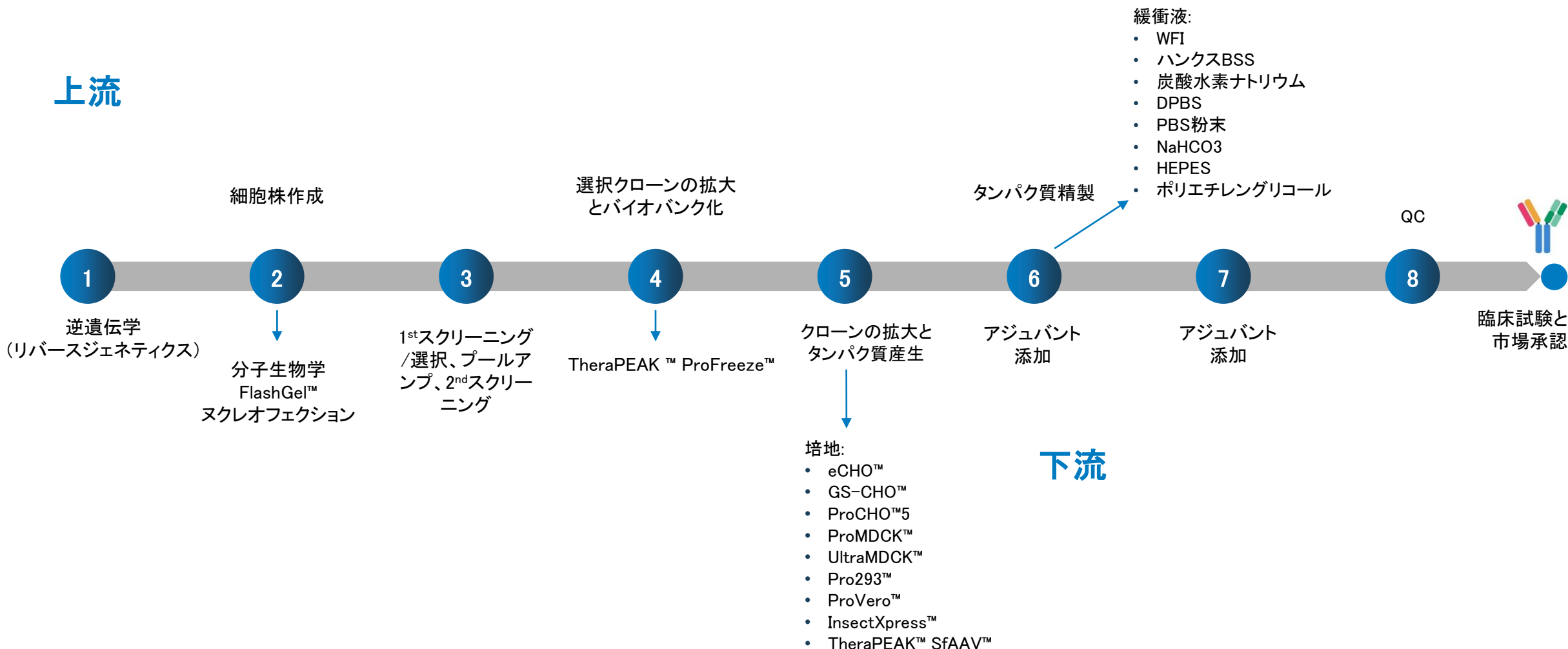
Lonza Bioscience|2020年4月



ワクチン開発旅行を通じたソリューション

クラシカル培地、緩衝液、無血清培地およびタンパク質産生用培地まで

上流



クラシカル培地

SARS-CoV-S2ウイルスに感染した細胞株を用いた研究用培地



広範囲の標準/クラシカル培地:

- DMEM
- MEM
- RPMI
- IMDM
- DMEM/F12



公開された組成

- 通常、血清(FBS)またはHL-1™(代用血清)を加えて使用
- Tissue Culture Associationの処方に従って製造
- 糖、グルタミン、フェノールレッド等、様々なサブ組成で入手可能
- RUOラベル表示のカatalog製品として手軽に入手可能
- PBS, DPBS, Waterのような研究用緩衝液・試薬が使用されています

研究から製造までの無血清培地

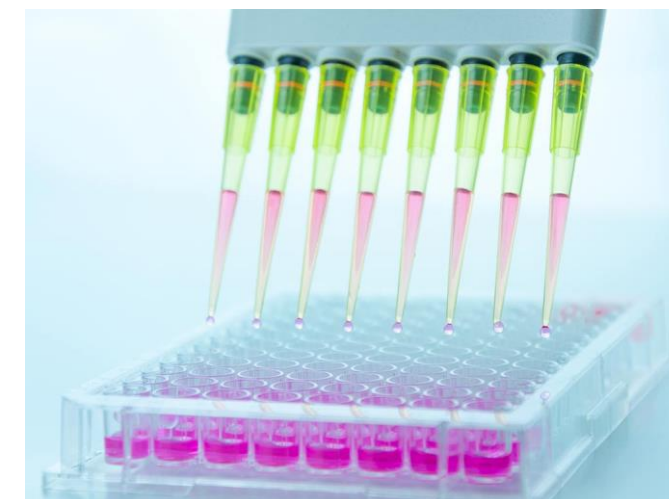
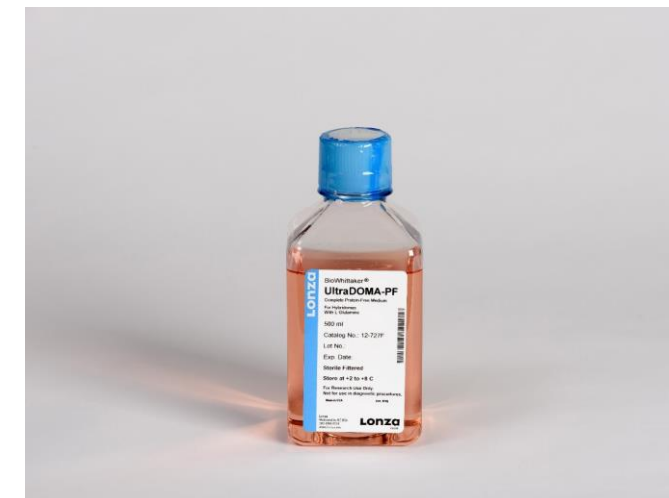
ACE2受容体に対する抗体の特異性の同定。

ELISAスクリーニングはハイブリドーマ産生抗体で実施されています。

- ➔ **UltraDOMA-PF™ タンパクフリーハイブリドーマ培地 (SF, CD, PF, NAO)**
 - マウス、ラット及びヒトハイブリドーマ
 - 無タンパク
- ➔ **ProDOMA™3 無血清ハイブリドーマ培地 (SF, PF, NAO)**
 - マウス、ラットおよびヒトのハイブリドーマ
 - 非動物由来
- ➔ **HL-1™無血清培地と代替品 (SF, AO)**
 - マウス、ラットおよびヒトのハイブリドーマ;また、単球、マクロファージおよびリンパ球
 - 蛋白濃度 < 30 µg/ml

セルバンキング用TherePEAK™ProFreeze™-CDM Freezing Mediumは、血清を必要としない凍結保存液です。(SF, CD, PF, NAO)

ハイブリドーマスクリーニングの後、選択された抗体は、IgGとして細胞株で産生されます。eCHO™、GS-CHO™、PowerCHO™、HEK293などの無血清培地は細胞株に応じて使用することができます。



MDCKおよびVERO細胞用の血清フリー培地

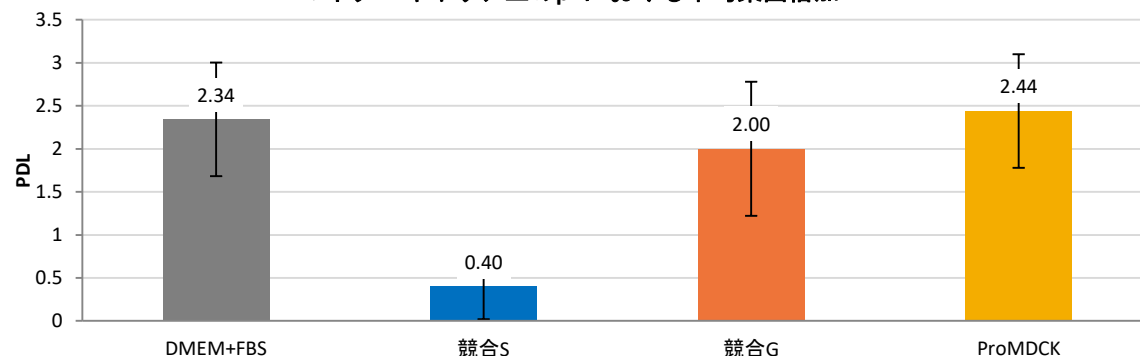
平面培養用 ProMDCK™2D 培地

ProMDCK™3D Medium for growth on microcarriers

主要な機能および利点

- 無血清・非動物由来培地
- 平面培養およびマイクロキャリア上で懸濁MDCK細胞の2Dおよび3D成長をサポートします
- バイオリアクターでのワクチン製造用に設計
- 増殖およびウイルス感染には同じ培地を用いることができます
- 適応不要
- 競合に比べて高い細胞収率

マイクロキャリア上のp1における平均集団倍加

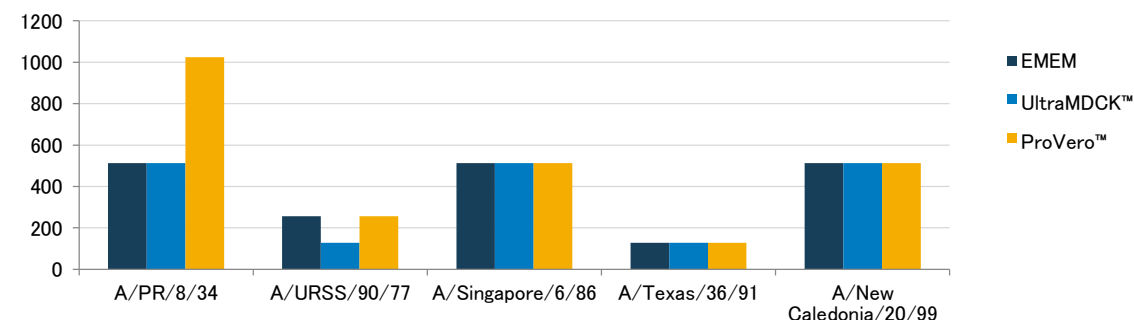


ProVERO™-1 Medium

主要な機能および利点

- 無血清
- 動物由来成分なし
- タンパクフリー
- 化学的既知組成による下流処理の容易化
- MDCKおよびVERO細胞におけるワクチンおよびタンパク質産生を支持

MDCK細胞におけるA/H1N1採取のHA力価-ProVero™培地を用いた血球凝集素の同様またはより高い産生



Insect-XPRESS™培地

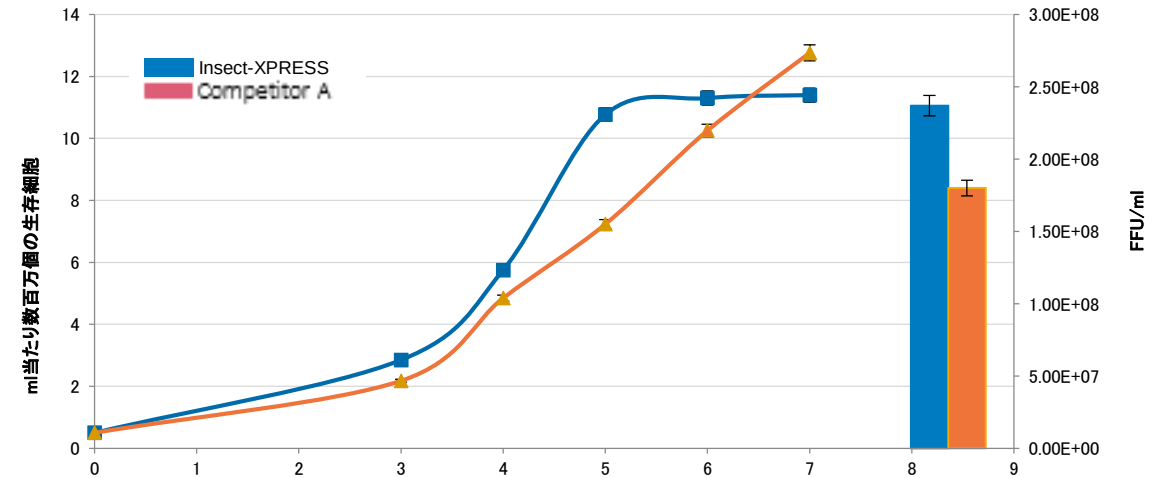
昆虫細胞の成長と生産のための無血清培地

昆虫細胞を使う利点

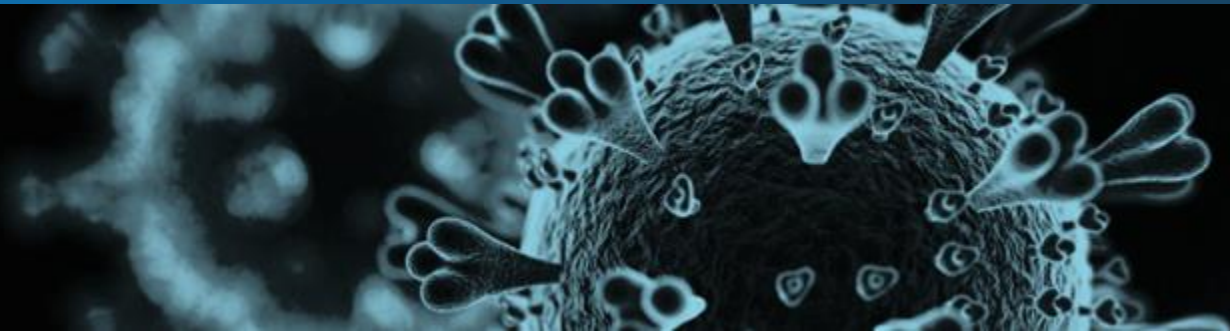
- 高レベルの遺伝子発現
- 正確なフォールディング
- 哺乳類細胞に類似した翻訳後修飾
- 低コストモデル
- 確立された安定なトランスフェクションプロトコル
 - バキュロウイルス(Bac)発現系

Insect-XPRESS™培地使用の利点

- 無血清条件によるタンパク質収率の向上
- 細胞密度を 8.3×10^6 cells/mL以上にサポート
- 静置単層培養および振盪フラスコ培養における昆虫細胞増殖をサポートします
- タンパク質やワクチンの生産に使用できます



ワクチンの品質試験 エンドトキシン試験及び試料採取



ワクチンのエンドトキシン試験

規制要件

- ワクチン接種は、世界中で感染症に有用な予防と治療方法の一つです。
- 注射用製剤には、患者に重篤な健康被害をもたらす可能性のある発熱物質が含まれていない事を確認する規制要件が、要求されています。

ワクチン開発期

- ウイルスワクチンを含むワクチン製剤は、出荷前の品質試験として、LALまたはrFCを用いてエンドトキシン試験をルーチンに行います。
- 生物学的製剤のウイルスワクチンは、ウサギを用いての発熱性試験を行う必要はなく、単球活性化試験(MAT)をLALが適用できない場合に、代替法として実施が可能です。

ワクチンのエンドトキシン試験

エンドトキシン試験の対象は...

- 原料
- 製造用水
- 工程内中間体
- バルク製剤(原薬)
- 最終製剤(医薬品)

...また、いつエンドトキシン試験をするのか?

- 前臨床ロット
 - 臨床試験に使用する動物に投与する前に
- 臨床ロット
 - フェーズⅠ - 安全性確認
 - フェーズⅡ - 有効性、安全性の確認
 - フェーズⅢ - 拡大した有効性、安全性の確認
- 市販ロット
 - 商業用のすべてのワクチンは、規則に従って発熱性物質について試験をしなければなりません
 - 最も頻度の高い汚染物質はグラム陰性菌由来のエンドトキシンです

ワクチン開発とバッチリリースのエンドキシン試験をサポート

エンドキシン試験(BET)

- ゲル化法
- カイネティック比濁法
- カイネティック比色法
- 組換え(rFC)ライセート試薬(蛍光法)

とともに...

- エンドキシン標準品
- エンドキシンフリー消耗品
- エンドキシン検出機器・ロボットソリューション
- インフォマティクソリューション
- 点検サービス等

試薬



消耗品



検出機器/ロボット



ソフトウェア



ハイスループットアプリケーション用PyroTec™PROシステム

自動エンドトキシン ロボットシステム

- Tecan Freedom EVO®150Air LiHaプラットフォーム

「Plugin」 WinKQCL™6.0ソフト ウェア

- 高信頼性セキュリティデータベース、テスト・エンジニア、リーダーコントロール

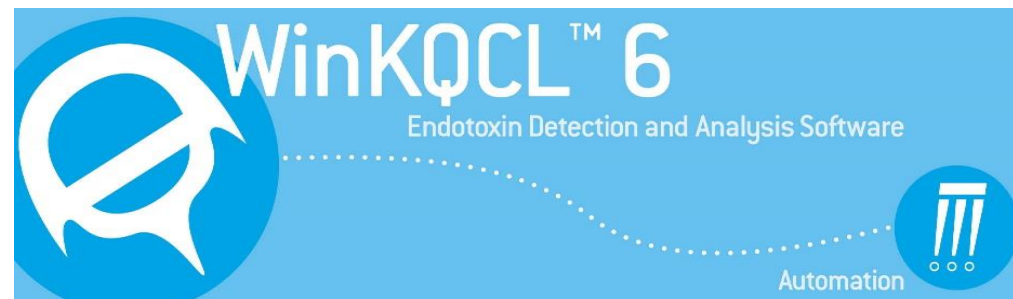
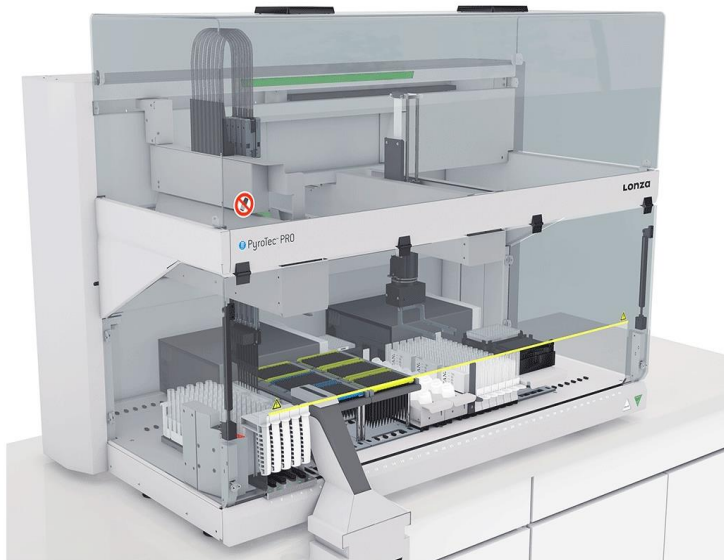
Lonza Kinetic QCL™ 、PYROGENT™-5000 PyroGene™ 各ライセンス試薬に 対応

作業手順の標準化

- すべての手動ピペットステップを自動化します
- 精度の向上、ミスの軽減、分析者の実作業時間の短縮

データ完全性のニーズへの対応

- (オプション)エクスポートデータ形式のカスタマイズ
- 紙媒体の排除
- 自動データエクスポート対応(MODA/LIMS)



ご覧いただき
ありがとうございました！