



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

- | | |
|---|--|
| (21) Nr. cerere: 96-01762 | (61) Perfecționare la brevet:
Nr. |
| (22) Data de depozit: 03.03.1995 | (62) Divizată din cererea:
Nr. |
| (30) Prioritate: 08.03.1994 US 208.162; | (86) Cerere internațională PCT:
Nr. US 95 / 02516 03.03.1995 |
| (41) Data publicării cererii:
BOPI nr. | (87) Publicare internațională:
Nr. WO 95/24468 14.09.1995 |
| (42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.11.1999 BOPI nr. 11/1999 | (56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0583142; US 4448884 |
| (45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr. | |

- | | |
|-------------------|--|
| (71) Solicitant: | MERCK & CO., INC., RAHWAY, US; |
| (73) Titular: | MERCK & CO., INC., RAHWAY, US; |
| (72) Inventatori: | LEU FRANK S., RAHWAY, US; SEIFERT DOUGLAS B., RAHWAY, US; |
| (74) Mandatar: | ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER
TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI, RO |

(54) **PROCEDEU PENTRU PRODUCEREA UNUI VIRUS ÎNTR-O
CULTURĂ AGREGATĂ MICROPURTĂTOR-CELULĂ**

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru producerea unui virus într-o cultură agregată micropurtător-celulă, care cuprinde reținerea unei populații de celule, într-o stare atașată și agregată, pentru producerea unei cantități comerciale de antigen vaccin viral și cuprinde etapele: prepararea micropurtătorilor înveliți în sticlă, într-un strat subțire de sticlă, cu densitatea de 2,4 g/ml; inocularea celulelor într-un mediu de cultură adecvat, pentru a realiza o atașare uniformă de 1...10 celule/micro-

purtător, preferabil 5...10 celule/micropurtător, la un pH de 7,6...7,9; creșterea celulelor inoculate și atașate în faza logaritmică târzie sau la cea staționară incipientă, timp de aproximativ 6 zile; infectarea agregatului micropurtător-celulă în faza logaritmică târzie sau staționară incipientă cu virus; recoltarea și recuperarea virusului din cultura de agregate micropurtător-celulă.

Revendicări: 5
Figuri: 20

RO 115176 B1



Invenția se referă la un procedeu de producerea unui virus într-o cultură agregată micropurtător-celulă, pentru producerea unei cantități de vaccin antigen viral. Procedeu este exemplificat cu celule MRC-5 perfuzate, cultivate pe micropurtători înveliți în sticlă și infectate cu virusul hepatitei A.

5 Este cunoscut din **EP 0583142** un procedeu reproductibil la scară înaltă pentru producerea de virus de hepatită (HAV), produsul final conținând suplimentar proteină, carbohidrați, lipide, ADN și ARN-ul caracteristic.

10 Este, de asemenea, cunoscut din **US 4448884**, un micropurtător pentru ancorarea celulelor cultivate pe micropurtători sferici dintr-un material polimeric cu o densitate de 1 g/cm³ care au un strat din sticlă de siliciu.

15 Se cunoaște, de asemenea, că mulți virusi și proteine terapeutice se obțin prin celule dependente de ancorare, în care atașarea celulei de o suprafață este o cerință pentru creșterea celulei și pentru funcția chctată a liniei de celule. Când sunt necesare cantități mici se folosesc baloane multiple-T și sticle Roller pentru a furniza suprafața necesară. Alte sisteme accesibile comercial, ca de exemplu uzinele de celule Nunc (Nunc Cell Factories) și cuburile Costar (Costar Cube) au suprafețe mărite ceea ce are ca efect o productivitate crescută per unitate de bioreactor. Cu toate acestea, aceste sisteme necesită unități bioreactor multiple, pentru cantități mari și de aceea prezintă limitări în cazul producției comerciale.

20 S-au elaborat diferite sisteme în pat compact, care includ reactoarele cu fibre goale în interior, pat compact de sfere, pat compact de fibre orientate aleator și monoliți ceramici poroși. Aceste sisteme prezintă dificultatea menținerii rezervei nutritive la celule în reactor datorită configurației și restricțiilor căilor de transport a agentului nutritiv datorită creșterii celulelor. Reactoarele cu fibre cu interiorul gol se bazează pe difuzia și curgerea Starling a mediului de-a lungul compartimentului celulei (vezi *J. M. Piret (1989), B. C. D. Thesis, Dept. Of Chem. Eng. Mass. Inst. Technology, August 1989*). Penetrarea agentului nutritiv prin difuzie este adecvată numai dacă adâncimea acumulării celulelor pe fibre este controlabilă și uniformă, ceea ce nu se întâmplă în aceste reactoare. Curgerea Starling descrește pe măsura creșterii celulelor, datorită rezistenței crescute a curgerii creată de creșterea celulelor. Aceasta reduce amestecarea în camera de creștere a celulelor. Paturile de mărgelile sau fibre compacte aleator se bazează pe convecția forțată și ambele sunt predispuse spre crearea de canale prin zonele cu rezistență hidraulică mai mică, by-pasarea suprafețelor cu densitate mai mare și care pot conține celule. Monoliții ceramici poroși sunt mai buni din acest punct de vedere, dar prezintă o bioancrasare. Pe măsură ce celulele cresc pe suprafața pe care se așează ele pot restrânge sau chiar să ocluzioneze căile de curgere ale mediului (*J. E. Putnam ș. a., Ann. Mtg. Soc. Ind. Microbiol., Orlando, Florida, Aug. 1, 1990*). În cazul monolitului ceramic, creșterea celulelor duce la restricția canalului astfel că se produce o creștere a rezistenței hidraulice a curgerii. Mediul curge, astfel, preferențial prin alte canale paralele și rezultatul este că canalul cu cea mai mare creștere a celulelor primește cel mai puțin mediu. Datorită acestor heterogenități în microambianța celulară și a potențialului limitat de extindere aceste reactoare au un succes limitat, nu se cunoaște nici un vaccin unam sau terapeutice obținute prin aceste sisteme omologate în SUA.

45 Este cunoscută utilizarea elementelor solide de amestecare statică în cultura de celule și virusi, (vezi Grabner și Paul, US 4 296 204). Folosirea unei site pentru cultura

țesuturilor primare care conțin câteva tipuri de celule este prezentată în **US 4 963 489** și **5 160 490**. Țesutul rezultat dintr-o cultură pe sită de fibroblaste stromale este revendicat în **US 4 963 489**. Folosirea elementelor de amestecare fără mișcare ca suprafață pentru creșterea celulei asigură un transport uniform al agentului nutritiv la populația de celule. Extinderea, curățarea și sterilizarea rămân probleme ce trebuie rezolvate pentru aplicarea acestor sisteme bioreactor. În plus, biomasa în aceste sisteme nu poate fi monitorizată direct în timpul cultivării. De aceea, trebuie folosite măsuri indirecte ale masei de celule pentru caracterizarea performanței bioreactorului. Din aceleași motive, îndepărtarea produsului asociat celulei poate fi, de asemenea, problematică cu aceste configurații ale reactorului.

Tehnologia cu micropurtător asigură o cantitate mare de suprafață pentru creșterea celulelor pe bile sferice mici (90...250μ) care sunt suspendate într-un bioreactor de tip vas cu agitare. Se pot realiza rapoarte mari de suprafață la volum, ceea ce are ca efect un sistem de producție foarte eficient raportat la volumul bioreactorului. Tehnologia asigură o cultură omogenă de celule care permite cuantificarea masei de celule și recoltarea produsului asociat celulei în timpul cultivării. Deoarece bioreactorul este un vas cu agitare se pot aplica cu ușurință curățarea și sterilizarea, cât și proiectarea reactorului care sunt cunoscute din industria de fermentare. Obținerea pe scară comercială a polivaccinului folosind micropurtători, la scară de 1000...1500 l, ilustrează potențialul de extindere. Producerea comercială a vaccinului antirabic și a vaccinului mână și picior, folosind cultura cu micropurtător, ilustrează potențialul de extindere al acestei metode.

Deși multe linii de celule și virusi au fost preparate pe micropurtători, sunt încă multe probleme de rezolvat pentru implementarea acestei tehnologii pe scară comercială. Este dificil de realizat un ambient cu forfecare joasă pe parcursul cultivării și menținerii unei culturi viabile pentru formarea produsului pe perioada de cultivare prelungită. Alegerea micropurtătorului adecvat și a condițiilor de cultură este deseori critică în obținerea produsului dorit. Propagarea hepatitei A constituie un exemplu bun al acestei probleme. Junker, B.ș.a. (*"Evaluation of a Microcarrier Process for Large Scale Cultivation of Attenuated Hepatitis A"*, Cytotechnology, vol.9, 1-3, 1992) au descris evaluarea micropurtătorilor CYTODEX 3 ca substraturi pentru creșterea celulelor MRC-5 și infectarea ulterioară cu virusul hepatitei A. O contribuție majoră la titrul scăzut al hepatitei A din culturile micropurtător s-a atribuit faptului că celulele se desprind treptat de pe bile în timpul perioadei de infecție. Bazat pe aceste rezultate, tehnologia cu micropurtători s-a prezentat a fi ne-optimală pentru obținerea pe scară comercială a virusului hepatitei A. Deoarece cultura virusului hepatitei A este exemplificată în prezenta invenție, se va prezenta în continuare o scurtă trecere în revistă a metodelor folosite pentru cultura acestui virus.

În 1973, Feinstone ș.a. (*Science* 182, p.1026) a identificat agentul etiologic al hepatitei infecțioase, cunoscut ulterior ca virusul hepatitei A (HAV), folosind microscopia electronică imună. Cultura *in vitro* a virusului hepatitei A (HAV) a fost raportată pentru prima dată de Provost ș.a. (P.S.E.B.M. 160, p.213, 1979), conform unui procedeu în care s-a folosit ficat de maimuță infectat ca inocul pentru cultura de explant de ficat și cultura de celule de rinichi de fetus rhesus (FrhK6) (SUA 4 164 566). Într-o invenție ulterioară, inocularea directă a HAV care nu a fost trecut anterior printr-un primat

subuman s-a folosit cu succes pentru inițierea propagării *in vitro* a HAV (Provost ș.a., P.S.E.B.M. 167, p.201 (1981); US 5 021 348).

O altă lucrare a fost aceea în care s-a demonstrat eficacitatea producției atât a virusului viu atenuat (Provost, ș.a., J.Med. Viol. 20, p.165 (1986)) și HAV inactivat cu formol (HBV. **US 4 164 566; US 5 021 348**; Provost ș.a. în *Viral Hepatitis and Liver Disease*, p.83-86, 1988-Alan R.Liss, Inc). Din lucrarea anterioară a devenit clar că sunt candidați posibili pentru vaccin atât HAV imunologic inactivat cât și atenuat. Totuși, este necesar un procedeu pe scară comercială reproductibil pentru obținerea antigenului de puritate înaltă dacă se dorește un vaccin HAV sigur și accesibil comercial, pentru utilizare la om.

Se cunosc diferite metode pentru cultura HAV în vederea producerii vaccinului. Astfel, Provost ș.a. (**US 5 021 348**) au descris un procedeu în care, într-o metodă preferată, o cultură de celule MRC-5 s-a infectat cu HAV. Conform descrierii, virusul și celulele s-au crescut conform unei metode convenționale într-un monostrat. În **US 4 783 407**, HAV s-a crescut în celule Vero (un tip de celule de rinichi de primat). În **US 4 301 209** s-a descris producerea de HAV cu titru ridicat într-o unitate capilară cu fibre cu interior gol. În **US 4 412 002** s-a descris un procedeu în care HAV s-a izolat din celule infectate persistent. În **EP 0 302 692** este prezentată cultura HAV în sticle rotative. În toate aceste sisteme, obținerea pe scară largă a HAV necesar pentru obținerea comercială nu a fost ușoară sau a fost limitată sever de cantitatea de suprafață accesibilă pentru fâșia celulară pentru infectarea cu HAV.

În 1984, Windel ș.a. au publicat propagarea hepatitei A tip sălbatic într-o linie de celule de rinichi de fetus de maimuță rhesus (FRh-K) crescute pe micropurtători CYTODEX 3 la 37°C (Windell, A ș.a., "A Microcarrier Cell Culture System for Large Scale Production of Hepatitis A Virus", J. Of Virological, Methods, Vol. 8, 63-71, 1984). Nu s-a menționat ștergerea celulelor sau agregarea micropurtătorului folosind micropurtători ca suprafața de creștere pentru celulele FRh-K. Deoarece același sistem micropurtător a fost găsit de Junker ș.a. ca neadecvat pentru producerea virusului atenuat în MRC-5, aceste sisteme de cultură sunt, în mod clar, foarte diferite. De aceea, linia de celule diploide umane MRC-5, care este preferată liniei de celule FRh-K obținută de la maimuțe pentru producerea unui vaccin uman nu poate fi cultivată cu succes pentru producerea vaccinului hepatitei A folosind procedeul descris de Widel, datorită tendinței celulelor MRC-5 de a forma agregate ale micropurtătorului. Deoarece metodologia descrisă de Widel este limitată la celulele FRh-K la care nu s-a menționat agregarea și ștergerea celulei, nu se cunoaște din această lucrare cum pot fi depășite aceste probleme atunci când se folosesc celule MRC-5.

Agregarea celulelor în cultură de micropurtător-celulă este foarte obișnuită și s-a menționat în publicații de specialitate încă de la mijlocul anilor '70. Cu toate acestea, doar câteva lucrări se ocupă în mod special de această problemă. Câteva publicații relevante sunt discutate în cele ce urmează.

Vairani, ș.a. (1983) au comparat creșterea celulelor diploide și a două linii de celule transformate pe micropurtători înveliți în sticlă cu cea pe micropurtători încărcăți cu DEAE-dextran (Varani, J. ș.a., "Growth of Three Established Cell Lines on Glass Microcarrier" Biotech. And Bioeng., vol. 25, 1359-1372, 1983). Agregarea micropurtătorului s-a produs cu toate cele 3 linii de celule pe micropurtătorii înveliți în sticlă în timp ce pe micropurtătorul dextran s-a agregat numai o singură linie continuă

de celule. Microscopia electronică de baleaj (SEM) ilustrează o diferență dramatică între modul de atașare al celulelor de cele două suprafețe. În culturile cu micropurtător de sticlă, celulele se atașează prin filopodii lungi în timp ce cu micropurtătorii dextran DEAE 140
atașarea are loc de-a lungul întregii muchii a celulei. Această diferență în mecanismul de atașare poate fi un factor important în stabilitatea constatată de noi a sistemului MRC-5/Solohill învelit în sticlă față de sistemele MRC-5/dextran.

Goetghbeur și Hu (1991) au demonstrat că poate fi indusă formarea agregatelor celulare pentru un număr de linii de celule în prezența microsferelor încărcate, cu un 145
diametru de aproximativ 20 microni (micropurtătorii au în mod curent 20-250 μ ; Goetghebeur, S și W.S. Hu, "*Cultivation of Anchorage-Dependent Animal Cells Microsphere-Induced Aggregate Culture*", Appl. Microbial. Biotech., vol.34, 735-741, 1991). Două linii de celule transformate crescute în acest mod s-au găsit ca populații multistrat și nu disperate. S-a crescut, ca agregate, și o linie de celule diploid, pe aceste 150
sfere, dar forma celulei a fost neregulată, vezi **US 5 114 855**. Deoarece sferele folosite în lucrările lui Hu sunt mult mai mici decât micropurtătorii convenționali, formarea agregatului descris în prezenta invenție nu intră în domeniul acoperit de brevetul lui Hu. Este improbabil ca o reducere a intervalului din brevetul lui Hu să fie aplicabilă pentru 155
obținerea hepatitei A.

Borys și Papoutsakis (1992) au investigat căile de inhibare a formării agregatelor celulare pe celule ovariene K1 de hamster chinezesc crescute pe micropurtători CYTODEX 3 (Borys, M. C., și Papoutsakis, "*Formation of Bridges and Large Cellular Clumps in CHO-cell Microcarrier Culture: Effect of Agitation, Dimethyl Sulfoxide and Calf Serum*", Cytotechnology, vol.8, 237-248, 1992). Accentul în această lucrare s-a pus pe 160
supracreșterea liniilor de celule transformate în timpul culturii pe micropurtător și nu s-a referit la creșterea liniilor de celule diploide ca agregate pe micropurtători. Agitarea mărită reduce agregarea și crește moartea celulelor ca urmare a ruperii punților celulare dintre micropurtători. Studiile noastre, prezentate în invenția de față, cu MRC-5 și micropurtători înveliți în sticlă sunt în concordanță cu aceste rezultate. Am găsit că 165
agitarea reduce viteza de agregare a celulelor MRC-5 în sistemul micropurtător învelit în sticlă și mărește moartea celulelor. Am găsit, de asemenea, că agregarea este un fenomen ireversibil în condițiile de cultură.

Un volum important de lucrări s-a făcut pentru inducerea creșterii ca agregate celulare a liniilor de celule continui. Tolbert ș.a. (1980) au publicat unele rezultate 170
preliminare și au citat un brevet despre "adaptarea liniilor de celule la cultura în suspensie" (Tolbert, W.R., ș.a., "*Cell Aggregate Suspension Culture for Large-Scale Production of Biomolecules*", In Vitro, vol.16(6), 486-490, 1980). Deoarece celulele MRC-5 sunt diploizi umani ei necesită dispersia celulei pentru activitate biologică și de aceea nu sunt verificabili prin această aproximare. 175

Astfel, deși există date referitoare la creșterea celulelor MRC-5 pe micropurtători de sticlă ca agregate celulă-micropurtător și că hepatita A poate fi obținută dintr-o cultură pe micropurtător CYTODEX 3, instabilitatea sistemului celulă MRC-5/micropurtător CYTODEX 3 i-a făcut pe specialiști să creadă că cultura pe micropurtător nu este adaptabilă producerii eficiente de HAV. Este prezentat în invenția 180
de față că există un singur sistem agregat micropurtător stabil care rezolvă problemele menționate anterior în obținerea hepatitei A din celule MRC-5 pe micropurtători. Se prezintă și metodologia integrării procedului de purificare HAV.

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru producerea unui virus într-o cultură agregată micropurtător-celulă care cuprinde reținerea unei populații de celule într-o stare atașată și agregată, pentru producerea unei cantități comerciale de antigen vaccin viral.

Procedeul pentru producerea unui virus într-o cultură agregată micropurtător-celulă care cuprinde reținerea unei populații de celule într-o stare atașată și agregată, fără desprinderea celulelor de micropurtători chiar într-o fază de infectare prelungită, pentru producerea unei cantități de vaccin antigen viral, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că el cuprinde etapele:

a) prepararea micropurtătorilor înveliți în sticlă, care constau din învelirea unor bile de polistiren de mărime și densitate predeterminate, învelite într-un strat subțire de sticlă cu densitatea de 2,4 g/ml, preferabil micropurtători de polistiren înveliți în sticlă și collagen, prin hidratarea, sterilizarea și echilibrarea respectivilor micropurtători într-un mediu de cultură, într-un bioreactor adecvat pentru cultivarea celulelor susceptibile la infectare cu un virus;

b) inocularea celulelor într-un mediu de cultură adecvat, la o concentrație suficientă pentru a realiza o atașare uniformă a celulelor la micropurtători, astfel încât fiecare micropurtător să aibe 1...10 celule/micropurtător, preferabil 5...10 celule/micropurtător, folosind o viteză de agitare egală cu viteza de realizare a unei suspensii, care este viteza minimă de agitare necesară realizării unei condiții în care nici un purtător nu stă mai mult de aproximativ 1 s pe fundul bioreactorului cu agitare, la un pH de 7,6...7,9;

c) creșterea celulelor inoculate și atașate în faza logaritmică târzie sau la cea staționară incipientă cu un control al pH-ului și cu completarea mediului suficient pentru a asigura nutriția adecvată a celulelor și controlul mărimii agregatului și o viteză de agitare suficient de lentă pentru a permite formarea eficientă a agregatului micropurtător-celulă, dar suficient de rapid pentru a menține toți micropurtătorii în suspensie, timp de aproximativ 6 zile;

d) infectarea agregatului micropurtător-celulă în faza logaritmică târzie sau staționară incipientă cu virus, folosind un stoc de virus infecțios pentru infectarea celulelor la multiplicitate de infectare, de aproximativ 0,05...1, de preferință 0,1. Perfuzia se stopează 2 h, în timpul de infectare pentru a permite atașarea virusului la celule apoi se restabilește perfuzia și creșterea virusului o perioadă de timp ce variază în funcție de tipul virusului, perioadă suficientă pentru obținerea unui randament maxim de virus pentru recoltare;

e) recoltarea și recuperarea virusului din cultura de agregate micropurtător-celulă, unde recoltarea virală cuprinde într-o primă etapă oprirea agitării și celulele infectate cu virus atașate la micropurtători sedimentează sub acțiunea gravitației.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- creșterea randamentului;
- condițiile tehnice de aplicare a procedurii sunt ușor de realizat.

Producerea hepatitei A în celulele MRC-5 s-a dovedit a fi problematică, datorită desprinderii celulelor de pe micropurtător în timpul perioadei de infecție. Utilizarea sistemului micropurtător învelit în sticlă și metodologia descrisă rezolvă această problemă prin crearea unui agregat micropurtător-celulă stabil capabil de a menține celulele în stare viabilă pentru obținerea în condiții de maxim în cultură cu micropurtător. Procedeul

este aplicabil la obținerea altor virusi în care poate fi mărită productivitatea virusului prin crearea unor culturi stabile, în timpul unei perioade prelungite de infecție. Experiențele cu CYTODEX 3, un microportător cu înveliș de collagen este în concordanță cu rezultatele care arată că în respectivul sistem formarea agregatelor a fost neregulată și producția celulelor a fost instabilă la intrarea în faza staționară. În contrast cu cele de mai sus, am descoperit un procedeu pe bază de microportător învelit în sticlă care susține cultura de celulă timp îndelungat. S-a elaborat, de asemenea, o metodă de rupere a agregatelor microportător și de lizare a celulelor cu un sistem tampon detergent. Nucleele rămân intacte în timpul acestui procedeu astfel că ele pot fi filtrate înaintea de începerea procesului de purificare. Lizatul este apoi supus prelucrării în aval, conform procedurilor de purificare cunoscute a virusilor. Aplicațiile acestui procedeu includ obținerea oricărui virus care poate fi propagat într-o cultură de microportător agregat și recuperat din bioreactor. Celulele dependente de ancorare care pot forma culturi agregate includ MRC-5, Vero și fibroblaste de embrion de pui. Virusii care pot fi propagați în aceste celule gazdă includ, dar nu se limitează la hepatita A, varicela, pojar, hion, rubeolă, poliovirusul, virusul Herpes și Rotavirusul.

În această lucrare s-a demonstrat atenuarea HAV printr-o cultură *in vitro*. În plus, s-a demonstrat prin treceri repetate *in vitro*, că culturile HAV devin mai productive și viteza de replicare s-a accelerat pe măsură ce virusul s-a adaptat la celulele cultivate.

Procedeu oferă o utilizare a avantajelor dovedite pe scară comercială a tehnologiei microportător pentru creșterea celulei în producerea vaccinurilor virale, cum ar fi hepatita A, care necesită timpi de cultură prelungiți. Aplicarea cu succes a tehnologiei microportător pentru producerea hepatitei A sau a altor produși în care cultivarea se extinde în faza staționară se datorează selecției adecvate a sistemului microportător-celulă care produce agregate care asigură microambianța pentru viabilitatea prelungită a celulei și formarea produsului. Formarea agregatelor, așa cum se descrie în prezenta invenție, protejează celulele de forfecarea generată de suspendarea microportătorilor. Agregatele au aproximativ 50...60% spațiu gol care asigură transportul prin convecție a agenților nutritivi prin agregat și micșorează densitatea agregatului pentru o mai ușoară suspendare a particulelor. Formarea agregatului asigură, de asemenea, contact apropiat celulă la celulă, creșterea dispersiei infecțiilor virale celulă-celulă și asigură contacte de tip țesut pentru formarea produsului.

Invenția se referă la un procedeu pentru replicarea și creșterea virusilor într-o cultură agregat microportător-celulă. Aplicarea pentru vaccinuri a acestui procedeu include producerea oricărui virus care poate fi propagat într-o cultură agregat microportător-celulă și recuperarea din bioreactor. Celulele dependente de ancorare care pot forma culturi agregate includ, dar nu se limitează la MRC-5, W 138, Vero și fibroblaste de embrion de pui. Virusii care pot fi propagați, în aceste celule gazdă, includ dar nu se limitează la hepatita A, pojar, oreion, rubeolă, poliovirus, virusul herpesului și Rotavirusul. Conform procedurii, celulele se cresc la o densitate optimă pe microportători înveliți și se infectează cu virus. Conform unei realizări a prezentei invenții, culturile se perfuzează cu mediu în etapele de creștere a celulelor și de infecție cu virus. La sfârșitul infectării se recoltează microportătorii. Virusul produs este colectat fie din supernatant, fie din celulele lizate. În cazul virusilor asociați celulei care nu sunt eliberați în mediu sau virusii care necesită etape suplimentare pentru eliberarea cu randament satisfăcător (cum ar fi congelare /decongelare sau forfecarea fluidului) se poate folosi

metoda de recoltare descrisă în prezenta invenție pentru eliberarea virusului din culturile agregate micropurtător-celulă. Recoltarea poate implica forfecarea fluidului sau forfecarea fluidului cuplată cu un detergent pentru a permeabiliza celulele.

Celulele MRC-5 perfuzate cultivate pe micropurtători înveliți în sticlă și infectați cu virusul hepatitei A exemplifică procedeul prezentei invenții. Un element important în producerea virusilor cu micropurtător perfuzată este stabilitatea populației de celule în procesul de infectare. Observația aceasta este deosebit de importantă pentru virusii cu creștere lentă cum ar fi virusul hepatitei A (HAV). În producerea HAV, celulele preferate sunt MRC-5, deși se pot folosi celule similare cum ar fi W138 sau VERO, care sunt acceptabile pentru producerea vaccinului uman. În cazul culturii HAV și MRC-5, populația de celule trebuie să rămână stabilă în timpul procesului de infectare de 21 zile. În timpul acestei perioade, celulele sunt în fază staționară.

În studiile de selectare a micropurtătorilor efectuate pe micropurtători din diferite surse ca Pharmacia (CYTODEX 1,2 &3), Solohill Laboratories (învelite în sticlă și colagen), Mat Tek (Plastek) și Mitsubishi Kasei (Diacarrier) s-a descoperit că numai bilele de polistiren învelite în sticlă Solohill dau o cultură stabilă în faza staționară. În acest sistem, celulele MRC-5 cresc în agregate micropurtător care își măresc dimensiunea pe măsură ce cultura se desfășoară. În selectarea diferitelor sisteme micropurtător, pentru aplicarea comercială, este uzual să se selecteze tipurile de micropurtător, care produc agregare semnificativă a liniei de celule folosite. Creșterea agitării, reducerea concentrației de calciu și reducerea concentrației serului sunt metode obișnuite folosite pentru minimizarea sau eliminarea agregării. În sistemul MRC-5, s-a descoperit că prin tehnici de cultivare adecvate, sistemul micropurtător, învelit în sticlă formează o structură agregat cu celulele MRC-5, care este un ambient ideal pentru propagarea virusilor pentru producerea vaccinului. Agregatul se formează prin punți celulare, prin intermediul contactului celulă-celulă. Pe măsură ce numărul de micropurtători crește, celulele cresc în spațiul gol furnizând o morfologie de creștere similară țesutului. Spațiul gol este de 50 sau 60 % din volumul agregatului, așa cum este ilustrat în fig. 19, în timp ce masa de celule ocupă numai 1...2% din acest spațiu. De aceea, spre deosebire de sistemele bioreactor sau de metodele de imobilizare care implică limitări ale difuziei în masa de celule, celulele sunt distribuite în agregat cu suficient spațiu gol pentru transportul prin convecție al agenților nutritivi și a produsului prin bile. Agregatul este rezistent la variațiile de pH și EDTA la concentrații până la 1 mM ceea ce indică că legăturile receptorului, care sunt probabil implicate în formarea agregatului, nu sunt necesare pentru menținerea structurii agregatului. Deoarece agregatele pot fi disociate complet prin tripsinizare, structura agregatului este, cel mai probabil, menținută prin proteinele matricei extracelulare secretate de celule. Alte sisteme MRC-5/micropurtător formează agregate care nu au stabilitatea celui obținut cu micropurtătorii înveliți în sticlă și descris în prezenta invenție. De aceea, selectarea micropurtătorilor înveliți în sticlă pentru cultivarea celulelor are ca rezultat crearea unei structuri agregat stabile pentru propagarea virusilor în producerea vaccinului.

Odată ales micropurtătorul învelit în sticlă pentru creșterea celulelor pe baza stabilității în faza de infecție, urmează folosirea condițiilor adecvate de cultivare pentru formarea agregatului uniform. Fig. 16-18 ilustrează formarea agregatului prin metodologia descrisă în prezenta invenție. Formarea unui agregat predeterminat și uniform este importantă pentru alegerea unui astfel de sistem în obținerea pe scară

comercială a vaccinului viral. În primul rând, atașarea celulelor trebuie să fie uniformă pe populația de micropurtător, deoarece agregarea se produce prin interacții celulă-celulă și nu prin interacții celulă-micropurtător. Aceasta se cunoaște din aceea că bilele care nu au atașate celule rămân ca atare în timpul cultivării în timp ce agregarea are loc cu micropurtători care au celulele atașate. În condiții de atașare adecvate, toți micropurtătorii au celule atașate și astfel toți se unesc pentru a forma agregate cum se ilustrează în Fig. 20. Aceasta se realizează prin inocularea a mai mult de 5 celule per bilă ceea ce este cunoscut în practica cu micropurtători. Procedeele de tripsinizare, agitare, pH-ul, temperatura și concentrația serică joacă, de asemenea, un rol în atașarea uniformă. Creșterea mărimii agregatului funcție de creșterea celulei în agregat este ilustrată în fig.20. Creșterea agregatelor în cultură este influențată de condițiile hidrodinamice date de agitare folosită. RPM trebuie menținute la sau puțin peste viteza de agitare critică care asigură suspendarea "off-bottom", adică acea viteză de agitare care corespunde situației în care nici un micropurtător nu rămâne staționar pe fund mai mult de o secundă.

Agitatorul cu paleți trebuie să fie aproximativ jumătate din diametrul vasului sau mai mare pentru a minimiza RPM cerută și a maximiza amestecarea șarjei. Agitatoare mai mici crează zone de forfecare înaltă lângă agitator, care poate rupe punțile celulare reducând agregarea și viabilitatea celulelor. Culturile nesănătoase măresc dimensiunea agregatului. Acest fapt se datorează eliberării ADN în timpul lizei celulelor și care acționează ca mediator pentru creșterea agregării. Folosirea unei strategii de alimentare (completarea mediului), care menține viabilitatea celulei, minimizează agregarea în continuare în faza staționată.

Suspendarea "off-bottom" critică pentru agregate este mai mică decât cea a micropurtătorilor singolari și care nu este de așteptat datorită dimensiunii mai mari a agregatului. Motivul se datorează densității mai mici a agregatului deoarece volumul gol (umplut cu mediu) este 50...60% din volumul agregatului și probabil și datorită hidrodinamicii de suspendare a agregatului prin disiparea energiei pe suprafața heterogenă. Agregatele, totuși, se sedimentează mult mai rapid decât micropurtătorii singolari. Aceste proprietăți sunt avantajoase pentru prelucrarea la scară comercială. Astfel, s-a descoperit de către autorii prezentei invenții, că agregatele celulare departe de a fi nedorite, cum s-a crezut anterior, conferă ambient stabil pentru celulele din faza staționară și pentru infectarea virală și creștere. Micropurtătorii de sticlă Solohill sunt formați din bile de polistiren de mărime și densitate predeterminate, învelite cu un strat subțire de sticlă, conform unui procedeu de obținere brevetat de Solohill Labs. Inc. (**US 4 028 045, 4 448 884 și 4 564 532**). Deoarece densitatea sticlei este de 2,4 g/ml, este necesar să se învelescă micropurtătorul cu densitate joasă pentru a asigura o suprafață de sticlă de densitate joasă (densitatea de 1,02 până la 1,04 g/ml). O densitate a micropurtătorului puțin peste densitatea mediului fluid este critică pentru minimizarea forfecării celulelor atunci când micropurtătorii sunt suspendați într-un vas cu agitare. Astfel, orice micropurtător învelit în sticlă care prezintă această proprietate poate fi folosit în procedeul conform invenției și micropurtătorii de sticlă Solohill reprezintă numai un exemplu accesibil comercial. Micropurtătorii de sticlă Solohill au fost utilizați pentru creșterea numărului de linii de celule dependente de ancorare incluzând celulele VERO (rinichi de maimuță), CEF (fibroblaste de embrion de pui), BHK (rinichi de hamster), MRC-5 (fibroblaste diploide de plămân de embrion uman), HFF (fibroblaste de

prepuț uman) și MDBK (rinichi de bovine Mardin-Darby). Prin aplicarea metodei descrise în prezenta invenție, toate aceste tipuri de celule pot fi folosite în culturi de celule agregate pentru a produce viruși care pot infecta și crește în aceste celule. Substratul de sticlă duce la o morfologie de atașare diferită decât cea pe micropurători CYTODEX de la Pharmacia LKB Biotechnology (Varani, j., ș.a., Substrate-dependent differences in growth and biological properties of fibroblasts and epithelial cells grown in microcarrier culture, j. Biol.Stand. Vol 13, pag. 67-76, 1985). Aceste diferențe combinate cu condiții de cultivare adecvate, prezentate în invenția de față, s-au folosit pentru a induce formarea agregatelor stabile pentru producerea vaccinului viral.

Într-o realizare a prezentei invenții, pentru ilustrarea acesteia, virusul hepatitei A(HAV) pasajul 28(P28) a tulpinii CR 326F s-a folosit pentru infectarea celulelor MRC-5 crescute pe micropurători, în scop ilustrativ și materialul s-a cultivat la pasajul 29(p29). P28CR326F este o tulpină HAV atenuată. Sunt cuprinse în prezenta invenție și alte tulpini și/sau serotipuri de HAV, inclusiv tulpinile HAV care pot fi atenuate prin tehnici convenționale cunoscute în domeniu. Alte linii adecvate de celule, pentru propagarea HAV, includ celulele Vero, WI-38 și FRhK6. Acestea și alte sisteme pentru propagarea HAV în culturi de celule sunt discutate, în Garety, R.J."Active Immunization Against Hepatitis A", în Garety, R.J. (Ed) Hepatitis A Academic Press 1984, pag.263-276; și Ticehurst, J. R., Seminars in Liver Disease 6.46-55(1986). În principiu, orice linie de celule, cum ar fi orice linie de celule fibroblaste diploide umane poate servi ca celulă gazdă pentru HAV cu condiția ca să fie susceptibilă la infectarea cu HAV. Linia de celule preferată este MRC-5. Este evident pentru specialiștii în domeniu că sfera de protecție a prezentei invenții cuprinde, pe lângă pasajul 18,P18 sau P28 a tulpinii CR 326F a HAV orice alt variant de tulpină HAV, atenuată sau virulentă cât și alți viruși care pot fi cultivați pe celule dependente de ancorare. Variantele sau tulpinile atenuate pot fi izolate prin pasaje seriale în celule animale sau prin alte metode. Vezi, de exemplu, Provost, P.J. ș.a.,J. Med.Virol.20, 165(1986); **US 4 164 566** și **5 021 348** pentru detalii privind atenuarea. Metoda de cultură a prezentei invenții este ușor și rapid adaptabilă la tulpinile atenuate sau virulente de HAV.

Într-o realizare preferată a prezentei invenții, celulele MRC-5 sunt infectate prin multiplicitatea infectării (MOI) HAV suficientă pentru a realiza infectarea eficientă a culturii de celule. O valoare MOI de aproximativ 0,05...1 este acceptabilă. Sămânța stoc este generată, în mod convenabil, prin folosirea HAV din fracția supernatantă a unei culturi staționare infectate cu HAV și incubată aproximativ 28 de zile. HAV este lăsat să se relice în cultură staționară până la un vârf al producției virusului. Alte metode cum ar fi cultura micropurătorului sau Costar Cube pot fi folosite pentru generarea seminței stoc. Mediul de cultură al celulei poate fi orice mediu care permite creșterea activă a celulelor MRC-5 și replicarea HAV.

Procedeul din prezenta invenție cuprinde următoarele etape și faze:

Etapa 1: Prepararea micropurătorului.

Un bioreactor adecvat pentru cultura suspensiilor agitate de celule mamare, este încărcat cu bile de micropurător învelite în sticlă, uscate. Bilele sunt suspendate în apă de calitate WF1 sterilizată în situ. După sterilizare, apa se scurge și se adaugă în reactor mediul steril adecvat pentru cultura celulelor alese pentru virusul care urmează a fi crescut.Pentru a asigura înlocuirea completă a apei și echilibrarea bilelor, mediul se

înlocuiește, de preferință, de 3 ori. Pentru cultura HAV, în această etapă este acceptabilă folosirea mediului Williams Media E (fără ser). Se dorește o concentrație de aproximativ 20 g/l până la 75 g/l micropurtător/mediu, de preferință aproximativ 40 g/l până la 60 g/l. 415

Etapă 2. Inocularea celulei.

După echilibrarea micropurtătorilor în mediu și la temperatura dorită (30...37°C), celulele, de preferință în faza de creștere logaritmică târzie, sunt însămânțate în vasul de cultură. Pentru lucrările la scară mică, sunt convenabile Nunc Cell Factories (NCFs) care sunt unități mici multilamelare de cultură a celulelor, în care celulele pot fi crescute în monostrat conform instrucțiunilor producătorului. Concentrația celulei de inoculare este de 5...10 celule per bilă de micropurtător, care corespunde la aproximativ 100.000(1×10^5) celule/ml. Pentru o cultură micropurtător mică de aproximativ 600 ml, sunt necesare aproximativ 6×10^7 celule. Dintr-un NCF cu 10 straturi pot fi recoltate 5×10^8 celule, folosind tripsina. Aceste rapoarte sunt ușor de mărit pentru un inocul de cultură micropurtător mai mare prin folosirea de NCF-uri suplimentare sau dacă este necesar, o cultură micropurtător pentru însămânțare. După recoltarea celulelor cu tripsină și neutralizare cu mediu conținând ser ele sunt peletizate prin centrifugare la viteză mică și resuspendate în mediul conținând ser de vițel suplimentat cu 10% fier. Prin folosirea unei părți de inocul o celulă la 9 părți micropurtător/mediu de cultură fără ser de atinge o concentrație finală de ser ce vițel suplimentat cu 1% fier. Acest raport poate fi modificat prin modificarea concentrației de ser adăugat la inoculul resuspendat sau prin modificarea rapoartelor inocul/bioreactor. O atașare uniformă a celulei se obține la o concentrație a serului de 1% și pH 7,6...7,9. 420 425 430 435

După inoculare, celulele sunt lăsate să se atașeze de micropurtători timp de aproximativ 3 h (deși sunt acceptabile durate mai lungi sau mai scurte, durata de atașare nefiind critică), folosind o viteză de agitare suficientă pentru realizarea unei suspensii "off-bottom" critică, care este viteza de agitare (rotații per minut ale impellerului, rpm) necesară realizării unei condiții în care nici un micropurtător nu stă mai mult de aproximativ 1 s, la fundul bioreactorului cu agitare. Aceasta se realizează prin controlul și modificarea adecvată a vitezei impeller-ului și este la îndemâna specialiștilor în domeniu. 440

Etapă 3. Perfuzia culturii de celule în faza logaritmică târzie

După ce s-a lăsat suficient timp pentru atașarea celulelor de micropurtător, mediul se suplimentează cu ser pentru creșterea celulei. Pentru cultura de celule MRC-5 pentru producerea de HAV se preferă adăugarea unei cantități suficiente de ser de vițel suplimentat cu fier pentru a atinge o concentrație a serului de 10%. Concentrația serului poate varia în funcție de formulările mediului, după cum este ușor de apreciat de către specialiștii în domeniu. 445 450

După 24 h de la atașarea celulelor și echilibrarea cu orice condiții cerute de ser, se realizează un sistem de perfuzie intrare/ieșire prin care mediul este îndepărtat și completat la un debit de aproximativ 0,7 la aproximativ 2, de preferință aproximativ 1,3 volume de mediu per zi. Monitorizarea glucozei, lactatului și amoniacului dă posibilitatea eliminării fluctuațiilor de pH și a epuizării agentului nutritiv. Specialiștilor le sunt familiare tehnicile de monitorizare a acestor parametri cât și metodele de stabilizare a lor. De exemplu, dacă rezerva de glucoză devine limitată se mărește viteza de perfuzie. Dacă pH-ul este prea acid, ca urmare a producerii și acumulării de lactat, această tendință 455

nedorită se controlează prin adăugare de alcalii slabe sau prin creșterea vitezei de perfuzie. În spațiul din capul reactorului se introduce aer filtrat steril și la o scară mică se poate folosi și un impeller de suprafață pentru a crește transferul de gaz prin ruperea tensiunii de suprafață la interfața aer-lichid.

După realizarea perfuziei, celulele sunt lăsate să crească până la faza exponențială finală (logaritmică) sau până la faza staționarăincipientă. În mod uzual, cu celule MRC-5 în mediu Williams Media E suplimentat cu ser de vițel cu 10% fier, această perioadă este de aproximativ 6 zile. Deși durata pentru creșterea celulelor nu este critică, se lasă suficient timp pentru realizarea unei bune creșteri a celulelor și a agregării.

Etapă 4: Infectarea

În mod uzual, virusul infecțios de însămânțare este stocat congelat. Se folosește un stoc viral pentru infectarea celulelor la o multiplicitate de infectare (MOI) de aproximativ 0,05 la aproximativ 1, de preferință aproximativ 0,1. În timpul perioadei de infectare se stopează perfuzia aproximativ 2 h pentru a permite atașarea virusului la celule. După ce s-a lăsat suficient timp pentru o atașare eficientă a virusului la celule, se restabilește perfuzia. Se pot lua probe de cultură săptămânal și după un timp suficient, în funcție de virus, se face recoltarea întregului bioreactor. Pentru sistemul descris, creșterea HAV pe celule MRC-5, vârful de producție al HAV se obține la aproximativ 14-28 de zile după infectare.

Etapă 5: Recolta virală

Ca o primă etapă a recoltării se oprește agitarea și celulele infectate de virus, atașate la micropurtători, se lasă sub acțiunea gravitației. La scară de producție se preferă metoda de spălare a agregatelor, cum ar fi folosirea unui dispozitiv de filtrare. Se îndepărtează supernatantul culturii. Pentru HAV, masa de virus se găsește în celule și trebuie eliberată prin lizarea celulelor. Acesta se realizează prin ruperea agregatelor celulare într-o soluție de recoltare. De preferință, soluția de recoltare conține un component eficient care face celulele permeabile la HAV. Asemenea componente sunt cunoscute în domeniu. De preferință, se furnizează un detergent cum ar fi Triton X-100, NP-40 sau un echivalent al acestora, la concentrațiile eficiente cele mai mici posibile, pentru a ușura îndepărtarea ulterioară. Pentru acest scop s-a găsit a fi accesibil detergentul TRITON-X100 la o concentrație de aproximativ 0,1% într-un tampon adecvat, cum ar fi 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM $MgCl_2$.

O metodă eficientă pentru ruperea agregatelor constă în trecerea micropurtătorilor printr-o buclă de reciclă în care sunt o serie de orificii cu diametru descrescător. Se folosesc diametre de 1/16'', apoi 3/64'', apoi 1/32'' și conținutul bioreactorului este reciclat la un debit de aproximativ 500-1000 ml/min până toate agregatele se rup (controlul microscopic al probelor).

La efectuarea acestei etape, forfecarea fluidului necesară pentru ruperea agregatelor se realizează din dimensiunea adecvată a diametrelor orificiului, pentru debit mărit în timpul recoltării, astfel încât viteza lineară să fie aceeași. Deoarece viteza lineară = debit/aria orificiului, condițiile pentru ruperea agregatelor pot fi obținute prin asigurarea vitezelor lineare în intervalul 1010 cm/min-2020 cm/min, indiferent de scară. Diametrul cel mai mic (1/32'', aproximativ 0,8 mm) este de aproximativ 5 ori diametrul unui micropurtător singular (aproximativ 150 μm). La scara de producție mai mare se mărește debitul. Acesta este un diametru suficient de îngust pentru a obține

o rupere eficientă a agregatului, dar și suficient de larg încât să fie minimizată ancrasarea, în special după treceri prin orificii mai largi. Se pot folosi și alte tehnici, cum ar fi sonicarea, dar fără a se limita la aceasta. Suspensia de micropurtător rezultată este lăsată să se sedimenteze și depunerea celulară conținând virusul este decantată și stocată. Se încarcă bioreactorul cu detergent suplimentar conținând tampon și conținutul bioreactorului este recirculat printr-o buclă exterioară și orificii pentru recuperarea virusului captat. Din nou se lasă suspensia să se sedimenteze și supernatantul se combină cu supernatantul stocat. În această etapă, o bună estimare a numărului de celule recoltate este obținută prin numărarea nucleelor din supernatant cu un hemacitometru. Se filtrează supernatantul printr-un filtru de 5 μ m pentru îndepărtarea nucleelor și apoi se prelucreează în modul dorit. Un procedeu adecvat purificării HAV este prezentat în continuare.

Etapă 6. Purificarea HAV

HAV produs în cultura conform prezentei invenții poate fi purificat prin metode cunoscute specialiștilor în domeniu sau poate fi folosit direct ca vaccin dacă se atenuază. Se poate inactiva prin metodele cunoscute în domeniu, în primul rând prin inactivarea cu formol. Pentru detalii privind aceste etape cunoscute în domeniu vezi **US 4 164 566; 5 021 348; EP 0 302 692** și **USSN 07/926 876**, înregistrat în 8/10/92.

Etapă 7. Inactivarea și formularea vaccinului

Pentru prepararea capsidelor HAV purificate, pentru utilizare în vaccin sunt necesare sau pot fi necesare etape de prelucrare suplimentare cu caracter convențional și cunoscut. De exemplu, tratarea cu formol, filtrarea sterilă și adsorbția pe purtător sau adjuvanți sunt etape de bază tipice pentru prepararea vaccinului inadecvat cu formol. Vezi, de exemplu, Provost, P.J. ș.a., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160, 213 (1979); Provost, P. J. ș. Aș J. Med. Virol. 19, 23 (1986). HAV poate fi inactivat termic, prin modificări de pH, iradiere, tratare cu solvenți organici, cum ar fi formolul sau paraformaldehida. În mod uzual, inactivarea HAV se face la un raport de formol de 1/4000. HAV inactivat este apoi adsorbit sau coprecipitat cu hidroxid de aluminiu pentru a asigura efectul de adjuvant și purtător. Eficacitatea vaccinului HAV inactivat a fost prezentată în *New England J. of Med.* 327: 453-457 (1992).

Pentru compararea procedurii prezentat cu procedeul de obținere a virusului în cultură de celule în monostrat s-au plantat celule MRC-5 în două bioreactoare Costar Cube de capacitate mare și 3 culturi cu micropurtător. Viteza de perfuzie pentru culturile cu micropurtător au fost de 0,7 și 1,5 volume bioreactor/zi, care include volumele de 1,3 bioreactor per zi în Costar Cube. Încărcătura de micropurtător a fost aleasă pentru a obține o densitate de celule similară producției bioreactoarelor Costar Cube, astfel încât să se poată face o comparație directă între cele două bioreactoare. Culturile cu micropurtători au fost stabile pe durata perioadei de infectare și au avut viteze metabolice similare cu bioreactorul Costar Cube, în ceea ce privește glucoza și lactatul. Lizatul micropurtător și un litru de lizat Costar Cube s-au purificat cu eficiențe similare și ușurință a manipulării folosind un proces în aval adaptat pentru purificarea HAV. Producerea hepatitei A a fost aproximativ jumătate din cea prin procedeul Costar Cube, per celulă, ceea ce indică necesitatea optimizării procesului de infectare în cultura cu micropurtător. Productivitate volumetrică per litru de bioreactor a fost aproximativ

550 jumătate din cea a Costar Cube; totuși, cu această metodă există potențial de a dubla
densitatea celulei și deci, productivitatea volumetrică prin creșterea încărcării
micropurtătorului. Populația de celule MRC-5 s-a menținut în agregatele de micropurtător
stabile fără nici o pierdere de celule în timpul procesului de infectare de 21 zile. Toate
555 celelalte tipuri de micropurtători testate au indicat desprinderea populației MRC-5 de
micropurtători după faza de creștere și au fost astfel neadecvate pentru producerea
virusului. S-a obținut o densitate finală de celule în culturile micropurtător de $2,2\text{--}2,4 \times 10^6$
celule/ml care este similară densității estimate de $2,6 \times 10^6$ celule/ml obținute în Costar
Cube-uri.

Viteza consumului de glucoză și viteza de formare a lactatului în culturile cu
560 micropurtător perfuzate au fost similare celor obținute în Costar Cube-uri perfuzate. În
ambele sisteme s-a observat o conversie stereochemică a glucozei în lactat. Obținerea
amoniacului, un produs secundar al metabolismului glutaminei a fost aprox. jumătate în
sistemul cu micropurtător în care s-a alimentat 2mM glutamină în loc de 4 mM
glutamină alimentată în Costar Cube. La 21 de zile după infectare cultura cu
565 micropurtători a produs în medie 112 unități per milion celule și 258 unități per litru de
volum de bioreactor. Aceste randamente reprezintă 40...50% și respectiv 38% din cele
obținute în Costar Cube. Curba creșterii virusului a indicat că peste 50% din virus a fost
produs până în ziua 14 după care a fost o scădere substanțială în creșterea virusului
între ziua a 14 și 21. Nu este clar dacă scăderea randamentului celular se datorează
570 faptului că nu toate celulele participă la infectare, productivității mai mici per celulă
infectată sau trecerii virusului în mediu înainte de recoltare. Agregatele au fost stabile
la 2 spălări saline chiar la adăugarea a 0,1% triton. Agregatele s-au rupt prin forfecarea
controlată a fluidului printr-o serie de orificii montate într-o buclă de reciclu a reactorului.
S-au eliberat nucleeele (și în acest fel s-au cuantificat) și s-au îndepărtat prin filtrare pe un
575 filtru Durapore de 5 μm care permite prelucrarea lizatului conform unui procedeu de
purificare. SDS Page a materialului extras cu solvent a prezentat 3 benzi caracteristice
pentru hepatita A și o a patra bandă la masa moleculară 66 000 care corespunde
probabil serului derivat BSA, care nu s-a îndepărtat complet în timpul spălărilor saline de
recoltare.

580 Unul din cele mai importante aspecte ale prezentei invenții este acela că s-a
demonstrat că celulele MRC-5 pot fi menținute pe micropurtători într-o stare stabilă în
timpul celor trei săptămâni de infectare cu hepatita A pentru obținerea și purificarea
cantitativă a hepatitei A. Stabilitatea sistemului este atribuită proprietății unice a
agregatelor formate în timpul creșterii celulelor MRC-5 pe micropurtători de polistiren
585 înveliți în sticlă.

Datele prezentate pentru o comparație a procedurii cu micropurtător perfuzat
cu procedeul de cultură a celulelor în monostrat la densități celulare și viteze de
perfuzare similare. Indicatorii metabolici, cum ar fi utilizarea glucozei, acumularea
lactatului și raportul molar al acestor viteze arată similaritatea metabolismului MRC-5 în
590 cele două procedee. Purificarea hepatitei A în ambele procedee a fost similară, ceea ce
indică că nu sunt necesare modificări majore în procesul în aval în cazul obținerii virusului
în cultură cu micropurtător.

Producția specifică de virus per celulă în culturile cu micropurtător cu viteză de
perfuzie mică (0,7 vol/zi) a fost cu numai 7% mai mică decât în culturile cu viteză de

perfuzie înaltă (1,5 vol/zi), ceea ce indică că vitezele de perfuzie nu sunt limitative în
 producția virusului. Producția specifică de virus per celulă în culturile cu micropurtător a
 fost aproximativ jumătate din cea obținută cu virus crescut pe monostrat, rezultate
 evaluate din densitatea celulei. Deoarece datele de viteză de perfuzie nu sugerează o
 limitare a agentului nutritiv se poate concluziona fie că toate celulele nu participă în
 infectare, fie că s-a produs virusul dar acesta a difuzat în mediu. În primul caz, se crede
 că viabilitatea este mare în timpul perioadei de infectare, bazat pe măsurători cu Trypan
 blue, în ultima experiență cu șarja realimentată (cazul cel mai defavorabil), și care este
 de 92% în a 21 zi post infectare. Dată fiind productivitatea specifică a virusului per celulă
 în cultura cu micropurtători, creșterea productivității globale poate fi realizată prin
 creșterea densității celulei în bioreactor printr-o încărcare mai mare cu bile. În concluzie,
 sistemul micropurtător agregat are un potențial mare pentru producerea vaccinurilor
 pentru hepatita A și a altor virusi.

În continuare, se prezintă 9 exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig.
 1... 20 care reprezintă:

-fig. 1, densitatea celulei pentru faza de creștere și de recoltare a virusului
 hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill.

-fig. 2, profilul pH pentru culturile perfuzate spinner micropurtător pentru faza de
 creștere și de recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători
 de sticlă Solohill.

-fig. 3, consumul cumulativ de glucoză pentru culturile perfuzate spinner
 micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și
 recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă
 Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 4, producerea cumulativă de lactat pentru culturile perfuzate spinner
 micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și
 recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă
 Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 5, producerea cumulativă de amoniac pentru culturile perfuzate spinner
 micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și
 recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă
 Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 6, profilul consumului de glucoză pentru culturile perfuzate spinner
 micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și
 recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă
 Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 7, profilul producerii lactatului pentru culturile perfuzate spinner micropurtător
 comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și recoltare a virusului
 hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill și respectiv
 suprafețe Costar Cube.

-fig. 8, raportul consumului de glucoză și a producției de lactat pentru culturile
 perfuzate spinner micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza
 de creștere și recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători
 de sticlă Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 9, curba de creștere a virusului hepatitei A pentru culturile perfuzate spinner
 micropurtător pe micropurtătorii de sticlă Solohill.

-fig. 10, SDS Page a virusului hepatitei A extras cu solvent cunoscut în culturi perfuzate spinner micropurtător pe micropurtători de sticlă Solohill.

-fig. 11, profilurile HPSEC pentru lizatul filtrat la 260 nm pentru culturile perfuzate spinner micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 12, profiluri HPSEC la 260 nm a lizatului tratat cu nuclează din culturile perfuzate spinner micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 13, profiluri HPSEC pentru produșii captați din culturile perfuzate spinner micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 14, profiluri HPSEC la 260 nm pentru produsul precipitat PEG din cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 15, profiluri HPSEC pentru lizatul filtrat la 260 nm pentru culturile perfuzate spinner micropurtător comparativ cu cultura de celule monostrat pentru faza de creștere și recoltare a virusului hepatitei A crescut pe celule MRC-5 și micropurtători de sticlă Solohill și respectiv suprafețe Costar Cube.

-fig. 16, agregatele micropurtător după 5 zile în cultura produsă prin metodologia prezentei invenții folosind celule MRC-5 și micropurtători înveliți în sticlă Solohill. Dimensiunile agregatului sunt similare și nu sunt prezenți micropurtători singulari fără celule.

-fig. 17, agregate MRC-5/Solohill micropurtători de sticlă colorat cu fluorescein diacent. Fluorescența verde indică celulele viabile.

-fig. 18, agregarea inițială a sistemului MRC-5/Solohill micropurtător de sticlă în ziua 1 a cultivării. S-a folosit fluorescein diacetat, fluorescența verde este dată de celule viabile.

-fig. 19, % spațiu gol în MRC-5/bile de micropurtător învelite în sticlă este de aproximativ 50% din diametrul agregatului.

-fig. 20, formarea agregatului în timpul creșterii celulelor. Mărimea agregatului crește proporțional cu creșterea numărului de celule per agregat.

Exemplul 1. *Obținerea virusului stoc a hepatitei A pentru însămânțare*

Un procedeu pe scară mare pentru producerea virusului de însămânțare și a celulei implică plantarea monostraturilor de celule MRC-5 în Nunc Cell Factories (NCFs) de 6000 cm². Celulele MRC-5 se cresc în NCF-uri până la confluență. Aceste celule pot fi recoltate și folosite pentru plantare pe micropurtători. Celulele confluențe în NCF se infectează cu virus la o valoare a MOI de aproximativ 0,1. După infectare, celulele se incubează 28 de zile cu înlocuirea săptămânală a mediului conținând 10% v/v de fetus de vițel. Se găsește că concentrațiile mari ale serului, 2-10% v/v permit o producție mai mare de virus decât la nivele joase de 0,5-2% v/v. La sfârșitul acestui ciclu fluidul supernatant conține cantități mari de virus, în acest exemplu 10^{7.3}TCID₅₀ per ml, care se recoltează direct din NCF-uri fără lizarea celulelor și este folosit ca sursă de virus stoc

pentru însămânțare. În acest mod se obțin cantități mari de virus infecțios necesar producției printr-o metodă mai reproductibilă și mai simplă decât în sticle rotative sau baloane sau cu recoltarea mecanică a celulelor.

Exemplul 2. *Producerea hepatitei A într-un sistem micropurtător agregat*

Prezentul exemplu și următorul ilustrează producerea cantitativă a hepatitei A într-o cultură micropurtător, pe scară mică și purificare lizatului printr-o schemă stabilită de purificarea a HAV. Prin modificări adecvate se pot obține alți viruși și tipuri de celule.

Etapă 1: Sistemul spinner micropurtător

Sistemul spinner a fost proiectat pentru a funcționa ca o unitate independentă într-un ansamblu în care eșantionarea, modificările mediului și infectarea se efectuează printr-un sistem închis folosind un dispozitiv cu tubulatură sterilă SCD II. Vasele spinner se fabrică din Bellco cu un volum de lucru de 565 ml și o manta pentru controlul temperaturii. Sistemul de agitare este format dintr-o paletă Bellco modificată la un diametru de 6,6 cm. Diametrul se alege pe baza studiilor de agitare care implică măsurarea vitezelor de agitare a suspensiei "off-bottom" critice (COBSR) și calculul condițiilor hidrodinamice pe baza acestei viteze. Un impeler de suprafață cu lungimea de 4 cm se poziționează la interfața culturii pentru a asigura un transfer de oxigen mărit la densități celulare mai înalte și, de asemenea, de a asista striparea CO₂. Efluentul fără micropurtător se îndepărtează cu un tub metalic cu diametrul interior de 1/2 inch, acoperit cu o sită de 10 μm, poziționat la volumul dorit al bioreactorului folosind un debit cu 50% mai mare decât debitul de intrare a perfuziei.

Prepararea micropurtătorului

Se folosesc pentru acest studiu, micropurtători de polistiren înveliți în sticlă de la Solohill Laboratories Inc. Se alege micropurtătorul cu greutatea specifică cea mai mică 1,02, accesibil de la SOLOHIL, pentru a minimiza energia de suspendare a micropurtătorului. Intervalul de mărimi a fost 150...210 μm. O analiză a mărimii particulelor, efectuată la Solohill, a permis determinarea ariei suprafeței și a numărului de bile, care au fost de 514 cm²/g și respectiv 6,6x10⁵bile/gram. Încărcarea cu micropurtător în experiment a fost de 35,4 g/l

Micropurtătorii se plasează în spinnere de 500 ml cu manta siliconate, se suspendă în apă WF1 și se autoclavează 30 min la 122°C. Micropurtătorii se spală de trei ori cu mediu William E, cu glutamină 2mM, fără ser.

Exemplul 3. *Expansiunea celulei/inocularea spinnerelor (Etapă 2)*

14 NCF se plantează cu celule MRC-5, 12 NCF-uri se recoltează și se folosesc pentru plantarea a 2 bioreactoare Costar Cube. Restul de 2 NCF se recoltează și se folosesc ca inocul pentru spinnerile micropurtător. Celulele se centrifughează 10 min la 300xg și se resuspendă în ser de vițel suplimentat cu 10% fier (FeCS), mediu William E modificat 90% cu 2 mM glutamină. În experiment nu se folosesc antibiotice. Celulele se atașează la aproximativ 8 celule/bilă în 1% FeCS și pH 7,7 și 37°C. În trei h toate celulele se atașează și mediul se aduce la 10% FeCS pentru începerea fazei de creștere.

Conform distribuției Poisson, numai 5 celule/bilă sunt necesare pentru a exista siguranța că cel puțin o celulă se atașează la fiecare bilă prin întâlnirea aleatoare dintre celule și bile. Se găsește că pentru unii purtători în condițiile de atașare specificate mai sus se obțin uneori 5 celule/bilă, unii micropurtători rămân fără celule. Acești micropurtători rămân ca MC singulari în timpul cultivării ceea ce indică că fenomenul de

agregare rezultă din contactul celulă-celulă și nu prin contactul MC-celulă. În acest exemplu raportul celulă/bilă este de 8,2 și toți MC au avut cel puțin o celulă atașată după 3 h (celulele sunt încă strânse și de aceea vizibile la MC opac). Diferența în raportul minim celulă/bilă se poate datora agregării anumitor celule în etapa de plantare, ceea ce duce la o scădere a raportului prevăzut celulă/bilă. Experiențe de rutină permit optimizarea condițiilor de atașare pentru acest sistem.

În acest experiment densitatea celulei la plantare este de $1,56 \times 10^5$ celule/ml ceea ce corespunde la 8600 celule/cm² MC. În ziua a doua se formează agregate mici de 2...5 MC care cresc la 10...30 MC până în ziua a 5-a. Ulterior, unele agregate de 10...30 MC se combină pentru a forma agregate MC 50. Este clar că creșterea celulelor are loc prin intermediul procesului de agregare. Nu a fost prezent în cultură nici un MC singular și creșterea celulei în spațiul gol dintre MC este evidentă. Profilul creșterii celulei, prezentat în -fig. 1, indică faptul că culturile ajung la o densitate a celulei de 2...3 MM celule/ml în ziua a 5-a. Numărul nucleelor în ziua a 6-a este mai mic deoarece agregatele mai mari se comprimă. Deoarece concentrația particulelor descrește de aproximativ 50 ori ca urmare a agregării, cultura se modifică de la opac cu MC singolari la translucid. Astfel, este posibilă monitorizarea desfășurării culturii prin turbiditate. În timpul experienței de 28 de zile nu se observă în efluent celule care plutesc ca urmare a desprinderii acestora. Numărarea nucleelor din recolta bioreactorului, de la sfârșitul experimentului, indică, de asemenea, că cultura este stabilă pe toată durata perioadei de infectare. Agregatele odată formate sunt foarte stabile chiar la valori extreme ale pH-ului, în prezența EDTA și la viteze de agitare înalte. Deoarece agregatele se rup în prezență de tripsină, agregatele sunt probabil stabilizate prin crearea unei matrici extracelulare compusă din colageni secretați de celule.

Exemplul 4. Etapa 3: Perfuzia

Culturile se cresc inițial discontinuu timp de 2 zile folosind mediu din sticle și ser iradiat UV. În ziua a 2-a se inițiază perfuzia folosind mediu în pungi obținut de la JRH cu mediu William E combinat cu FCS. Lotul de pungi este format din pungi de 10 și 20 l, atât mediu William E modificat cât și loturile de ser FeCS neiradiat se acceptă de către Merk pentru utilizare în producție. Se compară înainte și după experiment, creșterea celulelor MRC-5 în baloane T folosind mediu de cultură din pungă suplimentat cu ser și mediu din sticla cu ser iradiat drept control. Glucoza, lactatul și amoniacul se identifică demonstrând o stabilitate de 6 luni pentru amestecul FeCS/mediu de bază, de la data combinării mediului cu serul. În timpul experimentului, mediul se suplimentează cu bicarbonat până la o concentrație finală de 3,7 g/l pentru a menține un pH peste 7,3.

Debitele de perfuzie dorite sunt de 0,7 vol/zi (spinner 1) și 1,5 vol/zi (spinner 2&3), raportate la volumul bioreactorului de 565 ml. Cu toate acestea, microcaseta Watson Marlow Pumps nu asigură un control precis al debitului la o RPM stabilă, în special după deplasarea tubului. Debitele se măsoară periodic și valorile prezentate în continuare se folosesc în calcule. Debitele medii de perfuzie în timpul infectării sunt 0,76, 1,51 și respectiv 1,51 pentru cele trei spinnere. Eficacitatea sistemului este asigurată de rotametre pe linie și tubulatură calibrată mai largă (RPM mai puține). De remarcat că debitele se corectează atunci când se întrerupe perfuzia ca urmare a unor dificultăți apărute la schimbarea pungilor, vezi Tabelul 1.

Debitele de perfuzie măsurate: volume bioreactor/zi				
Vârsta culturii în zile	Spinner#1 volume/zi	Spinner#2 volume/zi	Spinner#3 volume/zi	
2	0,5	1,2	1,2	780
3	0,5	0,6	0,6	
4	0,5	1,2	1,2	
5	0,5	1,2	1,2	
6	0,5	1,2	1,2	
7	0,64	1,84	1,84	785
8	0,7	2,1	2,1	
9	0,7	2,1	2,1	
10	0,7	1,67	1,67	
11	0,7	1,6	1,6	
12	0,7	1,27	1,27	790
13	0,7	1,3	1,3	
14	0,7	1,3	1,3	
15	0,8	1,4	1,4	
16	0,8	1,4	1,4	
17	0,8	1,4	1,4	795
18	0,8	1,4	1,4	
19	0,8	1,4	1,4	
20	0,8	1,4	1,4	
21	0,8	1,4	1,4	
22	0,8	1,4	1,4	800
23	0,8	1,4	1,4	
24	0,8	1,4	1,4	
25	0,9	1,86	1,86	
26	0,8	1,4	1,4	
27	0,8	1,4	1,4	805
28	0,8	1,4	1,4	
Debitul de perfuzie: 1,5 vol/zi=565 ml/24 ore=23,5 ml/h				

pH-ul optim pentru celulele MRC-5 este dat în literatura de specialitate ca fiind 7,7 și la 7,2 se observă o încetare completă a creșterii (Forestell, S. ș.a., *Biotechnol. Bioenerg.* 39:305-313, 1992).

Producția Costar CubeS se controlează la pH de 7,3 pe toată durata cultivării. Deoarece nu există control pH în baloanele spinner, menținerea unui pH peste 7,3 se bazează pe îndepărtarea prin perfuzie a acidului lactic și pe aceea că impelerul de suprafață mărește striparea CO₂ din faza lichidă. Profilul pH din fig. 2 ilustrează scăderea pH-ului în primele 150 h. În momentul respectiv se adaugă bicarbonat de sodiu în următoarea pungă cu mediu pentru a mări concentrația de la 2,2 g/l la 3,7 g/l pentru tamponare suplimentară.

Unul din obiectivele acestui experiment este de a obține o cultură micropurtător cu o densitate similară cu cea estimată pentru creșterea pe scară mare în sistemul de cultură a celulelor în monostrat. Un asemenea sistem utilizează bioreactoare Costar Cube. În continuare, se compară profilele metabolice ale glucozei, lactatului și amoniacului într-un procedeu Costar Cube și cele din procedeul micropurtător conform invenției. Masa de celule determinată în producția Costar Cube ne-infectată este de 1,6x10⁶ celule/ml în ziua de infectare și 3,0x10⁶ după 28 zile. Deoarece viteza consumului de glucoză continuă să crească după timpul de infectare este probabil că și densitatea celulelor să crească tot atunci (se dublează) și această densitate celulară se menține în Costar Cube în restul perioadei de infectare. Densitatea celulară într-un Costar Cube infectat este de așteptat să fie între aceste două densități celulare și este cel mai probabil peste 2x10⁶ celule/ml. Pe baza acestor estimări, concluzionăm că culturile cu micropurtător și bioreactorul Costar Cube sunt în același interval al densității celulare. Debitele de perfuzie pentru culturile cu micropurtător sunt între 0,7 și 1,5 volume bioreactor per zi, interval care cuprinde debitul de 1,3 vol/zi folosit în procedeul de cultură Costar Cube. La densități celulare și debite de perfuzie similare este de așteptat ca profilele metabolice să fie similare pentru cele două procese dacă și metabolismul celulei este similar.

Cantitatea cumulativă de glucoză folosită, lactatul produs și amoniacul produs în cursul infectării sunt ilustrate în fig.3,4 și respectiv 5. Cantitatea cumulativă se calculează din bilanțul masic dat de debitul de perfuzie și curba concentrației în timp. În fig. 3 glucoza cumulativă este dată pentru 3 culturi micropurtător, un reactor Costar Cube reprezentativ și glucoza cumulativă medie din 18 loturi de producție Costar Cube. Diagrama ilustrează că valorile producției Costar Cube sunt între cele ale micropurtătorului la debite de perfuzie mai înalte și mai joase, așa cum se așteaptă în cazul unui metabolism similar. Figura ilustrează, de asemenea, că Costar Cube reprezentativ se comportă similar cu valorile medii Costar Cube cu excepția deplasării de aproximativ 450 h care se datorează probabil unei discontinuități în operația de perfuzie. Profilul lactatului cumulativ prezintă o tendință similară cu acumularea lactatului în procedeul Costar Cube și anume fiind între valorile procedeuului cu micropurtător la debite de perfuzie mai înalte și mai coborâte. Debitul specific de glucoză (mmoli glucoză consumată/l/h), care corespunde pantei glucozei cumulative funcție de timp, crește cu creșterea vitezelor de perfuzie în primele 400 h ale experimentului. Aceasta poate fi un indiciu al diferenței de concentrație a glucozei care afectează viteza cu care este metabolizată glucoza. În fig. 6 și 7 este evidențiată diferența în concentrația de glucoză și lactat în bioreactor între 0,7 vol/zi și 1,5 vol/zi culturi cu micropurtător. Un alt motiv

al acestei diferențe poate fi cel al diferențelor mici între densitatea celulară în bioreactoare. Raportul vitezelor glucozei și lactatului ilustrat în fig. 8 indică o conversie stoechiometrică a glucozei în lactat pe cale glicolitică, pentru ambele procedee. 855

Producția cumulativă a amoniacului prezentat în fig.5 prezintă diferența dramatică în metabolismul glutaminei la concentrație mai scăzută de glutamină. Din grașeală, într-un experiment Costar Cube concentrația de glutamină s-a dublat prin adăugarea din neatenție de glutamină la mediul conținând glutamină. Pe baza acestor date este probabil că glutamina este limitată în culturile de concentrație 2 mM. Glutamina, în mod tipic, intră în ciclul acidului tricarboxilic (TCA) prin α -cetoglutarat cu pierderea unei grupe amino (și transaminarea celei de a doua grupe amino). Presupunând că toată glutamina alimentată în reactor este transformată 1:1 în amoniac, viteza de acumulare a amoniacului ar trebui să fie 0,071 mM/l/h pentru 1,5 vol/zi și 0,033 mM/l/h pentru 0,7 vol/zi. Aceste viteze sunt apropiate de vitezele medii observate pentru aceste culturi. Se poate vedea că la aceeași concentrație de alimentare dar la o viteză de perfuzie mai mare, viteza de utilizare raportată la producția amoniacului crește. Acest efect se vede și în cazul metabolismului glucozei și indică o viteză de utilizare dependentă de concentrație cum s-a raportat pentru alte linii celulare. 860 865 870

Exemplul 5. Etapa 4: Infectarea

În ziua a 7-a culturile se infectează cu virus stoc de înșămânțare HAV preparat, de exemplu, în modul descris în Exemplul 1, la o valoare a MOI de 0,1 (adică 1 virion per 10 celule, cuantificat prin numărarea nucleelor). Ulterior, titlul virusului stoc s-a găsit a fi 7,19 log în loc de 7,4 log ceea ce înseamnă o valoare MOI de 0,062. Temperatura se scade la 32°C cu 5 h înainte de infectare. Perfuzia se reia la 2 h după infectare. 875

pH-ul culturii se măsoară cu analizorul de gaz sânge Corning-Ciba. Se iau precauții ca pH-ul să nu fie influențat de striparea CO₂ în timpul prelevării probei. Glucoza, acidul lactic și amoniacul se analizează cu un bioanalizor Kodak. Probele se diluează, când este necesar, cu WF1. Se cuantifică densitatea celulară prin metoda lui Sanford ș.a., (J. Nat. Cancer Inst., 11:773-795, 1951), în care nucleele sunt eliberate și colorate cu cristal violet 0,1%(g/v) și 0,1mM acid citric. Prelevarea de probe de cultură pentru numărarea celulelor se termină în ziua a 6-a deoarece agregatele se contractează în linia de probă. Prelevarea de probe de mediu efluent se efectuează zilnic. 880 885

Curba creșterii virusului din ziua a 9-a în ziua 21 post infecția este prezentată în fig.9. Havag (antigen HAV prin tehnica ELISA) unități/ml bioreactor se obține prin corectarea titrului pentru diluarea probei în timpul procedurii de recoltare. Viteza creșterii virusului pare a fi substanțial mai mică în a treia săptămână a infectării. O altă posibilitate este aceea că cultura se atenuează înainte de ziua 21 și virusul difuzează în mediu în ziua a 21-a. Din experimentele NCF se știe că virusul poate fi recoltat din celule în ziua a 21-a post infectare și din mediu în ziua a 28-a. Ultimul procedeu este încă folosit pentru obținerea virusului stoc de înșămânțare în NCF (vezi Exemplul 1). 890

În tabelele IIa și IIb se prezintă o comparație a producerii virusului prin cele două procedee, Costar Cube și procedeul cu micropurtător. 895

Randament Havag per litru volum bioreactor la 21 zile post infecție				
	Bioreactor CUBE perfuzat 1,3 vol/zi	Culturi micropurtător perfuzate		
		Spinner#1 0,7 vol/zi	Spinner#2 1,5 vol/zi	Spinner#3 1,5 vol/zi
Total unități Havag produse	$1,9 \times 10^7$	$1,54 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$
Volum bioreactor	28 litri	565 ml	565 ml	565 ml
Unități Havag/ml bioreactor	695	237	268	269

Tabel Iib

Randament Havag per celulă la 21 zile post infecție				
	Bioreactor CUBE perfuzat 1,3 vol/zi	Culturi micropurtător perfuzate		
		Spinner#1 0,7 vol/zi	Spinner#2 1,5 vol/zi	Spinner#3 1,5 vol/zi
Unități Havag/ml bioreactor	695	237	268	269
Celule/ml bioreactor	estimate* $2,4-3,0 \times 10^6$	$2,21 \times 10^6$	$2,34 \times 10^6$	$2,36 \times 10^6$
Unități Havag/ml bioreactor	229-286	107	115	114

*Estimarea celulelor se face pe baza măsurării densității celulelor neinfectate $2,5 \times 10^5$ celule/cm² după 21 de zile în Costar Cube corespunzătoare la 3MM celule/ml și o estimare mai mică de $2,0 \times 10^5$ celule/cm².

Se fac două comparații: randamentul volumetric (Havag per litru de bioreactor) și randamentul specific celular (Havag per celulă). Randamentul Havag per litru de bioreactor dă posibilitatea calculului direct al productivității reactorului. Deoarece densitățile celulare sunt similare între diferitele reactoare cu micropurtător și similare cu densitățile celulare estimate pentru reactorul Costar Cube, se poate face o comparație directă a productivității. Producția bioreactorului Costar Cube este media Havag total recoltat din câteva cultivări Costar Cube împărțită la volumul bioreactorului de 28 l. Productivitatea a 3 spinnere cu micropurtător este aproape similară la cultura cu viteză de perfuzie joasă (Spinner # 1), prezentând numai o descreștere de 12% în randament. Randamentul culturilor cu micropurtător este 38% din cel obținut în procedeul Costar Cube. Productivități similare s-ar putea obține prin creșterea încărcării cu bile, pentru a apropia densitatea celulară în cultura micropurtător cu mai mult de 2 ori față de densitatea celulară folosită.

Valorile Havag per celulă pentru Costar Cube se estimează pe baza densității celulare în Costar Cube. Densitățile celulare pentru spinnere sunt o măsură directă a nucleelor eliberate în timpul recoltării fiecărui bioreactor la 21 zile. Deoarece în bioreactorul cu viteză de perfuzie joasă se măsoară ceva mai puține celule, randamentul per celulă este cu numai 7% mai scăzut decât pentru celelalte spinnere (față de 12% pe bază volumetrică). Aceasta indică că o viteză de perfuzie mai coborâtă limitează numai puțin producerea virusului. Randamentele per celulă pentru micropurtător sunt aprox. 40...50% din randamentele per celulă estimate pentru Costar Cube, ceea ce indică o concordanță grosieră cu randamentul volumetric deoarece densitățile celulare sunt aproximativ aceleași în bioreactoare.

Exemplul 6. Recoltarea (Etapa 5)

În următoarea analiză se folosesc două proceduri de recoltare: o recoltă mică de 5 ml la 9 și 14 zile post-infecție și o recoltă din întregul bioreactor în ziua a 21-a post-infecție.

Pentru probele la scară mică, o parte aliquotă de 5 ml agregat se spală de două ori cu PBS și se suspendă în tampon de lizare 0,1% triton. Agregatele se rup prin forfecarea fluidului cu o pipetă și se prelevează probe pentru numărarea nucleelor. Nucleele se vizualizează prin diluarea 1:1 a unei probe de 200 μ l cu soluție 0,1% cristal violet / 0,1 mM acid citric. Se centrifughează, apoi, lizatul la 300xg pentru îndepărtarea nucleelor și se iau părți aliquote pentru determinări EIA.

Pentru recolta bioreactorului se îndepărtează mediul prin aspirare și agregatele se spală de 2 ori cu o cantitate de PBS echivalentă cu volumul bioreactorului. Se adaugă apoi peste agregate un volum echivalent cu volumul bioreactorului de tampon de lizare 0,1% Triton și se recirculă printr-un set de orificii înseriate, cu diametrele de 1/16", 1/32" și 1/64", la un debit de aprox. 700 ml/min. După 15...30 min de recirculare se lasă să sedimenteze MC (și agregatele mici de 1-3 MC) și se îndepărtează lizatul care nu conține MC. Un al doilea volum de Triton 0,1% echivalent cu volumul bioreactorului se adaugă la MC, se recirculă prin orificii timp de 15-30 min și se combină cu primul lizat. Cantitatea obținută este eșantionată în vederea cuantificării nucleelor (vezi procedeul de mai sus), EIA și HPSEC. Micropurtătorii se studiază microscopic pentru verificarea masei de celule.

Agregatele sunt destul de stabile în timpul celor 2 spălări cu PBS și sub agitare la o viteză de agitare de 3 ori mai mare decât viteza uzuală de agitare (75 față de 25 RPM). Pentru recoltele la scară mică se stabilește că agregatele sunt dificil de rupt chiar în prezența tamponului de lizare Triton. De aceea, se folosesc o serie de orificii pentru a simula forfecarea fluidului efectuată cu o pipetă la scară mică. Timpul de recirculare este de aprox. 15 min per spălare, la un debit de aprox. 700 ml/min., ceea ce este suficient pentru a produce o rupere adecvată; observarea vizuală a lizatului indică MC singulari și nuclee. Timpul de recirculare menționat nu este, probabil, cel optim, dar recircularea optimă este ușor de stabilit prin experimente de rutină bazate pe prezenta descriere. Un avantaj al acestui procedeu este acela că dă posibilitatea eliberării nucleelor în vederea cuantificării densității celulelor la momentul recoltării. Principala diferență între lizatul culturii monostrat și lizatul micropurtător este aceea că este necesară îndepărtarea prin filtrare a micropurtătorilor și a nucleelor înainte de filtrarea fragmentelor mai mici prin filtrele de 0,2 μ m.

Exemplul 7. Purificarea (Etapă 6)

Se poate folosi orice procedeu cunoscut de purificare a HAV obținut prin
procedeul descris. În continuare se va prezenta un procedeu care permite obținerea
reproductibilă a HAV de puritate înaltă.

1. Filtrare lizat/Benzonază

Aprox. 800 ml lizat se filtrează printr-un filtru Durapore de 5 μ m pentru a
îndepărta nucleeele și MC după care se filtrează printr-un filtru de 0,2 μ m pentru
îndepărtarea micilor fragmente. Lizatul Costar Cube se filtrează numai prin filtrul de 0,2
 μ m și în continuare lizatele provenite de la Costar Cube și micropurtător se tratează în
mod identic. Tamponul Triton 0,1% se suplimentează cu 2M $MgCl_2$ până la o
concentrație finală de 2 mM. La fiecare lizat se adaugă Benzonaza, o nuclează accesibilă
comercial și produsă ca proteină recombinantă de Nycomed Pharma A/S (Danemarca),
(58 μ l/l lizat) și se incubează peste noapte la temperatura camerei cu agitare.

2. Coloana de captare

Aproximativ 800 ml lizat tratat cu Benzonază se filtrează printr-un filtru de 0,2
 μ m și se încarcă sub acțiunea gravitației (diferența de înălțime 2 m), într-o coloană de
captare cu diametrul de 2,6 cm conținând 54 ml rășină Toyopearl 650M. Coloana se
spală cu 0,03 M NaCl cu 20 volume de coloană și produsul se eluează prin gravitație la
~6 ml/min. folosind NaCl 0,35 M.

3. Precipitarea PEG și extracția cu solvent

După stocare peste noapte la 4°C, produsul eluat din coloană (~30 ml) se
incubează cu PEG 4,5% și 0,42 M soluție de sare, la 4-8°C pentru precipitarea Hep.A
și centrifugare la 1000xg. Peleții se resuspendează în tampon salin cu EDTA(PNE),
combinat cu două părți amestec cloroform:alcool izoamilic 24:1, se agită manual 3 min
și se centrifughează la 3000xg. Faza apoasă (~7 ml) se îndepărtează și solventul se
reextrage cu 3,45 ml tampon PNE. Extractele se combină și reprezintă produsul extras
cu solvent.

4. Analizele EIA și HPSEC și SDS Page

Analizele EIA și HPSEC (sistem HPLC Rainin cu coloană cu excludere după mărime
TS12-Gel G4000 pw) se fac pe probe din fiecare etapă a procedurii de purificare.
Lizatul filtrat și lizat tratat cu nuclează este analizat la 260 nm iar celelalte la 214 nm.
Analiza SDS Page a produsului extras cu solvent se face pe gel 12%.

Tabelul 3

Randamentele etapei de purificare EIA

Etapă	Procedeu la scară mare	Lizat CUBE 8	Lizate micropurtător		
			1	2	3
Lizat filtrat	88	99	84	78	80
Tratare cu Nuclează	100	89	100	98	91
Coloană de captare	62	60	55	73	72
PEG	108	82	88	84	88
Extracție cu solvent	54	46*	64	72	77
Total prin extracție	32	20	26	30	35

* Datele EIA pentru acest randament se obțin din probe cu vechimea de o lună

Purificarea: Aria relativă % a Hepatitei A prin HPLC

Sursă	Aria % Precipitat PEG, 214 nm	Aria % a produsului AQX, 214 nm	Aria % a produsului AOX corectată cu picul BSA, la 214 nm
Lizat CUBE 8	35%	90%	98%
Micropurător 1	33%	55%	93%
Micropurător 2	41%	71%	98%
Micropurător 3	44%	73%	97%

1025

Producția medie

Loturile 18-26 27,9% SD 3,5% 68,3% SD 6,9%

Scopul lucrărilor de purificare este acela de a determina diferența dintre lizatul 1030
obținut de la micropurător și lizatul obținut din cultura celulară în monostrat, pentru
purificarea ulterioară. Un litru de lizat de la Costar Cube și aprox. 800 ml lizat
micropurător se purifică, în paralel, pentru comparație. Purificarea se efectuează prin
extracție cu solvent deoarece în acest fel se realizează marea parte a purificării și
asigură o bună comparație a performanței purificării. De asemenea, la această scară, 1035
cantitatea de material care trece prin restul procesului este limitată. După cum se
prezintă în Tabelul 3, valorile EIA pentru procedeul la scară mică sunt în concordanță
bună cu cele ale procedeului pe scară largă. În plus, randamentele de lizat micropurător
sunt în concordanță excelentă cu lizatul producției de control. Experiența de colorare cu
argint SDS Page efectuată pe produsul extras cu solvent, indicată în Fig. 10, arată în 1040
mod clar cele 3 benzi de Hep.A pentru lizatul Costar Cube la scară mică și cele 3 culturi
cu micropurător. Apare o altă bandă în zona micropurătorului la o masă moleculară de
aprox. 66000. Aceasta corespunde la BSA (66.200 MW) și se datorează probabil
spălării insuficiente cu PBS, în timpul etapei de recoltare, pentru îndepărtarea proteinelor
din ser înainte de adăugarea tamponului de lizare Triton. Lizatul Costar Cube are 1045
aproximativ dublul cantității normale de Hep.A determinată prin
EIA, datorită probabil amestecării inadecvate înaintea prelevării probei. Conținutul mai
mare de HAV în lizatul Costar Cube este prezent pe parcursul procedeului astfel că
diferența în densitatea benzii se datorează în parte acestui fapt și parțial randamentului
de aprox. 50% în culturile MC. 1050

Profilele HPSEC pentru lizatul filtrat, lizatul tratat cu nuclează, produsul captat,
precipitatul PEG și produsul de extracție cu solvent sunt prezentate în Fig. 11-15. De
remarcat că profilele sunt foarte similare pentru lizatul micropurător și lizatul Costar
Cube ceea ce indică o performanță de purificare similară. În profilul extractului cu solvent
pic-ul suplimentar existent între HAV și pic-ul corespunzător solventului se crede că este 1055
banda BSA din gelul SDS Page. Suprafața relativă %HAV pentru precipitatul PEG și
produsul extras cu solvent (AQX) sunt prezentate în Tabelul 4. Procentul este calculat
în același mod ca în producție și ține cont de toate pic.urile existente înaintea pic-ului
solventului.

Comparând lizatul Costar Cube # 8 cu lizatul micropurător se observă o 1060
concordanță relativă pentru produsul PEG și o arie % mai mică pentru produsul extras.

Pic-ul suplimentar în culturile micropurtător se atribuie a fi BSA. Pentru a ține cont de aceasta ariile % pentru Hep.A se recalculează prin scăderea pic-ului atribuit BSA. Aria % relativă pentru lizatul micropurtător și lizatul Costar Cube # 8 sunt într-o concordanță excelentă și prezintă un produs surprinzător de pur în acest punct. Compararea ariilor relative pentru lizatul Costar Cube # 8 și pentru media producției Costar Cube indică un randament pe scară mare puțin mai mic pentru etapa PEG și o scădere mult mai mare pentru etapa extracției cu solvent. Aceasta sugerează o diferență în purificarea pe scară mare și cea pe scară mică.

Exemplul 8. *Propagarea virusului varicelei în sistemul micropurtător agregat*

Se prezintă infectarea celulelor MRC-5 crescute ca o cultură agregat cu tulpina Oka a virusului varicelei. Într-un sistem spinner micropurtător, ca cel prezentat în Exemplul 2, se prepară micropurtători înveliți în sticlă Solohill, la 40 g/l, 60 g/l și 80 g/l și se inoculează cu celule MRC-5 extinse în Nunc Cell Factories, într-o manieră similară cu cea din Exemplul 3. Celulele se perfuzează la viteze de 1, 1,5 și 2 volume per zi, vitezele mai mari corespund la încărcături mai mari de bile. Perfuzia se efectuează ca în Exemplul 4. Celulele se cresc 4-5 zile, după care se infectează la un raport de infectare de o celulă de însămânțare recoltată la 15 celule țintă în cultura micropurtător. Densitatea celulelor în momentul infectării variază de la 2 la 4 milioane celule/ml. Virusul de însămânțare se prepară prin infectarea a 10 straturi NCF cu virusstoc la o valoare MOI de 1:125 și se recoltează cu tripsină la 48 h după infectare. După 30 h se recoltează probă de cultură micropurtător la fiecare 6 h, prin decantarea mediului, după 4 spălări cu tampon fosfat, urmată de resuspendare într-o formulare de stabilizator. Agregatele se rup prin forfecarea fluidului cu un ac de seringă. La aproximativ 48 h post-infectare întregul volum al fiecăruie din cele 3 spinnere se recoltează folosind metoda forfecării fluidului decsrisă în Exemplul 6. Agregatele sunt mai greu de rupt fără detergent, așa cum se prezintă în Exemplul 6. De aceea, este necesară o forfecare mai mare a fluidului prin creșterea vitezei lineare prin orificii.

Exemplul 9. *Propagarea virusului oreionului într-o cultură micropurtător agregată.*

Celule fibroblaste de embrion de pui, inițiale sau conservate prin congelare, după mai multe pasaje în culturi monostrat, în prezentul exemplu de 2 ori, se adaugă în cantitate de aprox. 5-10 celule/bilă de micropurtător din diferite materiale - în acest exemplu plastic învelit în sticlă (diametru 150-212 μ m, densitate 1,02) la o concentrație de 40 g/l, într-un vas Spinner din sticlă de 250 ml. Pentru creșterea celulelor până la o densitate de 4×10^6 celule/ml, se folosește un mediu 199 sau DMEM modificat cu 10% FBS, cu completarea zilnică a mediului. Creșterea în acest sistem se caracterizează prin agregarea micropurtătorilor până la o mărime care crește progresiv (2-50) pe măsură ce crește densitatea celulară. Infectarea și replicarea virusului oreionului, pentru obținerea vaccinului, se demonstrează în acest sistem prin adăugarea virusului oreionului de însămânțare (Jeryl Lynn Strain) în această cultură micropurtător.

Revendicări

1. Procedeu pentru producerea unui virus, într-o cultură agregată micropurtător-celulă, care cuprinde reținerea unei populații de celule, într-o stare atașată și agregată, fără desprinderea celulelor de micropurtători, chiar într-o fază de infectare prelungită,

pentru producerea unei cantități de antigen vaccin viral, **caracterizat prin aceea că el** cuprinde etapele:

a) prepararea micropurtătorilor înveliți în sticlă, prin învelirea unor bile de polistiren, de mărime și densitate predeterminate, cu un strat subțire de sticlă cu densitatea de 2,4 g/ml, prin hidratarea, sterilizarea și echilibrarea respectivelor micropurtători, într-un mediu de cultură, într-un bioreactor adecvat pentru cultivarea celulelor susceptibile la infectare cu un virus;

b) inocularea celulelor într-un mediu de cultură adecvat, la o concentrație suficientă, pentru a realiza o atașare uniformă a celulelor la micropurtători, astfel încât fiecare micropurtător să aibe 1...10 celule/micropurtător, preferabil 5...10 celule/micropurtător, folosind o viteză de agitare egală cu viteza de realizare a unei suspensii, care este viteza minimă de agitare necesară realizării unei condiții în care nici un purtător nu stă mai mult de aproximativ 1 s pe fundul bioreactorului cu agitare, la un pH de 7,6...7,9;

c) creșterea celulelor inoculate și atașate în faza logaritmică târzie sau la cea staționară incipientă cu un control al pH-ului și cu completarea mediului suficient pentru a asigura nutriția adecvată a celulelor și controlul mărimii agregatului și o viteză de agitare suficient de lentă pentru a permite formarea eficientă a agregatului micropurtător-celulă, dar suficient de rapid pentru a menține toți micropurtătorii în suspensie, timp de aproximativ 6 zile;

d) infectarea agregatului micropurtător-celulă în faza logaritmică târzie sau staționară incipientă cu virus, folosind un stoc de virus infecțios pentru infectarea celulelor la multiplicitate de infectare, preferabil micropurtători de polistiren înveliți în sticlă și collagen, de aproximativ 0,05...1, de preferință 0,1; perfuzia se stopează 2 h, în timpul de infectare pentru a permite atașarea virusului la celule apoi se restabilește perfuzia și creșterea virusului o perioadă de timp ce variază în funcție de tipul virusului, perioadă suficientă pentru obținerea unui randament maxim de virus pentru recoltare;

e) recoltarea și recuperarea virusului din cultura de agregate micropurtător-celulă, unde recoltarea virală cuprinde într-o primă etapă oprirea agitării și celulele infectate cu virus atașate la micropurtători sedimentează sub acțiunea gravitației.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** celule supuse infectării cu virus sunt celule firoblaste diploide de plămân uman, embrionar, celule de rinichi de maimuță, fibroblaste de embrion de pui sau celule W138.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** virusul care realizează infectarea celulelor poate fi: virusul hepatitei A, virusul de varicelă, pojar, oreion, rubeolă, polio, virusul de herpes sau

rotavirus.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, atunci când celulele supuse infectării sunt celule firoblaste diploide de plămân uman embrionar, virusul care realizează infectarea celulelor este virusul hepatitei A.

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** cuprinde etapele;

a) prepararea micropurtătorilor înveliți cu sticlă, care constau din bile de polistiren învelite într-un strat subțire de sticlă și collagen, hidratarea, sterilizarea și echilibrarea micropurtătorilor respectivi într-un mediu de cultură, într-un bioreactor adecvat pentru

RO 115176 B1

cultivarea celulelor susceptibile la infectarea cu virusul hepatitei A, care urmează a fi folosit ca antigen pentru vaccin;

b) inocularea celulelor fibroblaste diploide de plămân de embrion uman în mediul de cultură adecvat, la o concentrație de plantare de 5-10 celule/micropurtător pentru a realiza o atașare uniformă a celulelor la micropurtători astfel încât fiecare micropurtător să aibe atașată cel puțin o celulă, la o viteză de agitare cu viteza de realizare a unei suspensii, care este viteza minimă de agitare necesară realizării unei condiții în care nici un purtător nu stă mai mult de aproximativ 1 s pe fundul de agitare și la un pH și o temperatură care să permită formarea agregatelor structurale;

c) creșterea celulelor inoculate și atașate în faza logaritmică sau la cea staționară incipientă cu un control al pH-ului și cu o completare a mediului la o viteză de aproximativ 0,7 la aproximativ 2 volume/zi pentru a asigura nutriția adecvată a celulelor și controlul mărimii agregatului și o viteză de agitare suficient de lentă pentru a permite formarea eficientă a agregatului micropurtător-celulă, dar suficient de rapidă pentru a menține toți micropurtătorii în suspensie;

d) infectarea agregatului micropurtător-celulă în faza logaritmică târzie sau staționară incipientă cu virusul hepatitei A și creșterea virusului o perioadă de timp suficientă pentru obținerea unui randament maxim de virus pentru recoltare;

e) recoltarea virusului din cultura de agregare micropurtător-celulă prin îndepărtarea mediului de cultură și înlocuirea lui cu un tampon de recoltare, care conține preferabil un detergent, la o concentrație 0,1%, trecerea forțată a culturii de agregare micropurtător-celule printr-o serie de orificii cu diametrul descrescător astfel încât cel mai mic orificiu este aproximativ de 5 ori mărimea unui micropurtător singular, sau suficient pentru a obține o viteză lineară de la aproximativ 1010 m/min, la aproximativ 2020 m/min și recuperarea virusului hepatitei A eliberat.

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **ing. biochim. Eremia Laura**

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

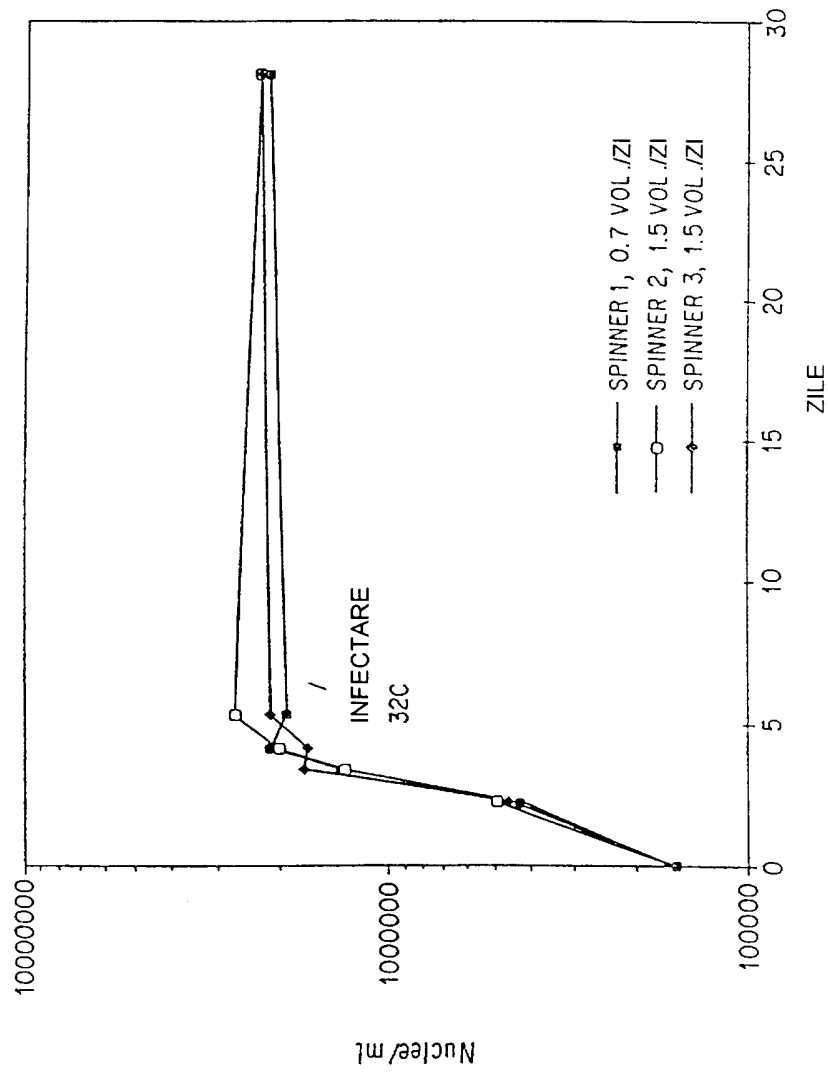


Fig. 1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

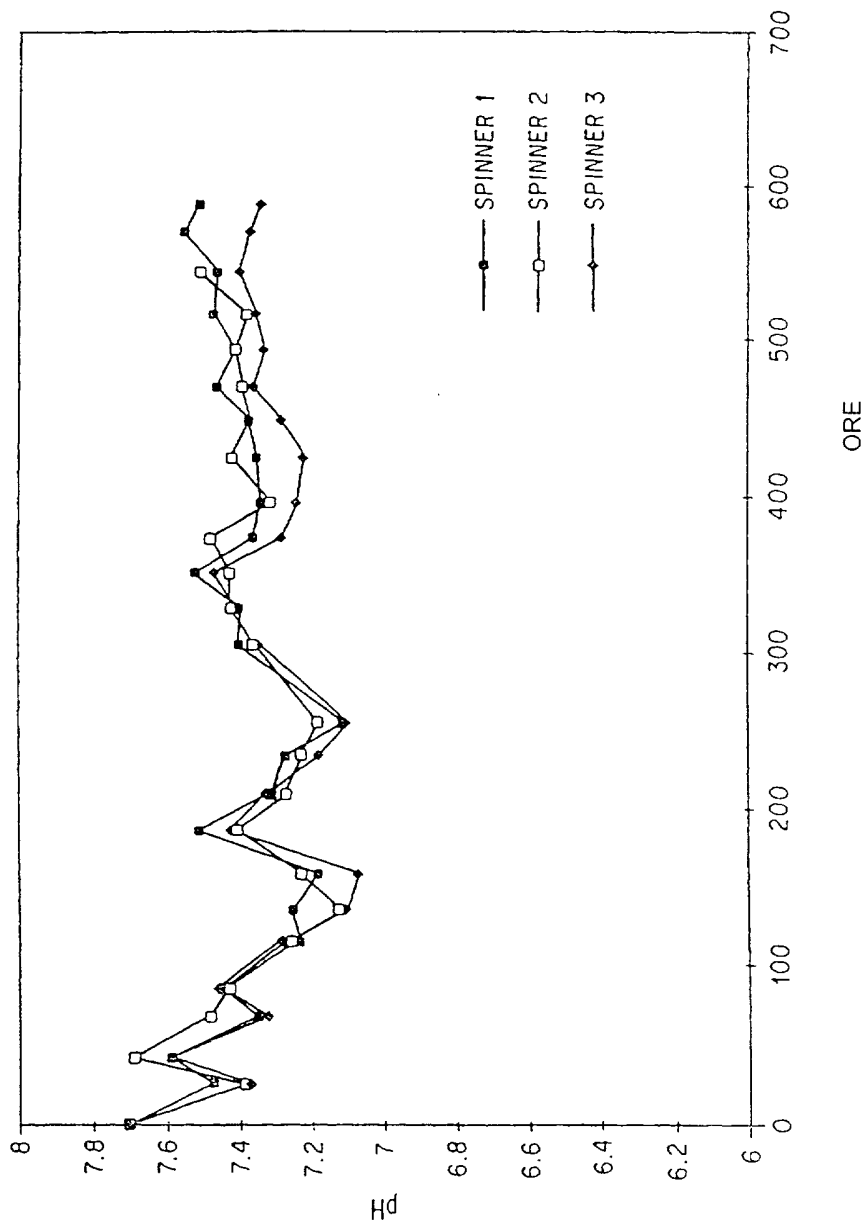


Fig. 2

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;

C 12 N 7/00;

A 61 K 39/29;

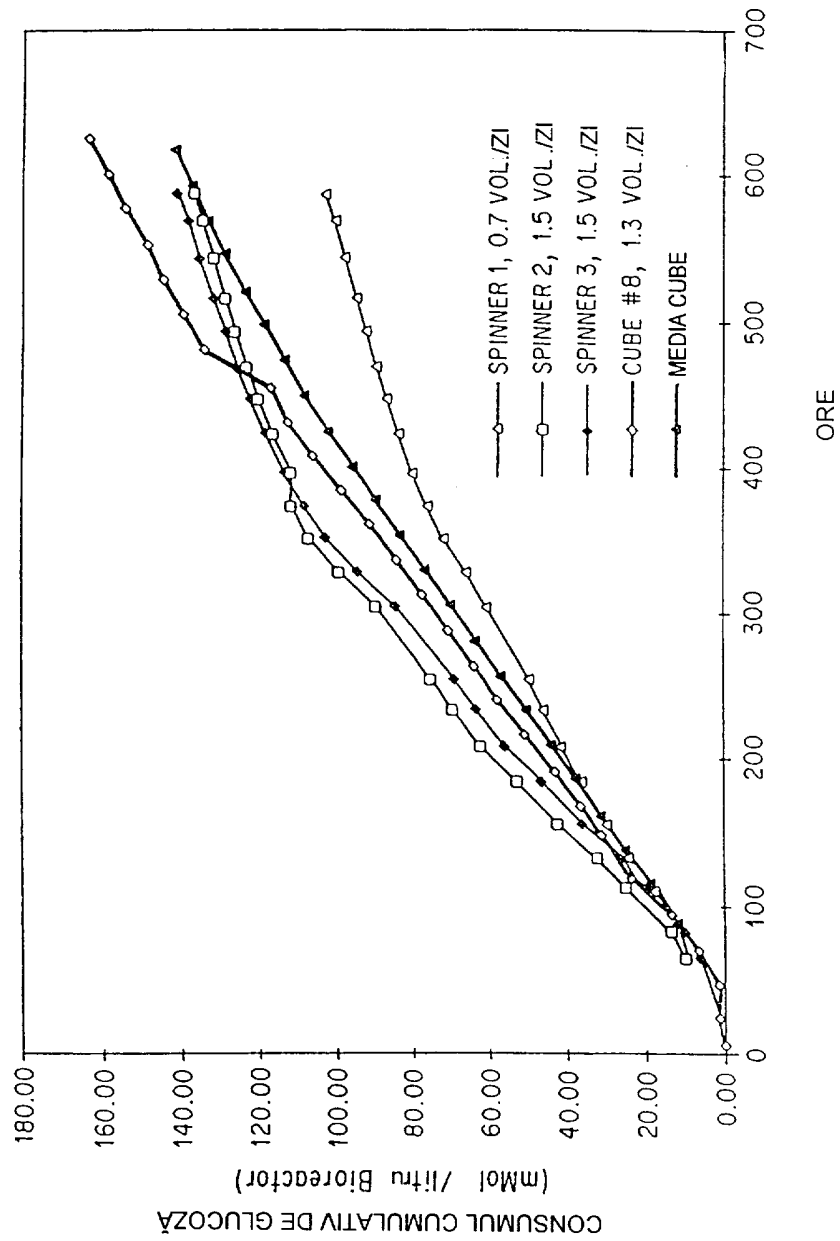


Fig. 3

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

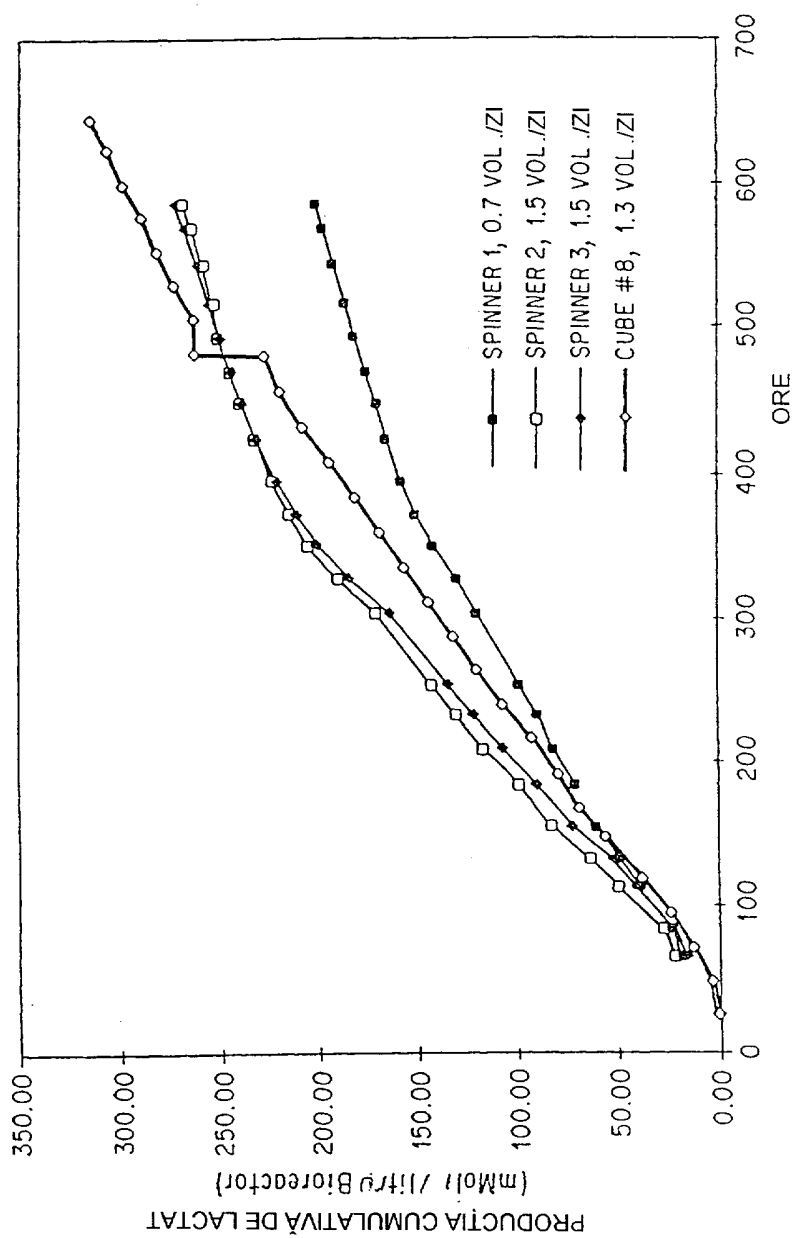


Fig. 4

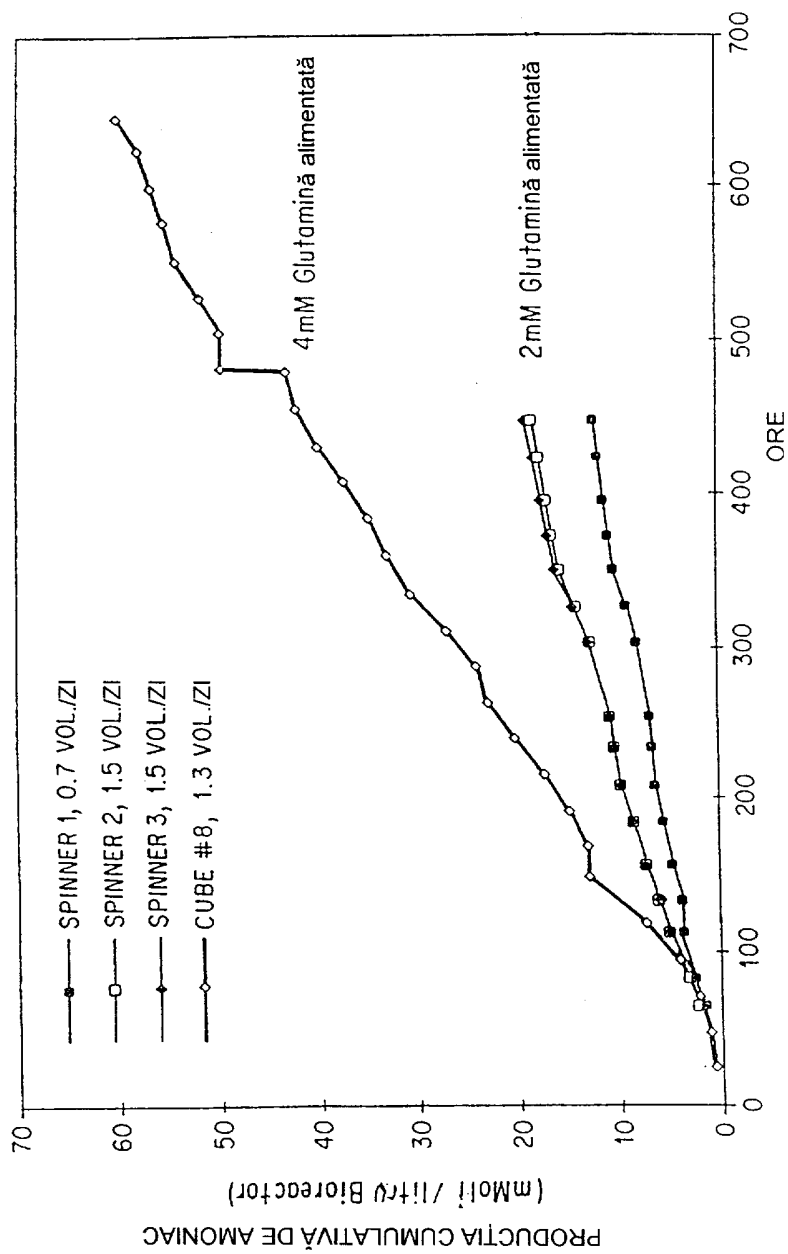


Fig. 5

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

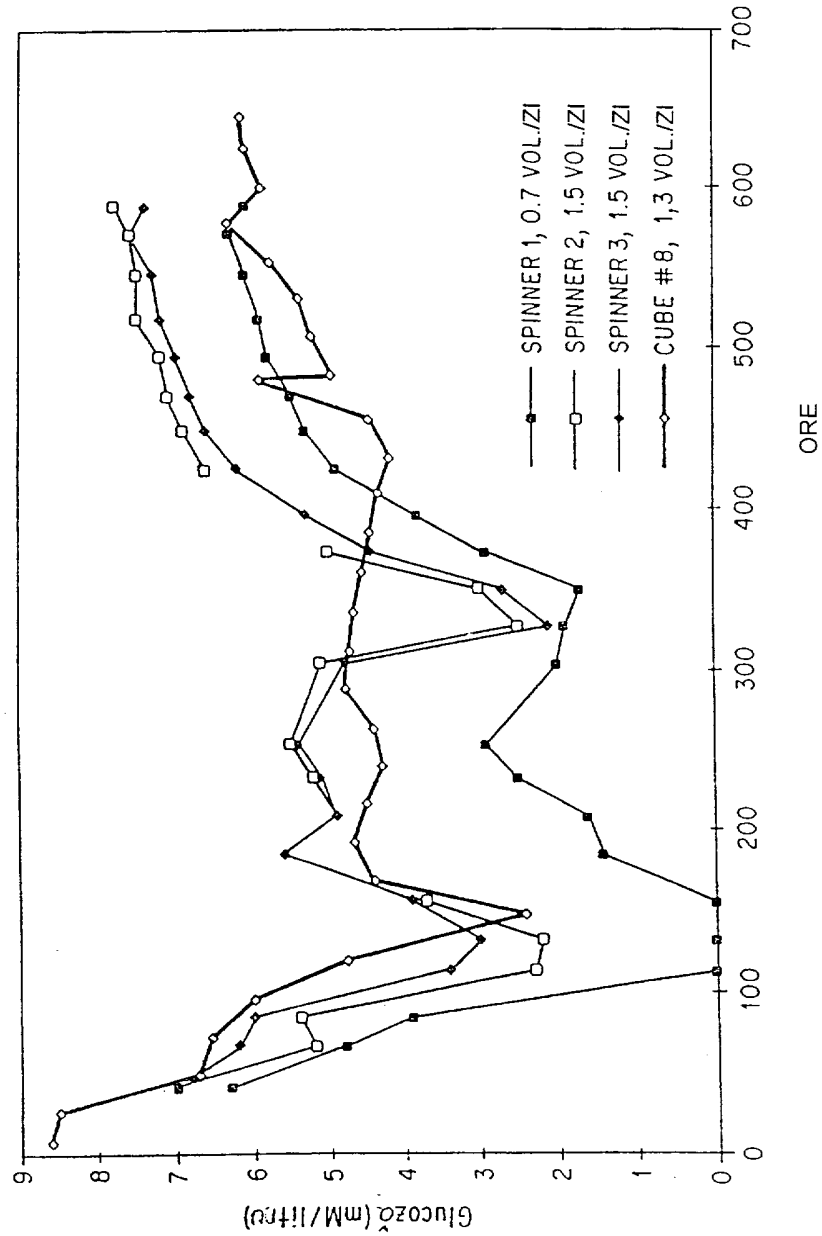


Fig. 6

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

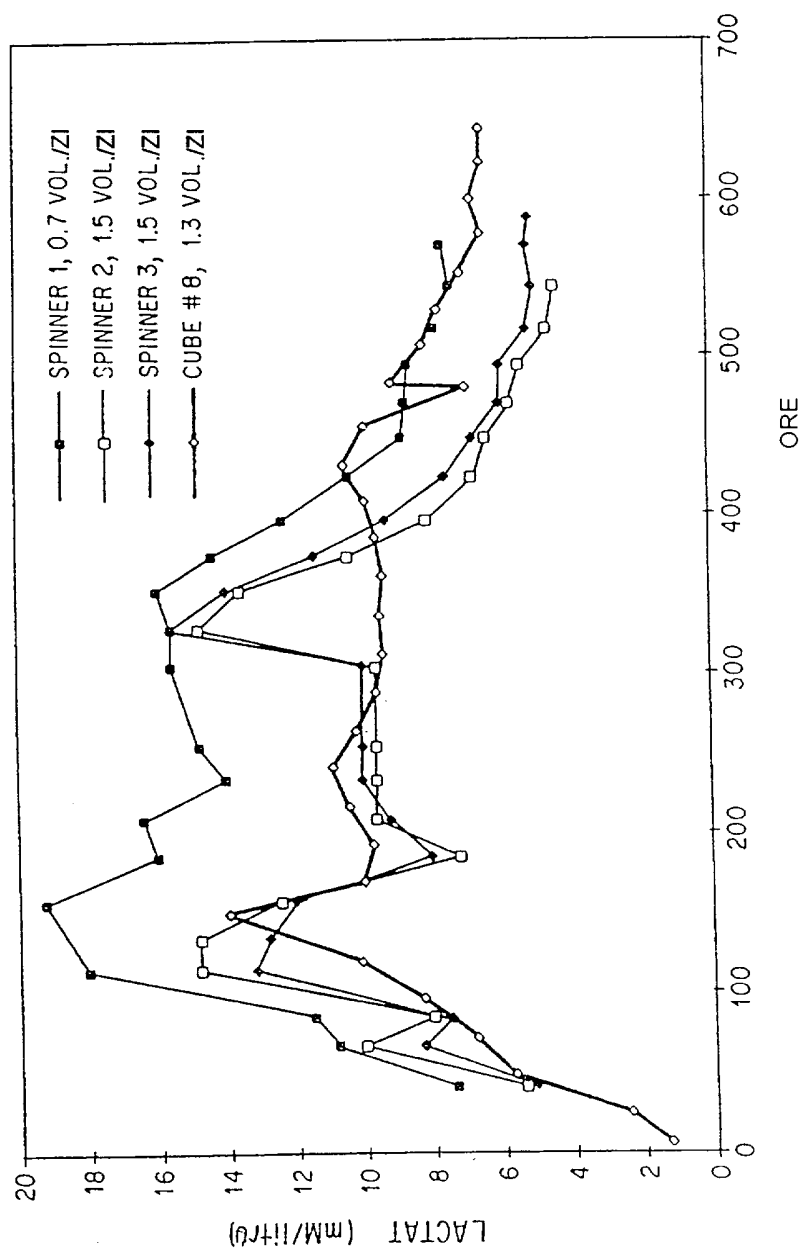


Fig. 7

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

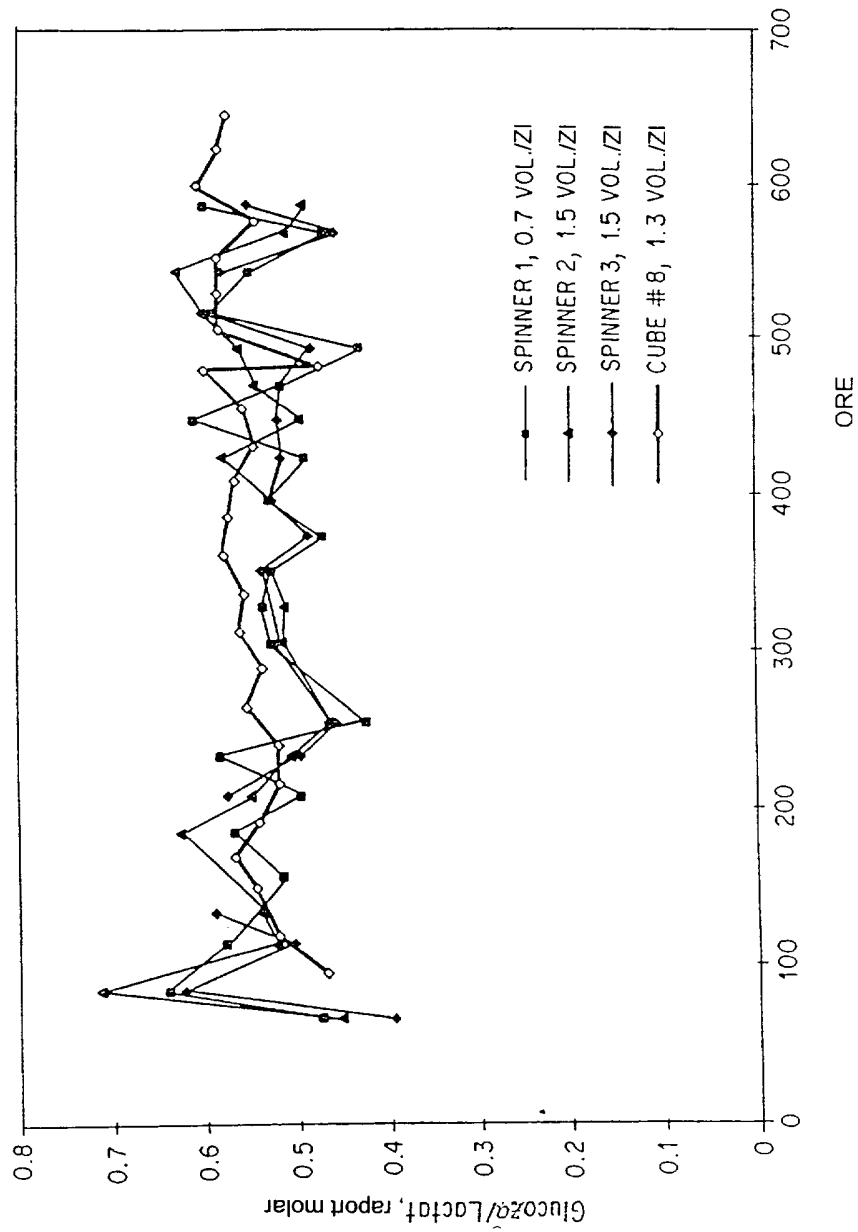


Fig. 8

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

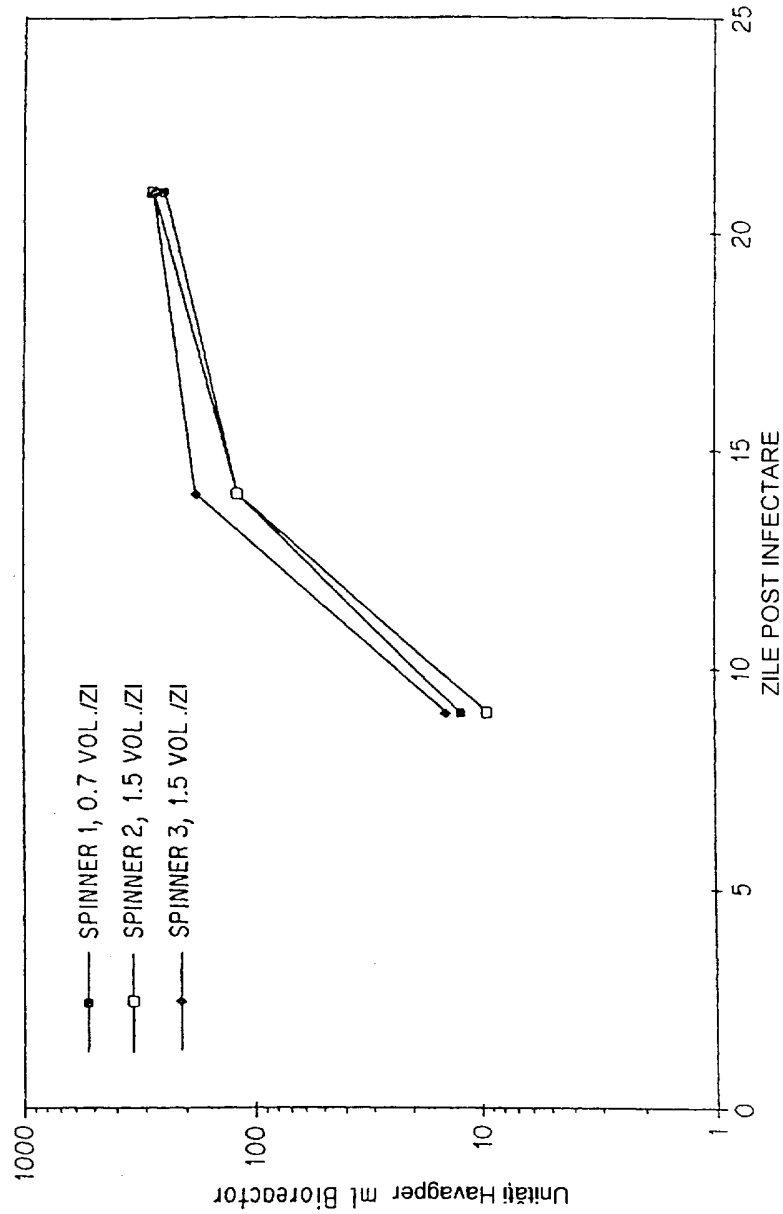


Fig. 9

RO 115176 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

Lane 5: SEC Purificat Hep A cu BSA adăugat
Lane 6: Cube #8 LIZAT
Lane 7: Microputător Spinner #1 , 0.7 Vol./ZI
Lane 8: Microputător Spinner #3, 1.5 Vol./ZI
Lane 9: Microputător Spinner #2, 1.5 Vol./ZI

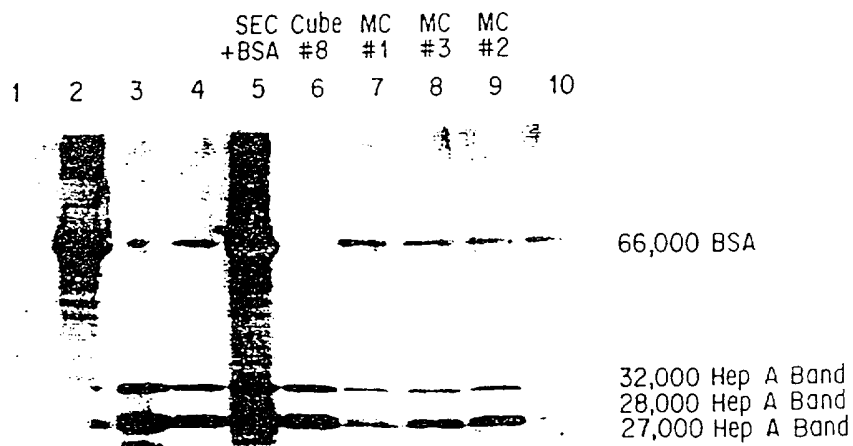


Fig. 10

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

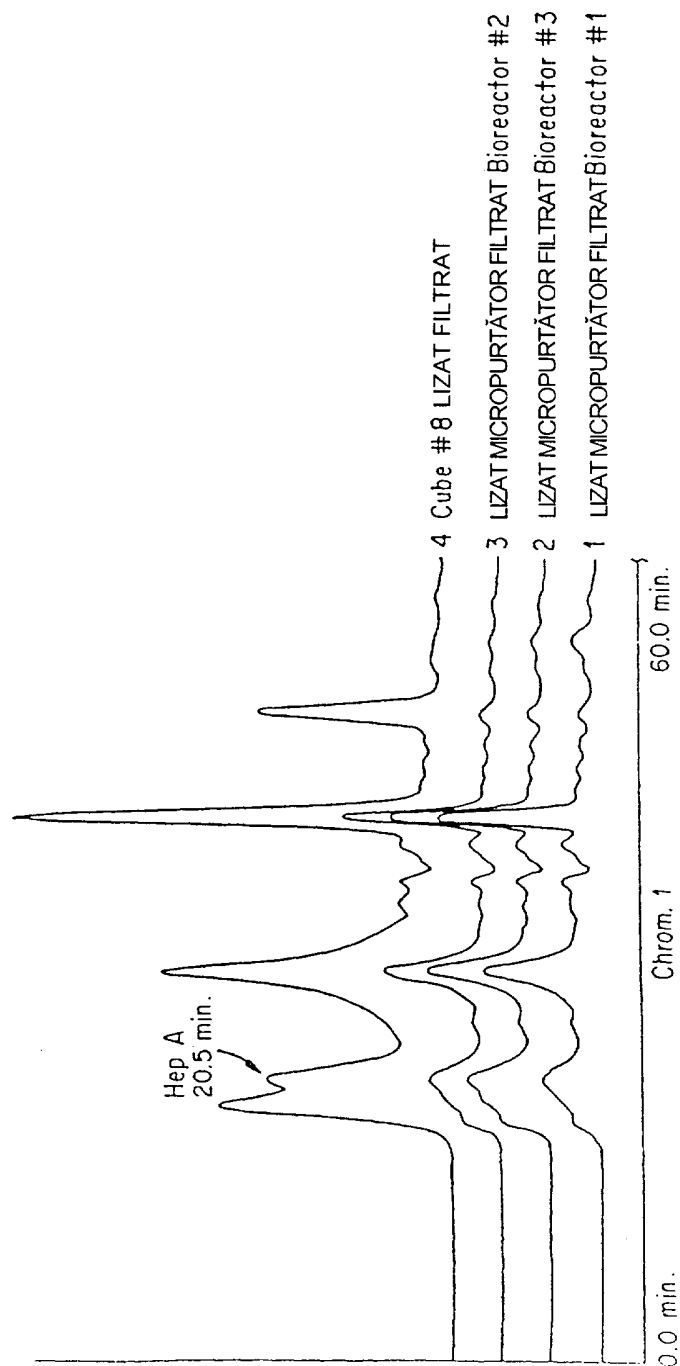


Fig. 11

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;

C 12 N 7/00;

A 61 K 39/29;

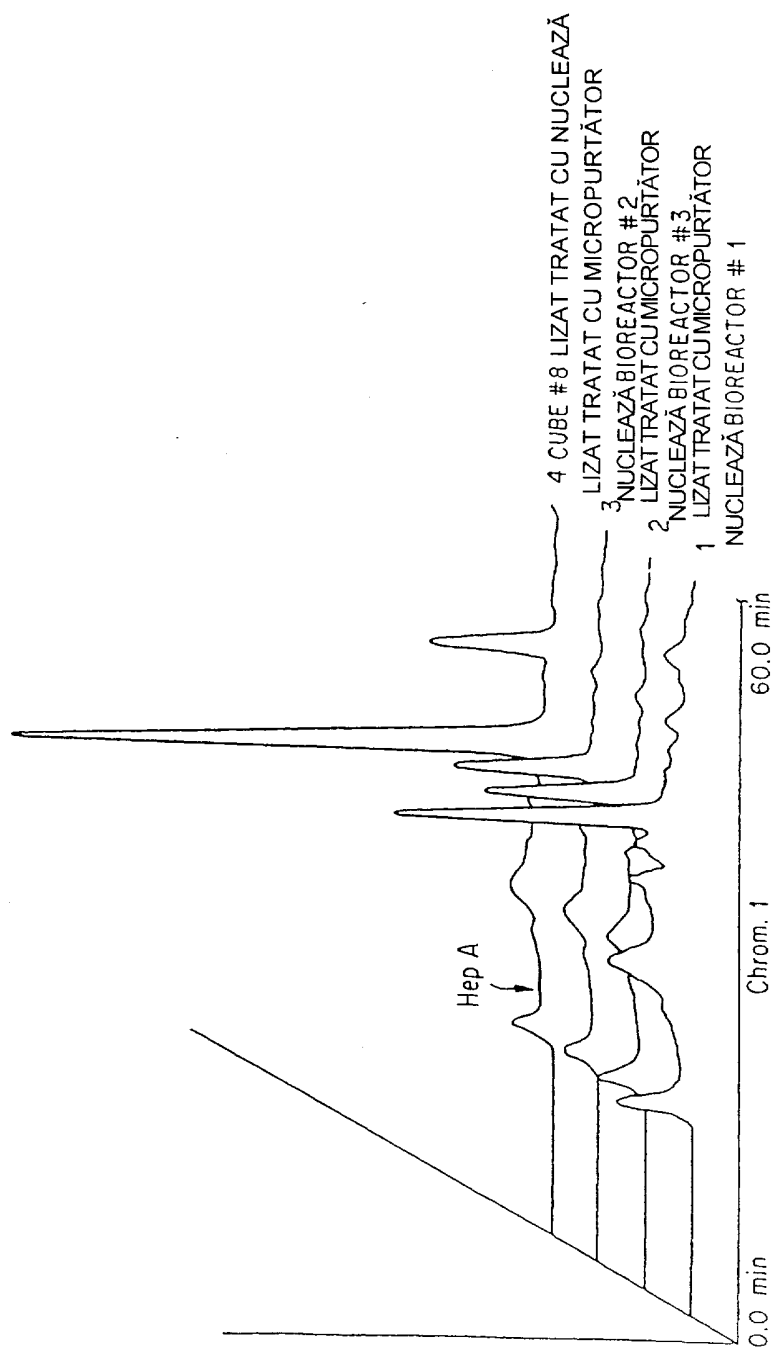


Fig. 12

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

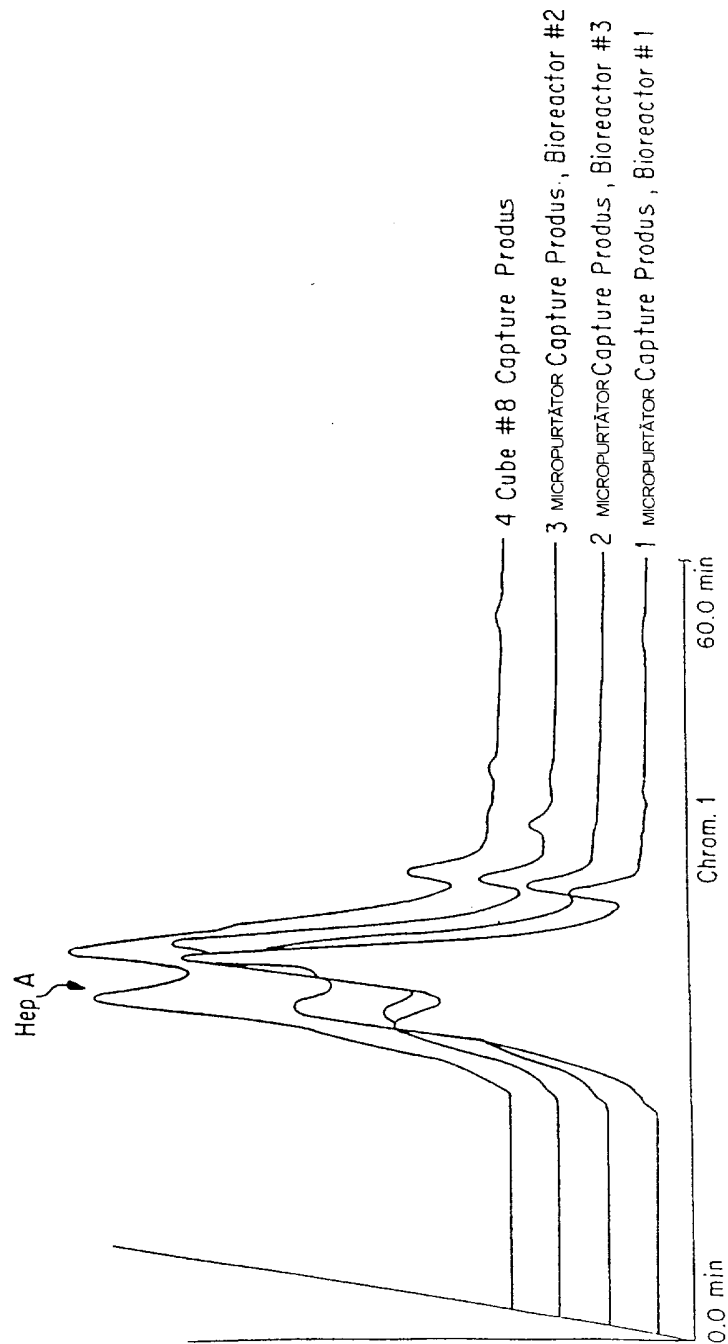


Fig. 13

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

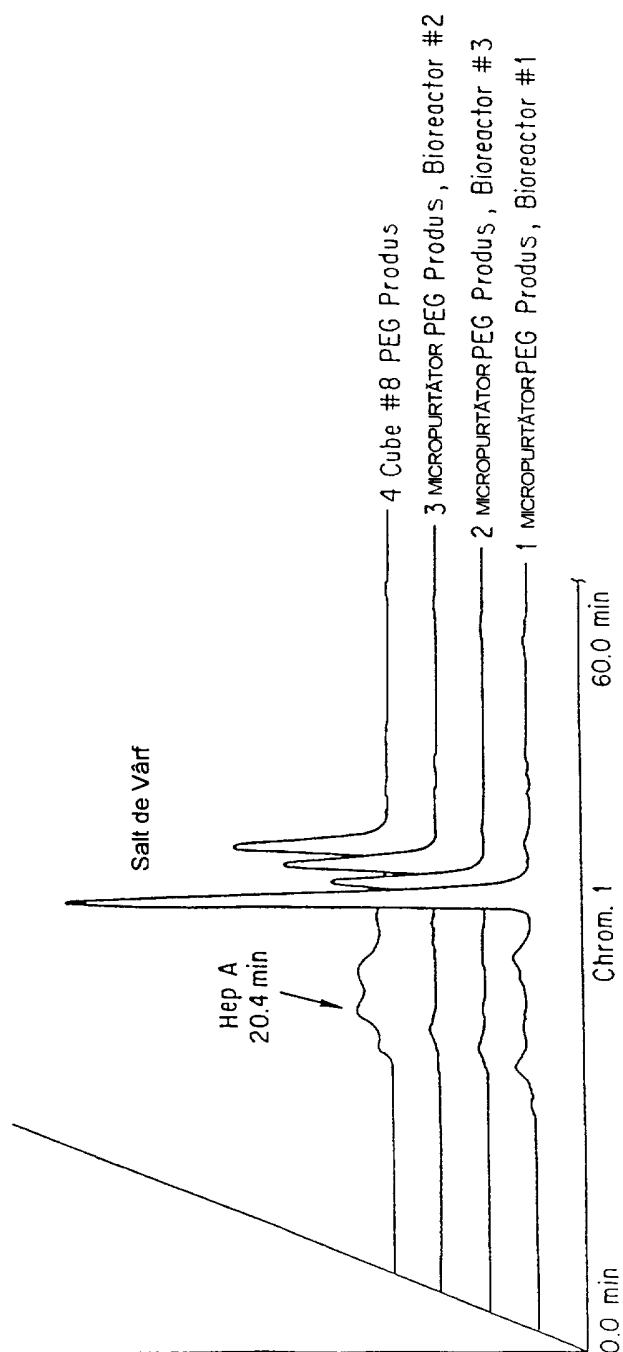


Fig. 14

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

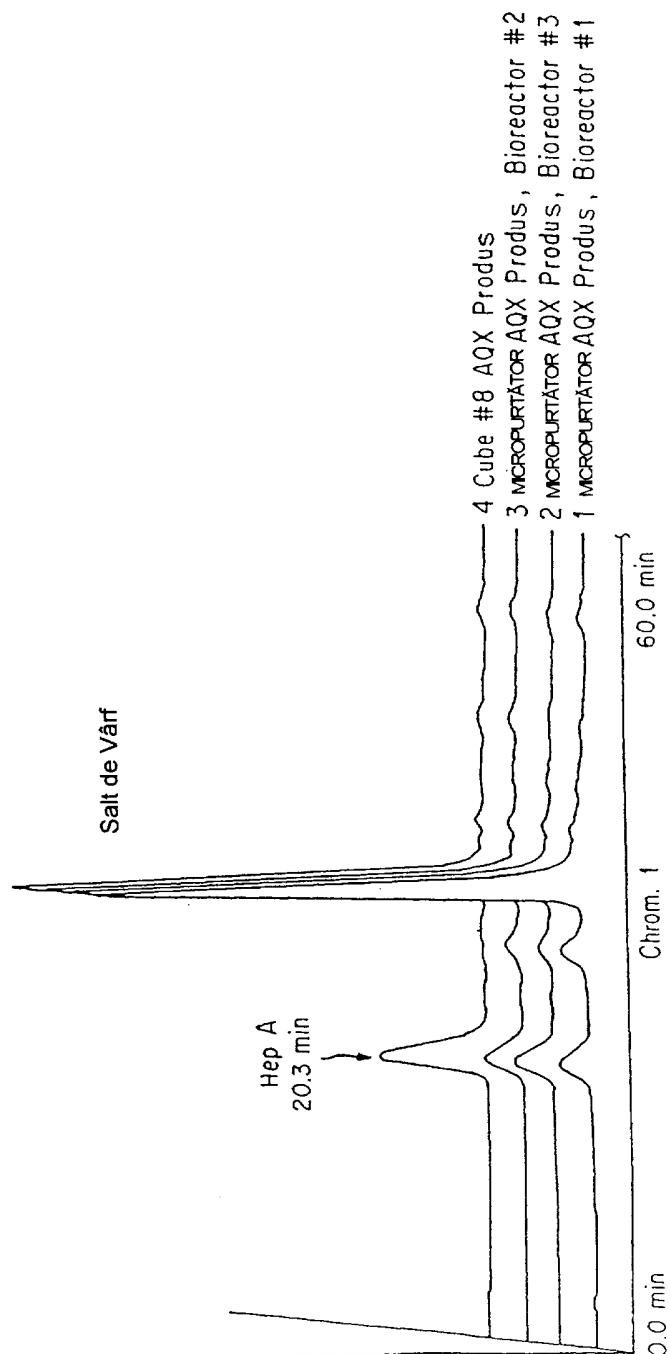


Fig. 15

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

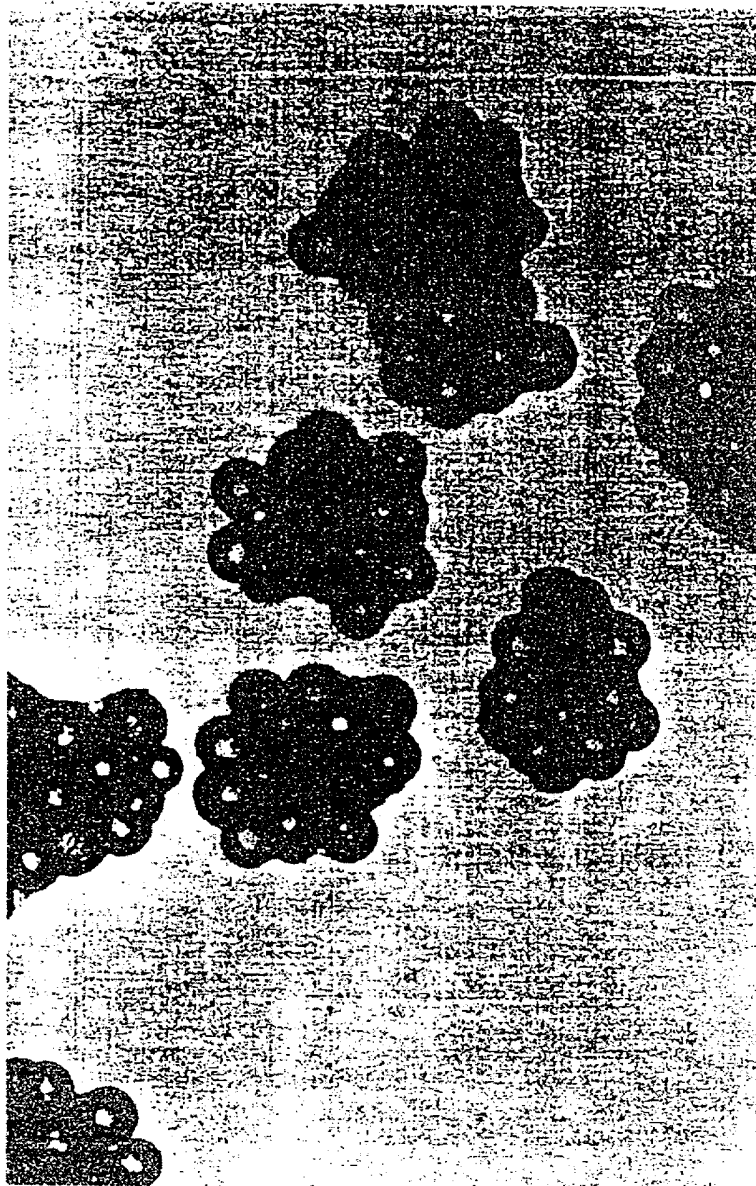


Fig. 16

RO 115176 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;



Fig. 17

RO 115176 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

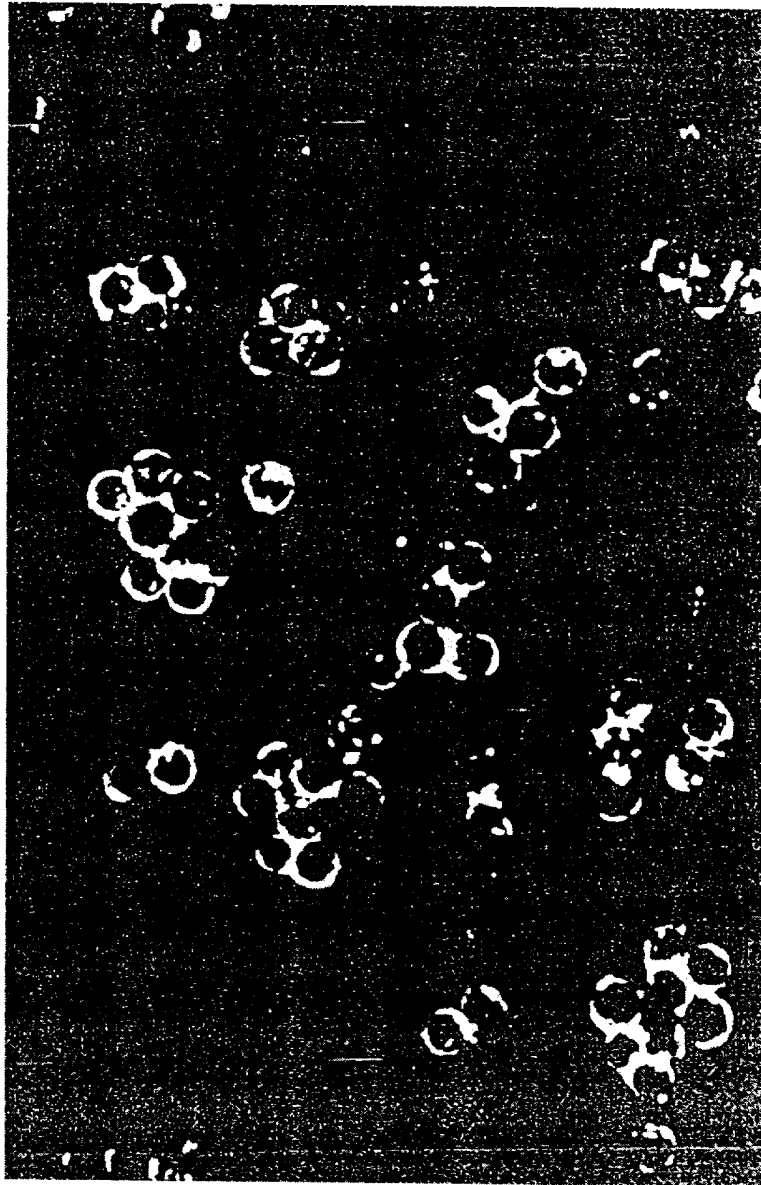


Fig. 18

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

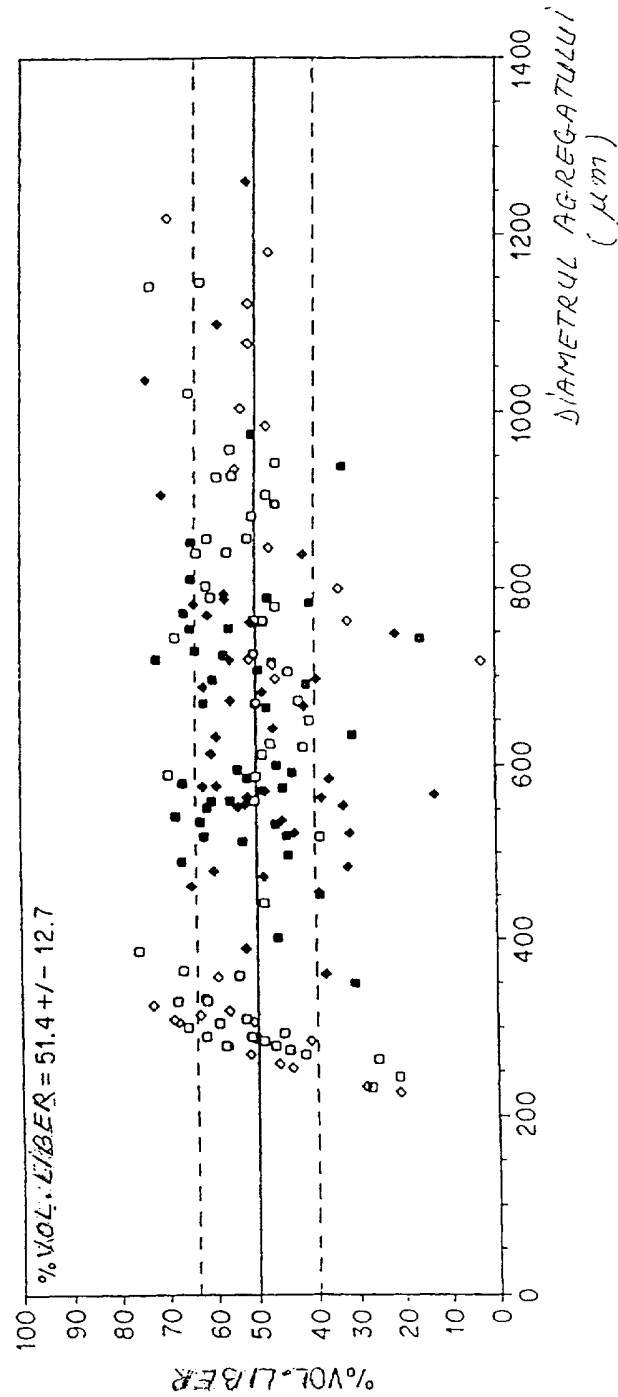


Fig. 19

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 5/00;
C 12 N 7/00;
A 61 K 39/29;

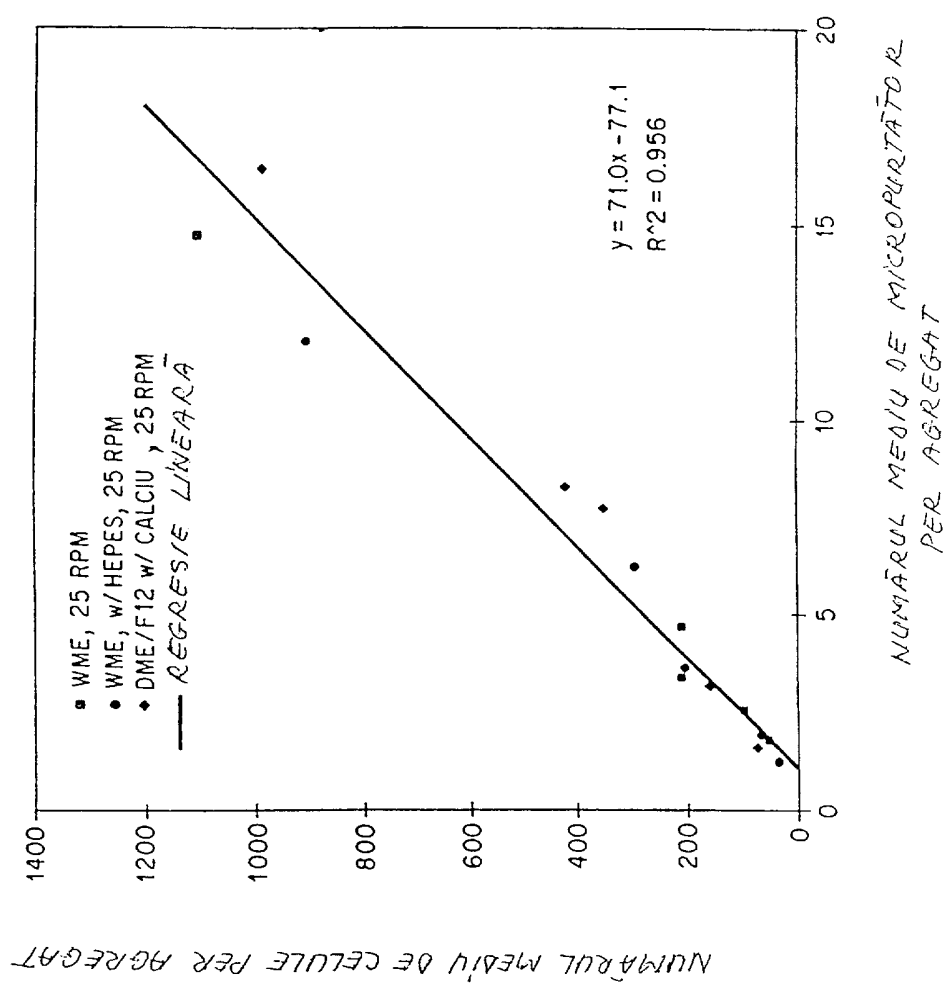


Fig. 20

