



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107460154 A

(43)申请公布日 2017. 12. 12

(21)申请号 201710197964.3

C12N 5/071(2010.01)

(22)申请日 2010.12.21

C12N 7/00(2006.01)

(30)优先权数据

0959472 2009.12.23 FR

1051754 2010.03.11 FR

(62)分案原申请数据

201080064525.1 2010.12.21

(71)申请人 赛诺菲巴斯德有限公司

地址 法国里昂

(72)发明人 E.卡尔沃萨 N.塞夫

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 杜艳玲 黄念

(51)Int.Cl.

C12N 5/00(2006.01)

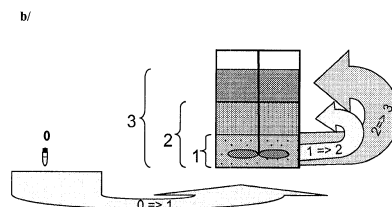
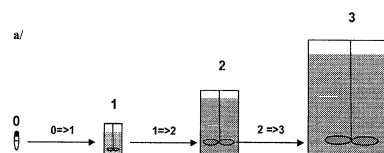
权利要求书2页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称

用于培养贴壁细胞的方法

(57)摘要

本发明涉及用于生产贴壁细胞的方法,根据这种方法:a. 将贴壁细胞引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体;b. 通过在这个相同培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,在其中执行在第一次细胞传代后的每次细胞传代:i. 在已对所述细胞群体实施酶促处理以便使所述细胞从微载体中脱离后,使用在先前细胞传代方法期间获得的所有或部分细胞群体;和ii. 通过引入培养基和增加量的微载体;和c. 在已对所述细胞群体任选实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,收获在末次细胞传代期间生产的细胞群体。本发明还涉及这种方法用于制备生物学剂,特别用于制备疫苗或药物的用途。



1. 一种用于生产贴壁细胞的方法,根据这种方法:
 - a. 将贴壁细胞引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体;
 - b. 通过在这个相同培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,其中进行在第一次细胞传代后的每次细胞传代:
 - i. 在已对所述细胞群体实施酶促处理以便使所述细胞从微载体中脱离后,使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体;和
 - ii. 通过引入培养基和增加量的微载体;和
 - c. 在任选已对所述细胞群体实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,收获在末次细胞传代期间生产的细胞群体。
2. 一种用于生产由贴壁细胞生产的生物学试剂的方法,根据这种方法:
 - a. 将贴壁细胞引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体;
 - b. 通过在这个相同培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增所述细胞,其中进行在第一次细胞传代后的每次细胞传代:
 - i. 在已对所述细胞群体实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体,和
 - ii. 通过引入培养基和增加量的微载体;
 - c. 处理在末次细胞传代期间生产的所述细胞群体,从而使得它生产生物学试剂,所述处理在与已用于扩增细胞的培养器皿相同的培养器皿中进行;和
 - d. 收获所述生物学试剂。
3. 如权利要求2中要求的方法,根据这种方法所述生物学试剂是传染剂,并且步骤c)中所述细胞群体的处理通过用在感染培养基中的所述传染剂感染所述细胞群体来执行。
4. 如权利要求3中要求的方法,根据这种方法所述传染剂是狂犬病病毒,并且所述感染培养基是不含动物起源的任何产物的病毒感染培养基。
5. 如权利要求1 - 4中任一项中要求的方法,根据这种方法在相同培养器皿中执行的所述细胞传代数目的是2、3或4。
6. 如权利要求1 - 5中任一项中要求的方法,根据这种方法在第一次细胞传代期间在所述培养基中的微载体浓度是 $< 1 \text{ g/l}$,且优选 $\leq 0.5 \text{ g/l}$ 。
7. 如权利要求1 - 6中任一项中要求的方法,根据这种方法所述酶促处理采用含有蛋白水解酶的溶液。
8. 如权利要求1 - 7中任一项中要求的方法,根据这种方法在增加所述培养基的体积的同时,进行每个后续细胞传代。
9. 如权利要求1 - 8中任一项中要求的方法,根据这种方法所述第一次细胞传代在培养基体积中执行,所述培养基体积是所述培养器皿工作体积的1/5和一半之间。
10. 如权利要求1 - 9中任一项中要求的方法,根据这种方法所述培养基不含动物起源的血清。
11. 如权利要求1 - 10中任一项中要求的方法,根据这种方法所述培养基不含动物起源的任何产物。
12. 如权利要求1 - 11中任一项中要求的方法,根据这种方法所述培养基中的蛋白质浓度是 $\leq 15 \text{ mg/l}$ 。

13.如权利要求1 - 12中任一项中要求的方法,根据这种方法所述培养基还含有细胞保护剂。

14.如权利要求13中要求的方法,根据这种方法所述细胞保护剂是聚乙烯吡咯烷酮或泊洛沙姆。

15.如权利要求1 - 14中任一项中要求的方法,根据这种方法所述培养器皿是生物反应器,其具有在3 - 3000升之间、优选在20 - 1000升之间、且特别优选在20 - 500升之间的工作体积。

16.如权利要求15中要求的方法,根据这种方法所述培养器皿是一次性使用的生物反应器。

17.如权利要求1 - 16中任一项中要求的方法,根据这种方法所述贴壁细胞是Vero细胞。

18.如权利要求1和5 - 17中任一项中要求的方法,根据这种方法所述在步骤c)中收获的所述细胞群体含有的细胞量为在方法的步骤a)中最初引入的细胞量的至少60倍。

19.一种用于生产贴壁细胞的方法,根据这种方法:

a. 将贴壁细胞的原种解冻,随后

b. 对所述解冻的贴壁细胞实施如权利要求1和5 - 18中任一项中要求的方法。

20.一种用于生产贴壁细胞的方法,根据这种方法,在根据权利要求1和5 - 19中任一项在第一个培养器皿中已生产贴壁细胞后:

a. 在已对所述细胞群体实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,将收获的细胞群体转移到第二个培养器皿内,所述第二个容器具有更大的工作体积,且包含含有比在第一个培养器皿中执行的末次细胞传代期间存在的微载体量更大量的微载体的培养基,和

b. 在这个第二个器皿中实施在如权利要求1和5 - 19中任一项中要求的方法的步骤b)和c)。

21.如权利要求20中要求的方法,根据这种方法,权利要求20的步骤a)和b)在第三个培养器皿中再次重复,第三个培养器皿的工作体积比所述第二个培养器皿的工作体积更大。

22.已根据如权利要求1和5 - 21中任一项中的方法生产的细胞用于生产生物学试剂的用途。

23.一种在含有在培养基中的微载体的培养器皿中生产贴壁细胞的方法,根据这种方法通过在单个培养器皿中进行连续细胞传代,所述生产的细胞量增加 ≥ 60 倍。

用于培养贴壁细胞的方法

[0001] 本申请是国际申请日为2010年12月21日、国际申请号为PCT/FR2010/052850、进入国家阶段的申请号为201080064525.1、发明名称为“用于培养贴壁细胞的方法”的PCT申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明的主题是用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法将贴壁细胞引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体,并且在这个相同器皿中执行数次连续细胞传代,每次使用先前细胞传代的所有或部分细胞群体用于执行下一次细胞传代。本发明还涉及这种方法用于生产生物学试剂特别是用于制备疫苗或药物的用途。

背景技术

[0003] 在20世纪80年代,在微载体上的细胞培养技术的开发促进贴壁细胞的大规模生产和因而生物学试剂的生产。然而,旨在用于生产用于药学用途的生物学试剂的贴壁细胞的生产必须遵循特定数目的管理规定,特别是:禁止使用超过特定数目的“细胞传代”的贴壁细胞的那种,因为存在细胞的形态学和/或生物转化的危险。这特别是对于Vero系细胞的情况。

[0004] US 4,664,912描述了在用于由源于工作细胞库的细胞种子产生一批贴壁细胞的工业规模上使用的方法。它基于细胞传代的连续,其每次在不同生物反应器中发生,所述生物反应器的工作体积经过连续细胞传代的方法增加。这使得每次能够增加微载体的量,同时维持培养基中微载体的最佳浓度,这一般在1 - 5 g/l之间。细胞生物量因此经过连续细胞传代的方法增加,直至获得细胞的所需工业分批。在已借助于用胰蛋白酶处理使贴壁细胞从微载体中脱离,且随后通过将血清蛋白质或血清引入培养基内封闭酶的作用,进行细胞从一个生物反应器到另一个生物反应器的转移,以便保存尽可能多的细胞完整性。随后将获得的细胞悬液转移(在使用的微载体的存在或不存在下)到更大的生物反应器内,其含有更大量的新微载体。然而,贴壁细胞的工业生产的这种方法需要大量材料的使用和处理,其对生物学试剂的生产成本具有作用。

[0005] 为了减少关于用于生产生物学试剂的贴壁细胞的生产成本,EP 1060241提出了更快速的生产方法,其不再需要从来自工作库的细胞种子再次起始,每次需要产生细胞的工业分批。该方法由下述组成:在每次细胞传代后,将大多数细胞(80 - 90%的细胞生物量)转移至一个或多个其他生物反应器中,以便继续细胞生物量的扩增且构成细胞的工业生产分批,同时维持剩余10 - 20%的细胞,以便保持“饲养细胞”原种,由其可以生产细胞的新的分批。然而,这种方法具有下述缺点:

- 生产的细胞分批显示特定异质性,在它们并非全部具有相同数目的细胞传代的范围来说;

- 在每次转移操作时在培养中的“饲养”细胞原种的维持不可避免地导致细胞的“衰老”,这与执行的细胞传代数直接关联,并且因此由于已提及的规定原因仅可以在有限时

间段使用。

[0006] 为了免除蛋白水解酶,例如对于细胞的完整性有害的胰蛋白酶,Ohlson等人在Cytotechnology(1994),第14卷,第67-80中,描述了用于在不存在任何酶促处理的情况下贴壁细胞从微载体至微载体转移(珠至珠转移)的技术。在由贴壁细胞覆盖的微载体和裸露微载体之间的紧密接触促进细胞转移到裸露微载体上,由其可以扩增细胞。为了增加细胞生长,裸露微载体因此加入培养基中,所述培养基含有由贴壁细胞覆盖的微载体,并且进行培养基的间歇搅拌,以便促进微载体之间的接触。然而,生产的细胞群体是“失去同步性”,因为细胞处于细胞周期的不同阶段,这对于生产生物学试剂可以是重大缺点。

[0007] 仍存在最佳化贴壁细胞的大规模生产以及由其衍生的生物学试剂生产的方法的需要,以便减少生产成本。

发明内容

[0008] 为此,本发明的主题是:

用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法:

- a. 将贴壁细胞引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体;
- b. 通过在这个相同培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,其中执行在第一次细胞传代后的每次细胞传代:
 - i. 在已对细胞群体实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体;和
 - ii. 通过引入培养基和增加量的微载体;和
- c. 在已对所述细胞群体任选实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,收获在末次细胞传代期间生产的细胞群体。

[0009] 本发明的目的还是:

用于生产由贴壁细胞生产的生物学试剂的方法,根据该方法:

- a. 将贴壁细胞引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体;
- b. 通过在这个相同培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,其中执行在第一次细胞传代后的每次细胞传代:
 - i. 在已对所述细胞群体实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体,和
 - ii. 通过引入培养基和增加量的微载体;
- c. 以这样的方式处理在末次细胞传代期间生产的细胞群体,从而使得它生产生物学试剂,所述处理在与用于扩增细胞相同的培养器皿中进行;和
- d. 收获生物学试剂。

[0010] 根据用于生产生物学试剂的方法的一个方面,所述生物学试剂是传染剂,并且细胞群体的处理通过用在感染培养基中的所述传染剂感染在末次细胞传代时产生的细胞群体来执行。

[0011] 根据一个特定方面,传染剂是狂犬病病毒,并且感染培养基是不含动物来源的任何产物的病毒感染培养基。

[0012] 一般地,在相同培养器皿中执行的细胞传代数目的是2、3或4。

[0013] 在第一次细胞传代过程中在培养基中的微载体浓度一般是 $< 1 \text{ g/l}$,且优选 $\leq 0.5 \text{ g/l}$ 。

[0014] 非常优选地,酶促处理采用含有蛋白水解酶例如胰蛋白酶的溶液。

[0015] 依照根据本发明的方法的另一个方面,通过增加培养基的体积,进行在第一次细胞传代后的每次细胞传代。

[0016] 优选地,第一次细胞传代在这样的培养基体积中执行,所述培养基体积是培养器皿工作体积的1/5至一半。

[0017] 在根据本发明的方法的另一个实施方案中,培养基不含动物来源的血清。

[0018] 优选地,培养基不含动物来源的产物。

[0019] 根据另一个方面,培养基中的蛋白质浓度是 $\leq 15 \text{ mg/l}$ 。

[0020] 根据另外一个方面,培养基还含有细胞保护剂。

[0021] 优选地,细胞保护剂是聚乙烯吡咯烷酮或泊洛沙姆。

[0022] 依照根据本发明的方法的另外一个实施方案,培养器皿是生物反应器,其具有在3 - 3000升之间、优选在20 - 1000升之间、且特别优选在20 - 500升之间的工作体积。

[0023] 在另外一个实施方案中,培养器皿是一次性使用的生物反应器。

[0024] 在根据本发明的方法的一个特定方面,贴壁细胞是Vero细胞。

[0025] 一般而言,收获的细胞群体含有的细胞量为最初引入培养器皿内的细胞量至少60倍。

[0026] 在另一个方面,本发明涉及用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法:

a. 将贴壁细胞的原种解冻,随后

b. 对解冻的贴壁细胞实施本发明的方法的一个实施方案。

[0027] 在另外一个方面,本发明涉及用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法,在根据本发明的方法在第一个培养器皿中已生产贴壁细胞后:

a. 在已对所述细胞群体实施酶促处理以便使细胞从微载体中脱离后,将收获的细胞群体转移到第二个培养器皿内,所述第二个容器具有更大的工作体积,且包含含有比在第一个培养器皿中执行的末次细胞传代期间存在的微载体量更大量的微载体的培养基,和

b. 本发明的方法的一个实施方案在该第二个器皿中实施。

[0028] 在一个特定方面,根据本发明的方法的一个实施方案在第三个培养器皿中重复,该第三个培养器皿具有比第二个培养器皿的工作体积更大的工作体积。

[0029] 本发明还涉及已根据本发明的方法生产的细胞用于生产生物学试剂的用途。

[0030] 最后,它涉及在含有在培养基中的微载体的培养器皿中用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法,通过在单一相同的培养器皿中进行连续细胞传代,生产的细胞量增加 ≥ 60 倍。

具体实施方式

[0031]

本发明涉及用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法,为了扩增细胞且形成细胞的工业分批,在单一相同的细胞培养器皿中执行数次连续细胞传代。借助于这种方法,减少待使用的培养器皿的数目,并且产生的细胞分批是同质的,因为它们都具有相同数目的细胞传代。

这种方法也用作生物学试剂的生产。

[0032] 为了本发明的目的,“细胞传代”在使贴壁细胞的悬液与培养基中的微载体接触时开始,并且通常在通过酶促处理使贴壁细胞从其微载体中释放时结束,并且再次以培养基中的悬液的形式。细胞传代通常包含下述期:

- 微载体建群期,其对应于在其方法中细胞已与附着至微载体的在培养基中的微载体接触的时间段;

- 附着至微载体的细胞的扩增期,其对应于在这样的时间段,在其中细胞在微载体上繁殖,直至由细胞覆盖的建群微载体的可用表面超过70%,且优选超过80%。当细胞已覆盖建群微载体的超过70%可用表面时,认为贴壁细胞是“基本上汇合的”或已达到“汇合阶段”;和

- 借助于酶促处理的基本上汇合的细胞从微载体中的脱离期,从而使得最大量的细胞在短时间间隔中(一般而言小于30分钟且通常在小于20分钟的时间段内)从其载体中脱离(一般而言超过80%且优选超过90%)。细胞群体这时为基本上以从其微载体中释放的(或从其微载体中脱离的)细胞悬液的形式。

[0033] 在本发明的情况下,取决于产生的贴壁细胞的用途,在培养器皿中执行的末次细胞传代包含或不包含脱离期。

[0034] 在本发明的背景下,在单一相同的培养器皿中进行连续细胞传代,通过使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体以执行下一次细胞传代。在先前细胞传代期间获得的细胞群体的至少80%通常用于进行下一次细胞传代。优选地,为了产生最大量的细胞,通过每次使用在先前细胞传代期间获得的整个细胞群体执行连续细胞传代,以进行下一次细胞传代。尽管,在每次细胞传代结束时,借助于酶促处理使细胞从其微载体中释放(脱离),但不进行现有技术中推荐的将细胞生物量转移到一个或多个其他细胞培养器皿内,以继续细胞扩增。细胞生物量的扩增在本文中在单一相同的培养器皿中进行。该方法是非常有利的,因为等量细胞在相同时间段中产生,而无需使用且处理数个培养器皿,这减少生产工业量的细胞所需的空间,且因而大量减少生产成本。令人惊讶的是,尽管细胞生物量的扩增需要在每次细胞传代时的酶促处理,但在实施根据本发明的方法结束时产生的细胞量显著大于使用常规的所谓“微载体至微载体转移”技术获得的细胞量(参考实施例2)。

[0035] 对应于在第一次细胞传代后的细胞传代的每次新细胞传代在相同培养器皿中执行。为了起动在第一次细胞传代后的传代,引入培养基和比在先前细胞传代中引入的微载体量更大的微载体,以便增加可用的细胞载体表面。应当理解术语“新细胞传代”或“在第一次细胞传代后的传代”指示在培养器皿中进行的细胞传代后的细胞传代。还应当理解微载体引入或加入培养器皿内对应于裸露微载体的引入。优选地,使用未使用过的微载体,以便促进贴壁细胞的附着。虽然通常培养基的体积在第一次细胞传代后的每次传代时伴随增大,但微载体量的增加一般按比例大于培养基体积中的增加,这一般导致在连续细胞传代方法中在培养基中微载体浓度中的逐渐增加。在末次细胞传代期间,当例如在名称 cytodex™ (Cytodex™ 1、2或3) 下销售的右旋糖酐微珠用作微载体时,培养基中的微载体浓度一般在1 - 7 g/l之间,但可以达到10 - 15 g/l。根据其,通过在单一相同的培养器皿中的连续细胞传代增加细胞生物量的本发明方法称为“合为一体方法 (procédé all-in-one)” (参见图1b)。

[0036] 通常在同一个培养器皿中执行2次细胞传代、3次细胞传代或4次细胞传代。取决于

由其进行的后续用途,在实施根据本发明的方法结束时收集的细胞群体以从其微载体中释放的细胞悬液的形式(在这种情况下,末次细胞传代通过包括的细胞脱离步骤执行),或以附着至微载体的细胞悬液的形式(在这种情况下,末次细胞传代通过忽略细胞脱离步骤执行)。当用于生产贴壁细胞的方法包括在单一相同的培养器皿中进行的2次连续细胞传代时,根据本发明的方法相当于实施下述步骤:

- a. 将培养基、微载体和贴壁细胞引入培养器皿内,
- b. 对细胞实施允许其在微载体上附着且增殖的培养条件,
- c. 借助于酶促处理使细胞从微载体中脱离,并且任选从培养器皿中取出部分细胞,
- d. 再次引入培养基和微载体,从而使得引入的微载体量大于先前引入的微载体量,
- e. 再次对细胞实施允许其在微载体上附着且增殖的培养条件,和
- f. 在已任选借助于酶促处理使细胞从其微载体中脱离后收获获得的细胞群体,步骤a)至e)在单一相同的培养器皿中进行。

[0037] 步骤a)至c)对应于第一次细胞传代,并且步骤d)至f)对应于以细胞收获而结束的第二次细胞传代。

[0038] 当存在在相同器皿中进行的超过2次连续细胞传代时,这相当于在实施收获细胞的步骤f)前,在相同培养器皿中在步骤e)后再次重复步骤c)、d)和e)。通常,步骤c)、d)和e)在步骤e)后重复一次,这对应于进行3次连续细胞传代,或步骤c)、d)和e)在步骤e)后重复二次,这对应于进行4次连续细胞传代。优选地,当细胞基本上汇合时,实施步骤c(其对应于细胞从其微载体中脱离)。通常,每次加入微载体时,还增加培养基的体积(步骤d)。

[0039] 当在实施根据本发明的方法结束时收获的细胞群体用于形成细胞原种时,末次细胞传代一般包含借助于酶促处理脱离细胞的步骤,这一般在相同培养器皿中执行。细胞群体随后基本上以从其微载体中脱离的细胞悬液的形式。

[0040] 当细胞群体用于生产生物学试剂时,末次细胞传代通常不包括细胞脱离步骤而执行。以附着至微载体的细胞悬液形式产生的细胞群体随后在相同培养器皿中直接进行处理,从而使得它产生目的生物学试剂。术语“生物学试剂”意指可以通过贴壁细胞产生的任何物质或生物。这些特别是病毒或蛋白质(抗体、抗原、酶等)。当用于生产通过贴壁细胞生产的生物学试剂的方法包括在相同培养器皿中进行的2次连续细胞传代时,根据本发明的方法因此相当于实施下述步骤:

- a. 将培养基、微载体和贴壁细胞引入培养器皿内,
- b. 对细胞实施允许其在微载体上附着且增殖的培养条件,
- c. 借助于酶促处理使细胞从微载体中脱离,并且任选从培养器皿中取出部分细胞,
- d. 再次引入培养基和微载体,从而使得新引入的微载体量大于先前引入的微载体量,
- e. 再次对细胞实施允许其在微载体上附着且增殖的培养条件,
- f. 以这样的方式处理获得的细胞群体,从而使得它生产生物学试剂,和
- g. 收获生物学试剂,步骤a)至f)在单一相同的培养器皿中进行。

[0041] 当存在在相同器皿中进行的超过2次连续细胞传代时,这相当于在实施生产生物学试剂的步骤f)前,在相同培养器皿中在步骤e)后再次重复步骤c)、d)和e)。通常,步骤c)、d)和e)在步骤e)后重复一次,这对应于进行3次连续细胞传代,或步骤c)、d)和e)在步骤e)后重复二次,这对应于进行4次连续细胞传代。优选地,当细胞基本上汇合时,实施步骤c(其

对应于细胞从其微载体中脱离)。通常,每次加入微载体时,还增加培养基的体积(步骤d)。

[0042] 当它是生产重组蛋白质例如细胞因子、抗体或疫苗蛋白质的问题时,将细胞悬液置于通过使用受调节的生产培养基促进这种蛋白质生产的培养条件下。例如,提及EP 0354129中描述的培养基用于通过CHO和Vero细胞的重组蛋白质生产。

[0043] 当生物学试剂是传染剂时,在一般已用感染培养基替换培养基后,通过将传染剂(细菌、病毒、寄生虫等)引入培养器皿内感染附着至微载体的细胞悬液。传染性生物学试剂可以特别是重组病毒(重组痘病毒、重组腺病毒),或病毒例如狂犬病病毒、流感病毒、脊髓灰质炎病毒等。生物学试剂通常通过在一次或多次取出培养上清液进行收获 - 参见实施例7。当生物学试剂更恰当地是细胞内的时,如在非裂解性病毒的情况下,收获上清液和细胞通常是有利的,所述细胞随后用裂解试剂进行处理。

[0044] 用于生产生物学试剂的培养基,特别是用于生产病毒例如狂犬病病毒的感染培养基,可以有利地不含动物来源的血清,动物来源的蛋白质,或甚至动物来源的任何产物。

[0045] 适合于本发明的主题的微载体通常以微珠的形式,所述微珠优选是无孔的,以便促进酶的作用。它们具有一般在90 - 250 μm 之间的直径。它们的密度略微高于培养基的密度,以便促进其通过简单沉降的回收,但同时它不应太高,以在对培养基实施中等搅拌后获得微珠的完全重悬浮。在标准培养条件下,微载体的密度通常在1.020 - 1.050 g/ml之间。微珠的表面这样进行选择,以便促进细胞的附着。微载体的基质优选是非刚性的,以便当在微珠之间发生碰撞时,提供细胞的更佳保存。用于细胞附着的平均可用表面通常在4000 - 5000 cm^2/g 微珠之间。这些特征特别对于在名称cytodex™(cytodex 1、cytodex 2、cytodex 3)下销售的,具有交联右旋糖酐基质的微珠上发现,但还可以对于其基质基于交联聚苯乙烯的其他微珠(Biosilon, Solohill)或玻璃微珠(Sigma Aldrich)上发现。

[0046] 在本发明的背景下,特别是当cytodex™微珠例如cytodex™ 1微珠用作微载体时,在第一次细胞传代过程中的微载体浓度一般减少至浓度 $<1 \text{ g/l}$,然而,在现有技术中,微载体以1 - 5 g/l 的浓度使用。它通常是 $\leq 0.5 \text{ g/l}$;更具体而言,它在0.1 - 0.4 g/l 之间,且更特别地,它在0.1 - 0.3 g/l 之间。这个浓度事实上对应于在细胞引入培养器皿内后,微载体在培养基中的起始浓度。它因此是 $< 1 \text{ g/l}$,优选 $\leq 0.5 \text{ g/l}$;它特别在0.1 - 0.4 g/l 之间,并且更具体而言,它在0.1 - 0.3 g/l 之间。

[0047] 引入培养器皿内的细胞的起始量进行选择,从而使得超过80%的微载体由细胞建群。为了获得这个建群程度,通常将为培养基中存在的微载体量至少5 - 10倍的细胞的起始量引入培养器皿内。例如,在Vero细胞生产的情况下,引入培养器皿内的细胞的起始量一般在 $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ 细胞/ cm^2 cytodex™微珠之间,这代表约5个细胞 - 50个细胞/微珠。事实上,因为在第一次细胞传代过程中在培养基中的微载体浓度低于现有技术中照常规使用的密度,因而接着而来的是起始细胞浓度也很低。

[0048] 在每次细胞传代结束时,通过用具有蛋白水解活性(蛋白酶)的酶溶液处理细胞,在短时间段内(一般而言小于30分钟且优选小于15分钟)使细胞从微载体中脱离。在本发明的背景下,细胞通常从用于执行连续细胞传代的培养器皿中的微载体中脱离,这意指所有细胞培养阶段和在连续传代过程中对细胞执行的所有处理在单一相同的培养器皿中进行。任选可以在已将细胞转移到在其中发生酶促处理的第二个器皿内后,使其从微载体中脱离,并且随后将获得的细胞悬液再引入在其中发生连续细胞传代的单个培养器皿内。这种

方法是不利的,因为它导致在转移操作期间的细胞丧失。

[0049] 蛋白水解酶溶液通常含有丝氨酸蛋白酶,例如胰蛋白酶、pronase®或dispase®。当微载体是cytodex 3微珠时,还可以使用木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶或胶原酶。胰蛋白酶溶液通常用于使贴壁细胞从cytodex™微珠中脱离。优选地,蛋白酶具有非动物来源,这指示它已通过使用不使用动物来源的材料的方法产生。它例如使用植物材料,通过化学合成,或通过使用细菌、酵母、真菌或植物的遗传重组产生。例如可以使用在商品名称TrypLE™ Select或TrypLE™ Express下由Invitrogen销售的,不含动物来源的任何产物的酶溶液。其蛋白质序列在W0 94/25583中描述的这种蛋白酶通过尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) DSM 2672菌株的发酵产生,或通过遗传重组产生。它具有类似于胰蛋白酶的酶促活性。为了促进细胞的脱离,结合钙离子的螯合剂例如EDTA、EGTA或柠檬酸盐可以加入酶溶液中,或任选地,贴壁细胞可以在执行酶促处理前用螯合剂进行处理。在培养基中蛋白酶和任选地螯合剂的浓度以及在其下进行细胞的酶促处理的温度(通常在20 - 38℃之间)进行设定,从而使得超过80%的细胞在短时间段内(≤30 分钟)从其载体中脱离。在严格意义上的酶促处理前,一般取出至少一半体积的培养基。通常取出约2/3体积的培养基。随后通过向培养基中加入一般具有肽或蛋白质起源的抑制剂中和蛋白水解活性,所述抑制剂中和蛋白酶的作用。优选地,抑制剂的组成不含动物来源的任何污染物。这种抑制剂是例如重组抑肽酶、或含有源于大豆或利马豆的胰蛋白酶抑制剂的提取物或纯化馏分(Worthington Biochemical)。培养基一般在细胞从微载体中的脱离期自始至终保持搅拌,但除了在取出培养基时的时期期间外。

[0050] 获得的细胞悬液一般使用常规计数系统进行定量,所述常规计数系统还测定细胞活力。尽管当已存在太多的细胞生长时,可以从培养器皿中取出部分细胞群体,但整个细胞群体通常用于起始在第一次细胞传代后的细胞传代,其在相同器皿中发生。为了提高在连续传代方法中的细胞生物量,必须在第一次细胞传代(其在使用酶促处理的细胞脱离步骤后开始)后的每次传代开始时,将比先前引入的微载体量更大量的微载体引入培养器皿内。如果在连续细胞传代过程中维持相同体积的培养基,那么这相当于增加在第一次细胞传代后的每次细胞传代时的微载体浓度。另一方面,如果培养基体积在每次新细胞传代时以相同比例增加,那么在连续细胞传代方法中可以维持相同微载体浓度。非常优选地,在第一次细胞传代后的每次细胞传代起动时,同时提高在培养器皿中的培养基体积和微载体浓度,以便获得细胞的最大限度扩增。作为指示,在每次新细胞传代时,细胞在培养基体积中进行培养,所述培养基体积是在先前传代时在其中含有细胞的体积的1.2 - 3倍之间。同样地,在每次新细胞传代时,培养基中的微载体浓度是在先前细胞传代时存在的浓度的2 - 10倍之间。在本发明的背景下,在每次细胞传代结束时(即在细胞脱离步骤结束时)取出使用的微载体通常不是有用的。即使所述微载体可以通过细胞再建群,但在计算在每次细胞传代开始时待引入的微载体量中一般不考虑来源于先前细胞传代的使用过的微载体量。细胞与微载体的附着期一般持续1 - 10小时之间,取决于细胞类型。在附着期后,在已允许微载体沉降后,可以有利地除去取出所有或部分培养基并且用新培养基替换它,以便加速附着至微载体的细胞的增殖。

[0051] 适合于本发明的主题的培养基可以是补充有动物来源的血清的常规细胞培养基。有利地,培养基既不含有血清也不含有血清蛋白质。培养基可以特别不含动物来源的任何

蛋白质或甚至动物来源的任何产物。术语“动物来源的蛋白质或产物”意指其生产方法包括其中使用源于动物或人的材料的至少一个步骤的蛋白质或产物。特别有利地,用于培养细胞的培养基可以不含任何蛋白质,或可以含有极少量的以重组蛋白质形式的蛋白质或从植物(大豆、稻等)或酵母中提取的蛋白质。它们最通常含有极低浓度的低分子量蛋白质(≤ 10 KD)(也称为多肽)。在这些培养基中的总蛋白质浓度一般是通过Bradford方法测量的 ≤ 15 mg/l。这特别是对于由InVitrogen销售的VP SFM培养基的情况,其适合于根据本发明的方法,特别是用于培养Vero细胞。还提及培养基Opti Pro™无血清(InVitrogen)、Episerf(InVitrogen)、Ex-cell® MDCK(Sigma-Aldrich)、Ex-Cell™ Vero(SAFC biosciences)MP-BHK®无血清(MP Biomedicals)、SFC-10 BHK无表达血清(Promo cell)、SFC-20 BHK无表达蛋白质(Promo cell)、HyQ PF Vero(Hyclone ref. SH30352.02)、Hyclone SFM4 Megavir、MDSS2培养基(Axcell biotechnology)、Iscove改良DMEM培养基(Hyclone)、Ham's营养培养基(Ham -F10、Ham-F12)、Leibovitz L-15培养基(Hyclone)、Pro Vero培养基(Lonza)和Power MDCK培养基(Lonza),其不含动物来源的任何产物且含有少数蛋白质或不含蛋白质。

[0052] 当培养基不含动物血清、血清蛋白质或具有总蛋白质浓度 < 15 mg/l(Bradford)时,一般加入保护细胞不受在搅拌培养基时施加的剪切力的细胞保护剂。最通常使用的细胞保护剂一般具有表面活性剂性质。它们特别是乙烯醇聚合物,也称为聚乙烯醇(PVA)、乙二醇聚合物,也称为聚乙二醇(PEG)、1-乙烯基-2-吡咯烷酮聚合物,也称为聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、或其为具有化学式 $H_0(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$ 的环氧乙烷和环氧丙烷的“嵌段共聚物”的泊洛沙姆,根据该式,a指示环氧乙烷单位数目,并且b指示环氧丙烷单位数目。这些细胞保护剂在培养基中一般以0.001% - 2%(p/v)的浓度范围使用。在特别优选的细胞保护剂中,可以提及泊洛沙姆188和PVP。泊洛沙姆188具有约8400道尔顿的平均分子量,并且在培养基中以通常在0.05 - 0.2%(p/v)之间的浓度使用。还推荐PVP,因为它刺激细胞生长,如WO 01/40443中描述的那样。PVP一般以在20 KDa - 360 KDa之间的平均分子量范围使用,优选以在20 KDa - 40 KDa之间的平均分子量范围,在培养基中一般在0.01% - 2%(p/v)之间的浓度,且优选在0.05% - 0.5%(p/v)之间的浓度。PVP还可以不再仅借助于其分子量而是根据其K值进行表征,所述K值考虑到PVP的平均分子量以及该平均值的两方面的分子量中的变动。对于K值的计算,提及如论文Cryobiology,8,453-464(1971)中定义的等式:K值根据下式基于PVP的1%溶液的相对粘度进行计算:

$$\log \eta_{rel}/C = 75K_0^2/(1+1.5 K_0C) + K_0$$

$$K = 1000 K_0$$

C代表以克PVP/100 ml培养基表示的PVP浓度。

[0053] η_{rel} 是与溶剂的粘度相比较的溶液粘度。

[0054] 适合于本发明的主题的PVP具有一般在18 - 60之间、优选在26 - 35之间的K值。作为指示,为了根据本发明的方法生产Vero细胞的原种,基于由Invitrogen销售的VPSFM的培养基(其含有以0.1%(p/v)浓度具有约K值30的PVP或以0.1%(p/v)浓度的泊洛沙姆188作为细胞保护剂)可以用作不含动物来源的任何产物且具有极低蛋白质含量(通过Bradford方法 < 15 mg/l)的培养基。

[0055] 通常,培养基的组成在连续细胞传代过程中是相同的,但根据需要,提供营养补充物例如葡萄糖和/或谷氨酰胺可以证明是有用的。在连续细胞传代过程中,在细胞增殖期

中,根据由细胞需要,更新所有或部分培养基也可以是有用的。这由本领域技术人员做主借助于常规测试方法进行评价,例如葡萄糖、谷氨酰胺、乳酸盐、铵离子水平的测量。在本发明的背景下,培养基一般用正好足以使微载体持久保持悬浮于培养基中的强度连续搅拌,但除了当除去所有或部分培养基时。

[0056] 在第一次细胞传代过程中培养基的体积通常占培养器皿工作体积的一半至1/5。在具有大容量的培养器皿(超过100升的生物反应器)的情况下,其中该培养器皿的特定构造(例如,配备锥形底部沉降区带的生物反应器)允许附着至微载体的细胞在小体积中培养,培养基的体积可以更小(生物反应器工作体积(volume utile)的1/6 - 1/10)或甚至更小,并且仅占生物反应器的1/20工作体积。如先前指示的,培养基体积一般在连续细胞传代期间是增加的,末次细胞传代通常在对应于器皿工作体积的至少70%的培养基体积的存在下进行。

[0057] 培养器皿配备搅拌系统(机械、借助于空气流等),其允许使微载体维持悬浮于细胞培养基中,并且设有根据培养需要用于更新培养基的工具和/或用于控制且调节温度、pH、氧压力、任选排出氮或空气、和代谢产物或营养素(乳酸盐、葡萄糖、谷氨酰胺、铵离子等)的工具。这些装置是本领域技术人员众所周知的,所述技术人员知道如何根据使用的器皿大小和构造来使用它们。例如,根据本发明的培养器皿可以为搅拌烧瓶形式(旋转器)或生物反应器的形式。当器皿的工作体积是 ≥ 2 升时,通常使用可以照常规为可重复使用的玻璃槽或金属槽形式的生物反应器,或当生物反应器是一次性使用的生物反应器时,以在名称Nucleo PG-ATMI™下特别由P. Guerin销售的一次性使用的袋形式的器皿。例如,还可以使用由General Electrics销售的Biowave系统(Wave Bioreactor™)、以Bioreactor™可得的STR系统(Sartorius)、SUB™系统(Hyclone)、或细胞预备系统(Millipore)。在根据本发明的方法的背景下,其主要目的是在工业规模上生产细胞分批,使用其工作体积是3升 - 1000升之间的生物反应器,但更一般地,使用其工作体积是20升 - 500升之间的生物反应器。

[0058] 为了本发明的目的,“贴壁细胞”是作为系建立的细胞或直接来自动物或人、健康或肿瘤组织的提取的细胞,其在使用的培养条件下,需要固体载体以便繁殖且正常发育。由于接触抑制现象,它们通常在其载体上形成单细胞层。事实上因此排除这样的细胞,其在使用的培养条件下,不需要固体载体用于其繁殖且可以在培养基中悬浮生长。贴壁细胞系可以衍生自健康或肿瘤细胞的原代培养物,但还可以通过使用永生化试剂的细胞转化获得,如对于PER.C6系的情况。

[0059] 作为适合于本发明主题的贴壁细胞系的例子,提及鼠细胞系例如3T3、NTCT或WEHI系,仓鼠细胞系例如BHK系(特别是BHK21系)或CHO系,犬科细胞系例如MDCK系,猪科细胞系例如PK15系,牛科细胞系例如MDBK系,猿猴细胞系例如Vero、LLC-MK2、FRHL2或MA104系,和人细胞系例如MRC5、293、PER.C6、Hela、ECV或A 431系。当这些贴壁细胞系预期用于重组蛋白质生产时,它们还可以为由重组载体(例如质粒、病毒等)转染的系的形式。

[0060] 由于根据本发明的方法,通过在单一相同的培养器皿中进行连续细胞传代,贴壁细胞的群体增加至少40倍,优选至少60倍且特别优选至少100倍。这是可实现的,因为根据本发明的方法使得能够使在这个单个器皿中进行的连续细胞传代期间的细胞载体表面积增加5 - 40倍、优选10 - 30倍。在现有技术方法中,这个级别的细胞扩增通过使用至少2个

器皿观察到,但更一般不同大小的3个培养器皿(参见实施例5)。根据本发明的方法是非常有利的,因为与用现有技术方法获得的相同的工业量的细胞也在相同时间段内产生,同时减少与培养器皿使用和维持相关的成本和用于产生这些细胞分批所需的空間。

[0061] 根据本发明用于生产贴壁细胞的方法可以有利地通过将细胞直接引入细胞培养器皿内进行,所述细胞正好已解冻,无需求助于通常推荐的适应期,在此期间执行一次或多次“适应”细胞传代,以便使细胞“适应于”更困难的培养条件,例如在培养基中浓度 ≤ 0.5 g/l的cytodex™微珠的存在下的培养,和/或在不含有血清或含有极少蛋白质(≤ 15 mg/l)的培养基中的培养。在物质情况下,根据本领域技术人员众所周知的程序解冻贴壁细胞的原种,并且随后将解冻细胞的悬液直接引入培养器皿内,所述培养器皿含有在培养基中的微载体,以便进行如本发明中所述的方法。如先前指示的,特别是当cytodex™微珠用作微载体时,在第一次细胞传代过程中在培养基中的微载体浓度一般减少至 ≤ 0.5 g/l浓度;它一般在 $0.1 - 0.4$ g/l之间,且更具体而言它在 $0.1 - 0.3$ g/l之间。培养基不再需要含有血清或血清蛋白质。培养基可以甚至完全不含蛋白质,或具有极低的总蛋白质含量(≤ 15 mg/l)。冷冻细胞的原种可以来源于安培瓶(在这种情况下,细胞的量一般相对很低, $10^7 - 5 \times 10^8$ 细胞)或有利地来源于含有最高多100倍细胞的袋。特别地加速大规模细胞生产方法,因为解冻袋的内容物可以直接接种到大容量的培养器皿内。

[0062] 当已使用本发明的方法生产的贴壁细胞的原种不足够时,通过将细胞群体转移到下述培养器皿内,可以进一步增加已使用单一相同的细胞培养器皿获得的细胞生物量:

- o 到一个或多个培养器皿内,从该培养器皿照常规进行连续细胞传代,即在每次细胞传代后,通过将获得的细胞生物量转移到另一个更大的培养器皿内;或更有利地,

- o 到第二个培养器皿内,其具有大得多的工作体积(一般大至少10倍,最通常比第一个器皿大 $10 - 50$ 倍之间),且将根据本发明的方法再次应用于已转移到该第二个器皿内的细胞。通过如此操作,用于生产细胞的工业分批的培养器皿数目以及需要的空間甚至更明显地减少。

[0063] 为了评估在贴壁细胞的工业规模生产的背景下实施根据本发明的方法的经济优点,可以参考用于工业生产用于生产脊髓灰质炎病毒的Vero细胞的常规方案,其如Reviews of Infectious Diseases,第6卷,supplement 2,S341-S344(1984)中所述的。常规方案包含5次连续细胞传代,第一次在1升生物反应器中进行,第二次在5升生物反应器中,第三次在20升生物反应器中,第四次在150升生物反应器中,并且最后第五次在1000升生物反应器中。由于根据本发明的方法,可以在单个20升生物反应器中执行前3次细胞传代,且随后通过将细胞转移到150升生物反应器内和随后转移到1000升生物反应器内照常规执行后2次传代。还可以将根据本发明的方法重复2次(在单个20升生物反应器中执行前3次细胞传代,并且随后将获得的细胞直接转移到单个500升或1000升生物反应器内,在其中执行后2次细胞传代)。在这2种情况下,在相同时间段内产生具有与当应用常规方案时获得的那种相同级别的细胞量,但在第一种情况下,节省2个生物反应器(1升和5升),并且在第二种情况下,节省3个生物反应器(1升、5升和150升)(参考实施例5)。

[0064] 从经济观点来看特别有利的贴壁细胞的生产方法在于在非常不同大小的2个培养器皿中重复根据本发明的方法。为此,本发明的主题因此是:

用于生产贴壁细胞的方法,根据该方法:

a. 将贴壁细胞引入第一个培养器皿内,所述第一个培养器皿含有在培养基中的微载体;

b. 通过在该第一个培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,其中进行在第一次细胞传代后的每次细胞传代,每次使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体和该细胞群体的细胞借助于酶促处理已从微载体中脱离,并且每次加入培养基和增加量的微载体;

c. 在已借助于酶促处理使细胞从微载体中脱离后,收获在该第一个培养器皿中进行的末次细胞传代期间获得的细胞群体;

d. 将收获的细胞群体转移到第二个培养器皿内,所述第二个培养器皿具有更大的工作体积,且其包含的培养基含有比在第一个培养器皿中执行的末次细胞传代期间存在的微载体量更大量的微载体;

e. 通过在该第二个培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,其中进行在第一次细胞传代后的每次细胞传代,每次使用在先前细胞传代期间获得的所有或部分细胞群体和该细胞群体的细胞借助于酶促处理已从微载体中脱离,并且每次加入培养基和增加量的微载体;

f. 在任选已借助于酶促处理使细胞从微载体中脱离后,收获在该第二个培养器皿中进行的末次细胞传代期间获得的细胞群体,和任选地,

g. 步骤d至f在具有甚至更大的工作体积的第三个培养器皿中再次重复。

[0065] 一般而言,第二个培养器皿的工作体积是第一个培养器皿的工作体积的20 - 50倍。

[0066] 有利地,在方法的步骤a)中引入的贴壁细胞来源于冷冻细胞的原种,其正好在引入到第一个培养器皿内之前解冻。

[0067] 还可以重复根据本发明的方法用于生产生物学试剂。为此,本发明的主题因此是:由附着至微载体的细胞生产的生物学试剂的生产方法,根据该方法:

a. 将贴壁细胞引入第一个培养器皿内,所述第一个培养器皿含有在培养基中的微载体;

b. 通过在该第一个培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,其中进行在第一次细胞传代后的每次细胞传代,每次使用在先前细胞传代期间生产的所有或部分细胞群体和细胞群体的细胞借助于酶促处理已从微载体中脱离,并且每次加入培养基和增加量的微载体;

c. 在已借助于酶促处理使细胞从微载体中脱离后,收获在该第一个培养器皿中进行的末次细胞传代期间获得的细胞群体;

d. 将收获的细胞群体转移到第二个培养器皿内,所述第二个培养器皿具有更大的工作体积,且包含的培养基含有比在第一个培养器皿中执行的末次细胞传代期间存在的微载体量更大量的微载体;

e. 通过在该第二个培养器皿中执行数次连续细胞传代来扩增细胞,在其中进行每次新细胞传代,每次使用在先前细胞传代中生产的所有或部分细胞群体和该细胞群体的细胞借助于酶促处理已从微载体中脱离,并且每次加入培养基和增加量的微载体;

f. 处理在该第二个培养器皿中进行的末次细胞传代期间生产的细胞群体,使得它们

生产生物学试剂,其中所述步骤f)在与用于进行步骤d)和e)的相同的培养器皿中进行;和
g. 收获生物学试剂。

[0068] 任选地,在处理细胞群体前,步骤d)和e)可以在第三个培养器皿中重复,从而使得它生产生物学试剂。

[0069] 如先前指示的,生产的生物学试剂可以是例如重组蛋白质或病毒,例如狂犬病病毒。

[0070] 本发明的主题还是已借助于根据本发明的方法之一生产的细胞用于生产生物学试剂的用途。

[0071] 最后,本发明涉及用于在包含微载体的培养基中生产贴壁细胞的方法,根据该方法在单一相同的培养器皿中进行连续细胞传代,以便使细胞群体增加 ≥ 40 倍,优选 ≥ 60 倍,且特别优选 ≥ 120 倍。使用的培养器皿优选是具有至少20升的工作体积的生物反应器。

[0072] 如已在本发明的背景下指示的培养基可以是补充有血清的常规培养基,但优选地培养基不含动物来源的血清。特别优选地,使用不含动物来源的任何产物和其蛋白质浓度是 ≤ 15 mg/l的培养基。

附图说明

[0073] 图1代表借助于连续细胞传代来扩增附着至微载体的细胞的2种方法:a)根据常规方法,在具有增大工作体积的不同培养器皿中进行连续细胞传代,和b)依照根据本发明的方法(合为一体方法),在单一相同的培养器皿中进行连续细胞传代。细胞在阶段0时为冷冻形式。步骤0 \rightarrow 1对应于解冻细胞转移到生物反应器内。步骤1对应于第一次细胞传代。步骤1 \rightarrow 2对应于在用蛋白水解酶处理(以便使细胞从微载体中脱离)后,在第一次细胞传代结束时获得的细胞群体的转移,在方法a)的情况下,转移到具有更大工作体积的第二个生物反应器内,或在方法b)的情况下,转移到相同培养器皿内。步骤2对应于第二次细胞传代。在方法b)的情况下,第二次细胞传代一般在更大的培养基体积中和在更高的微载体浓度的存在下进行。步骤2 \rightarrow 3对应于在用蛋白水解酶处理(以便使细胞从微载体中脱离)后,在第二次细胞传代结束时获得的细胞群体的转移,在方法a)的情况下,转移到具有更大工作体积的第三个生物反应器内,或在方法b)的情况下,转移到相同培养器皿内。步骤3对应于第三次细胞传代。在方法b)的情况下,第三次细胞传代一般在比第二次细胞传代期间更大的培养基体积中和在更高的微载体浓度的存在下进行。

[0074] 图2代表通过实施a)“合为一体”方法或b)“珠至珠转移”方法(关于操作条件参考实施例2)的Vero细胞培养8天后,在显微镜(放大倍数X20)下微珠的外观。

[0075] 借助于用于举例说明本发明然而并不限制其内容的下述实施例,本发明将得到更明确理解。

[0076] 实施例1:通过在单一相同的2升生物反应器中进行3次连续细胞传代的Vero细胞扩增

在这个实施例中,研究不同参数例如起始微载体浓度、在培养基中血清的存在或不存在和细胞保护剂的性质对细胞生长的作用。

[0077] 1.1)使用的材料

生物反应器:

实验在名称Cell ready (Mobius) 下由Millipore销售的,具有2.4升容量的一次性使用的生物反应器中进行。它们配备pH探针、 pO_2 探针和温度探针和船舶推进器类型搅拌桨。

[0078] 微载体:

使用由GE Healthcare供应的Cytodex 1微珠。在已取出对于进行每次细胞传代所需的量后,将微珠在磷酸盐缓冲液($1\times C$ PBS, $pH\approx 7.4$)中水合24小时。随后将它们在相同缓冲液中清洗3次,并且随后通过高压灭菌进行灭菌。正好在引入生物反应器内之前,在沉降微珠后将灭菌缓冲液替换为等体积的培养基。1 g微珠代表约 4400 cm^2 的附着面积。

[0079] 测试的培养基

VPSFM/K30: VPSFM培养基(Invitrogen),无血清和不含动物来源的产物,补充有由ISP供应的0.1% p/v聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K30。

[0080] VPSFM/F68: VPSFM培养基(Invitrogen),无血清和不含动物来源的产物,补充有由BASF供应的0.1% p/v泊洛沙姆188。

[0081] VPSFM/K30/SVF: 补充有4%去补体胎牛血清的VPSFM/K30培养基。

[0082] 细胞:

来源于细胞库的Vero细胞以冷冻形式以在含有10%二甲亚砜的无血清培养基中以 50×10^6 细胞/ml贮存于用于冷冻细胞的管(Nunc管商品号(référence): 430663, 5ml)中。

[0083] 1.2) 用于评估关于在“合为一体方法”中起始微载体浓度和细胞保护剂的参数的操作方案。

[0084] 相同操作方案已用于研究这2个参数。

[0085] 测试0.1 g/l和0.3 g/l的浓度,以评估在第一次细胞传代过程中的极低微载体浓度对Vero细胞生长的作用。

[0086] 在已调整生物反应器的调节参数例如pH在7.2-7.4、温度在 37°C 和 pO_2 在 $\approx 25\%$ 后,将在含有0.6 g微载体的2升VPSFM/K30培养基中的 66×10^6 细胞引入生物反应器1(bio 1)内(其等价于 $25\ 000$ 细胞/ cm^2 附着面积的量,并且代表0.3 g/l的起始微珠浓度)。

[0087] 将在含有0.2 g微载体的2升VPSFM/K30培养基中的 22×10^6 细胞引入生物反应器2(bio 2)内,其等价于 $25\ 000$ 细胞/ cm^2 附着面积的量,并且代表0.1 g/l的起始微珠浓度)。

[0088] 细胞培养持续时间自始至终,对培养基实施持续搅拌,但除了在微珠沉降期中(用于更新培养基或减少培养基体积)外。

[0089] 在第3天(J3)时,根据下述方案用胰蛋白酶处理所述细胞:

在沉降微珠后,将 $\approx 300\text{ ml}$ VPSFM/K30培养基留在生物反应器中,且随后加入在不含钙和镁的磷酸盐缓冲液中含有600 mg重组胰蛋白酶(商品号:Roche 04618734)的 $\approx 300\text{ ml}$ 0.025M柠檬酸钠溶液。将培养基维持在中等搅拌下。在已借助于测试样品验证细胞已完全脱离后,(一般而言,这种脱离在15 - 30分钟时期中发生),通过加入含有1 mg/ml胰蛋白酶抑制剂(商品号:Sigma T6522)的 $\approx 300\text{ ml}$ VPSFM/K30溶液来停止胰蛋白酶的作用。在细胞计数后,除去部分细胞悬液,以使得:该剩余细胞量使得在2升培养基总体积中引入2.4 g微载体(bio 1)或0.6 g微载体(bio 2)后,存在约 25×10^3 细胞/ cm^2 附着面积,以进行第二次细胞传代。随后再次如在第一次细胞传代过程中地调整所述调节参数。在4 - 6小时后,将培养基替换为新培养基,并且随后任选在培养24 - 48小时后更新第二次。在第7天

(J7)时,细胞根据与在第3天(J3)时使用的相同的方案再次受胰蛋白酶作用。在细胞计数后,也除去部分细胞悬液,以使得:该剩余细胞量使得在2升培养基总体积中引入6 g微载体(bio 1)或2.4 g微载体(bio 2)后,存在约 25×10^3 细胞/cm²附着面积,以进行第三次细胞传代。随后再次调整生物反应器调节参数。在4 - 6小时后,将培养基替换为新培养基,其随后任选在培养24 - 48小时后更新第二次。在第10天(J10)时,收获细胞以便根据培养器皿中的起始微载体浓度评估细胞扩增的强度。

[0090] 为了评估细胞保护剂的作用,通过使用相同操作方案且用0.3 g/l的起始微载体浓度测试泊洛沙姆188和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K30。

[0091] 1.3) 用于评估在“合为一体方法”中血清的作用的操作方案。

[0092] 使用与前面部分中所述的相同的操作方案,使用下述特征:

-测试VPSFM/K30/SVF培养基,

-起始微载体浓度是0.3 g/l,

-在第5天(J5)和第8天(J8)时进行胰蛋白酶处理。在每次胰蛋白酶处理前,借助于包括搅拌、沉降和去除清洗缓冲液的连续步骤,将微珠的悬液用600 ml清洗缓冲液(磷酸盐缓冲液(PBS 1×C))“清洗”3次,以便去除血清。

[0093] 1.4) 结果

为了评估所研究的不同参数对细胞生长的作用,使用Nucleocounter (Chemometec®)计数系统以规律间隔测量细胞浓度,并且确定累计细胞代的数目。每次,获取微珠悬液的2个样品。指示的值代表对于分析的每个时间点获取的2个样品的平均值。

[0094] 在培养过程中观测到的细胞量和累积细胞代的数目根据所研究的每个参数在下表3中给出。

[0095] 1.4.1) “起始微载体浓度”参数

天	起始微载体浓度: 0.1 g/l		起始微载体浓度: 0.3 g/l	
	细胞量 × 10 ⁶	累积细胞代的数目***	细胞量× 10 ⁶	累积细胞代的数目
第0天	22	0	66	0
第3天*	159	2.85	450	2.60
第3天**	66	2.85	264	2.60
第4天	144	3.98	522	3.58
第5天	267	4.87	1053	4.60
第6天	690	6.24	1905	5.45
第7天*	822	6.47	3243	6.21
第7天**	375	6.47	1077	6.21
第10天	2028	8.90	3150	7.76

*:在胰蛋白酶处理前;

**::在胰蛋白酶处理和细胞浓度调整至 25×10^3 细胞/cm²附着面积后;

***:对于累积细胞代数目的计算,考虑到在连续细胞传代方法中作出的可能的细胞浓度调整且使用下述通式:

$$\text{代的数目} = \frac{\log_{10} \{ \text{最终 [细胞] / 起始 [细胞]} \}}{\log_{10} 2}$$

最终 [细胞]:对应于在考虑当天的细胞浓度

起始 [细胞]:对应于在第0天时的起始细胞浓度

即使在3次连续细胞传代后产生的细胞量在生物反应器(其中起始微载体浓度是0.1 g/l)中更小,但另一方面,细胞群体倍增时间在这个生物反应器中略微更快,因为观察到的累积细胞代的数目在测试持续时间自始至终更高。

[0096] 令人惊讶的是,在第一次细胞传代过程中的极低微载体浓度(≈ 0.1 g/l)对细胞生长没有负面影响。相反的是,细胞具有比当它们在含有更高微载体浓度(0.3 g/l)的生物反应器中时更活跃地分裂的趋势。

[0097] 1.4.2) “细胞保护剂”参数

天	保护剂: PVP (K30)		保护剂: 泊洛沙姆 188	
	细胞量 $\times 10^6$	累积代的数目	细胞量 $\times 10^6$	累积代的数目
第 0 天	66	0	66	0
第 3 天*	450	2.60	558	3.08
第 3 天**	264	2.60	264	3.08
第 4 天	522	3.58	357	3.46
第 5 天	1053	4.60	909	4.84
第 6 天	1905	5.45	1215	5.26
第 7 天*	3243	6.21	2763	6.44
第 7 天**	1077	6.21	819	6.44
第 10 天	3150	7.76	4029	8.73

*:在胰蛋白酶处理前

**::在胰蛋白酶处理和细胞浓度调整至 25×10^3 细胞/cm²附着面积后

结果显示将泊洛沙姆188或PVP (K30) 加入到无血清培养基中对根据合为一体方法进行的细胞扩增具有总体等价作用。

[0098] 1.4.3) “血清”参数

天	具有血清的培养基 (VPSFM/K30/SVF)	
	细胞量 $\times 10^{6**}$	累积代的数目
第0天	66	0
第4天	993	3.91
第5天*	1371	4.38
第5天**	264	4.38
第6天	375	4.79
第7天	1098	6.40
第8天*	1956	7.25
第8天**	528	7.25
第11天	2289	9.33
第12天	3242	9.83

*:在用胰蛋白酶处理前

**:在用胰蛋白酶处理后。

[0099] 这些结果显示“合为一体”方法也可应用于在含有血清的培养基中培养的附着至微载体的细胞。

[0100] 实施例2:通过使用根据本发明的方法(“合为一体方法”)或通过使用经由微载体的简单添加的方法(所谓“珠至珠转移”技术)获得的Vero细胞生产的比较

在根据“合为一体方法”或使用“珠至珠转移”技术进行的2次连续细胞传代后比较了细胞生产。

[0101] 所述研究在名称Quattro下由Sartorius销售的具有4升容量的玻璃生物反应器中进行。它们配备pH、pO₂和温度探针和搅拌桨。

[0102] 2.1) 用于实施“合为一体方法”的操作方案

对于“合为一体方法”，应用与部分1.2中所述的相同的原理，具有下述特征：

–使用的培养基是VPSFM/K30培养基。

[0103] –培养基的体积在2次连续细胞传代期间保持恒定且是4升。

[0104] –使用0.3 g/l的微珠浓度和通过引入这样的细胞量进行第一次细胞传代，该细胞量使得存在50 000细胞/cm²附着表面。

[0105] –培养基在第3天时更新。

[0106] –在第4天时，根据与部分1.2中所述的相同的程序用胰蛋白酶处理细胞。在细胞受胰蛋白酶作用和计数后，除去2/3的细胞悬液体积，以便在4升培养基总体积中引入4.8 g微珠(即1.2 g/l的浓度)后，调整剩余细胞量为25 000细胞/cm²附着表面，以进行第二次细胞传代。

[0107] -将培养基更新2次:第一次在微珠引入后4 - 6小时且随后第二次在第6天时。

[0108] -在第8天时,将细胞收获且计数,以便评估细胞扩增的强度。还在显微镜下分析微珠悬液的等分试样,以便评估微珠由细胞覆盖的程度。

[0109] 2.2) 用于实施“珠至珠转移”方法的操作方案

应用与部分2.1中所述的相同的操作方案,但除了细胞在第4天时不用胰蛋白酶进行处理外。在第4天时,除去2/3的微珠悬液体积,以便除去相同比例的细胞和微珠,以便处于与“合为一体”方法中使用的那些相同的培养条件下。随后在4升细胞培养基总体积中引入含有4.8 g cytodex 1(即1.2 g/l的浓度)的微珠悬液。操作方案随后与部分2.1中所述的相同。

[0110] 2.3) 结果

为了比较在测试的2种方法期间的细胞生长,根据与部分1.4中所述的相同的程序以规律间隔测量细胞浓度。

[0111] 在培养过程中观测到的细胞量和累积细胞代的数目在下表中给出,

天	“合为一体”方法		“珠至珠转移”方法	
	细胞量 × 10 ⁶	累积代的数目	细胞量 × 10 ⁶	累积代的数目
第0天	264	0	272	0
第1天	456	0.79	416	0.61
第2天	792	1.58	832	1.61
第3天*	1508	2.51	1536	2.50
第3天**	456	2.51	476	2.50
第5天	1592	4.32	932	3.47
第6天	2532	4.99	1236	3.87
第7天	3048	5.25	1400	4.05
第8天	5420	6.09	2652	4.98

*: 在细胞浓度调整前

** : 在细胞浓度调整和任选的胰蛋白酶处理(在“合为一体”方法的情况下)后

在第一次细胞传代过程中(第0天至第3天),细胞生长在2个生物反应器中是相似的。另一方面,在第二次细胞传代过程中(第3天至第8天),在其中进行“珠至珠转移”技术的生物反应器中的细胞扩增弱得多。在第8天时,收获的细胞量是在其中进行“合为一体”方法的生物反应器中收获的细胞量的大约一半。关于累积细胞代的数目的变化的结果沿着相同方向发展。在第8天时,对于根据合为一体方法扩增的细胞,累积细胞代的数目是> 6。它对于根据“珠至珠转移”技术扩增的细胞是5。根据“合为一体”方法扩增的细胞因此更活跃地繁殖。这些结果是令人惊讶的,因为“合为一体”方法需要使用已知对于细胞完整性是有害的胰蛋白酶,以便保证细胞的连续细胞传代。

[0112] 这些结果在相同操作条件下进行的2个独立试验中已得到证实。关于在第8天时累积细胞代的数目的方差分析显示出显著差异(p=0.0137)。

[0113] 当进行合为一体方法时,在第8天时微珠的显微镜检查分析显示绝大多数微珠由细胞覆盖(参见图2a)。另一方面,当进行“珠至珠转移”技术时,仅部分微珠由细胞覆盖。在第4天时加入cytodex 1微珠后,培养基的连续搅拌或培养基的间歇搅拌(通过重复例如包含搅拌5分钟随后为20分钟静止期的2小时周期)基本上不改变结果(参见图2b)。

[0114] 实施例3:通过在单一相同的20升生物反应器中进行2次连续细胞传代的Vero细胞扩增

3.1) 使用的材料

生物反应器:

使用在名称Nucleo-20下由ATMI销售的一次性使用的袋形式的20升生物反应器。根据标准ATMI方案,在已校正且随后通过高压灭菌进行灭菌后,将pH、pO₂和温度探针借助于“探针支撑(probe holder)”袋而安装在所述袋上:将一方面定位于袋上且另一方面定位在探针支撑上的Kleenpack®连接相连,并且随后通过如此产生的连接将探针引入生物反应器内。

[0115] 微载体:由GE Healthcare供应的cytodex 1微珠(参考部分1.1)。

[0116] 培养基:VPSFM/K30 培养基(参考部分1.1)。

[0117] 细胞:Vero细胞(参考部分1.1)。

3.2) 操作方案

将6升VPSFM/K30培养基引入Nucleo-20内,并且随后加入含有4 g cytodex 1的1升微珠悬液(其代表在加入细胞后0.5 g/l的起始微珠浓度)。在已调整在Nucleo-20内的调节参数例如温度在37°C、pH在7.2-7.4和pO₂在≈25%,并且对培养基实施中等搅拌以便将微珠悬浮于培养基中后,在解冻后将500 × 10⁶ 细胞引入Nucleo-20内,且吸收到1升VPSFM/K30培养基。操作方案持续时间自始至终,对培养基实时连续搅拌,但除了在进行微珠沉降阶段以便更新培养基或减少培养基体积外。

[0119] 在第2天时(在置于培养中后2天),将培养基替换为新VPSFM/K30培养基。

[0120] 在第5天时,根据下述方案使细胞受胰蛋白酶作用:

停止搅拌、pH调节和pO₂调节。仅维持温度调节。在微珠沉降后,将≈ 3升VPSFM/K30培养基留在生物反应器中,且随后加入在不含钙和镁的磷酸盐缓冲液中含有600 mg重组胰蛋白酶(商品号:Roche 04618734)的≈ 3升0.025M柠檬酸钠溶液。将培养基再次中等搅拌。在已通过提取测试样品验证细胞已很好脱离后(一般而言,这种脱离在15 - 30分钟时期中发生),通过加入含有1 mg/ml胰蛋白酶抑制剂(商品号:Sigma T6522)的≈ 3升VPSFM/K30溶液来停止胰蛋白酶的作用。随后在已用VPSFM/K30培养基将培养基体积调整至20升后,加入含有28 g cytodex 1的微珠悬液,这代表在培养基中约1.4 g/l的微珠浓度。随后再次如第一次细胞传代过程中调整在Nucleo-20内的调节参数。在微珠引入后4 - 6小时后,将培养基替换为新培养基。用新培养基的第二次培养基替换在第7天(J7)时进行。在第9天(J9)时,细胞是基本上汇合的。它们随后根据与在第5天(J5)时使用的相同的方案受胰蛋白酶作用。由获得的细胞悬液测定在相同生物反应器中进行的在2次细胞传代后获得的细胞扩增水平。

3.3) 结果

为了测量获得的细胞扩增水平,根据与部分1.4中所述的相同的程序以规律间隔测量

细胞浓度。

[0122] 在培养过程中观测到的细胞量和浓度在下表I中表示，

培养天数	培养体积	在培养基中的细胞 浓度(细胞/ml)	在载体上的细胞浓 度(细胞/cm ² 微珠)	细胞量 × 10 ⁶
第0天	8L	48100	21875	385***
第1天	8L	73500	33400	588
第2天	8L	79500	36136	636
第5天*	8L	235000	213600	3760
第5天**	20L	145500	23600	2910
第6天	20L	195000	31650	3900
第7天	20L	474000	76950	9480
第8天	20L	807000	131000	16140
第9天	20L	1313000	213000	26260

*:在胰蛋白酶处理前

**：在胰蛋白酶处理和细胞附着后

***：代表接种的活细胞的起始量。

[0123] 在相同20升生物反应器中进行2次连续细胞传代后，细胞群体在培养9天后增加68倍，而细胞载体的表面增加7倍。

[0124] 实施例4：通过在单一相同的20升生物反应器中进行3次连续细胞传代的Vero细胞扩增

4.1) 使用的材料

使用的材料等同于在实施例3的程序中描述的材料。

[0125] 4.2) 操作方案

根据与部分3.2中所述的相同的方案进行细胞传代，但具有下述变动：

-通过将 250×10^6 细胞引入含有2 g cytodex 1微珠的8升VPSFM/K30培养基内(这代表0.25 g/l的微珠浓度)，进行第一次传代；

-在第5天(J5)时，在第一次胰蛋白酶处理后，为了进行第二次细胞传代，在已用VPSFM/K30培养基将培养基体积调整至13升后，加入含有14 g cytodex 1的微珠悬液，这代表约1.07 g/l的微珠浓度。

[0126] -在第9天(J9)时，在第二次胰蛋白酶处理后，为了进行第三次细胞传代，在已用VPSFM/K30培养基将培养基体积调整至20升后，加入含有60 g cytodex 1的微珠悬液，这代表约3 g/l的微珠浓度。

[0127] 在第12天(J12)时，细胞是基本上汇合的。它们随后根据与在第5天(J5)时使用的那种相同的方案受胰蛋白酶作用。

[0128] 使用获得的最终细胞悬液测量在相同生物反应器中执行的3次细胞传代后获得的细胞扩增水平。

[0129] 4.3) 结果

在培养过程中观测到的细胞量和浓度在下表中表示，

培养天数	培养体积	在培养基中的细胞浓度 (10^6 细胞/ml)	在载体上的细胞浓度 (细胞/cm ² 微珠)	细胞量 $\times 10^9$
第 0 天	8	0.038	30230	0.26
第 1 天	8	0.026	20684	0.18
第 2 天	8	0.051	40572	0.36
第 5 天*	8	0.12	95465	0.84
第 5 天**	13	0.072	11688	0.93
第 6 天	13	0.143	23214	1.85
第 7 天	13	0.241	39123	3.13
第 8 天	13	0.414	67207	5.38
第 9 天*	13	0.743	120616	9.65
第 9 天**	20	0.346	25064	7.72
第 10 天	20	0.537	34870	10.74
第 11 天	20	1.016	65974	20.32
第 12 天	20	1.649	107077	32.98

*: 在胰蛋白酶处理前

**: 在胰蛋白酶处理和细胞附着后。

[0130] 在相同20升生物反应器中进行Vero细胞的3次连续细胞传代后，细胞群体在培养12天后增加126倍，而细胞载体的表面增加30倍。

[0131] 实施例5：使用根据本发明的方法（在单一相同的生物反应器中进行连续细胞传代）或常规细胞扩增方法（每次在更大尺寸的不同生物反应器中进行连续细胞传代）的Vero细胞生产比较

5.1) 操作方案

通过根据实施例4中描述的方案在单个20升生物反应器中进行3次连续细胞传代且使用直接来源于冷冻细胞库的 250×10^6 细胞的起始量，或在不同不锈钢生物反应器中的3次连续细胞传代（第一个在2升生物反应器中，第二个在7升生物反应器中，并且第三个在28升生物反应器中），研究且比较Vero细胞的生产。使用的常规方法的实验条件如下：

通过经由将 40×10^3 细胞/cm²附着表面引入2升VPSFM/K30培养基内执行在Cell Factory (CF10) 中的起始传代，使解冻后的Vero细胞首先适应于其培养条件。在培养约5天后，在受胰蛋白酶作用步骤后收获所获得的细胞群体。将收获的细胞群体用于接种具有2升工作体积的生物反应器，其含有在2升VPSFM/K30培养基中的2 g cytodex 1微珠悬液（浓度1 g/l）。在已控制且调整调节参数后，如为37℃温度、在7.2-7.4的pH和在 $\approx 25\%$ 的pO₂，并且对培养基实施中等搅拌，平均起来用 220×10^6 细胞接种2升生物反应器。在第3天时，将培养基替换为新培养基。在第4天时，将基本上汇合的细胞受胰蛋白酶作用，且与使用的微载

体一起转移到含有7升VPSFM/K30培养基的7升生物反应器内,向其中预先加入14 g cytodex 1微珠,这代表约2 g/l的微珠浓度。在第6天时,将培养基替换为新培养基。在第8天时,将基本上汇合的细胞受胰蛋白酶作用,且随后以相同方式转移到含有28升VPSFM/K30培养基的28升生物反应器内,向其中预先加入70 g cytodex 1微珠,这代表约2.5 g/l的微珠浓度。在第10天时,将培养基替换为新培养基。在第11天时,将基本上汇合的细胞受胰蛋白酶作用并且随后收获且计数。

[0132] 5.2) 结果

为了监控在2种所测试的方法期间的细胞生长,根据与部分1.4中所述的相同的程序以规律间隔测量细胞浓度。

[0133] 在培养过程中观测到的细胞量和扩增水平在下表中给出,

天	“合为一体”方法 1 个单个 20 升生物反应器		常规方法 3 个生物反应器 (4、7 和 28 升)	
	细胞量 $\times 10^6^*$	扩增水平	细胞量 $\times 10^6^{**}$	扩增水平
第 0 天	253		220	
第 1 天	162	0.64	446	2.03
第 2 天	300	1.18	874	3.97
第 4 天	832	3.29	2017	9.17
第 5 天	1024	4.05	1499	6.59
第 6 天	1426	5.64	2763	12.56
第 7 天	2448	9.68	4494	20.43
第 8 天	4242	16.77	7251	32.96
第 10 天	10740	42.45	16567	75.30
第 11 天	20320	80.32	32056	145.71
第 12 天	29140	115.18		

*: 表达的量是已进行的8次不同实验获得的平均值;

** : 表达的量是已进行的3次不同实验获得的平均值。

[0134] 使用“合为一体”方法,在已将平均起来253百万直接解冻的细胞引入20升生物反应器内后,在培养12天后平均起来获得超过290亿细胞,即115的细胞扩增平均水平。使用常规方法,在已最初将平均起来220百万细胞引入2升生物反应器内后,在培养11天后平均起来获得320亿细胞,即145的细胞扩增平均水平。可用的细胞载体表面在2种方法中增加30倍,但在常规方法的情况下需要使用3个生物反应器。用常规方法获得的细胞量略微更高。这来自用于实施“合为一体”方法和常规方法的细胞不处于相同生理学条件中的事实。在“合为一体”方法的情况下用于接种20升生物反应器的细胞已正好解冻,而用于接种2升生物反应器的细胞健壮得多,因为它们已在Cell Factory中预先培养。在第1天时的结果非常明确地显示这点;在合为一体方法中,在第1天时细胞数目中约40%的降低是常规“解冻后潜伏”现象的结果。在相同时间段中,已在Cell Factory中预先培养的细胞在常规方法中繁殖

(细胞群体倍增)。尽管在“合为一体”方法中明显不利的起始培养条件,注意到在培养结束时,在2种方法中收获的细胞量之间最后存在极少差距。得出结论如果起始培养条件在测试的2种方法中已是相同的,那么将已获得相同量的细胞和相同的细胞扩增水平。与常规方法相比较,“合为一体”方法因此是非常有利的,因为为了使方法是经济性的,在相同时间段中产生相同量的细胞。

[0135] 实施例6:通过在单一相同的200升生物反应器中进行3次连续细胞传代的Vero细胞扩增

6.1) 使用的材料

除了生物反应器外,在本情况下,该反应器是在名称Nucleo-200下由ATMI销售的200升一次性使用的袋,使用的材料与实施例3中描述的材料相同。

[0136] 6.2) 操作方案

使用的操作方案类似于实施例3中描述的那种,具有下述修改:

在已解冻后,将Vero细胞以 40×10^3 细胞/ cm^2 附着表面和2升培养基/CF10的比例置于2个Cell Factories (CF10)中预先培养。在培养5天后,在胰蛋白酶处理步骤后收获细胞群体,并且随后用于接种Nucleo-200。

[0137] 通过将 2.2×10^9 细胞引入含有25 g cytodex 1微珠的50升VPSFM/K30培养基内(这代表0.5 g/l的微珠浓度),进行在Nucleo-200中的第一次细胞传代。在第3天时,将培养基替换为新培养基。在第4天时,根据实施例3的方案使细胞受胰蛋白酶处理,通过将 ≈ 20 升培养基留在Nucleo中,并且随后加入在含有3000 mg重组胰蛋白酶的 ≈ 20 升0.025M柠檬酸钠溶液(不含钙和镁的磷酸盐缓冲液中)进行。在细胞脱离后,通过加入含有1 mg/ml胰蛋白酶抑制剂的20升VPSFM/K30溶液来停止胰蛋白酶的作用。

[0138] 在已用VPSFM/K30培养基将培养基总体积调整至130升后,通过向获得的整个细胞群体中加入含有130 g cytodex 1的微珠悬液(这代表约1 g/l的微珠浓度),在相同Nucleo-200中进行第二次细胞传代。将培养基更新2次:第一次正好在细胞附着至微珠后,第二次在第6天时。在第7天时,根据在第4天时使用的相同方案再次使细胞受胰蛋白酶处理。

[0139] 通过调整细胞群体进行在相同Nucleo-200中的第三次细胞传代,从而使得在将450 g cytodex 1微珠引入用VPSFM/K30培养基调整至180升的培养基总体积中,存在20000细胞/ cm^2 附着表面的浓度。类似地,将培养基更新2次:正好在细胞附着至微珠后,然后在第10天时。随后定量在相同生物反应器中进行的3次连续细胞传代后获得的细胞群体。因此可以测量细胞扩增水平。

[0140] 6.3) 结果

在培养过程中观测到的细胞量和浓度在下表中表示,

培养天数	培养体积	在培养基中的细胞浓度 (10 ⁶ 细胞/ml)	在载体上的细胞浓度 (细胞/cm ² 微珠)	细胞量 × 10 ⁹
第 0 天	50L	0.038	17580	1.93
第 1 天	50L	0.034	15455	1.71
第 2 天	50L	0.07	31818	3.50
第 3 天	50L	0.147	66818	7.35
第 4 天*	50L	0.162	103000	11.34
第 4 天**	130L	0.114	25900	14.81
第 5 天	130L	0.135	30600	17.55
第 6 天	130L	0.275	62500	35.75
第 7 天*	130L	0.552	125455	71.76
第 7 天 ***	180L	0.212	19273	38.16
第 8 天	180L	0.329	29900	59.22
第 9 天	180L	0.646	58727	116.28
第 10 天	180L	1.1	100000	198
第 11 天	180L	1.5	136364	270

*:在胰蛋白酶处理前

**:在胰蛋白酶处理和细胞附着后

***:在胰蛋白酶处理和细胞群体调整至20 000细胞/cm²附着表面的浓度后。

[0141] 在相同200升生物反应器中进行的Vero细胞的3次连续细胞传代后,细胞群体在培养11天后增加140倍,而细胞载体表面增加18倍。

[0142] 尤其通过在名称Nucleo-500下由ATMI销售的单个500升一次性使用的生物反应器中执行2次连续细胞传代,还进行根据“合为一体方法”的用于Vero细胞扩增的测试。获得的细胞扩增水平相似于用200升生物反应器获得的扩增水平,这明确显示本发明的方法在极大规模上是可采用的。

[0143] 实施例7:使用通过在单一相同的200升生物反应器中进行3次连续细胞传代获得的细胞分批的狂犬病病毒生产

使用与实施例6中所述的相同的方案产生细胞分批。

[0144] 在第11天时,将培养基替换为基于VPSFM的病毒感染培养基,并且随后以0.01的感染复数,用源于Wistar研究所的狂犬病病毒的Pitman Moore毒株感染细胞。将用于细胞培养的关于培养基的温度、pH、pO₂和中等搅拌的相同调节参数保留且调整用于病毒生产。病毒感染培养基在病毒感染后第3天时更新,并且随后收获该培养上清液,以便测量在病毒感染后第7天、第10天和第14天时的感染效价。在每次病毒收获后,再次加入新病毒感染培养基。借助于在BHK21细胞上的常规免疫荧光测试测量培养上清液中的感染效价。对于测试的每种培养上清液制备一系列稀释度,并且随后将每个稀释度分配到96孔板的10个孔内。平

行进行2个系列的测试。随后将BHK21细胞的悬液加入每个孔中。将细胞在37℃在5% CO₂下温育48小时。在48小时后,将孔用细胞层覆盖,所述细胞层随后用丙酮固定。在已去除丙酮且使微板干燥后,加入针对狂犬病病毒的单克隆抗体的50 μl 1/70th稀释度(FDI Fujirebio Diagnostics-Ref 800092)。在温育1小时随后为数次清洗后,在荧光显微镜下分析微板。在至少一个细胞中观察到特异性荧光后,孔被视为阳性的。在不存在狂犬病病毒的情况下培养的BHK21细胞用作阴性对照,和在参照狂犬病病毒毒株的存在下培养的BHK21细胞用作阳性对照。根据Spearman-Kärber方法测定在测试的培养上清液中含有的狂犬病病毒的感染效价,并且以log₁₀细胞培养感染剂量50%(DICC 50)为单位表示。在观测到的培养上清液中获得感染效价是约7.0 log₁₀ DICC 50。

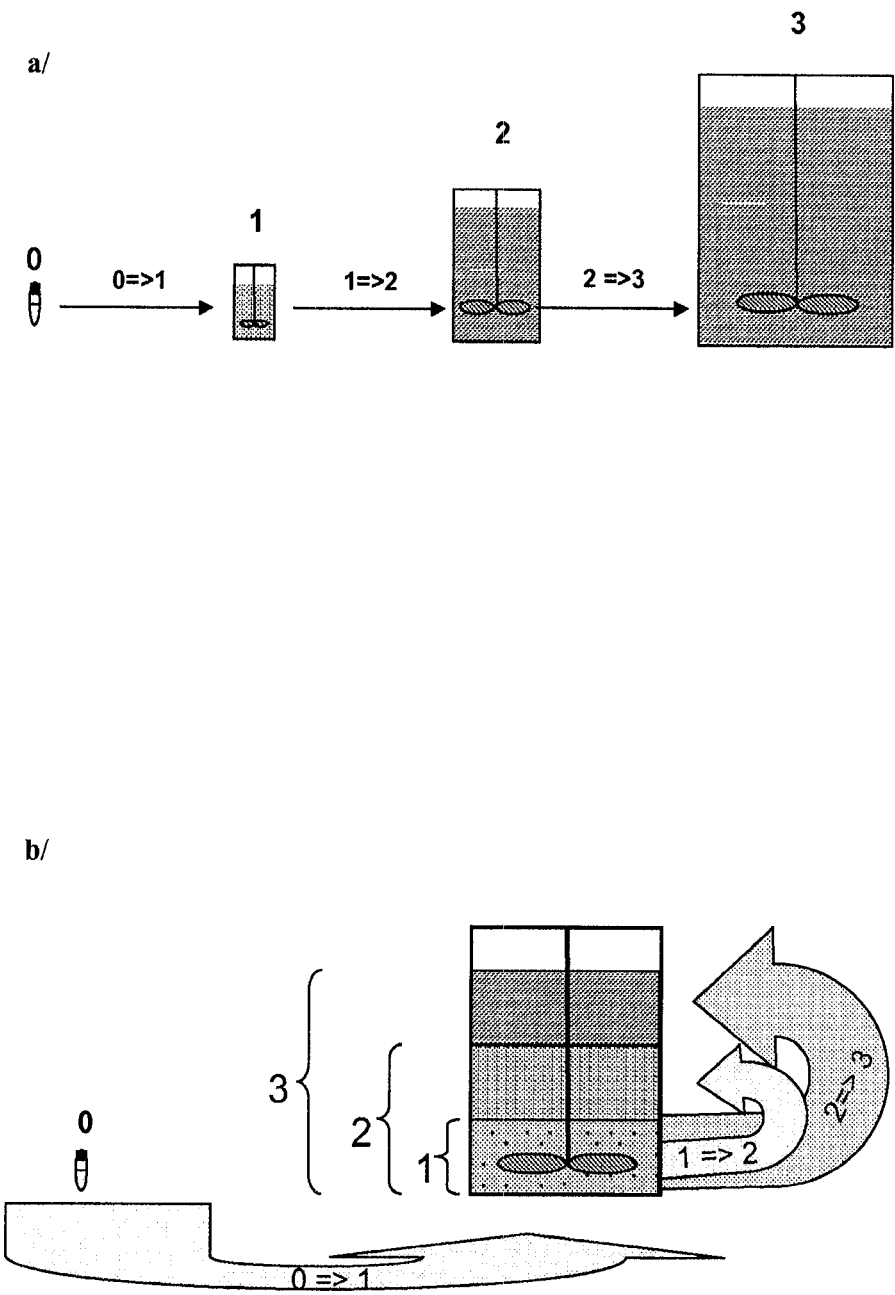
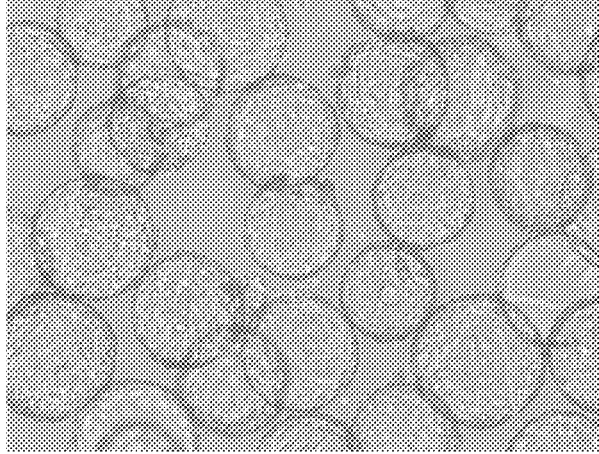


图 1

a)



b)

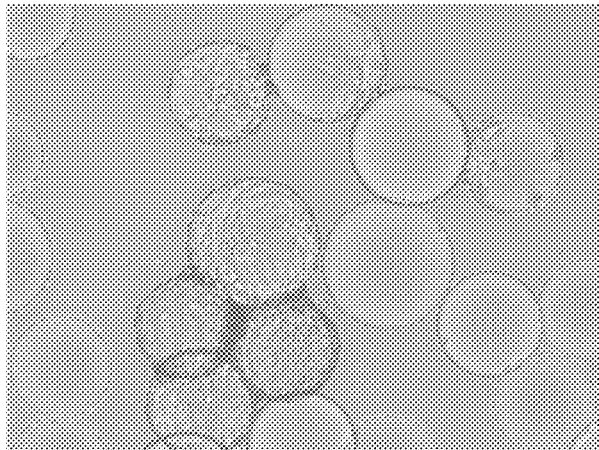


图 2

Abstract

The present invention relates to a process for producing adherent cells, according to which:

a. adherent cells are introduced into a culture vessel which contains microcarriers in a culture medium; b. the cells are amplified by performing several successive cell passages in this same culture vessel, wherein each cell passage subsequent to the first cell passage is carried out: i. using all or part of the cell population that was obtained during the preceding cell passage, after having subjected the cell population to an enzymatic treatment in order to detach the cells from the microcarriers, and ii. by introducing culture medium and an increasing amount of microcarriers; and c. the cell population produced during the final cell passage is harvested after having optionally subjected the cell population to an enzymatic treatment in order to detach the cells from the microcarriers. The present invention also relates to the use of this process for the production of biological agents, in particular for the production of vaccines or drugs.