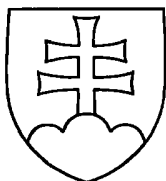


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania: 17.12.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 97204110.7
(32) Dátum priority: 24.12.1997
(33) Krajina priority: EP
(40) Dátum zverejnenia: 11.12.2000
(86) Číslo PCT: PCT/EP98/08522, 17.12.1998

(21) Číslo dokumentu:

965-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

C 12N 5/00
C 12N 7/00

(71) Prihlasovateľ: Duphar International Research B. V., Weesp, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Brands Rudi, Weesp, NL;

(74) Zástupca: Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob prípravy buniek na výrobu biologických materiálov**

(57) Anotácia:
Spôsob prípravy buniek na použitie pri výrobe biologických materiálov pomocou kultivácie buniek až do požadovaného objemu buniek predprodukčnej dávky, keď sa po opakovanom diskontinuálnom procese: a) časť buniek predprodukčnej dávky použije na prípravu najmenej jednej produkčnej dávky a b) zostávajúca časť buniek predprodukčnej dávky sa použije ako inokulum na prípravu najmenej jednej ďalšej predprodukčnej dávky.

Spôsob prípravy buniek na výrobu biologických materiálov

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka spôsobu prípravy buniek na použitie pri výrobe biologických materiálov.

Doterajší stav techniky

Na výrobu biologických materiálov, napríklad bunkových kmeňov, je nevyhnutné nájsť spôsob prípravy veľkých množstiev buniek s použitím postupov zvyšovania množstva v bioreaktoroch.

US patent č. 5 017 490 opisuje taký spôsob zvyšovania množstva, ktorý poskytuje najmä výhodu malého nebezpečia prenosovej kontaminácie. Tento spôsob však nie je vhodný pre bunky závislé na zakotvení (teda pre bunky, ktoré rastú len keď sú zakotvené na substráte) alebo bunky usadené v substráte (napríklad v pórovitých nosičoch).

US patent č. 4 644 912 opisuje spôsob prípravy buniek závislých na zakotvení na prípravu biologických materiálov (to jest vírusov) z inokula a následné pasážovanie uskutočňované pri následne sa zvyšujúcich objemoch bioreaktorov 1 liter, 5 litrov, 25 litrov, 150 litrov a nakoniec buď v 1000 litrovom bioreaktore alebo vo veľkom počte 150 litrových bioreaktorov. Medzi všetkými týmito pasážovacími krokmi sa bunky uvoľnia z nosičov zriedeným roztokom proteázy. Pri poslednom pasážovaní sa uskutoční naočkovanie vírusom.

Berúc do úvahy priemerné časy bunkového cyklu, asi 20 až 24 hodín sa predpokladajú intervaly pasážovania asi každých 3 až 5 dní. Aby sa bunky z pracovnej banky buniek výrobcu (MWCS) rozšírili do dostatočne veľkého objemu kultúry, môže celý proces rastu trvať niekoľko týždňov v závislosti na konečnom objeme bioreaktora.

Pri uvedených spôsoboch prípravy buniek sa každá konečná produkčná dávka musí pripravovať z pracovnej banky buniek výrobcu (MWCS). Na prípravu veľkého množstva biologického materiálu je nevyhnutné použiť niekoľko paralelných kultivačných línií až do najväčších objemov nádob. Tento výrobný postup je časovo veľmi náročný a vyžaduje prácu veľkého počtu bioreaktorov na prípravu buniek ako aj na výrobu biologického materiálu.

Cieľom predloženého vynálezu je poskytnúť oveľa rýchlejší spôsob prípravy buniek na výrobu biologických materiálov.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka spôsobu prípravy buniek na použitie pri výrobe biologických materiálov pomocou kultivácie buniek až do požadovaného objemu buniek predprodukčnej dávky, keď sa pri opakovanom diskontinuálnom procese:

- a) časť bunkovej predprodukčnej dávky použije na prípravu najmenej jednej produkčnej dávky, a
- b) zostávajúca časť bunkovej predprodukčnej dávky použije ako inokulum na prípravu najmenej jednej ďalšej predprodukčnej dávky.

Presnejšie sa predložený vynález týka spôsobu prípravy buniek na použitie pri výrobe biologického materiálu pomocou kultivácie buniek až do požadovaného objemu buniek predprodukčnej dávky, keď sa pri opakovanom diskontinuálnom procese:

- a) časť buniek predprodukčnej dávky prenesie na použitie pri príprave najmenej jednej produkčnej dávky, a
- b) zostávajúca časť buniek predprodukčnej dávky prenesie na použitie ako inokulum na prípravu najmenej jednej následnej predprodukčnej dávky.

Vo výhodnom uskutočnení podľa predloženého vynálezu sa prvá predprodukčná dávka pripraví z pracovného zásobného roztoku

buniek pomocou najmenej jedného pasážovacieho kroku.

V ďalšom výhodnom uskutočnení podľa predloženého vynálezu sú pripravované bunky závislé na zakotvení. V tomto prípade je všeobecne potrebné, aby sa bunky kultivovali na substráte. Je teda vhodné v priebehu opakovaného procesu vždy, keď sa použije časť dávky na prípravu novej dávky, pridať ďalšie množstvo substrátu. Vo výhodnom uskutočnení sa vždy pred pridaním substrátu aspoň časť buniek najskôr uvoľní z ich pôvodného substrátu.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „produkčná dávka“ kultúru buniek, ktorá sa použije na výrobu biologického materiálu.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „predprodukčná dávka“ kultúru buniek, ktorá sa použije pri spôsobe podľa predloženého vynálezu na prípravu najmenej jednej produkčnej dávky (ako je definovaná skôr) a jednej ďalšej predprodukčnej dávky.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „biologický materiál“ akúkoľvek látku alebo organizmus, ktorý sa môže vyrobiť z bunkovej kultúry. Príklady „biologických materiálov“ sú vírusy a proteíny, ako sú enzýmy.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „zásobný roztok inokulačných buniek“ množstvo určitého typu buniek definovaného pôvodu, skladovaných na použitie ako očkovacie médium, z ktorého sa odvodí celá kultúra rovnakého typu buniek.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „bunky závislé na zakotvení“ bunky, ktoré pre svoj vlastný rast a/alebo rozmnožovanie potrebujú byť pripojené k substrátu, ktorý je definovaný podľa vynálezu.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „substrát“ akúkoľvek látku vo forme častíc, vhodnú na pripojenie buniek.

Podľa predloženého vynálezu znamená termín „krok pasážovania“ postupnosť činností pri množení a výrobe buniek, zahŕňajúcu prinajmenšom prenos vhodného množstva buniek a vhodného množstva kultivačného média do produkčnej nádoby, inkubáciu nádoby pri podmienkach vhodných na rast a rozmnožovanie buniek po dobu, ktorá je dostatočná na účinný rast a rozmnožovanie buniek. Krok pasážovania prípadne zahŕňa oddelenie buniek z kultivačného média a/alebo zo substrátu po čase, ktorý je dostatočný na účinný rast a rozmnožovanie buniek.

Odborníkom pracujúcim v tejto oblasti je zrejmé, že spôsob podľa predloženého vynálezu sa zásadne odlišuje od spôsobov známych podľa stavu techniky, keď sa bunky vyrábajú kontinuálnym spôsobom, skôr ako diskontinuálnym spôsobom podľa predloženého vynálezu. Podľa patentovej prihlášky EP 0417531 a WO 89/08701 sa môže kontinuálny kultivačný systém použiť tiež na výrobu vírusov. Bunky najskôr rastú v prvom bioreaktore a potom, ako sa dosiahne určitá hustota buniek, sa bunky kontinuálne naplnia z uvedeného prvého bioreaktora do druhého bioreaktora. V tomto druhom bioreaktore sa vírusy kultivujú na bunkách a potom sa vírusy kontinuálne odoberú z druhého bioreaktora.

Základným pracovným postupom podľa predloženého vynálezu je použitie materského bioreaktora, z ktorého sa plnia produkčné bioreaktory bunkami. Ak sú bunky závislé na zakotvení, je po každom kroku pasážovania výhodne potrebné bunky oddeliť od ich substrátov.

Na tento cieľ sa vyvinul trypsinizačný postup vo veľkých bioreaktoroch. Pri použití takzvanej rozšírenej banky buniek (ECB, „Extended Cell Bank“) sú vlastnosti produkčných buniek definované do špecifického a charakteristického počtu pasáží. Opísaný spôsob umožňuje vysoko výkonnú výrobu, pretože spôsob zväčšovania množstva z WCS (pracovná banka buniek) na produkčné bunky sa môže veľmi skrátiť a je potrebných oveľa menej bioreaktorov, pretože už nie sú potrebné paralelné výrobné

línie.

Na obr. 1 sú zobrazené rôzne uskutočnenia podľa predloženého vynálezu.

Vo výhodnom uskutočnení sa bunky expandujú z jednej ampuly MWCS až na úroveň prvej predprodukčnej dávky prostredníctvom jedného alebo viacerých pasážovacích krokov. Veľkosť bioreaktora používaného na túto predprodukčnú dávku sa môže pohybovať od niekoľkých litrov pracovného objemu do niekoľkých stoviek litrov. Potom sa časť, napríklad 10 až 20% takto expandovaných buniek (napríklad pasáž X), použije na repopuláciu bioreaktora na prípravu ďalšej predprodukčnej dávky (pasáž číslo X+1), zatiaľ čo sa objem buniek prenesie (pasáž X alebo X+1) do bioreaktora väčšej veľkosti, aby sa priamo zahájila výroba alebo aby sa najskôr populoval a potom sa zahájila výroba.

V klasických sériových produkčných líniiach je počet zdvojení počtu buniek odvodených z MWCS vo chvíli zberu do určitej miery vopred známy. Maximálny možný počet generácií produkčného systému je nastavený na začiatku.

Pri spôsobe podľa predloženého vynálezu môže byť maximálny počet pasáží buniek definovaný pomocou ECB (rozšírená banka buniek). Počet produkčných pasáží (počet pasáží buniek použitých pred výrobou biologického produktu) je teda v medziach daných ECB irelevantný. V dôsledku toho by sa mal dodržať maximálny počet pasáží vzhľadom na regulačné obmedzenia. Výsledkom je, že príslušná dávka biologického materiálu je výsledným produktom jedného priameho procesu expanzie.

Aby sa mohlo overiť, či špecifikácie buniek v stupni ECB pri výrobe sú podobné MCB (kontrolná bunková banka), je potrebné vykonať špecifické hodnotenie s ohľadom na charakteristiky rastu, uvoľňovanie náhodilých, vonkajších aj vnútorných činidiel v rôznych krokoch, karyologickú izoenzymovú analýzu a podobne. Keď je taká ECB úplne charakterizovaná, je možné vyrobiť produkt

s bunkami pri akejkolvek pasáži medzi MCB a ECB, pretože je možné predpokladať, že sa bunky neodlíšili od svojich parametrov. Z toho vyplýva, že sa testy na MWCS môžu obmedziť na testovanie sterility. Toto je zvláštna výhoda spôsobu podľa predloženého vynálezu.

Pri maximálnom nastavenom počte pasáží je možné použiť bunky v akomkoľvek medzistupni. Aby sa teda ďalej minimalizoval čas potrebný na expanziu buniek z MWCS do produkčného bioreaktora, môže byť výhodné umožniť hromadné spustenie bunkovej kultúry. Je to možné uskutočniť napríklad nasledujúcim spôsobom:

- bunky sa môžu zastaviť v určitom počte pasáží v priebehu dlhších intervalov pri teplote miestnosti (17 až 32°C) a previesť do logaritmickéj fázy rastu pomocou zvýšenia teploty a zmeny kultivačného média, alebo
- bunky sa môžu zmraziť (teplota menšia ako -80°C) v určitom objeme a roztopiť pred prevedením do vopred stanoveného objemu bioreaktora, čím sa výrazne obmedzí nevyhnutný postup zväčšovania množstva.

Spôsob podľa predloženého vynálezu sa môže uskutočňovať so živočíšnymi bunkovými kultúrami a najmä s bunkami závislými na zakotvení. Vhodnými typmi buniek sú napríklad bunky škrečkov (CHO, BHK-1), bunky myši (Vero), hovadzie bunky (MDBK), psie bunky (MDCK), ľudské bunky (CaCo, A431) alebo bunky hydiny (CEF).

Ako bioreaktor podľa predloženého vynálezu sa môže použiť jedna jednotka alebo viac jednotiek, napríklad miešaných fermentorov, fermentorov s pevným lôžkom, fermentorov s fluidným lôžkom, fermentorov s prevzdušňovaním alebo reaktorov s dutými vláknami.

Skôr uvedené bunky sa môžu, a niektoré by sa dokonca mali, kultivovať pri upevnení na pevný nosič, ako sú mikronosiče alebo

makronosiče v suspenzii, napríklad v pevnom lôžku, fluidnom lôžku alebo v suspenzii alebo ako sú duté vlákna. Bunky sa môžu tiež usadiť v nosiči (napríklad pórovitom nosiči).

Pri spôsobe podľa predloženého vynálezu, najmä keď sa použije pevný nosič, sa bunky uvoľňujú z tohto pevného nosiča. Uvoľnenie sa môže uskutočniť pomocou akéhokolvek známeho spôsobu využiteľného na uvoľnenie buniek z pevného nosiča. Výhodne sa uvoľnenie môže uskutočniť pomocou roztoku proteolytického enzýmu. Prípadne sa pred týmto enzymatickým uvoľňovacím krokom môže uskutočniť jeden alebo viac upravovacích krokov, napríklad opracovaním PBS a/alebo EDTA, s cieľom zvýšiť proteolytickú účinnosť a/alebo s cieľom znížiť množstvo potrebného proteolytického enzýmu.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Uvoľnenie buniek a ich odstránenie z nosičov pred prevedením do ďalšieho bioreaktora

Bunky závislé na zakotvení bunkového kmeňa MDCK sa kultivujú pri 37°C na mikronosiči Cytodex-3 (Pharmacia Uppsala, Švédsko) (5 g nosiča/l) v miešanom štvorlitrovom reaktore („materský bioreaktor“). Rastovým médiom je EpiSerf (Life Technologies, Paisly, Škótsko). Rast pokračuje do maxima 5×10^6 buniek/ml kultúry.

Bunky sa uvoľnia z nosiča pomocou trypsinizácie v roztoku Trypsin-EDTA (Life Technologies, Paisly, Škótsko).

Po usadení nosiča sa 80% uvoľnených buniek prevedie do 3 ďalších bioreaktorov podobnej veľkosti. Všetky tieto „produkčné“ bioreaktory obsahujú nosiče (bunkový substrát), ktoré sa do nich pridávajú dopredu. Bunky sa nechajú repopulovať nosič a následne

sa použijú na výrobu v týchto bioreaktoroch.

Zvyšok buniek v „materskom bioreaktore“ sa nechá repopulovať zostávajúci nosič Cytodex-3 a kultivujú sa do požadovanej hustoty buniek.

Príklad 2

Uvoľnenie buniek bez oddelenia nosičov pred prevedením do ďalšieho bioreaktora

Kultivácia buniek sa uskutočňuje rovnakým spôsobom, ako je opísané v príklade 1, ale po trypsinizácii sa 80% uvoľnených buniek vrátane nosičov prevedie do troch produkčných bioreaktorov. Ďalej sa do všetkých bioreaktorov pridajú vhodné nosiče.

Príklad 3

Uvoľnenie buniek bez oddelenia od nosičov po prevedení do ďalšieho bioreaktora

Kultivácia buniek sa uskutočňuje rovnakým spôsobom, ako je opísané v príklade 1, ale 80% stále zakotvených buniek sa prevedie do bioreaktora podobnej veľkosti, ktorý sa ďalej použije priamo na prípravu produktu.

Zostávajúce bunky na mikronosičoch v materskom fermentore sa potom uvoľnia pomocou trypsinizácie, potom sa pridá ďalší nosič a bunky sa nechajú repopulovať substrát.

Príklad 4

Východiskovým materiálom sú zmrazené zásobné bunky

Pri tomto pokuse sa časť kultúry použije na opätovné dávkovanie materského fermentora a niektorých dcérskych fermentorov a časť kultúry sa použije na zmrazenie buniek do zásoby.

Zmrazené zásobné bunky (celkom $14,4 \times 10^8$ buniek) sa naočku-

jú do východiskovej kultúry v trojlitrovom materskom fermentore obsahujúcom 5 g Cytodexu na liter a médium EpiSerf a potom sa inkubujú pri 37°C. Zostávajúce ochranné látky pri zmrazení sa odstránia pomocou výmeny média v dni 1.

V dni 2 sa uskutoční trypsinizácia, 50% buniek sa zmrazí do zásoby a zostávajúce bunky sa inokulujú na mikronosiče v ďalšom fermentore.

Z tabuľky 1 je vidieť, že bunky medzi dňami 2 a 3 pokračujú v raste normálnou rýchlosťou.

V dni 4 sa obsah materského fermentora uvoľní trypsinom a vsadí sa na nové mikronosiče (10 g/l) v dvoch ďalších fermentoroch za materským fermentorom.

V dni 5 je účinnosť vysiatia asi 85%.

Tabuľka 1

deň	3 litrový mat. fermentor	3 litrový fermentor	3 litrový fermentor
	buniek x 100000/ml	buniek x 100000/ml	buniek x 100000/ml
0	NOD		
1	6,6		
2	14		
3	15,5		
4	30		
5	5,5	10	10
účinnosť vysiatia	85%	85%	85%

Príklad 5

Prevedenie z malého materského fermentora do veľkého produkčného fermentora

Bunky sa expandujú do veľkého meradla v 65 litrovom a 550

litrovom fermentore (pracovný objem 50 litrov a 250 litrov) s použitím hustoty mikronosiča 5 g Cytodexu na liter. Ako je vidieť z tabuľky 2, 90% z celkového množstva buniek sa prevedie do veľkého fermentora z 50 litrového kultivačného fermentora s 800 000 bunkami/ml, z ktorých je 69% životaschopných.

To isté sa pozorovalo v 50 litrovom materskom fermentore; asi 69 % rozmnožovacích buniek sa ukázalo byť životaschopných.

Postup je nasledujúci:

V dni 0 sa nosiče nechajú usadiť v 50 litroch kultúry, potom sa supernatant (kultivačné médium) odstráni a nahradí sa PBS. Obsah fermentora sa 5 až 15 minút trepe. Supernatant sa po usadení nosiča oddelí. Tento krok sa môže v prípade potreby zopakovať.

Potom sa tento krok zopakuje s PBS/EDTA (0,4 g EDTA/liter PBS). Kultivačné médium sa znova trepe 5 až 15 minút, nosiče sa nechajú usadiť, supernatant sa odstráni a opakuje sa krok PBS/EDTA pokiaľ sa bunky nezaoblia a nie sú pripravené na uvoľnenie pomocou trypsínu.

Potom sa k PBS/EDTA pridá trypsín (0,025 % výslednej koncentrácie) a inkubuje sa 5 až 15 minút. Potom sa buď bunky obsahujúce supernatant (po usadení teraz „nahého“ nosiča) prenesú (ako v príklade 9) alebo sa prenesie zmes buniek plus nosičov (celkom 80% celkovej zmesi).

Po prenose buniek do 550 litrového fermentora sa zvyšok buniek (10% životaschopných buniek) nechá repopulovať nosič stále prítomný vo fermentore po opätovnom naplnení 50 litrového fermentora kultivačným médium.

Zistilo sa, že asi 70% buniek je životaschopných.

Tabuľka 2

Deň	50 litrov kultúry	250 litrov kultúry
	buniek x 100 000/ml	buniek x 100 000/ml
0	8 (400 x 10 ⁸ buniek celkom)	1,1 (275 x 10 ⁸ životaschopných buniek)
1		0,8
2		2,9
3		3,4
4		8,9
5		18,0

Príklad 6

Zopakuje sa postup opísaný v príklade 5, ale 80% kultúry buniek viazaných no nosič sa prenesie z materského bioreaktora do produkčného bioreaktora. Produkcia sa zaháji po pridání vírusu.

20% buniek a nosiča zostávajúceho v materskom bioreaktore sa trypsinizuje a uvoľní a po pridání nového substrátu sa materský bioreaktor nechá repopulovať, zatiaľ čo vo fyzicky oddelenom produkčnom bioreaktore prebieha produkcia.

Príklad 7

Kultivácia vo veľkom množstve zahájená zo zásobných zmrazených buniek

Zmrazené zásobné bunky sa roztopia a naočkujú sa do 10 litrového (pracovný objem) fermentora (hustota nosiča Cytodex 5 g/l; kultivačné médium Epi Serf) pri očkovacej hustote 1x10⁶ buniek/ml. Po pripojení sa kultivačné médium vymení, aby sa odstránili zvyšky činidiel ochraňujúcich pri zmrazení.

Po dni 1 je množstvo životaschopných buniek viazaných na

nosiče $0,45 \times 10^6$ buniek/ml, ktoré potom začínajú rásť. Pri hustote $2,8 \times 10^6$ buniek/ml sa bunky uvoľnia z nosičov pomocou trypsinizácie a 80% sa prevedie do fermentora s pracovným objemom 50 litrov (nosiče 5 g/l).

Ako je možné vidieť z tabuľky 3 je v dni 1 množstvo životaschopných buniek po zmrazení zásobných buniek asi 45%.

Z celkového množstva prenesených buniek je životaschopnosť po uvoľnení trypsinom 71,4%.

Tabuľka 3

deň	hustota buniek ($\times 10^8/l$) v:	
	10 litrovom fermentore	50 litrovom fermentore
0	1,0	
$\frac{1}{2}$	0,45	
$\frac{3}{4}$	1,3	
5	2,6	
6	2,8 (280×10^8 celkom)	
6	0,6 (60×10^8 celkom)	0,28 (140×10^8 celkom)
7		0,4 (200×10^8 celkom)

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob prípravy buniek na použitie pri výrobe biologických materiálov pomocou kultivácie buniek až do požadovaného objemu buniek predprodukčnej dávky, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pri opakovanom diskontinuálnom procese:

- časť buniek predprodukčnej dávky použije na prípravu najmenej jednej produkčnej dávky, a
- zostávajúca časť buniek predprodukčnej dávky sa použije ako inokulum na prípravu najmenej jednej ďalšej predprodukčnej dávky.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa pri opakovanom diskontinuálnom procese:

- a) časť buniek predprodukčnej dávky prenesie na použitie pri príprave najmenej jednej produkčnej dávky, a
- b) zostávajúca časť buniek predprodukčnej dávky sa prevedie na použitie ako inokulum na prípravu najmenej jednej ďalšej predprodukčnej dávky.

3. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prvá predprodukčná dávka sa pripraví z pracovného zásobníka buniek pomocou najmenej jedného pasážovacieho kroku.

4. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že bunky sú závislé na zakotvení.

5. Spôsob podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že bunky sú závislé na zakotvení, bunky sa pestujú na substráte a pred každým krokom prenosu sa bunky uvoľnia zo substrátu.

6. Spôsob podľa ktoréhokolvek z nárokov 1 až 5, v y z n a-
č u j ú c i s a t ý m, že príslušným biologickým materiálom je
vírus.

1/1

Obr. 1

