



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0076679
(43) 공개일자 2017년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 38/21 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/56 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 38/212 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7011230
(22) 출원일자(국제) 2015년08월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년04월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/046927
(87) 국제공개번호 WO 2016/048556
국제공개일자 2016년03월31일
(30) 우선권주장
1417042.7 2014년09월25일 영국(GB)

(71) 출원인
트리젤 엘티디.
영국, 옥스퍼드셔 오엑스39 4티더블유, 치노, 샌
더럼 하우스 오클리 로드
(72) 발명자
래쉬, 한나, 피.
핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스
카르히넨, 민나
핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김윤배, 이상목, 김호석, 김양오, 강철중

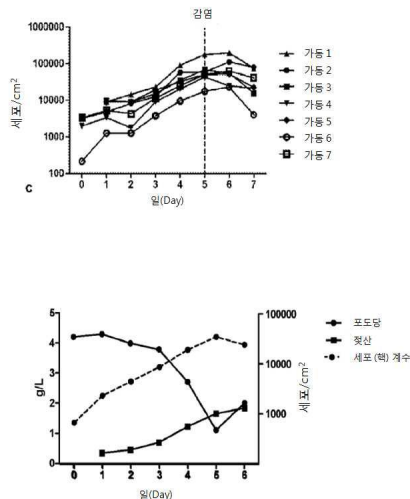
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 파종 밀도 한계를 증가시키고 원하는 팽창 시간을 감소시키는 접착 세포 생물반응기에의 비접착세포의 파종

(57) 요약

우리는 접착-세포 생물반응기에서 재조합 생물학적 생성물의 상업적-규모의 제조를 개선하기 위한 반-직관적인 방법을 발견하고, 이것은 세포 배양 오염의 위험을 감소시키고, 총 수율을 증가시키며 파종과 수확 사이의 지연을 감소시키고, 따라서 그 중에서도, 접착 배양 생물반응기에 현탁액-적용 생산자 세포를 집중시킴으로 인해 발현 생성물의 분해를 최소화한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61K 48/0091 (2013.01)

C07K 14/56 (2013.01)

C12N 2510/02 (2013.01)

C12N 2511/00 (2013.01)

C12N 2740/15043 (2013.01)

(72) 발명자

하스시넨, 민나

핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스

샤유, 로버트

핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스

파커, 니켈

영국, 옥스퍼드셔 오엑스39 4티더블유, 치노, 38
오클리 로드

일라-헤르투알라, 세포

핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스

리포넨, 에비

핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스

말리넨, 주나스

핀란드, 에프아이-70210 쿠오피오, 마이크로카투 1
에스

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 생물학적 생성물의 제조 방법으로서,

(b) 현탁액-적응 세포를 얻는 단계; 및

(c) (b)에서 얻어진 현탁액-적응 세포를 접착 세포 배양을 위한 표면적을 제공하는 담체를 갖는 생물반응기에 접종하는 단계를 포함하는 재조합 생물학적 생성물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 얻는 단계 이전 및 접종 단계 이전에, 비접착성 모드에서 현탁액-적응 세포를 팽창시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

(d) 접착을 촉진시키는데 필요한 양으로, 접착을 촉진시키는 인자에 세포를 노출시켜 접종 단계 이후에 세포가 생물 반응기 내에서 담체에 부착될 수 있게 하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

(e) 세포가 담체에 부착된 후, 세포에 전이 유전자를 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 전이 유전자가 바이러스성 벡터에 의해 세포내로 도입되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 세포가 생물반응기에서 전이 유전자를 발현하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 전이 유전자는 접종 단계 이후에 세포로 도입되는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 전이 유전자는 치료용 단백질을 코드화하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 치료용 단백질은 쇼트-폼 VEGF-D3, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 티미딘 키나제, 인간 인터페론 알파-2b, ABCA4, ABCD-1, 미오신 VILA, 시클로옥시게나제-2, PGF2-알파 수용체, 도파민, 인간 헤모글로빈 서브 유닛 베타 및 항체 서브유닛으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드를 포함하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 전이 유전자는 바이러스성 벡터, 바이러스계 입자, 바이러스 및 바이러스 백신으로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스성 성분을 포함하는 폴리펩타이드에 대해 코드화하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 폴리펩타이드는 바이러스성 벡터의 성분을 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 바이러스성 벡터는 렌티바이러스인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 폴리펩타이드는 적어도 약 1×10^{17} 바이러스성 벡터 입자를 포함하는 방법.

청구항 14

제1항의 방법에 의해 제조된 유전자 치료용 바이러스성 벡터.

청구항 15

제14항에 있어서, 유전자 치료용 벡터는 인간 인터페론 알파-2b에 대한 전이 유전자를 포함하는 아네노바이러스 벡터 및 VEGF-D3, 엔도스타틴, 엔지오스타틴, 티미닌 키나제, ABCA4, ABCD-1, 미오신 VILA, 사이클로옥시게나제-2, PGF2-알파 수용체, 도파민, 인간 헤모글로빈 서브유닛 베타 및 항체 서브유닛으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드에 대한 전이 유전자를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자 치료용 바이러스성 벡터.

청구항 16

- (a) 세포를 얻는 단계;
- (b) 접착 세포 배양을 위한 표면적을 갖는 배양 용기에 세포를 도입하는 단계;
- (c) 세포를 접착 배양을 촉진시키는 인자에 노출시켜 접종 단계 이후에 적어도 일부의 표면적에 세포가 부착되게 하고; 및
- (d) 세포가 표면적에 부착된 후, 세포를 pH 7.2 미만에서 전이 유전자로 형질감염시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

- (a) 세포를 얻는 단계;
- (b) 세포를 접착 세포 배양을 위한 표면적을 제공하는 담체를 갖는 생물반응기에 접종하는 단계;
- (c) 세포를 접착 배양을 촉진시키는 인자에 노출시켜 접종 단계 이후에 세포가 생물반응기에서 담체의 표면적의 적어도 일부에 되게 하는 단계; 및
- (d) 세포가 생물반응기에서 담체에 부착된 후, 세포를 전이 유전자를 담지하는 바이러스성 벡터로 형질감염시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제3항에 있어서, 인자는 태아의 소혈청, 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 칼슘이온, 세포외 매트릭스의 프로테오글리칸, 세포외 매트릭스의 비-프로테오글리칸 폴리사카라이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 포함하는 방법.

청구항 19

제5항에 있어서, 상기 형질감염에 대한 감염의 다중도(Multiplicity of infection)는 세포 당 약 10 바이러스성 입자 이하인 방법.

청구항 20

제조합 생물학적 생성물의 제조 방법에 현탁액-적응 세포를 사용하기 위한 것으로; 현탁액-적응 세포는 현탁액 세포 배양에서 팽창되고; 및 상기 방법은 현탁액 배양으로부터 얻어진 팽창된 세포를 생물반응기에 접종하고,

제조합 생물학적 생성물의 제조를 위해 접착 모드에서 팽창된 세포를 배양하는 것을 포함하는 현탁액-적응 세포의 용도.

청구항 21

- a. i) 접착성 세포 배양을 위한 표면적을 제공하는 담체 및 ii) 세포 배양 매체를 갖는 접착성-배양 생물반응기를 얻은 다음
- b. 담체 상에서, 담체에 접착된 세포를 배양하여, 세포가 발현 생성물을 발현한 후,
- c. 마이크로-담체로부터 세포 배양 매체를 제거한 후
- d. 상기 발현 생성물을 얻기 위해 담체를 행구는 것을 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

- e. 배양 매체로부터 상기 발현 생성물을 얻는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제16항에 있어서, 배양 용기는 접착 배양 생물배양기인 방법.

청구항 24

생산자 세포에 의해 만들어진 바이러스성 벡터를 정제하는 방법으로서, 그 개선점은 용해 세제 및 염을 침전 형성을 감소시키기 위해 충분한 양으로 첨가하는 것을 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 뉴클레아제를 첨가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 염의 양이 약 1000 mM인 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 뉴클레아제는 상기 용해 세제 및 염 이전에 첨가되는 방법.

청구항 28

진이 유전자를 발현하는 생산자 세포에 의해 제조된 폴리펩타이드를 수확하는 방법으로서, 그 개선점은 생산자 세포를 용해시키고, 폴리펩타이드를 수확하기에 적절한 시간 동안 생산자 세포를 저장액에 노출시키는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

정부 지원

없음

관련 출원

본 출원은 2014 년 9 월 25 일자로 출원된 영국 특허 출원 제 14/17042.7 호의 우선권을 주장하며, 그 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

분야

- [0006] 우리는 접착-세포 생물반응기에서 재조합 생물학적 생성물의 상업적-규모의 제조를 개선하기 위한 반-직관적인 방법을 발견했다. 우리의 접근 방법은 세포 배양 오염의 위험을 감소시키고, 총 수율을 증가시키며 파종과 수확 사이의 지연을 감소시켜서, 발현 생성물의 분해를 최소화한다.
- [0007] **배경**
- [0008] 현재까지, 단 하나의 승인된 유전자 치료제로 Glybera®가 있고, 이는 드문 가족성 지단백질 리파아제 결핍증 (살몬, Salmon. 2014) 치료를 위한 아데노-관련 바이러스를 함유한다. 그럼에도 불구하고, 광범위한 유전자 치료 응용 분야는 향후 개발 및 상용화 잠재력을 나타낸다. 소규모 임상 테스트를 위해 10^{12} - 10^{13} 바이러스 입자 (vp)의 환자 투여량을 달성하는 것은 지금까지 어려운 장애물로 판명되었고, 및 상용 공급 (즉, $\geq 10^{16}$ vp)을 위한 바이러스성 벡터의 대규모 제조가 도전으로 남아있다. 제조 도전은 최근에 (Vellinga 외. 2014)에 의해 검토되었다.
- [0009] 생산자 세포계의 범위는 넓다. 시험관 내 배양용 세포는 고체 기질에 접착되어 살기 위해 적응 세포와 액체 매체 중 현탁액에서 살기 위해 적응 세포, 두 개의 일반적인 유형이 있다. 접착 세포계는 예를 들어, HEK293(및 293T와 293FT 세포 같은 유도체), CEF, MDBK, A549 및 Vero를 포함한다. 이들은 아데노바이러스, MVA, 소 허피스 바이러스, AAV 또는 인플루엔자 바이러스(Knowles 외. 2013)와 같은 다른 생물학적 생성물의 제조에 사용되었다.
- [0010] 모든 세포가 현탁액에서 효율적으로 성장할 수 있는 것은 아니며, 또한, 접착 조건의 일부 세포는 보다 높은 특이적 벡터 생산성(Iyer 외. 1999)을 나타낸다. 따라서 접착 제조 시스템의 효율적인 스케일업이 요구된다. 접착 세포를 배양하는 전통적인 방법은 플라스크에 있으며, 이들은 유형(예를 들어, T-플라스크, 회전 병, 세포 스택, 하이퍼 스택(Hyper Stacks) 또는 세포 공장)에 따라 다양할 수 있다. 플라스크에서 증가된 생산량은 요구되는 제조 공간에 따라 제한적이며, 처리하기에는 비실용적이며 다중 단위로 인해 모니터/조절 배양 조건을 어렵게 만든다.
- [0011] 접착-적응 세포 배양 생물반응기에서 사용하기 위해 이용가능한 담체 또는 기질 상이한 종류가 있다. 예를 들어, 비드-유형 마이크로-담체(예를 들어, 키토텍스(Cytodex), GE 헬스케어)는 매체 중 현탁액으로 자유롭게 떠오른다. 매트릭스 유형 담체(예를 들어, Fibracell-세포 디스크, 에펜도르프)는 폴리에스테르 섬유로 이루어지고, 선택적으로 섬유를 고정시키기 위해 케이지(예를 들어, 폴리프로필렌의)내에서 유지된다. 우리는 여기서 접착 세포가 배양에 접착할 수 있는 표면을 제공하기 위해 사용되는 임의의 고체-상태 물질을 의미하는 용어 "담체"와 "기질"을 사용한다.
- [0012] 비드-유형 마이크로담체는 생물반응기(Wu 외. 2002)에서 시도되었으며, 마이크로-담체는 세포 배양 매체에 분산되면서 접착-세포 성장을 위한 기질을 제공한다. 그러나 이러한 시스템은 다루기가 쉽지 않으며, 균질한 성장을 보장하지 못한다. 또 다른 한계는 제한된 팽창성을 갖는 고정 혈관에서 큰 세포 덩어리의 팽창이다. 그들은 또한 공정(Dormond 외. 2009)에서 나중에 벡터로부터 그들의 분리를 위해 노동-소모적인 작업이 필요하다.
- [0013] 생산성에서 도전은
- [0014] 1. 조절된 자동 제조 시스템의 부족
- [0015] 2. 세포수/부피를 증가시키는 낮은 단일 세포 생산성
- [0016] 3. 높은 생산성을 지지하는 대규모 생물반응기 시스템의 부족
- [0017] 4. GMP에서 세척 및 살균 단계를 피하기 위한 일회용 생물반응기 시스템의 부족
- [0018] 5. 기능적인 먹이 전략에서 도전(예를 들어, 현탁액 세포 배양 중 살포 멤브레인 차단)
- [0019] 6. 세포 덩어리(세포 밀도)는 높은 수율 제조(세포 팽창 단계)을 지지하기에 충분하지 않다
- [0020] 7. 배치마다 낮은 총 수율
- [0021] 8. 하류 공정 중 응집/침전물
- [0022] 압축된 섬유층 접착 세포 배양 생물반응기의 사용은 낮은 진단 능력(Meuwly 외. 2007)을 갖는 선택적 조절, 관류가능한 시스템을 제공한다. iCELLis® 생물 반응기(Artelis S.A(프랑스 파리)사 제의 상업적으로 이용가능한 /Advanced Technology Materials Inc.(벨기에 브뤼셀)/폴 기업, Pall Corporation(매사추세츠주 폴 리버))는

확장가능한 접착 VERvert Origin (VERO) 세포 배양을 위해 개발된 고정-층 생물반응기를 나타낸다. iCELLis는 폴리에스테르 섬유로 만들어진 담체를 갖는 일회용 소형 고정층 생물반응기이다. 상업용 iCELLis는 0.5과 500m² 사이에서 다양하며, 담체의 두 상이한 압축 밀도 (Knowles 외. 2013)를 가지는 시스템이다. 이러한 생물반응기는 상이한 종류의 접착 세포 공정 시스템에 사용되었다. 이들은 HEK293, CEF, MDBK, A549 및 Vero와 같은 상이한 세포계의 사용, 및 아데노바이러스, MVA, 소 허피스 바이러스, AAV 또는 인플루엔자 바이러스 (Knowles 외. 2013) (Lennaertz 외. 2013)와 같은 상이한 생물학적 생성물의 제조에 대한 것을 포함한다.

[0023] 대용량 접착 세포 배양 시스템이 이론적으로 매력적인 제조 시스템을 제공할지라도, 대규모 접착 배양 생물반응기를 위한 초기 로딩 이전에 세포 덩어리의 팽창은 공정 중에 주요 장애물이 될 수 있다. 15 회 1700cm² 회전 병 또는 30 회 850cm² 회전 병이 Vero 세포를 접착 세포 배양 영역 (Knowles et al. 2013)의 500m²을 제공하는 접착 배양 생물반응기로 로딩하는데 필요하다는 것이 계산되었다. 그러나, 파종 밀도는 세포계에 의존하고 각 개별 공정에 대해 개발될 필요가 있다. 그들이 293T 세포를 사용했을 때, 로딩 밀도는 25 배 더 높았고 (80 000 세포/cm²) (Lennaertz 외. 2013), 이는 접착 세포 배양 영역의 500m²를 제공하는 접착 배양 생물반응기에 집중하는 수단이고, 이들은 약 1500-2000 개의 회전 병에서 팽창되는 4 x 10¹¹ 세포가 요구된다. 우리는 집중을 위해 더 적은 세포를 사용하고 적절한 세포 덩어리 (집중된 세포 밀도에 다소 의존한다)의 팽창을 위해 약 500 개의 회전 병이 필요할 때 배양 영역이 6000 회의 850cm² 회전 병과 동일한 500m² 고정층 생물반응기 시스템에서의 생산량을 계산한다. 집중 단계에 표준 175cm² 플라스크와 동일한 세포 밀도를 사용하는 표준 계산은 500m² 고정층 생물반응기에 대한 세포 질량의 팽창이 약 2000 회 175cm² T-플라스크를 요구한다는 것을 나타낸다.

[0024] 추가로, 많은 수의 플라스크는 구입하고 설치하는데 많은 비용이 든다. 다수의 플라스크로부터 생물반응기로 접착 세포를 전달하는 것은 오퍼레이터가 각각의 플라스크를 개별적으로, 예를 들어, 플라스크로부터 접착 세포를 제거하기 위한 트립신으로 처리해야하기 때문에 어려울 수 있다. 플라스크 수가 많을수록 하나의 플라스크가 오염될 위험이 더 커진다. 수많은 T-플라스크의 내용물이 하나의 생물반응기로 결합될 때, 그 오염으로 전체 제조 가동이 중단될 수 있다. 따라서, 많은 수의 플라스크를 사용하여 접착 세포를 팽창시키는 것은 상업적으로-수용가능한 품질의 생물학적 생성물을 제조하는데 실행 불가능한 것으로 고려된다.

[0025] 현재 바이러스성 벡터 제조를 위한 접착 및 현탁액 방법 모두가 일반적으로 사용된다 (Kamen & Henry 2004; Segura 외. 2007). 우리는 또한 이전에 다양한 현탁액에 적응 세포 배양 시스템 (예를 들어, Cultibag® 브랜드의 폴리프로필렌 백 현탁액 생물반응기 및 현탁액 적응 세포, 또는 현탁액-적응 세포 배양 시스템을 사용하는 플라스크를 사용하는 Mobius CellReady®의 교반 탱크 현탁액 세포 배양 생물반응기)을 사용하여 상이한 바이러스성 벡터를 제조했다. 특정 재조합 아데노바이러스 유형 5 생성물은 현탁액 세포 (15,000vp/세포)에서 낮은 생산성을 가지지만 전통적인 접착 제조 시스템에서는 생산성이 높다 (>50 000 vp/세포). 지금까지 접착 시스템의 업스케일링은 경제적으로 실행가능한 방법으로 불가능했다. 예를 들어, 폴리에스테르 섬유 담체에 접착 세포 배양 영역의 500m²를 제공하는 접착 배양 생물반응기는 이제 업스케일링 가능성을 제공하지만 대규모 파종 필요 요건에 수백개의 트리플 플라스크 또는 회전 병이 필요하기 때문에, 이러한 접착 시스템의 사용은 불가능하다. 따라서, 접착 시스템의 일부인 세포 팽창은 주요 장애물이다.

[0026] 이러한 도전이 상업적 규모의 제조에 대한 접착 시스템의 채택을 저지하지만 이러한 도전이 극복될 수 있다면, 접착 시스템은 중요한 이점을 제공한다: 접착 세포는 현탁액 세포보다 바이러스 입자를 더 많이 제조한다. 따라서, 바이러스성 벡터 생성에 여러 현탁액 접근법이 이용 가능할지라도, 접착 세포에서 바이러스성 벡터의 생산성이 현탁액보다 훨씬 높을 수 있기 때문에 접착 세포계가 상업적-규모의 제조에서 중요한 이점을 제공할 수 있다. 따라서, 많은 이유로 선행 기술이 태아의 소혈청 (Foetal Bovine Serum)의 사용을 방해하지만, 우리는 태아의 소혈청의 첨가가 바이러스성 벡터 생산성을 현저히 증가시킬 수 있다는 것을 발견했다. 이 현상은 태아의 소혈청의 지질 함량 때문인 것으로 보이는데, 이 지질은 바이러스성 벡터 제조 중에 수율 및 결과 벡터의 안정성을 증가시키는 주요 성분일 수 있다. 추가로, 특정 세포계는 현탁액 모드로 성장시킬 수 없으므로, 상업적-규모의 제조에서 이들 계를 생산적으로 사용할 수 있는 것은 상업적-규모 제조에 접착 배양을 적용시키는 방법을 찾는 것을 요구한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0027] 따라서, 이러한 생물반응기 및 접착성 모드의 세포 성장을 사용할 때, 생물 반응기의 초기 로딩에 필수 초기 세포 덩어리를 얻기 위한 세포 팽창의 효과적인 수단이 당업계에 필요하다.

[0028] **요약**

[0029] 당업계는 접착 배양에 접착-세포 생물반응기에서 적응 세포를 파종하도록 가르친다. 우리는 정확한 반대 접근법을 테스트하고, 접착-세포 생물반응기에서 현탁액-적응 세포를 파종하는 것을 시도했다. 우리는 놀랍게도 현탁액-적응 세포가 접착 생물반응기에서 기질에 접착할 뿐만 아니라 이들 현탁액-적응 세포가 접착성 모드로 배양될 때 번창하고, 및 현탁액-적응 세포를 사용하여 파종에 요구되는 세포의 양을 크게 감소시킬 수 있고, 기질 또는 담체의 막힘을 피하는 것을 발견했다. 따라서, 본 발명은, 적어도 부분적으로, 현탁액-적응 세포가 접착 배양 생물 반응기에 성공적으로 접종될 수 있고, 이어서 접착성 모드에서 성장할 수 있다는 발견에 기초한다. 이는 접착 세포를 사용하는 상업적-규모의 생물반응기의 로딩에 요구되는 세포 덩어리에 도달하기 위해, 현재 상업적으로-가능한 세포의 팽창 수단이 존재하지 않는 문제를 극복한다.

[0030] 이 접근법은 세포가 접착 제조 시스템에서 사용되기 이전에 접착성 모드로 팽창되어야 한다고 생각되는 일반적인 관행과는 대조적으로 작동한다. 실제로, 팽창을 위해 비-접착 현탁액 세포를 사용하는 것은 최소한 하나의 접착-배양 생물 반응기 제조자(Advanced Technology Materials Inc.(벨기에 브뤼셀)/폴 기업, Pall Corporation(매사추세츠주 폴 리버))의 명시적인 지시 및 권고에 어긋난다.

과제의 해결 수단

[0031] 본 발명의 제1측면에 따르면, 재조합 생물학적 생성물의 제조 방법이 제공되며, 이 방법은:

[0032] a) 현탁액 배양에서 세포를 얻는 단계;

[0033] b) a)에서 얻어진 세포를 접착-배양 생물반응기에 접종하고 세포 접착을 촉진시키는 인자에 노출하는 단계; 및

[0034] c) 접착-배양 생물반응기에서 세포를 접착성 모드로 배양하고, 바람직하게는 재조합 생물학적 생성물을 제조하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 iCELLisTM 브랜드의 접착-배양 생물반응기에서 유전자 치료 바이러스성 벡터를 제조하기 위해 우리의 공정을 사용하는 전형적인 단계를 나타내는 공정 흐름도이다.

도 2는 현탁액 모드에서 세포를 팽창하고, iCELLis NanoTM 브랜드 접착-배양 생물반응기에 현탁액-적응 세포를 접종하고 이후에 접착성 모드에서 세포를 성장시킨 후, iCELLis NanoTM 브랜드 접착-배양 생물반응기를 사용한 우리 공정의 전형적인 결과를 나타낸다. a) HEK293 세포 성장 곡선, b) 293T 세포 성장 곡선. 포도당 소비와 젖산 축적은 세포 성장과 관련있다.

도 3은 AAV2 발현 녹색 형광 단백질(GFP)의 제조를 위한 칼슘 포스페이트 형질감염 이후 24 시간 후 293T 세포의 형광 현미경 사진이다. 293T 세포는 현탁액에서 팽창되고, iCELLis NanoTM 브랜드 4m² 생물반응기에 접종하고 AAV 발현 중 접착성 모드로 성장된다.

도 4. 수확된 아데노바이러스 물질의 DNA 제거를 위한 상이한 벤조나제 농도와 접종 시간의 효과 테스트.

도 5. 다양한 바이러스 수확 샘플을 위한 혼탁도 대 시간.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명의 제2측면에 따르면, 재조합 생물학적 생성물의 제조 방법에서 현탁액-적응 세포의 사용이 제공되며; 상기 현탁액-적응 세포가 현탁액 세포 배양에서 팽창되며; 상기 방법은 현탁액 배양으로부터 얻어진 팽창된 세포를 접착-배양 생물반응기에 접종하고, 및 팽창된 세포를 접착성 모드로 배양하여 재조합 생물학적 생성물을 제조하는 것을 포함한다.

[0037] 제3측면에 따르면, 접착 배양 조건에서 성장할 수 있는 현탁액-적응 세포가 있으며, 상기 세포는 제1항의 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0038] 제4측면에 따르면, 현탁액 및 재접착에서 세포 배양을 위해 적응 세포가 있으며, 상기 세포는 제1항의 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0039] 제5측면에 따르면, 조건부의 세포계가 있으며, 상기 세포계는 접착 현탁액 배양으로부터 유도되고 이어서 재접착을 위해 적응된다.

[0040] 본 발명의 제6측면에 따르면, 우리의 역-직관적 접근법은 분리 및 정제를 위한 숙주 세포 용해를 요구하는 발현 생성물, 특히 현탁액-적응 생산자 세포계의 생성물의 하류 처리에 대한 필요를 크게 감소시키는 새로운 방법을 제공한다. 생산자 세포의 용해를 요구하는 생성물의 경우, 고정된-충 생물반응기는 많은 세포 파편이 고정층 접착 세포 배양 기질에 의해 접착되거나 여과되어 남을 때 필터 또는 "사전 정화(pre-clarification)"로서 기능하며, 따라서, 하류에 대한 부담은 현저하게 적다. 우리는 수확된 물질이 세포 용해 이후 현탁액 유형의 생물반응기로부터 수확된 물질에 비해 꽤 깨끗하다는 것을 관찰했다. 생물반응기 외부의 세포 DNA 분해는 응집이 검출되지 않았기 때문에 바이러스의 응집을 방지했다. 우리는 벤조나제 처리가 생물반응기 내부의 생산자 세포 화학적 용해 전후에 수행되고 이후에 높은 염을 함유하는 완충액의 추가한 경우에도 동일한 현상을 보았다.

[0041] 상세한 설명

[0042] 본 발명의 제1측면에 따르면, 재조합 생물학적 생성물의 제조 방법이 제공되며, 이 방법은:

[0043] a) 현탁액-적응 세포를 얻는 단계;

[0044] b) a)에서 얻어진 세포를 접착-배양 생물반응기(즉, 접착 세포 배양에 이용가능한 표면적을 증가시키기 위해 섬유 또는 마이크로 담체 비드와 같은 몇 가지 종류의 기질 또는 담체를 제공하는 생물반응기)에 접종하고 접착(생물반응기에 접종한 이후, 또는 접종 중, 또는 접종 직전으로 접종될 때, 세포는 담체에 즉시 접착하지 않고 그것을 방지한다)을 촉진시키는 인자에 세포를 노출하는 단계; 및

[0045] c) 생물반응기에서 팽창된 세포를 접착성 모드로 배양하고, 바람직하게는 재조합 생물학적 생성물을 제조하는 단계를 포함한다.

[0046] 본 발명의 제2측면에 따르면, 재조합 생물학적 생성물의 제조 방법에서 현탁액-적응 세포의 사용이 제공되며; 상기 현탁액-적응 세포가 현탁액 세포 배양에서 팽창되며; 상기 방법은 현탁액 배양으로부터 얻어진 팽창된 세포를 생물반응기에 접종하고, 및 팽창된 세포를 접착성 모드로 배양하여 재조합 생물학적 생성물을 제조하는 것을 포함한다.

[0047] 1. 생산자 세포계

[0048] 또한, 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 본 발명에서 사용하기 위한 세포는 바람직한 재조합 생물학적 생성물, 예를 들어 임의의 진핵 생산자 세포계(예를 들어, 불멸의 포유류의 세포계, 또는 곤충 세포계)에 따라 임의의 적합한 생산자 세포계의 그것을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이 세포계는 HEK293, 293T, 또는 세포계 HT-1080, HepG2, A549, CHO, BHK, Sf9, Sf21, NCL, UR, N52.E6, BTI-Tn 5 B 1 -4, COS, NIH/3T3, Vero, NSO, NC5T11, PerC6 또는 Her 세포와 관련된 임의의 HEK293; 또는 조합 및 그것의 개질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 그러나, HEK293 및 293T 세포가 보다 바람직하고, 또한 재조합 생물학적 생성물이 바이러스성 벡터일 때 특히 바람직하다.

[0049] 2. 접착 생물반응기 종류

[0050] 또한, 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 생물반응기는 팽창된 세포가 접착되려고 하는 적어도 하나, 보다 바람직하게는 복수의 담체를 포함하는 것이 바람직하며, 이는 생물반응기에서 유동하거나 고정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 담체는 예를 들어 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리스티렌, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, DEAE-덱스트란, 콜라겐, 유리, 알지네이트 또는 아크릴아미드로 만들어질 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 생물반응기는 비드-유형 마이크로-담체(예를 들어, General Electric Corp.의 GE Healthcare Inc.사의 상업용 Cytodex® 브랜드 비드) 및 매트릭스 유형 담체(예를 들어, Eppendorf Corp 사의 상업용 Fibracell™ 브랜드 디스크)를 함유하는 그것을 포함한다. 생물 반응기는 iCELLis® Nano 또는 iCellis® 500 생물반응기(Advanced Technology Materials Inc.(벨기에 브뤼셀) 및 Pall corporation(매사추세츠주, 폴 리버)사의 상업용)에서 사용되는 것과 같은 폴리에스테르 섬유 담체를 사용하는 것이 특히 바람직하다.

[0051] 3. 현탁액 팽창 방법

[0052] 또한, 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 현탁액 배양이 플라스크(flask)-유형 팽창 방법, 또는 비-접착(현탁액)성 모드에서 세포가 팽창된 추가의 생물반응기를 사용하는 것을 포함하는 것이 바람직하다. 플라스크-유형 현탁액 팽창 방법은 예를 들어 T-플라스크, 회전 병, 스피너 플라스크 또는 셰이커 플라스크; 또는 이들의 조합을 사용하여 안정적이거나 혼합/셰이크된 현탁액 세포 팽창에 적합한 임의 유형의 세포 배양 플라스크를 사용하여 당업계에서 임의로 이용가능할 수 있다. 유사하게, 추가의 생물반응기는 세포가 현탁액에서 팽창되는 당업계에서 임의로 이용가능할 수 있고, 예를 들면 임의의 배치, 페드-배치 또는 연속 생물반응기 유형, 일회용 또는 다중사용, 교반된 탱크 또는 웨이브 유형 생물반응기, 관류 또는 재순환 유형의 생물 반응기; 또는 이들의 조합이다. 현탁액 배양의 정확한 방법은 본 발명에 중요하지 않다. 임의의 현탁액 배양에서 성장의 제한 요인은 매체(및 접착 세포 배양과 같이 표면적이 아님)에서 세포의 농도이다. 따라서, 당업자에 의해 수행될 때, 임의의 적합한 현탁액 배양의 사용은, 유사한 규모의 접착 배양보다 높은 세포 덩어리의 도달을 가능하게 할 것이고, 다음 생물반응기(및 접착성 모드에서의 후속 배양)의 로딩에 사용될 수 있다. 현탁액 배양에서의 세포 확장에 적합한 매체는 또한 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, HEK293 세포의 성장을 위해, CD293, BHK, Ex-cell GTM3, Freestyle 또는 Hyclone SFM293 배양 매체는 바람직한 구현예에 사용될 수 있고, 예로서 제한하지는 않지만, Ex-Cell 매체 (시그마 알드리치, Sigma Aldrich 사)는 L- 글루타민 (예 : 6mM 농도)을 함유할 수 있는 플라스크-유형 또는 생물반응기-기반 팽창법 (상기에 기재됨)에 사용될 수 있고; 그러한 매체는 칼슘 및 세포 접착에 요구되는 다른 성분이 부족하고, 이로써 세포의 현탁액 적응을 촉진시킨다. 바람직하게는, 본 발명의 제1측면 및 제2측면의 (a)에서 현탁액-적용 세포는 칼슘 이온, 태아의 소혈청(FBS), 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌을 실질적으로 함유하지 않는(즉, 미량 수준 이하를 포함하는) 성장 매체에서 팽창하고, 또는 세포의 매트릭스의 프로테오글리칸 또는 비-프로테오글리칸 폴리사카라이드는 세포 앵커리지를 지지한다.

[0053] 4. 접종

[0054] 또한, 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, (b)에서 접종 동안/이후 팽창된 세포를 함유하는 매체가 세포 접착을 촉진시키는 인자, 바람직하게는 생물반응기의 담체(하기 단락 참조)를 포함하는 것이 특히 바람직하고, 예를 들면 FBS, 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, 칼슘 이온, 또는 세포의 매트릭스의 프로테오글리칸 또는 비-프로테오글리칸 폴리사카라이드; 또는 이들의 조합이다. FBS(또는 접착을 촉진시키는 다른 요인)는 생물반응기로 현탁액 세포의 접종 바로 이전, 동안 또는 이후 배양 매체로 첨가될 수 있다. 예로서 제한하지는 않지만, FBS(예를 들어, 매체 중량의 2와 20%사이, 바람직하게는 5와 15% 사이, 즉 10%), L- 글루타민(예를 들어 2mM의 농도에서)을 포함하는 Eagle's (DMEM) 매체(당업자에게 알려져 있듯이)의 Dulbecco의 개질이 사용될 수 있다. 유효량의 현탁액-팽창된 세포에 의한 생물반응기의 접종이 수행될 것이며, 상기 양은 사용되는 생물반응기에 따라 변한다. 예로서 제한하지는 않지만, iCELLis[®] Nano 4m² 생물반응기를 사용할 때, 1x10⁸와 1x10⁹ 사이, 바람직하게는 3x10⁸와 7x10⁸ 사이, 보다 바람직하게는 4x10⁸와 6x10⁸ 사이의 세포, 예를 들면 임의의 다른 크기의 접착 생물반응기가 사용된다면 팽창 단계에서 얻어지는 5.2x10⁸ 세포가 사용되거나 균일한 세포 밀도가 사용된다. 상기 세포는 세포 펠렛을 얻기 위해 원심분리될 수 있고, 예를 들어, iCELLis[®] Nano 접착 생물반응기로 접종 이전에, 아래 정의된 바와 같이 성장 매체(예를 들어, 100-300ml, 예를 들어, 200ml)의 적절한 부피에서 현탁된다. 아래에 정의된 바와 같이 현탁액 배양으로부터 직접 세포를 생물반응기에 첨가하는 것도 가능하다. 예를 들어, 세포 팽창 동안 Excell 매체를 사용하여, 예를 들어 FBS가 있거나 없는 DMEM을 함유하는 생물반응기에 직접 연결할 수 있다. 소량의 현탁액 매체가 세포 앵커리지에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 현탁액 배양에서 세포는 직접 전달, 또는 간접 전달을 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 접착 배양 생물반응기로 전달될 수 있다. 예를 들어, 세포는 현탁액 반응기 용기, 예를 들어, Cultibag[™] 폴리프로필렌 현탁액 배양 백을 접착 생물반응기로 직접 전달될 수 있고, 이것은 플라스크(또는 담체)로부터 분리된 세포와 같은 여러 가지 처리 단계가 필요한 현재의 플라스크 유형 팽창 시스템과 비교하여 주요 실용적인 진보이며, 처리 단계는 비용 및 오염 위험을 증가시킨다. 이것은 상업적 제조를 위한 제조 방법의 적합성을 추가로 증명한다.

[0055] 5. 감염/형질감염/형질도입 조건

[0056] 문제의 생성물에 따라, 재조합 생물학적 생성물이 생산자 세포로 도입되는 방법의 단계, 및 형태에서 다양할 것이다. 예를 들어, 재조합 단백질은 팽창 및 배양 이전에 수행될 코딩 폴리뉴클레오타이드(당업계에서 이용가능한 표준 방법을 사용하여)로서 생산자 세포로 도입될 수 있다. 대조적으로, 바이러스성 벡터는 이미-팽창된 세포의 감염을 통해 생물 반응기 내부로 도입될 수 있다. 안정한 세포계는 생성물 관련 요소를 함유하고 제조가 계속될 수 있거나 일부 프로모터 활성화/조절이 사용될 수 있다. 상기 기재된 종류의 방법에서 필요한 변화는 제조되는

제조합 생물학적 생성물에 따라 당업자에게 명백할 것이다.

[0057] 그러나, 바이러스성 벡터, 및 생물반응기 내부의 팽창된 세포의 형질도입, 형질감염 또는 감염에 의한 이들의 제조는 특히 바람직하다. 형질도입은 제조합 생물학적 생성물을 제조하기 위해 바이러스성 벡터 또는 바이러스를 통해 외래 DNA를 세포로 도입하여 수행될 수 있다. 형질감염은 바이러스성 벡터 제조에 요구되는 요소를 부호화하는 하나 이상의 플라스미드의 사용을 요구하며, 형질감염, 일렉트로포레이션, 세포 스퀴징, 소노포레이션(비-화학적 방법) 또는 인산 칼슘 또는 PEL과 같은 양이온성 지질인 형질감염 시약(화학적 방법)을 포함하는 당업계의 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 감염은 바이러스성 벡터 제조의 바람직한 방법이며, 당업계에서 이용가능한 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 우리는 약 400 바이러스 입자/세포까지의 다중 감염(MOI)을 사용 하였지만, 또 다른 적합한 MOI가 사용될 수 있다. 예로서 제한하지는 않지만, iCELLis[®] Nano와 같은 접착 생물반응기의 경우, 바이러스성 벡터 의약품이 성장 매체(예를 들어, 500-1500 ml, 바람직하게는 600-1200 ml, 예를 들어 800ml 성장 매체)에 첨가될 수 있고 사용된 매체 대신 또는 관류를 사용하여 순환된다. 예로서 제한하지는 않지만, 세포는 100,000-300,000 세포/cm², 바람직하게는 150,000-250,000 세포/cm², 보다 바람직하게는 170,000-230,000 세포/cm²의 세포 밀도에서 HEK293 또는 HEK293 관련 세포(예 : 293T)에 대해, 생물반응기에서 이들의 지수가 성장상일 때 감염/형질감염/형질도입될 수 있으며; 더 높은 세포 밀도(예를 들어 > 300,000 세포/cm²)일지라도 또한 감염의 표적이 될 수 있다.

[0058] 6. 생성물

[0059] 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 제조합 생물학적 생성물은 접착 세포를 사용하는 생물반응기에서의 제조에 적합한 것으로 당업계에 알려진 임의의 것일 수 있다. 본 발명이 현탁액-팽창된 세포를 생물반응기로 성공적으로 접종하고, 이어서 이들을 생물반응기에 접착시키는 것에 주어진다면, 상기 생성물은 바이러스성 벡터에 구체적으로 제한될 필요가 없다. 또한 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 바람직하게는 제조합 생물학적 생성물은 바이러스성 벡터, 바이러스계 입자, 바이러스, 제조합 단백질, 면역글로불린 또는 바이러스계 백신이다.

[0060] 또한 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 제조합 생물학적 생성물이 바이러스성 벡터일 때, 바람직하게는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 단순 허피스 바이러스, 우두 바이러스, 홍역 바이러스, 배콜로 및 매독 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 것은 아데노바이러스, 렌티바이러스 또는 AAV이다. 상이한 유형의 바이러스성 벡터를 생산자 세포에 도입하는 적합한 방법은 당업자에게 명백할 것이며, 예를 들어, 생산자 세포를 렌티바이러스성 벡터 또는 AAV 제조를 위한 플라스미드(들)로 형질감염시키는 것을 포함한다. 보다 바람직하게는, 제조합 바이러스성 벡터는 아데노바이러스 벡터(복제가능하거나 결핍된)이다. 그러나, 복제가 결핍된 아데노바이러스 혈청형 5 벡터, AAV 또는 렌티바이러스의 제조가 특히 바람직하다.

[0061] 또한 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 제조합 생물학적 생성물이 바이러스성 벡터인 경우, 벡터는 치료 전이 유전자, 바람직하게는 치료 전이 유전자 또는 siRNA, miRNA, shRNA와 같은 치료 전이 유전자 요소를 포함할 것이다. 예를 들어, 전이 유전자는 예를 들어 쇼트-폼 VEGF-D3와 같은 혈관내피성장인자(VEGF); 혈관 성장 억제제(예를 들어, 엔도스타틴, 엔지오스타틴); 티미딘 키나제(또는 유사한 효소 활성을 갖는 또 다른 폴리펩타이드); 인터페론(예를 들어, 인간 인터페론 알파-2b) 또는 유사한 면역-조절 활성을 갖는 또 다른 폴리펩타이드; ABC1 멤버 4(a/k/a ABCA4) 또는 ALD 단백질, 예를 들어, ABCD-1 단백질과 같은 ATP-결합 카세트(ABC) 수송 단백질; 미오신 VIIA; 시클로옥시게나제-2; PGF2-알파 수용체; 도파민; 인간 헤모글로빈 서브유닛 베타 단백질; 또는 모노클론 항체 서브유닛(들)에 대해 코드화할 수 있다. 우리는 전이 유전자가 자연-발생 폴리펩타이드의 cDNA 서열과 약 95 % 이상($\geq 95\%$)의 동일성을 갖는 것이 바람직하다.

[0062] 또한 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 복제-결핍 아데노바이러스 혈청형 5 벡터와 인간 인터페론 알파-2b 전이 유전자의 조합이 특히 바람직하다. 상기 벡터는 당 업계에 알려진 바와 같이 아데노바이러스 게놈의 5' 말단에서 E1a, E1b 및 pIX 영역을 대체하는 발현 카세트에서 인간 유전자로 구성될 수 있다. 이러한 벡터 구성은 표준 DNA 조작 기술을 사용하여 당업자에 의해 수행될 수 있다.

[0063] 대안적으로, 벡터는 렌티바이러스성 벡터, 예를 들어 VEGF, 엔도스타틴, 안지오스타틴, 티미딘 키나아제 ABCA4, ABCD-1, 미오신 VIIA, 시클로옥시게나제-2, PGF2-알파 수용체, 도파민, 인간 헤모글로빈 서브유닛 베타 단백질 또는 모노클론 항체 서브유닛(들)을 코딩하는 전이 유전자를 담지하는 렌티바이러스성 벡터일 수 있다.

[0064] 또한 상기 제1측면 및 제2측면에 따르면, 상기 단락에서 기재된 벡터가 본 발명의 방법에 의해 제조되는 것이

특히 바람직하되, HEK293 또는 293T 세포(특별한 수단 없이 현탁액에서 팽창된)는 파종 밀도가 5000 내지 20 000 세포/cm²까지 변화할 수 있을 때 바람직하게는 2x10⁸ 및 8x10⁸ 세포, 예를 들어 5x10⁹ 및 2x10¹⁰ 사이, 예를 들어 1x10¹⁰ 세포의 5.2x10⁸ 세포 또는 iCELLis[®] 500 100m² 사이를 포함하는 매체를 사용하는 iCELLis[®] Nano 4m² 생물반응기로 접종된다. 파종된 세포는 선택적으로 생물반응기에서 팽창될 수 있다. 이후 상기 파종된 세포는 생물반응기 내에서 감염/형질전환되거나 형질도입된다. 예를 들어, 상기 바이러스성 벡터는 200 바이러스 입자/세포 보다 큰 MOI에서, 바람직하게는 170,000-230,000 세포/cm²의 세포 밀도일 때 사용될 수 있다. 대안적으로, 더 낮은 MOI를 사용할 수도 있고; 우리는 약 10 바이러스 입자/세포 보다 많지 않은 MOI를 선호한다. 생물반응기 내부의 바이러스 제조는 바이러스를 수확하기 이전에 적어도 24 시간 동안, 바람직하게는 적어도 48 시간 동안 수행된다.

[0065] 7. 생성물의 수확

[0066] 제조합 생성물은 임의의 통상적인 방법으로 배양된 세포로부터 얻어질 수 있다. 일부 생성물은 세포 배양 매체로 방출되므로 매체를 수확하여 생성물 수확이 수행된다. 매체는 관류(생성물 지속적인 수집)에 의해 수확될 수 있다. 매체의 수확은 또한 제조의 말단에 생물반응기로부터 매체를 배출시켜 수행될 수 있고 또한 매체는 테스트 중에 여러 번 수집되고 생물반응기로 새로운 매체를 대체할 수 있다. 예를 들어, 렌티바이러스는 세포 배양 매체로 버드되고 형질감염 이후 매체의 수확은 수일 동안 수행될 수 있다.

[0067] 일부 생성물은 세포 내부에서 제조되고 매체로 방출되지 않으므로 세포로부터 생성물의 방출이 필요하다. 추가로, 일부 바이러스는 아데노바이러스와 같은 용해 바이러스이고 이들의 형성은 세포 내부에서 발생한다. 세포 용해는 임의의 종래의 수단에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 용해는 세제, 예를 들어 트윈(Tween), 바람직하게는 트윈(Tween) 20 또는 트리톤(Triton)-X의 사용에 의해 수행되며, 또는 용해는 예를 들어, 용해 바이러스가 제조된다면 자가용해로서 발생할 수 있다. 최종적으로 많은 바이러스가 세포를 용해시킬 수 있지만 여전히 세포 내부에 있는 생성물을 수확하는 것이 바람직할 수 있다. 전통적인 방법은 세포를 수집하는 것과 동결과 용해로 생성물을 방출하는 것이다. 세포는 집착 세포가 화학 물질에 의해 배양 표면에서 제거되는 세포 해리(dissociation)에 의해 플라스크 또는 생물반응기로부터 수확될 수 있다. 트립신 또는 EDTA 또는 임의의 유도제 또는 임의의 적절한 시약은 세포 제거에 사용될 수 있다. 대안적인 용해는 물과 같은 저장액 의해 수행될 수 있다.

[0068] 또한 세포는 생물반응기 내부에서 용해될 수 있다. 예를 들어 트리톤-X 또는 트윈을 사용한 화학적 용해는 세포 멤브레인을 파괴하고 생성물을 매체/완충액으로 방출한다. 생성물은 용해된 물질을 수집하여 수확될 수 있다. 또한 자가용해는 바이러스 제조가 오래 계속되고 세포가 감염의 결과로 자연적으로 용해되는 방출 옵션으로 사용될 수 있다. 전형적인 자가용해는 세포에서 생성물을 수확하는 경우보다 수일이 더 걸린다. 방출된 제조합 생성물의 정제는 통상적인 정제 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0069] 세포의 용해는 생성물을 상층액으로 방출하지만 세포 내 단백질이나 게놈 핵산과 같은 오염 물질도 방출한다. 높은 바이러스 입자 농도 및/또는 고농도의 오염 성분은 바이러스 응집을 일으키고 이는 최종적으로 총 수율이 낮아지거나 배치의 거부로도 이어질 수 있다는 것을 나타낸다. 흥미롭게도, 우리는 용해 완충액을 사용하여 고정된-층 생물반응기 내부에서 효율적인 세포 용해를 처음으로 보여줬고, 이 경우에는 트윈20 기반의 용해 완충액이었다. 우리는 수확된 물질이 현탁액 세포 또는 원상태 세포로 수확된 세포를 용해시키고 동결과 용해에 의해 용해된 것과 비교하여 현저히 보다 명확하다는 것을 알아냈다. 고정된-층은 일차 수확이 매우 명확할 때 담체층 내부에서 많은 세포 파편을 유지하는 "사전 필터"로 기능했다. 이것은 정제를 위한 로딩 물질이 매우 순수하기 때문에 현저한 개선이다.

[0070] 모든 생성물이 빈 생물반응기를 배출함으로써 수확될 수 있는 것이 아니라는 것이 알려졌다. 생물반응기를 행구면 세포 파편 및 담체 섬유에 여전히 집착된 일부 생성물을 회수할 수 있다. 행구는 세포 배양 매체 또는 임의의 다른 적합한 완충액에 의해 수행될 수 있다. 상층 단계는 보다 많은 바이러스 입자(또는 임의의 다른 생물학적 생성물)를 회수하는 독특한 방법이며, 예를 들어 이 맥락에서 현탁액 생물반응기에서 적용될 수 없다.

[0071] 8. DNA 분해 및 침전물 예방

[0072] 임상 생성물로부터 잔기 DNA의 제거는 당국에 의해 요구된다. 추가로, 세포 핵산 또는 단백질 바이러스와 같은 오염 물질의 존재는 생성물의 응집을 가속할 수 있다. 바이러스의 응집 또는 임의의 침전물은 생성물 처리 중에 알려진 문제점이며, 생성물의 현저한 손실 또는 총 배치의 거부로도 끝날 수 있다. 우리는 게놈 DNA를 분해할

수 있었고, 생성물의 하류 공정의 일부로, 분해가 생물반응기 외부에서 수행되었을 때 벤조나제라고 불리는 이 경우에 DNase 엔도뉴클레아제를 사용하여 세포 게놈 DNA를 분해하여 아데노바이러스의 눈에 보이는 응집/침전물을 피할 수 있었다. 다른 한편으로는, 소량의 벤조나제가 용해 전에 첨가되고 더 많은 효소가 용해 이후에 생물반응기에 첨가되면, 바이러스 응집이 높은 염이 벤조나제 분해 이후 상층액에 첨가될 때 방지되었다(도 5).

9. 결론

본 발명의 방법은 상업적 가치가 높은 세포 및 세포계를 제조한다. 예를 들어, 접착 배양 조건에서 성장할 수 있는 현탁액-적응 세포는 재조합 생성물의 제조에 사용될 수 있을 것이다. 그러나, 세포는 본 발명에 개시된 방법에 의해 얻을 수 있지만, 대안적인 방법이 당업자에게 명백할 수 있다. 처음으로, 본 명세서에 개략된 발명은 현탁액-적응 세포가 접착 특성을 되돌릴 수 있다는 것을 밝혔다. 이제 이것이 당업자가 재-접착을 달성하는 많은 방법이 있다는 것을 인식할 것으로 주목된다. 따라서, 본 발명의 세포는 특정 제조 방법에 한정되지 않지만, 본 발명에 기재된 세포와 동일한 특성을 공유해야 한다; 즉 이들이 현탁액 배양 조건에서 성장을 위해 적응된 다음 재-접착을 위해 조건화된 접착 세포이어야 한다.

우리는 이제 다음의 - 제한적인 실시예에 의해 본 발명을 기재한다.

실시예

1. 생산자 세포계

이 실험에서 두 가지 일반적으로 사용되는 세포계인, HEK293 및 293T 세포는 실시예로 사용되었다. 접착 HEK293 또는 293T 세포계는 10 % 태아의 소 혈청(FBS, 생명 기술), 2mM L-글루타민(인비트로젠)과 경정한 돌베코의 개질된 이글 매체(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(시그마-알드리치)를 사용하는 세포 배양 플라스크에서 37 °C 및 5 % CO₂에서 배양되었다. 선택적으로, 하나는 50 µg/ml/50 IU/ml 페니실린/스트렙토마이신(인비트로젠)을 첨가할 수 있다. 현탁액에서 HEK293 또는 293T 세포는 6 mM L-글루타민 및 50 µg/ml 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 EXCELL 293 세럼이 없는 매체(시그마-알드리치)를 사용하여 성장된다. CD293 (인비트로젠), BHK (머크 밀리포어), Ex-Cell GTM3 (시그마-알드리치), 프리스타일 (인비트로젠) 및 SFM293 (히클론)과 같은 다른 매체는 현탁액에서 이들 세포의 성장에 또한 사용되어왔다. 생물반응기에서, 접착 세포는 10 % FBS, 2mM L-글루타민을 함유하는 DMEM을 사용하여 배양되었다. 우리는 실제로 이 실험을 위해 50 µg /ml 페니실린/스트렙토마이신을 사용했지만, 우리는 가능하면 실제 상업-규모의 제조에는 사용하지 않는 것을 선호한다.

2. 접착 생물반응기 유형

이들 실시예에서는, Advance 또는 MyControl (Applicon Biotechnology) 조절 유닛과 BioXpert 소프트웨어를 갖는 iCELLis® Nano 생물반응기(Pall Life Science)이 사용되었다. iCELLis® Nano 생물반응기 0.8m² (층 높이 2cm, 담체 압축 144 g/L), 2.67m² (층 높이 10cm, 담체 압축 96 g/L) 및 4m² (층 높이 10cm, 담체 압축 44 g/L)가 테스트되었다. 생물반응기에 설치된 보정된 프로브를 45 분 동안 오토 클레이브하여 살균시켰다. 6000-13000 세포/cm² 사이의 밀도를 사용하여 세포가 접종되고 재-순환 매체 또는 관류에 의한 층-배치 모드로 두 가지 파종 방법이 사용되었다. pH 설정값은 7.2이고, 헤드 스페이스 CO₂ 또는 7.5 %의 중탄산나트륨 (Life Technologies)에 의해 조절되었다. 용해된 산소 (DO) 설정값은 50%이고 교반 및 헤드 스페이스 공기 또는 O₂ 흐름에 의해 조절되었다. 세포 밀도, pH 및 포도당/젖산을 매일 모니터링 하였다. 포도당과 젖산은 반사계 (MerckMillipore)에 의해 분석되고 pH는 SevenGo Pro SG8 (Mettler Toledo)에 의해 오프라인으로 측정된다. 담체 섬유 스트립은 살균 핀셋을 사용하여 생물반응기 상부로부터 채취되고, 1 ml의 용해 용액 A (Fisher Scientific)에서 5 내지 10 분 동안 볼텍싱되고, 헤모시토크리트 및 현미경 검사를 사용하여 핵이 계수되었다. 바이오매스는 ABER 바이오매스 모니터 (Applicon Biotechnology) 및 FuturaLite 소프트웨어를 사용하여 모니터링 된다.

세포 밀도, pH, 포도당 및 젖산은 iCELLis Nano로부터 매일 분석된다. 담체는 살균 핀셋을 사용하여 생물반응기로부터 채취된다. 세 개의 담체는 5-10 분 동안 1ml 용해 용액에 볼텍싱되고 핵은 헤모시토크리트 및 현미경을 사용하여 계수된다. 하나의 담체는 1 ml 크리스탈 바이올렛에 담겨지고 3 x 1 ml PBS로 행워진다. 접착된 세포는 현미경으로 관찰된다. 하나의 담체는 1 ml 트리판 블루에 담겨지고 3 x 1 ml PBS로 행워진다. 죽은 세포는 현미경으로 관찰된다. 약 5-8ml 매체는 pH 측정을 위해 생물반응기로부터 채취되고 또한 포도당 및 젖산은 PBS로 1:100으로 희석된 샘플로부터 분석된다.

[0082] 또한, Futura Scada 소프트웨어를 함께 갖는 iCELLis® 500 조절 시스템은 대규모 생물반응기 가동을 위해 사용된다. iCELLis® 500 생물반응기는 세포 성장을 위한 표면적 500m^2 (층 높이 10cm, 담체 압축 144g/L) 또는 100m^2 (층 높이 2cm, 담체 압축 144g/L)의 PET 섬유 층을 하우징하는 카세트로 제공된다. 500m^2 생물반응기는 생물반응기에서 세포 분포를 연구하는데 사용된다. 100m^2 생물반응기는 1차 바이러스 제조 실험에서 사용된다. 배양 매체변수는 iCELLis® Nano 실험과 동일하다. 매체는 매일 샘플링되고 포도당, 젖산 및 pH는 오프라인으로 측정된다. BioWelder 및 BioSealer (Sartorius Stedim Biotech S.A.)는 제조 중에 살균 튜브 연결부와 씰을 형성하기 위해 사용된다. iCELLis® 500 100m^2 에서 총 작업 부피는 65L이다. 수확할 때, 37°C 에서 2 시간 동안 성장 매체에서 1% 용해 완충액으로 원위치에서 처리되고, 연속적으로 생물반응기 고정된 층에서 매체를 교반한다. 매체를 함유하는 바이러스는 배출되고 담체는 고정된-층으로부터 더 많은 바이러스를 회수하기 위해 하나의 작업 부피로 행거진다.

[0083] 3. 현탁액 팽창 방법

[0084] 이용할 수 있는 상이한 종류의 현탁액 팽창 방법이 있다. 현탁액에서 우리는 회전 병 (Corning Incorporated Life Sciences), 셰이커 플라스크 (Corning Incorporated Life Sciences), 스피너 플라스크 (Corning Incorporated Life Science), BIOSTAT® CultiBag RM 관류 시스템 (Sartorius Stedim Biotech SA) 또는 Wave Bioreactor (GE Healthcare)로 0.5×10^6 세포/ml 파종 밀도 (주 2회)에서 HEK293 또는 293T 세포를 배양했다. 시그마-알드리치 Co. LLC의 Ex-Cell 매체는 이들 실시예로 사용된다. 그것은 현탁액 세포 성장과 부족, 예를 들어 칼슘 및 세포 접착을 위한 다른 성분을 지지하기 위해 개발되었다. HEK293 또는 293T 세포의 접착없이 병으로 떨어지는 것이 관찰되었다. 세포는 iCELLis® Nano 생물반응기에 접종될 때까지 현탁액에서 통과된다.

[0085] 생물반응기에 세포의 현탁액 팽창과 접착을 연구하는 1차 실험은 임의의 바이러스 제조없이(접종 연구 4. 접종 또한 참조) 수행된다. iCELLis® Nano 층 높이 10 cm 생물반응기(4m^2)는, $13,000$ 세포/ cm^2 의 파종 밀도를 사용하여 회전 병에서 팽창된 현탁액 HEK293 세포를 접종하고 세포는 5 일 동안 배양되었다. 생물반응기 상단으로부터 담체를 매일 샘플링되고 핵이 계수되었다(도 2a). 가동의 말단에, 생물반응기는 파괴되어 개방되고 담체는 고정된 섬유 층의 하단, 중간 및 상단에서 샘플링된다. 세포 밀도의 평균은 $172,600$ 세포/ cm^2 지만, 상단보다 하단 담체 위에 더 많은 세포가 있다. 따라서, 세포가 접착에서 잘 성장되지만 고정된-층 내에서 불균일하게 분포된다는 것이 결론내어졌다(표 1). 이 현상은 우리가 생물반응기로 접종되는 것보다 상단 담체로부터 동등한 수의 세포를 셀 수 없는 이유를 설명한다.

[0086] 1차 대규모 iCELLis®은 대규모 및 접착 세포 성장 테스트에서 현탁액 팽창에만 집중되어 가동되지만, 하단 담체 위에 세포의 “과성장”의 가능성을 탐구하기 위해 이번에는 6000 세포/ cm^2 의 더 낮은 파종 밀도를 사용한다. 세포는 고정된 섬유-층에 포집 및 접착된 다음 5일 동안 접착 성장했다. 생물반응기는 배출되고 개방되어 섬유 담체가 하단, 중간 및 상단 층으로부터 샘플링될 수 있는 섬유 담체를 허용한다. 이 생물반응기의 고정된 층의 더 큰 직경 때문에, 가변성과 계층화를 조사하기 위해, 담체는 각 층에서 5개의 상이한 반경 위치로부터 샘플링된다. 그 결과 iCELLis® 500에 균일한 세포의 분포가 나타나지 않지만, 그 차이는 극적이지 않다(표 1). 평균 밀도는 $103,600$ 세포/ cm^2 이다. 세포는 대규모 iCELLis® 500에서 더 잘 분포되고, 접종하는 동안 세포 밀도를 증가시키기 위한 가능성을 허용한다.

[0087] 세포의 배증 시간을 계산함으로써, 세포 성장을 예측하고 서로 상이한 크기 시스템을 비교할 수 있다. 배증 시간은 식: $N_t = N_0 2^{t/d}$ 여기서: N_t = 시간 t에서 세포수, N_0 = 초기 세포수, t = 시간, d = 배증 시간을 사용하여 계산된다. 우리의 이전 플라스크 실험에서 HEK293 세포를 위한 배증 시간은 28.8 시간(데이터는 도시되지 않음)이다. iCELLis® Nano에서, 배증 시간은 29.6 시간이고 iCELLis® 500에서 배증 시간은 29.2 시간이다. 세포 성장을 나타내는 것은 플라스크 시스템과 iCELLis® 사이에서 비교될 수 있는 것으로 보인다. 이것은 세포 성장을 위한 iCELLis® 기술의 실용성을 입증한다.

표 1

iCELLis Nano와 iCELLis 500에서 5 일간 배양한 이후 핵 수를 기반으로 한 세포 분포(세포/cm²). iCELLis Nano에 13 000 세포/cm², iCELLis 500에 6000 세포/cm²가 로딩되었다.

가동 ID	하단	중간	상단
iCELLis Nano (4m ²)	325 200	112 000	60 600
평균	172 600		
iCELLis 500 (500m ²)	136 800	85 900	88 200
평균	103 600		

[0088]

[0089]

현탁액 세포는 또한 4.5×10^6 세포/플라스크에서 정상의 175 cm^2 세포 배양 플라스크로 스플릿된다. 접종 2 시간 이후, 세포 플라스크의 하단에 세포 접착은 현미경으로 관찰되었다. 5일 동안, 세포 합류는 약 70 %이고 하나의 플라스크에 완전히 30.3×10^6 세포가 있었다. 이것은 현탁액 공정을 사용하여 팽창된 현탁액 적응 HEK293 세포가 또한 세포 배양 플라스크의 하단에 접착될 수 있고, 거기서 성장할 수 있다는 것을 증명했다.

[0090]

4. 접종

[0091]

스피너 플라스크 또는 회전 병에서 세포의 팽창 이후에 iCELLis™ nano 생물반응기의 접종은 상세하게 연구되었다. 1차 실험 동안에, 세포 계수 이후, 5.2×10^8 현탁액 세포(1.3×10^4 세포/cm²과 동일한)는 원심분리(209 g, 5 분, 20 ° C) 되고 200 ml DMEM+ FBS 성장 매체로 재-현탁된다. 세포 성장은 상단 담체로부터 세포(핵)를 계수함으로써 모니터링된다(도 2a).

[0092]

우리는 원심분리 단계를 빠뜨릴 가능성을 연구하고 접착 세포 배양 매체를 함유하는 현탁액(현탁액 매체)에서 생물반응기로 직접 세포를 접종했다. 첫째, 플라스크 실험이 수행된다. 현탁액 적응 HEK293 세포는 상이한 비율의 DMEM 및 ExCell 매체(100, 95, 90, 85, 80, 70 또는 60% DMEM, 나머지 중의 ExCell)를 사용하여 접착 플라스크에서 배양된다. 2차 실험 세포는 생산성에 대한 ExCell 잔기의 영향을 관찰하기 위해 감염된다. 낮은 ExCell 농도는 세포 성장에 주요한 영향을 줄만큼 접착을 가지지 못한다. ExCell 농도가 증가할 때, 세포는 더 둥글게 보이기 시작했고, 플라스크 하단에 매우 단단히 접착되지 않았다. 또한 DMEM에서 잔기 5% ExCell은 생산성에 오직 미미한 영향을 주고; 감소는 7%(데이터는 도시되지 않음)인 것이 관찰된다. 10% ExCell은 각각 총 수율을 이미 19%로 감소시키고, 15% FBS는 63% 감소한다. 플라스크 실험에서는 관류가 수행되지 않고 생물 반응기에서 수행되는 것처럼 테스트된다.

[0093]

우리는 FBS가 있거나 없는 600 ml의 미리-평형화된 접착 성장 매체를 함유하는 iCELLis Nono 생물반응기로 ExCell 매체 100-200 ml에 현탁액 세포 접종을 테스트했다. 만약 FBS가 접종 중에 존재하지 않는다면, 그것은 접종 10 분 내지 2 시간 후 첨가된다. 교반 속도는 처음 2시간 동안 1050 rpm(2 cm/초)으로 설정된 다음 755 rpm(1 cm/초)으로 감소된다. 속도 감소 이후에, 세포 접착은 작은 매체 샘플을 채취하고 세포를 계수함으로써 뒤따른다. 접착된 세포의 수는 핵을 계수함으로써 담체로부터 결정된다. 이 실험을 기반으로, 현탁액에서 성장하기 위해 초기에 적응 경우에도 세포는 담체에 접착된다. 우리는 또한 FBS가 세포 분포에 일부 영향을 주지만 상단 담체 상의 세포 수를 기반으로, 접종 중에 FBS의 존재가 담체 상의 세포 분포 및 세포 접착에 어떤 영향도 주지 않는다고 결론냈다(도 2a).

[0094]

HEK293 뿐만 아니라 293T 세포도 스피너 플라스크를 사용하여 현탁액으로 팽창되고 EXCell 매체와 7000 세포/cm²를 iCELLis Nano 4m² 생물반응기에 접종했다. 293T 세포는 담체 상에 접착되고 성장은 상단 담체로부터 및 포도당 소비 및 젖산 축적 이후에도 모니터링 되었다(도 2a). 293T 세포는 현탁액 팽창 후에 접착으로 iCELLis 생물반응기로 잘 성장한다.

[0095]

결론적으로, 2 가지 상이한 세포계는 접착 제조 이전에 현탁액 팽창에 대해 테스트된다. 어떤 추가 공정 단계 없이 일회용 현탁액 생물반응기에서 iCELLis 생물반응기로 직접적인 접종 방법이 실용적인 것이 알려졌다. 이것은 주요한 이점이고 이 혁신을 매우 비용-효율적이며 실용적으로 만든다. 모든 대규모 iCELLis 생물반응기 가동은 Cultibag 생물반응기로부터 직접 접종된다(또한 3. 현탁액 팽창 참조).

[0096]

6. 감염/형질감염/형질도입 조건

[0097]

현탁액 팽창된 HEK293 세포를 4 내지 5 일 동안 접착성 모드에서 성장시킨 후, 세포는 아데노바이러스 혈청형 5

바이러스성 벡터 (Ad5)에 감염된다(형질감염). 우리의 실험에서, MOI는 50과 400사이로 변화했다. iCELLis Nano 생물반응기에 요구되는 Ad5의 부피는 예열된 800ml의 성장 매체에 넣고 세포는 완전히 매체 교환에 의해 감염되고, 또는 바이러스는 작은 부피로 어떤 매체 제거 없이 생물반응기로 직접 첨가된다. 감염 이후에, 바이러스-함유 매체는 새로운 매체로 대체된다. 추가적으로 바이러스 매체는 제거되지 않고, 대신에 관류는 세포 성장을 지지하기 위해 시작된다. 관류 중에, 남아있는 바이러스는 최종적으로 폐기물로 제거된다.

[0098] 형질감염 실시에는 AAV를 제조하기 위해 인간 칼슘 매체 형질감염에 의해 수행된다. 현탁액-팽창된 293T 세포는 생물반응기에 접종되고 세포 덩어리는 추가로 iCELLis 생물반응기에서 4 일 동안 팽창된다. 세포 성장 곡선에도 2b에 도시된다. 세포는 2 개의 플라스미드 및 인간 칼슘 방법으로 형질감염된다. 현탁액 팽창된 세포의 플라스미드 형질감염 방법은 형질감염 24시간 후 형광 현미경에 의해 모니터링된다. 형질감염은 효율적이었다(도 3).

[0099] 상업적인 접착 생물반응기는 통상적으로 배양 매체가 일정한 pH에서 유지되도록 배양 매체 pH가 떨어지는 경우에 자동적으로 염기 용액 (예를 들어, 중탄산나트륨 용액)을 첨가하는, 자동 pH 조절이 제공된다. 우리는 iCELLis™ 생물반응기에서 자동 pH 조절이 작동 상태로 남게 되면, 생물반응기가 생물반응기로 염기 용액을 첨가하고, 이는 생물반응기에서 침전물의 형성의 이유가 된다는 것을 발견했다. 우리가 DNA-염 침전물이라고 생각하는 침전물은 생물반응기를 막고 생산성을 저해하기 때문에 바람직하지 않다. 우리는 형질감염 후 자동 pH 조절을 불가능하게 하고 배양 매체의 pH가 자연적으로 떨어지는 것을 허용함으로써, 생성된 약산성 배양 매체가 침전물 형성을 막아 수득을 증가시키는 것을 발견했다.

[0100] 7. 생성물 및 생산성

[0101] 이 개념 입증 실험에서 인간 인터페론 α 2b를 발현하는 아데노바이러스 유형 5가 실시예(Dinney 외. 2013)로서 사용된다. 개념 실시에는 이 생성물로만 제한되지 않는다. 플라스미드 형질감염은 마커 유전자로서 녹색 형광 단백질을 발현하는 아데노-관련 바이러스 혈청형 2를 사용하여 입증된다.

[0102] 현탁액 팽창 후 바이러스 제조를 연구하기 위해, 접종 이전에 현탁액 팽창 단계의 개념 입증을 보여주기 위해 세 개의 iCELLis® Nano를 작동했다. HEK293 세포는 혈청이 없는 현탁액 조건에서 두 가지 방법, 첫째로 회전 병이거나, 또는 BIOSTAT® Cultibag RM 관류 시스템으로 배양된다. Cultibag인 경우, 회전 병으로부터 1차 현탁액 적응 세포(200ml에서 500×10^6 세포)는 Cultibag RM의 관류 시스템으로 전달되고 6 mM의 L-글루타민과 50 μg/ml의 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 800ml의 성장 매체 Ex-Cell 매체는 이미 평형화되었다. 따라서, 1L 작업 부피에서 0.5×10^6 세포/mL의 시작 세포 농도가 달성된다. 세포는 1L 작업 부피에서 $2-4 \times 10^6$ 세포/mL까지 4일 동안 팽창된다. 관류는 세포 밀도가 1.0×10^6 세포/ml 이상($\geq 1.0 \times 10^6$ 세포/ml) 도달할 때 시작되고 팽창 전반에 걸쳐 계속된다. Cultibag^{RM} 관류 동안 새로운 성장 매체는 폐기물 매체가 제거된 것과 같은 비율로 Cultibag^{RM}에 도입된다. 관류율은 24시간 당 하나의 작업 부피 (1L)이다. 293T 세포는 스피너 플라스크에서 혈청이 없는 조건에서 배양된다. 현탁액 팽창된 세포는 - 이 HEK293 세포는 회전 병에서 0.8 m^2 (가동 1)까지 및 BIOSTAT® CultibagTM에서 4 m^2 (가동 2)까지 iCELLis® Nano 생물반응기로 전달된다. 293T 세포는 또한 4 m^2 iCELLis Nano로 전달된다. 대부분의 세포는 초기에 30 분 이내에 고정된 층에 포집된 다음 모든 세포는 담체에 접촉되어 접착성 모드에서 성장을 계속한다. 현탁액에서 팽창된 접착 HEK293와 293T 세포의 성장은 배양 중 매일 담체 상단으로부터 핵(세포)를 계산함으로써 모니터링된다. 담체에 접촉된 세포계 및 지수기 성장상 모두 관찰되었다(도 2).

[0103] HEK293 세포는 아데노바이러스에 감염되고, 이들의 생산성은 각각, 5.6×10^6 (총 4.4×10^{13} vp)과 2.6×10^6 vp / cm^2 (총 1.0×10^{14} vp) (표 1)이다. Ad5 적정은 바이러스 입자 적정 방법을 기반으로 HPLC에 의해 수행된다. AAV는 인간 칼슘 매체 플라스미드 형질감염에 의해 293T 세포에서 제조되고 생산성은 1.1×10^9 VG/ cm^2 (총 4.5×10^{13} VG, 바이러스 계수는 qPCR에 적정 방법에 의해 분석된다)이다. 현탁액 팽창은 세포가 접착성 모드에서 팽창되는 경우의 생산성에 비해 생산성에 주요한 영향을 주지 않는다.

[0104] 공정이 스케일업되고 처음으로 iCELLis 500 100m은 아데노바이러스 감염과 제조에 따른 현탁액 후 세포 성장에 대해 테스트된다. 이 실험에서 현탁액에서 HEK293 세포는 0.5×10^6 /ml의 밀도로 파종되고 BIOSTAT® Cultibag

RM 관류 시스템을 사용하여 1.9×10^6 세포/ml의 밀도로 팽창된다. 집중할 때, 1×10^{10} 세포는 평형화된 성장 매체를 함유하는 iCELLis® 500 100m² 생물반응기로 직접 집중된다. 실험 중에, 매일 포도당, 젖산 및 pH가 오프라인으로 측정된다. 관류는 새로운 매체로 세포 성장을 지지하기 위해 나중에 시작된다. 포도당 소비와 젖산 축적은 나노 실험에 비교될 수 있다. 수확량은 5.3×10^{15} vp이고 행굼에서 여전히 8.4×10^{14} vp로 총 수율의 14 %를 나타냈다. 생물 반응기로부터의 총 바이러스 수율은 6.1×10^{15} vp이고 생산성은 6.1×10^9 vp/cm²이다(표 1, 가동 3).

표 2

상이한 세포 팽창 방법 후에 iCELLis Nano®에서 아데노바이러스의 생산성의 비교.

시스템	가동 nro	설명	수율 (총 vp)	면적 (cm ²)	생산성 (vp/cm ²)
플라스크		조절 플라스크	8.1×10^{11}	175	4.6×10^9
iCELLis® Nano 0.8 m ²	가동 1	회전 병에서 현탁액 팽창	4.4×10^{12}	7776*	5.6×10^9
iCELLis® Nano 4 m ²	가동 2	BIOSTAT® CultiBag RM 에서 현탁액 팽창	1.0×10^{14}	40 000	2.6×10^9
iCELLis® 500 100 m ²	가동 3	공정 업스케일링, BIOSTAT® CultiBag RM 에서 현탁액 팽창	6.1×10^{15}	1 000 000	6.1×10^9

[0105]

[0106] iCELLis® 500은 실시예에서 나타난 것보다 훨씬 더 많은 확장성을 제공한다는 것을 알 수 있다. 생산성은 100m²의 생물 반응기에서 시험되는 반면에 생물반응기의 최대 면적은 이론적으로 5 배 더 많은 바이러스 입자를 제조할 수 있는 500m²이고, 이 경우에는 2.65×10^{16} vp이다. 이전에 설명한 바와 같이, 특정 생성물은 낮은 생산자이다. 이 생성물로, 우리는 플라스크에서 달성된 생산성은 대규모에서도 동일하게 유지된다는 것을 보았다.

[0107] 흥미로운 계산은 우리의 "높은 생산자" 중 하나를 실시예로 사용함에 의해 수행될 수 있다. 우리는 플라스크에서 생산성이 2.23×10^{10} vp/cm²인 것을 보았다. 이 수가 100m²로 변환된다면, 총 수확량은 2.23×10^{16} vp이고, 추가로 500m²의 수확량은 1.12×10^{17} 에 도달할 것이다. 다른 말로, 우리는 상업적 규모의 요구 사항을 충족시킬 수 있는 방법을 개발하고 제조 공정을 스케일업하는 현재의 문제를 해결할 수 있다.

[0108] 8. 수확

[0109] 상이한 수확 방법이 테스트된다. 수확은 예를 들어, 48 시간에 p.i. 용해 아데노바이러스가 생산자 세포에서 세포 배양 매체로 방출되기 전에 수행될 수 있다. 매체 샘플은, p.i. HPLC 분석에서 바이러스 입자 수는 검출한 계 아래로 나타났고, 중요한 바이러스가 아직 발생하지 않았으며 바이러스가 생산자 세포 내부에 여전히 있음을 증명하기 위해 48 시간에 채취된다. iCELLis® 생물반응기 고정층은 트립신 또는 유도체에 의해 세포를 분리하거나, 이들을 수집하는데 별로 실용적이지 않다. 따라서, 화학적 용해 완충액에 의해 세포 배양 매체 내로 바이러스의 방출을 테스트하기로 결정했다(트윈20).

[0110] 원위치에서 용해/수확의 효율을 이해하기 위해서, 22 개 담체는 37 °C에서 2 시간 동안 중탕에서 용해되고, 성장 매체에서 1 %의 용해 완충액을 사용하고, 10-15 분마다 수동으로 흔들었다. 나머지 iCELLis® 담체는 37 °C에서 2 시간 동안 생물반응기 내에서 원위치에서 테스트되고, 성장 매체에서 1 % 용해 완충액을 사용하고 이것은 고정된 담체층을 통해 연속적으로 순환된다. iCELLis® 생물반응기의 바이러스 수율은 총 7.3×10^{13} vp이고 생산성은 9.9×10^9 vp/cm²이다. 담체로부터 방출된 바이러스 입자의 양은 iCELLis® 내부에서 용해가 이루어 질 때보다 중탕에서 용해될 때 더 낮다. 추가 조절로써, 조절 플라스틱로부터의 세포는 또한 트립신화 및 수확되고, 뒤이어 바이러스는 전통적인 동결과 용해 방법으로 방출한다. 이것은 4.0×10^9 vp/cm²의 생산성을 나타냈다. 이러한 결과는 iCELLis® 고정된-층 내부에서 용해된 세포로부터 바이러스의 방출이 효율적이라는 것을 증명했다. HEK293 세포로부터 아데노바이러스에 대한 동일한 용해 방법은 또한 293T 세포로부터 AAV 방출을 위해 테스트된다. AAV의 방출은 총 4.5×10^{13} VG의 총 수율에 도달하는데 효율적이다.

[0111] 바이러스의 추가 회수를 위해, 용해 및 수확 후 행균 단계가 테스트되고, 이는 매우 독특한 방법이며 많은 유형의 생물반응기에 적용할 수 없다. 생물반응기를 DMEM과 같은 정상 세포 배양 매체로 행구었을 때, 생물반응기가 용해 세제를 함유하는 완충액으로 행귀질 때 보다 적은 바이러스 입자가 회수되었다.

[0112] 8.5 저장액을 사용한 수확

[0113] 수율을 증가시키기 위해, 생산자 세포를 용해시키고 용해된 세포로부터 생성물을 수확할 수 있다. 세포를 용해시키기 위해서, 저장액을 사용할 수 있다. 이 테스트를 위해서, 우리는 iCELLis™ nano 생물반응기에서 저장의 세포 용해 실험을 수행했다. 이 방법에서, 세포는 훨씬 낮은 용질 농도를 갖는 용액에 노출되었다. 용질 농도에서 상이함은 삼투압 경도를 만든다. 세포 내부와 외부의 농도 균형을 맞추기 위해, 물이 세포 안으로 흘러서 세포가 부풀고 파열할 수 있다. 이 실험에서, 감염된 세포는 관개를 위해 물에서 이들을 배양함으로써 용해된다.

[0114] 현탁액 배양된 HEK293 세포는 4 m² iCELLis nano 생물반응기로 접종되고 DMEM - 10 % - 1 % L-글루타민 - 1 % 펜-단계(Pen-Step)를 사용하여 약 120 시간 동안 팽창된다. 생물반응기에서 팽창 후, 세포는 MOI 200을 사용하여 미리 증폭된 DVL WVSS 01 (rAd-IFN)로 감염된다. 감염 후 약 24 시간 후, 혈청이 없는 매체가 관류하기 시작했다. 감염 후 약 56 시간 후, 수확은 사용된 매체를 생물반응기에서 분리된 용기로 전달함으로써 시작된다. 관개를 위해 700 ml의 물을 생물반응기로 전달하고 가열없이 20 - 30 분 동안 100 %에서 교반된다. 그 다음 수확 재료는 분리된 백(bag)에 전달된다. 고정된 층을 행구기 위해, 관개를 위해 600ml의 물을 생물반응기로 전달하고 가열없이 5 - 10 분 동안 100 %에서 교반된다. 다음 행균 재료는 백으로 전달되고 수확 물질과 혼합된다. 샘플은 각 단계에서 취해지고 아데노바이러스 입자 농도는 AEX-HPLC에 의해 분석된다(표 1).

【표 1】

저장 세포 용해 실험에서 바이러스 입자 수율

샘플링 단계	부피(ml) (약)	바이러스 농도 (vp/ml) (AEX_15_032)	총 바이러스 수율 (vp)
매체	900	검출되지 않음	-
WFI 수확(중량)	693	1.78E+10	1.23E+13
WFI 행균	600	2.59E+10	1.55E+13
공동 수확(중량)	1338	2.88E+10	3.85E+13

[0115]

[0116] 9. DNA 분해 및 침전/응집 방지

[0117] 최종 생성물로부터 DNA 제거는 당국으로부터 요구된다. DNA 제거는 효소로 DNA를 분해함으로써 시작된다. 벤조나제™ 처리가 테스트될 때, 바이러스 함유 수확은 분리된 용기로 전달되고 벤조나제™ (100-400u/ML)의 농도를 증가시키는 것으로 처리된다. 배양 시간의 효과도 또한 평가된다(30 - 90 분). 이 실험은 37 °C에서 수확된 물질을 배양함으로써 수행된다. 벤조나제™ 처리가 분리된 용기에서 이루어질 때, 400U/ml 및 90 분 배양 시간을 사용하여 96% 게놈 DNA 제거가 달성된다. 생성물이 추가로 하류 처리될 때, 수확 후 또는 하류 처리 중에 바이러스 응집 또는 침전이 관찰되지 않는다. 이러한 결과는 세포 핵산의 하나의 단계 분해가 생물반응기 내부보다 분리된 용기에서 수행될 때 효율적이라는 것을 나타낸다. 대부분의 세포 파편이 여전히 고정된 층에 남아있을 때 생성물은 생물반응기로부터 수확된다(도 4).

[0118] 대안적으로, 벤조나제™ 처리가 생산자 세포 화학적 용해 전후에 고염 함유 완충액을 첨가하여 수행될 때, DNA 분해는 생물 반응기 내에서 테스트된다. 침전 형성은 현탁액의 혼탁도(FNU)를 측정함으로써 연구된다. 우리의 발견을 기반으로, DNA의 분해, 용해 세제(예를 들어, 트윈™ 또는 트리톤-X™) 및 고염의 첨가는 침전의 형성을 방지한다. 고농도염 용액이 1000 mM NaCl에 도달하도록 첨가했다. 최종 수확 샘플은, 혼탁도의 증가가 검출되지 않을 때 pre-벤조나제™, 트윈-20 기반 용해, 벤조나제™로 처리되고, 1M NaCl, 50 mM Hepes, 1 % m/V 트윈 20, 1 % 글리세롤을 함유하는 완충액으로 희석된 물질을 함유한다(도 5).

[0119] 개질

[0120] 기대에 완전히 반대되는 것으로 세포 또는 긴 적응 기술의 개질은 사용되지 않았다. FVT 시스템에 의해 제공되는 비 접착 배양은 iCELLis nano 담체에 접착할 수 있다.

[0121] 결과 및 논의

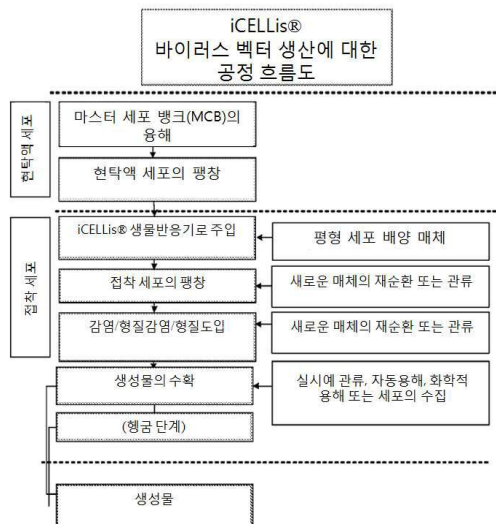
- [0122] 본 실시예는 현탁액 생물반응기에서의 비-앵커리지-의존성 현탁액-적응 HEK 293 세포의 팽창(예를 들어, 이는 Sartorius 사의 Cultibag 또는 대응하는 웨이브 생물반응기, 또는 실제로 현탁액 적응 세포를 위한 임의의 종류의 교반 탱크 생물반응기 또는 셰이커 플라스크 시스템일 수 있다) 및 접착 시스템에서 배양될 iCELLis 생물반응기 내에 이들의 접종을 입증한다.
- [0123] 공개된 모든 보고서는 접착 세포 팽창을 위한 유일한 옵션으로 예를 들어, 접착 회전 병, 세포 공장 또는 세포 스택을 사용하여 2 차원 접착 성장을 도입한다. GelBras 등은 iCELLis 생물 반응기, 그 기능 및 그 안에서 세포 성장을 연구하고 있다. 이들은 접착 세포가 생물반응기에 접종될 때, 세포는 예를 들어, 트립신(또는 유사한)을 사용하여 접착 플라스크/병(이들이 팽창되는)의 하단으로부터 먼저 분리되는 것이 필요하다는 것을 주목한다. 세포는 세포 성장 매체에서 현탁되고 생물반응기로 접종된다. 이 세포는 여전히 통상적으로 앵커리지-의존성 세포이다. Gelbras 등에 의해 연구된 바와 같이, 접종을 위한 제1 세포 현탁액을 형성, 그들은 정확하게 세포 성장과 세포 죽음은 접착 단계에서만 무시해도 될 정도라고 가정하고 있다. 제조업자의 전문가의 유일한 팁은 접종에 요구되는 세포의 수를 최소화하기 위해 절대 최소 세포 밀도를 연구하는 것이다. 이것은 현탁액 공정이 적응 세포가 접착하지 않도록 개질되었기 때문에, 아무도 이전에 임의의 크기의 접착 유형 생물반응기에 접종되도록 세포를 팽창시키기 위해 임의의 종류 현탁액 세포 시스템을 사용하는 것을 고려하지 않았다는 것이다.
- [0124] 우리의 발명이 주어질 때, 장인은 상이한 특정 응용분야에서 우리 연구의 이익을 달성하기 위해 변화를 용이하게 만들 수 있다. 예를 들어, 우리는 접착 세포 배양을 사용하여 배양된 생산자 세포를 용해시키는 것을 예시하는 반면에, 장인은 현탁액 모드로 배양된 생산자 세포를 용해시키는 동일한 기술을 용이하게 사용할 수 있다. 따라서, 우리는 상기 논의된 실시예가 아닌 아래 나열된 법적 청구항에 의해 정의된 우리의 특허 범위를 정의하고자 한다. 첨부된 청구항에서, 단수("a", "one")는 복수를 포함한다. 우리는 외래의 발현 가능한 핵산 서열을 숙주 세포에 도입하는 것을 광범위하게 포함하기 위해 "형질감염"이라는 용어를 사용한다; 이는 예를 들어, 바이러스성 벡터를 갖는 형질전환, 형질감염 및 감염을 포함한다. 법적 청구항에 명시적으로 언급된 경우를 제외하고 방법 단계는 임의의 순서에서 수행될 수 있다.
- [0125] **참고문헌**
- [0126] Dinney, C. P., M. B. Fisher, N. Navai, M. A. O'Donnell, D. Cutler *et al.* 2013 Phase I trial of intravesical recombinant adenovirus mediated interferon-alpha2b formulated in Syn3 for Bacillus Calmette-Guerin failures in nonmuscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* **190**: 850-856.
- [0127] Dormond, E., M. Perrier, and A. Kamen, 2009 From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield? *Biotechnol.Adv.* **27**: 133-144.
- [0128] Iyer, P., J. M. Ostrove, and D. Vacante, 1999 Comparison of manufacturing techniques for adenovirus production. *Cytotechnology* **30**: 169-172.
- [0129] Kamen, A., and O. Henry, 2004 Development and optimization of an adenovirus production process. *J. Gene Med.* **6 Suppl 1**: S184-S192.
- [0130] Lennaertz A., Knowles S., Drugmand JC. & Castillo J. Viral vector production in the integrity® iCELLis® single-use fixed-bed bioreactor, from bench-scale to industrial scale. 7 (Suppl 6), 59-60. 2013. BMC Proceedings.
- [0131] RefType: Generic
- [0132] Meuwly, F., P. A. Ruffieux, A. Kadouri, and S. U. von, 2007 Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: bioprocess and biomedical applications. *Biotechnol.Adv.* **25**: 45-56.
- [0133] Salmon, F., K. Grosios, and H. Perry, 2014 Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera(R)). *Expert.Rev.Clin.Pharmacol.* **7**: 53-65.
- [0134] Segura, M. M., A. Gamier, Y. Durocher, H. Coelho, and A. Kamen, 2007 Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification. *Biotechnol.Bioeng.* **98**: 789-799.
- [0135] Stacey, G. N., and O. W. Merten, 2011 Host cells and cell banking. *Methods Mol.Biol.* **737**: 45-88.
- [0136] Vellinga, J., J. P. Smith, A. Lipiec, D. Majhen, A. Lemckert et al. 2014 Challenges in manufacturing

adenoviral vectors for global vaccine product deployment. *Hum. Gene Ther.* **25**: 318-327.

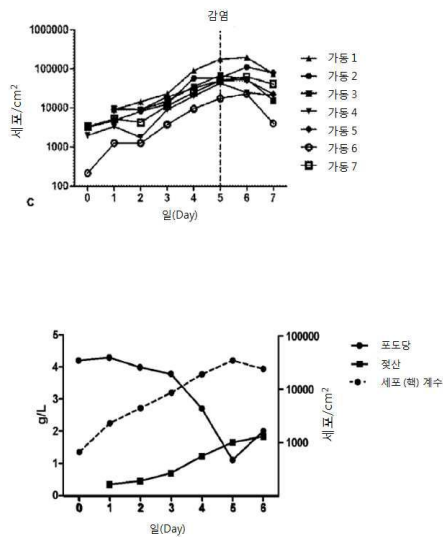
[0137] Wu, S. C, G. Y. Huang, and J. H. Liu, 2002 Production of retrovirus and adenovirus vectors for gene therapy: a comparative study using microcarrier and stationary cell culture. *Biotechnol.Prog.* **18**: 617-622.

도면

도면1



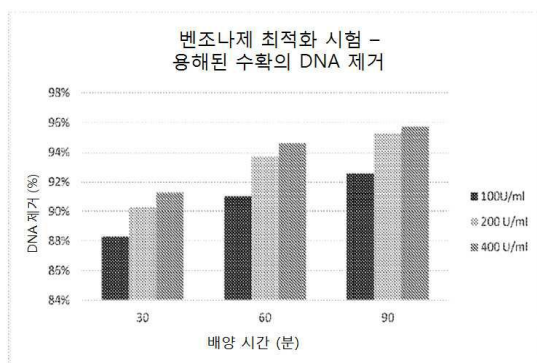
도면2



도면3



도면4



도면5

