



(19) **UA** (11) **72 732** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 5/00, 5/06, 7/00**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ**

(21), (22) Заявка: 2000074455, 17.12.1998

(24) Дата начала действия патента: 15.04.2005

(30) Приоритет: 24.12.1997 EP 97204110.7

(46) Дата публикации: 15.04.2005

(86) Заявка РСТ:
РСТ/EP98/08522, 19981217

(72) Изобретатель:

Брандс Руди, NL

(73) Патентовладелец:

ДЮФАР ИНТЕРНЕСНЛ РИСЕЧ Б.В., NL

(54) **ПРИГОТОВЛЕНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

(57) Реферат:

Изобретение касается способа приготовления клеток млекопитающих для использования в производстве вирусов путем размножения клеток до нужного объема предпроизводственной партии, в котором в повторяемом периодическом процессе:
а) часть клеток предпроизводственной партии используют для производства по крайней мере одной производственной партии, б) остальные клетки предпроизводственной партии используют как

затравку для приготовления по крайней мере одной следующей предпроизводственной партии.

Официальный бюлетьн "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 4, 15.04.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **72 732** (13) **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 5/00, 5/06, 7/00**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2000074455, 17.12.1998

(24) Effective date for property rights: 15.04.2005

(30) Priority: 24.12.1997 EP 97204110.7

(46) Publication date: 15.04.2005

(86) PCT application:
PCT/EP98/08522, 19981217

(72) Inventor:
Brands Rudy, NL

(73) Proprietor:
DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B.V., NL

(54) preparation of cells for production of biological objects.

(57) Abstract:

The present invention relates to a method for the preparation of mammalian cells for use in the production of viruses, by culturing cells up till a desired cell volume of a preproduction batch, where after in a repeated discontinuous process:
a) part of the cells of the preproduction batch is used for the preparation of at least one production batch, and b) the remaining part of

the cells of the preproduction batch is used as a seed for the preparation of at least one subsequent preproduction batch.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 4, 15.04.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **72 732** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **C 12N 5/00, 5/06, 7/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2000074455, 17.12.1998

(24) Дата набуття чинності: 15.04.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 24.12.1997 EP 97204110.7

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.04.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/EP98/08522, 19981217

(72) Винахідник(и):
Брандс Руді , NL

(73) Власник(и):
ДЮФАР ІНТЕРНЕТНЛ РІСЬОЧ Б.В., NL

(54) ПРИГОТУВАННЯ КЛІТИН ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу приготування клітин ссавців для використання у виробництві вірусів шляхом розмноження клітин до потрібного об'єму передпродукційної партії, в якому у повторюваному періодичному процесі: а) частину

клітин передпродукційної партії використовують для виробництва принаймні одної продукційної партії, б) решту клітин передпродукційної партії використовують як затравку для приготування принаймні одної наступної передпродукційної партії.

Опис винаходу

Винахід стосується способу приготування клітин для використання у виробництві біологічних об'єктів.

Для виробництва біологічних об'єктів, наприклад, клітинних ліній, тобто колоній клітин, що походять від одного спільного предка, необхідно приготування клітин у великих обсягах з використанням масштабування у біореакторах.

У патенті СІПА № 5017490 описана така методика масштабування, яка зокрема має перевагу в тому, що ймовірність забруднення при перенесенні мала. Втім, цей спосіб непридатний для мембранозалежних клітин (отже, для клітин, що ростуть лише, якщо прикріплені до підложки), або для клітин, закладених до підложки (наприклад, у пористі носії).

У патенті США № 4644912 описано спосіб приготування мембранозалежних клітин для виробництва біологічних об'єктів (наприклад, вірусів), згідно з яким спочатку роблять посів клітини, а потім послідовними проходами нарощують обсяги біореакторів на 1 л, 5 л, 25 л, 150 л і, накінець, завершують процес у біореакторі на 1000 л або у кількох по 150 л. У проміжках цих проходів клітини відокремлюють від носіїв розбавленим розчином протеази. На завершальному проході здійснюють інокуляцію вірусом.

Приймаючи середній клітинний цикл у 20-24 години, проміжки між проходами становлять біля 3-5 діб. Отже, аби виростити досить великі культури з РБКВ (робочого банку клітин виготовлювача), процедура масштабування потребує до кількох тижнів залежно від обсягу кінцевого біореактору.

У відомих способах приготування клітин кожна кінцева продукційна партія має походити з РБКВ. Для одержання біологічних об'єктів у великих кількостях необхідно задіяти кілька паралельних ліній вирощування культур аж до найбільших обсягів апаратів. Отже, такий спосіб займає надто багато часу й потребує дуже великої кількості біореакторів як для приготування клітин, так і для напрацювання біологічних об'єктів.

Завдання цього винаходу полягає у прискореному приготуванні клітин для одержання біологічних об'єктів.

Згідно з цим винахід стосується способу приготування клітин ссавців для застосування у виробництві вірусів шляхом вирощування клітинних культур до потрібного обсягу передпродукційної партії, де у повторюваному періодичному процесі:

а) частину клітин передпродукційної партії використовують для виробництва принаймні одної продукційної партії,

б) решту клітин передпродукційної партії використовують як затравку для приготування принаймні одної наступної передпродукційної партії.

Зокрема, винахід стосується способу приготування клітин ссавців для застосування у виробництві вірусів шляхом вирощування клітинних культур до потрібного обсягу передпродукційної партії, де у повторюваному періодичному процесі:

а) частину клітин передпродукційної партії переносять для використання у виробництві принаймні одної продукційної партії,

б) решту клітин перепродукційної партії переносять для використання в ролі затравки у приготуванні принаймні одної наступної передпродукційної партії.

У найприйнятнішому варіанті здійснення цього винаходу першу передпродукційну партію готують з матеріалу робочої затравки у принаймні один прохід.

В іншому найприйнятнішому варіанті здійснення винаходу клітини, що готуються, є мембранозалежними. В останньому випадку такі клітини необхідно вирощувати на підложці. Отже, рекомендується у повторюваному процесі кожного разу, коли частину партії використовують для приготування наступної партії, додавати свіжу підложку. У найприйнятнішому варіанті використання кожного разу перед додаванням підложки принаймні частину клітин спочатку відокремлюють від попередньої підложки.

У цьому контексті "продукційна партія" означає культуру клітин, що використовується для виробництва біологічних об'єктів.

"Передпродукційна партія" означає культуру клітин, яка використовується у способі за винаходом для одержання принаймні одної продукційної партії (як визначено вище) та одної наступної передпродукційної партії.

"Біологічний об'єкт" тут означає будь-яку речовину або організм, що їх можна одержати з клітинної культури. Як приклади біологічних об'єктів можна навести віруси або білки, зокрема ферменти.

"Робоча затравка" означає деяку кількість певного виду клітин відомого походження, що їх витримують як затравку, з якої вирощують усі культури того самого виду клітин.

Термін "мембранозалежні клітини" означає клітини, які для їх належного росту та/або відтворення мають бути прикріплені до підложки.

"Підложка" - будь-яка речовина, яку використовують для прикріплення клітин.

"Прохід" - послідовність операцій у розмноженні та виробництві клітин, що включає принаймні закладення достатньої кількості клітин та достатньої кількості культурного середовища до продукційного апарату, інкубацію апарату за умов, придатних для росту та розмноження клітин протягом часу, достатнього для ефективного росту та розмноження клітин. Крім того, прохід може включати відокремлення клітин від культурного середовища та/або від підложки після часу, достатнього для ефективного росту та розмноження клітин.

Спеціалістам зрозуміло, що спосіб за цим винаходом суттєво відрізняється від відомих способів, за якими клітини одержують у безперервному процесі, а не у періодичному, як за винаходом. Згідно з Європейською заявкою 0417531 та заявкою РСТ 89/08701, безперервні культурні системи можуть використовуватися також для

вироблення вірусів. Клітини спочатку вирощують у першому біореакторі, а коли вони досягнуть певної густини, безперервно переносять із зазначеного першого біореактору до другого біореактору. У другому біореакторі на клітинах вирощують віруси, що їх безперервно відбирають з другого біореактору.

Спосіб за винаходом ґрунтується на використанні материнського біореактору, з якого живлять клітинами продукційний біореактор (біореактори). Якщо клітини мембранозалежні, то після кожного проходу їх необхідно відокремлювати від підложок.

Для цього створено процедуру трипсінізації великих біореакторів.

Продукційні клітини визначають аж до необхідної кількості проходів для так званого РБК (розширеного банку клітин). Запропонований спосіб забезпечує високу продуктивність завдяки значному скороченню шляху масштабування від РБК до продукційних клітин та кількості біореакторів, бо паралельні виробничі лінії тут не потрібні.

Різні варіанти здійснення винаходу зображені на Фіг.1.

У найприйнятнішому варіанті здійснення винаходу клітини розмножують з однієї ампули РБКВ аж до рівня першої передпродукційної партії за один чи кілька проходів. Робочий обсяг біореактору, що використовується для такої передпродукційної партії, може становити від кількох літрів до кількох сотень літрів. Потім частину, наприклад, 10-20% клітин, розмножених таким чином (наприклад, прохід X) використовують для репопуляції наступної передпродукційної партії (прохід X+1), тимчасом як решту клітин переносять (прохід X або X+1) до більшого біореактору з метою почати безпосереднє вироблення або спочатку заселити, а потім розпочинати вироблення.

У класичному серійному виробництві число подвоєння клітин, що походять від РБКВ, на момент збору відомо у певному ступені заздалегідь. Максимально припустиме число генерацій закладають до продукційної системи з самого початку.

У способі за винаходом максимальна кількість проходів клітин може визначатися РБК. Отже, кількість продукційних проходів (кількість проходів, що передують виробленню біологічного об'єкту) у межах, визначених РБК, не відіграє ролі. Внаслідок цього треба дотримуватися лише цієї максимальної кількості проходів. Завдяки цьому кожна партія кінцевого біологічного продукту одержується шляхом прямого масштабування.

Аби впевнитися, що характеристики клітин на стадії РБК подібні до ВБК (вихідного банку клітин), треба провести відповідну перевірку щодо характеристик зростання, прибукалих, сторонніх та ендогенних агентів на різних стадіях, каріологічний аналіз ізоензимів та ін. Після повної характеристики такого РБК можна дозволити вироблення продукту з клітин за будь-яку кількість проходів між ВБК та РБК, бо можна бути певним, що параметри клітин не змінилися. Завдяки цьому випробування РБКВ можна обмежити лише перевіркою стерильності. У цьому полягає особлива перевага способу за винаходом.

При максимальній заданій кількості проходів клітини можна використовувати на будь-якій проміжній стадії.

Аби звести до мінімуму час, потрібний для розмноження клітин від РБКВ до біореактору, доцільно дозволити масовий запуск клітин. Цього можна досягти одним з кількох способів:

Клітини можна витримувати на певному проході довший час за температури середовища (17-32°C), а потім запустити логарифмічне зростання за рахунок підвищення температури та зміни культурного середовища; або

Клітини можна заморозити у масі до температури нижче за -80°C та відтаяти, після чого перенести їх до біореактору певного обсягу, що значно скорочує необхідність масштабування.

Спосіб за винаходом придатний для культур тваринних клітин, зокрема для мембранозалежних клітин. Це можуть бути хом'ячі (CHO, ВНК-1), мавпячі (Vero), бичачі (MDBK), собачі (MDCK), людські (CaCo, A431) або курячі (CEF) клітини.

Біореактором згідно з винаходом може бути єдиний апарат або кілька апаратів, наприклад, ферментери з мішалкою, ферментери з нерухомим шаром, ферментери з подачею повітря або реактори з системою порожнистих волокон.

Клітини зазначених видів можна, а деякі навіть треба культивувати прикріпленими до твердої підложки типу мікроносіїв або макроносіїв у суспензії, наприклад, у нерухомому шарі, киплячому шарі або суспензії, або у вигляді порожнистих волокон. Клітини можна також вміщувати до реактору (наприклад, пористі носії).

У способі за винаходом, зокрема з використанням твердої підложки, клітини треба відокремлювати від такої твердої підложки. Це можна здійснювати будь-яким відомим чином. Доцільно використовувати для цього розчин протеолітичного ензиму. Перед відокремленням за допомогою ензиму можливі підготовчі операції, наприклад, обробка ПБС та/або ЕДТО з метою посилення протеолітичної активності та/або зменшення споживання протеолітичного ензиму.

ПРИКЛАД 1

Відчеплення та відокремлювання клітин від носіїв перед переносом до наступного біореактору

Мембранозалежні клітини лінії MDCK (собачої нирки Мадін Дарбі) культивують при 37°C на мікроносіях Цитодекс-3 фірми Фармація (Упсала, Швеція) (5г носіїв/л) у 4-літровому біореакторі з мішалкою ("материнському біореакторі") на середовищі ЕпіСьорф фірми Лайф технолоджіз (Пейслі, Шотландія). Зростання продовжують до максимуму 5 x 10⁶ клітин/мл культури.

Клітини відчіпляють від носіїв трипсінізацією у розчині трипсін-ЕДТО фірми Лайф технолоджіз (Пейслі, Шотландія).

Після зсідання носіїв 80% відчеплених клітин переносять до 3 інших біореакторів такої самої місткості. У ці "продукційні" біореактори носії (клітинні підложки) вже закладені заздалегідь. Клітинам дають репопулювати носії, після чого використовують для виробництва у цих продукційних біореакторах.

Решті клітин у материнському біореакторі дають репопулювати носії Цитодекс-3, що залишилися, та

культивують до завданої густини клітин.

ПРИКЛАД 2

Відчеплення клітин без відокремлення від носіїв перед перенесенням до наступного біореактору

Клітини культивують, як описано у прикладі 1, але після трипсінізації 80% відчеплених клітин разом з носіями переносять до 3 продукційних біореакторів. До всіх біореакторів додають нові придатні носії.

ПРИКЛАД 3

Відчеплення клітин без відокремлення від носіїв після перенесення до наступного біореактору

Клітини культивують, як у прикладі 1, втім, 80% ще прикріплених клітин передають до біореактору такої самої місткості, який після цього використовується безпосередньо як продукційний.

Решту клітин на мікроносіях у материнському ферментері відчіпляють шляхом трипсінізації, потім додають нові носії, а клітинам дають репопулювати підложки.

ПРИКЛАД 4 Запуск із замороженої клітинної маси

У цьому експерименті частину культури використовують для поповнення материнського ферментеру та деяких дочірніх ферментерів, а частину культури використовують для заморожування клітинної маси.

Заморожену клітинну масу (разом $14,4 \times 10^8$ клітин) інокують у вихідній культурі у 3-літровому материнському ферментері, який містить 5 г/л Цитодексу та середовище ЕпіСьорф, після чого провадять інкубацію при 37°C. Решту кріоконсервів видаляють при зміні середовища першого дня.

На другий день здійснюють трипсінізацію, 50% клітин заморожують у масі, а решту клітин інокують до мікроносіїв у наступному ферментері.

З таблиці 1 можна побачити, що другого та третього дня клітини продовжують зростання у нормальному темпі.

Четвертого дня вміст материнського ферментеру відчіплюють трипсином та прикріплюють до нових мікроносіїв (10 г/л) у двох інших ферментерах услід материнському.

На п'ятий день виявляється, що ефективність культивування становить біля 85%.

Таблиця 1			
День	3-літровий материнський ферментер	3-літровий ферментер	3-літровий ферментер
	Клітин x 100.000/мл	Клітин x 100.000/мл	Клітин x 100.000/мл
0	Немає даних		
1	6,6		
2	14		
3	15,5		
4	30		
5	5,5	10	10
Ефективність культивування	85%	85%	85%

ПРИКЛАД 5

Перенесення з малого материнського ферментеру до великого продукційного ферментеру

Клітини масштабують до великої партії у ферментерах місткістю 65 літрів та 550 літрів (робочий обсяг відповідно 50 та 250 літрів) за густини мікроносіїв Цитодекс 5г/л. Як видно з таблиці 2, 90% загальної кількості клітин переносять до великого ферментеру з 50-літрового ферментеру, де вирощено культуру густиною 800.000 клітин/мл, з них 69% життєздатні.

У 50-літровому материнському ферментері до 69% повторно вирощуваних клітин теле виявилися життєздатними.

Спосіб здійснювався наступним чином:

Нульового дня носіям дали осісти у 50-літровій культурі, потім надосадову рідину (культурне середовище) видалили й замінили на ПБС. Вміст ферментера перемішували 5-15 хвилин. Після відстоювання носіїв надосадову рідину видалили. За потреби цю операцію можна повторювати.

Далі цю стадію повторили з ПБС/ЕДТО (0,4г ЕДТО/л ПБС). Культуру знову перемішували 5-15 хвилин, дали носіям осісти, видалили надосадову рідину й повторювали операцію з ПБС/ЕДТО, аж доки клітини не округлилися й зробилися готові до відчеплеї-ся трипсином.

Тоді до ПБС/ЕДТО додали трипсін (0,025% кінцевої концентрації) та інкубували 5-15 хвилин. Після цього переносили або надосадову рідину з вмістом клітин (після відстоювати! "оголених" носіїв), як у прикладі 9, або суміш клітин з носіями (80% загального обсягу суміші).

Після перенесення клітин до 550-літрового ферментеру решті клітин (тобто 10% кількості життєздатних клітин) дали репопулювати носії, які ще залишилися у ферментері після поповнення 50-літрового ферментеру культурним середовищем.

До 70% клітин виявилися життєздатними.

Таблиця 2		
День	50-літрова культура	250-літрова культура
	Клітин x 100 000/мл	Клітин x 100 000 /мл
0	8 (разом клітин 400×10^8)	1,1 (275×10^8 життєздатних клітин)
1		0,8
2		2,9

3		3,4
4		8,9
5		18.0

ПРИКЛАД 6

Подібно до прикладу 5, але 80% культури прив'язаних до носіїв клітин передали з материнського біореактору до продукційного біореактору. Вироблення почалося з додаванням вірусу.

20% клітин та носії, що залишилися у материнському біореакторі, піддали трипсінізації й розщепленню, а після додавання нової підложки до материнського біореактору дали репопулювати материнський біореактор, поки у фізично відокремленому продукційному біореакторі йшло вироблення продукту.

ПРИКЛАД 7

Запуск повномасштабної культури із замороженої клітинної маси

Заморожену клітинну масу відтаяли та інокулювали у ферментері робочим обсягом 10 л (густина носія Цитодекс 4г/л; культурне середовище ЕпіСьорф) за густини інокуляції 1×10^6 клітин/мл. Після причеплення культурне середовище змінили з метою видалення залишкових кріозахисників.

Після дня 1 кількість життєздатних клітин, причеплених до носіїв, становила $0,45 \times 10^6$ клітин/мл; з цього моменту почалося зростання. За густини $2,8 \times 10^6$ клітин/мл клітини відчепили шляхом трипсінізації й перенесли 80% до ферментеру робочим обсягом 50 л (вміст носіїв 5 г/л).

Як можна підрахувати з таблиці 3, першого дня кількість життєздатних клітин після розморожування клітинної маси становила біля 45%.

Із загальної кількості перенесених клітин життєздатними після відчеплення трипсіном виявилися 71,4%.

Таблиця 3		
День	Густина клітин ($\times 10^6$ /л) у:	
	10-літровому ферментері	50-літровому ферментері
0	1,0	
1/2	0,45	
3/4	1,3	
5	2,6	
6	2,6 (разом 280×10^8)	
6	0,6 (разом 60×10^8)	0,28 (140×10^8)
7		0,4 (200×10^8)

Переклад надписів на кресленнях Фіг. 1

1 ampule - ампула,

2 scale up - масштабування,

3 bulk - маса,

4 direct - безпосереднє перенесення,

5 mother fermenter - материнський ферментер,

6 10-20% turns on itself-10-20% повертаються до циклу,

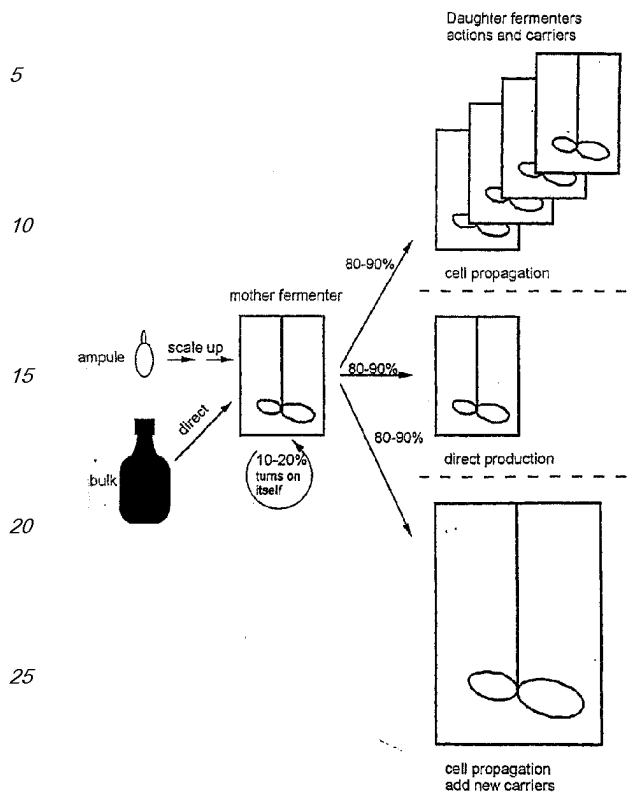
7 daughters fermenters actions and carriers - дочірні ферментери: дії та носії,

8 cell propagation - розмноження клітин,

9 direct production - безпосереднє вироблення,

10 cell propagation add new carriers - розмноження клітин з додаванням нових носіїв.

FIGURE 1



Формула винаходу

1. Спосіб приготування клітин ссавців для застосування у виробництві вірусів шляхом розмноження клітин до потрібного об'єму передпродукційної партії, у якому у повторюваному періодичному процесі:

а) частину клітин передпродукційної партії використовують для виробництва принаймні одної продукційної партії,

б) решту клітин передпродукційної партії використовують як затравку для приготування принаймні одної наступної передпродукційної партії.

2. Спосіб за п.1, у якому у повторюваному періодичному процесі:

а) частину клітин передпродукційної партії переносять для використання у виробництві принаймні одної продукційної партії,

б) решту клітин передпродукційної партії переносять для використання у ролі затравки для приготування принаймні одної наступної передпродукційної партії.

3. Спосіб за пп. 1 або 2, який відрізняється тим, що першу передпродукційну партію готують з робочої маси за принаймні один прохід.

4. Спосіб за пп.1-3, який відрізняється тим, що клітини є мембранозалежними.

5. Спосіб за п.2, який відрізняється тим, що клітини є мембранозалежними, їх вирощують на підкладці й перед кожною стадією перенесення відокремлюють клітини від підкладок.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 4, 15.04.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.