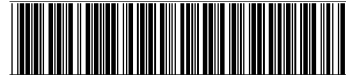




(19) **REPUBLIKA HRVATSKA**  
**DRŽAVNI ZAVOD ZA**  
**INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO**



(10) Identifikator  
dokumenta:

HR P950097 A2

HR P950097 A2

## (12) **PRIJAVA PATENTA**

(51) MKP<sup>6</sup>: **C 12 N 5/00**  
**C 12 N 7/00**  
**A 61 K 39/29**

(21) Broj prijave: P950097A  
(22) Datum podnošenja prijave patenta: 02.03.1995.  
(43) Datum objave prijave patenta: 30.06.1997.

(31) Broj prve prijave: 08/208,162 (32) Datum podnošenja prve prijave: 08.03.1994. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US  
(62) Broj i datum prvobitne prijave u slučaju podjele patenta:

(71) Podnositelj prijave: **Merck & Co. Inc., P. O. Box 2000, Rahway 07065-0907, NJ, US**  
(72) Izumitelj: **Frank S. Leu, 225 Bellows Way, Lansdale, 19446 PA, US**  
**Douglas B. Seifert, 2216 Rebecca Drive, Hatfield, 19440 PA, US**  
(74) Zastupnik: **odvjetnik Damir Mijatović, Zagreb, HR**

(54) Naziv izuma: **POSTUPAK ZA DOBIVANJE KULTURE VIRUSA HEPATITISA A**

(57) Sažetak: Postupak na bazi mikronosača za dobivanje virusnih vakcina, od kojih je jedan primjer virus hepatitisa A (HIV) koji se sastoji od jednog agregiranog mikronosačkog sistema od staklom obloženih polistirolnih mikronosača i MRC-5 stanica što daje stabilnu okolinu za razmnožavanje virusa čak preko produženih infekcijskih razdoblja. Mikronosački agregati formirani prema ovom postupku eliminiraju otpadanje stanica sa granula tokom drugih kultivacija što se događa u dugim sistemima, omogućavajući visoku produktivnost virusa u mikronosačkoj kulturi. Metodologija je primjenjiva tamo gdje se proizvodnja virusa može poboljšati kreiranjem stabilne kulture tokom produženog infekcionog razdoblja. Upotrebljavaju se bioreaktori koji se mogu mijenjati po veličini koji se miješaju umjesto višestrukih paralelnih bioreaktora sa stacioniranom površinom. Ovaj agregirani mikronosački postupak eliminira ograničenja kapaciteta bioreaktora sa stacioniranom površinom, on štiti stanice na kojima je virus kultiviran od micanja, osigurava povećane interakcije stanica na stranicu, osigurava stabilnu sredinu za razvijanje virusa, osigurava slobodan prostor za konvektivni transport hranjivih materijala kroz agregate, i osigurava direktan postupak za sakupljanje virusnog lizata za kasniji tok proizvodnje.

HR P950097 A2

Prema međunarodnoj klasifikaciji patenta ovaj izum spada u grupu A61K-039/29.

Područje ovog izuma je postupak za dobijanje virusa u staničnoj kulturi mikronosača. Navlašeni MRC-5 stanice kultivirane na mikronosačima obloženim staklom i inficiranje virusom hepatitisa A su primjeri ovog postupka.

Mnogi virusi i terapijski proteini se dobivaju stanicama zavisnim od usidrenosti, gdje je vezanost stanica za površinu preduvjet za rast stanica i pogodnu funkciju stanične linije. Kada se zahtijevaju relativno male količine, višestruke T-boce i "Roller"-boce se tradicionalno koriste da bi se dobilo potrebno površinsko područje. Drugi komercijalno dostupni sistemi kao NUNC STANIČNE TVORNICE (NUNC CELL FACTORIES) i COSTAR CUBES imaju bitno povećano površinsko područje i tako povećanu produktivnost po biorektorskoj stanici. Međutim, ovi sistemi još uvijek zahtijevaju višestruke birokratske stanice za velike količine i stoga su ograničeni u potencijalu povećanja razmjera za komercijalnu proizvodnju.

Također su razvijeni različiti sistemi pakiranih slojeva, uključujući reaktore sa šupljim vlaknima, pakiranim slojevima sfera, pakiranim slojevima stohastički orijentiranih vlakana, i poroznih keramičkih monolita. Ovi sistemi imaju dokumentirane teškoće sa održavanjem snabdijevanja hranjivim materijalom stanica u reaktoru zbog konfiguracije reaktora i ograničenja u transportnim putevima hranjivog materijala usljed rasta stanica. Reaktori od šupljih vlakana počivaju na difuziji i "Starling" toku za osiguravanje toka medijuma kroz staničnu komoru/vidjeti J.M. Piret (1989), B.C.D Thesis, dept. of Chem. Eng., mass. inst. technology, Kolovoz. Difuziona pentracija hranjivog materijala je samo tada adekvatna ako se dubina stanične akumulacije na vlaknima može kontrolirati i ako je homogena, što nije slučaj u ovim reaktorima. "Starling" tok opada kako dolazi do rasta stanica, usljed povećanog otpora u toku, do kojeg dolazi zbog rasta stanica. Ovo smanjuje mješanje unutar komore za stanični rast. Stohastički pakirani slojevi granula ili vlakana zasnivaju se na prinudnoj konvekciji i oni su podložni kanaliranju kroz puteve najmanje hidraulične otpornosti, obilazeći područja gdje je površinsko područje najgušće i prema tome vjerojatno sadrži stanice. Porozni keramički monoliti su u ovom smislu bolji, ali ovi imaju jedan drugi nedostatak, pate od bitrouljenja.

Kao stanice rastu na površini vezivanja, one mogu suziti ili začepiti puteve gdje se odvija tok medijuma /J.E. Putman i sarad., Ann.Mtg. Soc. ind. MicrobioL, Orlando, Florida, 1.08.1990/. U slučaju keramičkih monolita, usljed rasta stanica dolazi do sužavanja kanala, tako da dolazi do povećanja hidrauličnog otpora na tok. Međutim tada prvenstveno teče kroz druge paralelne kanale, i kao rezultat ovog kanal sa najvećim rastom stanica dobiva najmanje medijuma. Zbog ovih heterogenosti u staničnoj mikrokolini i ograničenog potencijala povećanja razmjera, ovi reaktori su imali ograničen uspjeh; nije poznata ni jedna U.S. licencirana humana vakcina ili terapijsko sredstvo koji su proizvedeni ovim sistemima.

Poznata je upotreba statičkih elemenata miksera u staničnoj i virusnoj kulturi, vidjeti Grabner i Paul, U.S. patent 4,296, 204. Upotreba mrežica za kultiviranje primarnih tkiva koje se sastoje od nekoliko staničnih tipova nalazi se u U.S. patentu 4,963,489 i 5,160,490. Tkivo koje se dobiva iz kulture sa mrežice stromalnih fibroblasta je prijavljeno u 4,963,489. Upotreba nepokretnih elemenata za mješanje kao površine za rast stanica osigurava homogeni transport hranjivog materijala staničnoj populaciji. Problem povećanja razmjera, čišćenja, i sterilizacije ostaju izazov za komercijalnu primjenu ovih sistema birokratora. pored toga, biomasa u ovim sistemima ne može direktno pratiti tok kultiviranja. Zato je neophodno koristiti indirektna mjerenja stanične mase za karakteriziranje izvođenja u birokratoru. Iz istih razloga, može biti također problematično uklanjanje proizvoda asociiranih sa stanicama, sa ovim konfiguracijama reaktora.

Tehnologija mikronosača osigurava veliku količinu površinskog područja. za rast stanica na malim, sferičnim granulama, (promjera 90 do 250 mikrona) koji su suspendirani u posudi biorektora koji se mješa. Može se postići veliki odnos površine prema volumenu, što ima kao posljedicu vrlo efikasan proizvodni sistem u odnosu na volumen biorektora. Ovom tehnologijom se osigurava homogena okolina stanične kulture sa mogućnošću kvanifikacije stanične mase i prikupljanja proizvoda povezanih sa stanicama tokom kultiviranja. Pošto je bioreaktor posuda koja se mješa, mogu se postići dobro uhodani postupci čišćenja i sterilizacije, kao i cjelokupan projekat posude koji se može dobiti iz fermentacione industrije za komercijalnu primjenu. Komercijalna proizvodnja Rabies vakacine (vakacine protiv bjesnila) i vakacine protiv šapa (Foot and Mouth disease) upotrebljavajući kulturu mikronosača ilustriraju provjerenu mogućnost povećanja razmjera ovog postupka.

Iako se mnoge stanične linije i virusi razmnožavaju na mikronosačima, ostaju mnogi problemi u primjeni ove tehnologije u komercijalno omjeru. Zadržavanje okoline niskog micanja za vrijeme kultiviranja i održavanje vitalne kulture za stalno formiranje proizvoda tokom produženih razdoblja kultiviranja može biti teško. Izbor pogodnih mikronosača i uvjeta kulture je često krirično u dobijanju željenog proizvoda. Razmnožavanje hepatitisa A je dobar primjer ovih problema. Junker, B. i sarad., ("Evalatiuon of Microcarrier process for Large Scale Cultivation of Attenuated Hepatitis A" Cytotechnology, Vol. 9, 1-3, 1992) opisuje procijenjivanje CYTODEX-3 mikronosača kao substrat za MRC-5 stanični rast i narednu infekciju virusom hepatitisa A. Osnovni doprinos niskim titrajima hepatitisa A iz kultura mikronosača se pripisuje činjemci da stanice postepeno otpadaju sa granuje tokom razdoblja infekcije.

Na osnovu ovih rezultata objavljeno je da je tehnologija mikronosača ispod optimalne za komercijalni obim proizvodnje virusa hepatitisa A. pošto je kultura virusa hepatitisa A dana kao primjer u ovom patentnom otkriću, na mjestu je dani kratak pregled postupak za kultiviranje ovog virusa.

5 1973 Feinstone i sarad.,/Science 182, str. 1026/ identificirali su etiološki agens infektivnog hepatitisa, kasnije poznatog kao virus hepatitisa A (HAV), upotrebljavajući imunsku elektronsku mikroskopiju. In vitro kultura virusa hepatitisa A (HAV) prvi put je objavljena od strane Provosta i sarad., /P.S.E.B.M. 160, str. 213, 1079/ prema postupku gdje je jetra HAV-om inficiranih marmozet majmuna upotrebljena kao inokulum za eksplant kulturu jetre i fetalnog rezus bubrega (FRhK6) staničnu kulturu /U.S. patent 4,164,566/. U kasnijem izumu, uspješno je upotrebljena direktna inokulacija HAV-a, koja nije prethodno prošla kroz subhumani primat, za iniciranje in vitro razmnožavanja HAV-a /Provost i sarad., P.S.E.B.M. 167, str. 201 (1981); U.S. Patent 5,021,348/.

15 Iz ovog rada, je demonstrirano slabljenje HAV kroz *m vitro* kulturu. pored toga, pokazano je, da su poslije ponovljenog prolaska in vitro. HAV kulture postale produktivnije i replikaciona brzina je povećana kako je virus postao adaptiran na kultivirane stanice. Dalji razvoj je bila demonstracija zaštitne efikasnosti kako živog oslabljenog virusa/provost i sarad., J. Med Viol. 20, str. 165 (1986)/ i formalinom inaktiviranog HAV-a/U.S. Patent 4,164,566; U.S. patent 5,021,348; Provost i sarad., u Viral Hepatitis and Liver Disease, str. 83-86, 1988-Alan R. Liss, Inc/. Iz prethodnog rada, postalo je jasno da su bilo inaktivirani ili oslabljeni, imunogeni PLAV mogući kandidati za vakcinu. međutim, potreban je reproduktivni, komercijalnih razmjera postupak za dobivanje antigena visoke čistoće, ako treba biti komercijalno dostupna sigurna HAV vakacina za upotrebu kod ljudi.

25 Opisani su različiti postupci za kultiviranje HAV za proizvodnju vakcine. tako su, Provost i sarad., (US 5,021348) opisali postupak kojim se, u prvenstvenom postupku, MRC-5 stanična kultura inficira sa HAV-om. Prema ovom otkriću, virus i stanice se uzgajaju prema konvencionalnim postupcima u monosloju. U US Patentu 4,783,407, HAV se razvija u vero stanicama (tip bubrežnih stanica primata). U US Patentu 4,301,209 opisan je visok titar HAV proizvodnje u kapilarnoj stanici od šupljih vlakana. U US Patentu 4,412,002 opisan je postupak kojim se HAV izolira iz trajno inficiranih stanica. U EP 0 302 692 HAV kultura u "roler" bocama je opisana. u svim ovim sistemima, proizvodnja u velikom obimu za proizvodnju HAV koja se zahtijeva za komercijalni postupak nije bila izvodljiva ili je bila ozbiljno ograničena količnom površinskog područja dostupnim za stanične slojeve da bi se postigla infekcija HAV-om.

30 U 1984, Widel i sarad., objavili su razmnožavanje divljeg tipa Hepatitisa A u staničnoj liniji bubrega fetalnogrezus majmuna (Frh-k) razvijenoj na CYTODEX 3 mikronosačima na 37°C (Widall, A. i sarad./A Microcarrier Cell Culture System for Large Scale Production of Hepatitis A Virus," J. Virological Methods, vol 8, 63-71, 1984). Nije bilo spomena o staničnim gubicima ili agregaciji mikronosača upotrebljavajući CYTODEX 3 mikronosača kao površinu rasta za Frh-k stanice. Pošto je isti sistem mikronosača određen od strane Junker-a i sarad., kao nepogodan za proizvodnju oslabljenog virusa u MRC-5, ovi sistemi kulture su jasno veoma različiti. Stoga, MRC-5, humane diploidne stanične linije, koje su bolje od Frh-k staničnih linija iz majmuna za proizvodnju humane vakcine, ne mogu se uspješno kultivirati za proizvodnju vakcina za hepatitis A upotrebljavajući postupak koji je opisao Widel usljed tendencije MRC-5 stanica da formiraju mikronosačke agregate. Pošto je metodologija koju je opisao Widel ograničena na FRH-stanice gdje agregacija i stanični gubici nisu spominjani, nije došlo do spoznaje kako da se nadmaše ovi problemi iz ovog rada kada se upotrebljavaju MRC-5 stanice.

45 Agregacija stanica u mikronosačkoj staničnoj kulturi je potpuno uobičajena i spomenuta je u publiciranoj literaturi od sredine 1970-tih. međutim malo radova je specifično upućeno od sredine 1970-tih. međutim malo radova je specifično upućeno ovoj temi. Nekoliko relevantnih publikacija je prodiskutirano niže:

50 Varani i sarad., (1983) su uporedili rast MRC-5 diploidnih stanica i dvije transformirane stanične linije na mikronosačima obloženim staklom i mikronosačima šaržiranim sa DEAE-dekstranom (Varani, J., i sarad., "Growth of Three Established Cell Lines on Glass microcarriers", Biotech. and Bioeng., Vol. 25, 1359-1372, 1983) Mikronosačka agregacija se događa sa sve tri stanične linije na mikronosačima obloženim staklom, dok se samo jedna kontinualna stanična linija agregira sa dekstran mikronosačem. Analize skanirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) ilustriraju dramatičnu razliku u načinu na koji su stanice vezane na dvije površine. U kulturama staklenih mikronosača, stanice se vezivaju dugom filopodijom, dok se kod DEAE dekstran mikronosača vezivanja događa preko cijelog ruba stanice. Ova razlika u mehanizmu vezivanja može biti važan faktor u stabilnosti koju smo mi objavili za MRC-5/SOLOHILL staklom obložen sistem nad MRC-5/dekstran sistemima.

60 Goetghebeur i Hu (1991) su demonstrirali da stanični agregati mogu biti inducirani da se formiraju sa nizom staničnih linija u prisustvu malih naelektriziranih mikrosfera sa promjerom od oko 20 mikrona (mikronosači su tipično 90-250 mikrona; Goetghebeur, S, i W.S. Hu, "Cultivation of Anchorage-dependent Animal Cells in Microsphere-Induced Aggregate Culture", Appl. Microbial Biotech., Vol 34, 735-741, 1991). Nađeno je da se ove transformirane stanične linije razvijene na ovaj način ne šire, već prije toga egzistiraju kao zaokružene višeslojne populacije.

Diploidna stanična linija je također razvijena u ovim sferama kao agregati, ali je stanični oblik bio neregularan, vidjeti US patent 5,114,855. Pošto su sfere upotrebljene u Hi-ovom radu bile mnogo manje nego uobičajeni mikronosači, formiranje agregata u ovom sadašnjem otkriću ne pada u domen pokriven Hu-ovim patentom. Nije vjerojatno da će smanjenje u veličini do opsega u Hu-ovom patentu biti primjenjivo za dobijanje Hepatitisa A.

5

Borys i Papoutsakis (1992) ispitali su načine za inhibiranje formiranja staničnih agregata sa stanicama jajnika kineskog hrčka kl razvijenim na CYTODEX 3 mikronosačima (Borys, M.C., i E.T. Papoutsakis, Formation of Bridges and Large Cellular Clumps in CHO-cell Microcarrier Cultures: Effects of Agitation, Dimetil Sulfoxide, and Calf Serum," Cytotechnology, Vol 8, 237-248, 1992). Ovaj rad se ističe nadmašivanju transformiranih staničnih linija tokom mikronosačke kulture i nije bio upućen na razvijanje diploidnih staničnih linija kao agregata na mikronosačima. Pronadeno je da povećano miješanje smanjuje agregaciju i povećava smrtnost stanica usljed razbijanja mostova između mikronosača. Naše studije, opisan ovdje, sa MRC-5 i staklom obloženim mikronosačima su u suglasnosti sa ovim rezultatima. Mi smo utvrdili da miješanje smanjuje brzinu agregacije MRC-5 stanica u staklom obloženom sistemu nosača sa povećanjem smrtnosti stanica. Mi smo također našli da je agregacija ireverzibilni fenomen pod uvjetima kulture.

15

Značajna količina rada je uložena da se potakne da se razvijaju kontinualne stanične linije kao stanični agregati u suspenziji kulture. Tolbert, i sarad., (1980) objavili su jedan rani izvještaj ovog pristupa i cidrali su patent o "adaption of cell lines to suspension culture" (adaptacija staničnih linija na suspenzionu kulturu) (Tolbert, W.R., i sarad., "Cell Aggregate Suspension Culture for Large Scale Production of Bimolecules", m Vitro, Vol. 16(6), 486-490, 1980). pošto su MRC-5 stanice humane diploidne, one zahtijevaju širenje stanice za biološku aktivnost i zbog toga nisu podložene ovom pristupu.

20

Prema tome, iako postoje izvještaji koji opisuju da se MRC-5 stanice mogu gajiti na staklenim mikronosačima kao ćelijskim-mikronosačkim agregatima i da se Hepatitis A može proizvesti iz CYTODEX 3 mikronosačke kulture, kao što je napomenuto ranije, nestabilnost MRC-5 stanice-CYTODEX 3 mikronosačkog sistema je doveo do toga da stručnjaci smatraju da mikronosačka kultura nije prilagodljiva za efikasnu proizvodnju HAV. Ovdje je opisan jedinstven stabilan sistem mikronosačkog agregata koji nadmašuje ranije probleme u proizvodnji Hepatitisa A iz MRC-5 stanica na mikronosačima. Ovo otkriće također identificira metodologiju razvijenu da se postupak mikronosača uključi u postojeći postupak pročišćavanja HAV nizvodnim tokom.

25

Ovaj izum osigurava postupak za kreiranje kulture mikronosačkih agregata koja zadržava staničnu populaciju kroz produženu infektivnu fazu za dobijanje virusnih vakcina, pokazano je da je proizvodnja Hepatitisa A problematična zbog skidanja (odvajanja) stanica sa mikronosača tokom infektivnog razdoblja. Upotreba staklom obloženih mikronosačkih sistema i metodologija stabilnog mikronosačkog agregata sposobnog da tadrži stanice u vitalnom stanju za maksimalnu proizvodnju virusa u mikronosačkoj kulturi. Postupak je primjenjiv na proizvodnju drugih virusa gdje je produktivnost virusa povećana kreiranjem stabilne kulture tokom produženog infektivnog razdoblja. naša iskustva sa CZTODEX 3, kolagenom obloženim mikronosačem, slažu se sa ranijim izvještajima koji pokazuju ka je u ovom sistemu formiranja agregata nestalno i da je stanična populacija nestabilna pri ulasku u stacioniranu fazu. Mi smo otkrili, da je postupak na bazi staklom obloženog mikronosača koji nosi produženu, stabilnu kulturu stanica u oštrm kontrastu sa prethodnim. Mi smo također otkrili postupak za razbijanje i lizu stanica sa pufiranim sistemom deterdenata. Nukleusi ostaju intaktni tokom ovog postupka, tako da se mogu profiltrirati prije nego što uđu u postupak pročišćavanja. Lizat je tada podložan preradi sa silaznim tokom prema uspostavljenim postupcima pročišćavanja virusa. Primjena vakcine za ovaj postupak uključuje proizvodnju bilo kojeg virusa koji se može razmnožavati u agregiranoj mikronosačkoj kulturi i regenerirati iz bioreaktora. Od usidrenosti zavisne stanice koje mogu formirati agregirane kulture uključuju MRC-5, WI38, Vero i Chick Embryo Fibroblast. Virus koji se mogu razmnožavati sa ovim stanicama domaćina obuhvaćaju, ali nisu ograničeni na Hepatitis A, Varičelu, male boginje, zauske, Rubeolu, Poliovirus, herpes virus i Rotavirus.

30

35

Postupak osigurava postupak za korištenje provjerenih prednosti povećanja razmjera kod tehnologije mikronosača za razmnožavanje stanica u proizvodnji virusnih vakcina, kao što je za hepatitis A, koje zahtijevaju produžena vremena kultiviranja. uspješna primjena tehnologije mikronosača za proizvodnju hepatitisa A ili drugih proizvoda gdje se kultiviranje produžava u stacioniranu fazu, pokazano je da se usljed pogodne selekcije sistema mikronosač/stanica, koji proizvodi agregate koji osiguravaju mikrookruženje za produženu vitalnost stanica i formiranje proizvoda. Formiranje agregata, ako što je opisano ovdje, štiti stanice od smetanja izazvanog suspendiranjem mikronosača. Agregati imaju približno 50-60% praznog prostora koji osigurava konvektivni transport hranjivih materija kroz agregate i smanjuje gustoću agregata za lakše suspendiranje stanica. Formiranje agregata također osigurava blizak kontakt stanice sa stanicom, povećavajući širenje virusne infekcije sa stanice na stanicu, i osigurava tkivu slične kontakte za formiranje proizvoda.

40

#### **Kratak opis slika**

- 60 Slika 1. Stanična gustoća za fazu razvijanja i prikupljanja virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima  
Slika 2. pH Profil pokvašenih mikronosačkih "spinner" kultura za fazu razvijanja i prikupljanja virusa hepatitisa

- A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima.
3. Slika. Kumulativna potrošnja glukoze za pokvašene mikronosačke "spinner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za fazu razvijanja i prikupljanja virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
5. Slika 4. Kumulativna proizvodnja laktata za namočene mikronosačke "spiner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za fazu razvijanja i prikupljanja virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima i odnosno COSTRA CUBE POVRŠINAMA:
10. Slika 5. Kumulativna proizvodnja amonijaka za namočene mikronosačke "spinner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za fazu razvijanja i prikupljanje virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površmama.
- Slika 6. Profil potrošnje glukoze za namočene mikronosačke kulture u usporedbi sa monoslojnim stanicama kulturom za fazu razvijanja i prikupljanje virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
15. Slika 7. Profil proizvodnje laktata za namočene mikronosačke "spinner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za fazu razvijanja i prikupljanje virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama
- Slika 8. Odnos potrošnje glukoze i proizvodnje laktata za namočene mikronosačke "spinner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za fazu razvijanja i prikupljanje virusa hepatitisa A razvijenog na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama
20. Slika 9. Kriva razvijanja (rasta) virusa A za namočene mikronosačke "spinner" kulture na SOLOHILL staklenim mikronosačima
- Slika 10. SDS PAGE otapalom ekstrahiranog virusa hepatitisa A razvijenog u namočenim mikronosačkim "spinner" kulturama na SOLOHILL staklenim mikronosačima.
25. Slika 11. HPSEC profili za filtrirane lizate na 260 nm za namočene mikronosačke "spinner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za virus hepatitisa A razvijen na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
- Slika 12. HPSEC profili na 260 nm za nukleazom tretirane lizate iz namočenih mikronosačkih "spinner" kultura u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za virus hepatitisa A razvijen na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
30. Slika 13. HPSEC profili na 260 nm za zarobljene proizvode iz namočenih mikronosačkih "spinner" kultura u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za virus hepatitisa A razvijen na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
35. Sliak 14. HPSEC profili na 260 nm za staloženi proizvod iz namočenih mikronosačkih "spinner" kultura u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za virus hepatitisa A razvijen na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
- Slika 15. HPSEC profili na 260 nm za proizvod anionske izmjene iz namočenih mikronosačkih "spinner" kulture u usporedbi sa monoslojnom staničnom kulturom za virus hepatitisa A razvijen na MRC-5 stanicama i SOLOHILL staklenim mikronosačima, i odnosno COSTAR CUBE površinama.
40. Slika 16. Mikronosački agregati poslije 5 dana u kulturi dobijeni medologijom prema ovom izumu upotrebljavajući MRC-5 stanice i SOLOHILL staklom obložene mikronosače. veličine agregata su slične nema pojedinačnih mikronosača bez stanica
- Slika 17. MRC-5/SOLOHILL stakleni mikronosački agregati obojeni sa fluorescein diacetatom. Zelena fluorescencija ukazuje na vitalne stanice
45. Slika 18. Početna agregacija MRC-5/SOLOHILL staklenog mikronosačkog sistema na dan 1 kultiviranja. upotrebljen je fluorescein diacetat; vitalne stanice fluoresciraju zeleno.
- Slika 19. slobodnog prostora unutar MRC-5 staklom obložene mikronosačke granule je približno 50% nezavisno od promjera agregata.
50. Slika 20. Formiranje agregata u toku razvijanja stanica. Veličina agregata raste proporcionalno sa povećanjem broja stanice po agregatu.

Ovaj izum je postupak za replikaciju i razvijanje virusa u mikronosačkoj staničnoj kulturi. Primjena vakcina za ovaj izum obuhvaća proizvodnju bilo kojeg virusa koji se može razmnožavati u agregiranoj mikronosačkoj kulturi i regenerirati iz bioreaktora. Od usidrenosti zavisne stanice koje mogu formirati agregatne kulture obuhvaćaju, ali nisu ograničene na, MRC-5, WI38, Vero i Chick Embry Fibroblaste.

Virusi koji se mogu razmnožavati u ovim stanicama domaćina obuhvaćaju, ali nisu ograničeni na Hepatitis A, Varičelu, male boginje, zauške, rubeolu, poliovirus, herpes virus i rotavirus. Prema ovom procesu, stanice sazrijevaju do optimalne gustoće na staklom obloženim mikronosačima i inficiraju se sa virusom. Prema jednoj realizaciji ovog postupka, kulture se moće sa medijumom. na kraju infekcije prikupljaju se mikronosači. Proizvod virusa se skuplja bilo iz gornjeg sloja medijuma ili liziranih stanica. U slučaju sa stanicama vezanih virusa koji se ne oslobadaju u medijum, ili virusa za koje su

potrebni dodatni stupnjevi da bi se oslobodili u dovoljnom prinosu (kao što je zamrzavanje/otapanje ili pomicanje tekućine), postupak prikupljanja opisan u ovom izumu za oslobađanje virusa iz agregiranih mikronosačkih kultura može se upotrijebiti prikupljanje može obuhvaćati tekuće micanje ili te tekuće micanje povezano sa deteredentom za permeabiliziranje stanica.

5 Namočene MRC-5 stanice kultivirane na staklom obloženim mikronosačima i inficirane sa virusom hepatitisa A daju primjer postupka prema ovom izumu. Važan element u proizvodnji virusa u namočenoj kulturi mikronosača je stabilnost stanične populacije tokom procesa inficiranja. Ovo promatranje je od posebnog značaja za viruse koji se sporo razvijaju, kao što je virus hepatitisa A (HAV). U proizvodnji HAV-a, prvenstvene stanice su MRC-5, mada se mogu upotrijebiti slične stanice, kao što su WI38 ili VERO, koje su prihvatljive za proizvodnju humane vakcine. U slučaju HAV i MRC-5 kulture, stanična populacija mora ostati stabilna u toku 21 dana postupka inficiranja. U toku ovog vremenskog razdoblja, stanice u stacioniranoj fazi.

15 U studijima pretraživanja mikronosača koje obuhvaćaju mikronosače različitih proizvođača uključujući Pharmacia (CYTODEX 1,2 &3), SOLOHILL Laboratories (staklom i kolagenom obložene), Mat Tek (Plastek), i Mitsubishi Kasei (Diacarrier). Mi smo utvrdili da samo SOLOHILL staklom obložene polistriolne granule uspostavljaju stabilne kulture kroz stacioniranu fazu. U ovom sistemu, MRC-5 stanice se razvijaju u agregatima mikronosača koji se povećavaju u veličini kako progresira kultura. U pretraživanju različitih mikronosačkih sistema za komercijalnu primjenu, uobičajeno je da se pretražuju tipovi mikronosačakoji izazivaju značajno agregiranje sa upotrebjenom staničnom linijom povećanje u 20 miješanju, smanjenje koncentracije kalcijuma, i smanjenje koncentracije seruma su uobičajeni postupci kojise koriste da bi se smanjilo na minimum ili eliminiralo agregiranje. ini smo otkrili da u MRC-5 sistemu, povoljnim tehnikama kultiviranja, staklom obložen sistem mikronosača formira strukturu agregata sa MRC-5 stanicama koja je idealna sredina zarazmnožavanje, stanice rasta u slobodnom prostoru osiguravajući tkivu sličnu morfologiju. Poznato je da slobodan prostor 50 ili 60% od volumena agregata kao što je ilustrirano na Slici 19 dok stanična masa okupira samo 1-2% od ovog 25 prostora. Zbog toga, nasuprot sistemima bioreaktora ili postupcima imobilizacije, koji dovode do difuzionih ograničenja kroz staničnu masu, stanice su distribuirane kroz agregat sa dovoljno slobodnog prostora za konventivan transport hranjivih materijala i proizvoda kroz granule. Agregat je otporan na promjene pH izvan onoga koji se javlja u kultivacijama stanica i EDTA pri koncentracijama sve do 1 mM, pokazujući sa receptorske veze koje su vjerojatno bile uključene u početno formiranje agregata nisu potrebne za održavanje strukture agregata. Pošto se agregati mogu potpuno 30 disocirati tripsintacijom, struktura agregata se najvjerojatnije održava ekstracelularmm proteinima martiksa koje izlučuju stanice.

Drugi sistemi MRC-5 stanice/mikronosač formiraju agregate koji nisu stabilni kao onaj dobiveni sa staklom obloženim mikronosačkim sistemom koji smo mi ovdje opisali. Zbog toga, po nama, selekcija staklom obloženih mikronosača za 35 kultivaciju stanica rezultira u kreaciji stabilne strukture agregata za razmnožavanje virusa za proizvodnju vakadne.

Jednom kada smo odabrali staklom obložen mikronosač za stanično razvijanje na bazi stabilnosti u toku infektivne faze, moraju se upotrijebiti odgovarajući uvjeti kultivacije za formiranje homogenog agregata. Slike 16-18 ilustriraju 40 formiranje agregata metodologijom opisanom u ovom postupku. Homogeno, predvidljivo formiranje agregata je značajno za promatranje takvog sistema za komercijalnu proizvodnju virusne vakcine. prvo, vezivanje stanice mora biti homogeno kroz populaciju mikronosača pošto se agregiranje događa interakcijama stanica na stanicu, a na interakcijama stanica na mikronosač. Ovo je poznato iz činjenice da granule bez vezanih stanica ostaju kao takve kroz kultivaciju dok se agregacija događa sa mikronosačima sa vezanim stanicama. pod odgovarajućim uvjetima, svi mikronosači imaju stanice koje su vezane i tako svi zajedno formiraju agregate u kulturi, kao što je ilustrirano u Slici 20. Ovo se postiže inklucijom pri više 45 od 5 stanica na granulu što je ustanovljena praksa u radu sa mikronosačima. Postupci tipsinizacije, mješanja, pH, temperatura i koncentracija seruma također imaju uloge u homogenom vezivanju. Porast veličine agregata kao funkcije razvoja stanice unutar agregata ilustriran je u Slici 20. Hidrodinamična okolina ustanovljena upotrebjenim mješanjem je značajna za rast agregata u kulturi. OPM treba se održati na ili neposredno iznad kritične brzine mješanja suspenzije iznad dna, što odgovara brzini mješalice kada ništa mikronosača ne ostaje stacionirano na dnu duže od jedne sekunde. propeleri 50 moraju biti oko pola promjera posude ili veći sa bi se smanjilo na minimum potrebni OPM, a povećalo na maksimum miješanja šarže.

Manji propeleri formiraju zone visokog micanja blizu propelera koje mogu razrušiti stanične mostove, tako smanjujući agregaciju i staničnu vitalnost. Nezdrave kulture će povećati veličine agregata. Ovo se očekuje da je usljed oslobodjenje 55 DNK u toku lizisa stanice što djeluje kao posrednik za povećanje agregacije. Upotrebljavajući strategiju napajanja (dopuna medijumom) što održava staničnu vitalnost smanjujući na minimum dalje agregiranje u stacionarnoj fazi. Kritična suspenzija iznad dna za agregate je manja nego ona pojedinačnih mikronosača koja se ne očekuje zbog veće veličine agregata. Razlog je usljed smanjene gustoće agregata pošto je slobodan volumen (napunjen sa medijumom) 50-60% od volumena agregata i vjerojatno je posljedica hidrodinamičnosti suspendiranje agregata preko rasipanja 60 energije na heterogenoj površini. Agregati se, međutim, talože mnogo brže nego pojedinačni mikronosači. ove osobine su prednosti za preradu u proizvodnim razmijerima. tako, smo mi pronašli da celularni agregati, prije nego što su nepoželjni, kao što se ranije mislilo, osiguravaju stabilnu okolinu za stacioniranu fazu stanica i za virusnu infekciju i razvijanje.

SOLOHILL stakleni mikronosači sastoje se od polistirolne granule preodređene veličine i gustoće, obložene sa tankim slojem stakla prema patentiranom postupku proizvodnje za koju ima licencu SOLOHILL Labs, Inc (U.S. patenti 4,029,045, 4,448,884, i 44,564,532). Pošto je gustoća stakla 2.4 mg/ml, neophodno je da se obloži mikronosač male gustoće, da bi se osigurala površina stakla male gustoće (gustoća od 1.02 do 1.04 g/ml). Gustoća mikronosača neposredno iznad gustoće tekućeg medijuma je kritična za smanjenje na minimum oštećenja stanica micanjem dok se suspendiraju mikronosači u posudi koja se miješa. Prema tome, bilo koji mikronosač obložen staklom koji ispoljava ovu osobinu je upotrebljiv u ovom postupku, a SOLOHILL stakleni mikronosači su jedan, komercijalno dostupni primjer. SOLOHILL stakleni mikronosači su iskorišteni za razvijanje jednog broja od usidrenosti zavisnih staničnih linija uključujući VERO (bubreg majmuna) CEF (chick embryo fibroblast) (fibroblasti pilećeg embriona) BHK (hamster kidney) (bubreg hrčka) MRC-5 (humani embrioni plućni diploidni fibroblasti) HFF (human foreskin fibroblasts) (humani fibroblasti udne navlake), i MDBK (Mardin-Darby bovine kidney) (Mardin-Darby goveđi bubreg).

Pridržavajući se postupka ovdje, svi ovi tipovi stanica mogu se sada upotrijebiti u produženoj agregiranoj staničnoj kulturi za proizvodnju virusa koji mogu inficirati i razvijati ove stanice. Objavljeno je da stakleni substrat ima različitu morfologiju vezivanja nego što je ona viđena na CYTODEX mikronosačima iz Pharmacia LKB Biotechnology (varani, J. i sarad., Substrate-depedent differences in growth and biological properties od fibroblasts and epithelial cells grown in microcarrier culture, J.Biol. Stand. Vol. 13, str. 67076, 1985). Ove razlike kombinirane sa odgovarajućim uvjetima kultiviranja opisanim ovdje upotrebene su da se inducira formiranje stabilnih agregata za proizvodnju virusne vakcine.

U jednoj realizaciji ovog izuma, Hepatitisa A virusa (HAV) varijanta pasaža 28 (P28) soja CR326F' upotrebjena je za inficiranje MRC-5 stanica razvijenih na mikronosačima samo u ilustriranim svrhama, i produkcionni materijal je kultiviran na pasažu 29 (P29). P28CR326F' je oslabljen HAV soj. Drugi sojevi i/ili serotipovi HAV su obuhvaćeni ovim izumom, uključujući HAV sojeve koji se mogu oslabiti uobičajenim tehnikama poznatim u tehnici. Druge pogodne stanične linije za HAV razmnožavanje obuhvaćaju Vero, FL, WI-38 i FRhK6 stanice. ovi i drugi sistemi za HAV razmnožavanje u staničnim kulturama su prođiskutirani u Gerety, R.J. "Active Immunization Against Hepatitis A", u Garety, R.J. (izd) Hepatitis A Academic Press 1984, str. 263-276; i Ticehurst, J.R., Seminars in Liver Disease 6 46-55 (1986). U principu, bilo koja stanična linija kao što je bilo koja humana diploidna fibroblast stanična linija, može poslužiti kao stanica domaćina za HAV pod uvjetom da je osjetljiva na HAV infekciju.

Prvenstvena stanična linija je MRC-5. od strane stručnjaka će biti razumljivo da obim ovog izuma obuhvaća, pored prenosa P18 ili p28, soja CR326F' HAV-a, bilo koju drugu Hav varijantu ili soj, bilo oslabljen ili virulentan, kao i druge viruse koji se mogu kultivirati na od usidrenosti zavisnim stanicama. Oslabljene varijante ili sojevi mogu se izolirati serijom prolazaka u stanicama, životinjama, ili drugim postupcima. Vidjeti na primjer. provost, P.J., i sarad., proc. Soc. Exp' Biol. Med. 170,8 (1982); Provost, P. J. 1 sarad., J. Med Virol. 20, 165 (1086); U.S. patent 4,164,566 i 5,021,348 za detalje o oslabljivanju. postupak kultiviranja se brzo i lako adaptira na oslabljene ili virulentne HAV sojeve.

U prvenstvenoj realizaciji ovog izuma, MRC-5 stanice se inficiraju multiplicitetom infekcija (MOI) HAV-a dovoljnim da se postigne efikasna infekcija stanične kulture. MOI od 0.05-1 je prihvatljivo: Kultura za zasijavanje (sjeme) se povoljno dobije upotrebljavajući HAV iz gornjih frakcija stacionarne kulture inficirane sa HAV i inkubirane oko 28 dana. Dopusti se da se HAV replicira u stacionarnoj kulturi do pika proizvodnje virusa. Drugi postupeci kao što su mikronosačka kultura ili COSTAR CUBE mogu se upotrijebiti za dobijanje kulture za zasijavanje (sjemena). Medijum stanične kulture može biti bilo koji medijum koji potpomaže aktivan razvoj MRC-5 stanica i HAV replikacije.

Postupak prema ovom izumu se bolje razumije s obzirom na slijedeće stupnjeve i faze.

#### Stupanj 1: DOBIJANJE MIKRONOSAČA

Pogodan bioreaktor za miješane suspenzione kulture stanice sisara, šaržira se sa suhim obloženim mikronosačkim granulama. Granule se suspendiraju u WFI kvaliteta vodi i steriliziraju se m situ. Poslije sterilizacije, voda se ispusti i u bioreaktor se dodaje pogodan sterilan medijum za kultiviranje stanica prema izboru za određeni virus koji se treba razvijati. da bi se osigurala potpuna zamjena vode i uravnotežavanje granula, medijum se prvenstveno zamjenjuje do tri puta. Za HAV kulturu, mi smo našli da je upotreba Williams-ovog medijuma E (bez seruma) prihvatljiva na ovom stadijumu. Poželjno je da se postigne cilj od oko 20 grama/lit do 75 grama/lit mikronosača na medijum, a prvenstveno oko 40 grama/lit do 60 grama/lit.

#### Stupanj 2: ĆELIJSKA INOKULACIJA

Jednom kada su mikronosači uravnoteženi u medijumu i na temperaturi (30°-37°C) prema želji, stanice, prvenstveno u kasnoj log fazi se zasiju u posudu kulture. Za rad u malim razmjerima, NUNC CELL FACTORIES (NCFs) NUNC stanične fabrike koje su male multilamelarne stanice stanične kulture u kojima stanice mogu razvijati u monosloju prema uputstvima proizvođača, su pogodni za ovu svrhu. Koncentracija inokuluma stanice je 5-10 stanica na granulu

mikronosača, što odgovara oko 100,000 (1x10<sup>5</sup>) stanica/ml pri upotrebljenim punjenjima granule. Za malu kulturu mikronosača od oko 600 ml, potrebno je oko 6 x 10<sup>7</sup> stanica. iz jedne konfulentne desetostojne NCF može se prikupiti približno 5 x 10<sup>8</sup> stanica upotrebljavajući tripsin. Ovi odnosi se lako povećaju na više za veće mikronosačke kulture inokuluma upotrebom dodatnog NCF ili, ako je potrebno, sjemena mikronosačke kulture. jednom kada su stanice prikupljene tripsinom i neutralizirane medijumom koji sadrži serum, one se peletiziraju pomoću centrifugiranja pri niskoj brzini i ponovo suspendiraju u medijumu koji sadrži teleći serum obogaćen sa oko 10% željeza, ili se jednostavno razrijeđuje sa medijumom koji sadrži teleći serum obogaćen sa oko 10% željeza. Upotrebljavajući jedan dio staničnog inokuluma na devet dijelova medijuma kulture mikronosača bez seruma, postiže se finalna koncentracija telećeg seruma obogaćenog sa 1 % željeza. Ovaj se odnos može prirodno modificirati modificiranjem koncentracije seruma koji se dodaje u ponovno suspendiran staničan inokulm ili modifikacijom odnosa inokulma prema volumenu bioreaktora. Nađeno je da koncentracija seruma od 1% pri pH 7.6-7.9 osigurava homogenu vezivanje stanica.

Jednom kada su cijepljene, stanice se ostave vezivati na mikronosače oko tri sata (mada su duža i kraća vremena prihvatljiva i precizna količina vremena potrebnog za vezivanje nije kritična) upotrebljavajući brzinu miješanja dovoljno da se postigne kritična suspenzija iznad dna, što je minimalna brzina miješanja (broj obrtaja u minuti, opm, propelera) da se postigne stanje u kojem ni jedan mikronosač ne provodi više od jedne sekunde na dnu bioreaktora koji se miješa. ovo se postiže ispitivanjem odgovarajuće modifikacije brzine propelera, i jednostavan je postupak sa kojim su upoznati stručnjaci.

### 20 Stupanj 3: NAMOČENE KULTURE STANICA DO KASNE LOG FAZE

Jednom kada je stanicama dano dovoljno vremena da se vežu za mikronosače, medijum se obogaćuje sa dodatnim serumom za razvoj stanica. za MRC-5 staničnu kulturu za HAV proizvodnju povoljan je podatak dovoljno telećeg seruma obogaćenog sa željezom da se postigne koncentracija seruma od 10%. koncentracija seruma može se mijenjati sa drugim formulacijama medijuma što će biti razumljivo stručnjacima.

Poslije oko 24 sata od vezivanja stanice i uravnotežavanja sa bilo kojim podešenim uvjetima seruma, uspostavlja se jedan ulazno/izlazni sistem sa pražnjenjem i ponovnim punjenjem medijuma pri brzini od oko 0.7 do oko 2, a prvenstveno 1.3. volumena medijuma na dan. praćenje glukoze, laktata i amonijaka osigurava postupak da se osigura da ne dode do osiromašenja hranjivim materijalom i pH fluktacija. Stručnjaci su dobro upoznati sa tehnikom praćenja ovih parametara i postupcima za postizanje njihove stabilnosti. na primjer, ako se nađe da je snabdijevanje glukozom ograničeno, brzina močenja može se povećati. Ako se nađe da je pH previše kiselo usljed proizvođenja laktata i akumulacije, dodatak blagih alkalija ili povećanje brzine močenja će kontrolirati ovaj nepoželjni trend. Sterilni filtrirani zrak se osigurava u gornjem prostoru bioreaktora, i u malim razmjerima, površinski propeler može se upotrijebiti da povoljno poveća transfer plina razbijanjem površinskog napona na graničnoj površini zraka-tekućine.

Jednom kada je uspostavljeno močenje ostavi se da se stanice razvijaju do kasne ekspotencijalne (log), ili rane stacionirane faze. tipično, sa MRC-5 stanicama u Williams-onom medijumu E obogaćenom sa telećim serumom obogaćenim sa 10% željeza, za ovo je potrebno razdoblje od oko 6 dana. lako dužina vremena osiguranog za razvoj stanica nije kritična, poželjno je da se osigura dovoljno vremena da se postigne dobar razvoj stanica i agregacija.

### Stupanj 4. INFEKCIJA

Tipično, rezervna sjemena infektivnog virusa se povoljno čuva zamrznuta. Međutim kada je razvijen, rezerva infektivnog virusa se koristi da inficira stanice pri multiplicitetu infekcija (MOI) od oko 0.05 do oko 1, a prvenstveno oko 0.1. Močenje se zaustavlja tokom ovog razdoblja inficiranja da bi se omogućilo vezivanje virusa na stanice oko dva sata. Jednom kada je osigurano dovoljno vremena da se postigne efikasno vezivanje virusa na stanice, ponovno se počinje sa močenjem. Mogu se uzimati uzorci kulture svake nedjelje, i poslije dovoljnog vremena, što zavisi od virusa, kompletan bioreaktor se skuplja.

Za HAV razvijen na MRC-5 stanicama u sistemu koji smo opisali, pik HAV, proizvodnje se tipično postuže oko 14-28 dana poslije infekcije.

### Stupanj 5: SAKUPLJANJE VIRUSA

Kao prvi stupanj u sakupljanju virusa, zaustavlja se miješanje i dopusti se da se virusom inficirane stanice vezane za mikronosače stalože gravitacijom. pri proizvodnom omjeru, postupci za pranje agregata, kao što je upotreba filtriranih uređaja, su prvenstveni. Gornji sloj tekućine nad kulturom se uklanja. Za HAV najveći dio virusa se nalazi unutar stanica i može se osloboditi lizisom stanice. Ovo se postiže razaranjem staničnih agregata u sakupljenoj otopini. Prvenstveno, sakupljena otopina sadrži komponentu da daju stanicama permeabilnost na HAV. Takve komponente su poznate u tehnici. Prvenstveno se dodaje deterđent kao što je Triton X-100 NP-40, ili ekvivalent pri najnižoj mogućoj efikasnoj koncentraciji da bi se olakšalo kasnije uklanjanje. Jedan deterđent za koji je nađeno da je prihvatljiv za ovu svrhu je



TRITON-X100, koji se može upotrijebiti pri koncentraciji od oko 0.1% u pogodnom puferu kao što je 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>.

Efikasna postupak za razaranje agregata u našem sistemu obuhvaća propuštanje mikronosača kroz petlju recikliranja u koju su uključeni niz otvora sa opadajućim promjerima. Korišteni su promjeri od 1/16", zatim 3/64", a zatim 1/32" i sadržaj bioreaktora je recikliran pri oko 500-1000 ml/minutu, dok se svi agregati (mikroskopom inspekcijom uzoraka) nisu razorili. po povećanju razmjera ovog stupnja, micanja tekućine neophodno za razaranje agregata postiže se ispravnim dimenzioniranjem promjera otvora za povećanu brzinu protoka za vrijeme prikupljanja kako bi se postigla ista linearna brzina. Pošto je linearna brzina=brzina protoka/površina otvora mogu se postići uvjeti za razaranje agregata dobivanjem linearnih brzina u području 1010 cm/minutu- 2020 cm/minutu, bez obzira na razmjer. Najmanji promjer (1/32", oko 0.8 mm) je približno pet puta veći od promjera pojedinačnog mikronosača (oko 150 um).

Pri većim omjerima proizvodnje koristi se veći otvor radi izbjegavanja truljenja što se kompenzira povećanjem brzine protoka da bi se dobile linearne brzine u njemu. Promjer je dovoljno uzak da se postigne efikasno razaranje agregata, ali također dovoljno veliki da se svede na minimum truljenja posebno poslije izuma kroz veće otvore. Druge tehnike uključujući, ali ne ograničene samo na obradu ultrazvukom mogu se također koristiti. Dobivena suspenzija mikronosača se ostavi staložiti i stanični ostaci, koji sadrže virus, dekantiraju se i lageriraju. Bioreaktor se šaržira sa dodatnim deterđentom koji sadrži pufer i sadržaji bioreaktora se recikliraju kroz vanjsku petlju 1 otvore da bi se izvukao zahvaćeni virus. Ponovno se ostavi staložiti suspenzija i gornji sloj tekućine se sjedinjava sa lageriranim gornjim slojem tekućine. Na ovom stadiju hemacitometrijskog brojanja jezgra koja se nalazi u gornjem sloju tekućine daje dobru procijenu broja sakupljenih stanica. Gornji sloj tekućine se filtrira kroz filter od 5 um radi uklanjanja jezgra, a gornji sloj tekućine se dalje obrađuje kao što je poželjno. Postupak koji je primjenjiv na pročišćavanje HAV dan je niže.

#### Stupanj 6: PROČIŠĆAVANJE HAV-a

HAV dobiven u kulturi prema ovom izumu može se pročititi prema postupcima poznatim u tehnici ili se može upotrijebiti direktno kao vakcina ako je oslabljen on se može isto tako inaktivirati prema postupcima poznatim u tehnici, među kojima je prvenstvena inaktivacija formalinom. Za detalje za ove stupnjeve poznate u tehnici, vidjeti na primjer US patent 4,164,566; 5.021,348; EP 0 302 692; i USSN 07926, 873, podnjet 8/10/92.

#### Stupanj 7: INAKTIVACIJA VAKCINE I FORMULACIJA

Dodatni stupnjevi uobičajenog i dobro poznatog karaktera su ili mogu biti potrebni za dobivanje pročišćenih HAV kapsida za upotrebu kao vakcine. Na primjer, tretiranje sa formalinom, sterilna filtracija i adsorpcija na nosače ili aduvante su tipični osnovni stupnjevi za dobijanje formalinom inaktivirane vakcine. Vidjeti, na primjer, Provost, P.J. i sarad., Proc. Soc. Exp. Biol. Med 160, 213 (1979); Provost P.J. i sarad, J.Med Viro. 19, 23 (1986). HAV se može inaktivirati toplinom, promjenama pH, ozračivanjem, tretiranjem sa organskim otapalima kao formalinom ili paraformaldehidom. Tipično, HAV inaktivacija se vrši pri 1/4000 odnosu formalina. inaktivirani HAV se tada apsorbira U<sub>i</sub> ponovno taloži sa aluminijumom hidroksidom da bi se osigurali efekti adjuvanta i nosača. Pokazana je efikasnost inaktivirane HAV vakcine/ New England J. of Med. 327: 453-457 (1992)/.

U svrhu uspoređenja ovog postupka sa produkcionim postupkom pomoću monoslojne stanične virusne kulture, MRC-5 stanice su zacijane u 2 COSTAR CUBE bioreaktora velikih razmjera i 3 mikronosačke kulture. Brzine močenja za mikronosačke kulture su bile 0.7 i 1.5 bioreaktorskih volumena/dan što obuhvaća 1.3 bioreaktorskih volumena na dan upotrebljenih u COSTAR CUBE:

Mikronosačko napajanje je odabrano tako da se dobije slična stanična gustoća kao kod COSTAR CUBE bioreaktora tako da se može napraviti direktno uspoređenje između ova dva bioreaktora. Mikronosačke kulture su bile stabilne kroz infektivni period i imale su slične metaboličke brzine kao COSTAR CUBE bioreaktor s obzirom na glukozu i laktat. Mikronosački lizat i jedna litra COSTAR CUBE lizata pročišćeni su sa sličnom efikasnošću i lakoćom rukovanja upotrebljavajući nizvodni postupak adaptiran na HAV pročišćavanje.

Proizvodnje Hepatitisa A je bila oko polovine COSTAR CUBE postupka na bazi po stanici, ukazujući na potrebu za optimizacijom infektivnog postupka u mikronosačkoj kulturi. Volumenska produktivnost po litri volumena bioreaktora je bila također polovina one kod COSTAR CUBE; međutim sa ovim postupkom postoji mogućnost da se više nego udvostruči gustoća stanice i time volumenska produktivnost, povećanjem šarži mikronosača. MRC-5 stanična populacija je održavanje u stabilnim mikronosačkim agregatima bez gubitka stanica tokom infektivnog procesa od 21 dan. Svi drugi testirani tipovi mikronosača pokazuju gubitak MRC-5 populacije sa mikronosača poslije faze razvijanja i zbog toga su nepogodni za proizvodnju virusa. Mi smo dobili krajnju staničnu gustoću u mikronosačkim kulturama od 2.2-2.4 x 10<sup>6</sup> stanica/ ml što je slično sa procjenjenom gustoćom od 2.6 x 10<sup>6</sup> stanica/ml dobivenom u COSTAR CUBES.

Brzina potrošnje glukoze i brzina proizvodnje laktata u namočenoj mikronosačkoj kulturi su bile sasvim slične sa onim u

namoćenim COSTAR CUBES. Stehiometrijska konverzija glukoze u laktat se vidi u oba sistema. Proizvodnja amonijaka, sporednog proizvoda osnovnog glutaminskog metabolizma je bila oko polovine u sistemu mikronosača gdje je upotrebljena šarža od 2 mM glutamina umjesto šarže od 4 mM glutamina u COSTAR CUBES. na 21 dan poslije infekcije mikronosačka kultura je proizvela prosječno 112 jediince na milion stanica i 258 szanica na litru volumena bioreaktora. Ovi prinosi su 40-50% i odnosno 38% od onih dobijenih u COSTAR CUBES: Kriva razvijanja virusa pokazuju da je preko 50% virusa već proizvedeno na dan 14 sa bitnim opadanjem brzine razvoja virusa od 14 do 21 dan. Nije jasno da li je smanjen stanični prinos usljed toga što nisu sve stanice učestvovala u infekciji, manje produktivnosti po inficiranoj stanici, ili isticanje virusa u medijum prije skupljanja. Agregati su bili stabilni tokom dva pranja slanom otopinom i čak poslije dodavanja 0.1% Tritona. Agregati su bili razoreni kontroliranim micanjem tekućine kroz niz otvora koji su bili instalirani u petlji za recikliranje kod bioreaktora. Jezgre su oslobođene i tako jednostavno kvantificirane) i uklanjana filtracijom kroz jedan Durapore filter od 5 um dozvoljavajući da se lizat obrađuje prema uspostavljenom postupku pročišćavanja. SDS PAGE otapalom ekstarhiranog materijala pokazuje tri karakteristične trake za Hepatitis A i četvrtu kod molekulske težine od 66.000 što vjerojatno odgovara BSA serumski dobivenom koji nije bio potpuno uklonjen tokom pranja slanom otopinom prikupljenog materijala.

Jedan od najvažnijih aspekata ovog izuma je što smo pokazali da se stanice MRC-5 mogu održati u stabilnom stanju sa mikronosačima tokom to-tjedne infekcije Hepatitisom A. Stabilnost sistema se pripisuje jedinstvenim osobinama agregata koji se formiraju tokom razvijanja MRC-5 stanica sa staklom obloženim polistirolnim mikronosačima.

Ovdje prikazani podaci daju usporedbu postupka sa namoćenim mikronosačima i postupka sa monoslojnom staničnom kulturom pri sličnim staničnim gustoćama i brzinom močenja. metabolički indikatori kao što je potrošnja glukoze, akumulacija laktata, i molarni odnos ove dvije brzine ukazuju na sličnost metabolizma MRC-5 u ova dva postupka. Pročišćavanje Hepatitisa A iz oba postupka su značajno slična što ukazuje da nikakve velike promjene u kasnijim fazama procesa neće biti potrebne ako se virusi proizvode na mikronosačkoj kulturi.

Specifična proizvodnost virusa po stanici pri mikronosačkim kulturama sa niskom brzinom močenja (0.7 zap/dan) je samo 7% niža nego proi većoj brzini močenja (1.5 zap/dan) kulture što ukazuje da korištene brzine močenja ne ograničavaju proizvodnju virusa.

Specifična proizvodnja virusa po stanici u mikronosačkim kulturama bila je oko polovine one dobivene u onim zasnovanim na virusima razvijanim na monoslojevima prema našim najboljim procjenama stanične gustoće. pošto podaci o brzini močenja ne ukazuju na ograničenje hranjivih materijala, može se zaključiti da ili sve stanice nisu učestvovala u infekciji ili je virus bio proizveden, ali rasut u medijumu. U prvom slučaju, vjeruje se da je vitalnost visoka kroz infekciono razdoblje što je zasnovano na mijerenjima pomoću tripan plavog u posljednjem ciklusu sa ponovnim punjenjem (najgori slučaj) i iznosi 92%, na dan 21 poslije infekcije. Za dane specifične tekuće produktivnosti po stanici za mikronosačke kulture može se postići povećanje ukupne produktivnosti povećanjem stanične gustoće u bioreaktoru većim šaržama granula. u zaključku, agregirani mikronosački sistem ima velike mogućnosti kao postupak koji se može razmjerno povećati za proizvodnju vakcina za Hepatitis A i druge viruse.

Slijedeći primjeri su dani da prikažu specifične realizacije ovog izuma, ali se primjeri ne trebaju smatrati kao jedini vid izvođenja ovog izuma.

### **Primjer 1**

#### **PROIZVODNJA KULTURE ZA ZASIJAVANJE ZA VIRUS HEPATITIS A**

Postupak u velikim razmjerima za proizvodnju stanica i sjemena virusa obuhvaća zasijavanje MRC-5 staničnih monoslojeva u 6000 cm<sup>2</sup> NUNC CELL Fabrika (NCFa) MRC-5 stanice su razvijene NCFa do konfluentnosti. Ove stanice se mogu sakupiti i upotrijebiti za zasijavanje na mikronosače. Alternativno, konfluentne stanice u NCFa se inficiraju sa virusom pri MOI od oko 0.1.

Poslije infekcije stanice se inkubiraju oko 28 dana sa nedjeljnim zamjenjivanjem medijum koji sadrži 10% zap/zap fetalnog telećeg seruma. nadeno je da visoke koncentracije seruma, 2 do 10% zap/zap omogućavaju veću proizvodnju virusa nego niski nivoi, 0.5 do 2% zap/zap. na kraju ovog ciklusa gornji sloj tekućine sadrži velike količine virusa, u ovom primjeru 10<sup>7.3</sup> TCID<sub>50</sub> na mililitar, koji se sakuplja direktno iz NCF, bez staničnog lizisa, i upotrebljava se kao izvor osnovno sjemena. na ovaj način se dobivaju velike količine infektivnog virusa potrebnog za proizvodnju postupkom koji je reproduktivniji i lakši od onog sa "roler" bocama ili flašama, ili sa mehaničkim skupljanjem stanica.

### **Primjer 2**

#### **PROIZVODNJA HEPATITISA A U AGREGIRANOM MIKRONOSAČKOM SISTEMU**

Ovaj i slijedeći primjeri ilustriraju kvantitativnu proizvodnju hepatitisa A u mikronosačkoj kulturi u malim razmjerima i pročišćavanje lizata ustanovljenom šemom pročišćavanja HAV. Povoljnim modifikacijama mogu se dobiti drugi virusi i stanični tipovi.

5 Mikronosački "spinner" sistem (Stupanj 1):

"Spinner" sistem je projektiran tako da radi kao samostalna jedinica na kolicima gdje se uzrokovanje, promjene medijuma, i infekcija izvode kroz zatvoren sistem obrade upotrebljavajući SCD II sterilni uređaj sa zavarenom cijevi. "Spinner" posuda je izrađena po narudžbi iz Bellco za radnim volumenom od 565 ml i oblogom za kontroliranje temperature. Sistem za miješanje sastoji se od Bellco lopatice modificirane na promjer od 6.6 cm. Promjer je izabran na osnovi studija mjerenja kritičnih brzina miješanja suspenzije iznad dna (COBSR) i izračunavanja hidrodinamičnih uvjeta baziranih na ovoj brzini. Površinski propeler, 4 cm dugačak postavljen je na razdjelnoj površini kulture da bi se osigurao povećan transfer kisika pri većim staničnim gustoćama također i pomoglo uklanjanje CO<sub>2</sub>. Eluent bez mikronosača se uklanja pomoću metalne cijevi unutrašnjeg promjera od 1/2 inča pokrivene mrežicom od 10 um postavljenom na željenom volumenu bireaktora upotrebljavajući 50% veću brzinu protoka nego što je ulazna brzina toka močenja.

Dobivanje mikronosača

20 Za studiju su upotrebljeni staklom obloženi polistirolni mikronosači iz SOLOHILL Laboratories Inc. Najniža specifična težina mikronosača iz SOLOHILL Laboratories Inc. najniža specifična težina mikronosača koja je dostupna iz SOLOHILL, od 1.02, izabrana je da bi se smanjila na minimum količina energije za suspendiranje MNa. opseg veličine je bio 150-210 um. Analiza veličine čestica koja je izvedena od strane SOLOHILL lab. odredila je da su površinski prostor i broj granula 514 cm<sup>2</sup>/g i odnosno 6.6x10<sup>5</sup> granula na gram. sarža mikronosača za eksperiment je odabrana od 35.4 g/litar.

25 MNI su šaržirani U silikonizirane spinnerne od 500 ml sa oblogom, suspendirani su WFI vodi i autoklavirani 30 minuta na 122°C. MNI su tada oprani 3 puta sa modificiranim Williamsovim medijumom E, sa 2 mM glutamina, bez seruma.

**Primjer 3**

30 Stanična ekspanzija/Inokulacija spinnera. (Stupanj 2):

Četrnaest NCFa je zasijano sa MRC-5 stanicama. Iz 12 NUNC CELL FABRIKA (NCFa) je sakupljen proizvod i upotrebljen za zasijavanje dva COSTAR CUBE bioreaktora. Iz preostale dvije NCFe je sakupljen proizvod i upotrebljen kao inokulum za mikronosačke spinnerne. Stanice su centrifugirane 10 minuta pri 300xg i ponovno suspendirane u sa 10% željeza dopunjenom telećem serumu (FeCS), 90% modificiranom Williams-ovom medijumu E sa 2 mM glutamina. U ovom eksperimentu nisu upotrebljeni antibiotici. Stanice su vezane pri oko 8 stanica/granulu u 1% FeCS, pH 7.7, na 37°C. Tokom 3 sata sve stanice su se vezale i medijum se dovede do 10% FeCS da bi započela faza razvijanja stanica.

40 Prema Poisson-ovoj distribuciji, samo 5 stanica po granuli je potrebno da se osigura da se najmanje jedna stanica veže za svaku granulu kroz stohastičke susrete između stanica i granula. Mi smo našli da se pod uvjetima vezivanja specifičnim ranije, 5 stanica po granuli često dovodi do nešto mikronosača (MNa) bez stanice. Ovi mikronosači su ostali kao pojedinačnim MNI kroz kultivaciju što dalje potvrđuje da se fenomen agregacije događa kontaktom stanice na stanicu, a ne stanica na MN kontaktom. U ovom eksperimentu odnos stanice na granulu je bilo 8.2 i uočeno je da svi MNI imaju najmanje jednu stanicu vezanu poslije 3 sata (stanice su još uvijek zaokružene i stoga su vidljive na neprozirnom MN). Razlika u minimalnom odnosu stanica/granula može biti usljed agregacije nekih od stanica na stadijumu zasijavanja, što dovodi do pada u predviđenom odnosu stanica-na-granulu. Rutinsko eksperimentiranje, međutim, dopušta optimizaciju uvjeta vezivanja za ovaj sistem.

50 U ovom eksperimentu, stanična gustoća pri zasijavanju je bila 1.56x10<sup>5</sup> stanica/ml. što odgovara 8600 stanica/cm<sup>2</sup>MN. Na dan 2 formirani su mali agregati od 2-5 MN koji su porasli na 10-30 MN na dan 5. poslije toga, neki od 10-30 MN agregata su kombinirani tako da formiraju oko 50 MN agregata. Potpuno je jasno da se rast stanica događa procesom agregacije. Nije bilo prisutan ni jedan pojedinačan MN u kulturi i vidljiv je bio razvoj stanica u praznom prostoru između MNa. Profil razvoja (rasta) stanica prikazan na Slici 1 pokazuje da su kulture postizale staničnu gustoću od 2-3 MM stanica/ml na dan 5. Broj jezgra na dan 6 bio je niži pošto su veći agregati smijestili u suženja u liniji uzorka. pošto je koncentracija čestica opala oko 50 puta usljed agregacije, kultura se promijenila od vrlo mutne sa pojedinačnim MNa do sasvim prozračne. Na taj način je moguće tekuće praćenje progressa kulture pomoću probe zamućenosti uzorka. Tokom 28 dnevnog procesa efluenta nisu primjećene plutajuće stanice usljed odvajanja stanica. Broj jezgara iz sakupljenog materijala iz bioreaktora na kraju ciklusa pokazuje također, da je kultura ostajala stabilna tokom cijelog razdoblja infekcije. Utvrdili smo također, da su agregati kada su jednom bili formirani bili vrlo stabilni. čak i pod ekstremnim pH, prisustvo EDTA i povećanim brzinama miješanja. Pošto se agregati vrlo lako raspadaju u prisustvu tripsina, najvjerojatnije jc da su agregati stabilizirali kreacijom ekstracelularnog matriksa sastavljenog od kolagena koji luče stanice.

**Primjer 4**Močenje (Stupanj 3):

- 5 Kulture su početno razvijene na šaržni način 2 dana koristeći medijum iz boca i UV ozračeni serum. Na dan 2 započeno je močenje upotrebljavajući medijum iz vreće dobiven iz JRH, sa modificiranim Williams-ovim medijumom E-kombiniranim sa FeCS. Grupa vreća se sastoji od 10-20 litarski "Stedim" vreća; Kako modificirani WILIAMS-ov medijum E tako i na ozračeni FeCS serum prihvaćeni su od strane Merck-a za proizvodnu upotrebu. Prije i poslije toka eksperimenta razvijanje MRC-5 stanica u t bocama je uspoređeno koristeći serumom dopunjen medijum u vrećama i
- 10 medijum iz boce kome je dodan ozračeni serum kao kontrolni. Glukoza, laktat i amonijak su bili identični, pokazujući šestomjesečnu stabilnost za FeCS/osnovnu smjesu medijuma od dana kada su serum i medijum bili kombinirani,. Za vrijeme eksperimenta, medijum je bio dopunjavan sa bikarbonatom do krajnje koncentracije od 3.7 g/litar da bi se održalo pH iznad 7.3.
- 15 Ciljane brzine močenja bile su 0.7 volumeni na dan (spinner 1 i 1.5 volumena na dan (Spiner 2 & 3) na osnovu volumena bioreaktora od 565 ml. međutim, mikrokazetne Watson Marlow pumpe koje smo koristili nisu točno regulirale brzinu protoka pri postavljenim opm, naročito pošto su uklonjene cijevi. Brzine su mjerene periodično, a dole navedene mjerene brzine korištene za obračun. prosječne brzine močenja za vrijeme infekcije su bile 0.76, 1.51, i odnosno 1.51 za 3 spinnera, linijski rotameri i cijevi šireg promjer (niži opm) doprinosiće efikasnosti ovog sistema. treba primjetiti također
- 20 da su brzine bile korigirane kada je močenje prekidano zbog greške da se na vrijeme zamijene vreće, vidjeti Tabelu I:

TABLICA I

Izmjena brzine moćenja:		Bioreaktor volumen/dan		
Kultura, dani	Starost, Volum./dan	"Spinner" # 1 Volum./dan	"Spinner" # 2 Volum./dan	"Spinner" # 3 Volum./dan
	2	0.5	1.2	1.2
	3	0.5	0.6	0.6
	4	0.5	1.2	1.2
	5	0.5	1.2	1.2
	6	0.5	1.2	1.2
	7	0.64	1.84	1.84
	8	0.7	2.1	2.1
	9	0.7	2.1	2.1
	10	0.7	1.67	1.67
	11	0.7	1.6	1.6
	12	0.7	1.27	1.27
	13	0.7	1.3	1.3
	14	0.7	1.3	1.3
	15	0.8	1.4	1.4
	16	0.8	1.4	1.4
	17	0.8	1.4	1.4
	18	0.8	1.4	1.4
	19	0.8	1.4	1.4
	20	0.8	1.4	1.4
	21	0.8	1.4	1.4
	22	0.8	1.4	1.4
	23	0.8	1.4	1.4
	24	0.8	1.4	1.4
	25	0.9	1.86	1.86
	26	0.8	1.4	1.4
	27	0.8	1.4	1.4
	28	0.8	1.4	1.4

Brzina moćenja: 1.5 vol/dan	=	565ml/24h = 23.5 ml/h
-----------------------------	---	-----------------------

- U literaturi je navedeno da se MPC-5 stanice optimalno pH iznosi 7.7, i da do potpunog prekida rasta dolazi pri pH 7.2 (Forestell, S, i sarad., Biotechnol. bioneg, 39: 305-313, 1992). Proizvodne COSTAR CUBES se kontroliraju pri pH podešena na 7.3 za vrijeme cijele kultivacije. Pošto u spinner bocama nema kontrole pH, održavanje pH iznad 7.3 zavisilo je od moćenja, da bi se uklonila mliječna kiselina i od površinskog propelera da bi se povećalo odavanje CO<sup>2</sup> iz tekuće faze. pH profil prikazan na Slici 2 pokazuje pad pH tokom prvih 150 sati. tada se dodaje natrijum bikarbonat u slijedeće vreće medijuma da bi se povećala koncentracija sa 2.2 g/litar do 3.7 g/litar za dodatni kapacitet puferiranja.
- Jedan od ciljeva ovog eksperimenta je bio da se stvori mikronosačka kultura sa sličnom gustoćom kao što je ona procijena za razvijanje za proizvodni razmjer, sistema monoslojne stanične kulture. Jedan takav sistem koristi COSTAR CUBE bioreaktore. U onome što slijedi, mi uspoređujemo metaboličke profile glukoze, laktata, i amonijaka u postupku zasnovanom na COSTAR CUBE i u našem mikronosačkom postupku. Stanična masa u neinficiranoj proizvodnji COSTAR CUBES je mjerena da iznosi  $1.6 \times 10^6$  stanica/ml na dan infekcije i  $3.0 \times 10^6$  poslije 28 dana. Pošto brzina vezivanja glukoze nastavlja rasti neposredno poslije vremena infekcije, vrlo vjerojatno da se dosta povećanja ćelijske gustoće događa tada (1 udvostručenej), a stanična gustoća se održava u COSTAR CUBE tokom ostatka inficiranja. očekuje se da će stanična gustoća i najvjerojatnije preko  $2 \times 10^6$  stanica/ml. Na osnovu ovih procijena zaključujemo da su mikronosačke kulture i COSTAR CUBE bioreaktor u području istih staničnih gustoća.

Brzine močenja za mikronosačke kulture su u opsegu od 0.7 do 1.5 bioreaktorski volumeni na dan što obuhvaća brzine od 1.3 volumena na dan korištene u COSTAR CUBE baziranom postupku kultiviranja. pri sličnim staničnim gustoćama i brzinama močenja, očekuje se da će u ova dva dana postupka metabolički profili biti slični ako je stanični metabolizam isto tako sličan.

Kumulativna količina upotrebljen glukoze, proizvedenog laktata i proizvedenog amonijaka tokom infekcije za oba sistema prikazana su na Slici 3, 4 i odnosno 5. Kumulativna količina je izračunana ravnotežom mase koja je dana brzinom močenja i koncentracionim profilom tokom vremena. na slici 3 dana je kumulativna glukoaza za 3 mikronosačke kulture, reprezentativni COSTAR CUBE reaktor, i prosječne kumulativne glukoze iz 18 COSTAR CUBE proizvodnih uređaja. Dijagram prikazuje da su proizvodni COSTAR CUBE obuhvaćeni mikronosačkim podacima pri većim i manjim brzinama močenja kao što se očekivalo ako je metabolizam sličan. Slika također prikazuje da se reprezentativni COSTAR CUBE ponašaju slično kao prosječni podaci COSTAR CUBE, sa izuzetkom pomaka na oko 450 sati, koji je vjerojatno posljedica prekida operacije močenja. Kumulativni profil laktata sa svoje strane pokazuje sličnu težnju akumulacije laktata u COSTAR CUBE procesima, pošto se nalazi između onog za mikronosački postupak pri većim i manjim brzinama močenja. Specifična brzina potrošnje glukoze (mMola utrošene glukoaze/litar/h) što odgovara nagibu dijagrama kumulativne glukoaze tokom vremena raste sa povećanjem brzine močenja prvih 400 sati ovog eksperimenta. Ovo se može indicirati kao razlike u koncentraciji glukoaze utječu na brzinu metabolizma glukoaze. Na slikama 6 i 7 vidna je razlika u koncentraciji glukoaze i laktata u biorektoru u mikronosačkim kulturama između 0.7 vol/dan i 1.5 vol/dan. Drugi razlog za razliku mogu biti male razlike u staničnoj gustoći u bioreaktoruima odnos brzina glukoze i laktata ilustrirani na Slici 8 indicira stehiometrijsku konverziju glukoaze u laktat glikolitičkim putem za oba procesa.

Kumulativna proizvodnja amonijaka, ilustrirana na Slici 5 pokazuje dramatičnu razliku metabolizma glutamina kada se koristi niža koncentracija glutamina. greškom u jednom COSTAR CUBE eksperimentu, koncentracija glutamina je udvostručena usljed nepažljivog dodavanja glutamina u medijum koji sadrži glutamin. Na osnovi ovih podataka, vjerojatno je da je glutamin ograničen u kulturama u koncentraciji od 2 mM. Glutamin tipično ulazi u ciklus trikarboksilne kiseline (TCA) preko  $\alpha$ -ketoglutarata sa gubitkom jedne amino grupe (i trans-aminacijom sekundarne amino grupe) Pretpostavljajući da se sav glutamin šaržiran u biorektor konvertira 1:1 u amonijak, brzina akumulacije amonijaka će biti 0.071 mM/litar/sat za 1.5 vol/dan i 0.033 mM/litar/dan za 0.7 vol/dan. Ove brzine su bliske prosječnim brzinama koje se vide u ovoj kulturi. Također se mogu vidjeti da pri istim koncentracijama napajanja, ali pri višim brzinama močenja, brzina korištenja, na bazi proizvodnje amonijaka rasta. Ovaj efekat se isto tako vidi kod metabolizma glukoaze i ukazuje na zavisnost brzine korištenja od koncentracije što je objavljeno za druge stanične linije.

### **Primjer 5**

#### **Infekcija (Stupanj 4):**

Na dan 7 kulture su inficirane sa HAV kulturom za zasijavanje (sjemenom), dobivenim kao što je opisano u Primjeru 1, pri ciljanoj MOI od 0.1 (tj.: 1 virion na 10 stanica u biorektoru kao što je kvantificirano brojem jezgra). odmah zatim, je utvrđeno da je titar kultura za zasijavanje 7.19 log umjesto 7.4 log što rezultira u stvarnom MOI od 0.062. Temperatura je smanjena na 32°C oko 5 sati prije infekcije. način močenja je ponovo uspostavljen 2 sata poslije infekcije.

Mjerenje pH kulture vršeno je pomoću Corning-Ciba Blood Gas Analizatora. Vodio se računa da se pH ne mijenja uklanjanjem CO<sub>2</sub> za vrijeme uzrokovanja. Glukoaza, mliječna kiselina i amonijak su analizirani upotrebljavajući Kodak Biolyzer. Uzorci su razrijeđeni sa WFI kada je bilo potrebno; u slučaju amonijaka, koncentracija je bila korigirana za koncentraciju amonijaka u WFI. Stanična gustoća je kvantificirana postupkom Sanford-a i sarad., (J.Nat. cancer Inst, 11:773-795, 1951) gdje se jezgre oslobađaju i boje pomoću 0.1% (mas/vol) kristal violet i 0.1 mM limunske kiseline. uzrokovanje kulture za brojanje stanica završeno je na dan 6 pošto su agregati ostali visjeti usuzenijima u liniji za uzrokovanje eluanata medijuma vrši se svaki dan.

Krivulja razvoja virusa od dana 9 do dana 21 poslije infekcije dana je na Slici 9. Havag (HAV antigen određen pomoću ELISA analize) jedinica/ml biorektora dobiven je korigirajući titar za razrijeđenje uzorka tokom postupka sakupljanja. Brzina rasta virusa pokazuje da postoje bitno niži u trećem tjednu od infekcije. Druga mogućnost je da je kultura imala maksimum prije 21 dan, a da se virus rasuo u medijumu na dan 21. iz NCF eksperimenta mi znamo da se virus može sakupiti iz stanica na poslije 21 dan infekcije i sakupiti iz medijuma na 28 dan. Ovaj posljednji postupak se još uvijek koristi za stvaranje kulture za zasijavanje u NCFa (vidjeti Primjer 1).

Uspoređivanje proizvodnje virusa između COSTAR CUBE postupka i mikronosačkog postupka dano je u Tabeli IIa i IIb:

Tablica IIa: Havag prinos po litri bioreaktora na 21 dan poslije infekcije				
Volumena		Namoćene mikronosačke kulture		
	Namoćeni produkcionni Cube bioreaktor 1.3 vol/dan	Spinner # 1 0.7	Spinner # 3 1/5 vol./dan	Spinner # 3 vol./dan
Ukupne Havag stanice proizvedene	$1.9 \times 10^7$	$1.34 \times 10^5$	$1.51 \times 10^5$	$1.52 \times 10^5$
Bioreaktor Volumena	28 lit.	565ml	565ml	565ml
Havag jedinica/ml Bioreaktor	695	237	268	269

Tablica IIb: Havag prinos po stanici na 21 dan poslije infekcije				
Volumena		Namoćene mikronosačke kulture		
	Namoćeni produkcionni Cube bioreaktor 1.3 vol/dan	Spinner # 1 0.7	Spinner # 3 1/5 vol./dan	Spinner # 3 vol./dan
Havag jedinica/ml Bioreaktor	695	237	268	269
Stanica/ml Bioreaktor	Procijenjeno <sup>1*</sup> $2.4-3.0 \times 10^6$	$2.21 \times 10^6$	$2.34 \times 10^6$	$2.36 \times 10^6$
Havag na $10^6$ stanica	229-286	107	115	114

\*Procjena stanice na bazi izmjerene stanične gustoće ne-inficirane stanice od  $2.5 \times 10^5$  stanica/cm<sup>2</sup> poslije 21 dan u COSTAR CUBE što odgovara 3 MM stanica/ml i nižoj procjeni od  $2.0 \times 10^5$  stanica/cm<sup>2</sup>.

5 Napravljene su dvije usporedbe: A volumetrijski prinos, (Havag na litru bioreaktora) i specifični na litru bioreaktora) i specifični celularni prinos na litru bioreaktora daje direktan obračun prinosa proizvodnosti bioreaktora. Pošto su stanične gustoće slične kod različitih mikronosačkih reaktora i slične su procijenjenim staničnim gustoćama u COSTAR CUBE proizvodnom bioreaktoru moguće je izvršiti direktno uspoređivanje koristeći ovaj prinos Proizvodni prino; COSTAR CUBE reaktora je prosjek ukupnog Havag sakupljenog iz nekoliko COSTAR CUBE kultivacije podijeljeno sa 28 litara bioreaktorskog volumena

10

Produktivnost 3 mikronosačkih spinera bila je sasvim slična pri čemu je kulturž sa nižom brzinom moćenja (Spinner #1)

pokazivala samo 12% smanjenje prinosa. Prinos iz mikronosačkih kultura je bio 38% od onog dobivenog L COSTAR CUBE postupka. Slične produktivnosti mogu se dobiti povećanjem-šarže granule radi povećanja stanične gustoće u mikronosačkoj kulturi na viš( od dva puta stanične gustoće koja je ovdje korištena.

- 5 Podaci Havag jedinica po stanici za COSTAR CUBE procijenjeni su na procijenjenu staničnu gustoću u COSTAR CUBE kao što je ranije prodiskutirano. Stanične gustoće za spinnera su direktna mjera jezgra oslobođenih tokom sakupljanja iz svakog bioreaktora na 21 dan. Pošto je bilo vrlo malo manje stanica izmjenjenih u bireктору sa niskom brzinom močenja, prinos po stanici je samo 7% niži nego kod drugih spinnera ( u odnosu na 12% na volumetrijskoj osnovi). ovo pokazuje da mala brzina močenja jako ograničava proizvodnju virusa. Prinosi mikronosačkih stanica su oko 40-50% od procijenjenih prinosa po stanici za COSTAR CUBE što se grubo slaže sa volumetrijskim prinosima pošto su stanične gustoće približno slične u birektorima.

### **Primjer 6**

#### 15 Sakupljanje (žetva) (Stupanj 5)

Sijedećoj analizi, koristili smo dva postupka sakupljanja, jedno malo 5 ml sakupljeno na 9 dana i 14 dana poslije infekcije i potpuno sakupljanje bireaktora na 21 dan poslije infekcije.

- 20 Uz uzorke u malom omjeru, 5 ml alkivot agregiranih MNA je opran dva puta sa PBS i suspendiran u 0.1% triton lizis pufera. Agregati su razbijeni tekućim micanjima sa pipetiranjem i uzrokovani za brojenje jezgra. Jezgre su učinjene vidljivim razrijeđenjem uzorka sa 200 ul sa 1.1 0.1% kristal violeta/0.1 mM otopina limunske kiseline. Lizat je tada centrifugiran pri 300xg da bi se uklonila jezgra i alkivotira se za EIA analizu.

- 25 Za sakupljanje bioreaktora, medijum je uklonjen aspiracijom, a agregat je opran dva puta sa bioreaktorskim volumenom PBS. Tada se dodaje jedan volumen bioreaktora 0.1% Triton lizis pufera u agregate i reciklira se kroz niz od 1/16", 1/32" i 1/64" otvora jedan iza drugog pri brzini protjecanja od oko 700 ml/min. Poslije 15-30 minuta recikliranja, MNI (i mali 1-3 MN agregati) se ostave staložiti i lizat bez MN se uklanja. Jedan drugi bioreaktorski volumen 0.1% Tritona se dodaje u MNe, i reciklira kroz otvore 15-30 minuta i sjedini se sa prvim lizatom. Sjedinjeni lizati se uzrokuju radi kvantifikacije jezgara (vidjeti gornji postupak), EIA, 1 HPSEC- Mikronosači su promatrani mikroskopski da bi se provjerilo uklanjanje stanične mase.

- 35 Agregati su bili sasvim stabilni tokom 2 ispiranja sa PBS, miješani sa preko 3 puta brzine miješanja tokom agregacije (75 u odnosu na 25 opm). Iz sakupljenom materijala u malom omjeru utvrdili sino da bi bilo teško razbiti agregate čak i u prisustvu triton lizis pufera. zato je korišten niz otvora da se simulira tekuće micanje koje se dobiva pipetiranjem u malim razmjerima. Vrijeme recikliranja od oko 15 minuta po pranju pri brzini proticanja od oko 700 ml/mn izgleda da je dovoljno da se postigne adekvatno razaranje; vizualno promatranje lizata ukazivalo je na pojedinačne MNe i jezgra. Vrijeme recikliranja koje se ovdje navodi vjerojatno nije optimalno, ali se optimalno recikliranje lako procijenjuje rutinskim eksperimentiranjem zasnovanim na ovom otkriću. pogodnost ovog postupka je da služi da oslobodi jezgre za kvantifikaciju stanične gustoće u vrijeme sakupljanja. osnovna razlika između lizata i monoslojne kulture i mikronosačkog lizata je potreba da se profiltriraju mikronosači i jezgra prije filtracije malog otpada radi prolaska kroz filtere od 0.2 um.

### **Primjer 7**

#### 45 Pročišćavanje, (Stupanj 6)

Bilo koji od poznatih postupaka za pročišćavanje HAV-a dobivenog prema gore opisanom postupku može se iskoristiti za dobijanje pročišćenog HAV-a. niže smo dali postupak koji reproduktivno osigurava HAV izvanredne čistoće.

#### 50 1. Filtracija lizata/BENZONASA:

- Oko 800 ml lizata se filtrira kroz Durapore filter od 5um da bi se uklonila jezgra i MNI, a zatim se filtratom od 0.2 um da bi se uklonile manje nečistoće. COSTAR CUBE lizat se filtrira samo kroz filter od 0.2 um; a poslije toga se COSTAR CUBE i mikronosački lizati tretiraju identično. 0.1 triton pufer se dopunjava sa 2M MgCl<sub>2</sub> do krajnje koncentracije od 2 mM. U svaki lizat se dodaje BENZONASA, komercijalno dostupna nukleaza proizvedena kao rekombinantni protein od strane Nycomed Pharma A/S (Danska), (58 ul/litru lizata) i inkubira preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje,

#### 60 2. Vežuća kolona

Oko 800 ml BENZONASOM tretiranog lizata se filtrira kroz filter od 0.2 um i nanosi se gravitacijom (2 metra razlike visine) na vežuću kolonu od 2.6 cm koja sadži 54 ml Toyopaearl 650M smole. Kolona se pere sa 0.03 M NaCl za 20



volumena kolone i proizvod se eluira gravitacijom na oko 6 ml/min upotrebljavajući stupanj izmjene do 0.35 M NaCl.

### 3. PEG Taloženje i ekstrahiranje otapalom

- 5 Poslije legiranja na 4°C preko noći, Oluirani proizvod iz vezujuće kolone (oko 30 ml) se inkubira sa 4.5% PEG i 0.42 M otopinom soli na 4-8°C da bi se staložio HepA i centrifugira se pri 1000xg. Pelete se ponovno suspendiraju i fosfatom slanom puferu sa EDTA, (PNE), kombiniranom sa 2 dijela smjese kloroforma: isomail alkohola 24:1, ručno mućka minute, i centrifugira pri 3000xg. Vodena faza (oko 7 ml) se uklanja i otapalo se ponovno ekstrahira sa 3.45 ml PNE pufera. Sjedinjeni proizvodi su kombinirani kao otapala ekstrahirani proizvod.

### 4. EIA: HPSEC i SDS PAGE Analiza:

- 10 EIA analiza i HPSEC analiza (Rainin HPLC sistem sa TSK-Gel G-4UOOpw veličine ekldutionom kolonom) izvršene su na uzorcima iz svakog stupnja postupka pročišćavanja. Filtrirani lizat i nukleazom tretirani lizat su analizirani na 260 nm, dok su drugi analizirani na 214nm. SDS PAGE analiza otapalom ekstrahiranih proizvoda izvršena je na 12% gelu.

Tabela 3: Pročišćavanje EIA Stupanj prinosa

Stupanj	potpuni omjer postupka	Cube # 8 lizat	Mikronosački lizat		
			#1	#2	#3
Filtrirani lizat	88	99	84	78	80
Nukleaza Tretiranja	100	89	100	88	91
Vezujuća kolona	62	60	55	73	72
PEG	108	82	88	84	88
Ekstrakcija otapalom	54	46*	64	72	77
Cjelokupna ekstrahiranje	32	20	26	30	35

\* EIA podaci za ovaj prinos su izvedeni iz uzorka starog 1 mjesec

Tabela 4: Pročišćavanje: Relativni% područja hepatitisa A pomoću HPSEL

Ulazni izvor	PEG talog 214 nm, područje	AQX proizvod 214 nm, područje	AQX proizvod BSA pik korigirano 214 nm područja
Cube # 8 lizat	35%	90%	98%
Mikronosač # 1	33%	55%	93%
Mikronosač # 2	41%	71%	98%
Mikronosač # 3	44%	73%	97%
Proizvodnja prosjek šarže 18-26	27.9% SD 3.5%	68.3% SD 6.9%	-

20 Svrha rada na pročišćavanju je bila da se odredi razlika između lizata izvedenog iz mikronosača i lizata dobivenog iz

monoslojne stanične kulture za naknadno pročišćavanje. Izvršeno je pročišćavanje 1 litre lizata dobivenog iz COSTAR CUBE i približno 800 ml lizata iz mikronosača jednog pored drugog radi usporedbe. pročišćavanje je izvršeno ekstrakcijom otapalom pošto se bitni stupanj pročišćavanja postiže tada i treba se osigurati dobra usporedba izvođenja pročišćavanja. Isto tako u ovom omjeru je količina materijala koja je potreban da se provede kroz ostatak postupka, ograničena. Kao što je prikazano u Tabeli 3, EIA prinosi za postupak u malim omjerima su u razumnoj suglasnosti sa postupkom u velikom omjeru. Pored toga, prinosi lizata dobivenog iz mikronosača su bili u savršenoj suglasnosti za kontrolu proizvodnje lizata. SDS PEGE bojenje srebrom na proizvodu dobivenom ekstrakcijom otapalom koje je dano na slici 10, jasno pokazuje 3 Hepatitis A traka za COSTAR CUBE u malom omjeru i 3 za mikronosačke kulture. jedna druga trake se pojavljuje u mikronosačkoj liniji pri oko 66.000 molekulske težini. Ovo odgovara sa BSA (66,200 MT) i najvjerojatnije potiče od nedovoljnog pranja sa PBS tokom stupnja sakupljanja radi uklanjanja serumskih proteina prije dodatka na Triton lizis pufer. COSTAR CUBE lizat je imao dvostruku količinu od normalne količine Hep A određeno pomoću EIA, koja se normalno vidi u proizvodnji, najvjerojatnije usljed neadekvatnog miješanja prije uzrokovanja veći sadržaj HAV u COSTAR CUBE lizatu bio je izveden postupkom tako da je razlika u gustoći traka djelomično posljedica ovoga, a djelomično oko 50% prinosu iz MV kultura.

Na slikama 11-15 dati su HPSEC profili za filtrirani lizat, vezani proizvod, PEG talog, i ekstrakciju otapalom. Treba primjetiti da su profili jako slični za mikronosačke i COSTAR CUBE lizate ukazujući na slična izvođenja pročišćavanja za svaki ulaz. U profilu ekstrakcije otapalom ekstra pik između HAV i pika otapalom vjeruje se da je BSA traka iz SDS PAGE gela. realtivni % HaV područja za PEG talog i proizvod ekstrakcije otapalom (AQX) ,su dani u Tabeli 4. Treba primjetiti da su procenti izračunani na isti način kao i pri proizvodnji, što se odnosi na sve pikove prije pika otapala. uspoređivanjem COSTAR CUBE #8 lizata sa lizatima mikronosača pokazuje relativno slaganje za PEG proizvode i niži % područja za otapalom ekstrahirani proizvod. Ekstra pik u mikronosačkoj kulturi se očekuje da je BSA. Da bi se ovo objasnilo % Hep A područja je ponovno izračunan oduzimanjem BSA pika na koji se sumlja radi usporedbe. Relativni % područja za lizate sa mikronosača i COSTAR CUBE #8 lizate su u inzavrednoj suglasnosti i u ovoj točki pokazuju jedan izuzetno čist proizvod. uspoređivanje relativnih područja za COSTAR CUBE #8 lizat i za prosjek iz COSTAR CUBE proizvodnje pokazuje nešto manji prinos u velikim razmjerima za PEG stupanj i mnogo veće smanjenje za stupanj ekstrakcije otapalom. Ovo ukazuje na razliku u pročišćavanju u velikom i malom razmjeru.

### **Primjer 8**

RAZMNOŽAVANJE virusa Varičele u agregiranom mikronosačkom sistemu

U slijedećem je opisana infekcija MRC-5 stanica razvijenih kao agregatna kultura sa Oka sojem virusa Varičele Solohill staklom obloženi mikronosači pri 40 g/litru, 60 g/litru i 80g/litru su pripremljeni u mikronosačkom spinner sistemu, kao što je izloženo u primjeru 2 i inokulirani sa MRC-5 stanicama expandiranim u NUNC STANIČNIM FABRIKAMA na sličan način kao što je izloženo u primjeru 3. Stanice su namočene pri ciljanim brzinama od 1, 1.5, i 2 volumena na dan sa povećanom brzinom koja odgovara većoj šarži granulata operacija močenja je bila slična kao u primjeru 4. Stanice su se razvijale 4 do 5 dana kada su bile inficirane radnim sjemenom sa približnim infekcijskim odnosom od 1 sakupljene stanice radnog sjemena sa na 15 ciljanih stanica u mikronosačkoj kulturi. stanična gustoća u vrijeme inficiranja kretala se od 2 do 4 milioina stanica/ml radno sjeme je bilo pripremano inficiranjem jedne desetoslojne NUNC stanične Fabrike sa kulturom za zasijavanje pri MOI od 1:125 i sakupljano sa tripsinom 48 sati po infekciji. Uzorak inficirane mikronosačke kulture je sakupljan svakih 6 sati počevši od sata 30, dekantiranjem medijuma sa 4 pranja fosfornog puferirane slane otopine praćeno ponovnim suspendiranjem u stabilizatorskoj formulaciji. Agregat je razbijan tekućim micanjem koristeći infekcijsku iglu.

Pri približno 48 sati poslije infekcije cjelokupan volumen svakog od tri spinnera bila je sakupljena koristeći metodologiju tekućeg micanja opisanu u primjeru 6. Bilo je teže razbiti agregate bez prisustva deterdenta, kao što je opisano u primjeru 6. Zato je bilo potrebno više tekućeg micanja povećanjem linearne brzine kroz otvore.

### **Primjer 9**

Razmnožavanje virusa zaušaka u agregiranoj mikronosačkoj kulturi

Bilo primarne ili krio-konzervirane stanice fibroblasta pilećeg embriona, propuštene više puta u monoslojnim kulturama, dva puta u ovom primjeru, dodavane su pri oko 5-10 stanica na granulu u mikronosače različitih materijala-staklom obložene plastike u ovom primjeru-(promjera 150-212 um, specifične težine 1.02) pri 40 g/litar u jednoj staklenoj spinner posudi od 250 ml. Upotrebljen je modificirani medijum 199 ili DMEM, sa 10% FBS za razvijanje stanica do krajnje gustoće koja je visine do 4 x 106 stanica/ml sa svakodnevnim napajanjem medijumom rast u ovom sistemu karakteriziran agregacijom mikronosača do progresivno rastuće veličine (2-50) kako se povećala stanična gustoća. Infekcija i replikacija virusa zaušaka za proizvodnju vakcine demonstrirana je u ovom sistemu dodavanjem sjemena (kulture za zasijavanje) virusa zaušaka (Jeryl Lynn Soj) u ovu mikronosačku kulturu.

## PATENTNI ZAHTJEVI

- 5 1. Postupak za dobijanje velikih količina virusa u agregiranoj mikronosačkoj staničnoj kulturi, **naznačen time**, što obuhvaća zadržavanje stanične populacije u agregiranom i vezanom stanju, bez otpadanja stanica sa mikronosača, tokom jedne čak produžene infektivne faze za proizvodnju komercijalnih količina antigena virusne vakcine, koji obuhvaća stupnjeve:
- 10 a) pripremu staklom obloženih mikronosača, hidratiziranjem, sterilizacijom i uravnoteženjem navedenih staklom obloženih mikronosača u medijumu kulture u biorektoru pogodnim za kultiviranje stanica osjetljivih na infekciju virusom koji se treba upotrijebiti kao antigen vakcine;
- 15 b) zasijavanje stanica u povoljnom medijumu kulture pri koncentraciji zasijavanja dovoljnoj da se postigne homogeno vezivanje stanica na mikronosače tako da u biti svaki mikronosač ima najmanje jednu stanicu vezanu, upotrebljavajući brzinu mješanja jednaku sa kritičnom brzinom suspenzije iznad dna (COBSR) i pH i temperaturu da se omogući formiranje strukturnih agregata;
- 20 c) razvijanje zasijanih i vezanih stanica do kasne log ili rane stacionirane faze sa kontrolom pH i dopunjavanjem medijumom dovoljnim da se osigura adekvatno hranjenje stanica i kontrola veličine agregata i brzinom mješanja dovoljno niskom da se omogući efikasno formiranje agregata mikronosača stanice, ali dovoljno brzom da se svi mikronosači održe u suspenziji (to je COBSR);
- 25 d) iniciranje agregata mikronosača-stanice sa virusom u kasnoj log ili ranoj stacioniranoj fazi, i razvijanje virusa dovoljno dugo razdoblje vremena da se postigne maksimalni prinos virusa poslije sakupljanja;
- e) sakupljanje i regeneracija virusa iz agregirane mikronosačke stanične kulture
2. Postupak prema zahtjevu 1, stupanj (b), **naznačen time**, što se stanice zasijavaju, pri oko 5 do 10 stanica po mikronosaču.
- 25 3. Postupak prema zahtjevu 1, stupanj (a), **naznačen time**, što su mikronosači SOLOHILL stakleni mikronosači.
4. Postupak prema zahtjevu 1, stupanj (b), **naznačen time**, što su stanice humani diploidni plućni fibroblasti, Vero stanice, ili fibroblast pilećeg embriona.
5. Postupak prema zahtjevu 4, **naznačen time**, što su stanice MRC-5 stanice ili W138 stanice.
- 30 6. Postupak prema zahtjevu 1, stupanj (d), **naznačen time**, što je virus Hepatitisa A, virus varičele, malih boginja, zaušaka, rubeole, polio virus, virus herpesa, ili rotavirus.
7. Postupak prema zahtjevu 6, **naznačen time**, što je virus, virus Hepatitisa A,
8. Postupak prema zahtjevu 6, **naznačen time**, što su stanice MRC-5 stanice, a virus je virus Hepatitisa A.
9. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što, sakupljanje iz stupnja (e) obuhvaća prisiljavanje prolaska agregirane mikronosačke stanične kulture kroz niz otvora sa opadajućim promjerom tako da je najmanji otvor približno dvostruke veličine pojedinačnog mikronosača.
- 35 10. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što obuhvaća prisiljavanje prolaska agregirane mikronosačke kulture kroz niz otvora sa opadajućim promjerom tako da se dobije linearna brzina od oko 1010 m/minutu do oko 2020m/minutu.
11. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što pranje agregiranih inficiranih stanica vezanih za mikronosače, sa fosfornim puferiranim slanim otopinama ne dovodi do otkidanja ili razaranja agregata sa mikronosača.
- 40 12. Postupak za dobijanje velikih količina virusa u agregiranoj mikronosačkoj staničnoj kulturi, **naznačen time**, što obuhvaća zadržavanje stanične populacije u agregiranom i vezanom stanju, bez otpadanja stanica sa mikronosača, tokom jedne čak produžene infektivne faze za proizvodnju komercijalnih količina antigena virusne vakcine, koji obuhvaća stupnjeve:
- 45 a) pripremu SOLOHILL staklom obloženih mikronosača hidratiziranjem, sterilizacijom i uravnotežavanjem navedenih staklom obloženih mikronosača u medijumu kulture u biorektoru pogodnom za kultiviranje stanica osjetljivih na infekciju virusom Hepatitisa A; koji se treba upotrijebiti kao antigen vakcine;
- 50 b) zasijavanje MRC-5 stanica u povoljnom medijumu kulture pri koncentraciji zasijavanja od oko 5 do 10 stanica po mikronosaču da se postigne homogeno vezivanje stanica na mikronosače tako da bitno svaki mikronosač ima najmanje jednu stanicu vezanu, upotrebljavajući brzinu mješanja jednaku sa kritičnom brzinom suspenzije iznad dna (COBSR) i pH i temperaturu da se omogući formiranje strukturnih agregata;
- 55 c) razvijanje zasijanih i vezanih stanica do kasne log ili rane stacionirane faze sa kontrolom pH i sa dopunjavanjem medijumom pri brzini od oko 0.7 do oko 2 volumena na dan da se osigura adekvatna ishrana stanice i kontrola veličine agregata i brzinom mješanja dovoljno niskom da se omogući efikasno formiranje agregata mikronosača-stanice, ali dovoljno brzom da se održe svi mikronosači u suspenziji (to je COBSR);
- 60 d) iniciranje agregata mikronosača-stanice u kasnoj log ili ranoj stacioniranoj fazi sa virusom Hepatitisa A, i razvijanje virusa dovoljno dugo razdoblje vremena da se postigne maksimalni prinos virusa poslije sakupljanja;
- e) sakupljanje virusa iz agregirane mikronosačke stanične kulture uklanjajući medijuma kulture i zamjenjivanjem ovoga sa puferom za sakupljanje koji sadrži oko 0.1% TRITON-a X-100, prisiljavanje prolaska agregirane mikronosačke stanične kulture kroz niz otvora sa opadajućim promjerom tako da najmanji otvor približno samo oko pet puta od veličine pojedinačnog mikronosača, ili dovoljan da se postigne linearna brzina od oko 1010 m/minutu i oko 2020 m/minutu i regeneriranje oslobođenog virusa Hepatitisa A.

13. Upotreba SOLOHILL staklenih mikronosača, **naznačen time**, što se kultiviraju virus hepatitisa A,, virus varičele, malih boginja, zaušaka, rubeole, poliovirus, virus herpesa ili rotavirus.
14. Upotreba SOLOHILL staklenih mikronosača, **naznačen time**, što se kultivira virus Hepatitisa A.
15. Agregirani mikronosač stanične kulture, **naznačen time**, što agregati imaju približno 50-60% slobodnog prostora.

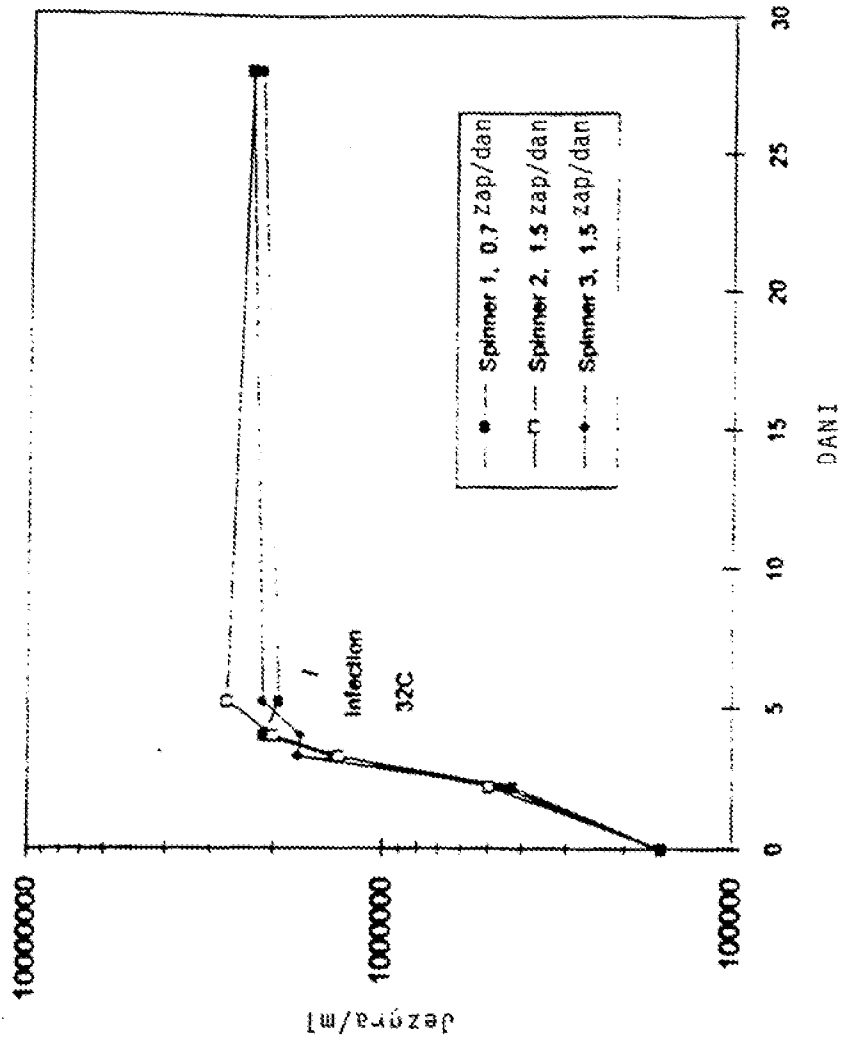
5

## SAŽETAK

- 10 Postupak na bazi mikronosača za dobivanje virusnih vakcina, od kojih je jedan primjer virus hepatitisa A (HIV) koji se sastoji od jednog agregiranog mikronosačkog sistema od staklom obloženih polistirolnih mikronosača i MRC-5 stanica što daje stabilnu okolinu za razmnožavanje virusa čak preko produženih infekcijskih razdoblja. Mikronosački agregati formirani prema ovom postupku eliminiraju otpadanje stanica sa granula tokom drugih kultivacija što se događa u dugim sistemima, omogućavajući visoku produktivnost virusa u mikronosačkoj kulturi. Metodologija je primjenjiva tamo gdje se proizvodnja virusa može poboljšati kreiranjem stabilne kulture tokom produženog infekcionog razdoblja. Upotrebljavaju se bioreaktori koji se mogu mijenjati po veličini koji se miješaju umjesto višestrukih paralelnih bioreaktora sa stacioniranom površinom. Ovaj agregirani mikronosački postupak eliminira ograničenja kapaciteta bioreaktora sa stacioniranom površinom, on štiti stanice na kojima je virus kultiviran od micanja, osigurava povećane interakcije stanica na stranicu, osigurava stabilnu sredinu za razvijanje virusa, osigurava slobodan prostor za konvektivni transport hranjivih materijala kroz agregate, i osigurava direktan postupak za sakupljanje virusnog lizata za kasniji tok proizvodnje.
- 15

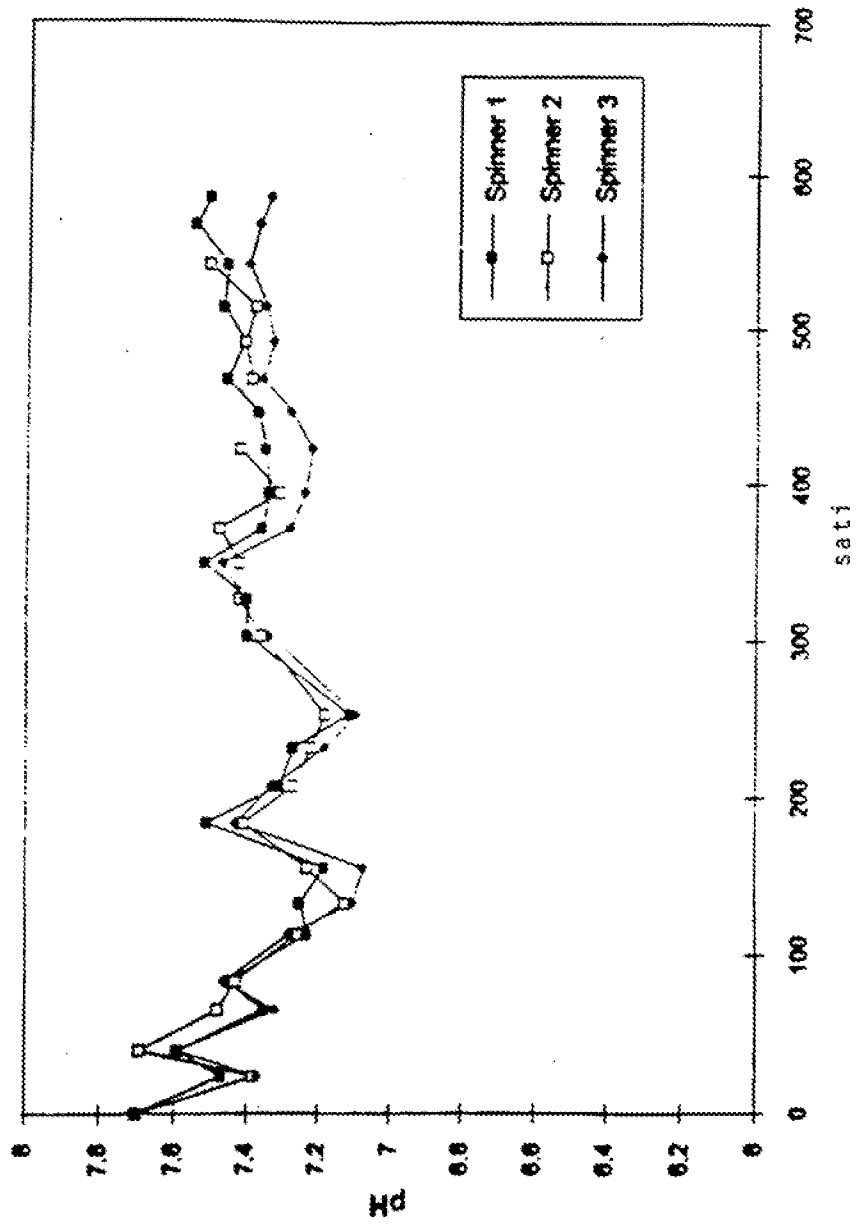
SLÍKA 1

STANIČNA GUSTOĆA ZA FAZU RAZVIJANJA I SAKUPLJANJA



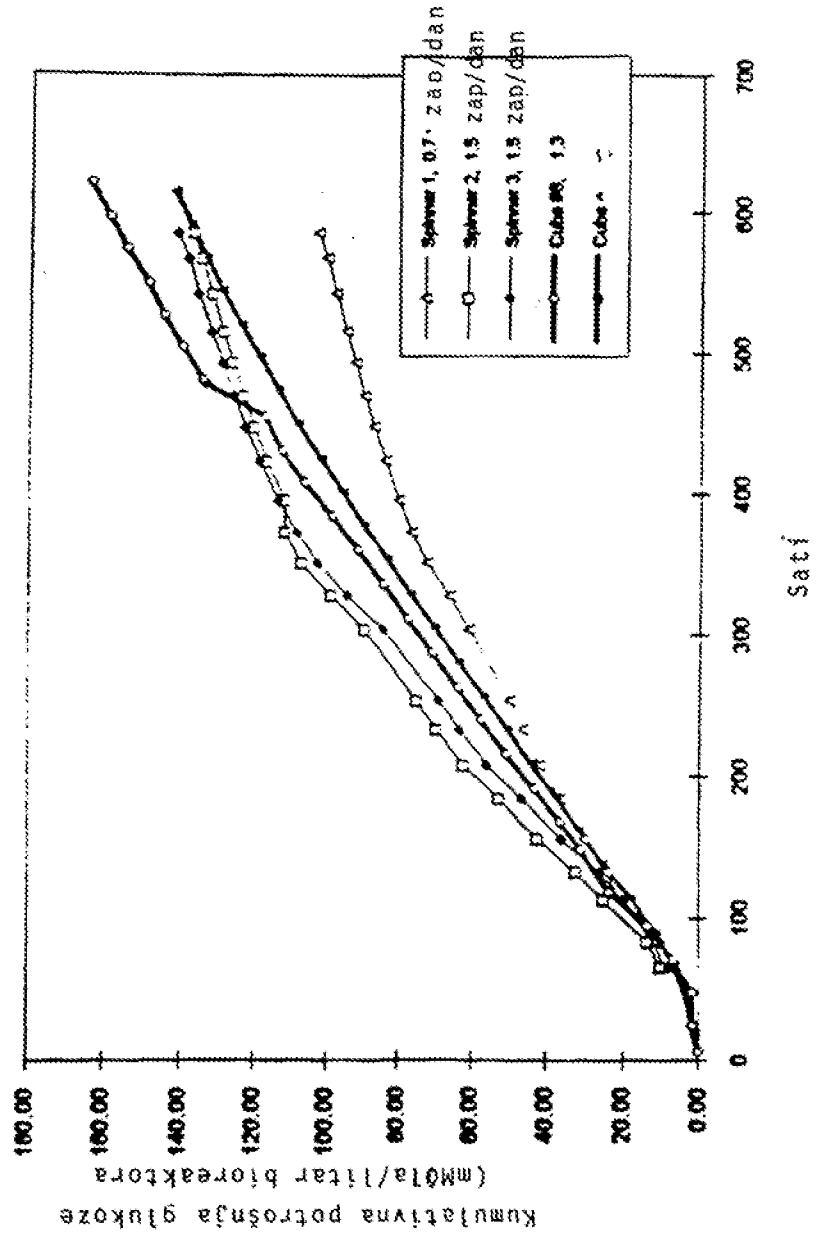
SLIKA 2

Ph Profil za namočene mikrososačke spinner kulture



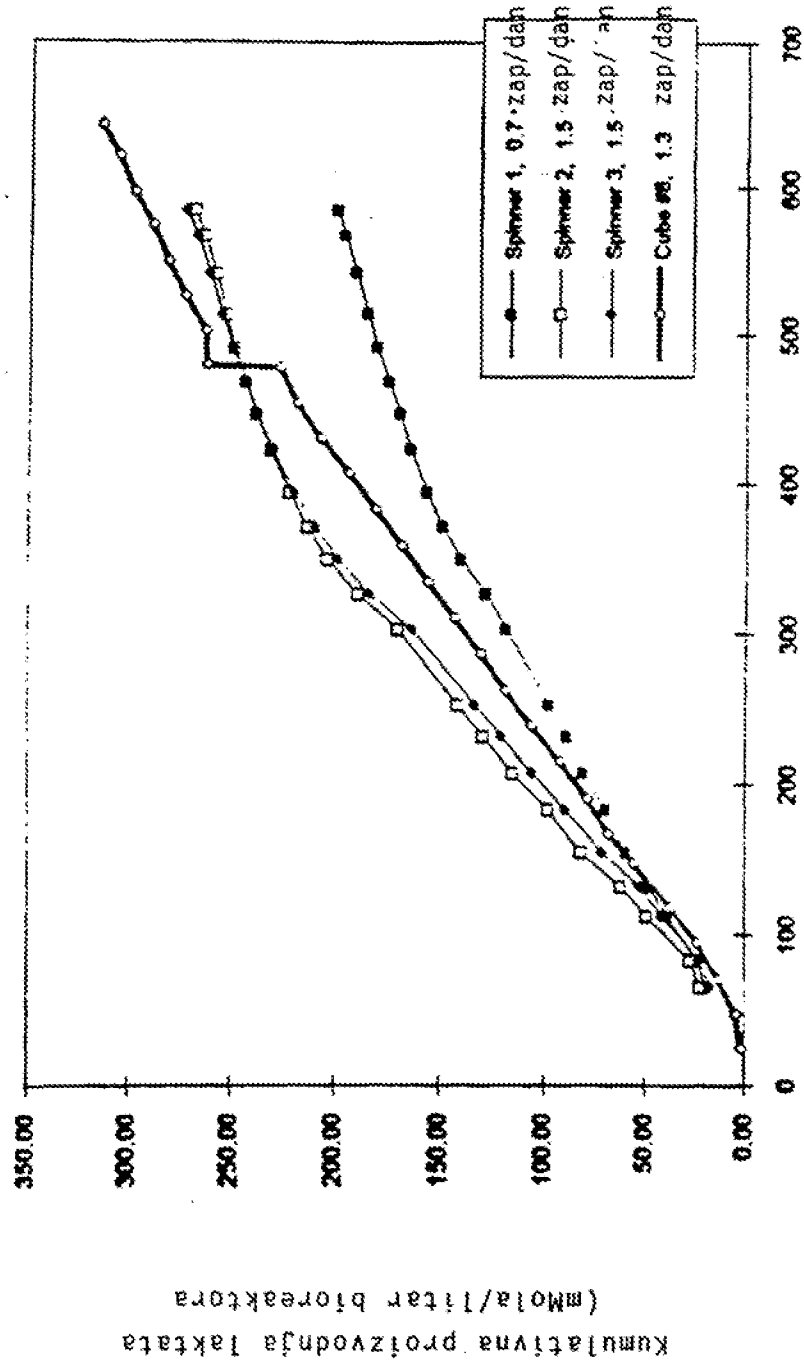
SLIKA 3

Kumulativna potrošnja glukoze za namočenu mikromosačku kulturu i  
 produkcioni CUBE bioreaktor



SLIKA A

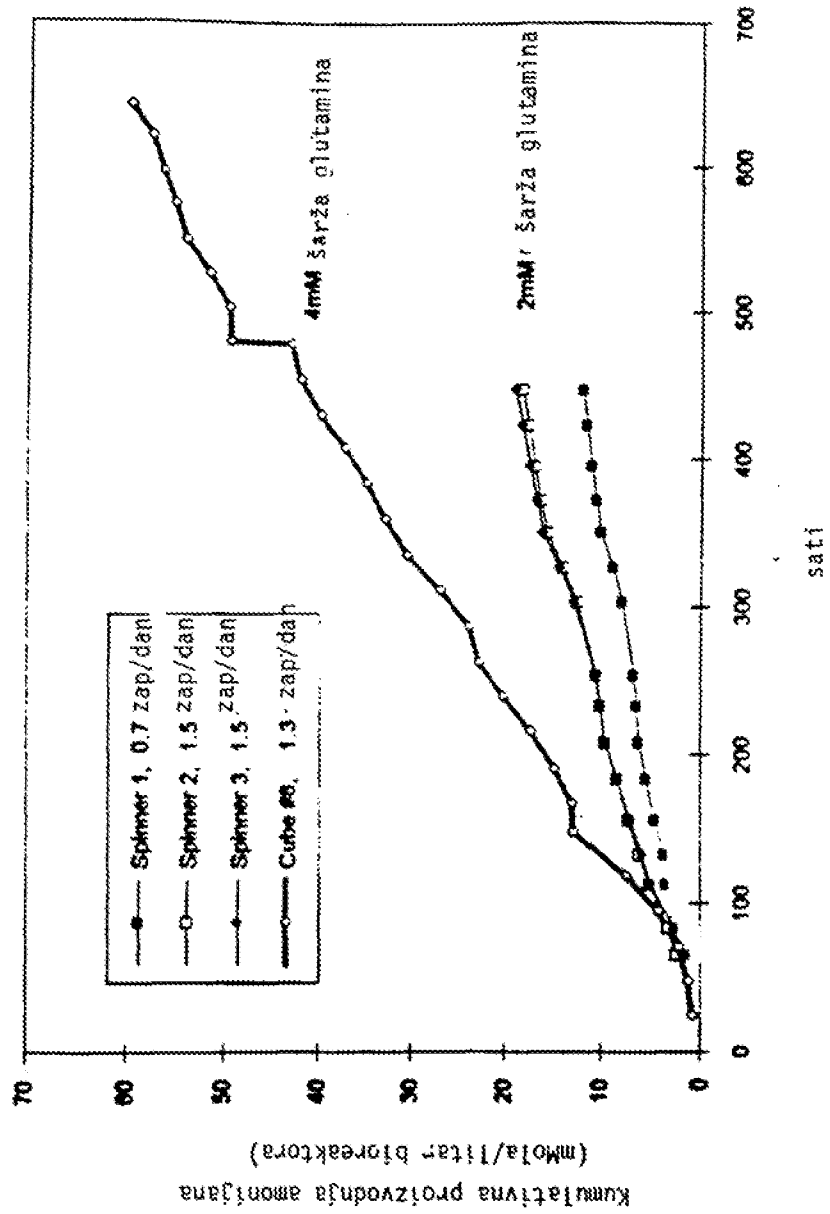
Kumulativna proizvodnja laktata za namoćenu mikronosaćku kulturu i  
 produkeioni bioreaktor





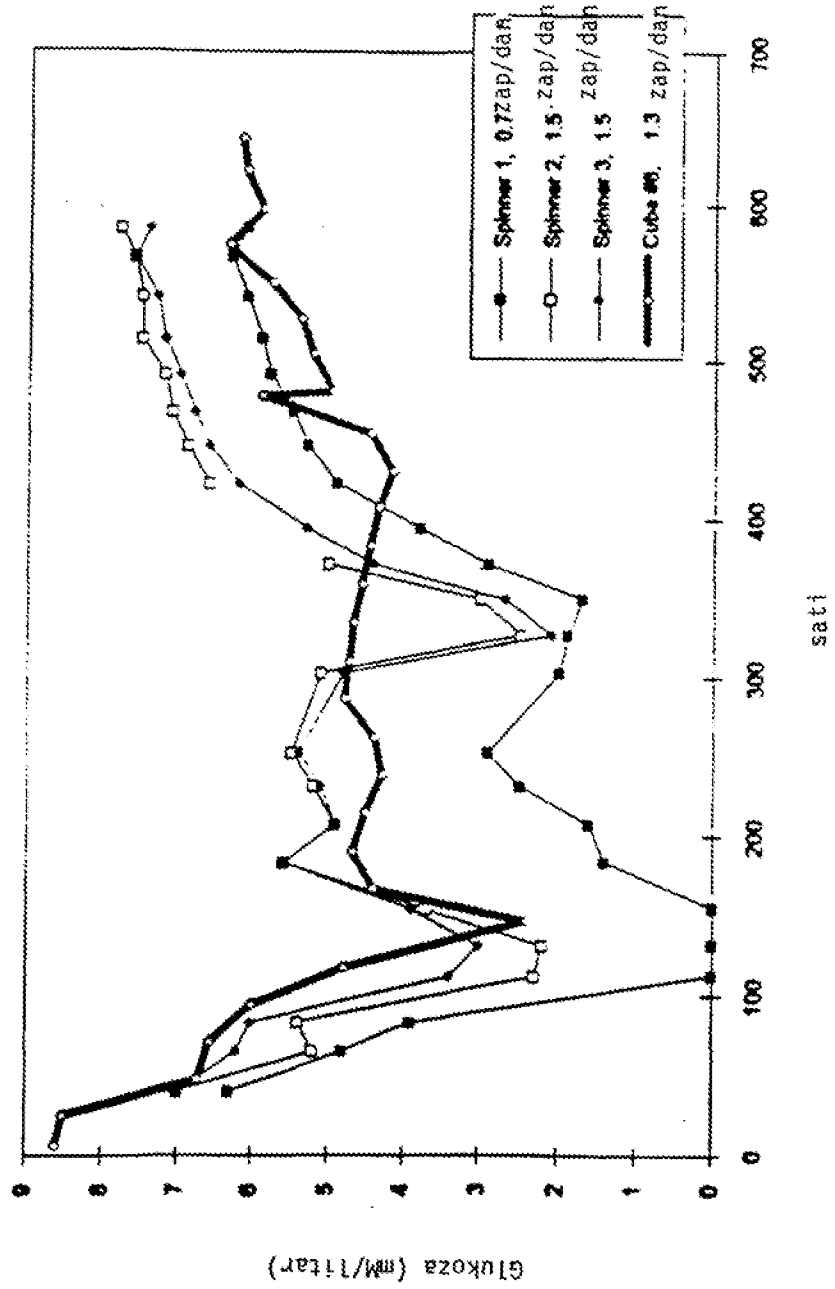
SLIKA 5

Kumulativna proizvodnja amonijaka za namočene mikronosačke kulture i  
 produkcioni CUBE bioreaktor



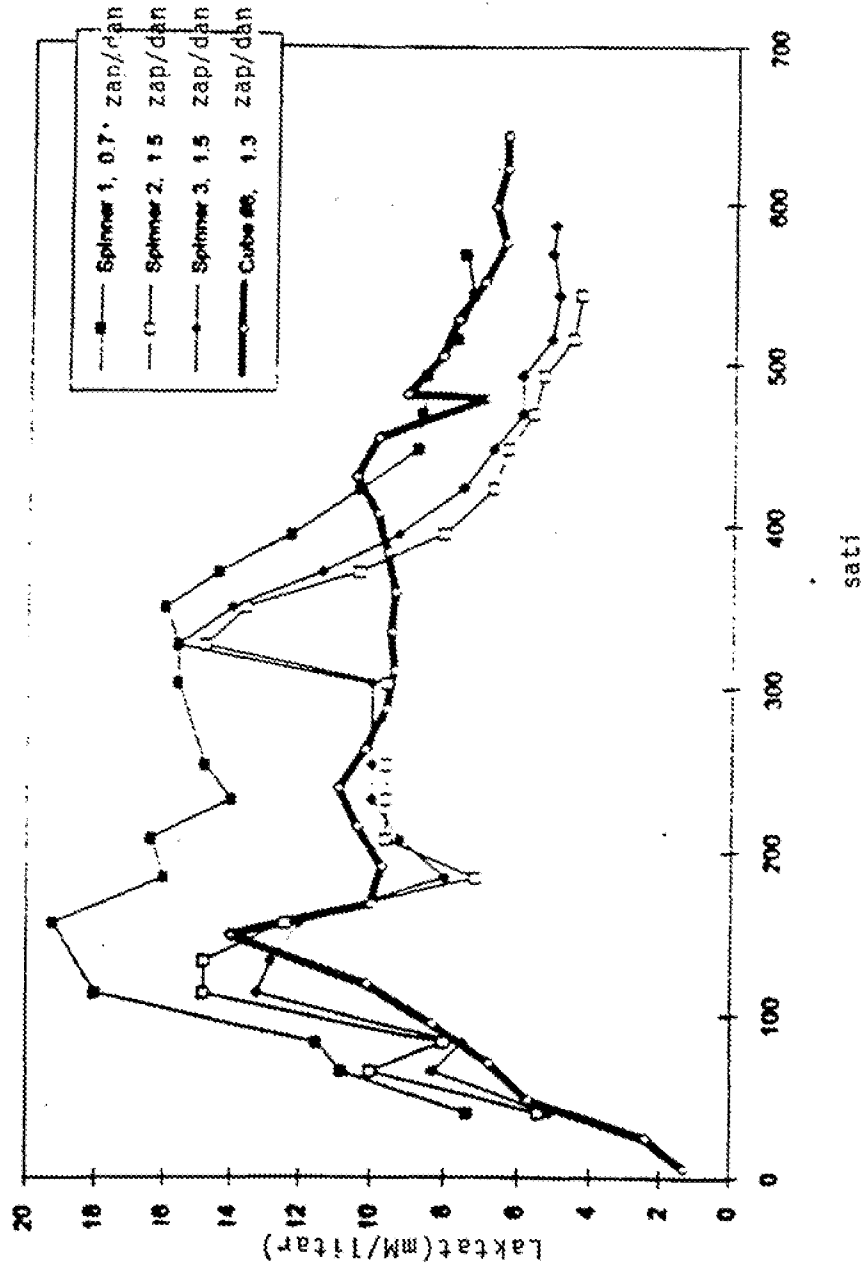
SLIKA 6

Profil glukoze za namočenu mikroosječku kulturu i produkcionu CUBE bioreaktor

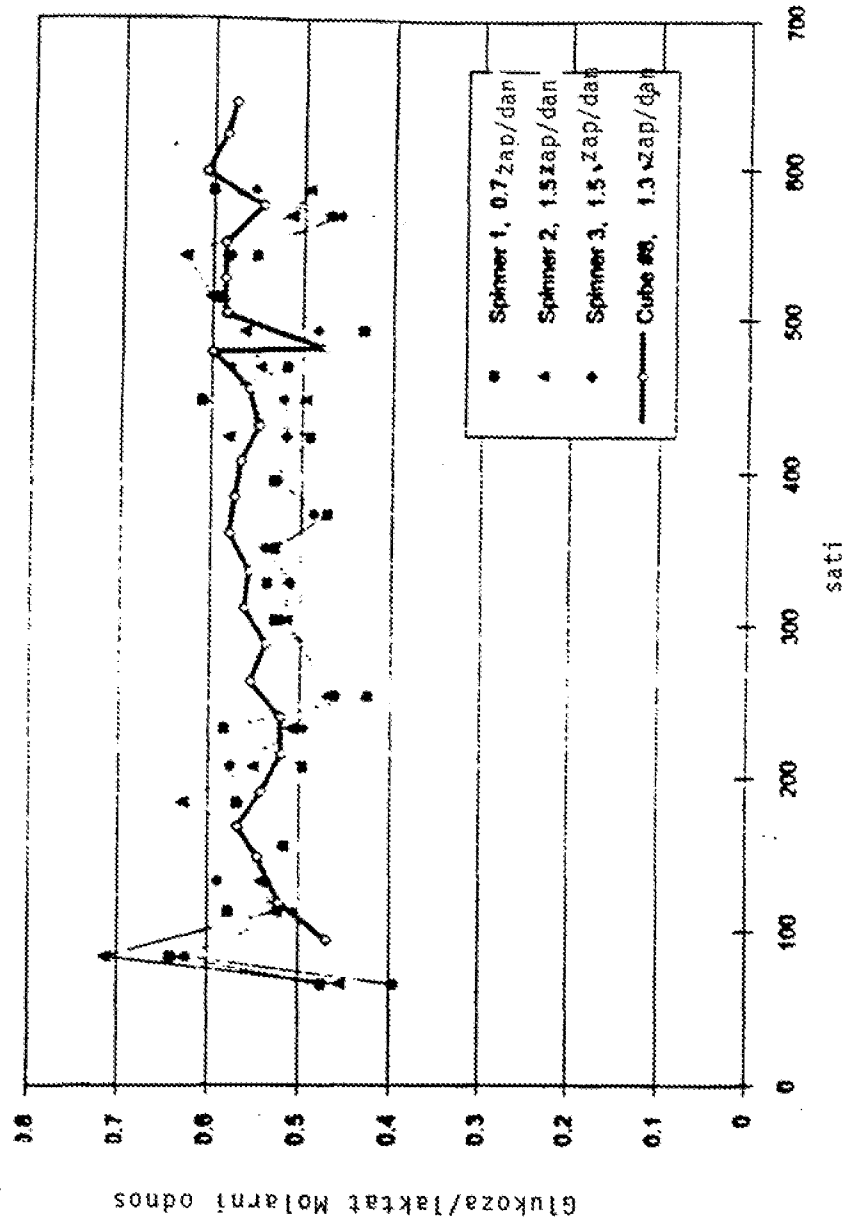


SLIKA 7

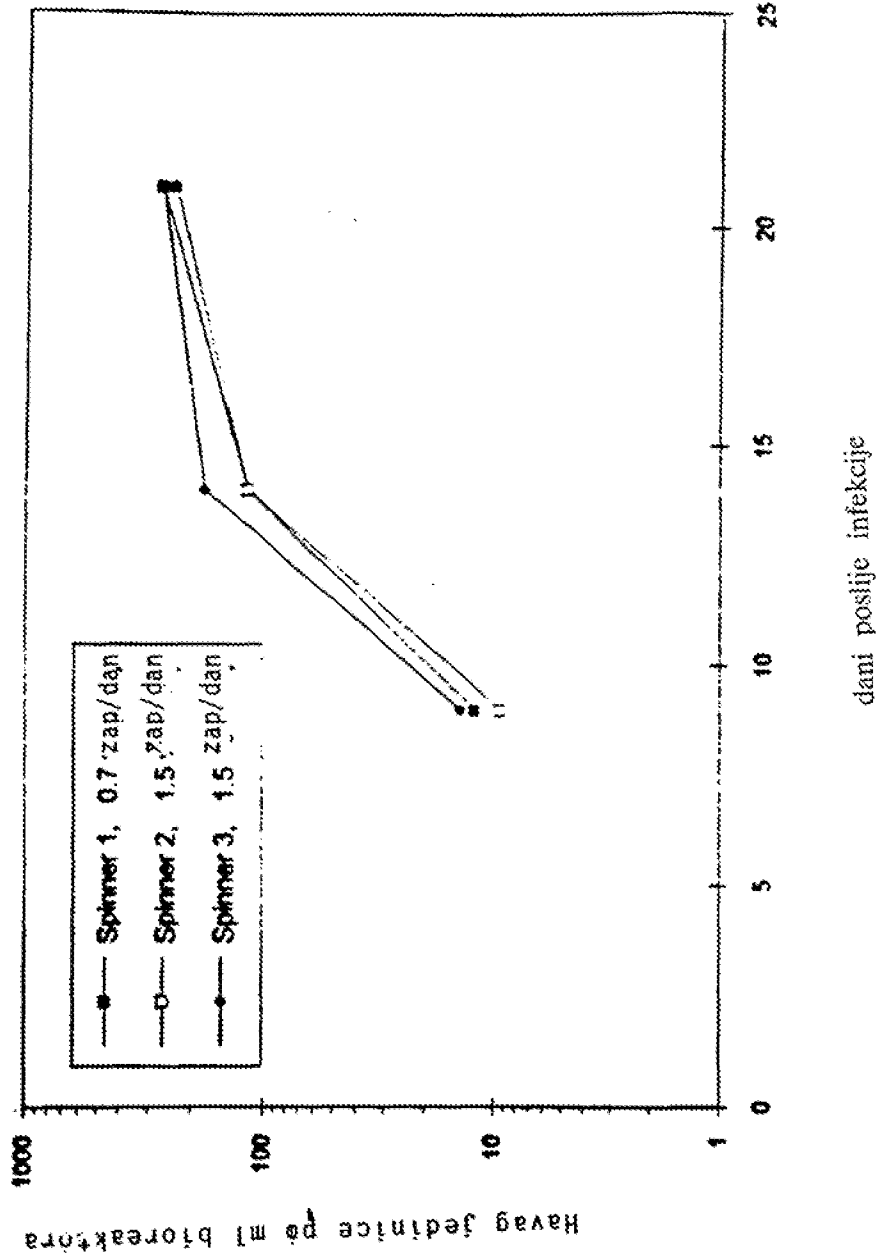
Profil laktata za namoćenu mikronosaćku kulturu i prizvodni CUBE bioreaktor



SLIKA 8 Odnos brzina korištenja glukoze i potrošnje laktata

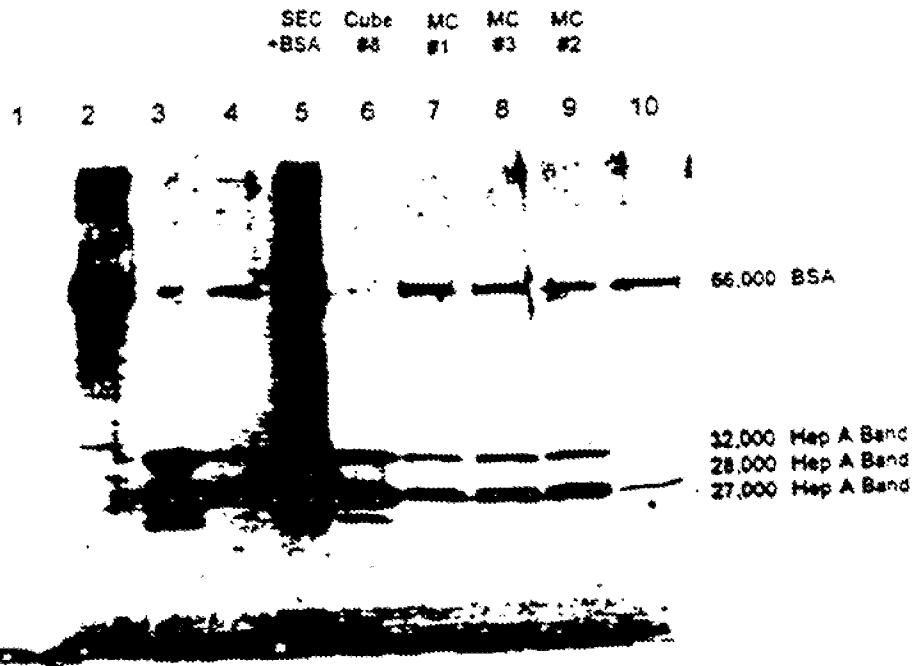


SLIKA 9  
 krivulja rasta virusa hepatitisa A za namoćenu mikronosaćke kulture



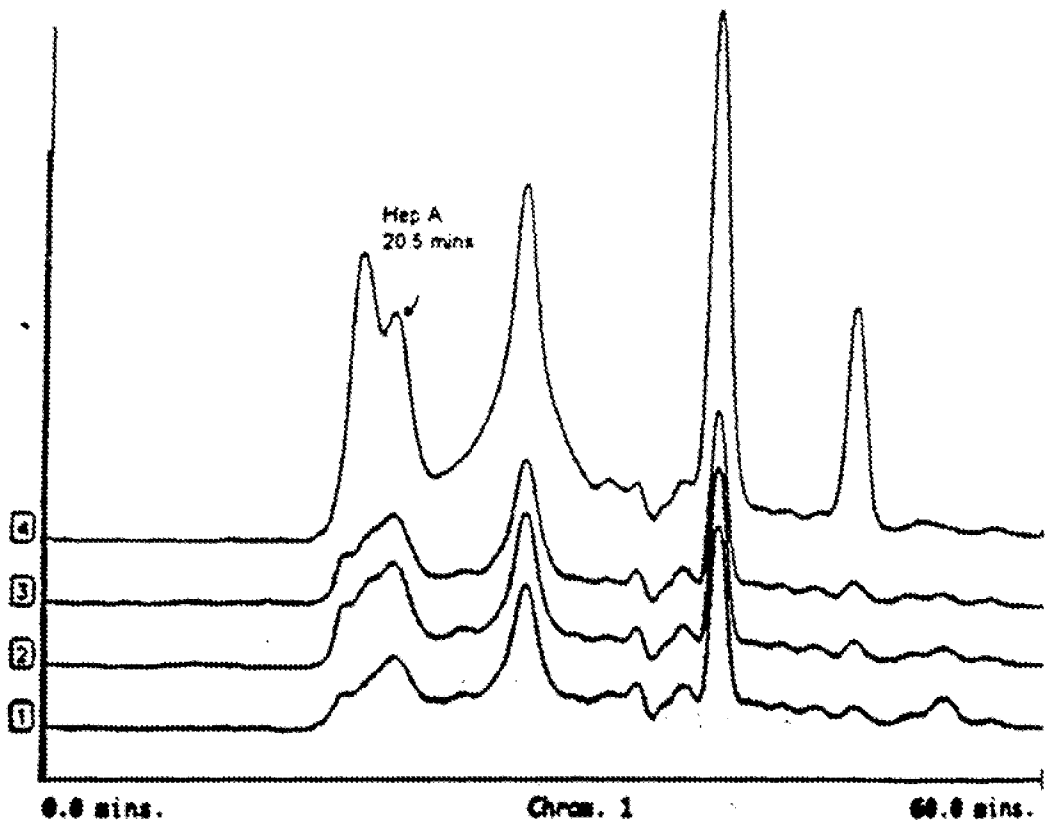
SLIKA 10 SDS PAGE PROIZVODA EKSTRAHIRANIH OTAPALOM

Lane 5: SEC Prečišćen Hep A sa dodatkom BSA  
 Lane 6: Cube #8 Lizat  
 Lane 7: Mikronosač Spinner #1, 0.7 zap/dan  
 Lane 8: Mikronosač Spinner #3, 1.5 zap/dan  
 Lane 9: Mikronosač Spinner #2, 1.5 zap/dan



SLIKA 11 HPSEC PROFILI FILTRIRANOG LIZATA 260 nm

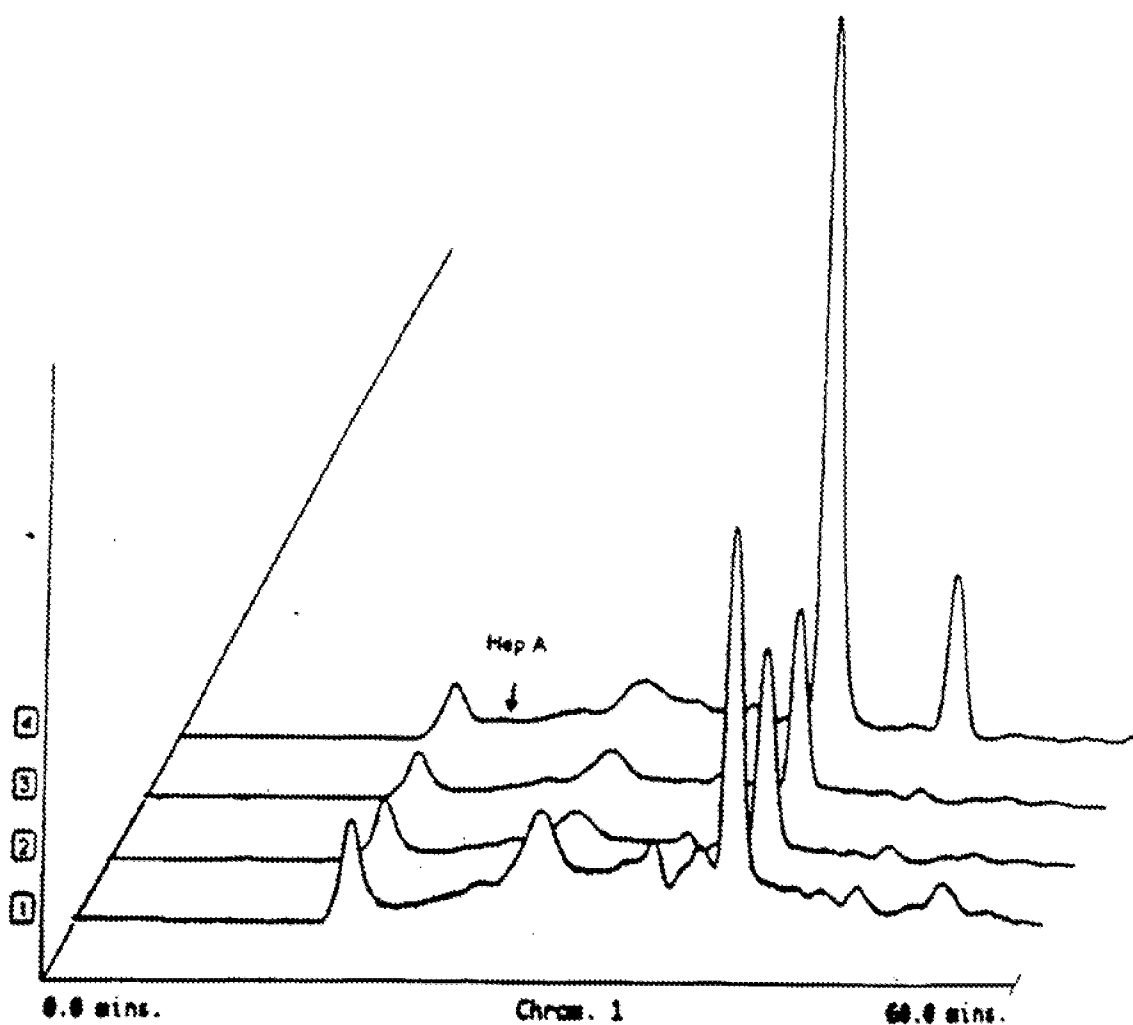
- 1 Mikronosač filtrirani lizat, Bioreaktor #1
- 2 Mikronosač filtrirani lizat, Bioreaktor #3
- 3 Mikronosač filtrirani lizat, Bioreaktor #2
- 4 Cube #6 filtriran lizat



SLIKA 12 HRSEC PROFILI NUKLEAZOM. TRETIRANOG LIZATA

260nm

- 1 Mikronosač nukleazom tretirani lizat, bioreaktor #1
- 2 Mikronosač nukleazom tretirani lizat, bioreaktor #3
- 3 Mikronosač nukleazom tretirani lizat, bioreaktor #2
- 4 Cube #8 nukleazom tretirani lizat

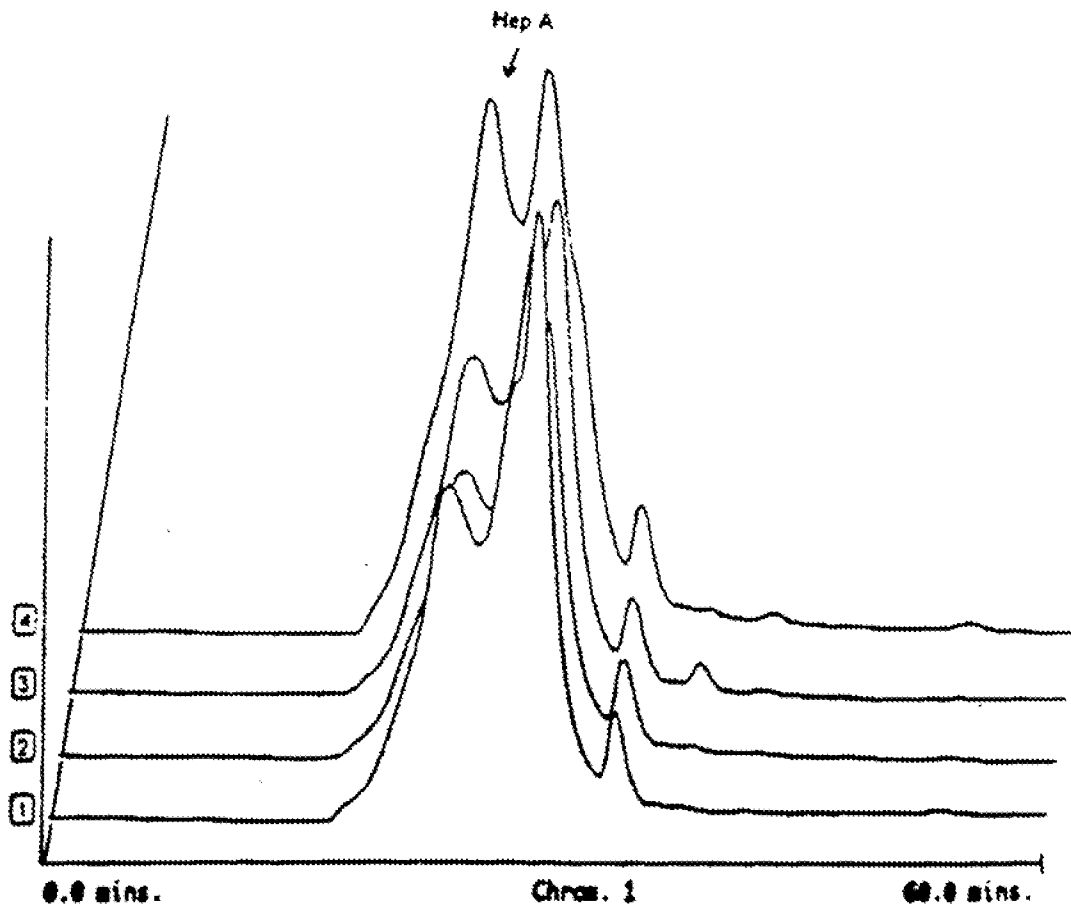




SLIKA-13 HPSEC PROFILI VEZANIH PROIZVODA

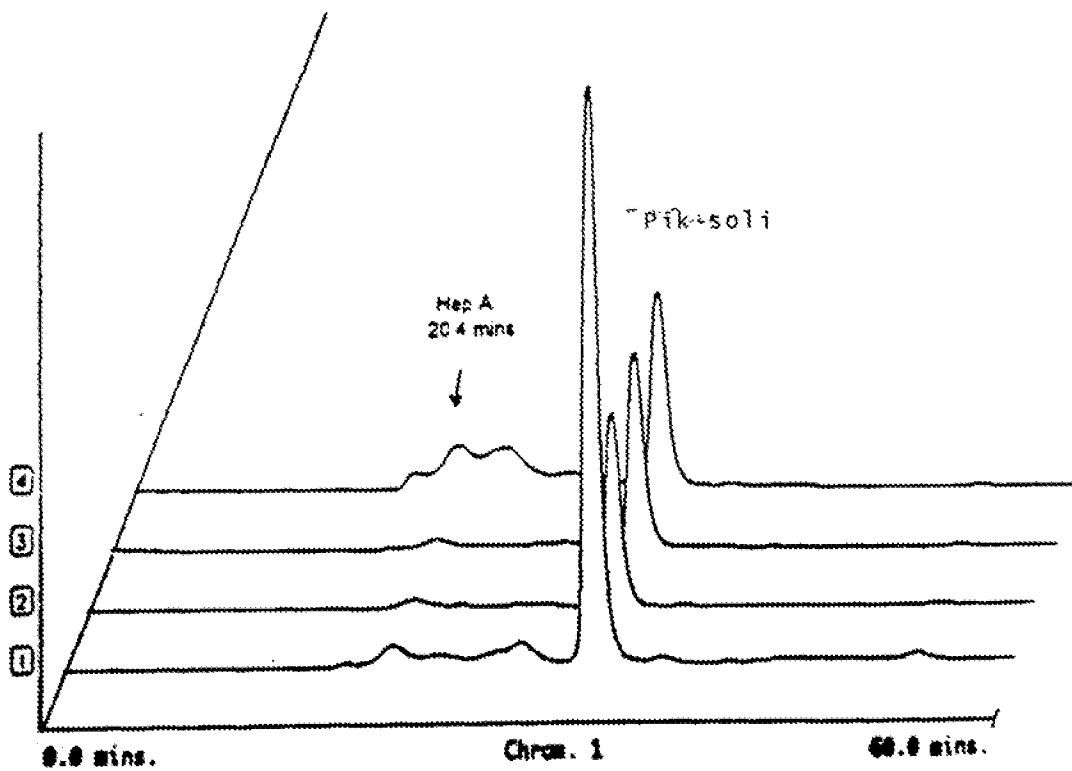
214nm

- 1 Mikronosač Vezani proizvod, Bioreaktor #1
- 2 Mikronosač Vezani proizvod, Bioreaktor #3
- 3 Mikronosač Vezani proizvod, Bioreaktor #2
- 4 Cube #8 Vezani proizvod



7 SLIKA 14 HPSEC PROFILI PEG PROIZVODA  
214nm

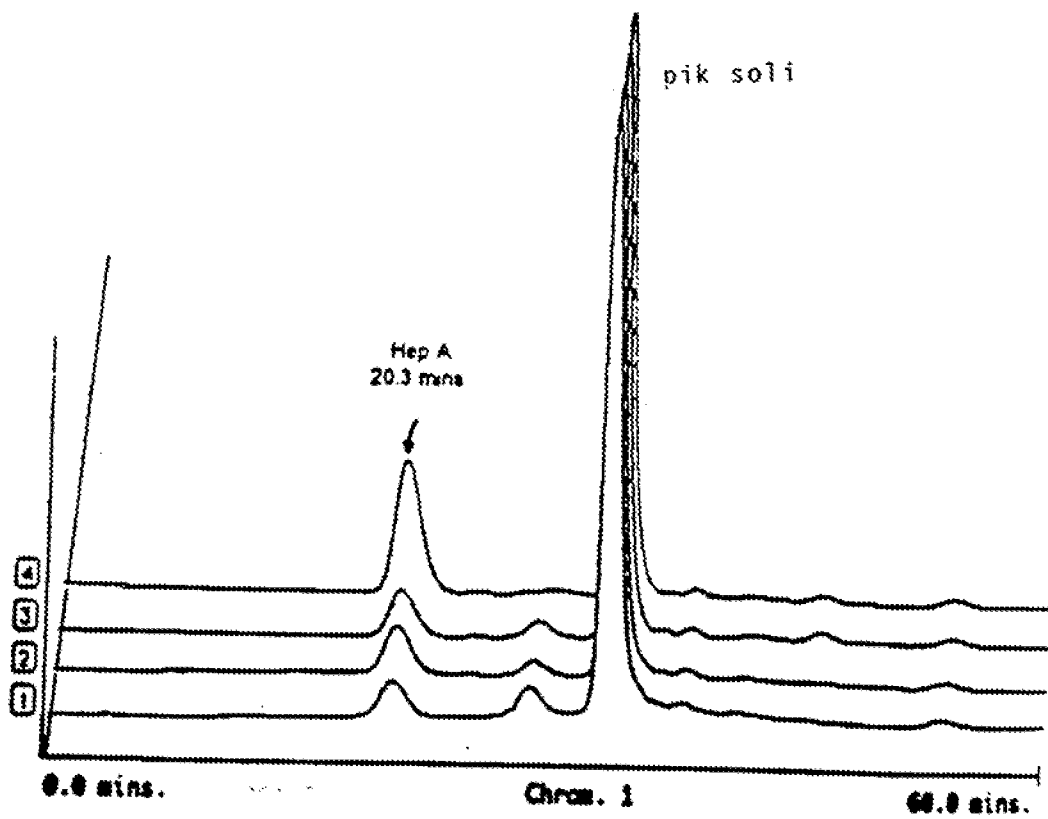
- 1 Mikronosač PEG proizvod, Bioreaktor #1
- 2 Mikronosač PEG proizvod, Bioreaktor
- 3 Mikronosač PEG proizvod, Bioreaktor #2
- 4 Cube #8 PEG PEG proizvod

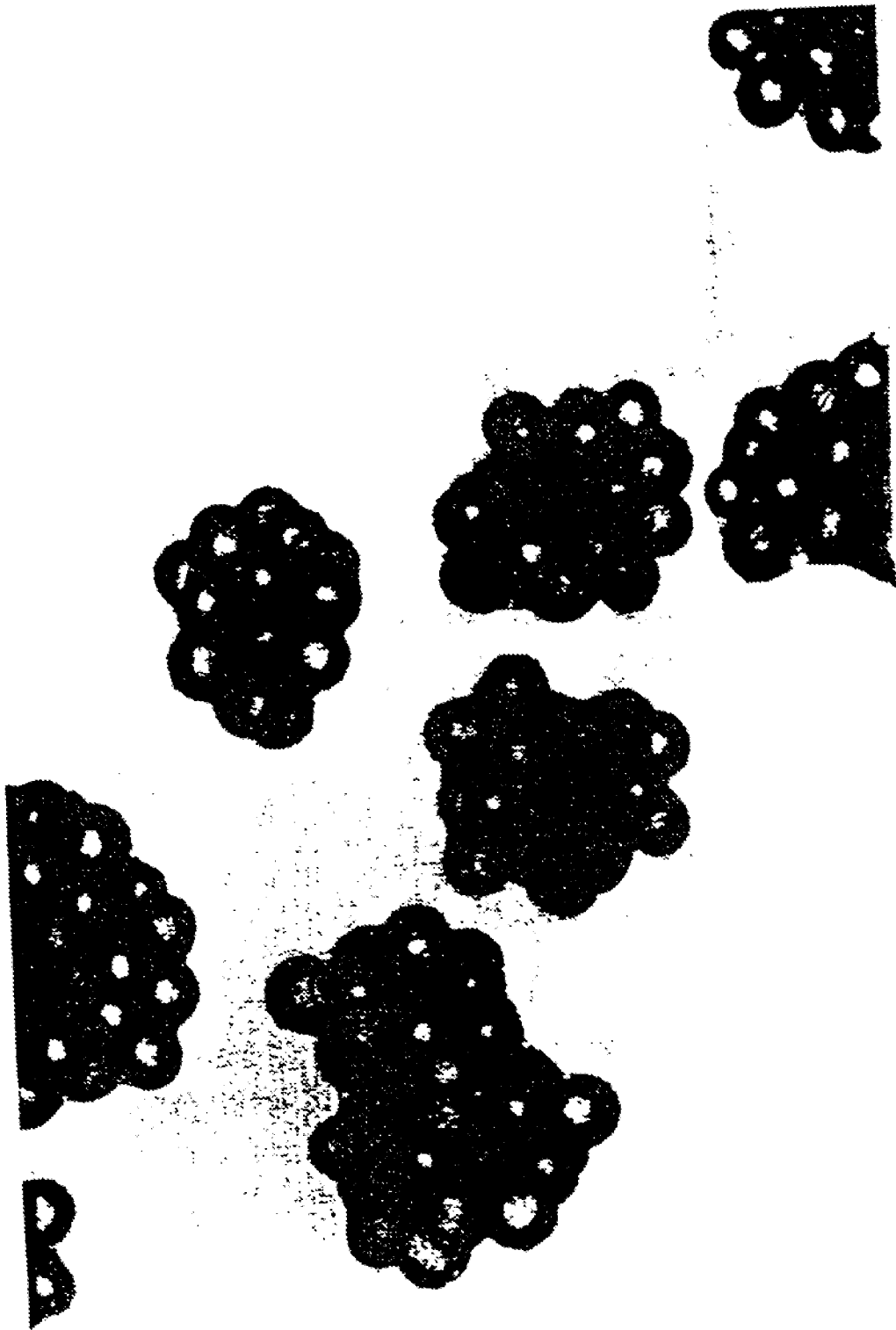


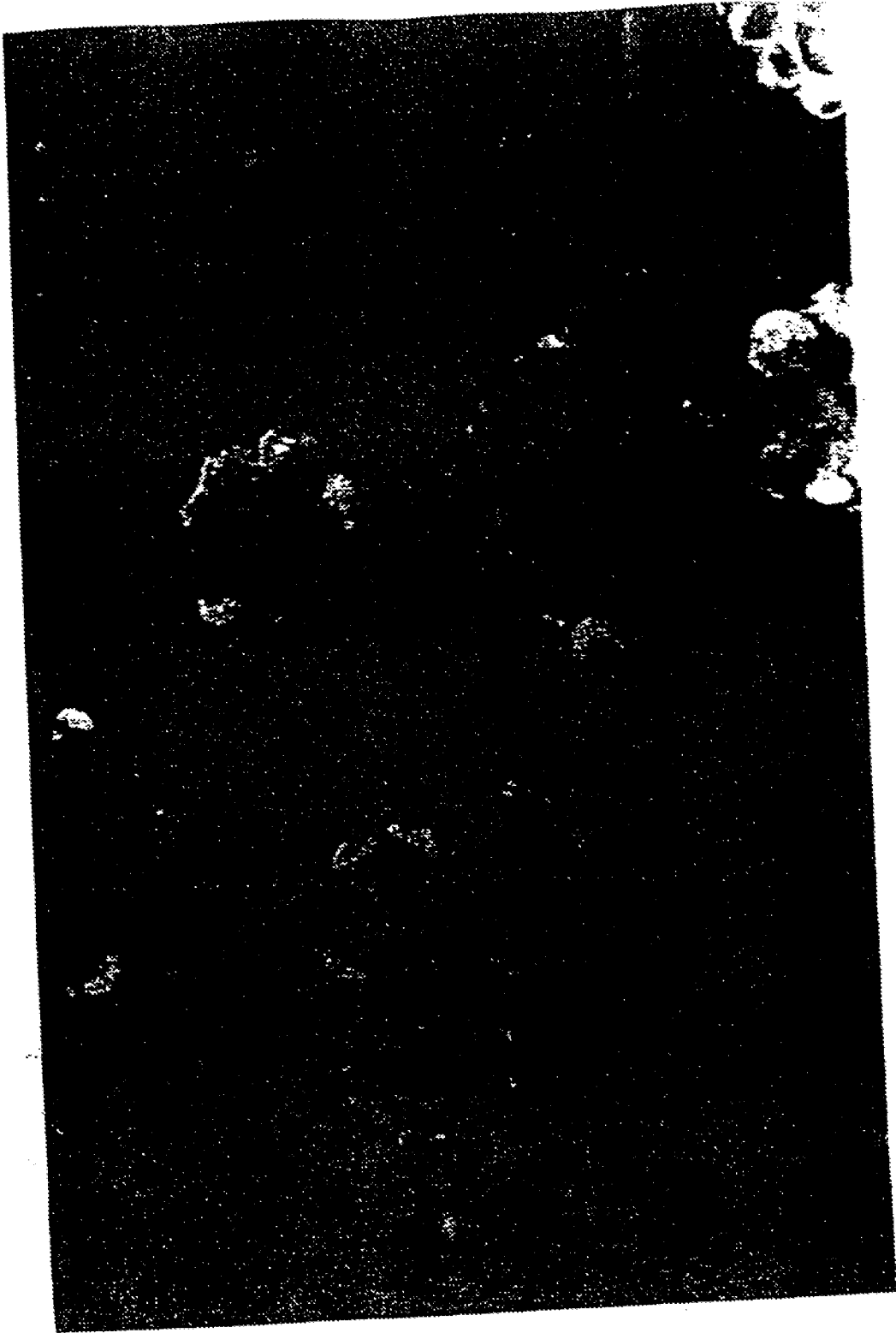
SLIKA 15 HPSEC PROFILI AQX PROIZVOD

214nm

- 1 Mikronosači AQX proizvod, Bioreaktor #1
- 2 Mikronosač AQX proizvod, Bioreaktor #3
- 3 Mikronosač AQX proizvod, Bioreaktor #2
- 4 Cube #8 AQX PROIZVOD









SLIKA 19

