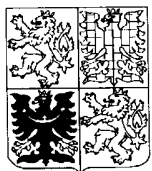


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/97204110**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/08522**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/33955**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2343

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷ :

C 12 N 5/00

C 12 N 7/00

(71) Přihlašovatel:

DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B. V.,
Weesp, NL;

(72) Původce:

Brands Rudi, Weesp, NL;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Příprava buněk pro výrobu biologických
materiálů**

(57) Anotace:

Způsob přípravy buněk pro použití při výrobě biologických materiálů pomocí kultivace buněk až do požadovaného objemu buněk předprodukční dávky, kdy se po opakovaném diskontinuálním procesu: a) část buněk předprodukční dávky použije pro přípravu nejméně jedné produkční dávky a b) zbývající část buněk předprodukční dávky se použije jako očka pro přípravu nejméně jedné další předprodukční dávky.

21.05.00

PV 1000 - 1343

Příprava buněk pro výrobu biologických materiálů

~~4833~~

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy buněk pro použití při výrobě biologických materiálů.

Dosavadní stav techniky

Pro výrobu biologických materiálů, například buněčných kmenů, bude nezbytné nalézt způsob přípravy velkých množství buněk za použití postupů v bioreaktorech ve zvyšujícím se měřítku.

US patent číslo 5,017,490 zahrnuje takový způsob ve zvětšujícím se měřítku, který poskytuje zejména výhodu malého nebezpečí kontaminace při převádění. Tento způsob však není vhodný pro buňky závislé na zakotvení (tedy pro buňky, které rostou pouze když jsou zakotvené na substrát) nebo buňky usazené v substrátu (například v porézních nosičích).

US patent číslo 4,644,912 popisuje způsob přípravy buněk závislých na zakotvení pro přípravu biologických materiálů (tj. virů) z inokula a následné pasážování prováděné při zvyšujících se následných objemech bioreaktorů 1 litr, 5 litrů, 25 litrů, 150 litrů a nakonec buď v 1000litrovém bioreaktoru nebo ve velkém počtu 150litrových bioreaktorů. Mezi všemi těmito pasážovacími kroky se buňky uvolní z nosičů zředěným roztokem proteázy. Při posledním pasážování se provede naočkování vi-rem.

Na základě průměrných časů buněčného cyklu asi 20 až 24 hodin se předpokládají intervaly pasážování asi každých 3 až 5 dní. Aby se tedy buňky expandovaly do dostatečně velkého objemu kultury z pracovní banky buněk výrobce (MWCS), může celý proces expandování trvat několik týdnů v závislosti na objemu konečného bioreaktoru.

Při výše uvedených způsobech přípravy buněk se každá konečná produkční dávka musí připravovat z pracovní banky buněk výrobce (MWCS). Pro přípravu velkého množství biologického materiálu bude nezbytné použít několik paralelních kultačních linek až do největších objemů nádob. Tento výrobní postup je tedy časově velmi náročný a vyžaduje práci značného počtu bioreaktorů pro přípravu buněk a také výrobu biologického materiálu.

Předmětem podle předkládaného vynálezu je poskytnout daleko rychlejší způsob přípravy buněk pro výrobu biologických materiálů.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se tedy týká způsobu přípravy buněk pro použití při výrobě biologických materiálů pomocí kultivace buněk až do požadovaného objemu buněk předprodukční dávky, kdy se při opakovaném diskontinuální procesu:

- a) část buněčné předprodukční dávky použije pro přípravu nejméně jedné produkční dávky a
- b) zbývající část buněčné předprodukční dávky použije jako očko pro přípravu nejméně jedné další předprodukční dávky.

Přesněji se předkládaný vynález týká způsobu přípravy buněk pro použití při výrobě biologického materiálu pomocí kultivace buněk až do požadovaného objemu buněk předprodukční dávky, kdy se při opakovaném diskontinuální procesu:

- a) část buněk předprodukční dávky převede pro použití při přípravě nejméně jedné produkční dávky a
- b) zbývající část buněk předprodukční dávky převede pro použití jako očko pro přípravu nejméně jedné následné předprodukční dávky.

Ve výhodném provedení podle předkládaného vynálezu se první předprodukční dávka připraví ze zásobního roztoku inokulačních buněk pomocí nejméně jednoho pasážovacího kroku.

V dalším výhodném provedení podle předkládaného vynálezu jsou připravované buňky závislé na zakotvení. V tomto případě bude obecně nutné, aby se buňky kultivovaly na substrátu. Bude tedy vhodné během opakovaného procesu pokaždé, když se použije část dávky pro přípravu nové dávky, přidat další množství substrátu. Ve výhodném provedení se pokaždé před přidáním substrátu alespoň část buněk nejprve uvolní z jejich původního substrátu.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „produkční dávka“ kulturu buněk, která se použije pro výrobu biologického materiálu.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „předprodukční dávka“ kulturu buněk, která se použije při způsobu podle předkládaného vynálezu pro přípravu nejméně jedné produkční dávky (která je definovaná výše) a jedné další předprodukční dávky.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „biologický materiál“ jakoukoli látku nebo organismus, který se může vyrobit z buněčné kultury. Příklady „biologických materiálů“ jsou viry a proteiny, jako jsou enzymy.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „zásobní roztok inokulačních buněk“ množství určitého typu buněk definovaného původu skladovaných pro použití jako očko, ze kterého se odvodí celá kultura stejného typu buněk.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „buňky závislé na zakotvení“ buňky, které pro svůj vlastní růst a/nebo rozmnožování potřebují být připojeny k substrátu, který je definovaný podle vynálezu.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „substrát“ jakoukoli látku ve formě částic vhodnou pro připojení buněk.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „krok pasážování“ posloupnost činností při množení a výrobě buněk, zahrnující alespoň přenos vhodného množství buněk a vhodného množství kultivačního média do produkční nádoby, inkubaci nádoby za podmínek vhodných pro růst a rozmnožování buněk po dobu, která je dostatečná pro účinný růst a rozmnožování buněk. Krok pasážování popřípadě zahrnuje oddělení buněk z kultivačního média a/nebo ze substrátu po době, která je dostatečná pro účinný růst a rozmnožování buněk.

Odborníkům pracujícím v této oblasti bude zřejmé, že způsob podle předkládaného vynálezu se zásadně liší od způsobů známých podle stavu techniky, kdy se buňky vyrábí kontinuálním způsobem, spíše než diskontinuálním způsobem podle předkládaného vynálezu. Podle patentové přihlášky EP0417531 a WO 89/08701 se může kontinuální kultivační systém použít také pro výrobu virů. Buňky nejprve rostou v prvním bioreaktoru a poté, co se dosáhne určité hustoty buněk, se buňky kontinuálně naplní ze jmenovaného prvního bioreaktoru do druhého bioreaktoru. V tomto druhém bioreaktoru se viry kultivují na buňkách a potom se viry kontinuálně odeberou z druhého bioreaktoru.

Základním pracovním postupem podle předkládaného vynálezu je použití mateřského bioreaktoru, ze kterého se plní produkční bioreaktor(y) buňkami. Pokud jsou buňky závislé na zakotvení, je po každém kroku pasážování s výhodou potřeba buňky oddělit od svých substrátů.

Pro tento účel byl vyvinut trypsinizační postup ve velkých bioreaktorech. Při použití tak zvané rozšířené banky buněk (ECB, „Extended Cell Bank“) jsou vlastnosti produkčních buněk definovány do specifického a charakteristického počtu pasáží. Popsaný způsob umožňuje vysoce výkonnou výrobu, protože způsob

expandování z WCS (pracovní banka buněk) pro přípravu buněk se může velmi zkrátit a je potřeba daleko méně bioreaktorů, protože již nejsou nutné paralelní výrobní linky.

Na obrázku 1 jsou uvedena různá provedení podle předkládaného vynálezu.

Ve výhodném provedení se buňky expandují z jedné ampule MWCS až na úroveň první předprodukční dávky prostřednictvím jednoho nebo více pasážovacích kroků. Velikost bioreaktoru používaného pro tuto předprodukční dávku se může pohybovat od několika litrů pracovního objemu do několika stovek litrů. Potom se část, například 10 až 20 % takto expandovaných buněk (například pasáž X), použije pro repopulaci bioreaktoru pro přípravu další předprodukční dávky (pasáž číslo X+1), zatímco se objem buněk převádí (pasáž X nebo X+1) do bioreaktoru větší velikosti, aby se přímo zahájila výroba nebo aby se nejprve populoval a potom se zahájila výroba.

V klasických sériových produkčních linkách je známo mnoho způsobů zdvojování počtu buněk odvozených od MWCS ve chvíli sklizně v předem daných mezích. Maximální možný počet generací je v produkčním systému nastaven na začátku.

Při způsobu podle předkládaného vynálezu se může maximální počet pasáží buněk definovat pomocí ECB (rozšířené banky buněk). Počet produkčních pasáží (počet pasáží buněk použitých před výrobou biologického produktu) je tedy v mezích daných ECB irelevantní. Tento maximální počet pasáží by se měl tedy řídit regulačními omezeními. Výsledkem je, že příslušná dávka biologického materiálu je koncovým produktem jednoho přímého procesu expanze.

Aby bylo možné ověřit, zda specifikace buněk ve stupni ECB při výrobě jsou podobné MCB (kontrolní buněčná banka), je nutné provést specifické hodnocení s ohledem na charakteristiky

růstu, uvolňování nahodilých, vnějších i vnitřních činidel v různých krocích, karyologickou isoenzymovou analýzu a podobně. Když je taková ECB plně charakterizována, je možné vyrobit produkt s buňkami při jakékoli pasáži mezi MCB a ECB, protože je možné předpokládat, že se buňky neliší od svého inokula. Z toho plyne, že se testy na MWCS mohou omezit na testování sterility. Toto je zvláštní výhoda způsobu podle předkládaného vynálezu.

Při maximálním nastaveném počtu pasáží je možné použít buňky v jakémkoli mezistupni. Aby se tedy dále minimalizovala doba potřebná pro expanzi buněk z MWCS do produkčního bioreaktoru, může být výhodné mít k dispozici startovací buněčnou kulturu. Toto je možné provést například následujícím způsobem:

- buňky se mohou zastavit v určitém počtu pasáží během delších intervalů při teplotě místnosti (17 až 32 °C) a převést do logaritmické fáze růstu pomocí zvýšení teploty a změny kultivačního média nebo
- buňky se mohou zmrazit (teplota menší než -80 °C) v určitém objemu a roztát před převedením do předem stanoveného objemu bioreaktoru, čímž se výrazně sníží potřeba úprav při přechodu do většího měřítká.

Způsob podle předkládaného vynálezu se může provádět s živočišnými buněčnými kulturami a zejména s buňkami závislými na zakotvení. Vhodnými typy buněk jsou například buňky křečků (CHO, BHK-1), buňky myši (Vero), bovinní buňky (MDBK), psí buňky (MDCK), lidské buňky (CaCo, A431) nebo drůbeží buňky (CEF).

Jako bioreaktor podle předkládaného vynálezu se může použít jedna jednotka nebo mnoho jednotek například míchaných fermentérů, fermentérů s pevným ložem, fermentérů s fluidním ložem, fermentérů s provzdušňováním nebo reaktorů s dutými vlákny.

Výše uvedené buňky se mohou, a některé by se dokonce měly, kultivovat při upevnění k pevnému nosiči, jako jsou mikronosiče nebo makronosiče v suspenzi, například v pevném loži, fluidním loži nebo v suspenzi nebo jako jsou dutá vlákna. Buňky se mohou také usadit v nosiči (například porézním nosiči).

Při způsobu podle předkládaného vynálezu, zejména, když se použije pevný nosič, se buňky uvolňují z tohoto pevného nosiče. Uvolnění se může provést pomocí jakéhokoli známého způsobu využitelného pro uvolnění buněk z pevného nosiče. S výhodou se uvolnění může provést pomocí roztoku proteolytického enzymu. Popřípadě se před tímto enzymatickým uvolňovacím krokem může provést jeden nebo více upravovacích kroků, například zpracováním PBS a/nebo EDTA, za účelem zvýšení proteolytické účinnosti a/nebo za účelem snížení množství potřebného proteolytického enzymu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Uvolnění buněk a jejich odstranění z nosičů před převedením do dalšího bioreaktoru

Buňky závislé na zakotvení MDCK buněčného kmene se kultivují při 37 °C na mikronosiči Cytodex-3 (Pharmacia Uppsala, Švédsko) (5 g nosiče/l) v míchaném čtyřlitrovém reaktoru („mateřský bioreaktor“). Růstovým médiem je EpiSerf (Life Technologies, Paisly, Skotsko). Růst pokračuje do maxima 5×10^6 buněk/ml kultury.

Buňky se uvolní z nosiče pomocí trypsinizace v roztoku Trypsin-EDTA (Life Technologies, Paisly, Skotsko).

Po usazení nosiče se 80 % uvolněných buněk převede do 3 dalších bioreaktorů podobné velikosti. Další „produkční“ bio-

reaktory všechny obsahují nosiče (buněčný substrát), které se do nich přidají předem. Buňky se nechají repopulovat nosiče a následně se použijí pro výrobu v těchto bioreaktorech.

Zbývající buňky v „mateřském bioreaktoru“ se nechají repopulovat zbývající nosiče Cytodex-3 a kultivují se do požadované hustoty buněk.

Příklad 2

Uvolnění buněk bez oddělení nosičů před převedením do dalšího bioreaktoru

Kultivace buněk se provádí stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 1, avšak po trypsinizaci se 80 % uvolněných buněk včetně nosičů převede do tří produkčních bioreaktorů. Dále se do všech bioreaktorů přidají vhodné nosiče.

Příklad 3

Uvolnění buněk bez oddělení od nosičů po převedení do dalšího bioreaktoru

Kultivace buněk se provádí stejným způsobem, jako je popsáno v příkladu 1, avšak 80 % stále zakotvených buněk se převede do bioreaktoru podobné velikosti, který se dále použije přímo pro přípravu produktu.

Zbývající buňky na mikronosičích v mateřském fermentéru se potom uvolní pomocí trypsinizace, potom se přidá další nosič a buňky se nechají repopulovat na substrátu.

Příklad 4

Výchozím materiálem jsou zmrazené zásobní buňky

Při tomto pokusu se část kultury použije pro opětovné dávkování mateřského fermentéru a některých dceřinných fermentérů a část kultury se použije pro zmrazení buněk do zásoby.

Zmrazené zásobní buňky (celkem $14,4 \times 10^8$ buněk) se naočkují do výchozí kultury v třílitrovém mateřském fermentéru obsahujícím 5 g Cytodexu na litr a médium EpiSerf a potom se inkubují při 37 °C. Zbývající ochranné látky při zmrazení se odstraní pomocí výměny média ve dni 1.

Ve dni 2 se provede trypsinizace, 50 % buněk se zmrazí do zásoby a zbývající buňky se inokulují na mikronosiče v dalším fermentéru.

Z tabulky 1 je možné vyvodit, že buňky mezi dny 2 a 3 pokračují v růstu normální rychlostí.

Ve dni 4 se obsah mateřského fermentéru uvolní trypsinem a vsadí se na nové mikronosiče (10 g/l) ve dvou dalších fermentérech za mateřským fermentérem.

Ve dni 5 je účinnost vysetí okolo 85 %.

Tabulka 1

den	3litrový mat. fermentér	3litrový fermentér	3litrový fermentér
	buněk x 100 000/ml	buněk x 100 000/ml	buněk x 100 000/ml
0	NOD		
1	6,6		
2	14		
3	15,5		
4	30		
5	5,5	10	10
účinnost pokrytí	85 %	85 %	85 %

Příklad 5

Převedení z malého mateřského fermentéru do velkého produkčního fermentéru

Buňky se expandují do velkého měřítka v 65litrovém a 550litrovém fermentéru (pracovní objem 50 litrů a 250 litrů) za použití hustoty mikronosiče 5 g Cytodexu na litr. Jak je zřejmé z tabulky 2, 90 % z celkového množství buněk se převede do velkého fermentéru z 50litrového kultivačního fermentéru s 800 000 buňkami/ml, ze kterých je 69 % životaschopných.

Totéž bylo pozorováno v 50litrovém mateřském fermentéru; asi 69 % rozmnožovacích buněk se ukazuje být životaschopných.

Postup je následující:

Ve dni 0 se nosiče nechají usadit v 50 litrech kultury, potom se supernatant (kultivační médium) odstraní a nahradí se PBS. Obsah fermentéru se 5 až 15 minut třepe. Supernatant se po usazení nosiče oddělí. Tento krok se může v případě potřeby zopakovat.

Potom se tento krok zopakuje s PBS/EDTA (0,4 gramu EDTA/litr PBS). Kultivační médium se znovu třepe 5 až 15 minut, nosiče se nechají usadit, supernatant se odstraní a opakuje se krok PBS/EDTA dokud se buňky nezaoblí a nejsou připraveny k uvolnění pomocí trypsinu.

Potom se k PBS/EDTA přidá trypsin (0,025 % konečné koncentrace) a inkubuje se 5 až 15 minut. Potom se buď buňky obsahující supernatant (po usazení nyní „nahého“ nosiče) převedou (jako v příkladu 9) nebo se převede směs buněk plus nosičů (celkem 80 % celkové směsi).

Po převedení buněk do 550litrového fermentéru se zbytek buněk (tedy 10 % životaschopných buněk) nechá repopulovat nosiče dosud přítomné ve fermentéru po opětovném naplnění 50litrového fermentéru kultivačním médiem.

Ukázalo se, že asi 70 % buněk je životaschopných.

Tabulka 2:

den	50 litrů kultury	250 litrů kultury
	buněk x 100 000/ml	buněk x 100 000/ml
0	8 (400 x 10 ⁸ buněk celkem)	1,1 (275 x 10 ⁸ životaschopných buněk)
1		0,8
2		2,9
3		3,4
4		8,9
5		18,0

Příklad 6

Zopakuje se postup popsany v příkladu 5, avšak 80 % kultury buněk vázaných k nosiči se převede z mateřského bioreaktoru do produkčního bioreaktoru. Produkce se zahájí po přidání viru.

20 % buněk a nosiče zbývající v mateřském bioreaktoru se trypsinizuje a uvolní a po přidání nového substrátu se mateřský bioreaktor nechá repopulovat, zatímco ve fyzicky odděleném produkčním bioreaktoru probíhá produkce.

Příklad 7

Kultivace ve velkém množství zahájena ze zásobních zmrazených buněk

Zmrazené zásobní buňky se roztají a naočkují se do 10litrového (pracovní objem) fermentéru (hustota nosiče Cytodex 5 g/l; kultivační médium Epi Serf) při očkovací hustotě 1x10⁶ buněk/ml. Po připojení se kultivační médium nahradí, aby se odstranila přebytečná činidla ochraňující při zmrazení.

Po dni 1 je množství životaschopných buněk vázaných k nosičům 0,45x10⁶ buněk/ml, které potom začínají růst. Při hustotě 2,8x10⁶ buněk/ml se buňky uvolní z nosičů pomocí trypsinizace a

21.08.00

80 % se převede do fermentéru o pracovním objemu 50 litrů (nosiče 5 g/l).

Jak je možné vyvodit z tabulky 3 je ve dni 1 množství životaschopných buněk po zmrazení zásobních buněk asi 45 %.

Z celkového množství převedených buněk je životaschopnost po uvolnění trypsinem 71,4 %.

Tabulka 3

Den	hustota buněk ($\times 10^6/l$) v:	
	10litrovém fermentéru	50litrovém fermentéru
0	1,0	
1/2	0,45	
3/4	1,3	
5	2,6	
6	2,8 (280 $\times 10^8$ celkem)	
6	0,6 (60 $\times 10^8$ celkem)	0,28 (140 $\times 10^8$ celkem)
7		0,4 (200 $\times 10^8$ celkem)

25.07.00

PV 207-2343

13160

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy buněk pro použití při výrobě biologických materiálů pomocí kultivace buněk až do požadovaného objemu buněk předprodukční dávky, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se při opakovaném diskontinuálním procesu:
 - část buněk předprodukční dávky použije pro přípravu nejméně jedné produkční dávky a
 - zbývající část buněk předprodukční dávky se použije jako očko pro přípravu nejméně jedné další předprodukční dávky.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se při opakovaném diskontinuálním procesu:
 - a) část buněk předprodukční dávky převede pro použití při přípravě nejméně jedné produkční dávky a
 - b) zbývající část buněk předprodukční dávky se převede pro použití jako očko pro přípravu nejméně jedné další předprodukční dávky.
3. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se první předprodukční dávka připraví z pracovního zásobníku buněk pomocí nejméně jednoho pasážovacího kroku.
4. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou buňky závislé na zakotvení.
5. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jsou buňky závislé na zakotvení, buňky se pěstují na substrátu a před každým krokem převedení se buňky uvolní ze substrátu.

21.05.00

~~45633~~

6. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 5, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že příslušným biologickým materiálem
je virus.