

Beispiel einer Strategie für die Adaption von Zellen an serumfreies Medium



Interne Publikation für Kundenzwecke 2004

Einleitung

Viele etablierte Produktionsverfahren benötigen serumhaltige Medien zur Produktion rekombinanter Proteine. Obwohl serumhaltige Medien in der Regel auf die Zellen gute Wachstums- und Produktivitätseigenschaften ausüben, kann sich ein Wechsel aus verschiedenen Gründen auf serumfreie Medien (SF-Medien) bezahlt machen. Vor allem zukünftige Produktionsverfahren, welche mit Serumzusätze gefahren werden, werden immer höheren gesetzlichen Anforderungen entsprechen müssen. Aber auch in der Forschung ist die serumfreie Kultivierung von Zellen für Experimente sinnvoll, weil das Serum einen unbekanntem Einfluss auf die Testergebnisse haben könnte.

Ziel der SF-Adaption

Vor Beginn der Arbeiten wird mit dem Kunden das Ziel der Adaption definiert. Dabei wird festgehalten, welche Parameter wie zum Beispiel Wachstum und Produktivität bei der Adaption der Zellen an das serumfreie Medium Priorität haben. In der Regel wird eine Kombination zwischen gutem Zellwachstum und einer gleich hohen Produktivität wie zu Beginn der Adaption angestrebt.

Gründe für die Umstellung auf SF-Medien

- ✓ Erleichterte Downstream-Prozesse (einfachere Reinigung und Isolierung von Zellprodukten)
- ✓ Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Prozesse
- ✓ Definierte und kontrollierte Wachstumsbedingungen
- ✓ Seren können Krankheitserreger (z.B. BSE, MKS) und Inhibitoren (z.B. Bakterientoxine, Lipide) enthalten
- ✓ Serumhaltige Medien verteuern die Prozesskosten
- ✓ Erleichterte Markteinführung dank gesetzlicher Bevorzugung
- ✓ Die Herstellung von Serum widerspricht im allgemeinen den ethischen Grundgedanken. Der Verzicht auf Produkte aus Zellkulturen mit serumhaltigen Medien kann daher als Marketingvorteil genutzt werden.

Serumfreie Kryokonservierung

Nach einer erfolgreichen Adaption an das serumfreie Medium drängt sich die Frage auf, ob bei dem Einfriermedium für die Langzeitkonservierung ebenfalls auf den Serumzusatz verzichtet werden kann. Anstelle von Serum können verschiedene Chemikalien für den Gefrierschutz der Zellen eingesetzt werden.

Auf Kundenwunsch werden die Schutzwirkungen einzelner Chemikalien in den Einfriermedien mit den SF-Zellen überprüft und die optimale Zusammensetzung des neuen Einfriermediums bestimmt.

Als Gefrierschutz können neben Dimethylsulfoxid noch Methylcellulose, pflanzliche Hydrolysate und andere chemische Stoffe eingesetzt werden.

Klonierung

Nach der Adaption liegen in der Zellsuspension Zellen mit unterschiedlichen Produktionsraten vor. Um die Zellen mit den höchsten Produktivitäten zu finden, kann eine Klonierung durchgeführt werden. Aus diesen Klonen können Working- oder Master Cell Banken erstellt werden.

Ausgangslage

Der Kunde übergibt im Normalfall die Zellen in einer T-Flasche oder in einem Kryoröhrchen und davon wird so schnell wie möglich ein Back-up mit serumhaltigem Medium erstellt. Die Zellen wachsen in der Regel adhären als Monolayerkultur in einem Medium mit 5-10% Serum und werden 2-3mal wöchentlich in eine neue T-Flasche passagiert. Dabei wird mit ca. $2 \cdot 10^4$ Zellen/cm² inokuliert und nach 3-4 Tagen Kultivierung ist die Wachstumsoberfläche zu 100% konfluent bewachsen. Bei 100% Konfluenz liegt die Zelldichte bei ca. $2 \cdot 10^5$ Zellen/cm².

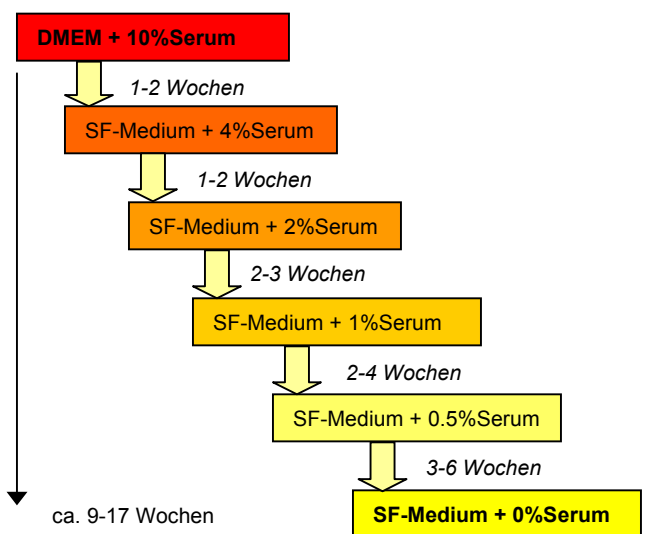
Adaptionsprozess

Nachdem mit den ursprünglichen Zellen ein Back-up angelegt wurde und die Zellen im serumhaltigen Originalmedium ein gutes Wachstum aufweisen, wird mit der Adaption begonnen.

Die Zellen werden direkt nach einer Passage in das neue serumfreie Medium mit einem kleinen Serumzusatz von 4% transferiert und solange kultiviert, bis sich die Zellen an die Umstellung gewöhnt haben. Durchschnittlich müssen die Zellen 2-3mal im neuen Medium passagiert werden, damit die ursprüngliche Wachstumsgeschwindigkeit und Produktivität wieder erreicht wird. Bei den Passagen wird üblicherweise die Hälfte der Zellmenge in die neue T-Flasche überführt. Die Zelldichten liegen beim Inokulieren bei ca. $4 \cdot 10^5$ Zellen/mL und gegen Inkubationsende nach 4-5 Tagen bei ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL.

Nach dieser ersten Angewöhnung werden die Zellen nach und nach in die serumfreien Medien mit immer kleiner werdenden Serumzusätzen transferiert, sobald sich die Zellen an das aktuelle Medium angepasst haben. Je tiefer die Serumkonzentration liegt, desto mehr Zellen lösen sich von der Wachstumsoberfläche ab und gehen in Suspension. Nach der Adaption liegen die Zellen meistens als Suspensionskultur im serumfreien Medium vor. Die benötigte Anpassungszeit der Zellen in den einzelnen Medien variiert von Zelllinie zu Zelllinie sehr stark.

Zeitlicher Verlauf einer Adaption



Alle Angaben ohne Gewähr