

## Einführung in USP - Seed Train Entwicklung

### Ihre Ziele:

Am Ende der Lektion sollten Sie in der Lage sein, die Schritte der Seed-Train-Entwicklung in eine Reihenfolge zu bringen

Ein **Seed Train** dient dazu, eine ausreichende Anzahl von Zellen für die Inokulation eines Produktionsbioreaktors zu erzeugen. Aus den Volumina, die entweder für das Auftauen der Zellen oder für die Aufrechterhaltung der Zelllinie verwendet werden, muss die Zellzahl erhöht werden, was sowohl zeit- als auch kostenintensiv ist.

Ein typischer Zellkulturprozess beginnt mit dem Auftauen eines kryokonservierten Zellbankfläschchens, gefolgt von sukzessiven Expansionen in größere Kulturgefäße wie Schüttelkolben, Spinner, Wave-Bags und gerührte Bioreaktoren.

Dieser Ansatz birgt einige Herausforderungen: Schüttelkolben oder Spinner, die in den ersten Phasen verwendet werden, erfordern manuelle Manipulationen in einer Laminar-Flow-Haube, was sie anfällig für Kontaminationen und Bedienerfehler macht. Da ein herkömmliches kryokonserviertes Zellbank-Fläschchen typischerweise eine geringe Zellzahl enthält, ist der Seed-Train-Prozess zudem zeitaufwändig. Er dauert länger und wird bei viel größeren Produktionsbioreaktoren noch komplexer, da zusätzliche großvolumige Kulturgefäße benötigt werden, um das Scale-up zu einem Produktionsbioreaktor zu unterstützen. Schließlich bedeuten Produktionsbioreaktoren, die üblicherweise mit einer Dichte von  $<0,5 \times 10^6$  lebensfähigen Zellen/mL beimpft werden, auch eine notwendige Wachstumsphase von 5 bis 10 Tagen, die grundsätzlich ungünstig ist, da während dieser Zeit die Zellkonzentrationen eher niedrig sind (ebenso wie die anfängliche Produktausbeute).

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Verwendung von High-Density (HD)-Zellbänken die Anzahl der erforderlichen Seed-Train-Schritte reduzieren und gleichzeitig den operativen Erfolg in Seed-Train-Prozessen verbessern kann, nämlich die Verwendung von HD-Zellbänken mit 450 Millionen lebensfähigen Zellen/vial zur direkten Inokulation eines 20-L-Wave-Bags. Eine spezielle Studie ergab, dass durch den Einsatz von HD-Zellbanken mehrere Zwischenschritte der Schüttelkolbenexpansion entfallen, wodurch sich die Prozesszeiten um bis zu neun (9) Tage verkürzen.

Eine andere Studie kombinierte HD-Zellbänke mit einem Single-Seed-Bioreaktor, der mit mehreren Arbeitsvolumina betrieben werden kann, wodurch sich die Expansionsdauer von Seed-Trains um bis zu 60 bis 70 Prozent reduzierte.

Die **Single-Use-Technologie** bietet zahlreiche Vorteile gegenüber Systemen aus Edelstahl, wie z. B. eine höhere Flexibilität der Anlage, Zeitersparnis beim Einrichten, Reinigen und Sterilisieren und nicht zuletzt eine Reduzierung der Investitionskosten. Einweg-Wave-Bioreaktoren werden daher routinemäßig in Seed-Train-Expansionsprozessen eingesetzt, da sie auch das Kontaminationsrisiko verringern (in der Regel sind keine Manipulationen in Laminar-Flow-Hauben erforderlich). Da solche Bioreaktoren Einwegprodukte sind, werden keine zusätzlichen umständlichen und kostspieligen Ressourcen für die Montage, Reinigung oder Sterilisation benötigt.

**Perfusions-Zellkulturverfahren** sind in dieser Branche immer gefragter, da Perfusions-Bioreaktoren bei der Herstellung von brauchbaren kommerziellen Therapeutika erfolgreich waren. Perfusionsprozesse können hohe Zelldichten in relativ kleinen Bioreaktorvolumina erreichen und entfernen instabile Produkte schneller aus den Kulturen als die konventionelleren Batch- und Fed-Batch-Prozesse. Aufgrund der oben genannten Vorteile (und anderer) hat sich die Perfusion gegenüber der Seed-Expansion zur bevorzugten Produktionsmethode entwickelt.



Die Abbildung vergleicht einen neuartigen Seed-Train-Prozess mit HD-Zellbanking, Einweg-Wave-Bioreaktoren und Refine Technology's Alternating Tangential Flow (ATF) Perfusions-Zellkulturtechnologien mit einem konventionellen Prozess. Ein Beispiel für diesen Prozess für

einen 500-L-Produktions-Perfusionsbioreaktor mit einem konventionellen Seed-Train-Prozess.

Bei der Verwendung des HD-Zellbank-Ansatzes werden zwei Spinner-Zwischenschritte eliminiert, indem eine direkte Inokulation in einen 2-L-Wave-Bioreaktor ermöglicht wird. Das Ersetzen von Spinnern (125 mL bis 10 L) durch Wave-Bioreaktoren (2 L und 20 L) bedeutet eine signifikante Reduzierung der Anzahl der erforderlichen Manipulationen in einer **Laminar-Flow-Kabine (Gewebekulturhaube)\*** und verbessert den operativen Erfolg, da der Betrieb unter einem "geschlossenen" System möglich ist. Zusätzlich ermöglicht der Einsatz der ATF-Perfusionstechnologie in der n - 1 Stufe (50-L-Bioreaktor mit ATF-Perfusionsgerät) Zelldichten von  $\geq 50 \times 10^6$  lebensfähigen Zellen/mL, was eine Beimpfungsdichte von  $5 \times 10^6$  lebensfähigen Zellen/mL im 500-L-Produktionsbioreaktor ermöglicht, anstatt  $0,5 \times 10^6$  lebensfähigen Zellen/mL im konventionellen Zellkulturprozess. Die höhere Beimpfungsdichte trägt dazu bei, die Wachstumsphase des 500-L-Produktionsbioreaktors um etwa fünf Tage zu verkürzen, was bei einem 500-L-Bioreaktor mit einer Betriebsdauer von 50 Tagen eine Zeitersparnis für die Produktionsanlage bedeutet.

\*Ein **Laminar-Flow-Kabinett** oder eine **Gewebekulturhaube** ist eine sorgfältig abgeschlossene Bank, die dazu dient, die Kontamination von Halbleiterwafern, biologischen Proben oder anderen partikelempfindlichen Materialien zu verhindern.

### Der Bioreaktoren-Zug

Die Bioreaktoren von Biogen sind in Zügen organisiert, von denen jeder größer als der nächste ist. Ein Bioreaktor-Zug besteht aus verschiedenen Volumina:

- 60 Liter
- 100 Liter
- 235 Liter
- 750 Liter
- 950 Liter
- 2000 Liter
- 3750 Liter
- 15000 Liter
- 18500 Liter

Jeder Bioreaktor speist in den nächsten ein. Der Zug ist eine Fortsetzung des Scale-up-Prozesses, der mit der Inokulumaufbereitung beginnt und in der Regel mit dem Ernteprozess im größten Bioreaktor endet.

