

IMPRESSUM

Herausgeber



DECHEMA

Gesellschaft für Chemische Technik
und Biotechnologie e.V.

Theodor-Heuss-Allee 25
60486 Frankfurt am Main

Tel.:

069 7564-0

Fax:

069 7564-201

E-Mail:

info@dechema.de

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung, Verbreitung und öffentlichen Wiedergabe in jeder Form, einschließlich einer Verwertung in elektronischen Medien, der reprografischen Vervielfältigung und einer digitalen Verbreitung, ausdrücklich vorbehalten.

Verantwortlich für den Inhalt

Prof. Dr. Kurt Wagemann

Dr. Kathrin Rübberdt

Layout

Peter Mück, PM-GrafikDesign, Wächtersbach

Druck

Seltersdruck, Selters/Ts.

1. Auflage, Januar 2014

ISBN: 978-3-89746-148-2

Empfehlung für Leachable-Studien

Standardisierter Zellkulturtest zur frühen Identifizierung kritischer Filme für CHO-Zelllinien und chemisch definierte Kulturmedien

Regine Eibl¹, Nina Steiger¹, Christina Fritz², Detlef Eisenkrätzer², Joachim Bär³,
Dethardt Müller⁴, Dieter Eibl¹

¹ *Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW)*, ² *Roche Diagnostics GmbH*,
³ *Boehringer Ingelheim Biopharmaceuticals GmbH*, ⁴ *Rentschler Biotechnologie GmbH*

EINFÜHRUNG

Die Single-Use-Technologie ist heute in biopharmazeutischen Entwicklungs- und Produktionsprozessen nicht mehr wegzudenken. So gelten Single-Use-Filter, Single-Use-Lagerbags und -Kultivierungsbags für wellendurchmischte und gerührte Bioreaktoren im Seedtrain als gut etabliert. Auch klein- und mittelvolumige Protein-basierte High-Value-Produkte wie therapeutische Antikörper werden mittlerweile immer häufiger in gerührten Single-Use-Bioreaktoren hergestellt (1). Zu diesem Trend haben neben den Vorteilen der Single-Use-Technologie (2-3) die in den vergangenen 10 Jahren stark gestiegenen Titer der mehrheitlich in chemisch definierten Medien kultivierten CHO-Zelllinien (3-4) wesentlich beigetragen.

Nichtsdestotrotz zeigen die verfügbaren Single-Use-Systeme immer noch Limitationen. Einer der meist zitierten Nachteile ist die mögliche Freisetzung von Leachables/Extractables aus dem in der Regel gammasterilisierten Kunststoffbag. Dieser ist aus Multilayerfilmen aufgebaut, die einen Polyethylen- oder Ethylenvinylacetatkontaktlayer haben (5-6). Leachables/Extractables stellen chemische Substanzen dar, die von der Filmzusammensetzung und dem komplexen Bagherstellungsprozess herrühren und infolge des Kontakts mit dem Prozessfluid (Kulturmedium oder Kulturbrühe mit Zellen) in das selbige migrieren können. Unter Prozessbedingungen sind vor allem cytotoxische Leachables unerwünscht, da diese das Wachstum der Produktionszellen, ihre Vitalität und folglich auch die Produktexpression (Titer und Qualität) nachteilig beeinflussen (7). So beschrieben Hammond et al. in einem im März 2013 veröffentlichten Paper (8), dass der Einsatz von Trisarylphosphit (Handelsname Irgafos 168) als antioxidatives Additiv bei der Herstellung von Polyethylenbags und ihrer anschließenden Gammabestrahlung zur Bildung von bDTBPP {bis(2,4-Di-Tert-Butylphenyl)Phosphat} führt, was bereits in geringen Konzentrationen (0,1 mg L⁻¹) das mitochondriale Membranpotential von CHO-Zelllinien herabsetzt und ihr Wachstum inhibiert. Ebenso wie Wood et al. (7) und Horvath et al. (9) plädieren sie für ein Screening-Verfahren mit Säugerzellkulturen zusätzlich zu den etablierten Extractablestudien. Über ein solches Screening sollen kritische Filme früh identifiziert, die Qualitätskontrolle von Single-Use-Bags verbessert und ihre Implementierung vereinfacht werden.

EMPFEHLUNG FÜR LEACHABLE-STUDIEN

Aktuell führen die Anwender von Single-Use-Bags solche Zellkulturtests mit ihren eigenen Zelllinien, Kulturmedien und Vorschriften durch, weshalb sich die Resultate mit den untersuchten Filmen schwer vergleichen und für Empfehlungen nutzen lassen. Es fehlt ein standardisierter Zellkulturtest, der auf einer oder mehreren kommerziellen, sensitiven Zelllinien und chemisch definierten Kulturmedien basiert und der Mehrheit der Anforderungen der Endnutzer genügt. Seine Verfügbarkeit wird sowohl die herstellerseitigen Qualifizierungsarbeiten (z.B. im Rahmen der Entwicklung neuer Filme für Bags) als auch die der Endnutzer (z.B. bei Entscheidungen zur Implementierung von Bags) unterstützen. Mit diesem Hintergrund und dem Ziel der Entwicklung eines standardisierten Zellkulturtests zur frühen Identifizierung kritischer Filme für CHO-Zelllinien und chemisch definierter Kulturmedien führte eine Arbeitsgruppe des Temporären Arbeitskreises „Single-Use-Technologie in der biopharmazeutischen Produktion“ der DECHEMA zwei Ringversuche durch.

RINGVERSUCH 1

In dem ersten Ringversuch, in welchem neun Filme von sieben Baglieferanten durch fünf Anwender mit sechs rekombinanten CHO-Zelllinien und sechs chemisch definierten Kulturmedien untersucht wurden, führte jeder Anwender seinen eigenen Zellkulturtest mit Schüttelkolben durch. Hier wurde das jeweilige Kulturmedium mit zuvor durch die Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW) inkubiertem WFI (Water for Injection) hergestellt. Wie in (10) detailliert beschrieben wurde, wurde parallel zur Wasserextraktion in den Bags (50% Befüllung, 37°C, 7 Tage, statisch, lichtgeschützt) WFI in Schottflaschen inkubiert und als Referenzkontrolle eingesetzt.

Die finale Auswertung des Ringversuches 1 erfolgte auf der Grundlage eines Fragebogens, der durch die Anwender ausgefüllt wurde und in welchem die Referenzkontrolldaten auf 100% normiert wurden. Beurteilt wurden die maximale Zelldichte, der pH-Wert, die Zellgröße, die Glukose-, Glutamin-, Laktat- und Ammoniumkonzentration in Abhängigkeit der Kultivierungszeit. Sieben der neun Filme lieferten bei allen Anwendern und allen Zelllinien in allen Beurteilungskriterien in Bezug auf die Referenz identische Daten. Hingegen wurde für zwei Filme ein von der Referenzkontrolle abweichendes Verhalten für eine oder sogar mehrere Zelllinien in mindestens zwei Beurteilungskriterien festgestellt. Für diese beiden Filme können unter den realisierten Versuchsbedingungen migrierte Leachables vermutet werden.

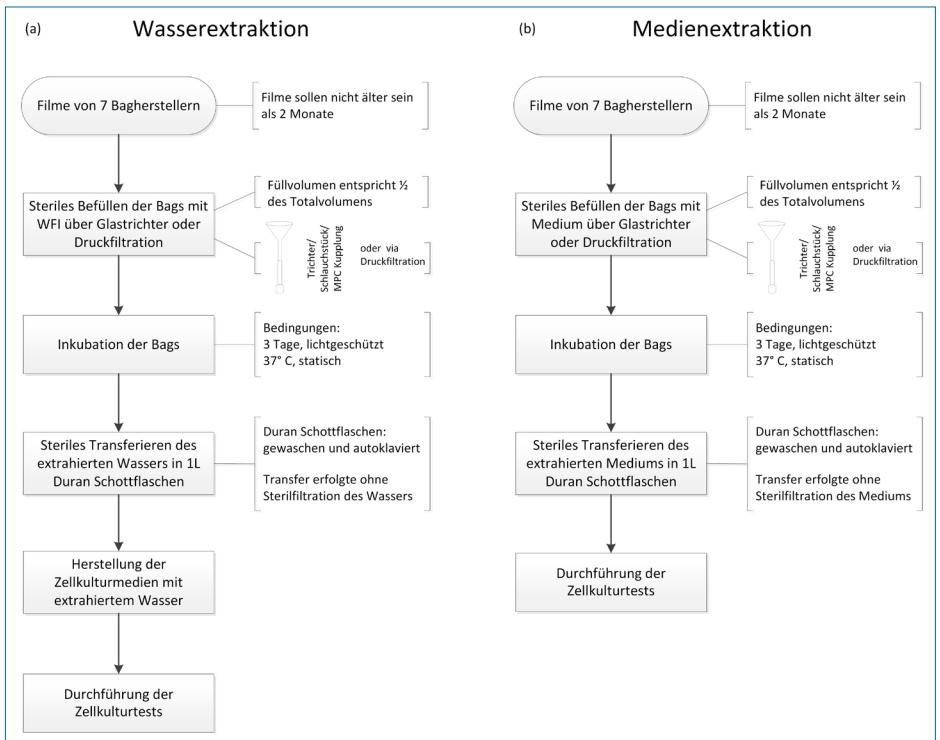
RINGVERSUCH 2

Der Ringversuch 2 wurde mit elf (z.T. anderen) Filmen von sieben Baglieferanten durch vier Anwender, die mit acht CHO-Zelllinien und sieben chemisch definierten Kulturmedien arbeiteten, durchgeführt. Bei einem der untersuchten Filme handelte es sich um eine Negativkontrolle, die durch einen Baglieferanten für diesen Ringversuch zur Verfügung gestellt worden war. Eine der verwendeten CHO-Zelllinien war eine leere, kommerziell erhältliche Zelllinie (CHO-easyC von Cell Culture Technologies, Schweiz). Die anderen Zelllinien waren rekombinant, wobei die ZHAW neben der leeren Zelllinie eine Modellzelllinie (CHO XM 111-10) verwendete, die SEAP (sekretierte alkalische Phosphatase der Plazenta) sekretiert. Diese Zelllinie wurde in den 90er Jahren durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Fussenegger (Eidgenössische

Technische Hochschule Zürich) etabliert (11) und kann über die Culture Collection Switzerland (CCOS 837) bezogen werden.

Anstelle des extrahierten WFI in Glasflaschen wurden im Ringversuch 2 durch die ZHAW die Filme zusammen mit den Auswertebögen direkt an die Tester versendet. Letztere führten ihre Zellkulturtests mit im Bag extrahiertem Zellkulturmedium und punktuell (drei Tester mit vier Zelllinien) mit extrahiertem WFI durch. Parallel zur Wasser- bzw. Medienextraktion im Bag wurde über drei Tage WFI bzw. Medium in Glasflaschen als Referenzkontrolle inkubiert. Um die Vergleichbarkeit der Resultate und die Aussagefähigkeit des Ringversuchs, dessen Ablauf in der **Abbildung 1** dargestellt ist, weiter zu verbessern, wurden zusätzliche Randbedingungen festgelegt.

Abbildung 1: Fließdiagramm zum Ablauf des Ringversuches 2 – (a) WFI-Extraktion, (b) Medienextraktion



EMPFEHLUNG FÜR LEACHABLE-STUDIEN

Es wurden ausschließlich Filme verwendet, deren Lagerzeit nach der Gammabestrahlung im Maximum zwei Monate betrug (das war im Ringversuch 1 bei zwei Filmen nicht der Fall). Darüber hinaus erfolgte die Sterilfiltration des Kulturmediums durch alle Tester mit dem PVDF-Membranfilter Gamma Compatible Millipak-20 Filter Unit 0,22 µm ¼ in. HB/HB w/bell sterile von Merck Millipore. Für die Auswertung des Ringversuches 2 wurden außerdem die nachfolgend aufgeführten Kriterien angesetzt:

- » keine oder vernachlässigbare Abweichung (k), wenn eine der getesteten Zelllinien bei keinem oder einem Kriterium eine negative Abweichung > 10% zur Kontrolle zeigt

Tabelle 1: Resultate der Zellkulturversuche mit verschiedenen Zelllinien-Medien-Kombinationen.
(a) Ergebnisse der Zellkulturversuche mit extrahiertem Medium und (b) mit extrahiertem WFI.
(a) Extrahiertes Medium

Film	Max. Zelldichte									Vitalität									Zelldurchmesser							
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V1	V2	V3	V4				
1	46%	+	20%	16%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	64%	31%	25%	21%	12%	25%	38%	+	61%	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	57%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	52%	21%	+	12%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	39%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	33%	+	25%	17%	+	+	+	+	38%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
8 (NK)	68%	42%	22%	26%	50%	55%	95%	12%	80%	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	50%	33%	21%	19%	+	+	+	+	57%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11	73%	+	23%	17%	13%	+	+	+	47%	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(b) Extrahiertes WFI

Film	Max. Zelldichte				Vitalität				Zelldurchmesser				Metabolismus				pH									
	V3	V4	V5	V7	V3	V4	V5	V7	V3	V4	V5	V7	V3	V4	V5	V7	V3	V4	V5	V7						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
2	31%	+	12%	81%	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	s
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
4	+	+	12%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
5	21%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
7	+	+	+	43%	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	s
8 (NK)	41%	+	55%	89%	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	s
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
10	33%	+	16%	75%	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	s
11	+	+	12%	31%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	m

- » mäßige Abweichung (m), wenn eine der getesteten Zelllinien bei zwei bis drei Kriterien oder mehrere der getesteten Zelllinien bei einem bis drei Kriterien negative Abweichungen von > 10% zur Kontrolle zeigen
- » starke Abweichungen zur Kontrolle (s), wenn eine oder mehrere der getesteten Zelllinien bei vier bis fünf Kriterien eine Abweichung > 10% zur Kontrolle zeigen.

Eine Übersicht der Resultate aus den Zellkulturtests ist in den **Tabellen 1a** (extrahiertes Medium) und **1b** (extrahiertes WFI) zusammengestellt. Aus **Tabelle 2** ist ersichtlich, welche Zelllinien in den einzelnen Versuchsansätzen eingesetzt wurden.

Zelldurchmesser					Metabolismus									pH									
V5	V6	V7	V8	V9	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	
+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	m
+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	s
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	m
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	s
+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	s
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	k
+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	s
+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	s

Tabelle 2: Übersicht über die in den einzelnen Versuchsansätzen eingesetzten Zelltypen

Versuch	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9
Zelltyp	CHO DG44	CHO DG44	CHO K1	CHO K1	CHO K1	CHO K1	CHO K1	CHO DG44	CHO K1

(+) keine Abweichungen / (%) prozentuale Abweichungen zur Kontrolle / (-) Abweichungen aufgetreten

(k) Keine oder vernachlässigbare Abweichung, (m) mäßige Abweichung, (s) starke Abweichung

NK Negativkontrolle

EMPFEHLUNG FÜR LEACHABLE-STUDIEN

Die Abweichungen zwischen den Resultaten mit extrahiertem Medium bzw. mit aus extrahiertem WFI hergestelltem Medium sind nicht erstaunlich. Ein Grund dafür könnte sein, dass neben Leachables auch Interaktionen von Medienbestandteilen wie z.B. Cholesterol und Fettsäuren (Linolsäure, Ölsäure) mit den hydrophoben Filmen (Kontaktlayer) eine Rolle spielen und zu einem limitierten Zellwachstum führen. Dieses Phänomen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für serumfreie, proteinfreie und chemisch definierte Kulturmedien gezeigt, in denen Serumalbumine als Proteincarriermoleküle fehlen (12-13).

Die Datenanalyse des zweiten Ringversuchs zeigte, dass vier der elf getesteten Filme keine bzw. vernachlässigbare Abweichungen von den Resultaten der Referenzkontrolle nach erfolgter Mediumextraktion aufwiesen. Für die Filme 3, 4, 6 und 9 können (unter der Annahme, dass Abweichungen von der maximalen Lebendzellichte von $\leq 10\%$ mit + bewertet werden und dass der Tester im Versuchsansatz V1 die erzielten maximalen Lebendzellichten trotz Abweichungen über 10% als akzeptabel einschätzt) sowohl migrierte Leachables als auch Interaktionen von Medienbestandteilen mit dem Film für die getesteten Zelllinien-Medien-Kombinationen ausgeschlossen werden. Die Resultate der Versuche, die auf der Wasserextraktion basieren, lassen auf Grund der höheren Korrosivität des WFI den Schluss zu, dass auch die Filme 1 und 5 keine bzw. vernachlässigbare Verunreinigungen durch Leachables für die untersuchten Zelllinien-Medien-Kombinationen verursachen. Vielmehr sind hier Interaktionen mit dem Film und Medienbestandteilen als Ursache für die mäßigen Abweichungen in den Resultaten mit extrahiertem Medium wahrscheinlicher.

Der Film 8 wurde durch alle Zelllinien-Medienkombinationen in den Zellkulturtests mit extrahiertem Medium als die Negativkontrolle (NK) identifiziert, wohingegen mit extrahiertem WFI-Medium nur drei der verwendeten Zelllinien (Versuche V3, V5 und V7) die Negativkontrolle anzeigten. Mit der Zelllinien-Medien-Kombination aus dem Versuch V4 waren die Abweichungen zur Referenzkontrolle im extrahierten WFI-Medium unterhalb 10%. In diesem Versuchsansatz wurde die Zelllinie CHO-easyC eingesetzt, die, wie sich zeigte, nicht sensitiv genug ist. Dagegen wurden mit den Zelllinien-Medien-Kombinationen in den Versuchen V3, V5 und V7 für das WFI-Medium ebenfalls starke Abweichungen für die Filme 2 und 10 bestimmt. Der Film 11, der mit der Zelllinie im Versuch V3 eine negative Abweichung des maximalen Zellwachstums von 9,7% im WFI-Medium hatte und deshalb noch mit Plus deklariert wurde, wich mit den Zelllinien aus den Versuchen V5 und V7 zwischen 12 und 31% leicht bis mäßig vom Zellwachstum, sonst aber in keinem weiteren Kriterium, ab. Eindeutiger sind die Resultate der Tests für extrahiertes WFI und die Zelllinien-Medien-Kombination aus V7 und dem Film 7 (**Tabelle 1b**).

SCHLUSSFOLGERUNG

Unter Berücksichtigung der Resultate aus den Medien- und WFI-Extraktionen wurden mit den Zelllinien-Medien-Kombinationen aus den Versuchen V3, V5 und V7 drei Filme (2, 8, 10) ermittelt, aus denen Substanzen aus den Filmen herausgelöst werden, die für die Zellen eine inhibierende Wirkung haben. Damit bieten sich diese 3 Testsysteme zur Identifizierung von Leachables mit einem auf CHO-Zellen basierenden Zellkulturtest an. Während es sich bei den Testsystemen in den Versuchen V5 und V7 um solche der Industrie handelt, war es im Versuch V3 die transfizierte Modellzelllinie CHO XM 111-10.

Das in dem Versuchsansatz V3 verwendete Minimalmedium besteht aus ca. 50 Komponenten und basiert auf dem ursprünglichen FMX-8 Basalmedium, dessen Zusammensetzung 1993 veröffentlicht wurde (14, 15). Es enthält Linolsäure (12), deren Interaktion mit Film 1 die mögliche Erklärung für die 20% tiefere maximale Zellzahl in den Experimenten mit extrahiertem Medium ist.

Die Autoren empfehlen das CHO XM 111-10/ChoMaster® HP-1/System und die in der Anlage 1 enthaltene Vorgehensweise zur frühen Identifizierung kritischer Filme für CHO-Zellen, die in serum- sowie protein-freien oder chemisch definierten Kulturmedien kultiviert werden.

DANKSAGUNG

Wir danken allen beteiligten Firmen für die Bereitstellung der Testfilme. Frau Angelika Geiselhart und Herrn Dr. Ferruccio Messi möchten wir für die Unterstützung bei der technischen Umsetzung und Auswertung der Versuchsergebnisse Dank sagen.

EMPFEHLUNG FÜR LEACHABLE-STUDIEN

LITERATUR

- (1) Eibl D, Eibl R, Eisenkrätzer D, Tiemann K (2013) TAK „Single-Use-Technologien in der biopharmazeutischen Produktion“. *Biospektrum*: 454-455.
- (2) Gottschalk U, Brorson K, Shukla AA (2013) Innovation in biomanufacturing: the only way forward. *Pharm Bioprocess* 1(2):141-157.
- (3) Levine HL, Lilja JE, Stock R, Hummel H, Jonas SD (2012) Efficient, flexible facilities. *BioProcess Int* 10(11) Suppl:20-30.
- (4) Ho SCL, Tong YW, Yang Y (2013) Generation of monoclonal antibody-producing mammalian cell lines. *Pharm Bioprocess* 1(1):71-87.
- (5) BioPlan Associates (2013) 10th Annual Report and Survey of Biopharmaceutical Manufacturing Capacity and Production.
- (6) Barbaroux M, Gerighausen S, Hackel H (2013) An approach to quality and security of supply for single-use bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. DOI: 10.1007/10_2013_198.
- (7) Wood J, Mahajan E, Shiratori M (2013) Strategy for selecting disposable bags for cell culture media applications based on a root-cause investigation. *Biotechnol Prog*. DOI: 10.1002/btpr.1802.
- (8) Hammond M, Nunn H, Rogers G (2013) Identification of a leachable compound detrimental to cell growth in single-use bioprocess containers. *PDA J Pharm Sci and Tech* 67 :123-134.
- (9) Horvath B, Tsang VL, Lin W, Dai XP, Kunas K, Frank G (2013) A generic test method for improving quality control of disposables in industrial cell culture. *BioPharm Int* 23(6):34-41.
- (10) Steiger N, Eibl R (2013) Interlaboratory test for detection of cytotoxic leachables arising from single-use bags. *Chemie Ingenieur Technik* 85 (1-2):26-28.
- (11) Mazur X, Eppenberger HM, Bailey JE, Fussenegger M (1999) A novel autoregulated proliferation-controlled production process using recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 65(2):144-150.
- (12) Altaras G M, Eklund C, Ranucci C, Maheshwari G (2006) Quantitation of interaction of lipids with polymer surfaces in cell culture. *Biotechnol Bioeng* 96 (5):999-10007.
- (13) Kadarusman J, Bhatia R, Mc Laughlin J, Lin WR (2005) Growing cholesterol-dependent NSo myeloma cell line in the Wave Bioreactor System : Overcoming cholesterol-polymer interaction by using pretreated polymer or inert fluorinated ethylene propylene. *Biotechnol Prog* 21(4):1341-1346.
- (14) Messi F (1993) Serum- und proteinfrei wachsende Zellen. EP o 653 487 A1.
- (15) Zang M, Trautmann H, Gandor C, Messi F, Asselbergs F, Leist C, Fiechter A, Reiser J (1995) Production of recombinant proteins in Chinese Hamster Ovary cells using a protein-free cell culture medium. *Biotechnol* 13:389-392.

ANLAGE

Titel	Arbeitsanweisung zur Durchführung eines standardisierten Zellkulturtests zur Identifizierung kritischer Bagfilme für CHO-Zelllinien
Zweck	Die vorliegende Arbeitsanweisung beschreibt die Durchführung eines Zellkulturtests zur Identifizierung kritischer Filme mit CHO XM 111-10 Zellen und chemisch definiertem Minimalmedium. Dieser Zellkulturtest ist zusätzlich zu Extractablestudien zu realisieren.
Geltungsbereich	Zellkulturlaboratorien
Status	–
Mitgeltende Unterlagen	Arbeitsanweisung des Medienherstellers Cell Culture Technologies, Schweiz, für ChoMaster® HP-1 Medium und FMX-8 Medium.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Definitionen und Abkürzungen	13
2	Material	13
3	Durchführung	14
3.1	Extraktion mit Zellkulturmedium	14
3.1.1	Anforderungen an den zu testenden Bag (Film)	14
3.1.2	Befüllen des Bags	14
3.1.3	Extraktion	14
3.2	Extraktion mit WFI	16
3.2.1	Anforderungen an den zu testenden Bag (Film)	16
3.2.2	Befüllen des Bags	16
3.2.3	Extraktion	16
3.3	Zellkulturtest	17
3.3.1	Herstellung des Inokulums	17
3.3.2	Durchführung des Zellkulturtests	17
4	Mitgeltende Unterlagen	20
5	Änderungshinweise	20
6	Anhang	20

1 DEFINITIONEN UND ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
disp.	disposable
T-75	T-Flasche 75 cm ²
WFI	Water for Injection

2 MATERIAL

Tabelle 1: Material

Name	Hersteller
Bioprofile 100 plus Analyzer	Nova BioMedical, USA
Cedex HiRes	Roche Diagnostics AG, Schweiz
CHO XM 111-10 (Nr. CCOS 837)	Prof. Dr. Martin Fussenegger ETHZ, Schweiz (zu beziehen über Culture Collection of Switzerland)
Duran Schottflasche	Duran Group GmbH, Deutschland
Duran Glastrichter	Duran Group GmbH, Deutschland
Inkubator	Brouwer AG, Schweiz
Kulturmedium ChoMaster [®] HP-1	Cell Culture Technologies GmbH, Schweiz
Kulturmedium FMX-8	Cell Culture Technologies GmbH, Schweiz
Membranfilter Gamma Compatible Millipak-20 Filter Unit 0,22 µm 1/4 in. HB/HB w/bell sterile	Merck Millipore, USA
Omniflix Einmalspritze Luerlock 10 ml,	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Pluronic F68	Sigma Aldrich, Switzerland
pH Meter, 691	Metrohm Schweiz AG, Schweiz
Spritzenfilter Millex-GP, 0,22 µm, Polyethersulfon, 33 mm	Merck Millipore, USA
Schüttelinkubatoren, Multitron 25 mm Auslenkung	Infors AG, Schweiz
Schüttelkolben Polycarbonat 500 mL und 1 L	Corning, USA
Tetrazyclin	Sigma Aldrich, Switzerland
Water for Cell Culture Application WFI, 1 L	Lonza, Switzerland
Zentrifuge Eppendorf, 5417C	Vaudaux-Eppendorf AG, Schweiz

3 DURCHFÜHRUNG

3 DURCHFÜHRUNG

Nachfolgend werden zwei Vorgehensweisen beschrieben. Unter 3.1 wird die Durchführung der Extraktion mit Zellkulturmedium beschrieben (siehe auch Abbildung 1). 3.2 beschreibt die Durchführung der Filmextraktion mit WFI. Für eine vollständige Bewertung wird empfohlen, beide Extraktionen zu realisieren. Im Kapitel 3.3 wird der eigentliche Zellkulturtest vorgestellt. Dieser ist unabhängig vom Extraktionsmittel identisch durchzuführen.

3.1 Extraktion mit Zellkulturmedium

3.1.1 Anforderungen an den zu testenden Bag (Film)

Der Bagfilm soll maximal zwei Monate nach realisierter Gamma-Sterilisation getestet werden. Eine Ausstattung des Bags mit MPC-Kupplungen ist vorteilhaft.

3.1.2 Befüllen des Bags

Das Befüllen des Bags soll in einer Laminarflow Bench erfolgen.

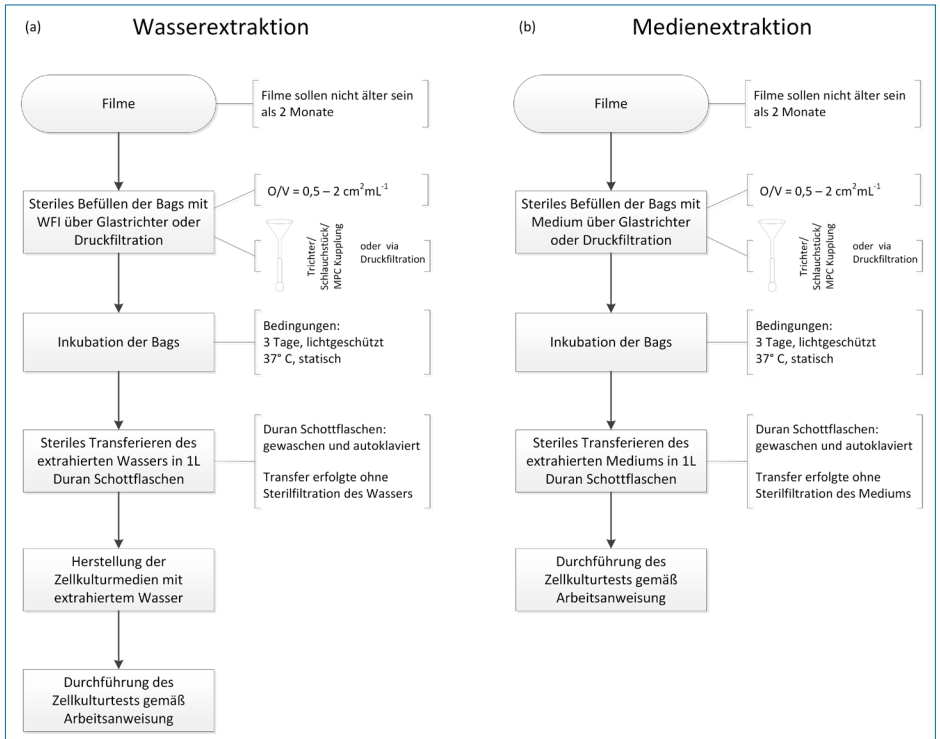
1. Der Bag wird unter sterilen Bedingungen aus der Verpackung entnommen und die Anschlüsse und Klemmen werden sofort geschlossen. Falls nötig, werden offene MPC-Kupplungen mit sterilen Deckeln geschlossen.
2. Das Medium ChoMaster® HP-1 wird vorgängig gemäß der Arbeitsanweisung des Herstellers (Cell Culture Technologies, Schweiz) hergestellt. Thermolabile Substanzen (z.B. Glutamin) können nach Bedarf nach der Extraktion dem Medium zugegeben werden.
3. Das frisch hergestellte Medium (nicht älter als drei Monate) wird über einen Glastrichter, welcher über ein Schlauchstück und eine MPC-Kupplung mit dem Bag verbunden wurde, oder via Druckfiltration steril in den Bag transferiert. Bezüglich der Befüllung des Bags ist darauf zu achten, dass das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis im Bereich von $0,5$ bis $2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$ liegt.
4. Als Referenzkontrolle wird eine sterile Duran-Schottflasche mit Medium befüllt.

3.1.3 Extraktion

1. Der Bag wird zusammen mit der Referenzkontrolle zur Extraktion in einen Inkubator transferiert und bei 37 °C , CO_2 -frei über drei Tage lichtgeschützt und statisch inkubiert.

- Nach der Extraktion wird das Medium steril in Duran-Schottflaschen transferiert. Die Schottflaschen wurden vor der Sterilisation gewaschen, um eventuelle Seifenrückstände zu beseitigen. Der Zeitraum vom Abfüllen des extrahierten Mediums in die Duran-Schottflaschen bis zur Durchführung des Zellkulturtests darf drei Tage nicht überschreiten. Es ist auf eine gekühlte und lichtgeschützte Lagerung zu achten.
- Vor der Kultivierung wird dem Medium Pluronic F68 (0,2 %) und Tetrazyclin (2,5 mg L⁻¹) zugegeben. Das verwendete Tetrazyclin dient nicht der Unterdrückung von Kontaminationen. Es unterstützt das Zellwachstum der Zelllinie CHO XM 111-10 (Tet-off) und unterdrückt die Expression des Modellproteins, der sekretierten alkalischen Phosphatase.

Abbildung 1: Fließdiagramm zum Ablauf des Tests – (a) WFI-Extraktion, (b) Medienextraktion
O/V Oberflächen-zu-Volumenverhältnis, was für die Befüllung des Bags zu berücksichtigen ist.



3 DURCHFÜHRUNG

3.2 Extraktion mit WFI

3.2.1 Anforderungen an den zu testenden Bag (Film)

Der Film soll maximal zwei Monate nach realisierter Gamma-Sterilisation getestet werden. Eine Ausstattung des Bags mit MPC-Kupplungen ist vorteilhaft.

3.2.2 Befüllen des Bags

Das Befüllen des Bags soll in einer Laminarflow Bench erfolgen.

1. Der Bag wird unter sterilen Bedingungen aus der Verpackung entnommen und die Anschlüsse und Klemmen werden sofort geschlossen. Falls nötig, werden offene MPC-Kupplungen mit sterilen Deckeln geschlossen.
2. Das WFI wird über einen Glastrichter, welcher über ein Schlauchstück und eine MPC-Kupplung mit dem Bag verbunden wurde, oder Druckfiltration steril in den Bag transferiert. Bei der Befüllung des Bags mit Medium wird darauf geachtet, dass das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis im Bereich von 0,5 bis 2 cm² mL⁻¹ liegt.
3. Als Referenzkontrolle wird wieder WFI in eine sterile Duran-Schottflasche gefüllt.

3.2.3 Extraktion

1. Der Bag wird zusammen mit der Referenzkontrolle zur Extraktion in einen Inkubator transferiert und bei 37 °C über drei Tage lichtgeschützt und statisch inkubiert.
2. Nach der Extraktion wird das WFI in Duran-Schottflaschen transferiert und bis zur Herstellung des Zellkulturmediums im Kühlraum gelagert. Die Schottflaschen wurden zuvor gewaschen, um eventuelle Seifenrückstände zu beseitigen. Der Zeitraum zwischen Abfüllen des extrahierten WFI in Duran-Schottflaschen bis zur Herstellung des Mediums darf drei Tage nicht überschreiten.
3. Das WFI wird nun zur Herstellung des Minimalmediums (ChoMaster® HP-1) verwendet. Die Herstellung erfolgt gemäß der Arbeitsanweisung des Herstellers (Cell Culture Technologies, Schweiz).
4. Das Medium wird mittels Millipak-20 Filtern (Millipore) unmittelbar vor Durchführung des Zellkulturtests in sterile Duran-Schottflaschen sterilfiltriert.
5. Vor der Kultivierung wird dem Medium Pluronic F68 (0,2 %) und Tetrazyclin (2,5 mg L⁻¹) zugegeben. Das verwendete Tetrazyclin dient nicht der Unterdrückung von Kontaminationen. Es unterstützt das Zellwachstum der Zelllinie CHO XM 111-10 (Tet-off) und unterdrückt die Expression des Modellproteins, der sekretierten alkalischen Phosphatase.

3.3 Zellkulturtest

3.3.1 Herstellung des Inokulums

Für den Zellkulturtest werden CHO XM 111-10 Zellen (CCOS 837) verwendet. Die Zellen werden nach dem Auftauen in eine T-Flasche 75 cm² (T-75) mit 10 mL FMX-8 Medium transferiert. Die Erhaltungskultur wird ebenfalls in T-75 mit FMX-8 Medium geführt. Die Kultivierung erfolgt statisch bei 37 °C und 7,5 % CO₂. Passagiert wird jeweils am Montag und Freitag, wobei 20 mL Arbeitsvolumen mit $0,2 \times 10^6$ Zellen mL⁻¹ inokuliert werden. Am Mittwoch wird jeweils das Arbeitsvolumen mit 20 mL Medium ergänzt.

Drei Passagen vor dem Zellkulturtest wird die Erhaltungskultur expandiert (pro getesteten Film/ Referenz drei bis fünf T-75 Flaschen). Bei der nächsten Passage wird die expandierte Kultur in ein steriles Becherglas überführt und mit dem gleichen Volumen an frischem ChoMaster® HP-1 Medium ergänzt. Die Zellen werden 2 bis 3 Stunden bei 37 °C und 7,5 % CO₂ sedimentiert. Nach dem Absetzen wird das überstehende Medium entfernt und 50 mL frisches ChoMaster® HP-1 Medium zugegeben. Die Suspension wird gut gemischt, bevor 1 mL Probe entnommen wird. Die Probe wird mittels Cedex HiRes analysiert. Mit den Zellen werden zwei bis drei disp. Schüttelkolben (1 L mit 100 mL Arbeitsvolumen) mit $0,3\text{-}0,5 \times 10^6$ Zellen mL⁻¹ inokuliert. Die Kultivierungsparameter sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Schüttelkolben werden bis zum Start des Zellkulturtests je nach Bedarf gesplittet oder gefeedet (Zugabe von ChoMaster® HP-1 Medium bis max. 350 mL Arbeitsvolumen erreicht sind). Die Zellzahl soll dabei $2,5 \times 10^6$ Zellen mL⁻¹ nicht überschreiten, und die Vitalität nicht unter 95% fallen.

Am Tag der Inokulation wird den Schüttelkolben dieselbe Menge frisches Medium zugegeben wie bereits in den Schüttelkolben enthalten ist. Die Zellen werden 2 bis 3 Stunden bei 37°C und 7,5 % CO₂ sedimentiert. Nach erfolgter Sedimentation wird das überstehende Medium entfernt und 50 mL frisches ChoMaster® HP-1 Medium zugegeben. Die Suspension wird gut gemischt und 2 mL Probe entnommen. Die Probe wird mittels Cedex HiRes und BioProfile 100 plus analysiert.

3.3.2 Durchführung des Zellkulturtests

Der Zellkulturtest wird mit CHO XM 111-10 Zellen (WCB 2008) im disp. Schüttelkolben (500 mL) realisiert. Der Zellkulturtest wird für jeden Film/ Referenz im Triplikate als Batch-Verfahren über fünf Tage durchgeführt. Die Schüttelkolben werden mit $0,2\text{-}0,3 \times 10^6$ Zellen mL⁻¹ inokuliert, wobei das Arbeitsvolumen 100 mL beträgt. In der Tabelle 2 sind die Kultivierungsparameter aufgeführt.

Die Probenahme erfolgt alle 24 Stunden. Für das Prozessmonitoring werden jeweils 2 mL Probe steril aus dem Schüttelkolben entnommen und mittels gängiger automatisierter Systeme für Säugerzellkultivierungen, wie zum Beispiel dem Cedex HiRes und BioProfile 100 plus, analysiert. Das Cedex HiRes dient dem Monitoring der Zelldichte und der Zellvitalität (obligatorische Beurteilungskriterien). Zusätzlich kann der Zelldurchmesser bestimmt werden, der als Beurteilungskriterium aber nicht zwingend (fakultativer Beurteilungskriterium) ist. Mit dem BioProfile 100 plus werden Glukose, Laktat, Glutamin und

3 DURCHFÜHRUNG

Ammonium gemessen (obligatorische Beurteilungskriterien). Außerdem kann der pH-Wert bestimmt werden, der wieder als fakultatives Beurteilungskriterium angesehen wird.

Tabelle 2: Kultivierungsparameter für den Zellkulturtest

Parameter	Wert
Temperatur	37 °C
CO ₂	7,5 %
Schüttelfrequenz	120 rpm
Auslenkung	25 mm
Luftfeuchtigkeit	70 %

Zur Versuchsauswertung sollen zunächst die Daten der Referenz auf 100% normiert werden. Die Verläufe der obligatorischen Beurteilungskriterien (der Zelldichte, der Vitalität, der Substrat- und Metabolitenkonzentrationen) werden über der Zeit und in Abhängigkeit des Films aufgezeichnet, wobei die Daten hierbei auf die der Referenz bezogen werden. Das geschieht sowohl für die Medien- als auch Wasserextraktion.

Zeigt der Test für die Wasser- und Medienextraktion bei keinem oder maximal einem Kriterium (bezieht sich auf die Summe der Resultate beider Extraktionen) eine negative prozentuale Differenz $\geq 10\%$ zur Kontrolle, sind Leachables für den getesteten Film vernachlässigbar. Tritt lediglich bei der Medienextraktion, nicht aber bei der Wasserextraktion eine negative Abweichung $\geq 10\%$ in der Zelldichte auf, ist eine Interaktion von Medienkomponenten mit diesem Film als Ursache für die Wachstumsinhibierung zu prüfen. Gibt es in der Summe der Ergebnisse aus der Medien- und Wasserextraktion Abweichungen in mehr als zwei Kriterien, ist der Bagfilm im Hinblick auf Leachables als kritisch zu bewerten. Tabelle 3 zeigt beispielhaft eine Auswertematrix.

Tabelle 3: Auswertematrix

Auswertematrix am Beispiel der Ergebnisse für CHO XM 111-10 Zellen in ChoMaster® HP-1 Medium

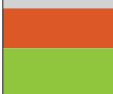
Film	max. Zelldichte		Vitalität		Metabolismus		Kriterium		
	Medien- extraktion	Wasser- extraktion	Medien- extraktion	Wasser- extraktion	Medien- extraktion	Wasser- extraktion	1	2	3
1	20 %	+	+	+	-	+	rot	grün	grün
2	25 %	31 %	+	+	-	+	rot	rot	rot
3	+	+	+	+	+	+	grün	grün	grün
4	+	+	+	+	+	+	grün	grün	grün
5	+	21 %	+	+	+	+	grün	grün	grün
6	+	+	+	+	+	+	grün	grün	grün
7	25 %	+	+	+	-	+	rot	grün	grün
8	22 %	41 %	+	+	-	+	rot	rot	rot
9	+	+	+	+	+	+	grün	grün	grün
10	21 %	33 %	+	+	-	+	rot	rot	rot
11	23 %	+	+	+	-	+	rot	grün	grün

Auswertekriterien:

- 1 In der Summe der Ergebnisse aus der Medien- und Wasserextraktion gibt es bei keinem oder einem Kriterium eine Abweichung $\geq 10\%$ zur Referenz
- 2 Lediglich bei der Medienextraktion, nicht aber bei der Wasserextraktion tritt eine Abweichung $\geq 10\%$ in der Zelldichte auf
→ Ist dies der Fall, muss geprüft werden, ob eine Interaktion von Mediumkomponenten mit dem Filmmaterial vorliegt
- 3 In der Summe der Ergebnisse aus der Medien- und Wasserextraktion gibt es bei mehr als 2 Kriterien eine Abweichung von $\geq 10\%$

Legende:

- % negative prozentuale Differenz zur Referenz
- + Abweichung zur Referenz $< 10\%$
- Abweichung zur Referenz $\geq 10\%$



Kriterium trifft nicht zu
Kriterium trifft zu

Ein Bagfilm ist in Hinblick auf Leachables als unkritisch zu bewerten, wenn mindestens zwei der drei Kriterien mit grün bewertet werden können

4 MITGELTENDE UNTERLAGEN / 5 ÄNDERUNGSHINWEISE / 6 ANHANG

4 MITGELTENDE UNTERLAGEN

Arbeitsanweisung des Medienherstellers Cell Culture Technologies, Schweiz, für ChoMaster® HP-1 Medium und FMX-8 Medium.

5 ÄNDERUNGSHINWEISE

Die Arbeitsanweisung wurde neu erstellt.

6 ANHANG

kein Anhang vorhanden







Gesellschaft für Chemische Technik
und Biotechnologie e.V.
Theodor-Heuss-Allee 25
60486 Frankfurt am Main

Tel.: 069 7564-0

Fax: 069 7564-201

E-Mail: info@dechema.de

ISBN: 978-3-89746-148-2

www.dechema.de