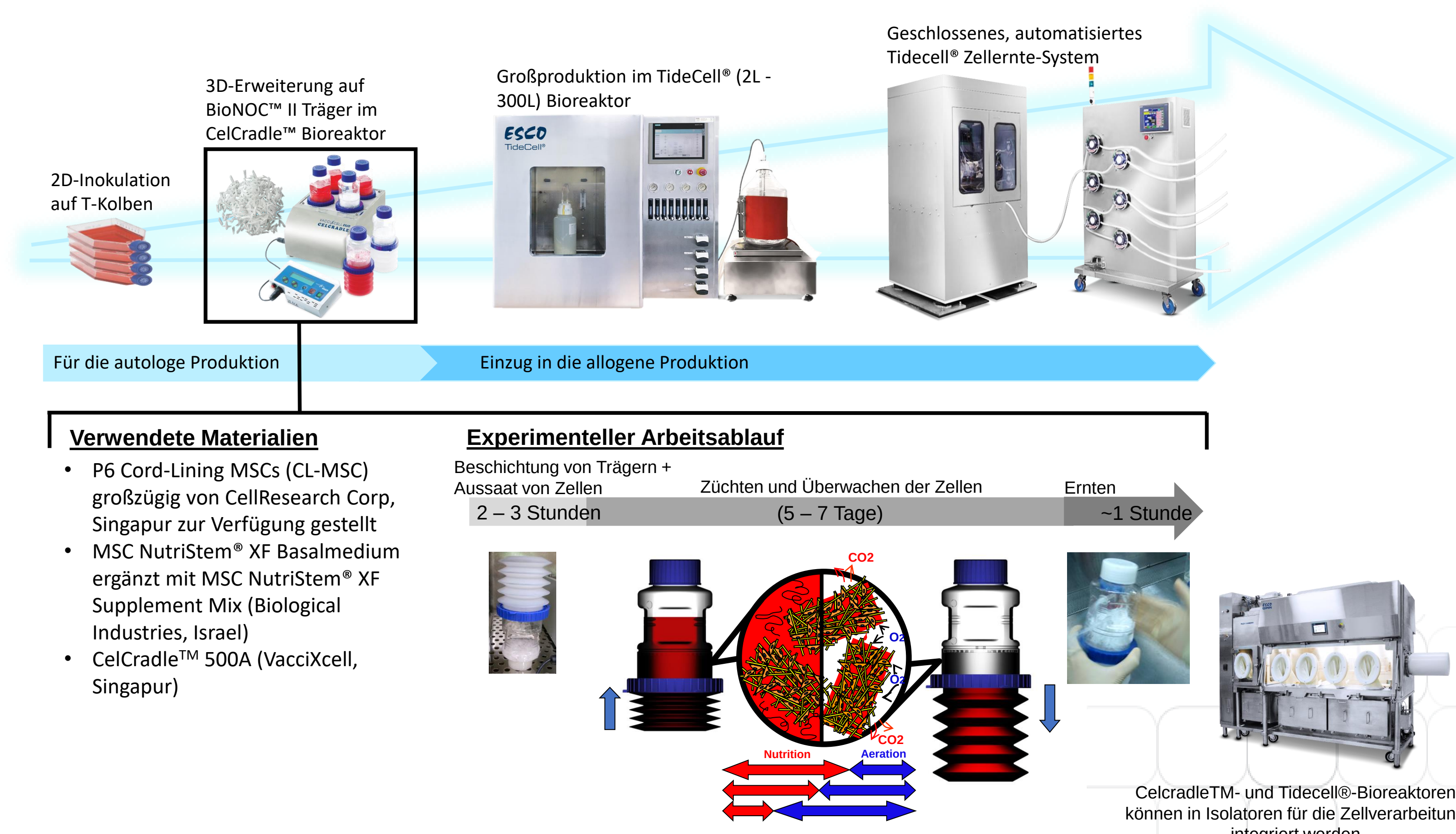


EINFÜHRUNG

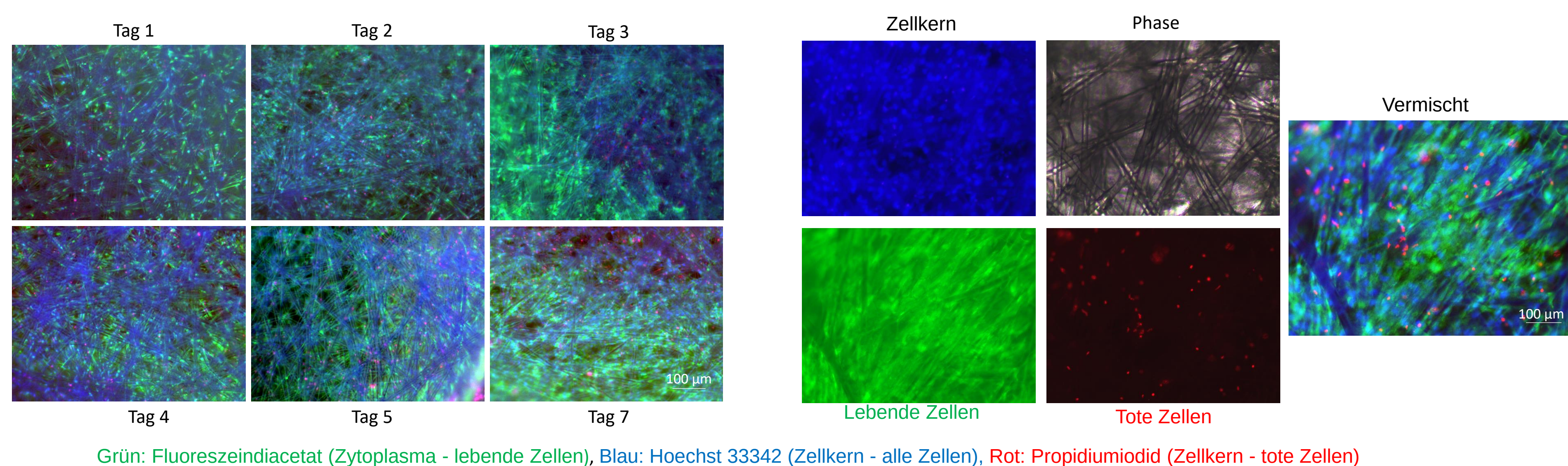
Menschliche mesenchymale Stammzellen (MSCs) haben großes medizinisches Interesse als neue Behandlungsoption erhalten und ein neues Zeitalter in der regenerativen Medizin angestoßen. Allerdings ist es bei der konventionellen Kultivierung an Kunststoffprodukten und in Suspensionen schwierig, die Produktion von MSCs für klinische Anwendungen zu erhöhen. Um diese Herausforderungen zu meistern, hat Esco Aster Tide Motion Bioreaktoren wirksam eingesetzt, um ein skalierbares Bioprozess-Verfahren für die Produktion von MSCs in einem cGMP-konformen Prozess (Current Good Manufacturing Practices) zu entwickeln. Menschliche MSCs, die von gesunden Spendern isoliert wurden, wurden in konventionellen 2D-adhärenz Kulturen für einige Passagen expandiert, bevor sie in Makroträgern (BioNOC™ II) in einer CelCradle™ -Flasche ausgesät wurden. Die Zellen wurden in chemisch definierten Medien gezüchtet, und Ernteeffizienzen von mehr als 90% erreicht, mit einer Lebensfähigkeit der Zellen von mehr als 85 % nach 5-7 Tagen in der Kultur. In Übereinstimmung mit der Internationalen Gesellschaft für Zelluläre Therapie (International Society for Cellular Therapy - ISCT) gewährleisteten Qualitätskontroll- und Freigabekriterien für MSCs, gekennzeichnet durch ihre Oberflächenmarker und Multipotenz (adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung), mehr als 95% der MSCs in der Kultur. Wichtig ist, dass MSCs, die auf dem BioNOC™ II kultiviert wurden, ähnliche In-vivo-Eigenschaften aufwiesen, mit Sekretionen von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und fibroblastischen morphologischen Veränderungen. Unser derzeitiger Prozess ist robust und basiert auf Standard-Bioprozess-Tools in den meisten Auftragsfertigungsbetrieben (Contract manufacturing facilities - CMOs). Durch die Überwachung und Optimierung wichtiger Prozessparameter, wie z. B. pH-Wert, Glukoseverbrauchsrate, ist es unser Ziel, die Produktion im Labormaßstab von akademischer / industrieller Forschung und Entwicklung in den Labormaßstab / Pilotmaßstab für klinische Versuche und kommerzielle Produktionen zu übertragen.

PROZESSENTWICKLUNG



ERGEBNISSE

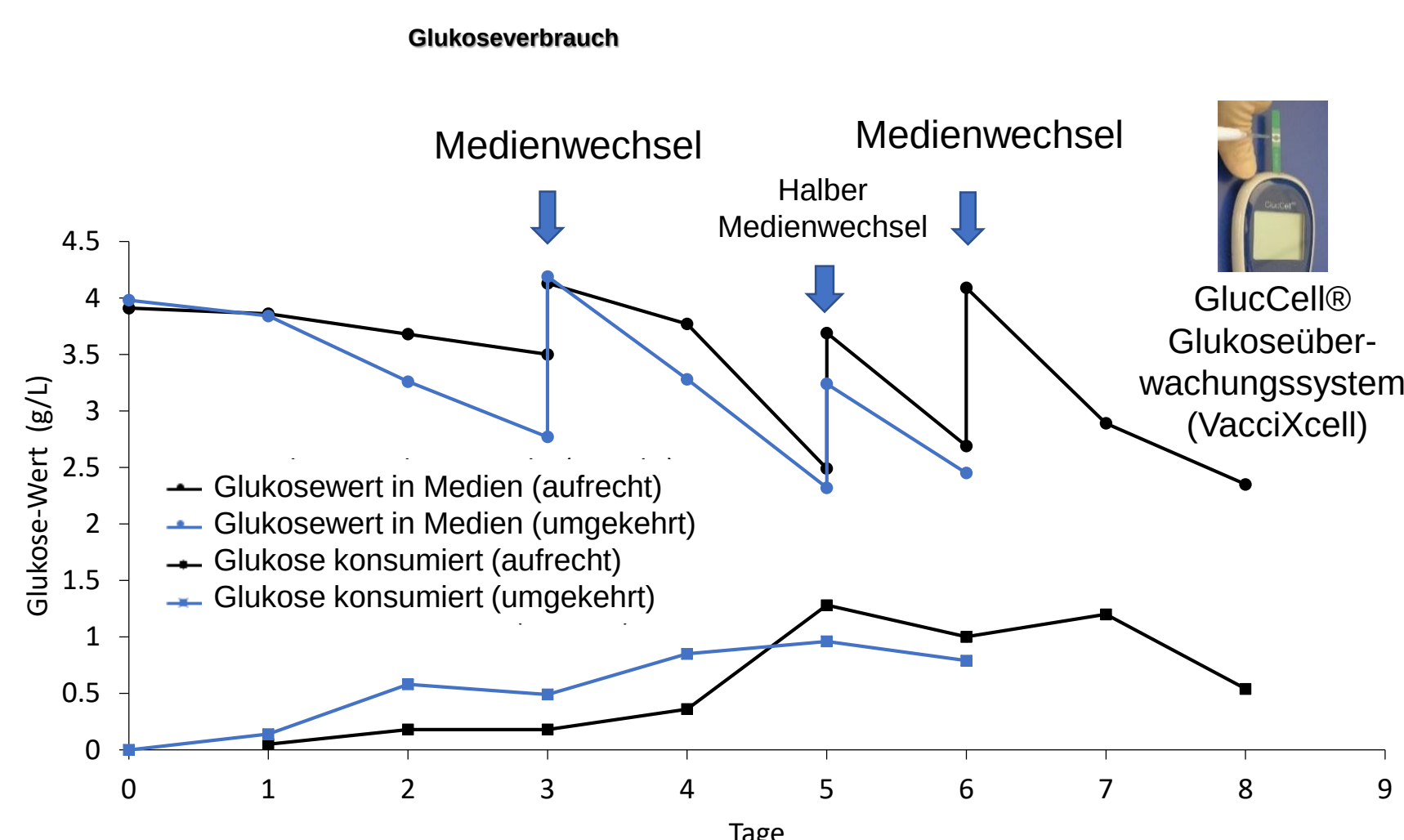
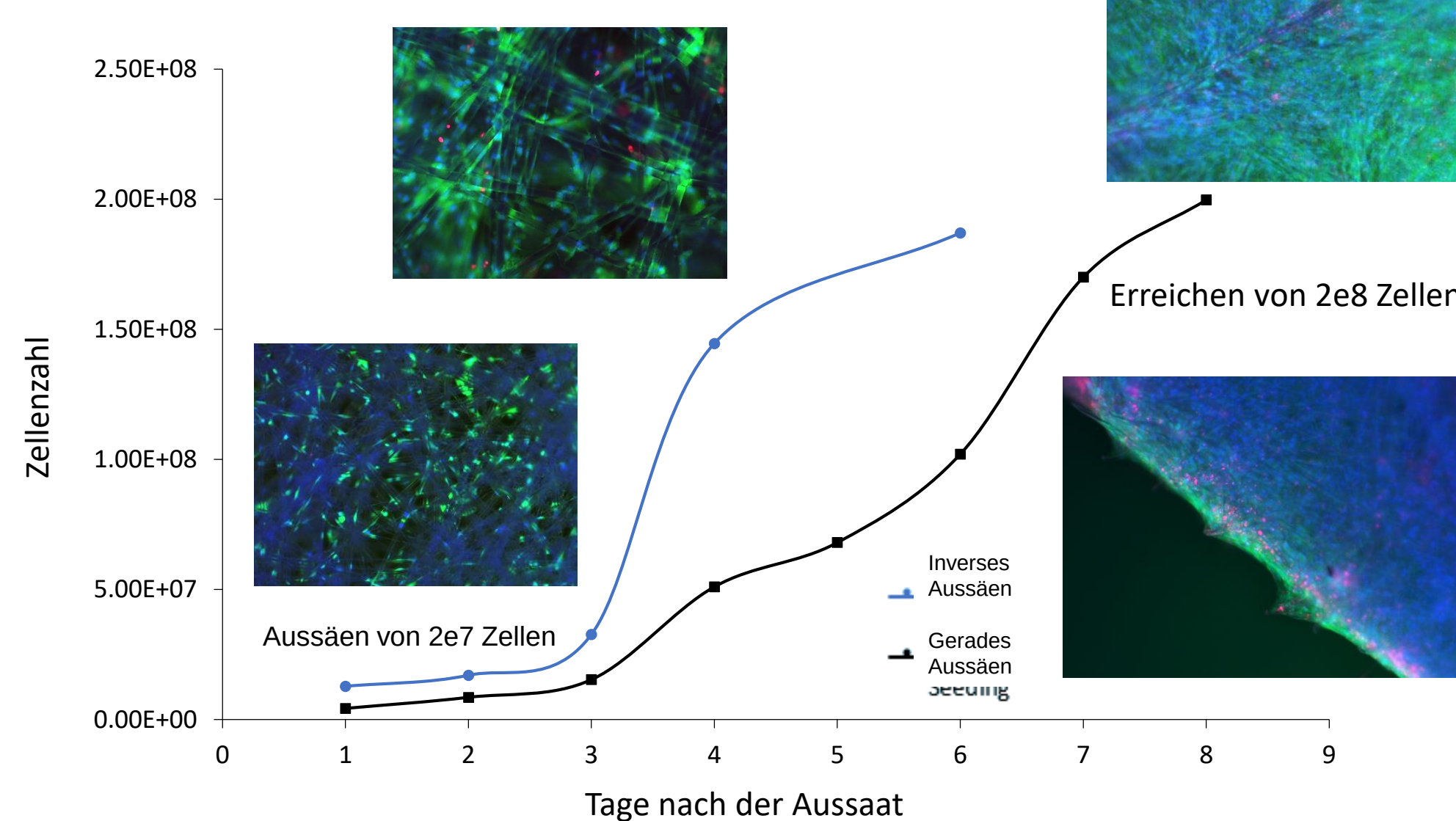
ÜBERWACHUNG DER ERWEITERUNG DER MSCs IN CELCRADLE™



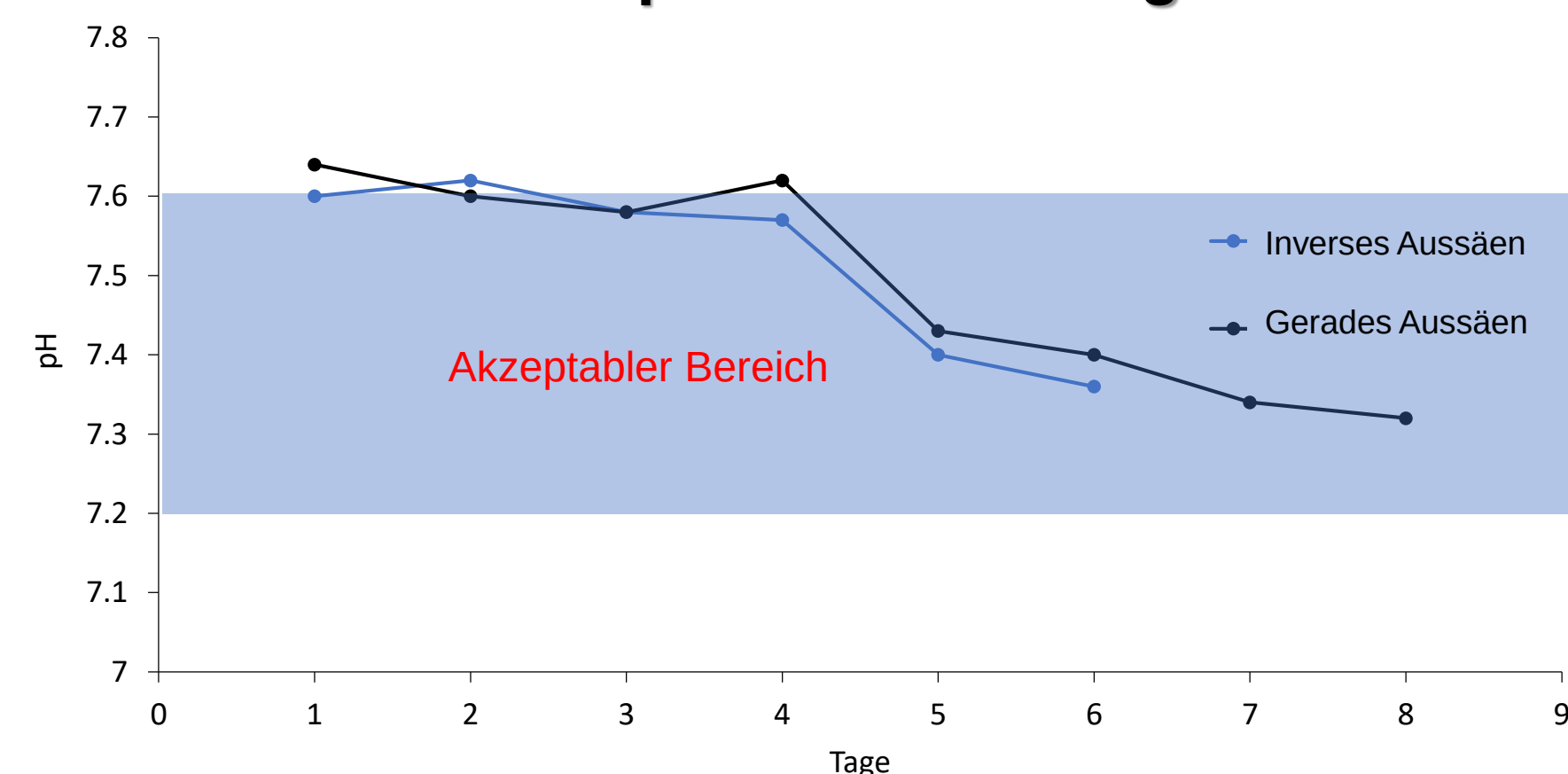
Hohe MSCs Konfluenz in BioNOC™ II



Zellwachstum in CelCradle™

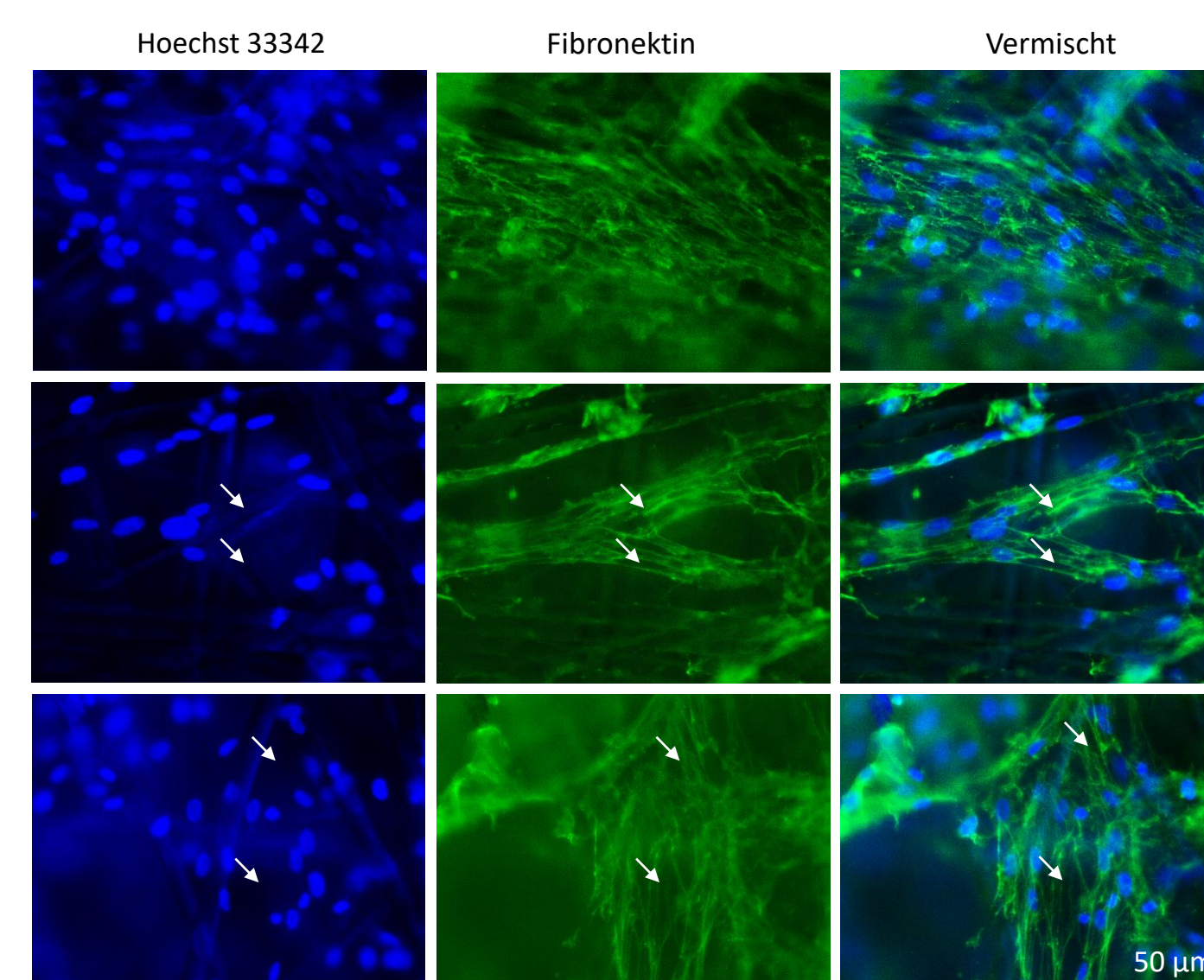
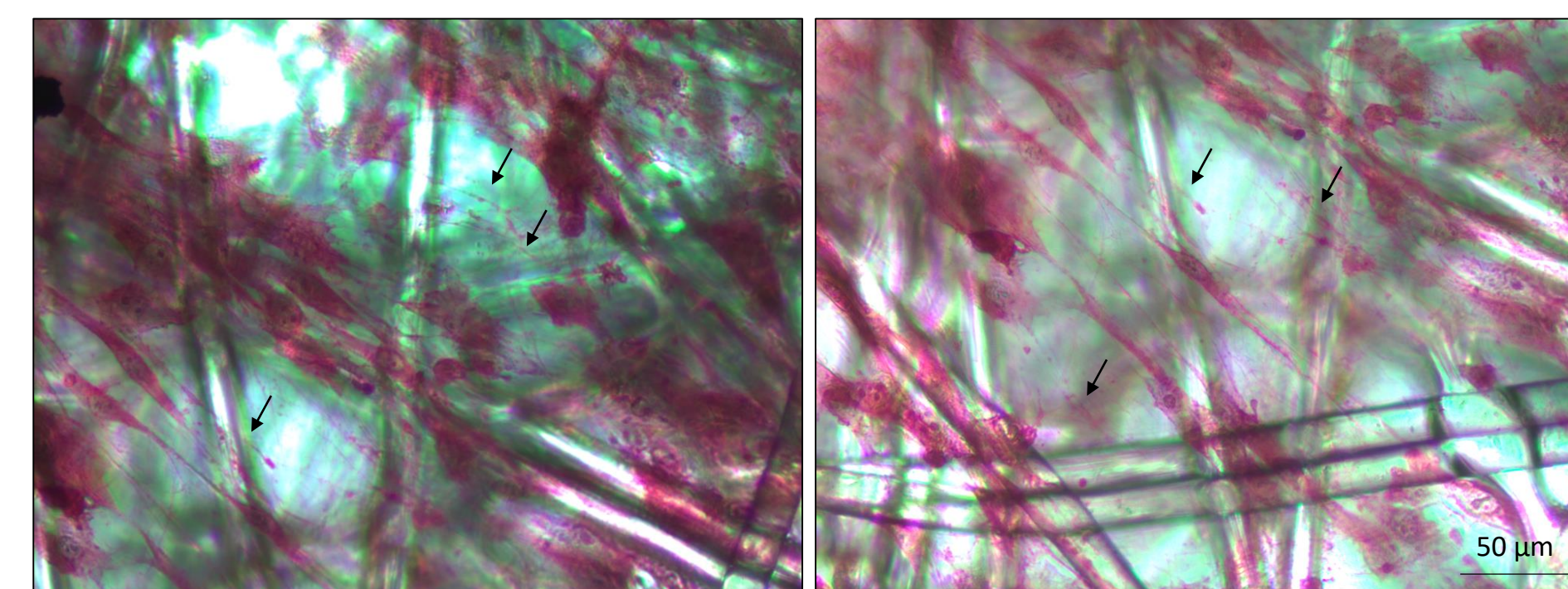


pH Überwachung



ECM FORMATION

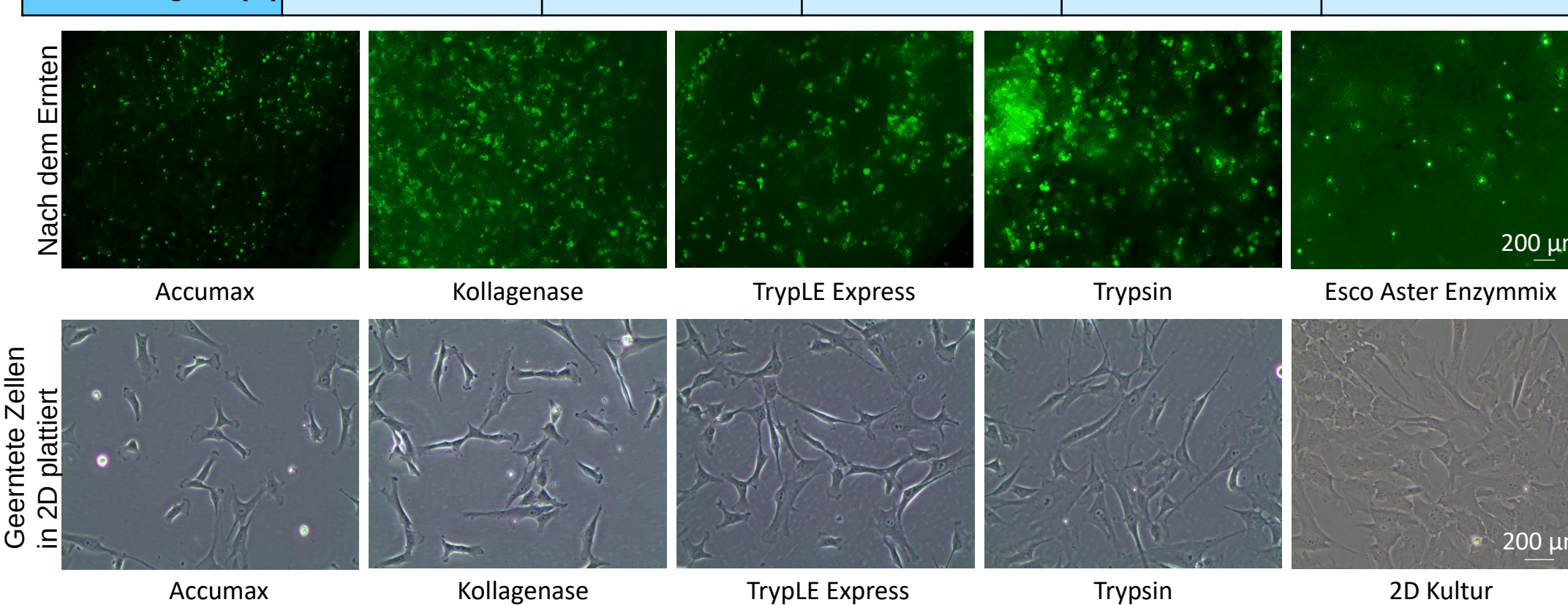
Zusammensetzung auf ECM Fibrillen-Strukturen auf 3D BioNOC™ II



Von MSCs sekretiertes ECM-Fibronectin

ZELLERTE

Enzyme	Accumax™	Kollagenase	TrypLE™ Express	Trypsin	Esco Aster Enzymmix
Ernte (%)	87	68.3	78.3	56.3	91.8
Lebensfähigkeit (%)	95.6	73.2	95.8	88.9	93.5



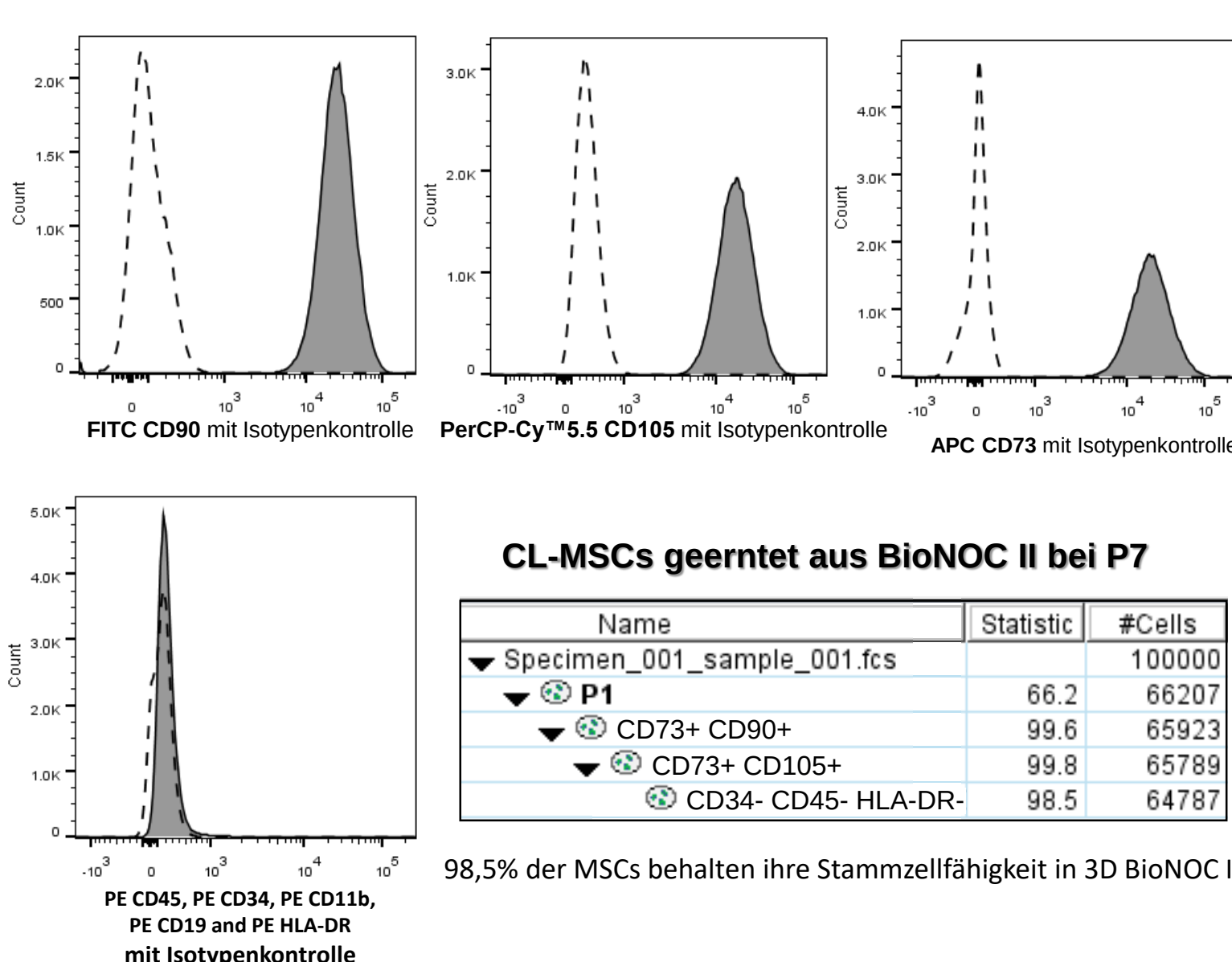
Nach dem Ernten, Geerntete Zellen in 2D plattiert

Accumax, Kollagenase, TrypLE Express, Trypsin, Esco Aster Enzymmix, 2D Kultur

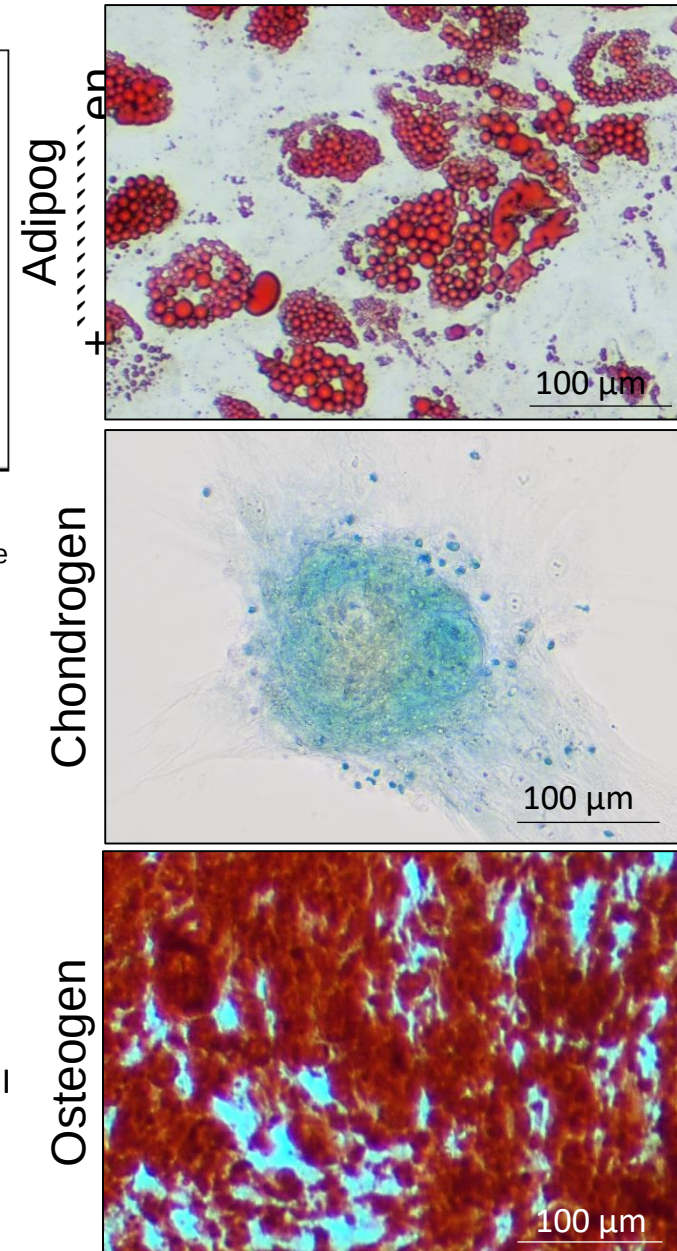
* Die Ernteeffizienz variiert je nach Stammzellentyp und verwendeten Enzymcocktail

QUALITÄTSKONTROLLE UND FREIGABEKRITERIEN

Zellidentität



Multipotenz



SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Einmalgebrauch-Festbett-Bioreaktor, mit einfacher Übersetzung vom Labor- zum industriellen Maßstab
- Vereinfachte Seed-Train-Operationen
- Erweiterung von MCS in einem cGMP-konformen Prozess (current Good Manufacturing Practices)

Faktor / Attribut	Leistung der MSCs
Anlagerung von Zellen	Hohe Säumeffizienz > 90% Fibronectin-Beschichtung für serumfreie Medien (geeignet für die cGMP-Produktion)
Zellenwachstum und Überwachung	Einfache Visualisierung der Zellen auf der Matrix durch Farbstoff Konfluenz am Tag 5-8 erreicht Steuerung und Überwachung von Prozessparametern
Zellernte	> 90% der Zellen wurden mit geeigneten, urheberrechtlich geschützten Enzymen von Esco Aster geerntet
ECM Sekretion	Fibronectin und Kollagen beobachtet Relevant für In-vivo-Bedingungen mit 3D-Wachstum
Qualität der Zellen	Stammzellenfähigkeit und Trilineage-Differenzierung von MSCs erhalten Lebensfähigkeit der Ernte > 90%, mit gesunden Zellen, die nach der Ernte erhalten werden

Vergleich von 2D vs. 3D Kulturen für CL-MSCs @ P6

	2D Kulturkolben	3D BioNOC™ II
Zellmorphologie	Polyedrisch	Spindelförmig, fibroblastisch
Zelldichte	2,5 Millionen/ T75 Kolben	2e8 Zellen/ CelCradle™
Mediennutzung	15 ml	500 ml
Zellnummer : Mediennutzung	166,000 Zellen: 1 ml	400,000 Zellen: 1ml
Um 2e8 Zellen zu erreichen	80 T75 Kolben mit 1200 ml Media	1 CelCradle™ mit 500 ml Media
% Zellen behalten die Stammzellfähigkeit	79%	98%

MSCs können eine ca. 10-fache Erweiterung mit CelCradle™ erreichen
Derzeit Aussaat zwischen 2-3e7 Zellen pro CelCradle™, um 2e8 Zellen zu erhalten
Entworfen, um 4e9 Zellen in 2L TideCell® und 9e11 Zellen in 300L TideCell® zu erhalten

* Die endgültige Dichte variiert je nach Alter, Stammzellenquelle und verwendetem Medientyp