



**QUINTA ANALYTICA**  
a CONSCIO company

Plně certifikovaný poskytovatel služeb pro globální farmaceutický a biotechnologický sektor - již více než dvacet šest let.

## **Cell-based assay: Buňky ve službách analytiků**

**Pro testování kvality léčiv na bázi velkých molekul (Biologics)**

Hana Čermáková



## Quinta-Analytica: A full-service CRO

- ✓ Trusted leader in pharmaceutical services for small molecules and biologics
- ✓ Offering a broad portfolio of services including drug testing, clinical studies, and bioanalytical services
- ✓ Fully certified: GMP (Human Medicinal & Veterinary Medicinal products)/GLP/GCP; FDA & EMA inspected
- ✓ Founded in 1997 with more than 220 top professionals ready to support your projects
- ✓ Three locations in CZ (Prague, Brno and Ostrava)
- ✓ 300+ validated bioanalytical methods
- ✓ Serving multinational clients in Europe, US, and Asia

**Prague (HQ):** Two fully-equipped buildings for bioanalysis, CMC and clinical trials (60 beds)



**Ostrava:** Clinical trials (36 beds)



**Brno:** Specialized laboratory for analyses of highly potent substances



**CONSCIO**  
Quality Science for a Healthy Future

**HyServe**



QUINTA  
ANALYTICA



**LVA**

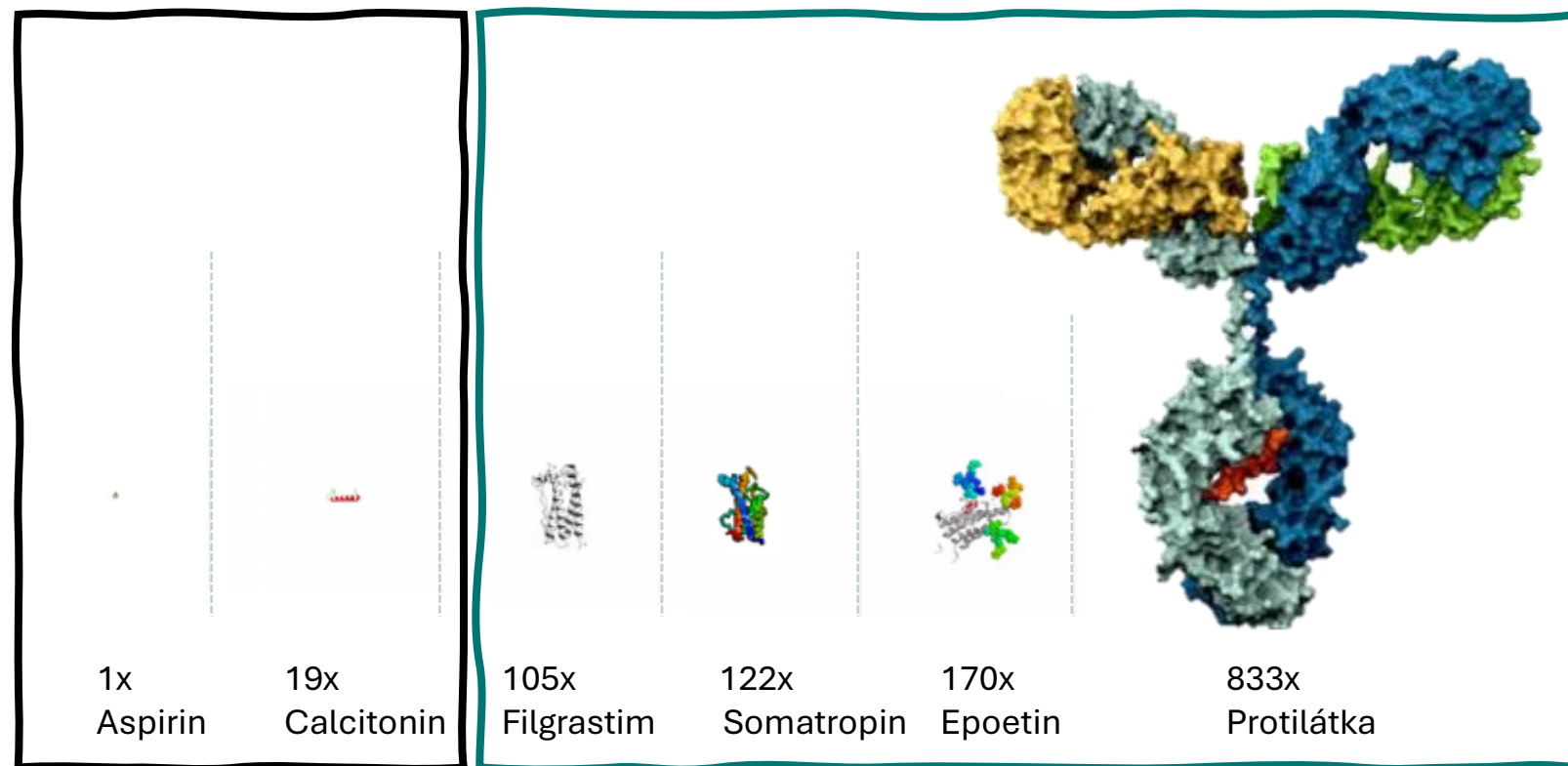
CONSCIO



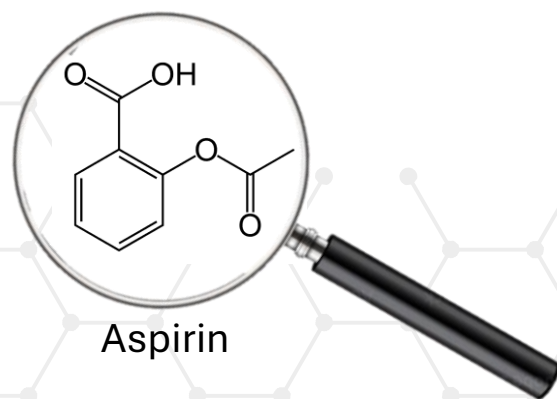
EL Labs

# Co jsou velké molekuly?

Léčiva na bázi	Zástupce	Struktura	Stabilita	Modifikace	Produkce
<b>Malé molekuly</b>	Aspirin, Ibalgin	jednoduché	stabilní	dobře definované a popsané molekuly	produkovány chemickou syntézou
<b>Velké molekuly</b>	enzym, peptid	složitější	méně stabilní	dobře definované a popsané molekuly	produkovány živými organismy
<b>Biologics</b>	protilátka	komplexní	méně stabilní	heterogenní a závislé na produkčním procesu	produkovány živými organismy



Online: <https://www.boehringer-ingenheim.com/science-innovation/human-health-innovation/science-stories/biopharmaceuticals-large-molecules-enormous-potential>



# Co dělají Biologics?

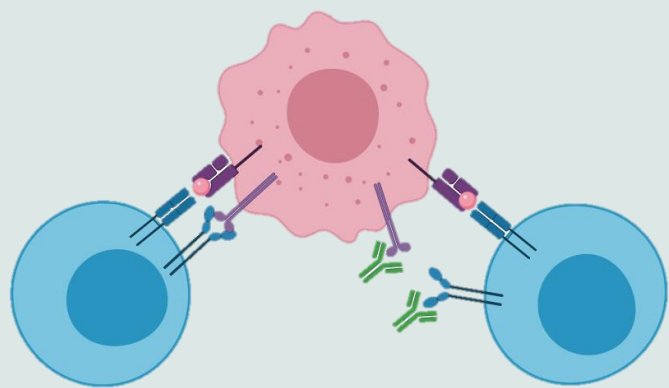
## Imunitní checkpoint inhibitory

### Účinek:

Blokují inhibiční signály v imunitním systému a umožňují T-lymfocytům efektivněji napadat nádorové buňky

### Příklady:

anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab), anti-PD-L1 (atezolizumab, durvalumab), anti-CTLA-4 (ipilimumab)



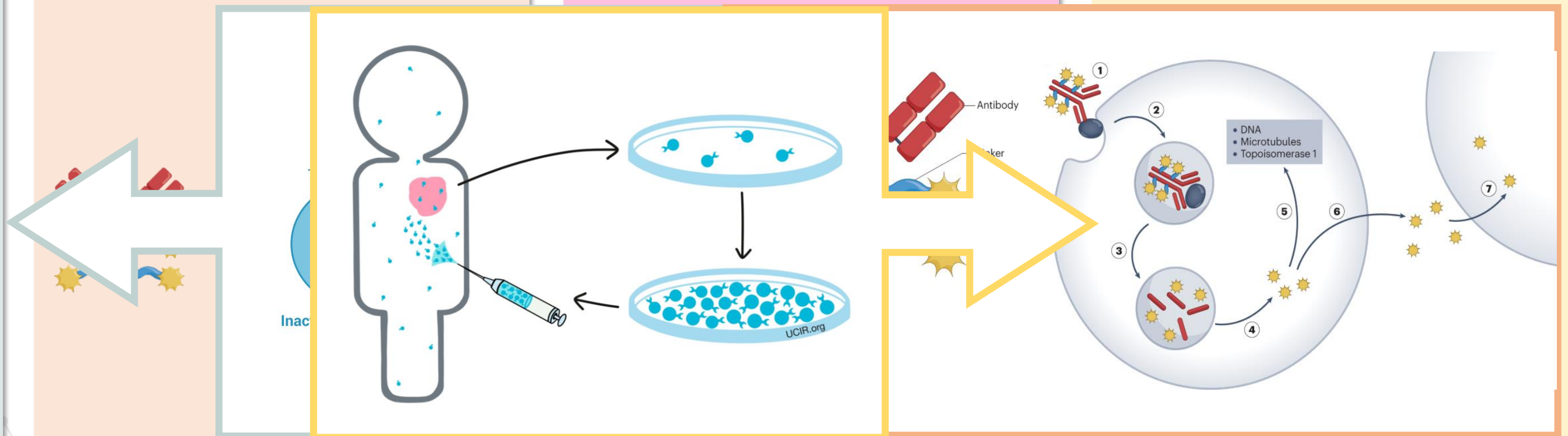
## Antibody-drug conjugates (ADC)

### Účinek:

Monoklonální protilátky s navázanou cytotoxickou látkou, která se uvolní po internalizaci do nádorové buňky

### Příklady:

trastuzumab emtansin (HER2+ rakoviny), enfortumab vedotin (urotel. karcinom)



## Cytokinová terapie

### Účinek:

Podpora imunitní odpovědi nebo přímé ovlivnění buněčné signalizace

### Příklady:

IL-2 (aldesleukin), IFN-α (proti virovým infekcím, melanomu)

## Buněčná terapie

### Účinek:

Geneticky modifikované T-buňky (CAR-T) zaměřené proti specifickým nádorovým antigenům

# Vývoj buněčné esej pro QC

- **Zjištění mechanismu účinku léčiva (MoA)**

- Co je to za molekulu (protilátka, cytokin, blokátor)?  
Na jaké buňky molekula působí (jaterní, rakovinné, imunitní)?  
Co jim způsobuje (buněčnou smrt, jejich množení – proliferaci)?  
Jak budeme detekovat (životaschopnost – viabilitu, množství ATP, reportérové geny, značená protilátka)?  
Čím budeme detekovat (detektorem destiček – plate reader, průtokovým cytometrem, fluorescenčním mikroskopem)?

- **Nákup vhodné buněčné linie**

- **Příprava buněčné banky**

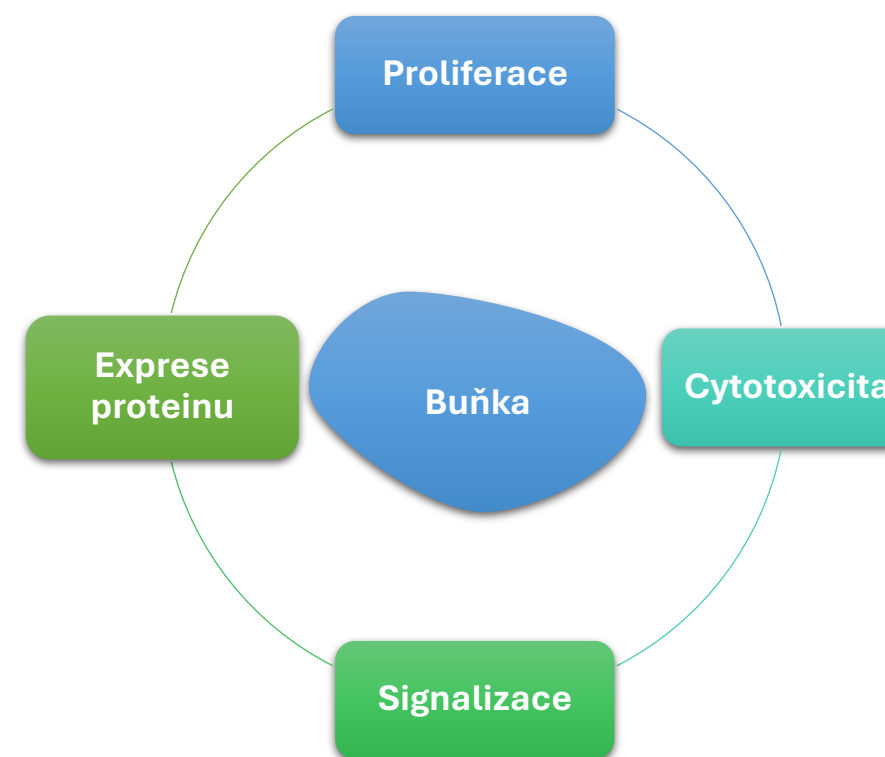
- **Vývoj a optimalizace metody**

- Zjištění vhodného koncentračního rozpětí a ředění léčiva
- Zjištění koncentrace buněk v esej
- Kritické reagensie

- **Kvalifikace/pre-validace metody**

- **Validace metody – dle příslušné legislativy (guidelines)**

- **Měření vzorku**



# Výběr buněčné linie

## Výběr a nákup vhodné buněčné linie

- Jak působí léčivo (MoA)?
- Jaký druh buněčných linií (jaterní, rakovinné, imunitní)?  
Co musí splňovat (produkovat interleukiny, mít určitý receptor, adherentní/suspenzní)?

## Vhodná detekce

- Jak budeme detekovat (viabilita, metab. aktivita, exprese proteinu, aktivace b. signalizace)?

## Kde bereme savčí buněčné linie?

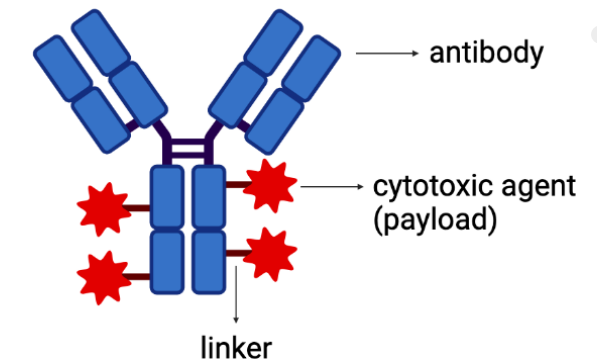
### Vyizolované buňky z lidských dárců:

HeLa – Henrietta Lacks, první lidská imortalizovaná buněčná linie, buňky rakoviny děložního čípku,  
HEK293 – Human Embyotic Kidney, imortalizovaná lidská buněčná linie, buňky ledvin lidského embrya  
hPBMC – human Peripheral Blood Mononuclear Cell, primární buněčné linie, z lidské krve

### Vyizolované buňky ze zvířecích dárců:

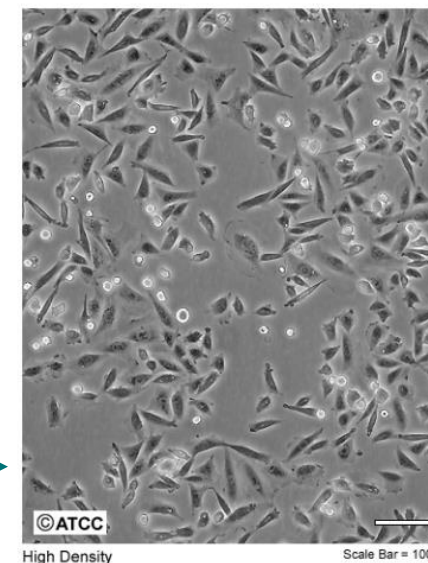
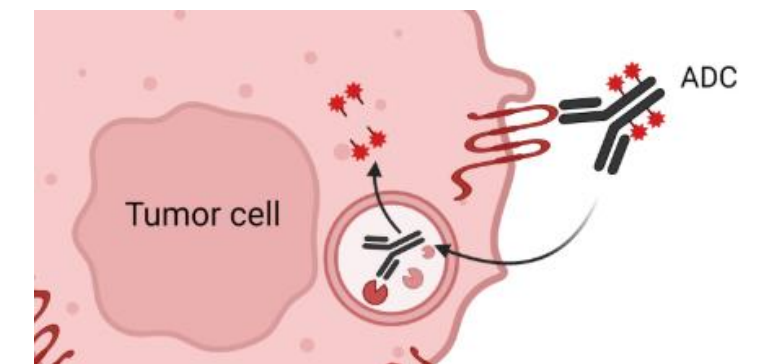
CHO – Chinese Hamster Ovary, imortalizovaná křeččí buněčná linie, buňky rakoviny vaječníků

Antibody-drug conjugate (ADC)  
Váží se na Claudin 18.2 (CLDN)



Buňky exprimující (produkující) CLDN, internalizují ADC  
-rakovinné s přirozeným výskytem – A549  
-Geneticky Modifikované Organismy (GMO) – CHO, HEK293

Metabolická aktivita živých buněk

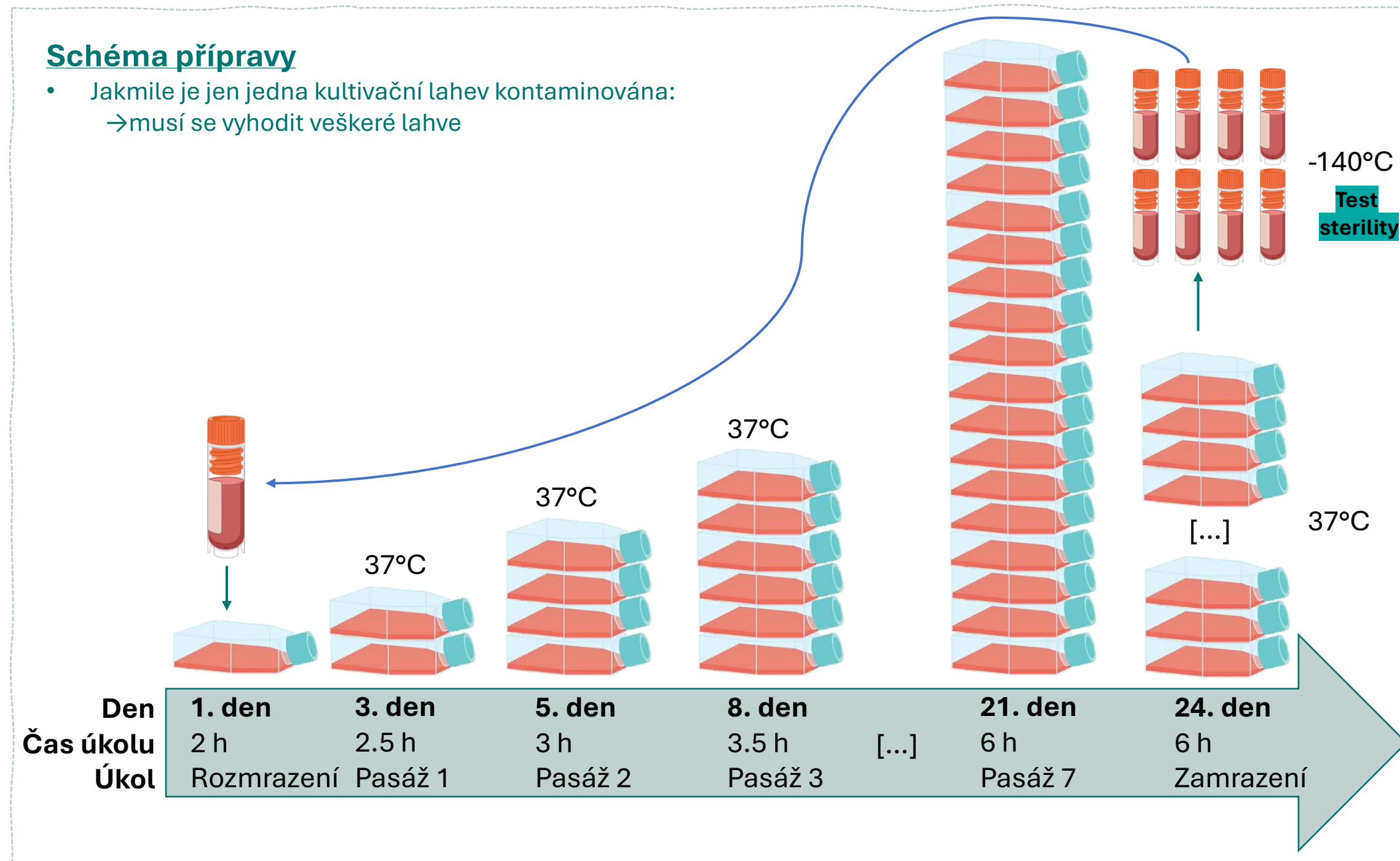


# Tvorba buněčné banky

## Proč tvoříme buněčnou banku?

- Konzistentní výsledky
- Ekonomické hledisko – zmnožení buněk

MCB  
↓  
WCB  
↓  
Esej



## Zkratky

MCB = master cell bank – hlavní buněčná banka

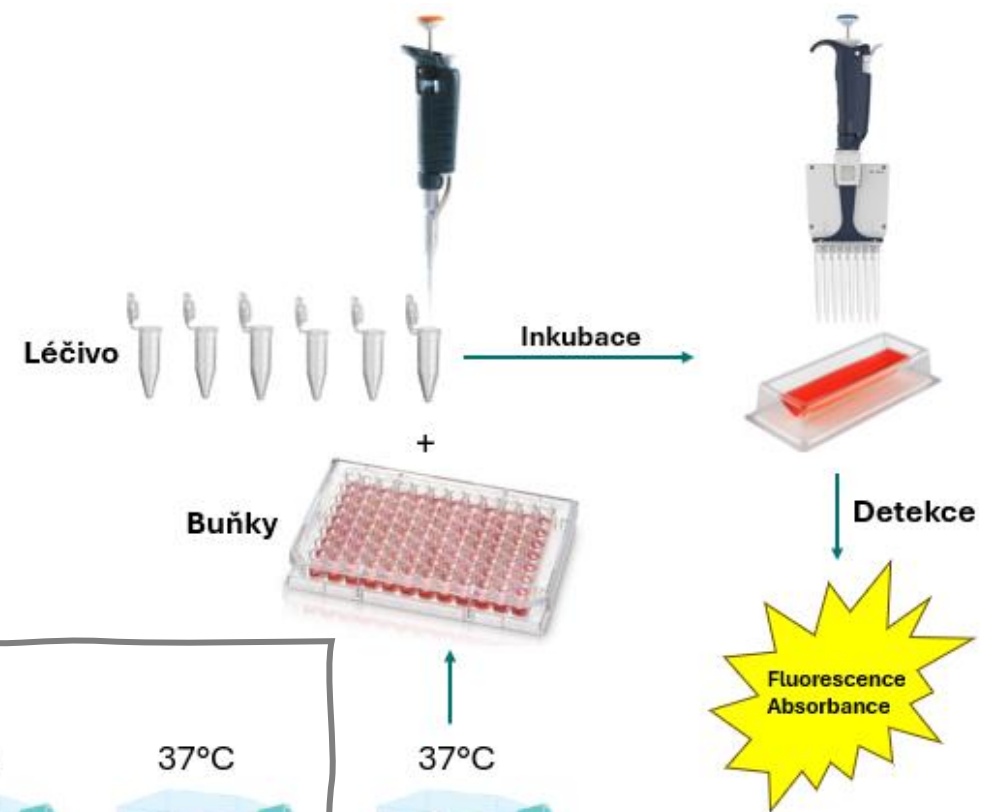
WCB = working cell bank – pracovní buněčná banka



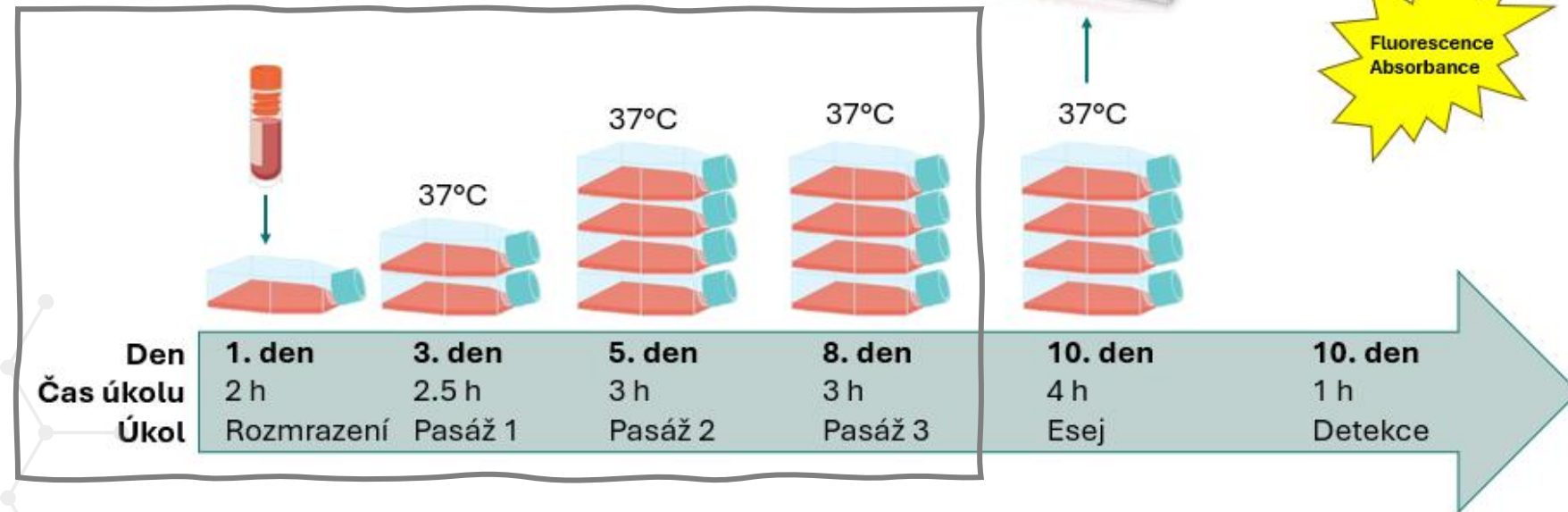


# Příprava a průběh buněčné eseje

## Workflow



### Pasážování



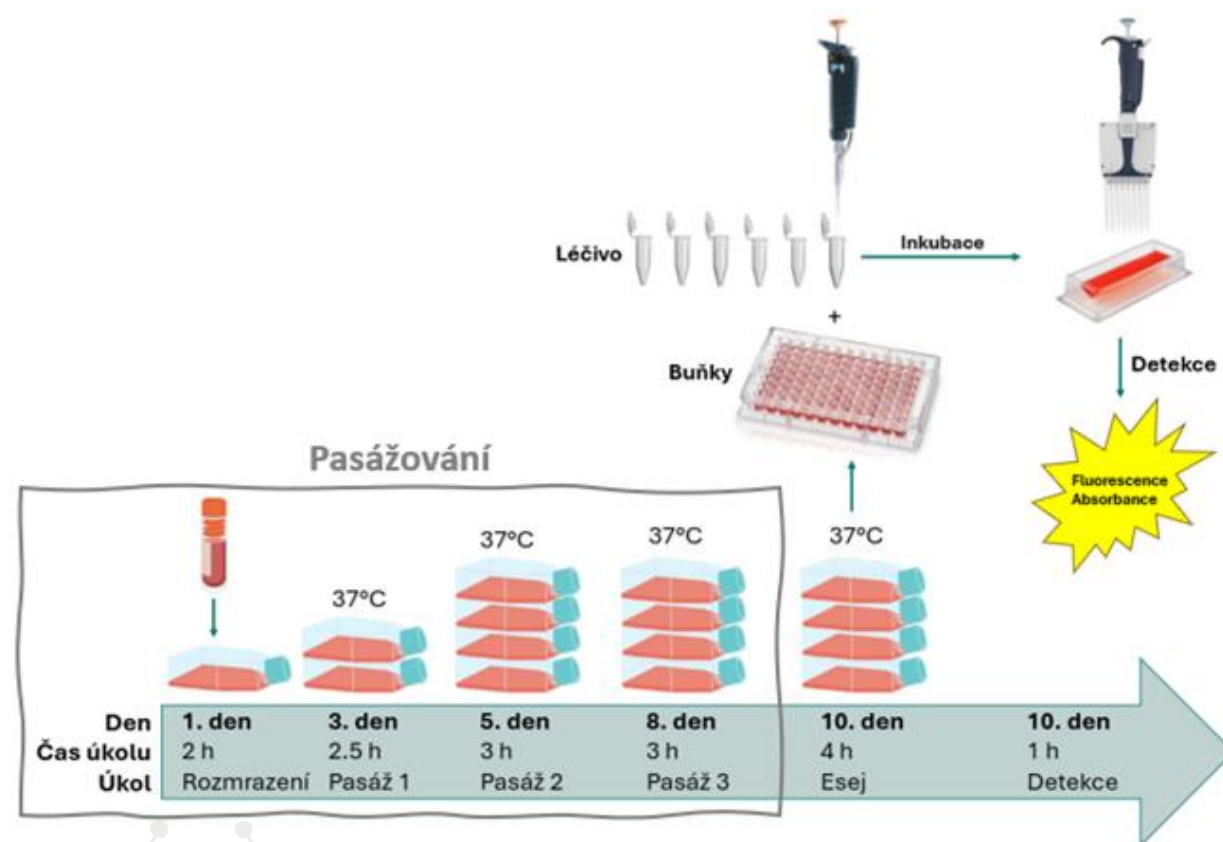
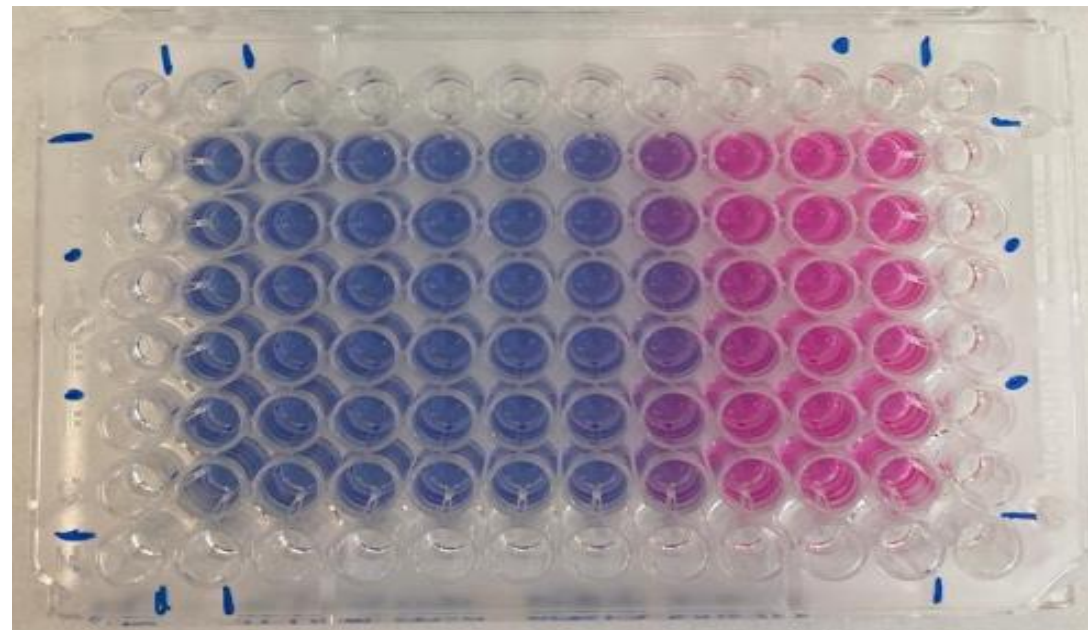
1. **Pasážování** (zotavení buněk po zamražení)
2. **Sklízení buněk** (počítání buněk)
3. **Sázení buněk do destičky** (100 000 buněk na jamku)
4. **Přidání ředící řady léčiva** do jamek s buňkami
5. **Inkubace buněk a léčiva** (proliferace, buněčná smrt, buněčná signalizace – záleží na MoA)
6. **Přidání detekčního reagentu a detekce** (Fluorescence, Luminescence, Absorbance)
7. **Generování výsledků** (parametry křivky, statistika)
8. **Reportování**

Vývoj – cca 20 destiček  
 Kvalifikace – cca 15 destiček  
 Validace – cca 15 destiček  
 = až 50 destiček před měřením samotného vzorku

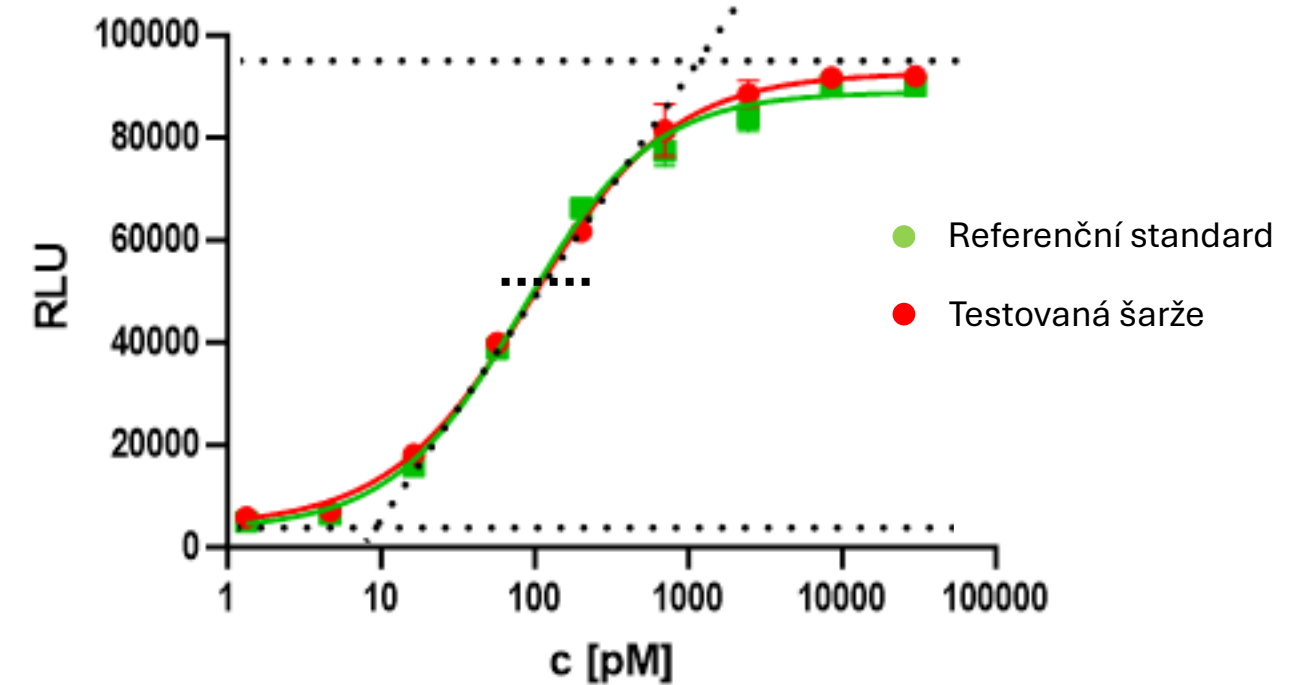


# Měření vzorku - konečně

Nová šarže léčiva



Porovnání testované šarže a referenčního standardu



**Parametry 4PL fitu:**

- B hodnota
- C hodnota (EC50/IC50)
- A/D hodnoty
- % Relative potency

Je běžná praxe **opakovat testování šarže 3x** (preferenčně v jiný den, jiným analytikem) - pokud není definováno zákazníkem jinak



# Key messages

## Proč se testují Biologics *in-vitro*

Mimikujeme působení léčiva na živém organismu, které nelze efektivně stanovit jinou analytickou metodou – poskytují fyziologický kontext

## Preklinická a vývojová fáze

- Testování mutací vložených do molekuly
- Testování stability (pH, UV, oxidace, teplota, chemický činitel)
- Zjištění vhodného dávkování *do in-vivo* – předstupeň testování na zvířatech
- Testování nově vyrobené šarže – QC

## Klinická fáze

- Testování imunogenicity – Neutralizační protilátky
- Testování nově vyrobené šarže – QC

## Fáze léčiva na trhu

- Testování nově vyrobené šarže – QC

## Jak vybrat správnou buněčnou linii

- **Správný typ buněk** – jaterní, imunitní,...
- **Vhodné protein na povrchu** – target
- **Signalizační dráhy**
- **Imortalizované vs primární linie**
- **Adherentní vs suspenzní**

## Proměnné v buněčné eseji

- Použití pasáže – jak staré jsou buňky, když jdou do eseje (jaká pasáž)
- Koncentrace buněk v jamce destičky
- Koncentrační rozsah léčiva – dosažení křivky s horním i dolním platem
- Délka inkubace léčiva a buněk
- Způsob detekce
- Použití jiné šarže reagensů a materiálu – destičky, suplementy do médií

## Čím se mohou šarže lišit

Šarže mohou být rozdílné na základě způsobu produkce v bioreaktoru (živými buňkami – bakterie, kvasinky, savčí b.)

## Ovlivnění finálního produktu:

Kompozice živného média

Změna teploty při kultivaci v bioreaktoru

Post-translační modifikace

Jak staré buňky produkují produkt – jaká pasáž buněk je použita

## QC kontrola léčiva v pozdější fázi vývoje (IND, klinické studie, trh)

FDA a EMA vyžadují kontrolu Biologics na buněčné eseji (mohou udělit výjimku)

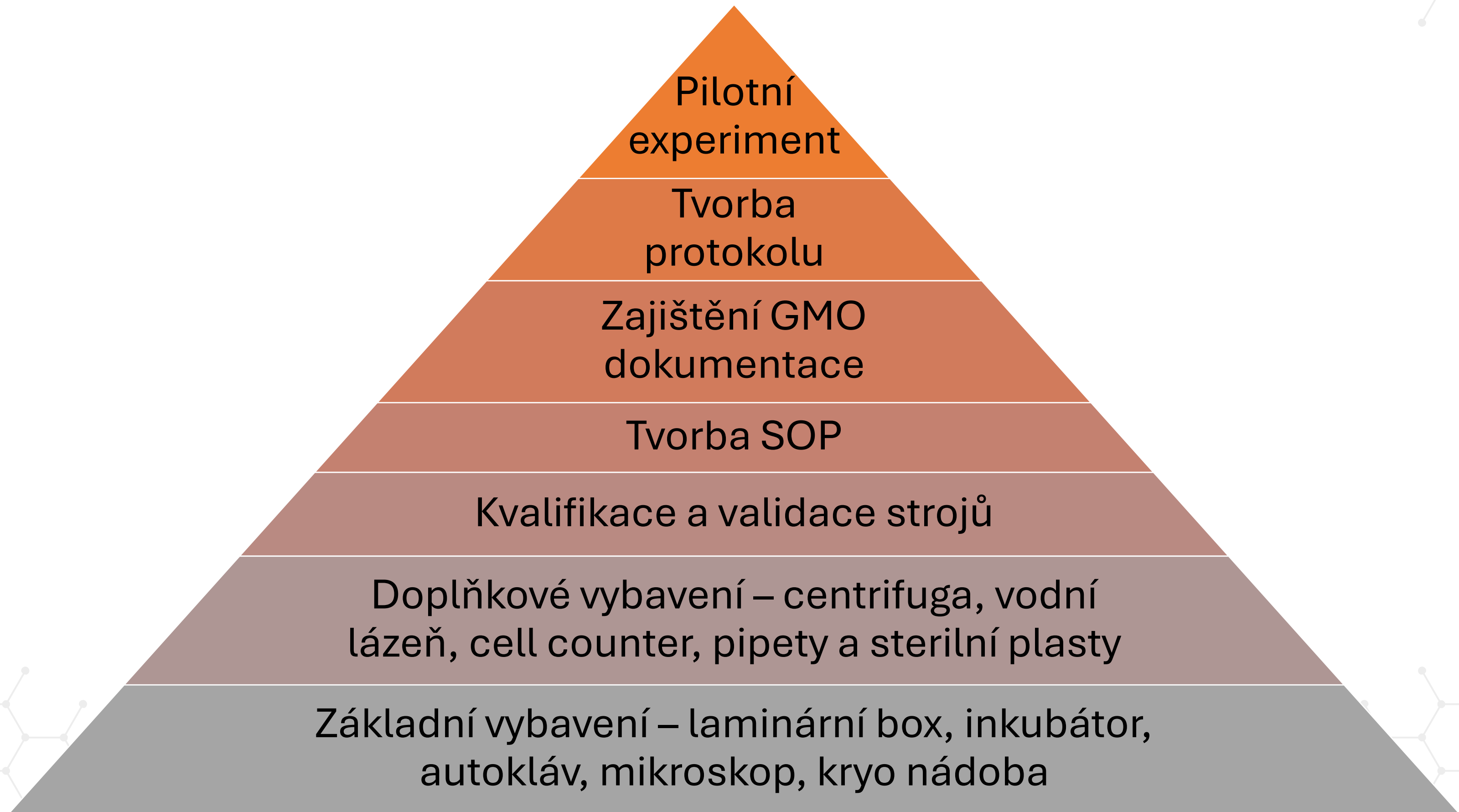
## Validovaná esej – dle příslušné legislativy

Běžná praxe je alespoň 3x destičku zopakovat – v jiný den, jiným analytikem s nově rozpěstovanými buňkami

**Nikdy není pozdě se naučit buněčné eseje.**



# Jak se staví buněčná laboratoř?



# Základní vybavení

Definice požadavků na jednotlivé přístroje – technické parametry, požadavky na software,...



Aseptická práce – majorita činností s buněčnými liniemi (pasážování, eseje, zamrazování)



Inkubace buněk – růst za kontrolovaných podmínek (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)



Sterilizace a dekontaminace – sterilizace pracovních nástrojů a dekontaminace odpadu



Kontrola buněk – počítání a sledování morfologie, kontaminace



Skladování buněk – dlouhodobé skladování při teplotách -190 až -150°C

Základní vybavení  
laminární box, inkubátor, autokláv, mikroskop, kryo nádoba

# Doplňkové vybavení

Definice požadavků na jednotlivé přístroje – technické parametry, požadavky na software,...



Centrifugace buněčné suspenze  
- vysokokapacitní



Temperace médií,  
inaktivace  
suplementů



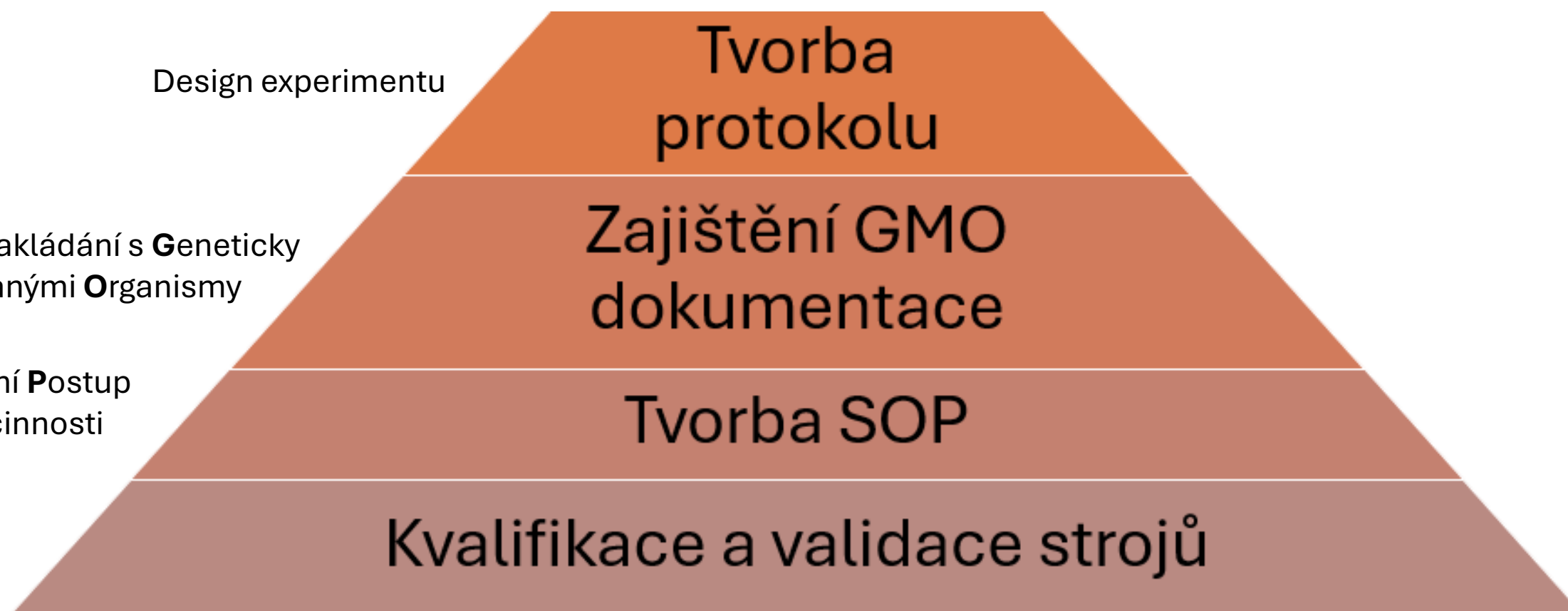
Rychlé počítání  
buněk, zjištění  
morfologie



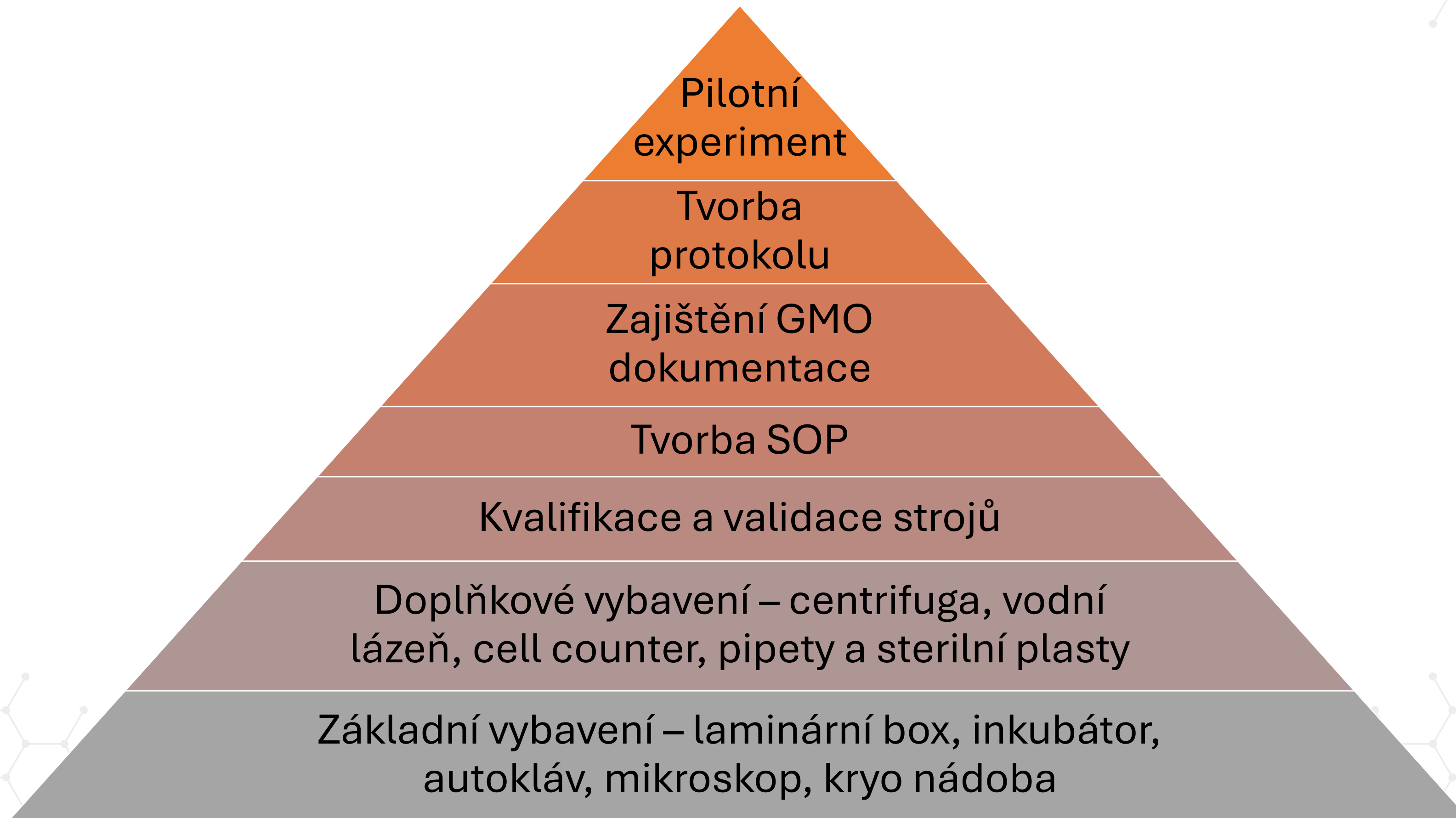
Kultivace, centrifugace

Doplňkové vybavení  
centrifuga, vodní lázeň, cell counter, pipety a sterilní plasty

# Dokumentace



# Tak se staví buněčná laboratoř





## Quinta - Analytica s.r.o.

Tel: +420 242 454 300

Email: [quinta@quinta.cz](mailto:quinta@quinta.cz)

Headquarters  
Pražská 1486/18c  
102 00 Prague 10  
Czech Republic  
[Google Maps](#)

Brno Laboratory  
Karásek 1n/2296  
621 00 Brno/Řečkovice  
Czech Republic  
[Google Maps](#)

Ostrava Clinic  
Umělecká 305/1  
702 00 Ostrava  
Czech Republic  
[Google Maps](#)

## USA Office

### Conscio Pharmaceuticals Inc.

Tel: +1 203 517 7406 | Email: [karin.cooke@consciopharma.com](mailto:karin.cooke@consciopharma.com)

36 Russ Street, 3rd Floor,  
Hartford, CT 06106, USA

[Google Maps](#)

## Follow us:

 [quinta-analytica](#)

 [www.quinta.cz](http://www.quinta.cz)

 [quinta-analytica](#)





# QUINTA ANALYTICA

a CONSCIO company

