



Hakan Dibek
Yüksek Kimyager
Satış Müdür Yardımcısı/İlaç
Ant Teknik Cihazlar



Senem Kalkan
Biyokimyager
Satış Mühendisi
Ant Teknik Cihazlar

Biyoreaktör Hücre Kültürünü İzlemek için Manuel ve Otomatik Örneklemeye Metodolojileri

Özet

Bu çalışmanın temel amacı, manuel olarak, *in-situ* (yerinde) ve otomatik olarak çekilen örneklerle biyoreaktör hücre kültürü parametrelerinin analizlerini bir *at-line* (çevrimiçi) cihazla karşılaştırmaktır. Aynı parametreler, aynı çoklu analiz cihazı kullanılarak elde edilen örneklerden analiz edildi. Glukoz, laktat ve canlı hücre konsantrasyonu için güçlü korelasyonlar elde edildi.

Giriş

Hücre kültürü ile kaliteli bir ürünü verimli bir şekilde üretmek için hücre kültürü ortamını ve hücreleri mümkün olduğunca yakından izlemek ve kontrol etmek önemlidir. *In-situ* (yerinde) sensörler olduğu sürece bunların hücre kültürü kabında direkt olarak kullanımı tercih edilir. Bu sebeple sıcaklık, çözülmüş oksijen ve pH sensörleri bütün ölçümlerdeki biyoreaktörlere dahil edilir. Fakat analizler ve hücre özellikleri doğrudan *in-situ* olarak ölçülemediğinde, hücre kültürü örneklerinin alınması ve analizinin dışarıda yapılması durumu söz konusu olur.

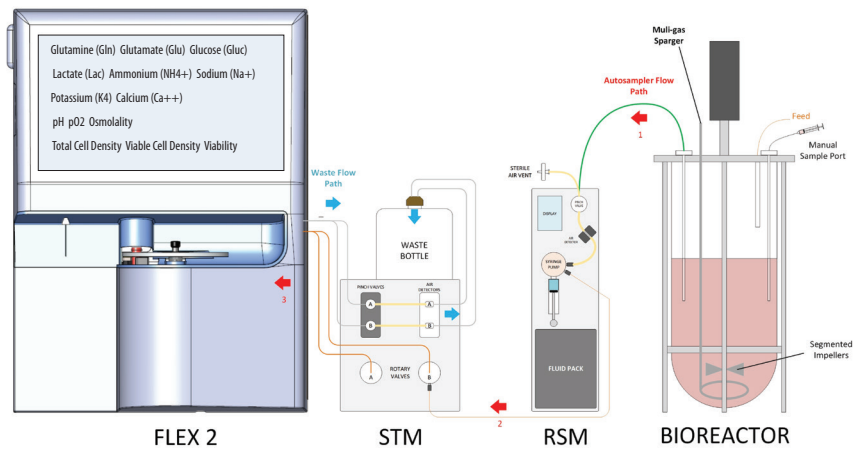
Örneğin, hücre konsantrasyonu ve canlılığı Tripan Mavis'i, glukoz ve laktat kullanılarak genel olarak biyoreaktörden manuel ya da otomatik örnek alınarak off-line ya da *at-line* olarak ölçülür. Her iki örnekleme metodolojisinde de faydalar vardır, ikincisi daha zengin bir veri havuzunun oluşturulmasını kolaylaştırır ve biyoprosesin daha sıkı kontrolünü sağlar.

Her iki metodoloji için de kültür ortamının sterilitesinin korunması önemlidir ve bu nedenle güvenilir örnekleme prosedürlerine ihtiyaç vardır.

Amaç

- *In-situ* ve *at-line* araçları kullanarak bir biyoreaktörde fed-batch hücre kültürünün izlenmesi

- Hücre kültürünün manuel ve otomatik prosedürler kullanarak steril olarak örnekleme,
- Hücre kültürünün temel parametrelerinin çoklu analit analizörü ile ölçülmesi ve karşılaştırılması.



Şekil 1. Otomatize Biyoreaktör Platformu



Şekil 2. Nova Biomedical FLEX2 Otomatik Hücre Kültürü Analizörü, OSM48 Ozmometre Modülü ve FLEX2 Online Otoörnekleyici

Metot

CHO-DG44 hücreleri, başlangıç glukoz miktarı yaklaşık 6g/L olan Dynamis™ Medium (Thermofisher Scientific, Waltham MA) kullanılarak 2 litrelik biyoreaktörde 9 günlük bir süre boyunca çoğaltıldı.

Glukoz konsantrasyonu deney boyunca azaldı ve eklem yapılarak 2g/L üzerinde tutulması hedeflendi.

Her gün birden fazla manuel ve otomatik numune alındı. Biyoreaktör, verilerin gerçek veya neredeyse gerçek zamanlı olarak görselleştirilmesini sağlayan bir veri kaydedicisine bağlandı. Belirli bir zaman noktası için, önce otomatik örnekleme başlatıldı ve hemen sonrasında manuel örnekleme yapıldı.

Tüm örneklerin analizi için aynı çoklu analit analizörü BioProfile® FLEX2™ (Nova Biomedical, Waltham MA) kullanıldı. Otomatik numuneler için reaktör örnekleme modülü (RSM), biyoreaktördeki kültürden doğrudan 5.6 mL çeker ve örnek transfer modülüne (STM) aktarır. Bu çalışmada, STM iki RSM'yi çoğaltır; biri örnekleme için kullanılırken diğeri temizlenir, bu da önceki numuneden sonra temizliğin tamamlanması beklemeden arka arkaya analiz yapılmasına izin verir. Aspirasyondan dağıtıma kadar yaklaşık 2-3 dakika sürer (Adım 1-3, Şekil 1).

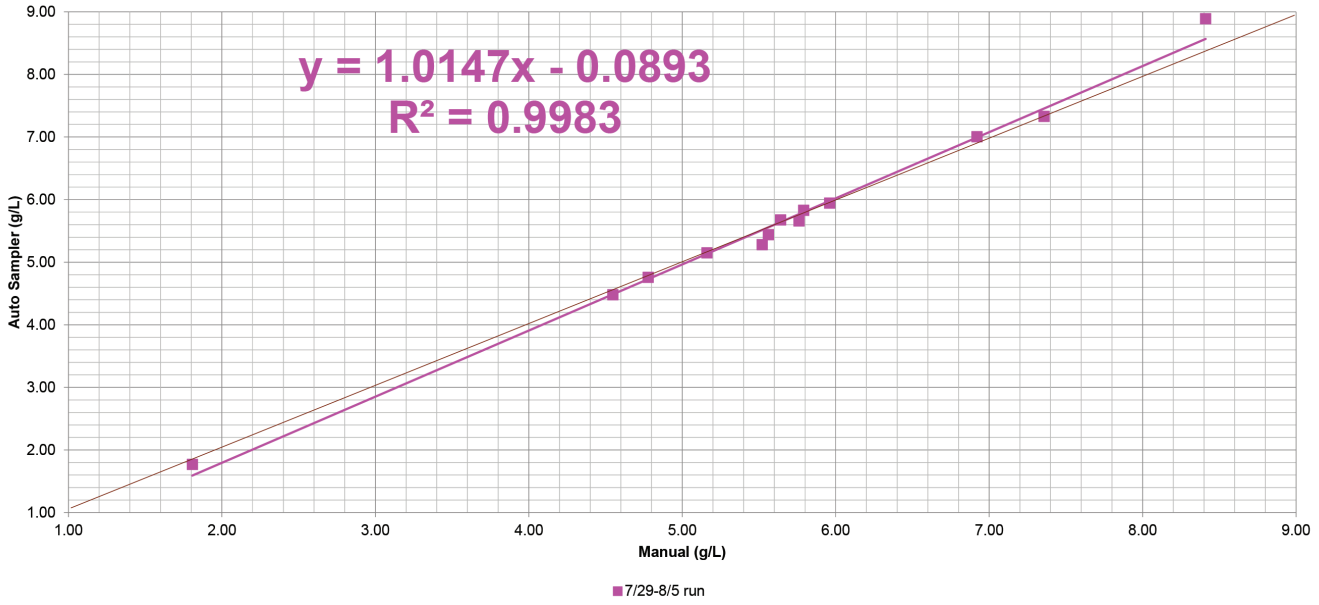
1. Adım, 5.6 mL'lik bir kültür numunesinin 3.8 mL'sinin alındığı ve numunenin biyoreaktörden RSM'ye taşındığı hareketi içerir.

2. Adım, numunenin RSM'den STM'ye olan hareketini içerir.

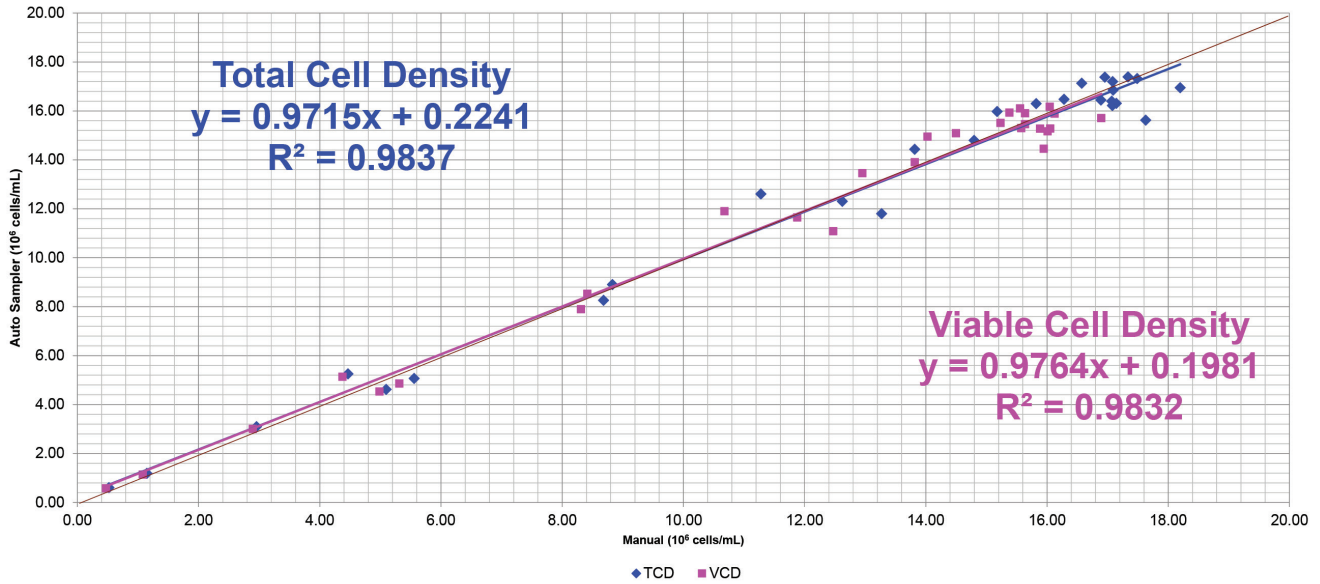
3. Adım, numunenin STM'den FLEX 2'ye hareketidir. Analiz süresi 4-5 dakikadır ve analiz 3. adımdan sonra Flex2'de gerçekleşir. Örnek analiz edildikten sonra cihazın hatları deproteinize edici çözelti ile yıkanır ve bir sonraki örnek analizi için hava ile temizlenir.

Manuel örnekleme için, 3 mL'lik bir şırınga kullanılarak önce bir boşluk hacmi alındı, daha sonra 5 mL'lik bir şırınga kullanılarak 4 mL ekstrakte edildi ve 1,5 mL örnek analiz edildi.

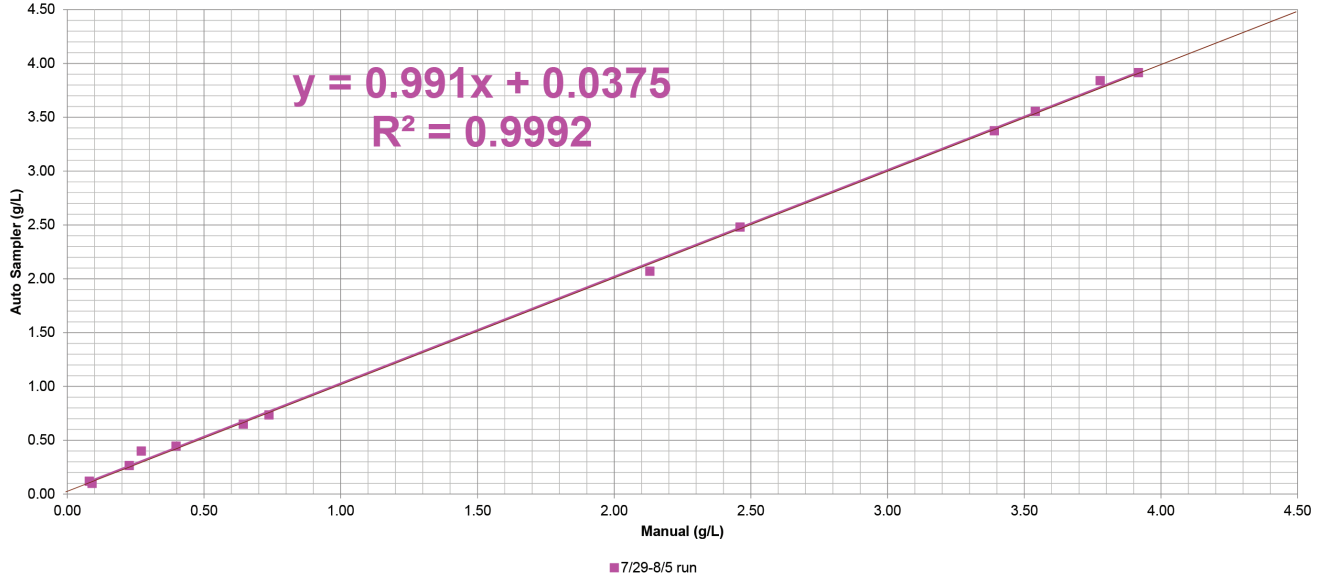
Manuel örnekleme portu Şekil 1'de bir şırınga ile gösterilmiştir. Analizörün probu (Şekil 1'de "in-situ Manuel örnekleme portu" olarak etiketlenmiştir) numunenin 350 µl'sini alır ve bu, her numune için üç tekrarlı olarak yapılır. Örnek alındıktan sonra prob, probu çevreleyen bir yıkama kılıfına çekilir. Deproteinize edici çözelti, şırınga pompası ile RSM üzerindeki sıkıştırma valfi arasındaki hat segmentini sterilize etmek için kullanılır. Daha sonra reaktörü şırınga pompasından izole etmek için hat kuru bırakılır.



Şekil 3. Glukoz düzeyleri izlenirken Manuel ve Otomatik Örnekleme karşılaştırılması. Determinasyon katsayısı 0.99'un üzerindedir, bu da güçlü bir korelasyona işaret eder.



Şekil 4. Toplam hücre yoğunluğu (TCD) ve canlı hücre yoğunluğu (VCD) üzerinden Manuel ve Otomatik Örnekleme karşılaştırılması. Determinasyon katsayısı 0.98'in üzerindedir, bu da güçlü bir korelasyona işaret eder.



Şekil 5. Laktat seviyeleri izlenirken Manuel ve Otomatik Örneklemenin karşılaştırılması. Determinasyon katsayısı 0.99'un üzerindedir, bu da güçlü bir korelasyona işaret eder.

Veriler

Hücre kültürü boyunca glukoz ve laktat konsantrasyonları, toplam ve canlı hücre yoğunlukları, otomatik sistem aracılığıyla ve şırınga ile manuel olarak çekilen örneklerden izlendi.

Otomatik örnekleme ile manuel metodoloji ile elde edilen datarlar ile 4 parametrenin (glukoz ve laktat konsantrasyonları, toplam ve canlı hücre yoğunlukları) her biri için doğrusal bir regresyon çizildi ve 0.98'den az olmayan bir determinasyon katsayısı elde edildi.

Sonuç ve Gelecek Çalışmalar

1. Otomatik ve manuel örnekleme metodolojileri ile elde edilen veriler arasında güçlü bir korelasyon olduğunu görülmüştür.
2. Otomatik örnekleme cihazı normalde *in-situ* ölçülemeyen anlık glukoz, laktat, toplam ve canlı hücre yoğunlukları gibi önemli hücre kültürü parametrelerinin analizi için manuel örnekleme yerine kullanılabilir.
3. Örnekleme otomasyonu, örnekleme süresini manuel metodolojiye benzer tutarken, proses verilerinin günün her saatinde toplanmasını kolaylaştırmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalar arasında, otomatik numune alma platformuyla elde edilen ölçümlerden

glukoz konsantrasyonunu sabit tutabilme gibi proses kontrolü metodolojisinin tasarımı yer alacaktır.

Orijinal Doküman

Manual and automated sampling methodologies for monitoring bioreactor cell culture,
Christa Ettee Nasri, Amey Abraham, Kenneth Vieira, Daniel Peterson and Jean-François Hamel (jhamel@mit.edu)
Massachusetts Institute of Technology, Chemical Engineering Department, Cambridge MA 02139
Çalışmanın poster sunumu, 12-16 Ağustos 2019 tarihlerinde Boston, MA'da gerçekleştirilen Biyoproses Zirvesi'nde yapılmıştır.