



Hakan Dibek

Yüksek Kimyager  
Satış Müdürü  
Yaşam Bilimleri  
Ant Teknik Cihazlar



Senem Kalkan

Biyokimyager  
Satış Mühendisi  
Ant Teknik Cihazlar

## micro-Matrix 24 Paralel Mikro-biyoreaktörde İzlenen CHO Hücreleri

### Giriş

Günümüzde hızlı proses geliştirme ve optimizasyon çalışmaları için ölçek küçültme metotları uygulanması, yeni terapilerin araştırılmasında ve maliyet etkin ilaç geliştirmede önemli bir rol oynamaktadır. (Barrett et al., 2010).

24'lü standart yuvarlak kuyucuklu plakalar (24 SRW), memeli hücre hatlarının kültivasyonu için uygun bir format olarak kurulmuş ve çalkalama şişeleri için küçültme modeli olarak başarıyla kullanılmıştır. (Micheletti & Lye, 2006; Silk et al., 2010).

Geleneksel mikrotitre plakaları, uygun bir fiyata yüksek derecede paralel çalışma fırsatı sunsa bile pH, çözülmüş oksijen ( $dO_2$ ) ve sıcaklık (T) gibi önemli proses parametrelerinin izlenmesinden ve kontrolünden yoksundur. Applikon'un micro-Matrix'i bu kültür parametrelerinin tam olarak izlenmesini ve kontrolünü sağlayarak bu boşluğu kapatır.

Platform, 24 derin kuyulu mikrotitre formatına dayalı 24 ayrı mikro biyoreaktör barındırır.

Bu çalışmada micro-Matrix; GS-CHO hücre hattı CY01 batch kültürünün pH (aşağı-kontrol),  $dO_2$  (yukarı ve aşağı kontrol) ve T (sıcaklık) kontrollü koşulları altında izlemek için kullanıldı.

Elde edilen sonuçlar, parametre profili açısından 24 kuyucukta tekrarlanabilir davranışı ortaya koymakta ve işlem sırasında pH için ek yukarı kontrolün gerekli olduğunu göstermektedir.

Canlılık, büyüme kinetiği, glukoz tüketimi ve titre üretimi gibi çevrimdışı ölçümler de yapıldı.

Ek olarak, buharlaşmanın micro-Matrix'te mikrotitre plakasına göre daha düşük olduğu görüldü ve bu da  $dO_2$  kontrol döngüsünün hücre kültürü için faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, beslemeli kesikli kültür gibi diğer uygulamalarda kullanılacak işlemin daha iyi anlaşılması için bir CHO hücre grubu izlenmiştir.

micro-Matrix, mikro ölçekli hücre kültürü uygulamaları için tam olarak izlenebilen ve kontrol edilebilen bir ortam elde etmek için uygun bir araç olduğunu kanıtladı.

### Materiyal ve Metot

#### -Ön Kültivasyon

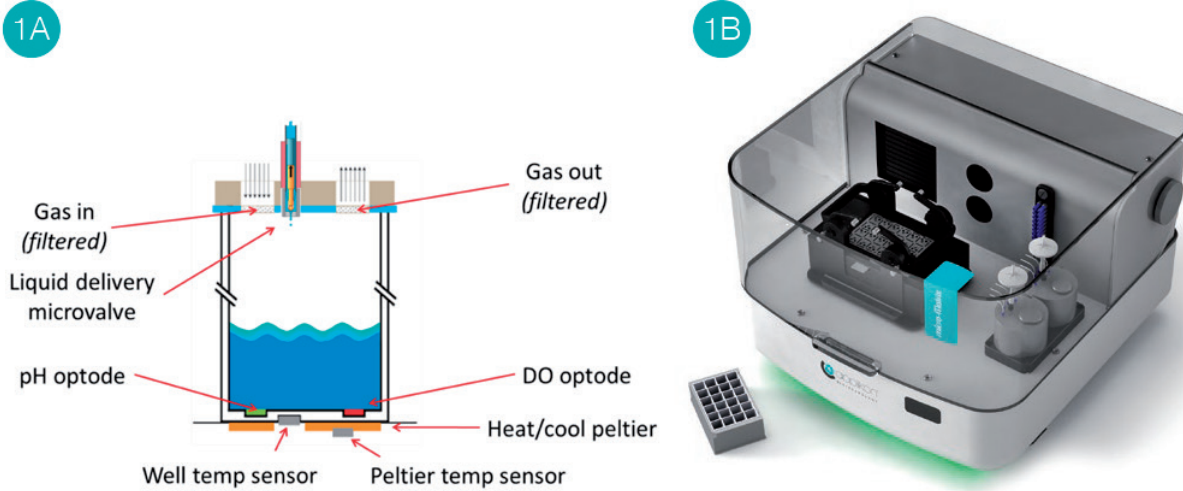
Hücreler çözündürülüp, 25  $\mu$ M MSX (Sigma-Aldrich) ile CD-CHO (Life Technologies, UK) içinde bir havalandırma kapaklı (Corning Life Sciences, ABD) 250 mL'lik bir çalkalama şişesinde 7 gün boyunca büyütülmüştür. Çalkalama şişesi, 25 mm'lik bir orbital çapına sahip ve çalkalama hızı 150 rpm'ye ayarlanmış bir orbital çalkalayıcıya (Sartorius, UK) yerleştirildi ve 37°C'de, %5  $CO_2$  ve %70 nemde inkübe edildi.

#### -Micro-Matrix'te Batch Kültivasyon

Uygun miktarda CD-CHO ortamı kullanılarak  $0.3 \times 10^6$  canlı hücre / mL son konsantrasyona sahip bir süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyonun 3.5 mL'lik hacmi, 24 derin kare oyuklu kaset (Applikon, Hollanda) için kullanıldı.

Micro-Matrix kaseti üst plaka ile kapatıldı, gaz besleme hatlarına bağlandı ve micro-Matrix'in optik termal modülüne (OTM) kelepçelendi (Şekil 1).

Parametreler  $\text{pH}=7.2$ ,  $\text{dO}_2 = \%30$  ve  $T= 37^\circ\text{C}$  çalkalama hızı= $220 \text{ rpm}$  olarak ayarlandı.  $\text{CO}_2$  ilavesiyle pH aşağı kontrolü sağlanırken,  $\text{dO}_2$  kontrolü basınçlı hava ve  $\text{N}_2$  ilavesiyle yukarı ve aşağı kontrol sağlandı.



**Şekil 1A:** Üst plaka, takılı filtre çubukları ve otomatik sıvı besleme için Sıvı Dağıtım Modülünün bir mikro valfiyle kaplı bir micro-Matrix kasetinin temsili kuyusu.  $\text{dO}_2$  ve pH için optik sensörler kuyunun dibinde bulunur. Sıcaklık sensörünün yanı sıra ısıtıcı ve soğutucu, OTM'nin bir parçasıdır.

**Şekil 1B:** Mikrotiter sistemi, sıcaklık kontrollü bir bölmeye yerleştirilen 2.5 cm'lik bir çalkalama çapı olan dahili bir orbital çalkalayıcı içerir. micro-Matrix kaset, OTM'nin üstüne oturur ve basınçlı besleme şişelerine ve bir gaz kaynağına bağlanır.

## -Analitik Metotlar

Canlı hücre konsantrasyonu ve canlılığı, Tripkan Mavisi boyama yöntemine dayanan Vi- CELL XR (Beckman Coulter, UK) kullanılarak belirlendi. Örnekler, Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (Thermo Fisher Scientific, UK) ile 1:1 oranında seyreltildi.

Metabolit konsantrasyonları, NOVA Bioprofile Flex (Nova Biomedical, UK) kullanılarak belirlendi. Örnekler Milli-Q su ile 1:1 oranında seyreltildi.

IgG4 ölçümü, 1 mL HiTrap Protein G HP kolonuyla (GE Healthcare, UK) bir Agilent 1200 (Agilent Technologies, UK) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak yapıldı. Kolonu çalıştırmak için pH'ı 7 ye ayarlanan 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Fluka, Kat No. 71642-

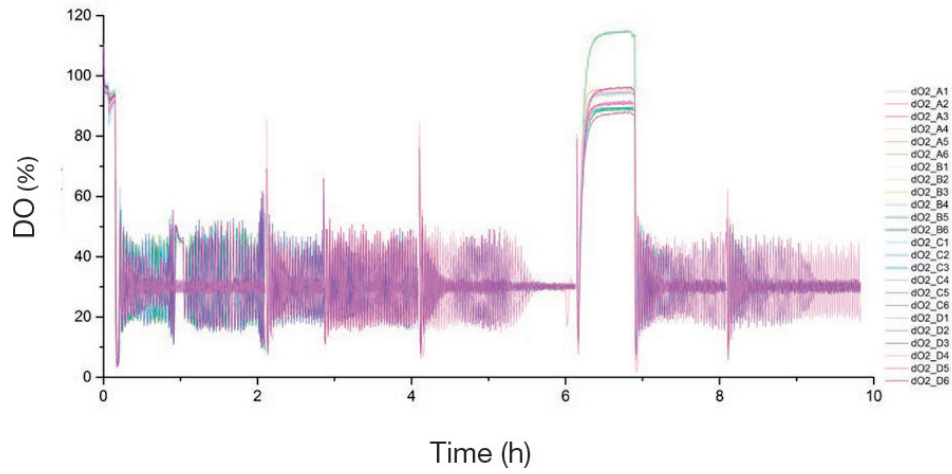
1KG) ve 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Kat No. 71507-1KG) tampon ve pH'ı 2.8'e ayarlanan 20 mM glisin (VWR, Kat No. 101196X tampon çözeltileri kullanıldı. Elüsyon piki, 260 nm'de UV yoluyla kaydedildi ve ortaya çıkan IgG4 konsantrasyonunu hesaplamak için bir standart kullanıldı. Analitik sonuçlar buharlaşma için düzetildi.

## Tartışma

### -Parametre Kontrolü

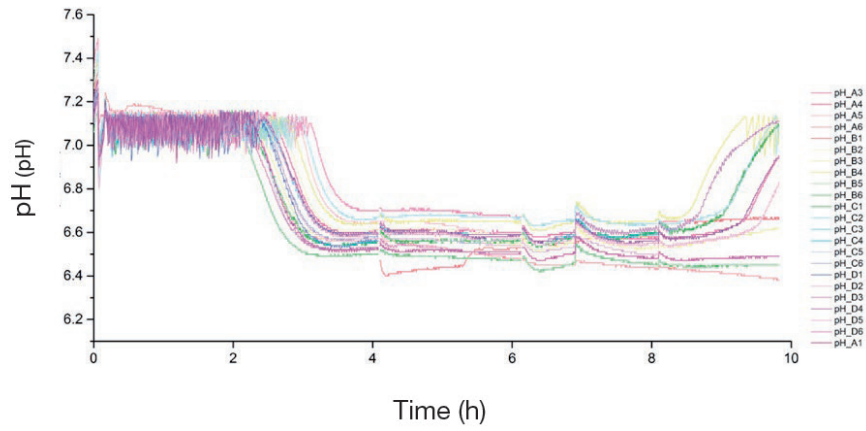
Micro-Matrix, pH,  $\text{dO}_2$  ve T'nin iyi izlenmesini ve kontrolünü gerçekleştirebilirliği ve 24 kuyucuktaki sonuçların tekrarlanabilirliği Şekil 2'de gösterilmiştir. pH'ın proses sırasında 6.5'e düştüğü ve ayar noktasını 7.2'de tutmak için pH'ın yukarı kontrolünün gerekli olduğunu görüldü.

2A



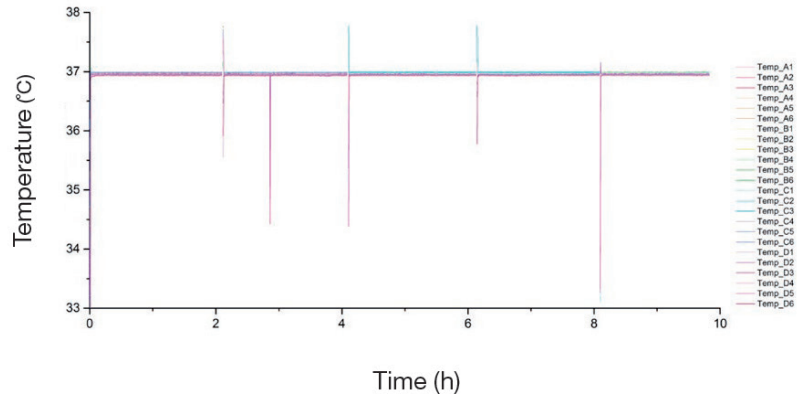
Şekil 2A: 24 kuyu için micro-Matrix'te parametre kontrolü, çözülmüş oksijen profili.

2B



Şekil 2B: 24 kuyu için micro-Matrix'te parametre kontrolü, pH profili.

2C

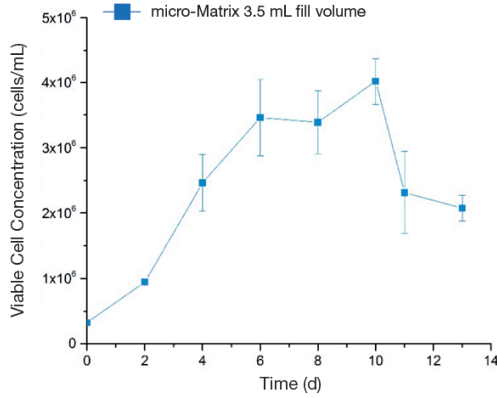


Şekil 2C: 24 kuyu için micro-Matrix'te parametre kontrolü, sıcaklık.

### -Büyüme Kinetiği

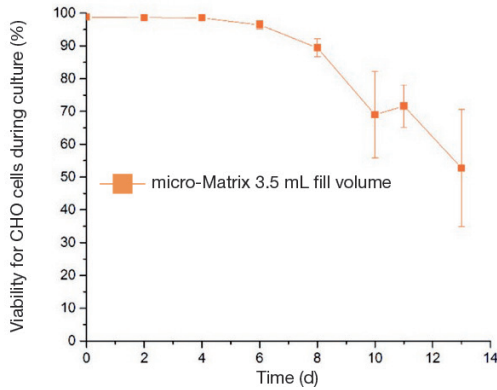
Hücre konsantrasyonunun, ilk 6 gün boyunca sürekli olarak arttığı (Şekil 3A) ve daha sonrasında canlı hücre konsantrasyonu 2 gün boyunca durgun kaldığı görüldü. Maksimum hücre yoğunluğuna 10. günde  $4 \times 10^6$  hücre/mL ile ulaştı. Canlılık, ilk kültür döneminde %90'ın üzerindeyken yaklaşık 8 günlük kültürasyondan sonra 13. günde yaklaşık %53'e düşmeye başladığı görüldü. (Şekil 3B).

3A



Şekil 3A: Micro-Matrix'te büyütülen CHO hücreleri için büyüme kinetiği.

3B



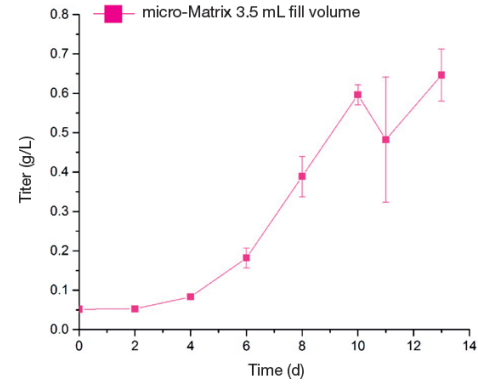
Şekil 3B: Micro-Matrix'te büyütülen CHO hücreleri için canlılık.

### -Üretim Kinetiği

Kültürasyonun ilk 4 günündeki lag aşaması ardından titrenin, 10. güne kadar hızla arttığı ve 14. günde yaklaşık 0.6 g/L olan maksimum değerine ulaştığı görüldü (Şekil 4).

En yüksek üretim verimliliğinin, logaritmik büyüme aşamasının sonuna denk geldiği görüldü. Bu hücre hattının üretkenliği, bu nedenle, büyümeyle ilişkili olmayan olarak kabul edilebilir.

4



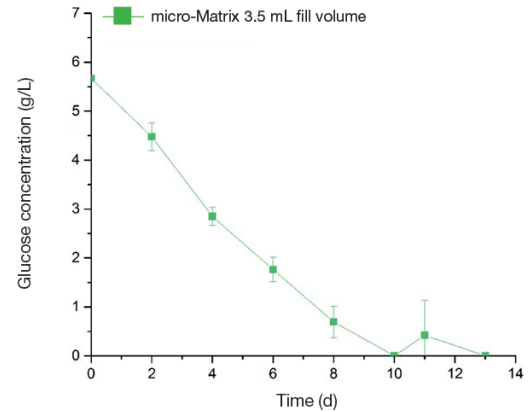
Şekil 4: micro-Matrix'te yetiştirilen CHO hücreleri için üretim kinetiği.

### -Metabolik Profil

Glukoz konsantrasyonunun, 5,7 g/L'den sürekli olarak azaldığı ve kültürasyonun 10. gününde tükenmiş olduğu görüldü. (Şekil 5A).

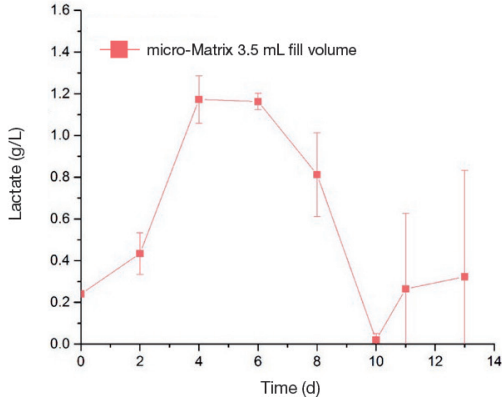
Kültürasyonun ilk 4 günü içinde laktat konsantrasyonu büyük ölçüde arttığı ve ardından 2 gün boyunca sabit kaldığı görülmüştür. (Şekil 5B). Daha sonra, laktat hücreler tarafından kullanılır ve 10. günde tükenmeye ulaşmadan önce konsantrasyonu azalır. 11. ve 13. günde, laktat konsantrasyonunda hafif bir artış gözlemlenebilir.

5A



Şekil 5A: Glukoz tüketimi.

5B

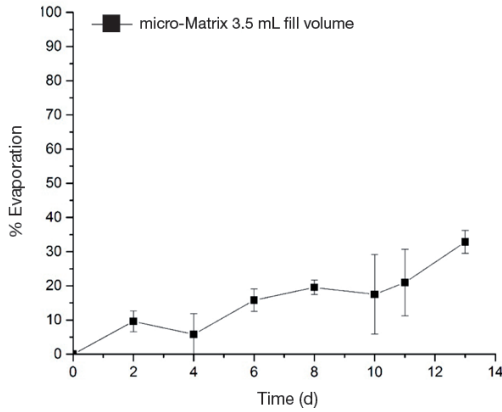


Şekil 5 B: Laktat üretimi / tüketimi.

## Buharlaşma

Kültivasyonun 14. gününde buharlaşma giderek arttı ve maksimum %30'a ulaştığı görüldü (Şekil 6). Hata çubuklarından görülebileceği gibi, bazı kuyular buharlaşmada önemli değişkenliğe tabidir. Geleneksel mikrotitre plakalarının aksine, bu değişkenliğin kuyu konumundan bağımsız olduğu görülmektedir.

6



Şekil 6: micro- Matrix'te büyütülen CHO hücreleri için buharlaşan kuyu içeriğinin yüzdesi.

## Sonuç

- micro-Matrix, kültür koşullarının izlenmesi ve kontrol edilmesinin avantajları ile GS-CHO hücre hattı CY01'i yetiştirmek için başarıyla kullanıldı.
- pH, çözülmüş oksijen ve sıcaklık profilleri 24 kuyucukta yeniden üretilebilir ve tekrarlanabilir olduğu görülmüştür.
- pH kontrolü başarılı ile sağlandı, ancak yukarı kontrolünün de gerekli olduğu görülmüştür.
- Üretim verimliliğinin büyüme ile ilişkili olmadığı, durgun canlı hücre konsantrasyonu ve laktat tüketiminin başlangıcı ile çakıştığı görülmüştür.
- Laktat profilinin, CHO hücreleri için tipik üretim/tüketim modelini takip ettiği görülmüştür.
- Buharlaşmanın, geleneksel mikrotitre plakalarından daha düşük olduğu görülmüştür, bu da  $dO_2$  kontrol döngüsünün kullanılmasının hücre kültürü için yararlı olduğu anlamına gelmektedir.

## Orijinal Doküman

micro-Matrix Monitored CHO cell batch in 24 parallel micro-bioreactors, Wiegmann, V<sup>1.</sup>, PhD-researcher, Bernal, C<sup>2.</sup>, PhD, Kreukniet, M<sup>2.</sup>, Msc, Baganz, F<sup>1.</sup>, Prof. 1 Department of Biochemical Engineering, University College London, Gordon Street, WC1H 0AH, London, U.K. 2 Applikon-Biotechnology BV. Heertjeslaan 2, 2629JG. Delft, The Netherlands.