



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



Senem Kalkan
Biyokimyager
Satış Mühendisi
Ant Teknik Cihazlar

Vero Hücre Kültürü için Geliştirilmiş Tek Kullanımlık Biyoreaktör (S.U.B.) Performansı

Giriş

Vero hücreleri gibi adherent hücre kültürleri ile çalışmak, süspanse hücre kültürlerine göre daha zordur. Mikro taşıyıcılar, adherent hücreler için mevcut yüzey alanını büyük ölçüde artırıp biyoreaktörlerde hücre çoğaltması için esneklik sunuyor olsa da scale-up çalışmaları karıştırma ve diğer proses parametrelerinin optimizasyonunu gerektirmektedir. Benzer şekilde, scale-up çalışmaları boyunca hücrelerin mikro taşıyıcılardan ayrılmasını ve yeniden tutunmasını sağlayan parametrelerin seçimi ve optimizasyonu da başarı için hayati önem taşımaktadır. Bu uygulama notu, Thermo Scientific™ HyPerforma™ Single Use Biyoreaktörlerin (S. U. B. s), GE Healthcare Cytodex™ 1 mikro taşıyıcılar ve serum içermeyen besiyeri ile farklı kültür hacimlerinde adherent hücrelerin nasıl büyütülebileceğini göstermektedir. Her bir ölçeklendirme adımında hücrelerin boncuktan-boncuğa transfer yöntemleri de ana hatlarıyla belirtilmiştir.

Geliştirilen S.U.B., çeşitli modifikasyonlarla adherent hücre büyümesi için optimize edilmiştir. Ayrıca S.U.B. BioProcess Container (BPC) da kolay besiyeri değişimi yapılabilecek şekilde modifiye edilmiştir.

Malzemeler ve Yöntemler

Vero hücreleri, inkübatör ve biyoreaktör kültürü boyunca VP-SFM besiyerinde tutulmuştur. Bu çalışma için kullanılan başlıca malzemeler Tablo 1'de listelenmiştir. İlk hücre kültürleri şişelerde başlatılmış ve sonunda Nunc Cell Factory sistemlerine, ardından sırasıyla 5 L'lik bir cam biyoreaktör ve S.U.B.'lara ölçeklendirilmiştir.

Tablo 1. Adherent Vero hücre kültürü ve scale-up için kullanılan malzemeler

Components	Description
Cell line	Vero cells (ATCC™ CCL-81™ cells)
Microcarrier type	GE Healthcare™ Cytodex™ 1 beads
Composition of medium	Gibco™ VP-SFM AGT™ Medium with 6 mM glutamine and 1 g/L Pluronic™ F-68 surfactant
Wash solution	Gibco™ DPBS
Dissociation agent	Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme
Quenching agent	Gibco™ Soybean Trypsin Inhibitor
Base solution	0.5 N NaOH
Antifoam agent	Sigma-Aldrich™ Antifoam C Emulsion at 10,000 ppm in DPBS
Tissue flasks	<ul style="list-style-type: none"> Thermo Scientific™ Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks Nunc™ EasyFill™ Cell Factory™ systems
Benchtop bioreactors	5 L glass bioreactor
S.U.B. hardware	<ul style="list-style-type: none"> HyPerforma 50 L S.U.B. with 4:1 drive shaft HyPerforma 250 L S.U.B. with 4:1 drive shaft HyPerforma 500 L S.U.B. with 4:1 drive shaft
BPCs (Aegis5-14 film)	<ul style="list-style-type: none"> HyPerforma 50 L S.U.B. BPC for microcarriers (Cat. No. SH31150.01) HyPerforma 250 L S.U.B. BPC for microcarriers (Cat. No. SH31150.03) HyPerforma 500 L S.U.B. BPC for microcarriers (Cat. No. SH31150.04)

ÜRÜN TANITIMI

Hücre Kültürü Hazırlıkları

Mikro taşıyıcılar, otoklav sterilizasyonundan önce ürün talimatlarına göre nemlendirildi ve DPBS ile yıkandı. VP-SFM AGT Ortamı, Thermo Scientific™ Tek Kullanımlık Karıştırıcı (S.U.M.) sistemleri kullanılarak ürün talimatına göre sulandırıldı ve steril filtrasyonla sterilize edildi. S.U.B. BPC'lerde pH için Hamilton™ OneFerm™ tek kullanımlık sensör ve çözülmüş oksijen (DO) için Thermo Scientific™ TruFluor™ probu kullanıldı. Kültür örnekleri, hücrelerin tutunmasını ve büyüme oranını değerlendirmek için günlük olarak alındı. Günlük numune alımı, ilk olarak numune hattını temizlemek için reaktörden 10 mL alınıp uzaklaştırılması ve ardından yeni bir 10 mL numune alınmasından oluşmaktadır. Bu 10 mL numuneden 1 mL süpernatant, besin tüketimi ile metabolik atık oluşumunu ölçmek için Nova Biomedical™ Bioprofile FLEX2™ cihazına yüklendi ve analiz edildi. Kültür görsel olarak incelenmek için de bir mikroskop lamı üzerine birkaç damla alındı ve bunun yanı sıra bir hemositometre üzerinde kristal viyole/sitrik asit çekirdek boyama yöntemi kullanılarak hücre sayımı için yaklaşık 8-9 mL kullanıldı.

Biyoreaktör Ekimi, Kültivasyonu ve Scale-up

Vero hücrelerinin, kademeli olarak şişelerden 4 katmanlı ve 10 katmanlı Nunc Cell Factory sistemlerine scale-up çalışması yapıldı. Daha sonra hücreler besiyerinden ayrıştırıldı ve 15 g mikro taşıyıcı içeren 5 L'lik bir cam tezgâh üstü biyoreaktöre ekildi. Boncuklara hücre tutunması ilk aşamada yavaş ve sürekli karıştırma yoluyla sağlandı. İlerideki aralıklı karıştırma işlemleri için taze mikro taşıyıcılar ve besiyeri kullanılmasından önce, hücrelerin büyümeleri için her hacim seviyesinde 4-5 gün süreyle beklendi. Boncuklar ve hücreler 16L'lik başlangıç hacmi ile taze VP-SFM içinde toplam 48 g olacak şekilde ilave 33 g boncuk HyPerforma 50 L S.U.B.'a transfer edildi. Aralıklı karıştırma (45 dakika çöktürme ve 5 dakika karıştırmadan oluşan döngüler) 8 saat boyunca reaktöre gaz eklenmeden gerçekleştirildi. Bu süreden sonra hücreler tutundu ve Tablo 2'de özetlendiği gibi çalışma için çalkalama ve gaz ekleme parametreleri ayarlandı.

Tablo 2. Geliştirilmiş HyPerforma S.U.B. için önerilen biyoreaktör koşulları

Parameter	50 L S.U.B.	250 L S.U.B.	500 L S.U.B.
Working volume	16 L*/50 L	250 L	500 L
Temperature	37°C	37°C	37°C
pH	7.3 (CO ₂ /0.5 N NaOH)	7.3 (CO ₂ /0.5 N NaOH)	7.3 (CO ₂ /0.5 N NaOH)
Agitation	35 rpm*/42.8 RPM	26.2 rpm	20.5 rpm
Tip speed	0.27*/0.33 m/s	0.34 m/s	0.34 m/s
DO setpoint	30%	30%	30%
DO cascade	Air/O ₂ through standard drilled-hole sparger	Air/O ₂ through standard drilled-hole sparger	Air/O ₂ through standard drilled-hole sparger
Headspace sparge	Air at 10 L/m ² /min, 1.0 LPM	Air at 10 L/m ² /min, 2.8 LPM	Air at 10 L/m ² /min, 4.5 LPM
Antifoam	As needed	As needed	As needed
Target seeding density	2.5 x 10 ⁵ cells/mL or 1.89 x 10 ⁴ cells/cm ²	2.5 x 10 ⁵ cells/mL or 1.89 x 10 ⁴ cells/cm ²	2.5 x 10 ⁵ cells/mL or 1.89 x 10 ⁴ cells/cm ²
Microcarrier concentration	3 g/L	3 g/L	3 g/L
Intermittent mixing parameters	45 min off/5 min on, for 8 hours	45 min off/5 min on, for 8 hours	45 min off/5 min on, for 8 hours

* Denotes initial operation at lower volume for in-vessel scale-up.

2. günden başlayarak, besiyerinin %50'si günlük olarak değiştirildi. Besiyerini değiştirmek için gazlar ve çalkalama kapatılarak mikro taşıyıcıların ve hücrelerin çökmesine izin verildi. Kültür ortamının yarısı, mikro taşıyıcı boncuk paketi seviyesinin hemen üzerindeki bir boşaltma portundan boşaltıldı. Daha sonra BPC'nin tepesindeki bir besleme hattından taze besiyeri ilave edildi ve reaktör parametreleri yeniden başlatıldı. Çalkalama durdurulduğunda sırada, kaptaki sıcaklık dalgalanmalarını önlemek için sıcaklık kontrolü de durduruldu. Bunun yerine, harici sıcaklık kontrol ünitesi bu işlemler sırasında 37°C'ye ayarlandı. Bunlar tamamlandıktan sonra sıcaklık kontrolü yeniden başlatıldı.

Hücreler konflüent olduktan sonra, hacim kültür ortamı ile 50 litre çalışma hacmine tamamlandı ve son mikro taşıyıcı konsantrasyonu 3 g/L olacak şekilde taze boncuklar eklendi. Reaktöre boncuklar eklendikten sonra boncuktan boncuğa hücre transferini sağlamak için aralıklı karıştırma gerçekleştirildi. Hücreler, her gün %50 besiyeri değişimi ile tekrar 4-5 gün büyütüldü. Daha sonra 50 L'lik reaktörün içeriği 250 L S.U.B.'a tam hacimde transfer edildi ve içerisine 3 g/L mikro taşıyıcı olacak şekilde taze boncuklar eklendi. 250 L'deki büyümenin tamamlanmasından sonra, split oranları korunarak 500 L'lik reaktöre ekim yapmak için 250 L hacmin yaklaşık yarısı kullanıldı. Yeni boncukların eklen-

diği her adımda, Vero hücrelerinin boncuktan boncuğa transferine izin vermek için aralıklı bir karıştırma adımı tamamlandı.

Geliştirilmiş S.U.B. Mikro Taşıyıcılar için: Kap Modifikasyonları

Bu biyoreaktörlerdeki pervane boyutu, bir boy daha büyük bir kap için olan pervane kullanılarak artırıldı. Bu boyut değişikliği, yeterli karıştırma sağlamak için dönüş başına güç girişi miktarını artırırken sıvı kesilmesini azalttı. Pervane yerleşimi, pervaneyi kabın altına ve merkezine yaklaştırmak için çevirme mili uzunluğu ve açısı kombinasyonu ile modifiye edildi.

Boncuk paketi içine daldırılmış olan problemlerin yerleşimi nedeniyle, çökmüş hücrelerin ve mikro taşıyıcıların rahatsız edilmesini önlemek için aralıklı karıştırma sırasında gaz kontrolünün kapatılması önemlidir. Gaz ekleme, BPC'ye dahil edilen standart lazerle delinmiş delikli sparger ile kontrol edildi. Çalkalama, kesme kuvvetleri için bariz bir endişe noktası olsa da, hücreler üzerindeki kesmeyi en aza indirmek için gaz ekleme sistemi de göz önünde bulundurulmalıdır.

Buna yardımcı olmak için, gaz ekleme işlemi saf oksijen ile kontrol etmek, yeterli oksijen dağılımını daha düşük genel gaz akış hızlarıyla sağlar. Hücrelere verilebilecek kesme hasarlarını daha da azaltmak için Tablo 1'de belirtildiği gibi temel besiyerine yüzey aktif madde de eklenmiştir.

Sonuçlar

Her scale-up adımı için hem kültür ayarlarının hem de aralıklı karıştırma adımlarının optimize edilmesi çalışmanın başarısı için çok önemliydi.

Hücreler bu transfer aşamaları sırasında düzgün bir şekilde düzleşmezse, standart karıştırma yeniden başladıktan sonra saatler veya günler içinde boncuklara tutunamayabilirler. DO'nun yeterince yüksek kalması kültürün ilk birkaç saatinde gaz eklemeye gerek kalmadan, bu proses adımları gerçekleşirken hücrelerin tutunması için en uygun koşullara katkıda bulunur. Bu koşullar önceki ölçekteki hücreleri ve boncukları eklemekten önce %60-80 DO'ya sahip taze besiyeri kullanılarak sağlandı.

Aralıklı karıştırmanın 8 saat süreyle tamamlanması, programlanmış bir hesaplama bloğunda ayrı motor kontrolüne izin veren Thermo Scientific™ TruBio™ yazılımının kullanılmasıyla desteklendi. Kültür için son kontrol parametrelerini etkinleştirmeden önce, hücre tutunması mikroskopik gözlemlerle doğrulanmalıdır.

Scale-up İlkeleri

Mikro taşıyıcı kültürlerde ölçeklendirme, birçok faktörün dikkate alınmasını gerektirir. Genel geometrik benzerlik korunabilirken, tüm parametrelerin aynı anda ölçek-

lendirmek imkansızdır. Mevcut ölçeklendirme kriterlerinden, hacim başına güç girişi (PIV), pervane uç hızı ve pervane girdapları etrafındaki Kolmogorov uzunluk ölçekleri dikkate alınması gereken parametrelerdir.

Bu çalışmada, uç hızı büyük ölçüde ölçekler arasında korunmuştur ve ilk uç hızı değeri, en küçük 50 L'lik kaptaki en agresif Kolmogorov uzunluk ölçekleri kullanılarak belirlenmiştir. 50 L'lik girdap uzunluğu yaklaşık 90 µm'dir ve bu da parçacık çapının yaklaşık %50'sine yakın hedefleme uzunluğu ölçeklerinden kaynaklanır. Aynı uç hızı, 500 L'lik kaptaki 120 mikrometre'ye yakın girdap uzunluğu ölçekleriyle ilişkilidir. Uç hızının korunması, PIV'in yaklaşık 50 L'lik kaptaki 1,0 W/m³'ten 500 L'lik kaptaki 0,57 W/m³'e değişmesine neden olmuştur.

Prensip olarak, daha büyük PIV için daha büyük kaplarda çalkalama oranının artırılması (dolayısıyla uç hızının muhafaza edilmemesi), Kolmogorov uzunluk ölçekleri süspansiyona alınmış partiküller için yarıçap altı boyutlara indirgenmediği sürece kültürler için kabul edilebilir.

Burada açıklanan geliştirmelerle, 1 W/m³ civarındaki PIV değerleri, hacim boyutlarında girdap uzunluğu ölçeği açısından verilen mikro taşıyıcı sistem için uygun olmuştur.

Bu nedenle, PIV uygun bir alternatif ölçeklendirme temelidir.

Şekil 1'de 50, 250 ve 500 L S.U.B. kültürler için karşılaştırmalı hücre yoğunluğu sonuçlarını gösterilmiştir.

50 L'lik kültür diğer boyutlardan biraz daha düşük yoğunluğa sahip olsa da, her bir kap 7 x 10⁴ hücre/cm²'nin üzerine ulaştı.

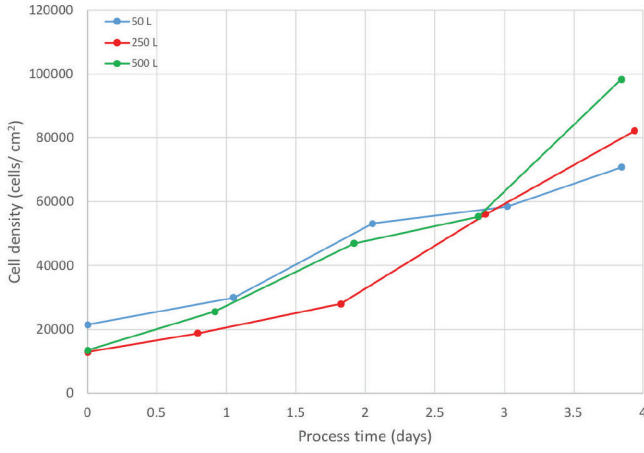
Bu değerler, bu 3 g/L kültürün 0,94 ila 1,3 x 10⁶ hücre/mL aralığına denk gelmektedir.

Mikro taşıyıcı yoğunlukları, toplam hücre verimini değiştirmek için ayarlanabilir.

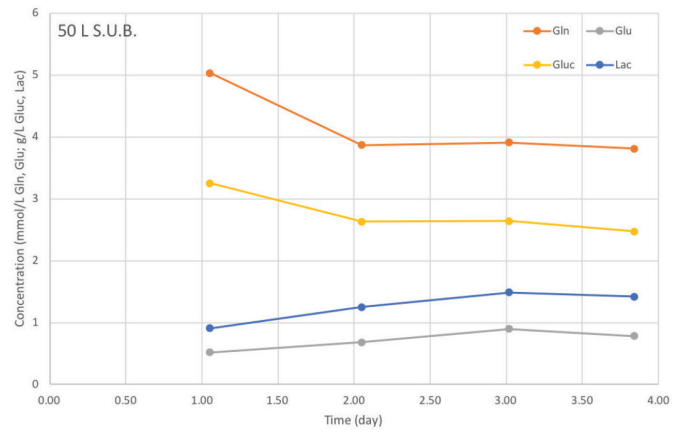
En düşük büyüme oranına sahip 50 L kültür üzerindeki bir olası etki de, en agresif Kolmogorov uzunluk ölçeğinde çalışmasıdır. 50 L'lik sistemde çalkalamanın azaltılması veya diğer sistemlerde çalkalamanın artırılması, büyüme profillerinin daha da benzer olmasına neden olabilmektedir.

Besiyeri analiz verileri Şekil 2-4'te sunulmaktadır. Örnekler Besiyeri değişimi öncesinde alınıp analiz edildi.

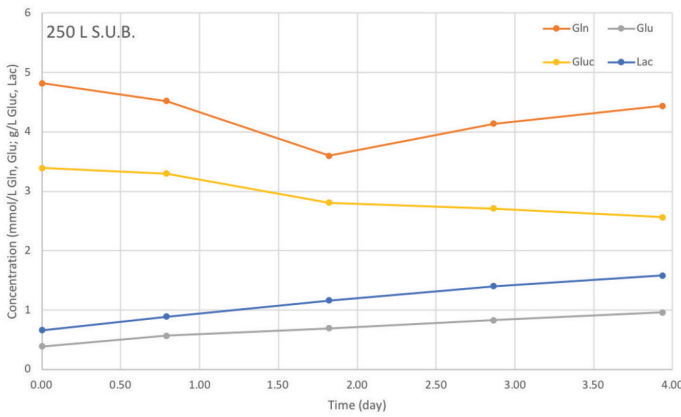
%50 besiyeri değişiminin, laktat (Lac) gibi atıkları uzaklaştırmayı ve glutamin (Gln), glutamat (Glu) ve glukoz (Gluc) gibi taze besinleri sağladığı görüldü.



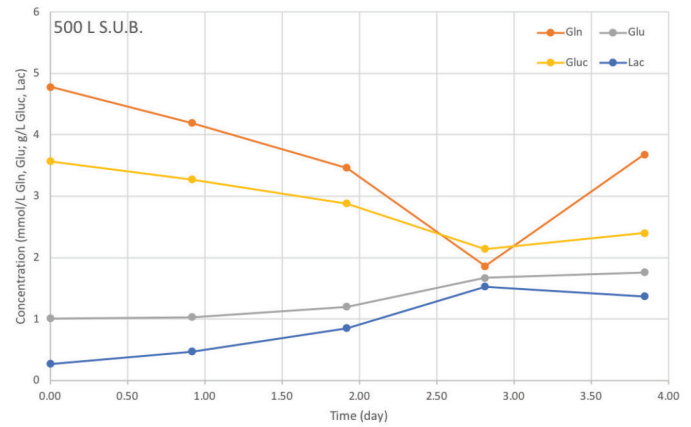
Şekil 1. Geliştirilmiş S.U.B.'lerde 50, 250 ve 500 L Vero hücre kültürlerinin canlı hücre yoğunluğu.



Şekil 2. Geliştirilmiş 50 L S.U.B. içinde mikro taşıyıcılar üzerinde Vero hücre kültürü için metabolik belirteçleri gösteren besiyeri analizi verileri.



Şekil 3. Geliştirilmiş 250 L S.U.B. içinde mikro taşıyıcılar üzerinde Vero hücre kültürü için metabolik belirteçleri gösteren besiyeri analizi verileri.



Şekil 4. Geliştirilmiş 500 L S.U.B. içinde mikro taşıyıcılar üzerinde Vero hücre kültürü için metabolik belirteçleri gösteren besiyeri analizi verileri.

Sonuç

Vero hücreleri, geliştirilmiş HyPerforma S.U.B. sistemlerinde boncuktan boncuğa transfer başarılı bir şekilde yetiştirilebilir ve ölçeklendirilebilir. Başarılı mikro taşıyıcı kültürler için temel faktörler şunlardır;

- Hücrelerin ilk tutunma sırasında mikro taşıyıcı yüzeyine tutunabilmesi ve yayılabilmesi.

Bu, daha yavaş sürekli karıştırma veya aralıklı karıştırma stratejileri yoluyla gerçekleştirildi. Her iki durumda da, bu süre içinde gazın devre dışı bırakılmasının önemli olduğu görüldü.

- Hücrelere etki eden kesme kuvvetlerini en aza indirirken çalışma hacmi boyunca genel olarak homojen bir dağılımın sağlanabilmesi.

Bu, pervanelerin çap boyutunun artırılması ile daha düşük çalkalama oranları kullanılarak sağlandı.

- Reaktör içindeki hücrelerin boncuktan boncuğa transferinin gerçekleştirilebilmesi.

Bu, konfluent mikro taşıyıcılar içeren sisteme ek Cytodex 1 boncukları eklenerek ve ardından 8 saat süren aralıklı bir karıştırma aşamasıyla yapıldı.

- Kesme kuvvetlerinin 1 g/L Pluronic F-68 yüzey aktif madde eklenerek azaltılması.

- S.U.B. içinde boşaltma ve ayrıştırma adımlarının gerçekleştirilebilmesi.

Bu, BPC'yi, doğrudan boncuk paketi seviyesinin üzerinde ek bir boşaltma hattına sahip olacak şekilde modifiye ederek yapıldı ve bu ayrışmadan önce boşaltma ve durulamaya olanak sağladı.

- Prosesin ve tasarımın ölçekler arasında taşınabilmesi.

Bu aralıklı karıştırma işlemi, 100x hacim artışı için 5 - 500 L'lik kaplarda tekrarlandı ve S.U.B.'deki kültürlerde, 10x hacim artışıyla başarılı olduğu görüldü.

Orijinal Doküman

- Thermo Scientific HyPerforma Single-Use Bioreactor (S.U.B.) Aplikasyon Notu.
- Enhanced single-use bioreactor performance for scalable Vero cell culture on microcarriers in serum-free medium; Tony Hsiao, Staff Engineer, Research and Development, Thermo Fisher Scientific.
- Paula Decaria, Senior Engineer, Research and Development, Thermo Fisher Scientific.
- Nephi Jones, Senior Manager, Research and Development, Thermo Fisher Scientific.