

KULTIVACE CHO BUNĚK V MÍCHANÉM „SINGLE – USE“ FERMENTORU

Firma Sartorius Stedim Biotech je už několik let dodavatelem „single – use“ technologie na špičkové světové úrovni. Nabídka této technologie je velmi široká, ale přesto se dá rozdělit do několika základních kategorií, a to: vaky v objemech od 5 ml do m³, Palletanky® k manipulaci s vaky od objemu 50 litrů, transferové sady a přechodky, míchadla, bioreaktory v objemech 1–200 litrů, Flexact® mobilní panely obsluhy pro vybrané druhy pracovních operací v biotechnologickém průmyslu a příslušenství, jako jsou svářečka a řezačka hadic, nebo plnička vaků, popřípadě nový systém Clipster® pro aseptické rozpojování hadic.

Biostat® Cultibag STR – „single-use“ fermentor

„Single-use“ fermentor typ STR představuje vlastně vak v objemu 200 litrů s příslušnými porty na měření teploty, koncentrace O₂ v médiu a pH. Vak je osazen také míchadlem a celý systém je dodáván předsterilizovaný. Vak se umístí do nerezového nosného pláště, parametry fermentace jsou již tradičně sledovány a řízeny na dotykovém display s mikroprocesorem ve vedlejší jednotce. Výroba a použité materiály splňují normy EMEA, European Pharmacopoeia a USP Class VI a FDA. Dnes tento typ fermentorů nachází široké uplatnění ve výzkumu i průmyslové sféře, protože mají několik výhod před tradičně používanými fermentory. Hlavně se to týká flexibility aplikací, nízkých nákladů na údržbu a validaci zařízení a v neposlední řadě i ve zkrácené době realizace procesu fermentace a tím i velmi rychlého vstupu daného výrobku na trh.

Kultivace CHO buněk

V této aplikaci jsme chtěli ukázat výkonnost fermentoru Biostat® Cultibag STR při kultivaci CHO buněk ve vsádkovém režimu. Pro kultivaci se použilo médium bez přídavku séra. Speciální klon CHO použitý v této aplikaci je s označením DG44 ST1-C6. V tomto typu bioreaktoru se dosáhlo hustoty buněk v rozmezí 6–7 x 10⁶ buněk/ml.

Použité materiály a zařízení:

- fermentor Biostat® Cultibag STR 200 plus (Sartorius Stedim Biotech),
- „single-use“ vak Cultibag STR 200 s míchadlem včetně příslušných měřicích

- a přípojovacích portů (Sartorius Stedim Biotech),
- řezačka hadic Biosealer (Sartorius Stedim Biotech),
- svářečka termoplastických hadic Biowelder (Sartorius Stedim Biotech),
- fermentor Biostat® Cultibag RM pro přípravu fermentačního média (Sartorius Stedim Biotech),
- „single-use“ vak Cultibag RM 20 s objemem 20 litrů (Sartorius Stedim Biotech),
- Nucleocounter (Sartorius Stedim Biotech),
- médium ProCho 5 (Lonza) obsahující 4 mM L-glutaminu, 1xhypoxanthin/thymidin ve 100 litrovém kontejneru,
- buňky CHO-DG44 naklonované ST1-C6, produkující human IgG.

Příprava fermentačního média

CHO klon se ponechal růst v médiu ProCho 5 až na koncový objem 10 litrů. Tato příprava proběhla ve fermentoru Biostat® Cultibag RM. Proces probíhal při teplotě 37 °C, pH 7,1 a dosažená koncentrace buněk byla 3 x 10⁶/ml.

Inokulace ve fermentoru Biostat® Cultibag STR a průběh fermentace

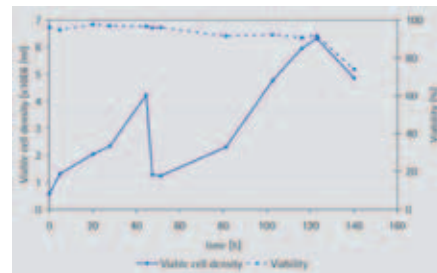
Před inokulací se do Cultibagu STR převadlo 50 litrů média a teplota média se udržovala na 37 °C. Spojení termoplastických hadic z kontejneru média do Cultibagu se provedlo pomocí svářečky Biowelder a rozpojení a zatavení hadic řezačkou Biosealer. Na fermentoru se nastavilo měření a regulace koncentrace kyslíku v médiu (DO) a pH. Koncentrace kyslíku se regulovala přidávkem N₂ do vzduchu a pH přidávkem NaOH a CO₂. Provozdušnění bylo nastaveno na hodnoty 0,01 vvm a otáčky míchadla na 100 ot/min. Při transferu média z Cultibagu RM do Cultibagu STR se opět použilo zařízení Biowelder a Biosealer. Při převodu média byla počáteční koncentrace buněk v Cultibagu STR 0,57 x 10⁶/ml. Vsádka se fermentovala celkem 6 dnů. Po 44 hodinách, když koncentrace buněk dosáhla úrovně 4 x 10⁶/ml, se přidalo dalších 140 litrů média, celkový objem vsádky byl potom 200 litrů. V pravidelných intervalech se odebíraly vzorky média přes aseptický konektor na Cultibagu STR a analyzovaly se na hustotu

Obr. 1 – Biostat® Cultibag STR Plus 200



buněk a jejich životaschopnost pomocí zařízení Nucleocounter. Zároveň se stanovovala koncentrace glukózy a mléčnanu. Buňky rostly do konečné koncentrace 6,3 x 10⁶/ml s udržením jejich životaschopnosti >90%. Po 120 hodinách kultivace se koncentrace a životaschopnost buněk začala snižovat. Na obr. 2 je graf průběhu koncentrace a životaschopnosti buněk. Pokles po 44 hodinách je způsoben přidáním dalšího média.

Obr. 2 – Průběh koncentrace a životaschopnosti buněk ve fermentoru



Závěr

Fermentor Biostat® Cultibag STR je „single-use“ bioreaktor kompletně srovnatelný se standardními typy „nerezových“ bioreaktorů. V této aplikaci jsme ukázali úspěšnou kultivaci CHO-DG44 v chemicky definovaném složení média bez přídavku séra. Dosažená koncentrace buněk byla 6,3 x 10⁶/ml, která je typická pro tento typ fermentačního procesu.

Podle firemních podkladů Sartorius zpracoval Ing. Pavel BROŽ, Karolina Express-Sartorius, 602175282, filtry@sartorius.cz.