

# Zellkultivierung ohne Kompromisse



► Dr. Kerstin Vieluf,  
Sartorius Stedim Biotech

Reproduzierbare Umgebungsbedingungen sind die Basis für eine optimale Kultivierung von Suspensionszellen. Nicht immer stehen jedoch geeignete Geräte zur Verfügung und Anwender behelfen sich häufig mit einem Kompromiss. So wird für Suspensionszellen ein Inkubationsschüttler mit den Eigenschaften eines CO<sub>2</sub>-Inkubators benötigt. Hierfür wurden bisher zwei unterschiedliche Lösungen angeboten: Entweder werden kleine Tischschüttler in einen CO<sub>2</sub>-Brutschrank gestellt oder die Bakterien-schüttler werden so modifiziert, dass die Einleitung von CO<sub>2</sub> und eine Befeuchtung des Innenraums ermöglicht wird. Beide Lösungen haben erhebliche Nachteile: Die Wärmeentwicklung, die durch den Betrieb eines Schüttlers in einem Brutschrank entsteht, beeinflusst die Temperaturgenauigkeit und -verteilung im Inkubator. Wird der Schüttler abgestellt, bildet sich kohlenstoffhaltiges Kondensat, das zur Korrosion des Antriebs und damit zu einer deutlich verkürzten Lebenszeit des Gerätes führt. Auch in Bakterien-Inkubationsschüttlern kann durch die Einleitung von CO<sub>2</sub> und Feuchtigkeit in schlecht isolierten Bereichen Kondensat entstehen und zu viel Kohlendioxid in die Laborluft entweichen.

## Neues Gerätedesign

Mit dem völlig neuen Gerätedesign eines Schüttlers, der von Sartorius Stedim Biotech entwickelt wurde, hat man die o.g. Aspekte berücksichtigt. Das Ergebnis ist der Certomat CTplus, der erste für die Säugerzellkultur spezialisierte Inkubationsschüttler (Abb. 1). Der Innenraum des neuen Gerätes ist vollständig vom mechanischen Antrieb und der Gerätesteuerung abgekapselt, wodurch es sehr wartungsarm ist. Die glatte Oberfläche der Edelstahlkammer ist leicht zu reinigen, um Kontaminationen in den Zellkulturen effektiv zu vermeiden.

**Die Kultivierung von Säugerzellen stellt hohe Ansprüche an die Umgebungsbedingungen und die Medienzusammensetzung. Dazu gehören eine präzise Temperaturkontrolle, eine stabile CO<sub>2</sub>-Konzentration, konstante Feuchtigkeit sowie die Regulierung des pH-Wertes und der Konzentration des gelösten Sauerstoffs im Medium. Insbesondere für die anspruchsvolle Kultivierung von Suspensionszellen sind innovative Lösungen gefragt.**

Viele Zelleigenschaften sind von einer präzisen Regulierung von Temperatur und CO<sub>2</sub> abhängig: Wachstumsrate, Proteinproduktion, intrazellulärer pH-Wert und Apoptose werden beeinflusst. Deshalb garantieren stringente Kontrollmechanismen des Inkubationsschüttlers und sein sehr schnelles erneutes Erreichen der Soll-Parameter nach einer Türöffnung optimale Kultivierungsbedingungen für alle Suspensionszellen.

Typische Einsatzgebiete des neuen Inkubationsschüttlers sind die Kultivierung von Starterkulturen in Erlenmeyerkolben, die Produktion monoklonaler Antikörper im Labormaßstab und die Medienoptimierung im kleinen Maßstab. Experimentell konnte gezeigt werden, dass hohe Zellzahlen mit unterschiedlichen Zelllinien (CHO-ST1-C6 und PER.C6 Epcam) in unterschiedlichen

Kulturverfahren erzielt werden können. Hierfür wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in 15 ml Medium in 50 ml CultiFlask 50 (Sartorius Stedim Biotech) angeimpft und unter gleichen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80% Feuchtigkeit, 240 rpm, 25 mm Hub) kultiviert. Die Zelllinie CHO-ST1-C6 erreichte im Batch-Verfahren nach 96 Stunden ihre höchste Zellzahl mit  $4,6 \times 10^6$ /ml, die durch Zugabe von Glutamin nur unwesentlich verbessert wurde. Das Wachstum der Zelllinie PER.C6 Epcam konnte hingegen deutlich optimiert werden: Während im Batch-Verfahren eine Zelldichte von  $6,2 \times 10^6$ /ml in 118 Stunden Kultivierung erreicht wurde, erhöhte sich die Zellzahl auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml im Fed-Batch-Ansatz mit Zugabe von 4 mM Glutamin an den Tagen 3 und 5 (Abb. 2).



Abb. 1: Für die Säugerzellkultur spezialisierter Inkubationsschüttler

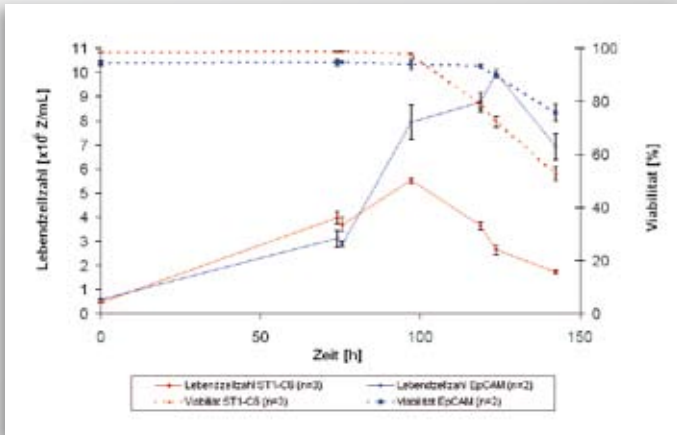


Abb. 2: Kultivierung von CHO-ST1-C6- und PER.C6 EpCAM-Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 240 rpm. Täglich wurde je eine Probe gezogen und auf Zellzahl und -viabilität untersucht. An Tag 3 und 5 erfolgte die Zugabe von 4 mM Glutamin, die zu einer signifikanten Erhöhung der Per.C6 EpCAM-Zellen führte.

### Nicht-invasive Kontrolle der Umgebungsbedingungen

Zellzahl und -viabilität sind nur zwei Größen, die während der Kultivierung überwacht werden können. Die Bestimmung weiterer Parameter während des Zellwachstums kann insbesondere während der frühen Phase der Prozessentwicklung von großer Bedeutung sein. Dazu zählen beispielsweise die Überwachung des pH-Werts und der Sauerstoffkonzentration. Bisher mussten hierfür in regelmäßigen Abständen mit großem Arbeitsaufwand Proben aus der Zellkultur entnommen und gemessen werden. Sartorius Stedim Biotech bietet mit der Sensolux-Technologie eine zeitsparende Alternative an, die die optische, nicht-invasive Messung der pH-Werte und der Konzentration

des gelösten Sauerstoffs (DO) in bis zu neun Erlenmeyer-Kolben gleichzeitig ermöglicht. Diese einfache und zuverlässige Detektionsmethode erleichtert die Selektion des produktivsten Zellklons und/oder des optimalen Kulturmediums. Die Ergebnisse geben schnell Auskunft über Wachstumsraten, Status von Bioreaktionen und frühe Hinweise auf Kontaminationen sowie Wachstumsstillstand. Die Messungen geschehen kontinuierlich, d.h. ein Ziehen von Proben ist überflüssig. So werden die Zellen nicht unnötig manipuliert. Über eine intuitive Kontroll-Software ist das Messintervall frei wählbar.

Das Kernstück des Sensolux-Systems ist ein intelligentes Schütteltablar mit einem integrierten Sensorsystem. Es wird zusammen mit speziellen Erlenmeyer-Kolben

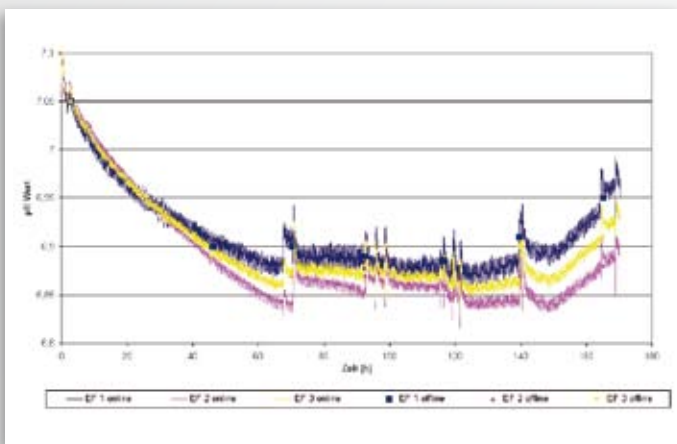


Abb. 4: CHO-Zellen wurden in drei Einweg- Sensolux EF 250 ml-Kolben bei 37°C, 200 rpm, 5% CO<sub>2</sub> und 85% Feuchtigkeit kultiviert. Die Grafik zeigt den Verlauf des pH-Werts – sowohl mit dieser Technik online als auch mit einer Standard-Elektrode offline gemessen – während der Kultivierungszeit.

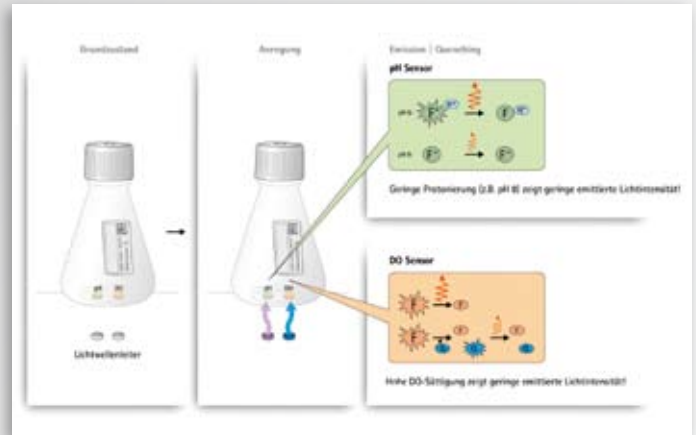


Abb. 3: Sensolux Patch-Technologie: Zwei Sensoren, die am Gefäßboden angebracht sind, emittieren in Abhängigkeit von Protonen- bzw. Sauerstoffkonzentration Licht einer spezifischen Wellenlänge.

verwendet, die im Gefäßboden zwei vorkalibrierte Sensor-Patches enthalten. Diese Patches enthalten Fluoreszenz-Farbstoffe, die durch spezifische Wellenlängen angeregt werden können. Der eine dient der Messung des pH-Wertes, der andere der Bestimmung des DO. Die Messung erfolgt von außen, also nicht-invasiv, durch das Sensor-System des Tablars. An jedem der neun Messplätze leiten optische Fasern, die in das Schütteltablar integriert sind, Licht der entsprechenden Anregungswellenlänge zu den Patches und übertragen das von den Patches emittierte Licht zurück zu den Messverstärkern. Die Charakteristik und die Intensität des emittierten Lichtsignals wird hierbei durch Änderungen der Parameter pH und DO beeinflusst (Abb. 3).

Auch hier überzeugten die Messreihen. Messwerte, die zum einen mit klassischen pH- und DO-Messsonden und zum anderen mit den entsprechenden Sensor-Patches erhalten werden, zeigen die direkte Vergleichbarkeit der Methoden. Bei der Aufnahme eines durch Titration erzeugten pH-Profiles zeigten sich maximale Abweichungen von +/-0,1 pH-Einheiten bei einem Messintervall von 6s über 19h, das 11.600 Einzelmessungen entspricht. Dies ist vergleichbar mit einer Zellkultivierung über 16 Tage bei einem 2-Minuten-Messintervall. Hier würde der Messwert aufgrund des Ausbleichens des Patches lediglich um einen Wert von 0,01 pro Tag driften.

Ein Vergleich des DO-Patches mit einer Clark-Sonde zeigt eine Abweichung von 0,2% bei niedriger und 1% Abweichung bei hoher Sauerstoffsättigung. Die Drift beträgt ca. 0,02% pro Tag bei 50% Sättigung.

Experimente mit CHO-Zellen, die in 50 ml Medium in 250 ml Sensolux EF Erlenmeyer-Kolben angeimpft und über mehrere Tage kultiviert wurden, zeigen vergleichbare Ergebnisse (Abb. 4).

Fazit: Die Überwachung der wichtigsten Parameter in der Zellkultur ist in der Regel mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden. Dagegen kombiniert das Sensolux-System die Präzision der klassischen Messmethoden mit einem deutlich geringeren Arbeitsaufwand. Dabei lässt sich das Tablar in jedem Inkubationsschüttler mit Hilfe einer Adapterplatte einsetzen. Mit seinen optimalen Kultivierungsbedingungen bietet jedoch der Certomat CTplus die beste Kombination für reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse.

### ► KONTAKT

Dr. Kerstin Vieluf  
Sartorius Stedim Biotech GmbH  
Göttingen  
Product Management,  
Lab Technologies  
Tel.: 0551/308-3522  
Fax: 0551/308-3565  
www.sartorius-stedim.com