



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR

SZERVES KÉMIA ÉS TECHNOLOGIA TANSZÉK

PHARMATECH MODELL LABORATÓRIUM

**Raman spektroszkópia-alapú dinamikus tápanyag-adagolási stratégiák
fejlesztése antitesttermelő emlőssejtes tenyészetnek**

TDK dolgozat

Szerző:

Hajdú Dorottya Katalin

IV. évfolyam, vegyészmérnöki alapképzési szak nappali BSc

Témavezető:

Dr. Hirsch Edit

Tudományos munkatárs

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Konzulens:

Domján Júlia

PhD hallgató

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Lezárva: 2023. 01. 01.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Hirsch Editnek a fáradhatatlan és alapos szakmai segítségéért. Domján Júliának köszönöm a laboratóriumi munkában nyújtott sok-sok segítséget; Miskolci Máté hallgatótársamnak, Vaskó Dorottyának és Pantea Eszternek a jó hangulatú laboratóriumi közös munkát. A Richter Gedeon Nyrt. munkatársainak a Cedex mérések elvégzését és a sejtvonál biztosítását köszönöm. Horváth Réka barátnőmnek köszönöm sok szakmai, és nem szakmai segítségét. Órsi Marcellnek köszönöm a statisztikai részekben nyújtott segítségét és hogy mindig mellettem állt. Végezetül családomnak, és különösen nagyszüleimnek köszönöm a folyamatos támogatást.

Tartalmi összefoglaló

A monoklonális antitest-alapú gyógyszerkészítmények igen nagy jelentőséggel bírnak a gyógyszeriparban. Előállításuk azonban bioreaktoros emlőssejtes tenyészetekkel történik, amely igen komplex gyártástechnológiát igényel. Az innovatív, folyamatfelügyelő és analizáló technológiák alkalmazásával lehetőség nyílik a kritikus tenyésztési paraméterek valós-idejű monitorozására és szabályozására a megfelelő minőségű antitestek hatékony előállítása érdekében. Ezért kutatómunkám során adalimumab termelő kínai hörcsög petefészek sejtek bioreaktoros tenyésztését valósítottam meg és a kritikus tápanyagkomponenseket inline Raman spektroszkópia alkalmazásával valós-időben monitoroztam és szabályoztam.

A Raman spektrumok kiértékelésére részleges legkisebb négyzetek módszerén alapuló regressziós modelleket fejlesztettem és sikeresen követtem a glükóz, arginin és laktát koncentrációját a bioreaktoros tenyésztési ciklusok során. A Raman spektrumokból nyert valós-idejű információ alapján, egy automatizált rendszer segítségével, a sejtek fogyasztásának megfelelően adagoltam a tápanyagokat a bioreaktorba. A kidolgozott dinamikus tápanyagadagolási stratégiában a pillanatnyi glükóz, illetve arginin – mint indikátor aminosav – koncentráció alapján szabályoztam a glükóz oldat és a többkomponensű tápanyagoldatok beadagolását.

A kifejlesztett dinamikus tápanyagadagolási stratégia hatására hosszabb tenyésztési időt és magasabb élő sejt számot, így több antitest terméket sikerült elérni. Az eredmények bizonyítják, hogy az inline Raman spektroszkópia alkalmas módszer biotechnológiai folyamatok valós-idejű monitorozására és szabályozására. Továbbá a valós-idejű információ lehetőséget ad a folyamatok jobb megértésére és elősegíti a tenyésztési folyamatparaméterek optimalizálását.

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	2
Jelölések jegyzéke	4
1 Bevezetés	5
2 Szakirodalmi áttekintés.....	6
2.1 Monoklonális antitestek	6
2.2 A CHO sejtek metabolizmusa.....	11
2.3 Biotechnológiai gyógyszerek minőségbiztosítása	13
2.4 Raman spektroszkópia	16
2.5 CHO sejtés tenyésztési folyamatok szabályozása, tápanyag-adagolási stratégiák ...	19
3 Célkitűzés.....	21
4 Kísérletek, módszerek.....	22
4.1 Tenyésztéshez felhasznált oldatok	22
4.2 Rázólombikos sejttenyésztés.....	22
4.3 Bioreaktoros kísérletek	24
4.4 Raman spektroszkópia alkalmazása.....	30
4.5 Fehérje titer meghatározása	34
4.6 Aminosav koncentrációk mérése	35
5 Eredmények és értékelésük.....	37
5.1 A kalibrációs modellek fejlesztése.....	37
5.2 A valós-idejű monitorozás megvalósítása.....	40
5.3 Dinamikus tápanyag-adagolási stratégiák fejlesztése	42
5.4 A tápanyag-adagolási stratégiák hatásának vizsgálata a sejttenyészetre	46
6 Összefoglalás	50
7 Irodalomjegyzék	51
8 Függelék.....	59

Jelölések jegyzéke

AWF	<i>Automatic Whittaker Filter</i>	-
BLI	<i>Biolayer interferometry</i>	Bioréteg interferometria
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	Kínai hörcsög petefészek sejt
CPP	<i>Critical Process Parameter</i>	Kritikus folyamatparaméter
CQA	<i>Critical Quality Attributes</i>	Kritikus minőségi tulajdonság
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetil-szulfoxid
DO	<i>Dissolved Oxygen</i>	Oldott oxigén
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügynöksége
LV	<i>Latent Variable</i>	Látens változó
MAb	<i>Monoclonal Antibody</i>	Monoklonális antitest
MC	<i>Mean Center</i>	Átlagra centrálás
MIR	<i>Middle Infrared</i>	Közép infravörös
NIR	<i>Near Infrared</i>	Közeli infravörös
PAT	<i>Process Analytical Technology</i>	Folyamatfelügyelő és analízáló technológia
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>	Foszfáttal pufferolt sóoldattal
PLS	<i>Partial Least Squares</i>	Részleges legkisebb négyzetek módszere
QbD	<i>Quality by Design</i>	Tervezés alapú minőségbiztosítás
QbT	<i>Quality by Testing</i>	Tesztelés alapú minőségbiztosítás
RCB	<i>Research Cell Bank</i>	Kísérleti sejtbank
RMSE	<i>Root Mean Square Error</i>	Átlagos négyzetes hiba gyöke
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i>	Kalibráció átlagos négyzetes hibájának négyzetgyöke
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>	Kereszt-validáció átlagos négyzetes hibájának négyzetgyöke
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>	Predikció átlagos átlagos négyzetes hibájának négyzetgyöke
SNV	<i>Standard Normal Variate</i>	-
TCD	<i>Total Cell Density</i>	Teljes sejtszám
VCD	<i>Viable Cell Density</i>	Élő sejtszám

1 Bevezetés

Napjainkra a modern biotechnológia egyik legmeghatározóbb ágazatává fejlődött ki a fehér biotechnológia, amely gyógyászati célú készítmények előállításáért felelős. A hagyományos, kismolekulás hatóanyagú gyógyszeripari készítmények fejlesztési lehetőségeinek korlátozódása mellett a 2000-es évek óta folyamatosan nő a biotechnológiai kutatások és fejlesztések jelentősége. Ezt jól mutatja az is, hogy az ipari szektoron belül ebben az ágazatban történik a legtöbb beruházás [1].

A monoklonális antitest (*Monoclonal Antibody*, MAb) -alapú gyógyszerek jelentőségét a gyógyszeriparban bizonyítja a tény, hogy a legnagyobb forgalmú gyógyszerkészítmények között számos képviselőjük szerepel [2]. Az Abbvie cég adalimumabot tartalmazó Humira nevű készítménye 2021-re már 9 éve vezette a legnagyobb árbevételű gyógyszerek listáját, mielőtt a Pfizer Comirnaty Covid-19 elleni vakcinája csaknem duplaannyi bevétellel megelőzte volna [3].

A MAb-ok azonban igen komplex gyártástechnológiával rendelkeznek, emlőssejtek bioreaktoros tenyésztésével állíthatóak elő. Az emlőssejtek összetett tápközeget igényelnek, és nagyon érzékenyen reagálhatnak egy-egy komponens koncentrációjának megváltozására, ami a termékminőségben is megjelenhet. A megfelelő mennyiségű, minőségű és reprodukálható előállítás érdekében szükséges a tenyésztési folyamatok fejlesztése, például korszerű folyamatfelügyelő- és analízáló technológiák alkalmazásával. A tenyészetek monitorozására alkalmas többek között a Raman spektroszkópia. A módszer előnye a gyors, roncsolásmentes analízis, valamint az, hogy nem igényel mintaelőkészítést, ezáltal valós időben kaphatunk mennyiségi és minőségi információt tápanyagok és melléktermékek koncentrációjáról a tenyésztési folyamatok során.

Munkám során adalimumab termelő kínai hörcsög petefészkek (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) sejtek bioreaktoros tenyésztését végeztem. A kísérletek során inline Raman spektroszkópia alkalmazásával valós időben monitoroztam különböző komponensek koncentrációját, és a pillanatnyi értékek alapján szabályoztam a sejtek számára szükséges tápanyagoldatok beadagolását. Vizsgáltam a különböző dinamikus tápanyag-adagolási stratégiák hatását a bioreaktoros tenyésztési folyamatra.

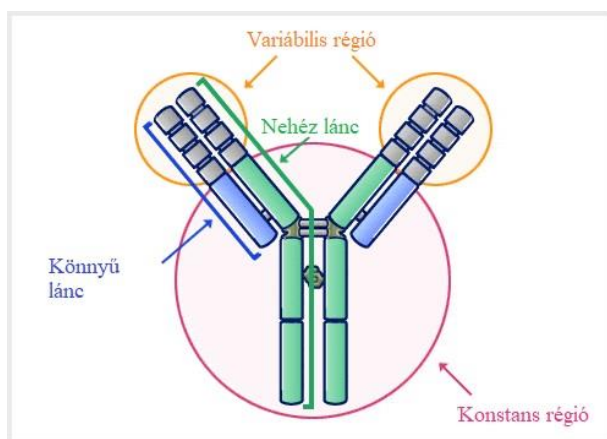
2 Szakirodalmi áttekintés

2.1 Monoklonális antitestek

Az antitestek limfociták által termelt fehérjék, amelyek felismerik, majd kötődnek az idegen anyagokhoz (antigének) a vérben, és ezáltal semlegesítik azokat. Mindegyik antitest egy-egy antigénre specifikus, és egy bizonyos típusú limfocita termeli.

2.1.1 Az antitestek szerkezete

Az antitestek nagy méretű (~150 kDa) globuláris plazmafehérjék. Az összes antitest alapvető szerkezete azonos (1. ábra). Négy polipeptid láncból állnak: két azonos nehéz lánc (körülbelül 50 000 Da) és két azonos könnyű lánc (körülbelül 22 000 Da), amelyeket diszulfidkötések kötnek össze. A különböző antigénekhez való specifikus kötődés a variábilis régió változatosságának köszönhető. A nehéz lánc szerkezetének függvényében 5 típust különböztetünk meg (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE).



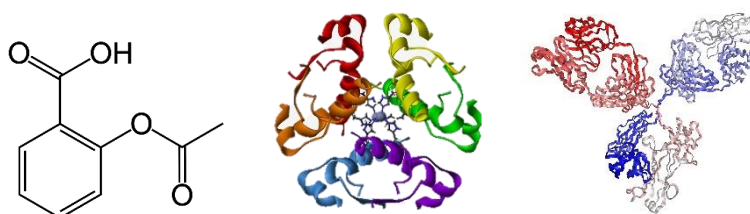
1. ábra: Az antitestek általános szerkezete [4]

Az antitestek glikoproteinek, nehéz láncaikon glikozilálási helyek vannak. A glikoziláció az egyik leggyakoribb fajspecifikus poszttranszlációs módosítás, ami erősen befolyásolja az antitest stabilitását, féléletidejét a vérben, immunogenitását és az antigén-antitest kölcsönhatások erősségét.

Az 1900-as évek elején Ehrlich vetette fel, hogy egy speciális vegyület szelektíven célba vehet, és támadhat egy betegséget okozó egységet [5]. Ez teremtette meg a monoklonális antitest gyógyszerek alapját.

2.1.2 Monoklonális antitestek előállításának fejlődése

Az Aspirin hatóanyaga, az acetil-szalicilsav, kismolekula lévén hagyományos, szintetikus úton állítható elő. Ehhez képest a humán inzulin, az első fehérje-alapú gyógyszerhatóanyag bonyolultabb, amelynek szintetikus változatát genetikailag módosított *Escherichia coli* baktériumokkal termeltették [6]. Az antitestek még ehhez képest is sokkal nagyobb molekulatömeggel és komplexebb szerkezettel rendelkeznek (2. ábra), így gyártásuk csak emlőssejtekben történhet a poszttranszlációs módosítások miatt.

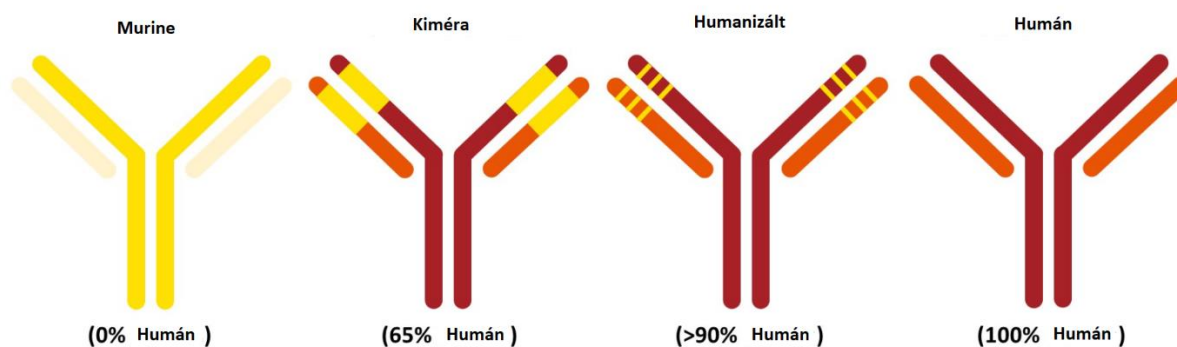


2. ábra: Az acetil-szalicilsav [7], az inzulin [8] és egy antitest szerkezete [9]

Az emberi szervezetben az antitesteket termelő plazmasejtek nem képesek osztódni, nem lehet sejtenyészetben szaporítani őket és termeltetni velük. Csak a tumorsejtek képesek korlátlanul osztódni (immortalitás). Az ezirányban folytatott eredményes kutatások közül kiemelendő Schwaber 1973-ban leírt monoklonális antitest előállítási módszere, ami hibrid ember-egér sejteket használt fel [10]. 1975-ben Köhlernek és Milsteinnek sikerült olyan halhatatlan hibridómákat létrehozniuk, amelyek ismert antigénekre specifikus antitesteket tudtak termelni [11].

A MAb-okban rejlő lehetőségeket akkor kezdték kiemelten értékelni, mikor a rekombináns DNS technika révén a rágcslókból kivont antitesteket emberi megfelelőik váltották fel [12], [13]. Az immunogenitás a fehérje humán részeinek növekedésével csökkent, így a mellékhatások is (3. ábra). A murine (rágcsáló) fehérjékhez képest a kiméra antitesteknek már csak a variábilis régiója származik rágcslókból. Humanizált antitesthez akkor jutunk, ha a murine antitestből „átvisszük” a hipervariábilis domént a humán antitestbe. A legjobbak immunogenitás, antigén-antitest kötéseerősség és affinitás szempontjából is a teljesen humán antitestek.

Az antitestek nevében is megjelenik eredetük. Az utótagok murine, kiméra, humanizált és humán sorrendben: -omab, -ximab, -zumab és -mumab.



3. ábra: Murine, kiméra, humanizált és humán antitestek [14]

A MAb-ok meghatározás szerint monospecifikus antitestek, amelyeket olyan azonos immunsejtek termelnek, amelyek mindegyike egy egyedi szülősejt klónja. A MAb-ok sokkal jobbak az ellenőrzött gyártási technológia és a specifikus célantigénnel szembeni reprodukálható affinitásuk tekintetében, mint a poliklonális antitestek.

2.1.3 Monoklonális antitestek felhasználása

A monoklonális antitest-alapú terápiás készítménypiac értéke az első készítmény óta exponenciálisan nő az egyre több új készítménynek köszönhetően [15]. Egyes becslések szerint 2025-re 179 milliárd USD-t is elérheti a globális értékesítésük [16].

A MAb-ok népszerűségüket annak köszönhetik, hogy számos betegség gyógyításában nyújtanak hatékony, kevesebb és enyhébb mellékhatással járó kezelési alternatívát. Rákos, autoimmun, vírusos és gyulladásos megbetegedések gyógyítása valósítható meg a szervezetre kevésbé toxikus hatóanyag bejuttatásával. Adalimumab antitest-alapú készítményekkel kezelhetőek krónikus ízületi, bél- és szisztémás gyulladásos megbetegedések, Crohn-betegség, plakkos pikkelysömör, autoimmun bőrbetegségek, a szem gyulladásos megbetegedése és köröm pikkelysömör. [17]

Alkalmasak vércsoport- és szövetvizsgálatra, ami elengedhetetlen a biztonságos vérátömlesztés és szervátültetés biztosításához. Meghatározható velük rákos, autoimmun és neurológiai betegségek kóros lefolyása és okai. Diagnosztikai szempontból a monoklonális antitestek az ovuláció, a terhesség vagy a menopauza kimutatására szolgáló tesztek összetevői. A MAb-okat ételmérgezések megelőzéséhez, és a környezetszennyezés vizsgálatára is használják. [18]

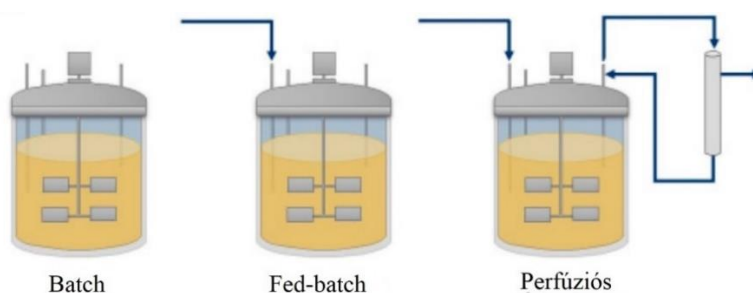
2.1.4 Monoklonális antitestek modern előállításának technológiája

Ma a MAb-okat rekombináns DNS-technológiával előállított sejtekkel gyártják. Az antitest termelést jellemzően CHO sejtek segítségével végzik az iparban, mivel ezek a humán terápiás kezelés szempontjából biztonságosak, ami engedélyeztetési szempontból kedvező. A CHO sejtek szuszpenzióban is nőnek, és képesek magas koncentrációjú fehérjetermelésre, még hozzá a hatalmas piaci igényeket kielégítő volumenben, ráadásul a poszttranszlációs módosulásokkal magas biológiai aktivitás érhető el az emberi szervezetben. [19], [20]

A MAb-ok előállításának két fő lépése ismeretes: upstream műveleteknek nevezzük az antitestek sejtek tenyésztésével történő termelését, a downstream műveletek pedig a sejtek elválasztását és a MAb-ok tisztítását foglalják magukba.

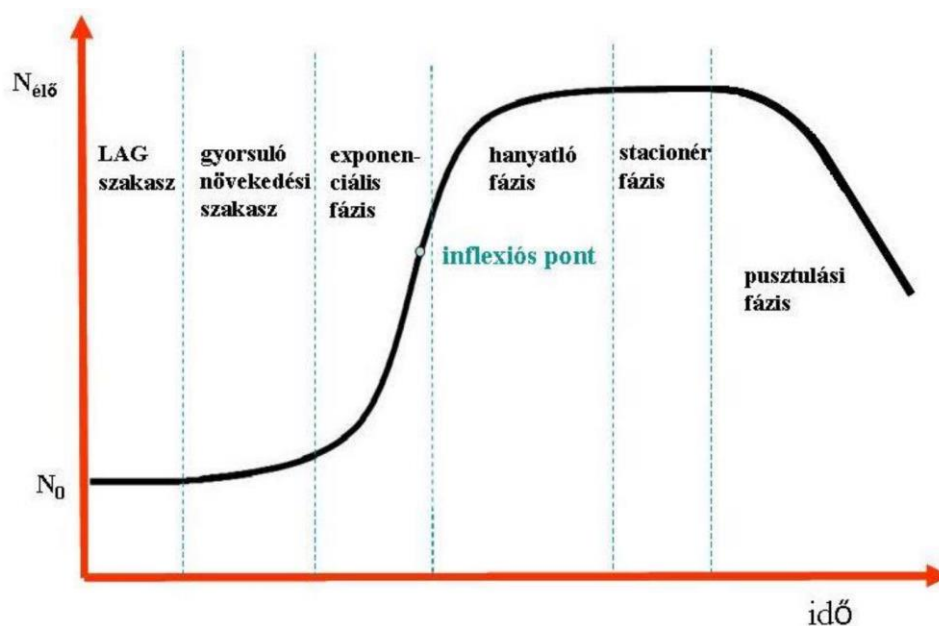
A CHO sejteket jellemzően szuszpenziós körülmények között tenyésztik bioreaktorokban. Az alkalmazott kémiaiailag definiált tápközeg, ozmolalitása jól szabályozott, és a megfelelő termeléshez nélkülözhetetlen aminosavakat, zsírsavakat, vitaminokat, sókat, valamint glükózt tartalmaz, amely utóbbi a sejtek fő energiaforrása. [21]

A tipikus tenyésztési módok a batch, fed-batch (rátáplálásos) és a folyamatos (pl. perfúzió) technikák (4. ábra). Az ipar a batch és a fed-batch műveleteket részesíti előnyben, azok könnyebb kezelhetősége és nagyobb megbízhatósága miatt, azonban a folyamatos technológiák térnyerése folyamatosan növekszik.



4. ábra: A tipikus tenyésztési módok [22]

A batch technikánál minden tápanyag, amelyet a sejtek a tenyésztési periódus során növekedésükhöz és a MAb-termeléshez felhasználnak, már jelen van a sejtek bejuttatásának időpontjában, és a tenyésztés során nem pótolják a tápanyagokat. Ekkor azonban a sejtek sokkal nagyobb tápanyag koncentrációnak vannak kitéve, mint ami az energiatermelésükhöz és a biomassza asszimilációjához szükséges lenne, így ez káros hatású metabolitok felhalmozódásához vezethet, ami pedig a tenyésztet pusztulását okozza. Egy ilyen rendszerben az osztódással szaporodó sejtek növekedését az alábbi görbe írja le (5. ábra).



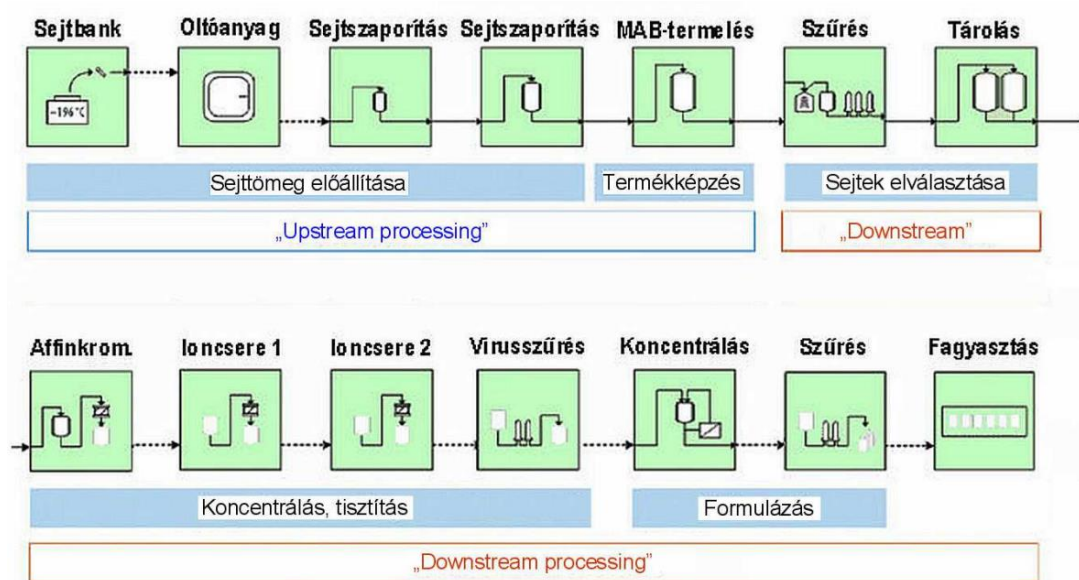
5. ábra: Egy batch tenyészet növekedési görbéje [23]

Ezzel ellentétben a fed-batch technikánál megfelelő időközönként további tápanyagokat adagolnak a tenyészetbe, miközben nincsen elvétel, és a tenyészet térfogata folyamatosan növekszik. Ilyenkor ingadoznak a tápanyagkomponensek koncentrációi, de a melléktermékek továbbra is felhalmozódhatnak. Előny, hogy magasabb sejtkoncentrációjú tenyészetet lehet fenntartani, ráadásul hosszabb ideig, ami által jelentősen emelkedhet a termelt fehérje mennyisége. Ellenben nagy hátrány, hogy nehéz a paramétereket szabályozni, nagyobb a befertőződés veszélye és az eljárás költségei is magasabbak.

Mivel a MAb-alapú gyógyszerkészítmények előállítása igen drága, nagy a verseny a termelési költségek csökkentésére, tehát a gyártás fejlesztésére, hatékonyságának növelésére. Előtérbe kerülnek a folytonos technológiák, mint például a perfúziós technika. Ebben az esetben folyamatosan táplálják be a tápanyagokat és friss tápközeget, miközben egyenlő sebességgel folyamatosan távolítják el a MAb-okat is tartalmazó felülúszót a sejtek visszatartása mellett. A technológia alkalmazásával a sejtek számára kiegyensúlyozott környezet biztosítható, aminek következtében magasabb sejtkoncentráció érhető el és hosszabb ideig tartható fent a tenyészet. Összességében magasabb lehet a produktivitás, mint batch vagy fed-batch technológiával. Hátránya azonban, hogy bonyolultabb a bioreaktor üzemeltetése, és elengedhetetlen a paraméterek valós időben való követése, amihez jelenleg kevesebb tudás áll rendelkezésre. [24]

A monoklonális antitestek megtermeltetése után elengedhetetlen, hogy a sejtek által a fermentáléba szekretált antitesteket megfelelően megtisztítsuk. Az upstream műveletek során

képződött sejtörmelékek, a sejtek DNS-ei, RNS-ei, fehérjéi, valamint a tápközeg komponensei is szennyezik a felülúszót, melyeket különböző mechanikai, illetve kromatográfiás módszerekkel tudunk elválasztani az antitestektől (6. ábra).



6. ábra: Monoklonális antitestek előállítási technológiájának vázlata [25]

Fontos megemlíteni, hogy a monoklonális antitestek az egyik legrágább gyógyszerek közé tartoznak. A gyártási költségek nagy részét a fehérjetermelő sejtek tenyésztéséhez használt tápanyag oldatok adják. A biztonságos előállítás során kiemelten fontos a minőség folyamatos ellenőrzése. Továbbá a végtermék szállítása és tárolása is speciális körülményeket igényel, hogy egészen a felhasználásig stabilak maradjanak.

2.2 A CHO sejtek metabolizmusa

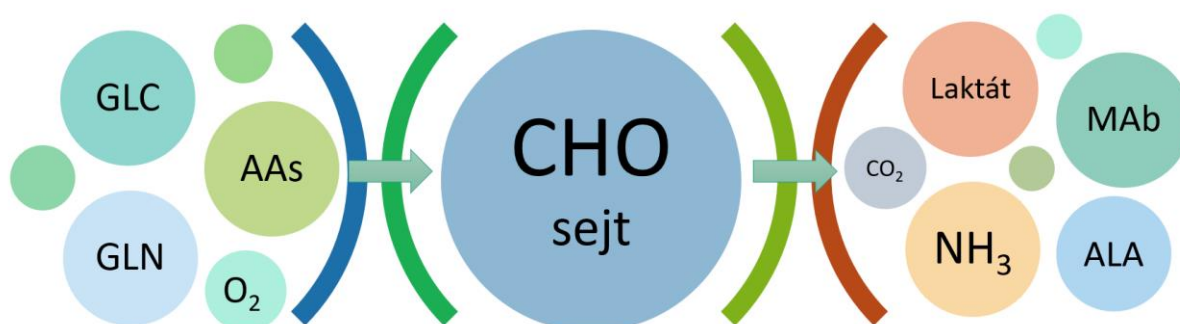
A terápiás monoklonális antitestek olyan glikoproteinek, amelyek nehéz láncain egy-egy N-glikozilálási hely van (Asn-297). A glikozilációt, ami az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, a MAb-ok kritikus minőségi jellemzőjének tekintik, mivel alapvető fontosságú a gyógyszer biztonságossága és hatásossága szempontjából.

Nagyfokú glikozilációs mintázatbeli variabilitást figyeltek meg ugyanazon MAb-termék különböző előállítási technológiái során, és ez többek között a sejtekben végbemenő sejtvonalspecifikus glikozilációs folyamatban részt vevő biológiai reakciókból, a sejtenyésztési körülményekre való érzékenysükből adódik. A tápközeg összetevői között a glükóz, az ammónium-ion koncentráció és a tápközeg hormonális összetétele elsődleges a glikoziláció szempontjából, mivel szerepet játszhatnak a sejtek energiaháztartásában, az

endoplazmás retikulum, a Golgi készülék, és a vezikuláris transzport megfelelő működésében és befolyásolhatják a glikozilációs folyamatban résztvevő enzimek működését. [26]

Az emlőssejt tenyésztés során az oldott oxigénnek (*Dissolved Oxygen*, DO) is meghatározó szerepe van, mivel az emlőssejtek anyagcseréjének fennmaradásához elengedhetetlenek az aerob folyamatok [27]. Ipari léptékben nehézkes a megfelelő oxigénellátottság biztosítása, így ez limitálja a termelést. A folyadékkultúra kémhatása is jelentősen befolyásolja az antitest termelést, és a sejtek életben maradáshoz is elengedhetetlen az optimumon tartása [28].

Ezek alapján a megfelelő minőségű és mennyiségű MAb előállítása érdekében nélkülözhetetlen a biotechnológiai gyártásfolyamat során a sejtek számára optimális környezet biztosítása, amihez a sejtek metabolizmusának az ismerete és az előállítás, feldolgozási műveletek minél alaposabb nyomon követésének megoldása kulcsfontosságú. A modern analitika eszközeit kihasználva előbb észlelhetőek a változások és így szükség esetén a gyártásba történő beavatkozással megőrizhető a termékminőség.



7. ábra: A CHO sejtek metabolizmusának egyszerűsített ábrája.
GLC: glükóz, GLN: glutamin, AAs: aminosavak, ALA: alanin

A CHO sejteknek glükóz és glutamin a fő szén- és nitrogénforrása, viszont az anabolikus igényeket meghaladó felvételük a melléktermékek felhalmozódását eredményezi (7. ábra). A glükóz lebontása történhet a mitokondriumban a citromsav ciklusban anaerob glikolízis során, de az in vitro körülmények között tenyésztett CHO sejtek – és általában az emlőssejtek – aerob glikolízist is mutatnak [29]. Az aerob glikolízis során a glükóz laktáttá alakul a citoszolban a metabolikus hatékonyság rovására. Túl sok glükóz jelenléte a sejteket aerob glikolízisre sarkallja és a laktát akkumulálódik. A laktát-felhalmozódás a tápközeg magas ozmolaritását okozza, mert lúgot adagolnak a kultúra pH értékének adott értéken tartásának érdekében, így ez kritikus probléma az ipari gyakorlatban. A magas laktát szint gátolhatja a sejtproliferációt és

a termékképződést [30], és befolyásolhatja a termék minőségét [31]. A glutamin lebontása glutamáton keresztül ammónia termeléssel jár, ami szintén a sejtnövekedés inhibitora [32].

A CHO sejtek figyelemre méltó tulajdonsága, hogy képesek átállni a laktát termeléséről a fogyasztására (laktát shift). A laktát a korai exponenciális növekedési fázisban halmozódik fel, míg újrafelvétele a későbbi tenyésztési fázisokban történhet. Számos tanulmány foglalkozott a közelmúltban a laktát-shift jobb megértésével és szabályozásával. Ezek eredménye szerint a glükóz koncentráció csökkentése lehet az egyik fő befolyásoló effektor [33].

Az aminosavaknak a fehérjeszintézisben van szerepük, illetve hozzájárulhatnak a katabolizmushoz azáltal, hogy ezekhez a folyamatokhoz szükséges intermedierekké alakulnak. A CHO DG44 sejtvonal számára az esszenciális aminosavak a hisztidin, leucin, izoleucin, lizin, metionin, treonin, triptofán, fenilalanin, metionin, cisztein, prolin, aszparagin és az arginin [34]. Az esszenciális aminosavakat a tápközegben kell biztosítani a sejtek számára.

Gonzalez-Leal és munkatársai Plackett-Burman kísérleti tervet alkalmazva tíz aminosav CHO DG44 sejtvonalra gyakorolt hatását vizsgálta. Pozitív hatásúnak találták az arginint a sejtek életképességére és az antitest termelésében, azonban túlzott koncentrációja gátolja a sejtek növekedését és csökkenti az életképességet. [35]

Kevés olyan cikk található a szakirodalomban, ami egyes aminosavak koncentrációinak hatását vizsgálja. Limitált a rendelkezésre álló ismeret az aminosavak optimális koncentrációjáról, amely hatással van a sejtnövekedésre és a fehérjetermelés mennyiségére és minőségére.

2.3 *Biotechnológiai gyógyszerek minőségbiztosítása*

A gyógyszerek előállítása nagyon szigorúan szabályozott, a gyártásnak meg kell felelnie a legmagasabb biztonsági és minőségi előírásoknak [36]. Mivel a fehérje-alapú gyógyszerek többsége élő szervezetek által állítható elő, elkerülhetetlen a termék változékonysága, így a megkövetelt minőség jellemzője a biohasonlóság. A biotechnológiai folyamatok gyártási körülményeinek apró eltérése is a végtermék drasztikus megváltozását eredményezheti, ami a cégnek jelentős pénzbeli veszteségként jelentkezik.

A hagyományos tesztelés alapú minőségbiztosítás (*Quality by Testing*, QbT) sok problémát vetett fel, hiszen ekkor a céltermékre kifejlesztett gyártási folyamatnak csak a bemenete és kimenete ismert. Ezáltal a termék folyamatos ellenőrzésével biztosítható csak a

megfelelő minőség, és ha probléma adódik a gyártásban nem lehetséges az azonnali beavatkozás a minőség megőrzésének érdekében.

A gazdasági versenyképesség és a hatósági előírások szempontjából is megoldás lehet az előállítási folyamatok monitorozása és szabályozása, ami megvalósítható a tervezés alapú minőségbiztosítás (*Quality by Design*, QbD) és az ezzel összhangban lévő folyamat felügyelő- és analízáló technológiák (*Process Analytical Technology*, PAT) alkalmazásával.

2.3.1 Quality by Design

A 2009 és 2012 között bevezetett innovatív QbD irányelv a gyógyszerek tervezése, fejlesztése és gyártása során statisztikai, elemzési és kockázatkezelési módszertan alkalmazásával kívánja biztosítani ezek minőségét. A változékonyság megfelelő intézkedésekkel való kezeléséhez először a termék kívánt minőségi tulajdonságait (*Critical Quality Attributes*, CQA) kell meghatározni, majd pedig a gyártási folyamatot érintő változékonyság forrásait (*Critical Process Parameters*, CPP) kell azonosítani és megmagyarázni. Ez többváltozós elemzés használatán alapul, gyakran modern analitikai módszerekkel és eszközökkel kombinálva.

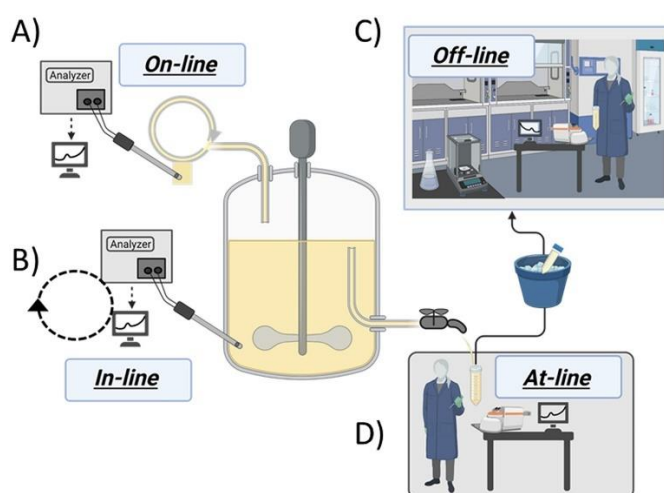
A Design Space a minőségre ható paraméterek számával megegyező dimenziójú tér azon része, amin belül tartva a paraméterek értékeit a minőség fenntartható. A szabályozórendszer megvalósításához szükséges a CPP-k valós idejű mérése, ami a PAT alkalmazásával valósítható meg. Emellett még nagyon fontos az adatok megfelelő gyűjtése és rendszerezése. [37], [38]

2.3.2 Process Analytical Technology

A PAT az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügynöksége (*Food and Drug Administration*, FDA) kezdeményezésével jött létre 2004-ben annak érdekében, hogy a gyógyszeripari gyártási folyamatok tervezését, ellenőrzését és szabályozását megkönnyítse [39]. A PAT megfelelően érzékeny analitikai eszközei a fizikai és kémiai folyamatparaméterek folyamatos ellenőrzésére alkalmasak a folyamatszabályozás optimalizálásának érdekében. A szondák és szenzorok beépülnek a gyógyszeripari gyártósorba és a hozzájuk kapcsolt számítástechnikai rendszereken keresztül történik az eredmények értelmezése kemometriai modellezéssel és ez alapján a paraméterek szabályozása. [40]

A gyártás során a paraméterek analizésére mérés-technikai szempontból többféle megvalósítás létezik (8. ábra):

- A) *Online*: az analizis a gyártási folyamat része, a mintát cirkuláltatva vizsgálják,
- B) *In-line*: valós idejű analizis, mérés során a mintát nem választják el, ez lehet invazív vagy noninvazív,
- C) *Offline*: az analizis a mintavétel után a gyártási folyamatától térben és időben elkülönítve történik,
- D) *At-line*: az analizis azonnal a mintavétel után történik, így a mért értékek ismeretében lehetőség van beavatkozni a folyamatba.



8. ábra: A folyamatparaméterek analizésének módszerei [40]

PAT rendszerek fejlesztésére az offline módszerek nem alkalmasak. A legjobbak az online és in-line módszerek, mivel mintavétel nélkül valósítható meg az adatok gyors elemzése, így a folyamatba azonnali be lehet avatkozni.

2.3.3 A CHO sejtek tenyésztésének kritikus folyamatparaméterei

A 2.2 fejezetben leírtak alapján megfogalmazhatóak a CHO sejtek tenyésztésének kritikus folyamatparaméterei. Ezek közül egyik sem hanyagolható el a végső termék tulajdonságainak szempontjából, így szükséges a megfelelő tartományon belüli szabályozásuk.

Ilyenek a médiumban lévő tápanyagok közül a glükóz koncentrációja, mint fő szén- és energiaforrás és az aminosavak koncentrációja, mint nitrogén- és energiaforrások, a metabolitok közül pedig a laktát- és az ammónia koncentrációja. Különböző fizikai paraméterek közül a pH, oldott oxigén szint és a hőmérséklet befolyásolják a sejtek életfolyamatait. Továbbá a tenyészet biokémiai tulajdonságai, mint az élő sejt szám (*Viable Cell*

Density, VCD), a teljes sejtszám (*Total Cell Density*, TCD) és az életképesség (*viability*) is nyomon követendők. [41]

2.3.3.1 CHO sejtek tenyésztésének vizsgálata inline módszerekkel

Előnyös a paraméterek inline és online vizsgálata, mert ez valós idejű szabályozást tesz lehetővé, és a befertőződés esélye is csökken. Az ilyen mérések rutinszerűek a fizikai paraméterek (hőmérséklet, pH, DO) mérésénél, azonban a tápanyagok és metabolitok monitorozása lényegesen nehezebb feladat részben a tápközeg komplex összetétele miatt. Így a bioreaktorokban használható szenzoroknak képesnek kell lenniük alacsony koncentrációk mérésére interferencia nélkül. [42]

Az elmúlt évtizedekben intenzív kutatások folytak a biológiai folyamatok valós idejű monitorozására alkalmas szenzorok fejlesztésében. Az ilyen folyamatok mérési módszereivel szembeni igények nagyok. A módszernek meg kell őriznie a sterilitást és ki kell bírnia a sterilizálás eléréséhez szükséges magas hőmérsékletet, érzékenynek kell lennie a komplex tápoldatokban lévő komponensek alacsony koncentrációjára és stabilnak kell lennie a hosszú tenyésztési idő során. [43]

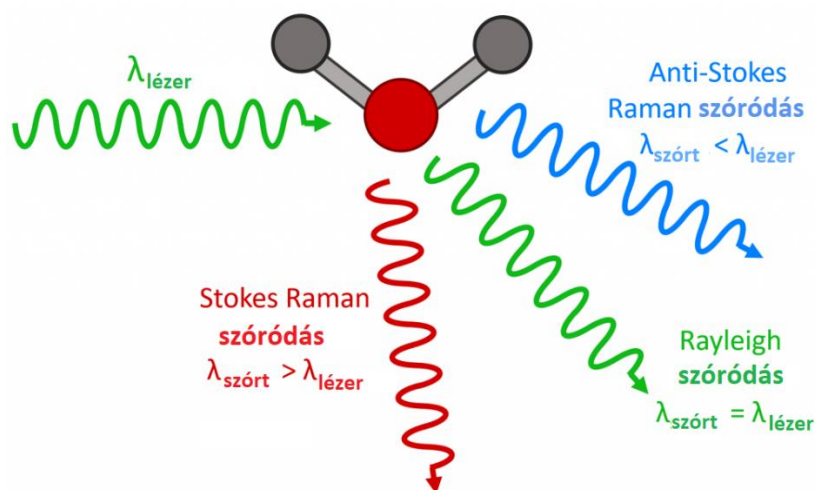
Megbízható analitikai módszerek, amelyek alkalmasak komplex összetételű rendszerek zavaró tényezők interferenciája nélküli vizsgálatára, így CHO sejt tenyészetek monitorozására, az alábbiak: [43], [44]

- Közeli és közép infravörös spektroszkópia (*Near and Middle Infrared*, NIR, MIR)
- Raman spektroszkópia
- Fluorimetria
- UV-VIS spektroszkópia
- Terahertzes spektroszkópia
- Dielektromos spektroszkópia stb.

2.4 Raman spektroszkópia

A Raman spektroszkópia rezgési spektroszkópai módszer, ami a fotonok rugalmatlan szóródásán, a Raman-effektuson alapszik. Nevét C. V. Raman indiai fizikusról kapta, aki 1928-ban elsőként figyelte meg a Raman-szórás [45]. Mennyiségi és szerkezeti információt is szerezhetünk anyagi rendszerekről a Raman-szórás mérésével.

Egy anyagi rendszert monokromatikus lézer fénnel besugározva az háromféleképpen szóródik (9. ábra). A szórt fény színekében legnagyobb intenzitással a Rayleigh-féle, rugalmas szórásból eredő vonalak jelennek meg, melyek a besugárzó fénnel megegyező hullámhosszú fénysugarakból származnak. Nagyon ritkán rugalmatlan Raman szóródás következik be, ekkor energiatranszfer történik a foton és a molekula közt. Ha a foton a folyamat során energiát veszített, megnő a hullámhossza, ez a Stokes-féle Raman-szóródás. Ha pedig energiát nyer a foton, hullámhossza csökken, amit anti-Stokes Raman-szórásnak neveznek. [46]



9. ábra: A fényszóródás három esete [47]

Kvantummechanikailag a Stokes és anti-Stokes szóródás egyformán valószínű folyamatok, azonban statisztikailag a Stokes valószínűbb, így ez intenzívebb, ezáltal jobban mérhető. Mivel a szórt fény hullámhossza függ a gerjesztő fény hullámhosszától célszerű relatív számmal, a gerjesztési hullámhossztól való eltérésben, a Raman eltolódásban (cm^{-1}) megadni.

A Raman spektroszkópia optikai módszerként roncsolásmentes elemzést tesz lehetővé. Akár több paraméter együttes, gyors analízise is megvalósítható vele már inline és online formában is. További nagy előnye, hogy vizes oldatok is jól mérhetőek vele, ellentétben a MIR vagy NIR spektroszkópiával. Ugyanakkor hátránya, hogy drága a mérőműszer, érzékeny külső fényre, az oldatban lévő fluoreszcens komponensek növelik a háttérzajt és az alapvonal-eltolódást. A spektrumok kiértékelése csak bonyolult kemometriai módszerek használatával valósítható meg, és mennyiségi információ csak nagy kalibrációs adathalmaz segítségével nyerhető ki belőlük. [48]

2.4.1 Raman spektroszkópia-alapú monitorozás a biotechnológiában

Ahogy a technológia fejlődött, a nehézségek kiküszöbölésével a Raman spektroszkópia polimer-, gyógyszer-, biotechnológiai és orvosbiológiai elemzési alkalmazása az elmúlt évtizedekben megnőtt. A Raman spektroszkópia mára már széleskörűen alkalmazott PAT eszköz megbízhatósága miatt. [49]

Számos alkalommal vizsgálták a Raman spektroszkópia alkalmazhatóságát biológiai folyamatok monitorozására. Egy korai tanulmányban Shope és munkatársai az etanol termelését követték a Raman spektrum csúcs alatti területének elemzésével szacharóz fermentáció során [50]. 1999-ben Shaw és munkatársai Raman spektroszkópiát alkalmaztak már sokváltozós adatelemzési módszerek alkalmazása mellett és a glükóz etanollá való alakulását monitorozták élesztő fermentációban [51]. Ezután többféle mikroorganizmus tenyésztésben, mint a *Saccharomyces cerevisiae* [52], a *Lactobacillus casei* [53] és az *Escherichia coli* [54], követték sikeresen a glükóz-, etanol-, tejsav, acetát-, formiát- és fenilalanin koncentrációkat.

2010-ben CHO emlőssejtek fed-batch tenyésztésében Abu-Absi és társai glükóz, glutamin, glutamát, laktát, ammónia, a TCD és a VCD valós idejű monitorozását valósították meg Raman spektroszkópiával, részleges legkisebb négyzetek módszerén (*Partial Least Squares*, PLS) alapuló modellekkel [55]. Utánuk több kutatócsoport is foglalkozott hasonló folyamatparaméterek monitorozásával, mint a sejtszám, tápanyag- és metabolit koncentrációk [43], [56].

Egy tanulmányban négy, a CHO sejtek növekedésének és a MAb termelés szempontjából fontos aminosav (tirozin, triptofán, fenil-alanin és metionin) monitorozását kísérelték meg. A komponensekre épített PLS modellek közül a metionin modellének alkalmazása nem volt sikeres [57]. Azonban a szakirodalomban korábban nem vizsgálták más aminosavak Raman spektroszkópia-alapú monitorozásának lehetőségét. Továbbá eredményes kutatások bizonyították, hogy Raman spektroszkópiával az antitest termék mennyisége [58], és a tenyésztet kémhatása [59] is nyomon követhető.

A Raman spektroszkópia ígéretes módszer az antitest termék minőségének nyomon követésére is. Sikerült az antitestek glikozilációját megfigyelni, mert a Raman spektroszkópia a tápközeg komplexitása ellenére is hatékony módszer a rendkívül hasonló molekulák megkülönböztetésére. A glikozilált és nem glikozilált MAb-ok koncentrációját sikeresen, egyidejűleg és valós időben prediktálták nagy pontossággal. [60]

2.4.2 Kalibrációs modell készítése és méretnövelhetősége

Pontos és robusztus kalibrációs modell fejlesztéséhez a kalibrációs stratégia és kemometriai eszközök megfelelő kiválasztása szükséges. A sokváltozós adatelemzést alkalmazó technikák általában nagy adathalmazt igényelnek a modell kalibrálásához. Új folyamatokra a kemometriai módszer megválasztása nehéz, és optimalizálása iteratív módon történik. [42]

A szakirodalom alapján biotechnológiai folyamatok Raman spektroszkópia-alapú monitorozását megvalósították explicit és implicit modellekkel is, azonban az újabb tanulmányok implicit modelleket használnak, mert célszerűbbnek bizonyultak. Az implicit modellek korreláción vagy kovariancián alapulnak, nem feltételezik a rendszer fizikai törvényeinek ismeretét, de mégis figyelembe veszik azokat, továbbá nem feltételeznek változó függetlenséget, és nem kényszerítik az adatokat egy ismert modellhez való illeszkedésre. [49]

A modellek kevésbé megbízhatóak a kalibrációs adathalmazon kívüli karakterisztikájú minták prediktálásában, de a körülmények és sejtvonal folyamatos változtatásával ez kiküszöbölhető. Mehdizadeh és munkatársai robusztus PLS modelleket hoztak létre glükózra, laktátra és VCD-re [61]. Webster és munkatársai tanulmányának célja a glükóz-, laktát-, glutamát-, ammónia- és antitest termék koncentrációt, a TCD-t és VCD-t jól prediktáló sejtvonaltól független, ipari gyártási méretben alkalmazható modellek létrehozása volt, amelyet szintén PLS regresszióval valósítottak meg [62]. Nagy mértékben javította a modellek predikációs képességét, ha a kalibrációs adathalmazt a mérendőhöz hasonló pontokkal egészítették ki. Több más tanulmányban is sikerült olyan PLS modelleket létrehozni, amik a bioreaktor méretétől függetlenül megfelelőek voltak [63], [64].

A lineáris regressziót alkalmazó modellek mellett új szemléletmódként megjelentek a gépi tanulást használó kalibrációs modellek is. Raman spektroszkópiával sikeresen monitorozták a VCD-t, életképességet, glükóz-, glutamát, glutamin-, ammónia-, laktát- és további komponensek koncentrációját *Just-In-Time* gépi tanulást alkalmazó modellek segítségével. [65], [66]

2.5 CHO sejtes tenyésztési folyamatok szabályozása, tápanyag-adagolási stratégiák

Terápiás fehérjék előállítása a gyógyszeriparban jelenleg legelterjedtebben fed-batch technológia alkalmazásával történik. Napi mintavétel alapján, bólus adagolással juttatják be a

szükséges tápanyagokat a bioreaktorba, a PAT eszközei által nyújtott előnyök kihasználása nélkül. Az ipari biotechnológiában még nem terjedtek el széleskörűen azok a robosztus és megbízható analitikai módszerek, amelyek támogatják a modern, automatizált folyamatszabályozási technikákat.

A 2.2 fejezetben részletezett módon a CHO sejtek számukra toxikus laktátot és ammóniát termelnek. A melléktermékek felhalmozódásának kiküszöbölésére a szakirodalomban a fizikai folyamatparaméterek szabályozása mellett különféle tápanyag-adagolási stratégiákat dolgoztak ki. A melléktermékek csökkentésére a manuális bólus tápanyag-adagolási stratégiák [67] után nagy előrelépés volt a valós idejű monitorozás kihasználása a kidolgozott technikákhoz. Gagnon és munkatársai által kidolgozott HIPDOG (*HI-end pH-controlled Delivery Of Glucose*) technológiában a pH érték függvényében történt a tápanyagoldatok adagolása a glükóz alacsony szinten tartásának érdekében [68]. Egy másik kutatásban Lu és csapata online kapacitás mérésből számolt sejtszám alapján, majd automata mintavételből meghatározott glükóz koncentráció alapján szabályozta a tápanyagoldatok beadagolását [69].

Raman spektroszkópia-alapú szabályozásról tíz éve publikáltak először. Egy dublini kutatócsoport valós idejű monitorozáson alapuló szabályozást valósított meg a glükóz adott értéken tartására [43], [70]. Berry és munkatársai a glükóz koncentráció szabályzásának hatását vizsgálta a sejtek által termelt fehérje glikációjára [71]. Egy másik tanulmányban online Raman spektroszkópiával mért laktát- és glükóz koncentráción alapuló tápanyag-adagolási stratégiát is kidolgoztak [72].

Összefoglalásként elmondható, hogy korábbi tanulmányokban egy-egy komponens szabályoztak, de folyamatoptimalizációként az arginin, mint a CHO DG44 sejtek számára fontos aminosav koncentrációjának hatását nem vizsgálták. Nincs példa a szakirodalomban az arginin koncentrációjának monitorozására, és az alapján történő tápanyag-adagolásra. Továbbá korábbi kutatások alapján a kemometriai modelleknek jó a méretnövelhetősége, így jó ipari méretekben alkalmazható modellt lehet fejleszteni labor méretű kísérletek alapján, ami költséghatékonyság szempontjából igen előnyös.

3 Célkitűzés

A célom egy olyan PAT elveknek megfelelő technológia kifejlesztése volt, amely alkalmas az adalimumab termelő CHO sejtvonal bioreaktoros tenyésztésének valós-idejű monitorozására. Emellett a technológia alkalmazásával olyan dinamikus tápanyag-adagolási stratégiát szerettem volna kidolgozni, amellyel a sejtek számára az antitest termelés szempontjából optimális körülmények biztosíthatóak a tenyésztés során.

A szakirodalom alapján elmondható, hogy a Raman spektroszkópia alkalmas emlőssejtes tenyészetek különböző komponenseinek valós-idejű monitorozására. A glükóz koncentráció kritikus folyamatparaméter a sejtenyésztés során, így több tanulmányban is dolgoztak ki rá szabályozási stratégiát. Az aminosav koncentrációk Raman spektroszkópia-alapú nyomon követésével és szabályozásával azonban kevésbé foglalkoztak korábban a szakirodalomban.

Ezért munkám során célul tűztem ki a glükóz, arginin, glutamin és laktát koncentráció követésére alkalmas Raman spektroszkópia-alapú kalibrációs modellek fejlesztését kemometriai módszerek alkalmazásával. A kifejlesztett modelleket egy bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérleten terveztem validálni. A kutatócsoport által kifejlesztett Raman spektroszkópia-alapú monitorozó és szabályozó rendszer segítségével a komponensek valós-idejű monitorozását, valamint a kedvező sejtenyésztési környezet fenntartására dinamikus tápanyagadagolási stratégiák fejlesztését tervezem megvalósítani. A kísérletek során célom a tápanyagoldatok beadagolását a valós-időben mért glükóz- és arginin koncentrációk alapján szabályozni, és vizsgálni a különböző szabályozási beállítások hatását a sejtenyésztetre és az antitest termelésre.

4 Kísérletek, módszerek

A kísérletek során DG44 típusú, adalimumabot termelő CHO sejtvonallal dolgoztam. A sejteket a Richter Gedeon Nyrt. biztosította.

4.1 Tenyésztéshez felhasznált oldatok

Tápoldat

A CHO sejtek tenyésztéséhez alkalmas tápoldatot porból készítettem el a gyártó ajánlása szerint (nem megadható adat), majd 6 mM glutamint (L-glutamin, Sigma-Aldrich) adtam hozzá. Elkészítés után az oldatot lamináris áramlású fülke (Holten, LaminAir) alatt sterilre szűrtem (Bottle Top Filtration Unit, 0,2 μm , VWR), majd felhasználásig hűtőben tároltam (4°C).

Tápanyagoldatok

A biorektorban a tápanyagok pótlására kétféle, porból készített tápanyag (feed) oldatot használtam. A két alkalmazott feed az ActiCHO Feed-A Powder Base CD (Feed A, Cytiva) és az ActiCHO Feed-B Powdered Base CD (Feed B, Cytiva) volt. Mindkét oldatot a gyártó javaslata alapján készítettem el, felhasználásig hűtőben, fénytől védve tároltam.

További szükséges oldatok

- 40 m/m%-os glükóz oldat (D-(+)-glükóz, Sigma-Aldrich)
- 9 g/l-es fiziológiás sóoldat (NaCl, Sigma-Aldrich)
- 0,5 M-os lúg oldat (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich)
- habzásgátló (Ex-cell antifoam, Sigma-Aldrich)

4.2 Rázólombikos sejtenyésztés

4.2.1 Sejtfelvétel

Az első lépés a sejtek felvétele volt a sejtbankból (*Research Cell Bank*, RCB), amelyek folyékony nitrogénben (-193 °C-on) voltak tárolva. A fiolák 1 ml, 10^7 db sejt/ml koncentrációjú oldatot, és krioprotektív anyagként 10% dimetil-szulfoxid (DMSO) oldatot tartalmaznak. Miután az RCB-ből kivettem felolvasztottam, és a tartalmát lamináris áramlású fülke alatt előzetesen kimért 10 ml 37 °C-os tápoldatba vittem át szerológiai pipetta segítségével. Ezt követően a DMSO eltávolítása érdekében a szuszpenziót centrifugáltam (Rotana 460R, Hettich) 10 perc, 25 °C, 1000 fordulat/perc programon és a felülúszó leöntése után a leülepedett sejteket lamináris fülkében 37 °C-ra előmelegített, 30 ml tápoldatot tartalmazó steril lombikba pipettáztam át. A tenyészetet steril körülmények között, inkubátorban (SANYO, 37,0 °C, 100%

relatív páratartalom, 5% CO₂), rázógépen (Thermo, MaxQ2000, 100 fordulat/perc) kevertetve tartottam.

4.2.2 Passzálás és sejtszámlálás

A sejteket meghatározott időközönként (3-4 naponta) friss tápoldatba passzáltam át, hogy a sejtosztódás és sejtnövekedés során elhasználódott tápanyagforrást pótoljam, illetve a toxikus melléktermékek felhalmozódását elkerüljem. Továbbá a passzálás során léptéknövelést is végrehajtottam.

A passzálások előtt mindig meghatároztam az aktuális lombikban a sejtek koncentrációját, amihez lamináris fülke alatt egy Eppendorf csőbe kb. 1 ml mintát vettem. A mintából vortexelés (WhirliMixer) után, automata pipetta segítségével a mintához Trypan kék festéket (Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%, Thermo Fisher Scientific)) kevertem 1:1 arányban. Amennyiben sejtszámláláshoz hígítani kellett a mintát a festék hozzáadása előtt ezt fiziológiás sóoldattal tettem meg. Ezután 10-10 µl szuszpenziót a Bürker-kamra (Blau Brand) egy-egy kamrájába pipettáztam, majd mikroszkóppal (Olympus KCX53) 10-szeres nagyításon megszámláltam az élő és halott sejteket. A megkülönböztetés alapja az, hogy a halott sejtek membránja sérült, így képes áthatolni a festék, megfestve azokat kék színűre. A számolást öt látótéren ismételtam, mindkét kamrából választva legalább kettőt, vettem az átlagukat és kiszámoltam a milliliterenkénti élő- és teljes sejtszámot, illetve az életképességet.

Ezek után a lombikból kivettem az ahhoz szükséges térfogatú szuszpenziót, ami a passzálás utáni léptéknövelt térfogatban 300 000 sejt/ml kezdő sejtszámot eredményezett. A szuszpenziót lecentrifugáltam (1000 fordulat/perc, 10 perc, 25°C), a felülúszó leöntése után a leülepedett sejteket pedig a megfelelő térfogatú, friss, 37 °C-ra előmelegített tápoldatba vittem át.

4.2.3 Inokulum készítése

A bioreaktoros sejtenyésztés elindításához nagy mennyiségű sejt előállítására volt szükség, amelyet a rázólombikos sejtenyészetek méretnövelésével valósítottam meg az 1. táblázat szerint.

1. táblázat: Passzálások összefoglalása

Passzázs száma	Térfogat (ml)	Lombik térfogat (ml)	Induló sejtszám (db/ml)	Méretnövelés
P_0	30	100	$3,33 * 10^5$	-
P_1	30	100	$3 * 10^5$	1:1
P_2	100	250	$3 * 10^5$	3:10
P_3	100	250	$3 * 10^5$	1:1
P_4	300	500	$3 * 10^5$	1:3
Bioreaktor	1500	2000	$5 * 10^5$	1:5

Az inokulum készítésének utolsó lépéseként a P_4 -es passzázsból a megfelelő sejtszámot tartalmazó szuszpenziót lecentrifugáltam (1000 fordulat/perc, 20 perc, 25°C) és a sejteket 200 ml előmelegített, friss tápoldatba juttattam. Az inokulumot tartalmazó Duran üveget a reaktorhoz csatlakoztattam csőhegesztéssel (BioWelder TC, Sartorius Stedium) és perisztaltikus pumpát (Watson-Marlow 120U) alkalmazva inokuláltam a reaktorba gondosan ügyelve arra, hogy a hőmérséklet ne csökkenjen 36,5 °C alá.

4.3 Bioreaktoros kísérletek

4.3.1 A reaktor előkészítése

Egy 2 l hasznos térfogatú üveg bioreaktort használtam, és kb. 1500 ml munkatérfogattal dolgoztam a kihabzás elkerülésének érdekében. A sejteknek szükséges további tápanyagok és habgátló beadagolása, levegőztetés, és a pH szabályozása. Ezek alapján a következő gáz, illetve folyadék beadagolására alkalmas ágakat csatlakoztattam a reaktorra:

- Sűrített levegő be + szén-dioxid,
- Levegő ki,
- Lúg oldat,
- Habzásgátló,
- Glükóz oldat,
- Feed A,
- Feed B,
- Tápoldat + inokulum,
- Mintavevő és sóoldat leeresztő ág.

A szükséges helyeken a folyadékágakat pumpálható és hegeszthető csőszakaszokkal (C-Flex, Saint-Gobain) láttam el, valamint az ágak végére üres, levegőszűrővel (Midisart 2000, Sartorius Stedim) ellátott nyomásálló (Duran) üveget szereltem (részletes szerelést lásd a Függelékben, 11. táblázat). A be- és kimenő levegő ágait szintén levegőszűrővel láttam el. A szilikon csőszakaszok csatlakozásait gyorskötegelő segítségével rögzítettem, a szabad csővégeket pedig hoffmann szorítóval zártam le.

Ezek után a tenyésztési paraméterek monitorozásához használt, előzetesen bekalibrált, inline szondákat csatlakoztattam:

- Hőmérő (Applikon),
- pH szonda (Hamilton, EasyFerm Plus), két pontosan kalibrálva
- Oldott oxigén mérő (Hamilton, Visiferm DO ECS), két pontosan kalibrálva
- Dielektromos spektrométer (Hamilton Incyte 220)
- Raman spektrométer immerziós bioszondája (Kaiser Raman RXN2 hibrid, BioOptic 220), hullámhossz és fényintenzitás szerint kalibrálva.

Az összeszerelt reaktort 1 l fiziológias sóoldattal töltöttem fel az elektródok minőségének megőrzésére, az üres Duran üvegekbe pedig kevés desztillált vizet töltöttem a sterilizációt biztosító gőzképződés érdekében. A levegőszűrőket, a keverőmotort és a szondák csatlakozóit alufóliával védtem az autoklávozás során. A reaktort a szerelésekkel együtt, illetve a glükóz és lúg oldatokat tartalmazó Duran üvegeket (kupakot meglazítva) az autoklávba (5075 ELV autoclave, Tuttnauer) helyeztem és a megfelelő program (121 °C, 30 perc) használatával sterilizáltam.

4.3.2 A reaktor indítása

Autoklávozás után lamináris fülke alatt kicseréltem az üres Duran üvegeket a megfelelő oldattal (tápoldat, glükóz oldat, habzágátló és lúg oldat) töltöttekre. A reaktort ezek után mérlegre (Kern PKT 24K0.1) helyeztem, a tenyésztet tömegének nyomon követéséhez. A reaktort fűtőköpennyel és keverőmotorral szereltem fel, bekötöttem a visszafolyó hűtő hűtővíz keringtetését, illetve a hőmérőt a desztillált vízzel feltöltött tokjába helyeztem, majd csatlakoztattam a pH, DO és hőmérsékletmérő szondákat az Ez-control (Applikon Biotechnology) szabályozó egységhez. Továbbá csatlakoztattam a dielektromos spektrométer szondát az EvoBox programot futtató számítógéphez, és a Raman szondát az iC Raman programot használó számítógéphez.

A fiziológias sóoldat kipumpálása után táráztam a mérleget és perisztaltikus pumpával belejuttattam a tápoldatot. Csatlakoztattam a tenyészet oxigén ellátását biztosító O₂, a sűrített levegő és a CO₂ ágakat az Ez-control kontrolleren lévő szelepekhez, elindítottam a fűtést és a kevertetést. Az egyes folyadékágakat perisztaltikus pumpa segítségével feltöltöttem.

Az Ez-control programja segítségével megkezdtem a tenyésztési paraméterek szabályozását. Az oldott oxigént 40 %-ra szabályozta oxigén beadagolásával a folyamatos (25 ml/perc) sűrített levegő beadagolás mellett. A pH szabályozása 7,10 értékre történt lúg oldat és CO₂ adagolásával. A fordulatszámot 120 fordulat/perc-re, a hőmérsékletet pedig 37 °C-ra állítottam. Az összeszerelt reaktor képe látható az alábbi ábrán (10. ábra).



10. ábra: A reaktor és az Ez-control kontrollere

A tenyésztési adatok gyűjtését megkezdtem a BioXpert programmal, és mikor a szabályozott paraméterek beálltak az adott értékre, elindítottam a Raman spektrumok felvételét. A reaktort védőfóliával borítottam, illetve lekapcsoltam a világítást, hogy csökkentssem az ebből adódó zajt a spektrumokon.

A paraméterek beállása után elindítottam az élő sejtszám mérésére alkalmas dielektromos spektrométert (Arc View 465 XL, Hamilton), majd a permittivitás értéket nulláztam az inokulálás előtt. Az inokulumot a 4.2.3 fejezetben leírt módon a reaktorba pumpáltam, ezzel elindítva a bioreaktoros kísérletet.

4.3.3 A tenyészet fenntartása

Az emlőssejtes tenyészetek fenntartása rátáplálásos technológiával történt. Az egyik esetben a hagyományos fed-batch technikával bólus adagolással, azaz előre meghatározott mennyiségű tápanyag- és glükóz oldatok beadagolásával tartottam fent a tenyészetet. Emellett

két olyan kísérletet végeztem, amelyben a glükóz- és arginin koncentrációkat adott értékre szabályoztam. Minden kísérlet során a reaktorban lévő glükóz-, arginin-, glutamin- és laktát koncentrációját monitoroztam.

Az alkalmazott tápanyagoldatokat (Feed A, Feed B) lamináris fülke alatt steril Duran üvegekbe mértem ki, majd az inokulumhoz hasonlóan csőhegesztő segítségével csatlakoztattam a reaktorhoz. A feed oldatokkal töltött üvegeket jéggel teli hőszigetelő zárt dobozban tartottam a kísérlet alatt az anyagok fényérzékenysége és bomlékonysága miatt.

A feed oldatok adagolása egyszerre történt, a gyártó ajánlása alapján a Feed B mennyisége minden esetben a Feed A mennyiségének a tizede volt. Fontos megjegyezni, hogy a Feed A oldat glükózt is tartalmaz.

4.3.3.1 Bólus tápanyag-adagolási stratégia

A tápanyagoldatok rátáplálását a tenyésztés 4. napján kezdtem, majd azt követően minden 2. napon ismételtam. A beadagolt mennyiség a tenyészet aktuális térfogatától függött. Ezt a mérlegről leolvasott tömegből becsültem a sűrűséget 1 g/ml-nek feltételezve. Nagy élő sejtszámnál a tenyésztés abban a szakaszában, amikor már nem a sejtnövekedés a meghatározó, hanem az antitest termelés, a sejteknek további glükózra volt szükségük. Az oldat adagolását a valós-időben monitorozott glükóz koncentráció alapján döntöttem el. A tápanyag- és glükóz oldatok beadagolását a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: Tápanyag- és glükóz oldatok beadagolása a bólus adagolású fed-batch kísérlet során

Tenyésztési idő [nap]	Tenyésztési idő [óra]	Oldat	Célérték a reaktorban	Reaktor térfogat (g)	Beadagolt mennyiség (g)
4. nap	96,15	FEED A	4 w/w%	1370	54,8
	99,00	FEED B	0,4 w/w%		5,5
5. nap	124,90	Glükóz	5 mM	1300	3,5
6. nap	144,20	FEED A	4 w/w%	1262	50,4
	147,13	FEED B	0,4 w/w%		5,05
8. nap	191,05	FEED A	8 w/w%	1183	94,6
	192,33	FEED B	0,8 w/w%		9,5
9. nap	214,95	Glükóz	10 mM	1230	6,4
10. nap	243,07	FEED A	8 w/w%	1178	94,2
	244,02	FEED B	0,8 w/w%		9,42
11. nap	267,82	Glükóz	45 mM	1226	33,6

4.3.3.2 Dinamikus tápanyag-adagolási stratégia

A CHO tenyészetek tápanyag-adagolása a Raman spektroszkópiával valós időben monitorozott pillanatnyi glükóz- és arginin koncentráció alapján történt 40m/m%-os glükóz-, valamint Feed A és Feed B tápanyagoldatok beadagolásával. A szabályozás célja az volt, hogy az arginin szintet 2,5 mM-os alapértéken, miközben a glükózt 11 mM-os szinten tartsam egy automatizált adatelemző és szabályozó rendszer alkalmazásával. A kísérletek során kétféle tápanyagadagolási stratégiát valósítottam meg, amely abban különbözött, hogy az egyik esetben a glükóz felső szabályozási limit 15 mM, a másik esetben 25 mM volt.

Az arginin szint szabályozása tápanyagoldatok beadagolásával történt, míg a glükóz szint szabályozásához glükóz oldatot és tápanyagoldatokat adagoltak a pumpák, mivel a Feed A oldat 500 mM glükózt is tartalmazott. A Feed A és Feed B oldatokat a gyártó ajánlása alapján mindig 10:1 arányban adagoltam. A tápanyag-adagolási stratégiákat tekintve az adagolás öt esete merülhet fel, amit az alacsonyabb glükóz felső limit esetében a 3. táblázatban és a magasabb glükóz felső limit esetében a 4. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: A tápanyag-adagolási stratégia oldat-beadagolási esetei alacsonyabb glükóz felső limit esetén

Eset sorszáma	Glükóz koncentráció	Arginin koncentráció	Esemény
1	>15 mM	>2,5 mM	nincs beadagolás
2	>15 mM	<2,5 mM	nincs beadagolás
3	<15 mM	<2,5 mM	1x Feed A és 0,1x Feed B beadagolás
4	<11 mM	<2,5 mM	1x Feed A és 0,1x Feed B beadagolás + glükóz-oldat (ha még szükséges)
5	<11 mM	>2,5 mM	glükóz oldat beadagolás

4. táblázat: A tápanyag-adagolási stratégia oldat-beadagolási esetei magasabb glükóz felső limit esetén

Eset sorszáma	Glükóz koncentráció	Arginin koncentráció	Esemény
1	>25 mM	>2,5 mM	nincs beadagolás
2	>25 mM	<2,5 mM	nincs beadagolás
3	<25 mM	<2,5 mM	1x Feed A és 0,1x Feed B beadagolás
4	<11 mM	<2,5 mM	1x Feed A és 0,1x Feed B beadagolás + glükóz-oldat (ha még szükséges)
5	<11 mM	>2,5 mM	glükóz oldat beadagolás

Ennek kivitelezésére a kutatócsoport által fejlesztett adatelemző és szabályozó rendszert alkalmaztam. A bioreaktorban inline felvett Raman spektrumokat a szoftver valós-időben kiértékelte és az általam fejlesztett kalibrációs modellek segítségével meghatározta a bioreaktorban a pillanatnyi glükóz-, arginin- és laktát koncentrációt. A szabályozó program a Raman spektrumok kiértékelésével kapott koncentráció és a reaktor térfogatának ismeretében kiszámolja a célkoncentráció eléréséhez szükséges anyagmennyiséget. Ezt tovább számolja a beadagolt oldatok koncentrációi, a pumpálható csőszakasz átmérője és a pumpák fordulatszáma alapján arra az időtartamra, ameddig a pumpáknak működni kell. Ez az időmennyiség a továbbított jel a mikrokontrollernek (Arduino UNO), ami vezérli a pumpákat. A reaktor térfogatához a program automatikusan hozzáadta a beadagolt tápanyag- és glükóz oldatokat, a mintavételezések alkalmával pedig manuálisan korrigáltam az értéket a lúgbeadagolás és mintavétel okozta tömegváltozásokkal.

4.3.4 Mintavételezés

A bioreaktorból hétköznapi naponta kétszer (9 és 15 órakor), hétvégekre pedig napi egyszer történt mintavétel. A mintákból:

- meghatároztam az élő és halott sejtszámot két párhuzamos Bürker-kamrás sejtszámlálással (lásd 4.2.2 fejezet), majd ebből életképességet számoltam,
- megvizsgáltam a sejtek morfológiáját, valamint az esetleges befertőződésre utaló idegen mikrobák jelenlétét,
- ellenőriztem külső pH mérő segítségével a reaktorban lévő pH elektród működését (egymás után kétszer mért 0,5 pH eltérés esetén korrigáltam a reaktorban mért pH értéket),
- naponta meghatároztam vércukorszintmérővel (Accucheck) a fermentlé glükóz koncentrációját.

A mintavételekkor ellenőriztem a reaktorban lévő hab mennyiségét, és amennyiben szükséges volt adagoltam habgátló oldatot. Továbbá ellenőriztem a reaktorban szabályozott paramétereket és a Raman spektroszkópia-alapú monitorozó és szabályozó rendszer működését.

A pH mérés és sejtszámlálás után a maradék mintában lévő sejteket centrifugában üleptettem (1000 fordulat/perc, 10 perc) és 5 ml felülúszót fagyasztottam le későbbi offline vizsgálatokhoz:

- titer mennyiségének meghatározása (Octet K2, FortéBio)
- aminosav koncentrációk mérése (S 433 Amino Acid Analyzer, Sykam)
- glükóz, glutamin, glutamát, laktát, ammónia koncentrációk mérése (Cedex Bio Analyzer (Custom Biotech, Roche))

A Cedex méréseket a Richter Gedeon Nyrt. munkatársai végezték el a mintákból.

4.4 Raman spektroszkópia alkalmazása

4.4.1 Raman spektroszkópiás mérések

A kísérletek során a Raman spektrumok felvételéhez Kaiser Raman RXN2 Hybrid (Kaiser Optical System) típusú készüléket használtam (11. ábra). A Raman bioszonda optikai kábel segítségével továbbítja a lézertényt a fényforrás és a detektort közt. A kísérletek előtt mindig elvégeztem a hullámhossz és intenzitás kalibrációját a gyártótól vásárolt feltét segítségével.

Az alkalmazott Raman spektrométer tulajdonságai:

Spektrofotométer: Kaiser Raman RXN2 Hybrid

Szonda: MR in-situ probe

Fényforrás: 785 nm, 400 mW Invictus diódlézer

Optika: BIO-Optic 220

Detektor: CCD detektor

Műszert vezérlő szoftver: iC Raman

Mérési hullámhossz tartomány: $1890 - 200 \text{ cm}^{-1}$

Spektrális felbontás: 1 cm^{-1}

Spektrum adatpontjainak száma: 1691

Spektrumfelvétel: 75x10 másodperc

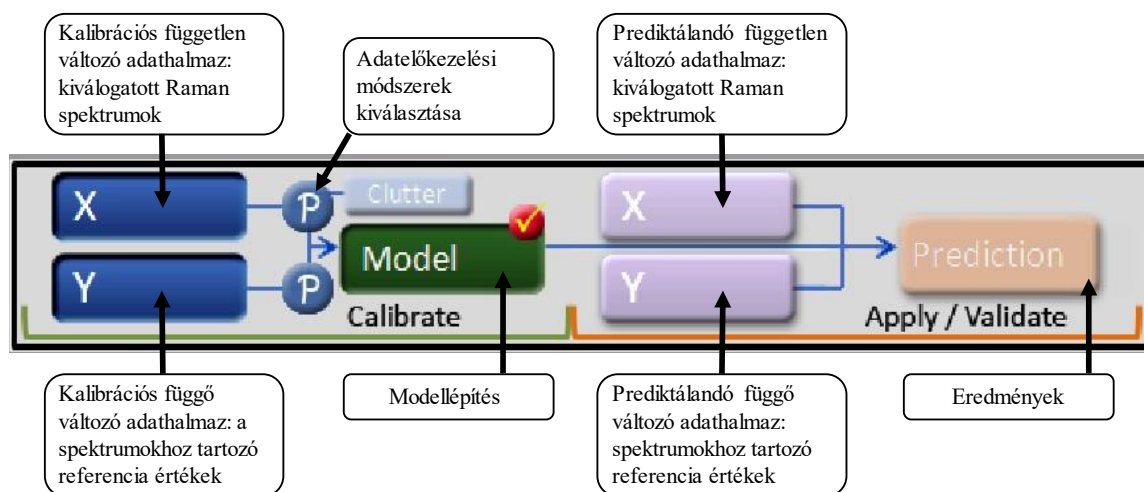


11. ábra: Kaiser Raman RXN2 Hybrid spektrométer [73]

A műszer 15 percenként egy spektrumot rögzített, amit 75 db 10 másodperces mérés összeadásával nyert. A több rövid spektrum felvételére azért volt szükség, mert lézerefény hosszabb ideig tartó besugárzásának hatására a rendszerben lévő biomolekulák erős fluoreszcenciája telítene a detektort. A rövid spektrumok összeadása pedig azért volt célszerű, mert az alacsony koncentrációjú komponensek jelintenzitása kicsi a spektrális zavaráshoz képest.

4.4.2 Raman spektrumok kemometriai elemzése

Az elemzés célja új mérések során a koncentrációk prediktálására alkalmas robusztus modell építése. A Raman spektrumok 1691 hullámszám változóhoz rendelt intenzitásokat tartalmaznak. A sokváltozós adatelemzés során az irodalomban leggyakrabban alkalmazott részleges legkisebb négyzetek módszerén (*Partial Least Squares*, PLS) alapuló regressziót használtam. A magyarázó változók nagy száma miatt nem használható például a legkisebb négyzetek (*Ordinary Least Squares*, OLS) módszere, hanem dimenziócsökkentésre van szükség. A PLS ezt úgy valósítja meg, hogy az eredeti változóteret matematikai transzformáció segítségével egy ortonormált térre vetíti, új, lineárisan független (látens) változókat hozva létre, amelyek maximalizálják a kovarianciát a függő változóval. A PLS regresszió során a spektrumokhoz, mint független változókhoz rendeltem a referenciaértéksort, mint függő változókat, ami esetemben a glükóz, arginin, glutamin és laktát koncentrációja. A spektrum- és koncentráció-adathalmazok előkezelése után modellt építettem belőlük, amit keresztvalidáció után külső validációra, másnéven predikcióra, tehát új adatpontok becslésére használtam. A spektrumok kiértékeléséhez a MATLAB R2017a (MathWorks) program PLS_Toolbox 8.2.1 (Eigenvector Research Inc.) szoftverét használtam. A PLS_Toolbox kezelőfelülete az alábbi ábrán látható (12. ábra).



12. ábra: A PLS modell építésének folyamata Matlab PLS_Toolboxban

A Raman spektrumok spc formátumban álltak rendelkezésemre, amelyekből a feldolgozáskor kiválogattam a referencia mérésekhez tartozó mintavételekkel párhuzamos spektrumokat és azokat töltöttem be a modellépítéshez.

4.4.2.1 Adatelőkezelés

A Raman spektrumok előkezelésére az alábbi módszereket alkalmaztam:

- Alapvonal-korrektúra (*Automatic Whittaker Filter, AWF*):

Az algoritmus a spektrumokhoz függvényt illeszt és ez alapján meghatározza, hogy mely adatok vannak az alapvonal felett és melyek tartoznak a háttérzajba (ezek nem tartalmaznak tényleges információt). Kétféle paramétert optimalizáltam:

λ : az alapvonal megengedett görbületét jellemzi, minél kisebb, annál nagyobb a megengedett görbület.

p : az illesztéshez szükséges aszimmetria mértékét jellemzi, nagyobb értékeknél a spektrum nagyobb hányada kerülhet az alapvonal alá, értéke 0 és 1 között változhat.

- Normálás:

A spektrumok normálásával a dinamikus környezet miatti fókuszálási hibákból és a lézer intenzitás ingadozásából eredő intenzitáseltolódások küszöbölhetőek ki. Az intenzitásértékek átskálázásával a változók relatív értékeivel dolgozhatunk tovább.

- *Standard Normal Variate, SNV*:

A spektrumokból kivonva a saját átlagukat, és elosztva a saját szórásukkal kapunk 0 átlagú és 1 szórású spektrumokat, azaz standard normális eloszlású változókat.

- *Területre normálás*

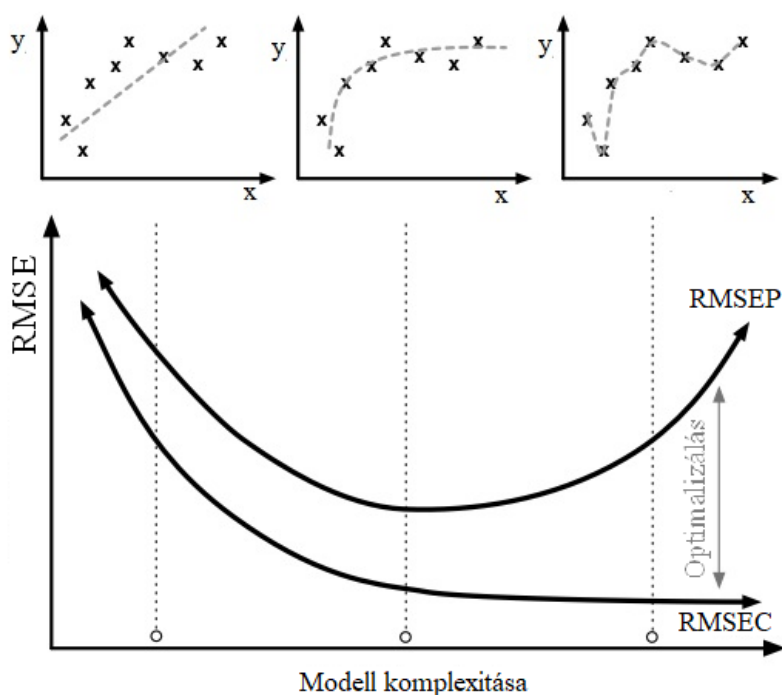
Az adott minta minden változóját (hullámszámok) a kiválasztott változó abszolút értékének összegével elosztva eredményül egy olyan vektort kapunk, aminek a görbe alatti területe egységnyi.

- Centrálás (*Mean Center, MC*):

Az átlagra centráláskor az egyes hullámszámokon mért intenzitások értékeiből kivonva a spektrumhalmaz átlagát csak az átlagtól való előjeles eltéréssel dolgozunk tovább.

4.4.2.2 Modellépítés

A PLS modell elkészítése során a látens változók (*Latent Variable*, LV) számát úgy optimalizáltam, hogy minél jobban leírja az adathalmaz változékonyságát. Az optimális LV szám meghatározása nagyon fontos a predikció szempontjából, ugyanis túl kevés választása esetén alulillesztett modellt kapunk, amely kevés információt hordoz, ha pedig túl sokat, akkor a modell túlillesztetté válhat, és elveszíti a robusztusságát, stabilitását (13. ábra).



13. ábra: Alul illesztett (balra), jól illesztett (középen) és túlillesztett (jobbra) modell [74]

4.4.2.3 Validálás

A validálás célja annak igazolása, hogy a matematikai modell a valóságnak megfelelő mennyiségi információt szolgáltatja. Ezt két féle módon valósítottam meg:

- a kalibráló mintasor bizonyos elemeinek felhasználásával (kereszt-validáció),
- és független, ismert összetételű minták felhasználásával (teszt-validáció).

A keresztvalidációnak két kritikus funkciója van a kemometriában. Egyrészt lehetővé teszi egy modell optimális komplexitásának felmérését (a LV-k számát), másrészt pedig egy modell teljesítményének becslését, ha azt ismeretlen adatokra alkalmazzák.

Venetian blinds típusú kereszt-validációt alkalmaztam. A módszer az eredeti spektrum adathalmaz elemeit ciklikusan 1, 2, ... n számozva, és az azonos számúakat egy csoportba sorolva n db halmazt képez. A kalibrációs adathalmaz 1/n-ed részét teszthalmaznak kihagyva,

a megmaradt adatokból (modellező halmaz) modellt készít. A kereszt-validálási eljárást több körben, eltérő teszhalmazok kihagyásával megismételte.

A teszt-validáció során független kísérletből származó (a modellező adathalmaztól független) adatokat használtam fel. A modelleket hagyományos bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérlet monitorozásával teszteltem.

4.4.2.4 Optimalizálás

Az optimalizációt a Pearson-féle korrelációs együttható (*Pearson's correlation coefficient*, R) és ennek négyzete (R^2), valamint az átlagos négyzetes hiba gyöke (*Root Mean Square Error*, RMSE) alapján végeztem, az 1-2 egyenlet szerint:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n}} \quad (2)$$

A látens változók számát és az adatelőkezelés beállításait iteratív módon optimalizáltam az R^2 és az alábbi hibaértékek alapján:

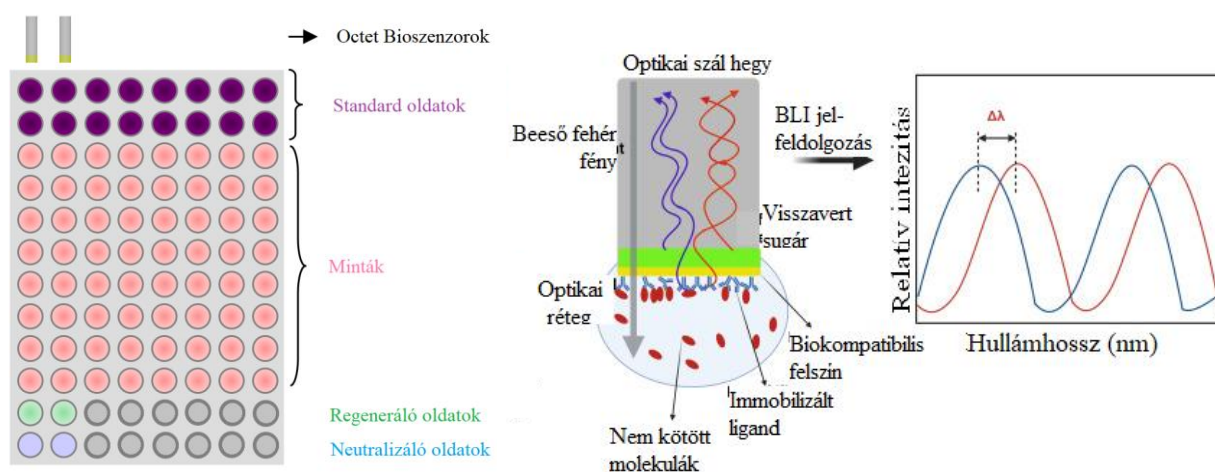
- a kalibráció átlagos négyzetes hibájának négyzetgyöke (*Root Mean Square Error of Calibration*, RMSEC),
- a kereszt-validáció átlagos négyzetes hibájának négyzetgyöke (*Root Mean Square Error of Cross Validation*, RMSECV),
- a predikció átlagos átlagos négyzetes hibájának négyzetgyöke (*Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP).

4.5 Fehérje titer meghatározása

A termelt adalimumab mennyiségét bioréteg interferometrián (*Biolayer Interferometry*, BLI) alapuló méréssel (Octet K2, FortéBio; Octet Data Acquisition és Analysis Szoftver) határoztam meg. A BLI egy optikai analitikai módszer, amely fényhullámok közti interferencia mintázatok alapján képes száloptikás bioszenzorokkal valós időben monitorozni a biomolekuláris kölcsönhatásokat. A bioszenzoron fehér fény halad át, és a fénysugarak az optikai szál végén lévő két optikai határfelületről visszaverődve (belső referencia réteg és biomolekuláris réteg) egymást erősítve vagy gyengítve interferálnak, amit egy CCD detektorsor

detektál. Mikor a bioszenzor az analátot tartalmazó oldatba merül, azok a szenzor felületéhez kötődve megnövelik a rétegvastagságot, így a két fényvisszaverő felület közti távolságot, ezzel eltolva az interferencia mintázatot (14. ábra).

A kalibráláshoz Humira referenciakészítményből hígítási sort készítettem 0-500 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció-tartományban, majd pedig a mintákat megfelelően hígítva egy 96 lyukú plate-be pipettáztam. A standardek ből és a minták ből is két párhuzamos mérést végeztem. A hígítást minden esetben foszfáttal puffertolt sóoldattal (*Phosphate-buffered saline*, PBS) végeztem. Minden lyuk, kivéve a regeneráló oldatot tartalmazó, 0,5% Tween 20 oldatot tartalmazott a nemspecifikus kötődések elkerülésének érdekében. A mérésekhez Protein A (Sartorius Stedim Biotech) szenzorhegyet használtam, amit 1,5 pH értékű 10%-os glicin oldattal regeneráltam és PBS oldattal neutralizáltam az egyes mérések között.



14. ábra: A műszerbe tehető 96 lyukú plate lehetséges elrendezése [75] (balra) és a szenzor működésének vázlatos rajza [76] (jobbra)

4.6 Aminosav koncentrációk mérése

Az aminosav koncentrációk meghatározása Sykam automata aminosav analizátorral (S 433 Amino Acid Analyzer, Sykam) történt. A méréseket Pantea Eszter és Simon László segítségével végeztem el. A módszer alapja, hogy az aminosavakat egy kationcserélő oszlopon elválasztjuk, majd ninhidrinnel reagáltatjuk, ami primer és szekunder aminosavakkal színes vegyületté alakul át, így lehetővé teszi az UV detektálást.

Az aminosavak elválasztásához 5. táblázatban részletezett összetételű eluenseket alkalmaztuk.

5. táblázat: Az aminosavak elválasztásához használt eluensek összetétele

	A eluens	B eluens	C eluens	Regeneráló oldat
Lítium-hidroxid (LiOH, Merck) [g/L]	2,877	4,796	4,796	10,790
Citromsav monohidrát (Merck) [g/L]	15,00	15,00	10,00	-
Lítium-klorid (LiCl, Merck) [g/L]	-	4,24	4,20	-
EDTA [g/L]	-	-	-	0,40
Etanol (EtOH, Merck) [mL/L]	50	-	-	-
Bórsav (Merck) [g/L]	-	-	10,00	-
Kaprilsav (Merck) [mL/L]	0,1	0,1	0,1	-
Sósav (HCl, 37%, Merck) [mL/L]	7,3	7,4	3	-
pH	2,9	4,2	8	-

Az eluensek számára hűthető tároló rész áll rendelkezésre, minden üveg speciális kupakkal rendelkezik, amely lehetővé teszi a légterek nitrogénnel öblítését. A minták automatizált injektálás (100 µl) után a mozgófázissal eljutnak a hőmérséklet program (37-70°C) szerint fűthető kationcserélő oszlopra (Cation Exchange Column, LCA K07/Li 4,6x150mm; Sykam), ahonnan távozva az eluátum összekeveredik a ninhidrinnel, majd a 130°C-ra fűtött reaktoron keresztül áramolva megtörténik a színreakció. A pufferek áramlási sebessége 0,45 ml/óra, a reagens áramlási sebessége 0,2 ml/óra volt. A végén kétutas fotométerbe jutva detektálhatjuk az elválasztott aminosavakat 440 és 570 nm hullámhosszokon. A kalibrációhoz 10-szeres hígítású PH-S Standard oldatot (Standard Stock Solution Type PH-S for Physiological Serum Sample Analysis; Sykam) alkalmaztunk. [77]

5 Eredmények és értékelésük

5.1 A kalibrációs modellek fejlesztése

A bioreaktoros CHO sejtenyésztések során a glükóz-, arginin-, glutamin- és laktát koncentrációk Raman spektroszkópiával való nyomon követéséhez szükség van kalibrációs modellek készítésére. Ezek elkészítéséhez hat korábban, a kutatócsoport segítségével végzett bioreaktoros kísérletből (KAL3, KAL4, KAL5, KAL6, KAL7 és KAL8 jelölésű kísérletek) származó adatpontokat használtam. A glükóz koncentráció prediktálására épített modell esetében további két, régebbi bioreaktoros kísérlet (KAL1, KAL2 jelölésű kísérletek) és rázó lombikos tenyészetek (LOMB jelölés alatt összefoglalva) eredményeit is felhasználtam, mert a glükóz monitorozásával előbb kezdett foglalkozni a kutatócsoport.

A glükóz, glutamin, glutamát, laktát és ammónia esetében a referencia koncentrációk mérése a Cedex Bio Analyzer készülékkel történt, míg az arginin esetében a Sykam automata aminosav analízátorral.

5.1.1 A Raman spektrumok előkezelése

Raman spektroszkópia esetén az adatok kiértékeléséhez szükség van különböző matematikai előfeldolgozási műveletekre az olyan hatások (fluoreszcencia, oldatban lévő szilárd részecskéken és buborékokon szóródó fény, detektor zaj stb.) csökkentésére vagy eltávolítására, amelyek rontják az értékes információ kinyerését a vizsgált spektrumból. Ezek a hatások általában a spektrumban alapvonal eltolódást, spektrális zajt és nagy intenzitású csúcsokat eredményeznek.

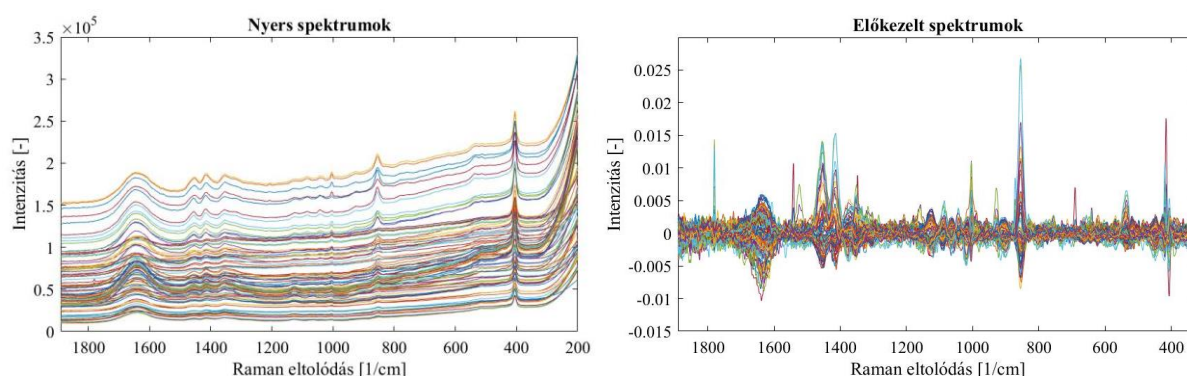
Nem létezik univerzális matematikai előkezelés. Minden mérési spektrumhalmaznak saját speciális megoldása van, így az egyes előkezeléseket különböző beállításokkal kipróbáltam, majd a hatásukat összevetve kiválasztottam a legjobbat. A Raman spektrumok esetén leggyakrabban alkalmazott előkezelési lépések az alapvonal-korrekción, a deriválás, a normálás és a centrálás. A spektrumok előkezelését a 4.4.2.1 fejezetben részletezett módszerekkel végeztem. Iteratív módon a RMSEC és RMSECV értékek alapján optimalizálva különböző spektrum-transzformációkat, és azok különböző beállításait találtam a legjobbnak az egyes komponensek esetében. Ezeket az 6. táblázatban foglaltam össze. Az aminosavak esetében (arginin és glutamin) a spektrumok végét levágtam ($200\text{--}320\text{ cm}^{-1}$), mert úgy találtam, hogy nem tartalmaz releváns információt. Továbbá területre normálást alkalmaztam az

aminosavak esetében a Raman szonda üvegének a jelére ($388\text{-}424\text{ cm}^{-1}$). A referencia koncentrációkon minden esetben átlagra centrálást végeztem.

6. táblázat: A Raman spektrumok előkezelése az egyes komponenseknél

	Alapvonalkorrekció		Normálás	Centrálás
Glükóz	AWF ($\lambda=10000$; $p=0,001$)		SNV	MC
Arginin	AWF ($\lambda=10000$; $p=0,001$)	SNV	Területre normálás ($388\text{-}424\text{ cm}^{-1}$)	MC
Glutamin	AWF ($\lambda=10000$; $p=0,001$)	SNV	Területre normálás ($388\text{-}424\text{ cm}^{-1}$)	MC
Laktát	AWF ($\lambda=1000$; $p=0,001$)		SNV	MC

Az előkezelés hatása az arginin koncentráció kalibrációs modelléhez felhasznált spektrumokra az alábbi ábrán tekinthető meg (15. ábra).



15. ábra: Az arginin koncentráció kalibrációs modelléhez felhasznált spektrumok az előkezelés előtt (bal oldalon) és után (jobb oldalon)

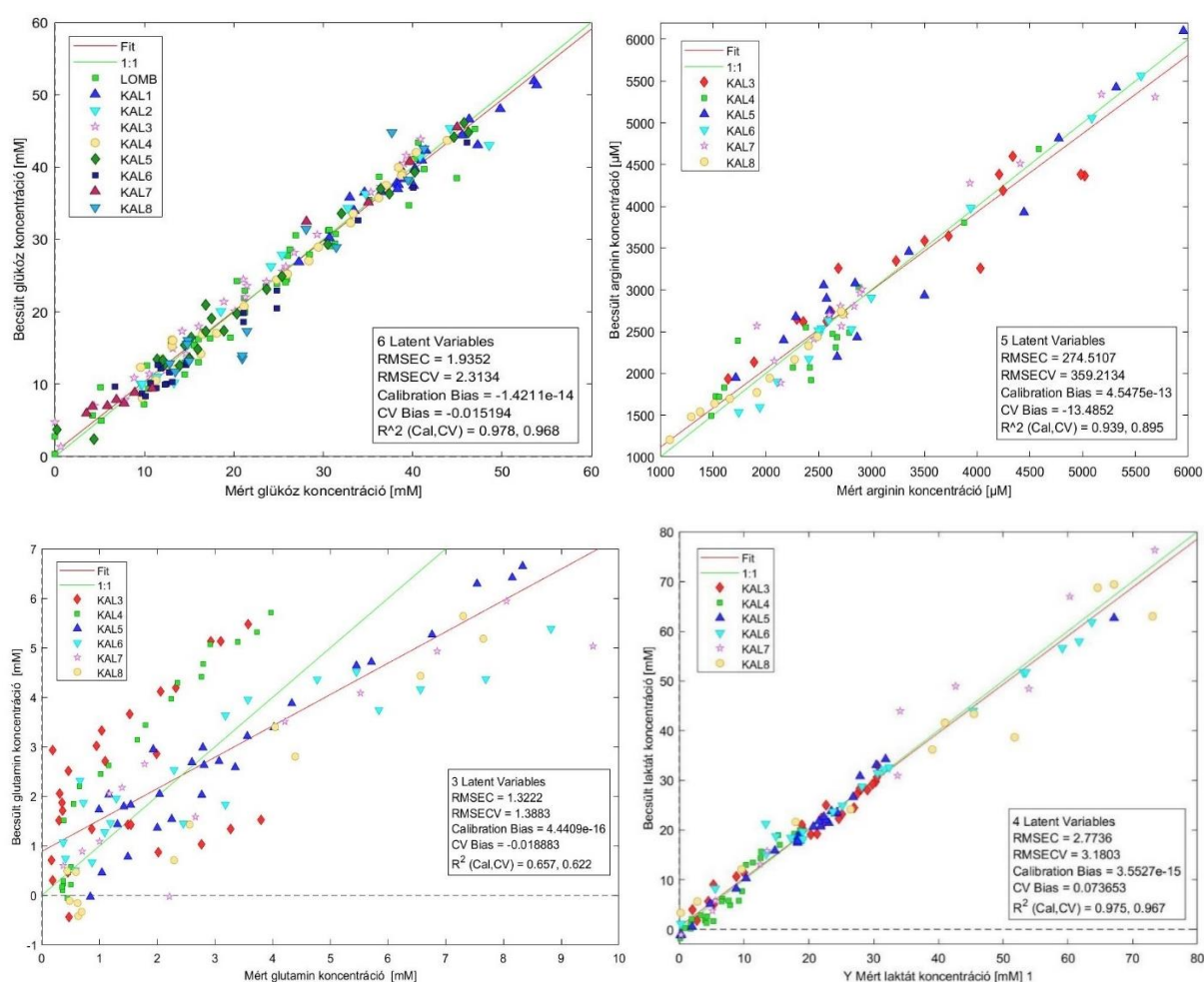
5.1.2 PLS modellépítés és keresztvalidálás

Az adatok előkezelése után PLS regresszióval modelleket építettem az egyes komponensekre. A modellek belső validálását *venetian blinds* típusú keresztvalidációval végeztem (4.4.2.3 fejezet) az adatok 10-15%-ának kihagyásával. A glükóz esetében az adatok 1/8-át, az arginin esetén 1/7-ét, glutamin esetén 1/8-át, laktát esetén pedig az 1/9-ét hagytam ki tesztelő adathalmaznak. A látens változók számát a keresztvalidálás után a RMSECV érték függvényében optimalizáltam, hogy robusztus modelleket kapjak (4.4.2.2 fejezet). A modellépítés során néhány kiugró értéket ki kellett zárnom, mert vagy a rögzített spektrum nem volt megfelelő, vagy pedig a referencia koncentráció mérése volt pontatlan.

Az egyes komponensek koncentrációira épített modellek optimális beállításait és RMSEC, RMSECV és R^2 értékeit a 7. táblázat tartalmazza. A modellek által becsült glükóz-, arginin- és laktát koncentrációk a teljes kalibrálási tartományban jól korrelálnak a mért referencia koncentráció értékeivel (16. ábra).

7. táblázat: A fejlesztett modellek teljesítményjelzői

	Adatpontok száma	Kalibrációs tartomány (mM)		LV (db)	RMSEC (mM)	RMSECV (mM)	
						R^2C	R^2CV
Glükóz	204	0,0-58,4	6	1,94	0,978	2,31	0,968
Arginin	88	1,1-6,0	5	0,275	0,939	0,359	0,895
Glutamin	123	0,17-9,55	3	1,32	0,657	1,39	0,622
Laktát	123	0,13-73,4	4	2,77	0,975	3,18	0,967



16. ábra: Az adott komponensekre fejlesztett modellek által becsült értékek a referencia mérések függvényében a glükóz (bal fent), arginin (jobb fent), glutamin (bal lent) és laktát (jobb lent) esetében

A glükóz, arginin és laktát komponensekre felállított kalibrációs modellek kicsi, az adattartomány közepére számolt hibával (glükóz: 7%; arginin: 11%; laktát: 8%) képesek becsülni a koncentrációkat, és az ábrákon látható, hogy a torzítások is kicsik (Bias). A glutamin koncentráció követésére fejlesztett modell azonban magasabb, 28% relatív hibával rendelkezett az adatpontok nagy szórása miatt. Ezt igazolja a glutamin modell fejlesztése során kapott alacsony (0,622) R^2CV érték is. A referencia adathalmaz főként 3 mM glutamin koncentráció alatti pontokat tartalmazott (az adatpontok több, mint 70%-a), így ennek az adathalmaznak a variabilitásának növelésével javítható a glutamin modell predikciós képessége. Mivel ezt a modellt nem ítéltem megfelelőnek, nem használtam a későbbiekben valós-idejű monitorozásra.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a Raman spektroszkópia alkalmas analitikai módszer CHO sejtek tenyésztésében a glükóz-, arginin-, és laktát koncentrációk pontos nyomon követésére, valamint további fejlesztés után a glutamin koncentráció nyomon követése is megvalósítható.

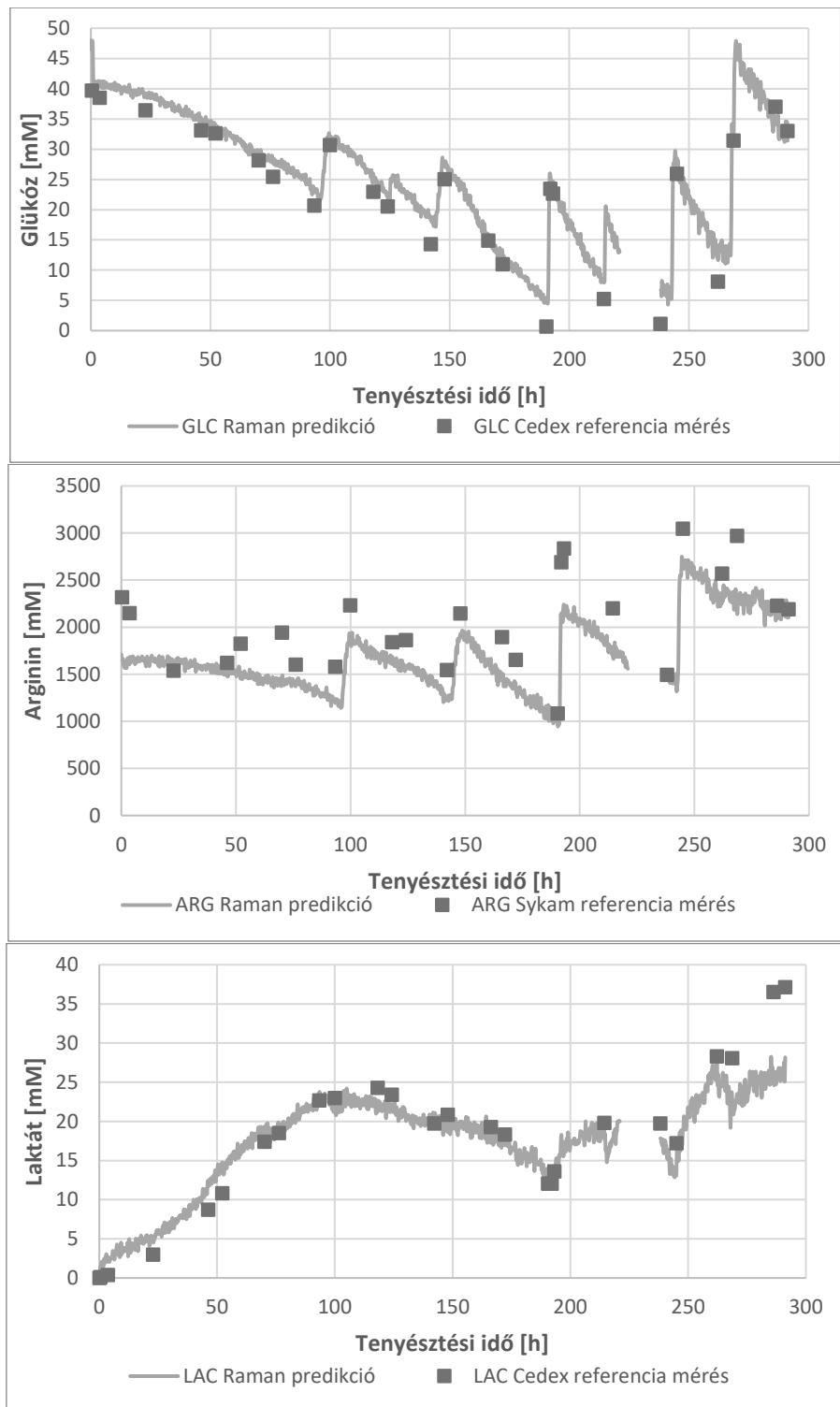
5.2 A valós-idejű monitorozás megvalósítása

A glükóz-, arginin- és laktát modellek külső validálását a hagyományos bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérlettel végeztem el, illetve a mintákból mért referencia koncentrációk alapján számolt RMSEP és R^2P értékekkel jellemeztem a modelleket. Ezeket a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: A modellek predikciós teljesítményjelzői független validáló kísérlet esetén

	RMSEP (mM)	R^2P
Glükóz	3,16	0,962
Arginin	0,392	0,798
Laktát	3,38	0,916

A glükóz-, arginin- és laktát koncentráció valós-idejű monitorozását a kutatócsoport által fejlesztett adatelemző szoftver segítségével valósítottam meg. A Raman spektrumokból számolt valós-időben meghatározott koncentrációk és a referencia mérések eredményei az alábbi ábrákon látható (17. ábra). Az iC Raman szoftver memória probléma miatt nem gyűjtött a 221. és 238. tenyésztési óra között spektrumokat. Ez az ábrákon a Raman spektrumokból becsült koncentrációk megszakadásán látszik.



17. ábra: A glükóz (fent), arginin (középen) és laktát (alul) koncentráció valós-idejű monitorozása Raman spektroszkópiával a teszt-validáló kísérlet során (GLC: glükóz, ARG: arginin, LAC: laktát)

A kalibrációs modellek jól becsülték a komponensek koncentrációit, a modellek RMSEP értékei egy nagyságrendi tartományban vannak a RMSEC és RMSECV értékekkel. A glükóz esetében az alacsony koncentrációk esetén nagyobb eltéréseket tapasztaltam a referencia

értékektől. Ez azzal magyarázható, hogy ebben a koncentráció tartományban kevesebb a kalibráló adatpont, mert felvételük nehézkes, hiszen ilyenkor éheznek a sejtek.

Az arginin esetén a modell nagyobb hibával tudta prediktálni a koncentrációkat, a prediktált és a referencia mérések közötti eltérés a modell hibahatárán belül van. Az eltérések adódhatnak a Sykam aminosav referenciamérés pontatlanságából.

A laktát koncentráció nyomon követése az utolsó két pontban mutat nagyobb eltérést a referencia koncentrációktól. Ennek oka, hogy a modell főként 35 mM alatti kalibráló pontokat tartalmaz (16. ábra).

Összességében elmondható, hogy a modellek bólus tápanyag-adagolású kísérleten való alkalmazásával validáltam azok jóságát. A kifejlesztett modellek alkalmazásával sikeresen megvalósítottam az emlőssejtes bioreaktoros kísérlet tápanyag és melléktermék komponensek koncentrációinak valós-idejű monitorozását.

5.3 Dinamikus tápanyag-adagolási stratégiák fejlesztése

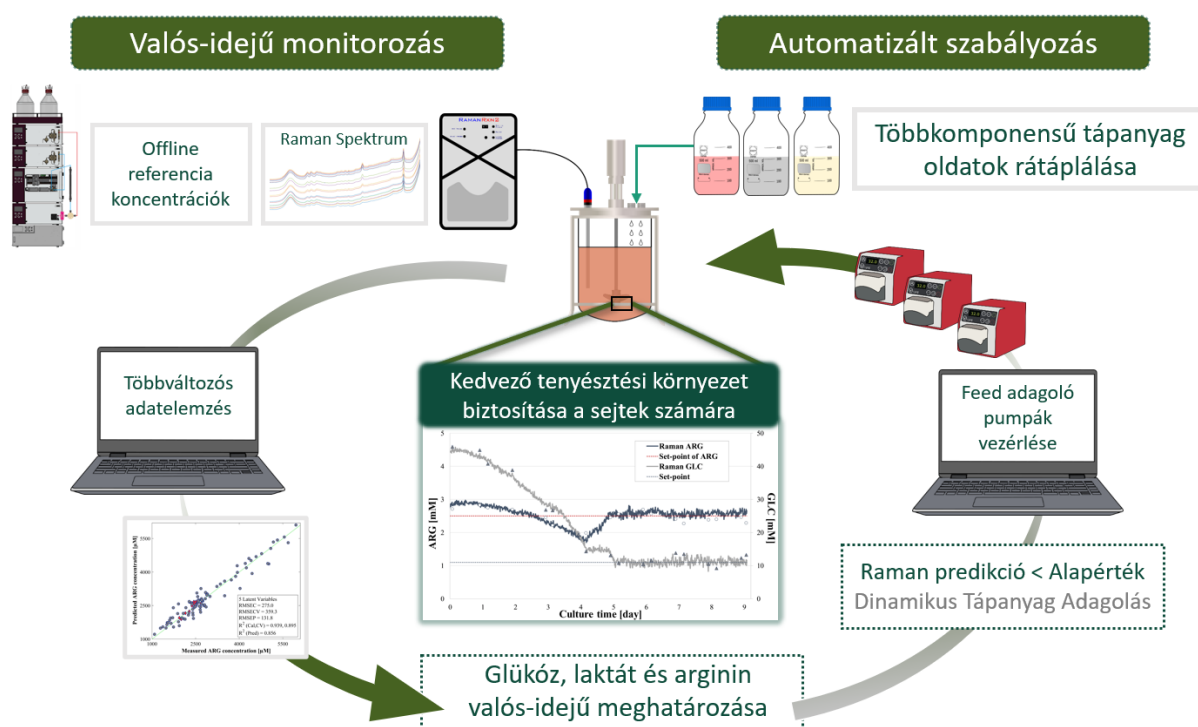
A fed-batch kísérlet során a tápanyagok adagolása előre meghatározott adagokban történt, amely hatására a tápanyagkoncentrációk ingadozását tapasztaltam. A glükóz a 190. és 238. tenyésztési órában is majdnem 0 mM-ra csökkent, illetve a tápanyagadagolások hatására 0,66-39,7 mM között változott. Az arginin koncentráció a bioreaktoros tenyésztés során az 1,08-3,05 mM koncentráció tartományban változott.

A 2.2 fejezetben leírtak alapján a glükóz koncentráció optimumának megtalálása, és adott értéken tartása kiemelten fontos. Ennek oka, hogy amennyiben nincs elegendő mennyiségben jelen a sejtek nem nőnek megfelelő sebességgel, és nem termelnek elég antitestet. Ellenkező esetben pedig nem történik meg a laktát shift, a laktát felhalmozódik, az életképesség pedig leesik. Mindkettő gyógyszeripari gyártás szempontjából kedvezőtlen lehet.

A glükóz mellett a rendelkezésre álló arginin mennyiségének – esszenciális aminosav lévén – is fontos szerepe van CHO DG44 sejtek életében az életképességre és a MAb-termelésre gyakorolt pozitív hatásán keresztül. Túl sok arginin azonban toxikus a sejtek számára. Továbbá az arginin Raman spektroszkópiával jól mérhető a tenyésztés során, és megfelelő indikátora a tenyésztés számára szükséges aminosavak fogyásának a tápanyagoldatokból. Erről szintén a 2.2 fejezetben írtam részletesebben.

A tápanyagok szintjének szabályozásával azonban optimális környezet biztosítható a sejtek számára, ezért célom volt a glükóz- és arginin koncentrációk optimális szinten tartása Raman spektroszkópia-alapú dinamikus tápanyag-adagolási stratégiák alkalmazásával.

A valós-idejű monitorozás és automatizált szabályzás megvalósítására alkalmazott rendszer vázlata a következő ábrán látható (18. ábra). A korábbi kísérletek Raman spektrum és offline mért referencia koncentráció adatpárjaiból épített kalibrációs modelleket betöltöttem az adatelemző szoftverbe, amely segítségével valós-időben monitoroztam a glükóz-, arginin-, és laktát koncentrációkat a bioreaktoros kísérlet során. A Raman spektrumokból számolt pillanatnyi glükóz- és arginin koncentráció alapján az automatizált rendszer folyamatosan pótolta az állandó értékre történő szabályozáshoz a szükséges tápanyag- és glükóz oldatokat (4.3.3.2 fejezet).



18. ábra: A valós-idejű monitorozás és automatizált szabályzás megvalósításának vázlata

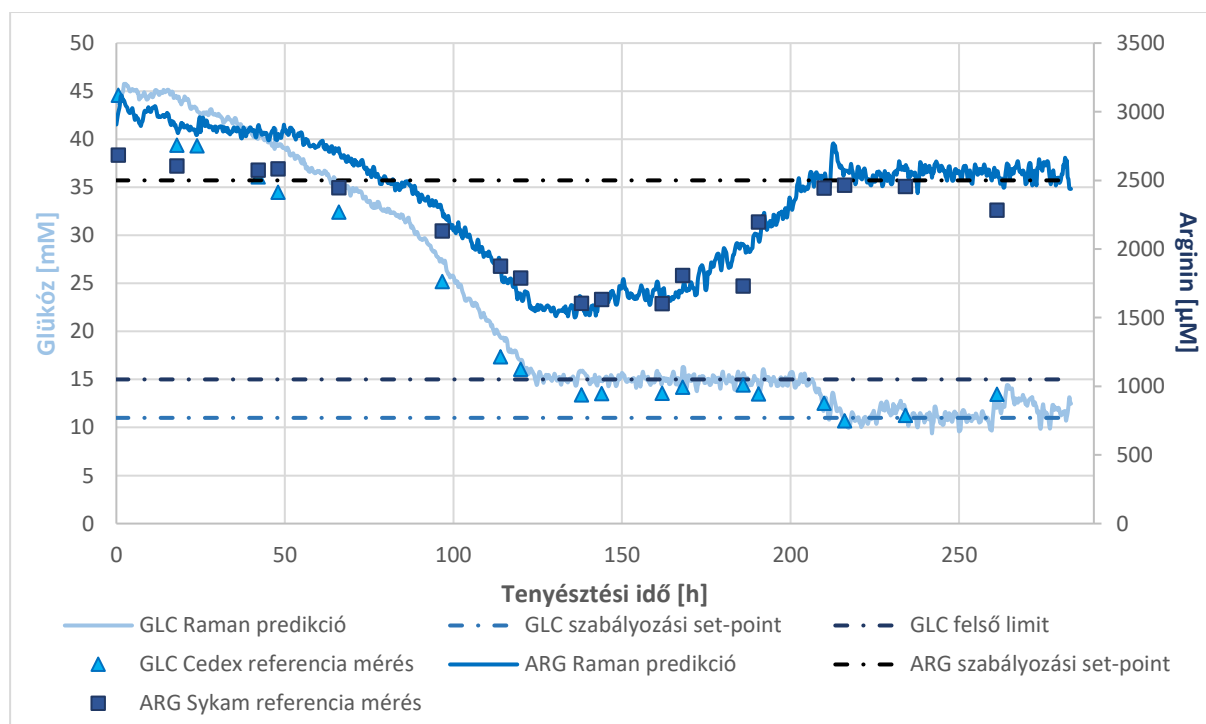
A kísérletek során a glükózt 11 mM-os értékre, ahogy a legtöbb irodalomban olvasható [70], az arginint pedig 2,5 mM-os értékre szabályoztam, miközben a glükóz felső szabályozási limitet két szinten változtattam (15 mM és 25 mM). A felső limit beállítására azért volt szükség, mert az arginin koncentrációja előbb esik a szabályozási érték alá, mint a glükózé, és mivel a beadagolandó Feed A oldat glükózt is tartalmaz, fennállna a glükóz túltáplálásának esélye.

A mintákból offline mért referencia koncentrációk alapján számolt predikciós teljesítményjelzői a modelleknek a 9. táblázatban tekinthetők meg a két szabályozott tápanyag-adagolású kísérlet esetében.

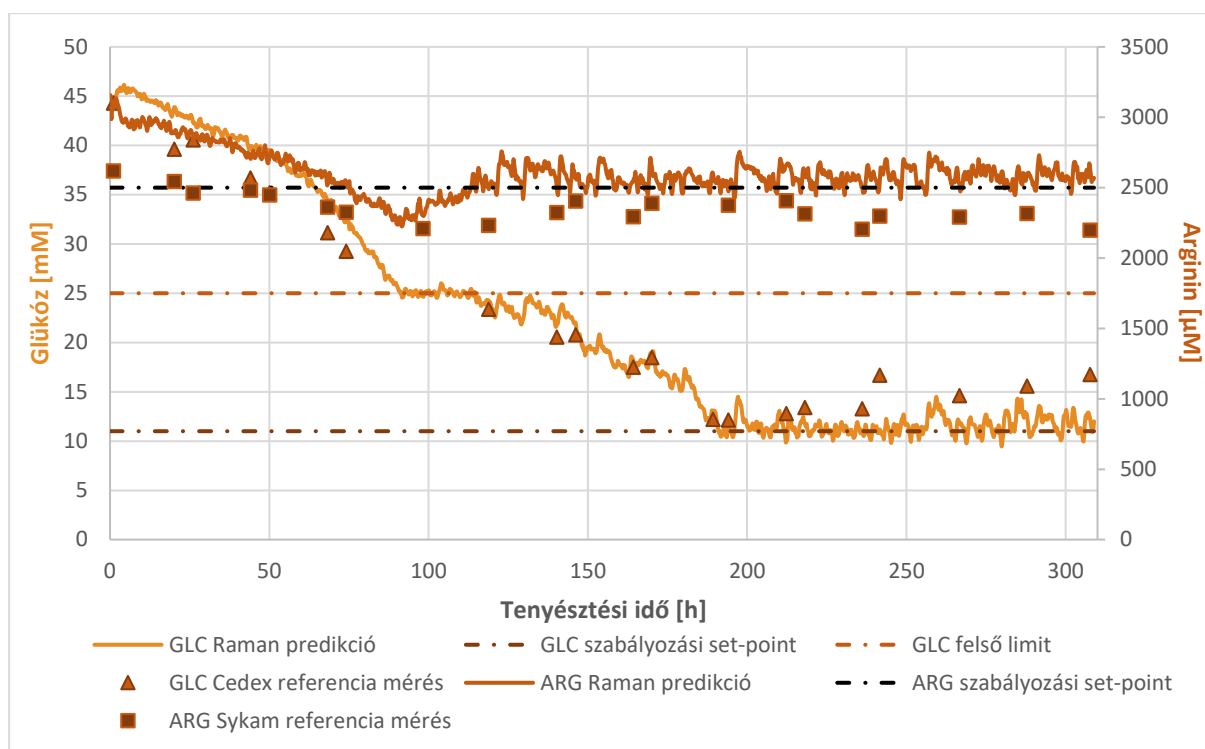
9. táblázat: A modellek predikciós teljesítményjelzői a két szabályozott kísérlet esetében

	Dinamikus tápanyag-adagolási stratégia 15 mM glükóz felső limittel		Dinamikus tápanyag-adagolási stratégia 25 mM glükóz felső limittel	
	RMSEP (mM)	R ² P	RMSEP (mM)	R ² P
Glükóz	2,35	0,988	2,91	0,969
Arginin	0,215	0,927	0,292	0,599
Laktát	1,73	0,965	2,00	0,973

A glükóz- és arginin koncentráció valós-idejű monitorozása alapján megvalósított szabályozás során az alábbi ábrákon látható a koncentrációk változása az alacsonyabb (19. ábra) és a magasabb glükóz felső limitet engedő stratégia esetében (20. ábra). Hasonló ábrák találhatóak meg a Függelékben a laktát valós idejű monitorozásáról (28. ábra).



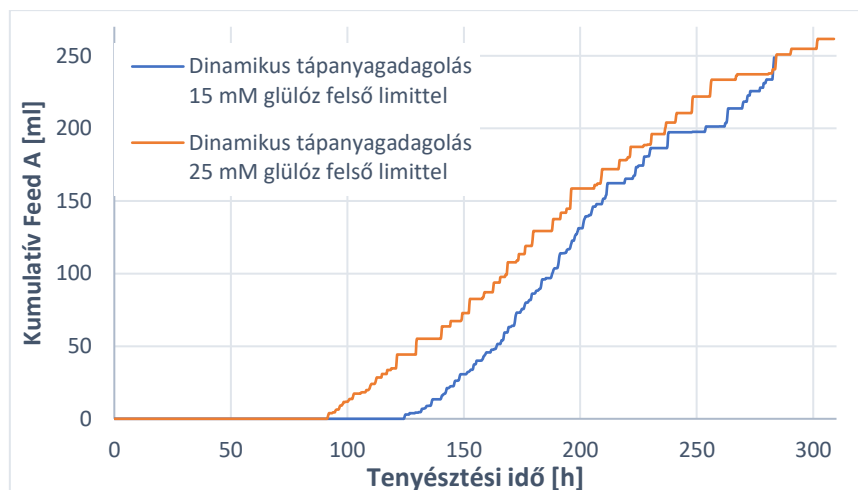
19. ábra: A valós-idejű monitorozás alapján megvalósított dinamikus tápanyag-adagolási stratégia 15 mM glükóz felső limittel (GLC: glükóz, ARG: arginin)



20. ábra: A valós-idejű monitorozás alapján megvalósított dinamikus tápanyag-adagolási stratégia 25 mM glükóz felső limittel (GLC: glükóz, ARG: arginin)

A modellek mindkét esetben megfelelően becsülték a komponensek koncentrációit és a RMSEP értékei közel vannak a RMSEC és RMSECV értékekhez (9. táblázat). Továbbá a modellek kisebb predikciós hibával becsülték a komponensek koncentrációit, mint a fed-batch kísérlet esetén (8. táblázat). Ennek az oka, hogy a referencia adathalmaz több szabályozott kísérletből származó adatpontot és kevesebb fed-batch kísérletből származó adatot tartalmazott. A Raman spektroszkópia alkalmazása során kiemelten fontos a megfelelő kalibráló adathalmaz kiválasztása, amely megfelelően reprezentálja a monitorozni kívánt adatok variabilitását. Fontos megjegyezni, hogy egy adott rendszeren kifejlesztett módszer csak abban az esetben alkalmazható megbízhatóan egy másik rendszerre, ha az új rendszerből származó pontokkal a kalibrációs modellt kiegészítik.

Az arginin esetében a magasabb glükóz limitű szabályozási kísérletben a Raman predikció eltérése a referencia mérésektől minden esetben a modell hibahatárán belül van. Az R^2P alacsony értékét az magyarázza, hogy szinte az egész kísérlet alatt egy érték körül ingadozott a koncentrációja, így a modell a szűk koncentráció tartományban lévő adatokra nem tudott jó illeszkedésű egyenest illeszteni.



21. ábra: A beadagolt Feed A oldat kumulált mennyisége a szabályozott kísérletek során

A fenti ábrán látható tápanyagoldatok beadagolásának folyamata a szabályozott kísérletek esetében (21. ábra). Az alacsonyabb glükóz felső limitű tápanyag-adagolási stratégia esetében 249 ml tápanyagoldat beadagolása történt összesen a kísérlet alatt. A magasabb glükóz felső limitű tápanyag-adagolási stratégia esetében a 91. órában, 33 órával hamarabb kezdődött el a tápanyagoldatok beadagolása, és összesen 262 ml tápanyagoldat beadagolása történt ebben az esetben.

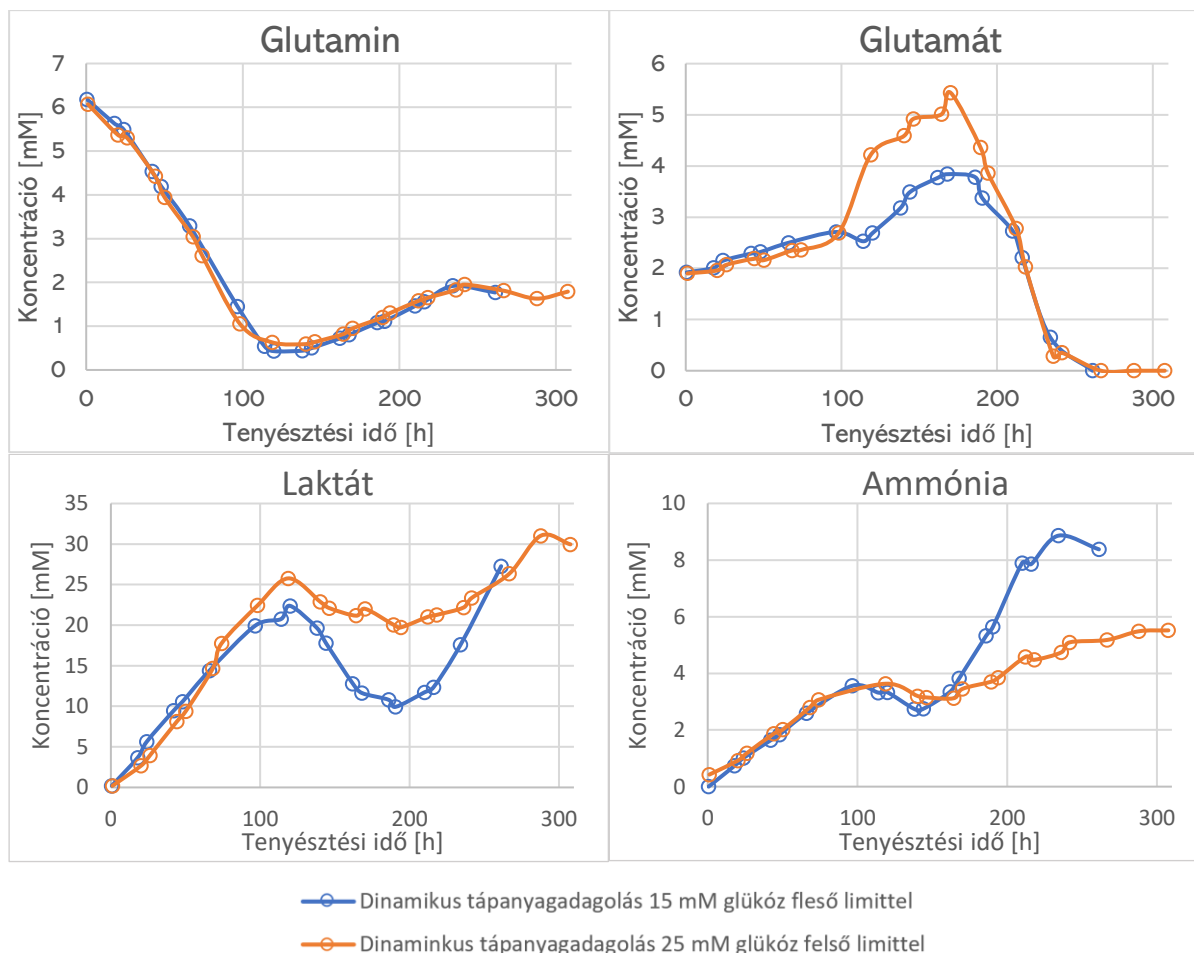
A bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérletnél összesen 294 ml tápanyagoldatot adagoltam be (25. ábra). Ehhez képest mindkét szabályozási kísérlet esetében kevesebb oldatmennyiségekre volt szükség. A tápanyag oldatok magas ára miatt a kifejlesztett szabályozási stratégia ipari viszonylatokban jelentős költségmegtakarítást eredményezhet.

Összefoglalva az eredményeket a modellek jól alkalmazhatóak a tenyésztés valós-idejű monitorozására, és alkalmasak a tápanyag koncentrációk szabályozásának megvalósítására. A Raman spektroszkópia-alapú dinamikus tápanyag-adagolással sikerült a glükóz- és arginin koncentrációkat a kívánt értékeken tartani. A szabályozási stratégia segítségével elkerülhető volt a tápanyagok elfogyása és nagymértékű ingadozása.

5.4 A tápanyag-adagolási stratégiák hatásának vizsgálata a sejtenyésztésre

Ebben a fejezetben szeretném ismertetni Raman spektroszkópia-alapú dinamikus tápanyag-adagolási stratégiák különböző tenyésztési paraméterekre gyakorolt hatását minden ponton összehasonlítva a bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérlet eredményeivel.

A glutamin-, glutamát-, laktát- és ammónia Cedex méréssel kapott koncentrációi a tenyésztési idő függvényében a szabályozott kísérletekre az alábbi ábrákon láthatóak (22. ábra).



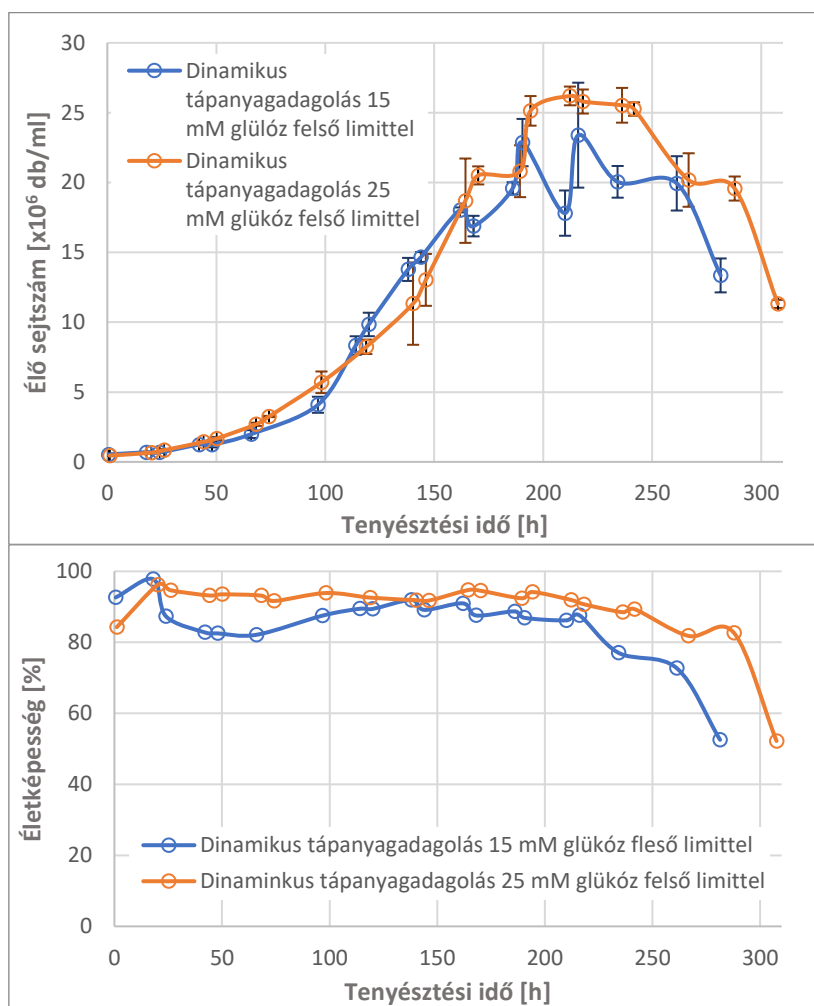
22. ábra: A kétféle szabályozási stratégia hatása a glutamin (bal fent), glutamát (jobb fent), laktát (bal lent) és ammónia (jobb lent) koncentrációra

A glutamin koncentrációk esetében nem volt szignifikáns eltérés a két tápanyag-adagolási stratégia között. Az alap médium 6 mM glutamint tartalmazott, amelyet a sejtek mindkét kísérlet esetén azonos sebességgel fogyasztottak el. A beadagolt tápanyag glutamin helyett glutamátot tartalmaztak, amely egy általános stratégia az ammónia koncentráció csökkentésére a bioreaktoros sejtenyésztések során. A magasabb glükóz felső limitű szabályozási stratégia esetén a tápanyagadagolás korábban kezdődött, ezért a glutamát koncentrációja a kísérlet közepén magasabb volt, emellett a glutamát lebontásából származó ammónia lassabban halmozódott fel. Az alacsonyabb ammónia koncentráció kedvező volt a sejtek számára, így a tenyésztet 26 órával tovább sikerült fenntartani. A magasabb glükóz felső limitű szabályozási stratégiával ugyan magasabb volt a laktát koncentrációja a tenyésztési folyamat során, de a laktát-shift megtörtént, és így sikerült csökkenteni a laktát akkumulációját mindkét szabályozási stratégia során.

Mindezzel szemben, ugyan a bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérletnél is megtörtént a laktát shift, hiszen volt, hogy a glükóz majdnem teljesen elfogyott, de a

tápanyagok koncentrációinak széles tartományban való ingadozása kedvezőtlen volt a sejtek számára. A tápanyagoldatok nagymennyiségű beadagolásai után a laktát és ammónia metabolitok koncentrációi megemelkedtek (26. ábra). A laktát maximális koncentrációja 37,1 mM volt, míg az ammóniáé 6,63 mM. A laktát és ammónia felhalmozódása gátolta a sejtnövekedést és erősen lecsökkentette az életképességet.

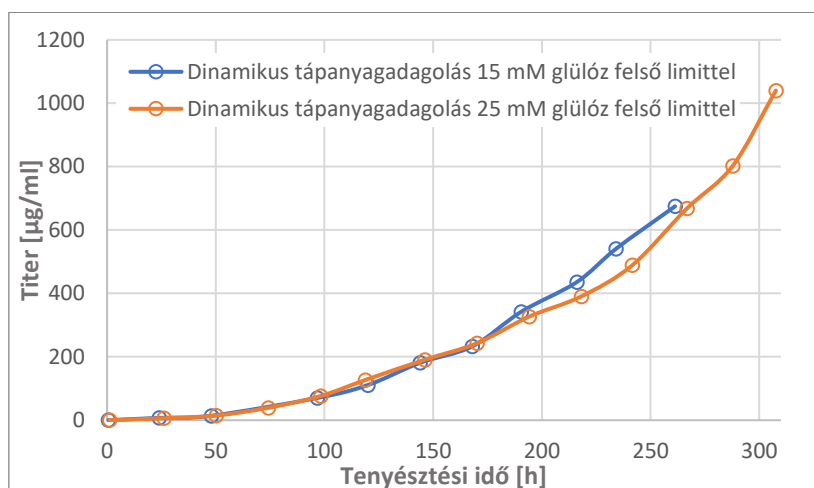
A következő ábrakon a kétféle szabályozási stratégia hatása tekinthető meg az élő sejszámra és az életképességre (23. ábra), valamint a termelt adalimumab mennyiségére (24. ábra).



23. ábra: A kétféle szabályozási stratégia hatása az élő sejszámra (fent) és az életképességre (lent)

Az ábrák alapján elmondható, hogy magasabb élő sejszámot ($26,2 \times 10^6$ db/ml szemben a $23,4 \times 10^6$ db/ml-rel) sikerült elérnem, amit hosszabb ideig tudtam fenntartani jobb életképességgel a magasabb glükóz felső limitű dinamikus tápanyag-adagolási stratégia alkalmazásával. Ennek háttérében valószínűleg az áll, hogy az alacsonyabb glükóz felső limitet engedő szabályozási stratégiájú kísérletben az ammónia felhalmozódott.

A szabályozott kísérletekkel szemben a bólus tápanyag-adagolású fed-batch kísérletben hasonlóan magas élő sejt számot sikerült elérni, azonban ez nem volt sokáig fenntartható a magasabb toxikus metabolit koncentrációk hatására az életképesség lecsökkent, és a kísérletet le kellett állítani (27. ábra).



24. ábra: A kétféle szabályozási stratégia hatása a termelt adalimumab mennyiségére

A monoklonális antitest termelésének tendenciájában nincs nagy különbség a két szabályozott kísérlet esetében, azonban mivel tovább sikerült fenntartani a tenyészetet a magasabb glükóz felső limitű tápanyag-adagolási stratégiával, így ebben az esetben majdnem kétszerannyi termék nyerhető ki a fermentléből. A három különböző tápanyag-adagolási stratégiájú kísérletekre a térfogattal korrigált végső adalimumab termék mennyiségét a 10. táblázatban foglaltam össze. A legjobb eredményt a dinamikus tápanyag-adagolási stratégiával, 25 mM glükóz felső szabályozási limit mellett sikerült elérni. A kísérlet során 1,68 g terméket állítottam elő, ami 60%-kal több a bólus adagolású fed-batch kísérlethez képest. A szabályozási technikák termékminőségre gyakorolt hatását egyelőre nem volt lehetőségünk vizsgálni, de tervezzük a jövőben bővíteni a kutatást ezen a területen.

10. táblázat: A különböző tápanyag-adagolási stratégiák esetén a titer mennyisége

Tápanyag-adagolási stratégia	Titer [g]
Dinamikus, 15 mM glükóz felső limittel	0,886
Dinamikus, 25 mM glükóz felső limittel	1,68
Fed-batch	1,01

Összefoglalásként megállapítható, hogy a sejtenyésztésre pozitív hatással van a tápanyagok koncentrációinak szabályozása. Sikerült kedvező környezetet biztosítani a sejtek

számára a sejtnövekedéshez és antitest termeléshez, különösen a magasabb glükóz felső limitű dinamikus tápanyag-adagolási stratégiával. Az inline Raman spektroszkópia-alapú folyamatmonitorozás kifejlesztése megnyitja az utat további, a szabályozási paraméterek optimalizálására irányuló kutatások előtt. Ezenkívül folyamatban van a glutamin, glutamát és ammónia koncentráció pontos meghatározására alkalmas modellek kifejlesztése, hogy valós-idejű monitorozásukkal jobban tanulmányozhassam a tenyésztés metabolikus folyamatait.

6 Összefoglalás

Kutatómunkám során adalimumab termelő kínai hörcsög petefészek sejtek fed-batch bioreaktoros tenyésztését végeztem. A kritikus tápanyagkomponensek inline Raman spektroszkópia alapján történő valós-idejű monitorozását és szabályozását valósítottam meg.

A Raman spektrumok kiértékelésére részleges legkisebb négyzetek módszerén alapuló regressziós modelleket fejlesztettem, amelyeket egy hagyományos bólus tápanyag-adagolású kísérlet segítségével validáltam. A modellekkel sikeresen követtem a glükóz, arginin és laktát koncentrációját a bioreaktoros tenyésztési ciklusok során. A Raman spektrumokból nyert valós-idejű információ alapján, egy automatizált szabályozó rendszer segítségével, a sejtek fogyasztásának megfelelően adagoltam a tápanyagokat a bioreaktorba. A kidolgozott dinamikus tápanyagadagolási stratégia során a glükóz koncentrációt 11 mM, az arginin koncentrációt 2,5 mM értékre szabályoztam a glükóz oldat és a többkomponensű tápanyagoldatok beadagolását. Továbbá vizsgáltam a 15 mM-os és a 25 mM-os glükóz felső szabályozási limit hatását a sejtek metabolizmusára, növekedésére és termelésére.

A kifejlesztett dinamikus tápanyagadagolási stratégia hatására hosszabb tenyésztési időt és magasabb élő sejtszámot, így több antitest terméket sikerült elérni. Az eredmények bizonyítják, hogy az inline Raman spektroszkópia alkalmas módszer biotechnológiai folyamatok valós-idejű monitorozására és szabályozására. Továbbá a valós-idejű információ lehetőséget ad a folyamatok jobb megértésére és elősegíti a tenyésztési folyamatparaméterek optimalizálását.

7 Irodalomjegyzék

- [1] „EFPIA Homepage”. https://www.efpia.eu/media/554521/efpia_pharmafigures_2020_web.pdf (elérés aug. 31, 2022).
- [2] A. L. Grilo és A. Mantalaris, „The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market”, *Trends Biotechnol*, köt. 37, sz. 1, o. 9–16, jan. 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.014.
- [3] K. Dunleavy, „The top 20 drugs by worldwide sales in 2021”, máj. 31, 2022. <https://www.fiercepharma.com/special-reports/top-20-drugs-worldwide-sales-2021> (elérés aug. 31, 2022).
- [4] „Antibody- Structure, Classes and Functions”. <https://microbiologyinfo.com/antibody-structure-classes-and-functions/> (elérés szept. 01, 2022).
- [5] B. Witkop, „Paul Ehrlich and His Magic Bullets, Revisited”, *Jstor*, köt. 143, sz. 4, o. 540–557, 1999, Elérés: aug. 31, 2022. [Online]. Available: <https://www.jstor.org/stable/3181987>
- [6] H. Boyer, A. Riggs, és K. Itakura, „First Successful Laboratory Production of Human Insulin”, *Genentech*, 1978.
- [7] „<https://hu.wikipedia.org/wiki/Acetilszalícilsav#/media/Fájl:Aspirin-skeletal.svg>”.
- [8] „https://www.nicepng.com/png/detail/171-1713827_human-insulin-hexamer-3d-ribbons-human-insulin-protein.png”.
- [9] „<https://www.immunology.org/sites/default/files/sites/default/files/images/content-types/60-day-tiles/Structure%20of%20an%20antibody.jpg>”.
- [10] J. Schwaber és E. P. Cohen, „Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types”, *Nature*, köt. 244, sz. 5416, o. 444–447, 1973, doi: 10.1038/244444A0.
- [11] G. Köhler és C. Milstein, „Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”, *Nature*, köt. 256, sz. 5517, o. 495–497, 1975, doi: 10.1038/256495A0.

- [12] G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, és H. R. Hoogenboom, „Making antibodies by phage display technology”, *Annu Rev Immunol*, köt. 12, o. 433–455, 1994, doi: 10.1146/ANNUREV.IY.12.040194.002245.
- [13] N. Lonberg, „Human antibodies from transgenic animals”, *Nat Biotechnol*, köt. 23, sz. 9, o. 1117–1125, szept. 2005, doi: 10.1038/NBT1135.
- [14] „Vivasolis”. <https://vivasolis.com/latestmore/21> (elérés szept. 13, 2022).
- [15] R. M. Lu és mtsai., „Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases”, *J Biomed Sci*, köt. 27, sz. 1, jan. 2020, doi: 10.1186/S12929-019-0592-Z.
- [16] The Business Research Company, „Monoclonal Antibodies (MAbs) Global Market Report 2022”, <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/monoclonal-antibodies-global-market-report>, febr. 2022.
- [17] „HUMIRA® (adalimumab) | A Biologic Treatment Option”. <https://www.humira.com/> (elérés okt. 03, 2022).
- [18] D. A. Quinteros, J. M. Bermúdez, S. Ravetti, A. Cid, D. A. Allemandi, és S. D. Palma, „Therapeutic use of monoclonal antibodies: general aspects and challenges for drug delivery”, *Nanostructures for Drug Delivery*, o. 807–833, 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-46143-6.00025-7.
- [19] F. M. Wurm, „Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells”, *Nat Biotechnol*, köt. 22, sz. 11, o. 1393–1398, nov. 2004, doi: 10.1038/nbt1026.
- [20] J. Y. Kim, Y. G. Kim, és G. M. Lee, „CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential”, *Appl Microbiol Biotechnol*, köt. 93, sz. 3, o. 917–930, febr. 2012, doi: 10.1007/S00253-011-3758-5/TABLES/1.
- [21] F. v. Ritacco, Y. Wu, és A. Khetan, „Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies”, *Biotechnol Prog*, köt. 34, sz. 6, o. 1407–1426, 2018, doi: 10.1002/BTPR.2706.
- [22] A. García-Rendón, A. Garibay-Escobar, R. Guzmán, és A. Tejeda-Mansir, „Plasmid-DNA lipid nanovaccines: An innovative approach for a better world health”, in *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*, A. Mihai Grumezescu, Szerk. William Andrew Publishing, 2018, o. 231–267. doi: 10.1016/B978-0-12-813687-4.00006-2.

- [23] A. Vidra és Á. Wirnhardt, „YeastFlow Bemutatók”. 2019.
- [24] W. C. Yang és mtsai., „Perfusion seed cultures improve biopharmaceutical fed-batch production capacity and product quality”, *Biotechnol Prog*, köt. 30, sz. 3, o. 616–625, 2014, doi: 10.1002/BTPR.1884.
- [25] M. Pécs, „Gyógyszer-és orvosi biotechnológia előadás”. BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék.
- [26] C. F. Goochee, M. J. Gramer, D. C. Andersen, J. B. Bahr, és J. R. Rasmussen, „The Oligosaccharides of Glycoproteins: Bioprocess Factors Affecting Oligosaccharide Structure and their Effect on Glycoprotein Properties”, *Bio/Technology*, köt. 9, sz. 12, o. 1347–1355, 1991, doi: 10.1038/nbt1291-1347.
- [27] T. Ogawa, M. Kamihira, H. Yoshida, S. Iijima, és T. Kobayashi, „Effect of dissolved oxygen concentration on monoclonal antibody production in hybridoma cell cultures”, *J Ferment Bioeng*, köt. 74, sz. 6, o. 372–378, 1992, doi: 10.1016/0922-338X(92)90034-R.
- [28] C. Harbour, K. S. Low, C. P. Marquis, és J. P. Barford, „pH control options for hybridoma cultures”, *Biotechnology Techniques*, köt. 3, sz. 2, o. 73–78, 1989, doi: 10.1007/BF01875556.
- [29] O. Warburg, „On the Origin of Cancer Cells”, *Science (1979)*, köt. 123, sz. 3191, o. 309–314, febr. 1956, doi: 10.1126/science.123.3191.309.
- [30] M. S. Lao és D. Toth, „Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture”, *Biotechnol Prog*, köt. 13, sz. 5, o. 688–691, 1997, doi: 10.1021/BP9602360.
- [31] J. Li, C. L. Wong, N. Vijayasankaran, T. Hudson, és A. Amanullah, „Feeding lactate for CHO cell culture processes: Impact on culture metabolism and performance”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 109, sz. 5, o. 1173–1186, máj. 2012, doi: 10.1002/BIT.24389.
- [32] M. Yang és M. Butler, „Effects of ammonia on CHO cell growth, erythropoietin production, and glycosylation”, *Biotechnology and Bioengineering*, köt. 68, sz. 4, 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000520\)68:4%3C370::AID-BIT2%3E3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000520)68:4%3C370::AID-BIT2%3E3.0.CO;2-K).

- [33] D. Baeza, Z. P. Gerdtzen, és J. C. Salgado, „Design and simulation of a controller system for metabolic shift regulation in mammalian cells”, *BMC Proceedings*, köt. 5, sz. 8, nov. 2011, doi: <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P11>.
- [34] H. Hefzi és mtsai., „A Consensus Genome-scale Reconstruction of Chinese Hamster Ovary Cell Metabolism”, *Cell Syst*, köt. 3, sz. 5, o. 434-443.e8, 2016, doi: 10.1016/J.CELS.2016.10.020.
- [35] I. J. González-Leal és mtsai., „Use of a Plackett–Burman statistical design to determine the effect of selected amino acids on monoclonal antibody production in CHO cells”, *Biotechnol Prog*, köt. 27, sz. 6, o. 1709–1717, 2011, doi: 10.1002/BTPR.674.
- [36] J. D. Nally, *Good manufacturing practices for pharmaceuticals*, 6th edition. CRC Press, 2007. doi: <https://doi.org/10.3109/9781420020939>.
- [37] TBMED, „Quality-by-Design”. <https://tbmed.eu/quality-by-design> (elérés szept. 18, 2022).
- [38] European Medicines Agency, „Quality by design”. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/quality-design> (elérés szept. 17, 2022).
- [39] Food and Drug Administration, „Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance”, 2004, Elérés: szept. 18, 2022. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/cvm/guidance/published.html>
- [40] G. Gerzon, Y. Sheng, és M. Kirkitadze, „Process Analytical Technologies – Advances in bioprocess integration and future perspectives”, *J Pharm Biomed Anal*, köt. 207, 2021, doi: 10.1016/J.JPBA.2021.114379.
- [41] F. Li, N. Vijayasankaran, A. Shen, R. Kiss, és A. Amanullah, „Cell culture processes for monoclonal antibody production”, *MAbs*, köt. 2, sz. 5, o. 466–479, 2010, doi: 10.4161/MABS.2.5.12720.
- [42] N. R. Abu-Absi, R. P. Martel, A. M. Lanza, S. J. Clements, M. C. Borys, és Z. J. Li, „Application of spectroscopic methods for monitoring of bioprocesses and the implications for the manufacture of biologics”, *Pharm Bioprocess*, köt. 2, sz. 3, o. 267–284, jún. 2014, doi: 10.4155/pbp.14.24.

- [43] J. Whelan, S. Craven, és B. Glennon, „In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors”, *Biotechnol Prog*, köt. 28, sz. 5, o. 1355–1362, szept. 2012, doi: 10.1002/BTPR.1590.
- [44] S. Beutel és S. Henkel, „In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring”, *Appl Microbiol Biotechnol*, köt. 91, sz. 6, o. 1493–1505, 2011, doi: 10.1007/S00253-011-3470-5/FIGURES/6.
- [45] C. v. Raman és K. S. Krishnan, „A New Type of Secondary Radiation”, *Nature*, köt. 121, sz. 3048, o. 501–502, 1928, doi: 10.1038/121501c0.
- [46] G. Pokol és mtsai., *Analitikai kémia*. Typotex, 2011.
- [47] „What is Raman Spectroscopy?” <https://www.edinst.com/blog/what-is-raman-spectroscopy/> (elérés szept. 20, 2022).
- [48] K. L. Davis, M. S. Kemper, és I. R. Lewis, „Raman Spectroscopy for Monitoring Real-Time Processes in the Pharmaceutical Industry”, *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*, o. 117–162, 2007, doi: 10.1002/9780470225882.CH5.
- [49] K. A. Esmonde-White, M. Cuellar, C. Uerpmann, B. Lenain, és I. R. Lewis, „Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing”, *Anal Bioanal Chem*, köt. 409, sz. 3, o. 637–649, 2017, doi: 10.1007/S00216-016-9824-1/FIGURES/3.
- [50] T. B. Shope, T. J. Vickers, és C. K. Mann, „The Direct Analysis of Fermentation Products by Raman Spectroscopy”, *Appl Spectrosc*, köt. 41, sz. 5, o. 908–912, 1987, doi: <https://doi.org/10.1366/0003702874448373>.
- [51] A. D. Shaw és mtsai., „Noninvasive, On-Line Monitoring of the Biotransformation by Yeast of Glucose to Ethanol Using Dispersive Raman Spectroscopy and Chemometrics”, *Appl Spectrosc*, köt. 53, sz. 11, o. 1419–1428, 1999, doi: 10.1366/0003702991945777.
- [52] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, és A. Demirci, „Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman spectroscopy”, *J Ind Microbiol Biotechnol*, köt. 26, sz. 4, o. 185–190, 2001, doi: 10.1038/SJ.JIM.7000124.
- [53] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, és D. Ali, „Simultaneous determination of multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR, NIR, and FT-Raman

- spectroscopic techniques”, *Process Biochemistry*, köt. 37, sz. 4, o. 371–378, 2001, doi: 10.1016/S0032-9592(01)00223-0.
- [54] H. L. T. Lee, P. Boccazzi, N. Gorret, R. J. Ram, és A. J. Sinskey, „In situ bioprocess monitoring of *Escherichia coli* bioreactions using Raman spectroscopy”, *Vib Spectrosc*, köt. 35, sz. 1–2, o. 131–137, 2004, doi: 10.1016/J.VIBSPEC.2003.12.015.
- [55] N. R. Abu-Absi és *mtsai.*, „Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 108, sz. 5, o. 1215–1221, 2010, doi: 10.1002/BIT.23023.
- [56] J. Moretto és *mtsai.*, „Process Raman Spectroscopy for In-Line CHO Cell Culture Monitoring”, *Am Pharm Rev*, 2011, Elérés: okt. 11, 2022. [Online]. Available: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/37040-Process-Raman-Spectroscopy-for-In-Line-CHO-Cell-Culture-Monitoring/>
- [57] H. Bhatia, H. Mehdizadeh, D. Drapeau, és S. Yoon, „In-line monitoring of amino acids in mammalian cell cultures using raman spectroscopy and multivariate chemometrics models”, *Eng Life Sci*, köt. 18, sz. 1, o. 55–61, 2018, doi: 10.1002/ELSC.201700084.
- [58] S. André, L. saint Cristau, S. Gaillard, O. Devos, É. Calvosa, és L. Duponchel, „In-line and real-time prediction of recombinant antibody titer by in situ Raman spectroscopy”, *Anal Chim Acta*, köt. 892, o. 148–152, 2015, doi: 10.1016/J.ACA.2015.08.050.
- [59] C. Rafferty, J. O’Mahony, B. Burgoyne, R. Rea, K. M. Balss, és D. C. Latshaw, „Raman spectroscopy as a method to replace off-line pH during mammalian cell culture processes”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 117, sz. 1, o. 146–156, 2020, doi: 10.1002/BIT.27197.
- [60] M. Y. Li, B. Ebel, C. Paris, F. Chauchard, E. Guedon, és A. Marc, „Real-time monitoring of antibody glycosylation site occupancy by in situ Raman spectroscopy during bioreactor CHO cell cultures”, *Biotechnol Prog*, köt. 34, sz. 2, o. 486–493, 2018, doi: 10.1002/BTPR.2604.
- [61] H. Mehdizadeh, D. Lauri, K. M. Karry, M. Moshgbar, R. Procopio-Melino, és D. Drapeau, „Generic Raman-based calibration models enabling real-time monitoring of cell culture bioreactors”, *Biotechnol Prog*, köt. 31, sz. 4, o. 1004–1013, 2015, doi: 10.1002/BTPR.2079.

- [62] T. A. Webster, B. C. Hadley, W. Hilliard, C. Jaques, és C. Mason, „Development of generic raman models for a GS-KOTM CHO platform process”, *Biotechnol Prog*, köt. 34, sz. 3, o. 730–737, máj. 2018, doi: 10.1002/BTPR.2633.
- [63] B. Berry, J. Moretto, T. Matthews, J. Smelko, és K. Wiltberger, „Cross-scale predictive modeling of CHO cell culture growth and metabolites using Raman spectroscopy and multivariate analysis”, *Biotechnol Prog*, köt. 31, sz. 2, o. 566–577, 2014, doi: 10.1002/BTPR.2035.
- [64] K. A. Esmonde-White, M. Cuellar, és I. R. Lewis, „The role of Raman spectroscopy in biopharmaceuticals from development to manufacturing”, *Anal Bioanal Chem*, köt. 414, sz. 2, o. 969–991, 2021, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03727-4>.
- [65] A. Tulsyan, G. Schorner, H. Khodabandehlou, T. Wang, M. Coufal, és C. Undey, „A machine-learning approach to calibrate generic Raman models for real-time monitoring of cell culture processes”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 116, sz. 10, o. 2575–2586, 2019, doi: 10.1002/BIT.27100.
- [66] A. Tulsyan, T. Wang, G. Schorner, H. Khodabandehlou, M. Coufal, és C. Undey, „Automatic real-time calibration, assessment, and maintenance of generic Raman models for online monitoring of cell culture processes”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 117, sz. 2, o. 406–416, 2020, doi: 10.1002/BIT.27205.
- [67] S. F. Khattak, Z. Xing, B. Kenty, I. Koyrakh, és Z. J. Li, „Feed development for fed-batch CHO production process by semisteady state analysis”, *Biotechnol Prog*, köt. 26, sz. 3, o. 797–804, 2010, doi: 10.1002/BTPR.362.
- [68] M. Gagnon, G. Hiller, Y. T. Luan, A. Kittredge, J. Defelice, és D. Drapeau, „High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 108, sz. 6, o. 1328–1337, 2011, doi: 10.1002/BIT.23072.
- [69] F. Lu és mtsai., „Automated dynamic fed-batch process and media optimization for high productivity cell culture process development”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 110, sz. 1, o. 191–205, 2012, doi: 10.1002/BIT.24602.

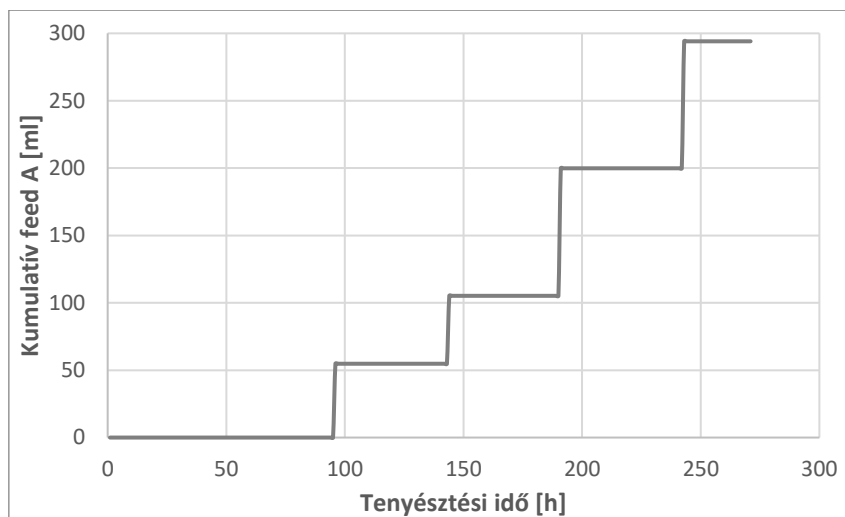
- [70] S. Craven, J. Whelan, és B. Glennon, „Glucose concentration control of a fed-batch mammalian cell bioprocess using a nonlinear model predictive controller”, *J Process Control*, köt. 24, sz. 4, o. 344–357, 2014, doi: 10.1016/J.JPROCONT.2014.02.007.
- [71] B. N. Berry, T. M. Dobrowsky, R. C. Timson, R. Kshirsagar, T. Ryll, és K. Wiltberger, „Quick generation of Raman spectroscopy based in-process glucose control to influence biopharmaceutical protein product quality during mammalian cell culture”, *Biotechnol Prog*, köt. 32, sz. 1, o. 224–234, 2015, doi: 10.1002/BTPR.2205.
- [72] T. E. Matthews, B. N. Berry, J. Smelko, J. Moretto, B. Moore, és K. Wiltberger, „Closed loop control of lactate concentration in mammalian cell culture by Raman spectroscopy leads to improved cell density, viability, and biopharmaceutical protein production”, *Biotechnol Bioeng*, köt. 113, sz. 11, o. 2416–2424, nov. 2016, doi: 10.1002/BIT.26018.
- [73] „Raman spectrometer - RamanRxn2™ Hybrid - Kaiser Optical Systems SARL - for analysis / robust”. <https://www.directindustry.com/prod/kaiser-optical-systems-sarl/product-104191-2059709.html> (elérés szept. 08, 2022).
- [74] „https://scipy-lectures.org/_images/sphx_glr_plot_bias_variance_001.png”.
- [75] S. Balk, „FortéBio BLI Systems: Versatile Tools for Rapid Biomolecular Kinetics and Quantitation”. márc. 2019.
- [76] A. N. Singh, K. Ramadan, és S. Singh, „Experimental methods to study the kinetics of protein–protein interactions”, in *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods*, T. Tripathi és V. Dubey, Szerk. Academic Press, 2022, o. 115–124. doi: 10.1016/B978-0-323-90264-9.00008-8.
- [77] Sykam GmbH, „Sykam S 433 Amino Acid Analyzer Brochure”, nov. 15, 2019. <https://sykam.com/download/sykam-s433-amino-acid-analyzer/> (elérés szept. 10, 2022).

8 Függelék

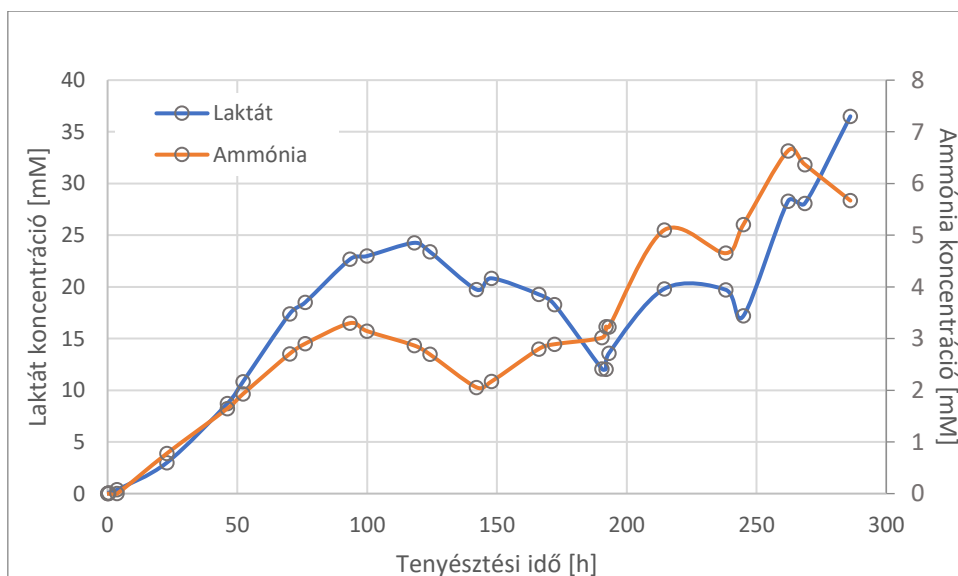
11. táblázat: A bioreaktorhoz csatlakoztatott ágak pontos szerelése

A csatlakoztatott

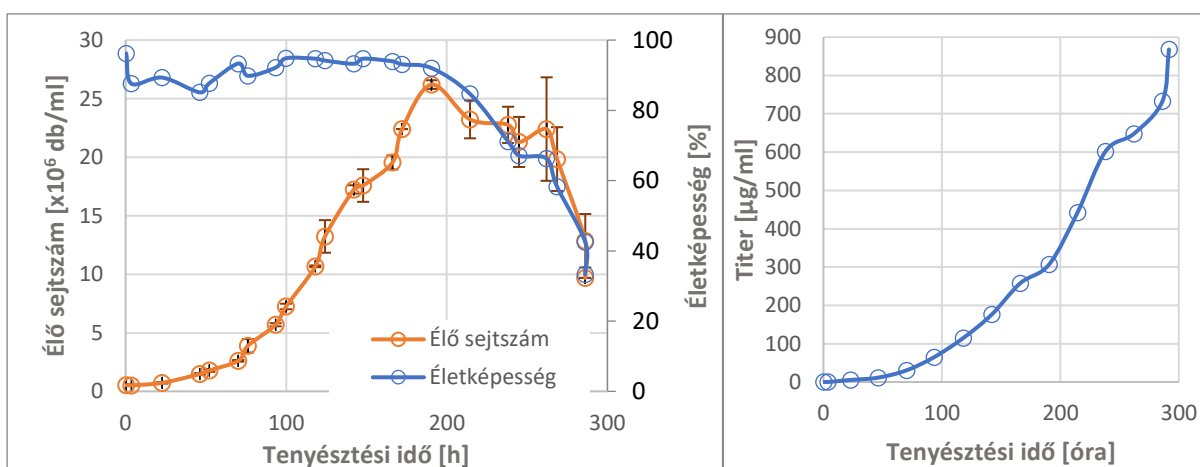
oldat	A csatlakoztatás kivitelezése	
<i>Lúg oldat</i>	pumpálható szakasz, üres üveg	Na ₂ CO ₃ oldat autoklávban sterilizálva és fülke alatt csatlakoztatva
<i>Habzásgátló</i>	pumpálható szakasz, üres üveg	oldat gyártó által sterilizálva
<i>Glükóz oldat</i>	pumpálható szakasz, üres üveg	glükóz-oldat autoklávban sterilizálva és fülke alatt csatlakoztatva
<i>Feed A</i>	pumpálható szakasz, hegeszthető szakasz, hoffmann szorító	oldat szűréssel sterilizálva, majd reaktorhoz hegesztve
<i>Feed B</i>	pumpálható szakasz, hegeszthető szakasz, hoffmann szorító	oldat szűréssel sterilizálva, majd reaktorhoz hegesztve
<i>Tápoldat + inokulum</i>	pumpálható szakasz, hegeszthető szakasz, üres üveg	tápoldat szűréssel sterilizálva, fülke alatt csatlakoztatva, majd inokulum hozzáhegesztés
<i>Mintavevő és sóoldat leeresztő ág</i>	visszacsapó szelep	



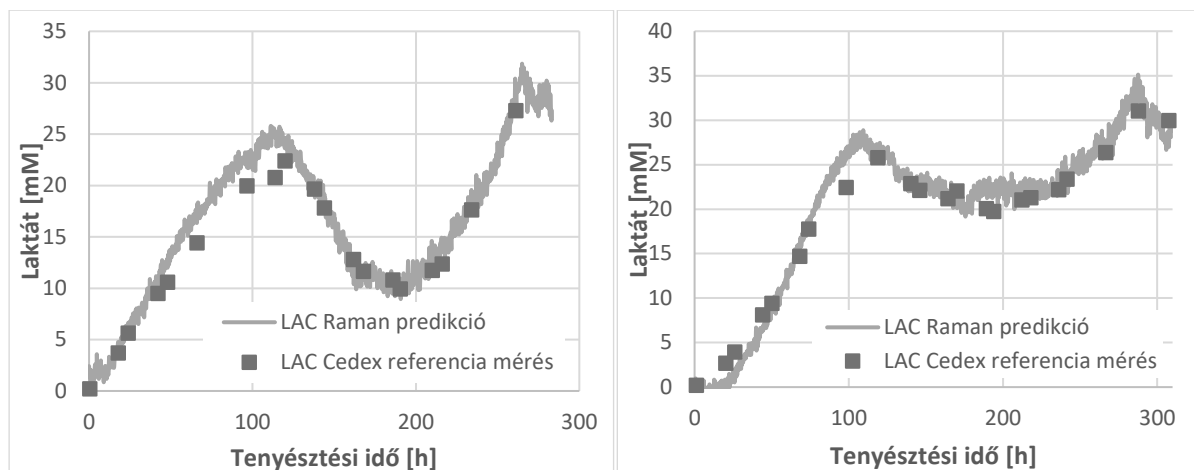
25. ábra: A bólus tápanyag-adagolás során beadagolt Feed A kumulált mennyisége



26. ábra: A bólus tápanyag-adagolású kísérlet során a laktát és ammónia koncentráció változása a tenyésztési idő függvényében



27. ábra: A bólus tápanyag-adagolási stratégia hatása az élő sejtszámra és az, életképességre (bal oldalon), és a termelt adalimumab mennyiségére (jobb oldalon)



28. ábra: A laktát koncentráció valós-idejű monitorozása Raman spektroszkópiával az alacsonyabb (balra) és magasabb (jobbra) glükóz felső limitet engedő dinamikus tápanyag-adagolású kísérlet során (LAC: laktát)