

Doświadczalne i przemysłowe systemy hodowli komórek zwierzęcych. II. Hodowle zawieszinowe

Włodzimierz Grajek
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Poznań

1. Wstęp

Znaczna ilość linii komórkowych stosowanych dla celów biotechnologicznych nie wymaga przyczepienia do nośnika i może rosnąć w formie zawiesziny w pożywce ciekłej. Właściwości takie wykazują przede wszystkim komórki typu limfoidalnego. Współczesna biotechnologia coraz szerzej wykorzystuje tego typu linie do produkcji przeciwciał oraz metabolitów stosowanych głównie w medycynie i weterynarii. Wśród najczęściej stosowanych są linie komórkowe wyprowadzone z tkanek nowotworowych i rakowych, komórek mieszańcowych (*hybrydoma*) oraz komórek transformowanych. Hodowle tych komórek prowadzone są podobnie do hodowli mikroorganizmów przemysłowych, stąd też łatwiejsze jest w ich przypadku powiększanie skali. Podstawową barierą w tym zakresie jest duża wrażliwość komórek na zniszczenie lub uszkodzenia mechaniczne. Wynika ona z braku ścian komórkowych oraz z dużych rozmiarów komórek i ich delikatnej budowy.

W porównaniu z hodowlami mikroorganizmów stopień trudności w prowadzeniu kultur zawieszinowych jest znacznie wyższy. Składa się na to kilka zasadniczych przyczyn: wolny wzrost komórek, objawiający się czasem podwojenia masy powyżej 15 godzin, duża wrażliwość na stropy mechaniczne, konieczność stosowania złożonych i drogich pożywek oraz wrażliwość na zakażenia. Szczególnie uciążliwa jest groźba zakażeń. Przy operowaniu dużymi tankami hodowlanymi istnieje wiele miejsc szczególnie narażonych na zakażenie. Należy tu wymienić wlot i wylot powietrza, miejsca wprowadzania sond pomiarowych, zawory do pobierania prób, wał mieszadła, połączenia z urządzeniami współpracującymi, np. separatorami, wszelkiego rodzaju uszczelnienia i szereg innych.

Dla swobodnego wzrostu i metabolizmu komórek wymagana jest homogenność składu chemicznego pożywek oraz precyzyjna regulacja podstawowych parametrów fizyko-chemicznych hodowli, jak pH, temperatury, natle-

nienia pożywek, ciśnienia osmotycznego i in. Utrzymanie tych parametrów na odpowiednim poziomie wymaga stałego mieszania i napowietrzania pożywek. Zapewnienie właściwych warunków wymiany masy w bioreaktorze — przy zachowaniu integralności struktury komórek — stanowi podstawowy problem bioinżynierjny w hodowlach komórek ssaków.

Dla zapewnienia rentowności produkcji konieczne jest uzyskanie możliwie dużej gęstości komórek w pożywce. Konieczne jest w takim przypadku stosowanie bogatych pożywek, zawierających w swym składzie białka i peptydy, co z kolei utrudnia oczyszczanie metabolitów. Należy jednak podkreślić, że im większa jest koncentracja komórek, tym uzyskuje się większe stężenie metabolitów i tym mniejsze są koszty ich wydzielenia oraz oczyszczania.

Jednym z najistotniejszych czynników wpływających na gęstość komórek są warunki ich hodowli. W normalnych warunkach stężenie komórek osiąga pewną ograniczoną, maksymalną wartość, która jest praktycznie nieprzekraczalna. Głównymi czynnikami limitującymi wzrost populacji komórek jest ograniczona szybkość transferu tlenu do pożywki oraz rosnące stężenie metabolitów toksycznych. W hodowlach komórkowych prowadzonych metodami tradycyjnymi osiąga się zwykle stężenie komórek na poziomie 2×10^6 /ml, a ich frakcja objętościowa w stosunku do pożywki, stanowi zaledwie 0,003. Dzięki postępowi technologicznemu bariera ta została w ostatnich latach znacznie przekroczona i aktualnie osiągane są stężenia na poziomie $10^7 - 10^8$ /ml, a nawet przy specjalnych technikach gęstość komórek dochodzi do 10^9 /ml.

2. Systemy hodowli komórek rosnących w zawiesinie

Obserwując rozwój technik stosowanych do hodowli komórek rosnących w zawiesinie należy zwrócić uwagę na dwie wyraźnie rysujące się tendencje. Pierwsza z nich, polega na dążeniu do stosowania możliwie prostych konstrukcji bioreaktorów, a druga, bardziej współczesna, na szukaniu sposobów prowadzenia hodowli przy wysokiej gęstości komórek.

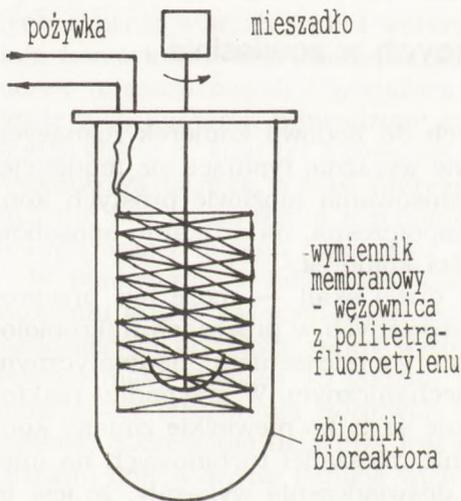
Hodowla komórek limfoidalnych — w dużej skali — może być przeprowadzana w klasycznych bioreaktorach stosowanych w procesach mikrobiologicznych. Wykorzystywane są głównie reaktory z mieszaniem pneumatycznym typu *air-lift* oraz reaktory z mieszaniem mechanicznym. W przypadku reaktorów z mieszaniem mechanicznym konieczne są tylko niewielkie zmiany konstrukcyjne. Polegają one m.in. na wymianie mieszadeł turbinowych na mieszadła typu śruby okrętowej. Wieloletnie doświadczenia wykazały, że jest to mieszadło generujące najmniejsze siły ścinające, a zatem wywołujące najmniejsze uszkodzenia mechaniczne komórek. Bioreaktory specjalnie budowane dla celów hodowli komórkowych różnią się od klasycznych bioreaktorów mikrobiologicznych mniejszym stosunkiem wysokości do średnicy oraz zaokrąglonym dnem. W porównaniu z hodowlami mikroorganizmów w hodowlach komórkowych ssaków stosowane są znacznie mniejsze objętości naczyń.

Bioreaktor o objętości kilku tysięcy litrów jest dużym reaktorem przemysłowym, podczas gdy w procesach mikrobiologicznych objętość taka stosowana jest zwykle na poziomie kultury inokulacyjnej.

2.1. Bioreaktory z mieszaniem mechanicznym i pneumatycznym

Zwetner i in. (22) opisali sposób wykorzystania bioreaktorów z mieszadłem typu śruby okrętowej do hodowli różnych linii komórkowych. Autorzy ci prowadzili hodowle w układzie bioreaktorów o objętości 14 l, 70 l i 200 l. W reaktorach tych hodowali z powodzeniem linie komórek limfoblastycznych ludzkich oraz linie limfoblastów mysich. Hodowle były prowadzone metodą półciągłą przez okres 1 – 3 tygodni w zależności od stosowanej linii. Wzrost populacji komórek rosnących w zawieszynie przebiegał według prostej półlogarytmicznej względem funkcji czasu. Dla osiągnięcia wysokiej szybkości wzrostu i dużych gęstości komórek konieczne jest stosowanie odpowiedniej szybkości rozcieńczania pożywki oraz ściśle określonego inoculum. W większości stosowanych linii komórkowych czas podwojenia populacji wynosił od 14 do 17 godzin.

Przykładem ciągłej hodowli komórek mieszańcowych w zawieszynie jest też praca Grafa i Schugerla (4). Stosowali oni bioreaktor o poj. 10 l wyposażony w mieszadło mechaniczne oraz specjalny system węży do napowietrzania i wymiany pożywki (rys. 1).



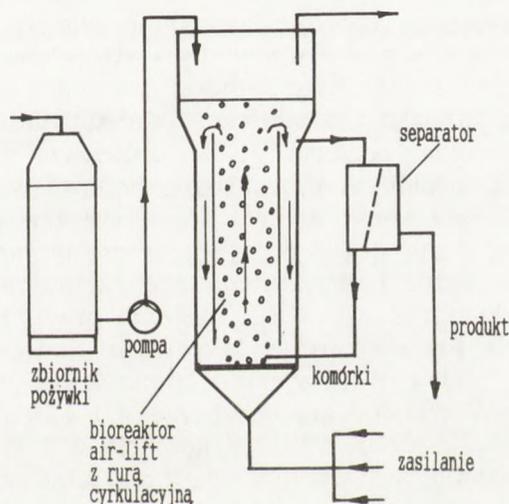
Rys. 1. Bioreaktor z membranowym systemem wprowadzania natlenionej pożywki.

Dla uniknięcia stresu mechanicznego korzystne rozwiązanie stanowi hodowla komórek w reaktorze z pneumatycznym mieszaniem cieczy (*air-lift*). Zapewnia on znacznie łagodniejsze warunki hodowli dzięki temu, że wyeliminowane jest mieszanie mechaniczne. W literaturze można spotkać liczne opisy hodowli komórkowych w tego typu bioreaktorach (1, 2, 7, 8).

2.2. Systemy hodowli o wysokiej gęstości komórek

Współczesne rozwiązania zmierzają zdecydowanie w kierunku budowy systemów hodowlanych pozwalających na prowadzenie hodowli przy dużym zagęszczeniu komórek. W ostatnich latach pojawiło się szereg publikacji przedstawiających różne konfiguracje aparaturowe i różne systemy hodowlane umożliwiające uzyskiwanie wysokiej gęstości komórek oraz prowadzenie ich hodowli metodą ciągłą. Oba te kierunki mają decydujące znaczenie z punktu widzenia ekonomiki procesu. Wysoka gęstość komórek pozwala na uzyskanie dużego stężenia produktu, np. przeciwciał, zaś możliwość hodowli ciągłej znacznie zwiększa efektywny czas produkcji metabolitów oraz sprzyja utrzymaniu optymalnych warunków środowiskowych dla rozwoju kultury. Większość proponowanych systemów łączy hodowlę komórek z jednoczesną selektywną separacją biomasy komórkowej lub produkowanych białek.

Systemy prowadzenia hodowli przy dużej gęstości komórek opierają się na połączeniu bioreaktora z separatorem (rys. 2). W charakterze separatorów wykorzystuje się moduły mikro- i ultrafiltracyjne, wirówki przepływowe oraz osadniki przepływowe. Oddzielną grupę systemów reaktorowo-separacyjnych stanowią reaktory membranowe (*hollow-fiber* i reaktory dializacyjne) oraz reaktory z komórkami unieruchomionymi.



Rys. 2. System do ciągłej hodowli komórek zwierzęcych z recykulacją komórek.

Moduł separatora przepływowego może być montowany wewnątrz bioreaktora lub poza nim. Dzięki takiemu rozwiązaniu możliwe jest stosowanie standardowych bioreaktorów, które umożliwiają pełną kontrolę i monitorowanie parametrów procesu (18). Umieszczenie separatora poza reaktorem jest korzystniejsze, gdyż w razie awarii może on być sterylnie wymieniony bez

przerywania hodowli. Jednym z podstawowych kryteriów stosowanych przy wyborze separatora jest jego zdolność do pracy ciągłej, możliwość sterylizacji termicznej oraz niskie powinowactwo przegrody filtracyjnej do białek.

2.3. Konfiguracja bioreaktor-moduł mikro/ultrafiltracyjny

W ostatnich latach można obserwować wyjątkowo dynamiczny rozwój technik filtracji przez przegrody mikroporowate, a szczególnie technik membranowych. Do najczęściej stosowanych filtrów należą mikrofiltry i ultrafiltry. Pierwsze z nich wykorzystuje się głównie do separacji zawiesin, przede wszystkim komórek, drugie do separacji zawiesin i frakcjonowania makrocząsteczek. Znanymi jest szereg membran z tworzyw sztucznych i pochodnych celulozy gwarantujących dużą wydajność filtracji i małe powinowactwo do białek.

Separatory filtracyjne są konfigurowane z bioreaktorem w formie modułów umieszczonych wewnątrz bioreaktora lub w formie modułów zewnętrznych. Z uwagi na dużą polaryzację membran przez białka stosowane są wyłączone układy filtracji dynamicznej, głównie z przepływem stycznym do powierzchni przegrody filtracyjnej (*cross-flow filtration*). Jednym z przykładów tego typu układu łączącego bioreaktor z filtrem jest zestaw aparaturowy opisany przez Takazawę i in. (18). Autorzy ci hodowali komórki mieszańcowe, mysio-ludzkie, (linie H2 i V6) metodą ciągłą. Naczynie hodowlane było wyposażone w mieszadło mechaniczne. Ponadto w bioreaktorze była wydzielona strefa osiadania komórek, do której wprowadzane były komórki wracające z układu ultrafiltracyjnego oraz świeża pożywka i powietrze. Moduł ultrafiltracyjny, wyposażony w membrany o punkcie odcięcia 10 kD, umieszczony był poza bioreaktorem. System ten pozwalał na prowadzenie hodowli w taki sposób, że zarówno komórki, jak i substancje wielkocząsteczkowe, tzn. przeciwciała monoklonalne i substancje wzrostowe o dużej masie cząsteczkowej, były utrzymywane cały czas w układzie hodowlanym. Dzięki temu możliwe było uzyskanie dużej gęstości komórek, wysokiego stężenia produktów oraz zmniejszenie zużycia pożywek. Redukcji uległy także koszty oczyszczania antyciał z niskocząsteczkowych białek. W przypadku komórek H2 po 10 dniach hodowli uzyskano gęstość komórek na poziomie $1,1 \times 10^7/\text{cm}^3$, natomiast w przypadku linii V6 uzyskano aż $1,7 \times 10^7$ komórek w 1 cm^3 pożywki. Stężenie przeciwciał monoklonalnych wynosiło ok. 2 mg/ml. Czystość przeciwciał wzrosła aż 18-krotnie w porównaniu z hodowlą bez recyrkulacji białek. Zdaniem autorów opisana metoda hodowli spełnia wszelkie kryteria ekonomiczne i pozwala na łatwe zwiększanie skali procesu. Zaznaczyć jednak należy, że wprowadzenie mikrofiltracji stycznej do separacji komórek zwierzęcych powoduje dodatkowy stres mechaniczny (13). Głównym czynnikiem niszczącym komórki jest ścinanie laminarne, występujące w samym filtrze przy przepływie komórek między membranami. Zjawisku temu można zapobiec przez dodatek substancji ochronnych, np. preparatu Pluronic F68 Polyol lub fosfolipidów sojowych.

TABELA 1
ZESTAW APARATUROWY DO PRODUKCJI PRZECIWCIAŁ MONOKLONALNYCH W SKALI PRZEMYSŁOWEJ (20)

Etap procesu produkcyjnego	Wielkości stosowanych zbiorników	
przygotowanie pożywek	zbiornik do przygotowania pożywki	10 000 l
	zbiornik gotowej pożywki	10 000 l
propagacja komórek	bioreaktor laboratoryjny	5 l
	bioreaktor laboratoryjny	20 l
	bioreaktor pilotowy	80 l
	bioreaktor pilotowy	400 l
produkcja antyciał metodą ciągłą	bioreaktor produkcyjny	2 000 l
odbior pynu pohodowlanego	odbieralnik	10 000 l
separacja komórek	separator przepływowy wirówka/ultrafiltr	
roztwór przeciwciał	zbiornik	10 000 l
oczyszczanie	linia oczyszczania przeciwciał	

Przy używaniu mniejszych bioreaktorów może być stosowana konfiguracja bioreaktor/filtr typu *hollow-fiber*. Aktualnie na rynku oferowana jest szeroka gama różnego rodzaju modułów typu *hollow-fiber*. Ich cena jest stosunkowo niska, co zwiększa ich atrakcyjność. W literaturze można spotkać opisy bioreaktorów skonfigurowanych z filtrami typu *hollow-fiber* poprzez umieszczenie modułu filtracyjnego bądź wewnątrz bioreaktora, bądź poza nim. To drugie rozwiązanie z punktu technologicznego jest korzystniejsze.

Smith i in. (17) stosowali konfigurację bioreaktor/filtr typu *hollow-fiber* do ciągłej hodowli komórek mieszańcowych (linia TW01). Filtr umieszczony był poza reaktorem i zawierał membrany o punkcie odcięcia 10 kD. Hodowlę prowadzono przez 420 h przy szybkości rozcieńczania w granicach 1,0 i 1,5 obj./dobę. W takich warunkach stężenie komórek osiągnęło poziom 2,1 i $3,6 \times 10^6/\text{cm}^3$, natomiast koncentracja przeciwciał wynosiła ok. 29 mg/l i była dwukrotnie wyższa niż w kontrolnej hodowli okresowej. Podobny układ do hodowli komórek mieszańcowych stosowali Munster i wsp. (13). Po 20 dobach hodowli gęstość komórek osiągnęła wartość $10^8/\text{cm}^3$, natomiast stężenie przeciwciał dochodziło do 400 mg/cm³.

Wysoką wydajność przeciwciał typu IgM uzyskano w bioreaktorze z mieszadłem membranowym (12). Reaktor ten jest wyposażony w mieszadło zbudowane z podwójnej wężownicy poruszającej się ruchem półobrotowym wokół wału mieszadła. Hydrofobowa część wężownicy służy do wprowadzania po-

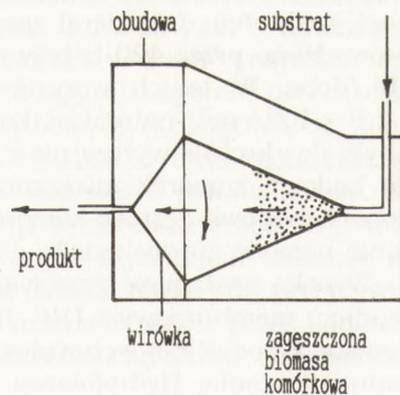
wietrza, a hydrofilna do wymiany pożywki. Bioreaktor ten pracuje w połączeniu z mikrofiltrem membranowym typu *hollow fiber* z porami o średnicy $0,3 \mu\text{m}$. Opisany zestaw pracował w układzie perfuzyjnym (hodowla ciągła; wymiana pożywki przy retencji komórek). W bioreaktorze hodowano rekombinowaną linię limfocytów B do gęstości komórek $2 \times 10^7/\text{ml}$, po czym utrzymywano tę gęstość poprzez częściowy odbiór nadmiaru komórek. Maksymalna wydajność przeciwciał wynosiła 250 mg w przeliczeniu na litr wprowadzonej pożywki i była dwukrotnie wyższa od wydajności uzyskanej w reaktorze membranowym pracującym z tym samym układem biologicznym.

Przykładem reaktora z wewnętrzną membraną filtracyjną może być reaktor o podwójnym dnie z zainstalowaną tam płaską membraną o porowatości rzędu $3 \mu\text{m}$ (16). Reaktor taki był wykorzystywany do ciągłej hodowli komórek mieszańcowych. Stosując pełną retencję komórek, uzyskano w nim bardzo wysoką koncentrację komórek, przekraczającą $10^9/\text{cm}^3$.

Analizując dane dotyczące zestawów reaktor/filtr membranowy odnotować należy, że wszystkie publikowane prace wykonywane były przy użyciu małych bioreaktorów. Czynnikiem ograniczającym powiększanie skali była niska wydajność filtracyjna stosowanych modułów.

2.4. Konfiguracja bioreaktor-wirówka

Niezwykle ciekawe rozwiązanie pozwalające na uzyskanie wysokich koncentracji komórek zaproponowali Van Wie i wsp. (19). Jest nim reaktor wirówkowy o pracy ciągłej (rys. 3). Naczynie hodowlane jest zbudowane w kształcie stożkowego bębna o kącie nachylenia ścian 24° umieszczonego poziomo i obracającego się w specjalnej obudowie. Wskutek siły odśrodkowej kręcącego się bębna komórki są zagęszczane w jego zężającej się części. Od tej strony doprowadzana jest świeża pożywka, natomiast jej odpływ odbywa się przez specjalny króciec w szerokiej części bębna. Eksperymenty przeprowadzone przy użyciu komórek mieszańcowych H21A1 wykazały, że system ten pozwala na skuteczną kontrolę gęstości komórek w bioreaktorze. Bęben hodowlany obracał się z szybkością $600 - 650 \text{ obr/min}$ wytwarzając siłę odśrodkową $15 - 40 \text{ g}$. Szybkość rozcieńczenia pożywki wynosiła $0,14 - 0,35 \text{ h}^{-1}$. Stwierdzono, że produktywność przepływowego reaktora wirówkowego była $5 - 10$ razy wyższa niż w hodowlach okresowych.



Rys. 3. Bioreaktor wirówkowy o działaniu ciągłym.

2.5. Konfiguracja bioreaktor-osadnik

Zagęszczanie komórek poprzez połączenie bioreaktora z modułem filtracyjnym lub wirówką, tak jak to opisano, wprowadza dodatkowy stres mechaniczny. W przypadku wyjątkowo wrażliwych linii komórkowych czynnik ten zdecydowanie ogranicza stosowanie tego typu konfiguracji aparaturowych. Kłopotliwe jest także utrzymanie pełnej sterylności zestawu reaktor-filtr. W celu wyeliminowania tych wad możliwe jest skonfigurowanie bioreaktora z osadnikiem przepływowym. Rozwiązanie takie przedstawili Hulschner i in. (6). Stosowany przez nich system składał się z bioreaktora kolumnowego typu *air-lift* z wewnętrzną rurą cyrkulacyjną oraz z przepływowego osadnika połączonego z bioreaktorem (rys. 2). W celu wywołania przepływu cieczy przez osadnik zastosowano chłodzenie pożywki przed wejściem do osadnika. Dzięki zwiększeniu gęstości cieczy uzyskiwano wzrost prędkości jej opadania i w ten sposób wymuszano przepływ w dół osadnika. Jednocześnie, ochłodzenie pożywki wpływało na zwolnienie metabolizmu komórkowego i ograniczało problemy wynikające z niedostatecznego natlenienia i braku świeżej pożywki w osadniku. Wymuszony ruch pożywki poprzez jej ochłodzenie pozwolił na rezygnację ze stosowania pomp, a tym samym znacznie zredukował siły ścinające, niszczące komórki. Wykorzystując ten prosty zestaw aparaturowy do hodowli hybrydoma uzyskano 17-krotne zwiększenie produktywności bioreaktora i 4-krotne zwiększenie stężenia komórek. Przy zastosowaniu odpowiednio dużej szybkości rozcieńczania ($1,3 \text{ d}^{-1}$) uzyskano dodatkowy efekt polegający na oddzielaniu komórek martwych (cięższych) od komórek żywych, przy 100% recyrkulacji tych ostatnich.

2.6. Systemy komórek immobilizowanych

Obserwując rozwój metod hodowli komórek ssaków zwracają uwagę poszukiwania nad zabezpieczeniem wrażliwych linii komórkowych przed ich zniszczeniem w trakcie hodowli. W praktyce głównym sposobem proponowanym przez większość badaczy jest wprowadzanie komórek w struktury ciał stałych o charakterze makrokapilar, usieciowanych polimerów, względnie struktur włóknistych. Należy jednak podkreślić zasadniczą różnicę jaka występuje między wiązaniem komórek rosnących na powierzchni nośników stałych, a unieruchamianiem komórek rosnących w zawiesinie w różnego rodzaju ośrodkach. W tym drugim przypadku nie mamy do czynienia z adhezją komórek do powierzchni nośnika, lecz ze zwykłym fizycznym ich uwięzieniem.

2.7. *Hollow-fiber*

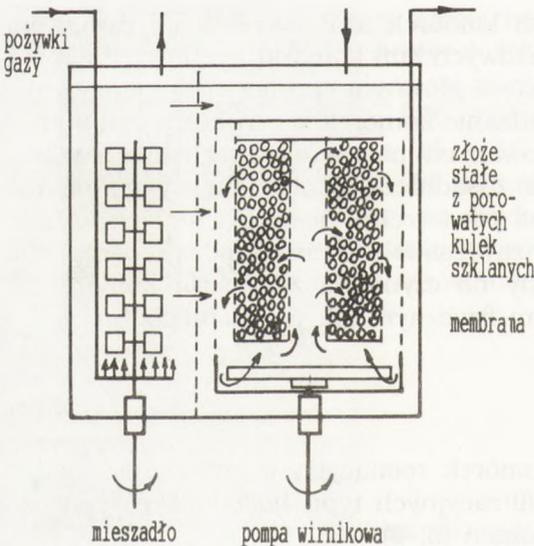
Duże możliwości zagęszczania komórek rosnących w zawiesinie stwarza bezpośrednia hodowla w modułach filtracyjnych typu *hollow-fiber* wyposażonych w wiązki cienkich, pustych włókien (6, 9).

Przykładem takich rozwiązań może być bioreaktor Celltronics (NBS) użyty do produkcji przeciwciał monoklonalnych przy zastosowaniu linii WD1 (5) lub reaktor o podwójnym systemie membran opisany przez Oh i Changa (14).

Ogólnie należy podkreślić, że hodowla komórek rosnących w zawieszynie w reaktorach membranowych jest jedną z najbardziej udanych technologii związanych z hodowlami komórkowymi w systemach immobilizowanych. Jest ona przydatna w hodowlach prowadzonych na małą skalę, szczególnie do produkcji immunodiagnostyków i białek z komórek rekombinowanych. W praktyce stosowane są moduły jednostkowe o objętości do 1 l. W przypadku konieczności stosowania większych objętości zestawia się moduły jednostkowe w systemy równoległe. Mogą one pracować w sposób ciągły przez szereg miesięcy, pozwalając na wyprodukowanie gramowych ilości przeciwciał w ciągu miesiąca.

2.8. Reaktor dializacyjny ze złożem stałym

Ciekawą metodę hodowli komórek mieszańcowych (linia IVF 19) opisali Kurosawa i wsp. (9). Zastosowali oni bioreaktor dializacyjny z wydzielonym złożem nieruchomym (rys. 4). Wewnątrz reaktora o dużej średnicy znajduje się asymetrycznie ułożony mniejszy cylinder dializacyjny, którego ściany zbudowane są z membrany ultrafiltracyjnej o punkcie odcięcia 10 kD. We wnętrzu cylindra dializacyjnego umieszczony jest mniejszy reaktor z wypełnieniem nieruchomym, rurą cyrkulacyjną i pompą wirową. Złoże nieruchome tworzy warstwa porowatych kulek szklanych. Pożywka pompowana jest od dołu do perforowanej rury cyrkulacyjnej, skąd przepływa promieniście na zewnątrz przez złoże kulek szklanych i spływa w dół do pompy wirowej. W ten sposób wymuszany jest ruch cieczy w poprzek złoża. Tlen wprowadzany jest do strefy



Rys. 4. Bioreaktor dializacyjny ze złożem stałym.

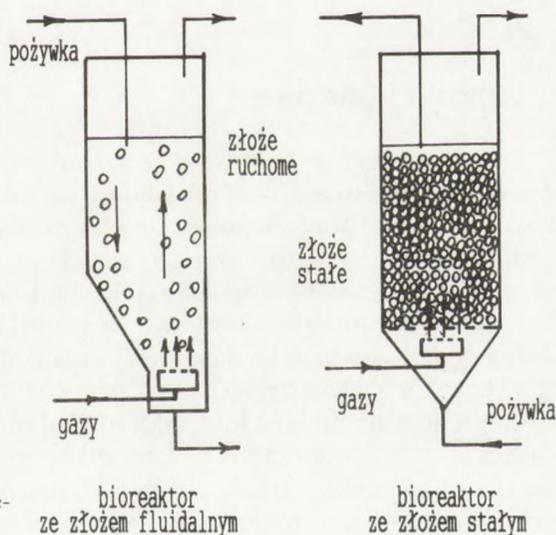
zewnątrznej reaktora, gdzie umieszczone jest mieszadło wieloturbinowe wspomagające transfer tlenu z fazy gazowej do ciekłej. Duża porowatość błony dializacyjnej umożliwia swobodny transfer tlenu do strefy wzrostu komórek. Autorzy podają, że w systemie tym większość komórek rosła w obrębie kulek szklanych, gdzie ich gęstość wynosiła $9,6 \times 10^6$ komórek/cm³ złoża. Część komórek rosła w zawieszynie i krążyła w całej objętości pożywki zamkniętej w cylindrze dializacyjnym. Zaletą tego rozwiązania jest oddzielenie strefy wzrostu komórek od strefy natleniania i wymiany pożywki, co dodatkowo zabezpiecza kulturę od zakażenia.

2.9. Kapsułkowanie komórek

Jedną z technologii pozwalających na zwiększenie stężenia komórek i ich zatrzymanie w bioreaktorze w czasie hodowli ciągłej jest kapsułkowanie, tzn. uwięzienie komórek wewnątrz mikrozbiorniczków. Techniki te zostały przeniesione z procesów mikrobiologicznych i enzymatycznych.

Z uwagi na duże trudności w kapsułkowaniu komórek w polimerach technika ta ogranicza się w zasadzie do małej skali, rzędu kilkudziesięciu litrów. Od nośnika wymaga się dobrych właściwości dyfuzyjnych i możliwie dużej wytrzymałości mechanicznej.

Hodowle komórek immobilizowanych prowadzi się zwykle w klasycznych reaktorach w formie złoża nieruchomego (reaktory kolumnowe i rurowe) lub złoża fluidalnego (reaktory z mieszaniem mechanicznym lub pneumatycznym) (rys. 5). Rozmiary kulek nośnika wahają się od 0,1 mm do 5 mm. Do najszerszej stosowanych nośników oferowanych na rynku należą kolagen (Verax), żelatyna (Cultispher), nośniki ceramiczne (Siran, Schott), a przede wszystkim alginiany i karaginy.



Rys. 5. Systemy bioreaktorów z unieruchomionymi komórkami zwierzęcymi.

Przykładem hodowli komórek zwierzęcych immobilizowanym w żelu alginianowym może być kultura komórek mieszańcowych S3H5/ γ 2bA2, opisana przez Lee i in. (10). Autorzy ci stwierdzili, że zastosowanie immobilizacji pozwala na 3-krotne zwiększenie wydajności produkcji przeciwciał w porównaniu do hodowli w zawieszynie.

Doskonałym materiałem do immobilizacji komórek ssaków jest siatkowana żywica poliwinylowa. Odznacza się ona dużą wytrzymałością mechaniczną i chemiczną. Ponadto nośnik ten charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami dyfuzyjnymi. Technika przygotowania polimeru oraz zasiedlania go przez komórki jest prosta, co ułatwia powiększanie skali hodowli. Yamaji i Fukuda (21) wykorzystali ten nośnik do hodowli mysich myeloma (linia MPC-11) stosując prosty reaktor ze złożem fluidalnym. Obserwowali oni szybki wzrost komórek. Ich gęstość w obrębie nośnika wynosiła $1,0 - 1,2 \times 10^7$ /ml natomiast, w pożywce była 100-krotnie niższa.

2.10. Włókna szklane

W hodowlach komórek przyczepno-niezależnych stosowane są też reaktory kolumnowe z nieruchomym wypełnieniem (*packed-bed bioreactors*). Do perspektywicznych rozwiązań należy zaliczyć reaktor wypełniony włóknem szklanym. Ramirez i Mutharasan (15) hodowali w takim reaktorze komórki hybrydoma HB32 produkujące przeciwciała monoklonalne. Uzyskali oni wysoką koncentrację żywych komórek sięgającą 1×10^7 /cm³ objętości pożywki, zaś produkcja przeciwciał wahała się od 100 do 140 mg/lh. Jako wypełnienie stosowane były włókna ze szkła borosilikatowego o średnicy 1 mm. Napowietrzanie pożywki odbywało się poza reaktorem kolumnowym w oddzielnym naczyniu. Analiza matematyczna procesu wskazuje, że system ten nadaje się doskonale do powiększania skali i jest bardzo tani.

3. Wnioski końcowe

Znaczna część stosowanych obecnie linii komórkowych ma zdolność wzrostu w formie zawiesziny. Pozwala to na stosowanie bioreaktorów używanych do hodowli mikroorganizmów, przy czym wymagane są modyfikacje konstrukcyjne polegające na zmianie geometrii dna, systemu napowietrzania i typu mieszadła. Możliwość stosowania swobodnie rosnących komórek znacznie ułatwia powiększanie skali hodowli. W praktyce tylko systemy hodowli komórek rosnących w zawieszynie dają możliwości dowolnego powiększania skali.

W przypadku produkcji białek przez kultury komórkowe wyraźnie zaznacza się tendencja do stosowania takich systemów hodowli, które umożliwiają prowadzenie procesów ciągłych przy dużej gęstości komórek i jednoczesnej selektywnej separacji metabolitów. Większość prowadzonych aktualnie prac technologicznych i bioinżynieryjnych poświęcona jest opanowaniu hodowli

w układzie aparaturowym łączącym bioreaktor z separatorem. Zapewnia to kontrolowaną recyrkulację komórek i selektywne usuwanie zużytej pożywki. Dzięki wysokiej koncentracji komórek uzyskuje się od 5 do 40-krotny wzrost produktywności bioreaktora.

Połączenie bioreaktora z układem dynamicznej ultrafiltracji umożliwia uzyskiwanie produktów o wysokiej czystości. System ten pozwala na zatrzymywanie substancji wielkocząsteczkowych, w tym czynników wzrostowych, co zmniejsza dodatek surowicy do pożywek. Stosowanie ciągłej metody hodowli jest jednak znacznie trudniejsze, szczególnie ze względu na niebezpieczeństwo zakażeń oraz konieczność stosowania dobrze ustabilizowanych linii komórkowych (20). Recyrkulacja komórek wymaga też znacznie droższej aparatury i większej dyscypliny pracy.

Dotychczas na dużą skalę ciągła metoda hodowli została opracowana tylko dla systemów przepływowych w układzie chemostatu. Największe naczynia hodowlane sięgają w tym przypadku objętości 2000 l. System ciągłej hodowli z retencją lub recyrkulacją komórek w tak dużej skali nie został jeszcze dostatecznie opracowany.

Ze względów praktycznych, stosowane są nadal prawie wyłącznie hodowle okresowe i ich modyfikacje. Są one dopracowane pod względem technologicznym i aparaturowym i stwarzają znacznie mniej problemów operacyjnych. Wszystko jednak wskazuje na to, że przyszłość będzie należeć do procesów ciągłych prowadzonych przy podwyższonych gęstościach komórek.

HISTORYCZNY RYS ROZWOJU TECHNIK HODOWLI KOMÓRKOWYCH SSAKÓW (3)

- | | |
|------|---|
| 1885 | Przechowywanie komórek zarodków kurzych w roztworze soli |
| 1897 | Utrzymywanie przy życiu komórek krwi w surowicy i plazmie |
| 1907 | Hodowla komórek nerwowych żaby <i>in vitro</i> |
| 1916 | Wprowadzenie trypsyny do obróbki subkultur komórek przyczepno-zależnych |
| 1940 | Ochrona kultur przed zakażeniem przez wprowadzenie do pożywek antybiotyków |
| 1948 | Izolacja fibroblastów mysich zdolnych do tworzenia klonów z pojedynczej komórki |
| 1949 | Wzrost wirusa polio na kulturze ludzkich komórek embrionowych |
| 1952 | Opanowanie ciągłej linii komórkowej HeLa (rak szyjki macicy) |
| 1955 | Opracowanie składu chemicznego pożywki przez Eagle'a |
| 1961 | Izolacja ludzkich fibroblastów (WI-38) i ich hodowla <i>in vitro</i> |
| 1964 | Wprowadzenie selekcyjnej pożywki HAT |
| 1965 | Wprowadzenie pierwszej bezsurowiczej pożywki do hodowli komórkowych |
| 1965 | Fuzja komórek mysich i ludzkich |
| 1975 | Uzyskanie produkcji przeciwciał monoklonalnych przez komórki mieszańcowe (Kohler i Milstein) |
| 1978 | Opracowanie podstaw do rozwoju pożywek bez dodatku surowicy złożonych z mieszaniny hormonów i czynników wzrostowych |
| 1982 | Otrzymanie insuliny jako białka rekombinowanego, które zostało dopuszczone do celów terapeutycznych |
| 1987 | Wprowadzenie na rynek tPA (<i>tissue-type plasminogen activator</i>) produkowanego przez zrekombinowane komórki zwierzęce |

Literatura

1. Arthoon W. R., Birch J. R., (1986), *Science*, 232, 1390 – 1395.
2. Bugarski B., King G. A., Jovanovic G., Daugulis A. J., Goosen M. F. A., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 264 – 269.
3. Butler M., (1991), *Mammalian Cell Biotechnology*, ed. Butler M., s. 1-25, Oxford Univ. Press.
4. Graf H., Schugerl K., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 165 – 175.
5. Hopkinson J. (1985), *Bio/Technology*, 3, 225 – 230.
6. Hulscher M., Scheibler U., Onken U., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 442 – 446.
7. Katinger H. W. D., Schreier W., Kroemer E., (1979), *Ger. Chem. Eng.*, 2, 31 – 38.
8. Knight P., (1989), *Bio/Technology*, 7, 459 – 461.
9. Kurosawa H., Markl H., Niebuhr-Redder C., Matsumura M., (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 41 – 45.
10. Lee G. M., Varma A., Palsson B.O., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 821 – 830.
11. Hehmann J., Buntemeyer H., Jager V., (1990), *Food Biotechnol.*, 4, 423 – 431.
12. Maiorella B., Dorin G., Carion A., Harano D., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 121 – 126.
13. Munster M. J., Kearns M. J., Steegmans U., Behrendt U., Comer M. J., (1991), *Bioprocess Engn.*, 6, 123 – 125.
14. Oh D. J., Chang H. N., (1992), *Biotechnol. Techniq.*, 6, 77 – 82.
15. Ramirez O. T., Mutharasan R., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1072 – 1076.
16. Schmid G., Wilke C. R., Blanch H. W., (1992), *J. Biotechnol.*, 22, 31 – 40.
17. Smith C. G., Guillaume J.-M., Greenfield P. F., Randerson D. H., (1991), *Bioprocess Engn.*, 6, 213 – 219.
18. Takazawa Y., Tokashiki M., Hamamoto K., Murakami H., (1988), *Cytotechnol.*, 1, 171 – 178.
19. Van Wie B. J., Brouns T. M., Elliott M. L., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1190 – 1202.
20. Werner R. G., Walz F., Noe W., Konrad A., (1992), *J. Biotechnol.*, 22, 51 – 68.
21. Yamaji H., Fukuda H., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 730 – 734.
22. Zwetner R. K., Cox R. M., Lynn J. D., Acton T., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2717 – 2735.

Pilot plant and industrial systems for animal cell cultivation. II. Anchorage independent cell cultures

Summary

In the last decade fast development of modern cell culture techniques is observed. Some new high performance cell culture bioreactors are being designed and tested. These reactors are usually configured with cell separators to cell recycling. As separators, microfilters, ultrafilters, continuous flow centrifuges and settlers are proposed. The main systems allowing to carry out the high cell density cultures and numerous technological applications of these systems are presented in this review.

Key words:

bioreactors, cell culture, cell recycling, cell separators.

Adres dla korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.