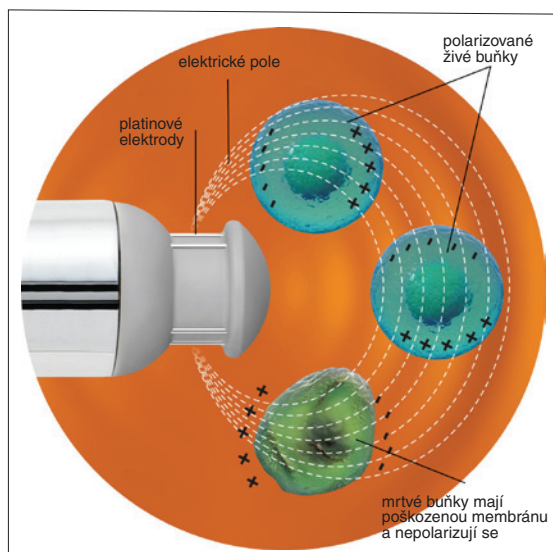


# On-line monitorování množství živých buněk

On-line nebo in-line měření je nevhodnější způsob monitorování biotechnologických procesů, je-li třeba zajistit jejich řízení podle aktuálních hodnot. Nejčastěji se využívá pro kontrolu pH a obsahu rozpuštěného kyslíku, běžných parametrů pro většinu biologických procesů. Je možné sledovat mnoho dalších parametrů, ale ty, které přímo souvisejí s buněčnou fyziologií, jsou nejčastěji získávány časově náročným off-line měřením, poskytujícím informaci pouze o jednom konkrétním okamžiku v minulosti procesu. Neustále narůstající požadavky na využívání provozní analytické techniky (PAT – *Process Analytical Technology*)<sup>1)</sup> v biofarmaceutických procesech vedou i ke zvýšenému zájmu sledovat tyto parametry v reálném čase.

Tyto požadavky plně splňují senzory společnosti Hamilton – Incyte Arc<sup>®</sup> a Dencytee Arc<sup>®</sup>, které monitorují množství živé a celkové biomasy v reálném čase. Jasně, okamžitě dostupné informace zajišťují, že kritické události, které mohly být mezi off-line vzorky přehlédnuty, jsou nyní okamžitě rozpoznatelné. Místo několika izolovaných hodnot z odebraných vzorků, které jsou navíc vyhodnoceny s časovým zpožděním, je k dispozici aktuální kontinuální měření. Větší objem dat z měření v reálném čase rozšiřuje možnosti řízení procesu, které lze využít pro zvýšení výtěžku, snížení provozních nákladů a zlepšení reprodukovatelnosti.



Obr. 1. Měření hustoty živých buněk prostřednictvím elektrické permitivity

## Hustota živých buněk

Nejspolehlivější metodou monitorování hustoty živých buněk (VCD – *Viable Cell Density*) je měření permitivity. Snímač okamžitě reaguje na změny a měření je možné použít k přesnému načasování zásahů do procesů a tím zvyšovat jejich výtěžek. Permitivita může být také použita k detekci změn ve fyziologii buňky jako bezprostřední metoda pro stanovení začátku fáze buněčné smrti (obr. 1).

Na tomto principu je založeno měření senzorem Incyte Arc, který umožňuje on-line měření hustoty živých buněk v reálném čase bez nutnosti odběru vzorků. Typické příklady použití zahrnují savčí buněčné kultury, kvasinky a bakteriální fermentace s velkou hustotou. Měření je nezávislé na změnách média, mikronosičů, mrtvých buněk a úlomků. Umožňuje detekovat jednotlivé události a reagovat v reálném čase. Uživatelé nejvíce oceňují možnost zvýšení výtěžku a snížení výrobních nákladů, detekci změn v buněčné

fyziologii pomocí frekvenčního skenování, zvýšení konzistence procesu a včasnou detekci odchylek procesu.

Princip měření je založen na chování živých buněk ve střídavém elektrickém poli, kdy buňky reagují jako malé kondenzátory. Náboj z těchto malých kondenzátorů je měřen senzorem a detekován jako permitivita.

## Celková hustota buněk

Celková hustota buněk (TCD – *Total Cell Density*) je spolehlivý parametr pro měření buněčného růstu. Nejrelevantnější informace jsou získány během klidové a exponenciální fáze před nárůstem odumírání buněk.

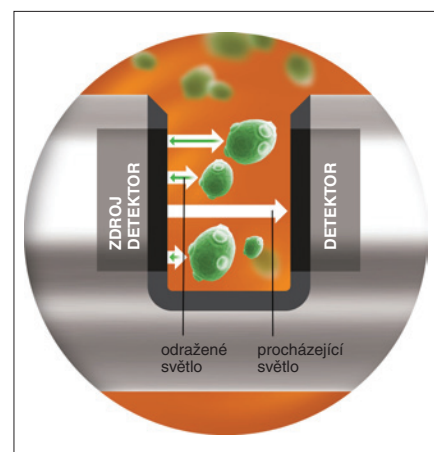
On-line měření celkové buněčné hustoty v roztoku se provádí při použití senzoru Dencytee Arc<sup>®</sup>, který měří zákal buněčné suspenze. Měření probíhá na vlnových délkách blízkého infračerveného světla (NIR), takže není citlivé na změny barvy média ve viditelném spektru. Jsou detekovány všech-

ny částice a molekuly, které rozptylují světlo při 860 nm, včetně živých a mrtvých buněk a též buněčných zbytků. Toto měření je vhodné také po inokulaci, kdy buňky rychle rostou, ale koncentrace jsou ještě nízké, takže měření založená na permitivitě jsou méně spolehlivá. Hlavními výhodami jsou jednoduché on-line měření buněčného růstu, získání spolehlivých hodnot během fáze růstu, velmi dobrá linearita při vysokých koncentracích a včasná detekce odchylek procesu.

Senzor Dencytee Arc využívá k monitorování TCD dva základní principy – průchod (transmise) a odraz (reflexe) světla. Měří se ve vrstvě o tloušťce 5 mm. Na jedné straně je zdroj světla a detektor odraženého světla, na druhé straně je pouze detektor, který měří intenzitu světla, jež prošlo vzorkem. V závislosti na koncentraci buněk se světlo buď více odráží od buněk a dopadá na detektor odraženého světla, nebo projde roztokem a je zachyceno detektorem procházejícího světla. Dencytee Arc<sup>®</sup> kombinuje signály obou detektorů do jediné hodnoty. Detekce odraženého světla umožňuje sledovat proces i při vysoké hustotě buněk (až 200 g/l sušiny).

## Viabilita (životaschopnost) buněk

Při sledování procesu pomocí obou senzorů lze vyhodnocovat i viabilitu (životaschopnost) buněk danou poměrem živých a všech buněk v populaci. To se využívá především u dlouhodobých kultivací, perfuzí a aplikací, které vyžadují velkou viabilitu.



Obr. 2. Měření celkové hustoty buněk detekcí průchodu a odrazu světla v blízké infračervené oblasti

<sup>1)</sup> Pozn. red.: viz [FDA: *Guidance for Industry: PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*. Food and Drug Administration, 5630 Fishers Lane, rm. 1061, Rockville, MD 20852, USA. Dostupné na <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf>]. Jde o pokyny určené k popisu regulatorního rámce využití provozní analytické techniky (*Process Analytical Technology*, PAT), který má podporovat dobrovolný vývoj a implementaci PAT ve vývoji, výrobě a zajišťování kvality ve farmacii. Farmaceutická výroba je ze své podstaty i pro nutnost veškeré inovace náročně ověřovat a validovat velmi konzervativní, což prodlužuje vývojové cykly a zvyšuje náklady. Jednou ověřené výrobní procesy zůstávají „zakonzervovány“ a není vůle je měnit a zlepšovat. Viz také [FDA: *Pharmaceutical cGMPs for the 21st century – A risk based approach*. Final Report, September 2004].

## Off-line, at-line, on-line a in-line měření v bioreaktorech

Při *off-line měření* je vzorek odebrán z bioreaktoru za sterilních podmínek a analyzován v laboratoři po fyzikálních předúpravách (např. filtraci a zředění). Příprava a manipulace vyžadují jasné standardní operační postupy (SOP) a také kvalifikovaný personál. Pokud se během těchto fází vyskytnou problémy, přesnost výsledků se sníží. Spolu se složitostí ruční manipulace je hlavní nevýhodou *off-line měření* časové zpoždění.

*Off-line měření* není provozní měření, tj. není součástí PAT, ale je to měření laboratorní.

*Off-line měření* se běžně používají také k monitorování a ověřování přesnosti *in-line* a *on-line* provozních analyzátorů.

Při *at-line měření* (na lince) se vzorek odebírá a analyzuje v těsné blízkosti výrobního zařízení, a to buď ručně, nebo pomocí automatických vzorkovacích zařízení. Podobně jako u *off-line měření* je pro přesné výsledky nutné udržovat sterilní podmínky. Měření *at-line* je nejběžnější způsob měření parametrů, které nelze přesně měřit *in-line* nebo *on-line*.

Mezi výhody měření *at-line* patří kratší zpoždění (ve srovnání s měřením *off-line*) a možnost zpětnovazebního řízení; měření však někdy mohou být příliš pomalá na to, aby účinně monitorovala kultury s velkými rychlostmi růstu, jako jsou mikrobiální kultury. V tom případě ani toto měření nemůže být součástí PAT.

Při *on-line měření* je vzorek odváděn z výrobního zařízení obtokem a může být vrácen zpět. Vzorek je automaticky měřen provozními (procesními) snímači. Výhody této metody spočívají v přímém přístupu ke vzorku ve stacionárních podmínkách. Implementace takového řešení vyžaduje specificky navržený nebo upravený bioreaktor, což měření poněkud komplikuje a prodražuje. Jde o měření, které je součástí PAT, stejně jako *in-line* měření.

Při *in-line* nebo *in situ měření* je provozní snímač instalován přímo do bioreaktoru. Měřené hodnoty jsou odesílány v reálném čase do PLC nebo systému SCADA pro automatizované řízení. Takto se běžně měří pH, ORP, koncentrace rozpuštěného O<sub>2</sub> nebo CO<sub>2</sub>, teplota a nebo vodivost. *In-line* a *on-line* měření jsou optimální volbou pro implementaci principů PAT.

Mají-li provozní snímače při měření *on-line* i *in-line* přesně a spolehlivě měřit v průběhu celého procesu, což může být několik týdnů i měsíců, je třeba myslet na preventivní opatření, jako jsou kalibrace a čištění, které by měly být prováděny ve stanovených intervalech. Senzory musí být kompatibilní s opakovaným čištěním CIP a SIP.

(Zdroj: Hamilton Bonaduz AG)

## System Arc

Oba senzory využívají systém Arc<sup>®</sup>, kdy mikroprocesor integrovaný do těla senzoru modifikuje signál pro přímé připojení k řídicímu systému. Není tedy nutné používat externí převodník, čímž se snižují pořizovací náklady i zjednodušuje řízení procesu. Zároveň vestavěná paměť poskytuje záložní úložiště provozních dat pro zajištění spolehlivosti.

Kalibrace, autodiagnostika a konfigurace senzoru jsou realizovány prostřednictvím USB nebo bezdrátově prostřednictvím Bluetoothu. Lze tak vždy zkontrolovat stav senzoru, dokonce i v průběhu měření.

Oba senzory na monitorování biomasy lze používat i s dalšími senzory Arc ze sortimentu firmy Hamilton – senzory koncentrace rozpuštěného kyslíku a CO<sub>2</sub>, pH i vodivosti. Používá-li se zároveň intuitivní software ArcAir<sup>®</sup>, lze všechny senzory zobrazovat ve společném grafu a zaznamenávat měřené hodnoty v čase. Všechny součásti systému Arc jsou plně využitelné ve výroбах validovaných podle GMP a navíc umožňují automaticky vytvářet dokumentaci vyhovující požadavkům GMP. Tím se z konceptu Arc stává jedinečný nástroj poskytující kompletní informace o dění uvnitř bioreaktoru a zároveň usnadňující práci obsluze.

(Petr Cetlovský, Hamilton Bonaduz AG)

# HAMILTON

## In-line měření množství živé a celkové biomasy

Monitorování množství buněk v reálném čase umožňuje automatické řízení procesu pomocí aktuálních dat

[www.hamiltoncompany.com](http://www.hamiltoncompany.com)  
[pcetlovsky@hamilton.ch](mailto:pcetlovsky@hamilton.ch)



Rozšířený objem dat z měření v reálném čase zvyšuje možnosti řízení procesu, kterých lze využít pro vyšší výtěžek, snížení provozních nákladů a zlepšení reprodukovatelnosti. Hamilton nabízí pro plnohodnotné využití všech možností procesní analytické technologie široké portfolio senzorů. S nimi lze sledovat další důležité procesní parametry – pH, množství rozpuštěného kyslíku a CO<sub>2</sub>, vodivost a ORP.