

Evaluation of the „Respiration Activity Monitoring System“ with Mammalian Cell Cultures

Prof. Dr. rer. nat. Manfred Biselli
Aachen University of Applied Sciences
Cell Culture Laboratory

Experiments have been performed demonstrating the consistency of parallel experiments for measuring the OTR values in shaken flasks with RAMOS, using hybridoma cell cultures.

From preliminary investigations and considerations oxygen limitations could be excluded for cell culture experiments in RAMOS, using standard oxygenation conditions (5% CO₂ / air). Contrary to RAMOS the conventional spinner culture oxygen tension is most often limiting. As K_{La} -values in the system are far above 40 1/h, OTR-values in cell cultures in the order of 0.4 mmol/L*h (data see below) yield oxygen tensions in the culture liquid near to the corresponding saturation values, according to Henrys law.

Problems may occur by sedimentation of cells and agglomeration in the centre of the bottom of the vessels, especially if the liquid volume is too high and the shaking rate too low. Shaking rates of 100 rpm at liquid volumes from 30 mL to 80 mL did not lead to such problems. Too high shaking rates can lead to cell damage. This was observed at shaking rates above 140 rpm (liquid volume 80mL). Shaking rate should be chosen high enough to prevent sedimentation. Higher rates are not necessary, as OTR is not limiting.



fig. 1 Experimental equipment

Experimental conditions:

Cell line: Mouse-Mouse Hybridoma Cell (secreting a monoclonal antibody)
 Culture Medium: 3:1 DMEM/Ham-F12, 1% FCS
 Inoculum density: $2 \cdot 10^5$ cells/mL, viability >90% (Inoculum from spinner culture, exponential growth phase)
 Gas phase: 5% CO₂ / air; gassing rate 40 L/h (8 flasks)
 Measuring time: 90 min; rinsing time 60 min
 Shaking flasks: 8 flasks (250mL total volume); liquid volume 50 mL

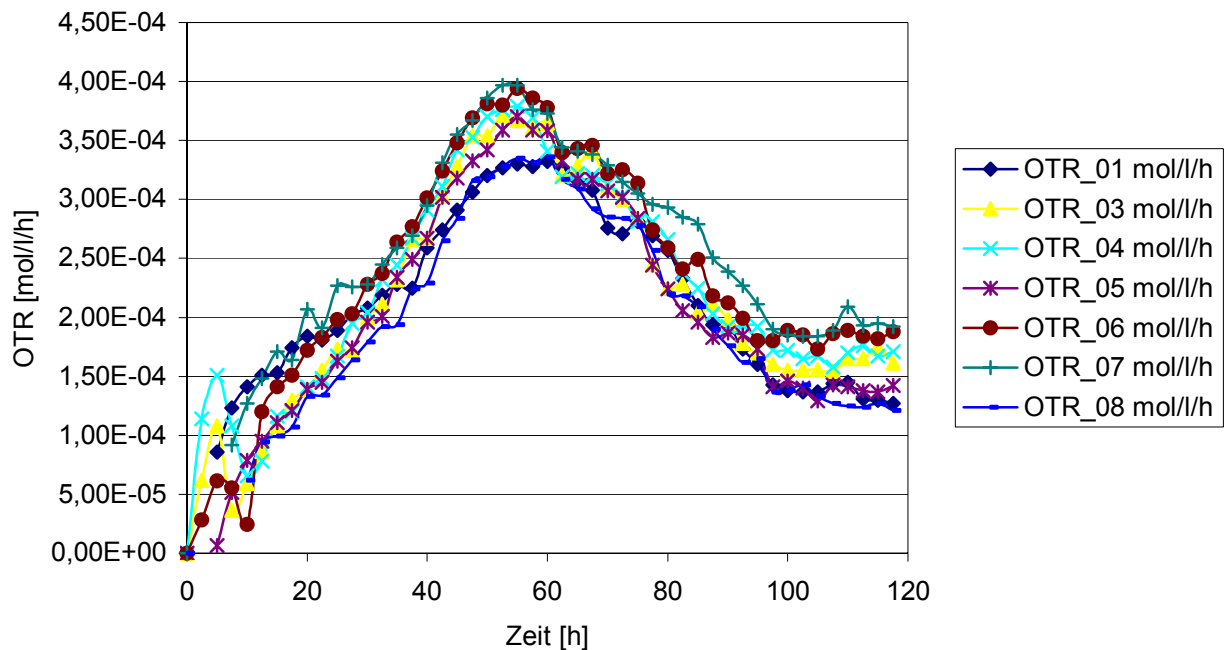


fig. 2

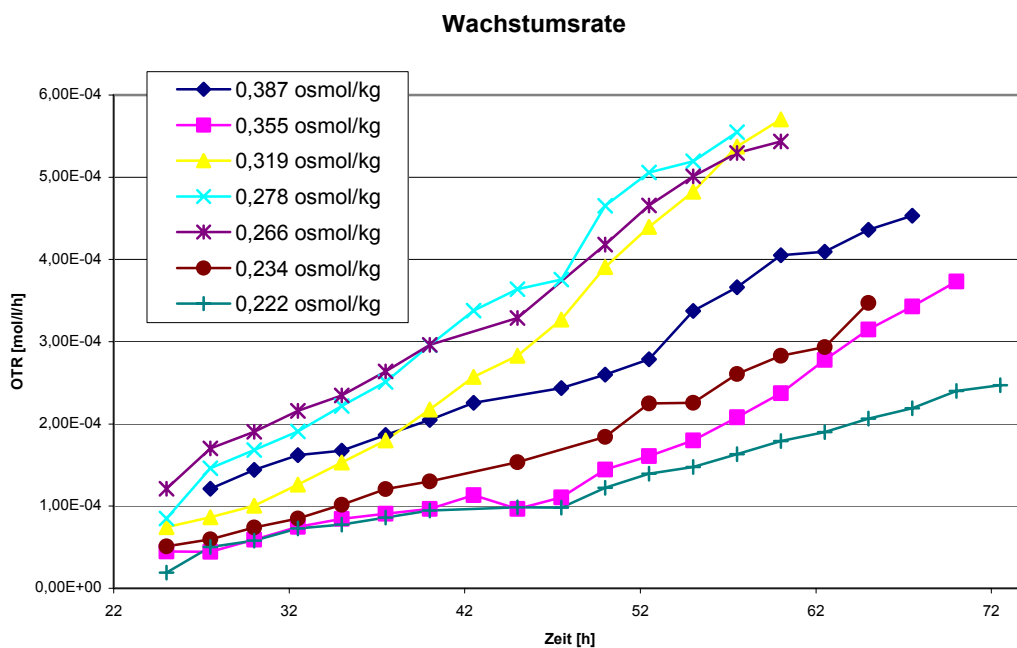
The metabolic activity of hybridoma cells in shaking flasks could be controlled online using RAMOS. The increase of OTR values in the exponential growth phase is very similar in all curves indicating identical growth rates. Still existing deviations of the curves may result from small differences of the temperature and / or inoculation density.

RAMOS will be a suitable tool for media and bioprocess development with mammalian cell cultures.

Weitere Ergebnisse (noch nicht übersetzt)

Als Beispiel für eine Medienoptimierung wurde der Einfluss unterschiedlicher Osmolaritäten im Ausgangsmedium auf die Wachstumsrate bei 7 Kulturen parallel untersucht. Das RAMOS-System ermöglichte eine automatisierte Messung des Osmolaritätsoptimums durch Bestimmung der jeweiligen maximalen Wachstumsraten in der exponentiellen Phase (errechnet aus der Steigung der Kurve $\ln(\text{OTR})=f(t)$). Nach Start der Parallelkultur ist dabei keinerlei offline-Probenahme mehr notwendig. Eine ebenso aussagekräftige konventionelle Versuchsdurchführung würde 7 getrennte Fermentationen mit mehrmaliger täglicher Probenahme zur Zellzahlbestimmung erfordern und wäre mit einem immensen Zeit- und Kostenaufwand verbunden.

A: Online OTR-Messung in der exponentiellen Phase zur Bestimmung der Wachstumsrate



B: Wachstumsrate in Abhängigkeit der Medienosmolarität

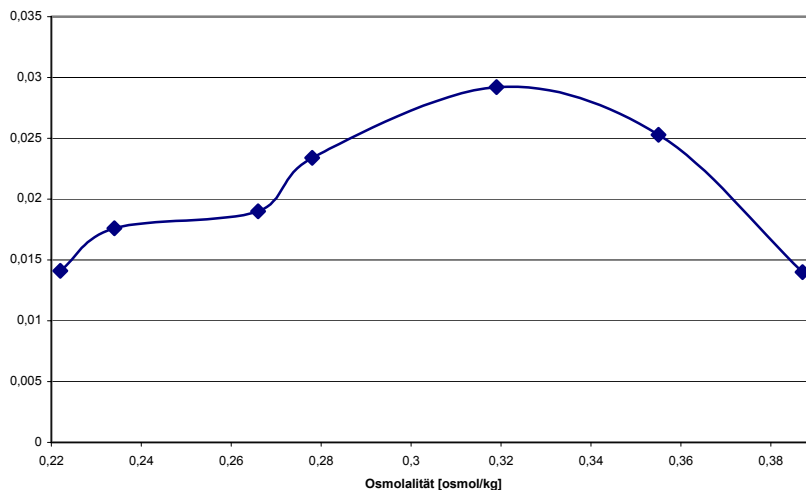


Abbildung 2: Automatisierte Bestimmung des Osmolaritätsoptimums mittels RAMOS

Andere Systeme am Markt, die ein online Monitoring und Dosierung ermöglichen, messen den gelösten Sauerstoff und berechnen mit Hilfe des zuvor bestimmten KLa-Wertes und der Kenntnis der Mischung der zugeführten Gase den OTR. Die Umrechnung ist dabei von verschiedenen Prozessparametern abhängig, die beim vorgestellten Verfahren, im Verlauf der Anzucht verändert werden müssen, wie z.B. der Füllstand. Zudem sind alle bisher üblichen Anzuchtstufen erforderlich. Ein weiterer Unterschied und Nachteil zum geplanten System sind die in das gerührte Medium eintauchenden Sensoren, die eine erheblich aufwändigere Handhabung verursachen und deshalb teilweise abgelehnt werden.

For further information please contact:

HiTec Zang GmbH
Dr. Werner Zang
52134 Herzogenrath
Germany
++49 (2) 2407- 9 10 10 12
werner.zang@hitec-zang.de