



---

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

FOLYAMATKÖVETŐ, -ELEMZŐ  
TECHNOLÓGIAI ESZKÖZÖK ALKALMAZÁSA  
KÍNAI HÖRCSÖG PETEFÉSZEK SEJTVONAL ALAPÚ ELJÁRÁSOKNÁL  
A BIOLÓGIAI GYÓGYSZERHATÓANYAG-GYÁRTÁSBAN

Tézisfüzet

Szerző: Párta László  
Témavezető: Dr. Gergely Szilveszter, PhD  
Konzulens: Dr. Salgó András, DSc

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar  
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék  
NIR Spektroszkópia Csoport

Biotechnológiai fejlesztési osztály  
Biotechnológiai kutatási és fejlesztési főosztály  
Biotechnológiai üzletág  
Richter Gedeon Nyrt.



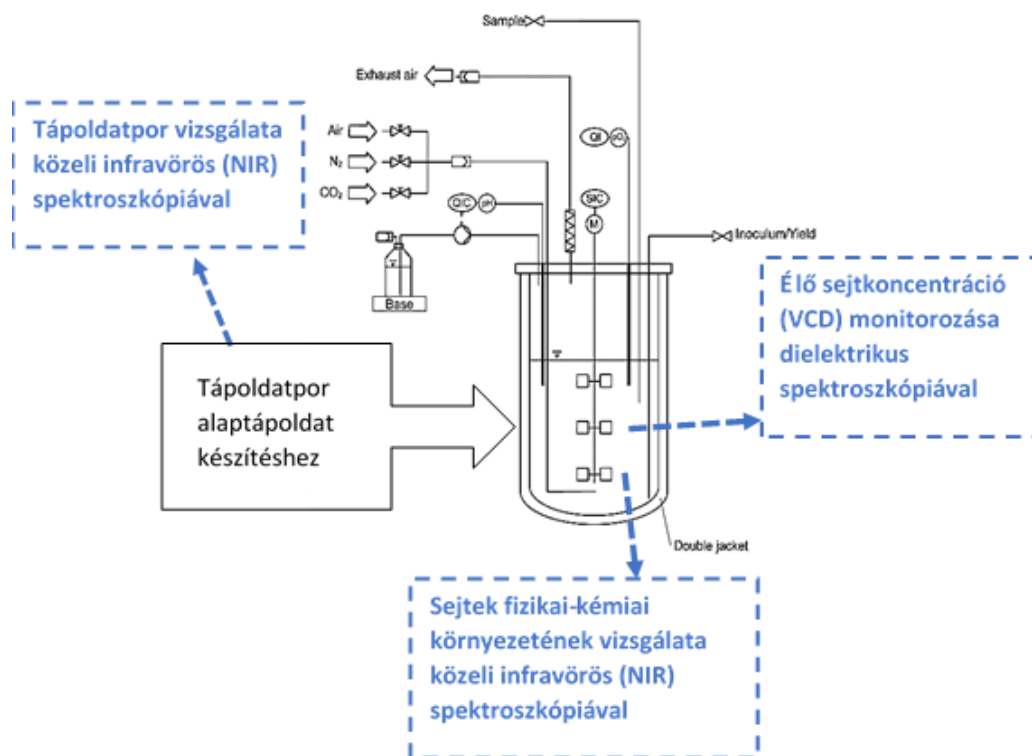
2017

## 1. Bevezetés és kutatási célok

Doktori kutatómunkám során a nagy gyógyszeripari jelentőségű, monoklonális antitesteket (*monoclonal antibody*, mAb) termelő, kínai hörcsög petefészek (*Chinese hamster ovary*, CHO) sejtvonal alapú fermentációk modern folyamatkövető, -elemző technológiai (*process analytical technology*, PAT) eszközökkel történő nyomon követését (monitorozását) tűztem ki általános célul. A fejlettebb monitorozó rendszerek megteremtik a lehetőséget arra, hogy a vizsgált sejtenyésztési folyamat reprodukálhatóságát és robusztusságát egy fejlettebb folyamatszabályozás (*advanced process control*, APC) segítségével megnövelhessük.

A CHO fermentációs folyamat PAT monitorozásának megvalósíthatóságát három kritikus területen szándékoztam megvizsgálni (1. ábra):

- az élő sejtek koncentrációjának (*viable cell density*, VCD) nyomon követhetőségét dielektromos spektroszkópiával (*dielectric spectroscopy*, DS);
- a sejtek fizikai-kémiai környezetének nyomon követhetőségét közeli infravörös (*near-infrared*, NIR) spektroszkópiával;
- a legkritikusabb bemenő alapanyag, a tápoldatpor minősíthetőségét NIR spektroszkópiával.



1. ábra – A CHO fermentáció kutatómunkám során megvizsgált PAT monitorozási területei.

Az előzőekben felsorolt területeken célul tűztem ki, hogy

- a dielektromos spektroszkópia (DS) alkalmazhatóságát megvizsgáljam az általánosan alkalmazott élő CHO sejt koncentráció tartományok mellett a viszonylagosan magas VCD tartományokban ( $\geq 40\text{-}50 \times 10^6$  sejt/ml) is bioreaktoros rendszerben annak érdekében, hogy ilyen szélsőséges körülmények között képet alkothassak a metodika robusztusságáról;
- a vizsgált sejtkoncentráció-tartományokban összehasonlítsak három különböző matematikai módszert – a lineáris regressziót, a Cole–Cole-modellezést, ill. a részleges legkisebb négyzetek (*partial least squares*, PLS) regressziót – a dielektromos VCD becslés pontossága szempontjából;
- rázatott lombikos modellrendszerben megvizsgáljam irányított biokémiai és fizikai változások nyomon követhetőségét NIR spektroszkópiával;
- ugyanabban a rázatott lombikos CHO modellrendszerben felmérjem a glükóz-koncentráció NIR spektroszkópiái alapú becslésének pontosságát a mátrix és a glükóz koncentráció változásának szétválasztása mellett;
- megvizsgáljam, hogy CHO tápoldatpor tervszerű hőkezelései esetében a NIR spektroszkópia alkalmas-e a végbemenő változások detektálására;
- összehasonlítsam a sejttenyésztéses és a NIR spektroszkópia alapú tápoldatpor-vizsgálat érzékenységét.

## 2. Irodalmi háttér

Az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügynöksége (*Food and Drug Administration*, FDA) 2004 szeptemberében publikálta az ún. folyamatkövető, -elemző technológia (*process analytical technology*, PAT) ajánlásait azzal a céllal, hogy ennek segítségével a gyógyszeripari termelést hatékonyabbá, robusztusabbá és ennek folytán költséghatékonyabbá tegye.<sup>1</sup> Az FDA definíciója szerint a PAT egy olyan tervező, elemző és szabályozó rendszer, ami a kiindulási alapanyagok és a folyamat kritikus paramétereinek mérésével biztosítja a végső termékminőséget. Röviden összefoglalva a PAT egy folyamatot mérő, elemző és szabályozó rendszer. Ennek megfelelően, az FDA szerint, a PAT eszközei a modern folyamatmonitorozó mérőrendszerek és az összegyűjtött adatok elemzésére szolgáló sokváltozós adatelemző (*multivariate data analysis*, MVDA) eljárások.

A PAT folyamatkövető mérőrendszerei az emlőssejtes – így a CHO – fermentációknál a monitorozás mellett folyamatszabályozás alapjai lehetnek.<sup>2</sup> Kiemelném, hogy az élősejt-koncentráció (*viable cell density*, VCD) dielektromos spektroszkópia (*dielectric spectroscopy*, DS) alapú szabályozására már találunk példát, valamint a három speciálisan sejtszámmonitorozó eljárás – automatizált áramlási citometria (*automated flow cytometry*, AFC), fókuszált lézersugár reflexiós vizsgálat (*focused beam reflectance method*, FBRM) és a DS – közül is ez utóbbi az iparilag legelterjedtebb.

1. US Food and Drug Administration (2004). *U.S. Department of Health and Human Services*, 1–16.

2. Gilbert et al. (2014). *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(6), 519–534.

Fontos megemlíteni, hogy a glükózkoncentráció Raman-spektroszkópia alapú szabályozására már van megoldás CHO eljárásoknál,<sup>3</sup> viszont a közeli infravörös (NIR) spektroszkópia alapján még csak monitorozási megoldások léteznek a bioreaktorok esetében. A bioreaktort elhagyó gázok (*off-gas*) monitorozását már régóta használja a fermentációs ipar, viszont az ezen alapuló szabályozások még nem kiforrottak. Az adott időegység alatt bemenő és kilépő oxigén mennyisége alapján az oxigén felvételi sebesség (*oxygen uptake rate*, OUR) számolható, ahogy az adott időegység alatt bemenő és kilépő szén-dioxid mennyisége alapján szén-dioxid képződési sebesség (*carbon dioxide evolution rate*, CER) is kalkulálható. Az OUR alapú specifikus sejtszámnövekedés szabályozása megvalósult már,<sup>4</sup> de a specifikus termékképzés OUR alapú, valós idejű (*real-time*) monitorozására és szabályozására is találunk példát tirozin beadagolás változtatása esetén.<sup>5</sup>

Dielektromos spektroszkópiai alkalmazásoknál az egy frekvencián mért permittivitáson alapuló lineáris sejtszám becslések csak speciális esetekben működhetnek pontosan és megbízhatóan, ezzel szemben a többfrekvenciás spektrummérések részletesebb ujjlenyomatát adják a sejtszuszpenzió dielektromos viselkedésének.<sup>6</sup> Alapvetően két megközelítést használnak arra, hogy a releváns információkat kinyerjék a dielektromos spektrumokból. Az egyik lehetőség, hogy egy matematikai modellt illesztünk a mért kapacitancia görbékre az ún. Cole–Cole-egyenlet használatával.<sup>7</sup> A másik megközelítés, amit a dielektromos mérések interpretálásra használnak, olyan sokváltozós projekciós eszközöket használ, mint a főkomponens-elemzés (*principal component analysis*, PCA) és a részleges legkisebb négyzetek (*partial least squares*, PLS) regresszió. PLS regresszióval pontosabb VCD becsléseket értek el, mint egy frekvenciás lineáris regresszióval vagy Cole–Cole-modellezéssel,<sup>8</sup> viszont ennél a módszernél korábbi adatok szükségesek a modellépítéshez.

Az emlőssejtes (és ezen belül a CHO fermentációk) *in situ* közeli infravörös (NIR) monitorozásának alapjait Arnold és mtsai.<sup>9</sup> tették le 2003-ban *on-line*, diszperziós készülék transzflexiós mérési módú alkalmazásával. Kiértékeléseik során változószelekciót (hullámhossz-szelekciót), valamint standard normál változó (*standard normal variate*, SNV) és második deriválási előkezelési eljárásokat is alkalmaztak. A tápoldat glükóz, laktát, glutamin és ammónia koncentrációjára végeztek kalibrációkat a referencia adatok felhasználásával. Az elért eredményeik biztatóak voltak, habár azok kevés fermentációból származtak, és valószínűleg túlillesztettek voltak. Mindazonáltal az általuk elért sikerek komoly lendületet adtak a további kutatásoknak. Henriques és mtsai.<sup>10</sup> már Fourier-transzformációs (FT) NIR készüléket alkalmazva szintén képesek voltak az Arnold és mtsai. által vizsgált négy metabolit (glükóz, laktát, glutamin és ammónia) koncentrációjára pontos kalibrációkat előállítani CHO bioreaktoros tenyészetekből. Az ő tanulmányuk már öt, nem teljesen egyforma tenyésztést vizsgált, és náluk jelent meg először ez egyes komponensek kvantitatív monitorozása mellett alternatívaként a bioreaktoros tenyésztés általános, ujjlenyomatszerű, kvalitatív monitorozása NIR spektroszkópiával.

3. Berry et al. (2016). *Biotechnology Progress*, 32(1), 224–234.
4. Aehle et. al. (2011). *Cytotechnology*, 63(1), 41–47.
5. Zalai et al. (2016). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7011–7024.
6. Davey et al. (1993). *Analytica Chimica Acta*, 279(1), 155–161.
7. Dabros et al. (2009). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(2), 161–173.
8. Opel et al. (2010). *Biotechnology Progress*, 26(4), 1187–1199.
9. Arnold et al. (2003). *Biotechnology and Bioengineering*, 84(1), 13–19.
10. Henriques et al. (2009). *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 116(June), 73–97.

Clavaud és mtsai.<sup>11</sup> megtartották és továbbfejlesztették a kvalitatív fermentációs ujjlenyomat elemzésének módszerét, a 10 fermentációból származó, matematikailag előkezelt FT-NIR spektrumok PCA főkomponens (*score*) ábráján különböző tenyésztési fázisokat elválasztó eseményeket tudtak azonosítani. Emellett a sejtek által termelt fehérje titer, az élősejt-koncentráció (VCD), valamint a glükózkoncentrációra állítottak elő kalibrációkat. Sandor és mtsai.<sup>12</sup> diódasoros (DA) készülékkel értek el hasonló eredményeket 8 CHO tenyésztés vizsgálata során a klasszikus négy metabolit mellett összes sejt-koncentrációra (*total cell count*, TCC) is. Milligan és mtsai.<sup>13</sup> diszperziós NIR készüléket alkalmazva vizsgáltak olyan CHO fermentációkat, amelyekben glükóz és laktát adagolással szüntették meg ennek a két komponensnek a korrelációját a tenyésztés előrehaladása során, annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjanak a glükóz NIR eszközzel való mérhetőségéről.

Napjainkban a CHO sejtvonalak tápoldat-porainak minősítését egyszerű mérési eredmények (például oldhatóság), költség- és időigényes sejtenyésztési vizsgálatok, valamint néhány kritikus komponens folyadékkromatográfiás mennyiségi meghatározása alapján végzik el.<sup>2</sup> Mindemellett a PAT megközelítés terjedésével ezen a területen is elkezdődött a korszerű, spektroszkópiai mérőrendszerek (és a támogató sokváltozós adatelemzési eljárások) alkalmazása<sup>14,15</sup>. A NIR<sup>16,17</sup> mellett a fluoreszcens<sup>18,19</sup> és a Raman<sup>20</sup> spektroszkópia alkalmazhatóságát is megvizsgálták emlőssejtes tápoldat-formulációk minőségi vizsgálatára. Ráadásul több kutatócsoport az előbbi alkalmazások mérési eredményeinek kombinálásával<sup>21-23</sup> ért el biztató eredményeket. Ennek alapvető oka az, hogy a különböző spektroszkópiai technikák más anyagtulajdonsági változókra érzékenyek. Mindazonáltal jelenleg a mindennapi ipari gyakorlatban a technika előnyei, a berendezések robusztussága és viszonylagosan alacsony beruházási költsége, valamint az általános gyógyszeripari ismertség és elismertség miatt a NIR alapú módszerek vannak elterjedőben a tápoldatporok gyártóinak, valamint különböző gyártói tételeinek összehasonlításánál, minősítésénél.<sup>17,22,23</sup>

### 3. Kísérleti módszerek

#### 3.1. A PAT mérőeszközökkel vizsgált CHO tenyészetek

A doktori munkám során használt rekombináns CHO-S sejtvonalak minden esetben monoklonális antitestet (mAb) termeltek extracellulárisan, a sejtampullák tartalmát rázatott lombikos tenyésztéssel szaporítottam fel a kísérletekhez. A rázatott lombikokat minden esetben 37 °C hőmérsékleten, 110 rpm rázatás mellett, 5% CO<sub>2</sub> légtérben inkubáltam.

11. Clavaud et al. (2013). *Talanta*, 111, 28–38.
12. Sandor et al. (2013). *Journal of Biotechnology*, 168(4), 636–645.
13. Milligan et al. (2014). *Biotechnology and Bioengineering*, 111(5), 896–903.
14. Read et al. (2010). *Biotechnology and Bioengineering*, 105(2), 276–284.
15. Read et al. (2010). *Biotechnology and Bioengineering*, 105(2), 285–295.
16. Kirdar et al. (2009). *Biotechnology Progress*, 26(2), 527.
17. Lee et al. (2012). *Biotechnology Progress*, 28(3), 824–832.
18. Li et al. (2011). *Applied Spectroscopy*, 65(11), 1240–1249.
19. Ryan et al. (2010). *Analytical Chemistry*, 82(4), 1311–1317.
20. Li et al. (2010). *Biotechnology and Bioengineering*, 107(2), 290–301.
21. Hakemeyer et al. (2013). *Biotechnology Journal*, 8(7), 835–846.
22. Lee et al. (2012). *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2819–2828.
23. Jose et al. (2011). *Biotechnology Progress*, 27(5), 1339–1346.

A dielektromos spektroszkópiai méréseket hat ún. koncentrált rátáplálásos (*concentrated fed-batch*, CFB) tenyésztést (Run1-6) hajtottam végre laboratóriumi, 1 literes maximális munkatérfogattal rendelkező, emlőssejtes tenyésztésre alkalmas Biostat B plus (Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen, Németország) típusú bioreaktorban. A fermentációkat (rátáplálás nélküli) ún. *batch* módban indítottam, majd a beoltás utáni második napon indítottam el a folyamatos tápoldat-rátáplálást és elvételt.

A NIR spektroszkópiát alkalmazó monitorozási kísérleteknél nem bioreaktoros futásokat vizsgáltam az alkalmazott PAT eszközzel, hanem rázatott lombikos tenyészetekeket. Nyolc olyan rázatott lombikos tenyészést (SF1-8) indítottam, amely a bioreaktoros tenyésztesek viszonylagosan magas sejtkoncentrációját, valamint a sejteket a bioreaktorban körülvevő mátrix anyagi összetételét modellezte. A nyolc monitorozott kísérleti futás kezdőtérfogata 430 ml volt, kezdeti sejtkoncentrációjukat  $0,3 \times 10^6$  sejt/ml-re állítottam.

A tápoldatpor-vizsgálatnál a gyártói ajánlás szerinti tápoldatpor mennyiség került (tisztított) vizes feloldásra, majd a sejtenyésztési tesztet 125 ml-es rázatott lombikban végeztem 30 ml tenyésztési térfogatban,  $0,3 \times 10^6$  sejt/ml kezdeti sejtkoncentrációval. 116 órás inkubációt követően határoztam meg az aktuális sejtkoncentrációt.

### 3.2. A dielektromos spektroszkópiai (DS) mérőrendszer és adatfeldolgozás

A dielektromos mérésekhez Biomass Monitor 220 (Aber Instruments, Aberystwyth, UK) készüléket használtam 12 mm átmérőjű, 4 gyűrűs mérési elrendezéssel rendelkező szondával. A Biomass Monitor 220 berendezéssel a permittivitás spektrumok 25 frekvencián (100, 120, 160, 190, 240, 300, 370, 470, 580, 720, 900, 1120, 1400, 1740, 2170, 2700, 3360, 4190, 5220, 6500, 8100, 10090, 12560, 15650 és 19490 kHz) 8 percenként kerültek automatikus rögzítésre.

A mért adatokat számítógépre gyűjtöttem, ahol azokat AberScan Beta 4.2 szoftver (Aber Instruments, Aberystwyth, UK) segítségével dolgoztam fel (Cole–Cole-modellezés). A spektrumok adatai „txt” formátumban voltak hozzáférhetőek a szoftveren kívüli, további adatelemzéshez: PCA-hoz, PLS regresszióhoz, valamint egyfrekvenciás lineáris regresszióhoz.

### 3.3. Közeleli infravörös (NIR) spektrumok felvétele kínai hörcsög petefészek (CHO) tenyészeteiből és az adatok feldolgozása

Minden mintából három NIR spektrumfelvétel készült Bruker Matrix-F (Bruker Optics, Ettlingen, Németország) FT-NIR berendezéssel. A készülék InGaAs detektorral rendelkezett, méréstartományja 834,2–2327,3 nm ( $11988$ – $4297$   $\text{cm}^{-1}$ ) volt, a mérések INGOLD IN271P típusú transzflexiós szondával, 2 mm optikai úthosszal, OPUS 6.5 (Bruker Optics, Ettlingen, Németország) szoftverrel történtek. A szondát 10 méteres optikai kábelköteg kötötte össze a készülékkel. Mindhárom spektrum 256 felvétel átlagaként állt elő,  $16$   $\text{cm}^{-1}$ -es felbontással. Azért választottam a leírt, *on-line*, *in situ* mérések elvégzésére is alkalmas mérési összeállítást és berendezést, hogy ezzel is közelebb kerüljek a bioreaktoros rendszer monitorozásának modellezéséhez.

A kapott adatok összerendezése Microsoft Office Excel 2010 alkalmazással (Microsoft, Redmond, WA, USA), miközben az adatok elemzése, előkezelése, valamint a kalibrációs és predikciós regresszió Unscrambler X 10.3 szoftverrel (CAMO Software, Oslo, Norvégia) történt.

### 3.4. Közeli infravörös (NIR) spektrumok felvétele kínai hörcsög petefészek (CHO) tenyésztéshez használt tápoldatporból és az adatok feldolgozása

A NIR spektrumok mérése PbS detektorral rendelkező Foss NIRSystems 6500 típusú spektrométeren (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA) történt. Egy spektrum mérésénél a készülék 32 felvételt készített 2 nm-es felbontással az 1100-2498 nm-es tartományban. A NIR spektrumok adatait Vision 3.20 szoftver (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA) gyűjtötte.

Az FT-NIR spektrumok felvétele InGaAs detektorral rendelkező PerkinElmer Spectrum 400 típusú spektrométeren (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) történt. Egy spektrum mérésénél a készülék 32 felvételt készített 2  $\text{cm}^{-1}$ -es felbontással a 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$ -es tartományban. Az FT-NIR spektrumok adatait Spectrum 6.3.2 szoftver (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) gyűjtötte.

A korábbi NIR spektroszkópiai monitorozási kísérletek adatelemzéséhez hasonlóan a kapott adatok összerendezése ezeknél a közeli infravörös (NIR) spektroszkópiai vizsgálatoknál is Microsoft Office Excel 2010 alkalmazással (Microsoft, Redmond, WA, USA), az adatok elemzése, előkezelése pedig Unscrambler X 10.3 szoftverrel (CAMO Software, Oslo, Norvégia) történt. Az összetett, egyenes szakaszon központosított (*central composite face-centered*, CCF) hőkezelési kísérlettervet, valamint annak statisztikai kiértékelését élősejt-koncentrációra (azaz VCD-re, mint válaszváltozó) MODDE 11 szoftver (Umetrics, Umeå, Svédország) segítségével hajtottam végre.

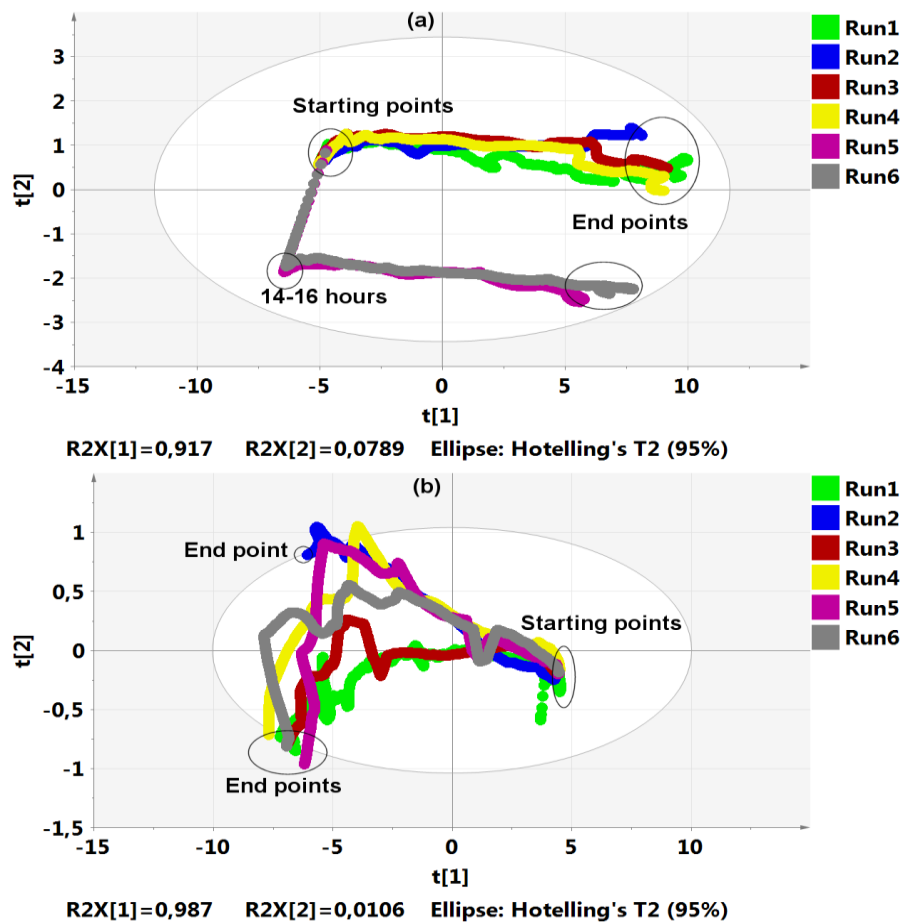
## 4. Eredmények

### 4.1. Kínai hörcsög petefészek (CHO) tenyészetek élősejt-koncentrációjának (VCD) dielektromos spektroszkópiai (DS) monitorozása

A vizsgált hat ATF alapú CHO tenyésztéssel (Run1-6) – az eredeti célkitűzésemnek megfelelően – sikerült olyan magas élősejt-koncentráció (VCD) szintet elérni, amit korábban dielektromos spektroszkópiával (DS) még nem vizsgáltak ( $\geq 40\text{-}50 \times 10^6$  sejt/ml).

Megállapítottam, hogy a kísérletek különböző rátáplálási stratégiái, valamint a folyamatparaméterek kismértékű eltérései nem befolyásolták a tenyészetek dielektromos tulajdonságait, a mérőrendszer ebből a szempontból robusztusnak bizonyult.

Másrészt viszont technikai okokra visszavezethető mérési bizonytalanságokat tartam fel a kísérletek kiértékelése során. A főkomponens-elemzéssel (PCA) és a spektrumok alapos vizsgálatával alapvonal-eltolódást detektáltam a Run5-6 kísérlet esetében a 2,7-20 MHz-es, magas frekvenciájú tartományban, amit standard normál változó (SNV) matematikai előkezeléssel nem tudtam kompenzálni, viszont Savitzky–Golay- (SG) simítással kombinált első deriválással el tudtam távolítani a spektrumokból (2. ábra).



2. ábra – A kísérleti futások dielektromos spektrumainak főkomponens-elemzésével (PCA) kapott *score* ábrái: a Run1-6 futások nyers (kezeletlen) spektrumainak *score* ábrája (a), a Run 1-6 futások Savitzky–Golay- (SG) simítással kombinált első deriválással előkezelt spektrumainak *score* ábrája (b). (A szürke ellipszis a 95%-os konfidencia intervallumot mutatja Hotelling T<sup>2</sup> statisztika alapján.)

Az alkalmazott SG-simítással kombinált első deriválás a részleges legkisebb négyzetek (PLS) regressziós VCD becslés pontosságát jelentősen megnövelte, amikor a kalibrációs adatok nem tartalmaztak alapvonal-eltolódást, de a becsült futás spektrumai mérési hibával terhelték voltak. Emellett főkomponens-elemzéssel (PCA) a Run2 esetben elektród polarizáció okozta mérési hibát tártam fel a 0-300 kHz-es, alacsonyfrekvenciás tartományban, amit az alkalmazott előkezelés szintén kompenzált. Az alkalmazott előkezelés utáni PLS alapú VCD becslési hiba (*RMSEP*)  $6,1-10,6 \times 10^6$  sejt/ml volt.

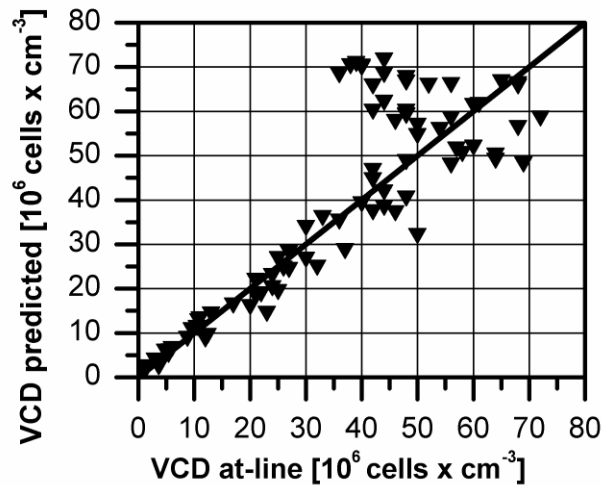
A PLS regresszióhoz hasonlóan a Cole–Cole-modellezés alapú VCD becslés is érzékenynek bizonyult a feltárt mérési zavarásokra (alapvonal-eltolódás, elektródpolarizáció). A Cole–Cole-modellezés esetében az alacsony frekvenciás zajt az *LFC* érték változtatásával, a magas frekvenciás zavarást a *C<sub>m</sub>* beállítások változtatásával tudtam kompenzálni, így  $3,9-7,4 \times 10^6$  sejt/ml *RMSEP* értéket értem el.

A PLS regressziós és a Cole–Cole-modell alapú VCD becslések eredményeinek összevetése alapján az utóbbi bizonyult pontosabbnak. Mindazonáltal az SG-simítással kombinált deriválás és a PLS módszer *on-line*, valós idejű PAT rendszerbe illesztését egyszerűbb kivitelezni, mint a Cole–Cole-modell adaptív *LFC* és *C<sub>m</sub>* változtatását a fermentáció során.

Egy frekvenciás lineáris regresszióval csak a fermentáció első fázisában, a növekedési szakaszban ( $50 \times 10^6$  sejt/ml sejt koncentráció alatt) értem el pontos VCD becslést,



az  $RMSEP$   $2,9-3,7 \times 10^6$  sejt/ml volt ekkor. A későbbi platófázisban viszont – amikor a sejtnövekedés lelassult, vagy megállt – a lineáris modell már pontatlan becslést eredményezett  $17,2 \times 10^6$  sejt/ml  $RMSEP$  értékkel (3. ábra). A PLS és Cole–Cole-módszerrel ellentétben a lineáris modellt a feltárt mérési zavarások nem befolyásolták.



3. ábra – Élősejt-koncentráció (VCD) becslés lineáris modell alapján Run1-6 adatokból. Az *at-line*, referencia mérések függvényében ábrázoltam a lineáris regressziós modell alapján becsült VCD értékeket.

A becslést a  $VCD = 414,492 \times C_{580} + 1,187 \times 10^6$  egyenlet alapján végeztem, ahol a  $C_{580}$  az 580 kHz-en mért permittivitás volt.

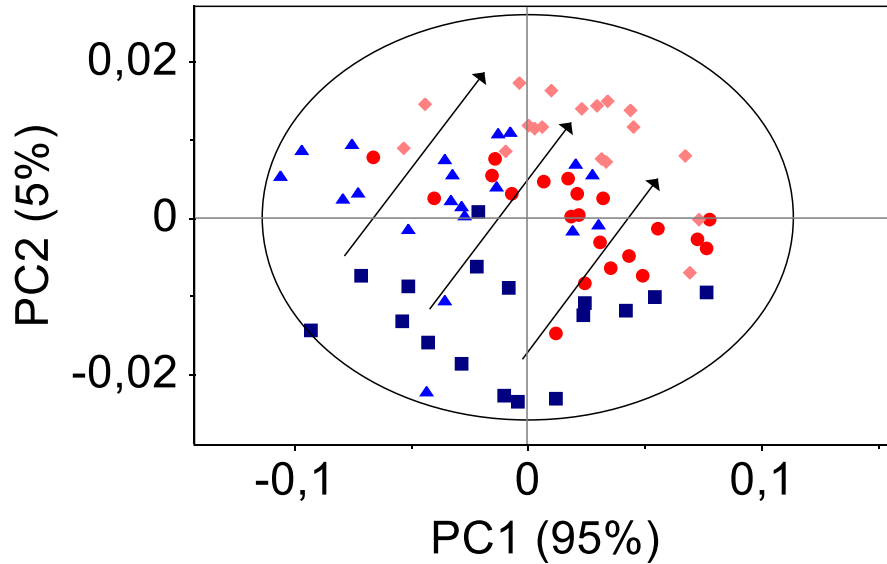
A 45°-os egyenes azt az elméleti esetet mutatja, amikor a mért és becsült értékek megegyeznek.

A PLS és a Cole–Cole-megközelítés úgy tudott az egész tenyésztés alatt viszonylag pontos VCD becslést produkálni, hogy érzékennyé vált a spektrum szélső régióiban a mérési zavarásokra, amelyek viszont kompenzálhatóak voltak különböző módszerekkel.

A fentiek alapján a dielektromos spektroszkópia (DS) megbízhatóan és robusztus módon alkalmas VCD becslésre az általánosan alkalmazott élő CHO sejt koncentráció tartományok mellett a viszonylagosan magas VCD tartományokban ( $\geq 40-50 \times 10^6$  sejt/ml) is bioreaktoros rendszerben. A legrobusztusabb (bár nem a legpontosabb) mérőrendszert a matematikai előkezeléssel kombinált PLS regresszióval lehetett elérni.

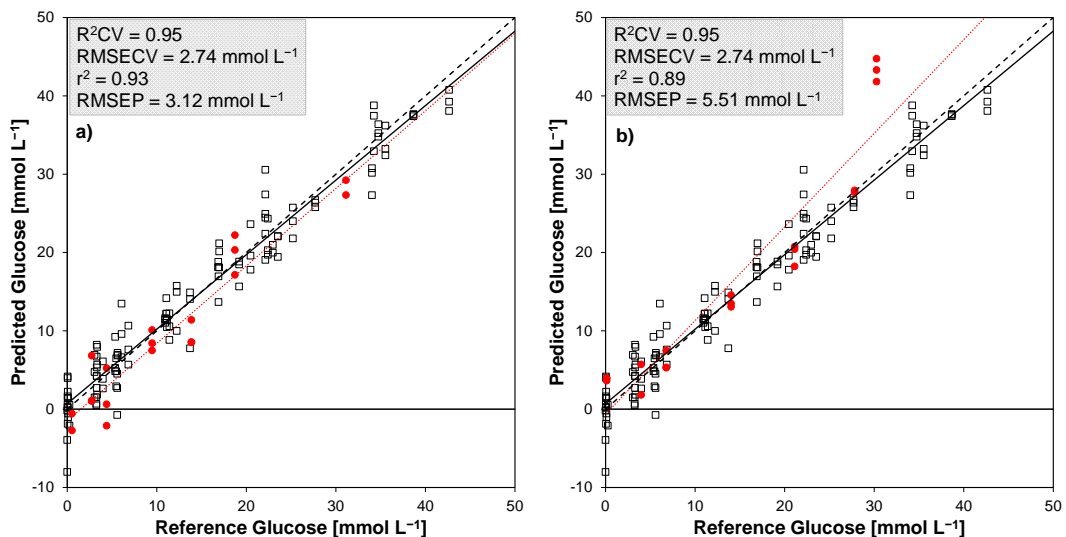
#### 4.2. Kínai hörcsög petefészek (CHO) tenyészetek közeli infravörös (NIR) spektroszkópai monitorozása

A vizsgált rázatott lombikos CHO rendszerben (a különböző rátáplálási stratégiák következtében előállt) irányított biokémiai változások mellett irányított fizikai változásokat (vortex kezelés hatására, 4. ábra) sikeresen lehetett detektálni a felvett NIR spektrumok főkomponens-elemzése (PCA) alapján. Ebből kifolyólag a NIR spektroszkópia alapú CHO fermentáció monitorozás érzékenyen képes releváns változásokat kimutatni, mint például a megváltozott sejtmetabolizmus (biokémiai változás), vagy a sejtdegradáció (fizikai változás). Ebből kifolyólag a NIR alapú monitorozásnak helye van egy CHO fermentációs folyamatot követő PAT rendszerben, az érzékenysége adott, hogy valós biokémiai és fizikai eltéréseket mutasson ki.



4. ábra – Az SF2 é SF5 lombikok mintáiból felvett NIR spektrumok PCA *score* értékei vortexes kezelés nélkül és vortexes kezelés után. Az SF2 nem vortexelt (sötétkék négyzet), az SF2 vortexelt (piros kör), SF5 nem vortexelt (világoskék háromszög), SF5 vortexelt (rózsaszín rombusz) minták spektrumait mutatják a jelölők. A PCA a korábban kiválasztott 6534-5678  $\text{cm}^{-1}$  tartományra történt. A folytonos nyilak az eltolódást mutatják a vortexes kezelés hatására. Az jelölők körüli ellipszis a 95%-os konfidencia intervallumot jelöli.

A NIR alapú rendszer képes volt a glükózkoncentrációt is becsülni a rázatott lombikos CHO tenyészetekből 3,1-5,5 mM pontossággal (5. ábra), ami a folyamat szempontjából az elvárt pontosság határán van.



5. ábra – Az SF1, SF4, SF5, SF6, SF7 és SF8 lombikok NIR spektrumaiból ( $n = 126$ ) végzett kalibrációk glükózkoncentrációra. A kalibráció előtt *deresolve* függvénnyel kombinált alapvonal korrekció (*baseline offset*) került alkalmazásra előkezelésként. Az ábrán a modell által becsült értékek kerültek ábrázolásra a referencia értékekkel szemben (üres négyzetek). A kalibrációs egyenest a fekete folytonos vonal szemlélteti, a szaggatott fekete vonal az elméleti célt mutatja. Az SF2 független minták becslései (piros kör, piros szaggatott vonal) (a). Az SF3 független minták becslései (piros kör, piros szaggatott vonal) (b).  $R^2CV$  – a kalibráció keresztvalidálásának Pearson-féle korrelációs koefficiensének négyzete;  $RMSECV$  – a keresztvalidálás hibája;  $r^2$  – a becslés Pearson-féle korrelációs koefficiensének négyzete;  $RMSEP$  – a becslés hibája.

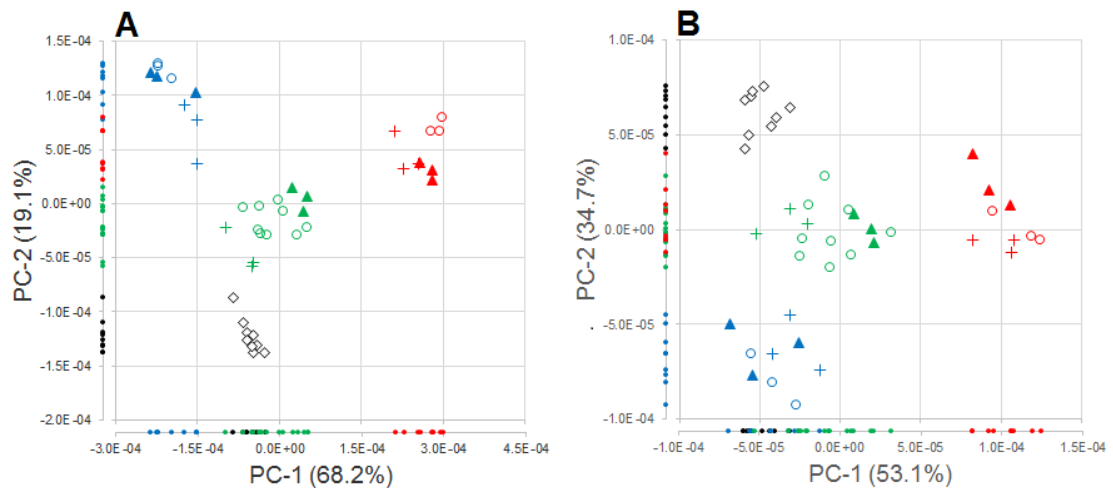
#### 4.3. Kínai hörcsög petefészek (CHO) tápoldatpor közeli infravörös (NIR) spektroszkópai monitorozása

A hőkezelt és a kontroll tápoldatporoknál diszperziós és Fourier-transzformációs (FT) spektrométerekkel rögzített nyers (kezeletlen) NIR spektrumok esetében az alapvonal-eltolódásokat második derivált matematikai előkezeléssel hatékonyan lehetett korrigálni.

A vizsgált CHO tápoldatpornál a 30-50-70 °C-os hőkezelések hatására tömegváltozás volt megfigyelhető, ami a nedvességtartalom változásának tulajdonítható. A 30 °C-os beállítások nedvességtartalma nőtt, a 70 °C-os beállítások nedvességtartalma csökkent, miközben az 50 °C-os beállításoké nem változott a kontrollhoz képest.

A nedvességtartalom változásának közvetlen hatását a NIR spektrumokra változó szelekcióval, vagyis a 2000-2500 nm tartomány figyelembevételével lehetett eliminálni.

A matematikailag előkezelte (2000-2500 nm, második deriválás) diszperziós és az FT-NIR spektrométerekkel rögzített spektrumok főkomponens-elemzésénél (PCA) határozott csoportosulás (klasztereződés) volt megfigyelhető a hőkezelések hőmérséklet szintjeinek (kontroll, 30 °C, 50 °C és 70 °C) megfelelően (6. ábra). A diszperziós NIR készülék spektrumainál valamivel élesebb elválás volt megfigyelhető. A PCA során a hőkezelés időtartama (1, 7, 13 óra) alapján nem volt megfigyelhető határozott szeparálódás.



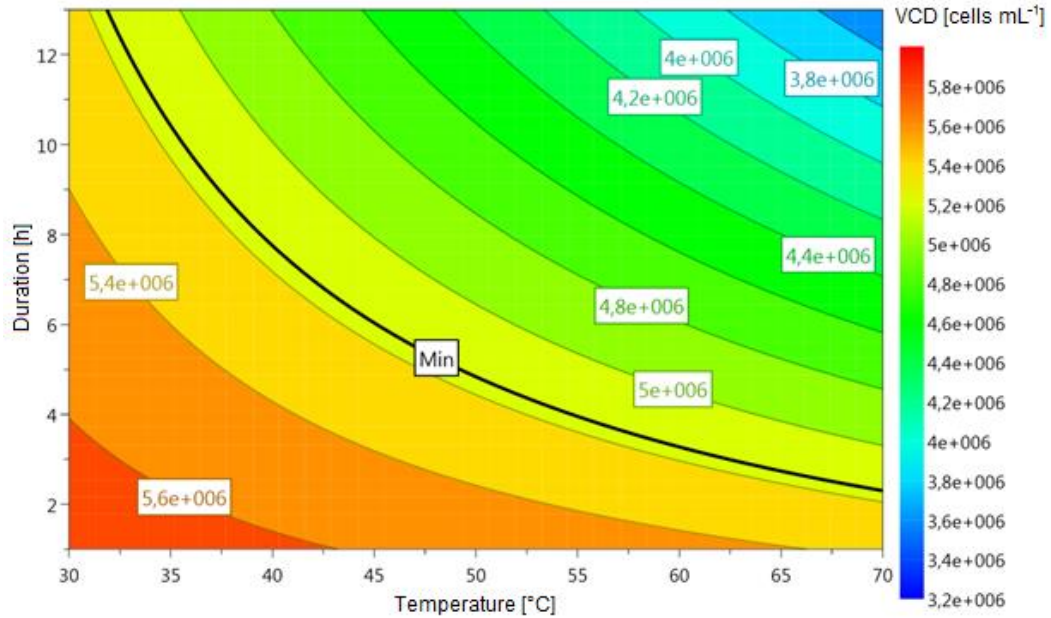
6. ábra – A második derivált NIR (a) és FT-NIR (b) spektrumok 2000-2500 nm (5000-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) tartományának PCA score ábrái.

A mintákat a különböző hőkezeléseknek megfelelően jelöltem (fekete üres négyzet – kontroll minták; kék kereszt – 30 °C, 1 óra; kék üres kör – 30 °C, 7 óra; kék teli háromszög – 30 °C, 13 óra; zöld kereszt – 50 °C, 1 óra; zöld üres kör – 50 °C, 7 óra; zöld teli háromszög – 50 °C, 13 óra; piros kereszt – 70 °C, 1 óra; piros üres kör – 70 °C, 7 óra; piros teli háromszög – 70 °C, 13 óra).

A tengelyeken a pontok PC-1 és PC-2 vetületei is láthatóak.

Ugyanazon minták diszperziós és FT-NIR spektrométerekkel rögzített spektrumainak osztályanalógiák közvetett modellezés (SIMCA) vizsgálata a nem hőkezelt kontroll mintákat mindkét mérőmódszer esetében elkülönítette a hőkezelt mintáktól. A diszperziós mérések esetében enyhén magasabb fokú érzékenység volt megfigyelhető.

A tradicionális, sejtenyésztési tápoldatpor minősítésnél a hőkezelés hőmérséklete mellett a hőkezelés időtartama is szignifikáns faktornak bizonyult, viszont ez a teszt a kontrolltól csak az [50 °C, 7 óra], [50 °C, 13 óra], [70 °C, 7 óra] és [70 °C, 13 óra] mintákat tudta szignifikánsan megkülönböztetni (7. ábra).



7. ábra – A tápoldatpor hőkezelési hőmérsékletének és időtartamának hatása a lombikban tenyésztett CHO sejtek 116 órás élősejt-koncentrációjára (VCD). A fekete vonal (Min) mutatja 95%-os konfidencia szint mellett a kontroll tápoldaton kapott VCD alsó határát ( $5,16 \times 10^6$  sejt/ml).

Következtetésként levonható, hogy a vizsgált hatások szempontjából a NIR spektroszkópia alapú tápoldatpor vizsgálat érzékenyebb volt, mint a sejtenyésztéses eljárás, viszont annak érdekében, hogy ne legyen indokolatlanul elutasított alapanyag (másodfajú hiba), összevont, hibrid döntési stratégia alkalmazása javasolt.

## 5. Tézisek

- 1) Kimutattam, hogy az ipari gyakorlatban egyszerűen kivitelezhető, egy frekvenciás (580 kHz) mérések adataira alkalmazott **lineáris regresszióval** csak a fermentáció első fázisában, a növekedési fázisban ( $50 \times 10^6$  sejt/ml sejtkoncentráció alatt) kapható pontos VCD becslés. Igazoltam, hogy a későbbi **platófázisban** viszont – amikor a sejtnövekedés lelassult, vagy megállt – a **lineáris modell már pontatlan becslést eredményezett**. [3]
- 2) A **Cole–Cole-modellezés** esetében az alacsony frekvenciás zajt az alacsony frekvenciás vágási érték (*LFC*) változtatásával, a magas frekvenciás zavarást a  $C_m$  (membrán kapacitása) beállítás változtatásával tudtam kompenzálni, így **kiváló VCD becslési pontosságot** értem el a növekedési- és platófázisra egyaránt. [3]
- 3) Igazoltam, hogy a **legrobustusabb dielektromos spektroszkópián alapuló VCD becslést Savitzky–Golay-simítással kombinált első deriválás** matematikai előkezelés utáni **részleges legkisebb négyzetek (PLS)** regresszióval lehetett elérni. Az alkalmazott előkezelés úgy kompenzálta a PCA során feltárt mérési zavarásokat, hogy értékes információkat nem távolított el a spektrumokból. [3]
- 4) **Közeli infravörös (NIR) spektroszkópiával** vizsgált rázatott lombikos CHO rendszerben (a különböző rátáplálási stratégiák következtében előállt) irányított **biokémiai változások** mellett irányított **fizikai változásokat** (vortex kezelés hatására) sikeresen tudtam detektálni a felvett **FT-NIR spektrumok főkomponens-elemzése (PCA) alapján**. Kimutattam, hogy a NIR spektroszkópia alapú CHO tenyésztési folyamat-monitorozás érzékenyen **képes releváns változásokat kimutatni**, mint például a megváltozott sejt metabolizmus (biokémiai változás), vagy a sejt degradáció (fizikai változás). [2]
- 5) Igazoltam, hogy amennyiben a CHO tenyésztés során a **fizikai és a biokémiai változékonyság viszonylag magas**, akkor az FT-NIR spektrum alapú glükózkoncentráció becsléshez a standard normál változó (SNV) és a többszörös szóródás korrekció (MSC) matematikai előkezeléseken kívül az újonnan alkalmazott **„baseline-offset – deresolve” előkezelési kombináció is hatékonyan alkalmazható** a PLS regresszió előtt a pontosság növelése érdekében. Eredményeim alapján az elérhető **glükózkoncentráció-mérési pontosság a fermentációs folyamat on-line szabályozhatósága szempontjából az elvárt szint határára van**. [2] [5]

- 6) **Igazoltam, hogy a CHO tápoldatpor** – a tárolás és szállítás esetén potenciálisan előforduló – releváns **hőhatásokra végbemenő változásai** diszperziós és Fourier-transzformációs (FT) spektrométerekkel rögzített **NIR spektrumok főkomponens-elemzésével (PCA) és osztályanalógiák közvetett modellezése (SIMCA) vizsgálatával** kimutathatók. A hőkezelt minták NIR spektrumai az alkalmazott **kezelési hőmérséklet alapján mutattak elválást** a kontroll mintáktól és egymástól is. [1]
- 7) A **CHO tápoldatpor hagyományos, sejttenyésztéses minősítésénél** a hőkezelés hőmérséklete mellett a kezelés időtartama is szignifikáns faktornak bizonyult, viszont ez a teszt csak a legalább 50 °C hőmérsékleten, valamint legalább 7 óráig kezelt mintákat különböztette meg a kontroll mintáktól. Bizonyítottam, hogy az indokolatlan alapanyag-elutasítás (másodfajú hiba) elkerülése érdekében **összevont, hibrid döntési stratégia alkalmazása javasolt**: csak akkor kell a sejttenyésztési tesztet elvégezni, ha a minta a NIR spektroszkópia alapú minősítésen megbukott. [1]

## 6. Alkalmazási lehetőségek

A CHO alapú hatóanyag-gyártási folyamatot monitorozó eredményeim a Richter Gedeon Nyrt. biotechnológiai fejlesztési és gyártási folyamataiban kerültek alkalmazásra: a dielektromos és közeli infravörös (NIR) spektrumok is bemenő adataivá váltak a jelenlegi folyamatkövető rendszernek. A tápoldatpor minősítéseknél is elkezdődött már a NIR spektrumok felvétele a tenyésztési kísérletekkel párhuzamosan, remélhetőleg eredményeim alapjául szolgálhatnak a minősítési stratégia további fejlesztéséhez.

## 7. Közlemények

### 7.1. Tudományos folyóiratokban megjelent közlemények az értekezés témájában

- [1] Szabó, É., Párta, L., Zalai, D., Gergely, S., & Salgó, A. (2016). Investigation of heat-treated cultivation medium for mammalian cells with near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 24(4), 373–385. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1222> (IF: 1,48)
- [2] Kozma, B., Párta, L., Zalai, D., Gergely, S., & Salgó, A. (2014). A model system and chemometrics to develop near infrared spectroscopic monitoring for Chinese hamster ovary cell cultivations. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 22(6), 401–410. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1133> (IF: 1,57)
- [3] Párta, L., Zalai, D., Borbély, S., & Putics, Á. (2013). Application of dielectric spectroscopy for monitoring high cell density in monoclonal antibody producing CHO cell cultivations. *Bio-process and Biosystems Engineering*, 37(2), 311–323. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0998-z> (IF: 1,95, I: 4)
- [4] Gergely, S., Párta, L., & Salgó A. (2013). Közeli infravörös spektroszkópia/mikroszkópia: roncsolásmentes kutakodás. *Magyar Kémiai Folyóirat – Kémiai Közlemények*, 119(1), 40–45. [http://www.mkf.mke.org.hu/images/stories/docs/2013\\_1/MKF\\_2013\\_40.pdf](http://www.mkf.mke.org.hu/images/stories/docs/2013_1/MKF_2013_40.pdf)

## 7.2. Nemzetközi konferencia kiadványokban megjelent közlemények (proceedings) az értekezés témájában

- [5] Kozma, B., Párta, L., Gergely, S., & Salgó, A. (2013). Developing FT-NIR calibrations to measure glucose level of mammalian cell cultivation broths. In *Bellon-Maurel, V., Williams, P., & Downey, G. (editors) Proceedings of the 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, NIR 2013*. 02-07. 06. 2013, La Grande-Motte, France (pp. 343–348). IRSTEA – France Institut National de recherche en sciences et technologies pour l’environnement et l’agriculture, 2013, 757 p.
- [6] Párta, L., Gergely, S., & Salgó, A. (2012). Pioneer experiences on PAT implementation of pharmaceutical biotech process development. In *Manley, M., McGoverin, C.M., Thomas, D.B., & Downey, G. (editors) Proceedings of the 15th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, NIR 2011*. 13-20. 05. 2011, Cape Town, South African Republic (pp. 145–149). 2012, 493 p.
- [7] Gergely, S., Párta, L., Salgó, A. (2009). Monitoring of fermentation broths operated with E. coli cells – what is measured by NIR spectroscopy? In *Saranwong, S., Kasemsumran, S., Thanapase, W., & Williams P. (editors) Proceedings of the 14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, NIR 2009*. 07-16. 11. 2009, Bangkok, Thailand (pp. 735–739). Chichester: IM Publications LLP, 2010., 1209 p. (ISBN:978-1-906715-03-8)

## 7.3. Egyéb közlemények

- [8] Hirsch, E., Pataki, H., Farkas, A., Bata, H., Vass, P., Fehér, C., Barta, Z., Párta, L., ... & Marosi, G. J. (2016). Raman-Based Feedback Control of the Enzymatic Hydrolysis of Lactose. *Organic Process Research and Development*, 20(10), 1721–1727. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00212> (IF: 2,54, I: 1)
- [9] Zalai, D., Hevér, H., Lovász, K., Molnár, D., Wechselberger, P., Hofer, A., Párta, L.,... & Herwig, C. (2016). A control strategy to investigate the relationship between specific productivity and high-mannose glycoforms in CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7011–7024. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7380-4> (IF: 3,43, I: 1)
- [10] Zalai, D., Koczka, K., Párta, L., Wechselberger, P., Klein, T., & Herwig, C. (2015). Combining mechanistic and data-driven approaches to gain process knowledge on the control of the metabolic shift to lactate uptake in a fed-batch CHO process. *Biotechnology Progress*, 31(6), 1657–1668. <https://doi.org/10.1002/btpr.2179> (IF: 2,07, I: 2)