



Application Note AN-PAN-1065

Monitoraggio in linea delle colture cellulari con la spettroscopia Raman

La coltura cellulare è un aspetto fondamentale dell'industria biofarmaceutica per monitorare la salute delle cellule. Un controllo rigoroso di questo processo è necessario per evitare reazioni collaterali indesiderate o rese insufficienti.

Il glucosio è essenziale per l'energia cellulare, ma la sua conversione in energia attraverso la glicolisi produce lattato. L'accumulo di lattato induce acidità, causando stress cellulare e riducendo i tassi di crescita cellulare.

I metodi di laboratorio manuali possono essere piuttosto macchinosi e possono introdurre distorsioni a seconda dell'analista, con conseguenti risultati

imprecisi e contaminazione del campione. Per risolvere questi problemi, la spettroscopia Raman in linea è una tecnica di analisi molto adatta a questo settore, poiché non richiede reagenti e il campione rimane inalterato.

Questa Application Note di processo presenta un metodo per monitorare accuratamente la crescita cellulare all'interno di un bioreattore in "tempo reale" con 2060 Raman Analyzer di Metrohm Process Analytics. In questo caso, un analizzatore di processo in linea è la soluzione preferita per garantire un'elevata qualità del prodotto ed evitare contaminazioni durante la misurazione.

INTRODUZIONE

La coltura cellulare è un passaggio essenziale nella produzione di un'ampia gamma di prodotti biofarmaceutici, tra cui proteine terapeutiche complesse, anticorpi monoclonali e vaccini [1]. Questo processo prevede la coltivazione di cellule in un ambiente controllato, in genere in un bioreattore, per produrre il prodotto desiderato.

Il glucosio è un componente importante della coltura cellulare, poiché fornisce alle cellule l'energia di cui hanno bisogno per crescere, dividersi e formare il prodotto finale [2]. La **Figura 1** illustra il processo fondamentale di conversione del glucosio in energia all'interno di una cellula.

La conversione del glucosio in energia (glicolisi) determina la produzione di lattato, la forma ionizzata dell'acido lattico. L'accumulo di lattato nei terreni di coltura può influire negativamente sulla crescita e sulla produttività cellulare. Poiché il lattato funziona come un acido, il suo accumulo nel terreno di coltura può abbassare il pH, inducendo stress cellulare e riducendo i tassi di crescita. [4].

Per prevenire l'accumulo di lattato, i produttori devono monitorare e regolare le condizioni di coltura cellulare per mantenere i livelli di lattato entro un intervallo accettabile. Ciò può comportare la misurazione continua della concentrazione di glucosio nel terreno di coltura, garantendo regolazioni precise per prevenire sovradosaggi o sottodosaggi.

In genere, gli analisti eseguono tali misurazioni manualmente (offline). Tuttavia, la contaminazione è comune in questa configurazione e i dati non riflettono il reale stato del processo di coltura cellulare.

Un modo più sicuro, efficiente e rapido per monitorare più parametri simultaneamente nei bioreattori è l'analisi in linea con spettroscopia Raman

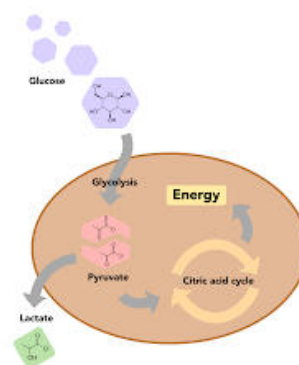


Figure 1. Panoramica del meccanismo del glucosio nelle cellule umane. Estratto da [3].

senza reagenti (**Figura 2**). Si tratta di una tecnica non distruttiva e senza contatto, ideale per l'analisi in linea direttamente nel bioreattore (**Figura 2**, lato sinistro).

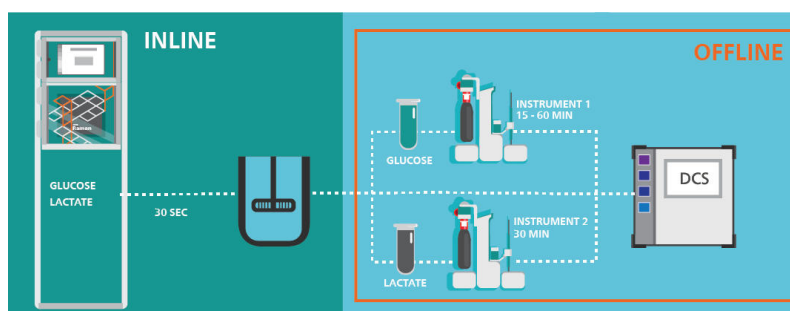


Figure 2. Fasi per misurare il glucosio e il lattato in un bioreattore implementando l'analisi in linea (a sinistra) o offline (a destra).

2060 Raman Analyzer di Metrohm Process Analytics enables the comparison of «real-time» spectral data from the process to a reference method (e.g., titration, ion chromatography, HPLC) consente il confronto dei dati spettrali «in tempo reale» del processo con un metodo di riferimento (ad esempio, titolazione, cromatografia ionica, HPLC) per creare un modello di calibrazione semplice ma indispensabile per il

monitoraggio del glucosio e del lattato nel bioreattore per colture cellulari.

L'analisi in tempo reale dello stato della coltura mantiene la reazione di glicolisi sotto controllo. Inoltre, l'analisi in linea può fornire informazioni sullo stato attuale di diversi processi (ad esempio, consumo di substrato e cinetica).

APPLICAZIONE

Laser utilizzato: 785 nm. L'analisi in linea è possibile utilizzando una sonda a immersione autoclavabile progettata da Metrohm Process Analytics.

I dati spettrali sono stati raccolti con 2060 Raman

Analyzer (**Figura 3**) utilizzando sia il software IMPACT che Vision di Metrohm. Le misurazioni sono state effettuate ogni minuto.

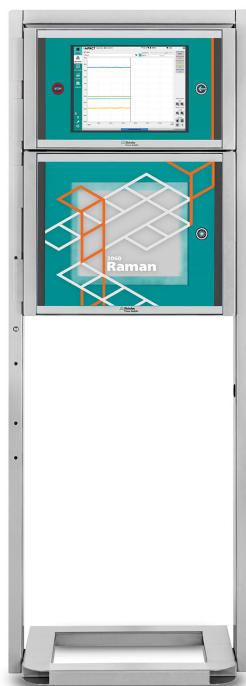


Figure 3. 2060 Raman Analyzer per l'analisi quantitativa di lattato e glucosio in un bioreattore per colture cellulari.

Tabella 1. Precisione di previsione dei due parametri misurati in un bioreattore per colture cellulari analizzato da 2060 Raman Analyzer (Figura 3).

	Glucosio	Lattato
Concentrazione minima	0.1 g/L	0.0 g/L
Concentrazione massima	40 g/L	5.0 g/L
Bias	-0.1349	-0.0849
SEP	0.2009	0.1166

CONCLUSIONE

La spettroscopia Raman viene utilizzata in numerose applicazioni e settori in cui la qualità dei dati è essenziale. 2060 Raman Analyzer è un sistema Raman ad alte prestazioni progettato per operazioni come il monitoraggio delle colture cellulari, che richiedono

analisi senza contatto. Insieme ai software Vision e IMPACT di Metrohm, 2060 Raman Analyzer può essere utilizzato per acquisire risultati quasi in tempo reale, supportando processi critici come lo sviluppo farmaceutico.

BENEFICI DI RAMAN IN PROCESSO

- Rilevamento precoce di errori di lotto durante la coltura cellulare.
- Parametri multipli da una singola misurazione.
- Ridurre al minimo i rischi di contaminazione del campione grazie a una **tecnica senza contatto**.
- Spettri Raman unici che fungono da impronte digitali specifiche per l'**identificazione dei materiali**.
- Segnali bassi provenienti da acqua o umidità che completano altre tecniche di spettroscopia.
- Tecnica **non distruttiva**, ideale quindi per l'analisi in linea.



RIFERIMENTI

1. *Cell Culture for Manufacturing*.
https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-for-manufacturing?gclid=Cj0KCQiA35urBhDCARIsAOU7QwnVfIHJBACARsDiW_HbgHGxW3Fs-69CzCg6ottMMj-nmakHFZ5QTrUaAt10EALw_wcB (accessed 2023-11-29).
2. *Glucose in Cell Culture*.
<https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/glucose> (accessed 2023-11-29).
3. admin. The Circle of Lactate: How Cancer Cells Can Reuse Their Own Waste. *Science in the News*, 2018.
4. Li, Z.-M.; Fan, Z.-L.; Wang, X.-Y.; et al. Factors Affecting the Expression of Recombinant Protein and Improvement Strategies in Chinese Hamster Ovary Cells. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 880155.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.880155>.

CONTACT

Metrohm Italiana Srl
Via G. Di Vittorio, 5
21040 Origgio (VA)

info@metrohm.it

CONFIGURAZIONE



2060 Raman Analyzer

2060 Raman Analyzer è uno strumento di analisi di processo inline non distruttivo che utilizza la spettroscopia Raman per garantire il monitoraggio del processo preciso e in tempo reale. Grazie alle sue capacità di automonitoraggio, allo spettrometro ad alto rendimento e alla stabilità del laser di lunga durata, fornisce informazioni immediate sulla composizione chimica e consente regolazioni tempestive per un controllo ottimale del processo, garantendo una qualità costante del prodotto e migliorando l'efficienza operativa nel complesso.

Possono essere collegate allo strumento di analisi fino a 5 sonde e/o celle a flusso. Tutti i 5 canali possono essere configurati in modo indipendente l'uno dall'altro nel software proprietario integrato.