



PREGLEDNI RAD / REVIEW

Bioreaktori za uzgoj kultura životinjskih stanica

Bioreactors for animal cell cultivation

Višnja Gaurina Srček¹, Kristina Radošević¹, Suzana Jukić², Igor Slivac^{1*}¹Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska²Agrokor, d.d., Trg D. Petrovića 3, 10000 Zagreb, Hrvatska**Sažetak**

U ovom radu opisani su osnovni tipovi kultivacijskih sustava za uzgoj životinjskih stanica tj. bioreaktori. Iznese su njihove ključne karakteristike oblikovanja i načina rada te potencijalne prednosti i nedostaci. U završnom dijelu rada razmatraju se čimbenici koji utječu na odabir odgovarajućeg kultivacijskog sustava za izvedbu proizvodnog postupka kao i neke smjernice budućeg razvoja bioreaktora.

Ključne riječi: bioproces, bioreaktor, kultura životinjskih stanica, kultivacijski sustav

Summary

In this paper an overview of bioreactors for animal cell cultivation is presented. Their major characteristics and mode of action are described together with potential (dis)advantages considering biotech production. In the final part of the paper we discuss strategies of bioreactor selection regarding various issues and requirements for setting up a bioprocess. Certain trends and prospects of bioreactor development are also pointed out.

Key words: animal cell culture, cultivation system, bioprocess, bioreactor

***Corresponding author**

(Tel. +385-1-46 05 278; Fax. +385-1-46 05 065; E-mail: islivac@pbf.hr)

Uvod

Oko 50% svih komercijalnih biotehnoloških proizvoda koji se danas koriste u dijagnostičke i terapijske svrhe dobiva se pomoću kultura životinjskih stanica. Jedan od ciljeva svakog proizvodnog procesa, pa tako i onog sa životinjskim stanicama, je njegova isplativost. Načelno, isplativost procesa je rezultat omjera vrijednosti proizvoda na tržištu prema troškovima proizvodnje, a ključni dio tog računa je racionalizacija između prinosa proizvoda i izdataka utrošenih za vođenje procesa. Prinos proizvoda ovisi poglavito o fiziološkim kvalitetama proizvodnog staničnog soja, ali također i o uvjetima u kojima se stanice uzgajaju tijekom proizvodnog postupka. Najvažnija uloga sustava za uzgoj stanica je osigurati svojstva staničnog mikro-okoliša koja jamče stanicama uspješni rast i produktivnost. Vođeni ranijim iskustvom s uzgojem mikroba te specifičnim zahtjevima kulture životinjskih stanica (Tablica 1.), stručnjaci su do danas razvili više vrsta kultivacijskih sustava koji se međusobno razlikuju karakteristikama i primjenom, a radni volumeni dosežu raspon od 0,025 do 25.000 litara (Warnock i Al-Rubeai, 2006). Sustavi radnog volumena većeg od jedne litre, konstruirani tako da omogućuju upravljanje proizvodnim postupkom bez kontinuirane primjene tzv. dodatnih jedinica za osiguravanje nekog od uzgojnih parametara (npr. CO₂ inkubatori, čiste komore, magnetska miješala)

zovu se bioreaktori. Dugi niz godina uzgoj stanica u kulturi bio je ograničen na male i jednostavne sustave za uzgoj od plastike ili stakla poput roler-boca ili spinner-boca. Istovremeno, bioreaktori velikih kapaciteta bili su u uporabi za komercijalnu proizvodnju različitih sekundarnih metabolita u procesima mikrobnog fermentacije (antibiotici). Razvoj industrijskih bioreaktora za uzgoj životinjskih stanica započinje krajem 50-ih godina prošlog stoljeća za potrebe proizvodnje cjepiva kao dijela velikog programa masovnog cijepljenja stanovništva. Prije toga, najkorišteniji sustav uzgoja bile su roler-boce, relativno ograničenog kapaciteta, a namijenjene isključivo rastu adherentnih stanica. Prvi komercijalno zanimljivi proizvodi stanica u suspenzijskoj kulturi (cjepivo za slinavku i šap, interferon) potaknuli su prilagodbu homogenih bioreaktorskih sustava, dotad korištenih samo za procese s mikrobima, zahtjevima životinjskih stanica koje su osjetljivije na hidrodinamičke promjene unutar bioreaktora. Razvoj proizvodnje monoklonskih protutijela 1970-ih dao je zamah i razvoju različitih sustava pogodnih za uzgoj suspenzijskih kultura s ciljem da se ostvari što veći prinos staničnog proizvoda putem opskrbe stanica hranjivim tvarima i uklanjanjem metaboličkih nusproizvoda. Tehnologija rekombinantne DNA koja je od 1980-tih temelj suvremene biotehnologije, omogućila je proizvodnju niza terapijskih rekombinantnih proteina i virusnih cjepiva pomoću kulture stanica sisavaca.

Ovakav razvoj tehnologije dao je i poticaj oblikovanju i optimiranju novih bioprocasa industrijskih mjerila za uzgoj svih tipova stanica i proizvodnju do nekoliko kilograma proteina godišnje. To je također potaknulo i razvoj medija bez dodatka seruma te određivanje optimalnih fizikalno-kemijskih karakteristika (pH, temperatura, otopljeni kisik itd.) za uzgoj stanica u velikom mjerilu. Od sredine 1990-ih razvijeni su sustavi za proizvodnju tkiva i matičnih stanica pa čak i umjetnih organa.

Osnovna uloga bioreaktora je osigurati uvjete za rast stanica i biosintezu odgovarajućeg staničnog proizvoda. To se najbolje postiže osiguravanjem uvjeta za staničnu homeostazu što uključuje održavanje temperature, pH i osmotskih svojstava medija za uzgoj, kontroliranu dobavu hranjivih tvari i kisika te uklanjanje proizvoda metabolizma. Nadalje, potrebno je održavati i monoseptične uvjete uzgoja, kako bi se izbjegle kontaminacije mikroorganizmima, virusima ili drugim stanicama. Životinjske stanice u kulturi mogu biti suspenzijske i adherentne. Rad sa suspenzijskim stanicama zbog svoje praktičnosti znatno olakšava nadzor i vođenje uzgoja

te je većina komercijalno dostupnih terapijskih rekombinantnih proteina proizvedena upravo u suspenzijskoj kulturi. Kod adherentnih staničnih kultura broj stanica izravno ovisi o raspoloživosti površine na kojoj stanice mogu rasti, pri čemu treba voditi računa da se kultura održava do pojave konfluentnosti, tj. potpune prekrivenosti površine stanicama. Prosječna gustoća je oko 10^5 stanica/cm², no ona prije svega ovisi o vrsti stanica. Za rast adherentnih staničnih kultura u bioreaktorima preporučuje se imobilizacija stanica na mikronosačima kojima se postupak uzgoja prevodi u tzv. pseudosuspenzijski oblik i time tehnološki olakšava izvedba procesa. Vrlo poželjno svojstvo bioreaktora je kapacitet povećanja mjerila proizvodnje unutar jedne bioreaktorske jedinice (tzv. *scale-up*). To je prvenstveno bitno iz ekonomskih razloga radi zadržavanja uhodanih tehnoloških postupaka te ujednačenosti kvalitete proizvoda za koju je poželjno da se ne mijenja promjenom proizvodnih kapaciteta. U ovom radu opisane su osnovne vrste bioreaktora za uzgoj životinjskih stanica s naglaskom na njihove funkcionalne, tehničke, znanstvene i ekonomske prednosti kao i njihova moguća ograničenja.

Tablica 1. Usporedba izvedbenih i operacijskih parametara za uzgoj mikroba i životinjskih stanica u bioreaktoru s mehaničkim miješalom (prema Eisenkraetzer, 2014.)

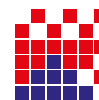
Table 1. Comparison of stirred tank bioreactor design and operational parameters for microbial and animal cell cultivation (from Eisenkraetzer, 2014).

Parametar	Mikrobni proces (<i>E.coli</i>)	Kultura životinjskih stanica (CHO)
Geometrija bioreaktora	<u>Visok</u> visina : promjer > 3 Učinkovit prijenos topline Zadržavanje plinske faze, povećanje $k_L a$	Nizak visina : promjer < 2 Zadržavanje hidrodinamičkog stresa pri dnu bioreaktora Poboljšanje aksijalnog miješanja zbog prihranjivanja odozgo
Aeracija (brzina protoka plinske faze)	<u>Jaka</u> 20-300 m/h	<u>Slaba</u> 4 - 9 m/h
Snaga miješanja (mehaničko miješalo)	<u>Velika</u> < 10.000 W/m ³	<u>Mala</u> 5 - 80 W/m ³

Bioreaktori s mehaničkim miješalom (*Stirred tank bioreactors*)

Bioreaktori s mehaničkim miješalom su najviše korišten tip bioreaktora za uzgoj životinjskih stanica. Njihova glavna prednost je tehnička jednostavnost kao i količina dostupnih podataka o načinu rada zbog tradicionalne zastupljenosti u biotehnološkim procesima s mikrobima. Radi se o cilindričnim posudama zaobljenog dna čijim središtem po visini prolazi mehaničko miješalo. Između dvostrukog plašta cilindra temperiranom vodom održava se toplina potrebna za rast stanica. Moguće je voditi uzgoj sa stanicama u suspenziji, u obliku agregata ili prihvaćenim na mikronosače. Mnogi proizvođači u farmaceutskoj i srodnim industrijama ističu prednost ove vrste bioreaktora zbog fleksibilnosti u postavi radnog volumena kao i prateće opreme (senzori, miješala). Postupci čišćenja i sterilizacije također se izvode na način koji smanjuje manipulaciju i zahtjeve za dodatnim prostorom (*cleaning in place*, (CIP) i *sterilization in place*, (SIP)). Raspon kapaciteta bioreaktora u procesima sa stanicama je od 1 do 25.000 litara (Warnock i Al-Rubeai, 2006). Manji tipovi bioreaktora, do 5 litara, izrađeni su

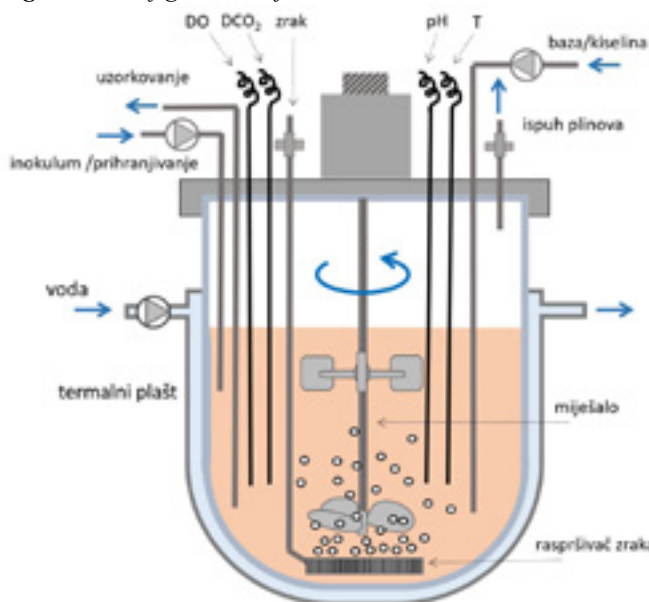
od stakla i uobičajeno se koriste u istraživačke svrhe ili kao dio pilot sustava. Na slici 1 prikazana je shema jednog takvog bioreaktora s potrebnom instrumentacijom za praćenja parametara rasta stanica te održavanja željenih uvjeta uzgoja. Standardno, sustavi veći od od 5 litara izrađuju se od nehrđajućeg čelika. Osnovni kriteriji za oblikovanje bioreaktora s mehaničkim miješalom potječu od bioreaktora za mikrobne procese, no pritom su redovito nužne dodatne prilagodbe za specifične zahtjeve uzgoja životinjskih stanica. Zbog osjetljivosti tih stanica na hidrodinamički stres, osobita se pozornost posvećuje izvedbama miješanja i aeracije tijekom bioprocasa (Henzler, 1982.). Svrha miješanja u bioreaktorima je sprječavanje nastajanja kemijskih (hranjive tvari, metaboliti), fizikalnih (pH, kisik) i temperaturnih gradijenata. Uobičajeno, velika miješala (promjer miješala $\geq 0,5$ x promjer posude bioreaktora) tipa brodski propeler i slonovsko uho koriste se za postizanje neturbulentnog strujanja tekućine uz minimalni hidrodinamički stres za stanice (Fenge i sur., 1993.). Povećanjem dimenzija bioreaktora, osobito u visinu, postoji potreba za postavljenjem višestrukih miješala radi sprječavanja pojave heterogenosti u sastavu kulture. Postoje različite preporuke za odabir i postav-



ljanje miješala, no unatoč tome, brodski propeleri koji stvaraju uspravno strujanje tekućine s relativno slabom radijalnom disperzijom, najzastupljeniji su u izvedbama industrijskih bioreaktora jer izazivaju najmanje fizičkog oštećenja na stanicama.

Slika 1. Shematski prikaz klasičnog bioreaktora s miješanjem.

Figure 1. Configuration of a stirred tank bioreactor.



Standardni omjer visina : promjer u bioreaktorima s miješalom varira od 1:1 do 3:1. Kod nižih omjera, prijelaz plinovite faze u tekućinu, uspostavlja se tako da se osigura relativno velika dodirna površina dviju faza u odnosu na ukupni radni volumen bioreaktora. Ovakav se sustav postavlja redovito u procesima sa stanicama na mikronosačima. Veliki omjeri, međutim, imaju znatnu prednost za izvedbu kulture stanica kad se uvede izravno raspršivanje zraka kao način obogaćivanja hranjivog medija kisikom. Bolja usitnjenost raspršenih mjehurića zraka (pospješana miješalom) i njihovo dulje zadržavanje u kulturi povećavaju prijenos kisika. Najčešće se koriste prstenasti ili sitasti raspršivači zraka. U malim bioreaktorima ponekad dolazi do pretjeranog odumiranja stanica zbog oštećenja uzrokovanih pucanjem mjehurića zraka. U velikim bioreaktorima to se izbjegava postavljanjem mikroraspršivača koji propuštaju čisti kisik relativno malom brzinom. Oštećivanje stanica uslijed pucanja mjehurića još je intenzivnije u medijima bez seruma i proteina jer u njima nema albumina, proteinske komponente koja je zaštita stanicama od hidrodinamičkog stresa. Iz tog razloga ponekad se u medij za uzgoj dodaju površinski aktivne tvari poput *Pluronic F68* i sličnih polimera (Chisti, 2000.). Osim toga, stanice mogu ostati zarobljene u pjenu nastaloj zbog prejakog raspršivanja zraka. Pjenjenje se može ublažiti dodatkom sredstava protiv pjenjenja koji opet mogu imati negativne posljedice na stabilnost proizvoda. Alternativno, mogu se primijeniti hidrofobne mreže koje se postavljaju na površinu tekućeg medija u bioreaktoru (Ishida i sur., 1990.). Unatoč hidrodinamičkom stresu i pjenjenju, izravno raspršivanje zraka u kulturi najčešći je način osiguravanja kisika stanicama tijekom bioprocesa u bioreaktorima s miješalom kapaciteta većih od 10 L. Aeracija stanične kulture postupcima koji ne izazivaju pjenjenje uključuje uporabu

silikonskih cijevi ili polipropilenskih membrana, no njihova primjena još je vrlo ograničena. U bioreaktorima s mehaničkim miješalom izvode se ove vrste uzgoja suspenzijskih stanica: šaržni, šaržni s prihranjivanjem i perfuzijski. Kontinuirani uzgoj kemostatskog tipa zbog sporog rasta stanica ima neznatnu primjenu. Najčešći su šaržni postupci koji traju do pada stanične vijabilnosti od 50%. Prihranjivanje kulture provodi se dodavanjem svježeg medija ili dodavanjem koncentriranih nutrijenata do doseganja punog volumnog kapaciteta bioreaktora. Perfuzijski postupci donose izuzetno visoke prinose željenog proizvoda, ali su tehnički složeniji i ovisno o načinu vraćanja stanica u kulturu donose rizik od kontaminacije. Što se tiče adherentnih stanica, njihov uzgoj redovito se odvija nakon prethodnog prihvaćanja stanica na mikronosače koja se može obaviti u samom bioreaktoru ili u nekom jednostavnijem sustavu. Ovisno o načinu vođenja procesa i vrsti mikronosača preporučuje se gustoća od 1 do 10 g mikronosača po litri medija. Posebnu pozornost u procesima s nosačima treba usmjeriti na miješanje i aeraciju kulture. Rast stanica može biti inhibiran ako je brzina miješanja prevelika, iz razloga što dolazi do oštećenja stanica zbog međusobnog sudaranja mikronosača u kulturi (Croughan i Wang, 1989.). Na stanice također štetno djeluje udaranje miješala kao i hidrodinamički stres uzrokovan virovima nastalim turbulentnim strujanjem medija, osobito ako stanice rastu na mikronosačima glatke površine. Što se tiče obogaćivanja medija kisikom, preporučuje se prozračivanje kulture bez propuhivanja mjehurića zraka jer često dolazi do nakupljanja mikronosača u nastaloj pjenu. Neka istraživanja ukazuju da kad se mjehurići vežu na prihvaćenu stanicu mogu je odvojiti od mikronosača tijekom svog uzdizanja na površinu medija (Bauer i sur., 2000.). Ako se izuzme primjena jednostavnih roler-boca, bioreaktori s mehaničkim miješalom su još uvijek prvi izbor prilikom proizvodnje u velikom mjerilu pomoću adherentnih stanica. Ovi bioreaktori se komercijalno primjenjuju u proizvodnji monoklonskih protutijela (Reuveny i sur., 1986.), rekombinantnih proteina poput faktora zgrušavanja krvi i eritropoetina (Griffiths, 2000.), virusnih cjepiva (Aunin, 2000.), peptidnih faktora rasta te interferona (Finter, 1991.).

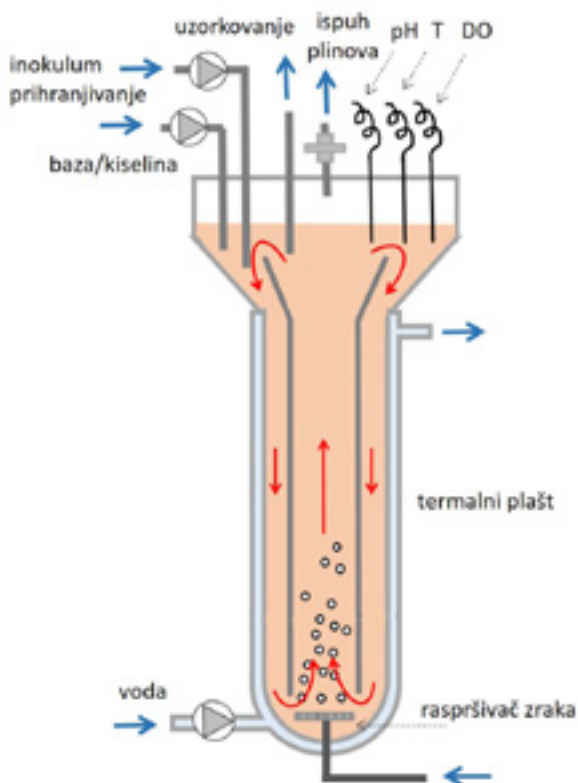
Bioreaktori s miješanjem pomoću zraka (*Airlift bioreactors*)

Ova vrsta bioreaktora druga je po zastupljenosti u procesima sa suspenzijskim staničnim kulturama nakon bioreaktora s mehaničkim miješalom. Vrlo se često i u velikim mjerilima (1500 m³) koristi za fermentacijske postupke s mikrobima. U tehnologiji životinjskih stanica trenutno najveći bioreaktor tog tipa volumena je 5 m³, a koristi se za proizvodnju monoklonskih protutijela (*Lonza Biologics*) (Birch i Racher, 2006.). Osim za suspenzijske stanice (Hilscher i sur., 1992.; Rhodes i Birch, 1988.) objavljeno je i nekoliko primjera korištenja ovog bioreaktora za uzgoj stanica na mikronosačima (Martens i sur., 1997.), iako se sam postupak smatra nepraktičnim zbog nakupljanja mikronosača na graničnim površinama zrak-medij (Grima i sur., 1997.). Postupak miješanja u ovim bioreaktorima obavljaju mjehurići zraka koji se dižu s dna cilindrične kolone (Slika 2). Kako bi miješanje bilo usmjereno, cirkulacija medija se mehanički postiže odvajanjem prolaza (kanala) za uzdizanje tekućine od prolaza za njeno spužtanje. Prolazi se spajaju na vrhu i dnu kolone osiguravajući kruženje sadržaja u bio-

reaktoru. Strujanje tekućine pokreće razlika u gustoći uzlazne tekućine prožete mjehurićima zraka i silazne tekućine bez mjehurića. Ovisno o izvedbi prolaza za cirkulaciju medija postoje dva osnovna tipa ove vrste bioreaktora: bioreaktori s vanjskim prolazom i bioreaktori s unutarnjim prolazom koji dodatno mogu biti u obliku koncentričnih cijevi ili razdvojene posude. U oba tipa bioreaktora miješanje i aeracija su združeni procesi, tj. protok zraka kroz kolonu regulirana je potrebom stanica za kisikom. Uobičajena brzina protoka zraka kroz bioreaktor je 0,001 – 0,01 m/s (Griffiths, 1988.) s rasponom $k_L a$ vrijednosti od 0,7 do 20 h⁻¹ (Varley i Birch, 1999.). Posebna važnost pri oblikovanju ovih bioreaktora daje se geometrijskom ustroju uzlaznog i silaznog kanala, postavljanju raspršivača te otvora za uzorkovanje i prihranjivanje. Najčešće izvedeni model je u obliku koncentričnih cijevi međusobnog omjera od 6:1 do 12:1 (Birch i Arathoon, 1990.; Griffiths, 1988.). Navedeni sustav najviše se koristi za šaržne procese ili šaržne s prihranjivanjem. Prednost bioreaktora s miješanjem pomoću zraka u usporedbi s bioreaktorima s mehaničkim miješalom je prvenstveno u boljoj aeraciji sustava i načinu homogeniziranja sastava kulture koji preferiraju neki tipova stanica.

Slika 2. Shematski prikaz bioreaktora s miješanjem pomoću zraka.

Figure 2. Configuration of an air-lift bioreactor:

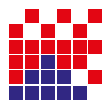


Bioreaktori s čvrstim i lebdećim slojem (Packed bed and fluidized bed bioreactors)

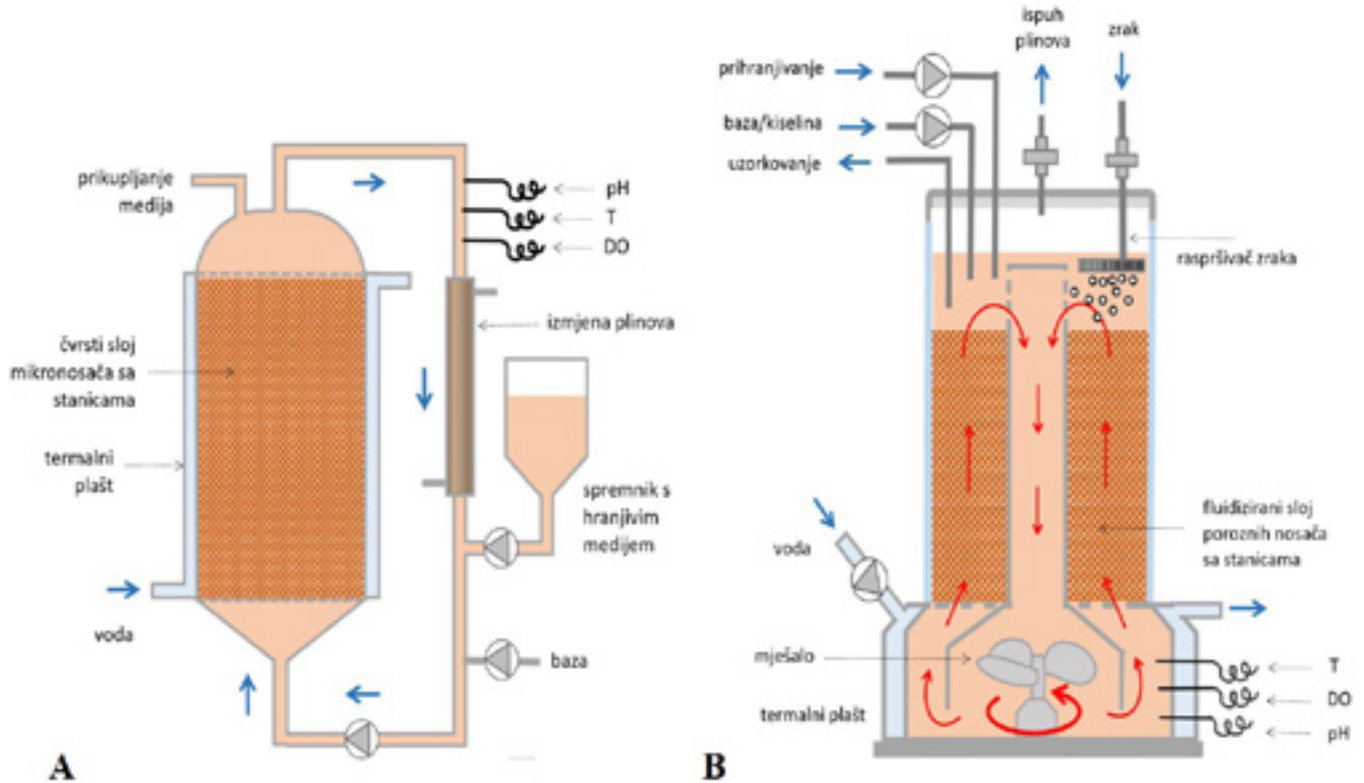
Ovo su dva vrlo slična bioreaktorska sustava u kojima se koriste isključivo imobilizirane stanice. Ako se radi o adherentnom tipu stanica, one moraju biti prihvaćene na porozne staklene ili polimerne mikronosače, a ako se radi o suspenzijskim stanicama, one se odgovarajućim postupkom

moraju „zarobiti“ u zrnca kalcijevog alginata ili agaroze. Veličina mikronosača varira od 0,5 do 5 mm u promjeru, što ujedno određuje stupanj poroznosti, tj. kapacitet prihvaćanja stanica. (Looby i sur., 1995.). Uređaj bioreaktora sastoji se od uspravne kolone kroz koju se odozdo vanjskom crpkom recirkulira hranjivi medij. Kod bioreaktora s čvrstim slojem medij prolazi kroz fiksiran sloj poroznih nosača sa stanicama dok je kod bioreaktora s lebdećim slojem strujanje medija takvo da održava stupac mikronosača u fluidiziranom stanju (Runstadler i Cernek, 1988.). U potonjem tom slučaju bitno je da čestice za imobilizaciju stanica imaju specifičnu težinu veću od 1,6 (npr. *Cytoline*, GE Life Sciences), kako bi bile homogeno raspršene u linearnom strujanju medija (~70 cm/min). Senzori za praćenje parametara uzgoja mogu se postavljati izravno u bioreaktor ili u cirkulacijsku cijev koja vodi od izlaska do ponovnog ulaska u bioreaktor. Rast stanica tijekom procesa uglavnom se ne provodi, osobito kod čvrstog sloja nosača. Načelno, radi se o perfuzijskom tipu uzgoja jer se odvajanje hranjivog medija iz sustava može provesti zadržavanjem imobilizirane stanične biomase u bioreaktoru. Glavne prednosti ovih bioreaktora su minimalni hidrodinamički stres i raspoloživost velike površine za rast adherentnih stanica. Ključni nedostatak je mala brzina prijenosa kisika, no taj se problem izbjegava ugradnjom membranskog modula za obogaćenje kisikom izravno u samu kolonu (Hambach i sur., 1992.; Born i sur., 1995.). Nepoželjna pojava dugotrajnih procesa je i postupno prekrivanje površine poroznih mikronosača stanicama što zbog smanjenog prijenosa tvari izaziva pojavu nekroze kod stanica unutar pora. Također, kod bioreaktora s čvrstim slojem, može doći i do kanaliziranja hranjivog medija kroz pukotine u stupcu nasutih nosača.

Zanimljivu izvedbu bioreaktora s lebdećim slojem (*CytopilotTM*) napravila je grupa austrijskih istraživača (Reiter i sur., 1991.; Reiter i sur., 1992.) koja je glavnu kolonu poroznom pregradom podijelila u donji i gornji cilindar te u središte smjestila protočnu cijev. U donjem cilindru nalazi se propelersko miješalo koje tjera medij kroz poroznu pregradu u gornji cilindar. Tu se nalaze nosači sa stanicama koje strujanje medija održava u suspenziji. Medij se dalje vraća u donji cilindar kroz porozni otvor na vrhu središnje cijevi. Time je kružni tok medija zatvoren. Stanice na mikronosačima cijelo su vrijeme zaštićene od udara miješala jer zbog poroznih pregrada ne prelaze u donji cilindar (Slika 3). Postoji još nekoliko izvedbi navedenih vrsta bioreaktora čiji volumen nije veći od 25 L. Brojna istraživanja trenutno su usmjerena na oblikovanje i primjenu mikronosača za ovaj tip bioreaktora. Osim za proizvodnju rekombinantnih proteina, ovi sustavi su korišteni i za uzgoj terapijskih stanica u svrhu regeneracije tkiva (Meisner i sur., 1998.).



Slika 3. Shematski prikaz bioreaktora s čvrstim slojem (A) i Cytopilot™ bioreaktora (B).
Figure 3. Configuration of fixed-bed bioreactor (A) and Cytopilot™ fluidized-bed bioreactor (B).



Bioreaktori sa polupropusnim vlaknima (*Hollow-fibre bioreactors*)

Ovaj tip bioreaktora osmišljen je 1970-ih (Knazek i sur., 1972.), a sastoji se od snopa kapilara zatvorenog u cilindrično kućište. Stjenke kapilara su polupropusne, tj. mikroporozne (0,1-0,2 μm) i kao takve propuštaju molekule veličine 10–100 kDa. Najčešći materijali za izradu su celuloza-acetat, polipropilen ili polisulfon (Dowd i sur. 1999.). Stanice rastu statično u prostoru između kapilara, dok kapilarama struji hranjivi medij peristaltički tjeran iz posuda gdje se zagrijava i obogaćuje kisikom. Zbog nametnutog hidrostatskog tlaka koji tjera medij uzduž kapilara, hranjive tvari i kisik iz medija prelaze kroz pore kapilarnih stjenki u vanjski prostor do stanica. Stanični proizvodi od interesa su uglavnom proteini velike molekulske mase, koji se nakupljaju u izvankapilarnom prostoru sa stanicama. Klasični bioreaktori postižu koncentraciju stanica najviše do 10^7 stanica/mL, međutim bioreaktori s polupropusnim vlaknima ostvaruju gustoću od 10^{10} stanica/mL koja je gotovo jednaka onoj u tkivima (Labecki i sur., 1996.). Tijekom dugotrajnih procesa uzgoja moguća je inhibicija rasta stanica proizvodom, ali i narušavanje stabilnosti samog proizvoda staničnim proteazama. Kako bi se to spriječilo u izvankapilarni prostor se malom brzinom propušta svježi medij kojim se razrijeđeni proizvod uklanja u posebne posude (Dowd i sur., 1999.). Za ovaj tip bioreaktora karakteristična je pojava gradijenta kisika i hranjivih tvari duž smjera strujanja medija što često rezultira neujednačenom gustoćom stanica u bioreaktoru. To se javlja zbog nejednakosti tlaka koji tjera medij kroz kapilare i glavni je nedostatak ovog sustava (Brotherton i Chau, 1996.). Predložena su međutim neka rješenja prema kojima se

kontinuirano nadzire i ispravlja razlika tlaka u i izvan kapilara detaljno opisana u Piret i Cooney (1990) i Taylor i sur., (1994.). Zbog same konstrukcije bioreaktora i fenomena gradijenta, povećanje mjerila proizvodnje tijekom trajanja bioprocesa moguće je jedino povećanjem broja bioreaktorskih jedinica. Proizvodni procesi u bioreaktoru s polupropusnim vlaknima zbog perfuzijskog načina uzgoja mogu trajati po nekoliko tjedana ili čak mjeseci. Velika koncentracija stanica jamči veliki prinos proizvoda. Tako se, prema jednom izvješću, u bioreaktorskom sustavu od 1 litre dnevno proizvede 10 g/L monoklonskog protutijela (Whitford i Cadwill, 2011.). Ovaj prinos je izuzetno visok ako se uspoređi s prosječnim prinosom dvotjednog procesa u bioreaktorima s miješalom od 1000 litara koji iznosi 1 g/L. Uz proizvodnju rekombinantnih proteina, rad s bioreaktorima s polupropusnim vlaknima usmjeren je i k razvoju tehnologije za obnovu organa poput bubrega (Moussy, 2000.) i jetre (Nyberg i sur., 1993.).

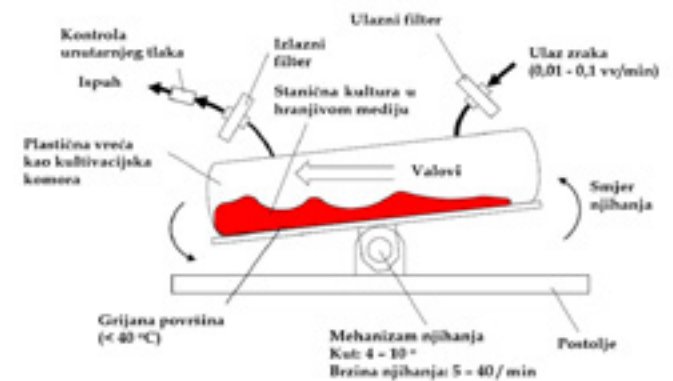
Bioreaktori za jednokratnu uporabu (*Single use bioreactors*)

Bioreaktori od stakla ili nehrđajućeg čelika koji se koriste višekratno, već su desetljećima pouzdani modeli za proizvodne postupke. Međutim u posljednjih nekoliko godina, primjena bioreaktora za jednokratnu uporabu sve je češća u izvedbi suvremenih biotehnoških procesa (Whitford, 2010). Usvajanje ove tehnologije izravno je povezano s potrebom da se poboljša fleksibilnost proizvodnje te umanje ulaganja i operativni troškovi: pranje, sterilizacija, održavanje, transport i skladištenje. Eliminacijom tih koraka ključnih za uspješnu

izvedbu proizvodnje, isplativost procesa može se povećati, a vrijeme potrebno za pojavljivanje proizvoda na tržištu skratiti. Njihova glavna karakteristika je da je posuda za kultivaciju zamjenjiva, pre-sterilizirana plastična vreća. Plastika za izradu vreća je sastavljena od više polimernih slojeva koji moraju osiguravati nepropusnost i mehaničku stabilnost, a sloj u kontaktu s kulturom stanica netoksičnost. Na vreći se nalazi niz cjevastih nastavaka sa septiranim otvorima koji osiguravaju aseptičnost manipulacije staničnom kulturom kao i unos senzora za praćenje tehnološkog postupka. Vreća se prije inokulacije puni hranjivim medijem te smjesom zraka i CO₂ koji pod kontroliranim pritiskom daju vreći konačni oblik. Nakon završetka proizvodnje, vreća se može odvojiti od bioreaktora i, ovisno o stabilnosti proizvoda, sa sadržajem pohraniti na za to odgovarajuće mjesto. Stanična kultura iz vreća najčešće se peristaltičkim pumpama prevodi u sustave za odvajanje stanične biomase, a supernatant se prosljeđuje na daljnju obradu. Ispražnjene vreće zbrinjavaju se kao otpad na propisan način. Postolje bioreaktora je spremno za postavu nove vreće i izvedbu novog proizvodnog procesa gotovo odmah nakon završetka prethodne proizvodnje i rekalkibracije senzora. Nedostaci ovog sustava su kritično održavanje tlaka i temperature u vreći, kao i zbrinjavanje iskorištenih vreća. Zbog troškova materijala i izrade dodatne opreme (senzori) trenutno su isplativi samo sustavi do 2000 litara, u usporedbi s istim volumenom kod klasičnih bioreaktora (Mardirosian, 2009). U industriji su najzastupljenije dvije vrste bioreaktora koji se razlikuju prema načinu kojim se izvodi miješanje medija u vreći za kultivaciju. Prvi su bioreaktori s mehaničkim miješalom. Oni po izvedbi i djelovanju sličje konvencionalnim bioreaktorima. Miješalo je ugrađeno u vreću s kojom je ujedno i sterilizirano te se s vanjske strane pričvršćuje na pogonsku jedinicu. Vreća se raširi u cilindričnom metalnom okviru, na postolju s upravljačkim jedinicama i zatim puni potrebnim sadržajem. Do danas su ovi bioreaktori uspješno korišteni za uzgoj staničnog inokuluma za veće sustave, proizvodnju monoklonskih protutijela i cjepiva (Ozturk, 2007; Tollnik, 2009). Pritom je postignuta zadovoljavajuća kvaliteta i prinos proizvoda, usporedivi s onima iz klasičnih bioreaktora s miješanjem. Drugu skupinu čine tzv. Wave bioreaktori. Njihova specifičnost je što se miješanje stanične kulture postiže mehanizmom koji njihanjem konstantno održava valovito kretanje medija kulture stanica (Singh, 1999.). Ovakav način miješanja ne zahtjeva uvođenje često invazivnih mehaničkih miješala ili sustava za raspršivanje mjehurića zraka. Njime se osigurava vrlo učinkovit prijenos kisika plinovite faze u tekući medij, a također se posve umanjuje učinak hidrodinamičkog stresa na stanice. Moguć je uzgoj suspenzijskih stanica te adherentnih stanica na mikronosačima (Hundt i sur., 2007.). Tipičan Wave bioreaktor sastoji se od uređaja za njihanje, komore za kultivaciju stanica (vreće) te regulatorne jedinice za podešavanje i praćenje parametara uzgoja (Slika 4).

Slika 4. Wave Bioreactor™ System 20/50, Wave Biotech, Švicarska (Slivac i sur., 2006.)

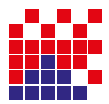
Figure 4. Wave Bioreactor™ System 20/5, Wave Biotech, Switzerland, (Slivac et al, 2006.)



Uređaj za njihanje izvodi kontrolirano njihanje metalne ploče na koju se postavlja vreća. Odabirom kuta nagiba i frekvencije njihanja podešava se intenzitet miješanja. Površina na koju se stavlja vreća istovremeno je grijana i služi za prijenos topline kulturi. Ovisno o veličini i potrebama procesa, mogu se nabaviti vreće od 1 do 1000 litara pri čemu je važno znati da se staničnom kulturom pune najviše do pola ukupnog volumena. Iznad tekućine hranjivog medija uvijek mora ostati praznog prostora tzv. *headspace* koji je bitan radi stvaranja valova i učinkovite aeracije kulture. Istraživanja su pokazala da se u vreći s 1 L kulture može ostvariti $K_L a$ vrijednosti do 3,5 h⁻¹ što je isto ili čak više nego u klasičnom bioreaktoru s miješalom jednakog radnog volumena (Fries i sur., 2005.). Na tržištu postoje i vreće s ugrađenim perfuzijskim filtrima što omogućuje izvedbu kontinuiranog uzgoja sa zadržavanjem stanica (Pierce i Shabram, 2004.). Wave bioreaktor ima sve širu primjenu za uzgoj različitih staničnih linija te za proizvodnju različitih komercijalno zanimljivih proizvoda: virusnih čestica (Weber i sur., 2002.; Slivac i sur. 2006.), monoklonskih protutijela (Jain i Kumar, 2008.) te ostalih rekombinantnih proteina i vektora (Negrete i Kotin, 2007.).

Izbor bioreaktora za proizvodne procese sa životinjskim stanicama

Ne postoji bioreaktor koji bi bio primjenjiv za sve procese kojima danas dobivamo visokovrijedne proizvode pomoću životinjskih stanica. Svaki bioreaktor kao kompleksni kultivacijski sustav ima svoje prednosti i nedostatke koji ograničavaju njegovu univerzalnu primjenu. Zbog toga je važno pri odabiru bioreaktora voditi računa o njegovim karakteristikama te načinu izvedbe proizvodnog procesa u kojem se taj bioreaktor

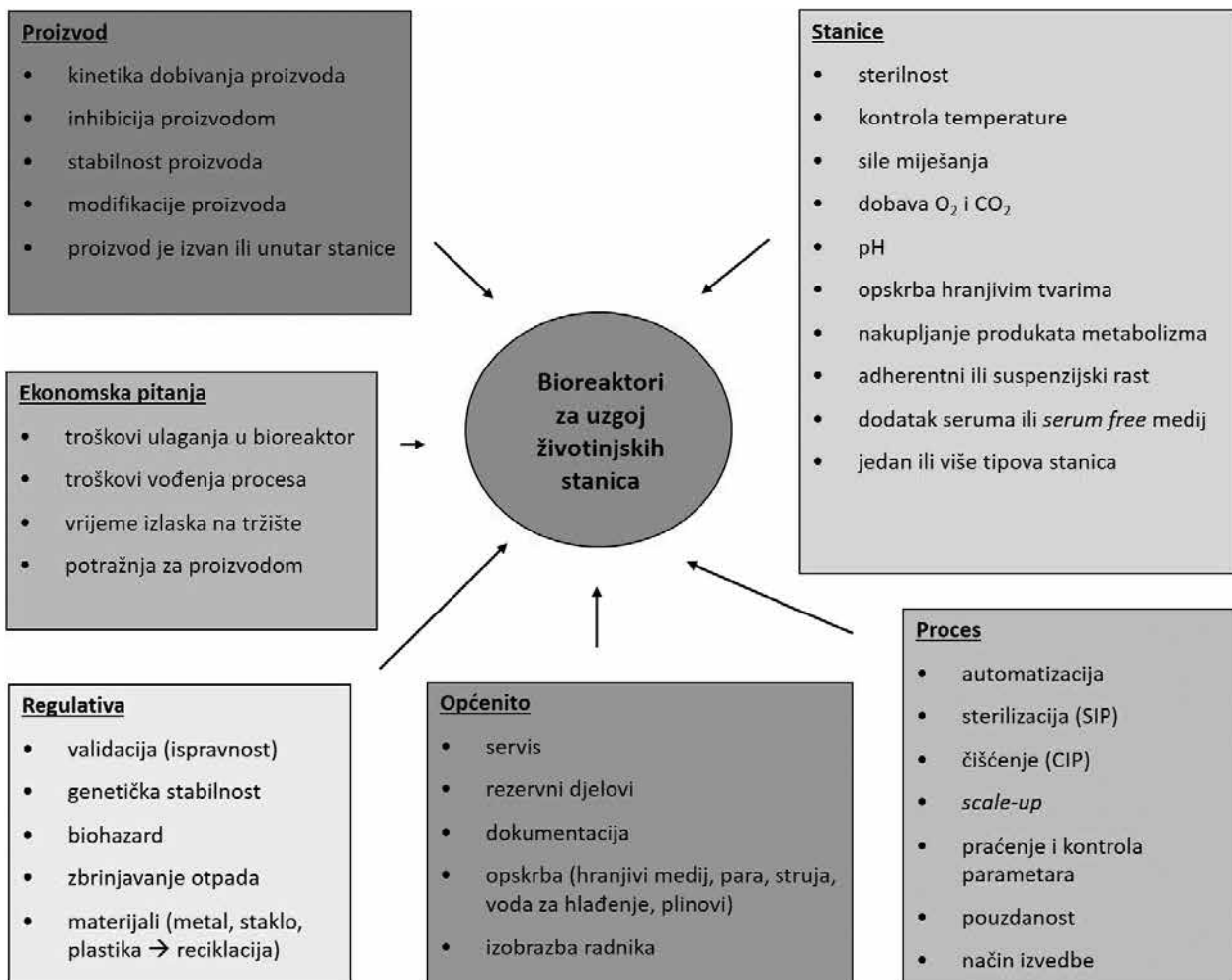


koristi. Karakteristike bioreaktora i proizvodni proces moraju zadovoljiti niz zahtjeva koji postavljaju fiziologija stanične linije i svojstva željenog proizvoda, ali i uvjeti tržišta te zakonska regulativa. Relativno noviji pojam “kakvoća kroz dizajn” (*Quality by design* ili *QbD*) opisuje pristup koji rješenje problema uspostave procesa proizvodnje, uključujući i odabir bioreaktora, traži kroz definiranje kvalitete i primjene konačnog proizvoda. Sve češće, dizajn eksperimenta, (DoE), procjena rizika (*risk assessment*) i tehnologija analitike procesa (PAT) postaju neizostavne smjernice *QbD* pristupa. Kinetika rasta stanica te promjena sastava medija tijekom uzgoja, skupina su biokemijskih čimbenika koji utječu na odabir načina miješanja te modeliranje prijenosa tvari i topline pri samom dizajniranju bioreaktora. Empirijskom korelacijom fizikalnih svojstva medija za uzgoj i geometrije bioreaktora (kao i miješala), određuju se vrijednosti kojima se ustanovljuje (ne)pogodnost nekog tipa bioreaktora za provedbu željenog proizvodnog procesa (Marks 2003.). Skup je i dugotrajan zadatak eksperimentalno određivati i uspoređivati izvedbene mogućnosti bioreaktora. Savjetovanje s iskusnim stručnjacima, praćenje stručne literature i industrijskih izvještaja kao i sudjelovanje na stručnim skupovima još su uvijek značajan izvor informacija korisnih za uspostavu bioprocenih sustava. Međutim, tijekom posljednjeg desetljeća taj problem se pokušava i praktično riješiti primjenom

tzv. mikro-bioreaktora, poput *Micro-24 Microreactor™* (Pall Corporations). Oni pružaju mogućnost simultanog vođenja više visokokontroliranih proizvodnih procesa sa stanicama u financijski prihvatljivom mikrolitarskom mjerilu pri različitim uzgojnim parametrima. Svrha mikro-bioreaktora u tom slučaju je generiranje rezultata eksperimenata metodom visokog probira (*high throughput screening*) koji bi trebali poslužiti kao prvi korak u modeliranju i planiranju prijenosa procesa prema višim proizvodnim kapacitetima. Niz tehničkih i zakonskih pitanja (lokacija postrojenja, dobava sirovina, sigurnost itd.) trebali bi također utjecati na odluku o svojstvima bioreaktora i načinu proizvodnje, tj. je li i koliko je predviđeni sustav primjenjiv i isplativ. U mnogo slučajeva, osobito kod bioreaktora za industrijsku primjenu, na izbor utječe upućenost izvođača s tehnologijom, raspoloživost prostora i usluga održavanja te troškovi same izvedbe procesa. Za industrijske potrebe, kod homogenih kultivacijskih sustava, najčešće se koriste bioreaktori s miješalom. Ta je tehnologija dominantna zbog svoje fleksibilnosti, *scale-up* mogućnosti i razvijenih modula kontrole procesnih parametara. Međutim, povećan je trend uporabe bioreaktora za jednokratnu uporabu kojim se izbjegavaju neki koraci u pripremi proizvodnog procesa, no pritom se nailazi na nove tehničke i regulatorne izazove (uhodanost procesa, zbrinjavanje otpada itd.).

Slika 5. Čimbenici koji utječu na izbor i dizajn bioreaktora.

Figure 5. Factors affecting the design and selection of bioreactors.



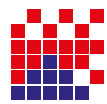
Slika 5 shematski prikazuje glavne čimbenike koji utječu na izbor ili dizajn bioreaktora. Iako su podijeljeni u nekoliko kategorija, većina tih čimbenika je u stvarnosti međuvisna. Preporuča se započeti s jasnom definicijom što i koja je svrha proizvoda dobivenog procesom u bioreaktoru te koja je potencijalna uporaba odabranog kultivacijskog sustava u budućnosti, s obzirom da se redovito radi o velikim ulaganjima kod njegove uspostave. Važnu ulogu pritom ima ekspertiza tima koji donosi te odluke kao i radne skupine koja će nadgledati proizvodnju. Sljedeći korak je precizno definiranje svih preostalih čimbenika kako bi se izradile jasne procjene izvodivosti proizvodnje u predviđenim kadrovskim, ekonomskim, prostornim i vremenskim okvirima. Velika industrijska postrojenja svakako bi trebala imati osiguranu i konstantnu tehničku podršku koja bi vodila brigu o dostupnosti energenata (struja, voda, plinovi) te redovitim mehaničkom održavanju (pumpe, miješala, čiste komore, hladnjaci itd.). S ekonomskog stajališta ključno je poznavanje vremena potrebnog da proizvod dođe do tržišta tj. krajnjih korisnika (*time to market* ili *time to patient*) imajući na umu zahtjevnost *downstream* postupaka (pročišćavanje i izolacija proizvoda), provjere biološke aktivnosti i konačnu formulaciju proizvoda. Regulatorni zahtjevi donose pravila o konačnoj čistoći proizvoda, stabilnosti i roku trajanja. To je izravno vezano na odabir tipa procesa proizvodnje i to preko definiranja sastava hranjivog medija, vremena nakupljanja proizvoda u kulturi i koncentracije stanica tijekom proizvodnog postupka. Sigurnosna pitanja bave se manipulacijom sirovinama, proizvodom i otpadom: nabava, skladištenje i zbrinjavanje; kao i sigurnošću rukovanja bioreaktorima: postava odvodnih i dovodnih cijevi, ugradnja ventila, način uzorkovanja. Posebne i ne manje važne stavke odnose se na primjenu genetički modificiranih organizama, zbrinjavanje mogućih kontaminacija, primjenu antibiotika i drugih biološki aktivnih komponenti koji bi također, dugoročno gledano, mogli utjecati na ljudsko zdravlje i okoliš. Dva su ključna čimbenika kojim stanična linija utječe na odbir bioreaktora i samog proizvodnog procesa: način rasta stanica (suspenzijski ili adherentni rast) i osjetljivost stanica na pojave u bioreaktoru (miješanje, areacija, utrošak nutrijenata). Ta svojstva definiraju vrstu bioreaktora kroz odabir načina prihranjivanja te brzinu i tip miješala, tj. raspršivača zraka. Inhibicija stanica metaboličkim nusproizvodima ili samim proizvodom određuje način uzgoja kojim će se proizvodni postupak voditi. Također, na tip proizvodnog postupka utječe i stabilnost samog proizvoda. Primjerice, povremena izmjena hranjivog medija ili kontinuirani perfuzijski postupci provode se kad je proizvod nestabilan pri radnoj temperaturi procesa ili podložan proteolitičkoj razgradnji. Slično se postupa i kad u kulturi željeni proizvod dostiže za stanice štetne koncentracije tijekom samog trajanja procesa. U posljednjih desetak godina prikupljeno je mnogo spoznaja o svojstvima kultivacijskih sustava za životinjske stanice. Iako su bioreaktori s miješalom još uvijek najzastupljeniji, potražnja za bioreaktorima jednokratne uporabe koji rade na principu njihanja značajno raste. Razvojem staničnih linija i pojavom sve većeg broja biotehnoških spojeva, čini se da je opći trend postavljanje višenamjenskih proizvodnih sustava. Pravi put k tome je pažljivo istraživanje izvedbenih mogućnosti bioreaktora i definiranje željenog operacijskog raspona odabranog uređaja.

Smjernice

Izbor bioreaktora nesumnjivo igra važnu ulogu u komercijalnom uspjehu bioloških spojeva proizvedenih pomoću životinjskih stanica. Kroz cijenu tih spojeva, isplativost proizvodnje dugo je godina bila funkcija volumena korištene stanične kulture. Najveća mjerila suspenzijskih kultura danas dosežu 25.000 litara, a kod pseudosuspenzijskih (stanice na mikronosačima) do 5.000 litara. Međutim znatnim povećanjem titra proizvoda, poboljšanjem genske ekspresije i genetičke stabilnosti proizvodnih staničnih linija, čini se da je trend povećanja mjerila bioreaktora ušao u završnicu. (Smelko i sur., 2011). Industrija se ubrzano okreće bioreaktorima za jednokratnu uporabu, kako učinkovitost i praktično iskustvo s tim uređajima raste. S druge strane, njihovi proizvođači rade na poboljšanju robustnosti, readaptibilnosti i modularnosti pojedinih bioreaktorskih jedinica što još više ide na ruku korisnicima. Nastavak istraživanja kemijskih promjena staničnog mikrookoliša tijekom bioprocasa kao i uklanjanje fizikalnih izvora stresa stanica na području prijenosa mase i hidrodinamike sustava, svakako će unaprijediti učinkovitost proizvodnog postupka. Razvoj automatizacije procesa kao i izrada boljih instrumenata za tzv. *in-situ/real-time* praćenje parametara uzgoja tome neupitno može doprinijeti. Dakako na cijelom tom putu vodeći kriterij trebao bi biti zadovoljenje propisanih GMP (*good manufacturing practice*) standarda koji su danas preduvjet komercijalizacije proizvoda.

Literatura

- Aunius J. (2000) Viral vaccine production in cell culture. U: Spier R.D. (ed): *Encyclopedia of cell technology*, str. 1182-1217. Wiley, New York, USA.
- Bauer P., Hancock L., Rathman J., Chalmers J.J. (2000) Cell-microcarrier adhesion to gas-liquid interfaces and foam. *Biotechnology Progress*, 16, 125-132.
- Birch J.R., Arathoon R. (1990) Suspension culture of mammalian cells. *Bioprocess Technology*, 10, 251-270.
- Birch J.R., Racher A.J. (2006) Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 671-685.
- Born C., Biseli M., Wandrey C. (1995) Production of monoclonal antibodies in a pilot scale fluidized-bed bioreactor. U: Beuvery E.C., Griffiths J.B., Zeijlemaker W.P. (eds): *Animal Cell Technology: Towards 21st century*, str. 683-686. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Nizozemska.
- Brotherton J.D., Chau P.C. (1996) Modeling of axial-flow hollow fiber bioreactors. *Biotechnology Process*, 12, 575-590.
- Chisti Y. (2000) Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 18, 320-432.
- Croughan M.S., Wang D.I.C. (1989) Growth and death in overagitated microcarrier cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 731-744.
- Dowd J.E., Weber I., Rodriguez B., Pirret J.M., Kwok K.E. (1999) Predictive control of hollow-fiber bioreactors for the production of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 484-492.
- Eisnekrætzter D. (2014) Bioreactors for animal cell culture. U: Hauser H., i Wagner R. (eds): *Animal cell biotechnology in biologics production*, str. 389-426. De Gruyter, Berlin, Njemačka.



- Fenge C., Klein C., Heuer C., Siegel U., Fraune E. (1993) Agitation, aeration and perfusion modules for cell culture bioreactors. *Cytotechnology*, 11, 233-244.
- Finter N.B. (1991) Animal cell culture: the problems and rewards. U: Griffiths, J.B., Meignier, B. (eds): Production of biologicals from animal cell culture, str.3-12. Butterworth-Heinemann, Oxford. UK.
- Fries S., Glazomitsky, K. Woods, A. Forrest, G. Hsu, A., Olewinski R., Robinson D., Chartrain, M. (2005) Evaluation of disposable bioreactors: rapid production of recombinant proteins by several animal cell lines. *Bioprocess International*, 3, 36-44.
- Griffiths J.B. (1988) Overview of cell culture systems and their scale-up. U: Spier R.E., Griffiths J.B. (eds): Animal cell biotechnology, str. 179-220. Academic Press, London, UK.
- Griffiths B. (2000) Animal cell products, overview. U: Spier R.E. (ed): Encyclopedia of cell technology, str. 1182-1217. Wiley, New York, USA.
- Grima E.M., Chisti Y., Moo-Young, M. (1997) Characterisation of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. *Journal of Biotechnology*, 54, 195-210.
- Hamabch B., Biseli M., Rundstadler P.W., Wandrey C. (1992) Development of reactor integrated aeration system for cultivation of animal cells in fluidized beds. U: Spier R.E., Griffiths J.B., MacDonald C. (eds): Animal cell technology: Development process and products, str. 381-385. Academic Press, London, UK.
- Henzler H.J. (1982) Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter. *Chemie Ingenieur Technik*, 54, 461-476.
- Hilscher M., Scheibler U., Onken U. (1992) Selective recycle of viable animal cells by coupling of airlift reactor and cell settler. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 442-446.
- Hundt B., Best C., Schlawin N., Kaßner H., Genzel Y., Reichl U. (2007) Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave® bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale. *Vaccine*, 25, 3987-3995.
- Ishida M., Haga R., Nishimura N., Matuzaki H.N.R. (1990) High cell density suspension culture of mammalian anchorage independent cells: oxygen transfer by gas sparging and defoaming with a hydrophobic net. *Cytotechnology*, 4, 215-225.
- Jain E., Kumar A. (2008) Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters. *Biotechnology Advances*, 26, 46-72.
- Knazek R.A., Gullino P.M., Kohler P.O., Dedrick R.L. (1972) Cell culture in artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. *Science*, 178, 65-67.
- Labecki M., Bowden B., Pirret J. (1996) Two-dimensional analysis of protein transport in the extracapillary space of hollow-fibre bioreactors. *Chemical Engineering Science* 51, 4197-4213.
- Looby D., Racher A.J., Fuller J.P., Griffiths B. (1995) Evaluation of porous silicone carrier (Immobilized G) for animal cell culture. U: Beuvery E.C., Griffiths J.B., Zeijlemaker W.P. (eds): Animal cell technology: Towards 21st century, str. 783-786. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Nizozemska.
- Mardirosian D., Guertin P., Crowell Y., Yetz-Aldape J., Hall M., Hodge G., Jonnalagadda K., Holmgren A., Galliher P. (2009) Scaling up a CHO-produced hormone-protein fusion product. *BioProcess International*, 7, 30-35.
- Marks D.M. (2003) Equipment design considerations for large scale cell culture. *Cytotechnology*, 42, 21-33.
- Martens D.E., Nollen E.A.A. Velden-de Groot C.A., Goojier C.D., Beuvery E.C., Tramper J. (1997) Death rate in small air-lift loop reactor of Vero cells grown on solid microcarriers and in macroporous microcarriers. *Cytotechnolog*, 23, 61-75.
- Meissner P., Werner P., Schröder B., Herfurth C., Wandrey C., Biselli M. (1998) Expansion of human hematopoietic progenitor cells in a fixed bed bioreactor. U: Merten O.W., Perrin B., Griffiths B. (eds): New developments and applications in animal cell technology, str. 635-636. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Nizozemska.
- Moussy Y. (2000) Bioartificial kidney, I. Theoretical analysis of connective flow in hollow fiber modules: application to a bioartificial hemofilter. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 142-152.
- Negrete A., Kotin R.M. (2007) Production of recombinant adeno-associated vectors using two bioreactor configurations at different scales. *Journal of Virological Methods*, 145, 155-161.
- Nyberg S.C., Shatford R.A., Peshwa M.W., White J.G., Cerra F., Hu W.S. (1993) Evaluation of a hepatocyte – entrapment hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 194-203.
- Ozturk S.S. (2007) Comparison of product quality: disposable and stainless steel bioreactor. *BioProduction*. Berlin.
- Pierce L., Shabram P. (2004) Scalability of a disposable bioreactor form 25 L-500 L run in perfusion mode with a CHO-based cell line: a tech review. *Bioprocessing*, 2, 51-56.
- Piret J.M., Cooney C.L. (1990) Mammalian cell and protein distributions in ultrafiltration hollow fiber bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 902-910.
- Reiter M., Bliml G., Gaida T., Zach N., Unterluggauer F., Doblhoff-Dier O., Noe M., Plail R., Huss S., Katinger H. (1991) Modular integrated fluidized bed bioreactor technology. *Biotechnology*, 9, 1100-1102.
- Reiter M., Zach N., Gaida T., Bluml G., Doblhoff-Dier O., Unterluggauer F., Katinger H. (1992) Oxygenation in fluidized bed bioreactors using the microsparging technique. U: Spier R.E., Griffiths J.B., MacDonald C. (eds): Animal cell technology: Development process and products, str. 386-392. Academic Press, London, UK.
- Reuveny S., Velez D., Miller L., MacMillian J.D. (1986) Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors. *Journal of Immunological Methods*, 86, 61-69.
- Rhodes M., Birch J. (1988) Large scale production of proteins from mammalian cells. *Biotechnology*, 6, 518-523.
- Rundstadler P.W., Cernek S.R. (1988) Large-scale fluidized-bed, immobilized cultivation of animal cell at high densities. U: Spier R.E., Griffiths J.B. (eds): Animal cell biotechnology, str. 305-320. Academic Press, London, UK.
- Slivac I., Gaurina Srček V., Radošević K., Kmetič I., Kniewald Z. (2006) Aujeszký's disease virus production in disposable bioreactor. *Journal of Bioscience*, 31, 363-368.
- Smelko J.P., Wiltberger K.R., Hickman E.F., Morris B.J., Blackburn T.J., Ryll T. (2011) Performance of high intensity fed-batch mammalian cell cultures in disposable bioreactors. *Biotechnology Progress*, 27, 1358-1364.



Singh V. (1999) Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 30, 149-158.

Taylor D.G., Piret J.M., Bowen B.D. (1994) Protein polarization in isotropic membrane hollow-fiber bioreactors. *AIChE Journal*, 40, 321-333.

Tollnik C. (2009) Einsatz von Disposables in der Praxis - ein Erfahrungsbericht zu Design und Betrieb einer Pilotanlage für klinische Wirkstoffproduktionen. 2. Konferenz Einsatz von SingleUse-Disposables (Concept Heidelberg), Mannheim, Njemačka.

Varley J., Birch J. (1999) Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology*, 29, 177-205.

Warnock, J. N., Al-Rubeai M. (2006), Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 45, 1-12.

Weber W., Weber E. Geisse S., Memmert K. (2002) Optimisation of protein expression and establishment of the Wave bioreactor for baculovirus/insect cell culture. *Cytotechnology*, 38, 77-85.

Whitford W.G. (2010) Single-use systems as principal components in bioproduction, *Bioprocess International*, 12, 34-42.

Whitford W.G., Cadwill J.J.S. (2011) The potential application of hollow fiber bioreactors to large-scale production. *Biopharm International Supplement* 24, 21-26.