

# Bedienungsanleitung

## miniPERM®





# Bedienungsanleitung miniPERM®

---

## *Inhaltsverzeichnis*

Einleitung.....	4
Konstruktion und Funktion des miniPERM® Bioreaktors	
Arbeitsanleitung.....	6
Am Beispiel einer Hybridomzellkultur	
Anhang.....	12
Hochzelldichte-Kulturmethode	
Sauerstoffbedarf von Hybridomzellen	
Produktionsrate	
Mediumwechsel	
Handling des miniPERM® Bioreaktors	
Troubleshooting.....	13
Problemstellung und Lösung	
Literatur.....	17
Publikation/Anwendungsberichte	
Zubehör.....	18
Bestellinformation.....	19
Kurzanleitung.....	20

Gilt für entsprechend gekennzeichnete Produkte:



Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden



Bei Wiederverwendung: Kontaminationsgefahr



# Bedienungsanleitung miniPERM®

## Einleitung

### Konstruktion des miniPERM® Bioreaktors

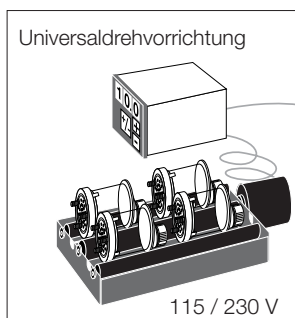
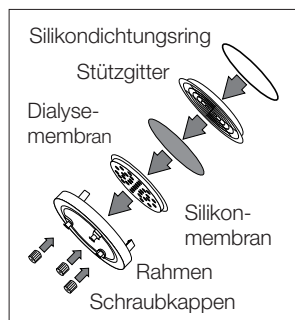
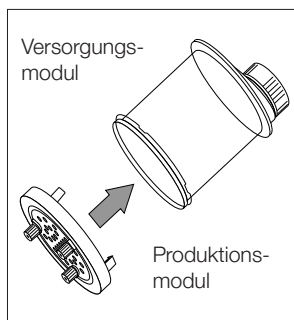
miniPERM® ist ein aus zwei miteinander verbundenen Modulen aufgebauter Bioreaktor zur Kultivierung von Hybridomzellen und anderen Zellen in hoher Dichte (Hochzelldichte-Kulturmethode). Er besteht aus:

- dem **Produktionsmodul**, einer nur einmal verwendbaren scheibenförmigen Zellkulturkammer mit 35 ml oder 50 ml (miniPERM® classic oder HDC 50) Volumen und
- dem **Versorgungsmodul**, einem autoklavierbaren, mehrfach verwendbaren oder sterilen, einmal verwendbaren Mediumbehälter aus Kunststoff (Polycarbonat) mit 550 ml Volumen, das mit dem Produktionsmodul verbunden wird.

Das Produktionsmodul ist an der dem Versorgungsmodul zugewandten Seite von einer **Dialysemembran** (MWCO 12,5 kD) abgeschlossen. Sind beide Module miteinander verbunden, bildet die semipermeable Dialysemembran eine Trennwand zwischen beiden.

Die nach außen gerichtete Seite des Produktionsmoduls besteht aus einer dünnen gasdurchlässigen **Silikonmembran**.

Der Schraubverschluss des Versorgungsmoduls ist mit einer integrierten **Gasaustauschmembran** ausgestattet.



## Funktion des miniPERM® Bioreaktors

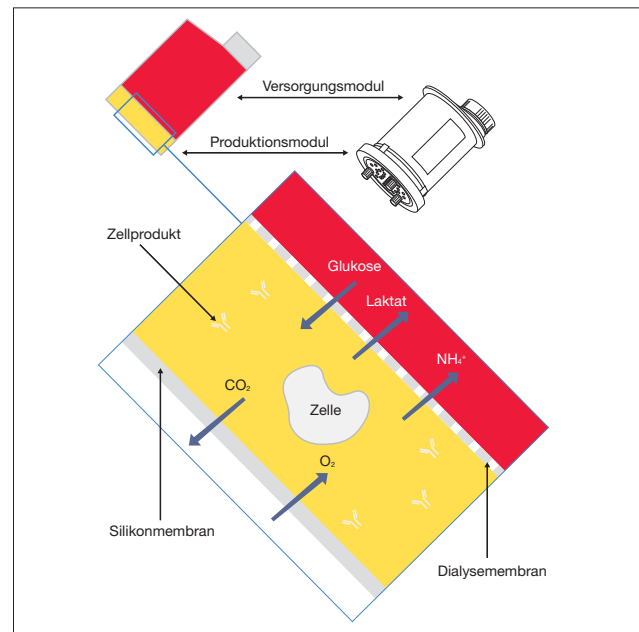
### 1. Dialysemembran

Die semipermeable Dialysemembran im miniPERM® Bioreaktor können weder die Zellen noch die von den Zellen freigesetzten hochmolekularen Produkte, wie z.B. die sezernierten monoklonalen Antikörper, passieren.

Nährstoffe (Glukose, Aminosäuren), Vitamine, Ionen und im Medium physikalisch gelöste Gase ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) können dagegen aus dem Versorgungsmodul nahezu ungehindert in das Produktionsmodul diffundieren. Wegen des mehr als 10-fachen Überschusses an Versorgungsmedium können die Zellen über einen langen Zeitraum versorgt werden.

Gleichzeitig können die von den Zellen abgegebenen sauren (z.B. Milchsäure), toxischen (z.B. Ammonium-Ionen) und anderen Metabolite über die Dialysemembran das Produktionsmodul verlassen und in dem wesentlich größeren Volumen des Versorgungsmoduls aufgefangen und neutralisiert werden.

Die Entsorgung von  $CO_2$  aus dem miniPERM® Bioreaktor wird dadurch gefördert, dass sowohl physikalisch als auch in Form von  $NaHCO_3$  im Medium gelöstes  $CO_2$  die Dialysemembran passieren und so vom Produktionsmodul in das Versorgungsmodul gelangen kann.



Vor der Dialysemembran befindet sich auf der dem Versorgungsmodul zugewandten Seite ein Stützgitter. Dieses Gitter schützt zum einen die Dialysemembran vor mechanischen Verletzungen. Zum anderen sorgt es für eine Verwirbelung des Mediums an der Membranoberfläche und verbessert die Diffusion von Nährstoffen und Metaboliten.

## **2. Silikonmembran**

Der Sauerstoffbedarf wird durch Eindiffundieren von atmosphärischem Sauerstoff aus der Inkubatoratmosphäre durch die Silikonmembran in das Produktionsmodul gedeckt. Auf gleichem Weg verlässt das in entsprechend großen Mengen von den Zellen produzierte  $\text{CO}_2$  das Produktionsmodul. Infolge der guten  $\text{CO}_2$ -Durchlässigkeit der Silikonmembran steht das im Medium des Produktionsmoduls enthaltene  $\text{NaHCO}_3$  mit dem  $\text{CO}_2$  der Inkubatoratmosphäre im Gleichgewicht.

## **3. Schraubverschluss mit Gasaustauschmembran**

Die Gasaustauschmembran der Schraubkappe des Versorgungsmoduls ermöglicht den Druckausgleich zwischen dem Bioreaktor und der Inkubatoratmosphäre.

## **4. Universaldrehvorrichtung**

Um einen optimalen Stoffaustausch an der Membran und somit eine optimale Versorgung der Zellen zu erreichen, muss sowohl das Versorgungsmedium als auch die Zellsuspension im Reaktionsmodul ständig umgewälzt werden.

Aufgrund der hohen Zelldichten, die im miniPERM® Bioreaktor erreicht werden, sollte für die Kultur eine höhere Umdrehungsgeschwindigkeit als bei üblichen Flaschendrehvorrichtungen (max. 2,5 UpM) eingestellt werden.

## Arbeitsanleitung



Alle Arbeiten müssen in der sterilen Werkbank vorgenommen werden. Die Zellen werden unter den im jeweiligen Labor üblichen Bedingungen kultiviert, zentrifugiert und auf die angegebene Dichte eingestellt.



Überprüfen Sie die Schnapphaken am Produktionsmodul ob diese eingerastet sind, ggf. einzeln nachfassen.



Das Versorgungsmodul darf bei max. 121°C und nicht häufiger als 10 x autoklaviert werden, höhere Temperaturen führen zur Verformung des Kunststoffmaterials.



Um einen Überdruck im Versorgungsmodul zu verhindern, sollte der Schraubverschluss des Versorgungsmoduls während des Zusammenbaus des Bioreaktors gelockert sein.

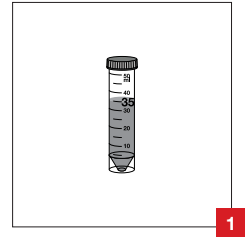


Überprüfen Sie die Schnapphaken am Produktionsmodul ob diese eingerastet sind, ggf. einzeln nachfassen.

## 1. Vorbereitung der Zellen für den miniPERM® Bioreaktor am Beispiel einer Hybridomzellkultur

Für den Start einer Kultur im miniPERM® classic Produktionsmodul werden ca. 35 - 37 ml einer Zellsuspension mit einer Dichte von ca.  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen/ml (gesamt: 35 - 185  $\times 10^6$  Zellen) benötigt (Abb. 1). In der Regel reicht hierzu der Inhalt von 1 - 2 gut bewachsenen 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen.

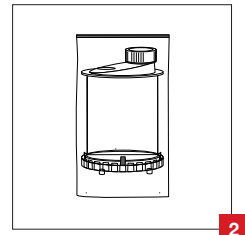
Bei der Verwendung des miniPERM® HDC 50 Produktionsmoduls werden 1 - 5  $\times 10^6$  Zellen/ml in 50 ml Medium vorbereitet.



## 2. Vorbereitung des miniPERM® Bioreaktors

### 2.1 miniPERM® komplett steril

Produktions- und Versorgungsmodul sind miteinander verbunden und sterilisiert. Der Bioreaktor wird als Einmalartikel geliefert und ist nicht autoklavierbar. Der miniPERM® Bioreaktor ist sofort gebrauchsfertig (Abb. 2).



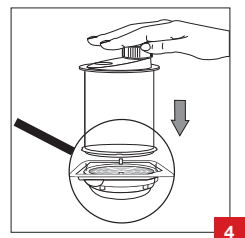
### 2.2 miniPERM® mehrfach verwendbar

Die Produktionsmodule werden als Einmalartikel einzeln steril verpackt (Alubeutel) geliefert. Das mehrfach verwendbare Versorgungsmodul muss vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert werden.

- Das Versorgungsmodul wird in einem Autoklavbeutel verpackt (Abb. 3) und 20 min bei max. 121°C ohne Schraubverschluss autoklaviert (siehe auch Punkt 7).



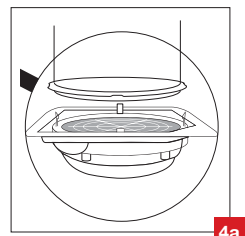
- Der Alubeutel des Produktionsmoduls wird so aufgezogen, dass das Produktionsmodul auf den Schraubkappen der Luer-Lock-Anschlüsse steht. Das Modul nicht aus der noch verbleibenden Kunststoffverpackung nehmen.



- Das autoklavierte Versorgungsmodul wird mit leichtem Druck auf das in der geöffneten Verpackung liegende Produktionsmodul gedrückt (Abb. 4). Dabei müssen die vier Schnapphaken des Produktionsmoduls in die vier Aussparungen am Rand des Versorgungsmoduls aufgesetzt und hörbar eingerastet werden (Abb. 4a).

Das Versorgungsmodul wird dabei gegen den im Produktionsmodul liegenden Silikonring gepresst.

- Die Kunststoffverpackung des Produktionsmoduls wird jetzt entfernt.
- Der so vorbereitete miniPERM® Bioreaktor ist jetzt gebrauchsfertig.



## 3. Befüllen des miniPERM® Bioreaktors

### 3.1 Einfüllen der Zellsuspension in das Produktionsmodul

Das Befüllen des Produktionsmoduls mit der Zellsuspension geschieht mittels Spritze über eine der drei Öffnungen mit Luer-Lock-Anschluss:

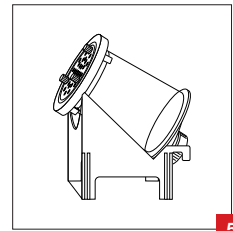
- Der zusammengesetzte miniPERM® Bioreaktor wird mit dem Produktionsmodul nach oben so auf den Ständer gestellt, dass sich eine der drei Schraubkappen am höchsten Punkt befindet (Abb. 5).
- Die vorbereitete Zellsuspension (35 oder 50 ml) wird mit einer Einmalspritze ( $\leq 50$  ml) über ein steriles Einfüllröhrchen (Einfülltubus 94.6077.138) aufgezogen (Abb. 6). Bevor die Zellsuspension eingefüllt wird, eventuelle Luftblasen aus der Spritze entfernen.
- Die obere Schraubkappe (A) wird entfernt und die Spritze (ohne Einfülltubus) auf den Luer-Lock-Anschluss gedreht (Abb. 7).
- Der miniPERM® Bioreaktor wird gedreht, bis sich eine der beiden anderen Schraubkappen am höchsten Punkt befindet.
- Eine 2. Schraubkappe (C) am höchsten Punkt wird zum Druckausgleich gelockert und die Zellsuspension langsam in das Produktionsmodul hineingespritzt (Abb. 8).
- Entlüftungsöffnung (C) mit einer Schraubkappe verschließen (Abb. 9).
- Den miniPERM® Bioreaktor so drehen, dass sich die Befüllungsöffnung (A) mit der daran befindlichen Spritze am höchsten Punkt befindet (Abb. 10).
- Die Spritze wird abgeschraubt. Im Produktionsmodul entstandene Luftblasen sollten durch leichten Druck mit den Fingerspitzen gegen die Silikonmembran entfernt werden.
- Danach wird das Produktionsmodul durch Aufschrauben einer dritten Schraubkappe oder eines Septumverschlusses auf den Luer-Lock-Anschluss (A) verschlossen (Abb. 11).



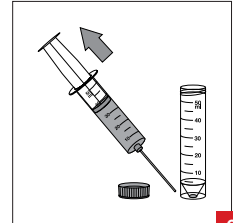
Beim Einfüllen der Zellsuspension ist gleichzeitig für Entlüftung zu sorgen. Hierfür muss eine 2. Schraubkappe am Produktionsmodul geöffnet werden.



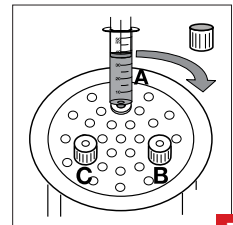
Mediumreste auf dem Rand der Öffnung müssen vor dem Verschließen abgesaugt werden.



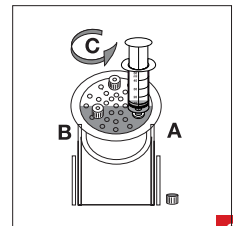
5



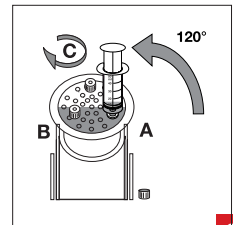
6



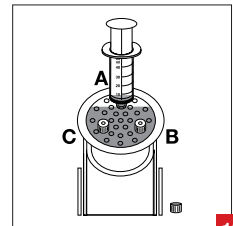
7



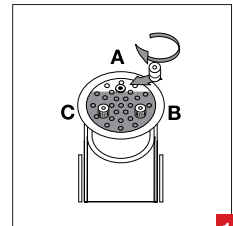
8



9



10



11



Nicht mehr als 400 ml Medium einfüllen. Das Vorhandensein einer Gasphase im Versorgungsmodul ist Voraussetzung für den Erfolg der Kultur.



Die Umdrehungsgeschwindigkeit ist von dem verwendeten Zelltyp und der verwendeten Zelllinie abhängig:

- murine Hybridomzellen  
5 - 20 UpM.
- humane Hybridom- und transfizierte Zellen  
2 - 10 UpM.

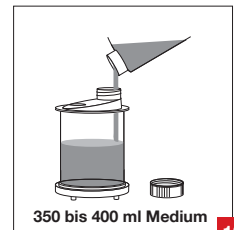


Der miniPERM® Bioreaktor dreht sich mit der Hälfte der an der Steuereinheit eingestellten Umdrehungsgeschwindigkeit, da der Durchmesser des miniPERM® Bioreaktors doppelt so groß ist wie der Durchmesser der Antriebsrolle der Universaldrehvorrichtung (Abb. 14).

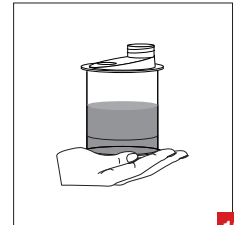
## 3.2 Befüllen des Versorgungsmoduls

Das Versorgungsmodul wird durch die große Öffnung wie folgt befüllt:

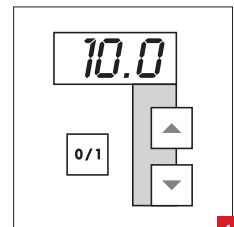
- Der Schraubverschluss der Befüllungsöffnung des Versorgungsmoduls wird abgenommen und 350 - 400 ml temperiertes Medium (37°C) eingefüllt (Abb. 12).
- Um evtl. entstandenen Druck im Bioreaktor zu entfernen, wird mit einer Hand gegen die Silikonmembran im Produktionsmodul gedrückt (Abb. 13).
- Die Befüllungsöffnung wird mit einem Schraubverschluss fest verschlossen.
- Der miniPERM® Bioreaktor wird auf die Universaldrehvorrichtung im Inkubator gelegt und die Umdrehungsgeschwindigkeit zwischen 0.1 und 40.0 UpM eingestellt.



12



13



14

Die tatsächliche Drehgeschwindigkeit des miniPERM® Bioreaktors bei einer Einstellung von 10.0 auf der Steuereinheit der Universaldrehvorrichtung beträgt 5 UpM.





Ist die Silikonmembran nach außen aufgebläht, dürfen auf keinen Fall die Schraubkappen an den Luer-Lock-Anschlüssen des Produktionsmoduls geöffnet werden. Aufgrund des im Versorgungsmodul herrschenden Überdrucks würde beim Öffnen die Zellsuspension herauspritzen und den Bioreaktor kontaminieren. Deshalb muss vorher für Druckausgleich gesorgt werden.



Bei der Verwendung von Serum im Medium kann es zu Schaumbildung im Bioreaktor kommen. Da beim Öffnen der Schraubkappe des Produktionsmoduls Schaum aus der Öffnung treten und dieser eine Kontamination verursachen kann, ist es ratsam, dem Medium im Versorgungsmodul ein Antischaummittel zuzusetzen (siehe Troubleshooting).



Mediumreste auf dem Rand der Entnahmeöffnung müssen vor dem Verschließen abgesaugt werden.

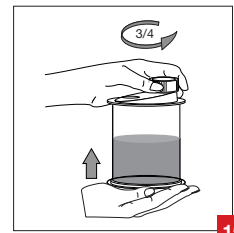


Abhängig vom entnommenen Probenvolumen sollte das Volumen durch frisches Medium ersetzt werden.

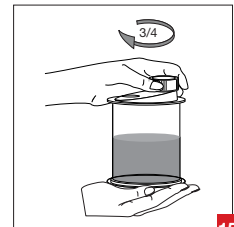
## 4. Probennahme

### 4.1 Probennahme über eine der drei Öffnungen am Produktionsmodul

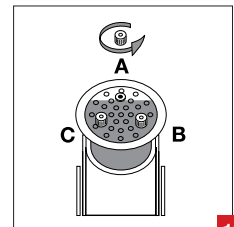
- Der miniPERM® Bioreaktor wird in die sterile Werkbank gebracht.
- Es wird für Druckausgleich gesorgt. Hierfür wird der Bioreaktor mit einer Hand festgehalten, mit den Fingern wird ein leichter Druck auf die Silikonmembran im Produktionsmodul ausgeübt.
- Mit der anderen Hand wird der Schraubverschluss des Versorgungsmoduls gelockert (nicht abschrauben), der Überdruck kann entweichen (Abb. 15/15a). Anschließend den Schraubverschluss wieder verschließen.
- Der Bioreaktor wird so auf den Ständer gestellt, dass eine der drei Öffnungen des Produktionsmoduls am höchsten Punkt (A) liegt. Die Schraubkappe dieser Öffnung wird abgeschraubt (Abb. 16).
- Aufschrauben einer Spritze geeigneter Größe (je nach Probenvolumen ca. 1 ml) auf den Luer-Lock-Anschluss (A).
- Der Bioreaktor wird so gedreht, dass die Entnahmeöffnung unterhalb des Flüssigkeitsspiegels liegt (Abb. 17). Die Probe kann aufgezogen werden.
- Vor Abnahme der Spritze wird der Bioreaktor so gedreht, dass sich die Entnahmeöffnung (A) wieder am höchsten Punkt befindet (Abb. 18).
- Nach Abnahme der Spritze sollten im Produktionsmodul entstandene Luftblasen durch leichten Druck mit den Fingerspitzen gegen die Silikonmembran entfernt werden.
- Die Entnahmeöffnung wird mit einer sterilen Schraubkappe verschlossen (Abb. 19) und der Bioreaktor wieder in den Inkubator gelegt.



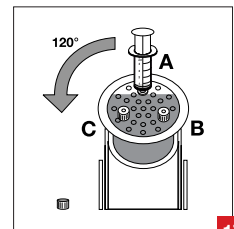
15



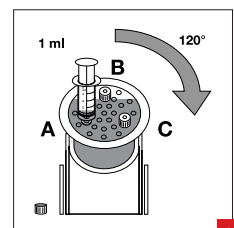
15a



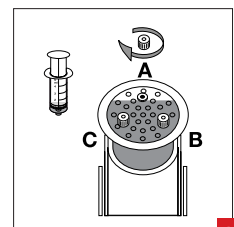
16



17



18



19



Bei der Verwendung von Septumverschlüssen sollten Kanülen (25G x  $\frac{5}{8}$ ") mit geringem Durchmesser verwendet werden, um das Einstichloch so klein wie möglich zu halten. Nach 5- bis 6-maligem Einstechen muss der Septumverschluss gegen einen sterilen Verschluss ausgetauscht werden.



Die Entnahme von Proben oder das Ernten muss schnell durchgeführt werden um ein Sedimentieren und Verklumpen der Zellen zu verhindern.

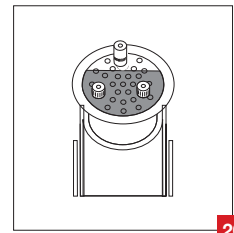


Mediumreste auf dem Rand der Entnahmeöffnung absaugen.

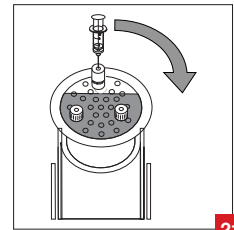
## 4.2 Probennahme über einen Septumverschluss

Einer der drei Luer Lock-Anschlüsse am Produktionsmodul kann durch einen Septumverschluss ersetzt werden, wodurch das Kontaminationsrisiko reduziert wird.

- Der miniPERM® Bioreaktor wird wie unter 4.1 beschrieben vorbereitet.
- Das Einstichloch des Septumverschlusses wird mit einem alkoholgetränkten (70% pharmazeutischer Alkohol) sterilen Tupfer abgewischt.
- Eine sterile Kanüle mit Spritze ( $\leq 5$  ml) wird in das Einstichloch des Septumverschlusses gesteckt und der miniPERM® Bioreaktor so gedreht, dass der Septumverschluss unterhalb des Flüssigkeitsspiegel liegt (Abb. 21).
- Die Probe wird aufgezogen.
- Die Kanüle aus dem Einstichloch entfernen.
- Das Einstichloch des Septumverschlusses mit einem alkoholgetränkten (70% pharmazeutischer Alkohol) sterilen Tupfer abwischen.



20



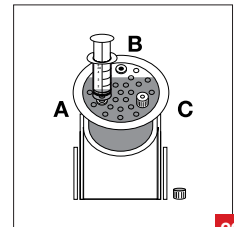
21

## 5. Ernte

Die Ernteintervalle und das Volumen sind abhängig von der erreichten Zelldichte und der von den Zellen produzierten Produktmenge. Im Durchschnitt werden 1 - 2 x wöchentlich  $\frac{2}{3}$  des Zellkulturüberstandes geerntet. Die Ernte wird analog zur Probennahme durchgeführt.

- Der miniPERM® Bioreaktor wird wie unter 4.1 beschrieben vorbereitet.
- Um zu verhindern, dass sich beim Aufziehen ein Unterdruck im Produktionsmodul aufbaut, ist es notwendig eine zweite Schraubkappe an Position B (Abb. 22) zu lockern.
- Das zu erntende Volumen wird aufgezogen.
- Verschließen der zweiten Öffnung (B) mit einer sterilen Schraubkappe.
- Anschließend wird der Bioreaktor so gedreht, dass sich die Entnahmeöffnung (A) am höchsten Punkt befindet. Die Spritze wird abgeschraubt.
- Das entnommene Erntevolumen wird durch frisches Medium ersetzt. Die Befüllung erfolgt genauso wie unter 3.1 beschrieben.

Abhängig von der erreichten Zelldichte können die entnommenen Zellen im frischen Medium resuspendiert und wieder in das Produktionsmodul zurückgegeben werden.



22



Sauberes Arbeiten beim Mediumwechsel ist von größter Wichtigkeit.



Die Schraubverschlüsse nur mit destilliertem Wasser spülen. Kein Ethanol, Propanol oder andere Desinfektionsmittel / Lösungsmittel mit alkoholhaltigen Verbindungen verwenden. Der Schraubverschluss enthält eine Filtermembran, deren Funktion durch Alkohol beeinträchtigt wird.



Der Ausgießrand der Befüllungsöffnung am Versorgungsmodul ist so konstruiert, dass ein tropfenfreies Ausgießen des Mediums möglich ist. Falls es doch einmal vorkommt, dass ein Mediumrest am Schraubgewinde bzw. auf dem Rand hängen bleibt oder daran herunterläuft, sollte dieser Mediumrest abgesaugt werden oder mit einem alkoholgetränkten (70% pharmazeutischer Ethanol) sterilen Tupfer entfernt werden. Nicht abflammen.

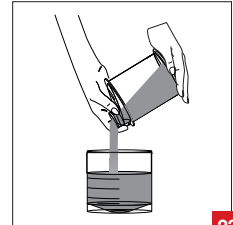


Bei der Verwendung von Desinfektionsmitteln sollte folgendes beachtet werden: Der miniPERM® Bioreaktor und der für die Kultivierung verwendete Inkubator sollten ausschließlich mit 70% pharmazeutischem Ethanol, Isopropanol oder mit Hautdesinfektionsmitteln, welche auf Ethanol basieren, kurzzeitig desinfiziert werden. Andere Desinfektionsmittel, insbesondere solche, die quartäre Ammoniumsalze (z.B. Baricidal, Biocidal) oder ionische Tenside enthalten, können Risse und Brüche am Kunststoffmaterial verursachen und somit zu Undichtigkeiten im Bioreaktor führen!

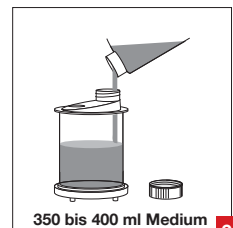
## 6. Wechsel des Versorgungsmediums

Beim Mediumwechsel erfolgt die Befüllung mit frischem Medium nach dem Ausgießen des verbrauchten Mediums genauso wie unter 3.2 für die Erstbefüllung beschrieben.

- Der Bioreaktor wird unter die sterile Werkbank gebracht.
- Der Schraubverschluss der Befüllungsöffnung am Versorgungsmodul wird abgeschraubt.
- Das verbrauchte Medium wird in einen desinfizierten Abfallbehälter entleert (Abb. 23).
- 350 - 400 ml frisches temperiertes Medium (37°C) wird eingefüllt (Abb. 24).
- Um evtl. entstandenen Druck im Bioreaktor zu entfernen wird, wie unter 3.2 beschrieben, für Druckausgleich gesorgt.
- Die Befüllungsöffnung wird mit einem sterilen Schraubverschluss fest verschlossen.



23

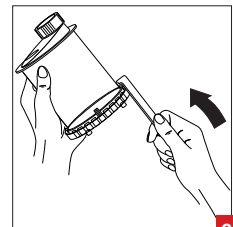


24

## 7. Reinigung und Sterilisation des mehrfach verwendbaren Versorgungsmoduls

Das mehrfach verwendbare Versorgungsmodul kann 10 x autoklaviert werden. Danach kann es zu Materialveränderungen, z.B. Verformung und Rissbildung, kommen. Um Beschädigungen des Kunststoffmaterials zu vermeiden, sollte das Versorgungsmodul frei (nicht gequetscht) im Autoklaven positioniert werden. Die Temperatur des Autoklaven darf max. 121°C betragen.

- Nach Beendigung der Kultur werden die beiden Module voneinander getrennt, indem die Schnapphaken des Produktionsmoduls mit Hilfe des mitgelieferten Öffners von dem Versorgungsmodul gelöst werden. Hierzu wird die Seite mit dem Haken eingesetzt (Abb. 25).
- Das Versorgungsmodul wird mit heißem Wasser und mit neutraler Laborreinigungslösung (z.B. RBS Neutral, C.Roth GmbH) gereinigt und mit Aqua dest. nachgespült. Nicht in der Spülmaschine waschen.
- Das Versorgungsmodul wird anschließend 20 Minuten bei max. 121°C ohne Schraubverschluss autoklaviert. Es darf kein alkalischer Korrosionsprotector im Autoklavenwasser verwendet werden.



25

## 8. Reinigung der Universaldrehvorrichtung

Die Universaldrehvorrichtung sollte mit einem mit 70% pharmazeutischen Ethanol oder Isopropanol getränkten Tuch oberflächendesinfiziert werden. Nicht autoklavieren.

## Kultivierung hoher Zelldichten im miniPERM®

### Hochzelldichte-Kulturmethode

Aufgrund der konstruktiven Merkmale des miniPERM® Bioreaktors ist es möglich, Zellen zu wesentlich höheren Dichten (Hochzelldichte-Kulturmethode) zu kultivieren als dieses in der konventionellen Standkultur möglich ist, bei der der Sauerstoffbedarf der Zellen lediglich über die Verschlusskappe gedeckt werden kann. Daher ist es möglich, auch die von den Zellen sezernierten Produkte in wesentlich höherer Konzentration zu produzieren als in einer konventionellen Standkultur.

Im Vergleich zur Standkultur ( $10^5$  - max.  $10^6$  Zellen/ml) können im miniPERM® Bioreaktor Zelldichten von  $10^7$  Zellen/ml und mehr erreicht werden. Die hohen Zelldichten sind auf die Zufuhr großer Mengen von Nährstoffen und Sauerstoff sowie auf die Entsorgung von Metaboliten und die „Abatmung“ von  $\text{CO}_2$  angewiesen.

Die im miniPERM® Produktionsmodul integrierte Dialysemembran trennt die Zellen und das Zellprodukt von den Nährstoffen und den Metaboliten und gewährleistet somit eine optimale Versorgung der Zellen und Entsorgung der Metabolite. Eine im Produktionsmodul integrierte Silikonmembran sorgt für eine ausreichende  $\text{O}_2$ -Versorgung und  $\text{CO}_2$ -Entsorgung der Zellen.

### Sauerstoffbedarf von Hybridomzellen

Der Sauerstoffbedarf von Hybridomzellen liegt in der Größenordnung von  $5 \mu\text{g O}_2$  pro  $10^6$  Zellen pro Stunde.

Bei einer Zelldichte von  $10^7$  Zellen/ml, (bei z.B. 35 ml total) wie sie in dem miniPERM® Bioreaktor leicht erreicht werden kann, beträgt der Sauerstoffbedarf der  $35 \times 10^7$  Zellen in den 35 ml Suspension des Produktionsmoduls (miniPERM® classic) etwa 1,75 mg/Stunde.

### Produktionsrate

Um eine bestimmte Menge an Zellprodukt (Hybridomzellen: monoklonale Antikörper) zu erzeugen, benötigt man eine entsprechende Anzahl von Zellen. Wie viele Zellen zur Erzeugung einer bestimmten Menge von monoklonalen Antikörpern benötigt werden, hängt von den individuellen Eigenschaften der jeweiligen Zelllinie ab. Hybridomzellen produzieren nach Fazekas de St. Groth, (J. Immunol. Methods 57, 1983, 121) in 24 Std. typischerweise zwischen  $4 \times 10^7$  und  $7 \times 10^8$  Antikörpermoleküle pro Zelle.

### Mediumwechsel

Unter den Stressbedingungen jeder Hochzelldichte-Kulturmethode sind die Zellen auf ein besonders gutes Medium bezüglich Glukose- und  $\text{NaHCO}_3$ -Gehalt angewiesen. Der Glukosegehalt sollte nicht weniger als 4,0 g/l betragen oder das Medium sollte zusätzlich mit Glukose supplementiert werden. Der Gehalt an

$\text{NaHCO}_3$  (DMEM 3,78 g/l) ist in den meisten Medien so gewählt, dass er eine Pufferkapazität für einen Zeitraum von bis zu 2 Wochen gewährleisten kann.

Aufgrund des optimalen Gasaustausches im miniPERM® Bioreaktor, würde sich bei der Hochzelldichte-Kulturmethode im miniPERM® zuerst die Mediumkapazität im Glukosegehalt erschöpfen, bevor der pH-Indikator einen Farbumschlag des Versorgungsmediums von rot nach gelb anzeigt und somit die Pufferkapazität des Mediums, Metabolite zu neutralisieren und abzupuffern, erschöpft ist.

In Abhängigkeit der Zelllinie und des Mediums muss mit zunehmender Zelldichte das Versorgungsmedium häufiger gewechselt werden. Wir empfehlen 1-2 x pro Woche. Als Indikator für hohe Zelldichten ( $10^7$  Zellen/ml im miniPERM®) ist eine Orange-Gelbfärbung des Mediums im Produktionsmodul zu beobachten.

### Handling des miniPERM® Bioreaktors

Das Versorgungsmedium sollte vor dem Einfüllen auf  $37^\circ\text{C}$  temperiert werden, denn nach dem Befüllen und Verschließen des Versorgungsmoduls und dem Einbringen des miniPERM® Bioreaktors in den Inkubator wird sich die über dem Medium befindliche Gasphase (etwa 150 - 200 ml) erwärmen und ausdehnen. Pro  $^\circ\text{C}$  beträgt die Volumenzunahme  $1/273$  des Volumens bei  $0^\circ\text{C}$ . Bei einer Gasphase von 200 ml und bei Verwendung von  $4^\circ\text{C}$  kaltem Medium, also bei einem Temperaturunterschied von  $33^\circ\text{C}$ , würde das Volumen der Gasphase um etwa 24 ml zunehmen und zu einem beträchtlichen Druckanstieg (ca. 0,1 bar) im miniPERM® Bioreaktor führen. Dies könnte zur Aufblähung der Silikonmembran im Produktionsmodul führen.

Es kommt noch ein anderer Effekt hinzu, der typisch für die Kultivierung in  $\text{NaHCO}_3$ -gepufferten Medien in geschlossenen Gefäßen ist und zu einem weiteren Anstieg des Drucks im Versorgungsmodul führt. Da sich in der Gasphase des Versorgungsmoduls zu Beginn der Kultur im allgemeinen Luft und nicht die  $\text{CO}_2$ -haltige Inkubatoratmosphäre befindet, steht dem  $\text{NaHCO}_3$  im Medium nicht der entsprechende  $\text{CO}_2$ -Partialdruck gegenüber. Infolgedessen wird  $\text{NaHCO}_3$  des Mediums zerfallen und  $\text{CO}_2$  an die Gasphase abgegeben werden. Dadurch kommt es zu einem weiteren Druckanstieg, sowie zur Alkalisierung des Mediums.

Durch Äquilibrierung mit der Inkubatoratmosphäre über die Gasaustauschmembran des Schraubverschlusses des Versorgungsmoduls wird sich jedoch innerhalb weniger Stunden wieder der richtige  $\text{CO}_2$ -Partialdruck und damit auch der physiologische pH-Wert einstellen.

# Bedienungsanleitung miniPERM®

## Troubleshooting

Problem	Lösung
Keine Erhöhung der Zelldichte (nach wenigen Tagen liegt der Anteil der toten Zellen bei über 70%)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Erhöhung der Startzelldichte.</li><li>• Die Start-Zellsuspension aus <math>\frac{1}{3}</math> selbstkonditioniertem Medium aus der Zellkulturflasche und <math>\frac{2}{3}</math> frischem Medium herstellen.</li><li>• Erhöhung des Serumanteils im Medium.</li><li>• Herabsetzen der Umdrehungsgeschwindigkeit (bei sehr empfindlichen Zellen, z.B. humane Hybridomzellen, bis auf 0,5 UpM).</li><li>• Verwendung von Additiven im Medium zur Reduzierung der Scherkräfte</li><li>• Nicht mehr als 400 ml Medium in das Versorgungsmodul füllen, um die notwendige Gasphase im Bioreaktor zu erhalten.</li></ul>
Es werden nur mittlere Zelldichten von $< 10^7$ Zellen/ml erreicht	<ul style="list-style-type: none"><li>• Es gibt Zelllinien, bei denen die Zellen nicht in extrem hohen Dichten wachsen, wie z.B. <math>2 \times 10^7</math> Zellen/ml und mehr. Wenn es gelingt, die Zellen durch regelmäßigen Mediumwechsel im Versorgungsmodul in mittlerer Dichte und hoher Vitalität über einen langen Zeitraum zu kultivieren, werden ebenfalls hohe Antikörperkonzentrationen erreicht.</li></ul>
Zellen verklumpen und sterben ab	<ul style="list-style-type: none"><li>• Zellen müssen ständig in Suspension gehalten werden. Wird der Bioreaktor zum Mediumwechsel, Ernte oder Probenentnahme von der Universaldrehvorrichtung genommen und auf die Werkbank gelegt, beginnen die Zellen sofort zu sedimentieren. Sie können verklumpen und evtl. absterben, wenn die einzelnen Arbeitsschritte am Bioreaktor über einen sehr langen Zeitraum durchgeführt werden.</li></ul>
Schaumbildung:  Im Versorgungsmodul und im Produktionsmodul bildet sich sehr viel Schaum, so dass der Druckausgleich nicht ohne Austreten von Schaum durchgeführt werden kann.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Verwendung eines Anti-Schaummittels</li><li>• Herabsetzen des Serumanteils im Medium des Versorgungsmoduls und evtl. im Produktionsmodul.</li><li>• Umdrehungsgeschwindigkeit an der Universaldrehvorrichtung reduzieren</li></ul>
Dauer der Kultur im miniPERM® Bioreaktor	<ul style="list-style-type: none"><li>• In Abhängigkeit von der Wachstumskinetik des Zellklons kann der miniPERM® Bioreaktor bei regelmäßigem Mediumwechsel, Kontrolle der Zelldichte und darauf abgestimmten Ernteintervallen über einen Zeitraum von mehreren Wochen betrieben werden.</li></ul>

Problem	Lösung
<p>Undichtigkeiten:</p> <p>1. An der Grenze zwischen Produktions- und Versorgungsmodul</p> <p>Beim Zusammenbau von Produktions- und Versorgungsmodul müssen die Schnapphaken des Produktionsmoduls in die Aussparungen des Versorgungsmoduls hörbar eingerastet werden. Die Module dürfen auf keinen Fall miteinander verdreht werden.</p> <p>2. An dem Schraubverschluss der Befüllungsöffnung des Versorgungsmoduls</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nach dem Zusammenbau von Produktions- und Versorgungsmodul kontrollieren, ob die Schnapphaken des Produktionsmoduls vollständig über der Ringwulst am Rand des Versorgungsmoduls sitzen. Dazu die Schnapphaken noch einmal einzeln nachfassen, bis sie hörbar einrasten.</li> <li>• Das wiederverwendbare Versorgungsmodul bei max. 121°C und nicht häufiger als 10 x autoklavieren, andernfalls kommt es zu Verformungen und Rissbildungen des Kunststoffmaterials.</li> <li>• Das Versorgungsmodul beim Autoklavieren nicht quetschen, Quetschungen führen zur Verformung.</li> <li>• Ausschließlich 70% pharmazeutisches Ethanol oder Isopropanol zur Desinfektion verwenden. Auf keinen Fall vergällten Alkohol oder Desinfektionsmittel z.B. mit quarternären Ammoniumsalzen oder ionischen Tensiden (Baricidal, Biocidal) zur Desinfektion des miniPERM® Bioreaktors, Inkubators und der Universaldrehvorrichtung verwenden. Diese können zu Rissbildungen und zum Bruch des Kunststoffmaterials führen.</li> <li>• Die Befüllungsöffnung des Versorgungsmoduls mit dem Schraubverschluss fest verschließen.</li> <li>• Sterile Einmal-Schraubverschlüsse sind nicht autoklavierbar.</li> <li>• Die Befüllungsöffnung des Versorgungsmoduls und den Schraubverschluss nicht abflammen. Dies führt zur Verformung des Kunststoffmaterials.</li> <li>• Nach dem Öffnen des Versorgungsmoduls einen neuen Schraubverschluss für das Versorgungsmodul verwenden.</li> </ul>
<p>Druck:</p> <p>Die Silikonmembran des Produktionsmoduls ist ständig aufgebläht. Im miniPERM® Bioreaktor baut sich nicht nur nach dem Mediumwechsel Druck auf, sondern auch während der Kultivierung.</p> <p>Die Silikonmembran im Produktionsmodul zieht sich nach innen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die relative Luftfeuchtigkeit im Inkubator ist zu gering. Es ist eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 90% notwendig.</li> <li>• Nährmedium vor der Befüllung des Versorgungsmoduls auf 37°C temperieren. Bei der Verwendung von kaltem Medium (4°C) kommt es nach dem Einbringen des Bioreaktors in den Inkubator zur Erwärmung und Ausdehnung der Gasphase über dem Medium und somit zur Aufblähung der Silikonmembran.</li> <li>• Für Druckausgleich sorgen. Den Schraubverschluss am Versorgungsmodul lockern (<math>\frac{3}{4}</math> Drehung), anschließend wieder fest verschließen.</li> <li>• Es handelt sich um eine evtl. noch nicht sichtbare Bakterien- oder Pilzkontamination im Versorgungsmodul oder Produktionsmodul.</li> </ul>

# Bedienungsanleitung miniPERM®

Problem	Lösung
<p>Kontaminationen:</p> <p>1. Im Produktionsmodul</p> <p>2. Im Versorgungsmodul</p>	<p>Zunächst sollte ausgeschlossen werden, dass die Kontaminationen von den verwendeten Ausgangsmaterialien (Zellkultursatz, Medium, Zellkulturgefäß, Inkubator usw.) stammen. Absolut steriles Arbeiten ist beim Mediumwechsel, Probennahme oder Ernte erforderlich.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Probennahme über Septumverschluss. Anstelle der Schraubkappen wird das Produktionsmodul mit einem sterilen Septumverschluss verschlossen (Bestellnummer siehe Seite 19).</li><li>• Nach der Probennahme oder Ernte über eine der drei Öffnungen am Produktionsmodul müssen Mediumreste auf dem Rand der Entnahmeöffnung abgesaugt werden.</li><li>• Nach jedem Öffnen sollte eine neue, sterile Schraubkappe verwendet werden.</li><li>• Antischaummittel verwenden denn bei der Verwendung von Serum im Kulturmedium kann es zu Schaumbildung im Bioreaktor kommen. Bei der Entnahme von Proben oder Ernten aus dem Produktionsmodul oder beim Mediumwechsel im Versorgungsmodul kann Schaum aus der Öffnung treten und somit ein Kontaminationsrisiko darstellen.</li><li>• Beim Ausgießen des Mediums aus dem Versorgungsmodul müssen Mediumreste auf dem Rand oder im Gewinde der Befüllungsöffnung abgesaugt werden.</li><li>• Nach jedem Mediumwechsel einen sterilen Schraubverschluss für das Versorgungsmodul verwenden.</li><li>• Bei Kontaminationen, die sich auf das Versorgungsmodul beschränken, kann der Kultursatz gerettet werden, indem die Zellen in einen sterilen Bioreaktor überführt werden.</li></ul>
<p>Welche Umdrehungsgeschwindigkeit wird eingestellt</p>	<p>In Abhängigkeit von Zelltyp und Zelllinie wird die Umdrehungsgeschwindigkeit gewählt.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Generell sollte zu Anfang der Kultur eine etwas niedrigere Umdrehungsgeschwindigkeit eingestellt werden, mit steigender Zelldichte wird die Umdrehungsgeschwindigkeit erhöht.</li></ul> <p>Beispiel: - murine Hybridomzellen 5 - 20 UpM (Display 10 - 40) - humane Hybridomzellen, transfizierte Zellen 2 - 10 UpM (Display 4 - 20)</p> <p><b>Auf dem Display der Steuereinheit wird der doppelte Wert eingestellt, da der Durchmesser des miniPERM® Bioreaktors doppelt so groß ist wie der Durchmesser der Antriebsrolle der Universaldrehvorrichtung.</b></p>
<p>Universaldrehvorrichtung:</p> <p>Die Rollen der Universaldrehvorrichtung bleiben stehen.</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Überprüfen, ob die Universaldrehvorrichtung richtig zusammengebaut ist.</li><li>• Bei häufigerer Reinigung mit Alkohol sollten die Lager der Rollen nachgefettet werden. Achtung! Nicht das Gummimaterial der Rollen fetten. Dies könnte die miniPERM® Bioreaktoren zum Rutschen bringen.</li><li>• Universaldrehvorrichtung auf keinen Fall autoklavieren. Ausschließlich 70% pharmazeutisches Ethanol oder Isopropanol verwenden.</li><li>• Kein n-Propanol verwenden.</li></ul>

## Bedienungsanleitung miniPERM®

Problem	Lösung
Medium  Mediumwechsel	<ul style="list-style-type: none"><li>• Unter den Bedingungen jeder Hochzelldichte-Kulturmethode sind die Zellen auf ein besonders gutes Medium bezüglich Glukose- und NaHCO<sub>3</sub>-Gehalt angewiesen. Die Zellen können in den gleichen NaHCO<sub>3</sub>-abhängigen Medien kultiviert werden, die üblicherweise in der Zellkultur verwendet werden. Das Medium sollte nicht weniger als 4 g Glukose/l enthalten, andernfalls Glukose ergänzen.</li><li>• Bei der Produktion von Proteinen (z.B. monoklonale Antikörper) sollte in Abständen von bis zu 7 Tagen, bei der Produktion von Biomasse in Abständen bis zu 5 Tagen das Medium gewechselt werden.</li><li>• Das Medium im Versorgungsmodul darf auf keinen Fall gelb werden. Sobald eine Veränderung der Mediumfarbe von lachsrot nach lachsrot-gelblich zu sehen ist, ist die Kapazität, Metabolite aufzunehmen und abzupuffern, erschöpft.</li></ul>
Serum	<ul style="list-style-type: none"><li>• Unter den Bedingungen der Hochzelldichte-Kulturmethode ist eine ausreichende Supplementierung des Kulturmediums mit Serum von größter Bedeutung. Der Serumanteil sollte für die Kultivierung im miniPERM® Bioreaktor auf keinen Fall geringer sein als in der Standkultur.</li><li>• Bei der Produktion monoklonaler Antikörper oder anderer Proteine sollte die Serumkonzentration im Produktionsmodul 5 bis 30% betragen. Bei der Produktion von Biomasse ist in den meisten Fällen eine Serumkonzentration von bis zu 10% ausreichend.</li><li>• Im miniPERM® Versorgungsmodul kann die Serumkonzentration halbiert oder sogar auf 0 reduziert werden. Serumbestandteile, deren molekulare Größe mehr als 12,5 kDa betragen, können die Dialysemembran nicht passieren.</li><li>• Es ist ebenso möglich, Hybridomzelllinien oder andere Zelllinien im miniPERM® Bioreaktor in serum- oder proteinfreiem Medium zu kultivieren. Die Zellen sollten vor der Kultivierung im miniPERM® Bioreaktor auf die serum- bzw. proteinfreien Mediumbedingungen adaptiert werden. Adaptionmethode beachten!</li></ul>



## Publikationen

Bruce, M.P.; Boyd, V.; Duch, C.; White, J.R.

### **Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies -alternatives to ascites production in mice.**

Journal of Immunological Methods 264, No. 1-2, (06/2002) 59-68

Caulfield, J.J.; Fernandez, M.H.; Sousa, A.R.; Lane, S.J.; Lee, T.H.;Hawrylowicz, C.M.

### **Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids**

Immunology 98 (1999) 104-110

Falkenberg, F.W.

### **Production of monoclonal antibodies in the miniPERM® bioreactor: comparison with other hybridoma culture methods**

Res. Immun. 6/149 (1998) 560-570

Falkenberg, F.W.; Weichert, H.; Krane, M.; Bartels, I.; Palme, M.; Nagels, H.-O.; Fiebig, H.

### **In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter**

J. Immun. Meth. 179 (1995) 13-29

Kagan, E.; Vieira, E.; Petrie, H.T.

### **Comparison of hollow fiber bioreactors and modular minifermenters for the production of antibodies**

CAAT-OPRR Workshop on Alternatives in Monoclonal Antibody Production, 9/1997, Harborplace Hotel Baltimore, MD

Little, M.; Kipriyanov, S.M.; Le Gall, F.; Moldenhauer, G.

### **Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies**

Review Immunology Today (08/00) 364-370

Metzger, J.; Nicklisch, N.; Schmidt, B.; Kufer, P.; Peschel, C.; Bernhard, H.

### **Induction of a T helper cell response against the tumor associated antigen HER-2 using monocyte-derived dendritic cells**

ESACT-Meeting 09/2001, Sweden

Raulf-Heimsoth, M.; Sander, I.; Zhiping, Ch.; Borowitzki, G.;

Diewald, K.; van Kampen, V., Baur, X.

### **Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of the latex allergen Hev b Int.**

Arch. Allergy Immunol. 123 (2000) 236-241, 8/2000

Schütt, C.; Fürll, B.; Stelter, F.; Jack, R.S.; Witt, S.

### **CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture**

Journal of Immunological Methods 204 (1997) 99-102

Vollmers, H.P.; Dämmrich, J.; Wozniak, E.; Bier, D.; Müller-Hermelink, H.K.

### **Apoptotic in vitro and in vivo activity of the human monoclonal antibody SC-1 on stomach cancer cells**

2nd International Gastric Cancer Congress, Munich, Germany, 04/1997

Konstantinov, M.; Mindova, M.; Gospodinov, P.; Genova, P.

### **Three-Dimensional Bioreactor Cultures: A Useful Dynamic Model for the Study of Cellular Interactions**

N.Y. Acad. Sci. 1030: 103-115 (2004)

Dewar, V.; Voet, P.; Denamur, F.; Smal, J.

### **Industrial Implementation of in Vitro Production of Monoclonal Antibodies**

ILAR Journal, Volume 46, Number 3 (2005)

Berlin, V.; Rousselle, P.

### **Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-Based Bioreactor**

Protein Expr. Purif 48(1): 43-48, 2006

## Anwendungsberichte

Vollmers, H.P.; Wozniak, E.

### **Kultivierung von humanen Hybridomzellen im miniPERM® Bioreaktor**

Universität Würzburg, Deutschland

Tutas, M.

### **Kultivierung von Maus-Hybridomzellen im miniPERM® Bioreaktor mit proFree mab**

Cell Diagnostica GmbH, Deutschland

Lingnau, A.

### **Kultivierung IgM-produzierender Hybridome im miniPERM® Bioreaktor**

VM-PRO GmbH, Luckenwalde, Deutschland

Schliephacke, T.; Käppel, S.

### **Langzeitproliferation von CHO-Zellen im miniPERM® Bioreaktor**

iOnGen AG, In vitro Systems Services GmbH, Deutschland

Müller, S.

### **Kultivierung von HEK-U293 Zellen als Suspensionskultur im miniPERM® Bioreaktor**

Knöll AG Ludwigshafen, Deutschland

Prestle, J.; Ott-Gebauer, S.

### **Produktion von rekombinanten Adenoviren im miniPERM® Bioreaktor**

Universität Göttingen, Deutschland

Sponaas, A.; Anding, P.

### **Kultivierung einer murinen makrophagenähnlichen Zelllinie (J774) im miniPERM® Bioreaktor**

Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, Deutschland

Dobner, T.

### **Kultivierung von Insektenzellen (SF9 Zellen - Baculovirussystem) im miniPERM® Bioreaktor**

Universität Regensburg, Deutschland

Schillo, M.; Meyer, N.; Bentrop, J.

### **Kultivierung von Insektenzellen (Drosophila Schneiderzellen [S2]) im miniPERM® Bioreaktor**

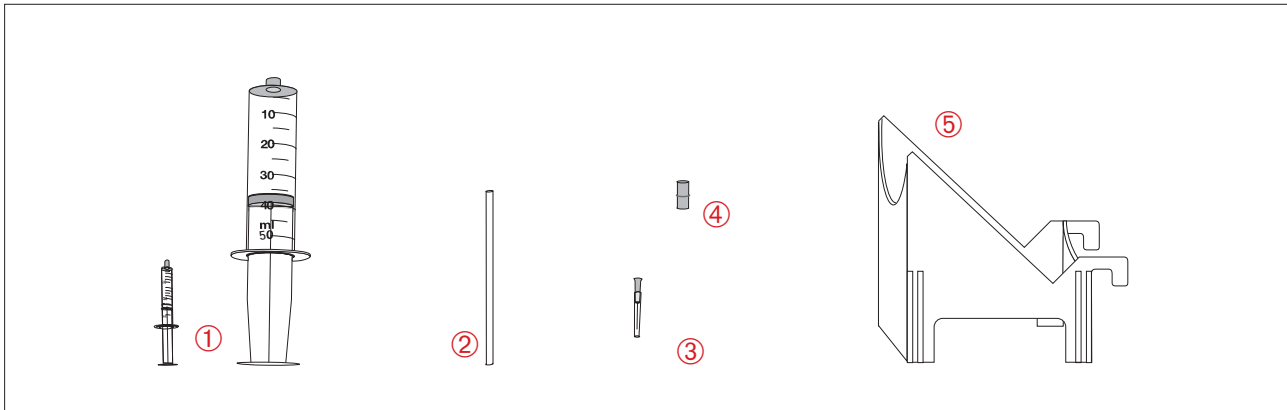
Universität Karlsruhe, Germany

Wuppermann, F.

### **Kultivierung einer murinen Hybridom-Zelllinie im miniPERM® classic and miniPERM® HDC 50 Bioreaktor**

LCTech GmbH, Dorfen, Deutschland

## miniPERM® Zubehör



Folgendes Zubehör wird für die einfache Handhabung des miniPERM® Bioreaktors angeboten:

### ① Sterile 2 ml und 50 ml Einzelspritzen mit Luer- und Luer-Lock-Anschluss

Die Einzelspritzen eignen sich zum einfachen und sicheren Animpfen des Bioreaktors mit der Zellsuspension (50 ml) sowie für die Entnahme von Proben und Ernten. Die Probenentnahme sollte mit der 2 ml Einzelspritze und entsprechender Kanüle durchgeführt werden.

### ② Steriles Einfüllröhrchen 5"

Um die vorbereitete Zellsuspension aus dem Zentrifugentröhrchen in eine Einzelspritze aufzunehmen, wird das halbflexible Einfüllröhrchen auf den Luer-Lock-Anschluss der Einzelspritze (50 ml) gesteckt und die Zellsuspension in die Einzelspritze aufgenommen. Die Öffnung des Einfüllröhrchens ist groß genug, so dass keine Scherkräfte entstehen können, die die Zellen schädigen könnten.

### ③ Kanüle Luer 25G x 5/8"

Die Kanüle mit geringer Länge eignet sich in Verbindung mit einer Einzelspritze (2 ml) zur Probenentnahme über einen Septumverschluss ohne dabei die Dialysemembran zu beschädigen.

### ④ Septumverschluss (IN-Stopfen)

Um die Handhabung zur Probenentnahme zu erleichtern und das Kontaminationsrisiko zu verringern, können ein bis zwei der Schraubkappen des Produktionsmoduls (Luer Lock) gegen sterile Septumverschlüsse ausgetauscht werden.

Der Septumverschluss ermöglicht das Hinzufügen von Flüssigkeiten oder die Entnahme von Proben aus dem Produktionsmodul mittels steriler Einzelspritze, ohne

das Produktionsmodul dabei zu öffnen. Nach 5- bis 6-maligem Einstecken sollte der Septumverschluss gegen einen neuen Verschluss ausgetauscht werden.

### ⑤ miniPERM® Ständer

Der miniPERM® Ständer dient der einfachen Handhabung während des Animpfens, der Probenentnahme und der Ernte.

### Start-up Support Kit

Zubehör zum Starten der Kultur, zur Probenentnahme und zur Ernte. Bestehend aus:

- Einzelspritze, 50 ml Luer Lock, steril (8x)
- Einzelspritze, 2 ml Luer, steril (20x)
- Einfüllröhrchen (Einfülltubus 5"), steril (8x)
- Kanüle Luer (25G x 5/8"), steril (20x)
- Septumverschluss, steril (6x)
- miniPERM® Ständer (1x)

# Bedienungsanleitung miniPERM®

## Bestellinformation

Bestell-Nr.	Beschreibung		Verpackung Stück/Karton
94.6001.059	miniPERM® classic	Bioreaktor, steril	12
94.6001.055	miniPERM® classic	Produktionsmodul, steril	12
94.6077.121	miniPERM® HDC 50	Bioreaktor, steril	12
94.6077.017	miniPERM® HDC 50	Produktionsmodul, steril	12

## Bestellinformation Zubehör

Bestell-Nr.	Beschreibung		Verpackung Stück/Karton
94.6001.153	Versorgungsmodul für miniPERM®, autoklavierbar		4
94.6001.054	Ständer für miniPERM®		4
94.6001.036	Schraubkappen für Produktionsmodul, steril		6
94.6077.037	Schraubverschluss für Versorgungsmodul, steril		16
94.6077.135	Kanüle Luer 25G x 5/8" (0,5 x 16 mm), steril		100
94.6077.136	Einmalspritze, 2 ml Luer, steril		100
94.6077.137	Einmalspritze, 50 ml Luer Lock, steril		60
94.6077.138	Einfülltubus 5", steril		100
94.6001.094	Start-up Support Kit	Stückzahl	1
	• Einmalspritze, 50 ml Luer Lock, steril	8	
	• Einmalspritze, 2 ml Luer, steril	20	
	• Einfülltubus 5", Luer, steril	8	
	• Luer Kanüle, 25G x 5/8", steril	20	
	• Septumverschluss, steril	6	
	• miniPERM® Ständer	1	

## Bestellinformation – Universaldrehvorrichtung / Zubehör

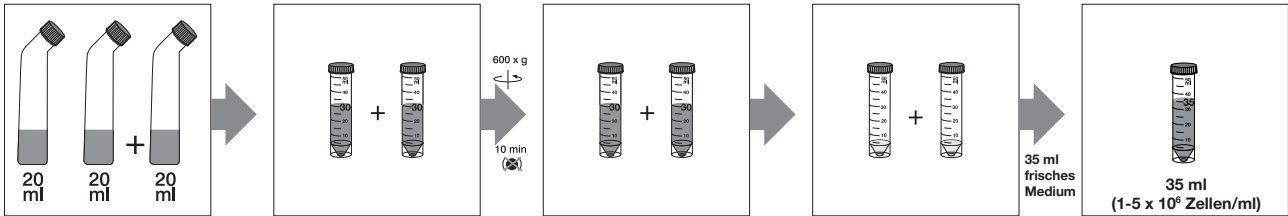
Bestell-Nr.	Beschreibung	Verpackung Stück/Karton
94.6001.061	Universaldrehvorrichtung 115/230 V	1

# Bedienungsanleitung miniPERM®

## Kurzbedienungsanleitung

Am Beispiel des miniPERM® classic Produktionsmoduls mit 35 ml Zellsuspension. Bei der Verwendung des miniPERM® HDC 50 Produktionsmoduls werden 1-5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in 50 ml Medium vorbereitet.

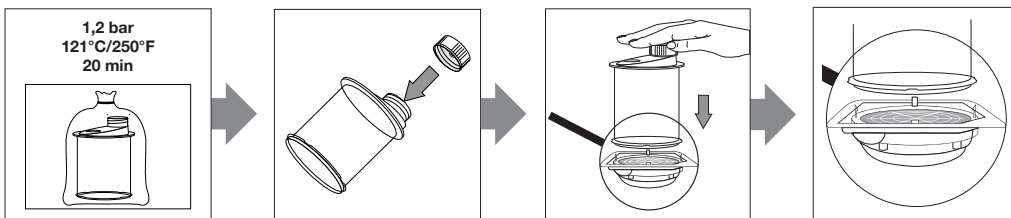
## Vorbereitung der Zellen



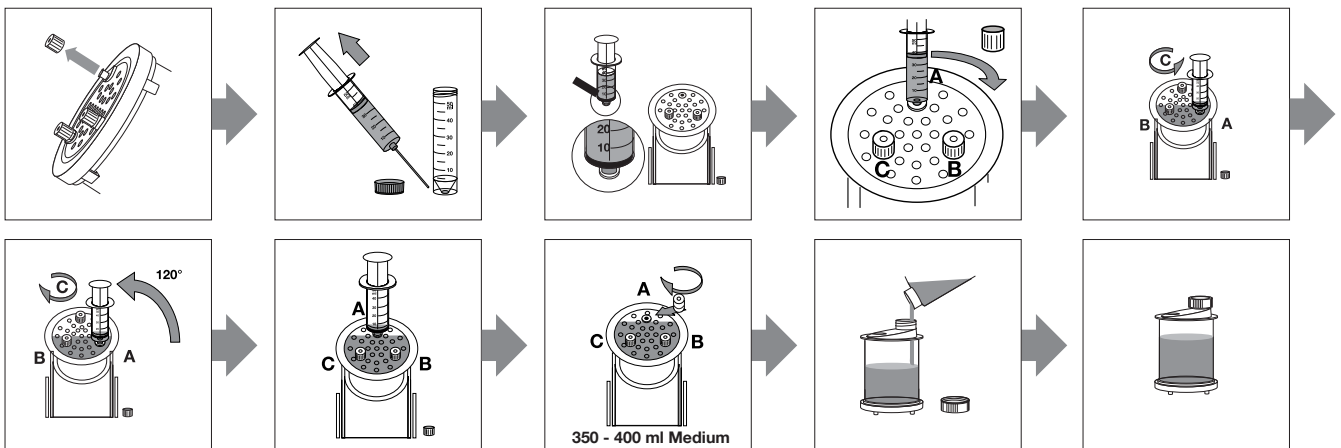
## Vorbereitung des miniPERM® Bioreaktors

(Der Bioreaktor steril kann ohne Vorbereitung eingesetzt werden)

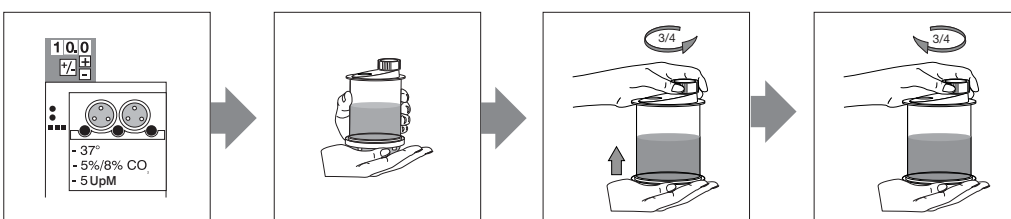
Autoklavierbares Versorgungsmodul:



## Befüllen des miniPERM® Bioreaktors

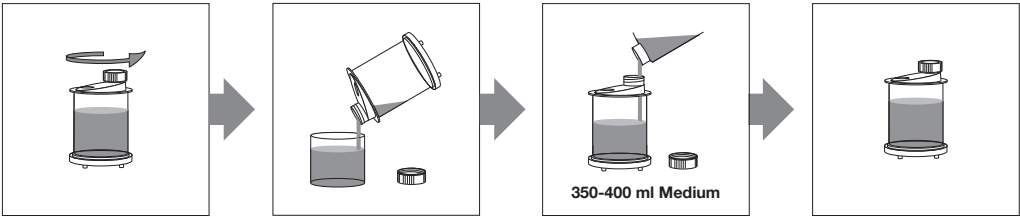


## Konditionierung

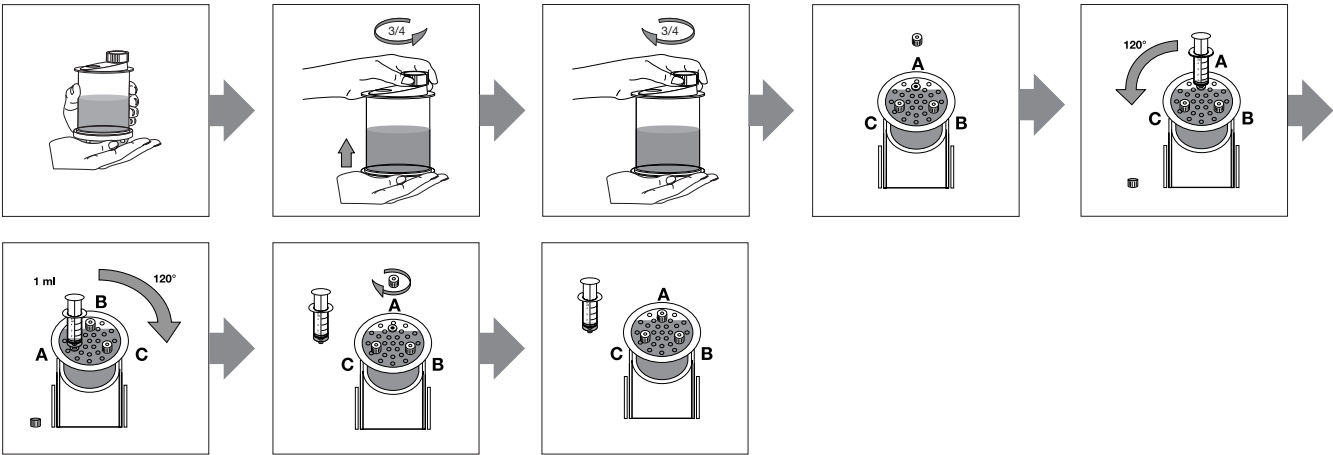


# Bedienungsanleitung miniPERM®

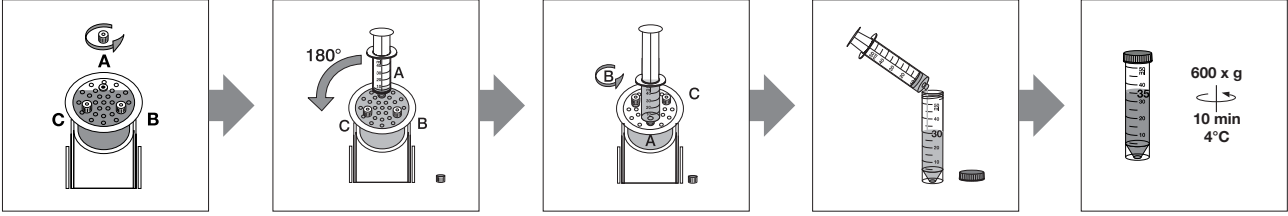
## Mediumwechsel



## Probenentnahme



## Ernte



# Bedienungsanleitung miniPERM®

---



# User Manual

## miniPERM<sup>®</sup>







## Contents

Introduction .....	26
Design and function of the miniPERM® bioreactor	
Operating instructions.....	28
Example of hybridoma cell culture	
High density cell culture in the miniPERM® bioreactor .....	34
High density cell culture	
Oxygen requirement of hybridoma cells	
Production rate	
Changing the medium	
Handling of the miniPERM® bioreactor	
Troubleshooting .....	35
Problems and solutions	
Literature .....	39
Publications and application notes	
Accessories.....	40
Ordering information .....	41
Brief instruction manual .....	42

Applies to labelled products:



Do not use if package is damaged



In case of re-use: risk of contamination



## Introduction

### Design of the miniPERM® bioreactor

miniPERM® is a bioreactor made of two connected modules designed for the cell culture of hybridoma and other cells in high densities ("high density culture"). It consists of:

- a disposable **production module** which serves as a culture chamber with a volume of 35 ml or 50 ml (miniPERM® classic or HDC 50); and
- an autoclavable, reusable or sterile disposable **nutrient module** made of plastic (polycarbonate) which serves as a media reservoir with 550 ml volume that is attached to the production module.

To separate the two modules, the production module is fitted with a semi-permeable **dialysis membrane** (MWCO 12.5 kDa) on the side facing the nutrient module, when the two modules are connected.

The outer part of the production module is made of a thin, gas-permeable **silicone membrane**.

The screw cap of the nutrient module has an integrated **gas-exchange membrane**.

## Function of the miniPERM® bioreactor

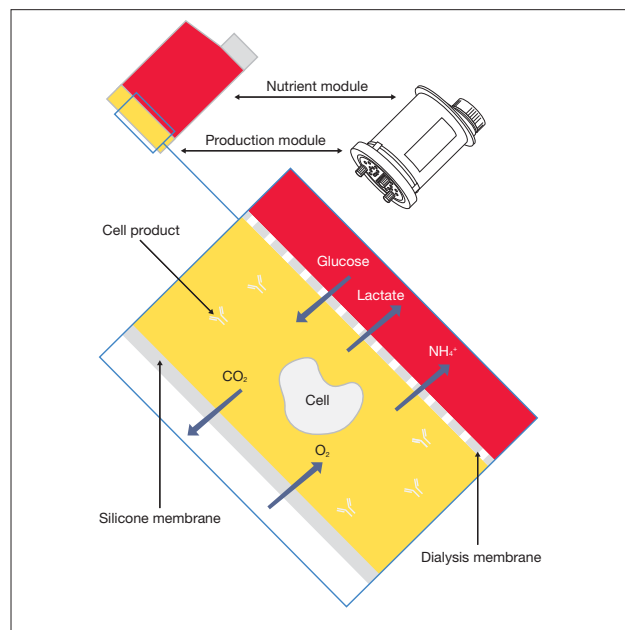
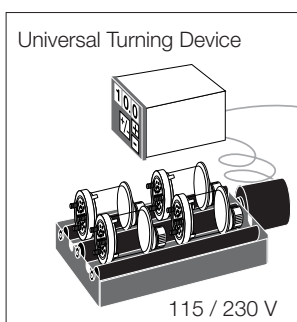
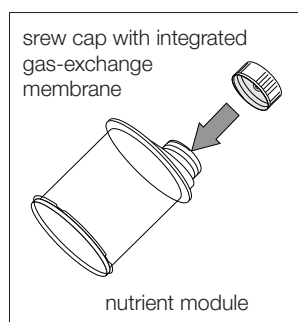
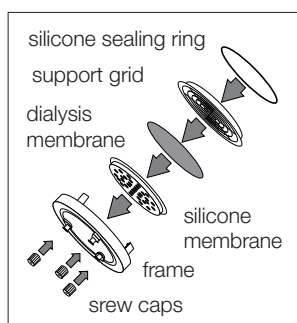
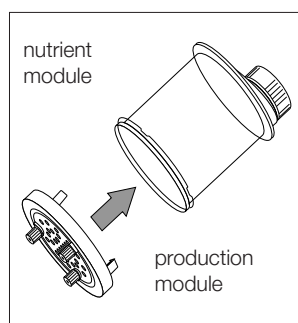
### 1. Dialysis membrane

Neither the cells nor high molecular weight products released by the cells, e.g. secreted monoclonal antibodies, can pass through the semi-permeable dialysis membrane.

However, nutrients (glucose, amino acids), vitamins, ions, and gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) dissolved in the medium can diffuse from the nutrient module into the production module. Due to more than a 10 fold excess of nutrient medium, the cells are provided with substances necessary for cultivation over a long period of time.

Simultaneously, acidic (e.g. lactic acid), toxic (e.g. ammonium ions) and other low molecular mass products of the cell metabolism diffuse from the production module through the dialysis membrane into the nutrient module where they are diluted and neutralised in the large excess of medium.

The discharge of  $CO_2$  from the miniPERM® is further promoted by the fact that  $CO_2$  (dissolved in the culture medium both physically and in the form of  $NaHCO_3$ ) can pass through the dialysis membrane from the production module to the nutrient module.



The dialysis membrane is covered with a support grid facing the nutrient module. This grid has two functions:

It protects the dialysis membrane from mechanical damage, and provides a means of swirling the nutrient medium at the dialysis membrane surface leading to an improved diffusion of nutrients and metabolic products.

## **2. Silicone membrane**

Oxygen requirements are fulfilled by O<sub>2</sub> diffusing from the incubator atmosphere into the production module through the silicone membrane. The CO<sub>2</sub> produced by the cells in corresponding quantities leaves the production module via the same route. The high CO<sub>2</sub> permeability of the silicone membrane in the production module means the NaHCO<sub>3</sub> in the medium is at equilibrium with the CO<sub>2</sub> in the incubator atmosphere.

## **3. Screw cap with gas-exchange membrane**

The gas-exchange membrane in the screw cap of the nutrient module enables equilibration of pressure between the bioreactor and the outer environment.

## **4. Universal Turning Device**

For optimal supply of nutrients and removal of metabolic waste products through the membranes, cells and the medium must be circulated continuously. Therefore, the miniPERM® bioreactor is rolled in a Universal Turning Device during cultivation.

Due to the exceptionally high cell densities produced in the miniPERM®, a higher than usual turning speed is required. For this reason, we recommended the use of the Universal Turning Device which can rotate the miniPERM® from 0.1 to 40 rpm compared to standard turners that usually have a maximum speed of 2.5 rpm.

## Operating Instruction



All the operations described below must be carried out in a sterile hood!

Cells are cultivated under normal laboratory conditions, centrifuged and adjusted to the specified density.



Ensure the clips of the production module are completely snapped!



It is very important that the nutrient module is autoclaved to a maximum of 121°C and no more than 10 times. Higher temperatures lead to deformation of the polycarbonate.



Before connecting the two modules, unscrew the screw cap of the nutrient module (to prevent pressure build-up)!

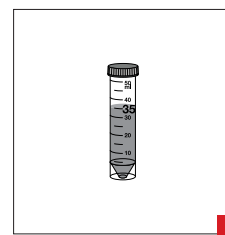


Ensure the clips of the production module are completely snapped!

### 1. Preparation of cells for culturing in the miniPERM® bioreactor using hybridoma cells as example

The miniPERM® classic culture can be started with about 35 to 37 ml of a cell suspension containing approximately 1 to 5 x 10<sup>6</sup> cells/ml (35 to 185 x 10<sup>6</sup> cells total) (fig. 1). In most cases, the contents of 1 to 2 well grown 150 cm<sup>2</sup> cell culture flasks are sufficient for this purpose.

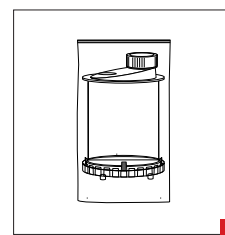
For using the miniPERM® HDC 50 production module the cell suspension contains 1 to 5 x 10<sup>6</sup> cells/ml in 50 ml.



### 2. Preparation of the miniPERM® bioreactor

#### 2.1 Pre-assembled miniPERM® sterile

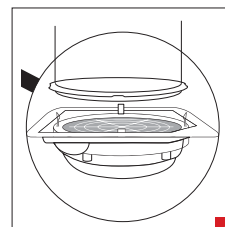
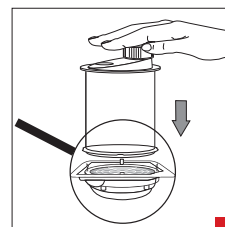
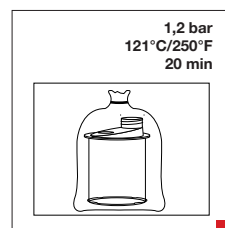
In this version, the miniPERM® has been assembled from the two modules and sterilized. This represents a single-use product. It is not autoclavable. It can be used without further treatment (fig. 2).



#### 2.2 Multiple-use miniPERM®

The production modules are supplied as disposables in an alu pouch. The reusable nutrient module must be sterilized by autoclaving to a maximum of 121°C prior to use.

- Pack the nutrient module in an autoclaving bag (fig.3) and autoclave it without the screw cap for 20 min to a maximum of 121°C (also refer to item 7).
- The alu pouch of the production module is opened to ensure the production module is resting on the screw caps of the Luer Lock-connectors. The production module should be left in the plastic pack!
- The autoclaved nutrient module is now pushed against the sealing ring of the production module (figs. 4 and 4a) until the snapper clips of the production module are snapped audibly into the indentations on the rim of the nutrient module.
- The plastic pack of the production module can now be removed.
- The assembled miniPERM® is now ready for use.





## 3. Filling the miniPERM® bioreactor

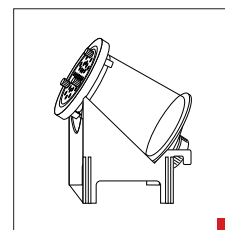
### 3.1 Introducing the cell suspension into the production module

The cell suspension is introduced into the production module with a syringe through one of the three ports equipped with Luer Lock connectors:

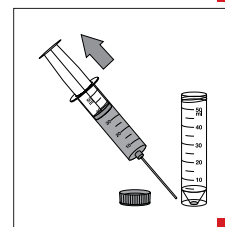
- Mount the miniPERM® bioreactor on the stand with the production module on top so that one of the three Luer Lock connectors is positioned at the highest point (fig. 5).
- Draw up the prepared cell suspension (35 or 50 ml) through a sterile filling tube (5") using a disposable syringe ( $\leq 50$  ml). Remove air bubbles from the syringe before injecting the cell suspension (fig. 6).
- Remove the screw cap at the uppermost point (A). Screw the syringe (without the filling tube) onto the Luer Lock connector (fig. 7).
- Turn the miniPERM® bioreactor so that one of the other screw caps is positioned at the highest point.
- Loosen a second screw cap at the uppermost point (C). Inject the cell suspension slowly into the production module (fig. 8).
- Close the Luer Lock connector of the port at position C tightly with a screw cap (fig. 9).
- Turn the miniPERM® bioreactor back so that the port (A) to which the syringe has been attached is positioned at the uppermost point again (fig. 10).
- Remove the syringe. Air bubbles should be removed by pressing the silicone membrane.
- Close the production module by tightly screwing a screw cap or a septum cap (see Troubleshooting) onto the Luer Lock connector of the third port in position A (fig. 11).

 When the cell suspension is introduced the air displaced by the medium must be released through one of the other ports! Therefore, a second screw cap should be loosened.

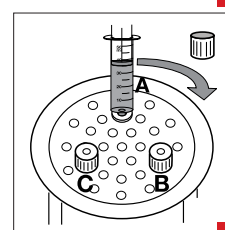
 Medium at the rim of the filling port must be thoroughly removed (by drawing up with an exhauster before closing the port).



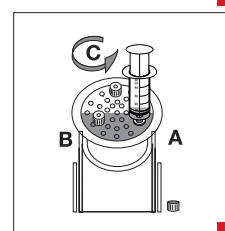
5



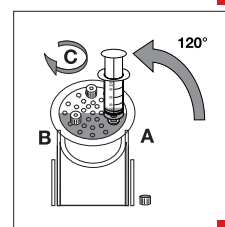
6



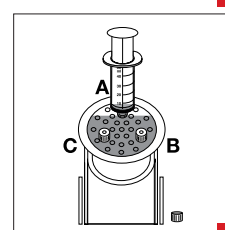
7



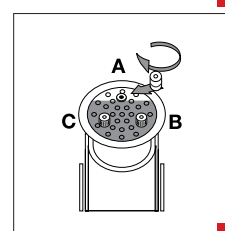
8



9



10



11



Do not fill more than 400 ml into the nutrient module. An air space must be maintained above the nutrient medium for successful cultivation.



The rolling speed must be selected according to the robustness of the cells, e.g.

- murine hybridoma cells: 5 to 20 rpm
- human hybridoma and transfected cells: 2 to 10 rpm

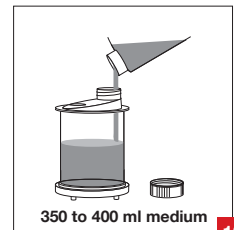


Since the diameter of the miniPERM® bioreactor is twice the size of the rolls of the Universal Turning Device, miniPERM® rotates at half the set speed.

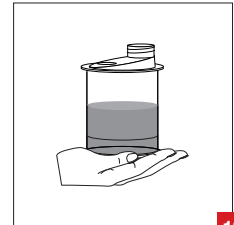
### 3.2 Introducing the medium into the nutrient module

The nutrient module is filled with medium through the large neck opening which is fitted with a screw cap as follows:

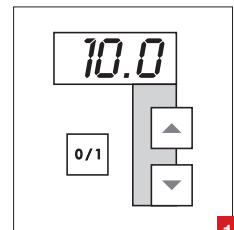
- Remove the screw cap from the neck opening of the nutrient module and pour in 350 to 400 ml of tempered nutrient medium (fig. 12).
- To remove pressure in the miniPERM® bioreactor, press your hand against the silicone membrane of the production module (fig. 13).
- Close the neck opening with the screw cap. Tighten the screw cap applying a slight pressure only.
- Place the miniPERM® bioreactor onto the Universal Turning Device and set the speed at the Control Unit on 0.1 to 40 rpm.



12





13




14

The above rolling speeds refer to the display on the Control Unit. miniPERM® actually rotates at half this speed.

 Under no circumstances should the screw caps of the three Luer Lock connectors of the production module be opened when the silicone membrane is extended! The excess pressure in the nutrient module would cause the cell suspension to spurt out and be lost. In addition, the outside of the miniPERM® bioreactor would be contaminated.

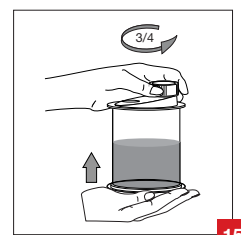
 Should foam accumulate in the production module which is often the case when FCS is used as a medium supplement, it is difficult to loosen the screw cap of the production module without getting foam into the thread. To solve this problem, an antiFOAM® agent can be used in the nutrient module (see Troubleshooting).

 Medium at the rim of the harvest port must be thoroughly removed (by drawing up with an exhaustor) before closing the port.

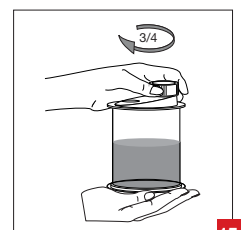
## 4. Taking samples

### 4.1 Taking samples through a port of the production module

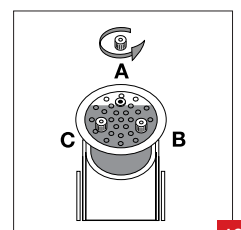
- Place the miniPERM® bioreactor in a sterile hood.
- Ensure that pressure is released. Hold the miniPERM® bioreactor with one hand applying light pressure to the silicone membrane. With the other hand loosen (do not unscrew) the screw cap of the nutrient module, so excess pressure is released (see figs.15/15a). Close tightly again.
- Position the miniPERM® bioreactor on the stand so that one of the ports of the production module is at the highest point (A) and remove the screw cap of this connector (fig. 16).
- Fit a syringe of suitable size (approx. 1 ml, depending on the sample volume to be taken) onto the Luer Lock connector in position A (fig. 17).
- Turn the miniPERM® bioreactor so that the sampling port (A) with the attached syringe is positioned below the level of the liquid in the production module (fig. 17). Draw up the sample into the syringe.
- Before removing the syringe, miniPERM® bioreactor must be turned so that the sampling port with the attached syringe is positioned at the uppermost point (fig. 18).
- After removing the syringe air bubbles should be removed by pressing the silicone membrane with the fingers.
- Close the Luer Lock connector of the sampling port with a sterile screw cap (fig. 19) and return the miniPERM® bioreactor to the incubator.



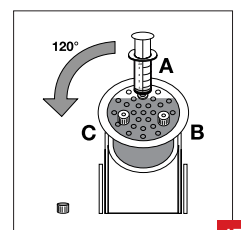
15



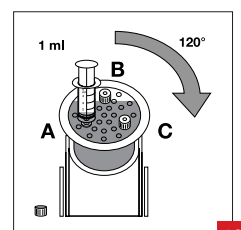
15a



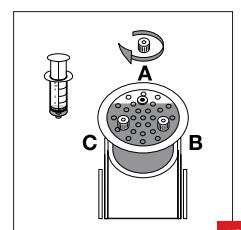
16



17



18



19

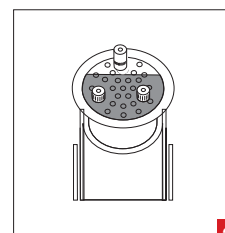


Small diameter needles (25G x 5/8") should be used in order to retain the sterile barrier. The septum caps should be replaced after they have been pierced 5 or 6 times.

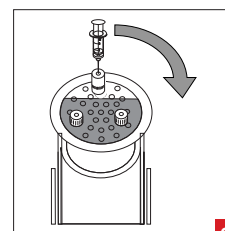
## 4.2 Taking samples through a septum

One of the three ports can be replaced with a septum cap which maintains the sterile barrier for sample removal.

- Prepare the miniPERM® bioreactor as described in 4.1.
- Clean the hole of the septum cap with a pad soaked in 70% pharmaceutical ethanol.
- Pierce a sterile needle with syringe ( $\leq 5$  ml) in the hole of the septum cap.
- Turn the miniPERM® bioreactor so that the septum cap with the attached syringe is positioned below the level of the liquid in the production module (fig. 21).
- Draw the sample into the syringe.
- Remove the needle from the septum cap.
- Clean the hole of the septum cap with a sterile pad soaked in 70% pharmaceutical ethanol.



20



21

## 5. Harvesting

The interval and volume of harvesting depend on the cell density and the amount of product which the cells produce. Once or twice a week on an average, 2/3 of supernatant is harvested. Harvesting is done essentially the same way as sampling.

- Prepare the miniPERM® bioreactor as described in 4.1.
- In order to prevent a negative pressure in the production module whilst drawing up the harvest with a syringe, it is necessary to loosen a second screw cap at position B (fig. 22).
- Draw the harvest into syringe.
- Close the second port (B) with a sterile screw cap.
- Turn the bioreactor so that the harvesting port (A) with the attached syringe is positioned at the uppermost point and remove the syringe.
- The volume extracted should be replaced by fresh medium, see 3.1.

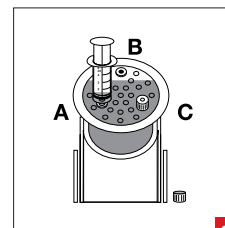
Depending on the cell density reached the harvested cells could be resuspended in fresh media and reinjected into the production module.



Harvesting must be quick to prevent the cells from settling and clumping.



Medium at the rim of the harvest port must be thoroughly removed (by drawing up with an exhaustor)!



22





Cleanliness is of utmost importance when changing the medium.



Risk of contamination! Care must be taken to ensure that no traces of the medium have been left on the thread of the filling port or run down the sides of the nutrient module. Should this occur, remove via an exhaustor or with a sterile pad soaked with 70% pharmaceutical ethanol. Do not flame.



For disinfectants of the screw cap do not use ethanol, propanol or disinfectants/solvents that contain alcohol as their use will impair function of the PTFE membrane. Rinse with distilled water only.



For disinfection use only 70% pharmaceutical grade ethanol or isopropanol for the miniPERM® bioreactor, the Universal Turning Device, the incubator and water bath.

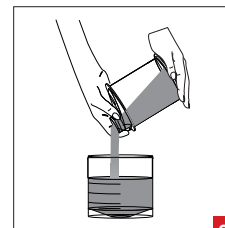
All other chemicals, especially quaternary ammonium complexes may cause microcracks.

Do not use n-propanol!

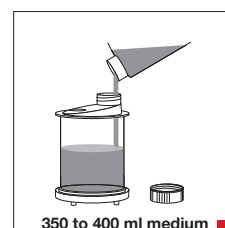
## 6. Changing the medium in the nutrient module

Replacing the spent medium with fresh medium follows the same procedure as described in 3.2 for the first filling of the nutrient module.

- Place the miniPERM® in a sterile hood.
- Unscrew the screw cap of the neck opening on the nutrient module.
- Pour the used medium into a disinfected waste bottle (fig. 23).
- Fill 350 to 400 ml of fresh tempered (37°C) medium into the nutrient module (fig. 24).
- Remove pressure in the miniPERM® following the same procedure as described in 3.2 for pressure equilibration.
- Close the neck opening with a sterile screw cap. Tighten the screw cap applying a slight pressure only.



23

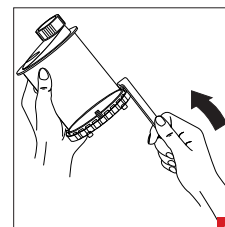


24

## 7. Cleaning and sterilisation of the nutrient module (multiple-use nutrient module)

The reusable nutrient module can be autoclaved at least ten times without changes to the material. To avoid damage to the polycarbonate, the nutrient module should be placed freely, i.e. not subjected to pressure in the autoclave. The maximum autoclave temperature is 121°C.

- The modules are separated at the end of the culture, using the hook end of the opener provided, to gently prise open the snapper clips. The production module can then be easily removed from the nutrient module (fig. 25).
- Clean the nutrient module only with hot water and neutral or weak acid or alkaline detergent without rinsing agents. Rinse with ample water to completely remove the detergent. Do not use an automatic dish washer.
- Autoclave the nutrient module without the screw cap for 20 min, to a maximum of 121°C. Do not use any alkaline-based corrosion protector in autoclave boiler water.



25

## 8. Cleaning the Universal Turning Device

The Universal Turning Device can be disinfected with a cloth soaked in 70% pharmaceutical grade ethanol or isopropanol. Do not use n-propanol. Do not autoclave the Universal Turning Device.

## High density cell culture in miniPERM®

### 'High density cell culture'

The design of the miniPERM® bioreactor makes it possible to culture cells to considerably higher densities ('high density cell culture') than in conventional stationary culture in which the oxygenation of the cells can only be achieved via gas exchange through the cap. Consequently, the cellular products are secreted in much higher concentrations compared to conventional cultures.

Cells cultured in high density are very much dependent on optimal culture, so they are more sensitive to disturbances than cells in conventional stationary culture at densities of  $10^5$  to  $10^6$  cells/ml.

Due to the high density ( $10^7$  cells/ml and greater) the cells are dependent on the continuous supply of large quantities of nutrients and oxygen and on the removal of metabolic waste products and  $\text{CO}_2$ .

### Oxygen requirement of hybridoma cells

The oxygen consumption rate of hybridoma cells is in the order of  $5\mu\text{g}$  per  $10^6$  cells per hour.

With a cell density of  $10^7$  cells/ml, (which is easily attainable in the miniPERM® bioreactor), the oxygen requirement of the  $35 \times 10^7$  cells cultivated in the 35 ml (miniPERM® classic) of the production module is approximately 1.75 mg/hour.

### Production rate

To produce a certain amount of product (monoclonal antibodies in the case of hybridoma cells), a certain number of cells are needed. The number of cells required depends on the individual properties of the cells cultured. According to Fazekas de St. Groth (J. Immunol. Methods 57, 1983, 121) hybridoma cells typically produce between  $4 \times 10^7$  and  $7 \times 10^8$  antibody molecules per cell in a 24-hour period.

### Changing medium

The stressful conditions of high density cell culture means the cells require a medium of particularly high quality with respect to the content of glucose and  $\text{NaHCO}_3$ . The content of glucose should not be less than 4 g/l. If less, the medium should be supplemented with additional glucose. Most media have an  $\text{NaHCO}_3$  content (DMEM 3.78 g/l) which ensures a buffer capacity up to 2 weeks. Due to the optimal gas exchange in the miniPERM® bioreactor and the high cell density the initial glucose content would be exhausted before the pH colour change of the nutrient medium is indicated from red to yellow. Thus, the buffer capacity of the medium to neutralize and to buffer metabolic waste products is exhausted.

The interval of the medium change depends on the cell line, the medium and the increase of the cell density. We suggest 1 to 2 times per week. An orange-yellow colour of the medium in the production module is indicative of a high cell density ( $> 10^7$  cells/ml).

### Handling of the miniPERM® bioreactor

The temperature of the nutrient medium should always be brought to  $37^\circ\text{C}$  before the module is filled. After miniPERM® is filled with nutrient medium and introduced to the incubator, the air above the medium heats and expands. This expansion can be substantial: per  $1^\circ\text{C}$  in temperature the increase in volume is  $1/273$  of the volume at  $0^\circ\text{C}$ . Thus, the volume increases by about 24 ml if the temperature in the space above the medium in the nutrient module rises from  $4^\circ\text{C}$  to  $37^\circ\text{C}$ . This increase in volume would cause a substantial rise in pressure (more than 0.1 bar) in the nutrient module of the miniPERM®. This would lead to expansion of the silicone membrane of the production module.

There is another effect typical for cultures with  $\text{NaHCO}_3$ -buffered media in a closed bioreactor which causes a further rise of pressure in the nutrient module. When a culture is started, there is usually atmospheric air rather than the  $\text{CO}_2$  containing incubator atmosphere in the air space above the medium of the nutrient module. Therefore, the  $\text{NaHCO}_3$  in the medium decomposes, and the  $\text{CO}_2$  is released into the space above the medium of the nutrient module. The result is a further rise in pressure in the nutrient module and alkalisation of the medium.

These differences in overall and  $\text{CO}_2$  partial pressure will be levelled off by diffusion of gases through the gas-exchange membrane of the screw cap for the nutrient module. Consequently, the pH value will be readjusted to physiological levels within a few hours.

## Troubleshooting

Problem	Solution
The cells are not growing (after a few days, the percentage of dead cells is above 70%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase the initial cell density.</li> <li>• Produce the starter cell suspension for the miniPERM® culture with <math>\frac{1}{3}</math> ml conditioned medium from a cell culture flask and <math>\frac{2}{3}</math> ml fresh medium.</li> <li>• Increase the percentage of the serum supplement in the medium.</li> <li>• Decrease the rolling speed when using sensitive cells, e.g. of human hybridoma cell lines. Set the rolling speed to just 0.5 rpm.</li> <li>• Use of additives in the medium to reduce shear forces.</li> <li>• Do not fill more than 400 ml medium into the nutrient module. An air space must be maintained above the nutrient medium in the bioreactor.</li> </ul>
The cells do not reach high densities ( $< 1 \times 10^7$ cells/ml)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cells of some lines do not grow to high densities (less than <math>2.0 \times 10^7</math> cells/ml). If it is possible to cultivate the cells at average cell densities and high viability over a long time period by regular changes of the medium in the nutrient module, high antibody concentration can be obtained.</li> </ul>
Cells aggregate and die	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The cells must always be kept in suspension. If the miniPERM® bioreactor is removed from the Universal Turning Device and placed in the sterile hood, the cells will immediately begin to settle. In this case, they may form clusters and possibly die. To avoid such an occurrence, all necessary manipulations must be carried out as quickly as possible.</li> </ul>
<p>Accumulation of foam:</p> <p>If too much foaming occurs in the nutrient and production modules, it is not possible to release the pressure without getting foam on the screw caps.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use an antifoam agent</li> <li>• Reduce the serum concentration in the medium contained in the nutrient module and, if possible, also in the production module.</li> <li>• Reduce the rolling speed at the Universal Turning Device</li> </ul>
Duration of the miniPERM® culture	<ul style="list-style-type: none"> <li>• This depends on the growth kinetics of the cell clone. By regularly changing the medium and regularly harvesting the cells, the miniPERM® bioreactor culture can be operated in a continuous way over several weeks. The timing of the medium exchange and cell harvesting will vary from cell line to cell line.</li> </ul>

Problem	Solution
<p>Leakage:</p> <p>1. Between production and nutrient module</p> <p>During assembly of the miniPERM®, the snapper clips on the production module are snapped audibly into the indentations on the rim of the nutrient module. Do not attempt to twist the two modules together.</p> <p>2. At the screw cap of the neck opening of the nutrient module</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• After assembly, ensure that all the snapper clips are fully snapped with their corresponding indentations on the rim of the nutrient module. A second check will ensure that nutrient and production modules are located correctly.</li> <li>• The reusable nutrient module should be autoclaved to a maximum temperature of 121°C. It should be used no more than 10 times, otherwise this leads to deformation and cracking of the polycarbonate.</li> <li>• To avoid damage to the polycarbonate, the nutrient module should be placed into the autoclave in a way as to be contact-free from any other item.</li> <li>• To sterilize the miniPERM® bioreactor, use only 70% pharmaceutical grade ethanol or isopropanol. <b>DO NOT USE</b> any other chemicals; especially quaternary ammonium complexes may cause microcracks.</li> <li>• Tighten the screw cap of the neck opening of the nutrient module applying slight pressure only.</li> <li>• The sterile single use screw caps are not autoclavable.</li> <li>• Do not flame the neck opening of the nutrient module and the screw caps. This will lead to deformation of the polycarbonate.</li> <li>• Each time the nutrient module is opened, reclose with a new screw cap.</li> </ul>
<p>Pressure:</p> <p>The silicone membrane of the production module is always expanded outwards, due to a build-up of pressure in the bioreactor.</p> <p>The silicone membrane of the production module is pulled inward.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The humidity inside the CO<sub>2</sub> incubator may be too low. Make sure that the humidity is at least 90%.</li> <li>• The temperature of the nutrient medium should always be brought to 37°C before the module is filled. If the nutrient module has been filled with cold medium (4°C) and the miniPERM® bioreactor has been placed into the incubator, the air above the medium heats up and expands. This will lead to expansion of the silicone membrane of the production module.</li> <li>• Equilibration of pressure. For this, loosen the nutrient module screw cap by ¼ turn and afterwards tighten applying slight pressure only.</li> <li>• This may be due to a bacterial or fungal contamination in the nutrient or production modules.</li> </ul>

Problem	Solution
<p>Contamination:</p> <p>1. In the production module</p> <p>2. In the nutrient module</p>	<p>First check the components (cell suspension, medium, culture vessels, incubator etc.) for sterility. Cleanliness is of utmost importance when taking samples, harvesting cells or changing the medium.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Use a septum port to take samples. Replace one screw cap on the production module with a septum (Ordering Information see page 41).</li> <li>• Following sampling or cell harvesting, the access ports must be free of culture medium before closing with the screw caps.</li> <li>• Always use a new screw cap for each sampling/harvest port which has been opened.</li> <li>• Use of an antifoam agent. If foam has accumulated in the production module, (which is often the case when FCS is used as a medium supplement), it is difficult to loosen the screw caps of the production or nutrient modules without getting foam into the threads. This could be a potential risk of contamination.</li> <li>• After exchanging the culture medium, the neck opening must be free from any such medium prior to closing with a screw cap.</li> <li>• Always use a new screw cap for the nutrient module after changing the medium.</li> <li>• If contamination is limited to the nutrient module, the culture can be saved. Remove the cells from the production module and transfer them to another sterile miniPERM® bioreactor.</li> </ul>
<p>Rotation speed</p>	<p>The turning speed must be selected according to the robustness of the cells.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Generally, the bioreactor has to be rotated at low speed at the beginning of the culture. With an increase of cell density the rolling speed can be increased concomitantly.</li> </ul> <p>Examples:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• murine hybridoma cells: 5 to 20 rpm (Display 10-40)</li> <li>• human hybridoma and transfected cells: 2 to 10 rpm (Display 4-20)</li> </ul> <p>The rolling speeds refer to the display on the Control unit. miniPERM® actually rotates at half this speed.</p>
<p>The rollers of the Universal Turning Device stop working</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensure that the Universal Turning Device is correctly assembled.</li> <li>• After cleaning the turning device with pharmaceutical grade ethanol or isopropanol you must oil the bearings.</li> </ul> <p>Do not use n-propanol.</p> <p>Caution! Keep the rubber material of the rollers free from oil in order to prevent the bioreactors from slipping from the device.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Do not autoclave the Universal Turning Device.</li> </ul>

Problem	Solution
Medium  Changing the medium	<ul style="list-style-type: none"><li>• Under conditions of stress, in each high density cell culture the cells require a medium of particular high quality with regard to the content of glucose and NaHCO<sub>3</sub>. In the miniPERM® bioreactor, the cells can be cultivated with the same NaHCO<sub>3</sub>-dependent media normally used in tissue culture. The content of glucose should be not less than 4 g/l, otherwise the medium should be additionally supplemented accordingly.</li><li>• For the production of proteins, the medium should be changed in intervals of up to 7 days. For the production of biomass, the medium should be changed in intervals of up to 5 days.</li><li>• The medium in the nutrient module should be replaced as soon as there is a slight change in colour from salmon-pink to a yellowish-pink. This signifies that the buffering capacity of the medium is reaching the point of exhaustion.</li></ul>
Serum	<ul style="list-style-type: none"><li>• Under high density cell culture conditions, serum concentration can be critical. In the miniPERM® bioreactor the serum concentration should be not less than that used in a stationary culture of the same cell line.</li><li>• For the production of monoclonal antibodies or other proteins, a serum concentration between 5 to 30% should be used. For the production of biomass, a serum concentration of 10% is generally sufficient.</li><li>• In the miniPERM® nutrient module the serum concentration can be halved, and in some cases it can be reduced to zero.</li><li>• It is also possible to cultivate hybridoma or other cell types in the miniPERM® bioreactor. The cells must be adapted to a serum or protein free environment.</li></ul>

## Publications & Application Notes

Bruce, M.P.; Boyd, V.; Duch, C.; White, J.R.

### **Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies -alternatives to ascites production in mice.**

Journal of Immunological Methods 264, No. 1-2, (06/2002) 59-68

Caulfield, J.J.; Fernandez, M.H.; Sousa, A.R.; Lane, S.J.; Lee, T.H.;Hawrylowicz, C.M.

### **Regulation of major histocompatibility complex class II antigens on human alveolar macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the presence of glucocorticoids**

Immunology 98 (1999) 104-110

Falkenberg, F.W.

### **Production of monoclonal antibodies in the miniPERM® bioreactor: comparison with other hybridoma culture methods**

Res. Immun. 6/149 (1998) 560-570

Falkenberg, F.W.; Weichert, H.; Krane, M.; Bartels, I.; Palme, M.; Nagels, H.-O.; Fiebig, H.

### **In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter**

J. Immun. Meth. 179 (1995) 13-29

Kagan, E.; Vieira, E.; Petrie, H.T.

### **Comparison of hollow fiber bioreactors and modular minifermenters for the production of antibodies**

CAAT-OPRR Workshop on Alternatives in Monoclonal Antibody Production, 9/1997, Harborplace Hotel Baltimore, MD

Little, M.; Kipriyanov, S.M.; Le Gall, F.; Moldenhauer, G.

### **Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies**

Review Immunology Today (08/00) 364-370

Metzger, J.; Nicklisch, N.; Schmidt, B.; Kufer, P.; Peschel, C.; Bernhard, H.

### **Induction of a T helper cell response against the tumor associated antigen HER-2 using monocyte-derived dendritic cells**

ESACT-Meeting 09/2001, Sweden

Raulf-Heimsoth, M.; Sander, I.; Zhiping, Ch.; Borowitzki, G.;

Diewald, K.; van Kampen, V., Baur, X.

### **Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of the latex allergen Hev b Int.**

Arch. Allergy Immunol. 123 (2000) 236-241, 8/2000

Schütt, C.; Füll, B.; Stelter, F.; Jack, R.S.; Witt, S.

### **CHO transfectants produce large amounts of recombinant protein in suspension culture**

Journal of Immunological Methods 204 (1997) 99-102

Vollmers, H.P.; Dämmrich, J.; Wozniak, E.; Bier, D.; Müller-Hermelink, H.K.

### **Apoptotic in vitro and in vivo activity of the human monoclonal antibody SC-1 on stomach cancer cells**

2nd International Gastric Cancer Congress, Munich, Germany, 04/1997

Konstantinov, M.; Mindova, M.; Gospodinov, P.; Genova, P.

### **Three-Dimensional Bioreactor Cultures: A Useful Dynamic Model for the Study of Cellular Interactions**

N.Y. Acad. Sci. 1030: 103-115 (2004)

Dewar, V.; Voet, P.; Denamur, F.; Smal, J.

### **Industrial Implementation of in Vitro Production of Monoclonal Antibodies**

ILAR Journal, Volume 46, Number 3 (2005)

Berlin, V.; Rousselle, P.

### **Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-Based Bioreactor**

Protein Expr. Purif 48(1): 43-48, 2006

## Application notes

Vollmers, H.P.; Wozniak, E.

### **Cultivation of human hybridoma cell line in the miniPERM® bioreactor**

University of Würzburg, Germany

Tutas, M.

### **Cultivation of mouse hybridoma cells in the miniPERM® bioreactor**

Cell Diagnostica GmbH, Germany

Lingnau, A.

### **Cultivation of IgM producing hybridoma cells in the miniPERM® bioreactor**

VM-PRO GmbH, Luckenwalde, Germany

Schliephacke, T.; Käppel, S.

### **Long-term proliferation of CHO cells in the miniPERM® bioreactor**

iOnGen AG, In vitro Systems Services GmbH, Germany

Müller, S.

### **HEK-U293 cells cultivated in suspension in the miniPERM® bioreactor**

Knoll AG Ludwigshafen, Germany

Prestle, J.; Ott-Gebauer, S.

### **Production of recombinant adenoviruses in the miniPERM® bioreactor**

University of Göttingen, Germany

Sponaas, A.; Anding, P.

### **Cultivation of a murine macrophage like cell line (K774) in the miniPERM® bioreactor**

Max-Planck-Institut für Infektions Biologie, Berlin, Germany

Dobner, T.

### **Cultivation of insect cells (SF9 cells - baculovirus system) in the miniPERM® bioreactor**

University of Regensburg, Germany

Schillo, M.; Meyer, N.; Bentrop, J.

### **Cultivation of insect cells (Drosophila Schneider cells [S2]) in the miniPERM® bioreactor**

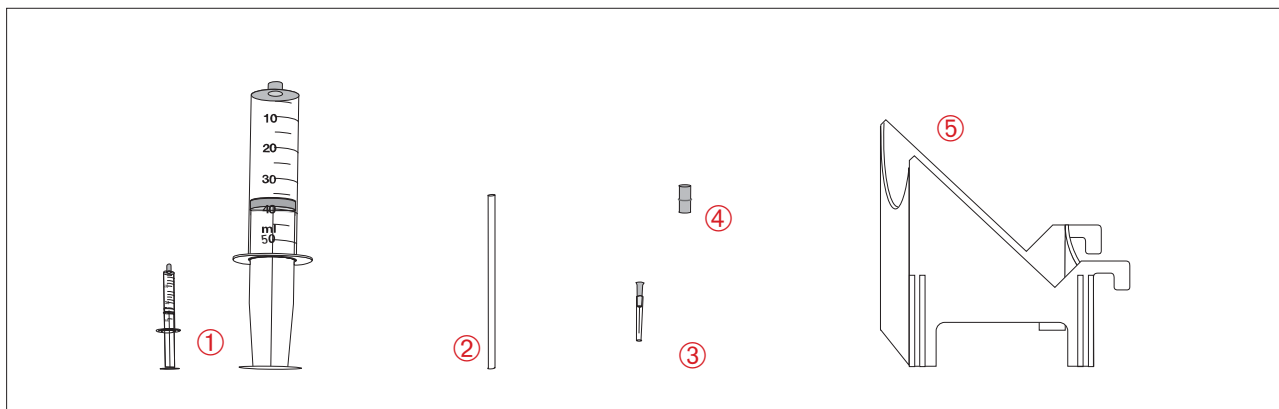
University of Karlsruhe, Germany

Wuppermann, F.

### **Cultivation of a murine hybridoma cell line in miniPERM® classic and miniPERM® HDC 50 bioreactors**

LCTech GmbH, Dorfen, Germany

## miniPERM® Accessories



The following accessories are available for convenient handling during cultivation:

### ① Sterile single-use 50 ml Luer Lock and 2 ml Luer syringes

For simple and safe cell suspension inoculation, sampling and harvesting.

### ② Sterile filling tube 5"

The sterile filling tube offers a simple solution to cell suspension transfer (e.g. from centrifuge tubes to single-use syringe). A filling tube is slightly flexible, connects directly to a 50 ml Luer syringe and has a sufficiently large inner diameter to minimize shear-stress induced cell damage.

### ③ Luer syringe needles 25G x 5/8"

For sampling and supplementing the medium in the production module via septum ports.

### ④ Septum ports

To simplify sampling and supplementing procedures and to further reduce contamination risks, a replacement of one or two of the three standard screw caps on the production module with sterile septum ports is possible.

The rubber septum ports offer the possibility for addition of fluids to or removal of samples from the production module using sterile single-use syringe needles of small diameter. There is no need to open the module. The septum ports should be replaced after they have been pierced 5 or 6 times.

### ⑤ miniPERM® stand

For mounting the miniPERM® bioreactor during inoculation, sampling and harvest.

### Start-up Support Kit

Accessories to inoculate, sample and harvest. Consists of:

- Single-use 50 ml Luer Lock syringe, sterile (8x)
- Single-use 2 ml Luer syringe, sterile (20x)
- Filling tube 5", sterile (8x)
- Luer syringe needles (25G x 5/8"), sterile (20x)
- Septum ports, sterile (6x)
- miniPERM® stand (1x)



# User Manual - miniPERM®

## Ordering information

Order no	Description	Packaging unit/case
94.6001.059	miniPERM® classic Bioreactor, sterile	12
94.6001.055	miniPERM® classic Production module, sterile	12
94.6077.121	miniPERM® HDC 50 Bioreactor, sterile	12
94.6077.017	miniPERM® HDC 50 Production module, sterile	12

## Ordering information - Accessories

Order no	Description	Packaging unit/case
94.6001.153	Nutrient module for miniPERM®, autoclavable.	4
94.6001.054	Stands for miniPERM®	4
94.6001.036	Screw caps for production module, sterile	6
94.6077.037	Screw cap for nutrient module, sterile	16
94.6077.135	Luer syringe needles 25G x 5/8" (0.5 x 16 mm), sterile	100
94.6077.136	Single use 2 ml Luer Syringe sterile	100
94.6077.137	Single use 50 ml Luer Lock Syringe, sterile	60
94.6077.138	Filling tube 5", sterile	100
94.6001.094	Start-up support kit	Quantity
	• Single use 50 ml Luer Lock Syringe, sterile	8
	• Single use 2 ml Luer Syringe, sterile	20
	• Filling tube 5", Luer, sterile	8
	• Luer syringe needle, 25G x 5/8", sterile	20
	• Septum port, sterile	6
	• Stand for miniPERM®	1

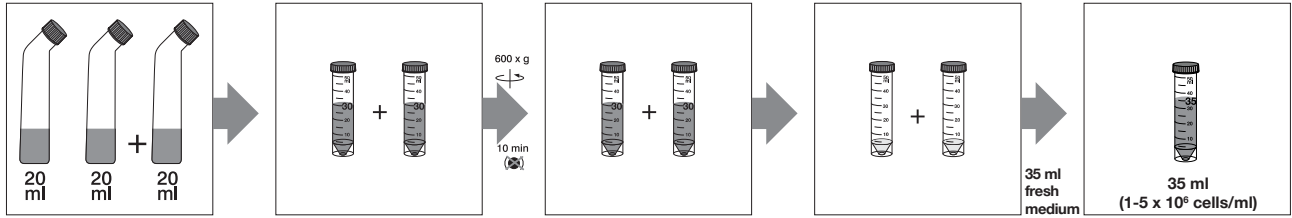
## Ordering information – Universal Turning Device/accessories

Order no	Description	Packaging unit/case
94.6001.061	Universal Turning Device 115/230 V	1

## Brief instructions for use

For example: Preparation of cells for cultivation in miniPERM® classic production module with 35 ml volume.  
For using the miniPERM® HDC 50 production module 1-5 x 10<sup>6</sup> cells/ml in 50 ml medium are prepared.

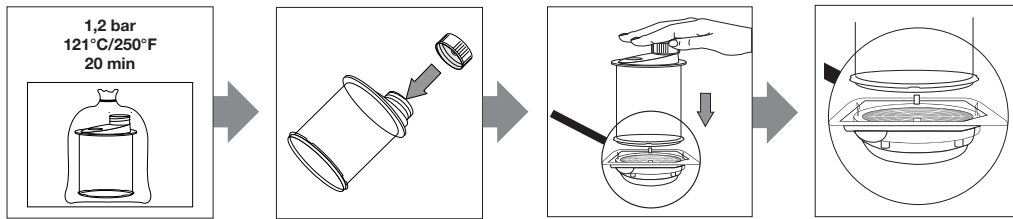
## Preparation of cells



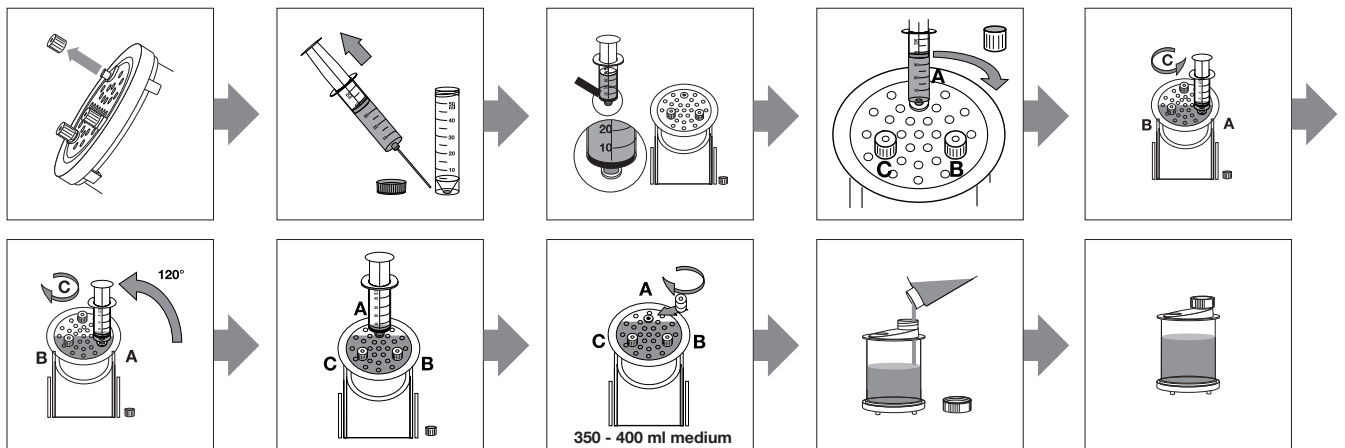
## miniPERM® preparation

(The sterile bioreactor option is ready for use without further preparation).

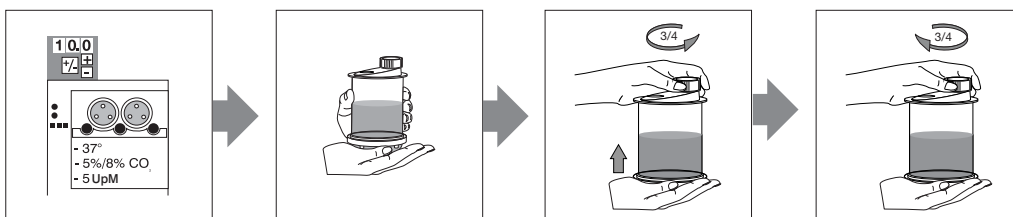
Autoclavable nutrient module:



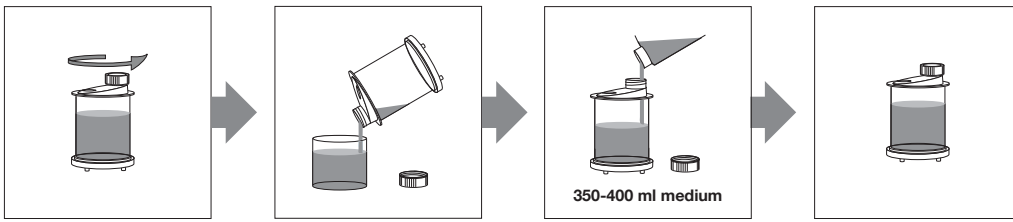
## Filling



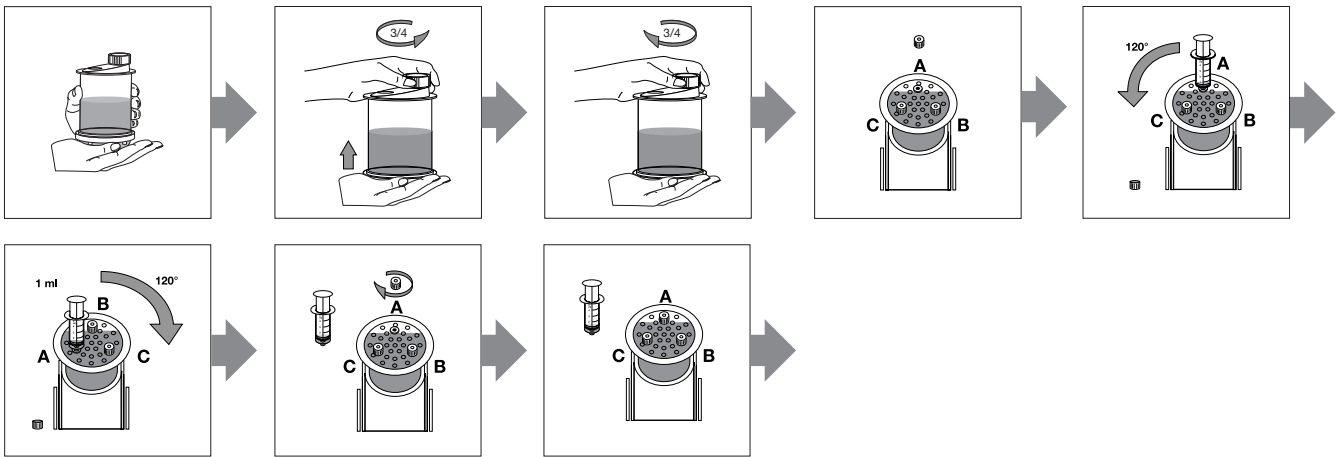
## Conditioning



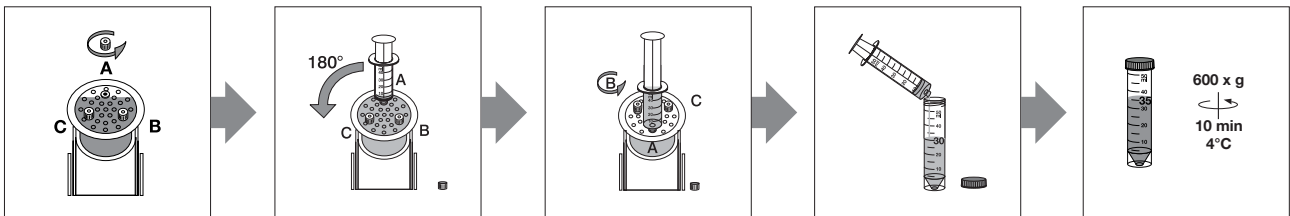
Medium change



Sampling



Harvesting





Technical modifications reserved



SARSTEDT AG & Co. KG  
Sarstedtstr. 1  
D-51588 Nümbrecht  
[www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)



**SARSTEDT**

---