INFORS HT

Application note

Fed-Batch-Kultivierung von CHO-Zellen im Minifors Cell

ZHAW, IBT, CH-Wädenswil, und INFORS HT, CH-Bottmingen, www.infors-ht.com

1. Einleitung

Die Verwendung von Tischbioreaktoren erlaubt eine einfache Optimierung von Entwicklungsprozessen zur Kultivierung von tierischen Zellkulturen. Am folgenden Beispiel der Kultivierung der Zelllinie CHO (Chinese Hamster Ovary) im Tischbioreaktor Minifors Cell (INFORS HT, CH-Bottmingen) wird mithilfe einer Fed-Batch-Strategie die Optimierung der SEAP-Herstellung dargestellt.

Die verwendete Zelllinie CHO wird in der Biotechnologie vielfach eingesetzt. Für die Versuche wurde der Klon CHO XM-111 verwendet. Dieser Klon wurde von der Gruppe von Prof. Dr. M. Fussenegger an der ETH Zürich mit einem Expressionsvektor transfiziert, welcher das Gen des rekombinanten Proteins SEAP (sekretierte, alkalische Phosphatase) kodiert und durch den tetrazyklinregulierten Promotor PhCMV-1 kontrolliert wird. Der Gebrauch der Expressionsvektoren macht die regulierbare Expression von zwei Genen mittels eines Promotors möglich und führt somit zur Aufteilung des SEAP-Produktionsprozesses in eine nichtproduktive Wachstumsphase, gefolgt von einer proliferationsinhibierten Produktionsphase, basierend auf einem Entzug des Tetrazyklins durch einen Medienwechsel.

2. Technische Spezifikationen des Minifors Cell

- Kulturgefäss: 2,5 l (auch 5 l verfügbar)
- Begasung mit O_2, Luft und CO_2
- Abluftkühler als Standard
- 4 autoklavierbare, peristaltische Pumpen
- Temperaturregelung über Heizmantel
- pO_2- und pH-Regelung
- Erfassung von Online-Parametern mittels Iris-Software
- Probenahme als Standard
- Regulation von Antischaummittel und Level möglich
- verschiedene Sparger und Impeller vorhanden

3. Experimentelle Spezifikationen

Zur Herstellung des Proteins SEAP erfolgte über mehrere Tage eine Kultivierung der Zellen CHO XM-111 in dem 2,5-l-Bioreaktor Minifors Cell (INFORS HT, CH-Bottmingen).

a) Medium

Für die Wachstumsphase der CHO-Zelle wurde das serum- und proteinfreie HP-1-Medium (Cell Culture Technologies GmbH) und für die Produktionsphase das HP-5-Medium verwendet. Dem Wachstumsmedium zugefügt wurden 2 g/l Pluronic F-68 und 2,5 g/l Tetrazyclin. Dem HP-5-Medium wurden 2 g/l Pluronic F-68 zugegeben.

b) Parametereinstellung im Minifors Cell

Für die optimalen Wachstumsbedingungen wurde eine Temperatur von 37 °C gewählt. Zur Produktion des SEAP-Proteins erfolgte am vierten Tag ein Temperatur-Shift auf 30 °C. Zur Regulation des pO_2-Gehaltes von 50% erfolgte eine Spargerbegasung mit bis zu 0,03 vvm. Zusätzlich wurde der Kopfraum mit 0,3 vvm Luft begast. Der pH-Wert von 7,2 konnte mit der Zugabe von CO_2 in den Sparger geregelt werden. Ein optimale Verteilung der Zellsuspension wurde mit 100 rpm erreicht.

4. Fed-Batch-Kultivierung

Eine Fed-Batch-Kultivierung wird eingesetzt, um höhere Zellkonzentrationen zu erreichen. Dabei wird der Kultur regelmässig frisches Medium zugegeben

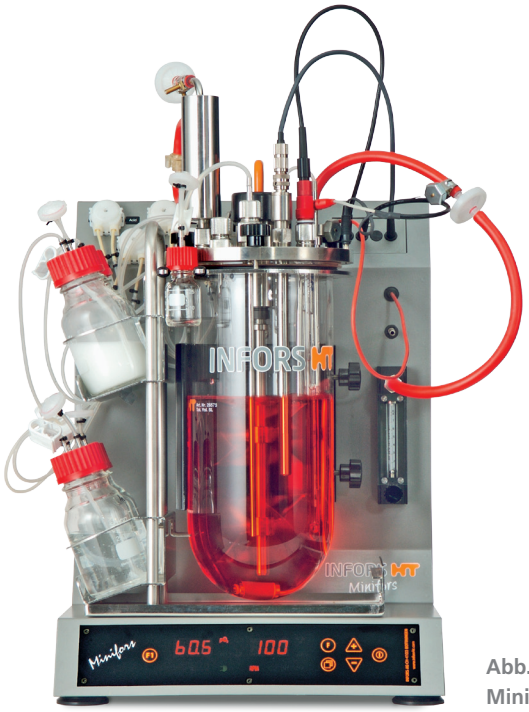

Abb. 1: Minifors Cell

und somit werden Nährstofflimitationen verhindert. Das Anfangsvolumen der CHO-Kultivierung im Minifors Cell betrug 600 ml, während am ersten Tag (30 h), sowie am zweiten Tag (46 h) mit je 300 ml HP-1-Medium gefüttert wurde. Am zweiten Tag (54 h) wurde zusätzlich mit 400 ml gefüttert. Ein Wechsel vom Wachstumsmedium HP-1 auf das HP-5-Medium wurde für die Produktionsphase am dritten Tag (65 h) durchgeführt. Dabei erfolgte zusätzlich ein Temperatur-Shift von 37 °C auf 30 °C , um Proliferation zu verhindern.

5. Analyse

a) Parameteranalyse

Zur täglichen Ermittlung der Lebendzellkonzentration stand der NucleoCounter YC 100 (Chemometec) zur Verfügung. Die Analyse der Wachstums- und der Produktionssubstrate konnte mit dem Bioprofile Analyzer 100 Plus (Nova Biomedical) durchgeführt werden.

b) Formeln

Für die Berechnung der maximalen Wachstumsrate μ_{max} und der Verdopplungszeit t_d wurden die angegebenen Formeln angewendet.

$$\mu_{max} = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{(t_2 - t_1)} \; [h^{-1}] \qquad t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \; [h]$$

Die Berechnung der SEAP-Aktivität erfolgte mittels der Steigerung des photometrisch ermittelten Substratumsatzes. Die SEAP-Aktivität pro Zeiteinheit wird mit der angegebenen Gleichung berechnet.

$$SEAP\text{-}Aktivität = \frac{\Delta_{405nm} / \min}{\varepsilon \cdot d \cdot V} = 2.4 \cdot \frac{\Delta A_{405nm}}{\min}$$

x = Zellkonzentration pro ml
T = Prozesszeit in h
ΔA_{405nm} = Absorption bei 405 nm
ε = Extinktionskoeffizient
V = Probevolumen
d = Durchmesser Küvette

6. Ergebnisse und Auswertung

Für die Optimierung der SEAP-Produktion der Zellen CHO XM-111 wurde eine Fed-Batch-Kultivierung im Multifors Cell durchgeführt. Während der Kultivierung der Zellen CHO XM-111 erfolgte eine tägliche Probenahme zur Bestimmung der Zellkonzentrationen, des Substratverbrauchs und der Produktion als auch der Aktivität des SEAP-Proteins.

Die Lebendzellkonzentration nahm während des ersten Tages ausgehend von 5,1 x 10^5 pro ml auf 1,1 x 10^6 pro ml zu. Die Lebendzellkonzentration stieg bis zum Medienwechsel am dritten Tag auf 2,55 x 10^6 pro ml. Nach dem Medienwechsel wurde am fünften Tag die maximale Lebendzellkonzentration von 3,15 x 10^6 pro ml erreicht. Nach diesem Zeitpunkt setzte die Absterbephase ein. Die Vitalität sank ausgehend von 99,2% bis zum Medienwechsel auf einen Wert von 94,7%. Insgesamt wurde die Kultivierung bis zu einer Vitalität von 18,2% und einer Lebendzellkonzentration von 3,9 x 10^5 pro ml durchgeführt (Abb. 2).

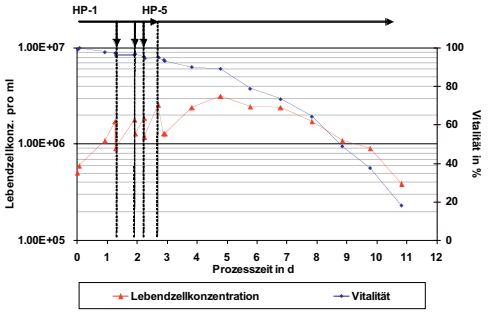

Abb. 2: Vergleich von Lebendzellkonzentration und Vitalität

Zur Berechnung der maximalen Wachstumsrate μ_{max} und der Verdopplungsrate t_d wurde der Bereich während der Wachstumsphase zwischen 54 h (2. Tag) und 65 h (3. Tag) gewählt. Dabei wurden eine Wachstumsrate von 0,040 pro Stunde und eine Verdopplungszeit von 17,43 h ermittelt.

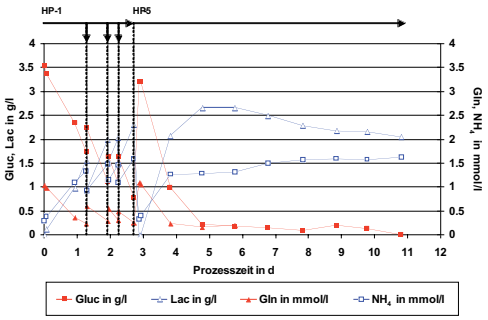

Abb. 3: Glucose und Glutaminverbrauch, Ammonium- und Glutamatbildung

Glucose- und Glutaminkonzentration sind in der Abbildung 3 dargestellt. Beide Substrate dienen den CHO-Zellen als Energiequellen und werden während des Wachstums verbraucht.

Gegenläufig zur Abnahme von Glucose und Glutamin werden Ammonium und Lactat gebildet. Anhand der Aufzeichnung der wichtigsten Stoffwechselparameter wurde für die Kultivierung der CHO-Zellen in einem 2,5-l-Kulturgefäss des Minifors Cell die Feedingstrategie optimiert (Abb. 3).

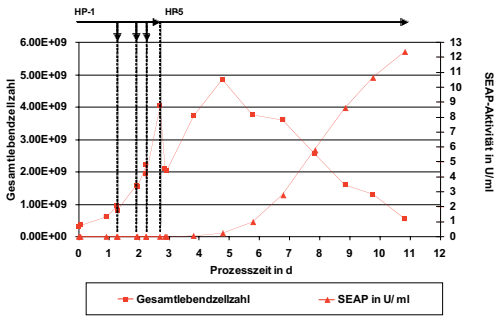

Abb. 4: SEAP-Aktivität

Nach dem Medienwechsel auf das HP-5-Medium setzte die SEAP-Produktbildung am dritten Tag ein und erreichte am 11. Tag eine maximale Aktivität von 12,36 U/ml (Abb. 4).

Die Aufzeichnung der Online-Parameter mit der Iris-Software ermöglicht die Überwachung der Kontrollparameter, wie der Temperatur, des pH-Wertes und der pO_2-Sättigung. Die Aufzeichnung dieser Parameter erlaubt eine umfassende Kontrolle des Kultivierungsprozesses und zeigt alle im Prozess abweichenden Werte. Eine Abweichung vom eingestellten Temperatur- und pO_2-Wert könnte durch die Zugabe von frischem Medium (Feeding) entstehen (Abb. 5).

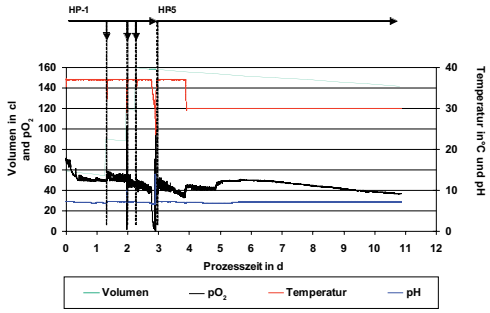

Abb. 5: Volumen, Temperatur, pH und pO_2

Zur pO_2-Regelung wurde die Kultur mit einem 2-Gasmix aus Luft und Sauerstoff begast, wodurch eine Sättigung zwischen 40% und 50% eingehalten werden konnte. Die parallele Begasung mit CO_2 erlaubte eine pH-Stabilität von pH = 7,2 und stellte somit für das Wachstum und die SEAP-Produktion der Zellen angepasste Kulturbedingungen her (Abb. 6).

7. Zusammenfassung

- Fed-Batch-Kultivierung von CHO XM-111 wurde über 11 Tage durchgeführt.
- Eine maximale Lebendzellkonzentration von 3,15 x 10^6 pro ml (4,85 x 10^9 Gesamtlebendzellen) mit Vitalität von 90% wurde am fünften Kultivierungstag erreicht.
- Die Umstellung auf Produktionsmedium und Temperatur-Shift ermöglichten eine Optimierung der SEAP-Produktion.
- Eine SEAP-Aktivität wurde am 11. Tag mit 12,36 U/ml beobachtet.
- Die Aufzeichnung der wichtigsten Stoffwechselparameter ist möglich.
- pH-, pO_2-, Rührer- und Temperaturregelung zur Prozesskontrolle und zur optimalen Einstellung der Kultivierungsparameter als Standard vorhanden.

AP001_de_0411

Infors AG
Headoffice, Schweiz
Rittergasse 27
CH-4103 Bottmingen
T +41 (0)61 425 77 00
F +41 (0)61 425 77 01
headoffice@infors-ht.com

Infors GmbH
Dachauer Str. 6
D-85254 Einsbach
T +49 (0)8135 8333
F +49 (0)8135 8320
infors.de@infors-ht.com

Infors UK Ltd
The Courtyard Business Centre, Dovers Farm, Lonesome Lane, Reigate, Surrey, RH2 7QT, UK
T +44 (0)1737 22 31 00
F +44 (0)1737 24 72 13
infors.uk@infors-ht.com

Infors Sarl
2, rue du Buisson aux Fraises
Bâtiment D13
FR-91300 Massy
T +33 (0)1 69 30 95 04
F +33 (0)1 69 30 95 05
infors.fr@infors-ht.com

Infors Benelux BV
Fabriekstraat 38
NL-7005 AR Doetinchem
P.O. Box 613
NL-7000 AP Doetinchem
T +31 (0)314 364 450
F +31 (0)314 378 076
infors.bnl@infors-ht.com

Infors Canada
8350 rue Bombardier
Anjou, Quebec
Canada H1J 1A6
T +1 514 352 50 95
F +1 514 352 56 10
infors.ca@infors-ht.com

Infors Biotechnology (China) Co., Ltd.
Room 505C, Building 106
Lize Zhongyuan
Wangjing New Industrial Zone
Chaoyang District, Beijing
100102 P. R. of China
T +86 (0)10 51 65 20 68
F +86 (0)10 64 39 05 85
info@infors-ht.com.cn

Referenz: ZHAW Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Life Sciences und Facility Managment, IBT Institut für Biotechnologie