

# Batch-Kultivierung von CHO-K1-Zellen

## im Labfors 5 Cell

Prof. Dr.-Ing. habil. Ralf Pörtner, Technische Universität Hamburg-Harburg, Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik, Hamburg, Deutschland

### 1. Einleitung

Bioreaktoren im Labormassstab finden für die Gewinnung kleiner Mengen an Zellen und Produkten, in der Prozessoptimierung und als Zwischenschritt im Seed-Train vielfältige Anwendungen zur Kultivierung von tierischen und humanen Zellen. Im Folgenden wird die erfolgreiche Batch-Kultivierung einer an Suspension adaptierten Zelllinie CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) im Laborbioreaktor Labfors 5 Cell (INFORS HT, CH-Bottmingen) diskutiert.

Die Zelllinie CHO wird in Akademie und Industrie vielfältig eingesetzt, etwa als Expressionssystem für pharmazeutische Wirkstoffe. Der hier verwendete Klon wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Noll, Universität Bielefeld, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

### 2. Technische Spezifikationen

- Kulturgefäß: 3,6 l Totalvolumen mit Rundboden
- Magnetrührer (30–300 rpm)
- Schrägblattrührer
- pO<sub>2</sub>-Regelung über Begasung mit 3-Gasmix Luft, O<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>
- pH-Regelung mit CO<sub>2</sub>
- Abluftkühler als Standard
- Temperierung über Heizmatte
- Sparger: Ringbegaser mit µ-Poren an der Unterseite
- aseptische Probenahme
- Regelung von Antischaum oder Füllstand möglich
- Erfassung von Onlineparametern mittels Iris-Kontrollsoftware

### 3. Methoden

#### a) Medium

Die CHO-K1-Zellen wurden in dem serum- und proteinfreien CHOMACS-CD-Medium (Milenyi Biotec GmbH, Deutschland) kultiviert. Das Medium wurde zusätzlich mit 4 mmol/l L-Glutamin (PAA Laboratories, Deutschland) versetzt.

#### b) Parametereinstellung

Das Kultivierungsgefäß des Labfors 5 Cell wurde für die Zellkultivierung vorbereitet und die pH- und pO<sub>2</sub>-Sonden kalibriert. Das Arbeitsvolumen betrug 2 l, die Temperatur lag bei 36,9 °C. Die Rührerdrehzahl wurde während der Kultivierung auf 156 rpm eingestellt. Dies entspricht einer Mischzeit von ca.  $\Theta_{95} = 5$  s (ermittelt mit der Farbumschlagmethode – Stärkelösung/Iod-Kaliumiodidlösung/Natriumthiosulfatlösung) und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 0,7 m/s. Die Werte liegen in dem von Platas et al. (2012) bestimmten Prozessfenster.

Der pO<sub>2</sub>-Gehalt von 30% Luftsättigung wurde mit dem 3-Gasmix aus Luft, Sauerstoff und Stickstoff bis zu einer Begasungsrate von 100 ml/min (0,05 vvm) direkt über den Begaser geregelt. Der pH-Wert von 7,15 konnte mit der Zugabe von CO<sub>2</sub> über die Spargerbegasung bzw. die Zugabe von 0,5 M NaCO<sub>3</sub> über eine Schlauchpumpe geregelt werden.

#### c) Batch-Kultivierung

Die Vorkulturen wurden in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Lebendzellkonzentration sollte nach Beimpfung bei ca.  $3 \times 10^5$  Zellen/ml liegen. Die Kultivierung dauerte 6 Tage und wurde anhand der aseptisch gewonnenen Proben hinsichtlich Zellwachstum, Substratverbrauch und Metabolitenproduktion bewertet.



Abb. 1: Bioreaktor Labfors 5 Cell

#### d) Analytik

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Haemocytometer (Neubauer Improved, Blue Brand, Deutschland), die Bestimmung des Lebendanteils mittels Trypanblau-Ausschlussmethode. Die Konzentrationen von Glukose, Laktat und Glutamin wurden mit einem YSI 7100 MBA (Yellow Springs Instruments, USA) bestimmt, Ammonium mit einem Spektrofotometer (Bio-Rad, München, Deutschland) und dem Spektroquant-Kit 1.14752.0001 (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 690 nm.

### 4. Ergebnisse

Die Batch-Kultivierung mit CHO-K1-Zellen wurde erfolgreich über einen Zeitraum von 6 Tagen durchgeführt. Der Verlauf der Zellkonzentrationen (lebend, gesamt) ist in Abb. 2 dargestellt.

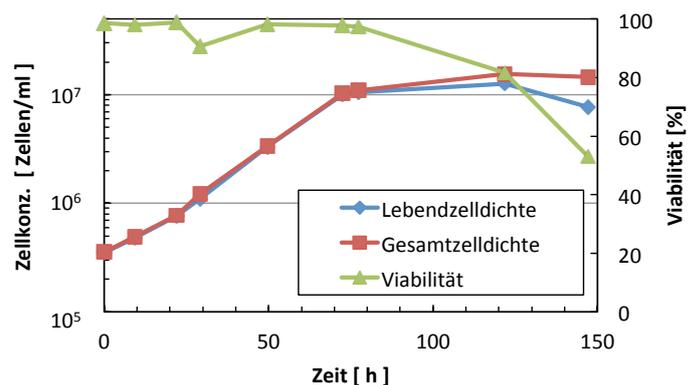


Abb. 2: Verlauf der Lebend- und der Gesamtzelldichte

Die maximale Lebendzellkonzentration lag bei  $1,27 \times 10^7$  Zellen/ml an Tag 5. Das entspricht einem Vermehrungsfaktor von 36 (Verhältnis von maximaler Zellkonzentration zu Anfangszellkonzentration). Während der exponentiellen Wachstumsphase (etwa bis Tag 3) lag die Viabilität im Mittel bei 98%. Die Zellen wuchsen während der exponentiellen Phase mit einer Wachstumsrate  $\mu$  von 0,049/h. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von 14,1 h (Abb. 3).

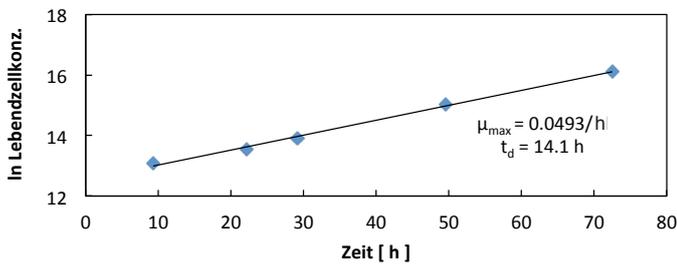


Abb. 3: Ermittlung der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  und der Verdopplungszeit  $t_d$

Die Verläufe der Hauptsubstrate (Glukose und Glutamin) und der Stoffwechselprodukte (Laktat und Ammonium) sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Glukose war zum Ende der Kultivierung hin verbraucht. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen (etwa ab Tag 3) begannen die Zellen, Laktat zu verstoffwechseln. Glutamin ist nach etwa 3 Tagen verbraucht. Dies entspricht in etwa dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Laktat und Ammonium erreichten während der Kultivierung keine inhibierenden Konzentrationen.

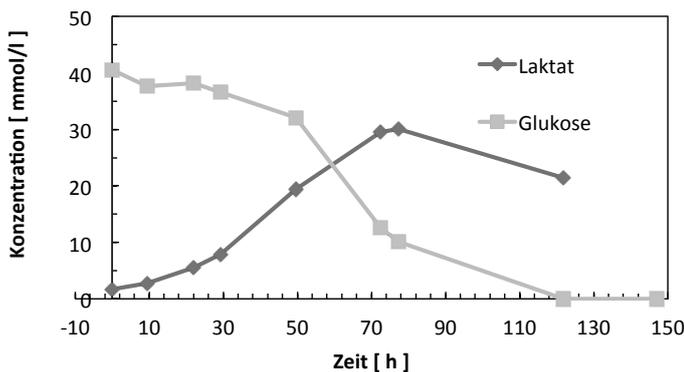


Abb. 4: Verlauf der Glukose und der Laktatkonzentration

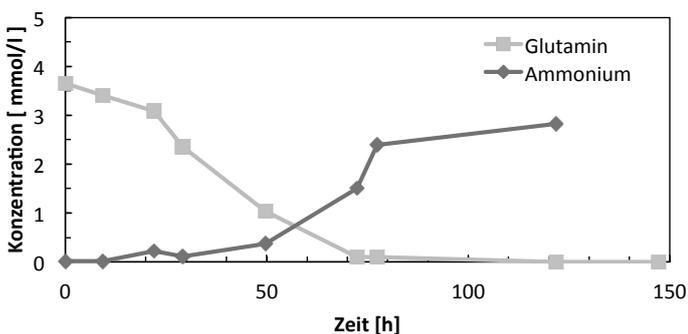


Abb. 5: Verlauf der Glutamin- und der Ammoniumkonzentration

## 5. Zusammenfassung

- Eine Batch-Kultivierung von CHO-K1-Zellen wurde erfolgreich über einen Zeitraum von 6 Tagen durchgeführt. Das Wachstumsverhalten der CHO-K1-Zellen war nach den vorliegenden Erfahrungen sehr gut vergleichbar mit anderen Kultivierungen.
- Die maximale Lebendzellkonzentration lag bei  $1,27 \times 10^7$  Zellen/ml an Tag 5.
- Während der exponentiellen Wachstumsphase lag die Viabilität im Mittel bei 98%.
- Die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit entsprechen den mit der Zelle vorliegenden Erfahrungen.
- Die Sauerstoffversorgung war auch bei diesen sehr hohen Zelldichten ausreichend.

## Referenzen

Platas OB, Jandt U, Phan LdM, Villanueva ME, Schaletzky M, Rath A, Freund S, Reichl U, Skerhutt E, Scholz S, Noll Th, Sandig V, Pörtner R, Zeng AP: Evaluation of criteria for bioreactor comparison and operation standardisation for mammalian cell culture. Engineering in Life Sciences, 12(5): 518–528, 2012, DOI: 10.1002/elsc.201100163

## Kontakt

Prof. Dr.-Ing. habil. Ralf Pörtner  
Technische Universität Hamburg-Harburg  
Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik  
Denickestr. 15, D-21073 Hamburg  
Tel. +49 (0) 40 42878-2886, Fax -2909,  
E-Mail poertner@tuhh.de

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

Mehr Informationen und Ihren lokalen  
Ansprechpartner finden Sie unter:

[www.infors-ht.com](http://www.infors-ht.com)

**INFORS HT**