

Einwegbioreaktoren für die Prozessentwicklung mit Insektenzellen

Der Einsatz geschüttelter und wellendurchmischer Systeme spart Zeit und Kosten



© Honnen (Photocase)



Prof. Dr. Regine Eibl, zhaw



Dipl. Ing. Christoph Ries, zhaw



Dr. Corinne John, Redbiotec

Keywords: BEVS (Baculovirus- Expressions-Vektor-System), Einwegbioreaktoren, Insektenzellen, Prozessentwicklung, rekombinante Proteine

Mit der Zulassung des Impfstoffes Cervarix gegen Gebärmutterhalskrebs ist das Interesse an der Kultivierung von Insektenzellen in Verbindung mit dem Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) stark gestiegen. So werden Insektenzellen heute als potente Expressionsorganismen für komplexe Proteine und virusähnliche Partikel (VLPs) im Pharmabereich angesehen. Im Hinblick auf Zeit- und Kosteneinsparungen setzen viele Prozessentwickler dabei vermehrt auf Einwegbioreaktoren. Hier berichten wir vom vorteilhaften Einsatz des CultiFlask 50 Einwegbioreaktors für Parameteroptimierungen in Insektenzellkultur-/BEVS-basierten Prozessen sowie die Übertragbarkeit der Resultate auf einen wellendurchmischten Einwegbioreaktor.

Seit Anfang der 70-er Jahre wird die Eignung von Insektenzellen zur Herstellung von komplexen Proteinen für Struktur- und Funktionsstudien sowie Diagnostika- und Impfstoffproduktionen in der Fachliteratur beschrieben. Die hierfür am häufigsten verwendeten Zelllinien (*Sf-9*, *Sf-21* und BTI-TN-5B1-4, auch als High Five bekannt) stammen von zwei Schmetterlingsarten, nämlich dem Nachtfalter (*Spodoptera frugiperda*) und dem Kohlspanner (*Trichoplusia ni*). Im Rahmen von einfachen Zellproduktionen wachsen diese Zellen bei Temperaturen

zwischen 27°C und 28°C sowie einem pH-Wert im Bereich von 6,2–6,9 bereits im Batch-Modus zu Hochzelldichten (>2 x 10⁷ Zellen ml⁻¹). Serumfreie Kulturmedien (z.B. Sf-900 III SFM von Gibco Invitrogen) für das Wachstum in Suspension und geeignete Kultivierungssysteme, die die Zellen nicht durch Scherstress schädigen und mit ausreichend Sauerstoff versorgen, sind die Voraussetzungen dafür.

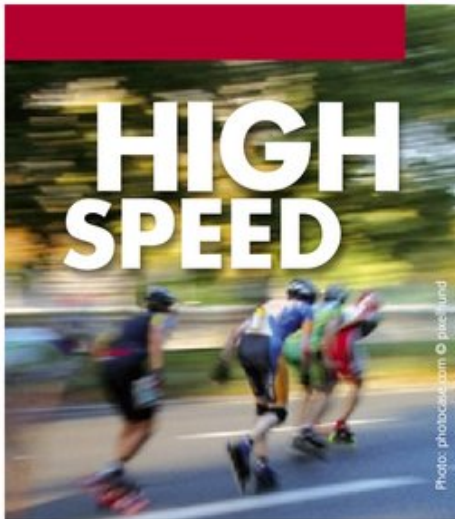
Die Bildung eines gewünschten Zielproteins in Insektenzellen erfordert deren Infektion mit einem vorgängig erzeugten rekombinanten

Baculovirusstock (vorzugsweise *Autographa californica* Multikapsid-Nukleopolyhedrovirus, AcMNPV). Dazu müssen die Insektenzellen in ausreichender Menge vorhanden und der exponentiellen Wachstumsphase sein. Für die Virusstockgenerierung haben sich die von Geisse [1] sowie Weber und Fussenegger [2] zusammengefassten Strategien bewährt. Die Baculoviren, die nur Invertebraten infizieren, replizieren sich in den Wirtszellen und produzieren in diesem Prozess das gewünschte Zielprotein unter Zunahme des Zelldurchmessers. Die Effizienz des Prozesses, die sich u.a. in der Höhe des Proteintiters niederschlägt, ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, wobei dem Bioreaktor eine Schlüsselrolle zukommt.

Vorteilhafter Einsatz von wellendurchmischten Einwegbioreaktoren im Liter-Massstab

Für die Prozessentwicklung sowie die schnelle Produk-

tion klein- und mittelvolumiger Produkte mit Insektenzellen werden heute immer häufiger Einweg- anstelle von Glas- oder Edelstahlbioreaktoren eingesetzt. Der Begriff Einwegbioreaktor ist auf die Kultivierungseinheit zurückzuführen, welche aus sterilem Plastikmaterial besteht. Unmittelbar nach Abschluss des Prozesses wird die Kultivierungseinheit entsorgt und der Bioreaktor steht somit sofort für den nächsten Ansatz zur Verfügung. Dadurch entfallen die sonst üblichen, langwierigen Reinigungs- sowie Sterilisationsprozeduren. Unter der Vielzahl der geeigneten Einwegbioreaktoren für Insektenzellen, die sich im Typ der Kultivierungseinheit, dem Energieeintrag, dem Kulturvolumen und der Instrumentierung unterscheiden [2] [3], haben sich für den Liter-Massstab wellendurchmischte Bioreaktoren wie der Wave Reaktor, der BioWave Reaktor und sein Nachfolger, der Biostat CultiBag RM (Abb. 1, a), exponiert [4] [5].



Schnell, einfach, direkt – ONLINE!

PRO-4-PRO.com ist die Online-Branchenplattform des GIT VERLAG.

Monatlich nutzen über 80.000 User PRO-4-PRO.com für ihre berufliche Information und zur Recherche.

Nutzen auch Sie die Vorteile!

- Komfortable Suchfunktion
- Keine Registrierung notwendig
- Branchenspezifische Newsletter
- Tägliche neue Produkte und Anbieter
- Veranstaltungskalender



www.PRO-4-PRO.com

PRO-4-PRO
PRODUCTS FOR PROFESSIONALS



Abb. 1: Biostat CultiBag RM (a) und CultiFlask 50 Einwegbioreaktor (b).

Bei diesen Bioreaktoren (maximales Kulturvolumen 500 l) wird der Stoffübergang durch die Kippbewegung der Rockerplattform bewerkstelligt. Letzteres geht mit der Induktion einer Welle, der kontinuierlichen Erneuerung der Medienoberfläche und einer blasenfreien Oberflächenbelüftung einher. Wachstum und Produktbildung lassen sich über die Entwicklung und Ausbreitung der induzierten Welle sowie den Sauerstoffübergang im Kulturbeutel (Bag) beeinflussen. Das lässt sich über die Regulierung des Kippwinkels, der Kipprate, des Füllvolumens und der Belüftungsrate steuern [6].

Geschüttelte Einwegsysteme für Screeningexperimente

Für Screeninguntersuchungen (Zellklonauswahl, Medien- und Prozessparameteroptimierungen) im Milliliter-Massstab haben sich geschüttelte, nicht instrumentierte Einweg-Erlenmeyer für tierische Zellkulturen gut etablieren können. Doch zeigten die Arbeiten der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Lausanne und der Firma ExcellGene, dass mit dem TubeSpin-Bioreaktor (von Sartorius Stedim als CultiFlask 50 Einwegbioreaktor vertrieben) ein noch effizienteres System für das industriennahe Down-Scaling von Prozessen mit CHO-Zellen existiert [7] [8]. Das Herzstück des ebenfalls orbital geschüttelten CultiFlask 50 Einwegbioreaktors (Abb. 1, b) ist ein handelsübliches 50 ml Zentrifugenröhrchen mit integrierter PTFE-Membran im Deckel. Diese dient als Sterilbarriere und verhindert das Verdunsten von Kulturbrühe. Bei Kulturvolumina zwischen 5 und 35 mL und ausreichend hoher Schüttelgeschwindigkeit wird über die fünf im Deckel integrierten Öffnungen der notwendige Gasaustausch mit der Umgebung garantiert.

Der von uns durchgeführte Vergleich zum Wachstumsverhalten von Sf-21 Zellen im CultiFlask 50 Einwegbioreaktor, 125 und 250 ml Erlenmeyer sowie BioWave Reaktor mit 2 l CultiBag lieferte nahezu identische Wachstums- und Vitalitätsverläufe (Abb. 2) bei vergleichbarem

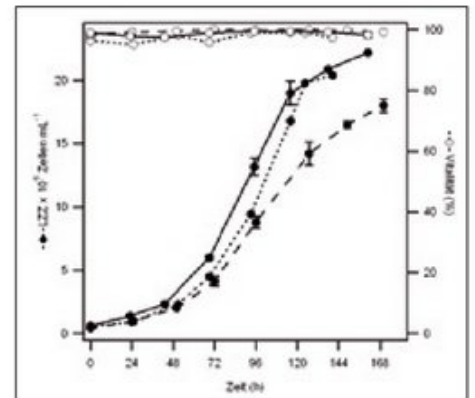


Abb. 2: In Sf-900 III SFM aufgenommene Wachstums- und Vitalitätsverläufe im CultiFlask 50 Einwegbioreaktor mit 20 ml Kulturvolumen (—), 125 ml Erlenmeyer mit 50 ml Kulturvolumen (- -) und BioWave 20 SPS Reaktor mit 2 l CultiBag bei 1 l Kulturvolumen (· · ·).

Glukose-, Glutamin- und Glutamatverbrauch [9]. Die folgenden Studien in CultiFlask 50 Einwegbioreaktoren dienen dem Screening der optimalen Infektionsparameter (MOI = Multiplicity of Infection, TOI = Time of Infection, POH = Point of Harvest) und der Evaluierung deren Übertragbarkeit auf Erlenmeyer und BioWave Reaktoren.

Neuer Ansatz für das Screening der Produktionsparameter und das Up-Scaling

Für das Screening stand die Prozesseffizienz (hoher Titer sowie Qualität des Proteins, kurze Produktionszeit, geringer Arbeitsaufwand) bei der Expression der löslichen Fraktion der katalytischen Domäne der B-Raf-Kinase (ca. 40 kDa) im Vordergrund [10]. Sämtliche Versuche wurden mit rekombinantem Virusstock (Virusgeneration 2, 1×10^8 pfu ml⁻¹) realisiert, der mit der MultiBac-Technologie der Redbiotec erzeugt worden war. Die routinemässige In-Prozess-Kontrolle beinhaltet generell die Aufnahme der Lebendzellzahl, der Vitalität, des durchschnittlichen Zelldurchmessers, des pH-Wertes sowie der Metaboliten mit entsprechenden Analysenautomaten (NucleoCounter, Cedex HiRes und BioProfile 100). Während der Virustiter mit den gän-

gigen Assays (Cell Swelling, Plaque, End-Point-Dilution) bestimmt wurde, wurden die Proteinfraktionen mittels Dot Blot, SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Aus den Screeningexperimenten der Infektionsparameter in den CultiFlask 50 Einwegbioreaktoren (220 rpm, 20 ml Kulturvolumen, 27 °C) wurde eine MOI von 0,1 und eine TOI von 1×10^6 Zellen ml^{-1} als optimale Bedingungen für die nachfolgenden Produktionen abgeleitet. Sowohl im Erlenmeyer (110 rpm, 100 ml Kulturvolumen, 27 °C) als auch im BioWave Reaktor (6–7,5°, 18 rpm–30 rpm, 0,1 vvm, 1 l Kulturvolumen, 27 °C) verlief die Infektionskinetik ähnlich wie im CultiFlask 50 Einwegbioreaktor. Unabhängig vom Bioreaktor war der POH der Zeitpunkt, an welchem der grösste Proteintiter sowie der grösste durchschnittliche Zelldurchmesser detektiert wurden. Folglich überrascht es nicht, dass auch die Proteinqualität (Menge des löslichen Proteins) wie auch die -quantität, ca. 50 mg l^{-1} , vergleichbar waren. Ein direktes Up-scaling vom CultiFlask 50 Einwegbioreaktor auf den BioWave Reaktor ist für Sf-21 Zellkultur-/BEVS-basierten Prozesse somit möglich. Gemäss unserer Abschätzungen lassen sich durch diese Vorgehensweise die Kosten für die Prozessentwicklung um mindestens 20–30 % reduzieren.

Danksagung

An dieser Stelle möchten wir Frau Dorothea Karrer und Virginia Wasem für ihren Einsatz bei den praktischen Arbeiten sowie der Kommission für Technologie und Innovation in Bern für die finanzielle Unterstützung Dank sagen.

Referenzen

[1] Pörtner R.: Animal cell biotechnology: Methods and protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, 489–507 (2007)
 [2] Eibl R. *et al.* (Editors): Cell and tissue reaction engineering, Springer, Berlin, Heidelberg, 263–277 (2008)

[3] Kasper G. *et al.* (Editors), Bioreactor systems for tissue engineering, Springer, Berlin, Heidelberg, 183–207 (2009)
 [4] Schlaeppli, J.M. *et al.*: Protein Expres Purif 50,185–195 (2006)
 [5] Eibl R. *et al.* (Editors): Cell and tissue reaction engineering, Springer, Berlin, Heidelberg, 243–244 (2008)
 [6] Datta Gupta S. und Ibaraki, Y. Plant tissue culture engineering, Springer, Dordrecht, 203–227 (2006)
 [7] De Jesus M. *et al.*: Biochem Eng J 17, 217–223 (2004)

[8] Stettler M. *et al.*: Biotechnol Bioeng 95, 1228–233 (2006)
 [9] Eibl R. und Eibl, D., BioProcess Int. 1, Supplement, 18–23 (2009)
 [10] Ries C. *et al.*: Projekt Nr. 9396.1 PFLS-LS, Abschlussbericht für die KTI, Februar 2009, vertraulich

Autoren:

Dipl. Ing. Christoph Ries, zhaw (CH-Wädenswil)
Dr. Corinne John, Redbiotec AG (CH-Schlieren)

Prof. Dr. Regine Eibl, zhaw (CH-Wädenswil)

Kontakt

Dipl. Ing. FH Biotechnologie Christoph Ries
 Bioverfahrens- und Zellkulturtechnik
 Institut für Biotechnologie
 Department für Life Sciences und Facility Management
 Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (zhaw)
 Wädenswil, Schweiz
 christoph.ries@zhaw.ch

©2009 Thermo Fisher Scientific, Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. PB AD 2009 11

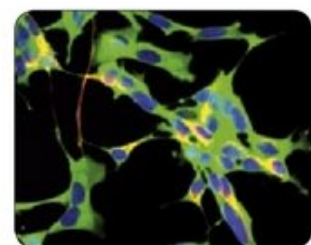
ABR-Affinity BioReagents Now Sold as Thermo Scientific

Quality-Guaranteed Antibodies.

With the addition of ABR-Affinity BioReagents to the Thermo Scientific Pierce family of products, you now have access to numerous products that are a perfect complement to many Thermo Scientific Pierce Protein Research products.

- Over 35,000 polyclonal and monoclonal antibodies in 42 research areas ... and growing!
- Custom polyclonal and monoclonal development services, offering a range of options and prices
- Numerous secondary antibodies, affinity-tagged antibodies, recombinant proteins and peptides

Please visit www.thermo.com/perbio to request the Thermo Scientific Pierce Antibody Handbook.



Immunocytochemistry of human neuro-blastoma SH-SY5Y cells stained with MA1-10036

Moving science forward

Thermo
 SCIENTIFIC
 Part of Thermo Fisher Scientific