

Langzeit-Kultivierung von protein-sezernierenden HEK293 Zellen in 3 parallel betriebenen geschlossenen Hohlfaserbioreaktor-Systemen

Dr. Jana Langenhan¹, Dr. Hans Nagels²

¹ EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Werkstraße 22, 23942 Dassow, Germany

² Cellab GmbH, Juri-Gagarin Straße 13a, 01454 Radeberg, Germany

Versuchsziel

Bei der eingesetzten Zelllinie handelt es sich um eine von HEK293 abgeleitete stabile Zelllinie, die bei Induktion mit Doxycyclin das Zielprotein exprimiert und in das Medium sezerniert. Die Konformation des Proteins ist so labil, dass es in handelsüblichen serumfreien oder chemisch definierten Medien (z.B. für die Suspensionskultur) nicht funktionell produziert werden kann. Für eine Produktion im großen Maßstab kommt deshalb nur eine adhärenzte Kultur auf großer Oberfläche in Frage.

Für die Kultivierung der HEK293-Zellen wurde ein Hohlfaser-basiertes Zellkultivierungssystem (Cellab[®] Bioreactor System) der Cellab GmbH getestet. Das Arbeiten mit dem Cellab[®] Disposable Set 5 HF/S ermöglicht paralleles Kultivieren von Zellen und die Anpassung verschiedener Kultivierungsparameter, wodurch es ein flexibles Downscaling-Modell für die spätere Massenproduktion des Zielproteins darstellt.

Die Hohlfaser-Module (HF-Module) selbst bestehen aus Hunderten von röhrenförmigen Membranen mit einem hohem Oberflächen-Volumen Verhältnis. Diese semipermeablen Membranen bilden ein Zwei-Kompartiment System und trennen das Zell-Kompartiment vom Medium (siehe Abb. 1). Dadurch werden die permanente Zufuhr von Nährstoffen und der Abtransport von Metaboliten ermöglicht, während gleichzeitig das Volumen des Zell-Kompartiments möglichst gering gehalten werden kann. Man erreicht als Konsequenz große Zelldichten und eine hohe Konzentration des Zielproteins.

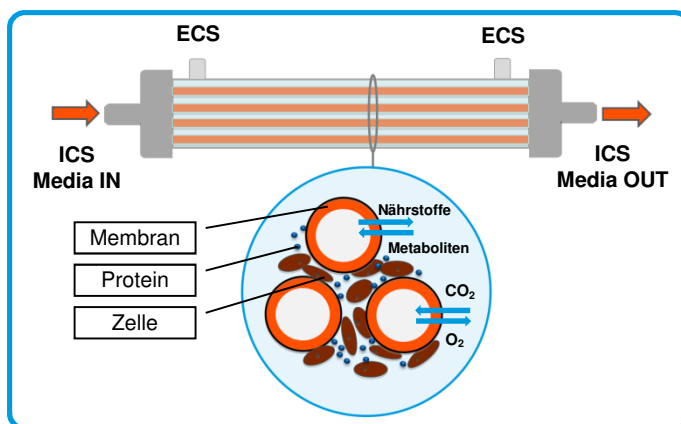


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Hohlfaser-Modul und der Kultivierungsmethode der Zellen im ECS

Die HF-Module und die für den Gasaustausch notwendigen Gas-Transfer-Module sind in das in sich geschlossene Cellab[®] Disposable Set integriert und werden auf der Cellab[®] Docking Station in einem Standard 37 °C CO₂-Inkubator betrieben. Die Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff für die Zellkultur wird durch einen semiautomatischen Prozess mittels der Docking Station gesteuert.

Material und Methoden

Das Experiment wurde mit einem Cellab[®] Disposable Set 5 HF/S (Art. Nr. 0510026) und einer Cellab[®] Docking Station mit 5-Kanal-Pumpe (Art. Nr. 0510017) mit einer Flussrate von 4,6 ml/min durchgeführt. Die HF-Bioreaktor Membran besteht aus Polysulfon und hat einen MWCO von 20 kDa. Die Kultivierungsfläche des Extracapillarraum (ECS) beträgt pro Modul 190 cm² bei einem Volumen von 1,8 ml. Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte jeweils im ECS von 3 Hohlfaser-Bioreaktoren in DMEM High Glucose mit 1 x Penicillin/Streptomycin und 10 % initialer FKS (Fetales Kälberserum) Konzentration. Die übrigen 2 HF-Module des 5er-Sets wurden in diesem Experiment nicht eingesetzt, da der Versuchsaufbau auf 3 Parallelkulturen ausgelegt ist.

Das Mediumreservoir, das durch den Innerkapillarraum (ICS) gepumpt wird, enthielt ebenfalls DMEM High Glucose mit 1 x Penicillin/Streptomycin, aber ohne FKS. Außerdem wurden 2 µg/ml Doxycyclin dem Medium zugegeben, um die Proteinexpression zu induzieren.

Das Zell-Kompartiment (ECS) der 3 HF-Module wurde am Tag 1 mit je 2×10^6 Zellen inokuliert. Diese Zellkonzentration schien für eine lebensfähige Besiedlungsdichte nicht ausreichend zu sein, denn es konnte in den ersten Tagen kein Verbrauch von Glukose festgestellt werden (siehe Abb. 2). Es erfolgte eine erneute Inokulation an Tag 7 mit 2×10^7 Zellen pro HF-Modul, was dann innerhalb weniger Tage zu einem messbaren Glukose-Verbrauch führte.

Das Mediumreservoir wurde zwei- bis dreimal pro Woche mit Hilfe einer sterilen 50 ml Spritze über den 3-Wege Hahn, im Schlauchset hinter den Hohlfaser-Bioreaktoren platziert, gewechselt. Jedes der 3 HF-Module verbrauchte 200-400 ml Medium pro Woche. Die Probenahme erfolgte mit einer sterilen 1 ml Spritze, ebenfalls über den 3-Wege Hahn. Die Glukose-Konzentration wurde mit einem GlucCell Glucose Monitoring Kit (Cesco) bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration des Zielproteins erfolgte mit StainFree-Gelen (BioRad) über eine Geldoc EZ und die zugehörige Software Image Lab.

Ergebnisse

Der Glukoseverbrauch der 3 HF-Module (siehe Abb. 2) hat sich über den Zeitraum von 65 Tagen auf einen Mittelwert von 135 mg/Tag angeglichen. Über die Kulturdauer zeigten die 3 Bioreaktormodule ein hohes Maß an Vergleichbarkeit, welches die hervorragende Reproduzierbarkeit des Systems aufzeigt.

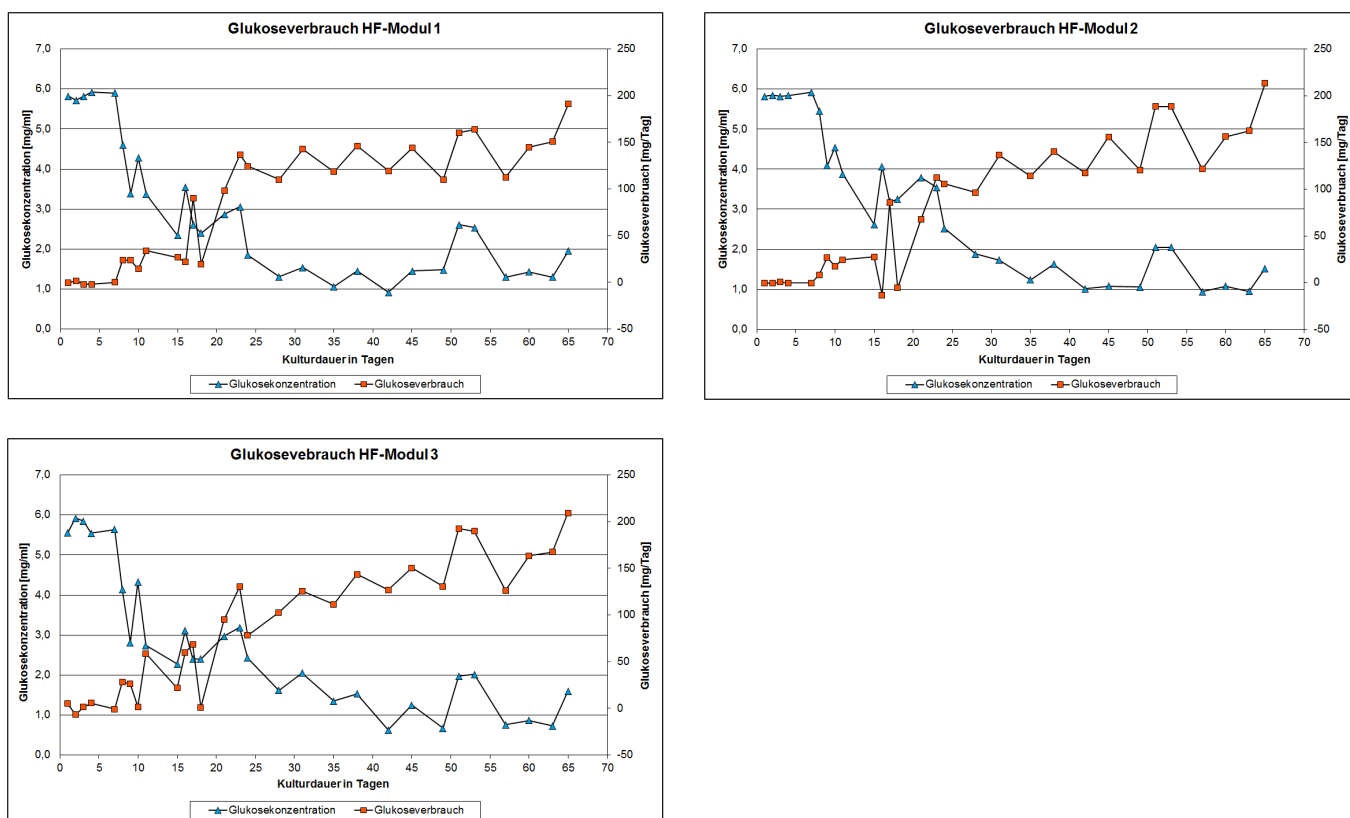


Abb.2: Glukoseverbrauch der Hohlfaser Bioreaktoren 1,2 und 3 über einen Zeitraum von 65 Tagen

Das von den HEK293-Zellen sezernierte Zielprotein, welches als Bande bei ca. 100 kDa im Gel läuft (siehe Markierung in Abb. 3, 4, 5), lässt sich problemlos mit einer sterilen 2 ml-Einwegspritze aus dem ECS des HF-Bioreaktors ernten. Bei der Ernte von je 1,6 ml wird gleichzeitig ein Teil der Zellen mit herausgespült. Dies verhindert eine zu hohe Zelldichte im Modul und fördert die kontinuierliche Proteinproduktion. Das Erntevolumen wird anschließend zentrifugiert, wodurch man ein zellfreies Produkt aus dem Überstand erhält.

Die berechnete Massenkonzentration des Zielproteins bleibt in jedem Modul über einen längeren Zeitraum bei gleichen Kultivierungsbedingungen stabil. Bei identischen Kultivierungsparametern sind zwischen den einzelnen HF-Modulen keine relevanten Unterschiede zu erkennen.

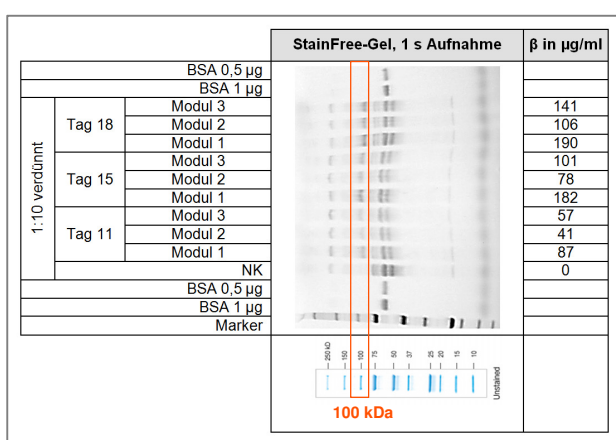


Abb.3: StainFree-Gel, aufgetragen sind die Zellkulturüberstände aus dem ECS der 3 Bioreaktoren von Tag 11, 15 und 18 sowie die Proteinkonzentration in µg/ml

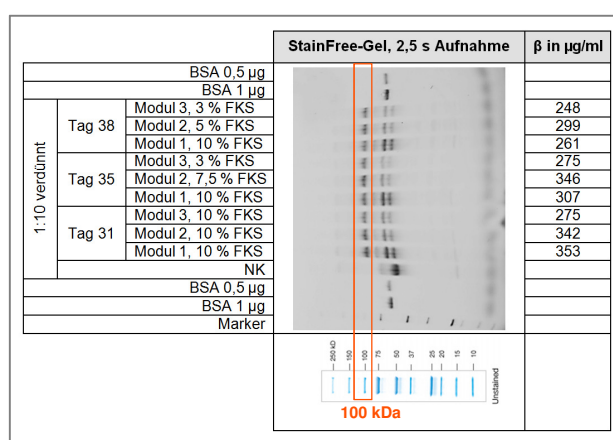


Abb.4: StainFree-Gel, aufgetragen sind die Zellkulturüberstände aus dem ECS der 3 Bioreaktoren von Tag 31, 35 und 38 sowie die Proteinkonzentration in µg/ml bei reduziertem FKS-Anteil im ECS-Medium

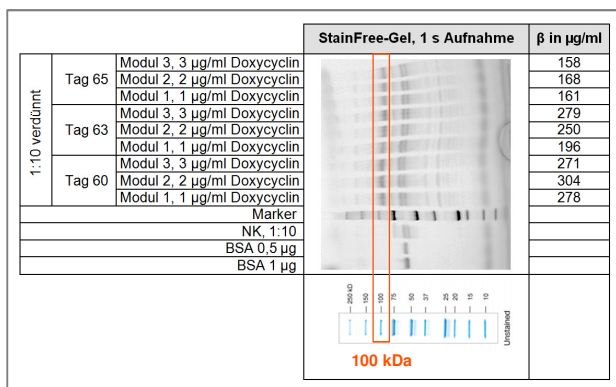


Abb.5: StainFree-Gel, aufgetragen sind die Zellkulturüberstände aus dem ECS der 3 Bioreaktoren von Tag 60, 63 und 65 sowie die Proteinkonzentration in µg/ml bei Änderung der Konzentration des Induktionsantibiotikums Doxycyclin sowohl im ICS- als auch im ECS-Medium

In Modul 2 wurde ab Tag 28 über mehrere Tage der FKS Gehalt des Mediums im Zell-Kompartiment von anfangs 10 % auf 3,5 % reduziert. Dies führte zu einem leichten Abfall der Proteinkonzentration (siehe Abb. 6). Ein abrupter Wechsel von 10 % FKS auf 3 % FKS ist ebenfalls möglich und wurde im Modul 3 durchgeführt.

Die Reduktion des FKS-Bedarfs führte zu einer wesentlichen Vereinfachung der Aufreinigung des Zielproteins infolge von weniger Fremdproteinen in der Erntefraktion. Trotz geringerer Proteinausbeuten lassen sich somit deutliche Kosteneinsparungen im Produktionsprozess erreichen.

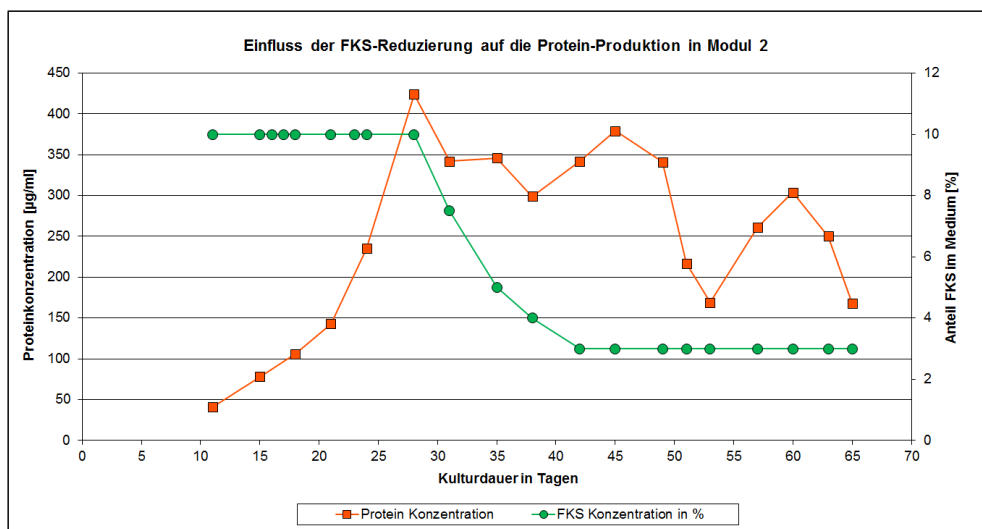


Abb.6: Einfluss der FKS Reduzierung auf die Protein-Produktion in Modul 2

Zusammenfassung:

Das über 65 Tage durchgeführte Langzeit-Kultivierungs-Experiment von protein-sezernierenden HEK293-Zellen in hohlfaserbasierten Bioreaktoren zeigt, wie effizient diese Kultivierungsmethode ist. Die Proteinkonzentration der Erntefraktion erreichte bis zu 500 µg/ml. Das Kultivierungsverhalten der 3 HF-Bioreaktoren war bei gleichen Parametern nahezu identisch, was anhand der Daten des Glukoseverbrauchs (siehe Abb. 2) und dem Verlauf der Proteinkonzentrationen (siehe Abb. 7) deutlich feststellbar ist.

Dies zeigt, dass gerade der Einsatz des 5 HF/S Bioreaktor-Systems für die Validierung von Produktionsprozessen im Labormaßstab unter reproduzierbaren Kultivierungsbedingungen hervorragend geeignet ist.

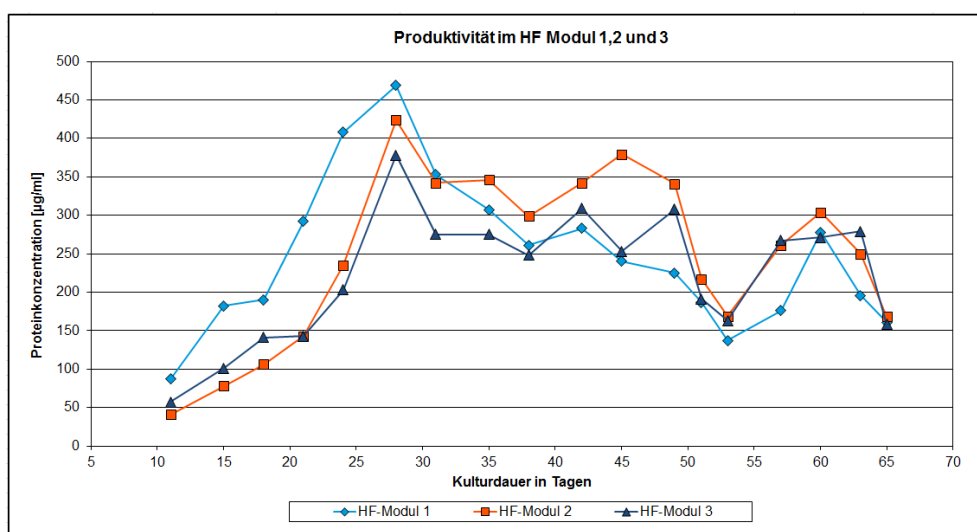


Abb.7: Proteinproduktivität in den 3 Hohlfaser Modulen über einen Zeitraum von 65 Tagen