

Antikörper-Produktion in Pflanzenzellen

Prozessentwicklung und -übertragung vom 50-ml- auf den 10-l-Maßstab

JOHANNA BRÄNDLI¹, MATTHIAS MÜLLER², NICOLE IMSENG¹,
STEFAN SCHILLBERG³, REGINE EIBL¹

¹ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN (ZHAW), WÄDENSWIL

²FACHHOCHSCHULE KÖTHEN DER HOCHSCHULE ANHALT

³FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND ANGEWANDTE OEKOLOGIE (IME), AACHEN

Engineered plant cells can be used in order to produce antibodies. Suitable methods for process development and scale-up allow fast production of pre-clinical antibody samples in single-use bioreactors.

DOI: 10.1007/s12268-012-0166-z
© Springer-Verlag 2012

■ Neben Säuger- und Insektenzellen sowie Mikroorganismen haben sich schnell wachsende, genetisch veränderte Pflanzenzellen zur Produktion von Proteinpharmazeutika bewährt [1]. Obwohl gegenwärtig beim Einsatz von Pflanzenzellen Limitierungen hinsichtlich der Glykosylierung bestehen können und die Produkttiter sowie die Produktstabilität häufig noch gering sind, wurde 2006 mit einem Veterinärimpfstoff gegen den Erreger der atypischen Geflügelpest das erste pflanzenzellbasierte Proteinpharmazeutikum zugelassen [2]. Mit Taliglucerase alfa zur Behandlung von Morbus Gaucher befindet sich ein Biopharmazeutikum für die Humananwendung kurz vor der Zulassung [2]. Weitere Enzyme, Vakzine und Antikörper, die mehrheitlich mit pflanzlichen Suspensionszellen hergestellt werden, befinden sich in der Entwicklung. Für ihre Produktion werden neuerdings auch pneumatisch angetriebene Einwegblasensäulen sowie orbital geschüttelte und wellendurchmischte Einwegbioreaktoren verwendet [3].

Orbital geschüttelte und wellendurchmischte Einwegbioreaktoren

Bei Einwegbioreaktoren sind die aus FDA (US Food and Drug Administration)-konformen Kunststoffen bestehenden Kultivierungscontainer für den Einmalgebrauch bestimmt [4]. Schon nicht-instrumentierte Tubes wie der orbital geschüttelte CultiFlask 50 Disposable Bioreactor (Sartorius Stedim Biotech; **Abb. 1A**) gestatten ein Hochdurchsatz-Screening im Milliliter-Maßstab. Der Gasaustausch mit der Umgebung wird hier über eine Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran im Deckel realisiert, die gleichzeitig als Sterilbarriere fungiert.

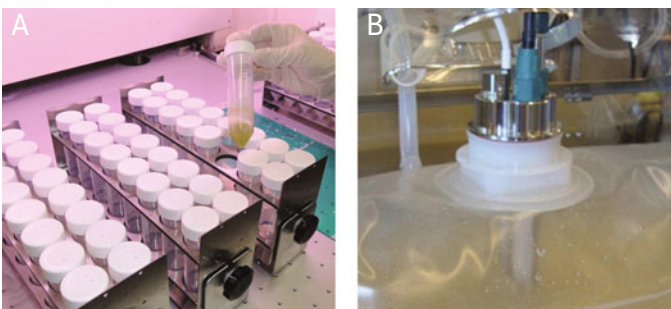
Anwenderseitig werden jedoch wellendurchmischte Einwegbioreaktoren wie der BIOSTAT CultiBag RM (Sartorius Stedim Biotech) oder der AppliFlex Single Use Bioreactor (Applikon Biotech; **Abb. 1B**) bei Produktionsverfahren mit pflanzlichen Suspensionszellen vorgezogen [1]. Sie haben eine eigene Mess-, Steuer- und Regeleinheit. Die Kultivierung erfolgt in einem flexiblen Beutel,

dem Bag, der auf einem temperierbaren Rocker fixiert ist. Der Bag ist mit Einweg- oder Standardsensoren zur Messung und Regelung des pH-Wertes und Gelöstsauerstoffgehalts (DO) ausgerüstet. Infolge der Bewegung des Rockers wird eine Welle im Bag induziert. Energieeintrag und Sauerstoffübergang lassen sich über die Rocking-Rate, den Rocking-Winkel, den Befüllungsgrad und die Begaungsrate einstellen.

Produktion des M12-Antikörpers im orbital geschüttelten 50-ml-Bioreaktor

Die Produktionszelllinie für den M12-Antikörper wurde über transformierte Kalluskulturen des Tabakkultivars BY-2 (*Nicotiana tabacum*) etabliert [1]. Sowohl die Erhaltungskultivierung als auch die Inokulumproduktion wurden in Erlenmeyerkolben durchgeführt. Zur Untersuchung des Zellwachstums und der Produktbildung in den orbital geschüttelten CultiFlask-Systemen (240 rpm, 26 °C, kein Licht) wurden immer drei Tage alte Suspensionskulturen (36. Passage) verwendet. Die Batch-, Feeding- und Medien austauschansätze in den CultiFlask-Systemen mit zehn Milliliter Kulturvolumen bei einem initialen pcv (*packed cell volume*) von zehn Prozent wurden über acht bzw. neun Tage gefahren. Die Zufütterung (ein Feed) des Produktionsmediums (MSM mit 100 Millimol Nitrat aus Salpetersäure) bzw. der Austausch (ein Austausch) des Wachstums- gegen das Produktionsmedium fand bei einem pcv zwischen 30 und 40 Prozent am dritten Kultivierungstag statt.

Wie von Raven *et al.* [1] beschrieben, unterstützte die Entkopplung der Wachstums- und Produktionsphase durch Nitrat



◀ **Abb. 1:** Einwegbioreaktoren zur Produktion von Antikörpern in Pflanzenzellen **A**, orbital geschüttelter Bioreaktor. CultiFlask 50 Disposable Bioreactors (Sartorius Stedim Biotech), die in einer Multitron Cell (25 Millimeter Schüttelhub, Infors) inkubiert werden. **B**, wellendurchmischter Bioreaktor. AppliFlex Single Use Bioreactor mit 10-l-Bag und Standardsensoren (Applikon Biotech). Dieser Bioreaktor hat eine eigene Mess-, Steuer- und Regeleinheit.

im Produktionsmedium die M12-Bildung. Während die Batch-Produktionen im CultiFlask-System am fünften Kultivierungstag 5,8 mg/l des M12-Antikörpers lieferten (Referenzschüttelkolben 6 mg/l), wurden 48 Stunden nach Einleitung der Produktionsphase im Feeding- und Austauschversuch 16 mg/l bzw. 25,6 mg/l erreicht. Wird die biomassespezifische Produktion betrachtet, garantiert das Feeding-Verfahren sogar 1,4-mal höhere M12-Ausbeuten als das Austauschverfahren. Deshalb wurde im Hinblick auf die leichtere, technische Umsetzbarkeit entschieden, die Prozessübertragung auf das wellendurchmischte AppliFlex-System im Feeding-Modus durchzuführen. Für den AppliFlex wurde festgelegt, einen Feed auf fünf Liter Kulturvolumen zu realisieren und die Kultivierungen bei einem Befüllungsgrad von 25 Prozent des Bag-Totalvolumens sowie einer Belüftungsrate von 0,5 vvm zu starten. Der im CultiFlask unter den realisierten Versuchsbedingungen erreichte durchschnittliche Sauerstoffübergangskoeffizient ($k_L a$ -Wert) von 7,6 pro Stunde sollte dabei im AppliFlex nicht unterschritten werden.

Prozessübertragung auf einen wellendurchmischten 10-l-Bioreaktor

Die Wachstums- und Produktionsphase in dem wellendurchmischten AppliFlex finden unter ähnlichen Strömungsbedingungen und einem vergleichbaren Sauerstoffübergang wie im BIOSTAT CultiBag RM statt [1]. Deshalb wurde der AppliFlex hinsichtlich Mischzeiten und $k_L a$ -Werten verfahrenstechnisch charakterisiert [5] und basierend auf diesen Resultaten beim Feeding-Verfahren eine Kaskadenschaltung verwendet. **Tabelle 1** fasst die ermittelten Parameterkombinationen zusammen, aus welchen der in **Abbildung 2** exemplarisch gezeigte Biomassewachstums- und Produktbildungsverlauf resultierten.

Angeimpft wurde der Bag mit einem pcv von 15 Prozent (40. Passage). Die Produktionsphase wurde durch das Feeden des Nitrat-haltigen Produktionsmediums bei einem pcv von 40 Prozent (dritter Kultivierungstag) induziert. Wie in den CultiFlask-Ansätzen (Feeding) wurde die maximale M12-Menge im AppliFlex am Tag 5 erreicht. Aufgrund des zunehmenden Alters der Kultur lag diese bei 14 mg/l. Die Biomasse konnte dagegen um 33 Prozent gesteigert werden.

Tab. 1: Geeignete Parameterkombinationen für eine Kaskadenschaltung im 10-l-Bag des wellendurchmischten AppliFlex Single Use Bioreactors.

2,5 l Kulturvolumen		5 l Kulturvolumen	
Rocking-Rate [rpm]	Rocking-Winkel [°]	Rocking-Rate [rpm]	Rocking-Winkel [°]
20	3	20	7
20	4	20	8
20	5	20	9
22	5	22	9
		25	9

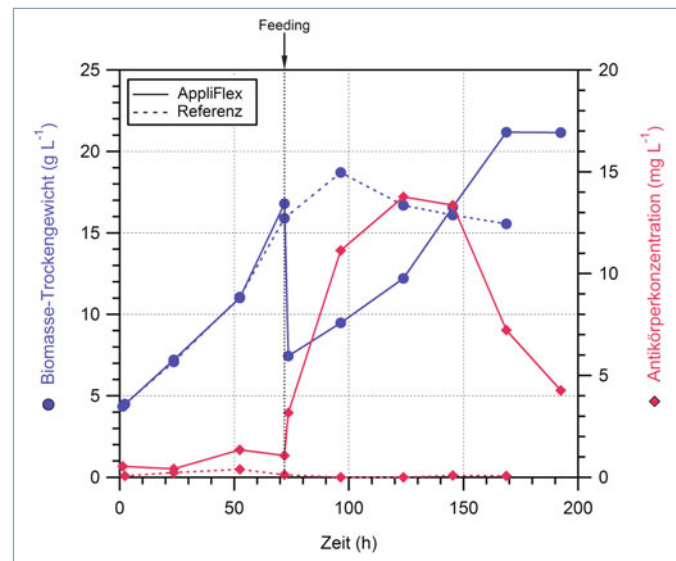


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Trockengewichtskonzentration und der M12-Bildung im wellendurchmischten 10-l-AppliFlex Single Use Bioreaktor und einem Referenzschüttelkolben.

Fazit

Orbital geschüttelte, nicht-instrumentierte Einwegbioreaktoren wie der CultiFlask 50 Disposable Bioreactor lassen sich zur schnellen und günstigen Prozessentwicklung bei der Produktion von Biopharmazeutika in pflanzlichen Suspensionszellen einsetzen. Die Prozessübertragung auf mit Standardsonden ausgerüstete, wellendurchmischte Einwegbioreaktoren wie dem AppliFlex Single Use Bioreaktor ist für biphasische Prozesse mit entkoppelter Wachstums- und Produktionsphase über die Anpassung der Rocking-Rate und des Rocking-Winkels möglich.

Literatur

- [1] Raven N, Schillberg S, Kirchoff J et al. (2011) Growth of BY-2 suspension cells and plantibody production in single-use bioreactors. In: Eibl R, Eibl D (Hrsg) Single-use technology in biopharmaceutical manufacture. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. 251–261
- [2] Xu J, Ge X, Dolan MC (2011) Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv* 29:278–299
- [3] Eibl R, Werner S, Eibl D (2009). Disposable bioreactors for plant liquid cultures at litre-scale. *Eng Life Sci* 9:156–164
- [4] Eibl D, Peuker T, Eibl R (2011) Single-use equipment in biopharmaceutical manufacture: a brief introduction. In: Eibl R, Eibl D (Hrsg) Single-use technology in biopharmaceutical manufacture. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey. 3–11
- [5] Müller M (2010) Realisierung eines zweistufigen Prozesses zur Plantibodyproduktion mit BY-2 Suspensionszellen im AppliFlex Bioreaktor. Bachelorarbeit, FH Anhalt



Johanna Brändli, Matthias Müller, Nicole Imseng, Stefan Schillberg und Regine Eibl (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ing. Regine Eibl
Zürcher Hochschule für
Angewandte Wissenschaften
Institut für Biotechnologie
Fachstelle für Bioverfahrens- und
Zellkulturtechnik
Campus Grüental
CH-8820 Wädenswil
Tel.: +41-(0)58-934-5713
regine.eibl@zhaw.ch
www.ibt.zhaw.ch/zellkulturtechnik