



Doctoral Thesis

Metabolic studies of mammalian cells in a fluidized bed reactor

Author(s):

Schuppenhauer, Michael Rainer

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001513405> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETHZ No. 11280

Metabolic Studies of Mammalian Cells in a Fluidized Bed Reactor

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

in candidacy for the degree of Doctor of Technical Sciences

presented by

Michael Rainer Schuppenhauer

Diplom-Ingenieur, Verfahrenstechnik, TU Hamburg-Harburg

born November 16, 1966 in Hamburg, Germany

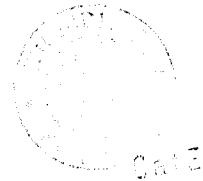
citizen of the Federal Republic of Germany

accepted on recommendation of

PD Dr. Irving J. Dunn, examiner

PD Dr. Bernhard Sonnleitner, co-examiner

Zürich, August 16, 1995



Abstract

The present work is directed at the investigation of a fluidized bed reactor for animal cell culture, where cells adhere to macro-porous borosilicate glass carriers (SIRAN), and are suspended by recirculating upwards flowing medium.

Axial gradients for relevant metabolites in fluidized bed reactors used for industrial production of recombinant proteins in high-density cell culture systems were investigated using a new approach. A system is presented that allows non-invasive localized ^{31}P -NMR spectroscopy in a solid-liquid fluidized bed using a biomedical magnetic resonance imaging instrument. Further, stable process control, allowing direct measurement of metabolic rates was achieved using a hardware controller (IMCS 2000) and a LabVIEW based object-oriented setpoint control and data-acquisition program with graphical user interface. This set-up allowed the non-invasive monitoring of the influence of pH and oxygen gradients on the energy state of the cells at different locations within the reactor. Application of step changes gave access to transport pattern and revealed an axial cell density gradient causing stratification.

The application of step changes and limiting conditions for the lead-nutrient glucose revealed the relationships between the calculated energy metabolism, protein synthesis and glycosylation in a CHO cell line expressing recombinant human chorionic gonadotropin (hCG). During a longterm chemostat steady-state cultivation it was shown that the cell shifted pathways to generate energy for metabolism according to availability of substrate. However, the glycosylation pattern was not influenced as determined by the 7 acid isoforms detectable using immunoblotting techniques. Change to a proprietary medium formulation (CHO-S-SFM-II) increased metabolic activity and triggered specific protein production, but did not change the relative position or amount of isoforms. However, it added two isoforms at higher pI (4.7 and 5.5).

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht einen Wirbelschichtreaktor für die tierische Zellkultur, in dem Zellen adhären auf offenporigen Borosilikat Trägern wachsen, und mit den Trägern durch eine aufwärts gerichtete Strömung rezirkulierenden Mediums suspendiert werden.

Axiale Gradienten für die relevanten Metaboliten in der Wirbelschicht, die auch für die industrielle Produktion von rekombinanten Proteinen in hochdichten Zellkulturen eingesetzt wird, wurden mittels eines neuen Ansatzes untersucht. Ein System wird vorgestellt, das nicht-invasive lokalisierte ^{31}P -NMR Spektroskopie in einer fest-flüssig Wirbelschicht mittels eines biomedizinischen Kernspintomographen erlaubt. Eine stabile Prozesskontrolle, die die direkte Bestimmung metabolischer Raten erlaubt, wurde durch einen Hardware-Controller (IMCS 2000) und ein auf LabVIEW basierendem objekt-orientierten SCADA Programm mit graphischer Benutzeroberfläche erreicht. Dieses erlaubte die nicht-invasive Bestimmung des Einflusses von pH und gelöstem Sauerstoff auf den Energie Zustand der Zelle an verschiedenen Orten im Reaktor. Die Verwendung von Stufenänderungen erlaubte Zugang zu Transportmustern und deckte einen axialen Gradienten bezüglich der Zelldichte auf, der in einer Klassierung der Wirbelschicht resultierte.

Die Anwendung von Stufenänderungen und Limitationen bezüglich des Leitsubstrates Glukose, zeigte den Zusammenhang zwischen berechnetem Energiemetabolismus, Proteinsynthese und Produktglykosylierung einer CHO Zelllinie, die rekombinantes humanes Choriogonadotropin (hCG) produziert. Während einer kontinuierlichen Langzeit-Kultivierung konnte an verschiedenen Fließgleichgewichten gezeigt werden, dass die Zelle ihre Stoffwechselfade in Abhängigkeit vom zur Verfügung stehenden Substrat wechselt, um ausreichend Energie zu erzeugen. Eine

Veränderung des Glykosylierungsmusters, gemessen mittels Immundetektion der sieben im sauren Bereich gefundenen Isoformen, konnte nicht beobachtet werden. Mediumwechsel auf eine serum-freie Formulierung (CHO-S-SFM-II) steigerte die metabolische Aktivität und erhöhte die spezifische Proteinproduktion, veränderte jedoch nicht die Lage und relative Menge der Isoformen. Es fügte jedoch zwei Isoformen mit höherem pI (4.7 und 5.5) hinzu.