

DISS. ETH NO. 18047

A Novel Lobed Taylor-Couette Bioreactor for the Cultivation of Shear Sensitive Cells and Tissues

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Timm Tanzeglock

Dipl. Biotechnol. Technical University Braunschweig, Germany

born on the 4th of July, 1976

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M. Morbidelli (ETH Zurich), examiner

Prof. Dr. M. Fussenegger (ETH Zurich), co-examiner

2008

Abstract

In the pharmaceutical industry mammalian cell lines gained more and more attention in the last decade and are nowadays the primary expression system in the production of therapeutic recombinant proteins. Despite its diverse drawbacks, the stirred tank reactor (STR) is usually the system of choice and serves as major workhorse for most applications. To overcome the limitations faced in established processes, improved bioreactors are needed to provide a more favorable *in vitro* environment to mimic *in vivo* conditions.

In the first part of this work the influence of shear flow on the cell physiology is investigated to identify and anticipate the impact of this process parameter during cell cultivation. The major goal is to determine whether the type of shear flow, to which cells are exposed, influences the initiation of cell death. Two flow devices are employed to impose distinct hydrodynamic flow fields: a uniform steady simple shear flow and an oscillating extensional flow. The cellular response is evaluated by measuring the release of intracellular components into the culture supernatant, as indicator for membrane rupture and necrotic death, and by means of fluorescence activated cell sorting, to distinguish between necrotic and apoptotic cell death. It is shown that mammalian cells, indeed, distinguish between discrete types of flow and respond differently. They will enter the apoptotic pathway when subjected to low levels of hydrodynamic stress in oscillating, extensional flow. In contrast, necrotic death prevails when the cells are exposed to low levels of hydrodynamic stresses in simple shear flow or to high levels in extensional flow. However, under prolonged exposure to extensional flow cells suffer severe necrosis even under shear stresses comparable to the threshold obtained using

simple shear flow. The determined threshold values at which cells will enter the respective death pathway should be avoided when culturing cells to enhance culture longevity and productivity. Based on these studies, in the second part of this work, a novel bioreactor for the cultivation of shear sensitive cells and tissues is introduced. The proposed device is based upon a lobed Taylor-Couette reactor, which was developed recently in our laboratory. The unit consists of two concentric cylinders of different diameter. The inner one is polygonal-shaped and furnished with a silicone membrane for oxygenation. The cells are cultivated within the annular gap, where the liquid is set in motion by the rotation of the inner cylinder. It is shown that the proposed device is featuring good mass transfer characteristics at low shear values both in maximal magnitude as well as distribution. Further, the lobed Taylor-Couette bioreactor emerged superior to a common stirred tank reactor regarding cell cultivation: It is proven that the lag phase after inoculation is shortened, the maximum cell density as well as the growth rate is increased, and that the volumetric productivity is enhanced. Moreover, the lobed Taylor-Couette reactor introduces ten times more energy to the system, and therefore enhancing mass transfer with respect to the STR, without sacrificing cell viability or productivity. Additionally, cell cultivation without the medium supplementation with cell protective or antifoam reagents is feasible. Especially nowadays, where product integrity and consistency are of uttermost importance and strongly controlled by the regulatory authorities, the lobed Taylor-Couette reactor provides a suitable tool for biopharmaceutical research, development, and production. Possible applications could be found in the cultivation of cell suspensions, cell aggregates, large plant cells, adherent cells on microcarriers, shear-sensitive biocatalysts, stem cells or tissue scaffolds.

Zusammenfassung

Die Kultivierung von Säugetierzellen zur Produktion von pharmazeutischen Proteinen erlangte in den letzten Jahrzehnten große Aufmerksamkeit. Während der Prozessentwicklung und in der industriellen Produktion werden hierbei größtenteils Rührkessel verwendet. Nichtsdestotrotz unterliegt dieses System verschiedenen Limitationen, so dass die Entwicklung von alternativen Bioreaktoren im Fokus wissenschaftlicher Arbeit steht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird eine detaillierte Studie über das zelluläre Verhalten bei Stressbeanspruchung im Kulturmedium durchgeführt. Mittels zweier hydrodynamischer Modellsysteme werden Säugetierzelllinien gezielt definierten Scherbeanspruchungen ausgesetzt: einerseits einer gleichförmigen, einfachen Scherströmung in einem Rotationsviskosimeter und andererseits einer oszillierenden Dehnströmung, generiert in einer sich verengenden Kapillare. Hierbei wird aufgezeigt, dass bei Überschreiten einer kritischen Scherspannung die Zellen makroskopisch beschädigt werden und Nekrose eintritt. In Abhängigkeit von der auftretenden Strömungsform, unterliegen die Zellen unterschiedlichen Mechanismen des Zelltodes. Setzt man die suspendierten Zellen wiederholt einer schwachen Dehnströmung aus, tritt Apoptose (programmierter Zelltod) ein. Im Gegensatz dazu dominiert im laminaren Strömungsprofil eines Rheometers Nekrose. Anhand der ermittelten kritischen Grenzwerte können Rückschlüsse auf die Scherempfindlichkeit der Zelllinien gezogen werden und diese bei der Entwicklung und Optimierung von biopharmazeutischen Produktionsverfahren genutzt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die gewonnenen Erkenntnisse zur Scherempfindlichkeit der Zelllinien verwendet, um einen neuartigen Bioreaktor zu entwickeln und in Betrieb zu nehmen. Konzeptionell basiert der Reaktor auf einem Taylor-Couette System, welches in unserem Institut entwickelt wurde. Der Reaktor besteht aus zwei konzentrischen Zylindern unterschiedlichen Durchmessers, wobei der Innere einen polygonalen Querschnitt aufweist. Im Ringspalt wird die Zellkultivierung durchgeführt, wobei die Durchmischung des Mediums durch Rotation des Innenzylinders gewährleistet wird. Zur Sauerstoffversorgung der Zellsuspension wird eine Silikonmembran verwendet, die auf dem perforierten Innenzylinder befestigt ist, welcher von Innen unter Druck gesetzt wird. Hydrodynamisch betrachtet zeichnet sich der beschriebene Reaktor vor allem durch eine enge Verteilung der Energiedissipation im Reaktionsvolumen und einer verbesserten Mischzeit aus. Nach erfolgter Charakterisierung des Reaktors bezüglich Mischzeit, Massentransfer und Energiedissipation wird seine Tauglichkeit zur Zellkultivierung nachgewiesen. Als Vergleichsreaktor wird hierbei ein kommerzieller Rührkessel verwendet. In Bezug auf Wachstumsrate, maximal erreichbarer Zelldichte und Produktionsrate erweist sich der Taylor-Couette Reaktor dem Rührkessel überlegen. Außerdem erlaubt das vorgestellte System einen höheren Energieeintrag bei gleichzeitig geringerer Scherbeanspruchung und den Betrieb ohne medienergänzende Zellschutzreagenzien, und stellt somit eine vielversprechende Alternative zum konventionellen Rührkessel dar. Mögliche Einsatzbereiche reichen von der Kultivierung von Zellen in Suspension, als Aggregate oder auf Microcarriern bis hin zu scherempfindlichen Biokatalysatoren, Stammzellen oder Gewebekulturen.