



Doctoral Thesis

Scale-down modeling of CHO fed-batch processes for monoclonal antibody production

Author(s):

Sieck, Jochen Bastian

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007575960> →

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. ETH N° 20659

Scale-Down Modeling of CHO Fed-Batch Processes for Monoclonal Antibody Production

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

Jochen Bastian Sieck

Dipl. Biotechnol., Braunschweig University of Technology, Germany

born on 6th November 1979

citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. Morbidelli (ETH Zurich), examiner
Prof. Dr. A. De Mello (ETH Zurich), co-examiner
Dr. M. Soos (ETH Zurich), co-examiner

2012

Abstract

Stirred Tank Reactors (STRs) are the most widely used type of bioreactor for the production of therapeutic proteins with mammalian cell cultures in biopharmaceutical industry today. Some cell lines like Chinese Hamster Ovary (CHO) cells have been successfully cultivated in such bioreactors greater than 10 m³. However, mammalian cells can be damaged by hydrodynamic stress present in sparged STRs resulting in a reduction of productivity or cell death. The prediction of hydrodynamic stress in sparged STRs and the resulting stress responses of CHO cells are extremely challenging, particularly for large-scale reactors. Therefore, during early process development, it can usually not be predicted how a certain CHO clone will perform under large-scale bioreactor conditions. This poses a tremendous economic risk to biopharmaceutical companies.

In the first part of this thesis, a Scale-Down model of the hydrodynamic stress present in our production bioreactors was developed to circumvent this problem. The local energy dissipation rates ε in stirred tank bioreactors are highly inhomogeneous, and this inhomogeneity increases with scale. This was modeled at laboratory scale by cultivating at oscillating ε values to simulate the repeated passage of cells through these local environments in large-scale bioreactors. Intensity, frequency and duration of the oscillation were calculated based on estimated large-scale values. The investigated clone showed a reduced specific productivity with constantly high or oscillating

hydrodynamic stress in 2 L bioreactors, indicating that both the local maximum ϵ in production scale bioreactors as well as the oscillation of ϵ itself causes stress to the cells. Results of mRNA microarray analysis revealed that DNA damage and repair mechanisms were involved in the stress response. The results with this particular clone indicate that the parameters of the Scale-Down model were appropriate to generate stress, related to large-scale bioreactor operation. Thus, this Scale-Down model can be used to screen for clones that are suitable for production scale.

In the second part of the work, we developed a shear-sensitive particulate model system to precisely measure hydrodynamic stress in sparged stirred tank bioreactors. The novel polymethylmethacrylate (PMMA) system was applied in comparison with a well described clay-polymer system to characterize hydrodynamic stress in sparged 4 L bioreactors for a wide range of stirrer combinations and operating conditions. It was observed that two separate hydrodynamic stress regimes can be found in the studied bioreactor. The maximum hydrodynamic stress can be determined either primarily by the sparging or by the agitation rate.

For the final part of this work, cultivations were performed in both identified shear regimes to analyze the cells' responses and to determine the threshold values that limit the operating window of the considered CHO process. In bioreactors, cells could withstand up to 9-12 Pa of stress without compromise in performance. Outside this operating window, different stress responses could be identified depending on the shear regime. The stress responses were characterized using mRNA microarrays. The results indicated different response mechanisms to agitation and sparging related shear, which confirmed that cells react differently to these shear types.

Zusammenfassung

Rührkessel (*stirred tank reactors*, STRs) sind seit Jahren der verbreitetste Bioreaktortyp für die Produktion therapeutischer Proteine mit Säugerzellkulturen in der biopharmazeutischen Industrie. Einige Zelllinien wie *Chinese Hamster Ovary* (CHO) wurden erfolgreich in Bioreaktoren über 10 m³ kultiviert. Säugerzellen können jedoch durch Scherbeanspruchung in begasten Rührkesseln geschädigt werden, was zu einem Verlust an Produktivität oder zum Zelltod führen kann. Die Vorhersage von Scherbeanspruchung und Stressantworten von CHO-Zellen in begasten Rührkesseln ist nach wie vor schwierig, insbesondere für Bioreaktoren im Produktionsmassstab. Üblicherweise kann daher in der frühen Prozessentwicklung nicht vorhergesagt werden, wie sich ein einzelner CHO-Klon unter Produktionsbedingungen verhalten wird. Dies stellt ein erhebliches wirtschaftliches Risiko für biopharmazeutische Unternehmen dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein Scale-Down Modell der Scherbeanspruchung in Produktions-Bioreaktoren entwickelt, um dieses Problem zu umgehen. Die lokalen Energiedissipationsraten in gerührten Bioreaktoren sind inhomogen, was mit grösser werdendem Massstab noch zunimmt. Dies wurde im Labormassstab durch Kultivierung bei oszillierenden Leistungseinträgen simuliert. Für die Berechnung der Intensität, Frequenz und Dauer der Beanspruchung wurden die Verhältnisse des Produktions-Bioreaktors zugrunde gelegt. Der untersuchte Klon zeigte eine reduzierte spezifische Produktivität bei konstant hohem und bei oszillierendem Scherstress in 2 L Bioreaktoren. Dies zeigt dass sowohl der hohe Leistungseintrag als auch die Oszillation an sich einen Stress für die Zellen darstellt. Die Analyse des Transkriptoms zeigte eine Reaktion der Zellen, die auf DNA-Schäden und -Reparaturmechanismen hinweist. Die

Resultate mit diesem Klon deuten darauf hin, dass die Parameter des Scale-Down Modells geeignet sind, die Scherbeanspruchung der Produktion zu simulieren, und dass dieses Modell für das Screening nach Klonen, die für die Produktion geeignet sind, eingesetzt werden kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wird ein partikuläres, scherempfindliches Modellsystem entwickelt, um die höchste in einem Bioreaktor vorhandene Scherbeanspruchung zu bestimmen. Das neue, Polymethylmethacrylat(PMMA)-basierte System wurde mit einem bekannten Ton-Polymer-Flockensystem verglichen und eingesetzt, um den Scherstress in begasten 4 L Bioreaktoren für einen weiten Bereich von Betriebsbedingungen und Rührerkombinationen zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass zwei verschiedene Bereiche der Scherbeanspruchung unterschieden werden können.

Im finalen Teil der Arbeit wurden Kultivierungen in beiden identifizierten Bereichen der Scherbeanspruchung durchgeführt, um die Reaktionen der Zellen zu analysieren und die Grenzen für Scherbeanspruchung dieser CHO-Zelllinie zu ermitteln. In Bioreaktoren konnten die Zellen Scherstress bis 9-12 Pa ohne negative Auswirkungen aushalten. Jenseits dieser Grenzen konnten unterschiedliche Stressantworten beobachtet werden, abhängig davon ob der Scherstress hauptsächlich durch Begasung oder Rühren verursacht wurde. Die Stressantworten wurden mittels mRNA Microarrays charakterisiert. Diese zeigten ebenfalls verschiedene Stressantworten für Scherbeanspruchung durch Rühren und Begasung, was belegt dass die Zellen mit verschiedenen Mechanismen auf die unterschiedlichen Scherbeanspruchungen reagieren.