



Doctoral Thesis

## Criteria for scale-up and scale-down of bioreactors for cultivation of mammalian cells

**Author(s):**

Neunstoecklin, Benjamin

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010316660> →

**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 NO. 22131

**Criteria for scale-up and scale-down of bioreactors for  
cultivation of mammalian cells**

A dissertation submitted to  
ETH Zurich

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**Benjamin Neunstoecklin**

Dipl.-Biol. University of Heidelberg, Germany

born 31<sup>st</sup> of May, 1982

Citizen of Germany

accepted on the recommendation of

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

Prof. Dr. Rudiyanto Gunawan (ETH Zurich), co-examiner

Dr. Miroslav Soos (ETH Zurich), co-examiner

Dr. Matthieu Stettler (Merck Serono), co examiner

Zurich, 2014

## Abstract

Application of quality by design (QbD) requires identification of the maximum operating range for parameters affecting the cell culture process. These include hydrodynamic stress, mass transfer or gradients in dissolved oxygen, carbon dioxide and pH. Since most of these are affected by the impeller design and speed, the main goal of the first part of this work was to identify the maximum operating range for hydrodynamic stress, where no variation of cell growth, productivity and product quality can be ensured. To properly represent the oscillation stress exposure of cells in large-scale bioreactors, two scale-down models were developed operating under laminar and turbulent condition, generating repetitive oscillating hydrodynamic stress with maximum stress values ranging from 0.4 to 420 Pa. Two manufacturing cell lines (CHO and Sp2/0) used for the synthesis of therapeutic proteins were employed. For both cell lines multiple process outputs were used such as cell growth, morphology, metabolism and productivity, to determine the threshold values of hydrodynamic stress resulting in values equal to  $32.4 \pm 4.4$  Pa and  $25.2 \pm 2.4$  Pa for CHO and Sp2/0, respectively. Below the measured thresholds both cell lines did not show any appreciable effect to hydrodynamic stress on any critical quality attribute, while above, cells responded negatively to elevated stress. To confirm the applicability of the proposed method, the obtained results were compared with data generated from classical small-scale reactors with a working volume of 3L.

Although several scaling models are suggested and described in the literature, they mostly lack reasonable validation or comparison at pilot or manufacturing-scale. Therefore, the second part of this work is dedicated to a validation of the before developed oscillating shear system. A 300 L pilot scale bioreactor was used for the validation, operated at either safe agitation conditions (7 Pa) or at 28 Pa, corresponding to the edge of failure (25 Pa) of the used Sp2/0 cell line. In order to consider the simultaneous action of stirring and sparging the

maximum stress values for the used bioreactors were determined using a stress sensitive particulate system. Pilot scale data were compared with historical data from classical 3 L cultivations and cultivations from the oscillating stress loop model. Results for the growth behavior, analyzed metabolites, productivity and product quality showed a dependency on the different environmental stress conditions but not on reactor size. Pilot scale conditions were very similar to those generated in the oscillating stress loop model confirming its predictive capabilities, including conditions beyond the edge of failure.

The final part of this work extends the investigation to multiple scale dependent parameters as observed from the oscillatory environment of a large-scale bioreactor. Parameters studied were increasing dissolved carbon dioxide over time, oscillation of hydrodynamic stress and dissolved oxygen plus the perturbation of the pH by a basic feed. Parameters were first examined individually resulting in the corresponding threshold values. A two zone model consisting of two differently sized interconnected bioreactors was developed to perform combinatorial experiments. With this model the most realistic large-scale environment was simulated and the validity of the before determined thresholds was reevaluated. Using different bubble sizes, elevated  $dCO_2$  levels were simulated resulting in a critical value of 100 mmHg, which inhibited growth completely. Combination experiments in the two zone model showed that the oscillation of dissolved oxygen between 40 and 60 % had no negative impact on growth or metabolism. In contrary, the combination of stress and elevated  $dCO_2$  levels both being below their individual threshold values, results in a combined negative effect on growth and productivity. This clearly indicates that only studies with combined effects of several parameters would represent the proper strategy when constructing a design space for a cell cultivation process.

# Zusammenfassung

Die Anwendung von „Quality by Design“ (QBD) benötigt die Identifizierung der maximal anwendbaren Prozessparameter, die den Zellkulturprozess beeinflussen. Diese sind hydrodynamischer Stress, Massentransfer oder Gradienten in gelöstem Sauerstoff und Kohlendioxid. Da diese durch die Rührerdrehzahl beeinflusst sind, ist das Hauptziel des ersten Teils dieser Arbeit die Identifizierung der maximalen Prozessparameter für hydrodynamischen Stress, bei denen kein negativer Effekt auf Zellwachstum, Produktivität und Produktqualität zu beobachten ist. Um die oszillierende Natur des hydrodynamischen Stresses nachzuahmen, wurden zwei scale-down Modelle entwickelt, welche unter turbulenten oder laminaren Konditionen arbeiten. Diese generieren einen oszillierenden Maximalstress von 0.4 Pa bis 420 Pa. Zwei industrielle Produktionszelllinien (CHO und Sp2/0) wurden untersucht. Für beide Zelllinien wurden mehrere Prozessresultate wie Zellwachstum, Aussehen, Metabolismus und Produktivität benutzt, um einen Schwellenwert zu definieren. Diese Werte waren  $32.4 \pm 4.4$  Pa für CHO Zellen und  $25.2 \pm 2.4$  Pa für Sp2/0 Zellen. Unterhalb dieses Schwellenwertes zeigten beide Zelltypen keinen deutlichen Effekt gegenüber hydrodynamischem Stress, bezüglich kritischer Qualitätsattribute. Über dem Schwellenwert wurde jedoch eine negative Zellantwort beobachtet. Um die Anwendbarkeit der vorgestellten Methode zu überprüfen, wurden die Resultate mit Daten aus klassischen 3 L Laborbioreaktoren verglichen.

Obwohl verschiedene Scaling Modelle in der Literatur beschrieben sind, wurden diese meistens nicht mittels Pilot- oder Produktionsanlagen validiert. Der Zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Validierung des zuvor beschriebenen Modells. Hierzu wurde ein 300 L Bioreaktor benutzt, welcher entweder unter einer sicheren Rührgeschwindigkeit (7 Pa) oder einer Rührgeschwindigkeit über dem Schwellenwert (28 Pa), welcher dem „Edge of failure“ entsprach, betrieben wurde. Um die Eigenschaften von Rührer und Begasung

zusammen zu betrachten, wurden die verwendeten Bioreaktoren mit einem Stress sensitiven System charakterisiert. Die Resultate der Pilotanlage wurden mit Daten des scale-down Modells und mit solchen aus klassischen 3 L Bioreaktoren verglichen. Resultate für Wachstum, Metabolite, Produktivität und Qualität zeigten eine Abhängigkeit von den angewendeten maximalen Stresswerten, aber nicht von der Grösse des Reaktors. Daten aus der Pilotanlage waren sehr vergleichbar zu denen aus dem scale-down Modell. Dies bestätigt die Voraussagefähigkeit des Geräts einschliesslich der Bedingungen über dem Schwellenwert.

Der letzte Teil der Arbeit erweitert die Studie im Hinblick auf die Untersuchung verschiedener grössenabhängiger Parameter, wie sie in Produktionsanlagen beobachtet werden. Diese waren Anreicherung von CO<sub>2</sub> über die Prozesszeit, Oszillation von hydrodynamischem Stress und gelöstem Sauerstoff plus Abweichungen vom pH-Wert. Die Parameter wurden zur Evaluierung der einzelnen Schwellenwerte zunächst einzeln untersucht. Ein zwei-Zonen Modell, bestehend aus zwei unterschiedlich grossen miteinander verbundenen Bioreaktoren, wurde entwickelt. Mit diesem Modell konnte die realistischste Umgebung eines Produktionsbioreaktors nachgeahmt werden und die Validität der zuvor festgelegten Schwellenwerte wurde neu evaluiert. Mittels Verwendung verschiedener Blasengrössen bei der Begasung wurde die Anreicherung von gelöstem CO<sub>2</sub> simuliert, resultierend in einem kritischen Schwellenwert von 100 mmHg, welcher zum Wachstumsstop führte. Kombinationsexperimente im zwei-Zonen Modell zeigten, dass die Oszillation von gelöstem Sauerstoff zwischen 40 und 60 % keinen negativen Einfluss auf Wachstum und Metabolismus hatte. Andererseits resultierte die Kombination aus Stress und erhöhtem gelöstem CO<sub>2</sub> in reduziertem Wachstum und reduzierter Produktivität, obwohl beide unterhalb des zuvor festgelegten Schwellenwertes waren. Diese Ergebnisse weisen klar darauf hin, dass nur Kombinationsstudien mit mehreren Parametern eine gute Strategie zur Erstellung eines „Design Spaces“ aufweisen.