

Optimierung von Zellkulturprozessen mittels Design of Experiment

Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner

Technische Universität Hamburg-Harburg
Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik
(Leiter: Prof. Dr. An-Ping Zeng)



AG „Zellkulturtechnik und Tissue Engineering“ „Cell Service Center“ im Forschungsschwerpunkt RIM (Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner)

Zellkulturprozesse zur Wirkstoffproduktion

- Steuerung von *fed-batch*-Prozessen
- Design, Betrieb und Scale-up von Festbettreaktoren mit immobilisierten Zellen
- Prozesstechnische Charakterisierung von Zellkultur-Bioreaktoren

Tissue Engineering

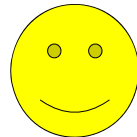
- Herstellung implantierbarer Knorpel-Träger-Konstrukte als Gelenkflächenersatz
- 3D-Gewebekulturen für Toxizitätstests

Bioprosesstechnik

- Tools zur Prozessentwicklung für Fermentationen unter extremen Bedingungen (ProTool – Biokatalyse2021, u.a. mit Prof. Hass, HS Bremen)

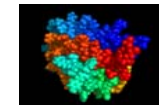
Ziele bei biotechnologischen Prozessen

- hohe Zell- und/oder Produktkonzentrationen
- hohe Raum-Zeit-Ausbeute
- effiziente Mediumausnutzung

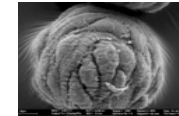


Beispiel Produktion von Biopharmaceuticals mittels tierischer oder humaner Zellen

- Große wirtschaftliche Bedeutung (virale Vakzine, Antikörper für Diagnostik und Therapie, rek. Glykoproteine als Wirkstoffe)
- Hohe Anforderungen an die Kultivierungstechnik (Zelleigenschaften, Medium, Prozessdauer, Prozessführung)
- Experimentelle Prozessauslegung und -optimierung sehr zeitaufwendig
- Großer Bedarf an gut ausgebildetem Personal



Erythropoietin
(Quelle: wikipedia)



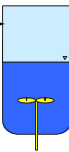
Optimierung biotechnologischer Prozesse

- Zelllinien- und Medienoptimierung 
- Reaktorsystem → **gerührte Reaktoren für Suspensionkultur** 
- Prozess- und Kontrollstrategie → **batch, fed-batch** 
- Ausbildung / Schulung → **Trainings-simulatoren** 

Optimierung biotechnologischer Prozesse

- Zelllinien- und Medienoptimierung
- Reaktorsystem
- **Prozess- und Kontrollstrategie für fed-batch-Prozesse**
- Ausbildung / Schulung

Probleme beim fed-batch

- exponentielles Wachstum → Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff (bei aeroben Organismen) steigt in ähnlicher Weise 
- häufig Veränderungen im Metabolismus der Zellen während einer Kultivierung oder zwischen aufeinander folgenden Kultivierungen
- Zulaufmedium beim fed-batch stark konzentriert → Überfütterung, Bildung und Anreicherung inhibierender Metabolite
- während des Prozesses stehen nur wenige Größen als online-Messgrößen zur Verfügung → Steuerungs- bzw. Regelungsstrategien schwierig
- Kontrolle des Prozesses bei niedrigen Substratkonzentrationen kann ggf. zu verringertem Zellwachstum oder Absterben der Zellen führen

→ **Optimierungsstrategie**

Beispiele für fed-batch-Steuerung

Fütterungsstrategien ohne zusätzliche Messdaten aus dem Prozess

- repeated fed-batch
- konstanter Zulaufstrom
- lineare oder exponentielle Zunahme des Zulaufstromes

Strategien mit zusätzlichen Informationen aus dem Prozess

- Proportional-Fütterung mittels Sauerstoffaufnahme (OUR)

Modellgestützte Prozessführungsstrategien

- modellgestützte, rückgekoppelte, adaptive Prozesssteuerung
 - iterative Anpassung der Zulaufströme
 - modellgestützte, rückgekoppelte adaptive Prozessführung mit optimierter Raum-Zeit-Ausbeute (OLFO)



Beispiele für *fed-batch*-Steuerung

Vergleich verschiedener *fed batch*-Strategien für Hybridom-Zelllinie***

Strategie	max. Zellkonz. [Zellen mL ⁻¹]	c_{MAB}/c_{MAB_batch} [-]
lineare Profile**	1,8 – 3,6×10 ⁶	0,7 – 1,25
OUR	2,8×10 ⁶	1,5
„a priori“	3×10 ⁶	1
OLFO	2,7×10 ⁶	2,9

* für eine jeweils parallel durchgeführte *batch*-Kultur bei max. 2×10⁶ Zellen mL⁻¹

** abhängig vom vorgegebenen Profil

Mab: monoklonale Antikörper

*** Prof. fil. Dr. Volker Kasche, TUHH

Beispiele für *fed-batch*-Steuerung

Vergleich verschiedener *fed batch*-Strategien für Hybridom-Zelllinie

2 Promotionen

8 Jahre Förderung durch Volkswagenstiftung, DFG, EU

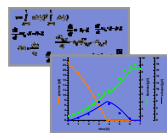
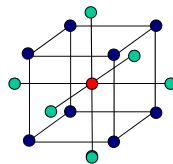
Lange Erfahrung mit einer Zelllinie

→ Geht's auch schneller?

→ Was ist bei wenig charakterisierten Zelllinien zu tun?

Optimierungsstrategien für *fed-batch*

- experimentell
 - Design of Experiments (DoE)
 - große Anzahl von Experimenten erforderlich, sehr zeit- und kostenintensiv
- Modellsimulationen
 - erfordert mathematisches Modell zu Zellwachstum, Metabolismus und Produktivität, Modellerstellung oft zeitaufwändig
 - Güte der Prädiktion?
- Lassen sich experimentelle und modellgestützte Strategien verknüpfen?



Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien

Problem:

- Vielzahl möglicher Strategien
- Hoher experimenteller Aufwand zur Bewertung der Strategien

Lösungsansatz:

- Durchführung weniger, repräsentativer *batch*-Experimente
- Modellierung - Anpassung kinetischer Parameter mit ausgewählten Modellen
- Bewertung verschiedener *fed batch*-Strategien *in silico* mittels DoE
- Durchführung ausgewählter Experimente

Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

batch-Experimente im Schüttelkolben

Ansatz	c _{Glucose} [mmol L ⁻¹]	c _{Glutamin} [mmol L ⁻¹]	c _{Ammonium} [mmol L ⁻¹]	c _{Laktat} [mmol L ⁻¹]	
1	10	5	0	0	Glucose-limitierung
2	30	2	0	0	Glutamin-limitierung
3	30	5	2	0	Ammonium-inhibierung
4	30	5	0	30	Laktat-inhibierung

jeweils Doppelbestimmung, Dauer 190 h

→ Bestimmung der kinetischen Parameter

Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

Modellierung → Anforderungen an das Prozessmodell

- hinreichend gute Beschreibung des gesamten Kultivierungsverlaufes (exponentielle Wachstumsphase, stationäre Phase, Absterbephase)
- schnelle Identifizierbarkeit der Modellparameter anhand weniger Messdaten
- Beschreibung unterschiedlicher Kultivierungsverläufe durch Adaption der Modellparameter
- hinreichend gute Vorhersagequalität
- einfache Übertragbarkeit auf verschiedene Zelllinien

Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

Modellierung

Biophase:

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - \mu_d) \cdot X_v - \frac{F_{in,v} + F_{in,w}}{V} \cdot X_v$$

$$\frac{dX_b}{dt} = \mu \cdot X_b - \frac{F_{in,b} + F_{in,w}}{V} \cdot X_b$$

Flüssigphase:

$$\frac{dc_{Glc}}{dt} = \frac{F_{in,Glc}}{V} (c_{Glc,r} - c_{Glc}) - \frac{F_{in,w}}{V} c_{Glc} - q_{Glc} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Gln}}{dt} = \frac{F_{in,Gln}}{V} (c_{Gln,r} - c_{Gln}) - \frac{F_{in,w}}{V} c_{Gln} - q_{Gln} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Amn}}{dt} = \frac{F_{in,Amn}}{V} (c_{Amn,r} - c_{Amn}) + q_{Amn} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Lac}}{dt} = \frac{F_{in,Lac}}{V} (c_{Lac,r} - c_{Lac}) + q_{Lac} \cdot X_v$$

$$\frac{dc_{Mab}}{dt} = \frac{F_{in,Mab}}{V} (c_{Mab,r} - c_{Mab}) + q_{Mab} \cdot X_v$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in,w} + F_{in,Glc}$$

$$\frac{dc_{Lac}}{dt} = \frac{F_{in,Lac}}{V} (c_{Lac,r} - c_{Lac}) - q_{Lac} \cdot X_v$$

$$q_{Mab} = q_{Mab,max}$$

Wachstumskinetik:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{c_{Gln}}{c_{Gln} + K_{S,Gln}} \cdot \frac{c_{Glc}}{c_{Glc} + K_{S,Glc}} \cdot \frac{c_{LS}}{c_{LS} + K_{S,LS}}$$

$$\mu_d = \mu_{d,min} + K_d \cdot \frac{k_{d,LS}}{c_{LS} + k_{d,LS}}$$

Substrataufnahme- / Produktbildungsrate:

$$q_{Glc} = q_{Glc,max} \cdot \frac{c_{Glc}}{c_{Glc} + k_{Glc,1}} \cdot \frac{c_{LS}}{c_{LS} + k_{LS}}$$

$$q_{Gln} = K_{p,Gln} \cdot X_{Gln,max} \cdot \frac{c_{Gln}}{c_{Gln} + k_{Gln}} \cdot \frac{c_{LS}}{c_{LS} + k_{LS}}$$

$$q_{LS} = q_{LS,max} \cdot \frac{c_{LS}}{c_{LS} + k_{LS}}$$

$$K_{p,Gln} = 1 + a \cdot X_{Glc,thr} \cdot c_{Glc}$$
 für $c_{Glc} \leq c_{Glc,thr}$

$$K_{p,Gln} = 1$$
 für $c_{Glc} > c_{Glc,thr}$

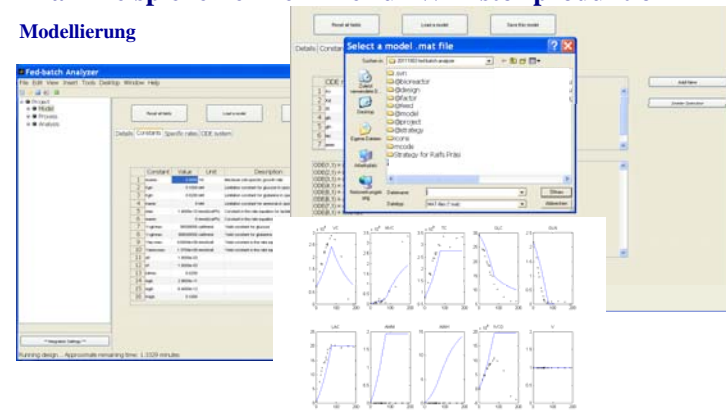
$$q_{Amn} = k_{Amn} \cdot X_{Gln}$$

$$q_{Lac} = k_{Lac} \cdot X_{Glc}$$

$$q_{Mab} = q_{Mab,max}$$

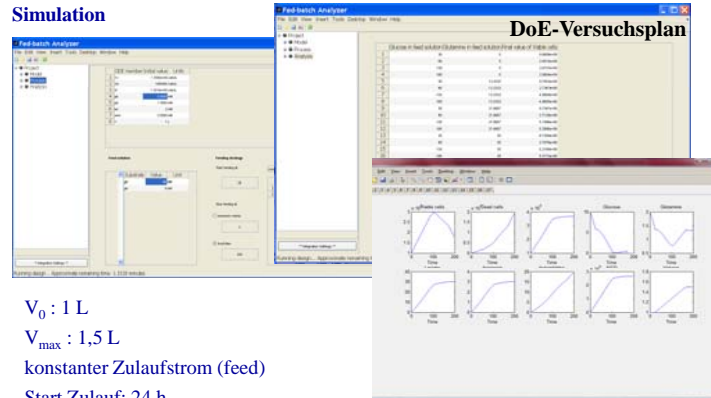
Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

Modellierung



Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

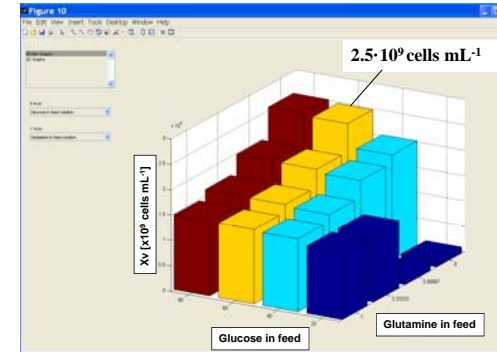
Simulation



V_0 : 1 L
 V_{max} : 1,5 L
 konstanter Zulaufstrom (feed)
 Start Zulauf: 24 h

Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

DoE für *in silico*-Experimente



Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

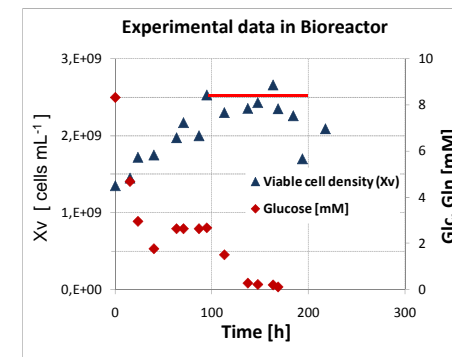
Bioreaktor-Experimente

Parameter	Value
Initial conditions (Batch)	
Glucose	10 mM
Glutamine	2 mM
Fed-Batch strategy	
Mode	constant
Glucose in Feed	60 mM
Glutamin in Feed	8 mM
Feed Rate	0.059 mL min^{-1}
Feed Start	24 h



Modellgestützte Entwicklung von *fed batch*-Strategien am Beispiel einer Zelllinie zur Wirkstoffproduktion

Bioreaktor-Experimente



Prognose und Experiment stimmen gut überein!

Zusammenfassung

Modellgestützte Entwicklung und Optimierung von Prozessführungsstrategien (z.B. *fed batch*) verspricht aussagekräftige Resultate bei minimiertem experimentellem Aufwand

