

Induzierbare SEAP-Produktion mit transfizierten CHO-Zellen

Genetisch veränderte, tierische Zellen, die in voll-synthetischen Kulturmedien rekombinante Proteine produzieren, sind im medizinischen und pharmazeutischen Bereich eine grosse Herausforderung in molekularbiologischer als auch biotechnologischer Hinsicht. Bei der Transfektion der Zellen kann neben der Sequenz des gewünschten Produktes ein steuerbarer Promotor in die DNA eingebaut werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, die transfizierte Zelle in den entsprechenden Kultivierungssystemen ohne gleichzeitige Produktbildung zu vermehren. Bei einer bestimmten Zelldichte wird durch die Induktion des Promotors die Sekretion des rekombinanten Proteins ins Kulturmedium gestartet. Die Produktausbeute wird bestimmt durch die Effizienz der transfizierten Zelle, das Kulturmedium, das Kultivierungsgefäss sowie die damit verbundenen steuerbaren Parameter. Die Aufteilung in eine Biomasseproliferationsphase und eine Produktionsphase auf der zellulären Ebene erleichtert die Steuerung und Kontrolle des biotechnologischen Prozesses.

Einleitung

Säugerzellkulturen sind in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug in der biologischen, medizinischen und pharmazeutischen Forschung geworden. Aufgrund der vielversprechenden Ansätze in der Produktion von Impfstoffen, Antikörpern, Hormonen und Enzymen durch genetisch veränderte Säugerzellen wird die Zellkultivierung in der biotechnologischen Industrie immer bedeutender. Voraussetzungen für einen raschen Wissenstransfer zwischen der Forschungsfront an den Hochschulen und der Industrie basieren auf einer intensiven Zusammenarbeit. In dieser Hinsicht kooperieren das Institut für Biotechnologie an der ETH, die HSW (Hochschule Wädenswil) und Industriepartner in verschiedenen Projekten, indem die ETH rekombinante Zellen mit den entsprechenden induzierbaren Promotoren und gewünschten Genen herstellt, die HSW die biotechnologische Prozessoptimierung vornimmt und die Industrie neue Medien, geeignete Reaktoren, Einzelelemente oder Messgeräte für spezielle Kultivierungen zum Austesten zur Verfügung stellt. Im vorliegenden Artikel werden die Resultate aus Semesterarbeiten aus der Zusammenarbeit ETH-HSW präsentiert: der von der ETH konstruierte, monocistronische CHO XM111-Klon (CHO: Chinese Hamster Ovary) gilt als Testzelllinie für spätere multicistronische Konstrukte. Die Wachstumsrate in serum- und proteinfreiem Medium sowie die Produktionsrate nach der Derepression des Promotors wurden an der HSW in Spinner- und Rollerflaschen, im Hohlfaser-, Rühr- und Wavereaktor ermittelt. Ziel ist es, optimale Bedingungen in den verschiedenen Systemen und das geeignetste Kultivierungsgefäss zu eruiieren.

Die Zelllinie CHO XM-111

Kontrollzelllinie der ETH-Zellkonstrukte ist der von Xenia Mazur in der Gruppe von Dr. M. Fussenegger hergestellte Klon CHO XM-111, der über den tetrazyklin-regulierten Promoter $P_{hCMV*_{-1}}$ verfügt und das Reportergen *seap* eingebaut hat. Durch Tetrazyklin-Entzug werden die Zellen aktiviert, exprimieren das Modellprotein SEAP (humane, sekretierte alkalische Phosphatase) und schütten es ins Medium aus. Nachgewiesen wird SEAP indirekt über die Phosphatase-Aktivität, indem der Umsatz von para-Nitrophenolphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol (pNP) photometrisch verfolgt wird. Die pNP-Bildung pro Minute und Zelle im

Vergleich zur Kultivierungsdauer ergibt ein unabhängiges Mass, um die produzierte SEAP-Menge in den verschiedenen Systemen zu vergleichen.
Zur Selektion und Stabilisierung der transformierten Zelle muss dem Medium Geneticin G418 und Puromycin zugefügt werden.

Die voll-synthetischen Zellkulturmedien

Die von der ETH zur Verfügung gestellten CHO XM-111 wachsen in Monolayern im Medium FMX-8 mit 10% fötalem Kälberserum. Aus wirtschaftlichen und sicherheitstechnischen Gründen wird allgemein eine serumfreie Kultivierung von tierischen Zellen angestrebt. Die CHO XM-111-Zellen wurden durch schrittweise Verminderung des Serumgehaltes an das neue Milieu adaptiert. Nach der Umstellung auf serumfreie Kultivierung in den chemisch definierten Kulturmedien verlieren sie jeweils ihre Adhärenz und lassen sich in Suspension in gerührten und ungerührten Systemen vermehren. Die drei voll-synthetischen Medien FMX-8, ChoMaster HP-1 und ChoMaster HP-5 von Cell Culture Technologies, Zürich, enthalten keine Komponenten tierischer Herkunft und unterscheiden sich hauptsächlich im Gehalt von Glucose, Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Lipiden. Die CHO XM-111-Zellen vermehren sich im Glucose-armen FMX-8 gut bis zu einer begrenzten Zelldichte wegen Nährstofflimitierung. Typisch für FMX-8-kultivierte CHO XM-111 ist die morphologische Erscheinungsform in Zellaggregaten, die in Kultur-Flaschen während der stationären Phase 30 bis 80 Zellen enthalten können, während in den gerührten Systemen Agglomerate von maximal 15 bis 30 Zellen erreicht werden. Bei den komponentenreicheren Medien ChoMaster HP-1 und HP-5 liegen die CHO XM-111 in Suspension vereinzelt vor.

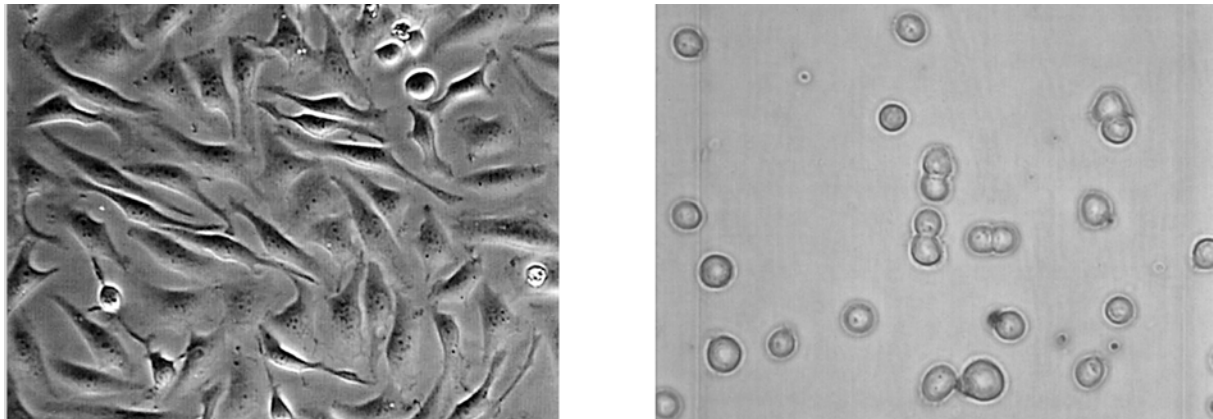


Abb. 1: Morphologie der CHO XM-111-Zellen im Kulturmedium FMX-8 mit 10% Kälberserum als Monolayer (links), im ChoMaster HP-1 in Suspension (rechts).

Systeme zur serum- und proteinfreien Kultivierung

Die serumfrei wachsenden Zellen wurden in verschiedenen Systemen kultiviert. Der Wachstumsprozess wurde kontrolliert, indem die Zelldichte, die Glucoseabnahme sowie die Lactatzunahme bestimmt wurde. Nach dem Erreichen der stationären Phase wurde durch das Weglassen von Tetrazyklin im Medium die Produktion von SEAP induziert und die Produktion analysiert.

Verglichen werden die Kultivierungen in bewegten Systemen ohne oder mit aktivem Gaseintrag sowie in Hochzelldichtesystemen. Zu den einfach bewegten Systemen gehören die Spinner- und Rollerflaschen (INTEGRA Biosciences, Wallisellen). Durch die von aussen gesteuerte Durchmischung des Mediums durch Rühren oder Drehen erfolgt der Gasaustausch an der Grenzoberfläche gemäss dem physikalischen/chemischen Gleichgewichts erfolgt. Während die Spinner- und Rollerflaschen für Kohlendioxid-Brutschränke konzipiert sind, können der Wavereaktor (*wave* Biotech, Tagelswangen) und der Biostat B (Braun Biotech International, D-Melsungen) überall installiert werden, solange Luft- und Kohlendioxidzufuhr gewährleistet sind. Der Wavereaktor besteht aus einem Plastiksack als Kultivierungsraum auf einem heizbaren Kipptisch. Im Sack wird ein Luftüberdruck erzeugt, so dass mehr Sauerstoff dem Kulturmedium zugeführt wird als bei Atmosphärendruck. Im Biostat B erfolgt der Sauerstoff-Eintrag über einen Begasungskorb, der in die Zellsuspension eingetaucht ist. Von den Hochzelldichtesystemen wurde die Celline-Kultivierungsflasche (INTEGRA Biosciences) sowie der Hohlfaser-Perfusionsreaktor Cellpharm System 100 (Digitana, Horgen) eingesetzt. Die Zellen befinden sich in einem separierten Raum, der so konzipiert ist, dass alle Zellen jederzeit genügend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sind und dass der Mediumwechsel zellfrei vorgenommen werden kann. Das Prinzip der Celline basiert auf einer Kulturflasche, in der die Zellen sich in einem separaten Kultivierungsraum befinden, der über eine gasdurchlässige Membran direkt von unten begast wird. Ueber dem Zellraum wird serumfreies, jederzeit auswechselbares Medium geschichtet, das über eine semipermeable Membran den Zellen Nährstoffe zuführt und die toxischen Metaboliten verdünnt. Der Hohlfaserreaktor Cellpharm beherbergt die Zellen im extracapillären Raum der Hohlfaserkartusche. Die Nährstoffversorgung und Metabolitenentsorgung geschieht im Perfusionsmodus über semipermeable Kapillaren, die mit Sauerstoff-angereichertem, frischem Medium durchströmt werden. Der Kultivierungsmodus erfolgte bei den Spinner- und Rollerflaschen durch täglichen Mediumsaustausch von einem Drittel bis zur Hälfte des jeweiligen Arbeitsvolumens, beim Wave und Biostat B im Fed-Batch-Verfahren.

Resultate

Die verschiedenen Kultivierungssysteme weisen unterschiedliche Arbeitsvolumina, Inokulationsdichten und Modi für Mediaustausch auf. Um die verschiedenen Ansätze hinsichtlich der Produktivität miteinander vergleichen zu können, wird die SEAP-Produktion als Enzymaktivität pro Tag und Zelle hinsichtlich des Abbaus von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol angegeben.







Aus Tabelle 1 geht hervor, dass die erreichten Lebendzellichten zwischen $1.1 \cdot 10^6$ Zellen/ml im Spinner mit dem glucosearmen FMX-8 und $2.3 \cdot 10^8$ Z/ml im Cellpharm mit dem Medium CHO-Master HP1 liegen. Die Verdoppelungszeiten betragen rund 20 Stunden mit CHO-Master HP-1 und HP-5, 32-40 Stunden mit FMX-8 in Spinnerflaschen und 50 Stunden in Cellpharm mit CHO-Master HP-1. Weniger schwankt die Produktion von SEAP bei den gewählten Kultivierungsmethoden: die normale SEAP-Aktivität liegt bei gut produzierenden Zellen mit einer Vitalität von 50-95% in der stationären Phase um 0.2 pMol/Minute p-Nitrophenol pro Zelle und Tag. Wurde der Wert von 0.2 unterschritten, wie es bei den Spinnern mit dem Medium ChoMaster HP-5 oder bei den Rollern und dem Biostaten mit dem Medium ChoMaster HP-1 der Fall war, lag es daran, dass die Zellen während der logarithmischen Wachstumsphase nur Zellen und kaum SEAP produzierten und somit eine Produktions-Lagphase bis zu 5 Tagen mit minimaler Produktivität durchliefen.

SEAP-Mengen mit Umsatzraten über 0.2 pMol/Minute p-Nitrophenol pro Zelle und Tag lagen bei den Hochzelldichtesystemen vor, wo die Zelldichte sehr hoch war und die Vitalität in

Tabelle 1: Zusammenstellung der Kultiviergefäße zum Ueberblick über die erreichten Zelldichten, Verdoppelungszeiten und SEAP-Produktion in den gewählten Arbeitsvolumina und Kulturmedien.

A: FMX-8, Puromycin, G418; B: ChoMaster HP-1 Puromycin, G418;

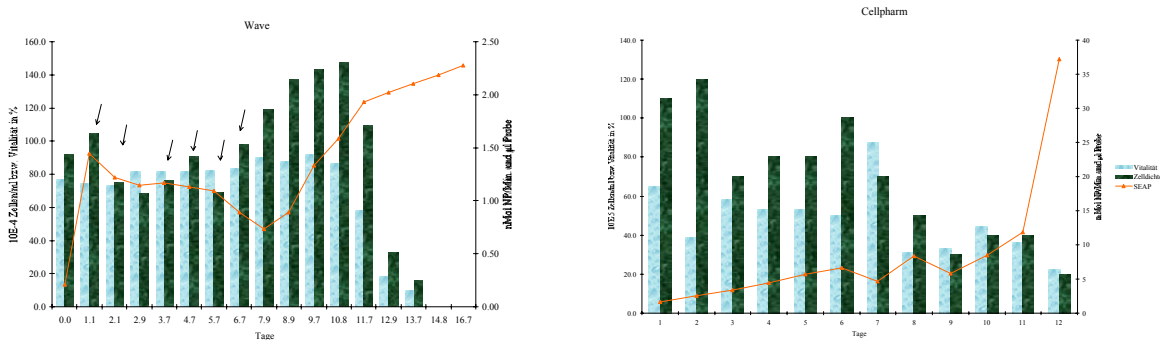
C: ChoMaster HP-1; D: ChoMaster HP-5 Puromycin, G418; Tet: Tetrazyklin

| | max. Lebend-Zelldichte leb. Zellen/ml | Volumen ml | Verdoppelungszeit Stunden | Medium | SEAP pMol NP/Min. ·Zelle·Tag |
|---|--|---------------|------------------------------|--------|------------------------------------|
| Spinner  | $1.4 \cdot 10^6$ | 100 | 39.4 ± 6.2 (n=4) | A, Tet | - |
| | $1.1 \cdot 10^6$ | 100 | 32.4 | A | 0.20 |
| | $1.2 \cdot 10^6$ | | 39.6 | | |
| | $2.1 \cdot 10^6$ | 100 | 22.8 ± 1.7 (n=4) | B, Tet | - |
| | $1.4 \cdot 10^6$ | 100 | 22.6 29.1 | B | 0.20 |
| | $1.1 \cdot 10^6$ | 100 | 29.6 | C | 0.24 |
| | $2.6 \cdot 10^6$ $2.2 \cdot 10^6$ | 100 | 17.5 23.2 | D | 0.14 0.10 |
| Roller  | $1.7 \cdot 10^6$ $2.0 \cdot 10^6$ | 150 | 23.9 28.5 | B, Tet | - |
| | $1.4 \cdot 10^6$ $1.6 \cdot 10^6$ $2.4 \cdot 10^6$ | 150 | 21.7 23.6 19.4 | B | 0.11 0.10 0.09 |
| | | | | | |
| Celline  | $1.3 \cdot 10^7$ | 15 | 35 | A | 0.2 |
| | $2.2 \cdot 10^7$ | 15 | 25.5 | B | 0.30 |
| Cellpharm  | $2.3 \cdot 10^8$ $1.2 \cdot 10^7$ | 6 | 50 46.6 | B | 0.26 0.32 |
| Biostat B  | $2.2 \cdot 10^6$ $2.1 \cdot 10^6$ | 1500 | 30 | B | 0.06 0.10 |
| Wave  | $1.5 \cdot 10^6$ | 1000 | 36 | C | 0.26 |

der stationären Phase selten 60% überstieg, so dass die Zellen dauernd gestresst waren. Ebenfalls aussergewöhnlichen Bedingungen unterlegen waren die Zellen, die im Spinner und im Wave mehr als die übliche Menge SEAP produzierten, durch Weglassen von Puromycin und G418, die für die Selektion und Stabilisierung der transfizierten Zellen eingesetzt werden.

Die stationäre Phase dauerte bei den verschiedenen Kulturgefässen 3 bis 5 Tage, wobei die Zelldichte maximal hoch und die Vitalität über 50% war und die SEAP-Aktivität jeweils 0.2 pMol NP/Min.pro Zelle und Tag betrug. Bei der darauf folgenden Absterbephase wurde beobachtet, dass bedeutend mehr SEAP pro Lebendzelle gebildet wurde, sobald die Vitalität unter 40% sank (Grafik 1). Während beim Wavereaktor die SEAP-Zunahme bei abnehmender Zellvitalität stetig und überproportional zur Zelldichte anstieg, war die SEAP-Produktion bei andern Systemen wie beim Cellpharm geradezu explosionsartig bei Vitalitäten unter 20%.

Grafik 1: Uebersicht über den Verlauf des Wachstumsprozesses und der Produktion Von SEAP nach Tetrazyklinentzug. Die angegebenen Zelldichten beziehen sich auf die lebenden Zellen, die SEAP-Menge wird als gebildetes p-Nitrophenol/Minute pro µl Probe ausgedrückt. Die Pfeile bei der Wave-Kultivierung kennzeichnen die Tage, an denen Kulturmedium zugefügt oder ausgetauscht wurde. Die maximal erreichte Zelldichte der Wave-Fedbatch-Kultur war Glucose-limitiert.



Ausblick

Transfizierte CHO XM-111-Zellen, deren Produktexpression über Tetrazyklin reguliert werden kann, produzieren in den eingesetzten Kultursystemen das gewünschte SEAP. Die maximal erreichbare Zelldichte hängt vom Kultiviergefäss, vom Kulturmedium und vom Kultivierungsmodus ab. Andererseits wird die Wahl der jeweiligen Kultivierungsart durch die Zielgrösse bestimmt: Bei Nachfrage nach möglichst viel Biomasse in Form von lebenden Zellen ist der Wave oder Biostat das zweckmässige Mittel, während bei Interesse am sekretierten SEAP der Hohlfaserperfusionsreaktor prädestiniert ist, weil in sehr kleinen Volumina über Wochen Höchstmengen des gewünschten Produktes geerntet werden können. Durch Optimierungen der Kulturbedingungen, aber auch der genetisch veränderten Zellkonstrukte kann zusätzlich die Produktivität erhöht und die stationäre Phase verlängert werden.

Literatur

- Semesterarbeiten an der Hochschule Wädenswil von Sandra Wenger, Sommersemester 1999, Andrea Schütz, Wintersemester 1999/2000 und David Strupler, Sommersemester 2000.
- Xenia Mazur: Higher productivity of growth-arrested CHO cells using a novel autoregulated production process. Diss ETH Zürich, 1999
- M. Fussenegger, S. Schlatter, D. Dätwyler, X. Mazur and J.E. Bailey: Controlled Proliferation by Multigene Metabolic Engineering Enhances the Productivity of CHO Cells. *Nature Biotechnol.* (1998) 16, 468-472.
- M. Fussenegger, X. Mazur and J.E. Bailey: pTrident: a Novel Vector Family for Tricistronic Gene Expression in Mammalian Cells. *Biotechnol. Bioeng.* (1998): 57,1-10.
- M. Fussenegger, S. Moser, X. Mazur and J.E. Bailey: Autoregulated Multicistronic Expression Vectors Provide One-Step Cloning of Regulated Product Gene Expression in Mammalian Cells. *Biotechnol. Progr.* (1997) 13, 733-740.
- D. Dätwyler, S. Schlatter, S. Moser, J.E. Bailey and M. Fussenegger: Diploma Thesis: Artificial Operons allow Multicistronic Gene Expression in Mammalian Cells. *Bioworld* (1997) 5, 29-31.
- R. Eibl, C. Lettenbauer, D. Eibl, M. Röhl: Experiences in the Application of the Wave Bioreactor System 20 in Cell Culture Technique. *Bioforum* 3/99
- M. Zang, H. Trautmann, Ch. Gandor, F. Messi F. Asselbergs, Ch. Leist, A. Fiechter, J. Reiser: Production of Recombinant Proteins in CHO-Cells Using a Protein-Free Cell Culture Medium. *Bio-Technology* (1995) 13, 389-390.
- F. Messi: New Developments in Animal Cell Culture. *Bioworld* (1997) 6, 8-10.

Dr. A. Viviani, A. Kurmanaviciene, C. Strebel
Hochschule Wädenswil Fachhochschule Zürich
Postfach 335
8820 Wädenswil