

**Entwicklung eines proteinfreien Zellkulturmediums zur Etablierung einer  
Fütterungsstrategie für rekombinante CHO-Zellen**

Vom Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Chem. Alexander Loa  
geboren am 07.05.1970 in Wilhelmshaven

2000

Referent: PD Dr. Gerlinde Kretzmer

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 26.05.2000

## **ABSTRACT**

### **Entwicklung eines proteinfreien Zellkulturmediums zur Etablierung einer Fütterungsstrategie für rekombinante CHO-Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach synthetischen Komponenten gesucht, die es ermöglichen, Tierzellen in Medien ohne Komponenten tierischen Ursprungs wachsen zu lassen. Als Beispielzelllinie wurde eine rekombinante CHO-Zelllinie gewählt, die ein pharmazeutisch wichtiges Protein (tissue Plasminogen-Activator) exprimiert.

Die ausgewählten Verbindungen wurden in der Zellkultur auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei Änderungen im Zellstoffwechsel. Nach Feststellung der grundsätzlichen Anwendbarkeit der Proteinersatzstoffe ist untersucht worden, ob die Zellen, bei längerer Anwendung der ausgewählten Substanzen, übermäßig ihr Wachstums- und Stoffwechselverhalten ändern. Nebenbei wurde der Vorteil von proteinfreiem Medium in Bezug auf die Produktaufreinigung deutlich. Nach erfolgreichem Abschluß dieses Teils der Arbeit, wurde für die CHO-Zellen ein proteinfreies Fütterungsmedium konzipiert und eine dazugehörige Fütterungsstrategie entwickelt.

Als Ausgangsbasis für das Fütterungsmedium diente das stöchiometrische Modell von Xie et al. (1994a). Dieses wurde, auf die in dieser Arbeit verwendeten Zellen, angepaßt und getestet. Die von Xie et al. (1994a) vorgeschlagene Fütterungsstrategie stellte sich als nicht praktikabel heraus, weswegen eine neue Strategie entwickelt werden mußte. Ebenso mußten Schwächen des Modells, wie z.B. die fehlende Berücksichtigung der Zellmaintenance überwunden werden, um das Fütterungsmedium so einsetzbar zu machen, daß deutliche Vorteile gegenüber Batch-Kulturen zu verzeichnen waren.

Ein Vergleich dieses Mediums mit der Erstellung eines Fütterungsmediums, durch Bestimmung der Verbrauchsraten, zeigte den Vorteil der verwendeten Methode.

**Schlagwörter:** CHO-Zellen, proteinfreies Medium, Fütterungsmedium

## **ABSTRACT**

### **Development of a protein-free cell culture medium for the establishment of a feeding strategy for recombinant CHO-cells**

In this thesis synthetic components were examined, which enable animal cells to grow in media without components of animal origin. Exemplary a recombinant CHO-cell-line was chosen, which produces a recombinant protein of pharmaceutical interest (tissue-plasminogen-activator).

The selected compounds were examined in cell culture for their applicability. Here the work has focussed on changes in cell metabolism. After testing the applicability of the protein-substitutes cells were examined in terms of a long-term application of the selected compounds modifies cell-growth or metabolic behaviour. The advantage of protein-free medium regarding the purification of recombinant product was shown. After this first section of the work, a protein-free feeding-medium for CHO-cells and an adapted feeding-strategy was developed.

As starting point for the feeding-medium a stoichiometric model out of literature was used. This model was adapted and tested for the cells used in this work. The feeding-strategy suggested for the chosen model was not practicable. Hence a new strategy had to be developed. Weaknesses of the model, e.g. the lack of consideration of cell maintenance had to be overcome in order to make the feeding medium applicable.

A comparison of this medium with a feeding-medium calculated by the consumption rates showed the advantage of the used method.

Key words: CHO-cells, proteinfree medium, feeding-medium

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis April 2000 im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer angefertigt. Mein besonderer Dank gilt vor allem Ihr für die Betreuung meiner Promotion. Das Verständnis für meine Situation als Vater, die Ermöglichung von Auslandsaufenthalten, die aufbauenden Worte nach niederschmetternden Resultaten und die freundliche Arbeitsatmosphäre, haben zur erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Pascal Lefebvre und BIO WHITTAKER EUROPE s.p.r.l. danke ich für die Möglichkeit mit meiner Arbeit für das Gelingen des EU-Projekts beitragen zu dürfen.

Frau Martina Weiß danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die Geduld, die sie mit meinen vielen Aminosäureproben hatte.

Conny und Petra danke ich besonders dafür, daß sie all die kleinen Fehlerleutchen aufgespürt und markiert hast.

Herrn Prof. Dr. Francesc Godia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), danke ich für die freundliche Aufnahme als Gast in seinem Arbeitskreis und die bis zum heutigen Tage andauernde fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. Jordi Cairo, Xavier, „Toni“ und Claudia danke ich für die nette Zeit in Spanien, in der sie mich sehr gut „beschäftigt“ haben.

So und der letzte Dank geht an alle, die mich während meiner Zeit am TCI nett aufgenommen haben und mit denen ich viel Spaß hatte.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	EINFÜHRUNG IN DAS THEMA.....	3
1.2	ZIELSETZUNG.....	5
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>6</b>
2.1	ZELLULÄRE TRANSPORTSYSTEME.....	6
2.1.1	Aminosäuretransport.....	7
2.2	WIRKMECHANISMUS DES TRANSFERRIN.....	8
2.3	INSULIN.....	9
2.4	AMINOSÄUREMETABOLISMUS.....	9
2.4.1	Stoffwechselweg der 2-Oxosäuren.....	12
2.5	GLUKOSE ALS ENERGIEQUELLE.....	13
2.6	WACHSTUMSKINETIK VON TIERZELLEN.....	15
2.7	SPEZIFISCHE VERBRAUCHS- UND BILDUNGSRATEN.....	16
2.8	„STÖCHIOMETRISCHES MODELL ZUR BESTIMMUNG VON MEDIENKOMPOSITIONEN NACH LIANGZHI XIE ET AL. (1994A).....	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
3.1	CHO-ZELLINIE.....	18
3.2	MEDIUM.....	18
3.3	KULTIVIERUNGSSYSTEME.....	19
3.4	ANALYTIK.....	20
3.5	SYNTHESE VON EISEN PYRIDOXAL ISONICOTINOYL HYDRAZID FEPIH.....	22
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>24</b>
4.1	TRANSFERRINERSATZSTOFF.....	24
4.1.1.1	Notwendigkeit des Transferrins im Medium.....	25
4.1.1.2	Grenzkonzentrationen des FePIH.....	27
4.1.1.3	FePIH als Transferrin-Ersatzstoff.....	28
4.1.1.4	Aminosäurekonzentrationen der FePIH-Kultur.....	30
4.1.1.5	Die Produktivität und Produktqualität mit dem FePIH-Medium.....	32
4.1.1.6	Stabilität des FePIH im Medium.....	34
4.1.1.7	Langzeitanwendung von FePIH-Medium.....	35
4.1.1.8	Transferrin und Produkt-HPLC.....	36
4.1.2	Weitere Transferrinersatzstoffe.....	37
4.2	INSULINERSATZSTOFF.....	39
4.2.1.1	Untersuchung der Auswirkung von 4 $\beta$ -Phorbol-12 $\beta$ -myristate-13 $\alpha$ -acetate (PMA) als Insulinersatzstoff auf die Zellkultur.....	39
4.2.1.2	Notwendigkeit von Insulin.....	40
4.2.1.3	PMA als Insulinersatzstoff.....	41
4.2.1.4	Erhöhte PMA-Konzentration (24 nM).....	45

4.2.1.5	Aminosäurekonzentrationen .....	46
4.2.2	Abhängigkeit von Glukoseverbrauchsrate und Zelldichte.....	57
4.3	ZUSAMMENFASSUNG PROTEINFREIES MEDIUM .....	59
4.4	ANWENDUNG DES STÖCHIOMETRISCHEN MODELLS ZUR BERECHNUNG DER ZUSAMMENSETZUNG EINES PROTEINFREIEN FÜTTERUNGSMEDIUMS .....	61
4.4.1	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	61
4.4.2	Bestimmung des Proteingehalts der CHO-Zellen .....	62
4.4.3	Bestimmung des DNA-/RNA-Gehalts der CHO-Zellen .....	63
4.4.4	Bestimmung des Lipidgehalts der CHO-Zellen .....	65
4.4.5	Bestimmung des Kohlenhydratgehalts der CHO-Zellen .....	66
4.4.6	Zusammenfassung der Zellkomposition.....	67
4.4.7	Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung der zellulären Proteine .....	68
4.4.8	Weitere Daten zur Berechnung des Fütterungsmediums.....	70
4.4.9	Berechnung des Fütterungsmediums .....	71
4.5	ERPROBUNG UND WEITERENTWICKLUNG DES FÜTTERUNGSMEDIUMS.....	76
4.5.1	Analytik der organischen Säuren.....	92
4.5.2	Aus Verbrauchsdaten erstelltes Fütterungsmedium.....	96
4.5.3	Glukosereduziertes Fütterungsmedium.....	98
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	

## 1 Einleitung

Die Kultivierung von Säugerzellen hat im 20. Jahrhundert seine Ursprünge, als Wissenschaftler begannen, Studien mit Geweben und Organen des Körpers in Glasgefäßen durchzuführen. Es sollte geklärt werden, wie die Zellen wachsen und was sie dazu benötigen. Unter dem Gesichtspunkt der Tumorforschung war vor allem die Frage interessant, weshalb und wann sie ihr Wachstum einstellen. In letzter Zeit intensiviert sich die Forschung in Richtung der Klärung der Mechanismen, die im Organismus die Differenzierung einer befruchteten Eizelle in die mannigfaltigen, für einen Organismus notwendigen Zellen, bewirkt. Ein wichtiges Instrument ist auch hier die Zellkulturtechnik (Sachs 1987). Im Laufe der Zeit wurden die Methoden verfeinert und Erfahrungen gesammelt, so daß immer mehr Anwendungen für die Kultivierung von Säugerzellen gefunden wurden. Die Entwicklung ist heute so weit fortgeschritten, daß Anwendungen zu finden sind, die ohne Zellkulturtechnik gar nicht denkbar wären, wie z.B. Experimente mit transgenen Tieren, die das fremde Erbmaterial ohne Zellkulturtechnik nicht erhalten könnten. Aber auch Zytotoxizitätstests, die in vivo-Verfahren ersetzen können, sind eine Errungenschaft der Zellkulturtechnik. Neben den mehr akademischen Fragestellungen, mit denen das Funktionieren der Zellen und somit des Organismus verstanden werden soll, gibt es aber auch kommerzielle Anwendungen der Zellkulturtechnik. Hier ist vor allem die Produktion von pharmazeutisch wirksamen Proteinen zu nennen, die in ihrer Komplexität zur Zeit nur durch rekombinante Zellen tierischen Ursprungs oder durch Isolation aus tierischem Material hergestellt werden können. Allerdings sind die Ressourcen an tierischem Material limitiert, so daß der immer weiter steigende Bedarf an diesen Substanzen wie z.B. Blutgerinnungsfaktoren, monoklonale Antikörper, Erythropoetin, Interferon  $\gamma$  oder t-PA (Mitrahi 1988; Spier 1982) nur durch die Zellkulturtechnik gedeckt werden kann. Mit dieser Technik kann über das Angebot auch der Preis dieser Pharmaka gesenkt und somit diese für therapeutische Zwecke einsetzbar werden. Allerdings ist der Preis der so erhaltenen Therapeutika wegen der aufwendigen Kultivierungsbedingungen von tierischen Zellen noch immer sehr hoch. Die Alternative wären andere, weniger aufwendige Expressionssysteme, wie z.B. Bakterien- oder Hefekulturen. Diese sind jedoch lediglich

in der Lage, kleine, weniger komplexe Proteine (z.B. Insulin oder Wachstumsfaktoren) zu synthetisieren. Für eine große Anzahl an therapeutischen Proteinen sind die hoch spezialisierten Syntheseapparate wie der Golgi Apparat oder das Endoplasmatische Retikulum notwendig, in denen die posttranslatorischen Modifikationen durchgeführt werden. Allerdings können auch hier transgene Tiere in Konkurrenz zur Zellkulturtechnik treten. Es sind schon mehr als 50 Proteine, wie z.B. Lactoferrin oder Protein C über die Milch transgener Mäuse, Ziegen oder Schafe hergestellt worden und befinden sich zur Zeit in der Zulassung (Pollok 1998, Garner 1998, Yoshida 1998, Werner 1998).

Ein recht neuer Zweig der Kultivierung von Säugerzellen ist die Gewebezüchtung (engl.: Tissue Engineering), bei der mit Hilfe humaner Zellen Ersatzorgane hergestellt werden. So ist z.B. heutzutage schon das Züchten von Haut aus Patientenzellen zur Behandlung von Defekten bei Verbrennungsoptionen eine gängige Technik (Fusenig 1998, Kolokoltsova 1998). Aber auch Organzellen wie Leber-, Nieren- oder Herzzellen und auch Knorpel und Knochen werden zu therapeutischen Zwecken per Zellkultur gezüchtet (Bratch 1998). Zur Zeit ist es zwar noch nicht möglich, komplette, funktionsfähige Organe in vitro zu züchten, aber die Forschung, gekoppelt mit den Erfahrungen, die aus der Stammzellforschung kommen, geht in die Richtung, daß einem Patienten im Falle eines Organversagens durch Unfall oder auch Krankheit ein neues Organ aus eigenen Körperzellen gezüchtet werden kann. Die Problematik der Immunabstoßung bei Organtransplantationen ist somit eliminiert. Die heute übliche technische Lösung, wie die Dialyse für Patienten mit Nierenversagen, wäre dann nur noch als Akutmaßnahme anzuwenden und, nach erfolgreicher Zucht des Ersatzorgans in vitro, durch dieses zu ersetzen.

Grundlage für die oben beschriebenen Techniken ist in allen Fällen das Kultivierungsmedium mit dessen Eigenschaften die Zellkultur steht und fällt. Der Einfluß, den das Medium auf die Zellen hat, ist enorm. So kann sich bei der Produktion von therapeutisch wirksamen Proteinen allein die Akkumulierung von Metaboliten auf das Glykolisierungsmuster des Produktes und somit auf seine Wirksamkeit auswirken (Schweikart 1998). Sogar die Zusammensetzung der Zelle verändert sich mit der Medienzusammensetzung (Bonarius 1996). Es ist also äußerst wichtig, gerade auch für die Produktion von Pharmaka, ein chemisch definiertes Kulturmedium zur Verfügung zu haben, das eine konstante Qualität besitzt und somit eine konstante Produktqualität begünstigt.

## 1.1 Einführung in das Thema

Wie schon deutlich wurde ist das Nährmedium in der Zellkulturtechnik von zentraler Bedeutung. In den ersten Ansätzen wurden die Zellkulturen mit dem natürlichen Medium des Organismus, dem Blut, versorgt, was aber einen großen Aufwand bedeutete. Es wurde nun versucht ein Medium für die Zellen zu schaffen, mit dem die natürliche Umgebung annähernd imitiert werden kann. Nach einigen Versuchen gelang es, ein Medium herzustellen, das es ermöglichte die Zellen kurze Zeit außerhalb des Körpers am Leben zu erhalten. Weitere Verbesserungen erlaubten es schließlich Tumorzellen zu vermehren.

Basierend auf diesen Rezepturen werden auch heutzutage noch viele der Nährmedien hergestellt. Diese einfachen Medien enthalten häufig noch Serum, ein aus tierischen Föten gewonnenes Supplement, das von undefinierter Beschaffenheit und nicht konstanter Qualität ist (Boone 1971). Neben dem Problem der schlechten Reproduzierbarkeit des Serums, was sich auf die Zellen, deren Wachstumsverhalten und die Produktqualität auswirken kann, birgt die Verwendung von Serum zusätzlich das Risiko von Kontaminationen (Stoll 1996). Es kann bei Serum, wie bei allen tierischen Produkten vorkommen, daß Viren, Mycoplasmen, Bakteriophagen oder auch Endotoxine trotz Qualitätskontrollen in das Zellkulturmedium gelangen (Fedroff 1971, Chu 1973). Gerade das in letzter Zeit stark diskutierte Problem der Prionen (vermuteter Auslöser der Creutzfeld-Jacob Krankheit beim Menschen) in Rinderprodukten und deren schlechte Nachweisbarkeit zeigt das Gefährdungspotential das tierische Produkte beherbergen. Da die Zellkulturen zur Produktion von Pharmaka eingesetzt werden, muß somit ein enormer Aufwand betrieben werden, um zu gewährleisten, daß keine Kontaminanten in das Produkt gelangen. Neben den möglichen Kontaminationen hat Serum, da es alle im Tier enthaltenen Komponenten beinhaltet, auch negative Faktoren, die das Zellwachstum hemmen oder sich negativ auf das rekombinante Produkt auswirken (Voigt 1998).

Es wurde deshalb schon frühzeitig der Versuch unternommen das Serum zu ersetzen oder nur noch die wachstumsfördernden Faktoren dem Medium zuzufügen. Die vielen im Serum enthaltenen Substanzen, die unzählige zelluläre Funktionen auslösen und der wachstumsfördernde Effekt des Serums machten es schwierig auf den Zusatz ganz zu

verzichten (Healy 1966, Holmes 1961). Eine Weiterentwicklung war das dialysierte Serum. Eagle zeigte, daß einige der dialysierbaren Komponenten des Serums nach einer enzymatischen Behandlung das Zellwachstum anregten (Eagle 1960) Die Anzahl der enthaltenen Komponenten im dialysierten Medium ist zwar reduziert, aber einen großen Fortschritt brachte diese Serumform nicht, da weiterhin undefinierte Moleküle mit variierender Qualität vorhanden waren. Eine weitere Eingrenzung der für das Zellwachstum wichtigen Komponenten brachte ein Medium hervor, das mit einer serumähnlichen Lösung versehen wurde, in der nur die für das Wachstum positiven Serumkomponenten enthalten waren (Lee 1999). Aber auch bei diesem Medium ist noch immer die Gefahr einer Kontamination gegeben. Anpassungen der Zelllinien und Optimierungen der Medien führten zu den heute schon üblichen serumfreien Medien (Wiles 1999), die allerdings noch immer mit Proteinen supplementiert werden müssen. Die Weiterentwicklung der serumfreien Medien wird deshalb noch immer weiter vorangetrieben (Lee 1999).

Die Proteine, die das Zellwachstum positiv beeinflussen, können heutzutage zwar rekombinant gewonnen werden, doch sind diese Zusatzstoffe sehr teuer und somit aus wirtschaftlichen Gründen im Kulturmedium unerwünscht. Diese Medien erfüllen die meisten Bedingungen für eine Anwendung, doch wäre es für den Down-stream-Prozeß noch immer von Vorteil, auch die letzten Proteine aus dem Medium zu entfernen. Hierdurch können bei der rekombinanten Proteingewinnung der Aufwand minimiert und die Kosten reduziert werden. In der Literatur wurde schon früh über proteinfreie Medien berichtet, aber es handelte sich immer um Spezialanwendungen, bei denen es nicht um die Entwicklung eines kommerziell einsetzbaren Mediums ging. So setzte Eagle (1960) ein proteinfreies Medium ein, um die Wirkung von dialysierten Serumkomponenten auf das Zellwachstum zu testen. Healy et al. (1966) nutzten ein proteinfreies Medium zu ähnlichen Zwecken. Eine Anwendung eines proteinfreien Mediums, bei der es nicht um die Wirkung von Serumkomponenten ging, waren statische Kulturen, bei denen es nicht auf das Zellwachstum ankam, sondern die Zellen neben einer bessern Vitalität eine erhöhte Produktivität zeigen (Bliem 1990, Cinatl 1992, Bertheussen 1993, Chisholm 1999, Gandor 1999 and Voigt 1999). Zum Up-scaling einer Vorkultur sind diese Medien aber nicht geeignet. Die Schwierigkeit Zellkulturmedien proteinfrei bei konstantem Zellwachstum bzw. maximaler Zelldichte zu bekommen, brachte Ansätze hervor, bei denen die Zellen durch genetische Manipulationen bzw. durch Selektionierung an proteinfreie Bedingungen angepaßt

wurden (Takaoka 1971, Cinatl 1988). Allerdings sind diese Methoden sehr zeitaufwendig (bis zu 10 Jahren durch Selektionierung, Takaoka 1971).

Zur Zeit werden einige proteinfreie Medien angeboten von denen das Medium PFHM-II (Gibco BRL, Eggenstein) (Fike 1990) wohl das bekannteste ist. Jedoch ist es lediglich für das Wachstum der relativ unempfindlichen Hybridomazellen gedacht. Ein Manko bei den kommerziellen Medien ist, daß über ihre Zusammensetzung nichts bekannt ist. Generell gelten Medien mit einem Proteingehalt  $< 100 \mu\text{g/mL}$  als proteinarm. Ob ein proteinfreies Medium wirklich proteinfrei ist oder nur eine zu vernachlässigende Konzentration an Protein enthält ist genauso unklar, wie die Frage ab wann ein Peptid als Protein gezählt werden muß. Die Grenze zwischen Peptid und Protein wird meistens bei ca. 100 Aminosäuren gesehen. Wenn man dieses berücksichtigt, so kann man ein Medium das das Hormon Insulin mit 51 Aminosäuren (Karlson 1994) beinhaltet, und somit als Peptid zählt, als proteinfrei deklarieren. Nur die Vorteile eines wirklich proteinfreien Mediums liegen nicht vor, denn auch das Insulin stört den Down-Stream-Prozeß, ist eine biologische Komponente von variierender Qualität und birgt zum Teil noch immer das Risiko von Kontaminationen. Das Potential in der Entwicklung von chemisch definierten Medien steckt auch in der gerade erst aufkeimenden Stammzellforschung (Wiles 1999), denn hier ist es besonders wichtig keine Faktoren im Basalmedium zu haben, die das Differenzieren der Zellen beeinflussen, um eine gezielte Lenkung der Zellentwicklung zu ermöglichen.

## 1.2 Zielsetzung

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es synthetische Ersatzstoffe zu finden, durch die in serumfreien Medien Produkte tierischen Ursprungs oder rekombinant gewonnene Peptide und Proteine ersetzt werden können. Um die Wirksamkeit dieser Substanzen zu testen, werden die Zellen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihres Stoffwechsels untersucht und beurteilt. Das so aus einem proteinarmen entwickelte proteinfreie Medium soll als Grundlage für eine Fütterungsstrategie dienen, mit deren Hilfe die Effektivität einer rekombinanten Zelllinie unter Berücksichtigung weiterer Kultivierungsparameter, wie z.B. der Temperatur, gesteigert werden soll. Zu diesem Zweck soll auf der Basis des proteinfreien Grundmediums ein Fütterungsmedium

entwickelt werden, welches das Zellwachstum optimiert und die Kultivierungsdauer verlängert, so daß die Produktausbeute maximiert werden kann. Hierzu wird ein stöchiometrisches Modell herangezogen mit dem der Substratbedarf der Zellen und somit die Zusammensetzung des Fütterungsmediums bestimmt werden kann. Mit Hilfe der erhaltenen Daten soll im Anschluß der Versuch unternommen werden, ein allgemeines Schema zur Verfahrensoptimierung aufzustellen.

## **2 Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Zelluläre Transportsysteme**

Die Lipid-Doppelschicht einer Zelle gestattet es im Zytoplasma andere Konzentrationen gelöster Bestandteile aufrecht zu erhalten, als im extrazellulären Raum. Ihr hydrophobes Innere dient dabei als Barriere für die meisten polaren Moleküle. Da bestimmte wasserlösliche Moleküle jedoch für die Zelle essentiell sind und toxische Metaboliten aus der Zelle geschleust werden müssen, wurden von der Zelle Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen diese Moleküle durch die Membran zu transportieren.

Anorganische Ionen und kleine wasserlösliche, organische Moleküle werden mit Hilfe bestimmter Transmembranproteine transportiert, wobei jedes Transportprotein sehr spezifisch arbeitet. Es gibt zum einen die Carrier-Proteine, die mittels beweglicher Teile bestimmte Moleküle durch die Membran schieben und die Kanalproteine, die enge hydrophile Poren bilden durch die sich dann kleine, anorganische Ionen passiv hindurchbewegen können (erleichterte Diffusion, z.B. Glukoseaufnahme der Zelle). Bei den Carrier-Proteinen kann der Transport an eine Energiequelle gekoppelt sein (aktiver Transport) (Alberts 1995). Formal unterscheidet man bei den Transportprozessen zwischen Uniport, Symport und Antiport. Während beim Uniport nur ein Molekül transportiert wird, ist bei den beiden anderen der Transport immer nur gekoppelt mit dem Transport eines zweiten Moleküls möglich. Beim Symport bewegen sich die

Moleküle in die gleiche Richtung, während die Bewegungsrichtung beim Antiport entgegengesetzt ist.

Größere Moleküle und Proteine werden durch Endo- bzw. Exozytose durch die Membran transportiert. Dabei werden die entsprechenden Moleküle an Membranrezeptoren gebunden, von der Membran umgeben und als Vesikel in die Zelle aufgenommen. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die im Kap. 2.2 beschriebene Transferrinaufnahme der Zelle.

### 2.1.1 Aminosäuretransport

Der Transport von Aminosäuren, die für jede tierische Zelle essentiell sind, ist immer mit einem Energieaufwand verbunden und somit als aktiver Transport einzustufen. Grund hierfür ist der Ionengradient von  $[\text{Na}^+]$  und  $[\text{K}^+]$ . Im Zytoplasma wird die  $\text{Na}^+$ -Konzentration gering und die  $\text{K}^+$ -Konzentration relativ hoch gehalten. Im extrazellulären Raum findet man eine gegenläufige Verteilung. Die Aufnahme der Aminosäuren erfolgt nun im Symport mit  $\text{Na}^+$ -Ionen, die die interzelluläre Konzentration erhöhen. Für die Aufnahme von sauren Aminosäuren werden sogar zwei  $\text{Na}^+$ -Ionen benötigt. Um den natürlichen Gradienten wieder einzustellen werden mittels  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Austausch über die ATPase  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle befördert. Das Enzym spaltet ATP zu ADP und nutzt die freiwerdende Energie zum Ionentransport. Pro Molekül ATP gelangen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen nach außen und zwei  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle. Die dabei auftretende Ladungsdifferenz (Membranpotential) wird durch einen weiteren Transport der  $\text{K}^+$ -Ionen ausgeglichen, die über sogenannte  $\text{K}^+$ -Sickerkanäle auch frei durch die Membran wandern können. Das Membranpotential sorgt hierbei für die elektrische Kraft, die die  $\text{K}^+$ -Ionen solange in die Zelle zieht, bis das Bestreben der Ionen dem Konzentrationsgradienten zu folgen mit dem Membranpotential im Gleichgewicht steht (Alberts 1995).

## 2.2 Wirkmechanismus des Transferrin

Transferrin ist ein  $\beta$ -Globulin mit  $M_r \approx 88.000$  Da. Dieses Glycoprotein ist in der Lage zwei  $\text{Fe}^{3+}$  - Ionen fest zu binden. Hierbei wird aus dem eisenfreien Apotransferrin das eisenhaltige Transferrin (Karlson 1994). Das so gebundene Eisen wird im Organismus von Säugetieren durch den Blutkreislauf verteilt und kann bei Bedarf von den Zellen über einen rezeptorgesteuerten Transportvorgang aufgenommen werden (Darnell 1998).

Freies Apotransferrin nimmt im Dünndarm  $\text{Fe}^{3+}$  -Ionen auf und transportiert sie zur Zielzelle. Hier geht das Transferrin mit dem Transferrinrezeptor eine Bindung ein und wird im Folgeschritt durch Endocytose von der Zelle aufgenommen. Das Transferrin, das so im Inneren eines Vesikels im Zytosol vorliegt, wird dort durch Absenkung auf pH 5 in Apotransferrin und freie  $\text{Fe}^{3+}$  -Ionen getrennt. Die Eisenionen werden in das Zytosol abgegeben. Das Apotransferrin wird an den Rezeptor gebunden und wieder zur Membranoberfläche gebracht, wo es aufgrund des neutralen pH- Wertes der extrazellulären Flüssigkeit abdissoziiert. Nun kann es wieder Eisenionen aufnehmen und den Transferrinkreislauf schließen (Abb. 1).

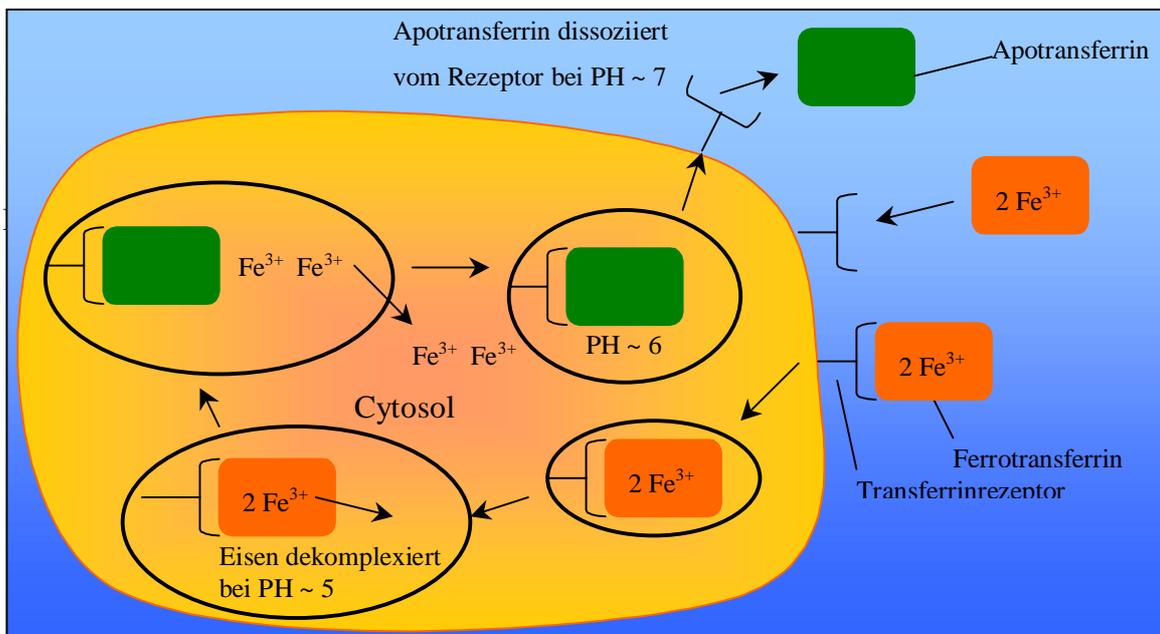


Abb. 1 Transferrin Zyklus einer proliferierenden Tierzelle

### 2.3 Insulin

Insulin ist ein Peptid mit 51 Aminosäuren und einer Molmasse von  $M_r \approx 5734$ . Die Gegenwart von Zink-Ionen führt leicht zur Aggregation der Einzelmoleküle, was dazu führte, daß Insulin früher als Protein angesehen wurde. Im Organismus hat Insulin eine Vielzahl von Funktionen, zu der als bekannteste die blutzuckerregulierende Eigenschaft zählt (Karlson 1994, Schlee 1991). Hierbei wird durch die Bindung von Insulin an den Insulin-Rezeptor die Expression von Glukosetransporter-Proteinen in der Zellmembran angeregt (Czech 1992). Aber auch der Aufbau von Speicherstoffen (Glycogen, Fett, Protein) oder die Hemmung des Abbaus von Speicherstoffen (Glycogenolyse, Lipolyse) wird durch das Insulin reguliert, wobei die Wirkungsweise außerdem noch vom Zelltyp abhängt (Karlson 1994). Neben diesen metabolischen Wirkungen spielt Insulin auch bei der Proliferation der Zellen als Wachstumsfaktor eine Rolle. Der Wirkmechanismus des Insulins in der Zelle ist allerdings bislang nicht genau bekannt (Cherqui 1990, Harrison 1990, Czech 1992, Sultan 1997).

### 2.4 Aminosäuremetabolismus

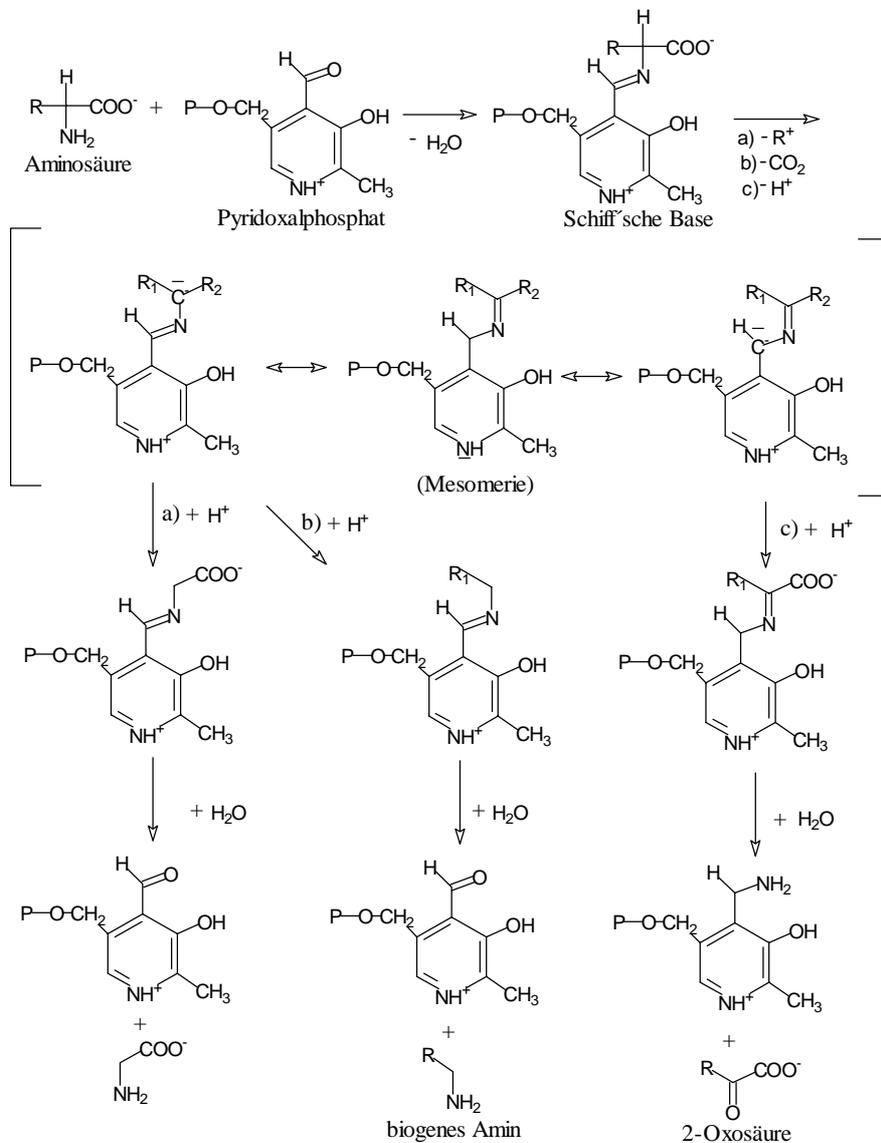
Die von der Zelle aufgenommenen Aminosäuren werden zum Teil dazu verwendet neue Zellproteine aufzubauen. Ein nicht unerheblicher Teil wird jedoch im Stoffwechsel weiter abgebaut, wobei verschiedene Reaktionswege durchlaufen werden können:

- a) Umwandlung der Seitenkette unter Erhalt der  $\alpha$ -Aminocarbonsäuregruppierung
- b) Decarboxylierung
- c) Transaminierung zu 2-Oxosäuren
- d) Oxidative Desaminierung zu 2-Oxosäuren

Die Reaktionswege sind in Abb. 2 dargestellt. Lediglich die oxidative Desaminierung wurde nicht aufgezeigt, da sie nicht über die Pyridoxalphosphatkatalyse abläuft.

## b) Die Decarboxylierung von Aminosäuren

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Pyridoxalphosphat katalysierte Reaktion, bei der neben  $\text{CO}_2$  ein primäres Amin entsteht, dessen Formel sich aus der Ausgangsaminosäure ableiten lässt. Die Aminosäuren werden durch Transaminasen auf das Pyridoxalphosphat übertragen. Nach der Abspaltung von  $\text{CO}_2$  wird das biogene Amin hydrolytisch abgespalten. Viele der so entstehenden biogenen Amine haben eine starke pharmakologische Wirkung oder sind wichtige Vorstufen zu Hormonen und Coenzymen (z.B.: Cystein, Asparaginsäure  $\rightarrow$  Cysteamin,  $\beta$ -Alanin  $\rightarrow$  Coenzym A oder 3,4-Dihydroxyphenylalanin  $\rightarrow$  Adrenalin  $\rightarrow$  Hormon).



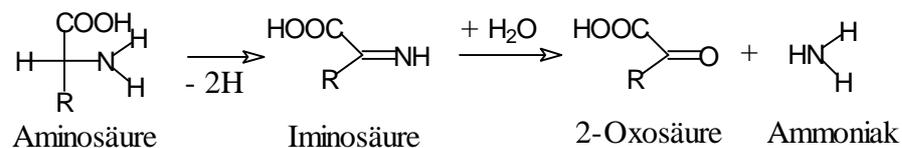
**Abb. 2 Funktion des Pyridoxalphosphats im Aminosäuremetabolismus. Die verschiedenen Abbauwege sind für die einzelnen Reaktionen mit a), b) und c) gekennzeichnet.**

## c) Die Transaminierung zu 2-Oxosäuren

Bei der Transaminierung werden die Aminosäuren wie bei der Decarboxylierung von Transaminasen auf das Pyridoxalphosphat übertragen. Das dabei entstehende Pyridoxaminphosphat bleibt an dem Enzym gebunden. Die gleichzeitig freiwerdende 2-Oxosäure stellt das Kohlenstoffgerüst der ursprünglichen Aminosäure dar. Das Pyridoxalphosphat kann durch die Reaktion mit 2-Oxoglutarat oder entsprechend wirksamen  $\text{NH}_2$ -Akzeptoren aus dem Pyridoxaminphosphat regeneriert werden. Die Umkehrung der Transaminierungsreaktion kann zur Synthese einiger Aminosäuren genutzt werden. So können z.B. Alanin aus Pyruvat, Serin aus Hydroxypyruvat oder auch Glutaminsäure aus 2-Oxoglutarat synthetisiert werden. Die auf diesem Wege nicht synthetisierbaren Aminosäuren sind die essentiellen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin, Methionin und Threonin).

## d) Oxidative Desaminierung

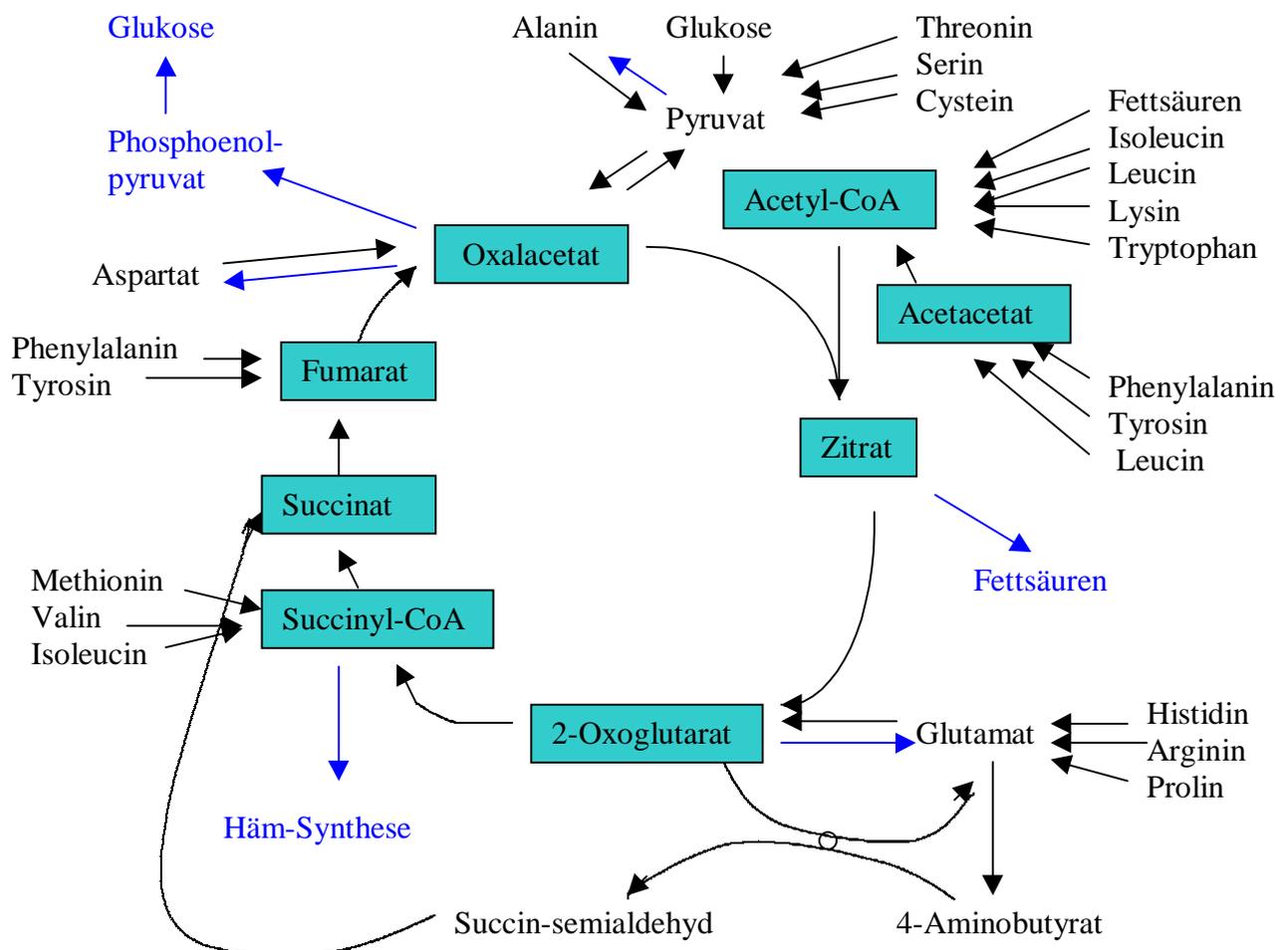
Bei diesem Reaktionsweg entsteht durch enzymatische Eliminierung von zwei Wasserstoffatomen aus der Aminosäure eine Iminosäure, die durch Hydrolyse in eine 2-Oxosäure und Ammoniak zerfällt.



**Abb. 3** Oxidative Desaminierung von Aminosäuren zu 2-Oxosäuren

### 2.4.1 Stoffwechselweg der 2-Oxosäuren

Die bei der Transaminierung und oxidativen Desaminierung entstehenden 2-Oxosäuren werden je nach Stoffwechsellage entweder unter Energiegewinn zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut oder zur Synthese von Kohlenhydraten, Fetten o.ä. verwendet. Dieses geschieht über Zwischenprodukte des Zitrat-Zyklus. Werden Aminosäuren zu  $\text{C}_4$ -Dicarbonsäuren oder Pyruvat abgebaut, so können sie im Zitrat-Zyklus in Glukose umgewandelt werden (Glucogenese). Dieses stellt einen wichtigen Stoffwechselweg dar.



**Abb. 4** Über die entsprechenden 2-Oxosäuren werden die decarboxylierten Aminosäuren in den Zitrat-Zyklus eingeschleust und weiter verstoffwechselt. Mehrfach aufgeführte Aminosäuren können mehr als einen Schlüsselmetaboliten liefern.

Der Zitrat-Zyklus wird hierfür beim Oxalacetat verlassen, das somit eine wichtige Glukose-Vorstufe darstellt. Die wichtigsten Stoffwechselwege der zu 2-Oxosäuren abgebauten Aminosäuren sind in Abb. 4 abgebildet.

Für die Fettsäuresynthese wird aus Oxalacetat und Acetyl-CoA Zitrat gebildet. Dieses wird aus dem Mitochondrium ins Zytosol geschleust und dort durch die ATP-Zitrat-Lyase unter Verbrauch von einem ATP in Acetyl-CoA und Oxalacetat gespalten. Die aktivierte Essigsäure kann dann im Fettsäure-Synthase-Komplex zur Fettsäuresynthese verwandt werden.

Die Häm-Synthese zweigt auf der Stufe des Succinyl-CoA aus dem Zitrat-Zyklus ab. Der Verbrauch an C<sub>4</sub>-Bausteinen brächte den Zitrat-Zyklus zum Erliegen, wenn nicht immer wieder durch anaplerotische Reaktionen, wie z.B. die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat, der Zyklus aufgefüllt würde. Zu diesen Reaktionen gehören auch die Abbaureaktionen der Aminosäuren.

## 2.5 Glukose als Energiequelle

Für die meisten tierischen Organismen ist Glukose die wichtigste Kohlenstoffquelle. Sie kann z.B. in Ribose umgewandelt werden, wenn die Zelle Nukleinsäuren aufbaut, aber wichtiger ist die Glukose im Energiestoffwechsel der Zelle. In der Glykolyse (Abb. 5) wird die Glukose in Pyruvat umgewandelt. Pyruvat seinerseits ist die Substanz, die in den Mitochondrien der Zelle in die Acetylgruppe des Acetyl-CoA umgewandelt werden kann. Das Acetyl-CoA ist eine reaktionsfähige Verbindung, die bei ihrer Hydrolyse einen erheblichen Energiebetrag freisetzt. In den Mitochondrien wird das Acetyl-CoA in den Zitrat-Zyklus eingeschleust und dort unter ATP-Produktion zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O abgebaut.

Bei der Glykolyse werden zur Synthese von Fruktose-1,6-bisphosphat zwei Moleküle ATP benötigt. Da im weiteren vier Moleküle ATP frei werden ist ein Nettogewinn von zwei ATP zu verzeichnen. Bei der Reaktion von Fruktose-1,6-bisphosphat wird der Sechs-Kohlenstoffzucker in zwei Drei-Kohlenstoffzucker gespalten, so daß sich im Nachfolgenden die Zahl der Moleküle verdoppelt. Der sich anschließende Abbau des Pyruvat im Zitrat-Zyklus setzt weitere 36 Mol ATP frei, so daß insgesamt durch den

oxidativen Abbau von Glukose 38 Mol ATP gewonnen werden (Stryer 1990, Schlee 1991, Alberts 1995, Voet 1995).

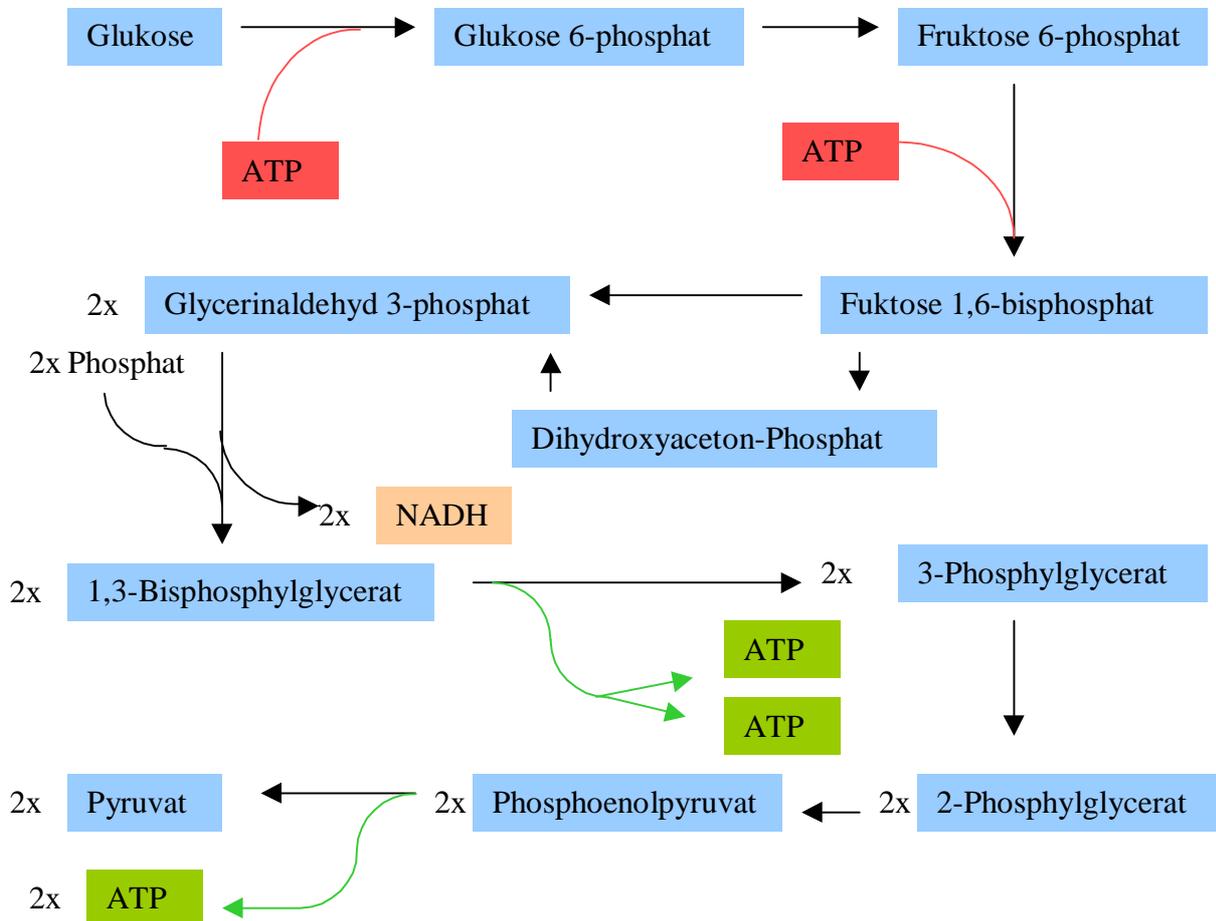


Abb. 5 Schematische Darstellung der Glykolyse.

Die Regulierung des Zitrat-Zyklus erfolgt enzymatisch durch Zitratsynthase, Isocitratdehydrogenase und auch durch die  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase. Diese Enzyme werden durch ATP und/oder NADH gehemmt und können so den Durchsatz im Zitrat-Zyklus stark vermindern. Auch organische Säuren, wie  $\alpha$ -Ketoglutarat, Oxalacetat oder Malonsäure, können auf diese Enzyme hemmend wirken und den Zyklus unterbrechen (Schlee 1991).

## 2.6 Wachstumskinetik von Tierzellen

Jede Batchkultur durchläuft nach dem Animpfen verschiedene Phasen. Zunächst stellen sich die Zellen auf die neue Umgebung ein. In dieser Phase, der Lag-Phase, ist das Zellwachstum verlangsamt, da die Zellen ihre Ressourcen nutzen, um ihre Umgebung zu konditionieren. Die Dauer dieser Phase kann variieren, ist aber bei gleichen Startbedingungen annähernd konstant.

Mit der Zeit nimmt die Geschwindigkeit des Zellwachstums zu, bis die Zellen sich mit einer maximalen, konstanten Geschwindigkeit vermehren. Diese Phase wird als exponentielle Phase bezeichnet und kann mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$R_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Gl. (1)}$$

$R_x$  = Wachstumsgeschwindigkeit;  $X$  = Zelldichte;  $\mu$  = spezifische Wachstumskonstante

Durch Integration ergibt sich folgende Gleichung:

$$X_t = X_{t_0} \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t} \quad \text{Gl. (2)}$$

$X_t$  = Zelldichte zum Zeitpunkt  $t$ ,  $X_{t_0}$  = Anfangszelldichte

Monod zeigte 1942, daß die spezifische Wachstumskonstante  $\mu$  unter anderem von der Substratkonzentration ( $S$ ) abhängt (Gl. (3)). Kommt es zu einem Substratmangel, dann geht  $\mu$  gegen Null und es kommt zu einem Wachstumsstillstand.

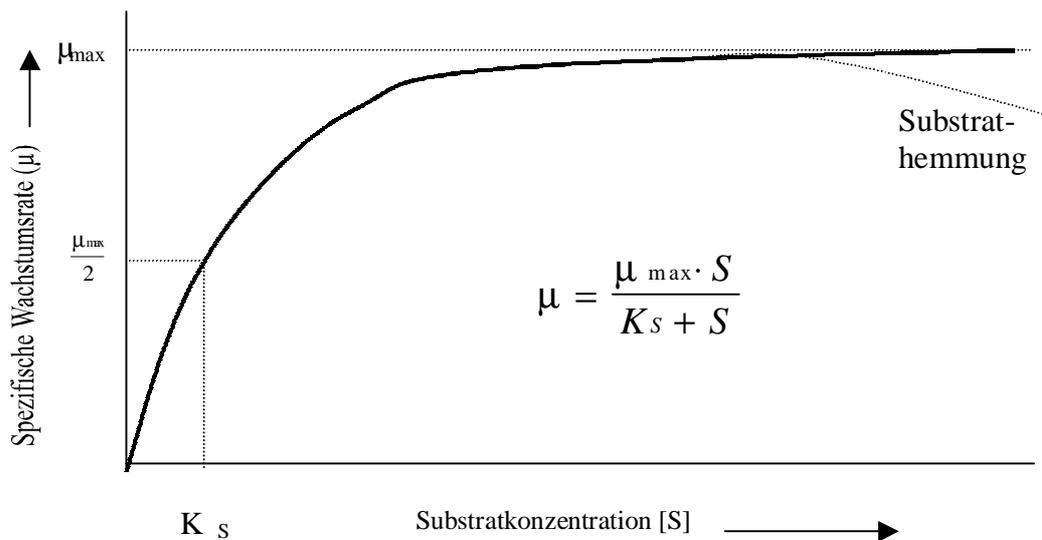
$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad \text{Gl. (3)}$$

$S$  = Substratkonzentration;  $K_S$  = Monod-Konstante ( Verwertungs- oder Substratssättigungs-Konstante)

Bei einem Wert von  $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$  ist die Substratkonzentration  $S$  gleich der Monodkonstante  $K_S$ . Der Zahlenwert ist ein Maß für die Affinität des Organismus zum

primären Substrat. Wird Gl. (3) in Gl. (1) eingesetzt, so ergibt sich für die Beschreibung der Wachstumskinetik folgende Beziehung:

$$R_x = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{S}{S + K_S} \right) \cdot X \quad \text{Gl. (4)}$$



**Abb. 6** Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  von der Substratkonzentration  $[S]$  (Schlee 1991).

## 2.7 Spezifische Verbrauchs- und Bildungsraten

Zur Ermittlung der spezifischen Verbrauchs- oder Bildungsrate wird die Gl. (5) verwendet. Das so zu berechnende  $q$  gibt die Änderung der Substratmenge pro Zellzahl und Zeiteinheit an. Bei der Berechnung der Verbrauchsrate hat man eine Substratabnahme, die das ermittelte  $\Delta S$  negativ werden läßt. Bei einer Substratzunahme hingegen ist der  $\Delta S$ -Wert, der maßgeblich für das Vorzeichen von  $q$  ist, positiv. Ein negatives  $q$  bedeutet die Verstoffwechslung der Komponente, während ein positives  $q$  deren Produktion anzeigt.

$$q = \frac{(S_1 - S_0) \cdot 24}{\frac{(Z_1 + Z_0)}{2} \cdot (t_1 - t_0)} = \frac{\Delta S \cdot 48}{\Sigma Z_n \cdot \Delta t} \quad \text{Gl. (5)}$$

$q$  = spezifische Verbrauchs-/ Bildungsrate [ $\mu\text{mol}/10^6 \cdot \text{d}$ ];  $S_0$  = Substratkonzentration [mM] zum Zeitpunkt  $t_0$ ;  $S_1$  = Substratkonzentration [mM] zum Zeitpunkt  $t_1$ ;  $Z_0$  = Lebendzellzahl [ $10^6/\text{mL}$ ] zum Zeitpunkt  $t_0$ ;  $Z_1$  = Lebendzellzahl [ $10^6/\text{mL}$ ] zum Zeitpunkt  $t_1$ .

## 2.8 Stöchiometrisches Modell zur Bestimmung von Medienkompositionen nach Liangzhi Xie et al. (1994a)

Optimale Bedingungen sind die Voraussetzung für eine erfolgreiche Kultivierung von Tierzellen. Bezogen auf das Kulturmedium bedeutet dieses, daß im Medium genau die Menge an Nährstoffen enthalten sein muß, die von den Zellen benötigt wird. Es darf während der Kultivierung weder zu einer Nährstofflimitierung kommen, noch darf die Anfangskonzentration der Substrate so hoch gewählt werden, daß ein inhibierender oder sogar toxischer Effekt auftritt. Zur Ermittlung eines Fütterungsmediums können zwei Strategien herangezogen werden. Zum einen kann man aus Batch-Experimenten Verbrauchsraten bestimmen und das Fütterungsmedium so abstimmen, daß während der Kultivierung keine Limitierung auftritt, aber die Substrate auch nicht im Überschuß vorliegen. Die Bestimmung der Verbrauchsraten ist allerdings bei den komplexen Kulturmedien mit mehr als 60 Einzelkomponenten sehr aufwendig. Der Aufwand ist fraglich, wenn berücksichtigt wird, daß sich die Bedürfnisse der Zellen mit den Umgebungsparametern ändern. Ein Überschuß an Glukose z.B. bedingt eine gesteigerte Glukoseaufnahme (Bonarius 1996). Aber auch Faktoren wie die Temperatur (Lübben 1994) spielen eine Rolle. Die Folge hiervon ist, daß mit Näherungswerten gearbeitet werden muß, die den tatsächlichen Bedürfnissen der Zelle nicht optimal entsprechen.

Um den analytischen Aufwand zu minimieren, wird in dieser Arbeit das stöchiometrische Modell nach Liangzhi Xie et al. (1994a,b) gewählt, das mit erheblich weniger analytischem Aufwand auskommt. Hier liegt der Berechnung der Medienzusammensetzung die Zellzusammensetzung zugrunde. Xie geht davon aus, daß für jede entstehende Zelle eine ganz spezifische Menge an bestimmten Nährstoffen zum

Zellaufbau und für deren Energiehaushalt, in Form von ATP, benötigt werden. Jede Zelle besteht aus einer für sie typischen Menge an Proteinen, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren. Um diese zu generieren müssen die entsprechenden Grundbausteine aus dem Kulturmedium aufgenommen werden. Es ist also zuerst einmal wichtig, den Aufbau der Zelle zu analysieren. Da sich auch die Zellzusammensetzung mit den Umgebungsparametern ändern kann (Bonarius 1996), ist bei der Berechnung der Medienzusammensetzung, teilweise auch bezüglich der Zellzusammensetzung, von Näherungswerten auszugehen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 CHO-Zelllinie**

In dieser Arbeit wird mit der rekombinanten Suspensionszelllinie CHO-Tf70R gearbeitet, die freundlicherweise von Pharmacia & Upjon (Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Zelllinie ist eine Weiterentwicklung der CHO-K1 Zellen, die 1988 von Sano transfiziert wurde (Sano 1988), um humanidentische Wirkstoffe zu produzieren. Die anfangs unbefriedigende Produktivität der Zellen konnte durch Selektion gesteigert werden, so daß sich ein produktiver Klon entwickelte. Weiterentwicklungen führten schließlich zu dem verwendeten Langzeitsuspensions-Klon, der von Buch an ein serumfreies Kulturmedium adaptiert wurde (Buch 1997).

#### **3.2 Medium**

Als Kulturmedium für die Kontrollversuche stand das proteinarme Medium Bio Pro 1 (Bio Whittaker, Belgien) zur Verfügung. Für die Experimente mit proteinfreiem Medium wird die proteinfreie Version Bio Pro 1 P.F. verwendet. Es handelt sich in beiden Fällen um ein Flüssigmedium, das niedersupplementiert ist, um auch bei

Fütterungsexperimenten als Startmedium dienen zu können. Vor jedem Versuch muß das Basalmedium mit Glukose und Glutamin angereichert werden. Im Verlauf dieser Arbeit zeigt es sich jedoch als vorteilhaft, das Glutamin durch eine äquimolare Menge an Glutaminsäure zu ersetzen. Bei dem proteinfreien Medium müssen zusätzlich noch die Proteinersatzstoffe oder Insulin und Transferrin zugefügt werden. Die Zugabe erfolgt über eine aus dem Medium hergestellte Stammlösung, die durch Filtration sterilisiert wurde (Cellulose-Acetatfilter 0,2 µ; SARTORIUS, Göttingen). Pro 500 mL Medium werden je nach Experiment 4 mMol – 8mMol Glukose, 1 mMol Glutamin bzw. 1 mMol Glutaminsäure, 1 mL Transferrinkonzentrat (Bio Whittaker, Belgien) und/oder 1mL Insulinkonzentrat (Bio Whittaker, Belgien) zugefügt.

### 3.3 Kultivierungssysteme

#### a) Spinner Flaschen

Mehrheitlich werden die Kulturen dieser Arbeit in Spinnerflaschen (Techne Corporation, Cambridge) mit einem Kultivierungsvolumen von 125 mL, 250 mL oder 500 mL durchgeführt. Die Rührergeschwindigkeit des entsprechenden Rührers (Techne Corporation Modell MCS-104S) beträgt 30 rpm. Durch Rotation einer Glaskugel mit Magnetkern wird bei diesem Kultivierungssystem eine nicht turbulente Strömung (Einstein-Thompson-Effekt) erzeugt, die es ermöglicht, die Zellen scherstreßarm in Suspension zu halten. Mit diesem System können hochempfindliche Säugerzellen zu hohen Zelldichten herangezüchtet werden. Der Gasaustausch findet über den Kopfraum der Kulturflasche statt. Totwassergebiete sind in einer Techne-Spinnerflasche nicht beschrieben.

Die Kultivierungen werden in Inkubatoren (HERAEUS B 5060 EK, HERAEUS, Hanau) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

#### b) Biostat<sup>®</sup> B

Fütterungsexperimente werden zum Teil in einem 2 L Rührkesselreaktor (Biostat<sup>®</sup> B, B. Braun, Melsungen) durchgeführt, bei dem die Regelung des pH- Wertes, der

Gelöstsauerstoffkonzentration, sowie der Temperatur und der Rührergeschwindigkeit möglich ist. Die Sauerstoffversorgung wird über eine Silikonschlauchbegasung vorgenommen (Kuhlmann 1987), was eine Beschädigung der Zellmembran durch Zerplatzen von Luftblasen an der Flüssigkeitsoberfläche verhindert (Hülscher, 1992). Zu Angaben auf weiteres Equipment und die Vorbereitung der Fermentationen wird auf einschlägige Literatur verwiesen (Fenge 1991, Weidemann 1995, Rössler 1995). Die Überwachung der Kultivierungsparameter wird mit dem Programm BIO-TEM DAT 5.86 (TEM-Electronics, Hannover) durchgeführt. Zur Fütterung wird bei der kontinuierlichen Fütterung eine Präzisionspumpe (HERAEUS CD70, HERAEUS, Hanau) verwendet.

### 3.4 Analytik

Die Probenahme zur Analyse erfolgt im 24-h-Takt. Bei den Fütterungsexperimenten zeigt sich jedoch ein 12-h-Rhythmus als vorteilhaft.

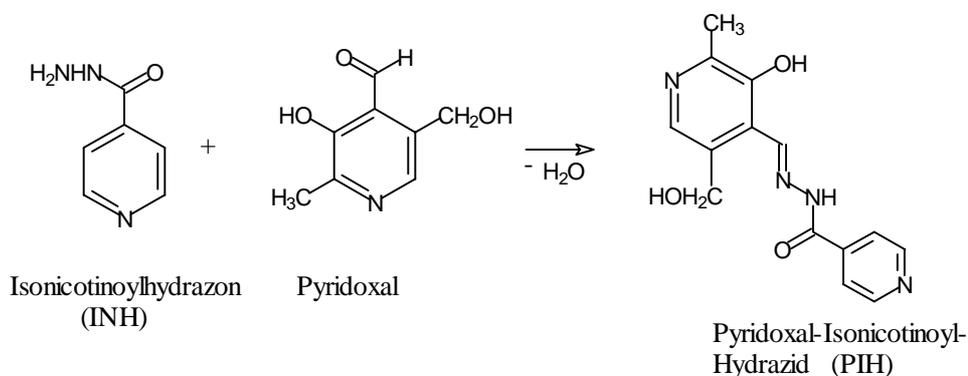
- a) **Zellzahl / Vitalität:** Die Zellzahlbestimmung erfolgt über die Trypanblau Methode (Morgan 1993) (Trypan blue 0,4%, Sigma, Deisenhofen) und die Zellkernmethode (Sanford 1951) mit Kristallviolett in einem Haemocytometer (Neubauer improved, amtlich geeicht). Aus der Gesamtzellzahl und der Totzellzahl wird die Vitalität [%] bestimmt.
- b) **Glukose / Laktat:** Die Konzentrationsbestimmung wird mittels des halb-automatischen Analyser YSI select 2700 (Yellow Springs Instruments, Ohio) durchgeführt (Handbuch)
- c) **Aminosäuren:** Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgt mittels „reversed phase“ HPLC über eine Gradientensteuerung nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA-MCE (Kretzmer 1986).

- d) **Produktnachweis:** Die Konzentrationsbestimmung des produzierten tissue plasminogen activator (t-PA) erfolgt mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (Immulyse™ t-PA Cat # 101005, Biopool, Umeå, Firmenschrift).
- e) **t-PA Aktivität:** Die Aktivität wird mittels Chromozym® t-PA (Cat. No. 1093037, Roche, Mannheim) bei 405 nm photometrisch (Kontron Uvikon 930, Fa. Kontron) bestimmt. (Firmenschrift Boehringer Mannheim)
- f) **Organische Säuren:** Die Bestimmung der organischen Säuren erfolgt mittels HPICE (High Performance Ion Chromatography Exclusion) über eine Shodex KC- 811 Säule (Christel 1995).
- g) **Ammonium:** Ammonium wird als Ammoniak mittels UV Testkit (Nr. 112345) der Firma Roche, Mannheim photometrisch analysiert.
- h) **Gesamtprotein:** Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgt über den Modified Lowry Protein Assay (PIERCE, Rockford, IL, Kit # 23240, Firmenschrift PIERCE) bei 750 nm photometrisch .
- i) **DNA/RNA-Gehalt:** Der zelluläre DNA/RNA Gehalt wird durch Fluoreszenzmessungen mittels Propidiumiodid (PI) in einem Fluoroscaner (Titertek® Fluoroskan II, Flow Laboratories, Lugano) bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission bei 590 nm gemessen. Zur DNA- Bestimmung ist die Probe zuvor mit RNase (Fluka, Buchs) behandelt worden.
- j) **Kohlenhydrate:** Die Bestimmung der Kohlenhydrate erfolgt durch die Periodic Acid Schiff Reaktion (PAS), die einen sehr sensitiven Nachweis für Kohlenhydrate in Zelllysaten darstellt (Mantle 1978).

- k) **Phospholipide:** Der zelluläre Gehalt an Phospholipiden wird nach der Methode von Barlett bestimmt, bei der nach einer Extraktion die Phospholipide verascht und anschließend der Ortho-Phosphatgehalt bestimmt wird (Testkit PMB, Merck, Darmstadt).

### 3.5 Synthese von Eisen Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazid FePIH

Die Darstellung von FePIH erfolgt nach der von Ponka et al. (1979) beschriebenen Methode. In einem ersten Arbeitsschritt werden äquimolare Mengen einer gesättigten Lösung von Isonicotinsäurehydrazon (INH) und Pyridoxal in jeweils 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 4,5) miteinander vermischt. Das Gemisch wird im Anschluß 5 min. refluxiert, wobei sich ein orangefarbener Niederschlag bildet. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches wird das Präzipitat durch Filtrieren vom Puffer getrennt, mit Eiswasser gewaschen und im Anschluß im Exsikkator getrocknet.



**Abb. 7 Schematische Darstellung der Substitutionsreaktion von INH und Pyridoxal zu PIH**

Aus dem so gewonnenen PIH wird in 50 mM Tris HCl (pH 7,4) eine 5 mM Lösung hergestellt. Zur Verbesserung der Löslichkeit muß das PIH zuerst in 0,1 M HCl gelöst und anschließend die Lösung auf pH 7,4 eingestellt werden. Die so erhaltenen Lösung wird zu einer 3 mM Eisenzitat-Lösung unter Rühren zugegeben, wobei sich ein rotbrauner Niederschlag bildet. Das gewonnene FePIH ( $M_r = 628,37$  g/mol) wird abfiltriert und gründlich mit Wasser gewaschen.

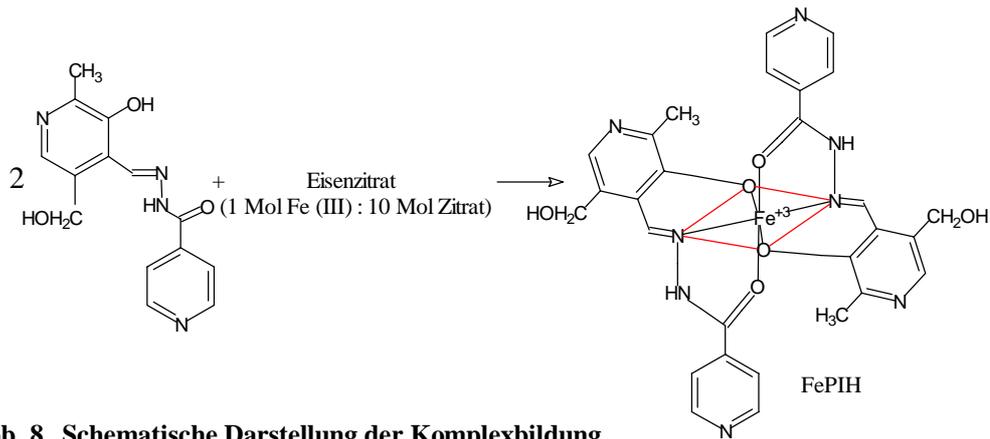


Abb. 8 Schematische Darstellung der Komplexbildung

Das IR-Spektrum des auf diese Weise dargestellten FePIH ist in Abb. 9 abgebildet und die entsprechende Zuordnung in Tab.1 aufgeführt.

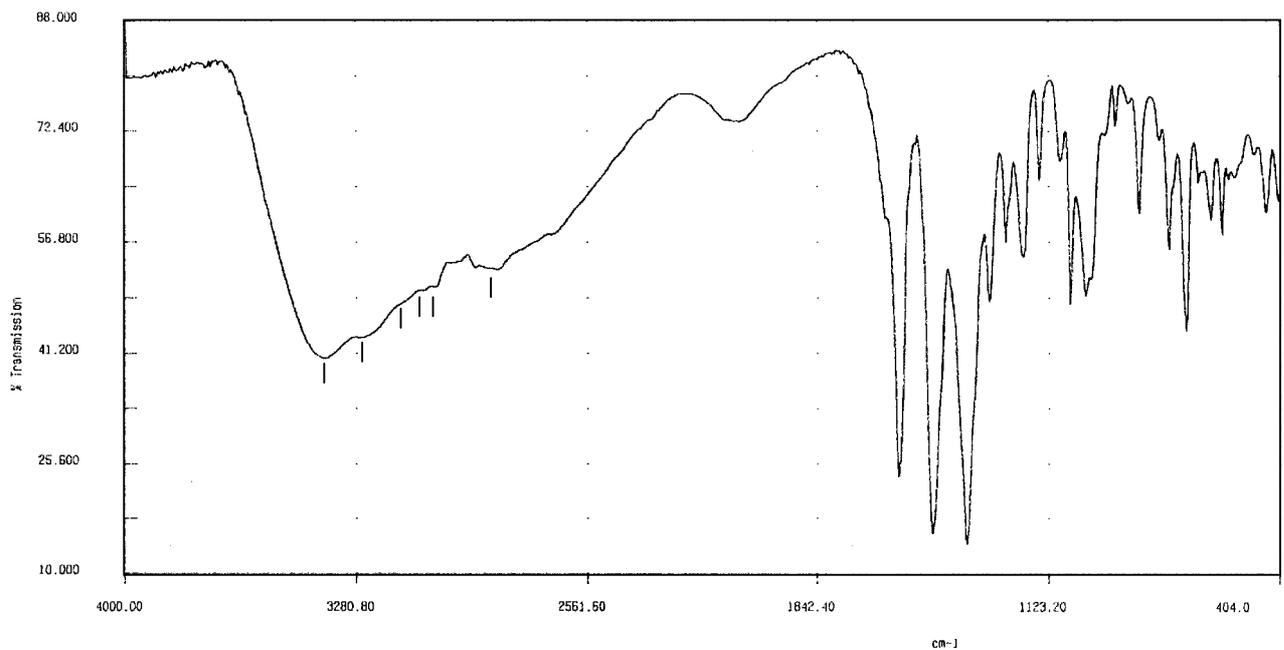


Abb. 9 IR-Spektrum von FePIH; aufgenommen als KBr-Pressling.

**Tab. 1 Peakzuordnung eines FePIH IR-Spektrums (KBr-Pressling)**

Peak Nr.	Wellenzahl [1/λ]	Transmission [%]	Peak Nr.	Wellenzahl [1/λ]	Transmission [%]
<b>1</b>	412	62,556	<b>15</b>	1092	68,147
<b>2</b>	452	60,975	<b>16</b>	1156	65,319
<b>3</b>	488	69,131	<b>17</b>	1208	54,734
<b>4</b>	552	65,850	<b>18</b>	1260	56,728
<b>5</b>	568	65,606	<b>19</b>	1312	48,525
<b>6</b>	588	57,728	<b>20</b>	1380	14,066
<b>7</b>	624	59,897	<b>21</b>	1488	15,703
<b>8</b>	664	65,134	<b>22</b>	1592	23,747
<b>9</b>	700	44,372	<b>23</b>	2844	52,919
<b>10</b>	752	55,752	<b>24</b>	2912	53,231
<b>11</b>	784	71,091	<b>25</b>	2988	53,828
<b>12</b>	844	60,794	<b>26</b>	3040	50,456
<b>13</b>	1012	49,272	<b>27</b>	3272	43,384
<b>14</b>	1060	48,122	<b>28</b>	3380	40,494

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Transferrinersatzstoff

Bei der Suche nach Transferrin-Ersatzstoffen muß das Augenmerk auf die Fähigkeit des Transferrins gerichtet werden, die Eisen-Ionen reversibel zu binden. Als Substanz kommen Komplexbildner in Frage, die eine relativ lockere Eisenbindung ausbilden. Alle unpolaren Substanzgruppen scheiden deshalb aus. Das Hauptaugenmerk wird in dieser Arbeit auf Hydrazide gerichtet, die in der Lage sind, zwischen den freien Elektronen ihrer Stickstoffatome bzw. ihres Carbonylsauerstoffs und den Eisen-Ionen schwache Bindungen auszubilden. Ponka et al. haben 1979 mit Pyridoxal-Isonicotinoyl-Hydrazid (PIH) radioaktiv markierte Eisen-Ionen aus Reticulozyten isoliert. Wenn es sich bei dieser Reaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, dann müßte es

dementsprechend möglich sein, den Eisenkomplex des PIH (FePIH) als Eisendonator und somit als Transferrinersatz zu verwenden.

Wegen der relativ schlechten Löslichkeit dieser Verbindung wird versucht weitere Komplexe ähnlicher Struktur mit einer erhöhten Polarität zu synthetisieren. Die Synthesen verlaufen analog der in Kap. 3.5 beschriebenen Synthese des FePIH, nur daß die Aldehydkomponente durch Salicylaldehyd oder Phloroglucincarbaldehyd ersetzt wird und als Hydrazinkomponente auch 4-Hydroxybenzhydrazin zum Einsatz kommt.

#### 4.1.1 Untersuchung der Auswirkung von FePIH auf die Zellkultur

##### 4.1.1.1 Notwendigkeit des Transferrins im Medium

Um auszuschließen, daß die im Medium enthaltenen anorganischen Eisenverbindungen für ein ausreichendes Zellwachstum sorgen können und somit das Transferrin nicht notwendig ist, wird als nächster Schritt die Überprüfung der Notwendigkeit von Transferrin im Zellkulturmedium vorgenommen. In Abb. 10 sieht man den Vergleich einer Kultur mit Transferrin und einer Kultur, in der das Transferrin eliminiert und auch auf einen Ersatzstoff verzichtet wurde.

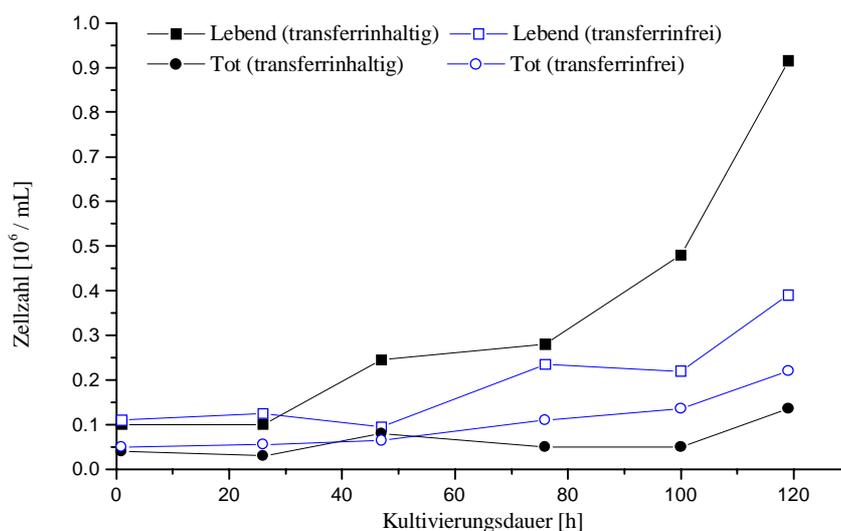
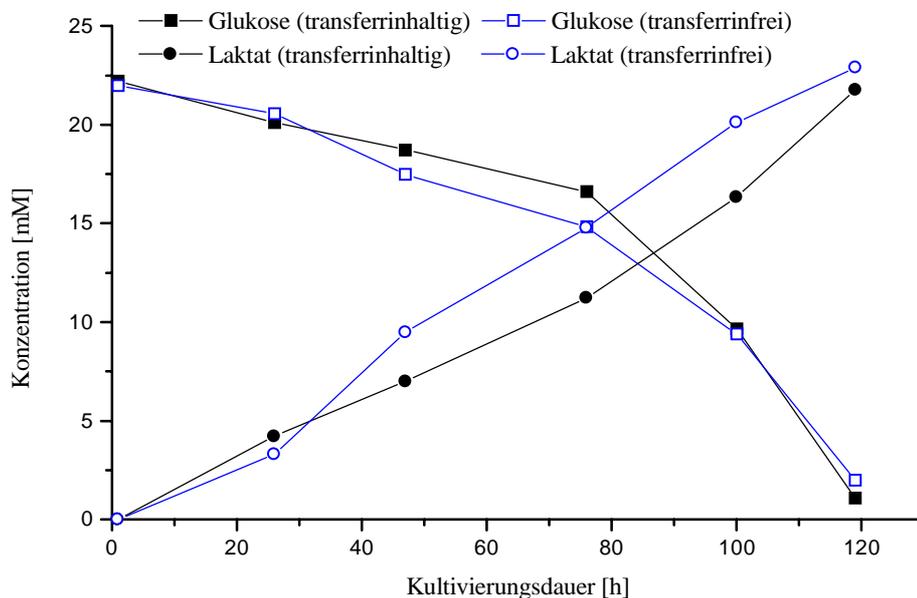


Abb. 10 Vergleich der Zellzahlen von Kulturen mit transferrinfreiem und transferrinhaltigem Medium.

Beim Betrachten der Kurven ist deutlich zu sehen, daß die Zellen ohne Transferrin schlechter wachsen als mit Transferrin. Ein Vergleich der mit den Punkten markierten Totzellzahlen zeigt außerdem, daß sich die Zellen ohne einen Eisentransporter schlechter regenerieren. Trotz anfänglich gleicher Totzellzahl ist die Anzahl an toten Zellen am Schluß der Kultivierung bei dem transferrinfreien Medium höher, was eine niedrigere Vitalität zur Folge hat. Während die Zellvitalität bei der Kontrollkultur im Verlaufe der Kultivierungsdauer steigt, stagniert sie in der transferrinfreien Kultur. Daß trotzdem ein geringes Zellwachstum zu beobachten ist, kann mit der Tatsache erklärt werden, daß auch ohne Eisentransporter geringe Mengen an anorganischem Eisen in die Zellen gelangen. Diese Menge reicht bei weitem jedoch nicht aus, um ein normales Zellwachstum hervorzurufen.

Laskey et al. zeigten 1988, daß Eisen bei der DNS-Synthese in Säugerzellen eine große Rolle spielt, womit das geringe Zellwachstum im transferrinfreien Fall zu erklären ist. Interessant ist in diesem Fall, daß trotz des geringen Zellwachstums und der geringeren Zellzahl die verbrauchte Gesamtmenge an Glukose nahezu identisch mit der in der Vergleichskultur ist (Abb.11).



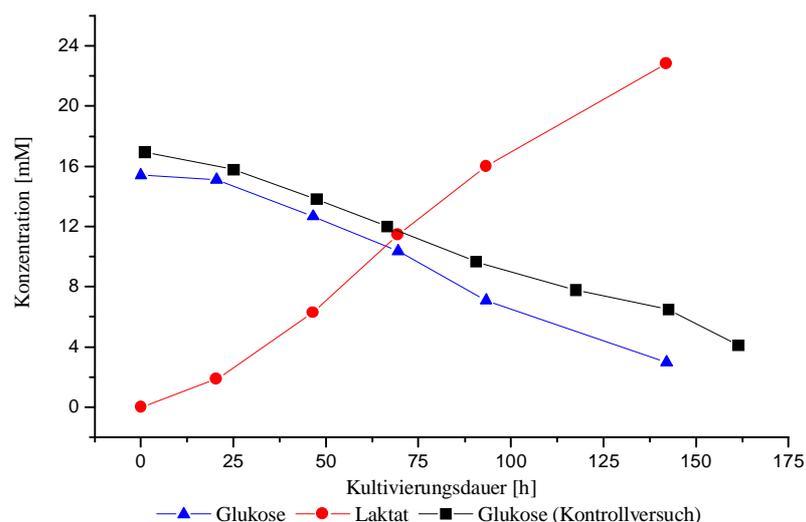
**Abb. 11 Vergleich der Glukose- und Laktatkonzentration von einer transferrinfreien und der Kontrollkultur.**

Bedingt durch die geringere Zellzahl sind die Verbrauchsraten im transferrinfreien Medium zwischen 30 % und 100 % größer als im Kontrollversuch. Dieses Verhalten der

Zellen kann man häufig beobachten, wenn suboptimale Bedingungen bei der Kultivierung vorliegen. Ein transferrinfreies Medium stellt für die Zelle eine Streßsituation dar, die am gesteigerten Glukosemetabolismus und der damit verbundenen erhöhten Laktatproduktion abzulesen ist.

#### 4.1.1.2 Grenzkonzentrationen des FePIH

Zu Beginn der Arbeit mit FePIH wird versucht die toxische Konzentration dieser Substanz zu ermitteln. In 12-Loch-Platten werden CHO Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an FePIH versehen und über die Dauer einer Batchkultivierung beobachtet. Täglich wird etwas Überstand entnommen, um den Glukose- und Laktatgehalt des Kultivierungsmediums zu bestimmen. Anhand des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion kann auf die Stoffwechselaktivität geschlossen und somit eine Aussage über den Zustand der Zellen gemacht werden. Bei toxischen Konzentrationen sterben die Zellen ab und der Glukoseverbrauch stagniert. Durch Zellyse kann der Laktatgehalt im Medium noch kurzfristig ansteigen, sollte dann aber ebenfalls konstant bleiben. Getestet wird der Konzentrationsbereich von 5  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  FePIH.



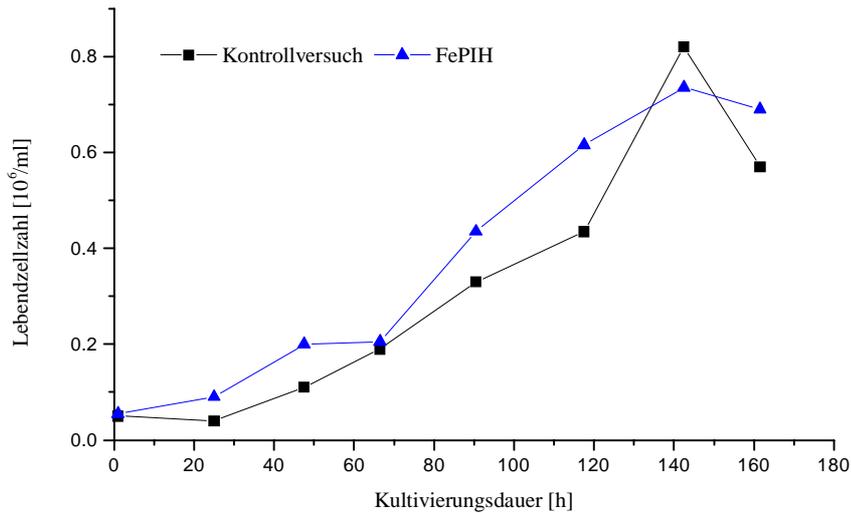
**Abb. 12** Konzentrationsprofile für eine Kultur mit 10  $\mu\text{M}$  FePIH im Medium, durchgeführt in einer 12-Loch-Platte. Bei dem Kontrollversuch ist statt FePIH Transferrin im Medium.

In Abb. 12 ist beispielhaft die Abnahme der Glukosekonzentration im Kulturmedium bei einer Testkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  FePIH aufgeföhrt. Im Konzentrationsbereich verlaufen alle Kurven entsprechend der in Abb. 12 dargestellten, so daß auf eine Darstellung sämtlicher Daten verzichtet wurde. Der Vergleich der Glukoseabnahme der FePIH-Kultur mit der Kontrolle zeigt, daß in beiden Fällen ein ähnlicher Kurvenverlauf vorliegt. Man kann somit davon ausgehen, daß FePIH im Bereich von 5  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  keinen toxischen Effekt auf die CHO-Zellen hat. Eine Zählung der Gesamtzellen nach Abbruch der Kultur zeigte, daß sich die Zelldichte von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/mL beim Animpfen auf  $8 \cdot 10^5$  Zellen/mL erhöht hat.

Bei der Verwendung von Konzentrationen um 100  $\mu\text{M}$  FePIH im Medium treten Probleme mit ausfallenden FePIH-Kristallen auf, die bei mechanischer Belastung der Zellen durch Röhrsysteme die Zellwand zerstören können. Anhand dieser Daten wird für die folgenden Versuche in den Techne-Spinnerflaschen eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  FePIH gewählt.

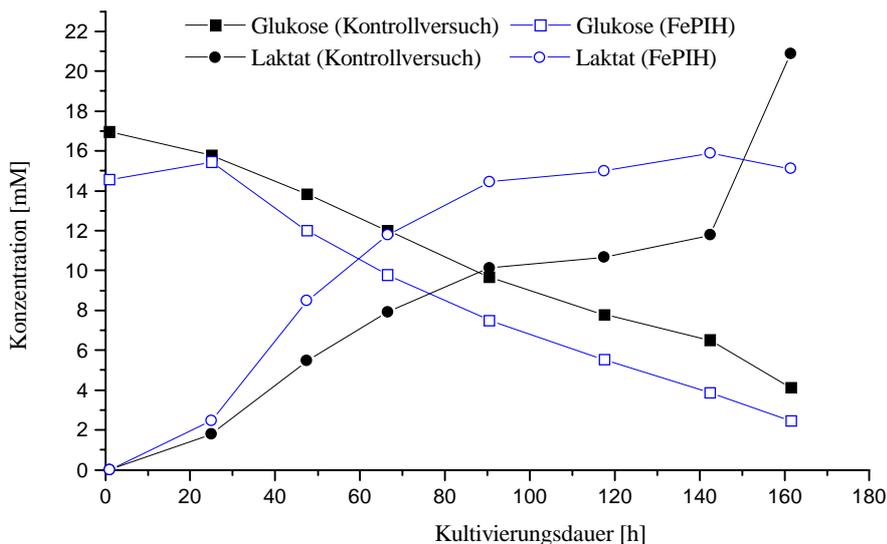
#### **4.1.1.3 FePIH als Transferrin-Ersatzstoff**

Da für den Einsatz eines Transferrinersatzstoffes nach obigen Ergebnissen eine Notwendigkeit besteht, wird im Folgenden FePIH auf seine Wirksamkeit untersucht. Bei den Untersuchungen werden als Konzentration der Wahl, wie schon bei den Toxizitätstests erwähnt, 10  $\mu\text{mol}$  FePIH pro Liter Medium eingesetzt. In Abb. 13 ist das Wachstumsverhalten der ersten Kultur mit dem Transferrinersatzstoff im Vergleich zu der Kultur mit dem Kontrollmedium dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß sich das Wachstumsverhalten beider Kulturen ähnelt. Es fällt auf, daß in der Kontrollkultur keine stationäre Phase vorhanden ist. Nach dem Erreichen der maximalen Lebendzellzahl von  $0,8 \cdot 10^6$  Zellen/mL in der 142. Kultivierungsstunde kommt es zu einem abrupten Zellsterben. Warum die Zellen sofort absterben ist nicht geklärt, das Verhalten ist aber immer wieder zu beobachten. Die FePIH-Kultur hat im Gegensatz dazu den normalen Verlauf einer Fermentation. Insgesamt zeigt der Vergleich beider Kulturen, daß das Wachstum der Zellen mit FePIH als Eisendonator gegenüber den Kontrollzellen im transferrinhaltigen Medium leicht verbessert wurde.



**Abb. 13 Zellzahlvergleich der Kultur mit FePIH als Transferrinersatzstoff und dem Kontrollexperiment.**

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich die Laktatkonzentration von der 142. bis zur 161. Stunde annähernd verdoppelt (Abb. 14). Anfänglich wurde dieses Verhalten als Folge des Zellsterbens und der damit verbundenen Zellyse gesehen. Jedoch kann der intrazelluläre Laktatgehalt nicht so hoch sein, daß solch eine Konzentrationszunahme im Kulturüberstand zu beobachten wäre. Die vermehrte Laktatproduktion scheint vielmehr die Folge eines unbekanntem Streßfaktors zu sein.



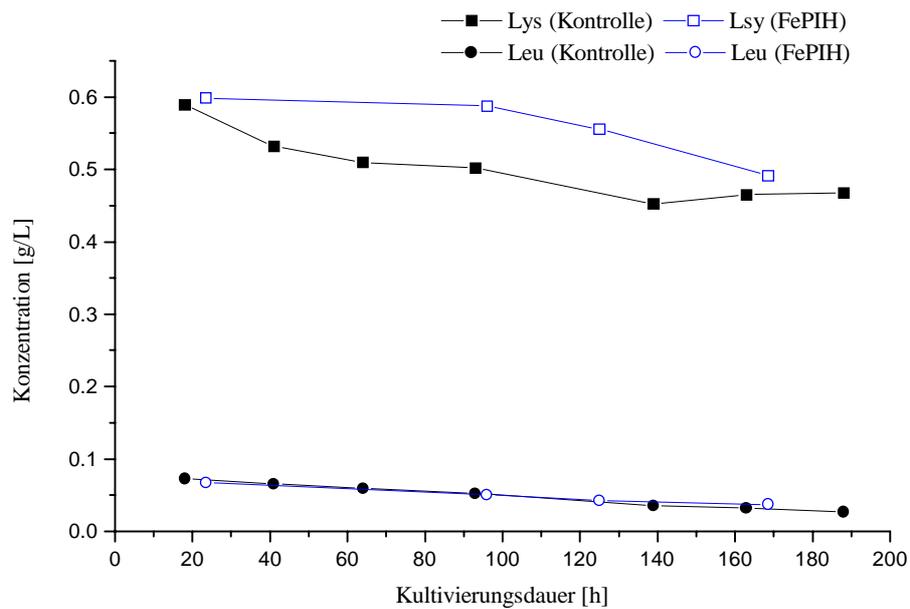
**Abb. 14 Vergleich der Glukose- und Laktatkonzentration von der FePIH- und der Kontrollkultur.**

Das etwas bessere Zellwachstum der FePIH-Kultur spiegelt sich auch im schnelleren Glukoseverbrauch wieder. Es kann in Abb. 14 gesehen werden, daß damit verbunden mehr Laktat produziert und akkumuliert wird. Allerdings ist die anfänglich stärkere Laktatproduktion unbedeutend, da die Laktatkonzentration unter dem für diese Zellen kritischen Wert von 22 mM bleibt. Interessant ist, daß sich die Laktatkonzentration beider Kulturen, trotz ausreichend vorhandener Glukose, sich einer Grenzkonzentration annähert. Dieses Verhalten ist bei der verwendeten Zelllinie üblicherweise dann zu beobachten, wenn die Glukosekonzentration unter einen Wert von 2 mM absinkt. Weshalb in diesem Experimenten die Laktatproduktion trotz einer Glukosekonzentration von 8 mM stagniert bleibt offen. Von Nachteil ist dieses Verhalten aber nicht.

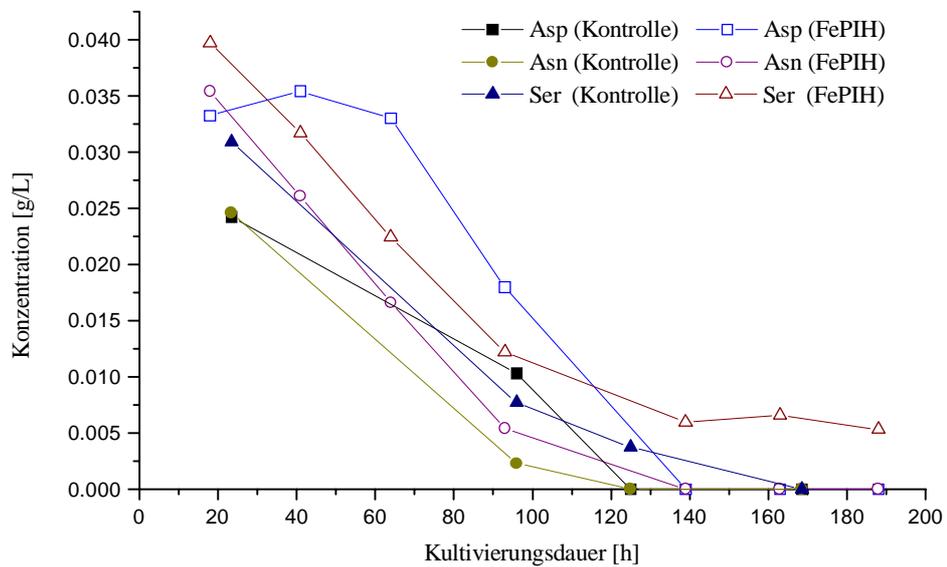
Daß FePIH als Transferrinersatzstoff wirkt, ist mit diesem Experiment gezeigt. Der beschleunigte Glukoseverbrauch und das etwas schnellere Zellwachstum zeigt aber, daß sich das Zellverhalten geändert hat. Daß es sich dabei um geringfügige Änderungen handelt zeigt eine Betrachtung der Aminosäuredaten des Kulturmediums.

#### **4.1.1.4 Aminosäurekonzentrationen der FePIH-Kultur**

Größere metabolische Veränderungen müssen sich in Veränderungen im Aminosäurekonsum bemerkbar machen. Bei Betrachtung von Abb. 15 und 16, bei denen die Aminosäuren gewählt wurden, die große Abweichungen zeigen, ist, bis auf eine etwas höhere Ausgangskonzentration bei der FePIH-Kultur, kaum ein Unterschied zu erkennen. Die Leucin-Konzentration ist als Beispiel für den Vergleich der restlichen Aminosäuren aufgeführt. Wegen der sehr guten Übereinstimmung dieser Konzentrationswerte wird auf eine Aufführung der Daten verzichtet. Aus dem Vergleich der Aminosäuredaten wird ersichtlich, daß der Zellmetabolismus sich nur unwesentlich verändert hat. Lediglich drei von zwanzig Aminosäuren erfahren leichte Änderungen im Verbrauch.



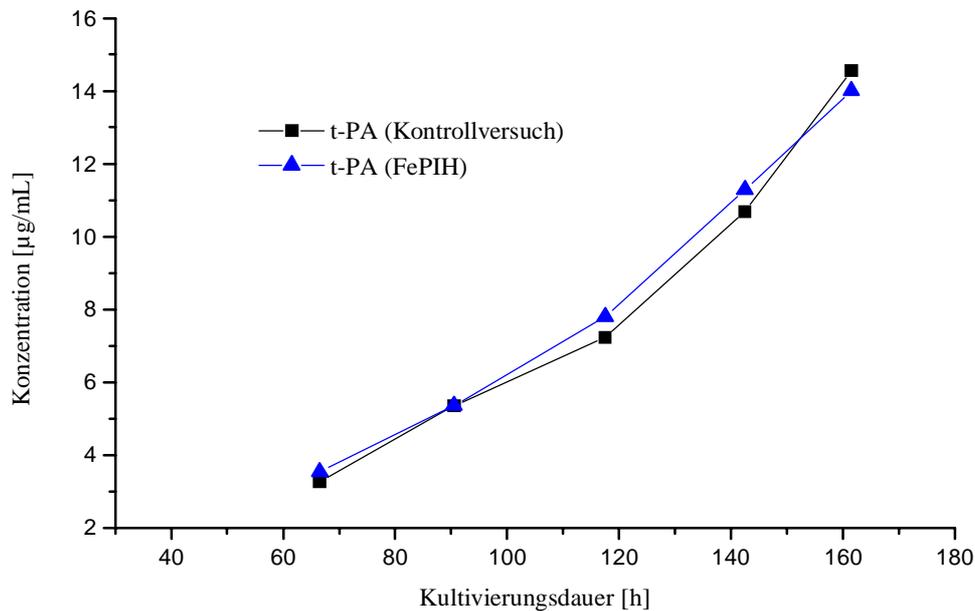
**Abb. 15** Vergleich der Konzentrationen von Lysin (Lys) und Leucin (Leu) im transferrin-haltigen und transferrinfreien Medium während einer Kultivierung.



**Abb. 16** Vergleich der Konzentrationen von Asparaginsäure (Asp), Asparagin (Asn) und Serin (Ser) im transferrin-haltigen und transferrinfreien Medium während einer Kultivierung.

#### 4.1.1.5 Die Produktivität und Produktqualität mit dem FePIH-Medium

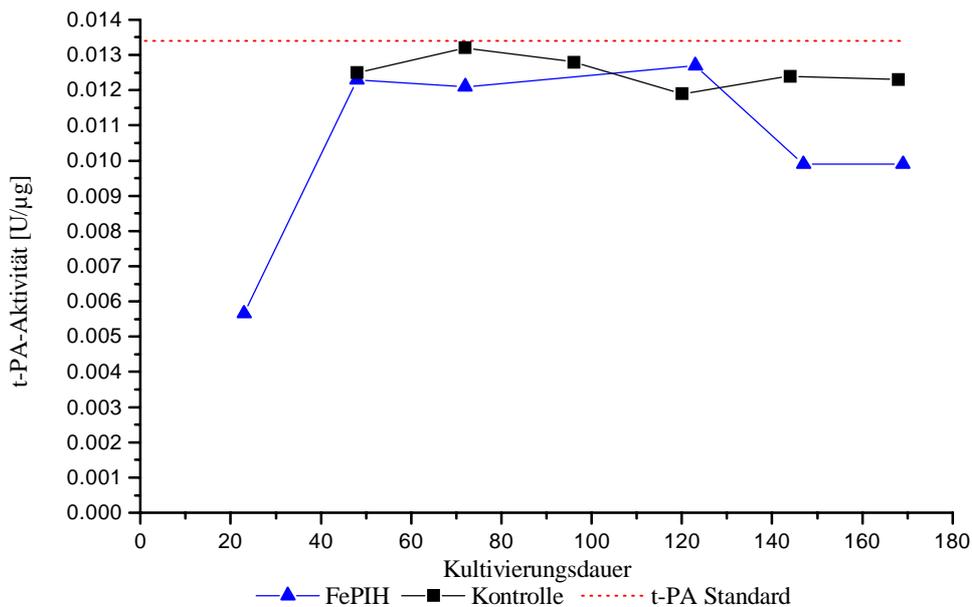
Die Vermutung liegt nahe, daß sich auch am weiteren Zellverhalten nichts geändert hat, doch zur Sicherheit wird die in Abb. 17 dargestellte Produktkonzentration bestimmt. Damit soll ausgeschlossen werden, daß sich FePIH negativ auf die Expression des rekombinanten Proteins auswirkt.



**Abb. 17** Vergleich der Produktkonzentration einer Kultur mit FePIH als Transferrinersatz und der Kontrollkultur.

Beim Betrachten der Abb. 17 fällt auf, daß der Verlauf der t-PA-Konzentration fast deckungsgleich ist. Unter Berücksichtigung des leicht verbesserten Wachstums der FePIH-Kultur wird ersichtlich, daß sich die Produktivität, im Vergleich zur Kontrolle, etwas verschlechtert hat. Die Produktbildungsraten für die Kontrolle liegen im Bereich von  $4,992 \mu\text{g t-PA}/10^6\text{d}$  bis  $7,052 \mu\text{g t-PA}/10^6\text{d}$ , während sie in der FePIH-Kultur zwischen  $4,131 \mu\text{g t-PA}/10^6\text{d}$  und  $5,688 \mu\text{g t-PA}/10^6\text{d}$  liegen. Da die Produktmenge pro Zeiteinheit aber durch das leicht verbesserte Wachstum gleich bleibt, kann die verminderte Produktivität in Kauf genommen werden. Dem Einsatz von FePIH als Transferrinersatzstoff steht demnach nichts entgegen.

Da die Zellen sehr empfindliche Systeme sind, die auf kleine Änderungen in ihrem Umfeld stark reagieren können und das produzierte Protein sehr genau produziert werden muß, um pharmakologisch wirksam zu sein, muß überprüft werden, ob sich die Produktqualität verschlechtert hat. Zu diesem Zweck wird ein Aktivitätstest durchgeführt, dessen Resultate in Abb. 18 zu sehen sind.



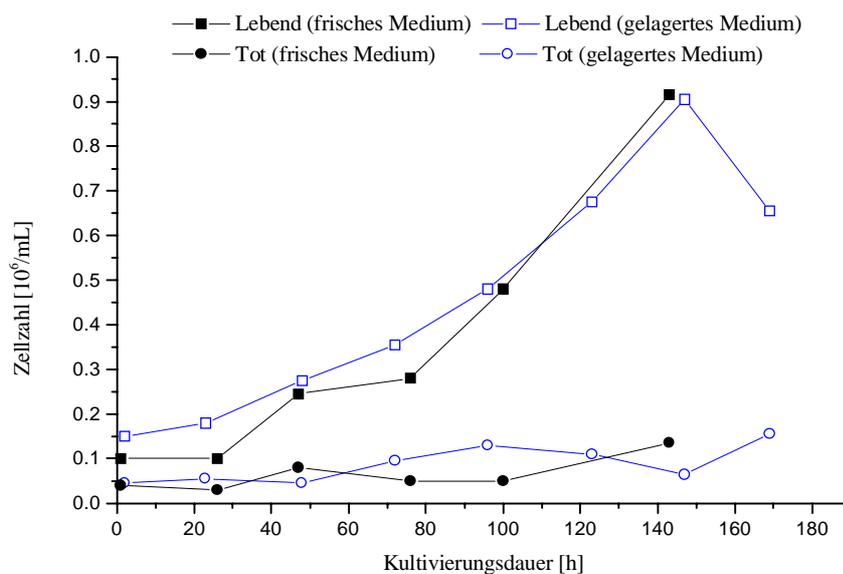
**Abb. 18** Vergleich der Produktqualität (Aktivität) von t-PA aus der FePIH-Kultur mit der Kontrolle und der eines Standards.

Die t-PA-Aktivität ist am ersten Kultivierungstag sehr viel schlechter, als bei dem Standard t-PA. Der Grund hierfür kann in der sehr geringen t-PA-Konzentration von 0,55 µg/mL liegen, die nahe dem Grenzbereich für die Anwendbarkeit des Aktivitätstests liegt (Firmenschrift Boehringer Mannheim). Wie man weiter in der Abbildung sehen kann, ist die Produktqualität bei dem Einsatz von FePIH kaum schlechter als die des Standards (klinisch eingesetztes t-PA (Thomae)). Lediglich am Ende der Kultivierung kann ein Abfall der Aktivität verzeichnet werden, was auf einen Produktabbau durch Proteasen schließen läßt. Die t-PA-Aktivität im Kontrollexperiment ist ähnlich der des im FePIH-Medium gewonnenen t-PA, nur daß die Produktaktivität zum Ende der Kultivierung langsamer abnimmt. Für die Betrachtung, ob die CHO-Zellen durch die FePIH-Behandlung ihrer Fähigkeit pharmazeutisch wirksames t-PA zu produzieren verloren haben, sind die Anfangs- und Endwerte nicht von Bedeutung. Wichtig ist hier nur, daß rund 80 Stunden lang wirksames t-PA vorhanden ist. Aus Sicht

der Produktivität und der Produktqualität steht dem Einsatz von FePIH folglich nichts im Wege.

#### 4.1.1.6 Stabilität des FePIH im Medium

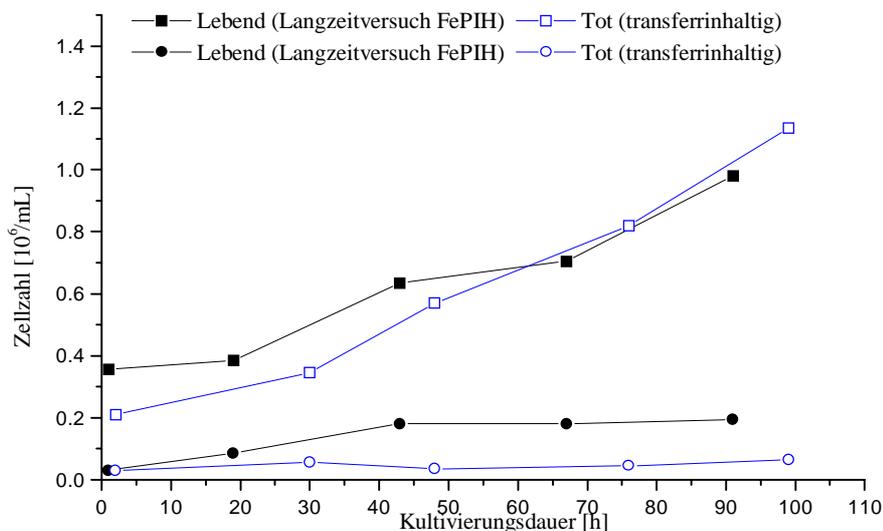
Für den Einsatz in einem kommerziellen Medium ist neben der Wirksamkeit eines Proteinersatzstoffes auch noch die Stabilität (Lagerfähigkeit) der Substanz im Medium von Bedeutung. Zur Überprüfung der Langzeitstabilität wurde ein FePIH-haltiges Medium 15 Monate bei + 4°C unter Lichtausschluß aufbewahrt. Eine Vergleichskultivierung brachte sehr gute Übereinstimmungen in den Kurvenverläufen (Abb. 19). Die Kultur mit dem frisch hergestellten Medium wird infolge einer Infektion vorzeitig abgebrochen, das Experiment wegen der guten Korrelation der Kurvenverläufe nicht wiederholt. Die genaue Betrachtung der Abb. 19 zeigt zwar, daß die Kultur in frisch hergestelltem Medium eine etwas geringere Animpfdichte und ein etwas schnelleres exponentielles Wachstum besitzt, nur sollte in Betracht gezogen werden, daß es sich hier um biologische Systeme handelt, die immer eine gewisse Streubreite in ihrem Verhalten vorweisen. Die Unterschiede können folglich als für den Batchmodus nicht relevant angesehen und damit vernachlässigt werden. Beide Kulturen erreichten nach 143 Stunden eine Zelldichte von ca.  $0,9 \cdot 10^6$  Zellen/mL was durchaus normal ist.



**Abb. 19** Vergleich der Lebendzellzahlen von Kulturen in frisch hergestelltem FePIH-Medium und in 15 Monate gelagertem FePIH-Medium.

#### 4.1.1.7 Langzeitanwendung von FePIH-Medium

Als letzten Parameter für die Anwendbarkeit von FePIH muss untersucht werden, ob die permanente Anwendung des Transferrinersatzstoffes die Zellen mehr als gewöhnlich mutieren läßt. Zu diesem Zweck wird nach den ersten erfolgreichen Versuchen eine Stammkultur in FePIH-Medium gehalten. Diese Kultur wird nach 18 Monaten mit einer Kultur verglichen, die lediglich mit transferrinhaltigem Medium in Kontakt gekommen war (Abb. 20). Der Vergleich der Kurven zeigt deutlich, daß die Zellen sich durch die 18 monatige Behandlung mit FePIH-haltigem Medium nicht verändert haben. Die Unterschiede in den Wachstumskurven sind durch die unterschiedlichen Stammkulturen, die keine identische Vorgeschichte haben, zu erklären. Die Abweichungen bewegen sich aber in einem Bereich, der für biologische Systeme normal ist.

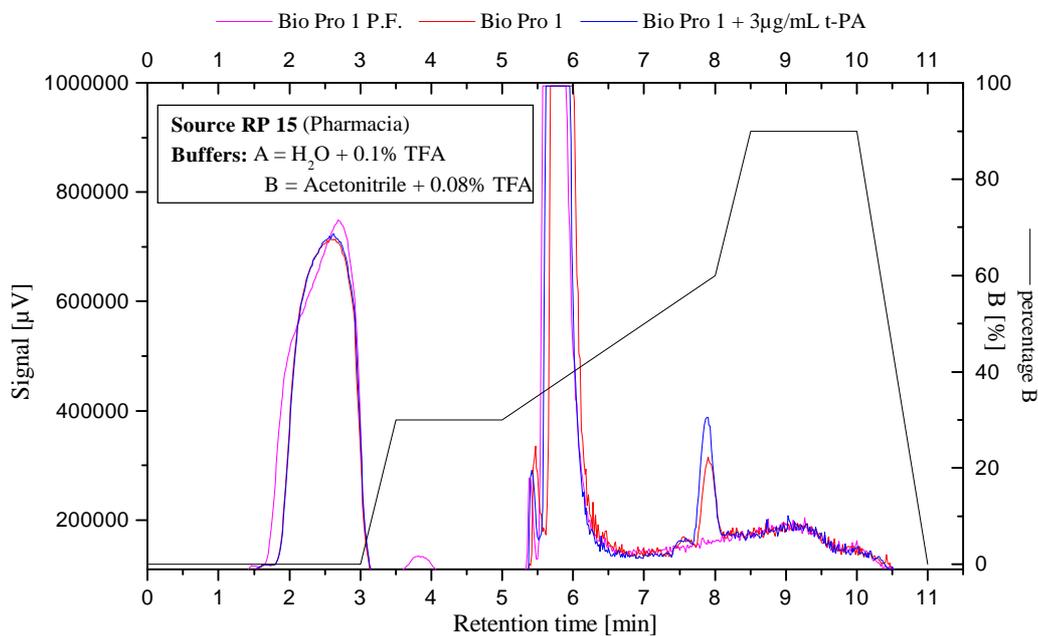


**Abb. 20** Vergleich der Zellzahlen einer Kultur die über 18 Monate mit FePIH behandelt worden ist und der Kontrolle (nur transferrinhaltiges Medium).

Im großen und ganzen haben die Ergebnisse bis jetzt gezeigt, daß FePIH ein zuverlässiger Transferrinersatzstoff ist, der ohne Schwierigkeiten im Kulturmedium eingesetzt werden kann. Hervorzuheben ist außerdem, daß es bei der Umstellung von Transferrin auf FePIH keiner Adaption der Zellen bedarf. Alle weiteren Experimente dieser Arbeit werden mit transferrinfreiem Medium durchgeführt.

#### 4.1.1.8 Transferrin und Produkt-HPLC

Einen zusätzlichen Vorteil brachte der Einsatz des transferrinfreien Mediums bei der Konzentrationsbestimmung von t-PA mittels reversed phase HPLC. Renemann (2000) hatte während der Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung der t-PA-Konzentration das Problem, daß Transferrin annähernd die gleiche Retentionszeit besitzt wie das Zielprotein (Abb. 21).



**Abb. 21** t-PA-Analytik mittels reversed phase HPLC in transferrinfreiem und –haltigem Medium (mit freundlicher Genehmigung von G. Renemann (2000)).

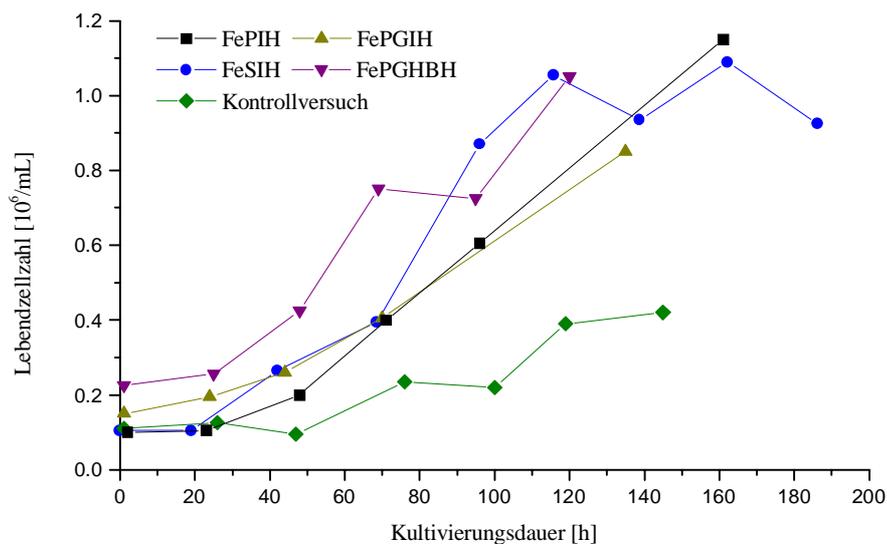
Das Chromatogramm (Abb. 21) zeigt, daß mit der gewählten Methode nach ca. 8 min. ein Peak zu verzeichnen ist, wenn a) Bio Pro 1 (rot) und b) Bio Pro 1 mit 3 µg/mL t-PA angereichert (blau) verwendet wurde. Wird Bio Pro 1 P.F. (rosa) analysiert, das so angereichert wurde, daß es bis auf den Transferringehalt die gleiche Zusammensetzung besitzt wie das Bio Pro 1, so wird bei einer Retentionszeit von 8 min. kein Elutionspeak erhalten. Es ist folglich eindeutig, daß es sich bei dem Peak, um das Transferrinsignal handelt. Vergleicht man den blauen mit dem roten Peak so fällt auf, daß der blaue größer ist und somit einer höheren Konzentration zugeordnet werden kann. Da sich in der roten Probe exakt die gleiche Menge an Transferrin befindet und bei der blauen nur

t-PA zugefügt wurde, wird deutlich, daß t-PA und Transferrin sich bei der Analyse stören. Eine vernünftige Auswertung ist hier nicht möglich, besonders unter Berücksichtigung der geringen t-PA-Konzentrationen im Medium, die sich oftmals im Bereich von 1- 6  $\mu\text{g/mL}$  bewegt. Durch den Einsatz von transferrinfreiem Medium kann dieses Problem gelöst und ein wichtiger Fortschritt in der Methodenentwicklung erzielt werden.

#### 4.1.2 Weitere Transferrinersatzstoffe

In einer dieser Arbeit angegliederten Diplomarbeit (Krabsch 1999) sind vier weitere Komponenten synthetisiert und drei davon eingesetzt worden. Es handelt sich hierbei um:

- Eisen-Pyridoxal-4-Hydroxybenzhydrazid (FePHBH)
- Eisen-Salicylaldehyd-Isonicotinoyl-Hydrazid (FeSIH)
- Eisen-Phloroglucincarbaldehyd-Isonicotinoyl-Hydrazid (FePGIH)
- Eisen-Phloroglucincarbaldehyd-4-Hydroxybenzhydrazid (FePGHBH)



**Abb. 22** Vergleich der Wachstumskurven von Kulturen mit verschiedenen Transferrinersatzstoffen. (Daten aus Diplomarbeit Krabsch 1999).

In Abb. 22 wird deutlich, daß diese Substanzen für das Zellwachstum ebenso einsetzbar sind, wie das FePIH. Bei dem Kontrollversuch handelt es sich um eine Kultur, bei der kein Transferrin und kein Ersatzstoff dem Medium zugefügt wurde. Man sieht deutlich, daß diese Kultur sehr viel schlechter wächst als die Kulturen mit den Transferrinersatzstoffen. Das scheinbar bessere Wachstum der FePGHBH-Kultur ist auf die höhere Animpfdichte zurückzuführen. Lediglich FeSIH hat, wie in Tab. 2 ersichtlich eine höhere Wachstumsrate in der exponentiellen Phase.

**Tab.2 Wachstumsraten der Kulturen mit verschiedenen Transferrinersatzstoffen (Rohdaten aus Krabsch 1999).**

	Kontrolle	FePIH	FeSIH	FePIGH	FePGHBH
Wachstumsrate					
$\mu$ [ $10^6$ /mL·d]	0,250	0,372	0,454	0,312	0,358
Produkt-					
bildungsrate	-	2,99	3,56	1,04	2,43
$\mu_{t-PA}$ [mg / $10^6$ ·d]					

Anhand obiger Ergebnisse scheint das FeSIH am besten als Transferrinersatzstoff geeignet zu sein, da neben der höchsten Wachstumsrate von  $\mu = 0,454 \cdot 10^6 / \text{mL} \cdot \text{d}$  auch die Produktbildungsrate der Zellen gegenüber der FePIH-Kultur zugenommen hat (von  $\mu_{t-PA} = 2,99 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  auf  $\mu_{t-PA} = 3,56 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$ ). Bisher wurde die Verwendung von FeSIH lediglich über einen Zeitraum von 21 Tagen getestet, es zeigte sich aber, daß keine Verschlechterungen im Zellverhalten zu beobachten waren (Krabsch 1999). Weitere Untersuchungen über das Langzeitverhalten und die Stabilität im Medium sind sinnvoll und sollten weiter verfolgt werden. Ein Nachteil von FeSIH liegt in der schwierigeren Synthese. Bei der Kristallisation des Salicylaldehyd-Isonicotinoyl-Hydrazids (SIH) entstehen äußerst kleine Nadeln, die einen so dichten Filterkuchen bilden, daß selbst mit Vakuumunterstützung kaum noch Filtrat durchtreten kann. Wegen der größeren Erfahrungen mit dem FePIH ist es vertretbar, auf einen Wechsel des Transferrinersatzstoffes zu verzichten.

## 4.2 Insulinersatzstoff

Wie schon in Kap. 2.3 erwähnt, hat Insulin eine Vielzahl möglicher Auswirkungen auf die Zelle. Im Gegensatz zum Organismus ist in der Zellkultur die glukoseregulierende Wirkung des Insulins unbedeutend, vielmehr sind hier intrazellulären Effekte wichtig, die sich auf die Proliferation der Zelle auswirken. Da die genaue Wirkungsweise des Insulins auf die Stoffwechselfvorgänge in der Zelle bis heute noch nicht ausreichend geklärt sind, gestaltet sich die Suche nach einem Insulinersatzstoff schwierig. Die Stimulation des Insulinrezeptors scheidet wegen der Spezifität der Wechselwirkung von Protein und Proteinrezeptor weitgehend aus. Die Suche nach einem Ersatzstoff muß sich vielmehr auf die intrazellulären Wirkungen des Insulins konzentrieren. Wichtigster Ansatzpunkt dieser Arbeit war der insulininduzierte intrazelluläre Anstieg der Myristol-diacylglycerol- (DAG) Konzentration (Cherqui 1990). Der Hauptgedanke ist, wenn durch die Insulin-Insulinrezeptor-Bindung die DAG-Produktion in der Zelle angeregt wird und der vermehrte intrazelluläre DAG-Gehalt die Ursache für alle weiteren Zellreaktionen ist, dann müßte durch die Aufnahme von DAG durch die Zelle der gleiche Effekt erzielt werden können.

Erste Experimente werden mit 1,2-dimyristol-glycerol (Sigma) durchgeführt, doch gibt es bei dieser Substanz Probleme mit der Löslichkeit. Alle probierten Verfahren die Substanz in ausreichenden Mengen in Lösung zu bringen haben zur Folge, daß die Zellen nach spätestens 24 Stunden nur noch eine Vitalität von max. 20 % aufzeigen. Die Nutzbarmachung dieser Substanz wird nach einigen Experimenten nicht mehr weiterverfolgt. Statt dessen kam 4 $\beta$ -Phorbol 12 $\beta$ -myristate 13 $\alpha$ -acetate (PMA (Sigma)) zum Einsatz.

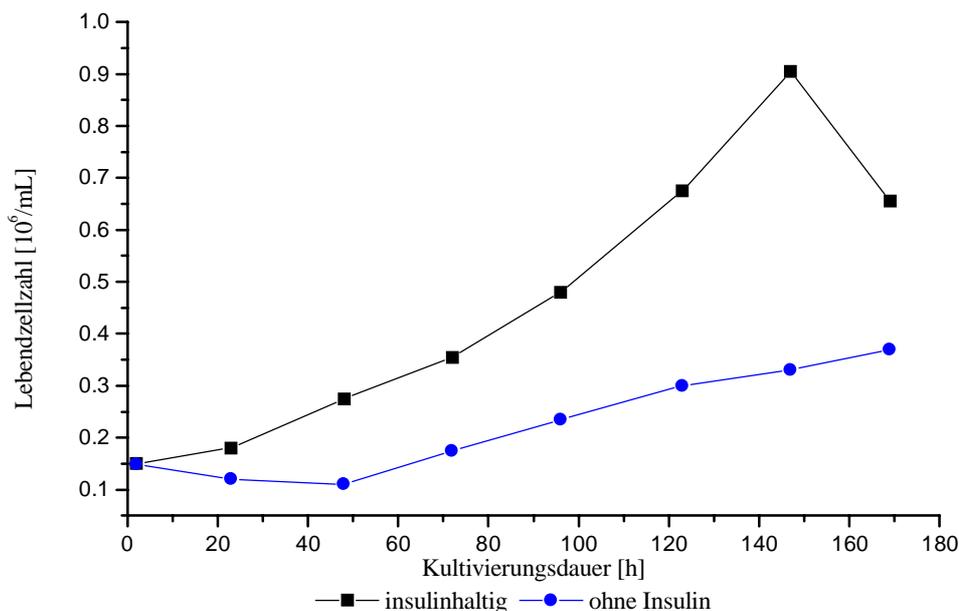
### 4.2.1.1 Untersuchung der Auswirkung von 4 $\beta$ -Phorbol-12 $\beta$ -myristate-13 $\alpha$ -acetate (PMA) als Insulinersatzstoff auf die Zellkultur

Nachdem Transferrin erfolgreich aus dem Basalmedium eliminiert wurde, kann mit dem Ersetzen des Insulins begonnen werden. PMA, das als Protein-Kinase-C-Aktivator

bekannt ist, kann als sehr toxisch eingestuft werden, ist aber, wie Experimente gezeigt haben, bei Konzentrationen zwischen 16 nM und 32 nM anwendbar. In der Literatur wird der Einsatz von PMA an verschiedenen Stellen beschrieben. Die Kultivierungsdauer liegt aber oft nur im Bereich von Minuten bis Stunden (Flesch 1986, Todd 1986, Cherqui 1990, Balteskard 1998).

#### 4.2.1.2 Notwendigkeit von Insulin

Als erstes wurde getestet, wie sich die Abwesenheit von Insulin im Kulturmedium auf das Zellwachstum auswirkt. In Abb. 24 sind die Wachstumskurven einer insulinfreien und einer insulinhaltigen Zellkultur aufgeführt.



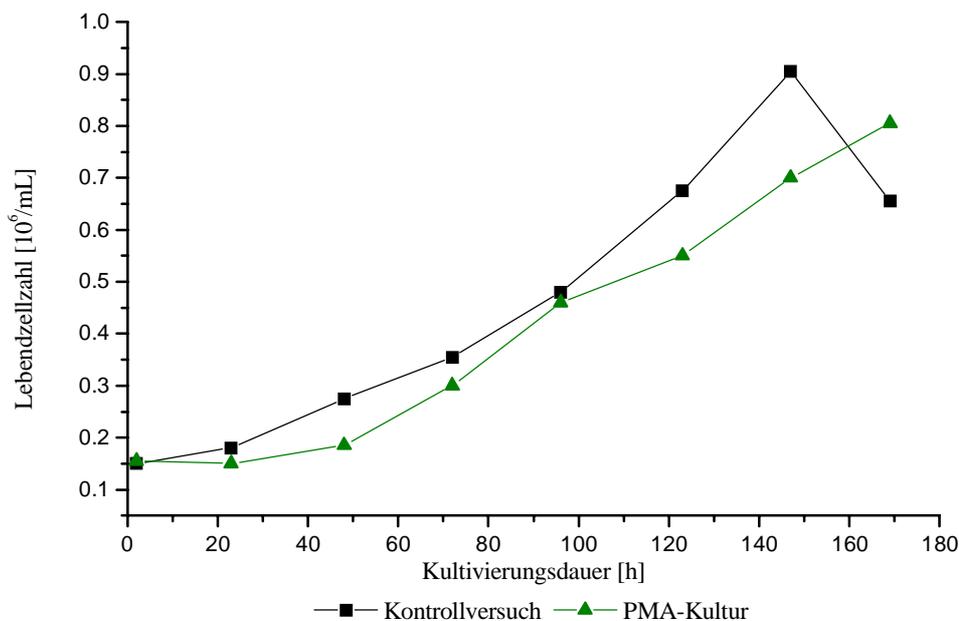
**Abb. 24** Vergleich der Wachstumskurve einer insulinfreien mit einer insulinhaltigen CHO-Kultur.

Es ist deutlich zu sehen, daß die Zellkultur ohne Insulin ein langsames Wachstum aufweist als die insulinhaltige. Die maximale Zelldichte liegt in der insulinhaltigen Kultur mit  $0,905 \cdot 10^6$  Zellen/mL um 245 % über der insulinfreien ( $0,37 \cdot 10^6$  Zellen/mL). Ein Kultivieren der CHO-Zellen ohne Insulin ist zwar möglich, aber dadurch wird das Zellwachstum dermaßen verlangsamt, daß es nicht sinnvoll ist, eine Zelllinie zur

Produktion rekombinanter Proteine, die mit der Zelldichte die Produktausbeute steigert, insulinfrei zu kultivieren. Der Einsatz eines Insulinersatzstoffes ist demnach für ein gutes Zellwachstum notwendig.

#### 4.2.1.3 PMA als Insulinersatzstoff

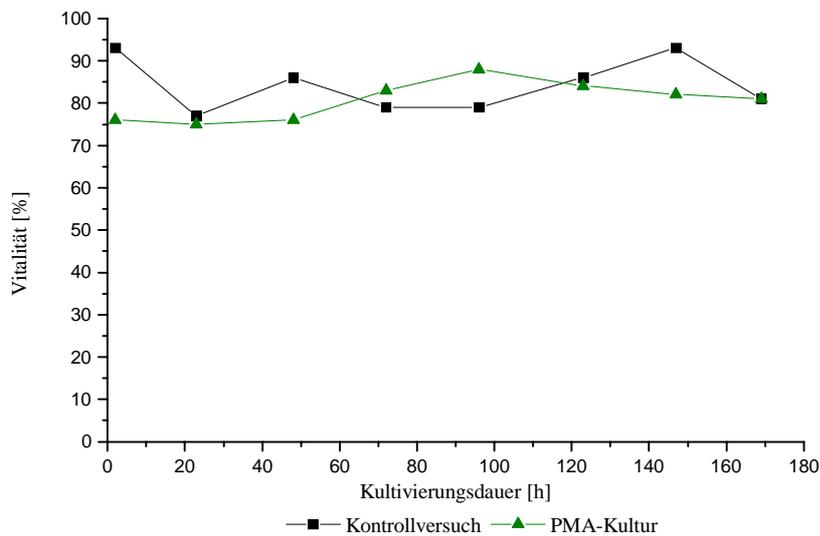
Daraufhin wird getestet, ob eine CHO-Kultur das toxische PMA über die Dauer einer typischen Batch-Kultivierung (ca. 7 Tage) toleriert. Das insulinfreie Basalmedium wird auf 16 nM PMA eingestellt und mit einer insulinhaltigen, aber PMA-freien Kultur verglichen (Abb. 25).



**Abb. 25** Vergleich der Wachstumskurven einer insulinhaltigen mit einer PMA-haltigen (16nM) CHO-Kultur.

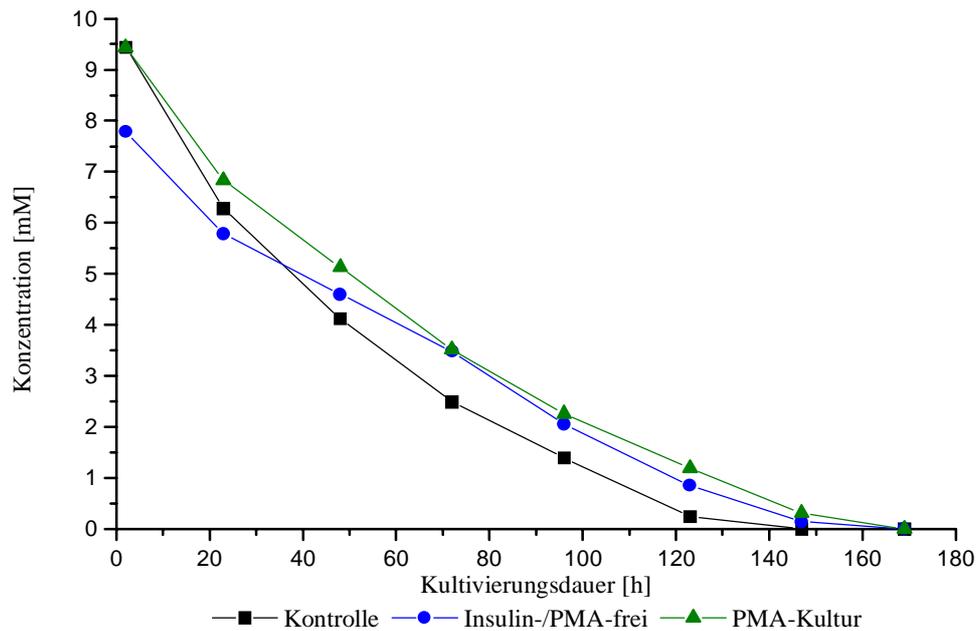
Es ist deutlich zu erkennen, daß die PMA-Kultur ein ähnliches Wachstumsverhalten hat wie die insulinhaltige Kultur. Die Kontrollkultur erreicht nach 147 Stunden eine Zelldichte von  $0,905 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Im Vergleich dazu erreicht die PMA-Kultur erst nach 169 Stunden eine Zelldichte von  $0,805 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Der Unterschied ist jedoch gering genug, um von einem annähernd gleichen Wachstum sprechen zu können. Die anfängliche Lag-Phase ist bei der PMA-Kultur etwas stärker ausgeprägt und führt somit

auch zu den etwas niedrigeren Zelldichten. Beim Vergleich der Wachstumsraten wird aber deutlich, daß die Unterschiede kaum zum Tragen kommen. So hat die Insulinkultur in der exponentiellen Phase eine Wachstumsrate von  $\mu = 0,312 \text{ d}^{-1}$ , während die PMA-Kultur einen Wert von  $\mu = 0,288 \text{ d}^{-1}$  vorweist. Das PMA ist also in der Lage eine insulinfreie Zellkultur so zu stimulieren, als wäre Insulin vorhanden. Auch spielt bei einer Konzentration von 16 nM PMA die Toxizität dieser Substanz keine Rolle. Wie man in Abb. 26 sehen kann, ist es möglich die Zellen über den Zeitraum eines Batch Experiments ohne Vitalitätsverlust in PMA-haltigem Medium zu kultivieren. Die Vitalitäten schwanken in beiden Kulturen um 85% und sind somit im normalen Bereich. Es ist in keiner der beiden Kulturen eine starke Vitalitätsabnahme zum Kultivierungsende hin zu sehen. Die Verwendung einer 16 nM PMA-Lösung ist unter diesem Gesichtspunkt unbedenklich.



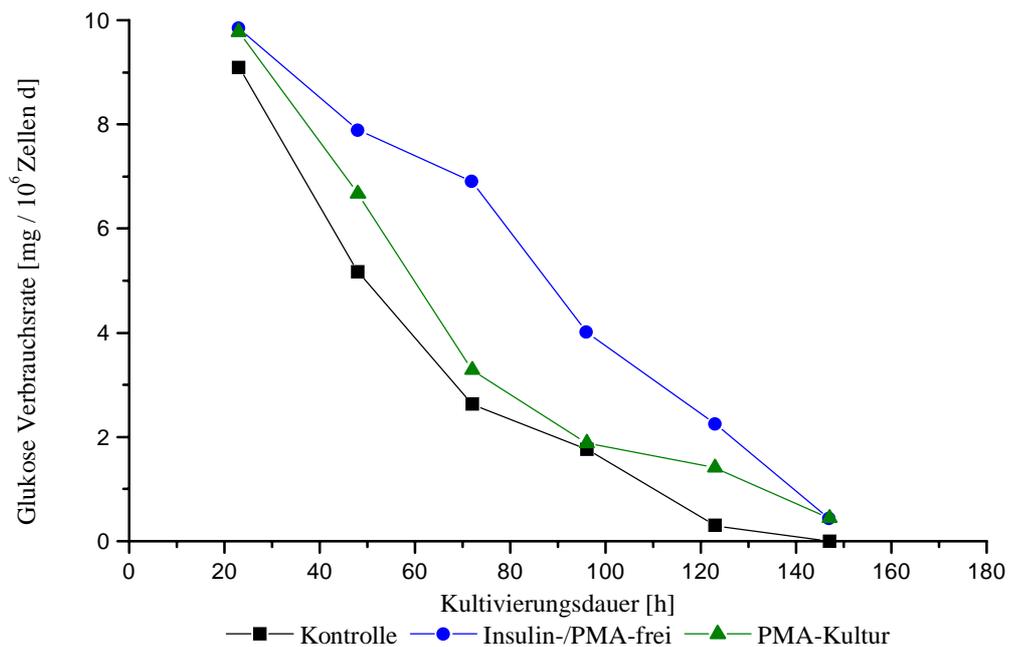
**Abb. 26** Vergleich der Vitalitäten einer PMA-Kultur (16 nM) mit einer insulinhaltigen CHO-Kultur.

Beim Betrachten der Abb. 27 fällt auf, daß alle Kulturen nach einer Glukoseanfängskonzentration von 9,5 mM (7,9 mM im PMA- / insulinfreien Fall) eine ähnliche Konzentrationsabnahme im Kulturmedium zeigen. Für die Insulin- und PMA-Kultur ist dieses nicht verwunderlich, da diese Kulturen auch ähnlich wachsen. Interessant ist hier aber, daß die Kultur ohne Insulin und ohne PMA nahezu den selben Abfall in der Glukosekonzentration aufweist, obwohl dort geringere Zelldichten vorliegen. Pro Zelle wird folglich mehr Glukose aufgenommen und verstoffwechselt.



**Abb. 27** Vergleich der Glukosekonzentrationen einer PMA-Kultur (16 nM), einer insulinhaltigen (Kontrolle) und einer PMA- und insulinfreien CHO-Kultur.

Dieses kann man deutlich an den Verbrauchsrate, die in Abb. 28 dargestellt sind. Die Verbrauchsrate nehmen im Verlauf der Kultivierung mit der Glukosekonzentration ab. Am Anfang liegt die Verbrauchsrate in allen Kulturen bei ca.  $q_{\text{Glukose}} = 10 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d}$ , nimmt dann aber bis zur 72. Kultivierungsstunde sehr schnell auf  $q_{\text{Glukose}} = 2,6 - 3,2 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d}$  ab. Anschließend verlangsamt sich die Abnahme der Glukose-Verbrauchsrate bis zur Erschöpfung der Glukosekonzentration. Nur bei der PMA- und insulinfreien Kultur ist der Abfall der Verbrauchsrate schwächer ausgeprägt und scheint vom Beginn bis zum Schluß annähernd linear zu sein. Erstaunlich ist, daß ohne Insulin der Glukoseverbrauch und damit auch die Glukoseaufnahme höher ist, als in der insulinhaltigen Kultur. Im Normalfall bindet Insulin erst an den Insulinrezeptor und bewirkt damit die Bildung von Glukosetransporterproteinen in der Zellmembran, die dann den Glukosetransport in die Zelle verstärken. Dieses zeigt, daß die basale, nicht rezeptorgesteuerte Glukoseaufnahme ausreicht, um die Zellen mit Glukose zu versorgen. Insulin ist folglich in den Kulturen nicht notwendig, um die Glukoseaufnahme zu erhöhen, sondern dient lediglich als Wachstumsfaktor.

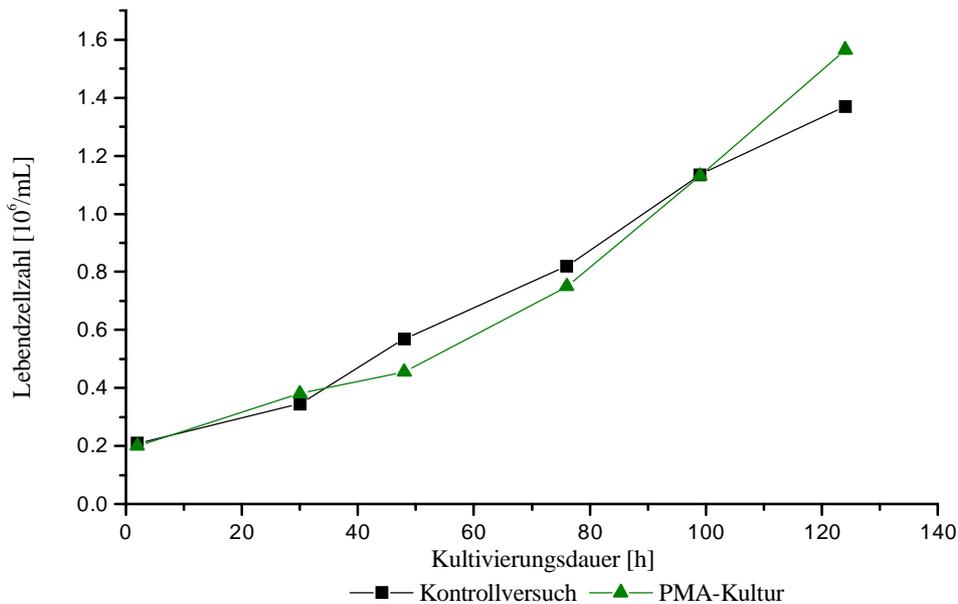


**Abb. 28** Vergleich der Glukose-Verbrauchsrate von einer PMA-Kultur (16 nM), einer insulinhaltigen (Kontrolle) und einer PMA- und insulinfreien CHO-Kultur.

Die verstärkte Glukoseaufnahme bei der insulinfreien Kultur kann auf vermehrten Streß durch das Fehlen eines Wachstumsfaktors zurückgeführt werden. Es kommt nun die Frage auf, warum in der Kultur, bei der Insulinrezeptoren stimuliert werden, der Glukoseverbrauch schneller abnimmt, als ohne Insulin. Ein Vergleich der Glukosekonzentrationen mit den Verbrauchsrate zeigt keinen Zusammenhang auf. Es kann also nicht sein, daß die durch das Insulin schneller wachsenden Zellen anfangs schneller die Glukose verbrauchen und dann, wenn die Glukosekonzentration abnimmt, in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration weniger Glukose aufnehmen. Vielmehr sieht es so aus, als sei eine Beziehung zwischen der Zelldichte und dem Glukoseverbrauch vorhanden (Kap. 4.2.2).

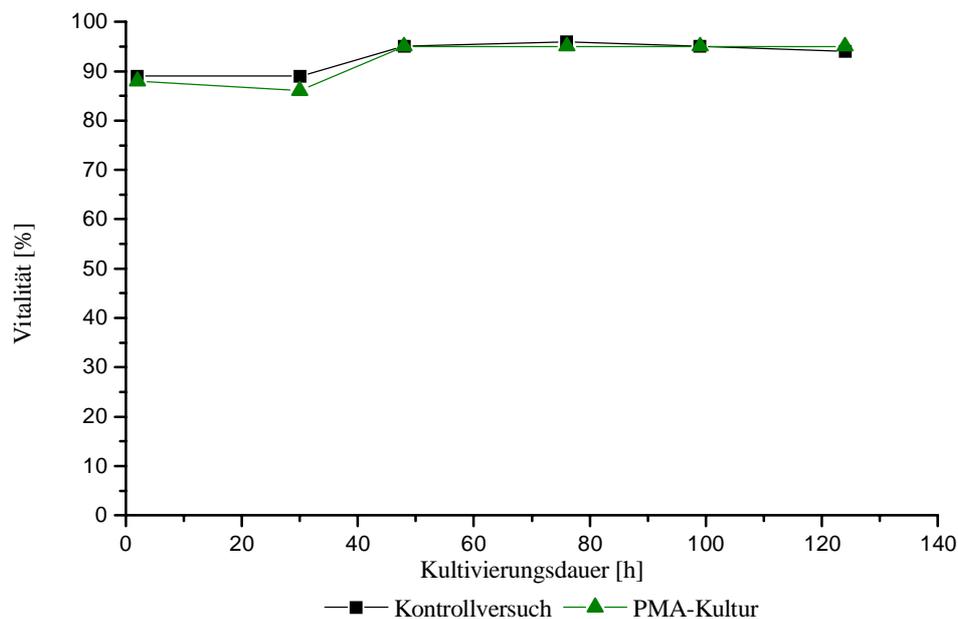
#### 4.2.1.4 Erhöhte PMA-Konzentration (24 nM)

Da die verwendete Konzentration an PMA den Zellen nicht schadet, wird ein weiteres Wachstumsexperiment mit einer erhöhten PMA-Konzentration (24 nM) durchgeführt.



**Abb. 29** Vergleich der Wachstumskurven einer insulinhaltigen mit einer PMA-haltigen (24 nM) CHO-Kultur.

Im Vergleich zu den Kulturen in Abb. 25 sind die Zellen, die bei den in Abb. 29 gezeigten Kulturen verwendet wurden, aus einer Vorkultur mit höherer Anfangsvitalität. Dieses hat ein besseres Wachstumsverhalten zur Folge, was deutlich in der Wachstumsrate der Kontrollexperimente abgelesen werden kann. Die Wachstumsrate des Experiments in Abb. 25 von  $\mu = 0,312 \cdot d^{-1}$  wird im Experiment in Abb. 29 mit  $\mu = 0,369 \cdot d^{-1}$  übertroffen. Bei einem Vergleich mit der Wachstumsrate der Zellen des 24 nM PMA enthaltenden Mediums stellt sich heraus, daß diese Kultur mit  $\mu = 0,405 \cdot d^{-1}$  eine noch bessere Wachstumsrate besitzt. Die maximale Zellzahl liegt hier bei  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen/mL und bei  $1,4 \cdot 10^6$  Zellen/mL im Kontrollfall. Es zeigt sich, daß eine etwas höhere Konzentration von 24 nM PMA bessere Wachstumsergebnisse erzielt als die Kultur mit 16 nM PMA ( $\mu = 0,288 \cdot d^{-1}$ ). Der Vergleich der Vitalitäten in Abb. 30 zeigt, daß auch die erhöhte Konzentration keinen Einfluß auf die Vitalität hat.



**Abb. 30** Vergleich der Vitalitäten einer PMA-Kultur (24 nM) mit einer insulinhaltigen CHO-Kultur.

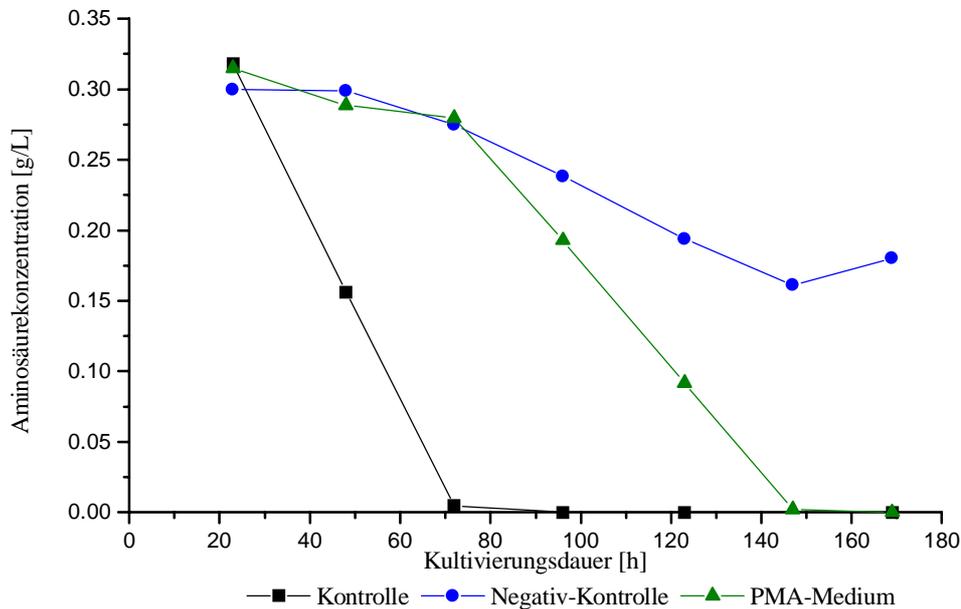
Es ist ersichtlich, daß sich die Zellvitalität über den gesamten Kultivierungszeitraum annähernd konstant bei 95 % hält. Die Berücksichtigung dieser Ergebnisse läßt den Schluß zu, daß PMA durchaus ein potenter Insulinersatzstoff ist.

#### 4.2.1.5 Aminosäurekonzentrationen

Der Vergleich der Glukose-Verbrauchsraten in Abb. 28 zeigt, daß zwischen der PMA-Kultur und der insulinhaltigen Kultur in Bezug auf den Stoffwechsel, in den die Glukose involviert ist, keine gravierenden Unterschiede bestehen. Einen weiteren Einblick in die Stoffwechselsituation der Zellen bieten die Aminosäuren. Deshalb sollen im Folgenden die Konzentrationen der im Medium enthaltenen Aminosäuren betrachtet werden.

Bei den betrachteten Kulturen wird das meist bei Tierzellkulturen verwendete Glutamin durch Glutamat ersetzt, das die Hauptstickstoffquelle der Zellen darstellt. Aus diesem Grund ist der Verbrauch an Glutamat sehr hoch. Werden die Glutamatkonzentrationen

der verschiedenen Kulturen verglichen, so können gewisse Unterschiede im Glutamatverbrauch beobachtet werden.



**Abb. 31** Vergleich der Glutamatkonzentrationen einer insulinhaltigen- (Kontrolle), insulin-/PMA-freien-(Negativ-Kontrolle) und einer PMA-haltigen Kultur (PMA-Medium).

Die Kontrollkultur verhält sich wie erwartet. Die Konzentration an Glutamat nimmt von Anfang an schnell ab, bis das Glutamat nach 72 Kultivierungsstunden erschöpft ist. Die Negativ-Kontrolle wächst sehr langsam. Ihr Zustand kann fast als statisch betrachtet werden und deshalb ist auch der Verbrauch an Glutamat entsprechend gering. Interessant ist, daß die Glutamatkonzentration zum Ende der Kultivierung noch einmal von 0,16 g/L auf 0,18 g/L ansteigt. Diese Beobachtung ist bei mehreren Aminosäuren zu machen und könnte mit einem Kollaps des Zitratzyklus zusammenhängen. Eine Blockade des Zyklus in einem Reaktionsschritt oder eine Überlastung könnte zu Ausweichreaktionen führen, bei denen die in den Zyklus eingeschleusten Substrate nach einer Teilumwandlung an den entsprechenden Stellen wieder aus dem Kreislauf ausgeschleust und schließlich ins Medium abgegeben werden.

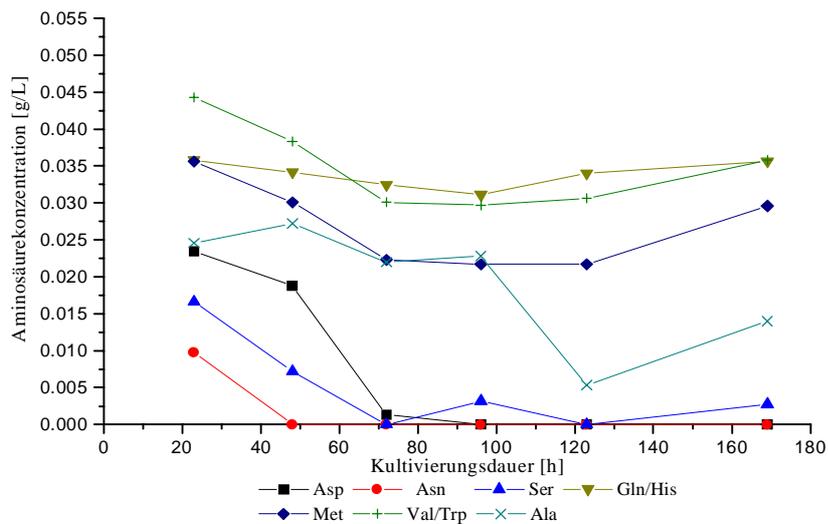
Auffällig ist außerdem, daß bei der PMA-Kultur trotz gleichen Zellwachstums (Abb. 29) zu Anfang die Glutamatkonzentration fast genauso wenig abnimmt, wie bei der Negativ-Kontrolle. Nach der 72. Kultivierungsstunde ändert sich dieses Verhalten abrupt und die Konzentrationsabnahme gleicht der der insulinhaltigen Kultur. Die anfänglich verminderte Abnahme mag mit der Umstellung auf das insulinfreie Medium

zusammenhängen und kann als kurze Adaptionsphase gewertet werden. Daß die Wachstumskurven weniger unterschiedlich sind, hängt mit der geringen Anfangszelldichte zusammen, bei der sich eine kurze Verzögerung nicht so stark bemerkbar macht. Kleine Änderungen des Stoffwechsels werden aber auch hier schon sichtbar, wenn man die Verbrauchsdaten vergleicht. In der insulinhaltigen Kontrollkultur ist der Wert für die Glutamat - Verbrauchsrate bei  $q_{\text{glu}} = 0,58 \text{ g}/10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d}$ , während sie bei der PMA-Kultur lediglich ein Drittel dieses Wertes beträgt ( $q_{\text{glu}} = 0,18 \text{ g}/10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{d}$ ).

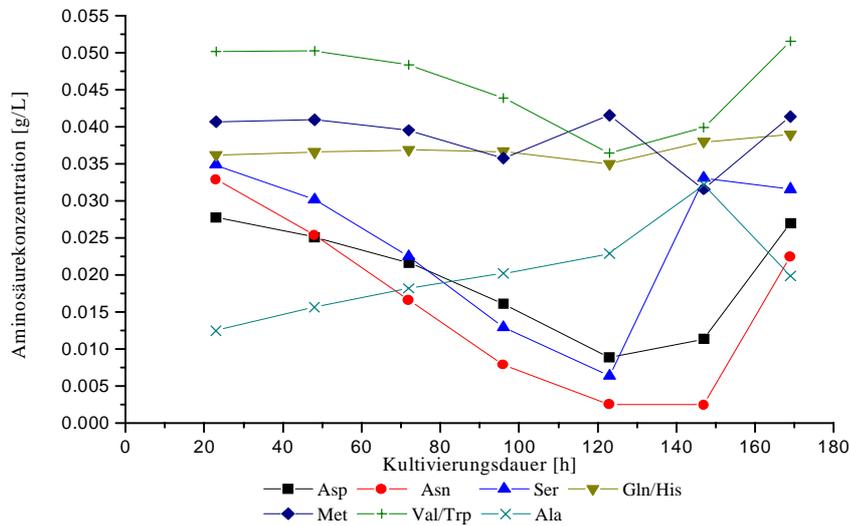
Die Aminosäuren, bei denen es kaum Unterschiede in den Konzentrationsverläufen gibt, werden im Folgenden nicht extra aufgeführt. Es sei nur bemerkt, daß sich die Konzentrationen von Glycin (Gly), Threonin (Thr), Tyrosin (Tyr), Phenylalanin (Phe), Isoleucin (Ile) und Leucin (Leu) in einem Bereich von 0,04 g/L bis 0,08 g/L bewegen. In der Negativ-Kontrolle sind sie alle annähernd konstant, während sie in der Kontrollkultur etwa bis zur 96. Kultivierungsstunde um ca. 0,01 g/L abnehmen, um anschließend wieder etwas anzusteigen. Bei der PMA-Kultur gibt es bei diesen Aminosäuren eine permanente Konzentrationsabnahme über den Kultivierungszeitraum von ca. 0,03 g/L.

In Abb. 32 sind die Aminosäuren aufgeführt, die größere Konzentrationsänderungen durchlaufen. Die Betrachtung der Kontrollkultur a) zeigt einen typischen Verlauf der Aminosäurekonzentrationen in einem Batch-Experiment. Asparaginsäure (Asp), Asparagin (Asn) und Serin (Ser) sind nach spätestens 72 h verbraucht. Valin (Val) und Tryptophan (Trp), die bedingt durch eine neue HPLC-Säule nur zusammen gemessen werden konnten, nehmen bis zur 72. Kultivierungsstunde auf einen Wert von 0,03 g/L ab und liegen dann im weiteren Kultivierungsverlauf in gleichbleibender Konzentration vor. Die leichte Zunahme um 0,005 g/L ist zu vernachlässigen. Die Konzentration von Histidin (His) bleibt während der Kultivierung annähernd konstant. Die Bezeichnung his/gln rührt von der Analyse her, bei der Histidin nur zusammen mit Glutamin (Gln) bestimmt werden kann. Da sich in dem Medium aber kein Glutamin befindet ist der Konzentrationswert gleich der Histidinkonzentration. Alanin (Ala) nimmt über den Kultivierungszeitraum langsam ab. Die Methioninkonzentration steigt nach einem anfänglich leichten Abfall zum Ende der Kultivierung wieder an.

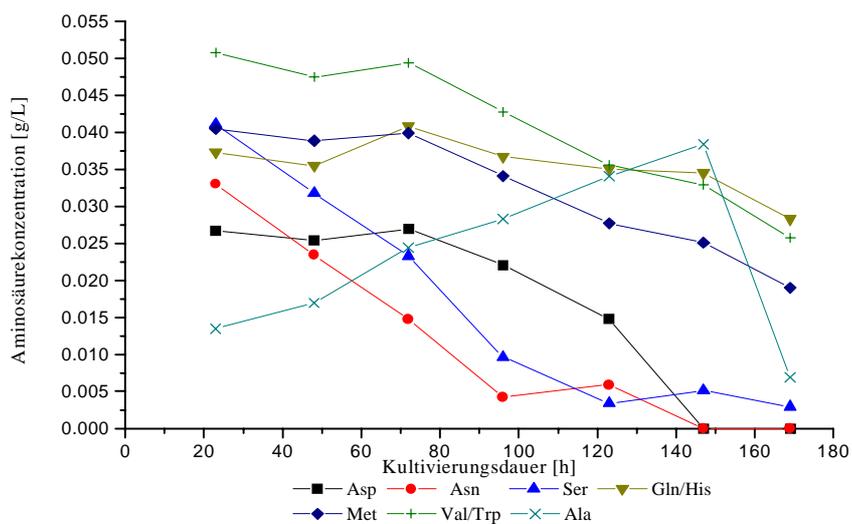
a)



b)



c)



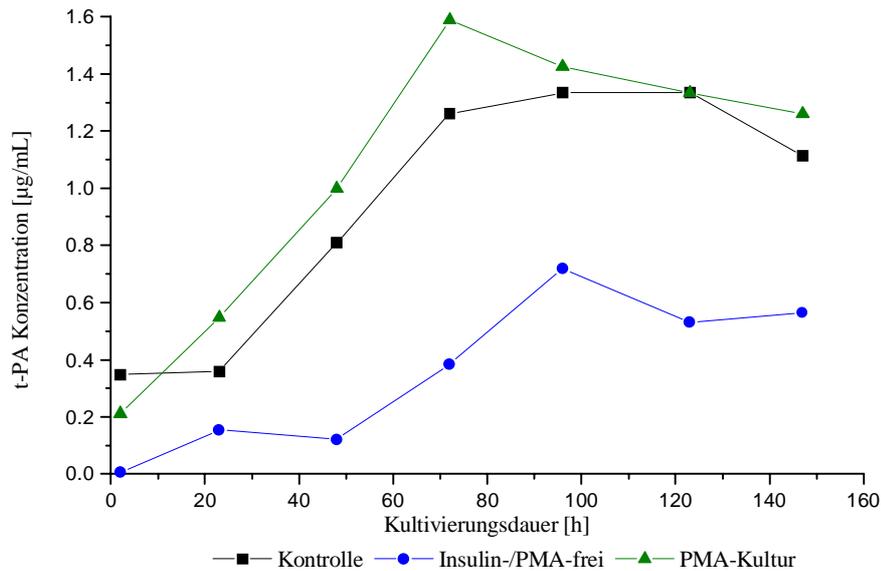
**Abb. 32a-c** Vergleich der Aminosäurekonzentrationen (a) einer insulinhaltigen Kontrollkultur, (b) einer Negativ-Kontrolle ohne Insulin/PMA und (c) einer PMA-Kultur.

Bei der Negativ-Kontrolle ändert sich dieses Verhalten. Die stärker konsumierten Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure und Serin nehmen langsamer ab als in der Kontrolle, was durch das verlangsamte Wachstum zu erklären ist. Zum Kultivierungsende werden diese Aminosäuren aber wieder, wie auch das Glutamat, massiv produziert, was wiederum auf ein Versagen des Zitratzykluses hindeutet. Alanin wird während der gesamten Kultivierungsdauer produziert statt konsumiert.

Bei Betrachtung der PMA-Kultur (c) ist zum Kultivierungsende ein Ansteigen der Aminosäurekonzentrationen nicht zu beobachten. Im Vergleich mit der Kontrolle (a) fällt aber auf, daß auch hier wie bei der Negativ-Kontrolle Alanin produziert wird. Auch nehmen die Konzentrationen der wichtigeren Aminosäuren (asp, asn und ser) analog zu der in Abb. 31 gezeigten Glutamatkonzentration langsamer ab, als in der Kontrolle. Zum Ende der Kultivierung ist ebenfalls kein Stagnieren der Konzentrationabnahme zu beobachten, wie es in der Kontrolle bei Histidin, Valin/Tryptophan und Methionin der Fall ist. Diese Aminosäuren werden weiterhin recht gleichmäßig verstoffwechselt. Es scheint, als würde PMA den Stoffwechsel in allen Bereichen gleichmäßig anregen und eine zelluläre Anpassung auf veränderte Kultivierungsbedingungen unterdrücken.

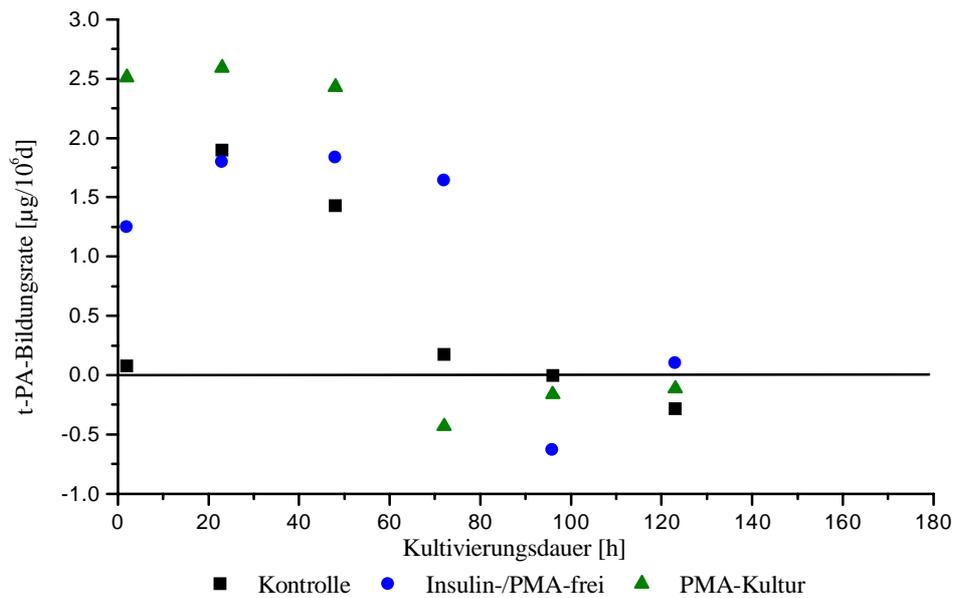
Die Zellen dürften folglich weniger flexibel auf extreme Kultivierungsbedingungen reagieren können und somit anfälliger werden. Da unter Normalbedingungen ohnehin extreme Änderungen in den Bedingungen vermieden werden, wird der leicht veränderte Metabolismus keine negativen Auswirkungen auf die Kultivierung von CHO-Zellen haben, was sich auch in dem problemlosen Einsatz von PMA während dieser Arbeit widerspiegelt. Vielmehr bringt ein gleichmäßiger und sich kaum ändernder Metabolismus weitere Vorteile mit sich, die z.B. bei der Berechnung von Stoffflüssen und der Konzeption von Fütterungsmedien zur Geltung kommen.

Da das Zellwachstum mit PMA angeregt werden kann, muß im Folgenden überprüft werden, wie sich diese Substanz auf die Produktivität der Zellen auswirkt. Die Ergebnisse der Analyse der t-PA-Konzentration im Kulturüberstand sind in Abb. 33 aufgezeigt. Der Vergleich der t-PA-Konzentrationen im Kulturüberstand zeigt, daß sich die Produktmenge durch den Einsatz von PMA nicht verschlechtert hat. Die PMA-Kultur zeigt eine ähnliche t-PA-Konzentration wie das Kontrollexperiment. Bei der Kultur ohne Insulin und PMA liegt die Produktmenge, wie auch die Zelldichte, weit unterhalb der Kontrolle. Für Aussagen über die Produktivität muß jedoch die Produktbildungsrate in Abb. 34 betrachtet werden.



**Abb. 33** Vergleich der t-PA-Konzentrationen einer PMA-, einer insulinhaltigen und einer CHO-Kultur frei von PMA und Insulin.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die PMA-Kultur die höchsten Produktbildungsraten hat. Ihre Werte liegen in den ersten drei Kultivierungstagen bei  $q_{tPA} = 2,5 \mu\text{g} / 10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$ , während sich die Werte der beiden anderen Kulturen in einem Bereich von Werte von  $q_{tPA} = 0,1 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  bis  $q_{tPA} = 1,8 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  bewegen. Nach 72 Kultivierungsstunden nimmt die Produktivität abrupt ab. In der Kontrollkultur liegt die Produktbildungsrate bei  $q_{tPA} = 0,1 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  und in der PMA-Kultur ist sogar eine negative Produktbildungsrate zu verzeichnen, d.h. die t-PA-Konzentration im Überstand nimmt ab. Nur die Negativkontrolle (ohne PMA und Insulin) kann bis zur 96. Stunde eine Produktbildungsrate von  $q_{tPA} = 1,6 \mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  halten, bevor auch sie ihre Produktivität einstellt. Bei der PMA-Kultur entsteht der Eindruck, daß die Zellen mit dieser Substanz entweder so viel wie möglich oder gar nicht produzieren. Bei den anderen Kulturen sind jeweils Zunahme- bzw. Abnahmetendenzen in der Produktivität zu verzeichnen. Da t-PA schon wegen seiner Funktion im Körper ein labiles Protein ist, das schnell abgebaut bzw. durch Inhibitoren deaktiviert werden kann, zeigt es eine Halbwertszeit von fünf Minuten (Schlee 1991).



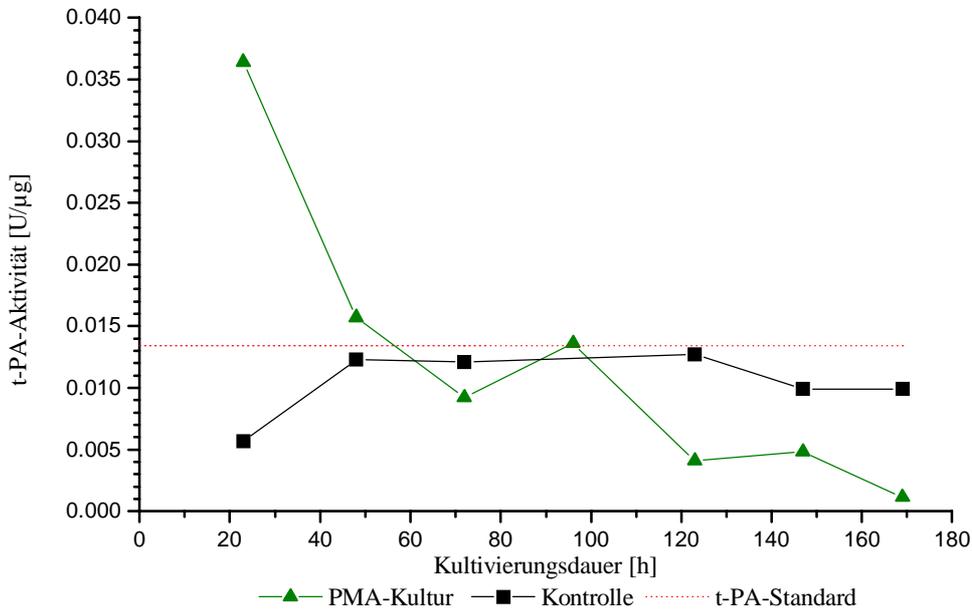
**Abb. 34** Vergleich der Produktbildungsrate der Kulturen aus Abb. 31.

Die im Kulturüberstand enthaltenen Proteasen bewirken einen Abbau an t-PA, was dazu führt, daß der Produkttiter langsamer steigt. Der t-PA-Abbau wird bei den Kontrollexperimenten durch entsprechende Neubildung an t-PA ausgeglichen, so daß die Konzentration annähernd konstant bleibt, während bei der PMA-Kultur die fortlaufende Neubildung auszubleiben scheint, bzw. so weit gedrosselt ist, daß die Produktkonzentration im Medium spürbar abnimmt.

Da die Verminderung der t-PA-Produktion bei der PMA-Kultur und der Kontrollkultur annähernd zum gleichen Zeitpunkt einsetzt und die Produktivität der PMA-Kultur höher ist, macht es Sinn PMA als Mediumbestandteil einzusetzen, wenn auch die Produktqualität für pharmazeutische Zwecke ausreichend ist. Um einen ersten Eindruck darüber zu bekommen, wird in Abb. 35 die t-PA-Aktivität des aus der PMA-Kultur gewonnenen t-PA mit einem Standard t-PA verglichen.

Die Abb. 35 zeigt deutlich, daß die t-PA-Aktivität im Verlaufe der Kultivierung abnimmt. Von der 48. bis zur 96. Stunde sind die Aktivitäten vom Standard und dem aus der Kultur gewonnenen t-PA gleichwertig (Aktivität  $A \approx 0,0134 \text{ U}/\mu\text{g}$ ). Ab der 123. bis zur 169. Stunde ist die Qualität des im Kulturüberstand enthaltenen t-PA deutlich schlechter ( $A \approx 0,0045 \text{ U}/\mu\text{g}$ ). Die Verschlechterung der t-PA-Aktivität folgt unmittelbar auf den in Abb. 33 festgestellten Produktionsrückgang, bzw. die Verminderung des Produkttiters. Zersetztes t-PA wird nicht mehr ausreichend durch

neugebildetes ersetzt. Bevor das t-PA mittels ELISA nicht mehr nachgewiesen werden kann, verliert es schon an Aktivität. Die Folge davon ist, daß sich der Rückgang der Produktaktivität stärker bemerkbar macht, als der Produktionsrückgang.

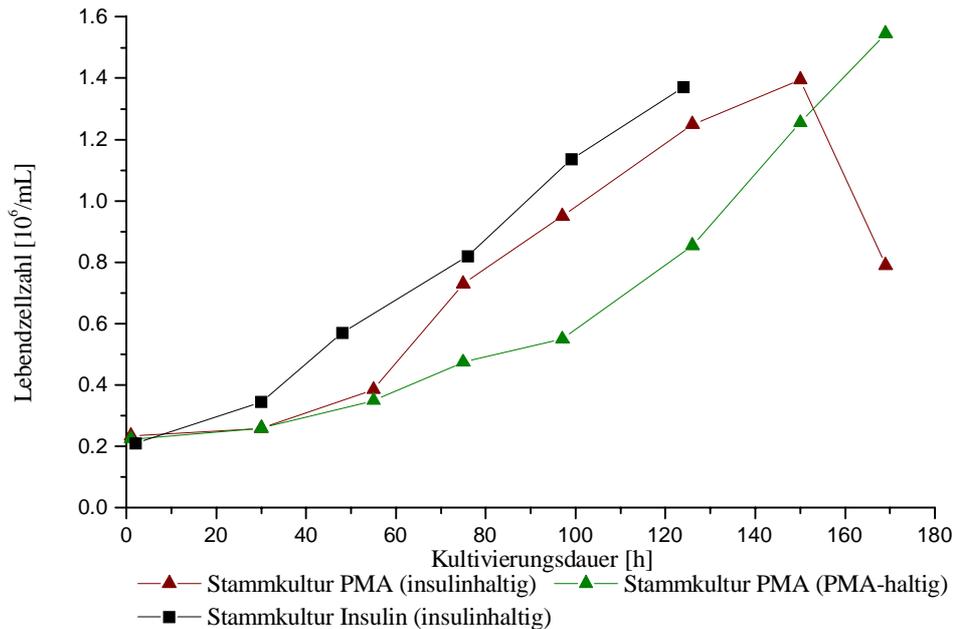


**Abb. 35** Vergleich der t-PA-Aktivität eines Standards mit der eines aus einer PMA-Kultur gewonnenen t-PA.

Daß die Aktivität nicht gegen Null geht, liegt an dem geringen Anteil an neu produziertem t-PA. Der erste Aktivitätswert für das aus der PMA-Kultur gewonnene t-PA liegt sehr hoch ( $A = 0,036 \text{ U}/\mu\text{g}$ ). Es sieht aus, als handele es sich hier um einen Meßfehler. Denkbar ist aber auch, daß die sehr gute Aktivität auf eine andere t-PA-Form zurückzuführen ist. Die zweikettige Form weist z.B. eine sehr viel höhere Aktivität auf als die einkettige. Im Normalfall wird das einkettige t-PA erst durch Plasmin in die zweikettige gespalten. Es kann aber auch sein, daß dieses durch andere Faktoren ebenfalls geschieht. Interessant ist, daß sich die Aktivität der zweikettigen Form ebenfalls bei  $A = 0,035 \text{ U}/\mu\text{g}$  befindet (Loa 1997). Es ist also Vorsicht bei der Interpretation des ersten Aktivitätswertes geboten. Der Vergleich mit der Kontrollkultur zeigt ein analoges Verhalten zu der Kontrolle bei dem Versuch zum Transferrin-Erstatzstoff (Abb. 18). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es grundsätzlich möglich ist mit dem PMA-Medium t-PA zu produzieren, das aktiv ist.

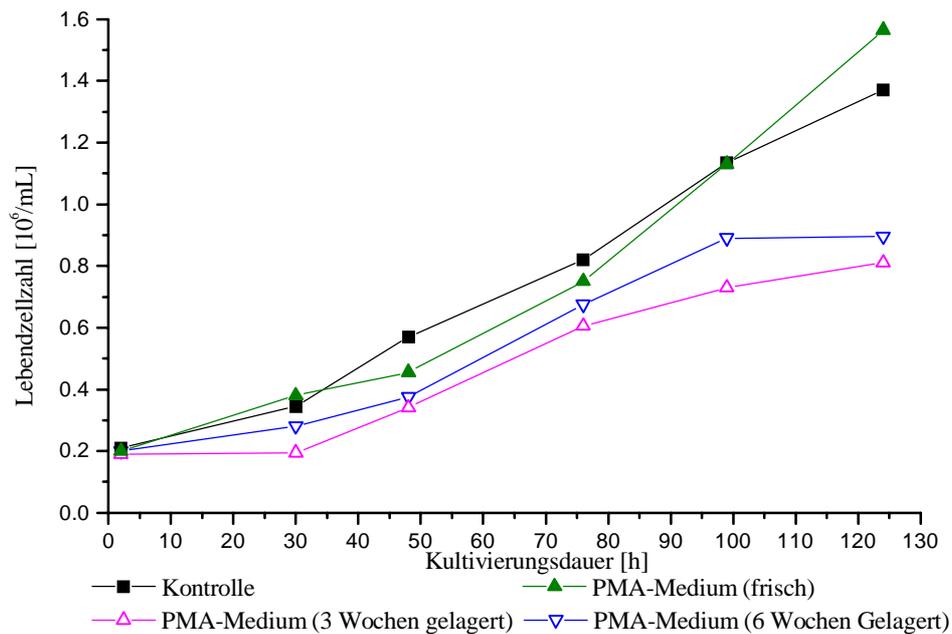
Bis hierhin steht dem Einsatz von PMA als Insulinersatzstoff nichts Gravierendes entgegen. Eventuelle Nachteile, wie z.B. ein stärkerer Produktabbau im Überstand, können durch Änderungen in der Prozeßführung (z.B. früheres Abschöpfen des Produktes) aufgehoben werden.

Als letztes muß noch geklärt werden, ob eine dauerhafte Anwendung von PMA negative Auswirkungen auf die Zellen hat. Zur Überprüfung dieses Sachverhalts wird eine Stammkultur in PMA-haltigem Medium über mehrere Wochen kultiviert. Die Zellen werden im Anschluß zum einen in PMA- und zum anderen in insulinhaltigem Medium kultiviert und mit einer aus einer PMA-freien Stammkultur stammenden Zellgruppe verglichen. Die in Abb. 36 gezeigte Graphik verdeutlicht, daß das PMA auch nach mehreren Umsetzungen die Zellen nicht wesentlich beeinflußt hat. Der Vergleich der Wachstumskurven von den Kulturen im insulinhaltigen Medium zeigt ein ähnliches Verhalten. Die Unterschiede sind durch die verwendeten Stammkulturen zu erklären. Die Zellen haben somit nicht absolut gleiche Startbedingungen. Beide Kulturen erreichen aber eine maximale Zelldichte von ca.  $1,4 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Die Wachstumsraten beider Kulturen unterscheiden sich nur unwesentlich (PMA-Stammkultur (insulinhaltig)  $\mu = 0,398 \cdot d^{-1}$ , Insulin-Stammkultur  $\mu = 0,352 \cdot d^{-1}$ ). Zwar ist die Lag-Phase der Kultur im PMA-haltigen Medium ca. 48 Stunden länger als bei den Kulturen im insulinhaltigen Medium, doch hat sie ebenfalls gute Wachstumsraten in der exponentiellen Phase ( $\mu = 0,344 \cdot d^{-1}$ ). Die Zelldichte von  $1,545 \cdot 10^6$  Zellen/mL am Ende der Kultivierung übersteigt sogar die der Kontrollkulturen ( $\approx 1,4 \cdot 10^6$  Zellen /mL). Der Grund für dieses Verhalten mag in der Stabilität des PMA im Kulturmedium liegen. Um Klarheit zu bekommen, wie lange PMA im Medium bei Lagerung unter Lichtausschluß und einer Temperatur von + 4°C wirksam bleibt, werden aus der gleichen Stammkultur verschiedene Experimente mit unterschiedlich lange gelagerten PMA-haltigen Medien gemacht.



**Abb. 36** Vergleich der Lebendzellzahlen einer PMA-Kultur nach sechs Umsetzungen in PMA-haltigem Medium, einer Kultur in insulinhaltigem Medium aus der selben Stammkultur und einer Kontrolle, die aus einer insulinhaltigen Stammkultur genommen wurde.

Die in Abb. 37 gezeigten Kurven verdeutlichen, daß PMA im Kulturmedium bei +4°C nicht gelagert werden sollte. Schon nach drei Wochen kann ein Absinken der max. erreichbaren Zellkonzentration auf  $0,81 \cdot 10^6$  Zellen/mL gegenüber  $1,37 \cdot 10^6$  Zellen/mL in der 124. Stunde bei der Kontrolle beobachtet werden. Die Analyse der Glukose- und Laktatkonzentration im Medium ergibt, daß weder die Glukose noch das Laktat limitierend sind. Der frühe Eintritt in die stationäre Phase ist eine Folge der Lagerung des Mediums. Eine weitere Lagerung von erneut drei Wochen scheint das Ergebnis allerdings nicht weiter zu verschlechtern. Die Werte der Kontrollkultivierung können nur mit dem frisch hergestellten PMA-Medium erreicht und sogar noch um 15% übertroffen werden. Hier liegt die maximale Zelldichte in der 124. Kultivierungsstunde bei  $1,57 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Ein Vergleich der Wachstumsraten in der exponentiellen Phase (Tab. 3) bestätigt diesen negativen Einfluß der Lagerung von PMA-Medium (24 nM PMA) bei + 4°C nicht.



**Abb. 37** Vergleich der Wachstumskurven von Kulturen in unterschiedlich lange gelagertem PMA-Medium und einer insulinhaltigen Kontrolle.

**Tab. 3** Vergleich der Wachstumsraten in der exponentiellen Phase verschiedener PMA-Kulturen und einer Kontrolle.

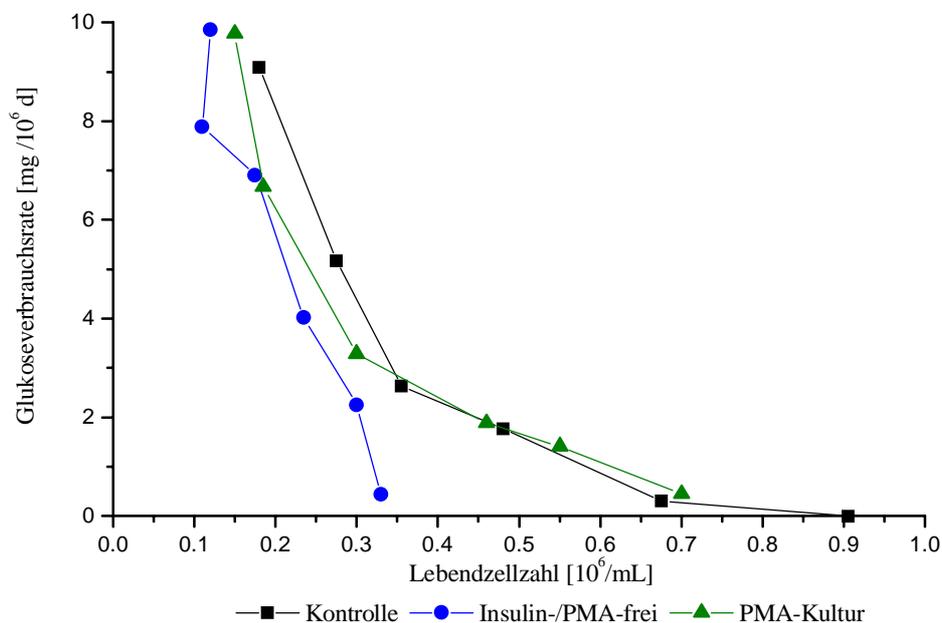
	Kontrolle	frisch	3 Wochen alt	6 Wochen alt
Wachstumsrate [ $d^{-1}$ ]	0,352	0,428	0,459	0,402
Ausbeute ( $Y_{Lactat/Glukose}$ )	1,35	0,91	1,59	1,46

Die Wachstumsraten der PMA-Kulturen liegen mit Werten um  $\mu \approx 0,4 d^{-1}$  alle über dem Kontrollwert von  $\mu = 0,352 d^{-1}$ . Es scheint somit nicht der Fall zu sein, daß die wachstumsfördernde Wirkung des PMA durch Alterung abnimmt. Wird die Ausbeute  $Y_{Lactat/Glukose}$  betrachtet ist zu sehen, daß sich bei den älteren Medien eine Verschlechterung der Glukoseausnutzung einstellt. Bei der Kultur im frischen PMA-Medium werden 46 % der Glukose zu Laktat umgesetzt, während der Anteil bei den gelagerten Medien auf 73 % bis 80 % wächst. Das 35% bis 75% der eingesetzten Glukose in Laktat umgesetzt werden ist durchaus üblich (Xie 1994). Das Kontrollexperiment (68%) und die Kultur mit dem frisch angesetzten PMA-Medium weisen Werte auf, die genau in diesem Bereich liegen, während die Experimente mit

den gelagerten PMA-Medien außerhalb liegen. Diese Werte spiegeln wieder, daß sich der Stoffwechsel geändert haben muß. Die geringere maximale Zellzahl stimmt mit der schlechteren Ausnutzung der Glukose überein. Eine Lagerung des Mediums bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  könnte dieses Problem eliminieren.

#### 4.2.2 Abhängigkeit von Glukoseverbrauchsrate und Zelldichte

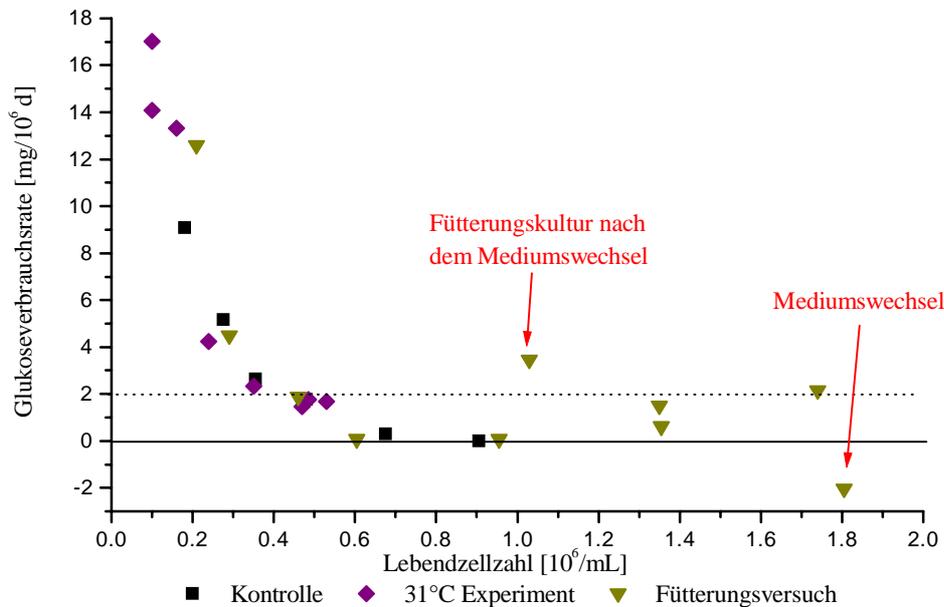
In Abb. 38 ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Zelldichte und der Glukoseverbrauchsrate zu erkennen. Je weniger Zellen in einem Milliliter Kulturmedium vorhanden sind, desto höher ist die Glukoseverbrauchsrate der Zellen. Alle Kurven liegen sehr dicht zusammen, so daß einer bestimmten Zelldichte eine ungefähre Glukoseverbrauchsrate zugeordnet werden kann. Die Abweichung bei der PMA- / insulinfreien Kultur ist dadurch verursacht, daß zu diesem Zeitpunkt kaum noch Glukose vorhanden war und somit die Verbrauchsrate zwangsläufig gegen Null gehen mußte.



**Abb. 38** Darstellung der Abhängigkeit der Glukoseverbrauchsrate von der Lebendzellzahl verschiedener Kulturen.

Dadurch, daß in der PMA-/insulinfreien Kultur das Zellwachstum verlangsamt ist, nimmt die Zelldichte langsamer zu und die Glukoseverbrauchsrate bleibt länger auf hohem Niveau, so daß die Gesamtmenge an verbrauchter Glukose in etwa gleich ist. Die Frage, ob die Zellen in frischem Medium eine hohe Glukoseverbrauchsrate haben, da sie sich das Medium erst konditionieren müssen, kann durch ein Experiment geklärt werden in dem eine Zellkultur mit hoher Animpfdichte untersucht wird.

Solch ein Experiment ist in Abb. 39 dargestellt. Zu diesem Zweck wird in einem Fütterungsexperiment beim Erreichen der max. Zelldichte ( $1,8 \cdot 10^6$  Zellen/mL) das Kulturmedium gegen frisches ausgetauscht und mit ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL weiterkultiviert. Hier müßte die Glukoseverbrauchsrate wieder ansteigen, wenn es einen Zusammenhang zwischen frischem Medium und hoher Glukoseverbrauchsrate gibt.



**Abb. 39** Darstellung der Abhängigkeit der Glukoseverbrauchsrate von der Lebendzellzahl verschiedener Kulturen.

Es ist deutlich zu sehen, daß die Glukoseverbrauchsrate nach dem Mediumswechsel kurz auf  $q_{\text{Glukose}} = 3,5 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  ansteigt und dann schnell auf einen Wert von  $q_{\text{Glukose}} = 2 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  abfällt. Dieses kurze Ansteigen der Verbrauchsrate zeigt deutlich, daß ein Zusammenhang zwischen Mediumkonditionierung und der Glukoseverbrauchsrate besteht. Die hohe Animpfdichte verkürzt lediglich die Phase der Anpassung, da mehr Zellen zur Mediumkonditionierung zur Verfügung stehen. Die Punkte, bei denen in Abb. 39 Werte unterhalb  $q_{\text{Glukose}} = 2 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  auftreten,

sind durch kompletten Verbrauch der Glukose verursacht, so daß auch die Verbrauchsrate gegen Null gehen muß. Die negative Glukoseverbrauchsrate im Fütterungsexperiment hängt mit dem Mediumswechsel zusammen, bei dem die Glukosekonzentration auf den Anfangswert eingestellt und somit erhöht wurde. Die Ergebnisse, vor allem die der Fütterung, zeigen, daß die „normale“ Glukoseverbrauchsrate der Zellen bei  $q_{\text{Glukose}} = 2 \text{ mg}/10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{d}$  (gepunktete Linie) liegt. In einer mit ca.  $0,2 \cdot 10^6 \text{ Zellen}/\text{mL}$  angeimpften Kultur wird der Grenzwert bei ca.  $0,4 \cdot 10^6 \text{ Zellen}/\text{mL}$  erreicht.

Es können Kulturen mit unterschiedlichster Vorgeschichte und unter den verschiedensten Bedingungen miteinander verglichen werden, ohne daß sich die Beziehung zwischen Glukoseverbrauchsrate und Lebendzellzahl ändert. Je weniger Zellen vorhanden sind oder je langsamer die Zellen wachsen, desto länger dauert die Konditionierungsphase. Die gute Übereinstimmung der Kurven in Abb.38 und 39 zeigt aber, daß ein Zusammenhang zwischen Zellteilung und Ausschüttung von Substanzen zur Mediumskonditionierung bestehen muß. Wäre dieses nicht der Fall, dann würde nicht immer annähernd die selbe Zelldichte beim Erreichen des Grenzwerts vorliegen.

Ein Vergleich der Ausbeuten Laktat über Glukose zeigt auch, daß ab einer Zelldichte von  $0,4 \cdot 10^6 \text{ Zellen}/\text{mL}$  sich das Verhältnis zugunsten einer besseren Glukoseausnutzung verändert. Anfängliche Werte von  $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}} \approx 2$  zeigen, daß die Glukose ausschließlich in Laktat umgewandelt wurde. Ab einer Zelldichte von ca.  $0,4 \cdot 10^6 \text{ Zellen}/\text{mL}$  erhält man einen Wert von  $Y_{\text{Lak}/\text{Gluk}} \approx 1,5$ . Das bedeutet, daß zumindest 33 % der Glukose nicht zu Laktat umgesetzt worden sind. Optimal sind die Bedingungen hier sicher noch nicht, aber läßt sich erkennen, daß sich die Ausnutzung der Glukose ab diesem Zeitpunkt verbessert. Das Medium scheint soweit konditioniert zu sein, daß die Zellen von diesem Zeitpunkt an gute Wachstumsbedingungen haben.

### 4.3 Zusammenfassung proteinfreies Medium

Die in den Kapiteln 4.1 und 4.2 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, daß es möglich ist CHO-Zellen in einem chemisch definierten Medium ohne tierische Komponenten zu kultivieren. Bei der Umstellung der Zellen auf das neue Medium ist keine Adaption

notwendig. Die Zellen sind sofort in der Lage, mit den neuen Bedingungen zurechtzukommen.

Der Ersatz des Transferrins bringt Ergebnisse, die uneingeschränkt den Einsatz von FePIH fordern. Als Alternative zu dem FePIH kristallisiert sich das FeSIH heraus, dessen Verwendbarkeit über lange Zeiträume noch überprüft werden muß. Es gibt allerdings keine Anzeichen dafür, daß sich die Verwendbarkeit des FeSIH über einen längeren Zeitraum als nicht praktikabel erweisen könnte. Das im Laufe dieser Arbeit auf FePIH umgestellte Medium wird zur Zeit im Arbeitskreis von Frau PD Dr. Gerlinde Kretzmer mit Erfolg eingesetzt, was die Anwendbarkeit dieses Transferrinersatzstoffes noch einmal aufzeigt.

Die Ergebnisse, die mit dem Insulinersatzstoff PMA erzielt wurden, sind positiv. Die bei der Lagerung des PMA-haltigen Mediums auftretenden Probleme müssen noch näher untersucht werden. Besondere Sorgfalt ist bei der Zugabe des PMA zum Medium notwendig, da für eine Konzentration von 24 mM lediglich 30 µL PMA-Stammlösung auf 1 L Medium zugesetzt werden müssen. Während der PMA-Experimente erwies sich eine Konzentration von 100 nM PMA als toxisch. Kleine Fehler bei der PMA-Zugabe können somit das Medium unbrauchbar machen. Das Wachstumsverhalten, die Zellvitalität und Produktivität werden durch das PMA genauso gut, wenn nicht sogar in Einzelfällen besser unterstützt, als vom Insulin. Auch Versuche über längere Kultivierungszeiträume zeigten, daß PMA in der Zellkultur anwendbar ist. Zwar liegen keine Erfahrungen über Zeiträume vor, die mit denen des FePIH vergleichbar wären, doch scheint nichts dafür zu sprechen, daß sich die PMA-Kulturen mit der Zeit ungewöhnlich stark verändern.

Durch die Verwendung der beiden beschriebenen Komponenten ist es nun möglich CHO-Zellen in einem Medium zu kultivieren, das vollkommen synthetisch und von konstanter Qualität ist. Es sind keine tierischen oder rekombinant hergestellten Komponenten (z.B. Insulin) enthalten, die ein Kontaminationsrisiko bergen oder qualitativen Schwankungen unterliegen.

## 4.4 Anwendung des stöchiometrischen Modells zur Berechnung der Zusammensetzung eines proteinfreien Fütterungsmediums

### 4.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Berechnung eines Fütterungsmediums nach Xie et al. (1994a) wird zuerst die Analyse der Zellzusammensetzung, sowie deren Trockenmasse benötigt. In einem ersten experimentellen Teil wird versucht die entsprechenden Werte für die verwendete CHO-Zelllinie zu ermitteln. Die Ergebnisse von der Biotrockenmassenbestimmung sind in Tab. 4 aufgeführt.

**Tab. 4 Ergebnisse der Biotrockenmassenbestimmung von CHO-Tf70R-Zellen.**

Kultivierungs-Phase	Biotrockenmasse [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	Fehler [%]
Lag-Phase	57,1	± 6,1%
Log-Phase	65	±6,0%
Stationäre-Phase	36,7	± 5,8%
Literaturwert (Xie et al.1994) <sup>1)</sup>	36	-

Der in der stationären Phase ermittelte Wert für die Biotrockenmasse entspricht im Rahmen des Fehlerintervalls sehr gut dem Literaturwert für tierische Zellen. Es ist aber interessant zu sehen, wie sich die Trockenmassen in den einzelnen Kultivierungsphasen unterscheiden. Die erhöhte Biotrockenmasse in der Lag- und Log-Phase hängt sicher mit der höheren Zellaktivität zusammen.

<sup>1)</sup> Die Literaturwerte sind aus bekannten Daten von verschiedenen Zelllinien zusammengetragen und sollen hier nur als Anhaltspunkt dienen, um die Richtigkeit der erhaltenen Werte abschätzen zu können. Auch im Folgenden sollen die Literaturwerte von Xie et al. (1994) nur als Orientierungshilfe verstanden werden. Exakte Daten für die Zellzusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie konnten in der Literatur nicht ausfindig gemacht werden, weshalb auf eine Durchführung der Bestimmungen nicht verzichtet werden konnte.

In diesen Phasen ist der Anteil der Zellen, die sich in einem Stadium kurz vor der Zellteilung befinden, relativ hoch, verglichen mit der stationären Phase. Diese werden noch als eine Zelle gezählt, beinhalten aber schon einen doppelten Chromosomensatz und mehr Organellen als eine Einzelzelle. So ist der Wert für die Biotrockenmasse auch in der exponentiellen Phase am größten. In der stationären Phase hat sich ein Gleichgewicht aus neu produzierten und absterbenden Zellen eingestellt. Die toten Zellen lysieren und geben Bestandteile des Zytoplasmas in das Medium ab. Somit sind diese Zellen leichter, als die intakten Zellen und die ermittelte Biotrockenmasse liegt etwas unter dem tatsächlichen Wert. Da der reale Wert irgendwo zwischen diesen Ergebnissen liegt, wurde für die Berechnung des Fütterungsmediums der Mittelwert für die Biotrockenmasse aus den drei Kultivierungsphasen verwendet. Für die Berechnungen wurde im Folgenden eine Biotrockenmasse von  $W = 53 \text{ mg}/10^8$  Zellen verwendet.

#### 4.4.2 Bestimmung des Proteingehalts der CHO-Zellen

Zur Bestimmung des Proteingehalts der CHO-Zellen werden  $24 \cdot 10^6$  Zellen aus jeder Wachstumsphase einer Batch-Kultur benutzt. Vor der Verwendung des Proteintests (Modified Lowrey Test, PIERCE) wird jede Probe mit PBS (pH7,4) vier mal gewaschen, um im Kulturüberstand enthaltene Proteine zu entfernen.

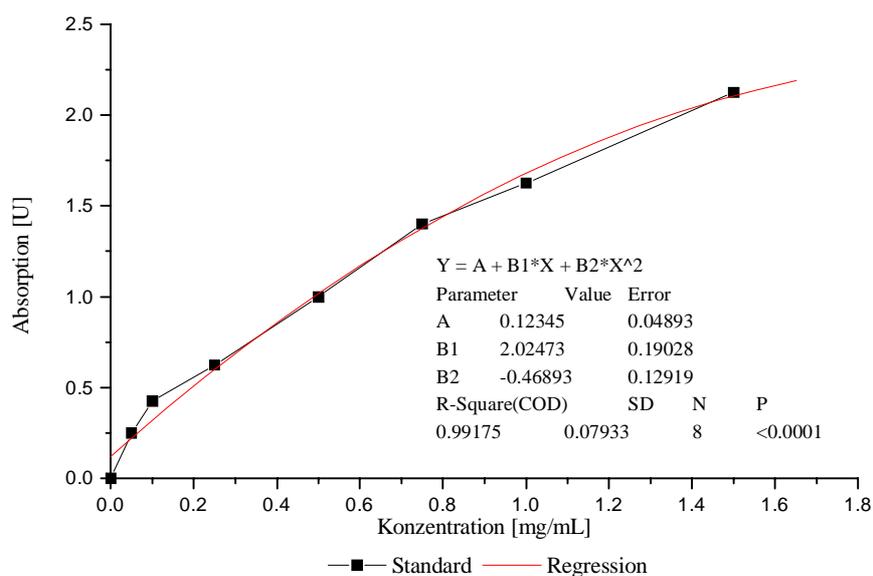


Abb. 40 Kalibrationskurve des Proteintests nach Lowrey

Die Ergebnisse des modifizierten Lowrey Tests sind in Tab. 5 aufgeführt. Es ergibt sich ein Proteingehalt von 23,4 mg/10<sup>8</sup> Zellen festgestellt, was bei einer Biotrockenmasse von 53 mg/10<sup>8</sup> Zellen einem prozentualen Anteil von  $Z_p = 44\%$  entspricht. In der Literatur werden prozentuale Anteile angegeben, die zwischen  $Z_p = 37,5\%$  (Xie et al.1994) und  $Z_p = 59,3\%$  (Creighton 1996) liegen. Der ermittelte Wert wird für die Berechnung des Fütterungsmediums herangezogen.

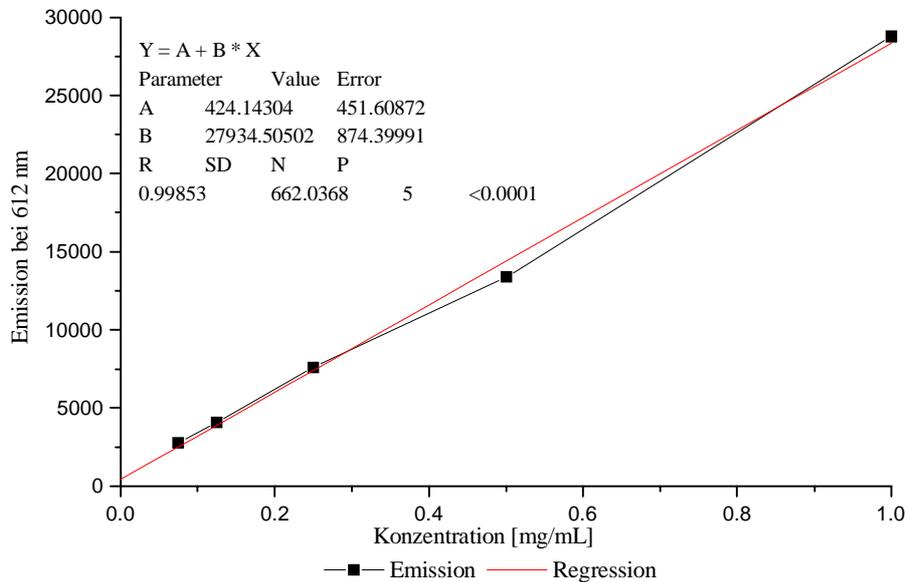
**Tab. 5 Ergebnisse der Bestimmung des Proteingehalts von CHO-Tf70R-Zellen**

Probe	Proteingehalt [mg/mL]	Zellulärer Proteingehalt [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]
4	0,254	25,4
5	0,197	19,7
6	0,205	20,5
7	0,242	24,2
9	0,300	30,0
10	0,298	29,8
11	0,195	19,5
12	0,194	19,4
14	0,250	25,0
15	0,204	20,4
Mittelwert	0,234	23,4
Standardabweichung	±0,041	±4,13
Standardfehler	±0,013	±1,31
Literaturwert	-	13,5

#### 4.4.3 Bestimmung des DNA-/RNA-Gehalts der CHO-Zellen

Die Bestimmung des DNA-/RNA-Gehalts erfolgt nach einer Messung der Fluoreszenzaktivität von mit Propidiumiodid behandelten Zellen mit und ohne Behandlung mit RNase. Aus der Differenz des Wertes für die DNA und des Wertes für das DNA/RNA-Gemisch kann der RNA-Gehalt berechnet werden. In Abb. 41 ist die Kalibrationsgerade dargestellt, die durch die Messung von DNA-Standards erhalten

wird. Der Regressionskoeffizient von  $R = 0,99853$  zeigt, daß die Methode gut funktioniert. Die Linearität der Messungen ist bis zu einem DNA-Konzentrationswert von 1 mg/mL gewährleistet.



**Abb. 41** Kalibration der Fluoreszenzmessung von DNA/RNA mit Hilfe von Propidiumiodid mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektion der Emission bei 590 nm.

**Tab. 6** Ergebnisse der DNA-/RNA-Bestimmung mittels Fluoreszenzmessung

	Konzentration DNA/RNA [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	Konzentration DNA [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	Konzentration RNA [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]
Probe 1	3,3610	0,9289	2,4321
Probe 2	3,2855	0,7861	2,4994
Probe 3	3,4670	0,9676	2,4994
Probe 4	3,2211	0,9175	2,3036
Probe 5	3,2490	0,9147	2,3343
Probe 6	3,4000	1,1104	2,2896
Mittelwert	3,33	<b>0,94</b>	<b>2,39</b>
Standardabweichung	± 0,095	± 0,11	± 0,10
Standardfehler	± 0,039	± 0,04	± 0,04
Literaturwert	-	<b>0,9</b>	<b>2,5</b>

Die Ergebnisse der Messung sind in Tab. 6 aufgeführt. Ein Vergleich mit Literaturwerten Xie et al. (1994a) zeigt, daß die detektierten DNA-/RNA-Mengen ähnlich sind. Der DNA-Gehalt ist mit der Messung 4,4% größer ausgefallen, als in der Literatur beschrieben. Bei dem bestimmten RNA-Gehalt hingegen liegt der Wert 4,6% unter dem Literaturwert. Die betragsmäßig gute Übereinstimmung der beiden Abweichungen zeigt, daß die Gesamtmenge der bestimmten Nukleinsäuren in dem Experiment entsprechend den Literaturwerten ist. Die aus diesen Daten berechneten prozentualen Anteile an der Biotrockenmasse ( $W = 53 \text{ mg}/10^8 \text{ Zellen}$ ) von  $Z_D = 1,77\%$  (DNA) und  $Z_R = 4,52\%$  (RNA) werden zur Berechnung des Fütterungsmediums eingesetzt.

#### 4.4.4 Bestimmung des Lipidgehalts der CHO-Zellen

Die Bestimmung des Lipidgehalts erfolgt durch Wägung nach Extraktion der Lipide mittels Chloroform. Durch Verdampfen der Chloroformphase unter Stickstoffatmosphäre wird die zu bestimmende Lipidmenge erhalten. Die Differenz aus Leerwert und Masse des Verdampfungsgefäßes nach dem Auftrag und Abdampfen der Chloroformphase ergibt die in Tab. 7 aufgeführten Ergebnisse.

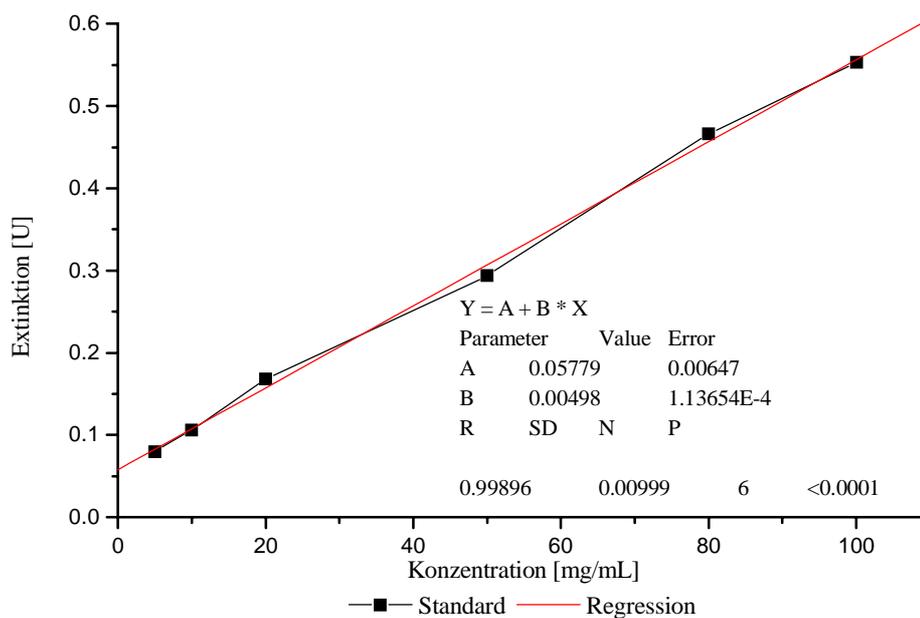
**Tab. 7 Ergebnisse der Lipidbestimmung durch Extaktion und Wägung**

	Lipidgehalt [mg]	Lipidgehalt [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]
Probe 1	7,3	8,9
Probe 2	6,9	8,4
Probe 3	6,8	8,3
Probe 4	7,1	8,7
Probe 5	6,6	8,0
Probe 6	6,7	8,2
Mittelwert	6,90	8,41
Standardabweichung	± 0,26	± 0,32
Standardfehler	± 0,11	± 0,13
Literaturwert	-	7,2

Das Ergebnis dieser Messung ist ebenfalls nahe dem Literaturwert (Xie et al. 1994a). Die Abweichung beträgt 16,8%. Dieses darf aber nicht verwundern, da der Literaturwert nicht mit CHO-Zellen gewonnen wurde. Für die Berechnung des Fütterungsmediums wird ein prozentualer Lipidanteil, bezogen auf die Biotrockenmasse ( $W = 53 \text{ mg}/10^8$  Zellen), von  $Z_L = 15,87\%$  verwendet.

#### 4.4.5 Bestimmung des Kohlenhydratgehalts der CHO-Zellen

Die Bestimmung des Kohlenhydratanteils erfolgt mit Hilfe der Periodic Acid Schiff Reaction (PASR) (Mantle 1978). Die Kalibrationsgerade ist in Abb. 42 dargestellt und weist einen sehr guten Regressionskoeffizienten von  $R = 0,99896$  auf.



**Abb. 42** Kalibrationsgerade der PAS-Reaktion zum Nachweis des Kohlenhydratgehaltes von Zelllysaten.

**Tab. 8 Ergebnisse der Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes im CHO-Zellysat mittels PAS-Reaktion.**

	Kohlenhydratgehalt [mg/mL]	Kohlenhydratgehalt [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]
Probe 1	0,4014	5,435
Probe 2	0,4115	5,596
Probe 3	0,4053	5,498
Probe 4	0,4111	5,589
Probe 5	0,4121	5,605
Probe 6	0,4019	5,444
Mittelwert	0,41	5,53
Standardabweichung	± 0,01	± 0,08
Standardfehler	± 0,002	± 0,03
Literaturwert	-	9,0

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der Messungen aufgeführt. In diesem Fall weicht das Endergebnis stark (38,6%) von dem Literaturwert (Xie et al. 1994a) ab. Aber auch hier gilt wieder der Hinweis, daß es sich bei dem Literaturwert um Daten handelt, die mit anderen Zellen gewonnen wurden. Daß der erhaltene Wert dennoch in einem vertretbaren Bereich liegt, zeigt die Tabelle 9 im Kapitel 4.4.6. Für die Berechnung des Fütterungsmediums wird ein prozentualer Kohlenhydratanteil, von  $Z_C = 10,43\%$  verwendet (bezogen auf die Biotrockenmasse  $W = 53 \text{ mg}/10^8 \text{ Zellen}$ ).

#### 4.4.6 Zusammenfassung der Zellkomposition

Aus den vorangegangenen Experimenten kann die in Tab. 9 wiedergegebene Zellzusammensetzung der CHO-Tf70R-Zellen ermittelt werden. Die erhaltenen Werte liegen in den Bereichen der in der Literatur (Bonarius 1996, Creighton 1996 und Xie et al. 1994a) für verschiedene Zelllinien angegebenen Zellkompositionen.

**Tab. 9 Zusammenfassung der Zellkomposition von CHO-Tf70R-Zellen**

Y (= P, D, R, L, C)	Gehalt (exp.) [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	Gehalt (Creighton 1996) [mg/10 <sup>8</sup> Zellen]	Z <sub>y</sub> (exp.) [%]	Z <sub>y</sub> (Xie et al. 1994) [%]	Z <sub>y</sub> (Bonarius 1996) [%]
Proteine	23,4	13,5	44,00	37,5	67,1
DNA	0,9	0,9	1,77	2,5	1,5
RNA	2,4	2,5	4,52	6,9	5,3
Lipide	8,4	7,2	15,87	20	10,0
Kohlenhydrate	5,5	9,0	10,43	25	7,1
Salze und Metabolite	12,4	2,9	23,41	8,1	9,0

Der Restanteil, bestehend aus anorganischen Salzen und kleineren Metaboliten, berechnet sich aus der Differenz, die sich aus der Summe der prozentualen Anteile und 100% ergibt. Er ist mit 23,41% bei der in dieser Arbeit ermittelten Zusammensetzung fast dreimal so hoch, wie der aus den Literaturdaten ermittelte. Ein Vergleich der anderen Daten zeigt aber, daß die für die CHO-Zellen ermittelten Anteile immer zwischen den von Xie et al. und Bonarius liegen. Es scheint, daß die CHO-Zellen einen größeren Salzanteil besitzen, als die in der Literatur herangezogenen Zellen. Eine Erklärung kann das verwendete Kulturmedium sein, das eine für Zellkulturen hohe Osmolalität von 340 mOsmol/Kg aufweist. Dieses könnte zu einer verstärkten Aufnahme von Salzen führen. Das sich die Zellzusammensetzung mit den Kultivierungsbedingungen ändern kann, hat Bonarius (1996) in seiner Arbeit gezeigt.

#### 4.4.7 Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung der zellulären Proteine

Für die Berechnung des Fütterungsmediums nach einem stöchiometrischen Model ist es weiterhin notwendig die Zusammensetzung der Zellproteine zu kennen. Xie et al. (1994a) haben hierfür 207 zufällig ausgewählte Proteine mit bekannter Aminosäuresequenz verwendet und anhand der Daten die prozentualen Aminosäureanteile vom Gesamtproteingehalt bestimmt.

Diese Literaturdaten werden für diese Arbeit übernommen, da die Analyse der Aminosäurezusammensetzung der Zellproteine keine sinnvollen Ergebnisse brachte. In Tab. 10 sind die verwendeten prozentualen Anteile der Aminosäuren aufgeführt und werden mit den experimentell ermittelten Daten verglichen.

**Tab. 10 Prozentuale Aminosäurezusammensetzung  $O_i$  des zellulären Proteins von CHO-Zellen**

Aminosäure	ala	arg	asn	asp	cys	glu	gln
$O_i$ (Analyse)	2,36	-	-	3,08	-	4,7	-
<b><math>O_i</math> (Xie 1994)</b>	<b>9,0</b>	<b>4,7</b>	<b>4,4</b>	<b>5,5</b>	<b>2,8</b>	<b>6,2</b>	<b>3,9</b>
Aminosäure	gly	his	ile	leu	lys	met	phe
$O_i$ (Analyse)	2,99	-	0,28	1,75	2,81	0,83	1,18
<b><math>O_i</math> (Xie 1994)</b>	<b>7,5</b>	<b>2,1</b>	<b>4,6</b>	<b>7,5</b>	<b>7,0</b>	<b>1,7</b>	<b>3,5</b>
Aminosäure	pro	ser	thr	trp	tyr	val	
$O_i$ (Analyse)	-	1,05	0,18	0,36	1,03	0,54	
<b><math>O_i</math> (Xie 1994)</b>	<b>4,6</b>	<b>7,1</b>	<b>6,0</b>	<b>1,1</b>	<b>3,5</b>	<b>6,9</b>	

Rechnet man die prozentualen Anteile der analysierten Aminosäuren zusammen, so wird einen Wert von 23 % des Gesamtproteingehalts erhalten. Die Verluste bei der Analysenprozedur sind zu groß, um sicher die Anteile berechnen zu können. So fällt auch auf, daß einige Aminosäuren gar nicht nachweisbar sind, was durch den geringen Anteil an analysiertem Protein zu erklären ist. Auf eine intensivere Untersuchung der Zellproteinzusammensetzung wird verzichtet, da der Aufwand in keinem Verhältnis zu den erwarteten Ergebnissen steht. Wie bei Bonarius (1996) erwähnt, ändert sich die Zusammensetzung der Zellproteine bei veränderten Kultivierungsbedingungen unwesentlich. Vergleiche zwischen den Werten, die aus 207 bekannten Proteinen gewonnen werden und experimentellen Daten, zeigen Abweichungen von max. 1,3%. Eigene Bestimmungen von Zellproteinzusammensetzungen würden kaum andere Werte ergeben, die den damit verbundenen Zeitaufwand rechtfertigen würden, zumal das Ziel dieser Arbeit nicht die Gewinnung von zellinien-spezifischen Daten, sondern die Erstellung eines proteinfreien Fütterungsmediums ist. Die verwendeten Werte sind in Tab. 10 durch Fettdruck hervorgehoben.

#### 4.4.8 Weitere Daten zur Berechnung des Fütterungsmediums

Die restlichen Informationen über zelluläre Bestandteile können mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden nicht bestimmt werden. Es wird deshalb auf Datenmaterial aus der Literatur zurückgegriffen, um die notwendigen Berechnungen durchführen zu können. Die dabei auftretenden Ungenauigkeiten in der Zusammensetzung des Fütterungsmediums fallen aber, der kleinen Werte halber, kaum ins Gewicht.

Die Zusammensetzung der zellulären DNA und RNA kann weder in der Literatur gefunden noch analysiert werden, so daß von einer Gleichverteilung der Basen ausgegangen wird. Somit wird für Adenin ( $D_A$ ), Guanin ( $D_G$ ), Cytosin ( $D_C$ ) und Thymin ( $D_T$ ) ein Wert von  $D_A = D_G = D_C = D_T = 0,25$  verwendet.

Aus Batchdaten wurden Wachstumsraten von  $\mu = 0,015 \text{ h}^{-1}$  erhalten. Zusammen mit der spezifischen Produktbildungsrate von  $q_p = 1,25 \cdot 10^{-6} \text{ } \mu\text{g/h/Zelle}$  wird nach Gl. 6 der stöchiometrische Koeffizient für das Produkt ( $\theta_p$ ) erhalten.

$$\theta_p = \frac{q_p}{\mu} = 8,31 \cdot 10^{-5} \text{ } \mu\text{g/Zelle} \quad (\text{Gl. 6})$$

Die spezifische ATP-Verbrauchsrate wird aus einer kontinuierlichen Hybridomakultur (AB2-143.2) übernommen (Miller 1989).

$$q_{\text{ATP}} = \mu / 7,48 \cdot 10^7 = 2,01 \cdot 10^{-10} \text{ mmol ATP/Zelle} \cdot \text{h} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die stöchiometrischen Koeffizienten für die Vitamine werden ebenfalls aus der Literatur übernommen. Sie sind in Tab. 11 aufgeführt.

**Tab. 11 Stöchiometrische Koeffizienten der zellulären Vitamine nach Xie et al. (1994a)**

Vitamin	Biotin	Choline	Folsäure	Inositol	Nicotinamid
$\theta_{v,i}$ [ $\mu\text{mol}/10^9$ Zellen]	0,778	38,3	1,4	20,4	5,57
Vitamin	Pyridoxal	Riboflavin	Thiamin	Panhotenat	Vit. B <sub>12</sub>
$\theta_{v,i}$ [ $\mu\text{mol}/10^9$ Zellen]	7,66	0,5	1,27	1,6	0,1

Mit den bis hierhin zusammengestellten Daten kann nun die Berechnung des Fütterungsmediums erfolgen.

#### 4.4.9 Berechnung des Fütterungsmediums

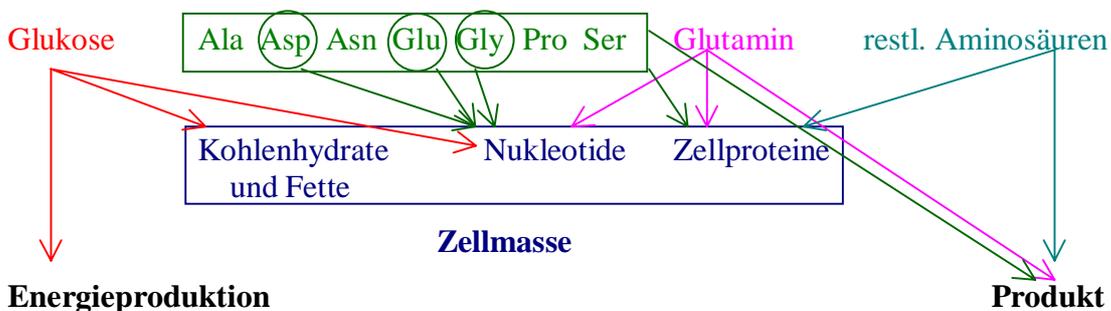
Die stöchiometrische Gleichung, die das Zellwachstum beschreibt, lautet nach Xie et al. (Xie 1994b):

$$\theta_{glk} [Glukose] + \sum_{i=1}^{20} \theta_{a,i} [Aminosäure]_i + \sum_{j=1}^{10} \theta_{v,j} [Vitamin]_j = \theta_p [Produkt] + \theta_{ATP} [ATP] + [W \cdot Z_p \text{ Protein} + W \cdot Z_D \text{ DNA} + W \cdot Z_R \text{ RNA} + W \cdot Z_L \text{ Fette} + W \cdot Z_C \text{ Kohlenhydrate}]_{Zellmasse}$$

(Gl. 8)

$Z_L$ ,  $Z_C$ ,  $Z_D$  und  $Z_R$  sind die prozentualen Anteile von Fetten, Kohlenhydraten, DNA und RNA an der Biotrockenmasse  $W$

Die rechte Seite der Gleichung beschreibt, woraus eine Zelle besteht, bzw. was in ihr steckt und die linke gibt an, was zum Aufbau benötigt wird. Ausgehend von dieser Gleichung lassen sich die einzelnen stöchiometrischen Koeffizienten berechnen. In Abb. 43 sind die zur Berechnung notwendigen Zusammenhänge der Nährstoffkomponenten mit den Produkten schematisch aufgezeigt.



**Abb. 43 Schematischer Syntheseweg von Zellmasse und Produkt**

Die aufgezeigten Beziehungen werden auf Gl. 8 übertragen, so daß die Bilanzgleichung in Teilbereiche eingeteilt werden kann.

Bei der Berechnung des stöchiometrischen Koeffizienten für die Glukose spielen nach Abb. 43 die Energieproduktion, Fette, Kohlenhydrate und die Nukleotide eine Rolle. Für den stöchiometrischen Koeffizienten der Glukose läßt sich demnach folgende Gleichung aufstellen:

$$\theta_{gluk} = \frac{Z_L W}{M_{CH_2} \cdot 6} + \frac{Z_C W}{M_{CH_2O} \cdot 6} + \frac{Z_D W}{M_D \cdot \frac{6}{5}} + \frac{Z_R W}{M_R \cdot \frac{6}{5}} + \frac{\theta_{ATP}}{36} \quad (\text{Gl. 9})$$

$Z_L$ ,  $Z_C$ ,  $Z_D$  und  $Z_R$  sind die prozentualen Anteile von Fetten, Kohlenhydraten, DNA und RNA an der Biotrockenmasse  $W$ ;  $M_D$  und  $M_R$  sind Molmassendurchschnittswerte für die Basiseinheit  $X-C_5H_7O-PO_4$  und  $X-C_5H_7O_2-PO_4$ .

Der zur Berechnung benötigte stöchiometrische Koeffizient für das ATP kann durch Einsetzen von Gleichung 7 in Gleichung 10 erhalten werden.

$$\theta_{ATP} = \frac{q_{ATP}}{\mu} = 1,34 \cdot 10^{-8} \frac{\text{mmol ATP}}{\text{Zelle}} \quad (\text{Gl. 10})$$

Die Berechnung von  $M_D$  und  $M_R$  erfolgt nach den Gleichungen 11 und 12.

$$M_D = M_{PO_4} + M_{C_5H_7O} + D_A \cdot M_{C_5H_4N_4} + D_G \cdot M_{C_5H_4ON_5} + D_C \cdot M_{C_4H_4ON_3} + D_T \cdot M_{C_5H_5O_2N_2} \quad (\text{Gl. 11})$$

$$M_R = M_{PO_4} + M_{C_5H_7O_2} + R_A \cdot M_{C_5H_4N_4} + R_G \cdot M_{C_5H_4ON_5} + R_C \cdot M_{C_4H_4ON_3} + R_U \cdot M_{C_4H_3O_2N_2} \quad (\text{Gl. 12})$$

$D_A$ ,  $D_G$ ,  $D_C$  und  $D_T$  = DNA-Basenzusammensetzung [mol%]  $\equiv$  25 mol%;  $R_A$ ,  $R_G$ ,  $R_C$  und  $R_U$  = RNA-Basenzusammensetzung [mol%]  $\equiv$  25 mol%

Die Berechnungen ergeben:

$$M_D = 305,75 \text{ g/mol}$$

$$M_R = 318,25 \text{ g/mol}$$

Die für den Nukleotidaufbau wichtigen Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure, Glycin und Asparaginsäure werden gesondert nach den Gleichungen 13 – 16 berechnet.

$$\theta_{gln} = [Z_P W + \theta_P] \cdot \theta_{a,gln}^P + 3N_G + 2[N_A + N_C + N_T + N_U] \quad (\text{Gl. 13})$$

$$\theta_{glu} = [Z_P W + \theta_P] \cdot \theta_{a,glu}^P - [3N_G + 2(N_A + N_C + N_T + N_U)] \quad (\text{Gl. 14})$$

$$\theta_{asp} = [Z_P W + \theta_P] \cdot \theta_{a,asp}^P + N_G + N_A + N_C + N_T + N_U \quad (\text{Gl. 15})$$

$$\theta_{gly} = [Z_P W + \theta_P] \cdot \theta_{a,gly}^P + N_G + 2 \cdot N_A \quad (\text{Gl. 16})$$

$N_G, N_A, N_C, N_T$  und  $N_U$  sind die absoluten Mole an Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin und Uracil;  $\theta_{a,glu}^P, \theta_{a,glu}^P, \theta_{a,asp}^P$  und  $\theta_{a,gly}^P$  sind die Anteile dieser Aminosäuren im zellulären Protein, berechnet nach Gl.24;  $Z_P$  ist der prozentuale Anteil der Proteine an der Biotrockenmasse  $W$ .

Die Berechnung der absoluten Mole  $N_G, N_A, N_C, N_T$  und  $N_U$  erfolgt nach den Gleichungen 17 – 23:

$$N_A = N_{DNA} \cdot D_A + N_{RNA} \cdot R_A = 2,649 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 17})$$

$$N_G = N_{DNA} \cdot D_G + N_{RNA} \cdot R_G = 2,649 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 18})$$

$$N_C = N_{DNA} \cdot D_C + N_{RNA} \cdot R_C = 2,649 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 19})$$

$$N_T = N_{DNA} \cdot D_T = 7,67 \cdot 10^{-12} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 20})$$

$$N_U = N_{RNA} \cdot R_U = 1,882 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 21})$$

$$N_{DNA} = Z_D \cdot W / M_D = 3,068 \cdot 10^{-11} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 22})$$

$$N_{RNA} = Z_R \cdot W / M_R = 7,527 \cdot 10^{-10} \text{ mmol/Zelle} \quad (\text{Gl. 23})$$

Die stöchiometrischen Koeffizienten ( $\theta_{a,i}$ ) für die restlichen Aminosäuren werden nach den Gleichungen 24 – 26 berechnet. Gleichung 24 beschreibt den Aminosäureanteil der entsprechenden Aminosäure am Zellprotein ( $\theta_{a,i}^P$ ).

$$M_P = \sum_{i=1}^{20} M_{a,i} \cdot O_i \% \quad (\text{Gl. 24})$$

$$\theta_{a,i}^P = \frac{O_i \%}{M_P} \quad (\text{Gl. 25})$$

$$\theta_{a,i} = [Z_P W + \theta_P] \theta_{a,i}^P \quad (\text{Gl. 26})$$

$O_i$  = Durchschnittsprozentsatz der  $i$ -ten Aminosäure im zellulären Protein;  $M_{a,i}$  = Molmasse der  $i$ -ten Aminosäure;  $M_P$  = Durchschnittsmolekülgewicht der Peptide im zellulären Protein ( $M_P = 127,44 \text{ g/mol}$ )

Der gesamtstöchiometrische Koeffizient der Nährstoffkomponenten  $\beta$  [mmol/Zelle] setzt sich aus den Einzelkoeffizienten  $\theta_k$  zusammen.  $\theta_k$  ist der stöchiometrische Koeffizient des  $k$ -ten Nährstoffs.

$$\beta = \sum_{k=1}^{31} \theta_k \quad (\text{Gl. 27})$$

Aus Gl. 27 kann nun der molare Anteil  $X_k$  und die molare Konzentration  $C_k$  des  $k$ -ten Nährstoffs berechnet werden.

$$X_k = \frac{\theta_k}{\beta} \quad (\text{Gl. 28}) \quad C_k = X_k \cdot C_t \quad (\text{Gl. 29})$$

$C_t$  = absolute Konzentration an Nährstoffen [mM] (340 mM wurde gewählt).

**Tab. 12 . Zusammenstellung eines auf die verwendeten CHO-Zellen abgestimmten Fütterungsmediums nach den Berechnungen aus Gl. 6 –Gl. 29.**

Nährstoff	$\theta_{a,i}^P$ [mMol/mg Protein]	$\theta_k$ [mMol/Zellen]	$X_k$	$C_k$ [mM]	M [g/Mol]	C [g/l]
Glukose	-	$1,44 \cdot 10^{-8}$	0,828	281,52	180,16	50,75
Alanin	$7,06 \cdot 10^{-4}$	$2,23 \cdot 10^{-10}$	0,013	4,36	89,09	0,39
Arginin	$3,69 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-10}$	0,0067	2,29	174,2	0,40
Asparagin	$3,45 \cdot 10^{-4}$	$1,09 \cdot 10^{-10}$	0,0063	2,13	132,1	0,28
Asparaginsäure	$4,32 \cdot 10^{-4}$	$2,43 \cdot 10^{-10}$	0,014	4,75	133,1	0,63
Cystein	$2,20 \cdot 10^{-4}$	$6,96 \cdot 10^{-11}$	0,0040	1,36	121,2	0,17
Glutamat	$4,87 \cdot 10^{-4}$	$-8,44 \cdot 10^{-11}$	-0,0049	-1,25	147,1	-0,24
Glutamin	$3,06 \cdot 10^{-4}$	$3,35 \cdot 10^{-10}$	0,019	6,55	146,1	0,96
Glycin	$5,89 \cdot 10^{-4}$	$2,66 \cdot 10^{-10}$	0,015	5,20	75,05	0,39
Histidin	$1,65 \cdot 10^{-4}$	$5,22 \cdot 10^{-11}$	0,0030	1,02	155,2	0,16
Isoleucin	$3,61 \cdot 10^{-4}$	$1,14 \cdot 10^{-10}$	0,0066	2,23	131,2	0,29
Leucin	$5,89 \cdot 10^{-4}$	$1,86 \cdot 10^{-10}$	0,011	3,64	131,2	0,48
Lysin	$5,49 \cdot 10^{-4}$	$1,74 \cdot 10^{-10}$	0,010	3,40	146,2	0,50
Methionin	$1,33 \cdot 10^{-4}$	$4,21 \cdot 10^{-11}$	0,0024	0,82	149,2	0,12
Phenylalanin	$2,75 \cdot 10^{-4}$	$8,70 \cdot 10^{-11}$	0,0050	1,70	165,2	0,28
Prolin	$3,61 \cdot 10^{-4}$	$1,14 \cdot 10^{-10}$	0,0066	2,23	115,1	0,26
Serin	$5,57 \cdot 10^{-4}$	$1,76 \cdot 10^{-10}$	0,010	3,44	105,1	0,36
Threonin	$4,71 \cdot 10^{-4}$	$1,49 \cdot 10^{-10}$	0,0086	2,91	119,1	0,35
Tryptophan	$8,63 \cdot 10^{-4}$	$2,73 \cdot 10^{-10}$	0,016	5,34	204,2	1,09
Tyrosin	$2,75 \cdot 10^{-4}$	$8,70 \cdot 10^{-11}$	0,0050	1,70	181,2	0,31
Valin	$5,41 \cdot 10^{-4}$	$1,71 \cdot 10^{-10}$	0,0098	3,35	117,1	0,39
D- Biotin	-	$0,078 \cdot 10^{-11}$	0,00004	0,015	244,3	0,0037
Cholinechloride	-	$3,83 \cdot 10^{-11}$	0,0022	0,75	139,6	0,10
Folsäure	-	$0,14 \cdot 10^{-11}$	$8 \cdot 10^{-5}$	0,027	441,4	0,012
Myo- Inositol	-	$2,04 \cdot 10^{-11}$	0,0012	0,40	180,2	0,072
Nicotinamid	-	$0,557 \cdot 10^{-11}$	0,00032	0,11	122,1	0,013
Pyridoxal	-	$0,766 \cdot 10^{-11}$	0,00044	0,15	203,6	0,031
Riboflavin	-	$0,05 \cdot 10^{-11}$	$3 \cdot 10^{-5}$	0,0098	376,4	0,0037
Thiamin	-	$0,127 \cdot 10^{-11}$	$7 \cdot 10^{-5}$	0,025	337,3	0,0084
D-Ca-Pantothenat	-	$0,16 \cdot 10^{-11}$	$9 \cdot 10^{-5}$	0,031	476,5	0,015
Vitamin B <sub>12</sub>	-	$0,01 \cdot 10^{-11}$	$6 \cdot 10^{-6}$	0,0020	1355,4	0,0027

Die in Tab. 12 markierte Spalte gibt die Menge Substrat in Gramm an, die in einem Liter des Fütterungsmediums gelöst sein müssen. Der negative Wert für das Glutamat hängt damit zusammen, daß Glutamat von den Zellen produziert wird. Es braucht demnach im Fütterungsmedium nicht enthalten zu sein. Die wichtigste Nährstoffkomponente ist, deutlich zu erkennen, die Glukose, die den größten molaren Anteil  $X_k = 0,83$  besitzt. Dieses speziell auf die CHO-Zellen angepaßte Fütterungsmedium ist im Folgenden an den CHO-Zellen getestet worden. Xie et al. (1994a) schlagen als Fütterungsstrategie eine Fütterung vor, die nach Gleichung 30 durch Abschätzen des Zellwachstums auf ein Fütterungsvolumen schließen läßt.

$$\Delta V_n^f = \frac{\beta \cdot \Delta N_{t,n}}{C_t} - \left( \Delta V_{n-1}^f - \frac{\beta \cdot \Delta N_{t,n-1}^m}{C_t} \right) \quad (\text{Gl. 30})$$

$\Delta V_n^f$  = Fütterungsvolumen der n-ten Fütterung [L];  $\Delta N_{t,n}$  = Geschätzte Nettozunahme an Zellen im Intervall von der n-ten zur (n+1)-ten Fütterung [Zellen];  $\Delta V_{n-1}^f$  = Fütterungsvolumen der (n-1)-ten Fütterung [L];  $\Delta N_{t,n-1}^m$  = Gemessene Zunahme an Zellen im Intervall von der n-ten zur (n+1)-ten Fütterung [Zellen].

Das Fütterungsvolumen berechnet sich demnach aus der geschätzten Zahl an neu gebildeten Zellen multipliziert mit dem gesamtstöchiometrischen Koeffizienten dividiert durch die Nährstoffkonzentration im Medium. Dieses entspricht dem ersten Teil der Gleichung 30. Der zweite Teil ist ein Korrekturfaktor. In dem Klammer-Ausdruck wird die im nachhinein bestimmte Fütterungsmenge von der zuvor gefütterten abgezogen. Daraus ergibt sich die zuviel gefütterte Menge, die ihrerseits wieder von der aus der aktuellen Schätzung berechneten Fütterungsmenge abgezogen wird.

Die Idee des Modells ist, daß für jede neu gebildete Zelle eine bestimmte Menge an Nährstoffen dem Medium zugefügt wird, um den durch die Zellbildung verursachten Nährstoffverlust auszugleichen. Das Medium kann folglich als aus vielen kleinen Nährstoffpäckchen zusammengesetzt angesehen werden, die die Nährstoffe entsprechend den molaren Anteilen  $X_k$  beinhalten. Ein Nährstoffpäckchen wird für eine Zelle verbraucht. D.h., es reicht aus ein Substrat im Medium zu überwachen und konstant zu halten. Wenn dieses geschieht, dann dürfte nach dem Modell auch bei keinem der anderen Substrate eine Limitierung auftreten. Der Einfachheit halber wird die bei der täglichen Analytik bestimmte Glukosekonzentration als Kontrollsubstrat

gewählt. Diese Abschätzungen fordern wenig variierende Zellen, die immer gleich gut wachsen. Das Umstellen auf die Fütterung führt aber in den ersten Experimenten (Daten nicht gezeigt) dazu, daß die Zellen ihr Wachstum zunächst verlangsamen, was eine Überfütterung zur Folge hatte. Durch den Korrekturterm wird eine weitere Fütterung unmöglich und die Zellen, die ihre Glukose trotz schlechteren Wachstums verbrauchen, sterben ab. Daher wird die Fütterungsstrategie umgestellt.

Es wird versucht, die Fütterung so vorzunehmen, daß eine Glukosekonzentration von 2,8 mM gehalten werden kann. Wegen der kleinen Reaktionsvolumina muß auf eine kontinuierliche Fütterung verzichtet werden. Die Fütterung erfolgt alle 12 Stunden nach Bestimmung der Glukosekonzentration in den entsprechenden Mengen.

#### 4.5 Erprobung und Weiterentwicklung des Fütterungsmediums

Das im Kap. 4.4.9 berechnete Fütterungsmedium wurde zuerst mit einer gewöhnlichen Batch-Kultur verglichen, um zu klären, ob die Fütterung dieses Cocktails von Aminosäuren und Vitaminen einen Vorteil bringt.

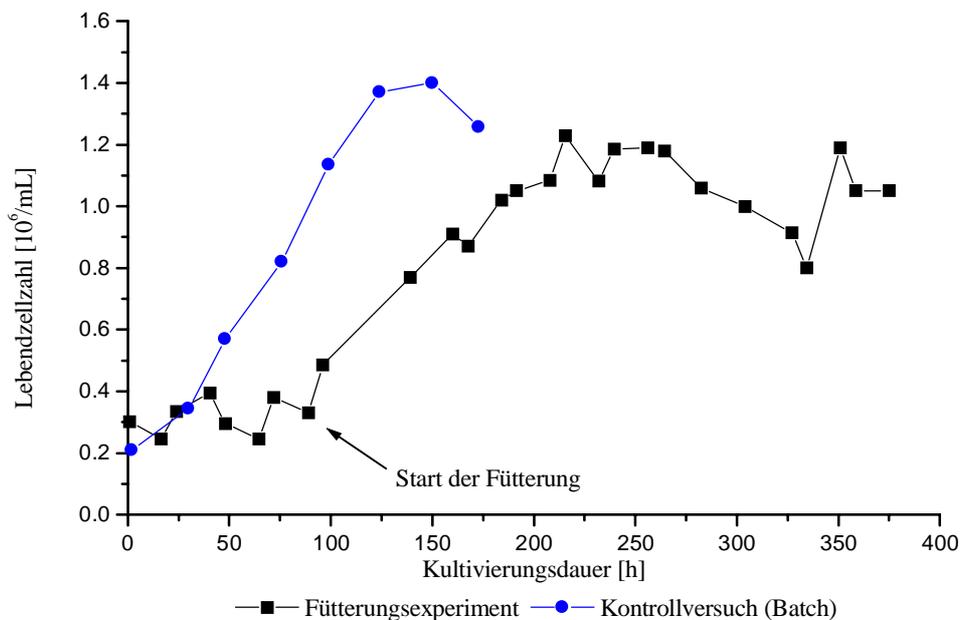


Abb. 44 Vergleich einer Batch- mit einer Fed-Batch-Kultur

Bei dem in Abb. 44 gezeigten Fed-Batch-Experiment wird das Startmedium in seiner Nährstoffkonzentration auf 50% des in der Kontrolle verwendeten Mediums gesenkt. Hierdurch soll verhindert werden, daß die Zellen durch das Basalmedium schon zu stark mit Nährstoffen versorgt werden und dadurch toxische Metabolite, wie z.B. Ammonium, angereichert werden. Durch diese Verdünnung kommt es in der Anfangsphase des Experiments zu einer Verzögerung des Wachstums im Vergleich zu der Batch-Kultur. Der Fütterungsstart nach der 72. Kultivierungsstunde initiiert sofort das Zellwachstum, das allerdings schlechter als das der Batch-Kultur ist. Die Wachstumsrate von  $\mu = 0,21 \text{ d}^{-1}$  im Fed-Batch-Experiment erreicht lediglich 60% der Wachstumsrate des Batch-Experiments ( $\mu = 0,35 \text{ d}^{-1}$ ). Eine Erklärung für dieses schlechtere Abschneiden mag in den schlechteren Anfangsbedingungen gelegen haben. Während die Batch-Kultur direkt aus der exponentiellen Phase ins frische, nährstoffhaltige Medium angeimpft wird, ist bei der Fed-Batch Kultur das exponentielle Wachstum erst einmal durch das nährstoffarme Medium gebremst. Die Wachstumsrate wird somit gedrückt und kann nicht den maximal möglichen Wert annehmen. Die maximal erreichte Zelldichte von  $1,2 \cdot 10^6$  Zellen/mL entspricht in etwa der des Kontrolllexperiments ( $1,4 \cdot 10^6$  Zellen/mL). Hier wird deutlich, daß die Zellen gut auf das Fütterungsmedium ansprechen, denn nach Beginn der Fütterung, fangen die Zellen an zu wachsen. Die Fütterung wird über die Glukosekonzentration gesteuert. Es wird versucht immer eine Konzentration von 2,8 mM beizubehalten. Wegen der diskontinuierlichen Fütterung kommt es aber zu Schwankungen im Bereich von 1 mM bis 4 mM. Die Schwankungen in der Lebendzellzahl des Fed-Batch-Experiments sind durch die Fütterung zu erklären. Die Betrachtung der Kultivierung nach der 190. Stunde zeigt, daß im Vergleich zu der Batch-Kultur die Stationäre Phase verlängert werden konnte (43 h gegenüber 26 h im Kontrolllexperiment). Das Absterben setzt erst nach 265 Stunden ein. Die Dauer der Kultivierung kann somit von 173 h (Batch) auf 282 h um 63% verlängert werden.

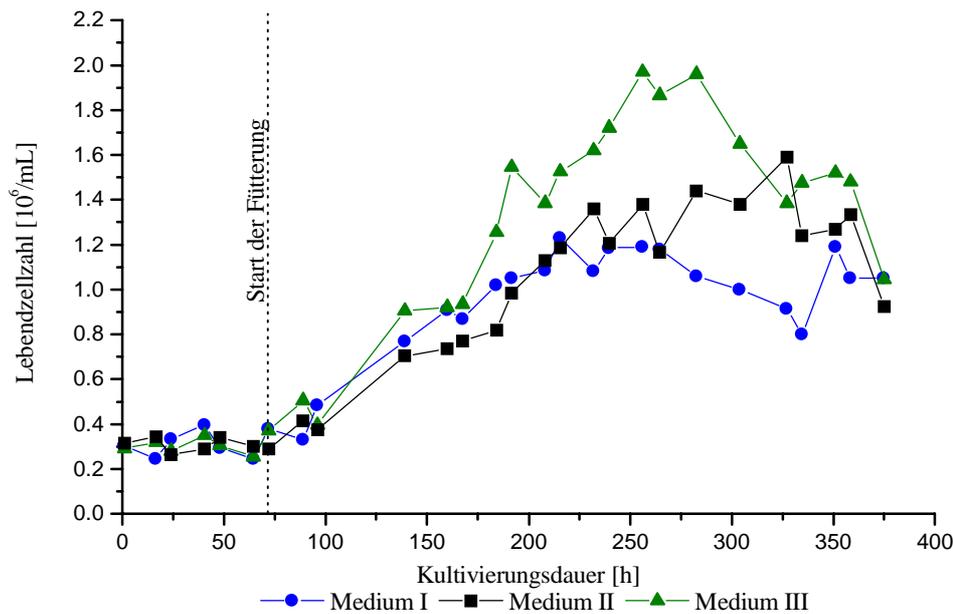
Parallel zu dieser ersten Fütterung mit dem auf die eingesetzten CHO-Zellen abgestimmten Medium werden zwei weitere Fütterungen durchgeführt, die mit anderen Fütterungsmedien versorgt werden. Diese Medien berechnen sich auf die gleiche Weise, nur daß hier ausschließlich Literaturdaten zur Berechnung herangezogen werden, die sich deutlich von den ermittelten unterscheiden. Es soll damit überprüft werden, inwieweit überhaupt die genaue Zusammensetzung des Fütterungsmediums einen Einfluß auf das Zellwachstum hat. Diesen Sachverhalt zu klären erscheint besonders

wichtig, da bekannt ist, daß Zellen sich auf ihre Umgebung einstellen können und sogar die Zellzusammensetzung sich mit veränderten Kultivierungsbedingungen ändert (Bonarius 1996). Es könnte somit sein, daß ein verändertes Fütterungsmedium lediglich eine andere Zellzusammensetzung und einen etwas veränderten Zellmetabolismus zur Folge hat, die Wachstumsgeschwindigkeit und die max. Zelldichte aber konstant bleiben. Die verwendeten Fütterungsmedien sind im Vergleich in Tab. 13 dargestellt.

**Tab. 13 Vergleich der Fütterungsmedien berechnet nach experimentellen Daten (I) und Literaturdaten (II, (Bonarius 1996)) und (III; (Creighton 1996)).**

Verbindung	Medium I [g/L]	Medium II [g/L]	Medium III [g/L]
Glukose	50,75	18,46	25,33
Alanin	0,39	1,75	1,49
Arginin	0,40	1,79	1,52
Asparagin	0,28	1,27	1,08
Asparaginsäure	0,63	1,26	0,94
Cystein	0,17	0,74	0,63
Glutamat	0	0	0
Glutamin	0,96	3,25	2,76
Glycin	0,39	1,74	1,36
Histidin	0,16	0,71	0,61
Isoleucin	0,29	1,32	1,12
Leucin	0,48	2,15	1,83
Lysin	0,50	2,23	1,90
Methionin	0,12	0,55	0,47
Phenylalanin	0,28	1,26	1,07
Prolin	0,26	1,16	0,98
Serin	0,36	1,64	1,39
Threonin	0,35	1,33	1,56
Tryptophan	1,09	0,49	0,42
Tyrosin	0,31	1,39	1,18
Valin	0,39	1,77	1,50
D- Biotin	0,0037	0,016	0,021
Cholinechlorid	0,10	0,45	0,58
Folsäure	0,012	0,052	0,067
Myo-Inositol	0,072	0,31	0,47
Nicotinamid	0,013	0,057	0,074
Pyridoxal	0,031	0,13	0,17
Ribovlavin	0,0037	0,016	0,020
Thiamin	0,0084	0,036	0,047
D-Ca-Pantothenat	0,015	0,064	0,083
Vitamin B <sub>12</sub>	0,0027	0,011	0,015

Während das auf die CHO-Zellen abgestimmte Medium I den Schwerpunkt auf die Glukose legt, haben die anderen beiden Medien ein größeres Gewicht bei den Aminosäuren. Auch die Vitamine sind in den Medien II und III stärker vertreten.



**Abb. 45** Vergleich der Lebendzellzahlen von Kulturen, die mit unterschiedlichen Fütterungsmedien versorgt werden.

In Abb. 45 sind die Kulturen mit den verschiedenen Medien im Vergleich dargestellt. In der Anfangsphase der Kultivierung verhalten sich alle Medien in etwa gleich. Nach ca. 150 Stunden kristallisiert sich Medium III als das Potenteste heraus. Medium I und II erreichen in etwa gleiche Zelldichten, nur daß die Kultur mit Medium I schneller anfängt abzusterben. Das speziell für die Zellen berechnete Medium schneidet am schlechtesten von den drei Vergleichsmedien ab. Vergleicht man die Zusammensetzung in Tab. 13 so fällt auf, daß die Medien, die ihren Schwerpunkt nicht auf die Glukose gelegt haben, besser abschneiden. Der überproportionale Anteil von 80% Glukose im Medium I wirkt sich gegenüber den Medien mit einem Anteil von 40% (Medium III) und 30% (Medium II) nachteilig aus. Ein Vergleich der stöchiometrischen Koeffizienten, die zur Berechnung herangezogen werden zeigt, daß die der Medien I und II besonders gut übereinstimmen (Tab. 14). Der Unterschied besteht hauptsächlich in dem Koeffizienten für die Glukose. Der stöchiometrische Koeffizient gibt an wieviel Millimol des betreffenden Stoffes zur Bildung einer Zelle verbraucht wird. Gute Übereinstimmungen lassen folglich die Verhältnisse der Nährstoffkomponenten zueinander gleich sein. Bei dem Medium III liegen die stöchiometrischen Koeffizienten der Aminosäuren generell unter denen der Medien I und II. Der Anteil an Glukose liegt zwischen den Medien I und II. Es scheint, daß im Medium I der Glukoseanteil und in

Medium II der Aminosäureanteil zu groß ist. Das ausgewogenere Medium III liefert daher die besseren Ergebnisse.

**Tab. 14** Vergleich der stöchiometrischen Koeffizienten für die Berechnung der Fütterungsmedien I, II und III.

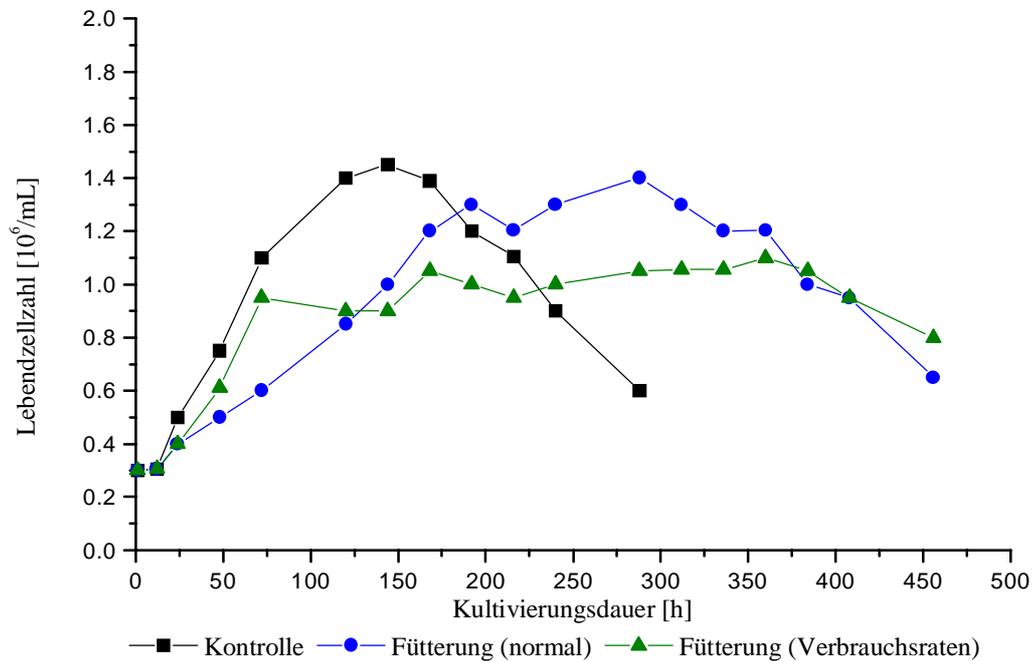
Komponente	Medium I $\theta_k$ [mMol/Zellen]	Medium II $\theta_k$ [mMol/Zellen]	Medium III $\theta_k$ [mMol/Zellen]
Glukose	$1,44 \cdot 10^{-8}$	$1,19 \cdot 10^{-9}$	$1,26 \cdot 10^{-9}$
Alanin	$2,23 \cdot 10^{-10}$	$2,34 \cdot 10^{-10}$	$1,54 \cdot 10^{-10}$
Arginin	$1,17 \cdot 10^{-10}$	$1,22 \cdot 10^{-10}$	$8,04 \cdot 10^{-11}$
Asparagin	$1,09 \cdot 10^{-10}$	$1,14 \cdot 10^{-10}$	$7,51 \cdot 10^{-11}$
Asparaginsäure	$2,43 \cdot 10^{-10}$	$2,51 \cdot 10^{-10}$	$1,45 \cdot 10^{-10}$
Cystein	$6,96 \cdot 10^{-11}$	$7,30 \cdot 10^{-11}$	$4,79 \cdot 10^{-11}$
Glutamat	$-8,44 \cdot 10^{-11}$	$-7,96 \cdot 10^{-11}$	$-9,03 \cdot 10^{-12}$
Glutamin	$3,35 \cdot 10^{-10}$	$2,63 \cdot 10^{-10}$	$1,73 \cdot 10^{-10}$
Glycin	$2,66 \cdot 10^{-10}$	$2,76 \cdot 10^{-10}$	$1,67 \cdot 10^{-10}$
Histidin	$5,22 \cdot 10^{-11}$	$5,48 \cdot 10^{-11}$	$3,59 \cdot 10^{-11}$
Isoleucin	$1,14 \cdot 10^{-10}$	$1,20 \cdot 10^{-11}$	$7,86 \cdot 10^{-11}$
Leucin	$1,86 \cdot 10^{-10}$	$1,95 \cdot 10^{-10}$	$1,28 \cdot 10^{-10}$
Lysin	$1,74 \cdot 10^{-10}$	$1,82 \cdot 10^{-10}$	$1,19 \cdot 10^{-10}$
Methionin	$4,21 \cdot 10^{-11}$	$4,41 \cdot 10^{-11}$	$2,89 \cdot 10^{-11}$
Phenylalanin	$8,70 \cdot 10^{-11}$	$9,13 \cdot 10^{-11}$	$5,98 \cdot 10^{-11}$
Prolin	$1,14 \cdot 10^{-10}$	$1,20 \cdot 10^{-10}$	$7,86 \cdot 10^{-11}$
Serin	$1,76 \cdot 10^{-10}$	$1,86 \cdot 10^{-10}$	$1,22 \cdot 10^{-10}$
Threonin	$1,49 \cdot 10^{-10}$	$1,56 \cdot 10^{-10}$	$1,03 \cdot 10^{-10}$
Tryptophan	$2,73 \cdot 10^{-10}$	$2,86 \cdot 10^{-11}$	$1,88 \cdot 10^{-11}$
Tyrosin	$8,70 \cdot 10^{-11}$	$9,13 \cdot 10^{-11}$	$5,89 \cdot 10^{-11}$
Valin	$1,71 \cdot 10^{-10}$	$1,80 \cdot 10^{-10}$	$1,18 \cdot 10^{-10}$
D- Biotin	$0,078 \cdot 10^{-11}$	$0,078 \cdot 10^{-11}$	$0,078 \cdot 10^{-11}$
Cholinechlorid	$3,83 \cdot 10^{-11}$	$3,83 \cdot 10^{-11}$	$3,83 \cdot 10^{-11}$
Folsäure	$0,14 \cdot 10^{-11}$	$0,14 \cdot 10^{-11}$	$0,14 \cdot 10^{-11}$
Myo-Inositol	$2,04 \cdot 10^{-11}$	$2,04 \cdot 10^{-11}$	$2,04 \cdot 10^{-11}$
Nicotinamid	$0,557 \cdot 10^{-11}$	$0,557 \cdot 10^{-11}$	$0,557 \cdot 10^{-11}$
Pyridoxal	$0,766 \cdot 10^{-11}$	$0,766 \cdot 10^{-11}$	$0,766 \cdot 10^{-11}$
Ribovlavin	$0,05 \cdot 10^{-11}$	$0,05 \cdot 10^{-11}$	$0,05 \cdot 10^{-11}$
Thiamin	$0,127 \cdot 10^{-11}$	$0,127 \cdot 10^{-11}$	$0,127 \cdot 10^{-11}$
D-Ca-Pantothenat	$0,16 \cdot 10^{-11}$	$0,16 \cdot 10^{-11}$	$0,16 \cdot 10^{-11}$
Vitamin B <sub>12</sub>	$0,01 \cdot 10^{-11}$	$0,01 \cdot 10^{-11}$	$0,01 \cdot 10^{-11}$

Das Experiment zeigt, daß die Medienzusammensetzung bei einem Fütterungsmedium von Bedeutung ist. Es zeigt leider auch, daß die Berechnung des Mediums mit Daten speziell für eine Zelllinie schlechtere Ergebnisse liefert, als die Berechnung mit Hilfe von Durchschnittswerten für tierische Zellen. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann wieder in der Flexibilität der Zellen zu finden sein. Die Zellen verändern sich wie schon mehrfach erwähnt, mit veränderten Kultivierungsbedingungen. Jeder kleine

Parameterwechsel, wie Temperatur- Substratkonzentrations- oder auch pH-Schwankungen, verändert die Bedürfnisse. Wird eine Probe gezogen und ermittelt man daraus die Zellzusammensetzung, so handelt es sich um eine Momentaufnahme eines sich ständig wandelnden Systems. Wird aus diesen Daten ein Fütterungsmedium berechnet, so ist dieses für die Bedingungen bei der Probenahme optimiert. Da aber ständig variierende Bedingungen vorliegen, kann das Medium die Zellen nicht optimal versorgen. Wird das Fütterungsmedium aus Daten berechnet, die sich aus Durchschnittswerten von vielen verschiedenen Zelllinien ergeben, so wird ein Medium erhalten, daß zwar nicht für eine spezielle Situation optimal ist, aber die Zusammensetzung ist so ausgewogen, daß viele Bedingungen zufriedenstellend abgedeckt werden. Dieses erklärt, warum das Fütterungsmedium III das beste Wachstum erzeugt.

Ein ähnliches Problem tritt bei der Zusammenstellung des Fütterungsmediums aus Verbrauchsraten auf, die in Batch-Kulturen gewonnen werden. Die Verbrauchsraten sind auf die Batch-Bedingungen abgestimmt und dafür optimiert. Das Medium kommt aber in einem Fed-Batch-Experiment zum Einsatz und kann die Zellen daher nur ungenügend mit Nährstoffen versorgen. In Abb. 46 ist solch ein Experiment aufgeführt. Die Daten wurden freundlicherweise von Claudia Altamirano Gomez (Universität Autonoma de Barcelona) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um dieselbe Zelllinie, bei der das Fütterungsmedium anhand von Verbrauchsraten erstellt wird. Es kann deutlich gesehen werden, daß auch bei dieser Fütterungskultur das Zellwachstum im Vergleich zum Batch-Experiment verlangsamt ist. Die hier erreichte maximale Zelldichte liegt mit  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen/mL sogar deutlich unter der des Batch-Experiments mit  $1,45 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Interessant ist, daß die Fütterung mit dem unangepaßten Startmedium bessere Ergebnisse liefert ( $1,4 \cdot 10^6$  Zellen/mL), die zumindest mit denen des Kontroll-experiments annähernd mithalten können. Auch hier wird wieder die Spezialisierung des Fütterungsmediums auf eine bestimmte Kultivierungssituation vorgenommen. Die Verbrauchsraten werden in einem Batch-Experiment in der exponentiellen Phase bestimmt, aber dieses ist auch wieder eine Momentaufnahme, die eine Kultur nur unzureichend beschreibt. Das Startmedium hingegen wird nicht angepaßt. Es soll die Grundlage für die Kultivierung bilden und wird somit allgemein gehalten. Eine Fütterung mit diesem Medium hat wieder mehr Erfolg, da das Fütterungsmedium nicht spezifisch für eine Situation erstellt wird. Daß die Ergebnisse trotzdem nicht besser als die der Batch-Kultur sind, hängt damit zusammen, daß es sich

um ein Basalmedium und nicht um ein Fütterungsmedium handelt, das nährstoffreicher ist.

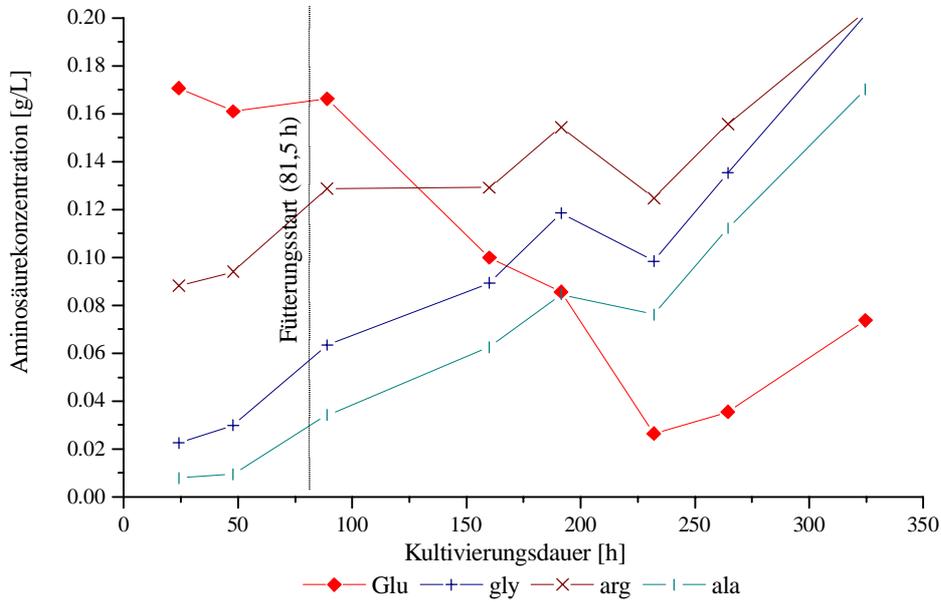


**Abb. 46** Vergleich der Lebendzellzahlen einer Batch-Kultur (Kontrolle), Fütterung mit Startmedium (normal) und einer Fütterung mit einem durch Verbrauchsdaten zusammengestellten Fütterungsmediums (Verbrauchsdaten) (Claudia Altamirano Gomez 2000).

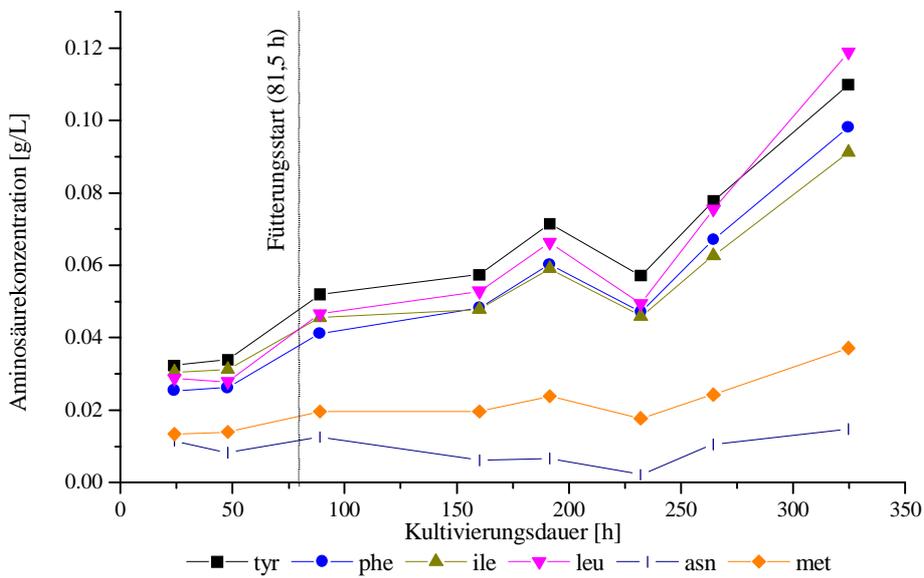
Die in dieser Arbeit gewählte Methode zur Erstellung eines Fütterungsmediums hat gegenüber der Methode, die über die Berechnung von Verbrauchsdaten geht, keine Nachteile. Das erste über die stöchiometrische Methode erstellte Fütterungsmedium erzielte sogar vergleichsweise gute Ergebnisse (Abb. 44).

Die Betrachtung der Aminosäurekonzentrationen der Fütterungskultur (Medium III), die in Abb. 45 aufgeführt wurde, zeigt in Abb. 47b, daß auch das Fütterungsmedium III nicht ganz ausgewogen ist. Bei Aminosäuren wie Asparagin (asn) und Methionin (met) (Abb. 47a) stimmt die gefütterte Menge mit der verbrauchten Menge gut überein. Bei Tyrosin (tyr), Phenylalanin (phe), Isoleucin (ile) und Leucin (leu) wird die Konzentration durch die Fütterung erst einmal angehoben, bleibt dann aber annähernd konstant. Nach der 230. Kultivierungsstunde ist bei den Konzentrationen aller Aminosäuren (Abb. 47a und b) ein Anstieg zu beobachten. Das heißt ab diesem Zeitpunkt wird die Kultur überfüttert. Besonders fällt dieses in der Abb. 47b auf, in der

die Glutamatkonzentration (glu) bis zur 230. Stunde abnimmt und anschließend wieder ansteigt. Dieser Punkt korreliert sehr gut mit dem Eintreten der stationären Phase der Fütterungskultur in Abb. 45.

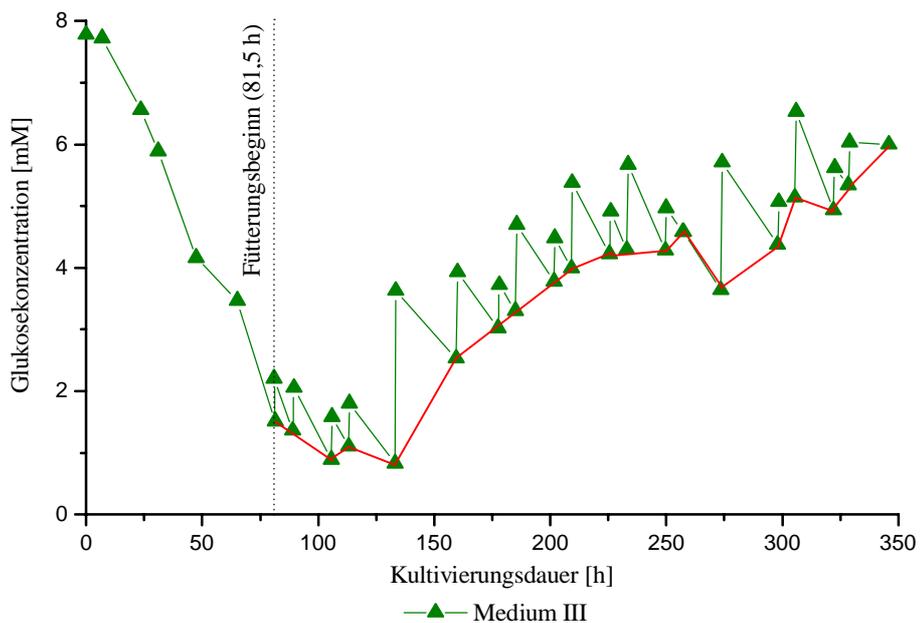


**Abb. 47a** Verlauf der Aminosäurekonzentrationen der in Abb. 45 dargestellten Fütterungskultur mit dem Medium III.



**Abb. 47b** Verlauf der Aminosäurekonzentrationen der in Abb. 45 dargestellten Fütterungskultur mit dem Medium III.

Es scheint, als würde das Zellwachstum auf Grund eines inhibierenden Stoffes eingestellt. Eine Nährstofflimitierung ist bei Betrachtung der Glukose- (Abb. 48) und Aminosäurekonzentrationen (Abb. 47a und b) weitgehend auszuschließen. Trotzdem ist zu bemerken, daß der Anteil an Glycin (gly), Arginin (arg) und Alanin (ala) im Fütterungsmedium zu hoch ist. Der Glutamatanteil (glu) hingegen, der als Ersatz von Glutamin (gln) eingesetzt wird, muß erhöht werden, da die Glutamatkonzentration bis zum Einsetzen der stationären Phase stark abgenommen hat.

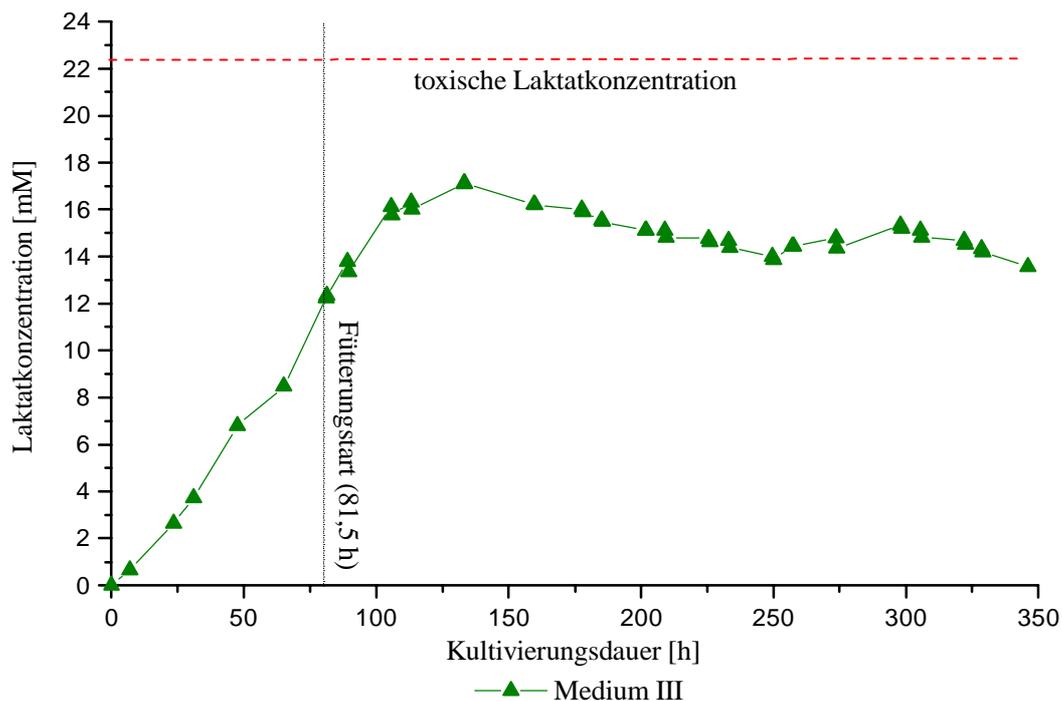


**Abb. 48** Verlauf der Glukosekonzentration des Fütterungsversuchs aus Abb. 45 mit Medium III (Kontrolle); Die rote Linie stellt die gemessene Konzentration dar.

Beim Einsetzen der Fütterung ist der Glukosewert unter den gesetzten Sollwert von 2 mM abgesunken. Zum Ausgleich wird so gefüttert, daß mit der nächsten Messung der Sollwert erhalten wird. Nach 159 h konnte dann auch ein Wert von 2,5 mM gemessen werden. Es wird wegen des Zellwachstums für den nächsten Kultivierungsabschnitt von einem etwas höheren Verbrauch ausgegangen und deshalb etwas mehr nachgefüttert. Leider bestätigt sich dieses Verhalten nicht und die Glukosekonzentration liegt in der 177. Kultivierungsstunde bei 3 mM. Die Fütterung wird im Folgenden so eingestellt, daß sich die Glukosekonzentration bei 4 mM stabilisiert. Erst bei Erreichen der Stationären Phase gerät die Fütterung wieder außer Kontrolle und die Konzentration im Kulturüberstand erhöht sich auf Werte bis zu 6 mM.

Da die Mehrheit der Aminosäuren bis zur 230. Kultivierungsstunde recht ausgewogen vorliegt, kann davon ausgegangen werden, daß bei dem Fütterungsmedium III nur der Anteil an Glukose, Glycin, Arginin und Alanin zu hoch ist.

Bei der Verstoffwechslung von Glukose wird in der Regel Laktat frei, das in höheren Konzentrationen auf die Zellen toxisch wirkt. Konzentrationen von 22,2 mM Laktat zeigen sich als wachstumshemmend und fördern das Zellsterben. Bei der Fütterungskultur, in der 30 mM Glukose verstoffwechselt werden, könnte bei schlechter Ausnutzung der toxische Bereich erreicht werden. Die Betrachtung der Laktatkonzentration in Abb. 49 zeigt aber, daß nach einem anfänglich starken Anstieg der Laktatkonzentration auf 17 mM ab der 133. Kultivierungsstunde ein Rückgang bis auf 13,56 mM am Kultivierungsende zu beobachten ist. Eine toxische Wirkung des Laktats ist demnach auszuschließen.

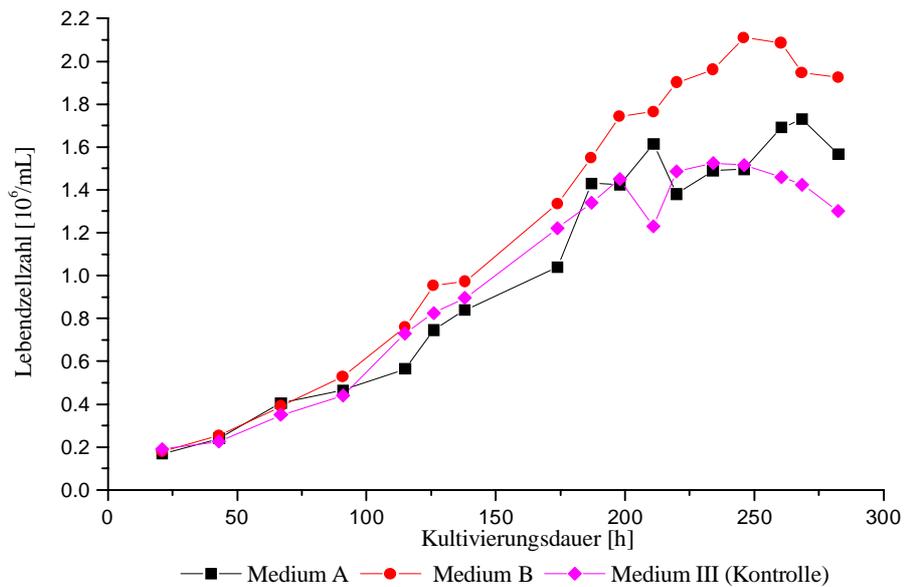


**Abb. 49** Verlauf der Laktatkonzentration des Fütterungsversuchs aus Abb. 45 mit Medium III (Kontrolle).

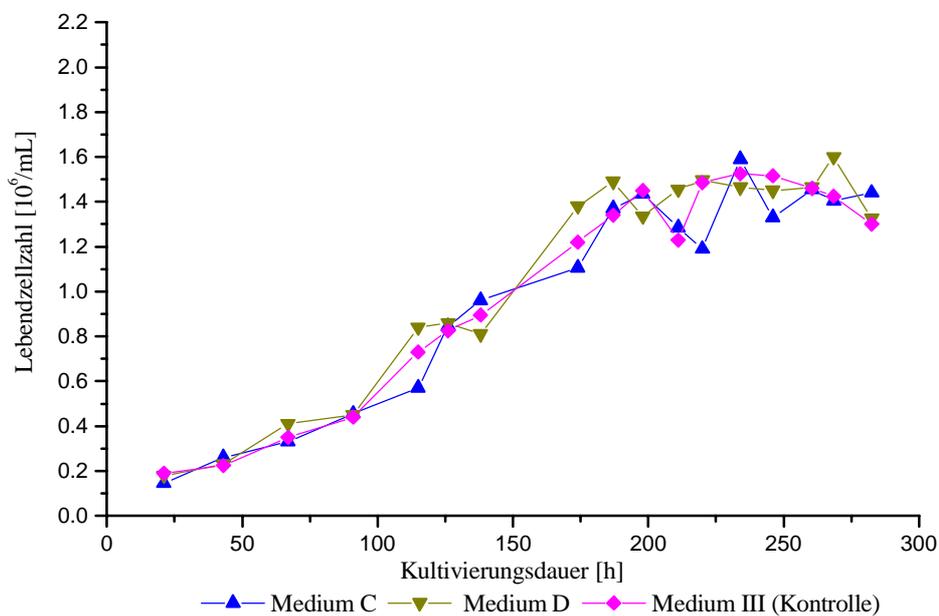
Um herauszufinden, ob einer der verwendeten Nährstoffe durch die Fütterung in Konzentrationen vorliegt, die inhibierend oder toxisch sind, werden die Medienbestandteile in verschiedene Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe befinden

sich die stark verstoffwechselten Substrate wie Glukose und Glutamat, in der zweiten Gruppe befinden sich die weniger stark verstoffwechselten Aminosäuren und in der dritten Gruppe die Vitamine, die von den Zellen sehr wenig konsumiert werden. Hier kommt es leicht zu einer Überdosierung. Aus diesen Gruppen werden Fütterungsmedien erstellt in denen jeweils eine Gruppe ca. dreifach konzentriert vorlag. Zusätzlich wird noch ein Fütterungsmedium hergestellt, das die gleiche Zusammensetzung wie das verbesserte Medium III besitzt, aber noch zusätzlich mit  $\text{FeSO}_4$  ( $5,65 \cdot 10^{-4}$  g/L),  $\text{ZnSO}_4$  ( $5,75 \cdot 10^{-4}$  g/L), Hepes (5,96 g/L), Insulin (0,01 g/L), Fe-PIH ( $6,26 \cdot 10^{-3}$  g/L) und Lipidkonzentrat 3 mL/L (Sigma) angereichert wird. Sollte eine der Komponentengruppen inhibierende Konzentrationen bei der Fütterung hervorbringen, so müßte dieses bei gleichmäßiger Fütterung aller Kulturen, bei der betreffenden Kultur zu einer Wachstumsstagnation führen.

In Abb. 50a und b ist zu sehen, daß es bei den Kultivierungen keine Verschlechterung gegenüber der Kontrollkultur gibt. Vielmehr ist in Abb. 50a der Verlauf der Kultur mit dem Medium B vorteilhafter. Es verwundert nicht, daß bei dieser Kultur bessere Zellzahlen erreicht werden, wenn berücksichtigt wird, daß bei dem Fütterungsmedium B die Glutamatkonzentration ebenfalls erhöht ist. Nach der Aminosäureanalyse der Fütterungskultur mit dem Medium III (Abb. 47b) ist das Glutamat als Substrat identifiziert worden, das in nicht ausreichendem Maße, wenn auch nicht unbedingt limitierend, vorliegt. Werden die Konzentrationen von Valin (val) und Threonin (thr) betrachtet, so fällt auf, daß sie besonders schnell steigen und einen hohen Wert erreichen (Abb. 52 und 53). Die Konzentrationen erreichen immer im Bereich von der 200. bis 250. Kultivierungsstunde Werte um 0,3 g/L. Bei genauer Betrachtung der Abb. 50b fällt auf, daß die Kultur mit den angereicherten Aminosäuren (Medium C) stärkeren Schwankungen in der Lebendzellzahl unterliegt. Dieses könnte auf ein früheres Erreichen einer inhibierenden Konzentration einer Komponente hindeuten. Ein Vergleich der Kulturen zeigt, daß das Ansteigen der Lebendzellzahl allgemein zwischen der 200. und 250. Kultivierungsstunde zum Stillstand kommt.

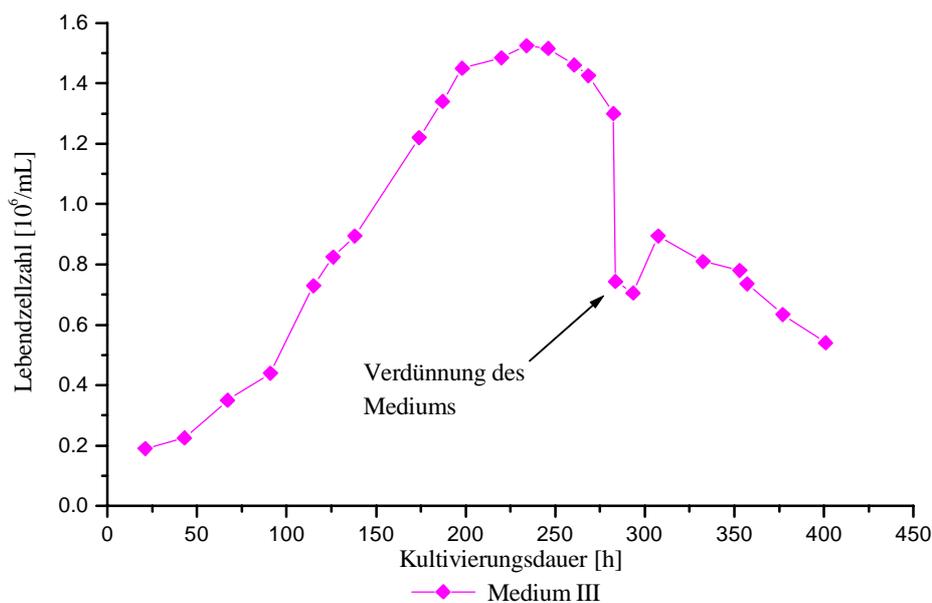


**Abb. 50a** Vergleich der Fütterungsmedien mit verschiedenen Komponentenschwerpunkten; Medium A (zusätzliche Salze), Medium B (mehr Glukose, asp, glu, asn, arg) und Medium III (Kontrollversuch).



**Abb. 50b** Vergleich der Fütterungsmedien mit verschiedenen Komponentenschwerpunkten; Medium C (mehr restl. Aminosäuren), Medium D (mehr Vitamine) und Medium III (Kontrollversuch).

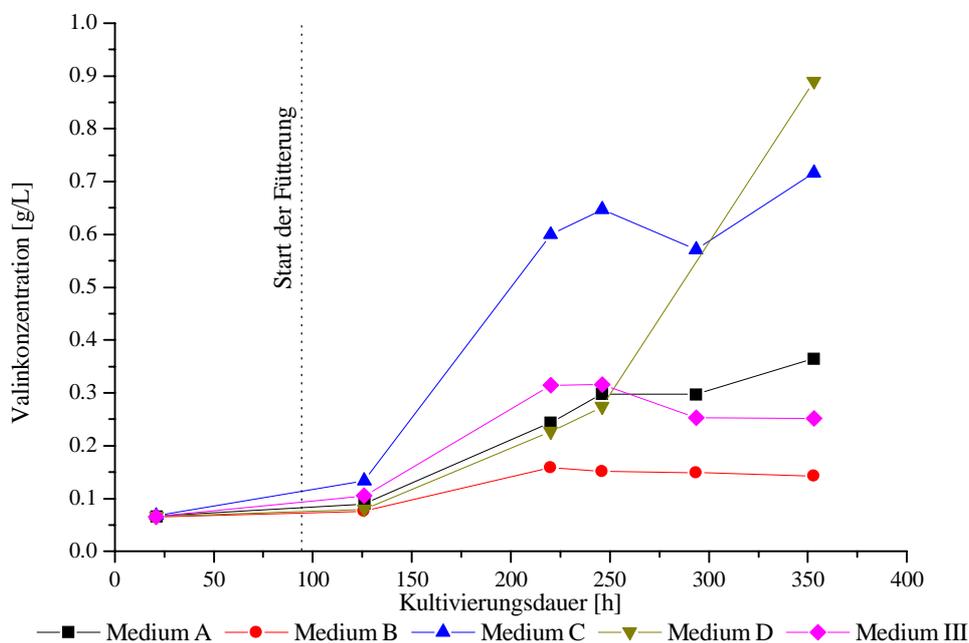
Durch Verdünnen des Kulturüberstandes mit einer Salzlösung, die zum Angleichen der Osmolalität die Salze des Basalmediums enthält, soll geklärt werden, ob ein inhibierender Stoff vorliegt. Denn wird die inhibierende Komponente unter einen bestimmten Schwellenwert verdünnt, so müßte das Zellwachstum wieder angeregt werden. Wie in Abb. 51 gut zu erkennen ist, kommt es nach der Verdünnung des Mediums kurzfristig wieder zu einem vermehrten Zellwachstum, das allerdings nur von kurzer Dauer ist. Die Verdünnung wird in allen Kulturen durchgeführt, der Übersicht halber ist aber nur eine Kultur beispielhaft dargestellt. Der Effekt ist in den anderen Kulturen (außer Medium C) ähnlich zu beobachten. Da die Beobachtung bei allen Kulturen (außer Medium C) zu machen ist, muß überlegt werden, ob eine der beiden Aminosäuren (val, thr) inhibierend wirkt. Das Verdünnen hätte somit bei der Kultur mit dem Fütterungsmedium C nicht ausgereicht, um die Valin- bzw. Threoninkonzentration unter den kritischen Wert von 0,3 g/L zu bringen.



**Abb. 51** Betrachtung der Lebendzellzahl eines Fütterungsexperiments mit Verdünnung des Kulturüberstandes mit einer Salzlösung bei der 283. Kultivierungsstunde.

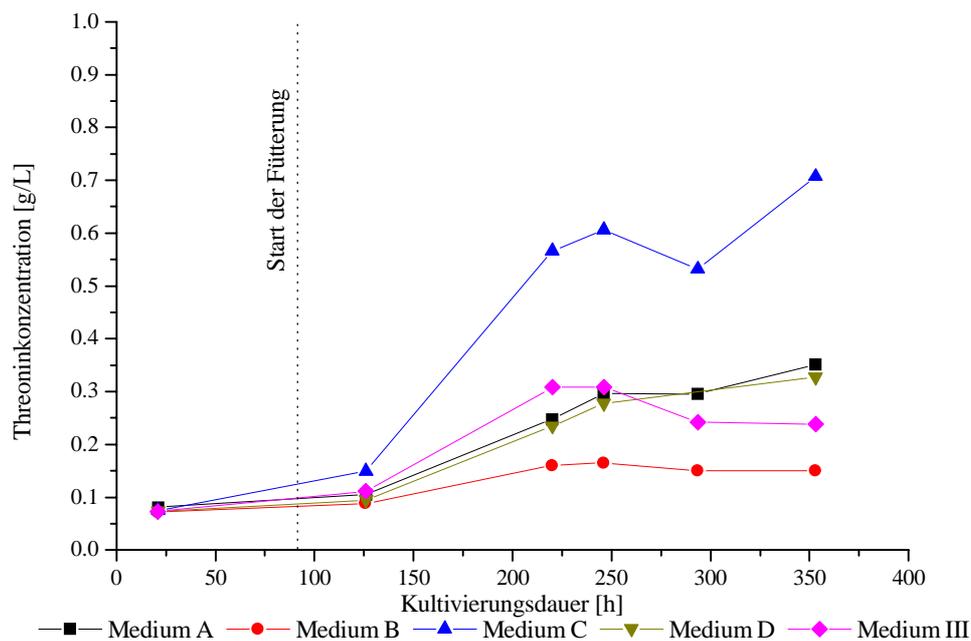
Abb. 52 zeigt die Valinkonzentrationen. Lediglich Medium III (Kontrolle) und Medium B werden ausgewogen gefüttert. Zwar ist am Anfang der Fütterung bei diesen Kulturen ein Anstieg der Valinkonzentration zu beobachten, aber im Laufe der Kultivierung bleiben die Konzentrationsänderungen vernachlässigbar. Die anderen Kulturen weisen eine kontinuierliche Konzentrationszunahme an Valin auf. Das

Fütterungsmedium beinhaltet folglich einen zu großen Valinanteil, was zu einer Überfütterung führt. Die Betrachtung des Konzentrationsverlaufs in der mit Medium C gefütterten Kultur zeigt, daß der vermeintlich kritische Konzentrationswert von 0,3 g/L Valin nach ca. 150 Stunden erreicht wird. Das Wachstum geht aber bis zur 180. Kultivierungsstunde weiter. Außerdem erreicht die besser wachsende Kultur mit dem Fütterungsmedium B während der ganzen Kultivierungsdauer den potentiell kritischen Wert nicht, kommt aber trotzdem in eine stationäre Phase. Valin scheidet somit als inhibierende Komponente aus, kann aber in den nächsten Fütterungen weniger stark zugefügt werden.



**Abb. 52** Vergleich der Konzentrationen an Valin (val) in den Kulturen mit den Fütterungsmedien A, B, C, D und Medium III.

Für das in Abb. 53 aufgeführte Threonin gilt dasselbe, wie für das Valin (Abb. 52). Zwar wird mit dieser Aminosäure überfüttert, doch scheidet eine Inhibierung des Zellwachstums durch den Verlauf der Kultur mit dem Medium B aus, die trotz geringer Threoninwerte das Wachstum einstellt. Die Versuche zeigen folglich, daß keine der Fütterungskomponenten durch Überfütterung so angereichert wird, daß die Kulturen in eine stationäre Phase gezwungen werden.

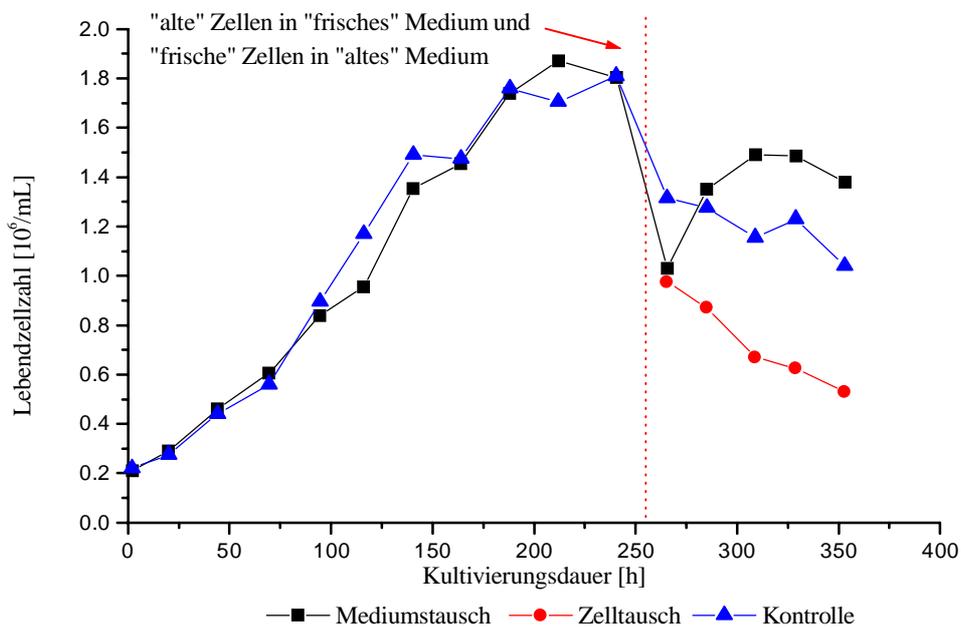


**Abb. 53** Vergleich der Konzentrationen an Threonin (thr) in den Kulturen mit den Fütterungsmedien A, B, C, D und Medium III.

Der Verlauf der Aminosäurekonzentrationen für den Kontrollversuch (Medium III) entspricht in etwa dem aus dem Vorexperiment. Auf eine Darstellung wird hier deshalb verzichtet. Auch die restlichen Aminosäuren der Kulturen mit den zusätzlichen Salzen (Medium A) und den zusätzlichen Vitaminen (Medium D) liefern ein ähnliches Bild wie die Kontrollkultur, nur daß die Konzentrationen etwas niedriger liegen. Bei Medium B mit der zusätzlichen Glukose und den Aminosäuren asp, asn, arg und glu entsprechen die Aminosäurekonzentrationen, bis auf die angereicherten ebenfalls der Kontrolle. Lediglich die Kultur mit dem Fütterungsmedium C hat einen leichten Anstieg aller stärker gefütterten Aminosäuren zu verzeichnen.

Der das Zellwachstum begrenzende Faktor scheint vielmehr ein Stoffwechselprodukt zu sein, das von den Zellen in das Medium abgegeben wird. Die Produktion dieses Stoffes scheint von der Fütterungsweise annähernd unabhängig zu sein, da die stationäre Phase fast immer nach 230 Stunden eintritt.

Um sicher zu sein, daß dieser Verlust an Wachstumsgeschwindigkeit nicht mit den Zellen an sich zusammenhängt, wird ein erneutes Fütterungsexperiment gestartet, in dem eine Fütterungskultur nach 240 Stunden gesplittet wird. Zum einen werden die Zellen in frisches Medium gesetzt, zum anderen werden in das „alte“ Medium (Kulturüberstand) aus einer parallel wachsenden Stammkultur frische Zellen gegeben. Läge das Stagnieren des Zellwachstums an den Zellen, so dürften die Zellen im frischen Medium nicht weiterwachsen und die frischen Zellen müßten mit dem „alten“ Medium ein normales Wachstumsverhalten zeigen.



**Abb. 54** Vergleich der Lebendzellzahl einer Kultur, in der das Medium ausgetauscht wurde, mit einer Kultur, in der die Zellen ausgetauscht wurden.

Wie in Abb. 54 zu sehen ist, ermöglicht der Tausch der Zellen kein Weiterwachsen der Zellen. Die frischen Zellen sterben in dem „alten“ Medium auf ähnliche Weise ab, wie es ohne Zelltausch geschehen wäre (Kontrolle). Der Tausch des Mediums hingegen beschleunigt das Zellwachstum, so daß die Lebendzellzahl wieder ansteigt. Die hohe „Animpfdichte“ ist der Grund für die sehr kurze exponentielle Phase. Eine Nährstofflimitierung kann auch hier wieder ausgeschlossen werden, da genügend Glukose und Aminosäuren zur 240. Kultivierungsstunde vorliegen.

(Glukose = 6,17 mM, asp = 0,03 g/L, glu = 0,003 g/L, asn = 0,016 g/L, ser = 0,006 g/L, his = 0,07 g/L, gly = 0,009 g/L, thr = 0,220 g/L, arg = 0,440 g/L, ala = 0,018 g/L,

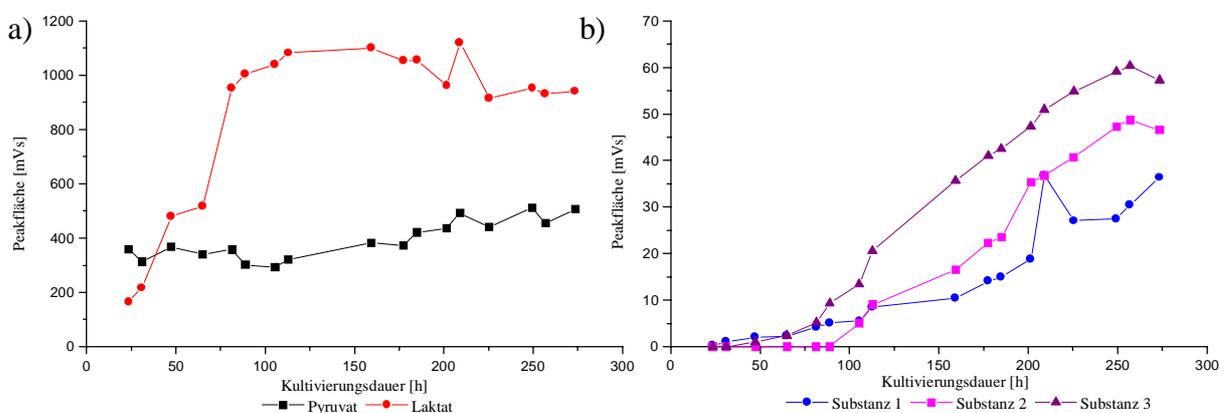
tyr = 0,065 g/L, met = 0,015 g/L, val = 0,17 g/L, trp = 0,048 g/L, phe = 0,054 g/L, ile = 0,069 g/L, leu = 0,077 g/L und lys = 0,403 g/L)

Wie schon erwartet, zeigt dieses Experiment, daß die inhibierende Komponente in dem verbrauchten Medium enthalten ist. Um Laktat handelt es sich aber nicht, da es mit 9,71 mM keine inhibierende Wirkung auf die Zellen haben kann.

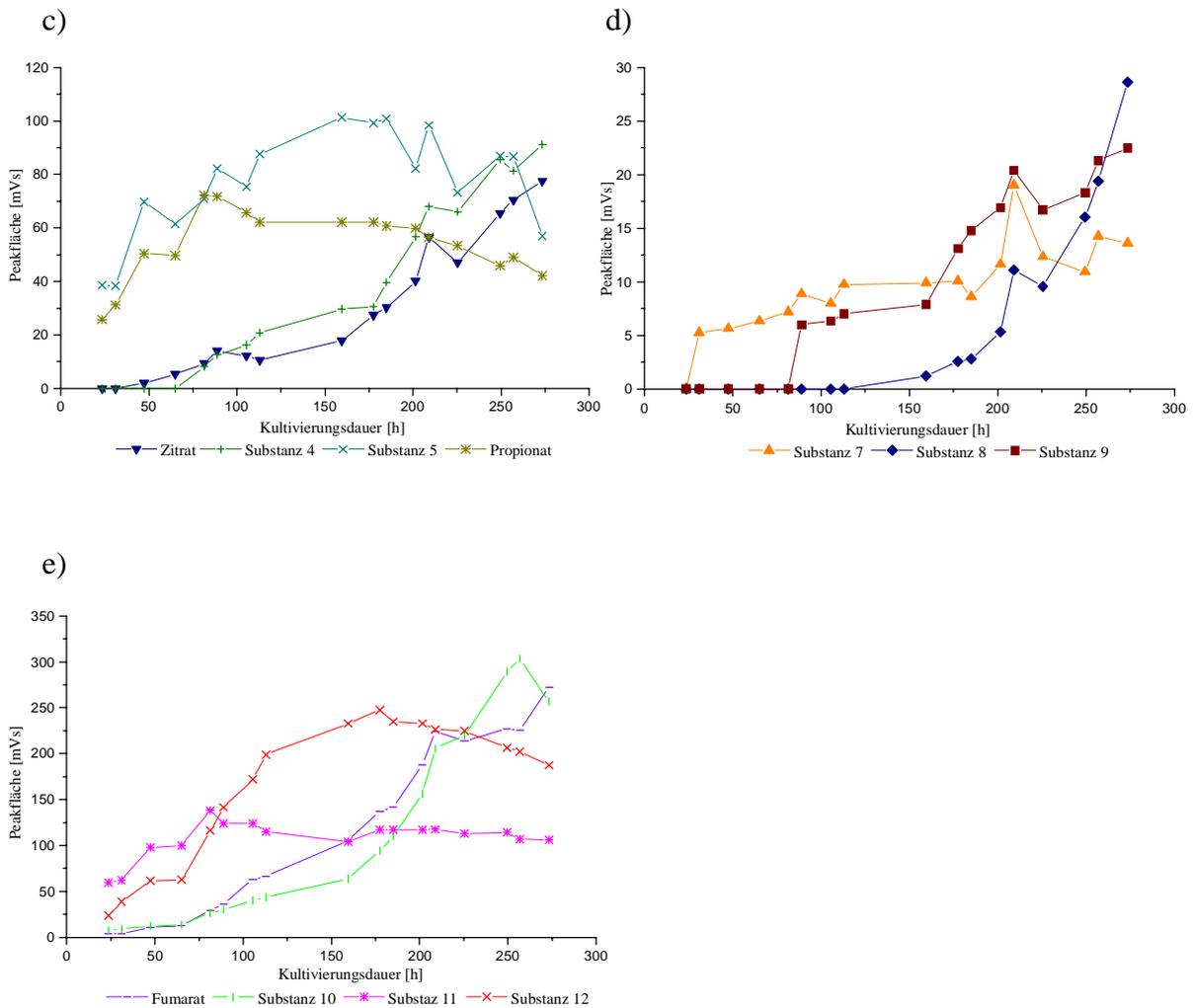
Da es sich um ein Stoffwechselprodukt der Zellen handeln muß, wird ein Blick auf die organischen Säuren geworfen, die in den Kulturüberstand abgegeben werden. Die Hoffnung ist, dort eine Substanz zu finden, die sich nach ca. 200 Kultivierungsstunden so angehäuft hat, daß sie eine inhibierende Wirkung entfalten könnte. Die Identifikation des Inhibitors ist der erste Schritt zur Lösung des Wachstumsproblems.

#### 4.5.1 Analytik der organischen Säuren

Es erfolgt die Analytik der organischen Säuren nach einer HPLC-Methode von Christel (1995). Als Standards werden Zitrat, Tartrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Malat, Pyruvat, Lactat, Formiat, Fumarat, Acetat, Butanat und Propionat eingesetzt. Es werden drei verschiedene Kulturen vermessen, die mit jeweils unterschiedlichen Fütterungsmedien versorgt wurden. In allen Fällen setzt die stationäre Phase nach ca. 230 Kultivierungsstunden ein. Tartrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Formiat, Acetat und Malat können bei den meisten Analysen nicht nachgewiesen werden. Stattdessen werden 12 nicht identifizierte Substanzen detektiert, die bei den Kultivierungen entstanden sind. Die Abb. 55a-e zeigen als Beispiel die Signalintensitäten im Verlauf einer Kultivierung mit dem Fütterungsmedium III.



**Abb. 55a-b Bestimmung von Zell-Metaboliten mittels HPLC in einer Kultivierung mit dem Fütterungsmedium III.**



**Abb. 55c-e Bestimmung von Zell-Metaboliten mittels HPLC in einer Kultivierung mit dem Fütterungsmedium III.**

Da es sich bei der Detektionsmethode um eine Fluoreszenzmessung handelt, können die Peakflächen der einzelnen Substanzen zueinander nicht in Beziehung gesetzt werden, um Aussagen über die Stoffmenge zu erhalten. Eine Kalibration ist nicht möglich, da die meisten Substanzen nicht identifiziert sind. Es zeigt sich aber, daß ca. 12 unbekannte Substanzen, die mit der Methode für organische Säuren trennbar sind, von den Zellen produziert werden. Wenn eine dieser Substanzen in allen Kulturen zum Eintritt in die stationäre Phase in der selben Konzentration vorliegen würde, dann wäre dieses ein Anhaltspunkt bei der Suche nach dem Inhibitor. Vergleiche der Peaks mit der gleichen Retentionszeit unterschiedlicher Kulturen ergaben wenig Übereinstimmung. Die Signale sind in den Kulturen zum Zeitpunkt des Eintritts in die stationäre Phase unterschiedlich groß. Bei dem Zitrat in Abb. 56 liegen die Signale, beim Einsetzen der stationären

Phase zumindest alle oberhalb 60 mVs was eine gewisse Gemeinsamkeit ist. Ein Beweis dafür, daß Zitrat als Inhibitor wirkt, ist das jedoch nicht.

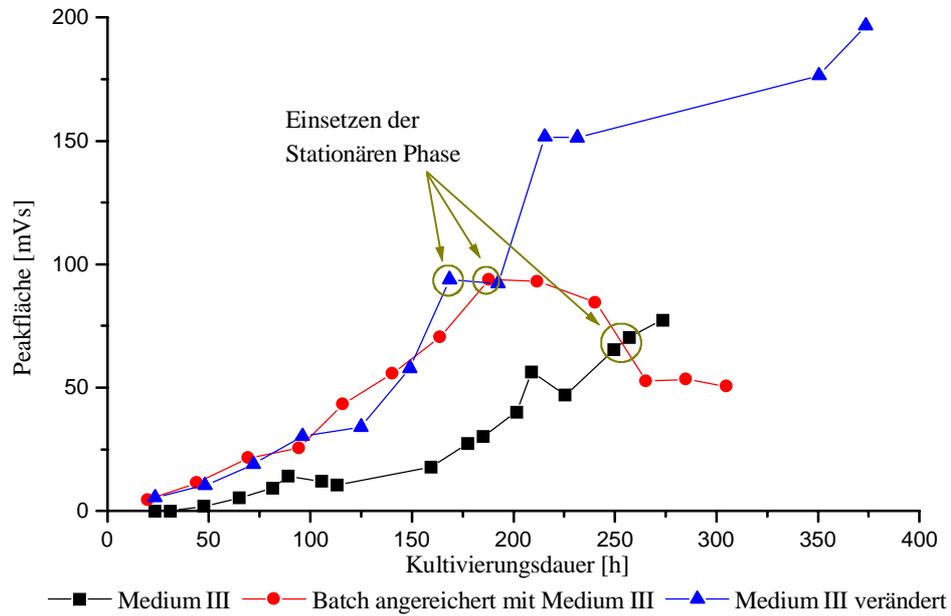


Abb. 56 Vergleich der Peakflächen [mVs] des Zitratsignals in verschiedenen Kulturen.

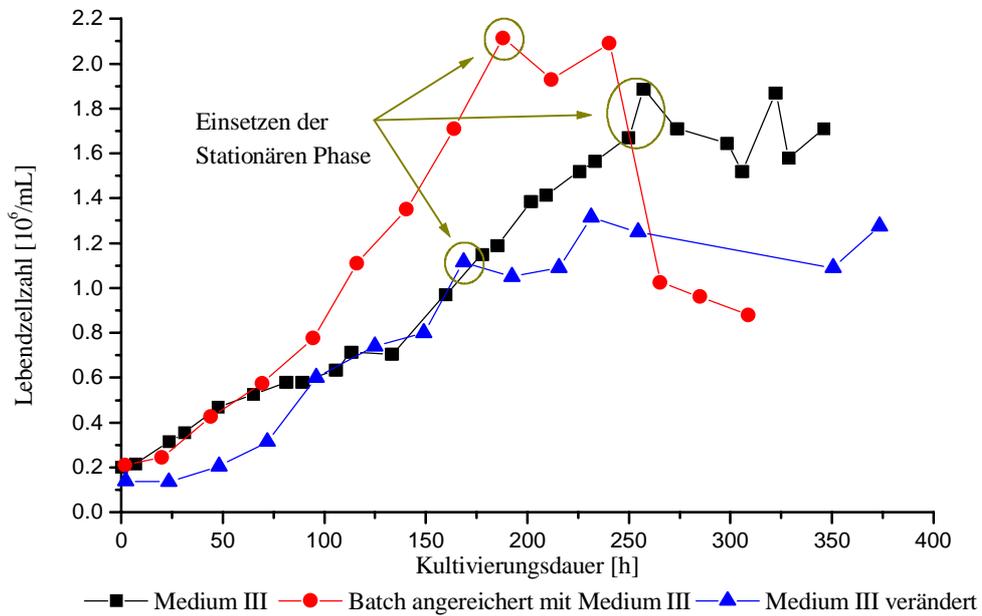
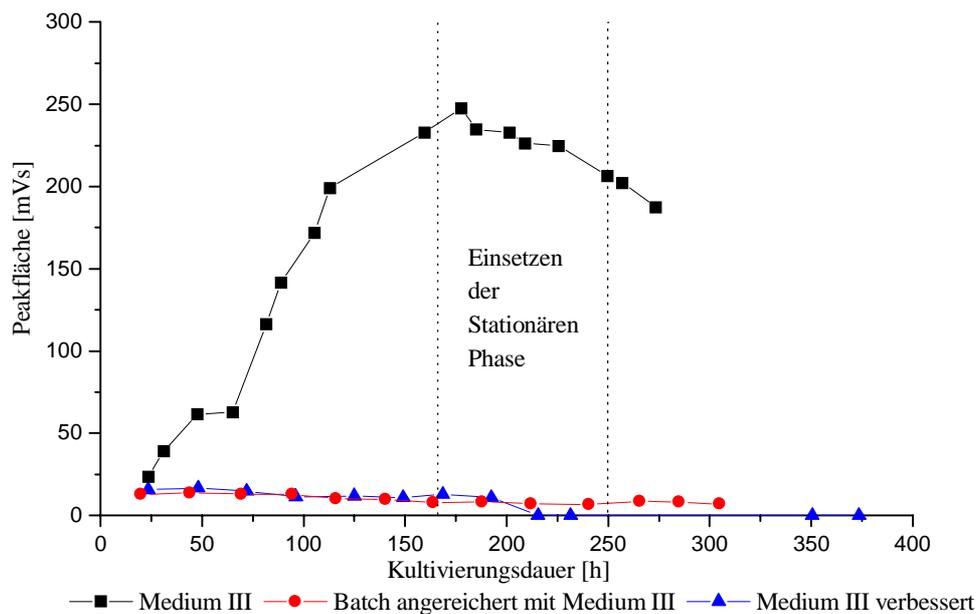


Abb. 57 Vergleich der Lebendzellzahlen der Kulturen, die zur Analytik verwendet wurden.

Wie aus Abb. 57 zu entnehmen ist, treten die Kulturen nach 183 h bis 250 h in die Stationäre Phase ein. Die mit Medium III gefütterte Kultur erreicht nach ca. 250 h den

kritischen Punkt. Zu diesem Zeitpunkt weist der Zitratpeak eine Fläche von 63 mVs auf. In der mit Medium III angereicherten Batch-Kultur liegt der Wert nach 183 h bei 95 mVs und bei der mit dem veränderten Medium III gefütterten Kultur liegt der Wert nach 170 h bei ebenfalls 95 mVs. Zwei Kulturen weisen zum Eintritt in ihre Stationäre Phase exakt die gleiche Zitratkonzentration auf, was für eine inhibierende Wirkung des Zitrats sprechen könnte. Die Kultur mit dem Medium III tritt schon mit ca. 2/3 der Zitratkonzentration in die stationäre Phase ein. Dieses wäre nur zu erklären, wenn neben dem Zitrat mindestens eine weitere inhibierende Komponente vorliegt, oder aber die inhibierende Konzentration niedriger liegen würde. Wegen der Probenahmeintervalle von 12 h ist der Eintritt in die Stationäre Phase, bzw. die Zitratkonzentration zum Eintritt, nicht exakt bestimmbar. Eine inhibierende Wirkung von Zitrat bei einem Signal von 95 mVs ist zwar nicht ausgeschlossen, aber auf keinen Fall ausreichend, um bei allen Kulturen den Eintritt in die stationäre Phase zu erklären.



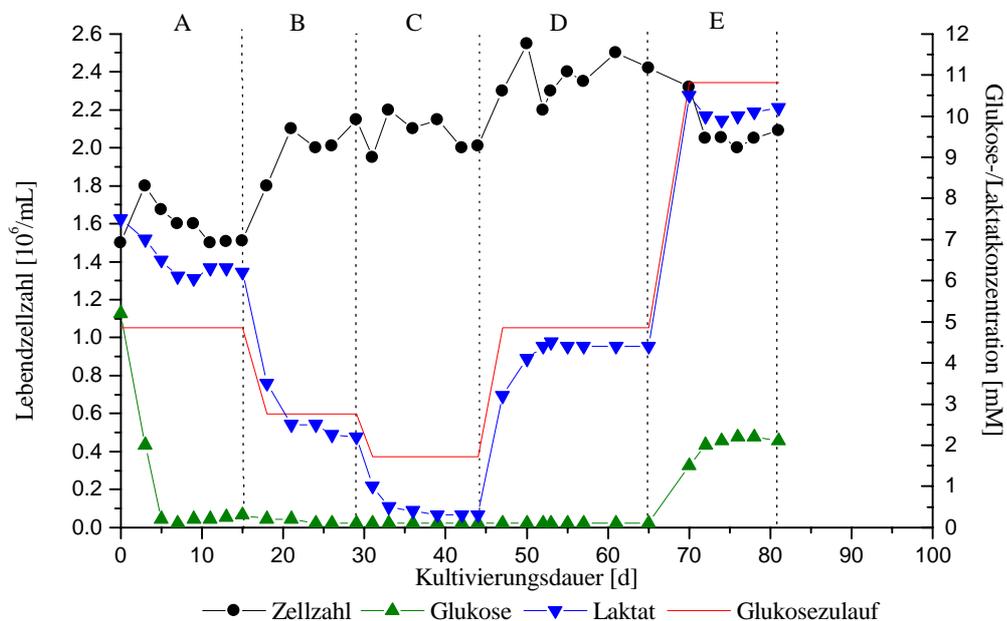
**Abb. 58** Vergleich der Peakflächen [mVs] des Signals der Verbindung, die als Substanz 12 bei der organische Säuren-HPLC der verschiedenen Kulturen aufzufinden ist.

Die in Abb. 58 dargestellte 12. unbekannte Substanz zeigt, daß in der Kultur mit dem Medium III im Vergleich zu den beiden anderen Kulturen durchaus andere Substanzen auftreten, die inhibierend auf das Zellwachstum wirken können. Als Grund für das Eintreten in die stationäre Phase bei der Medium III-Kultur ist die Substanz 12 aber

nicht zu sehen, denn ihr Signal sinkt schon vor dem Erreichen der stationären Phase nach 250 Kultivierungsstunden von 250 mVs auf 213 mVs ab. Aus diesen Daten wird ersichtlich, daß allein mit der HPLC-Methode für organische Säuren eine Vielzahl von möglichen Komponenten gefunden wird, die inhibierend wirken können. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, müßten diese Substanzen identifiziert und deren Einfluß auf das Zellwachstum untersucht werden. Diese Studien wären zu umfangreich, um indieser Arbeit abgehandelt werden zu können und ergeben ein eigenes Feld für wissenschaftliche Untersuchungen.

#### 4.5.2 Aus Verbrauchsraten erstelltes Fütterungsmedium

Eine weitere Beobachtung wurde von Claudia Altamirano Gomez (2000) im Rahmen ihrer Dissertation gemacht, die auf eine inhibierende Substanz im Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel schließen läßt. Ihre Arbeit befaßt sich ebenfalls, wie schon erwähnt, mit der Erstellung eines Fütterungsmediums für die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie. Die Erstellung des Fütterungsmediums beruht auf einem anderen Ansatz, bei dem von den Verbrauchsraten der Zellen im Batchmodus ausgegangen wird.



**Abb. 59** Chemostat mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen im Zulaufmedium. (Reaktorvolumen  $V = 145 \text{ mL}$ ; Austauschrate  $\mu = 0,0209 \text{ d}^{-1}$ ; Verweilzeit  $t = 49,6 \text{ d}$ ) (Mit freundlicher Genehmigung von Claudia Altamirano Gomez (2000), Barcelona, Spanien)

Das in Abb. 59 gezeigte Chemostatexperiment, bei der mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen gearbeitet wird, macht den Zusammenhang zwischen inhibierender Komponente und der Glukose erkennbar. Werden die Ausbeuten (Ertragskoeffizienten) der einzelnen stationären Zustände nach Gleichung 31 berechnet, so wird deutlich, daß sie effizienter sind, wenn weniger Glukose im Zulaufmedium enthalten ist.

$$Y = \frac{dX}{dS} \quad \text{bzw.} \quad \frac{dP}{dS} \quad (\text{Gl. 31})$$

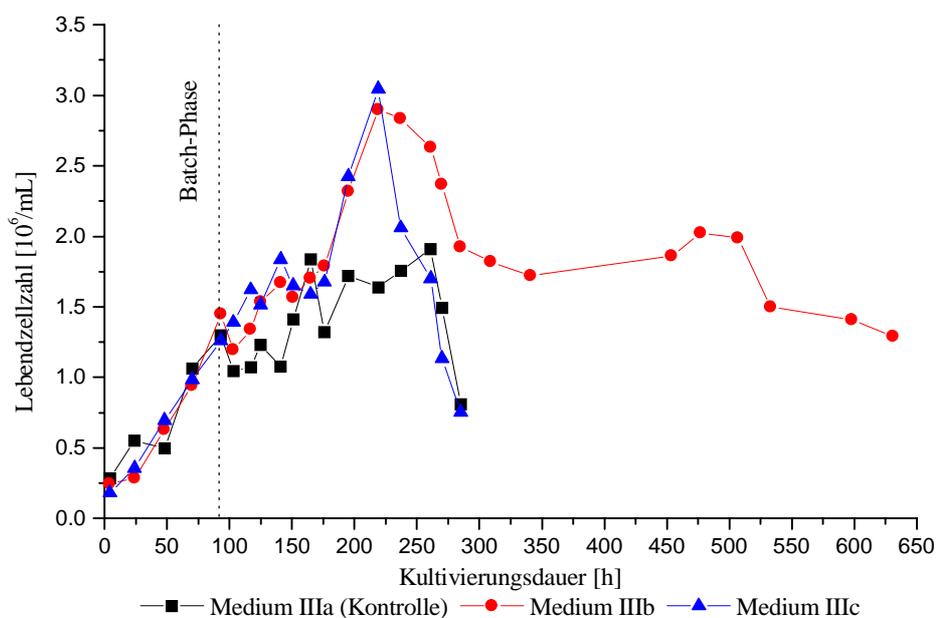
*Y = Ausbeute; dX = Biomassenzuwachs; dP = Produktzunahme und dS = verbrauchtes Substrat.*

Die Ausbeute im stationären Zustand A beträgt  $Y_A = 3,3 \cdot 10^7$  Zellen/mMol Glukose. Mit der Abnahme der Glukosekonzentration im Zulauf verbessert sich dieser Wert über den stationären Zustand B ( $Y_B = 7 \cdot 10^8$  Zellen/mMol) auf  $Y_C = 1,2 \cdot 10^9$  Zellen/mMol im stationären Zustand C. Wird die Glukosekonzentration im Zulauf wieder erhöht, so verschlechtert sich auch die Ausbeute ( $Y_D = 5,2 \cdot 10^8$  Zellen/mMol und  $Y_E = 1,8 \cdot 10^8$  Zellen/mMol). Bei Zustand D wird die gesamte Glukose, die zugeführt wird, sofort verbraucht, so daß die Konzentration im Reaktor Null ist; die Glukose ist limitierend. Bei der Erhöhung der Glukosekonzentration im Zulaufmedium wäre jetzt zu erwarten, daß die Zellzahl ansteigen müßte. Da alle anderen Nährstoffkomponenten konstant bleiben ist, für den Fall, daß eine andere Komponente limitierend wirkt zu erwarten, daß die Zellzahl konstant bleibt. Stattdessen verringert sich aber die Zellzahl deutlich. Die Glukosekonzentration im Reaktor ist minimal, so daß ein Negativeinfluß der Glukose an sich ausgeschlossen werden kann. Dieses Verhalten läßt sich nur damit erklären, daß durch das vermehrte Angebot an Glukose auch mehr Glukose umgesetzt wird und dabei ein Stoffwechselprodukt frei wird, das auf das Zellwachstum inhibierend wirkt. Laktat kommt wegen der geringen Konzentration von ca. 10 mM als Wachstumsinhibitor nicht in Frage. Die Suche nach der inhibierenden Substanz sollte sich folglich auf Nebenprodukte des Glukosestoffwechsels konzentrieren.

### 4.5.3 Glukosereduziertes Fütterungsmedium

Werden die in Kap. 4.5.2 gewonnenen Ergebnisse auf die Fed-Batch-Experimente übertragen, so bedeutet das, daß bei einer schlechten Glukoseausbeute auch die produzierte Menge an inhibierendem Beiprodukt ansteigt und sich im Kulturüberstand akkumuliert. Die in dieser Arbeit verwendeten Fütterungsmedien beinhalteten aber Glukose als Hauptkomponente, was nach obigen Erkenntnissen zwangsläufig zu einem Wachstumsstop führen muß. Um die Bildung des Inhibitors zu vermeiden, könnte die Substitution der Glukose eine Lösung sein.

Es wird ein weiteres Experiment konzipiert, das Aufschluß darüber geben soll, ob durch den Glukoseersatz die Wachstumsdauer verlängert werden kann. Hierzu wird das Medium III in leicht abgewandelter Form (höhere Glutamat-Konzentration) erneut hergestellt, nur daß es a) mit 100% Glukose (Kontrolle), b) mit 10% Glukose und 90 % Galaktose als Ersatzstoff und c) mit Glutamat und Asparagin als Glukoseersatz versehen wurde. Die Kulturen b) und c) sollten zu einem späteren Zeitpunkt in eine stationäre Phase gelangen, wenn die Glukose tatsächlich Auslöser für die Produktion eines Inhibitors ist.

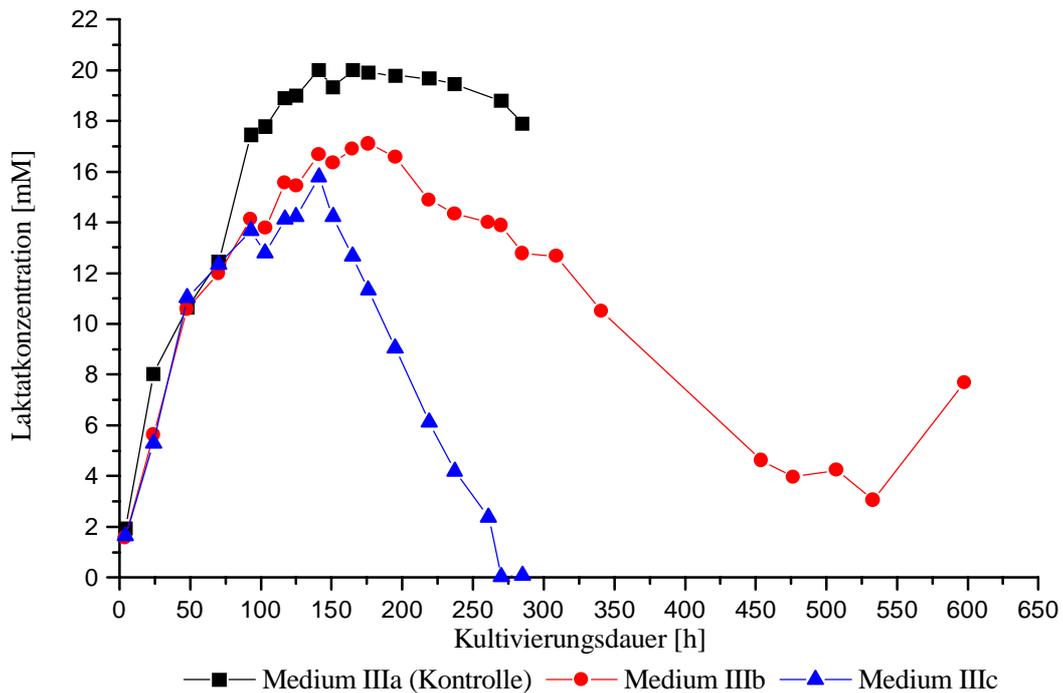


**Abb. 60** Vergleich der Lebendzellzahlen von Fütterungskulturen mit substituierter Glukose und der Kontrolle.

Abb. 60 zeigt die Kulturen im Vergleich. Es fällt auf, daß beide Kulturen mit der substituierten Glukose bessere Zellzahlen erreichen als die Kontrollkultur. Die Werte liegen mit  $3,1 \cdot 10^6$  Zellen/mL deutlich über der bisher erreichten maximalen Zelldichte von  $2,2 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Es scheint auch möglich zu sein, für kurze Zeit die Glukose gänzlich durch Aminosäuren zu ersetzen, doch setzt dann schnell ein abruptes Zellsterben ein. Die Kultur, in der die Glukose zu 90% durch Galaktose ersetzt wird erzielt deutlich die besten Ergebnisse. Die Kultur kann annähernd 500 h bei Zelldichten um  $1,9 \cdot 10^6$  Zellen/mL gehalten werden, bevor sie abstirbt. Es muß aber zu bedenken gegeben werden, daß alle Kulturen im Startmedium Glukose zur Verfügung haben und somit einen eventuellen Inhibitor in gewissen Mengen produziert haben können. Der steile Abfall der Zellzahlkurve nach Erreichen der maximalen Zelldichte bei den Medien IIIb und c wird vermutlich mit dem Fehlen der Glukose zu erklären sein, denn die Kultur mit dem Fütterungsmedium IIIb, die 10% Glukoseanteil beinhaltet hat stabilisiert sich und kann weiterkultiviert werden. Es scheint, als ob ein gewisser Glukoseanteil im Medium notwendig ist, um den Energiehaushalt der Zellen aufrecht zu erhalten. Es muß somit nach einem Mittelweg gesucht werden, der einerseits die Produktion von inhibierendem Beiprodukt des Glukosestoffwechsels minimiert und andererseits genug Glukose zur Verfügung stellt, um das Zellwachstum weiter zu forcieren und lange Zeit auf hohem Niveau zu halten. Das schlechte Abschneiden der Kontrollkultur, die lediglich  $1,9 \cdot 10^6$  Zellen/mL erreicht, ist durch die schlechte Glukoseausnutzung zu erklären.

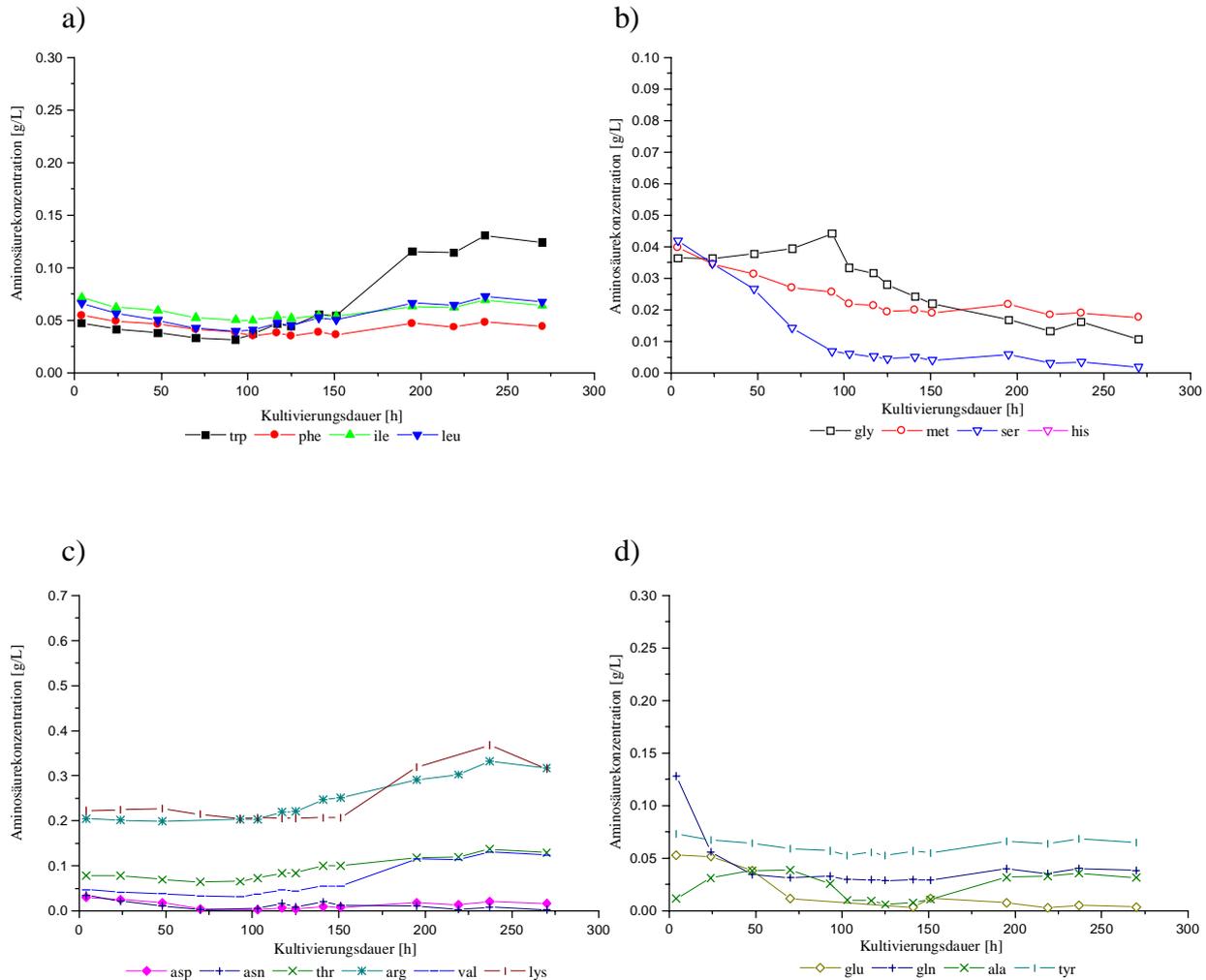
Bei Betrachtung der Laktatkonzentrationen im Kulturüberstand (Abb. 61) fällt auf, daß die Laktatwerte bis an 20 mM heran kommen (22,22 mM sind als Grenze zur toxischen Konzentration zu sehen), was bei den bisherigen Fütterungsexperimenten nie der Fall war. Laktat ist an sich in dieser Konzentration noch nicht toxisch, aber ein Nebenprodukt des Glukosestoffwechsels. Und zwar ein Nebenprodukt, das entsteht, wenn die Glukose schlecht ausgenutzt wird. Da der vermutete Inhibitor auch ein Produkt des Glukosemetabolismus ist, kann darauf geschlossen werden, daß er ebenfalls übermäßig produziert wird, was das schlechte Wachstum der Kultur erklären kann.

Die beiden glukosesubstituierten Kulturen bauen das anfänglich stark gebildete Laktat wieder ab, wobei die vollkommen glukosefreie Kultur ca. 24 h vor dem Abbruch auch das Laktat gänzlich verbraucht hat.



**Abb. 61** Vergleich der Laktatkonzentrationen von Fütterungskulturen mit substituierter Glukose und der Kontrolle.

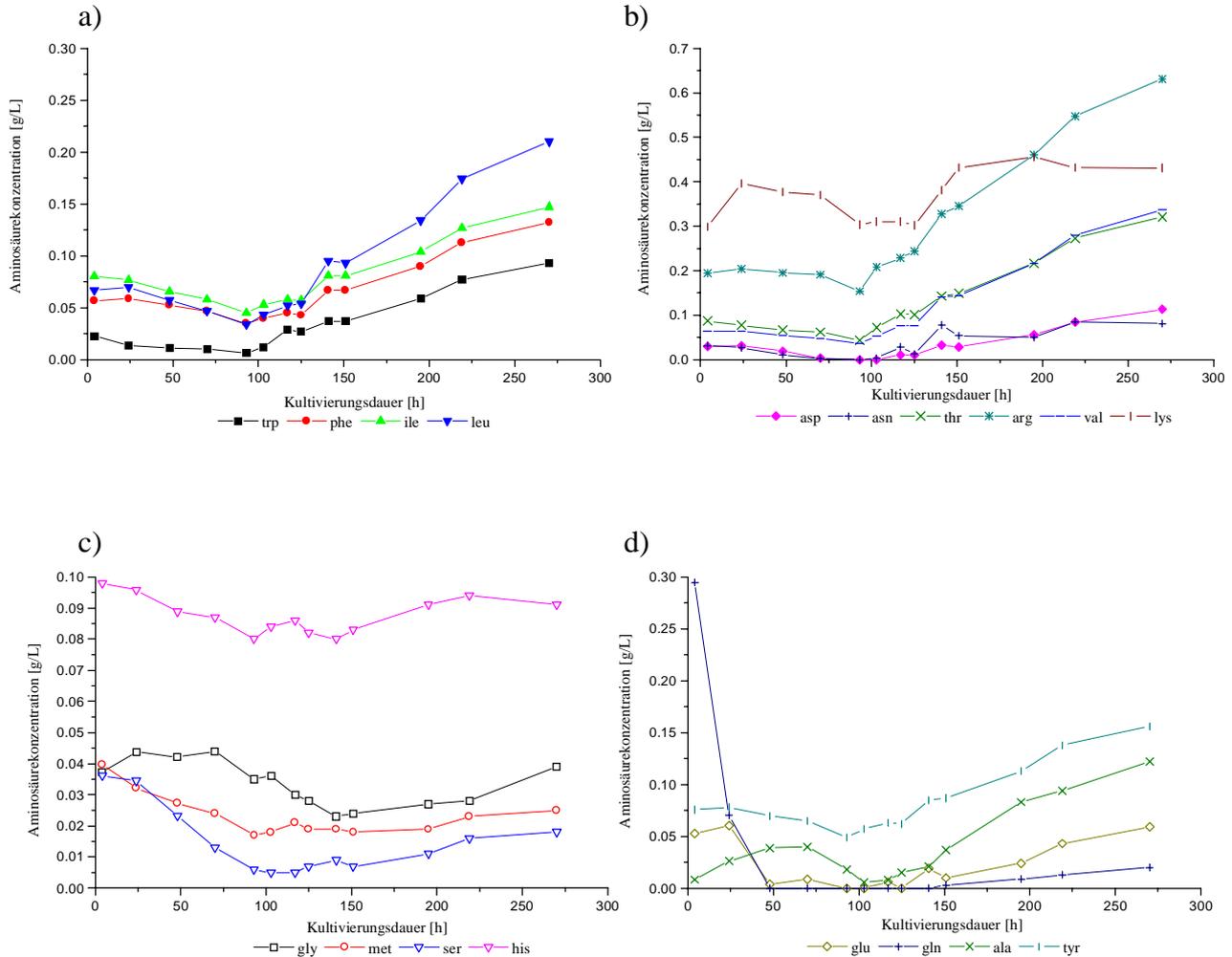
Die Betrachtung der Aminosäurekonzentrationen (Abb 62a-d) der Kontrollkultur zeigt, daß das Fütterungsmedium von der Zusammenstellung gut ausgeglichen ist. Ab der 175. Kultivierungsstunde ist bei den meisten Aminosäuren ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der durch den Eintritt der Kultur in die Stationäre Phase verursacht ist. Lediglich die Konzentrationen von Glycin und Serin nehmen stärker ab und hätten stärker gefüttert werden können. Die Konzentrationen von Asparagin und Asparaginsäure bewegen sich kurz über der Nulllinie und könnten ebenfalls in höheren Konzentrationen zugegeben werden. Da es sich bei keiner dieser Aminosäuren um eine essentielle Aminosäure handelt, ist das Absterben der Kultur auf Grund der geringen Konzentrationen eher unwahrscheinlich.



**Abb. 62 a-d** Aminosäurekonzentrationen des Kontrollexperiments (Medium III Glutamat-angereichert).

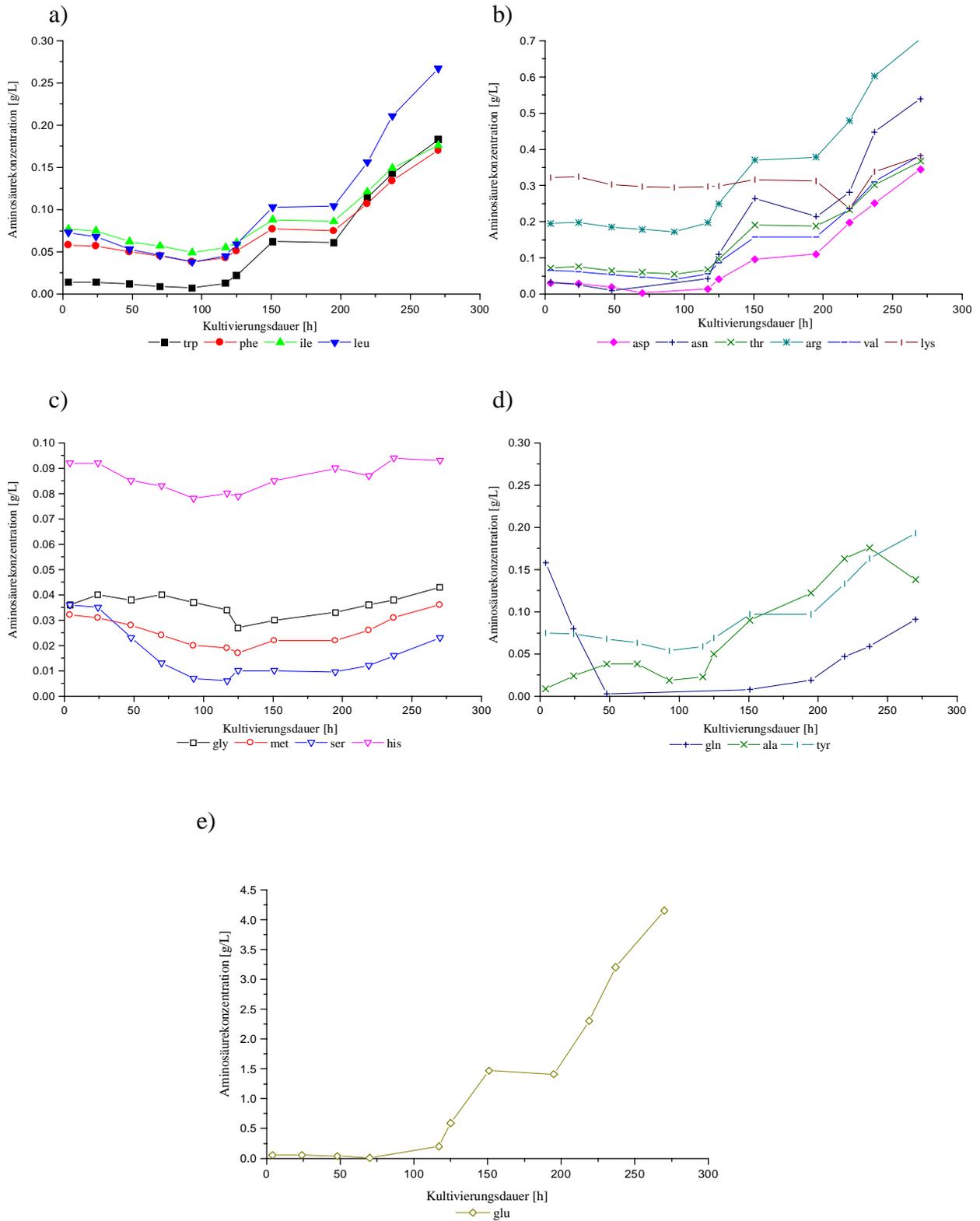
Bei der Betrachtung der Aminosäurekonzentrationen der Kultur, die noch 10 % Glukose im Fütterungsmedium hat (Abb.63 a-d), ist festzustellen, daß die in der Kontrolle doch recht ausgewogene Aminosäurefütterung etwas aus dem Gleichgewicht gekommen ist. Es fällt auf, daß die Aminosäurekonzentrationen einiger Aminosäuren schon vor dem Einbruch der Lebendzellzahl in der 225. Kultivierungsstunde wieder steigen. Z.B. der Gehalt an Arginin (Abb. 63 b) nimmt mit Beginn der Fütterung von 0,15 g/L auf 0,63 g/L im Medium zu, während er im gesamten Kontrollexperiment von 0,2 g/L auf maximal 0,3 g/L steigt. Asparagin und Asparaginsäure sind auch in dieser Kultur kurz vor dem Einsetzen der Fütterung verbraucht. Die Konzentration nimmt aber im Verlauf der Fütterung wieder zu. Auch bei Serin und Glycin kommt es zu einem ähnlichen Verlauf wie in der Kontrolle, aber die Aminosäurekonzentrationen erholen sich

ebenfalls schneller nach Einsetzen der Fütterung. Der Ersatz von 90% der im Fütterungsmedium enthaltenen Glukose durch Galaktose hat den Stoffwechsel sichtlich beeinflusst.



**Abb. 63a-d** Aminosäurekonzentrationen des Fütterungsexperiments mit 90% substituierter Glukose im Fütterungsmedium.

Noch stärker ist dieses Verhalten, wenn statt Glukose Glutamat und Asparagin gefüttert werden. Hier steigen die Aminosäurekonzentrationen (Abb. 64a-e) nach der Batch-Phase sehr viel schneller an, als im Kontrollexperiment. Vor allem die Konzentrationen von Tryptophan, Leucin (Abb. 64a) und Arginin (Abb. 64b) nehmen stärker zu als im Experiment mit der Galaktose. (trp = 0,09 g/L ↔ 0,18 g/L, leu = 0,21 g/L ↔ 0,27 g/L und arg = 0,63 g/L ↔ 0,71 g/L in der 270. Kultivierungsstunde). Extreme Werte werden für das Glutamat erhalten.

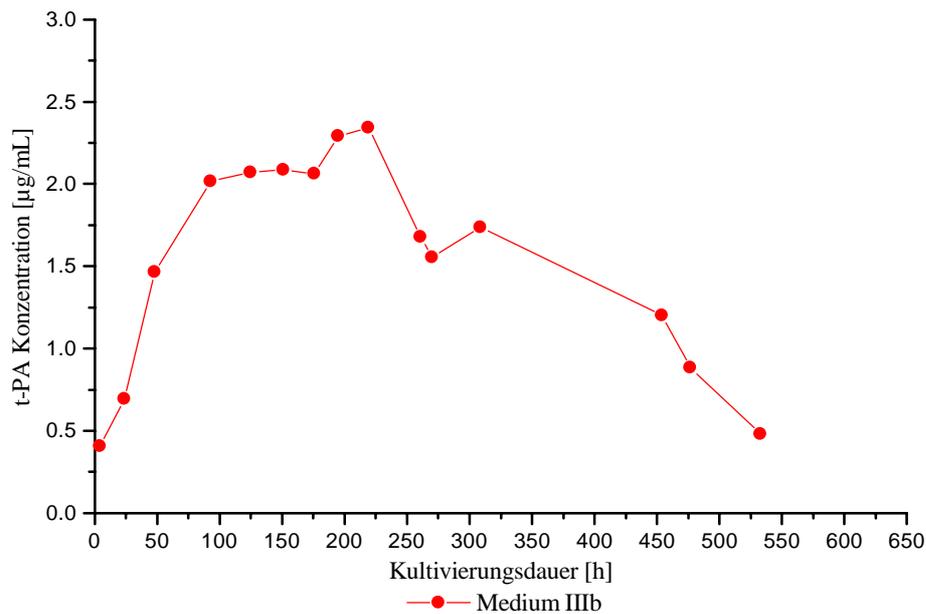


**Abb. 64a- e Aminosäurekonzentrationen des Fütterungsexperiments mit Glutamat und Asparagin als Glukoseersatz im Fütterungsmedium.**

Da in diesem Experiment die Glukose als Kontrollparameter für die Fütterung fehlt, wird die gleiche Menge an Fütterungsmedium zugegeben, die für den Kontrollversuch

ermittelt worden ist. Gleichzeitig wird die Glutamat- und Asparaginkonzentration erheblich erhöht, um die Glukose zu ersetzen. Die Kultur ist mit Glutamat überfüttert worden, was das schnelle Absterben nach 225 Stunden erklären mag. Bei einer Wiederholung dieses Experiments muss die Fütterungsmenge durch Glutamat als Kontrollparameter bestimmt werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Fütterungsmedium in seiner jetzigen Zusammensetzung gut einsetzbar ist. Kleine Korrekturen an dem Gehalt von Galaktose/Glukose oder Glutamat/Asparagin würden die Ergebnisse noch verbessern. Verglichen mit einer Batch-Kultur ist es aber gelungen, statt maximal  $1,6 \cdot 10^6$  Zellen/mL und ca. 160 Kultivierungsstunden, die Zellen auf eine Zelldichte von maximal  $3,1 \cdot 10^6$  Zellen/mL und  $1,9 \cdot 10^6$  Zellen/mL über 350 Stunden zu kultivieren (Kultivierungsdauer 650 h). Die Zelldichte wird somit um 100% erhöht und die Kultivierungsdauer sogar um 400% verlängert. Probleme bereitet bei der Kultivierung das Produkt t-PA.



**Abb. 65** t-PA-Konzentration der Fütterung mit 90% Galaktose als Glukoseersatz.

Wie in Abb. 65 zu sehen ist, akkumuliert sich dieses äußerst labile Produkt nicht im Kulturüberstand. Es scheint vielmehr mit der Zellzahl abzunehmen. Je weniger Zellen vorhanden sind, desto weniger t-PA ist vorhanden. Produziertes t-PA wird schnell

abgebaut und somit ist immer nur das gerade produzierte t-PA meßbar und verwertbar. Um durch die Fütterung den Produktionsprozeß zu optimieren, müßte das t-PA in dem Medium stabilisiert oder permanent aus dem Kulturüberstand entfernt werden.

## **5 Zusammenfassung und Ausblick**

Die Entwicklung von Proteinersatzstoffen für ein chemisch definiertes Medium, was frei von tierischen oder rekombinanten Komponenten ist, zeigt sich als praktikabel. Das erhaltene, niedrig supplementierte Medium ist absolut protein- und sogar auch peptidfrei, was bei den meisten kommerziellen proteinfreien Medien nicht der Fall ist. Häufig ist in diesen Medien Insulin enthalten, das nach Definition als Peptid angesehen werden kann. Wenn diese Medien als frei von tierischen Komponenten angepriesen werden, dann beinhalten sie zumeist rekombinant hergestelltes Insulin, was das Risiko von Kontaminationen zwar mindert, aber nicht ausschließt. Das in dieser Arbeit entwickelte Medium ist dagegen zu 100% synthetisch hergestellt und keine der verwendeten Komponenten ist je in Kontakt mit Mikroorganismen gekommen bevor sie in einer Kultivierung eingesetzt wurden. Eine Umstellung der Zellen auf das proteinfreie Medium ist ohne Probleme möglich und bedarf keiner Adaptionphase. Leider werden kleine Änderungen im Stoffwechselverhalten der Zellen beobachtet, die allerdings auf das Wachstum, die Produktivität und die Produktqualität keinen Einfluß zu haben scheinen. Genauere Untersuchungen über die Produktbeschaffenheit des im proteinfreien Medium synthetisierten t-PA wären jedoch sicherlich angebracht, wenn das Produkt zum pharmazeutischen Einsatz kommen soll. Interessant wären Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien, die Aufschluß darüber geben könnten, ob die Komponenten wie vermutet universell oder nur zellspezifisch einsetzbar sind.

Das Transferrin dient allem Anschein nach lediglich als Eisentransporter und kann deshalb leicht durch das in dieser Arbeit verwendete FePIH ersetzt werden, ohne weitere Auswirkungen auf die Zellen zu haben. Lediglich die Transporterqualität, zu der die Leichtigkeit der Aufnahme und Abgabe des Eisens gehört, bestimmt die Effizienz mit der das Transferrin ersetzt wird. Ebenfalls aussichtsreich scheint das FeSIH als Transferrinersatz zu sein. Weitere Untersuchungen sind sicherlich sinnvoll, da es den

Anschein hat, daß die Zellen durch diese Substanz noch etwas besser mit Eisen versorgt werden können.

Dem Insulin kommt in der Zellkultur nicht wie im lebenden Organismus hauptsächlich die Aufgabe zu den Glukosespiegel im Blut zu regulieren, bzw. die Glukoseaufnahme der Zellen zu steuern, sondern es dient lediglich als Wachstumsfaktor. Die basale Glukoseaufnahme ist ausreichend, um die Zellen in der Zellkultur zu versorgen, aber das Zellwachstum ist ohne Insulin eindeutig schlechter als mit. Hypothetische Überlegungen lassen es als logisch erscheinen, daß der in dieser Arbeit verwendete Ersatzstoff PMA als Insulinersatzstoff dienen kann. Das eingesetzte PMA greift in die durch das Insulin ausgelösten intrazellulären Prozesse ein. Insulin stimuliert durch seine Rezeptorbindung die Myristol-Diacylglycerol (DAG-) Produktion der Zelle und führt dadurch zur Aktivierung der Protein-Kinase-C. PMA scheint generell alle intrazellulären Vorgänge zu stimulieren, was auch das bessere Wachstum, die vermehrte Produktion und erhöhten Glukoseverbrauchsrate erklärt. Es werden aber auch die Vorgänge stimuliert, die sonst durch das Insulin aktiviert werden. Deshalb ist es möglich mit dem PMA das Insulin zu ersetzen. Diese generelle Aktivierung von Stoffwechselfvorgängen in der Zelle macht das PMA aber auch zu einem recht kritischen Faktor, denn bei einer geringen Überdosierung führt es in der Zelle zu einem Overflow an Reaktionen und damit zum Zellsterben. Ob dieses so zutrifft sollte zukünftig noch Gegenstand von Untersuchungen sein, um Gewißheit über den Wirkmechanismus zu bekommen.

Probleme macht das PMA bei der Lagerung im Medium. Für die PMA-Versuche dieser Arbeit wird eine Stammlösung von 5 mg PMA in 1 mL 70 %-igem Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und direkt vor Verwendung des Mediums zugefügt. Diese Art der Anwendung ist eine recht einfache. Es spricht nichts dagegen sie für den Einsatz von PMA zu empfehlen. Trotzdem könnte überprüft werden, ob PMA-haltiges Medium bei einer Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  keine Stabilitätsprobleme mehr hat. Dieses würde für den Anwender bequemer sein und die konstante Konzentration von 24 nM PMA wäre garantiert. Ein Fertigmedium würde sicherstellen, daß der Anwender niemals in den toxischen Konzentrationsbereich kommen kann.

Das so erhaltene proteinfreie Medium dient im zweiten Teil dieser Arbeit als Startmedium der Fütterungsversuche. Das Fütterungsmedium wird anhand des stöchiometrischen Modells von Xie et al. (1994a) entwickelt. Dieses Modell weist sich

jedoch als nicht optimal, da es nicht berücksichtigt, daß die Zusammensetzung und auch der Nährstoffverbrauch der Zellen sich mit den Umgebungsparametern ändert. Außerdem berechnet sich die Fütterungsmenge nach diesem Modell lediglich nach den neu gebildeten Zellen. Sie läßt aber außer acht, daß in der Kultur auch nicht neu entstandene Zellen vorhanden sind, die trotzdem Nährstoffe verbrauchen (Erhaltungsstoffwechsel). Die Fütterungsstrategie ist somit von vornherein zum Scheitern verurteilt. Besser ist es eine Nährstoffkomponente als Indikatorsubstanz auszuwählen und die Fütterung so einzustellen, daß diese Komponente eine konstante Konzentration hat. Auf diese Weise kann vermieden werden, daß die Kultur zu wenig Nährstoffe bekommt, weil die in der  $G_0$ -Phase befindlichen Zellen ebenfalls Substrate aufnehmen.

Bei den Experimenten sind die Kulturen immer wieder an eine Grenze gestoßen, die nicht durch einen Nährstoffmangel verursacht wird. Bei der Suche nach dem Grund für den Eintritt der Kultur in eine stationäre Phase führt die Analyse, der von den Zellen produzierten organischen Säuren, zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Es wird deutlich, daß die mit der HPLC-Methode detektierten Substanzen auf kleinste Änderungen im System sehr sensibel reagieren. Bis zu 12 unbekannte Substanzen werden mit dieser Methode getrennt, die es zuerst zu identifizieren gilt. Mit Sicherheit ist dieses eine interessante Untersuchung, die jedoch zu umfangreich für diese Arbeit gewesen wäre. Auf dem Gebiet der organischen Säuren ist im Bereich der Tierzellkultivierung bis in die heutige Zeit kaum etwas bekannt und es ist mit Sicherheit lohnenswert den weißen Fleck im Themengebiet der Tierzellkulturtechnik zu füllen.

Bessere Ergebnisse bringt die von Claudia Altamirano Gomez geäußerte Theorie, daß der das Zellwachstum inhibierende Stoff ein Nebenprodukt des Glukosemetabolismus ist. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Substanz auch eine organische Säure ist und mit der ersten Idee, die organischen Säuren zu analysieren, gefunden werden kann, doch ist der Aufwand dafür zu groß. Mit einem Chemostatexperiment wird die Vermutung gestützt.

Von dieser Idee inspiriert, wird in dieser Arbeit im Fütterungsmedium die Glukose durch andere Kohlenstoffquellen ersetzt. Es kann gezeigt werden, daß sich tatsächlich die Zelldichte erhöht. Leider stößt das Experiment nach kurzer Zeit wieder auf eine Wachstumsgrenze, so daß erneut nach dem Inhibitor gesucht werden muß. Es kann jetzt Schritt für Schritt das Fütterungsmedium solange verbessert werden, bis physikalische Grenzen eine Erhöhung der Zelldichte unmöglich machen. So spielen irgendwann

Transportprozeße eine immer größere Rolle oder aber das Reaktorvolumen ist durch Zufütterung erschöpft. Bis zu diesem Punkt ist aber noch ein weiter Weg zurückzulegen und viel Anpassungsarbeit zu leisten.

Es ist jedoch gelungen, mit dieser nicht idealen Methode ein Fütterungsmedium zu erstellen, daß die maximale Zelldichte gegenüber dem Batch-Experiment um 100% erhöht und die Kultivierungsdauer sogar um 400% verlängern kann. Der Ausdruck „nicht ideale Methode“ soll keinesfalls den Eindruck erwecken, daß diese Methode ein ungeeigneter Weg war, um ans Ziel zu kommen. Es soll lediglich zum Ausdruck bringen, daß das erhaltene Medium nicht optimal auf die Fütterung angepaßt ist, was aber mit dem heutigem Wissensstand keine Methode liefern kann. So wird auch deutlich, daß die Alternativmethode, in der das Fütterungsmedium aus Verbrauchsraten der Zellen berechnet wird, nicht besser ist. Versuche mit solch einem Fütterungsmedium führen zu schlechteren Ergebnissen als die Batch-Kontrollversuche. Für die Entwicklung einer idealen Methode, muß der Stoffwechsel der Zellen noch besser bekannt sein und die Verknüpfungen der Reaktionen müssen mit allen Möglichkeiten berücksichtigt werden. Hierfür werden aber Modelle und leistungsstarke Rechner gebraucht, die möglichst umfassend das Netzwerk der chemischen Reaktionen in einer Zelle berücksichtigen. Ob sich der Aufwand aus industrieller Sicht allerdings lohnen wird, ist fraglich, denn um die Reaktionen der Zelle zu kontrollieren ist ein immer weiter ausgeklügeltes System erforderlich, welches immer mehr Steuerungsaufwand im Prozeß bedeutet. Die hohen Kosten für einen großen Steueraufwand werden aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll sein.

Aus heutiger Sicht ist die in dieser Arbeit verwendete semiempirische Methode zur Erstellung eines Fütterungsmediums jedoch die bestmögliche, die sicher auch universell einsetzbar ist, da sie im Anfangsstadium von Mittelwerten vieler verschiedener Zelllinien ausgeht. Sie ist mit einfachen Mitteln zu bewerkstelligen und kommt im Vergleich zur Methode mit den Verbrauchsraten schneller zum Ziel.

## 6 Literaturverzeichnis

C. Altamirano Gomez, laufende Dissertation an der Universitat Autonoma de Barcelona, Spanien (2000)

L. Balteskard, K. Unneberg, D. Halvorsen, J.B. Hansen and A. Revhang, Effects of insulin-like growth factor 1 on neurophil and monocyte functions in normal and septic states, *Journal Parenter Enteral Nutrition* 22 (3) (1998), 127- 135

K. Bertheussen, Growth of cells in a new defined protein-free medium, *Cytotechnology* 11 (1993), 219-231

R. Bliem, R. Oakley, K. Matsuoka and V. Taiariol, Performance characteristics of mammalian cell culture process operating continuously with protein-free medium, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (1990), 217- 229

H.J.P. Bonarius, V. Hatzimanikatis, K.P.H. Meesters, C.D. De Grooijer, G. Schmidt and J. Tramper, Metabolic flux analysis of hybridoma cells in different culture media using mass balances, *Biotechnology and Bioengineering* 50 (1996), 299-318

C.W. Boone, N. Mantel, T.D. Caruso, E. Kazam and R.E. Stevenson, *In Vitro* 7 (1971), 174- 189

K. Bratch, A.J. Strain and M. Al-Rubeai, High density perfusion culture of primary rat hepatocytes for potential use as a bioartificial liver, *Proc. Of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting*, Kluwer Academic Publishers (1998), 661- 663

T. Buch, Charakterisierung des Temperatureinflusses auf verschiedene rekombinante Säugerzelllinien zur Optimierung des Produktionsprozesses von Glycoproteinen in Rührkesselreaktoren, Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, (1997)

G. Cheriqui, C. Regnet, M. Caron, B. Melin, D. Wicek, E. Clauser, J. Capeau and J. Picard, Insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 control insulin stimulation of myristol-diacylglycerol generation and subsequent activation of glucose transport, *The Journal of Biological Chemistry* 265 (34) (1990), 21254- 21261

J.W. Chisholm, A.K. Gebre and J. Parks, Characterization of C-terminal histidine-tagged human recombinant lecithin: Cholesterol acyltransferase, *Journal of lipid Research* 40 (1999), 1512- 1519

O. Christel, Bestimmung von Stoffwechselmetaboliten aus Fermentationslösungen von *E. coli* und *Aspergillus Awamori* mittels Ionenausschlußchromatographie, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, (1995)

- F.C. Chu, J.B. Johnson, H.C. Orr, P.G. Probst and J.C. Petricciami, *In Vitro* 9 (1973), 31- 34
- J. Cinatl Jr., J. Cinatl, V. Gerein, B. Kornhaber and H.W. Doerr, The establishment and characterization of mouse L- 929 cells in protein- free Eagle's Minimal Essential Medium, *Journal of Biological Standardization* 16 (1988), 249- 257
- J. Cinatl Jr., J. Cinatl, H. Rabenau and H.W. Doerr, Polyvenyl formal surface promotes continuous growth of vero cells in protein-free medium, *Biologicals* 20 (1992), 59-65
- T.E. Creighton, *Encyclopedia of molecular biology*, (1996), Wiley, New York
- M.P. Czech, B.M. Clancy, A. Pessino, C.-W. Woon and S.A. Harrison, Complex regulation of simple sugar transport in insulin-responsive cells, *TIBS* 17 (1992), 192-201
- I. Darnell and E. James, *Molecular cellbiology*, (1998), Scientific American Books Inc., New York
- H. Eagle, The sustained growth of human and animal cells in a protein-free environment, *Proc. N. A. S. USA* 46 (1950), 427-432
- V.J. Evans, H.E. Hopps, K.K. Sanford and C.W Boone, *In Vitro* 7 (1971), 161- 167
- C. Fenge, *Untersuchung zur Auslegung von Perfusions-Bioreaktoren zur Kultivierung von Suspensionszellen*, Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, (1991)
- R. Fike and J. Pfohl, Protein-free hybridoma medium, *Focus* 12 (3) (1990), 83- 85
- Firmenschrift, Chromozym<sup>®</sup> t- PA, Cat No. 1093037, Boehringer Mannheim
- Firmenschrift, Imulyse<sup>™</sup> t- PA, Cat # 101005, Biopool, Umeå, Schweden
- Firmenschrift, Modified Lowry Protein Assay, Kit # 23240, PIERCE, Rockford IL
- I. Flesch and E. Ferber, Growth requirements of murine bone marrow macrophages in serum-free cell culture, *Immunobiology* 171 (1-2) (1986), 14- 26
- N.E. Fusenig, H.-J. Stark and N. Maas-Szabowski, Organotypical skin culture models in basic research and application, 1. International workshop on principles and perspectives of tissue engineering for basic and applied research, ETCS European Tissue Culture Society, 1998 Hannover, Documentation S.33
- C.R. Gandor, M.O. Zang- Gandor, P.J. Floor, M. Morangi and F.A.M. Asselbergs, Conditionally adherent growth of serum-independent CHO cells for automated drug screening and biopharmaceutical production, *Biotechnology and Bioengineering* 65 (1999), 523- 528

I. Garner, The production of proteins in the milk of transgenic livestock: A comparison of microinjection and nuclear transfer, Proc. Of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting, Kluwer Academic Publishers (1998), 745- 750

Handbuch, Amino Acid Analysis, Theory & Laboratory Techniques, (1987), Pharmacia LKB Biotechnology AB 1987

Handbuch, YSI 2700 select, Yellow Springs Instruments Co., Ohio, 45387

S.A. Harrison, J.M. Buxton, A. Helgerson, R.G. Mac Donald, F.J. Chlapowski, A. Cerruthes and M.P Czech, Insulin action on activity and cell surface disposition of human Hep G2 glucose transporters expressed in chinese hamster ovary cells, The Journal of Biological Chemistry 265 (10) (1990), 5793- 5801

G.M. Healy and R.C. Parker Journal of Cell Biology 30 (1966), 539- 553

R. Holmes and S.W. Wolfe, Biophysical and Biochemical Cytology 10 (1961), 389- 401

M. Hülscher and U. Onken, Mechanical damage of suspended animal cells in directly sparged bioreactors, In: Spier, Griffiths and Mac Donald: Production of biologicals from animal cells in culture, (1992), Butterworth, Stoneham MA., pp 195- 201

P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. Auflage (1994), Thieme, New York

T.D. Kolokoltsova, N.D. Yurchenko, N.G. Kolosov, O.V. Shumakova and E.A. Nechaeva, Cultivation of skin cells Suitable for recovery of burn wounds, Proc. of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting, Kluwer Academic Publishers (1998), 673- 675

D. Krabsch, Weiterentwicklung eines proteinarmeren Mediums für CHO-Tf70R-Suspensionszellen im Batch-Modus, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (1999)

G. Kretzmer, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (1986)

W.Kuhlmann, Optimisation of a membrane oxygenation system for all cell culture in stirred tank reactors, Development and Biological Standardisation 66 (1987), 263- 268

J. Laskey, I. Webb, H.M. Schulmann and P. Poňka, Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis, Experimental Cell Research 176 (1988), 87- 95

G.M. Lee, E.J. Kim, N.S. Kim, S.K. Yoon, Y.H. Ahn and J.Y. Song, Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant chinese hamster ovary cells using a statistical design, Journal of Biotechnology 69 (1999), 85-93

A. Loa, Untersuchung der Aktivität von t-PA aus CHO-Tf70R Suspensionszellen bei variierenden Kultivierungsparametern, Schwerpunktarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, (1997)

H. Lübben, Einfluß der Temperatur auf das Wachstums- und Produktionsverhalten von rekombinanten CHO SSO/A2 Suspensionszellen, Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (1994)

C. Mantle and A. Allen, Colorimetric Assay for glycoproteins based on periodic acid shift stain, Biochemical Society Transactions 574<sup>th</sup> Meeting, Bath; 6 (1978), 607- 609

W.M. Miller, C.R. Wilke and H.W. Blanc, Transistent responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. glucose pulse and step changes, Biotechnology and Bioengineering 33 (1989), 477- 486

S.J. Morgan, D.C. Darling, Kultur tierischer Zellen, Focus, Spektrum Akademischer Verlag (1993), Heidelberg, Berlin, Oxford

D. Pollok, L. Chien, H. Liem, B. Wilburn, J. Williams, M. Harrington, Y. Echelard and H. Meade, Secretion of fusion proteins into milk by transgenic mouse mammary epithelium, Proc. Of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting, Kluwer Academic Publishers (1998), 743- 744

P. Poňka, J. Borová, J. Neuwirt and O. Fuchs, Mobilization of iron from reticulocytes, FEBS Letters 97 (2) (1979), 317- 321

G. Renemann, Laufende Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (2000)

B. Rössler, Prozeßcharakterisierung und Optimierung bei der Kultivierung von rekombinanten Säugerzellen unter Einsatz von on-line Meßsystemen, Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, (1995)

A.M.N. Saltan and Z.A. Khan, The impact of physiological insulin concentration and depletion on the metabolism of glucose, endogenous glycogen and triglycerides, Biochemical Cell Biology 75 (1997), 183- 190

K.K. Sanford, W.R. Earle, V.J. Evans, K.H. Waltz and J.E. Shannon, The measurement of nuclei, Journal Natl. Cancer Inst. 11 (1951), 733- 738

E. Sano, K. Okano, R. Scewadna, M. Naratu, Constitutive long-term production and characterization of recombinant interferon gamma from two different mammalian cells, Cell Structure and Function 13 (1988), 143- 159

D. Schlee und H.-P. Kleber, Biotechnologie, (1991), Gustav Fischer Verlag Jena

F. Schweikart, E. Lüllau, R. Jones and G.J. Huges, Effects of different production systems on glycosylation pattern of murine monoclonal IgA, Proc. of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting, Kluwer Academic Publishers (1998), 149- 152

T.S. Stoll, K. Mathlethaler, K. von Stockar and I.W. Marison, Systematic improvement of a chemically identified protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production, *Journal of Biotechnology* 45 (1996), 111-123

Stryer and Lubert, *Biochemistry*, 4. ed. (1995), Freeman, New York

T. Takaoka and H. Katsuta, Long-term cultivation of mammalian cell strains in protein- and lipid-free chemically defined synthetic media, *Experimental Cell Research* 67 (1971), 295- 304

R.F. 3<sup>rd</sup> Todd and D. Liu, Mononuclear phagocyte activation: activation-associated antigens, *Fed Proc.* 45 (12) (1986), 2829- 2836

D. Voet and J.G. Voet, *Biochemistry*, 2. ed. (1995), Wiley, New York

A.Voigt and F. Zintl, Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers, *Journal of Biotechnology* 68 (1999), 213-226

R. Weidemann, Optimierung der Produktion von Antithrombin III mit adhären, rekombinanten Säugerzellen im Rührkesselreaktor, Dissertation am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, (1995)

R.G. Werner, Transgenic technology: A challenge for mammalian cell culture production systems, *Proc. of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting*, Kluwer Academic Publishers (1998), 757- 763

M.V. Wiles and B.M. Johansson, Embryonic stem cell development in a chemically defined medium, *Experimental Cell Research* 247 (1999), 241-248

H. Yoshida, K. Tomizuka, H. Uejima, H. Kugoh, K. Satoh, A. Ohguma, M. Hayasaka, K. Hanaoka, M. Oshimura and I. Ishida, Creation of mice expressing human antibody by introduction of human chromosome, *Proc. of the 15<sup>th</sup> ESACT Meeting*, Kluwer Academic Publishers (1998), 751- 756

L. Xie and D.I.C. Wang, Fed-batch cultivation of animal cells using different medium design concepts and feeding strategies, *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994a), 1175- 1189

L. Xie and D.I.C. Wang, Stoichiometric analysis of animal cell growth and its application in medium design, *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994b), 1164- 1174

L. Xie and D.I.C. Wang, Applications of improved stoichiometric model in medium design and fed-batch cultivation of animal cells in bioreactor, *Cytotechnology* 15 (1994c), 17- 29

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>A</b>	Aktivität
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary
$C_k$	Molare Nährstoffkonzentration
$C_t$	Absolute Nährstoffkonzentration
<b>d</b>	Tage
$D_A, D_G, D_C, D_T$	Prozentualer Anteil von Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin in der Nukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dP	Änderung der Produktkonzentration
dS	Änderung der Substratkonzentration
dX	Biomassenzuwachs
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
exp.	Experimentell
<b>Gl.</b>	Gleichung
<b>h</b>	Stunden
HPICE	High Performance Ion Chromatography Exclusion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
$K_s$	Monodkonstante
$M_r$	Molmasse
$N_A, N_G, N_C, N_U, N_T$	Molarer Anteil von Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin in der Nukleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
$O_i$	Prozentuale Aminosäurezusammensetzung
<b>PAS</b>	Periodic Acid Schiff
PASR	Periodic Acid Schiff Reaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidium-Iodid
PMA	4 $\beta$ -Phorbol-12 $\beta$ -myristate-13 $\alpha$ -acetate
<b>q</b>	Stoffwechselraten (Verbrauchs-/Bildungsraten)
<b>R</b>	Regressionskoeffizient
$R_A, R_G, R_C, R_U$	Prozentualer Anteil von Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil in der Nukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
$R_x$	Wachstumsgeschwindigkeit
<b>S</b>	Substratkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>t</b>	Zeit
Tab.	Tabelle
t-PA	Tissue (Gewebe)-Plasminogen-Activator
<b>U</b>	Units
<b>W</b>	Biotrockenmasse
<b>X</b>	Zelldichte
$X_k$	Molarer Anteil des <i>k-ten</i> Nährstoffs
<b>Y</b>	Ausbeute (Ertragskoeffizient)
$Z_C$	Prozentualer Kohlenhydratanteil an der Biotrockenmasse
$Z_{DNA}$	Prozentualer DNA-Anteil an der Biotrockenmasse
$Z_L$	Prozentualer Lipidanteil an der Biotrockenmasse
$Z_P$	Prozentualer Proteinanteil an der Biotrockenmasse
$Z_{RNA}$	Prozentualer RNA-Anteil an der Biotrockenmasse
$\Delta N_{t,n-1}^m$	Gemessene Zunahme an Zellen im Intervall von der <i>n-ten</i> zur <i>(n+1)-ten</i> Fütterung
$\Delta N_{t,n}$	Geschätzte Nettozunahme an Zellen im Intervall von der <i>n-ten</i> zur <i>(n+1)-ten</i> Fütterung
$\Delta V_n^f$	Fütterungsvolumen der <i>n-ten</i> Fütterung
$\Delta V_{n-1}^f$	Fütterungsvolumen der <i>(n-1)-ten</i> Fütterung
$\beta$	Koeffizient der Nährstoffkomponenten
$\mu$	Spezifische Wachstumskonstante
$\theta$	Stöchiometrischer Koeffizient

### Aminosäuren

ala	Alanin
asn	Asparagin
asp	Asparaginsäure
gln	Glutamin
glu	Glutaminsäure
gly	Glycin
his	Histidin
ile	Isoleucin
leu	Leucin
lys	Lysin
met	Methionin
phe	Phenylalanin
ser	Serin
thr	Threonin
trp	Tryptophan
tyr	Tyrosin
val	Valin

**LEBENS LAUF**

Name: Alexander Loa

Geburtsdatum: 07.05.1970

Geburtsort: Wilhelmshaven, Niedersachsen

Schulbildung: Grundschule Jungfernbusch (Schortens) 1976- 1980  
OS Schortens 1980-1 982  
Mariengymnasium Jever 1982- 1990

Zivildienst Reinhardt-Nieter-Krankenhaus WHV 1990- 1991

Studium: Chemiestudium an derUniversität 1991- 1994  
Oldenburg, bis zum Vordiplom

Fortführung des Chemiestudiums an 1994-1997  
Der Universität Hannover bis zum  
Diplom am 15. 12. 1997

Thema: “Untersuchung über die Auswirkung  
verschiedener Parameter auf die  
Kultivierung CHO-Tf70R-  
Suspensionszellen in Batch-  
Kulturen und Chemostaten”

Promotion in der Arbeitsgruppe von Frau 1997-2000  
PD Dr. G. Kretzmer (Tierzellgruppe) am  
Institut für Technische Chemie  
derUniversität Hannover