

**Prozessoptimierung und Onlineanalytik
bei Tierzellkultivierungen**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte
Dissertation

von

Dipl.-Chem. Georg Renemann
geboren am 20.10.1971
in Neubörger

Hannover, im Januar 2001

Referentin:

Priv.-Doz. Dr. Gerlinde Kretzmer

Korreferenten:

Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl,

Prof. Dr. Tatiana Tennikova

Tag der Promotion:

19.01.2001

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis April 2000 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover angefertigt. Für die Betreuung und Unterstützung während der Arbeit sowie für die mir ermöglichten Auslandsaufenthalte möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Priv.-Doz. Dr. Gerlinde Kretzmer bedanken.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl und Frau Prof. Dr. Tatiana Tennikova danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei allen Mitgliedern des TCI möchte ich mich an dieser Stelle für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Im einzelnen danke ich folgenden Personen für vielfältige Hilfestellung und Unterstützung während meiner Zeit am Institut für Technische Chemie:

Den Mitarbeitern aus der Feinmechanikwerkstatt und der Glasbläserei für die Umsetzung diverser Ideen zur Probenahme aus Tierzellkulturen;

Martina Weiß für die Hilfe beim Aufbau der HPLC-Anlage und für die Messungen der Aminosäuren;

Prof. Tatiana Tennikova und Dr. Galina Platonova für ihre hervorragende Einführung in das Gebiet der Diskchromatographie während meines Aufenthaltes in St. Petersburg;

Marco Rieseberg für die Messungen am Coulter;

Jörg Hagedorn (Fa. Trace) für die Bereitstellung der Probenahmesonde;

Christos Dörries und Claudia Loa für die gute Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Schwerpunkt- bzw. Diplomarbeiten;

Petra Dinhof und Alexander Loa aus dem Arbeitskreis Kretzmer für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima;

Daniela Boehl für ihre Hilfe bei den Fluoreszenzmessungen am Bioprozess;

Daniela und Karin Boehl für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und allen Freunden, die mich immer unterstützt haben.

Abstract

Georg Renemann

Prozessoptimierung und Onlineproduktanalytik bei Tierzellkultivierungen

Die Produktion komplexer Proteine durch Tierzellkultivierungen ist von großer therapeutischer Relevanz. Aufgrund der aufwendigen und teuren Bedingungen zur Kultur tierischer Zellen kommt der Optimierung dieser Prozesse in der Biotechnologie eine sehr hohe Bedeutung zu. Der Beitrag dieser Arbeit zur Optimierung der Produktionsprozesse gliedert sich in drei Teile. Zum einen wurde der Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktausbeute von t-PA (tissue plasminogen activator) durch rekombinante CHO-Zellen untersucht. Zwei weitere Schwerpunkte waren die Entwicklung eines robusten und sicheren Probenahmesystems und die Etablierung einer schnellen affinitätschromatographischen Analyse von t-PA.

Durch verschiedene Prozessstrategien in Bezug auf die Temperaturführung von Kultivierungen der CHO-Zellen wurde versucht, die Produktausbeute zu optimieren. Bei Temperaturshiflexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Produktausbeute umso höher ist, je eher die Temperaturabsenkung während der Kultivierung erfolgt. Der höchste Produkttiter wurde jedoch immer bei Kulturen erreicht, die konstant bei einer Temperatur von 31 °C kultiviert wurden. Einen anderen Ansatz zur Optimierung dieses Prozesses bildeten periodische Wachstumszyklen zwischen 37 °C und 31 °C, die so geführt wurden, dass die Zellen bei diesen beiden Temperaturen entweder im 12-stündigen oder 24-stündigen Rhythmus kultiviert wurden. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Verweilzeit der Zellen bei 31 °C entscheidend für ihre Produktivität ist.

Für die Onlineprobenahme wurden verschiedene käulich erhältliche Systeme wie das ESIP (Eppendorf-sterile-inline-Probenahmesonde) oder das auf Dialyse beruhende Probenahmesystem ProcessTrace eingesetzt. Keines dieser Systeme konnte eine effektive Probenahme ohne Produktverlust gewährleisten. Durch Entwicklung einer sterilisierbaren Bakterienfalle, die mit zwei Filtereinheiten kombiniert wurde, konnte das Problem einer kontinuierlichen Probenahme ohne Kontaminationsrisiko gelöst werden.

Zur Bestimmung von t-PA mittels High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography (HPMADC) wurde eine Methodenentwicklung durchgeführt. Mit t-PA-spezifischen Antikörpern als Affinitätsliganden sollte eine quantitative t-PA-Analytik möglich sein. Bei der Bestimmung von Kultivierungsüberständen zeigten sich Abweichungen im Vergleich zur Referenzmethode (ELISA), die durch Störungen von Proteinen aus dem Kultivierungsüberstand verursacht werden.

Erste Ergebnisse durch fluoreszenzspektroskopische Messungen zeigen, dass ein Online-monitoring von t-PA auf diese Weise möglich sein sollte.

Stichworte: CHO-Zellen, t-PA, Kultivierungstemperatur, Onlineproduktanalytik, HPMADC.

Abstract

Georg Renemann

Prozessoptimierung und Onlineproduktanalytik bei Tierzellkultivierungen

The production of complex proteins by animal cell cultivation is of high therapeutic interest. Because of the expensive requirements of animal cell cultures the optimization of the production processes is very important. The contribution of this work to the optimization of these processes is divided into three parts. The first part was the investigation of the effect of the cultivation temperature on the yield of t-PA (tissue plasminogen activator) produced by recombinant CHO-cells. Two other points were the development of a robust and secure sampling system and the establishment of a fast analysis of t-PA by affinity chromatography. Several process strategies with different temperature variations were performed on cultivations of CHO-cells in order to optimize the product yield. By lowering the temperature during the cultivation it was found, that the product concentration was higher the earlier the temperature was changed. The highest product concentrations were obtained by cultivations at a constant temperature of 31 °C. Other experiments were performed with periodical temperature changes after 12 and 24 hours between 37 °C and 31 °C. As result these experiments showed that the time of cultivation at 31 °C is decisive for the productivity of the CHO-cells.

For online sampling the commercially available sampling systems ESIP (Eppendorf-sterile-inline-Probenahmesonde) and ProcessTrace, which is based on dialysis, were used. None of them enabled the sampling without loss of protein. By developing a sterile barrier combined with two filtration units the problem of a continuous sampling without risk of contamination was solved.

The development of a method for the analysis of t-PA by High Performance Monolith Affinity Disk Chromatography (HPMADC) was carried out. Using t-PA-specific antibodies as ligands this method should provide the possibility of a quantitative t-PA analysis. The comparison of the analysed concentrations of cultivation samples by HPMADC and ELISA as a reference method showed evident deviations, which were caused by proteins in the supernatant.

First results of fluorescence measurements showed that online monitoring of t-PA should be possible by this method.

Key words: CHO-cells, t-PA, cultivation temperature, online product monitoring, HPMADC.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Säugetierzellen in der Biotechnologie	3
2.2	Kultivierungen von Säugetierzellen bei Temperaturen unterhalb von 37 °C	5
2.2.1	Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das Zellwachstum	5
2.2.2	Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktivität	6
2.2.3	Einfluss einer Temperaturänderung während der Kultivierung	7
2.3	Probenahmesysteme zur Onlinekontrolle von Tierzellkulturen	9
2.4	Affine Methoden zur Analytik von Proteinen	11
2.4.1	Fliess-Injektions-Analytik	11
2.4.2	Affinitätschromatographie	12
2.4.2.1	Membranen als Affinitätsmatrix	13
2.4.2.2	Anwendungen von Membranen in der Affinitätschromatographie	15
2.4.2.3	High Performance Monolith Affinity Disk Chromatography	15
2.4.2.4	Anwendungen der HPMADC	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Kultivierungsversuche mit CHO-Zellen (<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary)	19
3.1.1	Stamm und Kultivierungsbedingungen	19
3.1.2	Untersuchungen zum Temperatureinfluss auf das Wachstum und die Produktivität von CHO-Zellen	19
3.1.3	Kultivierungen mit Versuchen zur Onlineprobenahme	21
3.1.4	Kultivierung im Bioreaktor mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen	21
3.1.5	Begleitende Analytik zu den Kultivierungen	22
3.1.5.1	Zellzahlbestimmung	22
3.1.5.2	Zellzyklusbestimmung mittels Durchflusszytometrie	22
3.1.5.3	Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration	22
3.1.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	23
3.1.5.5	t-PA-Analytik mittels ELISA	23
3.1.5.6	Aminosäurebestimmung mittels HPLC	24
3.2	Probenahmesysteme zur Onlineanalytik bei Kultivierungen von Tierzellen	24

3.3	Entwicklung einer t-PA-Analytik mittels HPMADC (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>M</u> onolith <u>A</u> ffinity <u>D</u> isk <u>C</u> hromatography)	26
3.3.1	Immobilisierung verschiedener Liganden auf Disks	26
3.3.2	Frontalanalyse	27
3.3.3	t-PA-Analytik mittels HPMADC	28
3.3.4	Untersuchungen mit verschiedenen Matrices	30
3.3.5	t-PA-Analytik mittels Kationenaustauschchromatographie	30
3.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	31
3.3.7	Proteinanalytik mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.4	Onlinefluoreszenzmessungen mit dem Hitachi 4500	32
4	Ergebnisse und Diskussion	33
4.1	Der Temperatureinfluss auf das Produktionsverhalten rekomanter CHO-Zellen	33
4.1.1	Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen bei 32 °C und 31 °C	33
4.1.2	Zerfallsgeschwindigkeit von t-PA bei 37 °C und 31 °C	36
4.1.3	Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit Temperaturabsenkung zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase	37
4.1.4	Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit Temperaturabsenkung während der exponentiellen Wachstumsphase	40
4.1.5	Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit Temperaturabsenkung von 33 °C auf 31 °C zu verschiedenen Zeiten der exponentiellen Wachstumsphase	46
4.1.6	Kultivierungsversuche mit periodischem Temperaturwechsel	48
4.1.6.1	Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit 12-stündigem periodischen Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C	48
4.1.6.2	Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit 24-stündigem periodischen Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C	53
4.1.6.3	Zellzyklusanalyse von CHO-Zellen in Kultivierungen mit 12- und 24-stündigem Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C	57
4.2	Probenahmesysteme zur Onlineanalytik von Proteinen	61
4.2.1	Untersuchungen zur Onlineprobenahme mit dem ESIP-Modul	61
4.2.2	Untersuchungen zur Onlineprobenahme mit dem Probenahmesystem ProcessTrace	62
4.2.3	Entwicklung eines kombinierten Probenahmesystems mit Bakterienfalle und Filtereinheiten	63

4.2.3.1	Entwicklung einer Bakterienfalle zur kontinuierlichen Probenahme	64
4.2.3.2	Anwendung des entwickelten Systems zur kontinuierlichen Probenahme	66
4.3	Methodenentwicklung zur t-PA-Analytik mittels HPMADC (High Performance Monolith Affinity Disk Chromatography)	68
4.3.1	Untersuchungen zur Immobilisierung von Proteinen und Peptiden als Affinitätsliganden	68
4.3.2	Kinetik der Bindung von t-PA an immobilisierte Affinitätsliganden	69
4.3.3	Optimierung der chromatographischen Bedingungen	71
4.3.4	Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der optimierten Methode	72
4.3.5	Bestimmung der t-PA-Konzentration aus Kultivierungsüberständen	73
4.3.5.1	Untersuchungen zur Qualität der Antikörper	76
4.3.5.2	Verwendung von Spülpuffern mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen	77
4.3.5.3	Einsatz von verschiedenen Matrices	77
4.3.5.4	Analyse der störenden Proteine mittels Gelelektrophorese	78
4.3.6	Entwicklung einer t-PA-Analytik mittels Kationenaustauschchromatographie	80
4.4	t-PA-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie	83
5	Zusammenfassung und Ausblick	86
6	Literaturverzeichnis	91
7	Anhang	96
7.1	Durchführung des ELISA (Testkit Imulyse™ tPA)	96
7.2	Immobilisierung von Proteinen auf GMA-EDMA-Disks [KASPER, 1998]	97
7.3	Immobilisierung von Peptiden auf GMA-EDMA-Disks [TENNIKOVA, 1999]	98
7.4	Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	98
7.5	Aminosäure-HPLC	100
7.6	Kationenaustausch-HPDC	100
7.7	PBS-Puffer (20-fach konzentriert)	100
7.8	Abkürzungsverzeichnis	100

1 Einleitung und Zielsetzung

Die biotechnologische Produktion vieler therapeutisch wirksamer Proteine ist oftmals ausschliesslich durch Kultivierung von animalen oder humanen Zellen möglich, da nur sie in der Lage sind, komplexe Proteine wie z.B. Glykoproteine zu synthetisieren. Die Kultivierung von scherstressempfindlichen Tierzellen ist sehr kostenintensiv (komplexe Nährmedien, anspruchsvolle Bioreaktortechnik) und zeitintensiv (lange Wachstumszeiten), und auch die Aufarbeitung und die Analytik der Produkte verursachen weitere Kosten. Um die Produktion von komplexen Proteinen rentabel auch im großtechnischen Maßstab durchführen zu können, sind kostengünstige Produktionsverfahren notwendig. Das bedeutet, dass jeder einzelne Produktionsschritt optimiert sein muss.

In der Tierzellkultivierung wurde erst vor einigen Jahren damit begonnen, den Einfluss der Temperatur auf das Wachstums- und das Produktionsverhalten der Zellen genauer zu untersuchen. Dabei wurden unterschiedliche Auswirkungen von Temperaturänderungen beobachtet, die aber zum Teil nur unzureichend oder gar nicht erklärt werden können. Deshalb soll der Prozessparameter Temperatur in dieser Arbeit im Hinblick auf eine Optimierung der Produktausbeute von t-PA bei der Kultivierung von CHO-Zellen untersucht werden. Dabei sollen auch Versuche, bei denen die Kultivierungstemperatur während der Kultivierung verändert wird, durchgeführt werden.

Im Weiteren soll eine Onlineanalytik zur Bestimmung des Proteins t-PA entwickelt werden. Dazu ist ein System zur Onlineprobenahme notwendig, das eine sterile Probenahme und Abtrennung der Zellen vom Kulturüberstand gewährleistet. Verschiedene kommerziell erhältliche Probenahmesysteme sollen auf ihre Anwendbarkeit untersucht werden.

Zur Onlineanalytik von t-PA soll eine Methodenentwicklung auf Grundlage der High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography (HPMADC) erfolgen. Die chromatographische Methode eignet sich aufgrund der robusten Eigenschaften und der Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung innerhalb weniger Minuten für den Einsatz als Onlineanalytik. Bei dieser Methode werden auf makroporöse Disks Affinitätsliganden immobilisiert und diese Disks als stationäre Phase in der Chromatographie eingesetzt. Es

können chromatographische Läufe mit Durchflussraten von mehr als 4 mL/min durchgeführt werden, so dass Analysenzeiten von weniger als 2 Minuten möglich sind.

Zum Einen soll durch Optimierung des Kultivierungsprozesses der t-PA-produzierenden CHO-Zellen die Produktausbeute erhöht und zum Anderen zur Onlineanalytik von t-PA eine schnelle und robuste Bestimmungsmethode entwickelt werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Säugetierzellen in der Biotechnologie

„Warum Verbindungen selbst mühsam herstellen, wenn es auch ein Bazillus kann?“- dieses Zitat von I.B.S. Haldane aus dem Jahr 1929 beschreibt den Grundgedanken der Biotechnologie. Der Begriff „Biotechnologie“ ist allerdings erst später über die Grenzen der Forschungslabore hinaus bekannt geworden und inzwischen hat die wissenschaftliche und technische Entwicklung einen rasanten Fortschritt gemacht [PRENTIS, 1987].

Bei den ersten großtechnischen Prozessen wurden Bakterien zur Herstellung von wichtigen Industriechemikalien wie Aceton und Glycerin (seit 1912) eingesetzt. Es folgte 1944 die Penicillin-Großproduktion. Ein großer Schritt in der Entwicklung brachte zu Beginn der 70er Jahre die Gentechnologie. Die Möglichkeit, in Mikroorganismen fremde Stücke genetischer Informationen einzubauen und so beispielsweise rekombinantes Insulin herzustellen, erweiterte vor allem die therapeutischen Möglichkeiten bei vielen Krankheiten [DELLWEG, 1994; PRENTIS, 1987].

Die ersten Invitrokultivierungen von tierischen Zellen gelangen 1950. Zunächst wurden auf diese Weise Impfstoffe gegen Polio hergestellt; es folgte die Produktion von Impfstoffen gegen weitere Viruserkrankungen wie Masern oder Röteln [ACTIP, 1998].

Heute werden durch Zellkulturtechnik sehr viel mehr Proteine zur Therapie verschiedener Krankheiten hergestellt (s. Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Produkte aus Säugetierzellkulturen zur therapeutischen Behandlung [ACTIP, 1998].

Erkrankung	Produkt
Bluterkrankung	Blutgerinnungsfaktoren VIII und IX
Blutarmut	Erythropoietin (EPO)
multiple Sklerose	Interferone
Herzerkrankungen	tissue plasminogen activator (t-PA)
Wachstumsstörungen	Wachstumshormone (hGH)
Krebs	Interferone, Interleukine
virale Erkrankungen	Interferone, Interleukine

Weitere Anwendungen sind beispielsweise der Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur Reduzierung des Abstoßungsrisikos bei Organtransplantationen oder die Verwendung von spezifischen Antikörpern zur Analytik von Proteinen.

Animale Zellkulturen werden zu diagnostischen Zwecken und zum Test von neuen Pharmazeutika verwendet. Gleichzeitig bilden sie eine Basis für eine neue Art der Gentherapie. Fehlerhafte Gene können möglicherweise über einen Gentransfer mit rekombinanten Viren in bestimmten Organen ersetzt werden. Die Expressierung dieser Viren erfolgt zuvor in Säugetierzellen.

Der Vorteil von tierischen und humanen Zellkulturen gegenüber Bakterien und Pilzen ist die Möglichkeit der Expression von großen und komplexen Proteinen. Die für die einwandfreie Funktion von Proteinen notwendige Glykosilierung und richtige Faltung kann von Säugetierzellen, jedoch nicht von Bakterien durchgeführt werden.

Als Nachteile der Zellkulturen sind allerdings die hohen Kosten bei der Kultivierung und die geringen Ausbeuten im Vergleich zu Bakterienkultivierungen zu nennen. Aufgrund der Scherstressempfindlichkeit und der Sensibilität gegenüber den Kultivierungsbedingungen bestehen hohe Anforderungen an Prozessparameter wie Medienzusammensetzung, Begasung und Temperatur [ACTIP, 1998].

Trotzdem wird aus rein wissenschaftlichen aber auch aus wirtschaftlichen Gründen in der Zukunft eine Herstellung bestimmter Proteine nur durch Kultivierung von Säugetierzellen möglich sein. Dazu gehören wahrscheinlich die monoklonalen Antikörper wegen der komplexen Transkription und Translation ihres genetischen Materials und die Interferone aufgrund der Kosten und der Effektivität [TREVAN, 1993].

Zur Gewinnung der biotechnologisch hergestellten Produkte sind nach der Kultivierung noch eine Reihe von Aufreinigungs- und Fraktionierungsschritten (engl. Down stream-processing) notwendig, um das Rohprodukt in eine verwertbare Form umzuwandeln. Diese Verfahrensschritte verursachen oft mehr als 50 % der Gesamtkosten [DELLWEG, 1994]. Dabei gibt es kein allgemein gültiges Reinigungsschema, so dass für jedes neue Produkt ein geeigneter Aufarbeitungsweg entwickelt werden muss. Entsprechendes gilt für die qualitative und quantitative Analytik der produzierten Proteine zur Qualitätskontrolle [LOTTSPEICH, 1998].

2.2 Kultivierungen von Säugetierzellen bei Temperaturen unterhalb von 37 °C

Um einen biotechnologischen Prozess wirtschaftlicher zu gestalten, müssen alle Prozessparameter optimiert werden. Die Temperatur ist dabei meist ein entscheidender Faktor, um das Wachstum von Mikroorganismen zu beeinflussen und die Produktausbeute zu verbessern. Säugetierzellen werden im allgemeinen unter denselben Bedingungen gehalten, die auch in ihrer natürlichen Umgebung herrschen, d.h. sie werden häufig bei 37 °C kultiviert [ACTIP, 1998]. Untersuchungen verschiedener Zelllinien ergaben, dass eine Steigerung der Vitalität und der Produktivität durch Änderungen der Kultivierungstemperatur bei Säugetierzellen möglich ist.

2.2.1 Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das Zellwachstum

Die Abhängigkeit des Zellwachstums von der Temperatur wurde bei verschiedenen animalen und humanen Zellkulturen untersucht. Bei Kultivierungstemperaturen unterhalb von 37 °C wurde bei vielen Zelltypen wie z.B. Lungenzellen [TAKAGI UND UEDA, 1994], Maus-Maus-Hybridomazellen [REUVENY, 1986; SURESHKUMAR, 1991] und CHO-Zellen [FURUKAWA, 1998] ein vermindertes Zellwachstum festgestellt.

Eine verlängerte exponentielle Wachstumsphase wurde bei Versuchen mit CHO-Zellen bei Kultivierungstemperaturen von 34 °C von Rössler et al. [RÖSSLER, 1996] ermittelt. Die unterschiedlichen Temperaturen hatten dabei keinen Einfluss auf die maximal erreichbare Zelldichte, wie auch bei Versuchen von Weidemann et al. [WEIDEMANN, 1994] mit BHK-Zellen nachgewiesen wurde.

Ein fast identisches Wachstumsverhalten fand Loa [LOA, A., 1997] bei Kultivierungen von CHO-Zellen bei 37 °C und 33 °C. Bei einer Temperatur von 31 °C wurde allerdings nur noch ein schwaches lineares Wachstum ($\mu_{\max} = 0,27$) beobachtet. In weiteren Kultivierungsversuchen konnten Grenztemperaturen für verschiedene Zelllinien ermittelt werden, unterhalb derer kein exponentielles, sondern nur noch lineares Wachstum der Zellen erfolgt [BUCH, 1997].

Eine Absenkung der Kultivierungstemperatur ergab bei den unterschiedlichen Zelllinien im allgemeinen eine höhere und länger anhaltende Vitalität der Zellen [REUVENY, 1986; SURESHKUMAR, 1991; TAKAGI UND UEDA, 1994; BUCH, 1997].

Weitergehende Untersuchungen von CHO-Zellen bei Temperaturen unter 37 °C zeigten einen verringerten Verbrauch an Nährstoffen [FURUKAWA, 1998] und eine verminderte ATP-Produktion [MOORE, 1997], die auf eine Verlangsamung des gesamten Stoffwechsels

schliessen lässt. Hinweise auf eine Beeinflussung des Stoffwechsels geben auch die beobachteten Glucose- und Lactatstoffwechselraten. Bei verminderter Kultivierungstemperatur besteht ein günstigeres Verhältnis von Glucoseverbrauch und Lactatbildung [WEIDEMANN, 1994]. Die Glutaminverbrauchsrate hingegen verhält sich unabhängig von der Temperatur, wie in Versuchen mit CHO-Zellen nachgewiesen wurde [BUCH, 1997; RÖSSLER, 1996].

Bei allen genannten Zelllinien wurde bei Kultivierungstemperaturen unterhalb von 37 °C ein verlangsamtes Wachstum, aber auch eine verbesserte Vitalität beobachtet. Im Hinblick auf die Produktion von Proteinen und anderen Produkten könnte die höhere und länger anhaltende Vitalität der Zellen zu einer größeren Ausbeute führen.

2.2.2 Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktivität

Eine Steigerung der Produktausbeute im Verhältnis zur Gesamtzellzahl konnte bei Kultivierungen von t-PA produzierenden CHO-Zellen bei 31 °C erreicht werden [LOA, A.,1997]. Merten et al. [MERTEN, 1985] beschreiben eine verbesserte Produktivität bei Kultivierungstemperaturen von 32 °C bei Human-Maus-Hybridomazellen, die normalerweise schnell an Produktivität verlieren. Ein positiver Einfluss der geringen Kultivierungstemperatur auf die Produktausbeute konnte auch bei BHK-Zellen, die den Blutfaktor VII exprimieren [RENEMANN, 1997], festgestellt werden.

Furakawa et al. [FURUKAWA, 1998] beobachteten eine deutliche Zunahme der Bildung eines α -amidierenden Enzyms bei Kultivierungen von CHO-Zellen bei 30 °C und 32 °C mit zunehmender Kultivierungsdauer. Bei Kultivierungen oberhalb von 32 °C nahm die Produktivität der Zellen während der Kultivierung ab. Sie erklärten diese Zusammenhänge mit einem stabilisierenden Effekt der tieferen Temperaturen auf die m-RNA. Die m-RNA kann sich bei niedrigeren Temperaturen anreichern und es folgt eine höhere Produktivität mit zunehmender Kultivierungsdauer. Außerdem wird davon ausgegangen, dass die Translation und Sekretion bei tiefen Temperaturen beschleunigt ist.

Bei anderen Kultivierungsversuchen wurde beobachtet, dass es zur Produktionssteigerung notwendig ist, die Zellen möglichst lange in der G1-Phase zu halten. So erreichten Kaufmann et al. [KAUFMANN, 1998] eine achtfache Produktivität von CHO-Zellen bei 30 °C.

Diese Theorie wird auch durch Versuche von Suzuki und Ollis [SUZUKI, 1990] nachgewiesen. Sie nutzten chemische Methoden (Zusätze von Thymidin oder Hydroxyurea), um Maus-Maus-Hybridoma-Zellen in der G1-Phase zu arretieren. Auf diese Weise konnte die Produktivität um 130 % gesteigert werden.

Auch Bloemkolk et al. [BLOEMKOLK, 1992] wiesen eine erhöhte Produktivität nach, wenn die Zellen länger in der G1-Phase gehalten werden. Dabei wurde unterschieden, durch welchen Mechanismus das Wachstum inhibiert wird. Bei Hybridomazellen beispielsweise wird durch Temperaturabsenkung zwar das Wachstum inhibiert, aber die Temperaturabsenkung hat keine Auswirkungen auf die Produktivität.

Buch [BUCH, 1997] und Renemann [RENEMANN, 1997] untersuchten ebenfalls den Zusammenhang von Zellzyklus und Produktivität an verschiedenen CHO-Zelllinien und BHK-Zellen. Dabei konnten sie den von Kaufmann beobachteten Sachverhalt nicht bestätigen. Statt dessen erzielten sie eine Produktionssteigerung bei verkürzter G1-Phase und verlängerter S-Phase.

Bei anderen Zelllinien wurden hingegen gegenteilige Effekte bei erniedrigten Kultivierungstemperaturen festgestellt. So fanden Reuveny et al. [REUVENY, 1986] und Sureshkumar [SURESHKUMAR, 1991] eine verringerte Produktivität von Maus-Maus-Hybridomazellen bei Kultivierungstemperaturen unterhalb von 34°C.

Eine gleichbleibende Produktivität wurde bei BHK-Zellen [WEIDEMANN, 1994] und CHO-Zellen [RÖSSLER, 1996], die beide AT III exprimieren, beobachtet.

Eine einheitliche Aussage über den Einfluss der Temperatur auf die Produktivität von humanen und animalen Zellkulturen ist nicht möglich. Nur bei einem Teil der verschiedenen Zelllinien führt eine Temperaturerniedrigung zum Anstieg der Produktivität. Ein möglicher Grund ist das längere Verweilen der Zellen in der G1-Phase, in der die Produktion von Sekundärmetaboliten erfolgt.

2.2.3 Einfluss einer Temperaturänderung während der Kultivierung

Aufgrund der in Kapitel 2.2.2. dargestellten Auswirkung einer Temperaturerniedrigung auf die Produktivität einzelner Zelllinien wurde eine Kultivierungsstrategie zum Erreichen einer hohen Produktausbeute entwickelt. Zunächst erfolgt das Anzüchten der Zellen bei Temperaturen, die ein schnelles Wachstum gewährleisten. Ist eine hohe Zelldichte erreicht, erfolgt das Absenken der Temperatur, um die Vitalität der Zellen zu stabilisieren und die höchste Produktivität zu erzielen.

Kaufmann et al. [KAUFMANN, 1998] führten Temperaturshifts von 37 °C auf 30 °C bei einer CHO-Zelllinie, die Phosphatase produziert, durch. Sie fanden heraus, dass das Wachstum um so mehr inhibiert wurde, je eher der Temperaturshift durchgeführt wurde. Die Ausbeute bei diesen Versuchen war maximal um den Faktor 1,7 erhöht, dabei befanden sich 80 % der Zellen in der G1-Phase.

Takagi und Ueda [TAKAGI UND UEDA, 1994] optimierten die t-PA-Produktion mit embryonalen Lungenzellen durch Anzüchten der Zellen bei 37 °C und nachfolgendem Absenken der Temperatur auf 33 °C.

Eine Steigerung des Produkttiters um 112 % wurde bei Kultivierungen von t-PA produzierenden CHO-Zellen durch Absenken der Temperatur nach dem Anwachsen auf 33 °C erreicht [BUCH, 1997].

Auch Moore et al. [MOORE, 1997] führten Temperaturshiftexperimente an CHO-Zellen durch. Sie senkten die Temperatur nach 48 h Kultivierungsdauer von 37 °C auf 30 °C und legten bei diesen Versuchen besonderes Augenmerk auf die Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Apoptose der Zellen. Durch die Reduktion der Temperatur erfolgte ein längeres Verweilen der Zellen in der G1-Phase und das Zellsterben wurde deutlich vermindert. Sie bemerkten allerdings auch, dass, sobald das Zellsterben einsetzt, die Geschwindigkeit der Abnahme der Vitalität bei 30 °C genauso hoch ist wie bei 37 °C.

Temperaturshiftexperimente mit einer temperatursensitiven Mutante einer CHO-Zelllinie ergaben, dass eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase höhere Ausbeuten liefert. Das Besondere dieser Mutante ist, dass bei 34°C die Wachstumsrate der Zellen am höchsten ist und das Wachstum bei 39°C inhibiert wird. Die Zellen wurden im Wechsel bei 34°C und 39°C kultiviert, so dass eine Arretierung der Zellen in der G1-Phase erfolgte. Im Vergleich zu Kultivierungen, die bei 34°C durchgeführt wurden, gab es eine drei- bis vierfache Steigerung der Produktausbeute [JENKINS, 1993].

Weidemann et al. [WEIDEMANN, 1994] führten Temperaturshiftexperimente an adhärent wachsenden BHK-Zellen durch. Dies führte zu einer Ökonomisierung des Produktionsprozesses hinsichtlich des Nährstoffverbrauchs, eine Steigerung der Produktivität der Zellen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Bei Versuchen mit einer AT III-produzierenden CHO-Zelllinie wurde ebenfalls das von Weidemann beschriebene Verhalten beobachtet [RÖSSLER, 1996].

Wie bei Kultivierungsversuchen, die ohne Temperaturshift bei erniedrigter Temperatur durchgeführt wurden, können bei diesen Experimenten keine einheitlichen Aussagen über den Einfluss der Temperatur auf die Produktivität der Zellen gemacht werden. Ob eine höhere Produktausbeute über Temperaturänderung erreichbar ist, muss für jede Zelllinie einzeln untersucht werden. Für viele animale und humane Zellen ist eine geeignete Temperaturführung jedoch eine sinnvolle Möglichkeit, den Produktionsprozess zu optimieren.

2.3 Probenahmesysteme zur Onlinekontrolle von Tierzellkulturen

Die Produktkontrolle ist ein wichtiger Faktor bei biotechnologischen Prozessen. Aus ökonomischen Gründen sollte die Produktkonzentration während des gesamten Prozesses ohne zeitliche Verzögerung und ohne großen Aufwand in Bezug auf die Zellabtrennung und die Analytik verfolgt werden können. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Systeme für das sogenannte Onlinemonitoring von Bioprozessen entwickelt. Eine entscheidende Komponente ist dabei die Trennung von Zellen und Produkten. Dafür sind Probenahmesysteme notwendig, die eine sterile Probenahme gewährleisten und im Anschluss eine Onlineanalytik ermöglichen.

Entsprechende Probenahmesonden wurden für verschiedene Anwendungen entwickelt. Diese Systeme können in zwei Grundtypen eingeteilt werden: In-situ-probenahmesonden, die in den Bioreaktor eingesetzt werden, und Systeme, die an einen Bypass angeschlossen werden. Weitere Unterscheidungen können bei den Membranen, die zur Abtrennung von Zellen verwendet werden, gemacht werden. Eine Übersicht der Membranen und Probenahmesonden gibt Tabelle 2.2.

Tab. 2.2: Probenahmesysteme.

Probenahmetyp	Membran	Probenahmesonde
in-situ	tubuläre Membran Flachmembran Keramik (diskusförmig)	ESIP (Eppendorf, Trace) ProcessTrace (Trace)
bypass	Flachmembran mit Rührer (Cross-Flow-Filtration) Flachmembran ohne Rührer (Bildung eines Filterkuchens)	Biopem (B. Braun) Sartocon (Sartorius)

Bei Tierzellkultivierungen wurden bisher zwei verschiedene Systeme angewendet. Fenge et al. [FENGE, 1991] verwendeten die Biopem-Probenahmesonde und das ESIP-Modul (Eppendorf-sterile-inline-Probenahmesonde) zur Kontrolle der Antikörperproduktion bei Hybridomazellen. Diese Probenahmesysteme werden im folgendem beschrieben.

Das von der Arbeitsgruppe Kroner entwickelte und von B.Braun, Melsungen, vertriebene Biopem ist ein Kreuzstrommodul aus Edelstahl, das aus einem Aufsatz mit höhenverstellbarem Rührer und einem zweiten Teil zum Einsetzen der Membran besteht. Die Membran trennt die Retentat- und die Analysenseite. Das Prozessfluid wird über zwei Stutzen

im Aufsatz kontinuierlich zu- und abgeführt und das Filtrat wird über einen Stutzen im Boden abgepumpt. Dieses Probenahmemodul hat ein Arbeitsvolumen von 200 mL [KRONER, 1986]. Für den Einsatz bei Kultivierungen von Hybridomazellen wurden entweder PVDF-Membranen mit Porengrößen von 0,22 μm verwendet, die neben dem Filtrationseffekt auch eine Sterilbarriere bilden, oder PVDF-Membranen mit Porengrößen von 5 μm in Kombination mit einer tangentialen Flusszelle als Sterilbarriere. Bei Verwendung der 0,22 μm -Membranen wurde eine Abnahme der Permeabilität für das Produkt nach 100 Stunden festgestellt, die auf Agglomeration der Membranen mit Zellbruchstücken und großen Proteinen zurückzuführen ist. Der Betrieb mit Membranen mit größerem Porendurchmesser und der Flusszelle ergaben keinen Vorteil, weil die Permealibilität in gleicher Weise abnahm [FENGE, 1991].

Das ESIP-Modul kann von der Fa. Trace, Braunschweig bezogen werden. Die Anwendung des Moduls an Tierzellkulturen erfolgte an der Universität Hannover von Wentz [WENTZ, 1988] und Graf [GRAF, 1989]. Es kann über einen Normstutzen in einen Bioreaktor eingebaut werden. Ein Ansaugstutzen reicht bis in das Kulturmedium. Das Medium wird durch die tubuläre Membran, die in eine entsprechende Vorrichtung eingespannt ist, gesaugt.

Von Fenge [FENGE, 1991] wurde das Modul mit einer PTFE-Membran (Porendurchmesser 1 μm) betrieben. Als Sterilbarriere wurde zusätzlich ein Kreuzstrommodul mit einer PVDF-Membran mit einem Porendurchmesser von 0,22 μm eingesetzt. Die Permeabilität für das Produkt lag 75 Stunden bei 100 %, nahm dann allerdings bis zur 150. Stunde auf weniger als 75 % ab.

Während diese Probenahmesysteme bei Kultivierungen von anderen Mikroorganismen erfolgreich eingesetzt werden, konnten bei Tierzellkulturen aufgrund der starken Abnahme der Membranpermeabilität keine zufrieden stellenden Ergebnisse erreicht werden.

2.4 Affine Methoden zur Analytik von Proteinen

Zur Bestimmung von rekombinant produzierten Proteinen werden häufig Methoden verwendet, die Affinitätswechselwirkungen zwischen geeigneten Liganden und dem Protein ausnutzen. Der Vorteil der Affinitätstrennung ist eine sehr hohe Selektivität, mit der aus komplexen Mischungen ein Protein in einem einzigen Schritt isoliert werden kann [LOTTSPREICH, 1998].

Aus diesem Grund ist der Einsatz von immunoaffinen Methoden zur Onlinekontrolle von Bioprocessen naheliegend. Eine Onlineproduktanalytik erfordert außerdem Methoden, die innerhalb weniger Minuten Aufschluss über die aktuelle Produktkonzentration geben und zusätzlich robust und zuverlässig sind. Für die online Analytik kommen deshalb zum Einen die Fliess-Injektions-Analytik (FIA) und zum Anderen verschiedene chromatographische Verfahren in Frage.

Diese Verfahren werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt und ihre Anwendung zur Aufarbeitung und Analytik von Proteinen beschrieben. Die Methode der High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatographie (HPMADC), die in dieser Arbeit zur Analytik von t-PA eingesetzt wird, wird in Kapitel 2.4.2.3 ausführlich dargestellt. Die Grundlagen der Membranchromatographie sind zuvor in Kap. 2.4.2.1 erläutert.

2.4.1 Fliess-Injektions-Analytik

Bei der immunoaffinen Fliess-Injektions-Analytik wird zwischen der turbidimetrischen FIA und der heterogenen FIA unterschieden.

Das Prinzip der turbidimetrischen Immuno-FIA beruht auf Trübungsmessung bei Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes. Dabei werden der produktspezifische Antikörper und die Probelösung in einer Probenschleife gemischt und die Trübung photometrisch verfolgt [FREITAG, 1991].

Diese Methode wurde von Schulze et al. [SCHULZE, 1994] zur Bestimmung von t-PA aus Kulturüberständen von Tierzellen angewendet. Es konnte eine gute Übereinstimmung ($r = 0,98$) der Konzentrationen, die mit FIA und als Referenz mit ELISA bestimmt wurden, festgestellt werden. Ebenfalls gute Ergebnisse erhielten Freitag et al. [FREITAG, 1991] beim Vergleich von FIA und ELISA bei der Analytik von AT III ($r = 0,988$) und Pullulanase ($r = 0,976$) aus Tierzell- bzw. Bakterien-Kultivierungen. Eine Onlineanwendung der turbidimetrischen FIA bei Hochzelllichtperfusionskultivierungen von Hybridomazellen wird von Fenge [FENGE, 1991] beschrieben. Der quantitative Nachweis der produzierten

monoklonalen Antikörper ist mit einem Regressionsfaktor von 0,996 als sehr gut zu bewerten. Die Probenahme erfolgte dabei mit verschiedenen Onlineprobenahmesystemen (s. Kap. 2.3). Bei der heterogenen Immuno-FIA wird ein produktspezifischer Antikörper auf eine Kartusche immobilisiert. Die Probelösung wird durch die Kartusche gepumpt; dabei werden die Produktmoleküle gebunden. Nachfolgend wird gespült und das Produkt eluiert. Die quantitative Bestimmung erfolgt dann mit Hilfe eines geeigneten Detektors [SCHULZE, 1994]. Beyer et al. [BEYER, 1995] beschreiben die Anwendung dieser Analysetechnik bei t-PA- und AT III-Produktionen in Tierzellkultivierungen. Sie beurteilen diese Methode als eine schnelle, stabile und gut reproduzierbare Proteinanalytik. Ebenfalls sehr gute Übereinstimmung mit ELISA-Messungen erhielten Schulze et al. [SCHULZE, 1994] bei der Entwicklung einer heterogenen FIA zum Nachweis von t-PA aus Tierzellkulturen. Eine weitere Anwendung beschreiben Reinecke und Scheper [REINECKE, 1997] für die Bestimmung von IgG aus Hybridoma-Zellkulturen. Ohne Vorbehandlung der Kultivierungsproben erreichten sie eine Analysenzeit von 6 min. Die Abweichung von FIA und ELISA lag in diesem Falle unter 10 %.

Im Vergleich werden bei der heterogenen Immuno-FIA weniger Antikörper verbraucht als bei der turbidimetrischen FIA, weil die Kartuschen mehrfach verwendet werden können.

2.4.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls (Adsorbent) an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner. Typische Bindungspaare sind Antigene und Antikörper, Glykoproteine und Lectine, Enzyme und Coenzyme. Ein affiner Bindungspartner wird kovalent an eine Matrix gebunden und dient als immobilisierter Ligand. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Adsorbent wird genutzt, um diesen selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird dann entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung des pH Wertes oder der Ionenstärke. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen [LOTTSPEICH, 1998].

Biospezifische Wechselwirkungen für die Affinitätschromatographie besitzen Bindungskonstanten k_D in der Größenordnung von etwa 10^{-5} bis 10^{-7} M. Bei größeren k_D -Werten von z.B. 10^{-4} wird die Bindung zu schwach, um für die Chromatographie nutzbar zu sein. Andererseits wird die Bindung zu stark, wenn k_D kleiner als 10^{-8} M ist. Die Elution

wird dann erschwert und ist eventuell nur unter denaturierenden oder inaktivierenden Bedingungen möglich.

Die Durchführung der Affinitätschromatographie orientiert sich an den allgemeinen Schritten: Adsorption der Probe, Waschen, Desorption und Regeneration der Matrix. Für die Adsorption der Probe spielen die Bindungskonstante des Proteins und die Kapazität der Säule eine wesentliche Rolle. Das Protein und die Affinitätsmatrix werden in einem geeigneten Puffer äquilibriert, der optimale Werte von pH und Ionenstärke sicherstellt. Das Auftragsvolumen spielt keine Rolle. Beim Waschen wird versucht, bei erhöhter Ionenstärke unspezifisch gebundene Komponenten zu entfernen. Für die Desorption ist die Erniedrigung des pH-Wertes die gängigste Methode. Die Regeneration für mehrfachen Gebrauch der Affinitätsmatrix ist bei aufwendig hergestellten oder teuren Medien von Interesse [LOTTSPREICH, 1998].

2.4.2.1 Membranen als Affinitätsmatrix

In der Bioprozessaufarbeitung werden zur Separation von Proteinen, die sich sehr stark in ihrer Größe unterscheiden, häufig Filtrationsmembranen verwendet. Das Trennprinzip beruht auf einem Filtrationseffekt, bei dem kleine Moleküle durch die Membran gespült werden und größere Moleküle auf der Membran zurückbleiben. Durch chemische Modifikation der Membran mit biospezifischen Affinitätsliganden wird die Trennleistung weiter erhöht.

Die Unterschiede zwischen Membranchromatographie und Säulenchromatographie liegen in den Transporteigenschaften der Trennmedien. Bei Trennsäulen, die mit starren Partikeln gepackt sind, stellt die Porendiffusion das grösste Massentransporthindernis dar. In der Membranchromatographie entfällt die Porendiffusion, weil der Transport nur durch die sogenannten Durchflusssporen stattfindet. Eine Transportlimitierung gibt es lediglich aufgrund der Filmdiffusion in den Durchflusssporen, die um einige Größenordnungen kleiner ist als die Porendiffusion. Außerdem ermöglichen die Durchflusssporen eine hohe Flussrate bei geringem Druckabfall. Entsprechende Nachweise wurden von Briefs und Kula [BRIEFS, 1992] geführt. Bei der Verwendung von Cibacron Blue-Membranen stellten sie fest, dass der Massentransport nur auf Konvektion zurückzuführen ist.

Die chromatographischen Wechselwirkungen, die eine Auftrennung der verschiedenen Moleküle bewirken, verlaufen im Allgemeinen sehr schnell. Durch den Wegfall der Porendiffusion in der Membranchromatographie werden diese Interaktionen geschwindigkeitsbestimmend.

Aus diesem Grund und der Möglichkeit der Einstellung einer hohen Flussrate reduzieren sich die Analysen- bzw. Aufreinigungszeiten maßgeblich im Vergleich zur Säulenchromatographie [TENNIKOVA, 2000].

Unarska et al. [UNARSKA, 1991] stellten eine zweihundert- bis dreihundertfache Verringerung der Analysenzeit bei der Bestimmung von γ -Globulin fest. Dabei wurde Protein A als Ligand auf einer Membran immobilisiert.

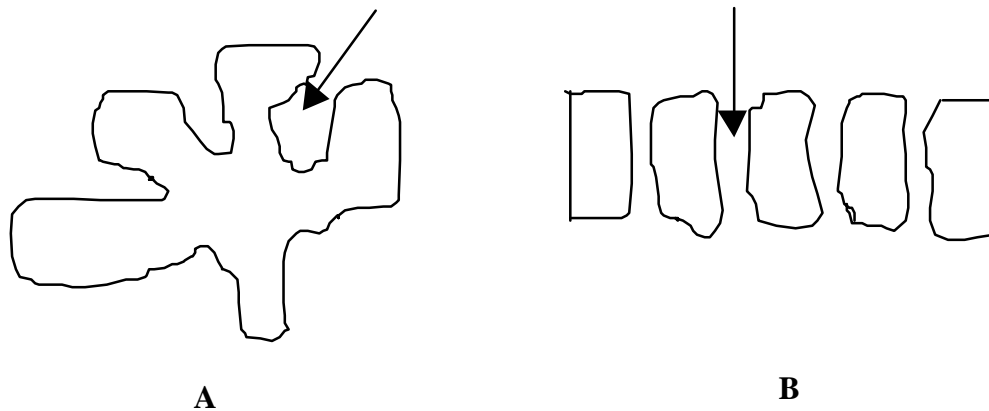


Abb. 2.1: A: Diffusionsporen eines Säulenpartikels, B: Durchflusssporen einer Membran.

Weitergehende Untersuchungen wurden von Nachman [NACHMAN, 1992] durchgeführt. Sie charakterisierten die Kinetik von Antigen-Antikörper-Reaktionen mit Hilfe der Membranchromatographie. Sie arbeiteten unter der Annahme, dass der chromatographische Prozess von drei Hauptfaktoren beeinflusst wird: der Bindungskinetik, der axialen Diffusion und der Porendiffusion. Bei der Membranchromatographie entfällt der Faktor der Porendiffusion. Durch Änderung der Flussrate, der Ligandendichte und der Ligatkonzentration konnte festgestellt werden, dass ab einer linearen Flussrate von 0,5 cm/min die Bindungskinetiken einen kontrollierenden Einfluss haben. Ferner kamen sie zu dem Ergebnis, dass bei Antigenkonzentrationen oberhalb der effektiven Dissoziationskonstante des Antigen-Antikörper-Komplexes ein effektives Abfangen des Antigens aus der Lösung möglich ist. Somit ist es möglich, stark verdünnte Proteinlösungen über Membranchromatographie zu analysieren und das Protein in hoher Konzentration zu gewinnen.

Langlotz und Kroner [LANGLOTZ, 1992] beurteilen Affinitätsmembranen als sehr nützliches Hilfsmittel bei der Aufreinigung von Proteinen. Sie sehen vor allem in der Anwendung von

Affinitätsmembranen im Cross-flow-Modus zur Prozessierung von Zellkulturüberständen ohne Vorfiltration eine viel versprechende Methode für die Zukunft.

2.4.2.2 Anwendungen von Membranen in der Affinitätschromatographie

Den Vorteil des ausschliesslich konvektiven Transports in der Membranchromatographie nutzten Huang et al. [HUANG, 1988] bei einem scale-up von affinitätschromatographischen Anwendungen. Sie verwendeten modifizierte Cellulose als Membran und führten zusätzlich ein System des radialen Flusses ein, so dass die Flussraten noch weiter erhöht werden konnten.

In einer Studie von Krause et al. [KRAUSE, 1991] wurde eine Cibracron Blue-Membran mit verschiedenen Gelmatrices verglichen. Bei der Aufreinigung von Malatdehydrogenase ergaben sich vergleichbare Kapazitäten der Cibracron Blue-Membran wie bei der Gelmatrix Blue Sepharose. Als Vorteil der Membran gegenüber den Gelmatrices erwies sich die Möglichkeit der Aufarbeitung von unvorbehandelten Homogenaten.

Liu und Fried [LIU, 1994] nutzten eine mit Cibacron Blue 3 GA immobilisierte Cellulosemembran, um die dynamische Affinitätsadsorption von Lysozym zu untersuchen. Es wurden Durchbruchskurven des Lysozyms in Abhängigkeit von der Anzahl der gestapelten Membranen aufgenommen. Es zeigte sich, dass die Durchbruchskurven unabhängig von der Flussrate, aber abhängig von der Anzahl der Membranen waren.

Zur Aufreinigung von Kultivierungsüberständen, die AT III enthielten, wurden von Lütkemeyer et al. [LÜTKEMEYER, 1993] Membranen eingesetzt, auf die durch reduktive Aminierung Heparin gebunden wurde. Heparin besitzt eine sehr starke Affinität zu AT III. Mit diesen Membranen erzielten sie eine Aufreinigung des AT III von 97 %.

Nachman et al. [NACHMAN, 1992] entwickelten ein System zur Aufreinigung von rekombinantem Interferon- α 2a, Interleukin-2 und Interleukin-2-Rezeptoren. Es wurden geeignete Antikörper auf eine Hydrazin-Hohlfibermembran immobilisiert und über ein standardisiertes Programm (pH-Shift von pH 7,0 auf pH 2,8) konnten die Wachstumsfaktoren mit einer Reinheit von über 95 % gewonnen werden.

2.4.2.3 High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography

Eine mit der Membranchromatographie vergleichbare Methode, die High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatographie (HPMADC), wurde von Tennikova et al. [TENNIKOVA, 1990] vor etwa 10 Jahren entwickelt.

Sie nutzten die Technik der Suspensionspolymerisation, die bis dahin nur zur Produktion von porösen Partikeln genutzt wurde, zur Herstellung von monomeren Blöcken (monolithische Disks). Wird diese Polymerisation in Anwesenheit eines Porogens durchgeführt, erhalten die Monolithen eine makroporöse Struktur. Während des Polymerisationsvorganges werden kleine Mikrokugeln gebildet, die sich wiederum zu größeren Aggregaten (Clustern) zusammenlagern. Der Raum zwischen den Clustern ist relativ groß (Makroporen), während zwischen den einzelnen kleinen Kugeln kleinere Poren vorherrschen, die sogenannten Mesoporen. Die Gesamtheit der Cluster bildet die monolithische Disk [TENNIKOVA, 1990].

Wie bei der Membranchromatographie gibt es auch bei der HPMADC keine Porendiffusion. Deshalb ergeben sich entsprechend gute chromatographische Eigenschaften: eine hohe Flussrate bei geringem Druckaufbau, kurze Analysenzeiten und die Möglichkeit der Aufkonzentration von gering konzentrierten Proteinlösungen.

Die anfänglichen Probleme der Probenverteilung im Monolithen (Bildung von Totzonen, ungleiche Strömungsverteilung) konnten durch die Entwicklung geeigneter Diskkartuschen behoben werden [STRANCAR, 1996]. In Abb. 2.2 sind die kommerziell erhältlichen Disks und Kartuschen der Firma BIA.doo (Slowenien) gezeigt.



Abb. 2.2: Affinitätsdisk mit Kartusche (BIA.doo, Slowenien).

Nach ihrer Fertigstellung befinden sich an der Oberfläche der Disks Epoxygruppen, an die Liganden zur Affinitätschromatographie kovalent gebunden werden können (Abb. 2.3). Die Epoxygruppen können durch entsprechende chemische Reaktionen durch andere funktionelle Gruppen ersetzt werden, so dass diese Disks z.B. auch als Kationenaustauschdisks,

Anionenaustauschdisks, HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)-Disk oder reversed phase-Disks verwendet werden können [TENNIKOVA, 1993].

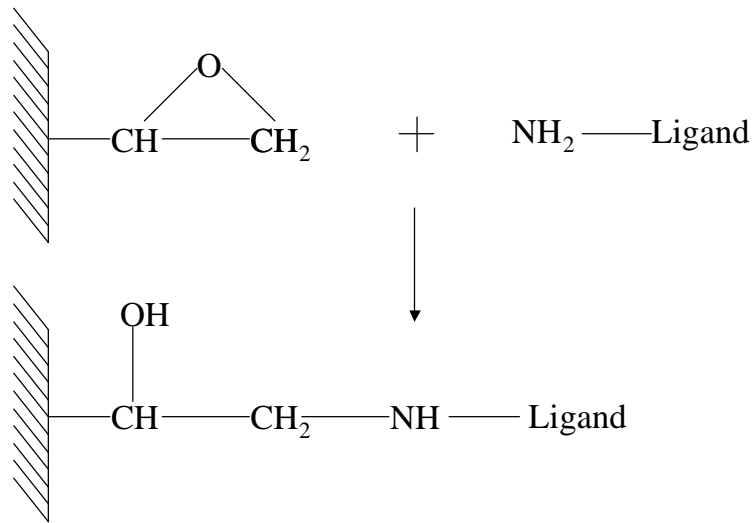


Abb. 2.3: Mechanismus der Kopplung von Liganden an Epoxygruppen [ABOUH-REBYEH, 1991].

2.4.2.4 Anwendungen der HPMADC

Bei verschiedenen Anwendungen konnten die Vorteile der HPMADC gegenüber der Säulenchromatographie bestätigt werden.

Josic [JOSIC, 1994] nutzte diese Methode zur Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Antiseren. Als Affinitätsliganden auf epoxyaktivierten Disks wurden Protein A-Moleküle verwendet. Es konnten in einem Lauf 100 µg des Antikörpers in hoher Reinheit isoliert werden.

Eine weitere Anwendung ist die Separierung und Aufkonzentrierung von Glykoproteinen aus Rattenleber unter Einsatz von Disks, auf die Concanavalin A immobilisiert wurde. Es gelang eine vierzigfache Aufreinigung der Proteine mit einer Ausbeute von über 90 %. Beachtlich ist dabei vor allem die Prozesszeit von nur 1 Stunde [JOSIC, 1998].

Die Technik der HPMADC wurde zur Chromatographie von Kultivierungsüberständen von Kasper [KASPER, 1998] eingesetzt. Zur Isolierung von rekombinantem Protein G aus Zelllysaten von *E. coli* wurden IgG-Moleküle als Affinitätsliganden auf epoxyaktivierten Disks immobilisiert. Durch Optimierung der Immobilisierungsbedingungen konnte bei einer Immobilisierungsdauer von 16 Stunden eine hohe Ligandendichte von 6 mg/mL erreicht werden. Somit war es möglich, das Protein G aus den Lysaten in einem Aufreinigungsschritt in hohen Reinheiten zu gewinnen, die mittels Gelelektrophorese bestätigt wurden.

Berruex [BERRUEX, 1999] erreichte bei der Analytik von monoklonalen Antikörpern mit Affinitätsdisks, auf die Protein A und L immobilisiert waren, sehr hohe Flussraten von 4 und 6 mL/min. Dabei wurde festgestellt, dass die ermittelten Bindungsstärken (Affinitätskonstanten) umso größer sind, je höher die Flussrate ist.

Aufgrund der kurzen Analysenzeiten und der effektiven Trennleistung ist die HPMADC eine effiziente Methode zur Aufarbeitung und Analytik von Proteinen aus komplexen Zellkulturüberständen. Eine Vorbereitung der Proben ist in den meisten Fällen nicht erforderlich, so dass sich diese Methode auch zur Onlineanalytik bei Kultivierungen eignet. Die Vorteile gegenüber der Affinitätsmembranchromatographie liegen in der größeren mechanischen Stabilität und in der Möglichkeit zum unkomplizierten Upscaling.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierungsversuche mit CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary)

3.1.1 Stamm und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierungsversuche werden mit der rekombinanten Zelllinie CHO TF 70 R (Pharmacia & Upjohn, Stockholm, Schweden) durchgeführt. Diese ist gentechnisch so verändert, dass sie humanes t-PA (tissue plasminogen activator) exprimiert. Die Zellen sind an serumfreie Bedingungen adaptiert.

Die CHO-Zellen werden in BioPro1-Medium (Biowhittaker, Verviers, Belgien) und in BioPro1-PF-Medium (ebenfalls Biowhittaker) kultiviert. BioPro1 ist ein serumfreies Nährmedium, das Insulin und Transferrin enthält. BioPro1-PF ist ebenfalls serumfrei, im Gegensatz zu BioPro1 ist es ein völlig proteinfreies Medium, da Transferrin und Insulin durch synthetische Stoffe ersetzt sind [LOA, A., 2000]. Die Medien werden vom Hersteller in 500 mL-Flaschen als Flüssigmedien geliefert.

Die Stammhaltung erfolgt in Monolayerflaschen (75 cm², Greiner, Solingen, Deutschland) und Spinnerflaschen (250 und 500 mL, Techne Corporation, Cambridge, Großbritannien) auf speziellen Spinnerflaschenrührern bei einer Rührergeschwindigkeit von 25 rpm (Techne MCS-104-S oder MCS-102-L Biological Stirrer, Techne Corporation, Cambridge, Großbritannien) in temperierbaren Brutschränken (Typ B5060 EK-02 oder Function line instruments, Heraeus, Hanau, Deutschland) unter 5 %iger Kohlendioxidbegasung und gesättigter Wasserdampf Atmosphäre. Die langfristige Haltung erfolgt in Kulturmedien mit einem Zusatz von Dimethylsulfoxid (5 %) bei -196°C.

3.1.2 Untersuchungen zum Temperatureinfluss auf das Wachstum und die Produktivität von CHO-Zellen

Die Kultivierungen zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf das Wachstum und die Produktivität werden in Spinnerflaschen (250 mL) durchgeführt. Ein Teil der Kultivierungsansätze wird bei konstanter Temperatur gehalten, bei weiteren Ansätzen wird die Kultivierungstemperatur während der Versuche geändert. Eine Übersicht über die Kultivierungsbedingungen der verschiedenen Versuchsreihen gibt Tab. 3.1.

Bei diesen Kultivierungen wird das BioPro1-Medium verwendet. Die Animpfdichte beträgt in allen Versuchen etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL. Bei der Probenahme werden jeweils 8 mL Kulturmedium entnommen. Ein Teil des Probevolumens wird zur Bestimmung der Zellzahl (Kap. 3.1.5.1) und des Zellzyklus (Kap. 3.1.5.2) verwendet, das restliche Probevolumen wird zentrifugiert und der Kulturüberstand bis zur weiteren Analytik bei -20°C eingefroren.

Tab. 3.1: Kultivierungsversuche zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf CHO-Zellen.

Versuch	Ansatz	Kultivierungstemperatur	Probenahme
Temperatur konstant	T31	31 °C	alle 24 Stunden
	T32	32 °C	
Temparturwechsel während der exp. Wachstumsphase nach 47 Stunden	T(47)37-31	Temperaturwechsel von 37 °C auf 31 °C	alle 24 Stunden
	T(47)37-32	Temperaturwechsel von 37 °C auf 32 °C	
	T(47)Ref37	37 °C (Referenz)	
Temperaturwechsel während der exp. Wachstumsphase nach 74 Stunden	T(74)37-31	Temperaturwechsel von 37 °C auf 31 °C	alle 24 Stunden
	T(74)33-31	Temperaturwechsel von 33 °C auf 31 °C	
	T(74)Ref37	37 °C (Referenz)	
	T(74)Ref31	31 °C (Referenz)	
Temperaturwechsel von 33 °C auf 31 °C	T(33-31)68,5h	Temperaturwechsel nach 68,5 Stunden	alle 24 Stunden
	T(33-31)116,5h	Temperaturwechsel nach 116,5 Stunden	
	T(33-31)164h	Temperaturwechsel nach 164 Stunden	
	T(33-31)Ref37	37 °C (Referenz)	
periodischer Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden	T12h	Temperaturwechsel zw. 37 °C und 31 °C	alle 12 Stunden
	T12hRef37	37 °C (Referenz)	
	T12hRef31	31 °C (Referenz)	
periodischer Temperaturwechsel nach jeweils 24 Stunden	T24h	Temperaturwechsel zw. 37 °C und 31 °C	alle 24 Stunden
	T24hRef37	37 °C (Referenz)	
	T24hRef31	31 °C (Referenz)	

3.1.3 Kultivierungen mit Versuchen zur Onlineprobenahme

Das in Kap. 3.2 beschriebene Probenahmesystem wird zur Probenahme bei einer Kultivierung in einer 500 mL-Spinnerflasche (Techne Corporation, Cambridge, Großbritannien) eingesetzt. Bei dieser Kultivierung P1 wird das BioPro1-Medium verwendet. Die Animpfdichte beträgt $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL, die Kultivierungstemperatur 37°C . Bei der Probenahme werden jeweils 4 mL Kulturmedium entnommen. Das gesamte Probevolumen wird abzentrifugiert und der Kulturüberstand zur t-PA-Konzentrationsbestimmung mittels ELISA (Kap. 3.1.5.5) verwendet. Über das Probenahmesystem werden nochmals 4 mL Kulturmedium entnommen und die t-PA-Konzentration im erhaltenen Kulturüberstand ebenfalls mittels ELISA analysiert.

3.1.4 Kultivierung im Bioreaktor mit fluoreszenzspektroskopischen Messungen

Für die Aufnahme von fluoreszenzspektroskopischen Messungen (Kap. 3.4) wird eine Kultivierung im 3,5 L Edelstahlreaktor (Eigenbau des Institutes für Technische Chemie, Universität Hannover, Deutschland) mit angeschlossenem Fluoreszenz-Spektralphotometer F-4500 (Hitachi, Japan) durchgeführt.

Das Füllvolumen des Reaktors bei dieser Kultivierung F1 beträgt 2 L. Als Kulturmedium wird das BioPro1-PF-Medium verwendet. Um eine ausreichende Zellzahl zum Animpfen zu erhalten (Animpfdichte: $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL), werden die Vorkulturen zunächst in Monolayer-Flaschen (75 cm^2) und dann in Spinnerflaschen mit 250 und 500 mL Volumen angezogen.

Die Regelung der Parameter Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Rührerdrehgeschwindigkeit wird über die Steuereinheit Biostat B (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gewährleistet. Die Kultivierungen werden bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt. Zur Durchmischung wird ein Paddelrührer verwendet, die Rührerdrehgeschwindigkeit beträgt 100 rpm. Der pH-Wert wird mit NaOH (1 M) und HCl (1 M) auf 7,15 eingestellt. Die Begasung (50 % Luftsättigung) der scherstreßempfindlichen CHO-Zellen erfolgt über eine indirekte Silikonschlauchbegasung [KUHLMANN, 1987].

Bei der Probenahme (alle 12 Stunden) werden jeweils 8 mL Kulturmedium entnommen. Ein Teil des Probevolumens wird zur Bestimmung der Zellzahl (Kap. 3.1.5.1) verwendet, das restliche Probevolumen wird zentrifugiert und der Kulturüberstand bis zur weiteren Analytik bei -20°C eingefroren.

3.1.5 Begleitende Analytik zu den Kultivierungen

3.1.5.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt durch Zählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop. Die Kultivierungsproben werden zur Bestimmung der Vitalität mit einer Trypan-Blau-Lösung im Verhältnis 1:2 gemischt und zur Auszählung auf die Kammer aufgetragen. Trypan-Blau färbt die Organellen toter Zellen blau, da beschädigte Cytoplasmamembranen für den Farbstoff durchlässig werden. Lebende Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop gelb.

3.1.5.2 Zellzyklusbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die DNA-Analyse mittels Durchflusszytometrie liefert Informationen über die Zellzyklusphasen. Durch Anfärben der DNA mit Propidiumiodid, das an die DNA bindet, kann der DNA-Gehalt einer Einzelzelle bestimmt werden. Um eine quantitative Anfärbung der DNA zu erreichen, werden die Zellen mit dem Reagenz Tween 20 zur Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran vorbehandelt. Störende RNA wird durch Zusatz von RNase (Type III-A) beseitigt. Im Durchflusszytometer erfolgt die Anregung des Propidiumiodids durch Licht und die Messung der Emission. Aus den Messungen vieler Zellen entstehen lineare DNA-Histogramme, aus denen die einzelnen Phasen des Zellzyklus mittels Algorithmen (Phoenix Flow Systems, Kalifornien, USA) errechnet werden.

Zur Durchführung werden 5 mL Probevolumen abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 mL 70 %igem Ethanol bei -20°C bis zur weiteren Analytik fixiert. Dann werden die Proben erneut abzentrifugiert und das Zellpellet in einer Lösung aus 0,5 % Tween 20 und 2 mg/mL RNase in PBS (10 mM, 150 mM NaCl) aufgenommen. Es wird 0,5 Stunden bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend werden 50 µL Propidiumiodid zugegeben, die Proben durchmischt und die Messung im Durchflusszytometer ausgeführt.

3.1.5.3 Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration

Die Messungen der Glucosekonzentrationen erfolgen mit einem Biochemistry Analyzer (YSI 2700 Select, Yellow Springs Instruments, Ohio, USA). Das Meßprinzip dieses Gerätes beruht auf der elektroenzymatischen Oxidation von β -D-Glucose. Die Glucoseoxidase setzt die enthaltene β -D-Glucose zu Gluconsäure und Wasserstoffperoxid um. Über einen Stromfluss (Messung des Potentials des Wasserstoffperoxids an einer Platinelektrode) kann die Glucosekonzentration indirekt bestimmt werden.

Die Lactatkonzentration wird nach dem gleichen Meßprinzip bestimmt. Lactat wird dabei durch Lactatoxidase unter Bildung von Wasserstoffperoxid zu Pyruvat oxidiert.

Die Messungen erfolgen im Bereich von 0 bis 4 g/L Glucose und 0 bis 2 g/L Lactat. Die Kulturüberstände können ohne Verdünnung analysiert werden.

3.1.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Bestimmungsmethode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250 bei Reaktion mit Proteinen.

Die Bestimmung wird auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Es werden 10 µL Probe bzw. Standardlösung mit 300 µL Coomassie Plus-Reagenz vermischt und die Extinktion bei 595 nm mit dem Photometer Immunoreader NJ-2000 (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) gemessen. Als Proteinstandard wird Bovine-Serum-Albumin verwendet. Der Meßbereich liegt zwischen 1 und 25 µg/mL. Die Kultivierungsproben werden zuvor im Verhältnis 1:10 verdünnt.

3.1.5.5 t-PA-Analytik mittels ELISA

Als quantitative Bestimmungsmethode wird ein t-PA-spezifischer ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay, Testkit ImulyseTM tPA, Fa. Biopool, Umea, Schweden) verwendet. Der ELISA-Test beruht auf einer hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der Antikörper bzw. Antigene verwendet werden, an die einfach quantitativ zu bestimmende Enzyme gekoppelt sind.

Im ersten Inkubationsschritt werden monoklonale Antikörper an die Kunststoffoberfläche der Kavernen der Mikrotiterplatten immobilisiert. Anschließend wird mit PET-Puffer (PBS-EDTA-Tween-Puffer) gewaschen. Im zweiten Schritt wird das Antigen t-PA aus Kultivierungslösungen bzw. aus Standardlösungen an die Antikörper gebunden. Nach der Inkubation wird nochmals mit Puffer gewaschen. Nachfolgend wird ein zweiter Antikörper hinzugefügt, an dem das Enzym Peroxidase (POD) gekoppelt ist und der spezifisch an t-PA bindet. Nach mehreren Waschsritten wird das Farbreagenz (o-Phenylendiamin) und das Substrat Wasserstoffperoxid zugegeben. Das zugegebene Peroxid wird durch das Enzym Peroxidase reduziert. Dabei fungiert das Farbreagenz als Wasserstoffdonator und die Farbe des o-Phenylendiamins wechselt von farblos nach gelb. Die Extinktion wird mit einem Photometer Immunoreader NJ-2000 (Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Da die Extinktion nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz

proportional der Konzentration des Farbstoffes ist, kann die Menge des Antikörpers bzw. des t-PA über eine Kalibrationsgerade berechnet werden.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Anhang 7.1 beschrieben.

Weil die Testmethode sehr empfindlich ist, sollte die maximale t-PA-Konzentration in den Probelösungen nicht größer als 100 ng/ml sein. Deshalb ist eine 400fache Verdünnung der Kultivierungsproben erforderlich.

3.1.5.6 Aminosäurebestimmung mittels HPLC

Die Konzentrationen der Aminosäuren werden mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) bestimmt. Die chromatographische Trennung der Aminosäuren beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, die durch die verschiedenen Polaritäten der Aminosäuren hervorgerufen werden.

Die chromatographischen Bedingungen sind im Anhang 7.6 angegeben.

Die Messungen wurden von Frau Martina Weiß (Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) durchgeführt.

3.2 Probenahmesysteme zur Onlineanalytik bei Kultivierungen von Tierzellen

In dieser Arbeit werden drei unterschiedliche Probenahmesysteme auf ihre Anwendbarkeit im Hinblick auf eine Onlineprobenahme mit nachfolgender Analytik von t-PA aus Tierzellkulturen untersucht.

Zum einen wird ein ESIP-Modul (Eppendorf sterile inline Probenahmesonde, Trace AG Biotech, Braunschweig, Deutschland) verwendet. In dieses Probenahmemodul wird eine tubuläre Membran (low protein binding-Membran Nr. 5442 012. 034, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) eingespannt.

Es werden Probenahmeversuche und Untersuchungen zur t-PA-Adsorption auf der Membran durchgeführt. Dazu wird die Probenahmesonde vollständig in eine t-PA-Lösung (15 µg/mL in PBS 10 mM, 150 mM NaCl) getaucht und in zeitlichen Abständen von 20 min werden Proben durch Ansaugen auf der Permeatseite mit einem Fluß von 1 mL/min entnommen. Gleichzeitig erfolgt eine Probenahme auf der Retentatseite. Aufgrund des Totvolumens der Sonde von 3,5 mL wird ein Vorlauf von 5 mL entnommen. Der t-PA-Gehalt der entnommenen Lösungen wird mittels ELISA (Kap. 3.1.5.5) analysiert.

Als weitere Möglichkeit zur Probenahme bietet sich die Probenahmesonde ProcessTrace (Trace AG Biotech, Braunschweig, Deutschland). Dieses System basiert auf Dialyse des

Analyten durch eine Dialysemembran in einen Puffer, der im Kreislauf durch die Probenahmesonde gepumpt wird. Es werden Probenahmeversuche und Untersuchungen zur Adsorption von t-PA auf verschiedenen Dialysemembranen (Tab. 3.2) durchgeführt. Dazu wird die Dialysesonde in eine t-PA-Lösung (15 µg/mL in PBS 10 mM, 150 mM NaCl) getaucht und durch die Probenahmesonde wird ein Dialysepuffer (PBS 10 mM, 150 mM NaCl) gepumpt. In zeitlichen Abständen von 60 min werden sowohl aus der t-PA Standardlösung als auch aus dem Dialysepuffer Proben gezogen und der t-PA-Gehalt mittels ELISA (Kap. 3.1.5.5) bestimmt.

Tab. 3.2: Dialysemembranen, die bei Versuchen mit der Probenahmesonde Process Trace eingesetzt werden.

Membrantyp	Porengröße	Anbieter	Bezeichnung
Polyvinylidenfluorid	0,1 µm	Millipore	VVLPO4700
Polyvinylidenfluorid	0,22 µm	Millipore	GVWPO4700
Polysulfon	100 kDa	Sartorius	TS14669-50
Polysulfon	300 kDa	Sartorius	TS14679-50
Celluloseacetat	100 kDa	Reichert	-

Als drittes Probenahmesystem wird eine Kombination aus einem Spinfilter der Firma B. Braun (Melsungen, Deutschland) und nachfolgender Filtration durch einen Celluloseacetat-Filter (Porengröße 2 µm, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) in einem Filtrationsgehäuse der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) untersucht. Der Aufbau dieses Probenahmesystems ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Im ersten Filtrationsschritt werden durch den Spinfilter Zellaggregate abgetrennt, im zweiten Schritt durch den Celluloseacetat-Filter einzelne Zellen und Zellbruchstücke. Der Spinfilter ist für den Einsatz in Bioreaktoren mit Arbeitsvolumen von mindestens 3 L konstruiert. Für die Anwendung bei Tierzellkultivierungen ist aufgrund der teuren Medienbestandteile zumindest bei Kultivierungen zu Forschungszwecken ein kleinerer Maßstab sinnvoll. Deshalb wurde eine Vorrichtung zur externen Zellabtrennung mit dem Spinfilter in Zusammenarbeit mit der Werkstatt des Instituts für Technische Chemie (Universität Hannover) entwickelt. Auf diese Weise ist es möglich, dieses System bei Kultivierungen in Spinnerflaschen einzusetzen.

Um eine kontinuierliche Probenahme ohne Gefahr einer Kontamination durch Mikroorganismen zu gewährleisten, wird eine Bakterienfalle zwischen den Spinfilter und die Celluloseacetatfiltereinheit eingebaut. Die Bakterienfalle ist für den kontinuierlichen Einsatz

so konstruiert, dass nach jeder Probenahme eine Desinfektion des Innenraums möglich ist. Die Desinfektionslösung (70 % Isopropanol) wird in einen Überlauf gepumpt, fließt über die Wände der Bakterienfalle und wird im unteren Teil abgeführt. Die Anfertigung dieser Bakterienfalle erfolgte in Zusammenarbeit mit der Glasbläserei des Instituts für Technische Chemie (Universität Hannover).

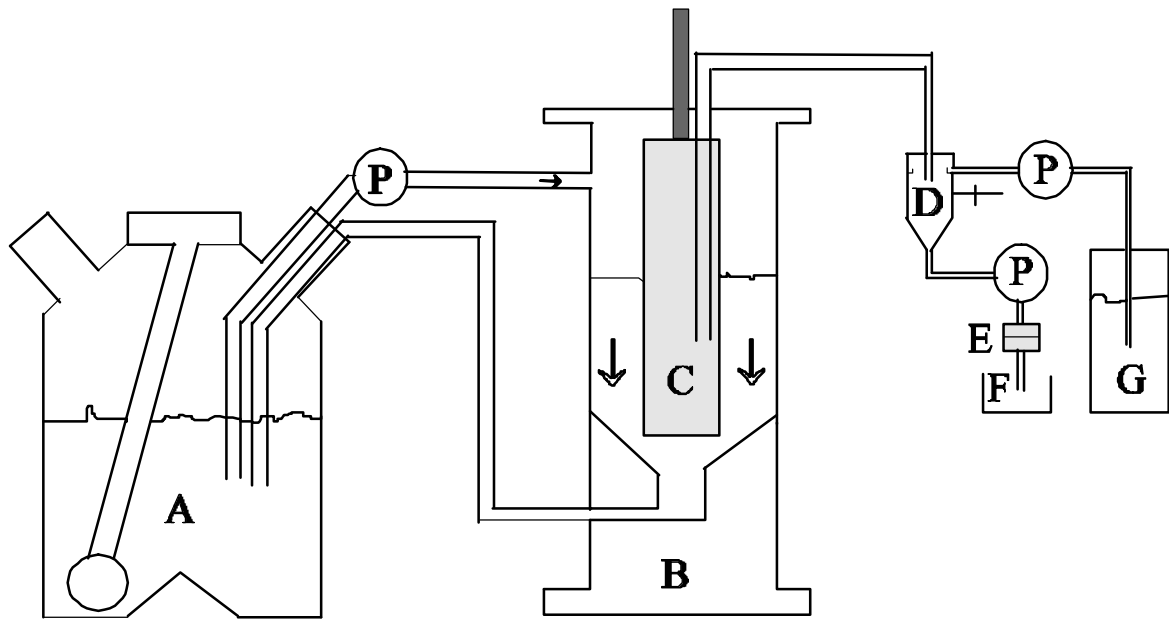


Abb. 3.1: Aufbau des entwickelten Probenahmesystems zur Onlineprobenahme.

- A: 500 mL-Spinnerflasche
- B: externe Vorrichtung aus Glas zur Zellabtrennung
- C: Spinfilter
- D: sterilisierbare Bakterienfalle
- E: Filtrationseinheit zur Feinfiltration (Porenweite: 2 μ m)
- F: Auffanggefäß
- G: Vorratsgefäß für Desinfektionsmittel zur Desinfektion der Bakterienfalle
- P: Peristaltikpumpen

3.3 Entwicklung einer t-PA-Analytik mittels HPMADC (High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography)

3.3.1 Immobilisierung verschiedener Liganden auf Disks

Zur Ermittlung geeigneter Liganden für die Bestimmung von t-PA mittels HPMADC werden ausgewählte Affinitätsliganden auf GMA-EDMA-Disks (Glycidylmethacrylat-co-ethylendimethacrylat, Fa. BIA.do, Ljubljana, Slowenien) immobilisiert und die Liganden-

dichte über einen Proteintest (Kap. 3.3.6), der vor und nach der Immobilisierung durchgeführt wird, bestimmt.

Als Liganden werden: 1. Monoklonale Antikörper und 2. Plasminogen eingesetzt, die nach der von Kasper [KASPER, 1998] optimierten Methode (Anhang 7.2) immobilisiert werden. Weitere Liganden sind 3. Polylysin und 4. Lysin, die nach einer Methode für Peptide (Anhang 7.3) immobilisiert werden. Die Untersuchungen mit den Liganden Polylysin und Lysin wurden von Frau Dr. Galina Platonova (Institute of Macromolecular Compounds der Russischen Akademie der Wissenschaften, St. Petersburg) durchgeführt [PLATONOVA, 1999].

3.3.2 Frontalanalyse

Mit Hilfe der Frontalanalyse [KRAUSE, 1991] werden die maximalen Beladungskapazitäten (Q_{\max}) der Liganden mit t-PA sowie die jeweiligen Dissoziationskonstanten (K_{Diss}) ermittelt. Zur Durchführung der notwendigen Messungen wird die in Kap. 3.3.3 beschriebene HPMADC-Anlage umgebaut. Die Affinitätsdisks (Disks mit immobilisierten Liganden) werden in die Kartusche eingesetzt und mit Lösungen unterschiedlicher t-PA-Konzentrationen unter Einsatz einer Peristaltikpumpe (Modell IPS4, Ismatec SA, Zürich, Schweiz, Pumprate 2 mL/min) bis zur Sättigung beladen. Anschließend wird bis zum Erreichen der Basislinie mit Puffer (PBS 10 mM, 150 mM NaCl) gespült. Die Elution von t-PA erfolgt mit HCL (10 mM, pH 2). Die t-PA-Konzentration in der Beladungslösung wird stufenweise erhöht, bis der Elutionspeak (Detektion mit Fluoreszenz-Detektor) ein Maximum erreicht. Dazu sind Lösungen im Konzentrationsbereich von 5 µg/mL bis 150 µg/mL notwendig. Abbildung 3.2 zeigt ein Chromatogramm der Frontalanalyse.

Die je Analysenlauf eluierte t-PA-Menge wird mittels Proteintest (Kap. 3.3.6) bestimmt und die Konzentration pro mL Diskmaterial berechnet. Zur Auswertung werden die t-PA-Konzentrationen pro mL Diskmaterial gegen die Konzentration der Beladungslösungen aufgetragen.

Die sich ergebenden Adsorptionsisothermen können mathematisch wie Langmuirisothermen behandelt werden. Demnach wird die Massentransferrate von der flüssigen Phase (Beladungslösung) auf die feste Phase (immobilisierte Liganden) durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 \cdot C(q_m - q) - k_2 \cdot q$$

C: t-PA-Konzentration der Beladungslösung [µg t-PA/mL]

q: Festphasenkonzentration an t-PA [µg t-PA/mL Diskmaterial]

q_m : maximale Adsorptionskapazität

Im Gleichgewicht gilt:

$$q = \frac{q_m \cdot C}{K_{Diss} + C} \quad \text{mit} \quad K_{Diss} = \frac{k_1}{k_2}$$

K_{Diss} : Dissoziationskonstante

Aus der graphischen Auftragung von $1/q$ gegen $1/C$ kann die maximale Beladungskapazität q_{max} (Einheit: $\mu\text{g t-PA/mL Diskmaterial}$) aus dem Abszissenabschnitt ($1/q_{max}$) und die Dissoziationskonstante K_{Diss} (Einheit: M) aus dem Ordinatenabschnitt ($1/K_{Diss}$) ermittelt werden.

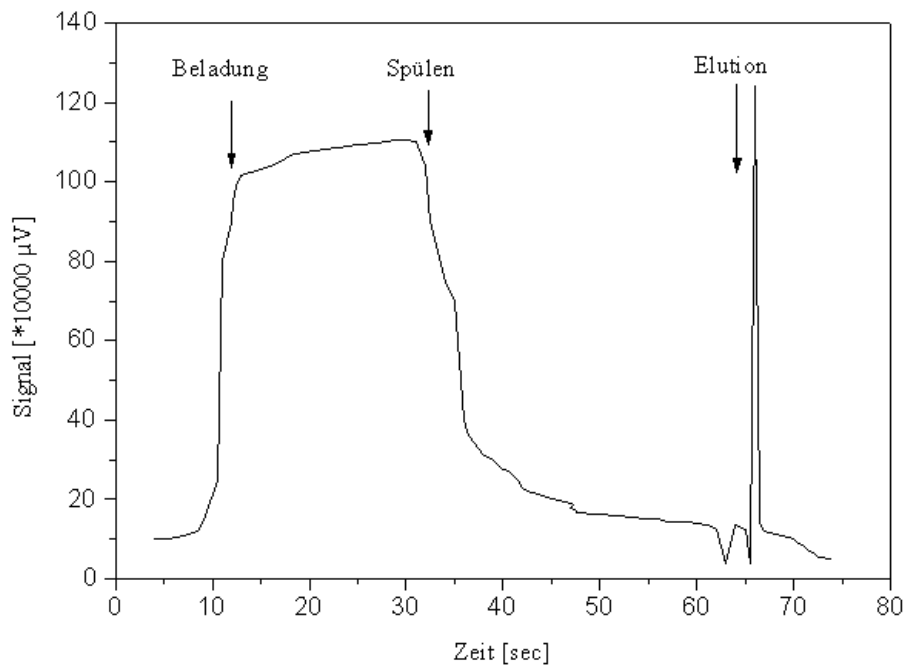


Abb. 3.2: Chromatogramm der Frontalanalyse der Bindung von t-PA an Antikörpern, die auf einer GMA-EMDA-Disk immobilisiert sind (t-PA-Konzentration der Beladungslösung: $60 \mu\text{g/mL}$).

3.3.3 t-PA-Analytik mittels HPMADC

Als Basis für die Entwicklung einer Affinitätsdiskchromatographie zur Bestimmung von t-PA dient die in Abb. 3.3 schematisch dargestellte Chromatographie-Anlage.

Mit zwei Pumpen für verschiedene Eluenten und einer Hochdruckmischkammer können Proben mit binären Gradienten chromatographiert werden. Die Gradientenformung wird mit dem Softwareprogramm M320-A (HPLC Gradient Workstation Version 2.17, Autochrom Incorporated, USA) über eine computergesteuerte CIM-Box geregelt, so dass eine

Programmierung zur Steuerung der Fördergeschwindigkeit und der Eluentenzusammensetzung möglich ist. Die Datenaufnahme erfolgt über eine CSI-Box, die mit dem Computer und mit dem Fluoreszenzdetektor verbunden ist. Zur Datenaufnahme- und Auswertung wird das Softwareprogramm Apex (Apex Chromatography Workstation, M625-1, Version 2.15, Autochrom Incorporated, USA) verwendet. Die Affinitätsdisk (Disk mit immobilisierten Liganden) wird in die Kartusche eingesetzt. Die Beladung der Affinitätsdisk mit t-PA aus Kultivierungsproben bzw. Standardlösungen erfolgt mit PBS-Puffer (10 mM, 150 mM NaCl) bei pH 7 und die Elution mit HCL (10 mM) bei pH 2. Die Eluentenzusammensetzungen wurden aus den Ergebnissen zur Bestimmung von Protein G mittels HPMADC von Kasper übernommen [KASPER, 1998].

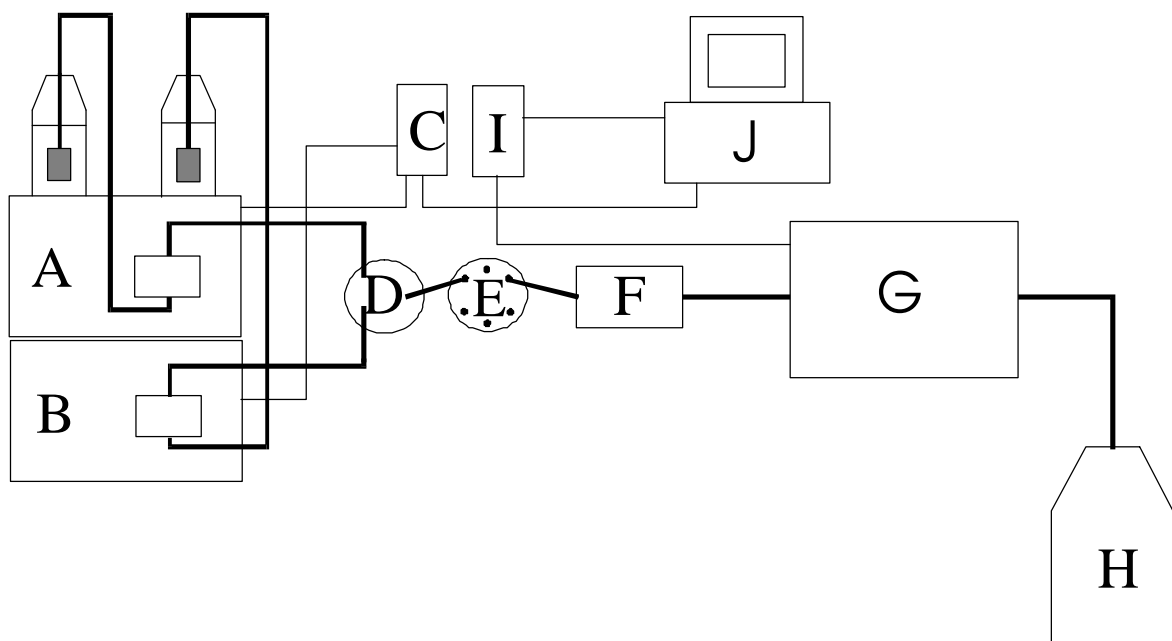


Abb. 3.3: Schematischer Aufbau der chromatographischen Anlage.

- A: Pumpe für Beladungspuffer (Knauer HPLC Pumpe 64, Knauer, Berlin, Deutschland)
- B: Pumpe für Eluenten (Knauer HPLC Pumpe 64, Knauer, Berlin, Deutschland)
- C: CIM-Box zur Gradientenformung (Autochrom Incorporated, USA)
- D: Hochdruckmischkammer (BIA.doo, Ljubliana, Slowenien)
- E: Injektionsventil mit Probenschleife (1000 μ L, Knauer, Berlin, Deutschland)
- F: Kartusche mit Affinitätsdisk (BIA.doo, Ljubliana, Slowenien)
- G: Fluoreszenzdetektor (Shimadzu Fluorescence HPLC Monitor RF-535, Shimadzu, Japan)
- H: Abfallgefäß
- I: CSI-Box zur Datenaufnahme (Autochrom Incorporated, USA)
- J: Computer zur Steuerung und Datenaufnahme (Highscreen AMD 486)

Die optimalen Bedingungen im Hinblick auf die Flussrate, die Spülzeit der einzelnen Eluenten und dem Volumen der Probenschleife wurden in Vorversuchen ermittelt. Für die Analytik von t-PA wird demnach ein Flußrate von 4 mL/min eingestellt und eine Probenschleife mit einem Volumen von 1000 µL verwendet. Die Spülzeit des Beladungspuffers zu Beginn des chromatographischen Laufes beträgt 0,5 min. Anschließend wird mit HCL 0,8 min eluiert. Zur Regenerierung wird mit dem Beladungspuffer nochmals 0,7 min gespült. Ein entsprechendes Elutionsprofil ist in Abb. 4.37 im Ergebnisteil dargestellt. Um die Reproduzierbarkeit der entwickelten chromatographischen Methode zu ermitteln, werden mehrfache Messungen mit t-PA-Standardlösungen (1,5-24 µg/mL) durchgeführt. Zusätzlich wird eine Kalibration erstellt.

Für die Messungen von Kultivierungsüberständen ist eine Probenvorbereitung notwendig: Zur Entfernung von Zellrückständen werden die Proben über einen Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert.

3.3.4 Untersuchungen mit verschiedenen Matrices

Zur weiteren Optimierung der chromatographischen Methode werden auf verschiedenen Membranen (Tab. 3.3) die t-PA-spezifischen Antikörper immobilisiert. Diese Affinitätsmatrices werden zur Analytik von Proben der Kultivierung T12hRef31 in der HPMADC (Kap. 3.3.3) eingesetzt. Diese Arbeiten wurden von Frau Claudia Loa im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt [LOA, C., 2000]. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen, die mit einer aldehydaktivierten Membran (Tab. 3.3) erzielt wurden, dargestellt.

Tab. 3.3: Charakteristika der Membran, die bei Untersuchungen zur t-PA-Analytik mittels HPMADC eingesetzt wird [LOA, C., 2000].

Membrantyp	Aktivierung	Porengröße	Membrandicke	Anbieter	Bezeichnung
Cellulose	Aldehyd	0,45 µm	ca. 200 µm	Sartorius	Aldehyd (1548 Sm19306)

3.3.5 t-PA-Analytik mittels Kationenaustauschromatographie

Als Vergleichsmethode zur Analytik von t-PA aus Kultivierungsüberständen mit GMA-EDMA-Disks werden Kationenaustauschdisks CIM-SO₃ der Firma BIA.doo (Ljubljana, Slowenien) eingesetzt. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche als funktionelle Gruppen

Sulfonsäuregruppen. Die Beladung der Kationenaustauschdisks erfolgt bei einem pH-Wert von 7,2. Der pH-Wert liegt somit etwa eine Einheit unter dem isoelektrischen Punkt des zu isolierenden Proteins t-PA. Die chromatographische Auftrennung der Proteinmischungen wird durch kontinuierliche Erhöhung der Ionenkonzentration im Elutionspuffer erreicht (linearer Gradient). Als Beladungs- und Spülpuffer wird PBS (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,2) verwendet, als Elutionspuffer PBS (10 mM, 1000 mM NaCl, pH 7,2).

Zur Probenvorbereitung ist eine Filtration über Celluloseacetatfilter (Porengröße 0,2 µm, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) zur Abtrennung von Zellrückständen notwendig.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in t-PA-Standardlösungen und Lösungen von Liganden erfolgt mit dem Proteintest Modified Lowry der Fa. Pierce. Die Farbreaktion dieses Testes zwischen dem Protein, einer alkalischen Kupferartratlösung und dem Folinreagenz findet in zwei Schritten statt. Zuerst wird das zweiwertige Kupfer durch Aminosäuren des Proteins in die einwertige Form reduziert. Im zweiten Schritt wird das Folinreagenz durch das einwertige Kupfer zu einer Verbindung mit charakteristischer blauer Farbe reduziert.

Bei der Durchführung werden 200 µL Probe und 200 µL Modified Lowry-Reagenz in einer Küvette vermischt und 10 min inkubiert. Anschließend werden 100 µL Folin Phenol-Reagenz zugegeben. Nach 30 min wird die Extinktion bei 750 nm im Spektrophotometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, Milano, Italien) gemessen.

Als Proteinstandard wird Bovine-Serum-Albumin verwendet. Der Arbeitsbereich liegt zwischen 1 µg/mL und 1500 µg/mL.

3.3.7 Proteinanalytik mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um qualitative Aussagen über die Proteinzusammensetzung aus Kultivierungsüberständen von CHO-Zellen und über den Aufreinigungsgrad durch HPMADC zu treffen, wird eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wird eine Phast-Gelapparatur (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Diese Apparatur besteht aus einer temperierbaren Kammer für maximal zwei vorgefertigte Gele, in der die Auftragung der Probe- und Standardlösungen und der Lauf durchgeführt werden kann. Nach dem Lauf werden die Gele in einer Entwicklungskammer, die mit verschiedenen Wasch- und Entwicklungslösungen geflutet werden kann, entwickelt.

Es werden vorgefertigte 12,5 %ige Polyacrylamidgele (Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden) verwendet. Als Färbemethode wird die Silberfärbung (Anhang 7.4) angewendet.

Sowohl Lauf als auch Entwicklung der Gele werden mit einem definierten Programm (Anhang 7.4) gesteuert.

3.4 Onlinefluoreszenzmessungen mit dem Hitachi 4500

In das Fluoreszenz-Photometer F 4500 (Hitachi, Japan) wird ein zweiarmiger Lichtleiter eingesetzt, der über einen Standardstutzen mit Quarzglasscheibe an den Reaktor angeschlossen wird. Es werden fluoreszenzspektroskopische Messungen im Exzitationswellenlängenbereich von 270 bis 500 nm und im Emissionswellenlängenbereich von 290 bis 600 nm in Zeitabständen von 20 min durchgeführt. Weitere technische Angaben sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.4: Einstellung des Fluoreszenz-Photometer F 4500

Parameter	Einstellungen
Exzitationswellenlänge	270 - 500 nm
Exzitationsschrittweite	10 nm
Exzitationsslit	10
Emissionswellenlänge	290 - 600 nm
Emissionsschrittweite	10 nm
Emissionsslit	20
Photomultiplierspannung	700 V
Scangeschwindigkeit	30 nm/s

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Der Temperatureinfluss auf das Produktionsverhalten rekombinanter CHO-Zellen

Im theoretischen Teil wird das unterschiedliche Verhalten verschiedener Zelllinien bei ihrer Kultivierung in Abhängigkeit von der Temperatur erläutert. Es gibt in der Literatur viele Beispiele, die belegen, dass keine universellen Aussagen über das Temperaturverhalten verschiedener Zelllinien getroffen werden können. Demnach gibt es keine allgemein gültigen Regeln über den Temperatureinfluss auf das Produktionsverhalten von animalen Zellen. Zur Optimierung von biotechnologischen Produktionsprozessen ist es deshalb sinnvoll, die Temperaturabhängigkeit des Zellwachstums und der Produktivität zu untersuchen. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen an CHO-Zellen dargestellt.

4.1.1 Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen bei 32 °C und 31 °C

Buch [BUCH, 1997] und Loa [LOA, A., 1997] konnten zeigen, dass bei der Zelllinie CHO Tf70R unterhalb von 33 °C kein exponentielles Wachstum mehr stattfindet. Im Gegensatz zum Wachstum ist die zellspezifische Produktivität unterhalb dieser Temperatur stark erhöht. Um die für die t-PA-Produktion durch CHO-Zellen optimale Temperatur zu ermitteln, werden zunächst Batch-Kultivierungen bei 31 °C (T31) und 32 °C (T32) durchgeführt. Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über den Verlauf der Lebendzellzahlen während dieser Kultivierungen. Bei gleicher Animpfdichte von etwa $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/mL erreicht die Kultur T32 eine maximale Zelldichte von $0,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL (160. Stunde), während die maximale Zelldichte bei der Kultur T31 $0,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL (180. Stunde) beträgt. Diese beiden Werte liegen deutlich unter den durchschnittlichen Werten für die maximale Zelldichte bei 37 °C (etwa $1,5 \cdot 10^6$ Ze/mL).

Dieses Verhalten des verminderten Zellwachstums bei erniedrigter Kultivierungstemperatur wird ebenfalls in mehreren Publikationen über Tierzellkultivierungen beschrieben [FURUKAWA, 1998; MOORE, 1997]. Untersuchungen von Buch [BUCH, 1997] und Loa [LOA, A., 1997] mit der hier eingesetzten Zelllinie ergaben hingegen nur eine geringe Abhängigkeit des Zellwachstums im Temperaturbereich zwischen 33 °C und 37 °C.

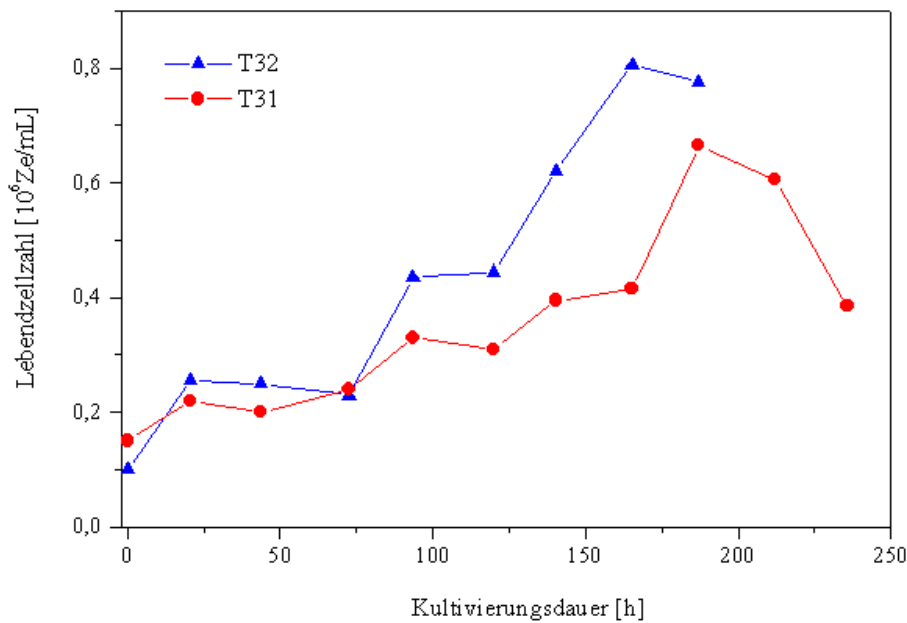


Abb. 4.1: Lebendzellzahlen während der Kultivierungen T31 und T32.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Gesamtproteinkonzentrationen (Abb. 4.2) und die t-PA-Konzentrationen (Abb. 4.3) während der Kultivierungen.

In Abbildung 4.2 ist zu erkennen, dass bei der Kultur T32 im Vergleich zur Kultur T31 der Gesamtproteingehalt gegen Ende der Kultivierung höhere Werte annimmt (Endkonzentrationen: T31: 23 $\mu\text{g/mL}$, T32: 48 $\mu\text{g/mL}$). Bei der Kultur T32 ist ein Anstieg in der Gesamtproteinkonzentration und bei der Kultur T31 eine konstante Konzentration über den Zeitraum der Kultivierung zu beobachten.

In Abbildung 4.3 ist der Konzentrationsverlauf des Produktes t-PA bei 31 °C und 32 °C dargestellt. Die t-PA-Konzentration der Kultur T32 steigt nahezu linear bis zum Ende der Kultivierung und erreicht dabei einen Wert von 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Die Besonderheit des Verlaufes der t-PA-Konzentration bei 31 °C ist der steile exponentielle Anstieg ab der 120. Stunde auf einen Endwert von 6,5 $\mu\text{g/mL}$. Dieser steile exponentielle Anstieg der Produktkonzentration konnte auch bei weiteren Kultivierungen bei 31 °C (Kap. 4.1.3 und Kap. 4.1.4) beobachtet werden.

Es ist ersichtlich, dass der Gesamtproteingehalt keinen Hinweis auf die t-PA-Produktion durch CHO-Zellen gibt. Die Kultivierung bei 31 °C erreicht eine höhere t-PA-Konzentration jedoch einen geringeren Gesamtproteingehalt als die Kultivierung bei 32 °C. Ein vergleichbares temperaturabhängiges Proteinexpressionsverhalten wird von Kaufmann [KAUFMANN, 1998] bei Temperaturexperimenten an CHO-Zellen mit Temperaturshifts von

37 °C auf 30 °C beschrieben. Durch Proteinanalyse mittels 2D-Gelen wurde nachgewiesen, dass einige Proteine verstärkt bei 30 °C und andere vermehrt bei 37 °C exprimiert werden. Als Erklärung für temperaturabhängiges Produktionsverhalten werden in der Literatur Stabilitätsänderungen der m-RNA und unterschiedliche Transkriptionsgeschwindigkeiten bei Änderungen der Kultivierungstemperatur angegeben [FURUKAWA, 1998].

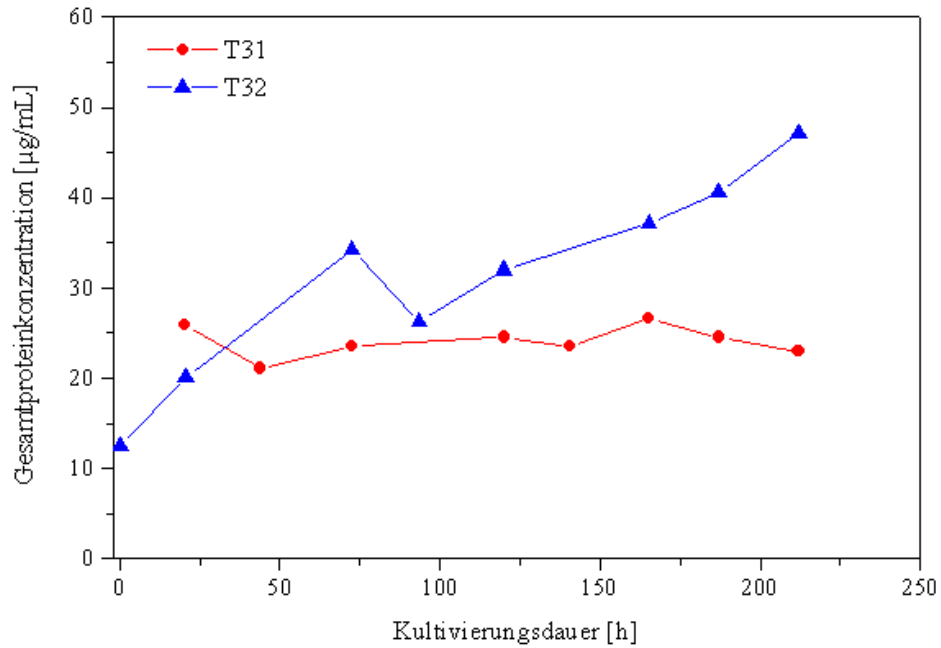


Abb. 4.2: Gesamtproteinkonzentrationen während der Kultivierungen T31 und T32

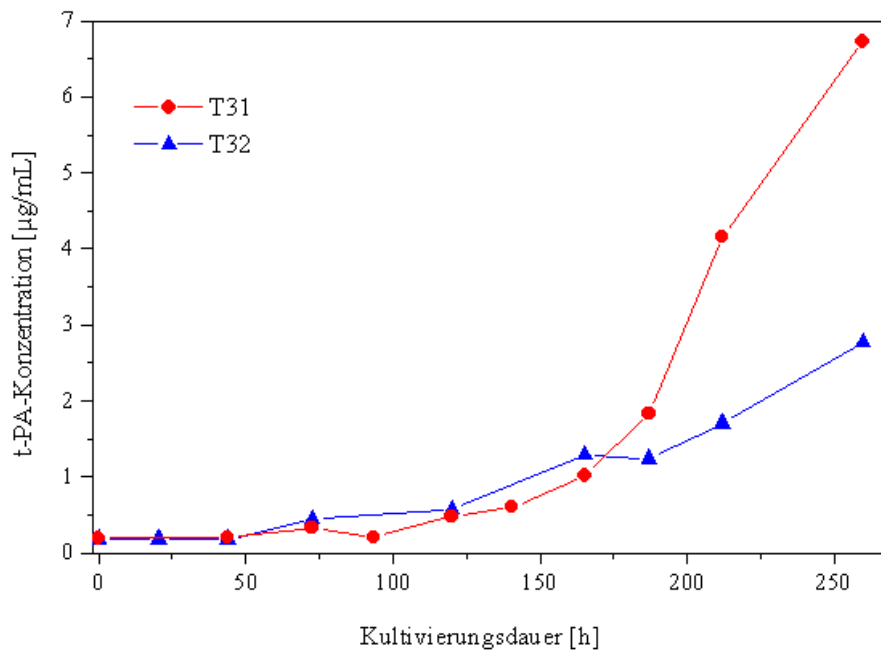


Abb. 4.3: t-PA-Konzentrationen während der Kultivierungen T31 und T32.

4.1.2 Zerfallsgeschwindigkeit von t-PA bei 37 °C und 31 °C

Die beobachteten unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bei den Kultivierungen mit verschiedenen Kultivierungstemperaturen können möglicherweise durch eine Temperaturabhängigkeit der Zersetzung von Proteinen verursacht werden. Um den Einfluss der Temperatur auf den Zerfall von t-PA (Eigenzerfall sowie Lyse des Glykoproteins durch Proteasen) zu untersuchen, wird eine Lösung von t-PA mit dem sterilfiltrierten Überstand einer CHO-Kultur angesetzt und bei 37 °C und 31 °C inkubiert. In Abbildung 4.4 sind die zeitlichen t-PA-Konzentrationsänderungen dargestellt.

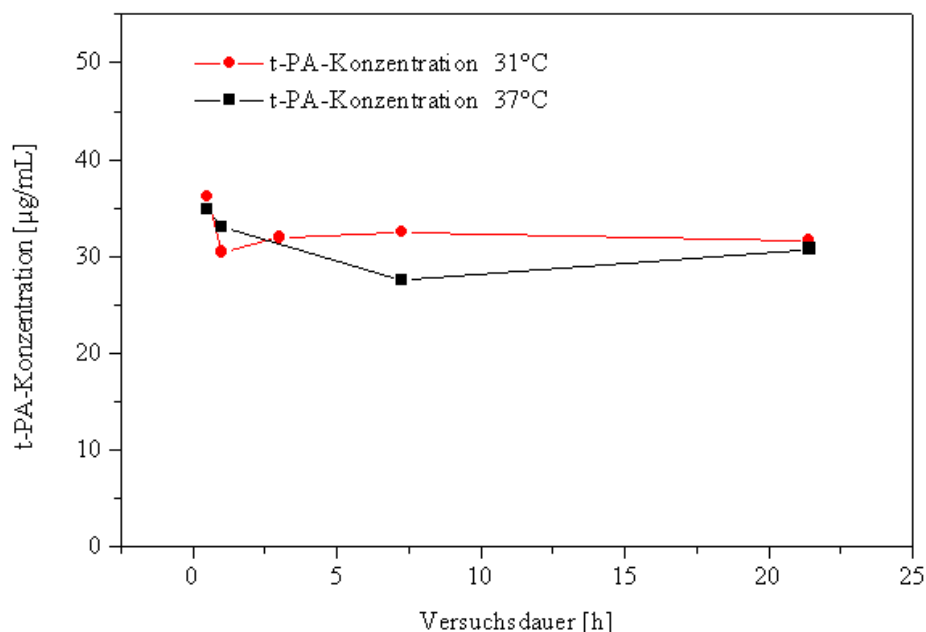


Abb. 4.4: t-PA-Konzentrationen im Stabilitätstest im sterilfiltrierten Kulturüberstand bei Temperaturen von 31 °C und 37 °C.

Unter Berücksichtigung des Fehlers in der Konzentrationsbestimmung mittels ELISA (bis zu 10 %) ist ein vergleichbarer Kurvenverlauf bei beiden Versuchstemperaturen zu erkennen. So nimmt die t-PA-Konzentration im Überstand bei 31 °C innerhalb von 22 Stunden von 36 µg/mL auf 31 µg/mL und bei 37 °C von 35 µg/mL auf 31 µg/mL ab. Ein Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Zersetzung und Lyse von t-PA ist demnach auszuschliessen. Die t-PA-Konzentrationsunterschiede bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen sind folglich auf ein temperaturabhängiges Produktionsverhalten der CHO-Zelllinie zurückzuführen. Da die Expression der verschiedenen Proteine einer Zelllinie eine unterschiedliche Temperaturabhängigkeit aufweisen (Kap. 4.1.1), sind im Hinblick auf eine Optimierung der Produktion bestimmter Proteine diese Abhängigkeiten zu beachten.

4.1.3 Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit Temperaturabsenkung zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase

Die in Kap. 4.1.1 dargestellten Ergebnisse zeigen ein geringeres Wachstum der CHO-Zellen, aber gleichzeitig eine höhere t-PA-Produktivität bei Kultivierungstemperaturen unterhalb von 37 °C. Um eine höchstmögliche Produktausbeute zu erzielen, sind hohe Zelldichten sowie hohe Produktionsraten erforderlich. Aus diesem Grund werden Kultivierungen durchgeführt, bei denen nach Anwachsen der Zellen bei 37 °C die Temperaturen auf 31 °C (T(47)37-31) bzw. 32 °C (T(47)37-32) abgesenkt werden. Die Temperaturänderung erfolgt zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach 47 Stunden. Als Referenz dient eine Kultur, die durchgängig bei 37 °C (T(47)Ref37) wächst.

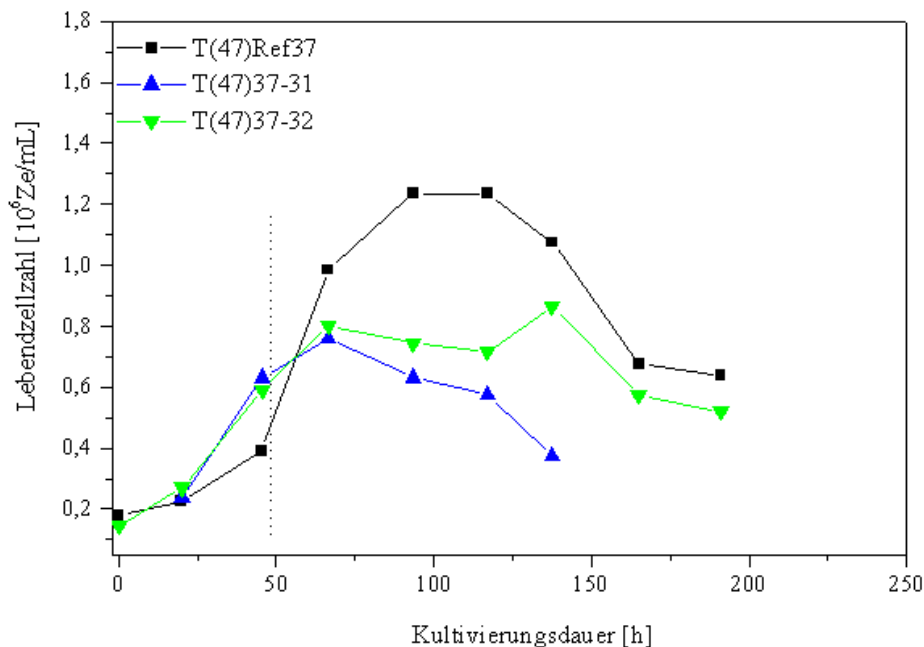


Abb. 4.5: Lebendzellzahlen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 47 Stunden. Die gestrichelte Linie gibt den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung an.

Abbildung 4.5 zeigt die Lebendzellzahlen der verschiedenen Ansätze während dieser Kultivierungen. Obwohl alle Kulturen bis zur 47. Stunde unter den gleichen Bedingungen gehalten werden, ist das Zellwachstum einer Kultivierung geringer. Diese Kultivierung wird als Referenzkultur bei 37°C weitergeführt, um eine gute Vergleichbarkeit der Ansätze mit Temperaturabsenkung zu gewährleisten. In der weiteren Kultivierungsdauer erreicht die Referenz eine maximale Zelldichte von $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/mL nach 93 Stunden. Die beiden Versuchskultivierungen T(47)37-32 und T(47)37-31 erreichen eine maximale Zelldichte von

$0,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL bereits nach 66,5 Stunden. Diese Kulturen wachsen nach der Temperaturabsenkung nur noch einen Tag, anschliessend sinken die Zellzahlen ab. (Die ermittelte Zellzahl der Kultur T(47)37-32 in der 138. Stunde ist auf einen Fehler in der Durchführung der Zellzählung zurückzuführen.) Die Temperaturabsenkung in der exponentiellen Phase hat einen schnellen Wachstumsstopp zur Folge, dabei hat die Temperaturabsenkung auf 31 °C die größte Auswirkung auf die Entwicklung der Zellzahl.

In Abbildung 4.6 sind die Glucose- und Lactatkonzentrationen während der Spinnerflaschenkultivierungen dargestellt. Die Referenzkultur zeigt über die gesamte Kultivierungsdauer die größte Verbrauchsrate von Glucose und die höchste Bildungsrate von Lactat, obwohl das Zellwachstum in den ersten 47 Stunden geringer ist. Die Glucosekonzentration der Referenz nimmt bis zur 190. Stunde auf 0,85 g/L ab, die Glucosekonzentrationen der beiden Versuchskultivierungen zeigen nur eine geringe Abnahme auf 2,2 g/L (T(47)37-32 und 2,2 g/L T(47)37-31.

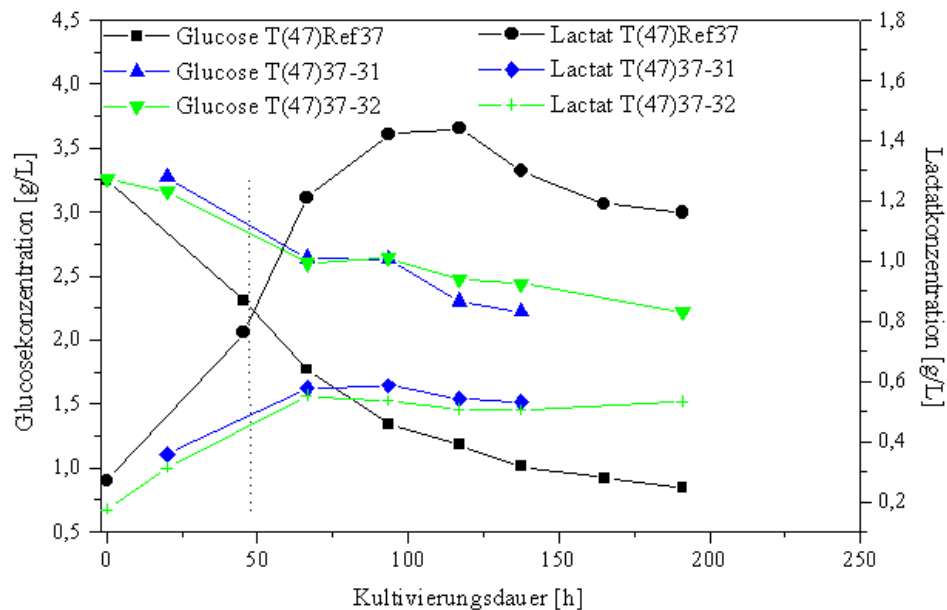


Abb. 4.6: Glucose- und Lactatkonzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 47 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

Entsprechend verhält sich die Lactatbildung: Während die maximale Lactatkonzentration bei der Referenzkultivierung bei 1,45 g/L nach 117 Stunden liegt, erreichen die beiden Versuchskultivierungen eine maximale Lactatkonzentration von 0,6 g/L (T(47)37-32) und 0,6 g/L (T(47)37-31) nach 66 Stunden. Es ist deutlich erkennbar, dass die Temperaturabsenkung den Stoffwechsel stark beeinträchtigt. Bei den beiden Versuchsansätzen mit unterschiedlich starker Temperaturabsenkung ist beim Verbrauch von

Glucose bzw. in der Produktion von Lactat kein Unterschied festzustellen. Diese Beobachtungen wurden auch bei anderen Zelllinien gemacht [KURANO, 1990; WEIDEMANN, 1994].

In Abbildung 4.7 sind die Gesamtproteinkonzentrationen aus dieser Versuchsreihe aufgetragen. Die Messwerte unterliegen großen Schwankungen, so dass kein Vergleich der Endkonzentrationen möglich ist. Ersichtlich ist, dass alle drei Kultivierungsansätze einen ähnlichen Kurvenanstieg haben und ein Einfluss der Temperatur auf die Gesamtproteinkonzentration in dieser Versuchsreihe nicht festgestellt werden kann.

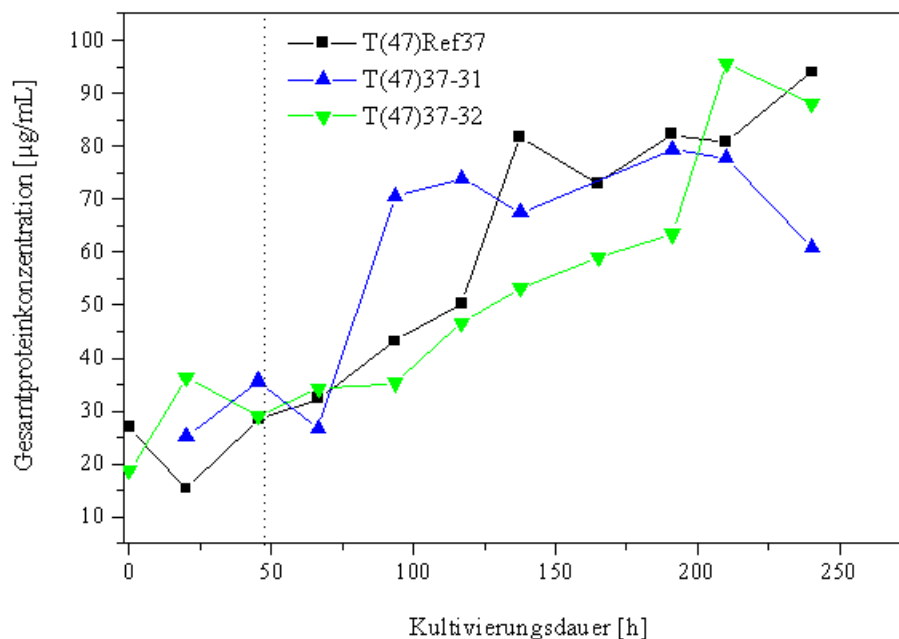


Abb. 4.7: Gesamtproteinkonzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 47 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

In Abbildung 4.8 ist der Verlauf der Produktkonzentration während der Kultivierung aufgetragen. Bis zur Temperaturabsenkung verlaufen die Konzentrationen der drei Ansätze gleich. Ab der 47. Stunde weist die Kultivierung T(47)37-31 einen geringeren Anstieg der Produktkonzentration auf. Ab der 138. Stunde ist dann eine deutliche Zunahme des Produkttiters zu beobachten. Der Endwert liegt sogar höher als bei den Kultivierungen mit höherer Temperatur. Dieser Verlauf entspricht der beobachteten Produktbildung bei einer konstanten Kultivierungstemperatur von 31 °C (Kap. 4.1.1).

Zwischen der Referenz und der Kultur T(47)37-32 ist bei der Produktbildung kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Diese Daten über das Wachstum und den Stoffwechsel sowie über das Produktionsverhalten sind vielversprechend im Hinblick auf eine optimale Kultivierungsstrategie mit hohen Zelldichten und hohen Produktivitäten.

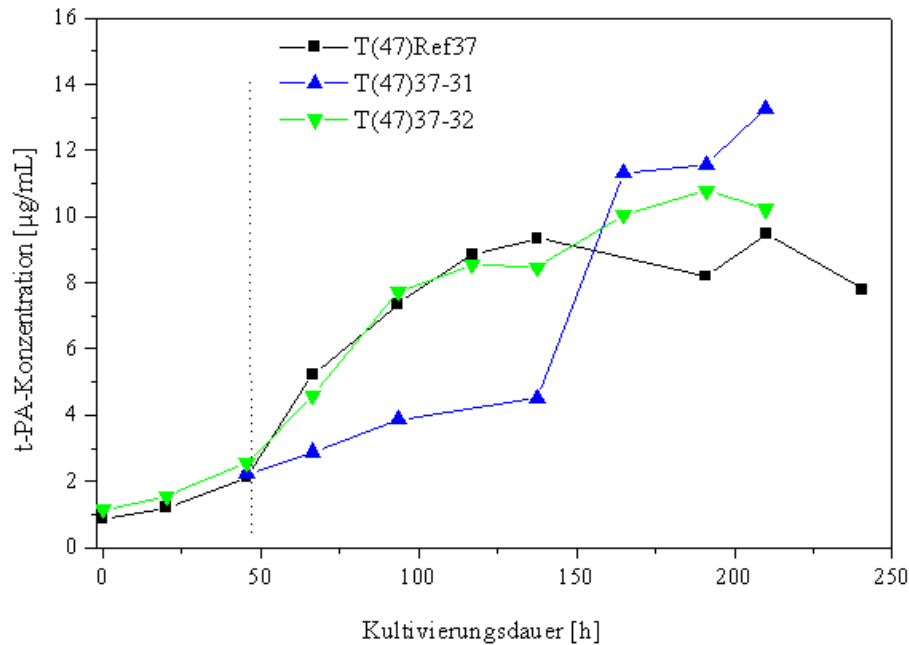


Abb. 4.8: t-PA-Konzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 47 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

4.1.4 Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit Temperaturabsenkung während der exponentiellen Wachstumsphase

Um den optimalen Zeitpunkt der Temperaturabsenkung zu ermitteln, wird die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Versuchsreihe mit Temperaturabsenkung auf 31 °C wiederholt. Dabei erfolgt die Temperaturabsenkung zu einem späteren Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase. Neben einer Referenzkultivierung bei 37 °C (T(74)Ref37) wird eine Referenzkultivierung bei einer konstanten Temperatur von 31 °C (T(74)Ref31) durchgeführt. Die Temperaturabsenkung von 37 °C auf 31 °C (T(74)37-31) bzw. von 33 °C auf 31 °C (T(74)33-31) erfolgt nach 74 Stunden.

Abbildung 4.9 zeigt den Verlauf der Lebendzellzahlen dieser Kultivierungen. Wie zu erwarten, zeigt die Referenzkultur bei 31 °C (T(74)Ref 31) ein lineares Wachstum. So erreicht diese Kultur eine maximale Zelldichte von $0,64 \cdot 10^6$ Zellen/mL in der 334. Stunde. Dahingegen erreicht die Referenzkultivierung bei 37 °C (T(74)Ref 37) bereits nach 212

Stunden ihre maximale Zelldichte von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die Kultur T(74)37-31 zeigt einen vergleichbaren Verlauf wie die Referenzkultur T(74)Ref37. Hier ist ein normaler exponentieller Wachstumsverlauf zu erkennen. Das Wachstum der Kultur mit Temperaturabsenkung von 33°C auf 31°C (T(74)37-31) wird bereits kurz nach der Temperaturänderung beendet und die Zellzahl verbleibt auf einem konstanten Niveau von $0,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL.

Dieses Verhalten konnte ebenfalls bei der Versuchsreihe mit Temperaturabsenkung nach 47 Stunden beobachtet werden (Kap. 4.1.3). Interessant ist, dass bei den Kulturen mit Temperaturabsenkung von 37°C auf 31°C der Zeitpunkt der Temperaturänderung einen Einfluss hat. Die Temperaturabsenkung zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase hat eine Einstellung des Zellwachstums zur Folge, während die Temperaturabsenkung zu einem späteren Zeitpunkt keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Ob diese Unterschiede des Einflusses der Temperaturabsenkung auch beim Stoffwechsel zu beobachten sind, zeigen die folgenden Ausführungen.

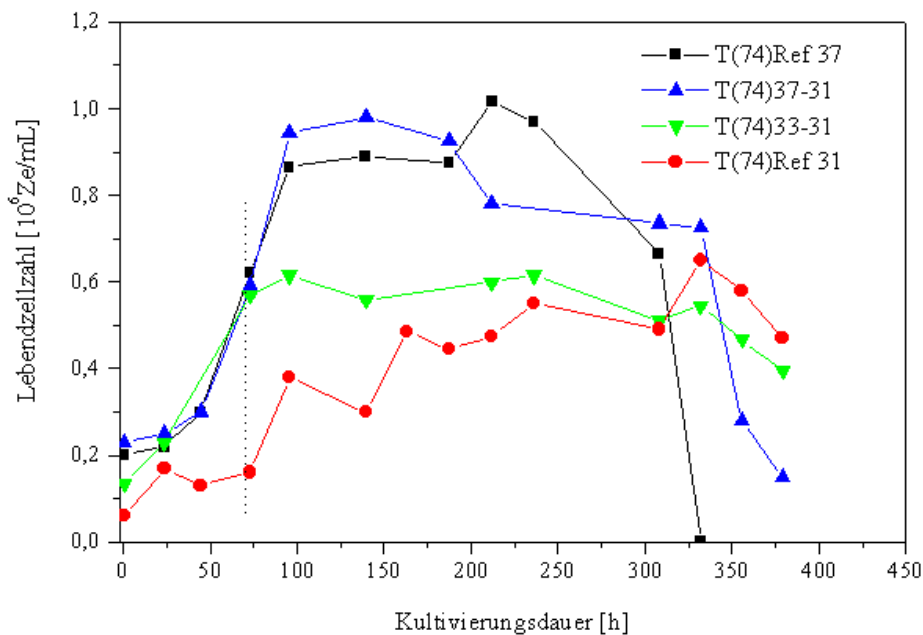


Abb. 4.9: Lebendzellzahlen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 74 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

Die Abbildung 4.10 zeigt den Verlauf der Glucosekonzentrationen während der Kultivierungen. Die Kurven zeigen den erwarteten Verlauf: Die Referenzkultur T(74)Ref37 hat den höchsten Verbrauch an Glucose, gefolgt von der Kultur mit Temperaturshift von 37°C auf 31°C . Danach folgt die Kultur mit Temperaturänderung von 33°C auf 31°C . Die

Kultur, die von Beginn an bei 31 °C wächst, hat die geringste Glucoseverbrauchsrate. Diese Tendenz entspricht der allgemeingültigen Regel, dass die Stoffwechselaktivität mit abnehmender Temperatur sinkt.

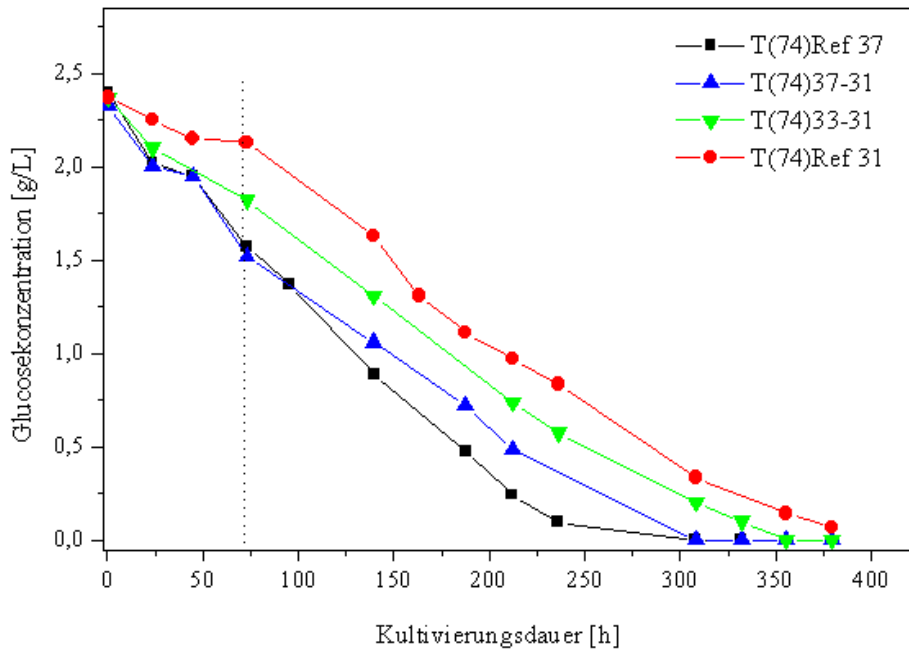


Abb. 4.10: Glucosekonzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 74 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

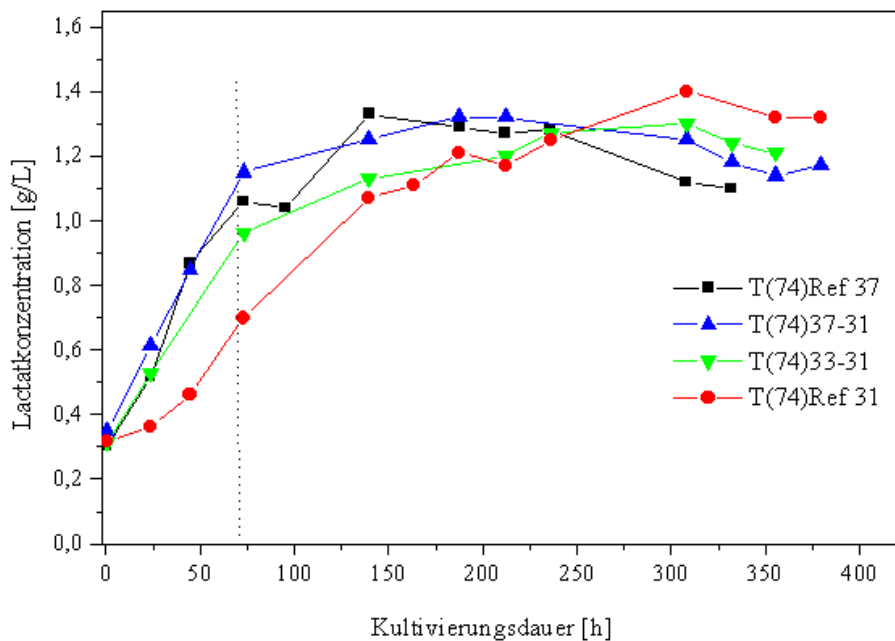


Abb. 4.11: Lactatkonzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 74 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

Abbildung 4.11 zeigt den Verlauf der Lactatkonzentration während der Kultivierungen. Die Lactatkonzentration steigt bei der Referenzkultur T(74)Ref31 deutlich geringer als bei den anderen Ansätzen. Die erreichten Endkonzentrationen aller Kultivierungsansätze zwischen 1,2 bis 1,4 g/L sind vergleichbar und liegen somit bei allen Kultivierungen im nichttoxischen Bereich.

In Kultivierungsproben dieser Versuchsreihe wurden die Konzentrationen der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin analysiert. Eine signifikante Änderung während der Kultivierung ist nur bei den Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat zu beobachten (Abb. 4.12 und Abb. 4.13).

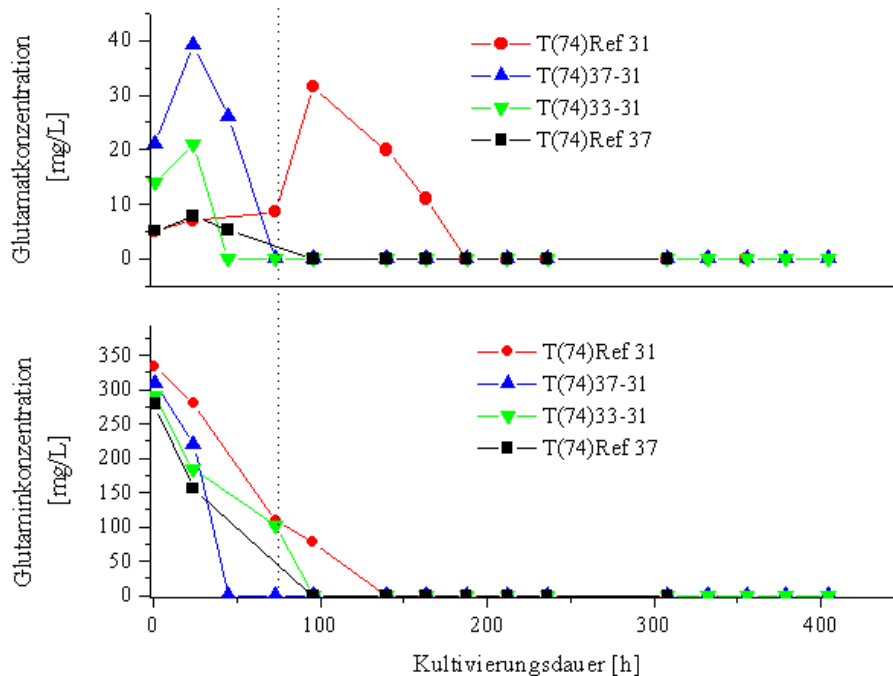


Abb. 4.12: Glutamin- und Glutamatkonzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 74 Stunden. Die gestrichelte Linie gibt den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung an.

Wie aus Abbildung 4.12 hervorgeht, wird die im Nährmedium vorhandene Menge an Glutamin in der Kultivierung am langsamsten verbraucht, die von Beginn an bei 31 °C wächst (T(74)Ref31). So sinkt die Konzentration von 300 mg/mL zu Beginn der Kultivierung innerhalb von 139 Stunden auf 0 mg/mL ab. Bei den anderen Kultivierungen wird die Aminosäure Glutamin in weniger als 100 Stunden verstoffwechselt. Bereits nach 48 Stunden ist in den Proben der Kultur T(74)37-31 kein Glutamin mehr nachzuweisen.

Bei Betrachtung der Glutamatkonzentrationen ist auffällig, dass bei der Kultur T(74)Ref31 die anfängliche Bildung von Glutamat aus Glutamin durch oxidative Desaminierung im

Vergleich zu den Kultivierungen, die teilweise zu Beginn oder über den gesamten Kultivierungszeitraum bei erhöhter Temperatur durchgeführt werden, verzögert stattfindet. So steigen die Glutamatkonzentrationen bei den Kultivierungen mit Temperaturshift von 37 °C bzw. 33 °C auf 31 °C innerhalb von 37 Stunden zunächst auf 39 mg/mL und 21 mg/mL. Die Konzentration der Kultur T(74)Ref37 steigt innerhalb dieses Zeitraumes nur um 2 mg/mL auf 7 mg/mL. Die höchste Glutamatkonzentration des Ansatzes T(74)Ref31 wird erst nach 98 Stunden gemessen (33 mg/mL). Dies ist dadurch zu erklären, dass bei der erniedrigten Kultivierungstemperatur ein verlangsamer Verbrauch an Glutamat stattfindet und somit diese Aminosäure zunächst akkumuliert wird.

Abbildung 4.13 zeigt die Entwicklung der Konzentrationen von Asparagin und Aspartat während dieses Kultivierungsversuches. Hier ist eine geringere Verbrauchsrate an Asparagin als bei der Kultur, die konstant bei 37 °C gehalten wird, zu erkennen. So ist die gesamte Menge an Asparagin erst nach 160 Stunden verbraucht, während sie bei den anderen Kulturen bereits nach 98 Stunden (T(74)Ref37) bzw. 48 Stunden (Kulturen mit Temperaturabsenkung) verbraucht ist.

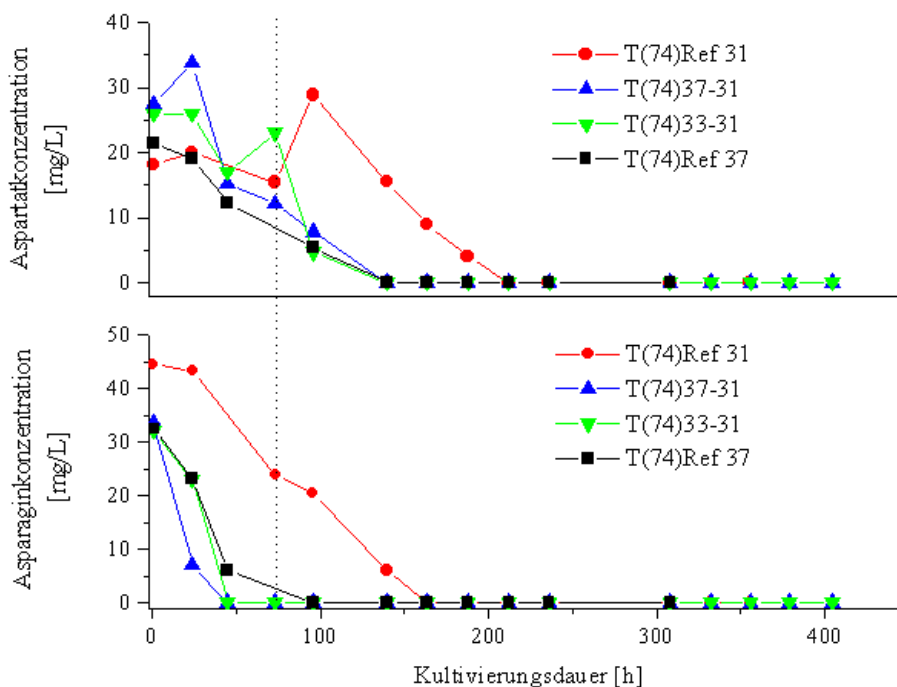


Abb. 4.13: Asparagin- und Aspartatkonzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 74 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

Ein entsprechendes Verhalten zeigt sich bei der Verstoffwechslung von Aspartat. Diese Aminosäure wird bei den Kulturen am schnellsten verbraucht (innerhalb von 143 Stunden), die bei erhöhter Temperatur wachsen. Die Kultivierung bei 31 °C enthält nach 218 Stunden kein Aspartat mehr im Medium. Da bei der Verstoffwechslung von Asparagin Aspartat gebildet wird, ist im Vergleich eine geringere Abnahme von Aspartat zu beobachten.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Temperaturführung auf die Produktbildung sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Kultivierung, die schon zu Beginn bei 31 °C wächst, zeigt die besten Ergebnisse bezüglich der Produktbildung. So steigt die Produktkonzentration, wie bereits in anderen Versuchsreihen beobachtet, ab der 98. Stunde exponentiell bis auf einen Wert von 8,4 µg/mL (230. Stunde). Das zweitbeste Ergebnis erreicht die Kultur, die nach 74 Stunden von 33 °C auf 31 °C umgestellt wird. Hier steigt der Produkttiter auf 6,2 µg/mL. Danach folgen die Kulturen mit Temperaturshift von 37 °C auf 31 °C (3,5 µg/mL) und die Referenzkultur bei 37 °C (2,6 µg/mL).

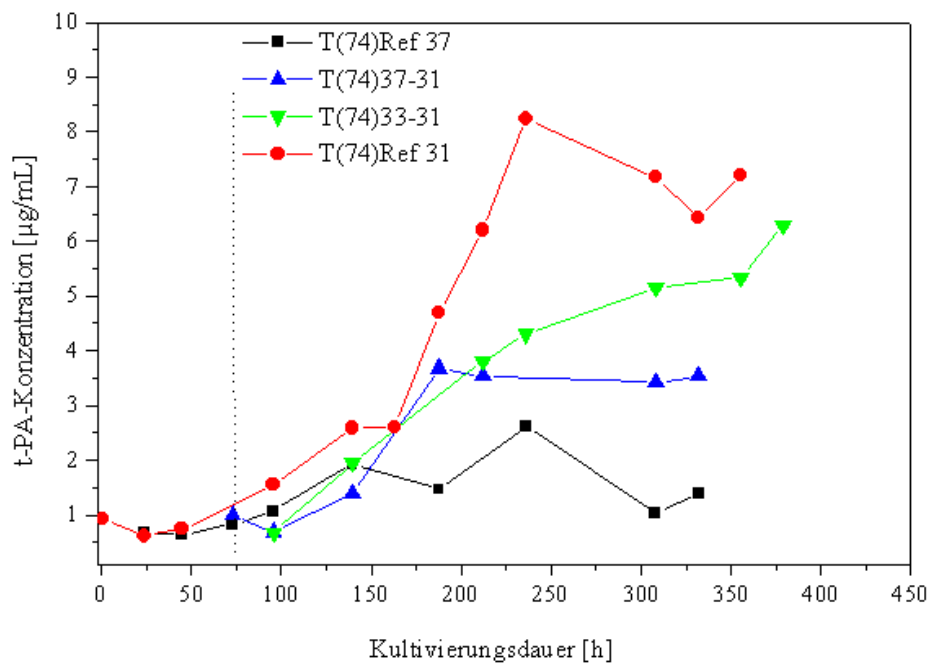


Abb. 4.14: t-PA-Konzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung nach 74 Stunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Temperaturabsenkung.

In dieser Versuchsreihe wird der produktionssteigernde Einfluss der Kultivierungstemperatur von 31 °C deutlich. Gleichzeitig ist ein negativer Einfluss erniedrigter Kultivierungstemperaturen auf das Zellwachstum festzustellen. Diese verringerten Wachstumsraten sind auf eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels zurückzuführen, die der Vergleich der Verbrauchs- bzw. Bildungsraten von Glucose, verschiedener Aminosäuren und

Lactat bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen zeigt. Diese Faktoren haben hingegen keinen Einfluss auf die Exprimierung von t-PA, denn auch eine Limitierung der Substrate bewirkt keine Änderung der Produktivitätsrate. Die t-PA-Produktion der Kultur T(74)Ref31 erfolgt auch noch 50 Stunden nachdem keine der untersuchten Nährstoffkomponenten mehr im Medium nachgewiesen werden können.

4.1.5 Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit Temperaturabsenkung von 33 °C auf 31 °C zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase

Die bisher beschriebenen Versuchsreihen mit Temperaturabsenkung während der Kultivierung wurden durchgeführt, um durch Anwachsen der Zellen bei hohen Temperaturen eine hohe Zelldichte und durch nachfolgende Temperaturabsenkung eine höhere Produktivitätsrate zu erzielen. Diese Versuche ergaben aber nur bei Kultivierungen bei konstanter Temperatur von 31 °C hohe Produktausbeuten.

In einer weiteren Versuchsreihe mit zeitlich gestaffelten Temperaturabsenkungen von 33 °C auf 31 °C soll diese Kultivierungsstrategie noch weiter untersucht werden. Die Temperaturabsenkung erfolgt dabei zu späteren Zeitpunkten als bei den vorhergehenden Versuchen. Bei der Kultur T(33-31)68,5h wird die Kultivierungstemperatur nach 68,5, bei T(33-31)116,5h nach 116,5 Stunden und bei T(33-31)164h nach 164 Stunden abgesenkt. Als Referenz für ein optimales Zellwachstum wird eine Kultur konstant bei 37 °C (T(33-31)Ref37) gehalten.

Die folgende Abbildung 4.15 zeigt die Verläufe der Lebendzellzahlen während dieser Kultivierungen. Die Referenzkultur bei 37 °C hat das günstigste Wachstumsverhalten (maximale Zelldichte von $1,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL nach 170 Stunden). Die Ansätze mit Temperaturabsenkung zeigen eine vergleichbare Zellzahlentwicklung (die höchsten Zellzahlen liegen zwischen $0,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL und $1,1 \cdot 10^6$ Zellen/mL). Das Wachstum dieser Kulturen ist geringer als das Wachstum der Referenzkultivierung bei 37 °C, es sind aber keine großen Unterschiede im Wachstum zu erkennen, die durch die zeitlich unterschiedliche Temperaturabsenkung bedingt sind.

Die Darstellung der Verläufe der t-PA-Konzentrationen (Abb. 4.16) gibt eine bestimmte Tendenz des Temperatureinflusses an. Je früher die Temperatur auf 31 °C abgesenkt wird, desto besser ist das Produktionsverhalten der Zellen. So hat die Kultur, die nach 68,5 Stunden von 33 °C auf 31 °C umgestellt wird, die höchste Produktausbeute von 11,2 µg/mL. Darunter liegt mit 5,2 µg/mL die Ausbeute des Ansatzes T(33-31)116,5h und mit 3,1 µg/mL die Kultur T(33-31)164h.

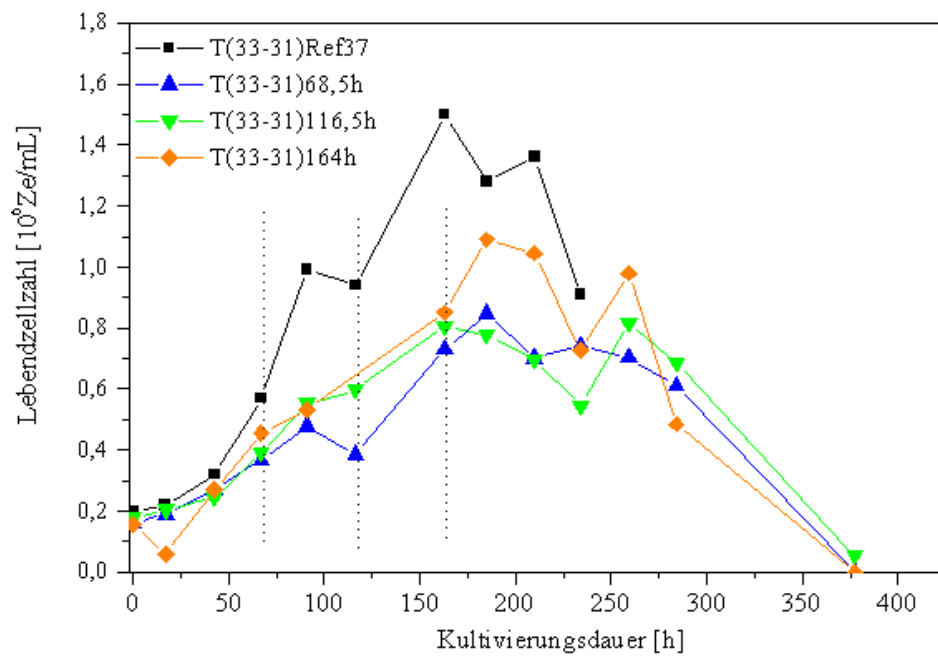


Abb. 4.15: Lebendzellzahlen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase. Die gestrichelten Linien markieren die Zeitpunkte der Temperaturabsenkung (68,5 h; 116,5 h; 164 h).

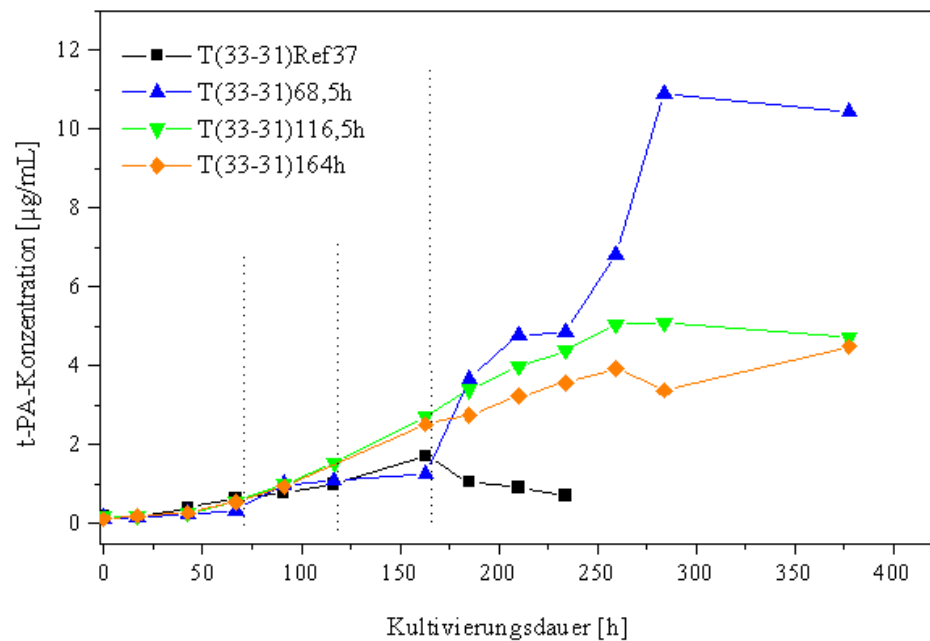


Abb. 4.16: t-PA-Konzentrationen während der Kultivierungen mit Temperaturabsenkung zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase. Die gestrichelten Linien markieren die Zeitpunkte der Temperaturabsenkung (68,5 h; 116,5 h; 164 h).

Als Ergebnis aller Versuchsreihen ist festzuhalten, dass die höchste t-PA-Produktivität bei einer Kultivierungstemperatur von 31 °C erreicht wird. Eine Kultivierungsstrategie mit Anwachsen der Zellen bei 37 °C und Temperaturabsenkung auf 31 °C während der Kultivierung führt zwar zu höheren Ausbeuten im Vergleich zu Kultivierungen, die konstant bei 37 °C geführt werden, aber eine Produktionssteigerung im Vergleich zu Kulturen, die bei 31 °C gehalten werden, wird nicht erreicht. Eine Kultivierungsstrategie, mit der zuerst eine hohe Zelldichte erreicht und anschliessend die Produktion durch Temperaturwechsel gesteigert werden soll, ist somit nicht sinnvoll. In weiteren Kultivierungsversuchen sollen Zellwachstum und t-PA-Produktion im Wechsel durch periodische Temperaturänderungen gefördert werden.

4.1.6 Kultivierungsversuche mit periodischem Temperaturwechsel

Im Folgenden werden die Auswirkungen von rhythmischen Temperaturwechseln zwischen 37 °C und 31 °C auf das Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten der CHO-Zellen untersucht. Zusätzlich werden die Anteile der Zellzyklusphasen der Zellen bestimmt. Die Temperaturwechsel erfolgen in einer Versuchsreihe in Abständen von 12 Stunden und in einer zweiten Versuchsreihe in Abständen von 24 Stunden. Als Referenz werden jeweils Kultivierungen bei 37 °C und 31 °C mitgeführt.

4.1.6.1 Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit 12-stündigem periodischem Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C

Abbildung 4.17 zeigt die Entwicklung der Lebendzellzahlen der Versuchsreihe mit 12-stündigem Temperaturwechsel. Die Zellen benötigen bei der Kultivierung mit einem periodischen Temperaturrhythmus eine verlängerte lag-Phase von fast 100 Stunden, in der die Zellzahl nur um $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/mL auf $0,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL zunimmt. Erst danach ist das normale exponentielle Wachstum zu beobachten und die Kultur erreicht die höchste Zelldichte von $1,1 \cdot 10^6$ Zellen/mL bereits in der 165. Stunde. Die Referenzkulturen erreichen jeweils zu einem späteren Zeitpunkt ihre höchste Zelldichte. Die höchste Zellzahl der Kultur, die bei 37 °C wächst (T12hRef37), beträgt $1,0 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die Kultur, die bei 31 °C wächst, erreicht eine maximale Zellzahl von nur $0,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Obwohl das Wachstum zu Beginn der Kultivierung gehemmt ist, erreicht die Kultur mit periodischem Temperaturwechsel eine höhere Zelldichte als die Referenzkulturen.

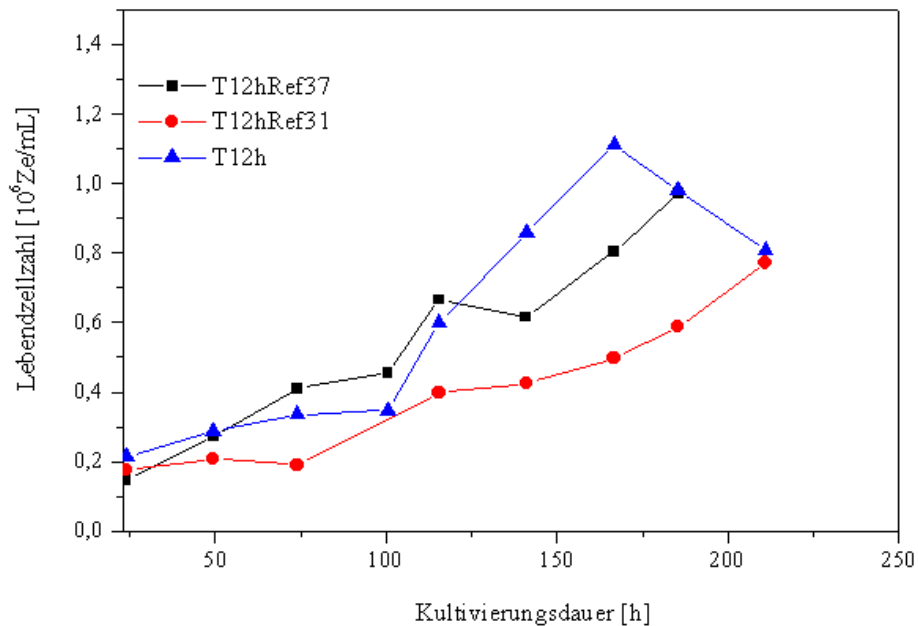


Abb. 4.17: Lebendzellzahlen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

Die Verläufe der Glucosekonzentrationen der drei Kulturen sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Die Glucosekonzentrationen der Kulturen T12h und T12hRef37 nehmen gleichermaßen ab (von 2,5 g/L Anfangskonzentration auf unter 0,5 g/L nach 210 Stunden). Die Kultur T12hRef31 verstoffwechselt weniger Glucose und so sinkt der Gehalt auf lediglich 0,75 g/L.

Dieses Stoffwechselverhalten spiegelt sich auch in der Lactatbildung (Abb. 4.19) wider. Die Referenzkultur bei 37 °C und die Versuchskultur zeigen eine analoge Lactatproduktion, die zum Ende der Kultivierung etwas schwächer wird. Die Endkonzentrationen betragen über 1,5 g/L. Die Kultur T12hRef31 hat eine geringere Lactatbildungsrate, die Endkonzentration liegt aber mit 1,75 g/L höher als die der beiden anderen Ansätze.

Sowohl bei der Glucoseaufnahme und als auch bei der Lactatbildung der Zellen zeigt die Kultur mit periodischem Temperaturwechsel ein Verhalten wie die Referenzkultivierung bei 37 °C. Dieser Trend findet sich auch in der Verstoffwechslung von bestimmten Aminosäuren, deren Verläufe in den folgenden Abbildungen 4.20 und 4.21 dargestellt sind.

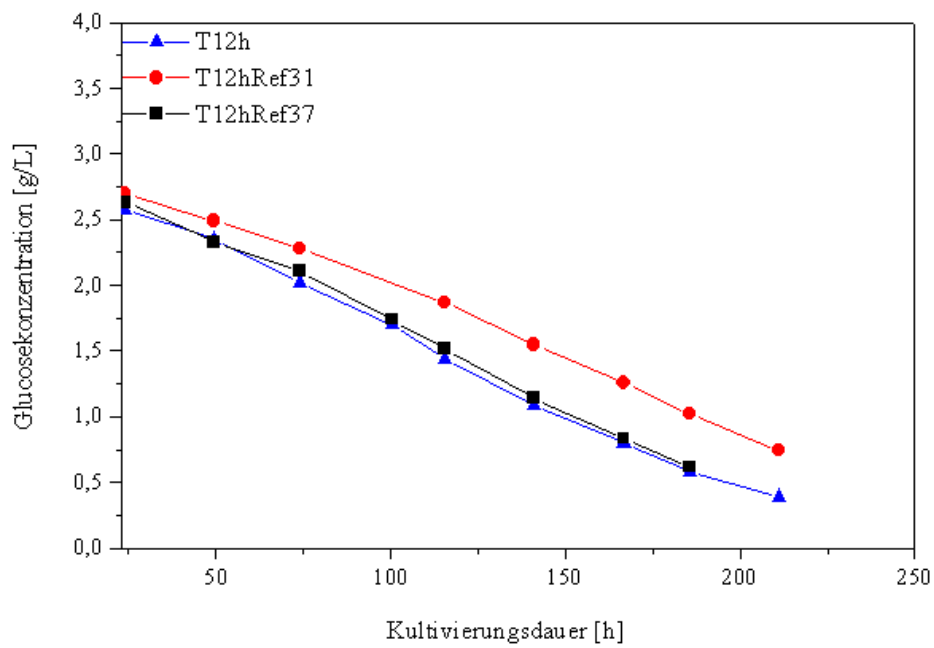


Abb. 4.18: Glucosekonzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

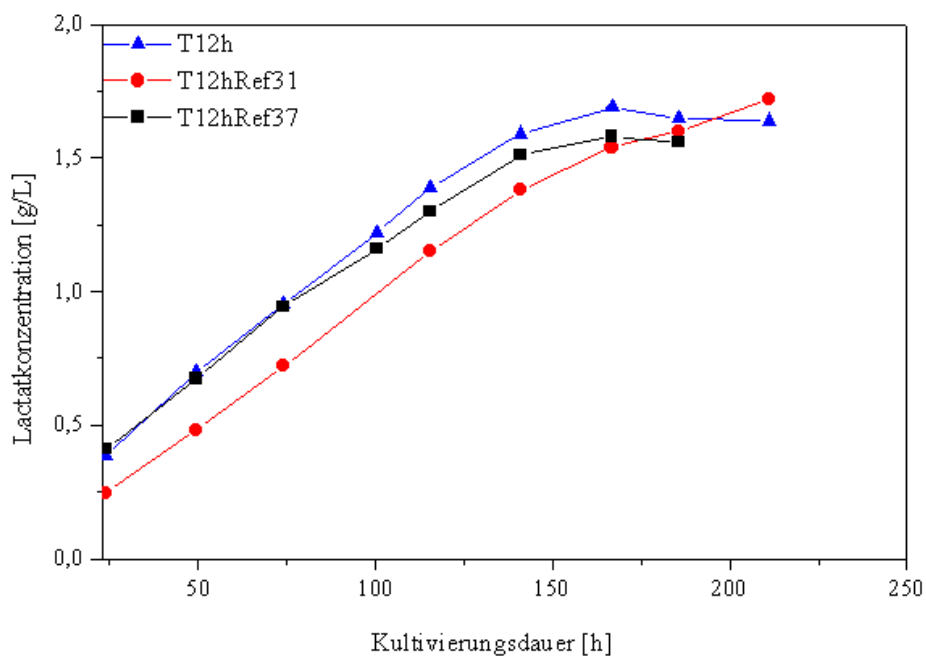


Abb. 4.19: Lactatkonzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

Während der Kultivierung nehmen die Glutaminkonzentrationen der Versuchskultur und der Referenzkultur T12hRef37 von etwa 300 mg/mL auf 0 mg/mL innerhalb von 100 Stunden ab, wohingegen das Glutamin der Kultur T12hRef31 erst nach 140 Stunden verbraucht ist.

Die Glutamatkonzentration des Ansatzes T12hRef37 nimmt kontinuierlich ab, so dass das Glutamat nach 120 Stunden vollständig verstoffwechselt ist. Die Glutamatkonzentration sinkt in der Versuchskultivierung ebenfalls nach 120 Stunden auf 0 mg/mL, jedoch ist zu Beginn ein Anstieg auf 27 mg/L zu beobachten. Auch bei der Kultivierung, die bei 31 °C geführt wird, ist zunächst ein Anstieg der Konzentration zu erkennen. Diese Anstiege resultieren aus der anfänglichen Bildung von Glutamat aus Glutamin durch oxidative Desaminierung. Demnach verläuft der Stoffwechsel bei 37 °C schneller, so dass das gebildete Glutamat sofort verbraucht wird.

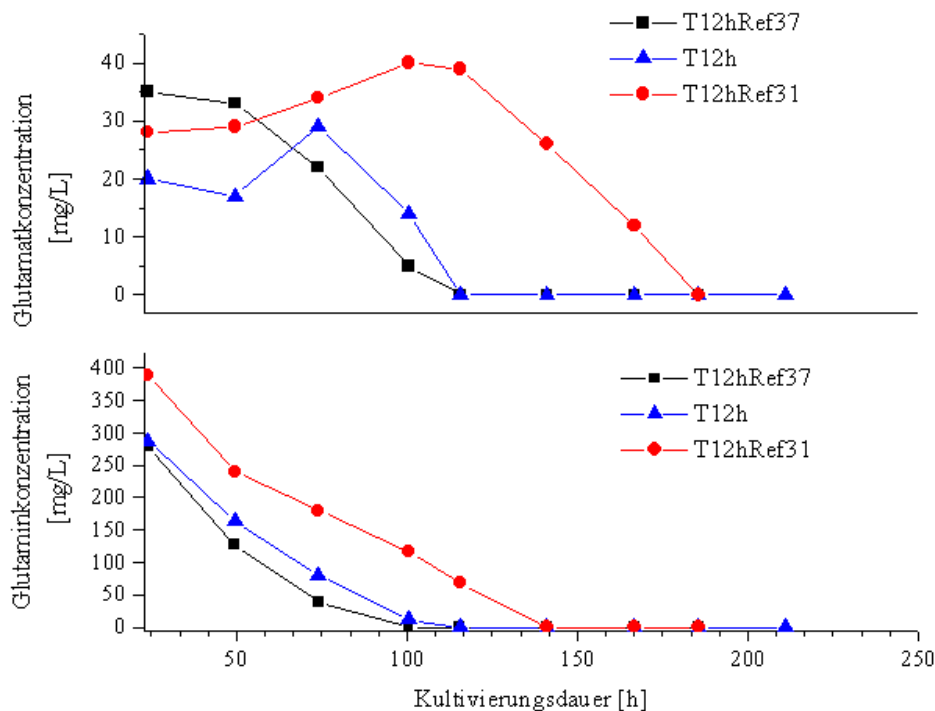


Abb. 4.20: Glutamin- und Glutamatkonzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

Sowohl Asparagin als auch Aspartat werden von den beiden Kulturen, die konstant und im Wechsel bei 37 °C und 31 °C kultiviert werden, kontinuierlich verbraucht. So ist nach 115 Stunden in dem Ansatz T12h und nach 142 Stunden in dem Ansatz T12hRef37 kein Asparagin mehr nachzuweisen. In beiden Kulturen ist das gesamte Aspartat nach 142 Stunden verbraucht. Die Abnahme dieser beiden Komponenten erfolgt in dem Ansatz T12hRef31

deutlich langsamer und auch am Ende der Kultivierung sind beide Aminosäuren noch im Medium nachzuweisen.

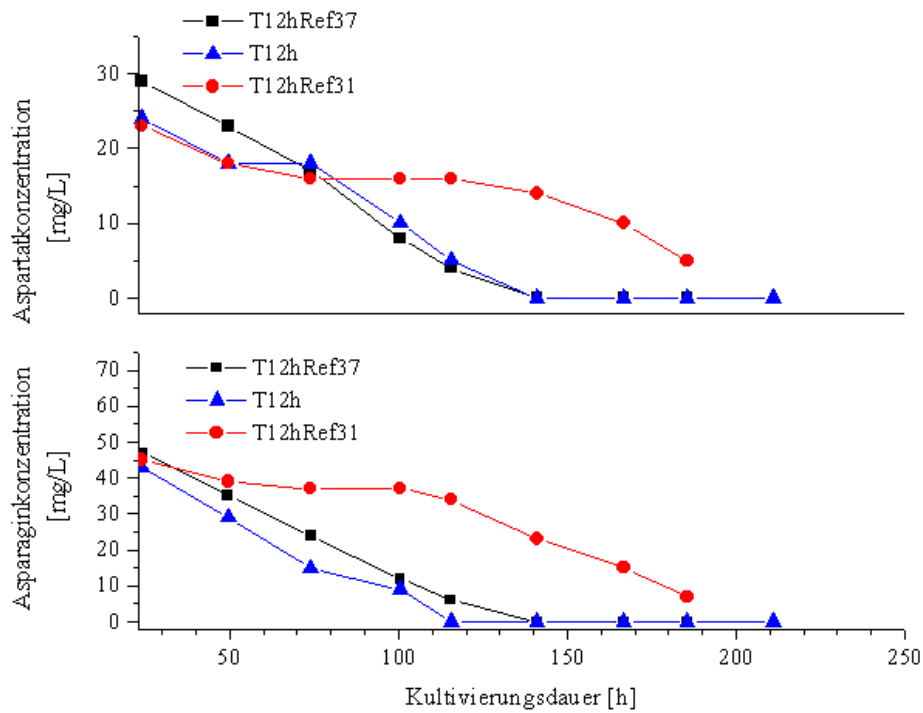


Abb. 4.21: Asparagin- und Aspartatkonzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

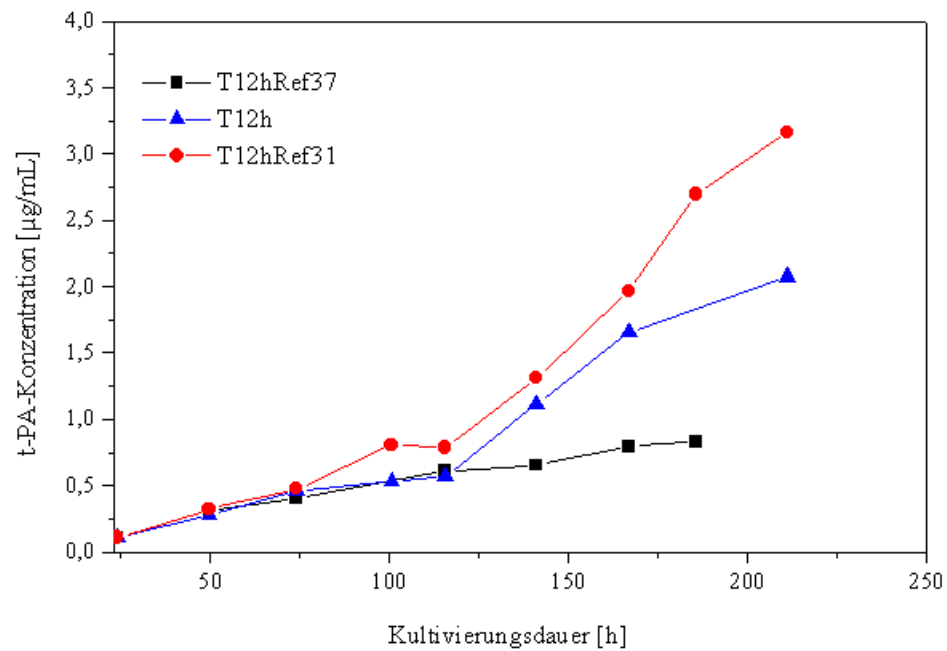


Abb. 4.22: t-PA-Konzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

Die Produktion von t-PA ist in Abbildung 4.22 dargestellt. Ab der 115. Stunde ist in der Kultur, die bei 31 °C wächst, der bereits mehrfach beobachtete exponentielle Anstieg der t-PA-Konzentration von 0,75 µg/mL auf etwa 3,2 µg/mL innerhalb von 110 Stunden zu sehen. Die Kultivierung mit Temperaturwechsel zeigt einen vergleichbaren Konzentrationsanstieg, die Endkonzentration von t-PA beträgt aber nur 2 µg/mL. Die t-PA-Konzentration in der Referenzkultivierung bei 37 °C zeigt einen linearen Anstieg auf 0,7 µg/mL.

Der periodische Temperaturwechsel hat auf die Verläufe des Zellwachstums und der Aufnahme von Nährstoffkomponenten keinen oder nur geringen Einfluss im Vergleich zu der Kultur, die konstant bei 37 °C wächst. Bei der Produktion von t-PA ist jedoch ein Unterschied zu vermerken. Die Ausbeute liegt zwischen den Produktendkonzentrationen der beiden Referenzkultivierungen bei 31 °C und 37 °C.

4.1.6.2 Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten von CHO-Zellen in Kultivierungen mit 24-stündigem periodischem Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C

Die Abbildung 4.23 zeigt Lebendzellzahlen aller Ansätze während der Versuchsreihe mit 24-stündigem Temperaturwechsel. In dieser Versuchsreihe wird mit einer etwas höheren Zelldichte von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL inokuliert. In der Referenzkultivierung bei 37 °C vermehren sich die Zellen bis auf eine Zelldichte von $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL nach einer Kultivierungsdauer von 120 Stunden. Hieran zeigt sich, dass eine größere Animpfdichte eine Erhöhung der maximal erreichbaren Zelldichte bewirkt.

Die Versuchskultivierung zeigt eine verlängerte lag-Phase von 75 Stunden. In dieser Zeit steigt die Zellzahl lediglich auf einen Wert von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Anschliessend steigt die Zellzahl in dieser Kultivierung auf einen Wert von $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/mL nach 140 Stunden. Bei der Kultur T24hRef31 ist lediglich ein lineares Wachstum zu erkennen. So steigt die Zellzahl bei dieser Kultur auf einen Wert von $0,7 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Im Vergleich zum vorherigen Versuchsansatz mit 12-stündigem Temperaturwechsel ist das Wachstum der Kultur mit Temperaturwechsel gehemmt. Hier haben die längeren Perioden bei 31 °C einen größeren Einfluss auf das Zellwachstum.

Dieser Einfluss macht sich auch bei den Verläufen der Glucose- und Lactatkonzentrationen bemerkbar (Daten nicht gezeigt). Dabei verlaufen die Konzentrationen der Versuchskultur analog zu der Kultur, die bei 31 °C wächst. Das bedeutet, dass der Stoffwechsel beeinträchtigt ist.

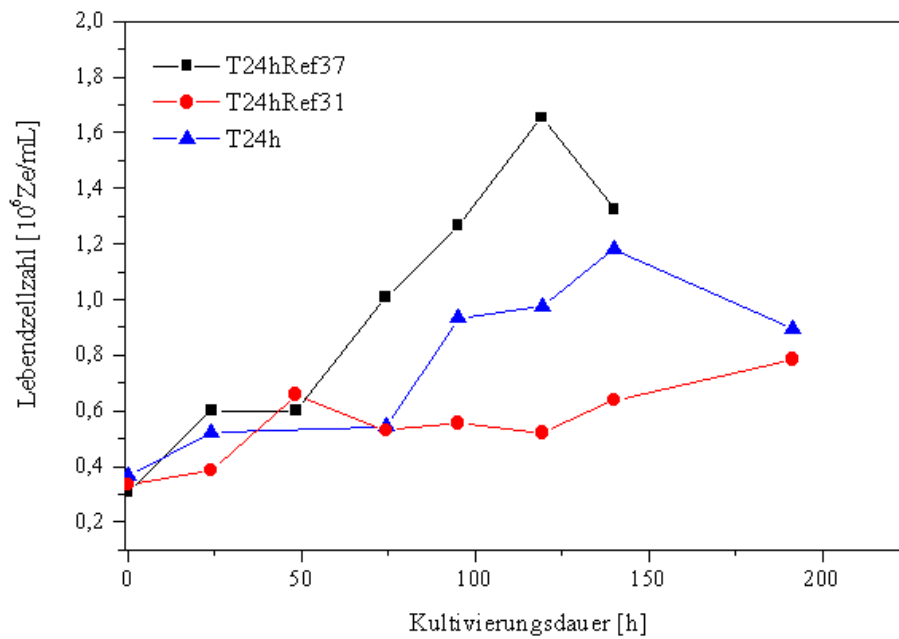


Abb. 4.23: Lebendzellzahlen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 24 Stunden.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparagin und Aspartat.

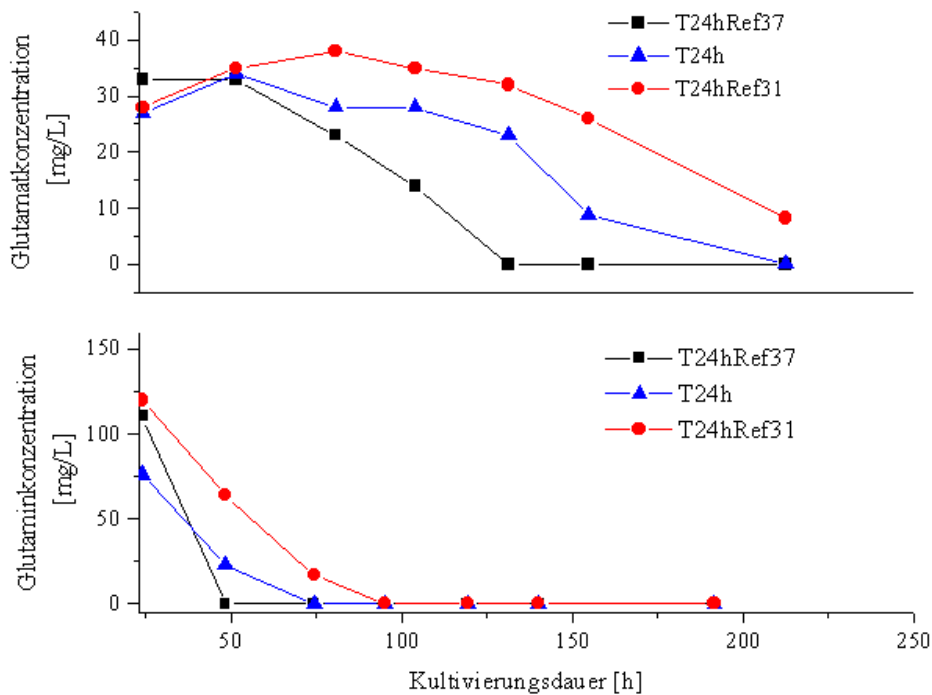


Abb. 4.24: Glutamin- und Glutamatkonzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 24 Stunden.

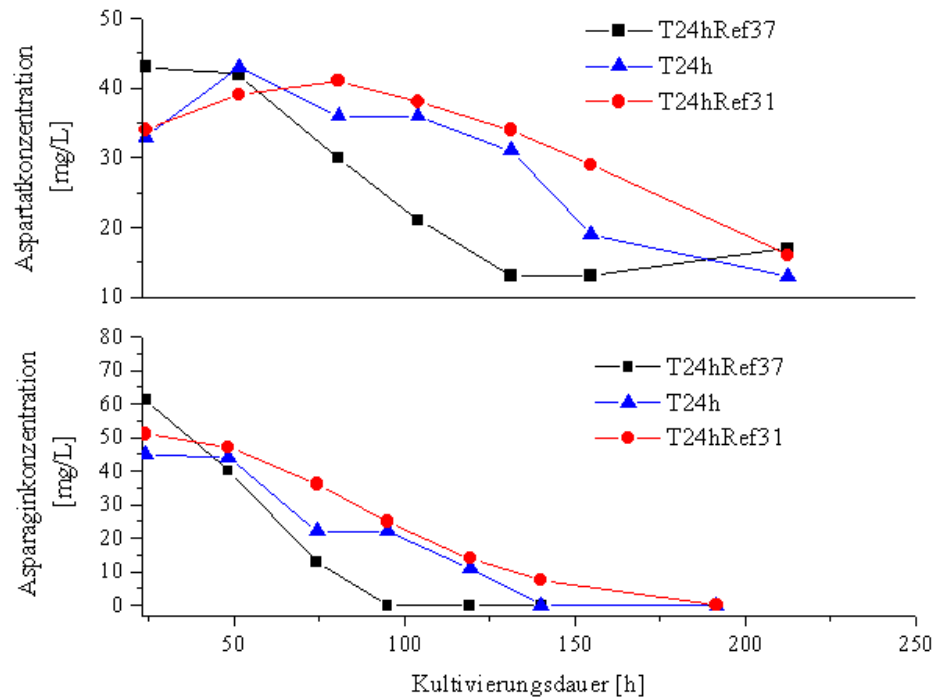


Abb. 4.25: Asparagin- und Aspartatkonzentrationen während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 24 Stunden.

Der Glutamingehalt der Kultivierung bei 37 °C ist bereits nach 49 Stunden und der Glutamingehalt der Versuchskultivierung nach 75 h aufgebraucht. Am langsamsten erfolgt die Verstoffwechslung bei der Kultivierung bei 31 °C.

Die Glutamatkonzentrationen der Ansätze T24h und T12hRef31 steigen zu Beginn der Kultivierung an, dabei erreicht die Versuchskultur nach 49 Stunden den höchsten Wert von 34 mg/L. Anschliessend sinkt die Konzentration auf 0 mg/L in der 220. Stunde. Die Referenz erreicht den höchsten Wert von 37 mg/L nach 75 Stunden, die Endkonzentration dieser Kultur beträgt 9 mg/L. Der Glutamatgehalt der Kultur T24hRef37 sinkt von Beginn an und ist nach 130 Stunden verbraucht.

Die Verläufe der Asparagin- und Aspartatkonzentrationen der Versuchskultur liegen jeweils zwischen den Verläufen der Referenzkultivierungen. So verbraucht die Kultur bei 37 °C innerhalb von 98 Stunden die gesamte Asparaginmenge, während in den Kulturen T24h und T24hRef31 erst nach 135 Stunden bzw. 220 Stunden kein Asparagin mehr nachzuweisen ist.

Bei der Versuchskultur ist zunächst ein Anstieg der Aspartatkonzentration wie bei der Referenz bei 31 °C zu vermerken, die Endkonzentration mit 12 mg/l liegt aber unter der Referenz (15 mg/L). Die Konzentration der Referenz bei 37 °C erreicht schon in der 135. Stunde einen niedrigen Wert von 12 mg/L. Der erhöhte Endwert ist auf eine fehlerhafte Bestimmung zurückzuführen.

Unter den Bedingungen in dieser Versuchsreihe zeigt die Kultur T24h ein Stoffwechselverhalten, das zwischen den Referenzkultivierungen liegt. Die längere Kultivierungszeit bei 31 °C wirkt sich ebenfalls stärker auf das Stoffwechselverhalten aus als bei der Kultivierung, die im 12-stündigem Wechsel kultiviert wurde.

Abbildung 4.26 zeigt den Verlauf der t-PA-Konzentration während der Kultivierungsreihe mit 24-stündigen Wachstumszyklen. Hier ist wiederum bei der 31 °C-Referenzkultivierung der exponentielle Anstieg bis auf Werte von 5,5 µg/mL zu erkennen. Die Versuchskultivierung mit 24-stündigem Wachstumsrhythmus zeigt einen ähnlichen t-PA-Konzentrationsverlauf, jedoch sind die hier erreichten maximalen t-PA-Konzentration geringer (Endkonzentration: 3,5 µg/mL). Die Referenzkultur bei 37 °C resultiert in den geringsten Endkonzentrationen an t-PA, so dass dort lediglich Werte von 2,75 µg/mL erreicht werden. Auch hier ist zu beobachten, dass die erreichte t-PA-Konzentration der Versuchskultur zwischen den Endkonzentrationen der Referenzkulturen liegt

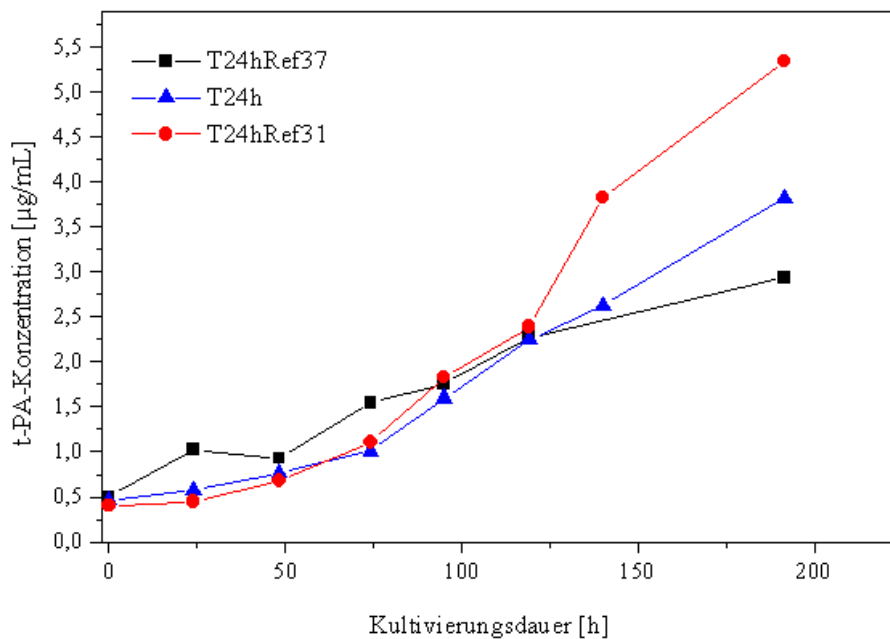


Abb. 4.26: Verlauf der t-PA-Konzentration während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 24 Stunden.

Diese Versuche mit periodischen Wachstumszyklen zwischen 37 °C und 31 °C zeigen deutlich, dass der entscheidende Faktor für die gebildete t-PA-Menge offenbar in der Zeitspanne liegt, in der die Zellen bei 31 °C kultiviert werden. So werden bei den Kulturen, die schon zu Beginn der Kultivierung bei 31 °C wachsen, die höchsten Endkonzentrationen an Produkt erzielt. Durch die Kultur, die abwechselnd im 12 Stunden Rhythmus bei 31 °C bzw.

37 °C kultiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass das Wachstums- und Stoffwechselverhalten der Zellen dem Verhalten von Zellen entspricht, die bei 37 °C kultiviert werden. Das Produktionsverhalten jedoch ist durch diese 12-stündigen Zyklen bei 31 °C gesteigert worden, es liegt jedoch nicht auf dem hohen Produktionsniveau, welches die Zellen zeigen, wenn sie bei 31 °C kultiviert werden.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen mit periodischen Temperaturwechseln weisen auf ein entkoppeltes Wachstums- und t-PA-Produktionsverhalten. Durch die verschiedenen Kultivierungstemperaturen werden unterschiedliche Zunahmen der Zellzahlen bzw. Produktausbeuten beobachtet.

4.1.6.3 Zellzyklusanalyse von CHO-Zellen in Kultivierungen mit 12- und 24-stündigem periodischem Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C

Zur Zellzyklusanalyse werden die Anteile der S-Phase, der G2/M-Phase und der G0/G1-Phase während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel bestimmt.

In Abbildung 4.27 sind die S-Phasenanteile der Versuchsreihe mit 12-stündigem Temperaturwechsel dargestellt. Der prozentuale Anteil der S-Phase am Gesamtzellzyklus nimmt bei der Kultivierung, die über den gesamten Zeitraum bei 31 °C geführt wird, mit zunehmender Kultivierungsdauer zu, wohingegen die S-Phasenanteile bei der 37 °C-Kultur bzw. Kultur mit 12-stündigem Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C mit zunehmender Kultivierungsdauer abnehmen. Dies entspricht auch den Beobachtungen bei der Entwicklung der Zellzahl während dieser Versuchsreihe (annähernd gleiches Wachstum der Versuchskultur und der Referenz bei 37 °C). Die Zunahme des S-Phasenanteils während der 31 °C Kultur über die Kultivierungsdauer könnte einen Hinweis darauf geben, dass die t-PA-Produktion mit dem Anstieg des S-Phasenanteils, also der DNA-Synthesephase gekoppelt ist.

Ganz ähnlich verhalten sich die G0/G1-Phasenanteile (Abb. 4.28) der Kultivierung bei 37 °C und der Kultur mit Temperaturwechsel. Sie steigen im Verlaufe der Kultivierung an, wohingegen die Phasenanteile der Referenz bei 31 °C ein gegenläufiges Verhalten zeigen, also mit zunehmender Kultivierungsdauer abnehmen.

Die G2/M-Phasenanteile (Abb. 4.29) zeigen für die 37 °C-Kultur und die Kultur mit Temperaturwechsel einen fast identisch Kurvenverlauf (zunächst leichter Anstieg und dann Abfall bis zum Ende der Kultur). Die 31 °C Kultur zeigt einen qualitativ gleichen Kurvenverlauf nur mit dem Unterschied, dass die Werte für den G2/M Anteil um etwa zehn Prozent niedriger laufen als bei den anderen beiden Kulturen.

Diese Werte unterstützen die Annahme, dass bei dieser Zelllinie die t-PA-Synthese nicht an das Wachstum gekoppelt ist.

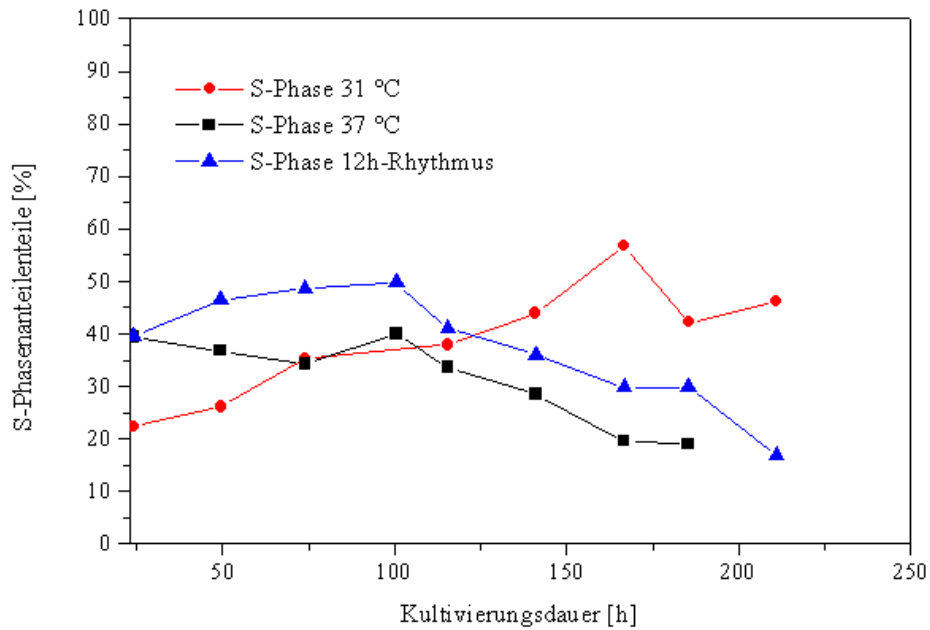


Abb. 4.27: S-Phasenanteile des Zellzyklus während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

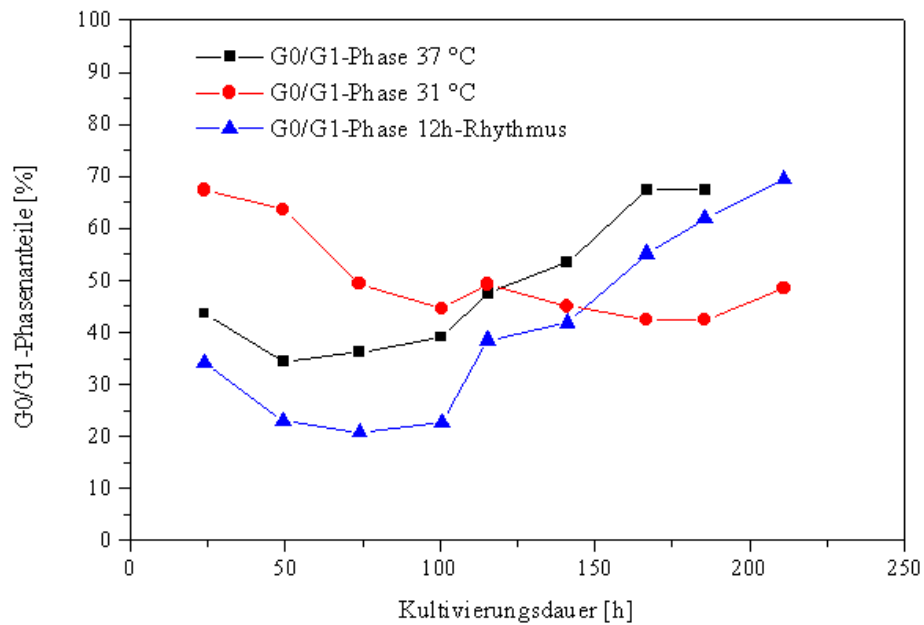


Abb. 4.28: G0- und G1-Phasenanteile des Zellzyklus während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

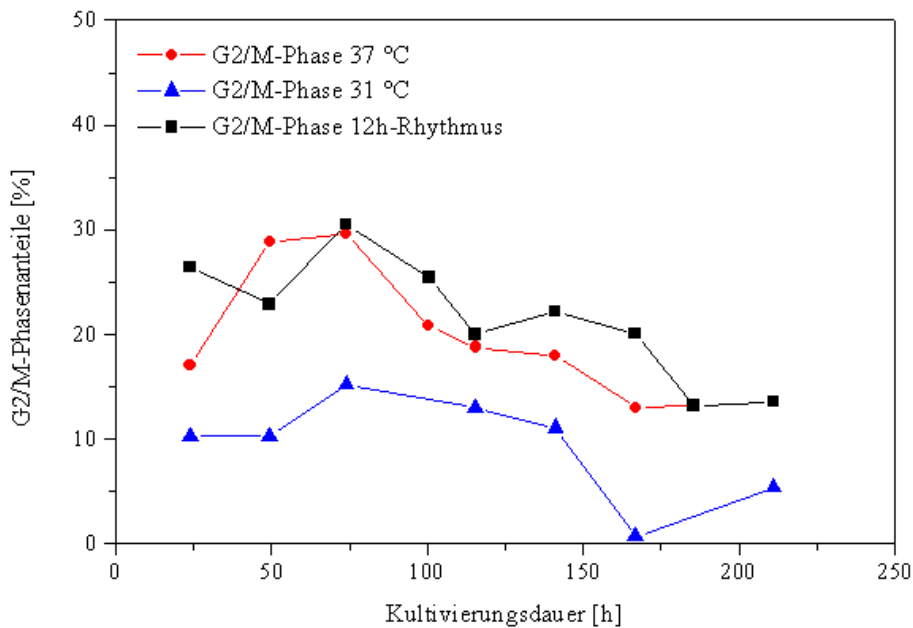


Abb. 4.29: G2- und M-Phasenanteile des Zellzyklus während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 12 Stunden.

Abbildung 4.30 zeigt die Anteile der S-Phasen, der G0/G1-Phasen und der G2/M-Phasen der Kultivierung, die im 24-Stundenrhythmus abwechselnd bei 37 °C und 31 °C kultiviert wird. Der G0/G1 Phasenanteil zeigt einen relativ uneindeutigen Kurvenverlauf während dieser Kultivierungen. Interessant ist jedoch der Verlauf der Zellzyklusanteile G2/M-Phasen und der S-Phase während dieser Kultivierung. Ab der 70. Stunde zeigen diese Anteile einen periodischen Verlauf, so dass ab der 120. Stunde ein exakt gegenläufiges Verhalten der S-Phasenanteile auf der einen Seite und der G2/M-Phasenanteile auf der anderen Seite zu beobachten ist. Durch die 24-stündigen Temperaturwechsel zwischen 37 °C und 31 °C erfolgt ein 24-stündiges Auf- und Abschwingen von S-Phasenanteil und G2/M-Phasenanteil. So nimmt der S-Phasenanteil jeweils ein Minimum ein, wenn der G2/M Phasenanteil ein Maximum erreicht und umgekehrt. Dabei verhalten sich die Anteile so, dass jeweils nach einer 31 °C-Phase der G2/M Phasenanteil ein Maximum und der S-Phasenanteil ein Minimum einnimmt. Nach einer 37 °C-Phase ist dies genau umgekehrt. Dies Verhalten kann mit einer zeitlichen Verzögerung erklärt werden. In der Phase bei 31 °C wird ein Anstieg des S-Phasenanteils induziert. Dieser Anstieg ist dann jedoch erst in der folgenden 37 °C-Phase sichtbar. Auf der anderen Seite wird der Anstieg des G2/M-Phasenanteils in der 37 °C-Kultivierungsphase induziert, sichtbar wird dieser jedoch erst in der nächsten 31 °C-Phase. Durch diesen Temperaturmodus ist es also möglich, die Zellen in eine Art Synchronisation zu bringen und die Anteile an den Zellzyklusphasen gezielt zu lenken.

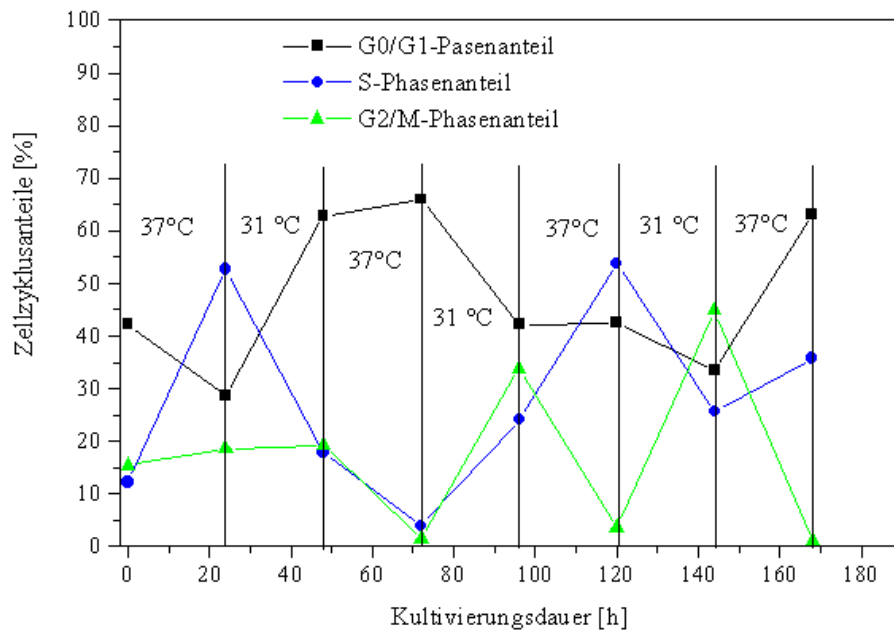


Abb. 4.30: S-, G0/G1- und G2/M-Phasenanteile des Zellzyklus während der Kultivierungen mit periodischem Temperaturwechsel nach jeweils 24 Stunden.

Diese Versuche geben einen Hinweis auf den Einfluss der Temperatur auf den Zellzyklus. Nach der Temperaturabsenkung von 37 °C auf 31 °C erhöht sich der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Bei Temperaturerhöhung sinkt dieser Anteil wieder. Parallel zur Erhöhung des S-Phasenanteils steigt auch die t-PA-Produktivität der Zellen. Je länger die Zellen bei 31 °C kultiviert werden, desto höher ist der S-Phasenanteil (vgl. S-Phasenanteil der Kultur T12hRef31) und desto größer ist auch die Ausbeute an t-PA.

Das bedeutet, dass die Verweildauer der CHO-Zellen bei einer Kultivierungstemperatur von 31 °C entscheidend für die gebildete Menge an t-PA ist. Für eine optimale Produktausbeute sollten diese Zellen deshalb durchgehend bei 31 °C kultiviert werden.

4.2 Probenahmesysteme zur Onlineanalytik von Proteinen

Die Onlineanalytik von Proteinen, die in biotechnologischen Verfahren hergestellt werden, erfordert Probenahmesysteme, die kontaminationsfrei eine schnelle Abtrennung der zu analysierenden Produkte von Zellen und Zellbruchstücken ermöglicht. Um die Proben direkt an eine nachfolgende flüssigchromatographische Analytik weiterzuführen, müssen die Proben zellfrei sein. Verschiedene Probenahmesysteme wie die Eppendorf-sterile-inline-Probenahmesonde (ESIP) und die Probenahmesonde ProcessTrace sowie ein während dieser Arbeit entwickeltes System werden auf die Anwendbarkeit zur Onlineanalytik von Proteinen untersucht.

4.2.1 Untersuchungen zur Onlineprobenahme mit dem ESIP-Modul

Der Einsatz der sterilisierbaren Probenahmesonde ESIP der Firma Eppendorf, die von der Firma Trace AG in Braunschweig vertrieben wird, ist für die Onlineprobenahme zur Bestimmung kleinerer Moleküle wie Glucose, Lactat und Glutamin beschrieben [WENTZ, 1988; GRAF, 1989].

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wird eine modifizierte Membran der Firma Eppendorf auf ihre Eignung für die Onlineprobenahme mit dem ESIP-Modul zur Proteinanalytik getestet. Laut Firmenangaben hat diese Membran „low-protein-binding“-Eigenschaften, d.h., dass die unspezifische Bindung von Proteinen auf dieser Membran durch geeignete Modifikationen herabgesetzt ist. Das Material dieser tubulären Membran ist aus modifiziertem Polypropylen (weitere Angaben sind nicht erhältlich). Die Membran wird in die Probenahmesonde eingesetzt und vor der Benutzung nach Vorschrift des Herstellers hydrophilisiert.

Es werden simulierte Probenahmen mit t-PA-Standardlösungen durchgeführt (s. Kap. 3.2). Der Gehalt an t-PA wird zum Vergleich in den entnommenen Proben (Permeat) und im Retentat ermittelt (s. Abb. 4.31).

Der Anstieg der t-PA-Konzentration im Retentat zu Beginn des Versuches ist theoretisch nicht möglich und ist deshalb auf Fehler bei der Konzentrationsbestimmung mittels ELISA zurückzuführen. Während der gesamten Versuchsdauer ist kein Übergang des t-PA auf die Permeatseite zu beobachten. Das bedeutet, dass die eingesetzte Membran nicht durchlässig für t-PA und für diese Anwendung nicht geeignet ist. Weitere für diese Anwendung geeignete Membranen sind nicht erhältlich, so dass das ESIP-Modul für eine Onlineanalytik von t-PA nicht verwendet werden kann.

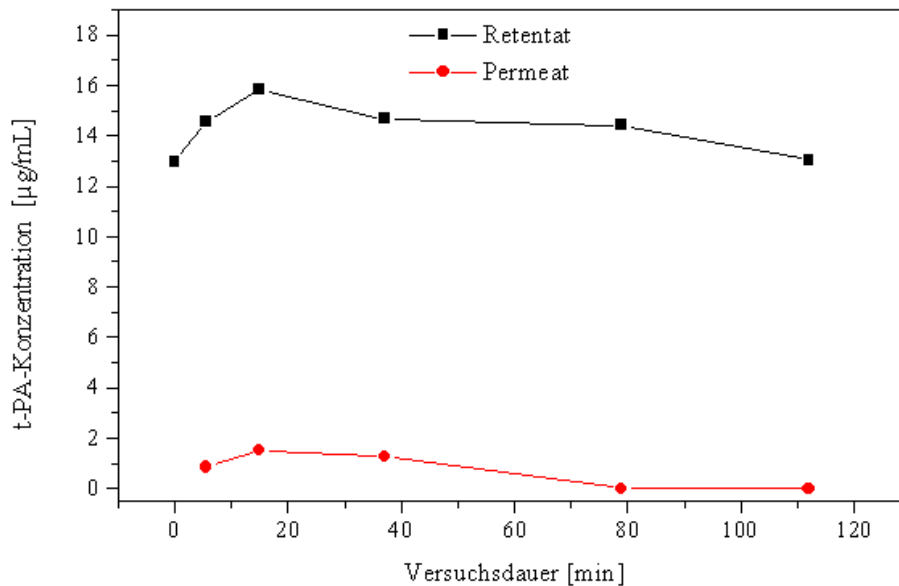


Abb. 4.31: t-PA-Konzentrationen im Verlauf eines simulierten Probenahmeexperimentes mit dem ESIP-Modul, in das eine modifizierte Polypropylenmembran eingesetzt wurde.

4.2.2 Untersuchungen zur Onlineprobenahme mit dem Probenahmesystem ProcessTrace

Die Firma Trace AG (Braunschweig) vertreibt die Probenahmesonde ProcessTrace für die Analytik kleiner Moleküle wie Glucose, Lactat und Glutamin. Das Prinzip dieser Probenahmesonde beruht auf Dialyse. In der Sonde befindet sich ein Pufferkreislauf, der den Dialysepuffer an einer Dialysemembran vorbeiströmen lässt. Als Dialysemembran werden Membranen mit Porengrößen $< 0,2 \mu\text{m}$ eingesetzt, die eine Sterilbarriere zum Kulturmedium bilden.

Für die Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieses Systems werden verschiedene Membranen unterschiedlicher Hersteller mit variierenden Schichtdicken und Porengrößen (s. Tab. 3.2) in die Sonde eingebaut und Probenahmeversuche mit t-PA-Standardlösungen durchgeführt. Nach einer jeweiligen Dialysedauer von 2 und 4 Stunden werden sowohl aus dem Retentat als auch aus dem Dialysepuffer Proben entnommen. Die ermittelten t-PA-Konzentrationen nach 2 Stunden Dialyse sind in Abbildung 4.32 angegeben.

Bei allen Membranen, die in dieser Versuchreihe getestet wurden, wird keine Gleichgewichtsdialyse der Proteine durch die Membran erreicht. Lediglich ein kleiner Anteil der t-PA-Menge gelangt durch die Membranen in den Dialysepuffer. Auch nach 4 Stunden Dialysedauer ist kein Gleichgewichtszustand erreicht. Die Summe der Konzentrationen im Permeat und Retentat liegt bei allen Membranen unterhalb von $15 \mu\text{g/mL}$

(Ausgangskonzentration). Das bedeutet, dass ein Teil der Proteine an den Membranen gebunden wird. Aus diesen Gründen ist auch dieses System zur Onlineprobenahme und nachfolgender Proteinanalytik ungeeignet.

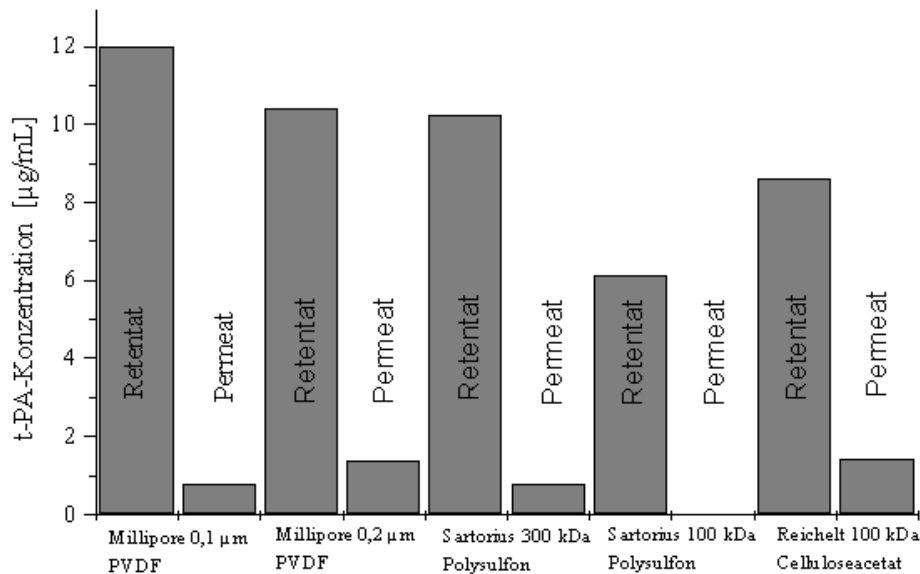


Abb. 4.32: t-PA-Konzentrationen im Verlauf simulierter Probenahmeexperimente mit der Probenahmesonde ProcessTrace, in die verschiedenartige Membranen eingesetzt wurden. Zum Vergleich sind die Konzentrationen im Dialysepuffer (Permeat) als auch im Retentat nach einer Dialysedauer von 2 Stunden aufgetragen. Die Ausgangskonzentration im Retentat beträgt 15 µg/mL.

4.2.3 Entwicklung eines kombinierten Probenahmesystems mit Bakterienfalle und Filtereinheiten

Für die Probenahme mit dem ESIP-Modul und dem System ProcessTrace werden Membranen mit Porengrößen < 0,2 µm verwendet, die eine Sterilbarriere bilden und eine Kontamination verhindern sollen. Auch weitere Systeme zur kontaminationsfreien Probenahme aus Bioreaktoren basieren auf dieser Membrantechnik [KRONER, 1986; WENTZ, 1988; GRAF, 1989; FENGE, 1991]. Diese geringen Porengrößen haben den Nachteil, dass die Membranen insbesondere bei längerem Einsatz durch große Moleküle (z.B. Proteine) verblocken. Um eine quantitative Onlineproteinanalytik durchführen zu können, müssen Membranen mit größeren Porendurchmessern verwendet werden, die eine gute Durchlässigkeit für das Produktprotein besitzen. Bei der Entwicklung eines solchen Probenahmesystems im Verlauf dieser Arbeit werden eine Bakterienfalle als Sterilbarriere und zwei Filtereinheiten zur Abtrennung von Zellen und Zellbruchstücken kombiniert. Dabei können Filter mit ausreichend großen Porengrößen eingesetzt werden, weil eine Kontamination des Bioreaktors durch die

Bakterienfalle verhindert wird. Das entwickelte Probenahmesystem sowie die Beschreibung der Anwendung dieses Systems bei einer Kultivierung werden im Folgenden vorgestellt.

4.2.3.1 Entwicklung einer Bakterienfalle zur kontinuierlichen Probenahme

Zur diskontinuierlichen Probenahme werden Bakterienfallen verwendet, bei denen der Reaktorinhalt angesaugt wird und in der Bakterienfalle heruntertropft (s. Abb. 4.33). Ein Zurückwachsen von Fremdkeimen wird in der Bakterienfalle verhindert. Nach jeder Probenahme wird der Ansaugschlauch in einer Desinfektionslösung sterilisiert.

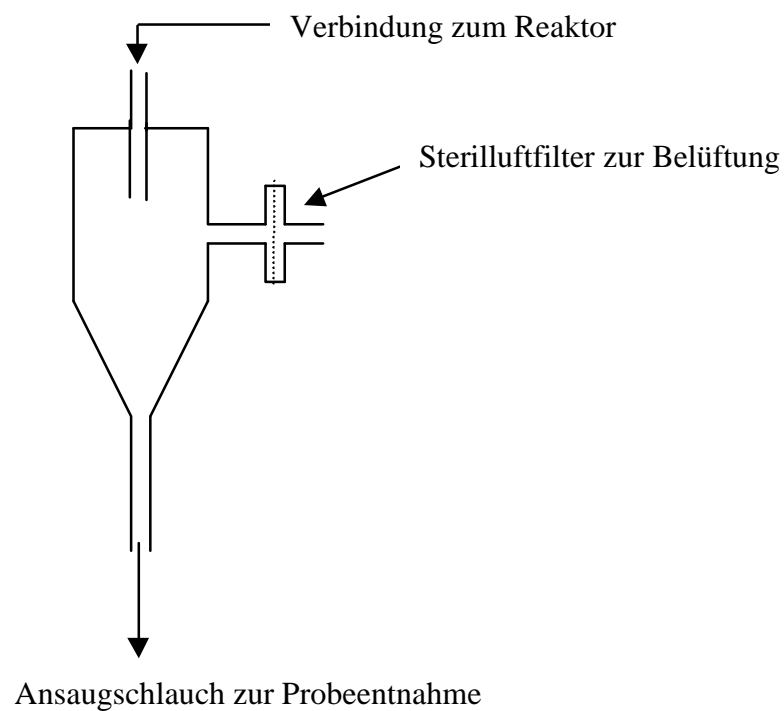


Abb. 4.33: Aufbau einer Bakterienfalle zur diskontinuierlichen Probenahme aus Bioreaktoren. Bei der Probenahme wird der Reaktorinhalt über den Ansaugschlauch angesaugt. Nach der Probenahme wird der Schlauch in eine Desinfektionslösung getaucht.

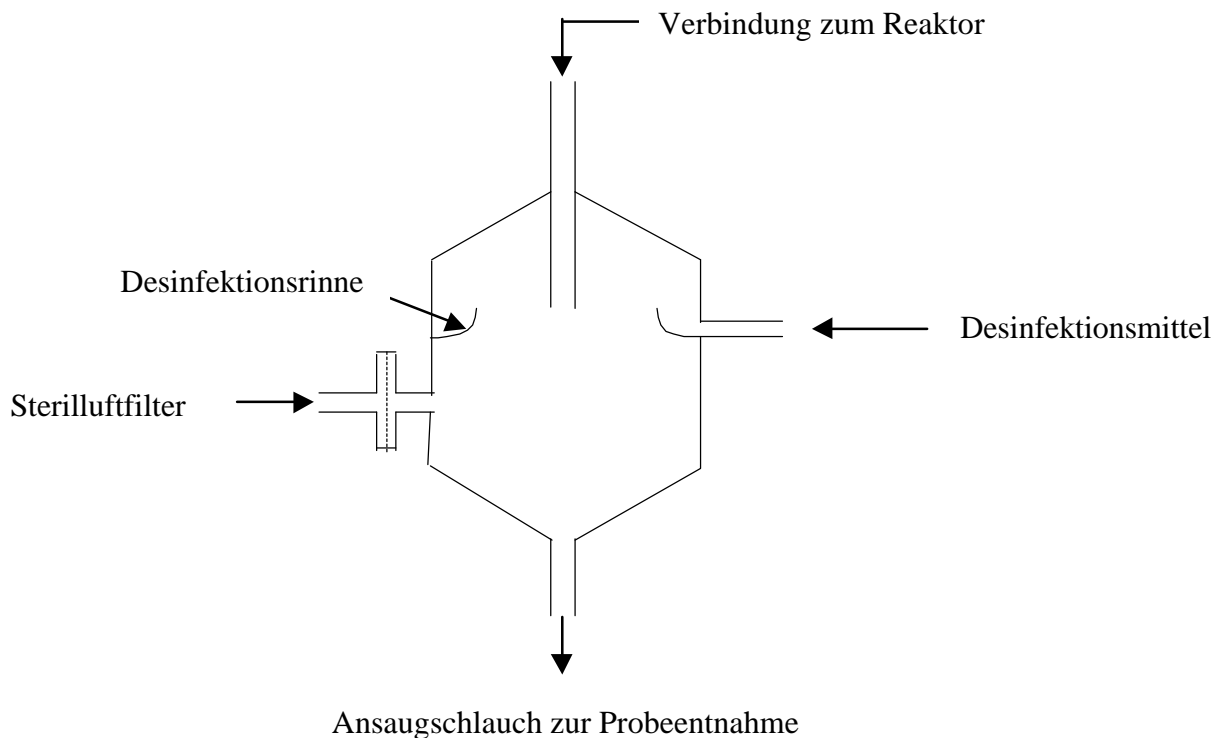


Abb. 4.34: Aufbau einer Bakterienfalle zur kontinuierlichen Probenahme aus Bioreaktoren. Bei der Probenahme wird der Reaktorinhalt über den Ansaugschlauch angesaugt. Nach der Probenahme wird aus einem Vorratsgefäß ein Desinfektionsmittel in die Desinfektionsrinne gepumpt. Durch Überlaufen des Desinfektionsmittels wird der gesamte untere Teil der Bakterienfalle desinfiziert.

In Abbildung 4.34 ist eine modifizierte Bakterienfalle zu sehen, die zur kontinuierlichen Probenahme geeignet ist (Anfertigung durch die Glasbläserei des Instituts für Technische Chemie, Universität Hannover). Die Probenahme läuft nach folgendem Schema ab: der Schlauch des Luftfilters wird geschlossen und über den Ansaugschlauch wird durch Abpumpen ein Unterdruck erzeugt. Der Reaktorinhalt wird angesaugt und gelangt durch die Bakterienfalle. Nach Beendigung der Probenahme wird der Schlauch des Luftfilters wieder geöffnet und aus dem Vorratsgefäß ein Desinfektionsmittel in die Desinfektionsrinne gepumpt, die sich am inneren Rand der Bakterienfalle befindet. Die Rinne wird so voll gepumpt, dass sie überläuft und dadurch auch der untere Teil der Bakterienfalle desinfiziert wird. Das verbleibende Desinfektionsmittel wird aus dem unteren Teil abgepumpt. Bei der nächsten Probenahme kann ein geringer Vorlauf entnommen werden, um einen Verdünnungseffekt der Probe mit Desinfektionsresten zu vermeiden. Die Desinfektionsrinne ist bis zur nächsten Probenahme mit Desinfektionsmittel gefüllt, so dass ein zusätzlicher Kontaminationsschutz besteht. Der Vorteil dieser Probenahmemethode ist das geringe Totvolumen, denn die Schläuche werden bei jeder Probenahme vollständig geleert.

4.2.3.2 Anwendung des entwickelten Systems zur kontinuierlichen Probenahme

Um die Probenahme so gestalten zu können, dass die Proben direkt in eine HPLC-Anlage injiziert werden können, wird der Aufbau wie in Abb. 3.1 (Kap. 3.2) gezeigt erstellt.

Das Konzept dieses Probenahmesystem besteht darin, zunächst eine Vorfiltration der entnommenen Probe durch den Spinfilter durchzuführen, um große Zellaggregate vom Medium zu trennen. Dadurch wird die Gefahr der Verstopfung von Schläuchen, die das Medium zur Analytik weiterleiten, vermindert. Die Zellaggregate werden in den Reaktor zurückgeführt. Aus der Spinfiltereinheit wird das Medium über die in Kap. 4.2.3.1 beschriebene Bakterienfalle angesaugt und durch einen weiteren Filter geführt. Als Filtermaterial wird in dieser zweiten Filtereinheit Celluloseacetat mit einer Porengröße von 2 µm eingesetzt. Auf diese Weise werden Zellen und Zellbruchstücke abgetrennt und das Medium kann direkt zur Analytik verwendet werden.

Der Vorteil dieses Systems besteht in der Möglichkeit, die Celluloseacetat-Filter nach der Probenahme auszutauschen, weil eine Kontamination durch die Bakterienfalle verhindert wird. Das Verblocken des Filters mit Proteinen oder Verstopfen mit Zellbruchstücken kann durch den Wechsel der Filter ebenfalls vermieden werden.

Die folgende Graphik zeigt die ermittelten Konzentrationswerte an t-PA von Proben, die während der Kultivierung zum einen über das Probenahmesystem (1,8 mL Probe und anschliessender Wechsel der Filtrationseinheit) und zum anderen auf herkömmliche Weise entnommen wurden. Die t-PA-Konzentrationen werden mittels ELISA bestimmt.

Wie in der Abbildung 4.35 ersichtlich ist, liegen die t-PA-Konzentrationen der Proben, die über das Probenahmesystem entnommen wurden, unterhalb der Konzentrationswerte aus Proben, die direkt aus der Kultivierung entnommen wurden. Es bleiben durchschnittlich 20 % t-PA bei der Filtration auf dem Celluloseacetatfilter zurück. Bei Untersuchungen zur Proteinadsorption an dem gleichen Material mit t-PA-Standardlösungen werden Wiederfindungsraten um 68,5 % ermittelt. Die geringeren Adsorptionswerte bei der Probenahme können mit der höheren Gesamtproteinkonzentration im Kulturmedium erklärt werden. Bei Verwendung von anderen Filtermaterialien, die eine geringere Proteinadsorption aufweisen, sind Verbesserungen der Qualität der Probenahme erreichbar.

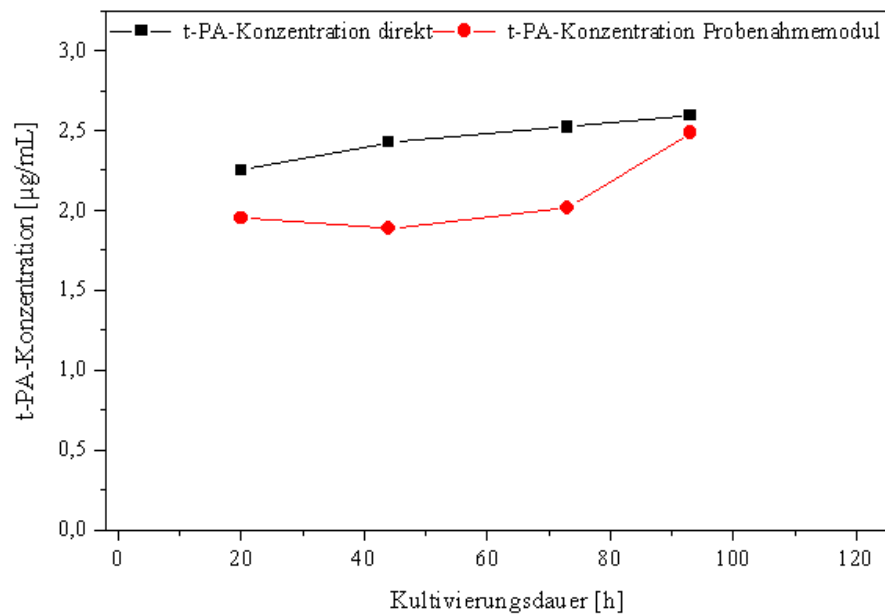


Abb. 4.35: Vergleich der t-PA-Konzentrationen der Proben der Kultivierung P1, die über das Probenahmesystem und direkt aus dem Reaktor entnommen wurden.

Die Versuche zeigen, dass durch dieses System der Probenahme (Kombination aus Bakterienfalle, Vorfiltration mittels Spinfilter und Endfiltration mittels Celluloseacetatfilter) und geeigneter Kalibration (unter Beachtung der Proteinadsorption am Filter) der nachfolgenden Onlineanalytik eine reproduzierbare Konzentrationsbestimmung von t-PA möglich sein sollte.

Die Vorteile dieses Probenahmesystems sind das geringe Kontaminationsrisiko, die Robustheit des Systems und die mögliche Automatisierbarkeit der Methode. So kann die gesamte Probenahme mit Hilfe eines Computerprogramms gesteuert werden.

4.3 Methodenentwicklung zur t-PA-Analytik mittels HPMADC (High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography)

Die Entwicklung einer schnellen affinitätschromatographischen Bestimmungsmethode von t-PA mit makroporösen Affinitätsdisks als stationäre Phase wird im Rahmen einer Kooperation mit dem Institute of Macromolecular Compounds der Russischen Akademie der Wissenschaften, St. Petersburg, durchgeführt. Dazu werden grundlegende Untersuchungen zur Immobilisierung von verschiedenen Liganden, zur Kinetik der Bindung zwischen den Affinitätspaaren sowie zur Optimierung der chromatographischen Bedingungen durchgeführt. Anschliessend folgt eine Anwendung der entwickelten Methode bei mehreren Kultivierungen von t-PA-produzierenden CHO-Zellen.

4.3.1 Untersuchungen zur Immobilisierung von Proteinen und Peptiden als Affinitätsliganden

Um geeignete Liganden für die affinitätschromatographische Analytik von t-PA zu finden, werden monoklonale Antikörper, Plasminogen, Polylysin und Lysin auf der Oberfläche von GMA-EDMA (Glycidylmethacrylat-co-ethylendimethacrylat) Disks (im Folgenden als Disks bezeichnet) immobilisiert und die Ligandendichte bestimmt (Kap. 3.3.1). Die Immobilisierung erfolgt für Proteine nach der von Kasper et al. [KASPER, 1998] optimierten Methode (Anhang 7.2) und für Polylysin und Lysin nach einer Methode für Peptide (Anhang 7.3).

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen immobilisierten Liganden und erreichbaren Ligandendichten auf den Disks. Die Versuche mit Lysin und Polylysin als Affinitätsliganden wurden von Frau Dr. Galina Platonova (Institute of Macromolecular Compounds der Russischen Akademie der Wissenschaften, St. Petersburg) durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tab. 4.1: Maximale Ligandendichten L verschiedener Liganden bei Immobilisierung auf GMA-EDMA-Disks. Polylysin- und Lysin Daten aus [PLATONOVA, 1999]

Immobilisierter Ligand	Ligandendichte L	
	[mg/mL Diskmaterial]	[μ mol/mL Diskmaterial]
Antikörper (IgGs) 150000 Da	4,85	0,032
Plasminogen Pmg 92000 Da	5,58	0,06
Polylysin 12000 Da	3,6	0,3
Lysin 147 Da	1,85	12,6

Bei einer Immobilisierungskonzentration von 6 mg/mL Proteinlösung können auf einer Disk 1,65 mg Antikörper immobilisiert werden, das entspricht einer Ligandendichte von 0,03 $\mu\text{mol/mL}$ Diskmaterial. Im Fall von Plasminogen wird eine Ligandendichte von 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ Diskmaterial erreicht. Die erreichte Ligandendichte an Polylysin beträgt 0,3 $\mu\text{mol/mL}$ Diskmaterial. Die höchste molare Ligandendichte bei der Immobilisierung von Lysin beträgt 12,6 $\mu\text{mol/mL}$ Diskmaterial.

4.3.2 Kinetik der Bindung von t-PA an immobilisierte Affinitätsliganden

Um die Anwendbarkeit der verschiedenen Affinitätsdisks für die t-PA-Analytik zu überprüfen, werden die Dissoziationskonstante K_{Diss} der Reaktion zwischen Ligat (t-PA) und jeweiligem Ligand sowie die maximale Adsorptionskapazität Q_{max} mittels Frontalanalyse (Kap. 3.3.2) bestimmt.

Zunächst wird die Beladungsdichte q in Abhängigkeit von der Beladungskonzentration C bestimmt. In Abb. 4.36 sind die daraus resultierenden Adsorptionsisothermen dargestellt.

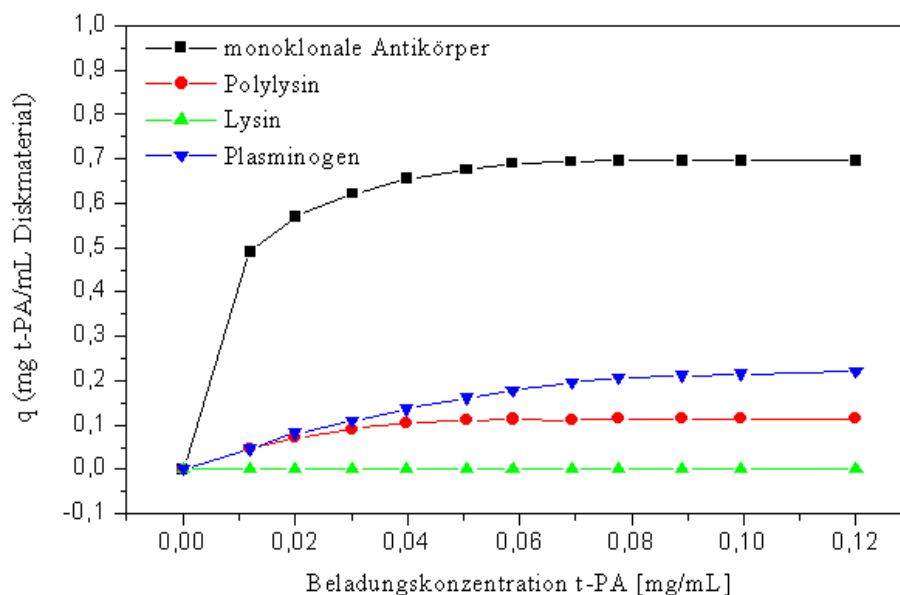


Abb. 4.36: Adsorptionsisothermen der Bindung von t-PA durch verschiedene Affinitätsliganden. Polylysin- und Lysin daten aus [PLATONOVA, 1999].

Die größten Mengen an t-PA (bis zu 0,7 mg/mL Diskmaterial) werden an Disks, die mit monoklonalen Antikörpern als Affinitätsliganden modifiziert sind, adsorbiert. Bei geringen Beladungskonzentrationen (zwischen 0 und 0,02 mg/mL) binden die mit Plasminogen und Polylysin modifizierten Disks die gleichen Mengen an t-PA. Bei höheren Beladungskonzentrationen zeigen die Plasminogenliganden jedoch eine höhere Kapazität

(0,2 mg t-PA/mL Diskmaterial) als Polylysinliganden (0,1 mg/mL). An Lysin kann kein t-PA gebunden werden und deshalb eignet sich Lysin nicht als Ligand zur affinitätschromatographischen t-PA-Analytik.

Die Dissoziationskonstante K_{Diss} und die maximale Adsorptionskapazität Q_{max} werden durch Auftragung des Kehrwertes der Beladungsdichte q gegen den Kehrwert der Beladungskonzentration C bestimmt (s. Kap. 3.3.2). Die ermittelten Werte sowie der Quotient aus Ligandendichte (L) und maximaler Adsorptionskapazität ($Q_{\text{max,molar}}$) sind in Tab. 4.2 angegeben.

Tab. 4.2: Dissoziationskonstanten und maximale Adsorptionskapazitäten der Bindung von t-PA an verschiedene Affinitätsliganden. Polylysin- und Lysindaten aus [PLATONOVA, 1999].

Ligand	K_{Diss} [M]	Q_{max} [$\mu\text{g/mL}$ Diskmaterial]	$Q_{\text{max,molar}}$ [$\mu\text{mol/mL}$ Diskmaterial]	Adsorptionskap./ Ligandendichte $Q_{\text{max,molar}} / L_{\text{molar}}$
Antikörper	$2,83 \cdot 10^{-7}$	923,5	0,0135	0,422
Plasminogen	$10,4 \cdot 10^{-7}$	367,4	0,00539	0,090
Polylysin	$1,61 \cdot 10^{-7}$	461,75	0,00603	0,020
Lysin	-	-	-	-

Alle Dissoziationskonstanten liegen im Bereich der Konstanten, die für starke Affinitätswechselwirkungen in der Literatur angegeben werden (10^{-5} - 10^{-7} M) [LOTTSPREICH, 1998].

Die höchste Adsorptionskapazität $Q_{\text{max,molar}}$ von 0,0135 $\mu\text{mol/mL}$ Diskmaterial und der günstigste Quotient aus Adsorptionskapazität zur Ligandendichte (0,422) wird bei Antikörpern als Liganden gefunden. Da pro verwendetem IgG-Antikörpermolekül maximal 2 Moleküle Antigen gebunden werden können, ist das theoretisch maximal erreichbare Verhältnis von Ligat zu Ligand 2. Weil bei der Immobilisierung einige Bindungswerten der Antikörper blockiert werden, wird hier ein kleinerer Quotient gefunden.

Dieses Verhältnis von Ligat zu Ligand verschlechtert sich bei Verwendung anderer Affinitätsliganden (Plasminogen: 0,090 und Polylysin: 0,020). Der Grund dafür ist, dass es sich bei den Bindungen von t-PA zu Plasminogen und Polylysin nicht um eine spezifische Reaktion wie z.B. zwischen Antikörpern und deren zugehöriges Antigen, sondern um eine vergleichsweise schwächere Wechselwirkung zwischen t-PA und den Liganden handelt. Ein

weiterer Grund sind sterische Hinderungen (bei den anderen Liganden handelt es sich um kleine Liganden im Vergleich zu den Antikörpern).

Die ermittelten Werte zeigen, dass die gefundenen Affinitätswechselwirkungen ausreichen, um t-PA wirkungsvoll aus Tierzellkultivierungen zu isolieren und zu detektieren. Da die eingesetzten Antikörper die besten Eigenschaften zeigen, werden weitere Versuche zur affinitätschromatographischen Bestimmung von t-PA mit Antikörpern als Liganden durchgeführt.

4.3.3 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

In der Affinitätschromatographie werden häufig Beladungs- und Spülpuffer im neutralen pH-Bereich (\sim pH 7) und Elutionspuffer im sauren bzw. basischen pH-Bereich (pH-Shift auf pH 2 bzw. pH 12) verwendet [SUBRAMAINAN, 2000]. Folgende Eluenten wurden erfolgreich bei der affinitätschromatographischen Isolierung von Protein G mittels Affinitätsdisk verwendet [KASPER, 1998], die deshalb auch zur Bestimmung von t-PA eingesetzt werden: Beladungs- und Spülpuffer: PBS (pH 7,0) und Elutionspuffer: HCl (pH 2). Zur Optimierung der Analytik werden Untersuchungen zur Flussrate, Spülzeit und Volumen der Probenschleife durchgeführt.

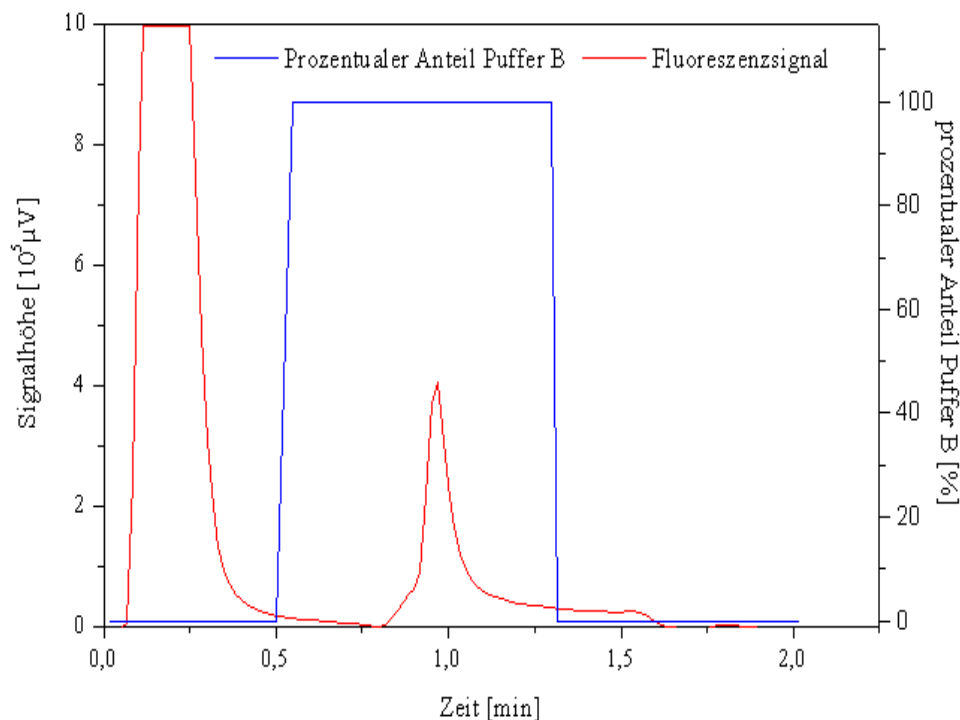


Abb. 4.37: Chromatogramm der t-PA-Analytik mittels HPMDAC. Die blaue Linie gibt das optimierte Elutionsprofil an. Chromatographie-Bedingungen: Puffer A: PBS (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,0), Puffer B: HCl (10 mM, pH 2), Flussrate: 4 mL/min, Probenschleife 1000 μ L.

Aufgrund des konvektiven Transportmechanismus (s. Kap. 2.4.2.1) erweist sich eine hohe Flussrate von 4 mL/min als geeignet. So kann auch eine kurze Dauer des gesamten chromatographischen Laufes von 2 min erzielt werden. Die Verwendung einer 1000 μL -Probenschleife ist erforderlich, weil das Detektionsminimum des Fluoreszenzdetektors bei einer Menge von 1 μg t-PA liegt und die Kultivierungsüberstände t-PA-Konzentrationen zwischen 0 $\mu\text{g/mL}$ und 15 $\mu\text{g/mL}$ enthalten. Ein unter diesen Bedingungen aufgenommenes Chromatogramm einer t-PA-Standardlösung sowie das dazugehörige optimierte Elutionsprofil sind in Abbildung 4.37 gezeigt.

4.3.4 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der optimierten Methode

Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit [GOTTWALD, 1992] einer chromatographischen Methode ist notwendig, um gleichbleibende Ergebnisse sicherzustellen. Entsprechende Versuche und eine Kalibration werden daher durchgeführt. In Abbildung 4.38 sind die Peakflächen aus den Chromatogrammen der Kalibrationsmessungen gegen die injizierte t-PA-Menge aufgetragen. Der berechnete Korrelationskoeffizient von 0,9981 weist eine hohe Linearität der Kalibrationsgerade im untersuchten Bereich von 1 bis 10 $\mu\text{g/mL}$ t-PA auf.

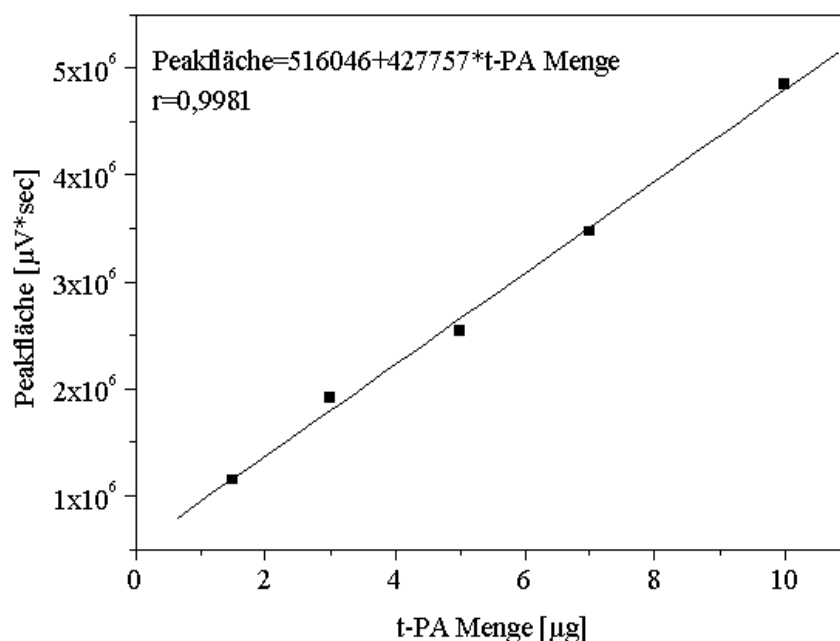


Abb. 4.38: Kalibrationsgerade der Affinitätsdiskchromatographie zur t-PA-Analytik.

Die Reproduzierbarkeit wird durch mehrfache Messungen von Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 1,5 bis 24 $\mu\text{g/mL}$ überprüft. In Abbildung 4.41 sind die Ergebnisse der Mehrfachmessung einer t-PA-Lösung (Konzentration 18 $\mu\text{g/mL}$) dargestellt,

für die ein Variationskoeffizient von 2,89 % berechnet wird. Messreihen weiterer Standardlösungen ergeben Variationskoeffizienten von 2,27 % bis 3,29 %. Damit ist für die entwickelte HPMADC-Methode eine sehr gute Reproduzierbarkeit nachgewiesen. Die hohe Linearität der Kalibrationsgeraden und die Reproduzierbarkeit bilden die Grundlage für eine stabile und verlässliche t-PA-Analytik aus Kulturüberständen.

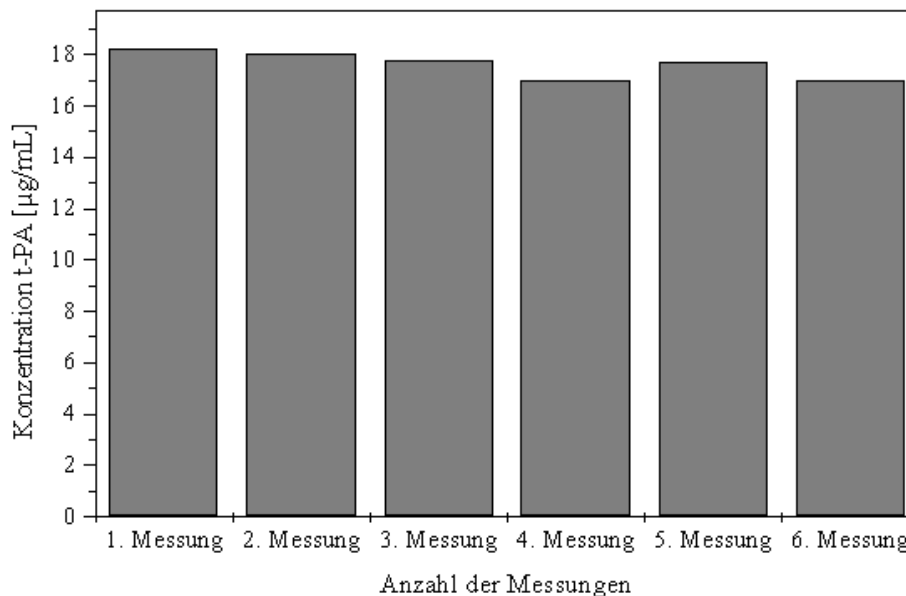


Abb. 4.39: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der entwickelten affinitätsdiskchromatographischen Methode für die t-PA-Analytik.

4.3.5 Bestimmung der t-PA-Konzentration aus Kultivierungsüberständen

Nach Entwicklung der schnellen affinitätsdiskchromatographischen Methode zur t-PA-Analytik wird diese zur t-PA-Konzentrationsbestimmung aus Kultivierungen der t-PA-produzierenden CHO-Zellen angewendet. Als Referenzmethode dient ein kommerziell erhältlicher t-PA-ELISA (s. Kap. 3.1.5.5).

In den Abbildungen 4.40, 4.41 und 4.42 sind zum Vergleich die t-PA-Konzentrationen aus verschiedenen Kultivierungen, die mittels HPMADC und ELISA bestimmt wurden, aufgetragen. Bei allen analysierten Kultivierungen liegen die t-PA-Werte, die mittels HPMADC bestimmt wurden, deutlich über den Referenzwerten. Die Abweichungen zwischen beiden Methoden liegen zu Beginn der Kultivierungen durchschnittlich bei 5 $\mu\text{g/mL}$. Gegen Ende der Kultivierungen liegen die Werte, die mittels HPMADC bestimmt wurden, im Mittel 30 $\mu\text{g/mL}$ über den ELISA-Werten.

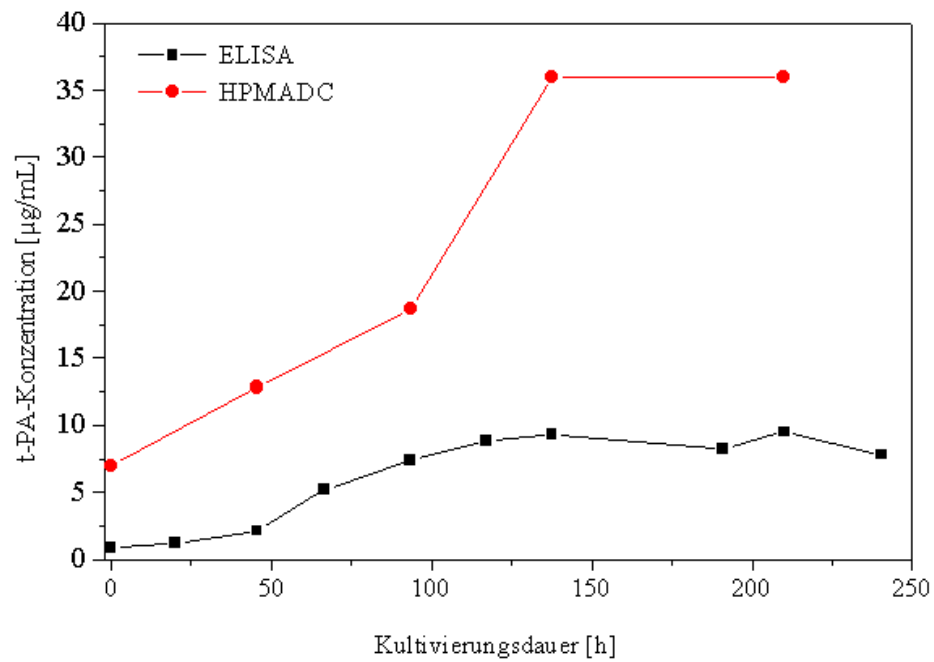


Abb. 4.40: Vergleich der t-PA-Konzentrationen der Kultivierung T(47)Ref37, die mittels HPMADC und als Referenz mittels ELISA bestimmt wurden.

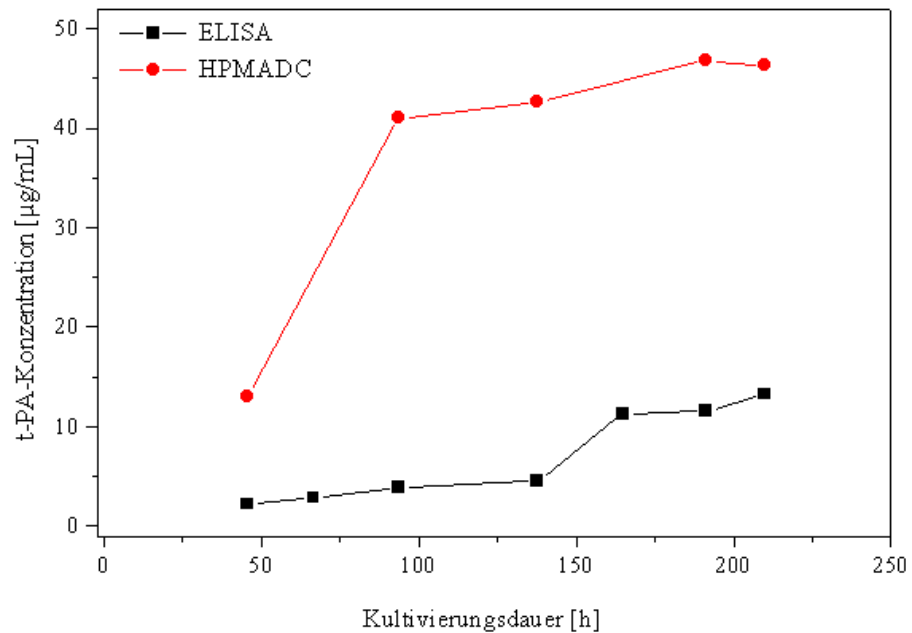


Abb. 4.41: Vergleich der t-PA-Konzentrationen der Kultivierung T(47)37-31, die mittels HPMADC und als Referenz mittels ELISA bestimmt wurden.

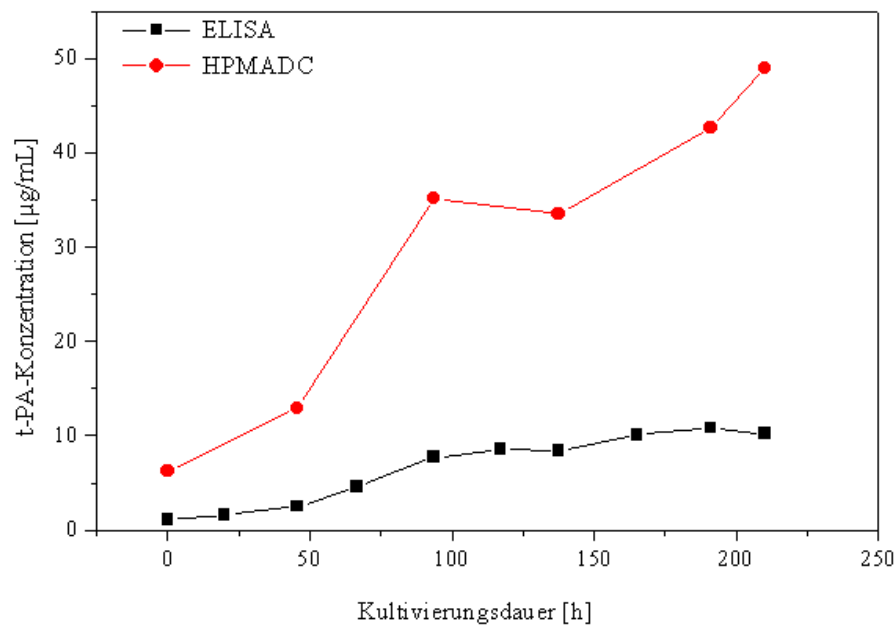


Abb. 4.42: Vergleich der t-PA-Konzentrationen der Kultivierung T(47)37-32, die mittels HPMADC und als Referenz mittels ELISA bestimmt wurden.

Zur Klärung der Abweichungen zwischen der chromatographischen Methode und dem ELISA werden im Folgenden diese beiden Methoden verglichen.

Der Hauptunterschied zwischen ELISA und Chromatographie liegt zum einen in der Art der t-PA-Detektion. Beim ELISA wird ein „Sandwich“ aus immobilisiertem Antikörper, Antigen (t-PA) und enzymgelabeltem Antikörper geformt. Die Detektion erfolgt über die Farbveränderung, die sich aus der Umsetzung von ortho-Phenylendiamin durch das Enzym Peroxidase ergibt. Die Gefahr einer Verfälschung des Messergebnisses durch Proteine aus dem Kulturüberstand ist gering, weil diese Proteine zuvor durch mehrere Waschvorgänge entfernt werden und der gelabelte Antikörper spezifisch an t-PA bindet.

Bei der Affinitätschromatographie hingegen können andere Proteine aus dem Kulturüberstand einen größeren Einfluss auf das Messergebnis haben. Nach einem einzigen Waschschritt (Spülung mit Puffer) wird die Bindung zwischen Antikörper und Antigen durch einen pH-Sprung auf pH 2 gebrochen, das Antigen eluiert und anschliessend detektiert. Kommt es bei der Beladung der Disk zu Bindungen zwischen Antikörpern und weiteren Proteinen, werden diese möglicherweise durch den Spülvorgang nicht entfernt. Das bedeutet, dass diese Proteine beim Elutionsschritt ebenfalls eluiert werden. Dadurch ergibt sich ein erhöhtes Signal bei der Detektion.

Die möglichen Ursachen für diese Bindungen der Proteine an die Affinitätsmatrix werden in mehreren Untersuchungen analysiert. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.3.5.1 Untersuchungen zur Qualität der Antikörper

Die Aktivität der Antikörper, die auf der Disk immobilisiert werden, wird mittels ELISA bestimmt. Dabei werden die Antikörper, die als Affinitätsliganden auf den Disks immobilisiert werden, und die Antikörper, die beim ELISA-Testkit standardmässig verwendet werden, auf einer ELISA-Platte immobilisiert. Als t-PA-Probenmaterial dienen Kultivierungsüberstände. Dadurch ist ein direkter Vergleich der Qualität der eingesetzten Antikörper möglich. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.43 dargestellt. Die Konzentrationsbestimmung im ELISA mit den beiden verschiedenen Antikörpern führt zu vergleichbaren Ergebnissen in der t-PA-Quantifizierung. Es sind demnach keine qualitativen Unterschiede zwischen den Antikörpern, die in der Diskchromatographie verwendet werden, und den Antikörpern, die im käuflichen ELISA-Testkit eingesetzt werden, festzustellen. Somit kann ein Unterschied in der Antikörperqualität als Ursache für die Differenzen zwischen Chromatographie und ELISA ausgeschlossen werden.

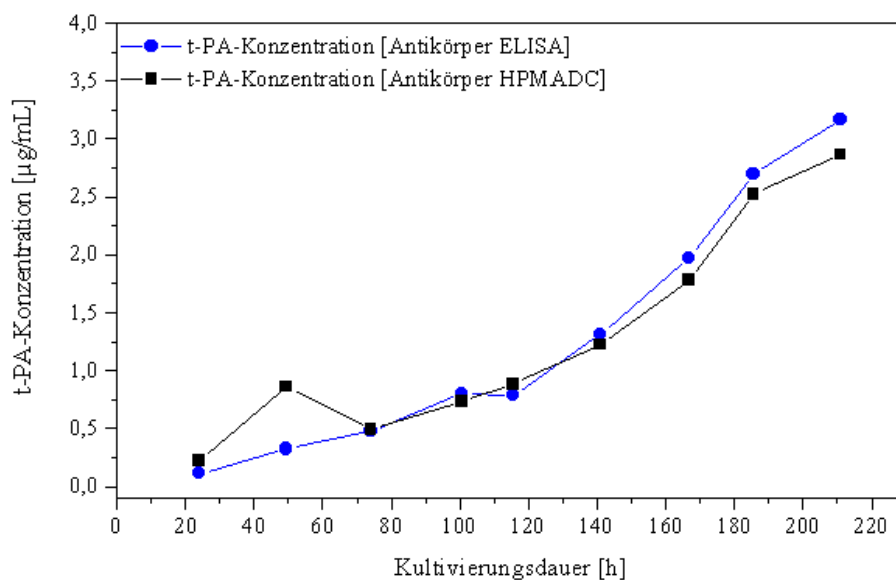


Abb.4.43: Vergleich der Qualität der Antikörper, die bei der HPMADC bzw. bei dem ELISA verwendet werden, in einem ELISA (Messung von t-PA-haltigen Kulturrüberständen der Kultivierung T12hRef31).

4.3.5.2 Verwendung von Spülpuffern mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen

Ein weiterer Grund für die Abweichungen der beiden Analytikmethoden kann die Bindung von Proteinen aus dem Kulturüberstand durch ionische Wechselwirkungen sein. Zur Überprüfung werden Kultivierungsproben zweimal unter unterschiedlichen Bedingungen mit der HPMADC gemessen.

Bei der ersten Messung wird als Spülpuffer 10 mM PBS mit einem Zusatz von 150 mM NaCl und bei der zweiten Messung als Puffer 10 mM PBS mit einem Zusatz von 1000 mM NaCl verwendet. Durch die hohe Salzkonzentration im zweiten Spülpuffer können mögliche ionische Wechselwirkungen zwischen der Matrix und Proteinen aus dem Kulturüberstand vermieden werden. Tabelle 4.3 gibt die Ergebnisse dieser Messungen wieder.

Tab. 4.3: Vergleich der t-PA-Konzentrationen von zwei Kulturproben der Kultivierung T(47)37-32, die mittels HPMADC mit unterschiedlichen Spülpuffern bestimmt wurden.
Spülpuffer 1: 10 mM PBS, 150 mM NaCl, Spülpuffer 2: 10 mM PBS, 1000 mM NaCl.

Kulturprobe	t-PA-Konz. HPMADC (Spülpuffer 1)	t-PA-Konz. HPMADC (Spülpuffer 2)	t-PA-Konz. ELISA
1	9,29 µg/mL	4,56 µg/mL	1,55 µg/mL
2	16,64 µg/mL	9,14 µg/mL	2,59 µg/mL

Die Bestimmung der Konzentrationen der beiden Kulturproben ergibt bei Verwendung von PBS mit 150 mM NaCl als Spülpuffer Werte von 9,29 µg/mL bzw. 16,64 µg/mL. Wird die Kochsalzkonzentration auf 1000 mM/mL erhöht, ergeben sich deutlich geringere t-PA-Konzentrationswerte. Im Vergleich zum ELISA sind aber auch diese Werte noch um mehr als das Dreifache höher als die Referenz. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Fehler in der t-PA-Konzentrationsbestimmung durch HPMADC zumindest zum Teil durch ionische Wechselwirkungen von Proteinen aus dem Kulturüberstand mit der Matrix und / oder den immobilisierten Antikörpern bedingt ist.

4.3.5.3 Einsatz von verschiedenen Matrices

Ob weitere unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der verwendeten Affinitätsmatrix die Abweichungen verursachen, soll in Versuchen mit Flachmembranen unterschiedlicher Hersteller als Matrices geklärt werden.

Die verwendeten Membranen und die jeweiligen Eigenschaften sind in Tab. 3.3 (S. 30) aufgeführt. Zuerst werden die Antikörper auf den Membranen immobilisiert und

anschliessend die membranaffinitätschromatographischen Messungen von Kulturüberständen durchgeführt. Diese Arbeiten wurden von Frau C. Loa im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt [LOA, C., 2000]. Abbildung 4.44 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit aldehydaktivierten Cellulosemembranen im Vergleich zur Referenzmethode.

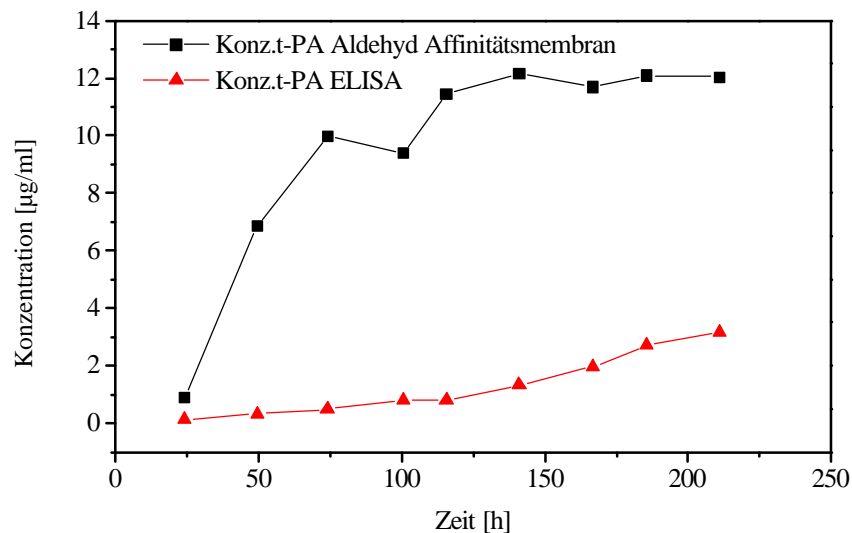


Abb. 4.44: Vergleich der t-PA-Konzentrationen der Kultivierung T12hRef31, die mittels HPMADC (Verwendung einer aldehydaktivierten Cellulosemembran (Aldehyd 1548 SM19306, Sartorius, Deutschland)) und als Referenz mittels ELISA bestimmt wurden [LOA, C., 2000].

Auch bei Verwendung der aldehydaktivierten Affinitätsmembran anstelle der GMA-EDMA Disks ergeben sich bei allen Proben höhere Konzentrationen an t-PA als bei der Referenzmethode. Entsprechende Resultate zeigen die durchgeführten Untersuchungen mit weiteren Membranen. Die Diskrepanzen bei der entwickelten HPMADC-Methode sind demnach nicht durch Verwendung von Membranen mit anderen Beschaffenheiten zu beheben.

4.3.5.4 Analyse der störenden Proteine mittels Gelelektrophorese

Um einen Hinweis über die Größe und Beschaffenheit der verunreinigenden Proteine zu erhalten, die zusammen mit dem t-PA bei der Affinitätsdiskchromatographie eluieren, werden die Elutionspeaks bei der Aufreinigung von t-PA aus Kulturüberständen gesammelt und deren Zusammensetzung mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Abb. 4.45).

Das abgebildete Gel zeigt, dass t-PA durch die Affinitätschromatographie im Vergleich zum unbehandelten Kulturüberstand (Spur 3) stark aufkonzentriert wird (Spur4), jedoch werden schwerere Proteine nicht abgetrennt. Die Größen der im Eluat enthaltenen Proteine sind:

66,9 kDa (t-PA), 84,7 kDa, 104,7 kDa und 126,7 kDa. Eine genauere Charakterisierung dieser Proteine ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

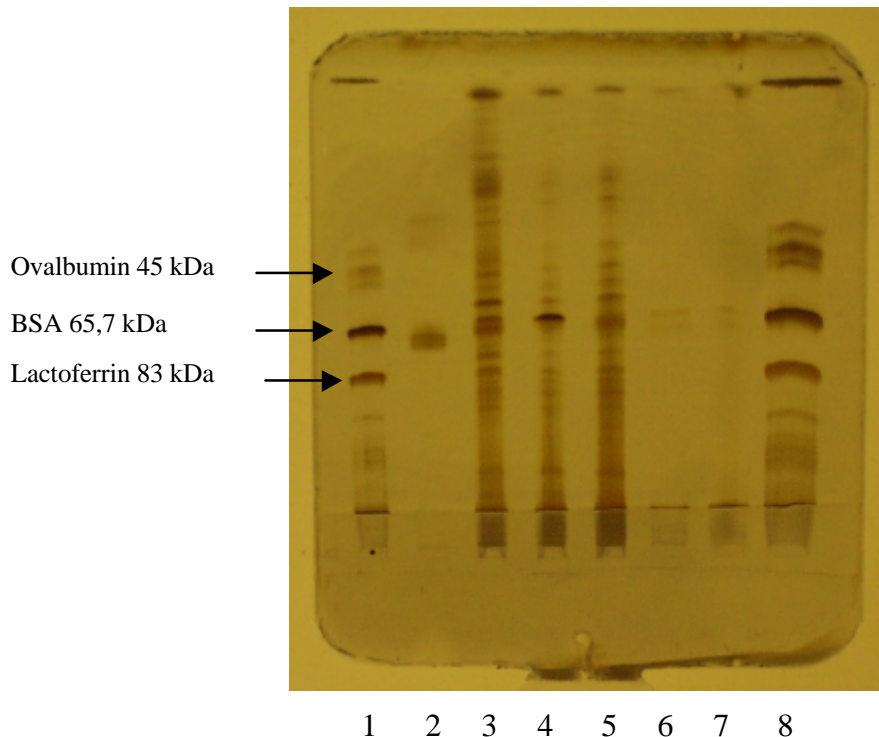


Abb. 4.45: SDS-PAGE von verschiedenen t-PA-haltigen Lösungen zum Vergleich von unbehandelten und affinitätschromatographisch analysierten Kulturüberständen.
Spurenbelegungen: 1: Proteingrößenmarker, 2: t-PA-Standardmaterial (Boehringer Ingelheim), 3: unbehandelter Kulturüberstand, 4 - 7: affinitätschromatographisch analysierte Kulturüberstände in verschiedenen Konzentrationen, 8: Proteingrößenmarker

Die Entwicklung einer schnellen t-PA-Analytik aus Kulturüberständen durch HPMADC stand in diesen Kapiteln im Mittelpunkt. Durch Immobilisierung verschiedener Liganden wie monoklonaler Antikörper gegen t-PA, Plasminogen und Polylysin konnten Affinitätsdisks hergestellt werden, die sehr gut zur Analytik und Aufreinigung von t-PA aus Kulturüberständen geeignet sein sollten. Nach Optimierung der Analysenbedingungen stellte sich jedoch heraus, dass bei der t-PA-Bestimmung in Kulturüberständen zu hohe Werte für die t-PA-Konzentration im Vergleich zur Referenzmethode, dem ELISA, detektiert werden. Genauere Untersuchungen der einzelnen Parameter der HPMADC zeigten, dass die Diskrepanzen zwischen HPMADC und ELISA zum einen auf ionische Wechselwirkungen und zum anderen auf unspezifische Bindungen von Proteinen aus dem Kulturüberstand mit den Affinitätsmatrices beruhen.

4.3.6 Entwicklung einer t-PA-Analytik mittels Kationenaustauschdiskchromatographie

Aufgrund der aufgetretenen Problematik bei der t-PA-Analytik mittels HPMADC werden als Alternative zu den Affinitätsdisks Kationenaustauscherdisks eingesetzt. In diesem Kapitel wird die Entwicklung einer t-PA-Analytik mit Disks, die auf der Oberfläche anionische Sulfonsäuregruppen (CIM-SO₃) tragen, beschrieben. Weiterhin soll überprüft werden, ob eine t-PA-Analytik der Kulturüberstände mit Kationenaustauscherdisks bessere Ergebnisse mit guter Korrelation zum ELISA liefert.

In Vorversuchen wird das pH-Optimum für die Bindung von t-PA an die Kationenaustauscherdisk ermittelt. Der günstigste pH-Wert für die Bindung und Elution des t-PAs liegt bei 7,2. In einem weiteren Vorversuch wird die Salzkonzentration ermittelt, die für die Gradientenelution des t-PA bei einem pH-Wert von 7,2 notwendig ist. Im Anhang 7.5 sind die optimierten Pufferzusammensetzungen und die chromatographischen Bedingungen zur t-PA Analytik mittels Kationenaustauscherdisks aufgeführt.

Abbildung 4.46 zeigt ein Kalibrationsprofil mit t-PA-Standards, die im Nährmedium für CHO-Zellen angesetzt sind. Bei Auswertung der t-PA-Peaks über die Signalthöhe beträgt der Regressionskoeffizient der Kalibrationsgeraden 0,9976.

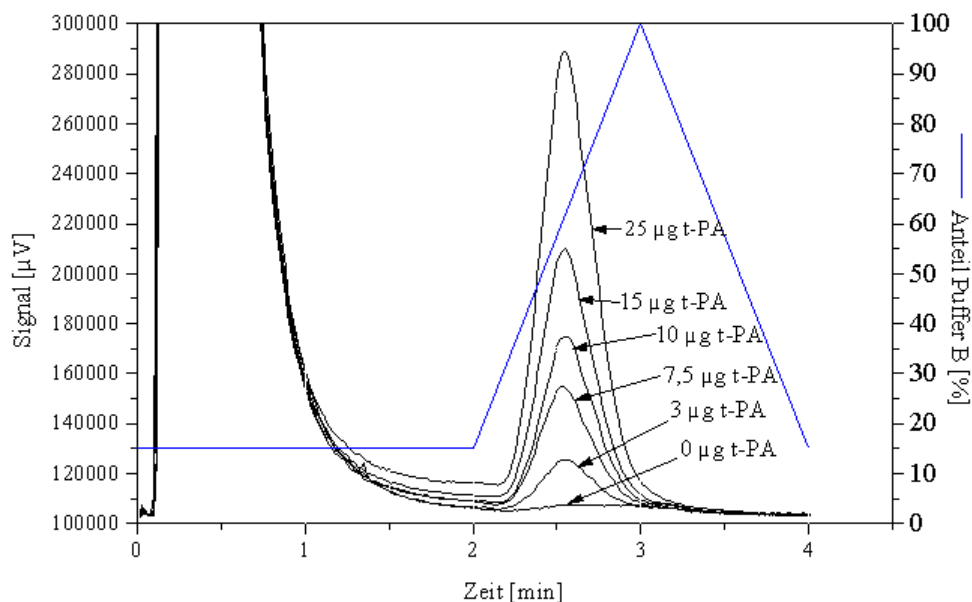


Abb. 4.46: Kalibrationsprofil der entwickelten Kationenaustauschdiskchromatographiemethode zur t-PA-Analytik. Die t-PA-Standardlösungen sind im Nährmedium für CHO-Zellen angesetzt. Die blaue Linie gibt das Elutionsprofil an. Chromatographie-Bedingungen: Puffer A: Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2; 150 mM NaCl), Puffer B: Puffer A + 1000mM NaCl, Flussrate: 4 mL/min, Probenschleife: 1000µL.

Die folgende Graphik zeigt den Vergleich von t-PA-Konzentrationen aus Kultivierungsproben, die zum einen über Kationenaustauscher-HPDC und zum anderen mittels ELISA bestimmt wurden. Auch bei dieser Methode zur Bestimmung der t-PA-Konzentration sind erheblich höhere Werte im Vergleich zum ELISA festzustellen. Die Abweichungen liegen etwa in dem Bereich, der auch schon für die HPMADC-Methode gefunden wurde.

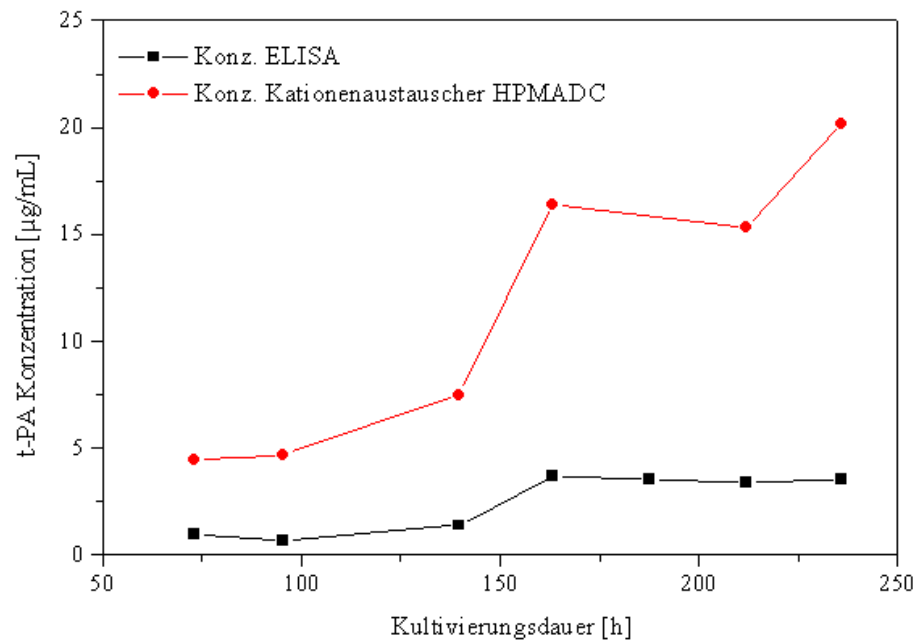


Abb. 4.47: Vergleich der t-PA-Konzentrationen der Kultivierung T(74)37-31, die mittels Kationenaustauscher-HPDC und als Referenz mittels ELISA bestimmt wurden.

Zusätzlich wird auch hier die Zusammensetzung des Eluates durch SDS-PAGE analysiert. Wie in Abbildung 4.48 zu erkennen ist, eluieren mit dem t-PA, das eine Größe von 68 kDa hat, noch weitere Proteine, die aber im Gegensatz zu den miteluierten Proteinen in der HPMADC kleinere Molmassen besitzen. Es werden demnach bei diesen beiden Methoden unterschiedliche Proteine gebunden und mit dem t-PA eluiert. Daraus lässt sich schliessen, dass die verunreinigenden Proteine in der HPMADC an die Antikörper und in der Kationenaustauscher-HPDC an die Sulfonsäuregruppen binden. Eine Bindung der Proteine an das Diskmaterial kann deshalb weitestgehend ausgeschlossen werden.

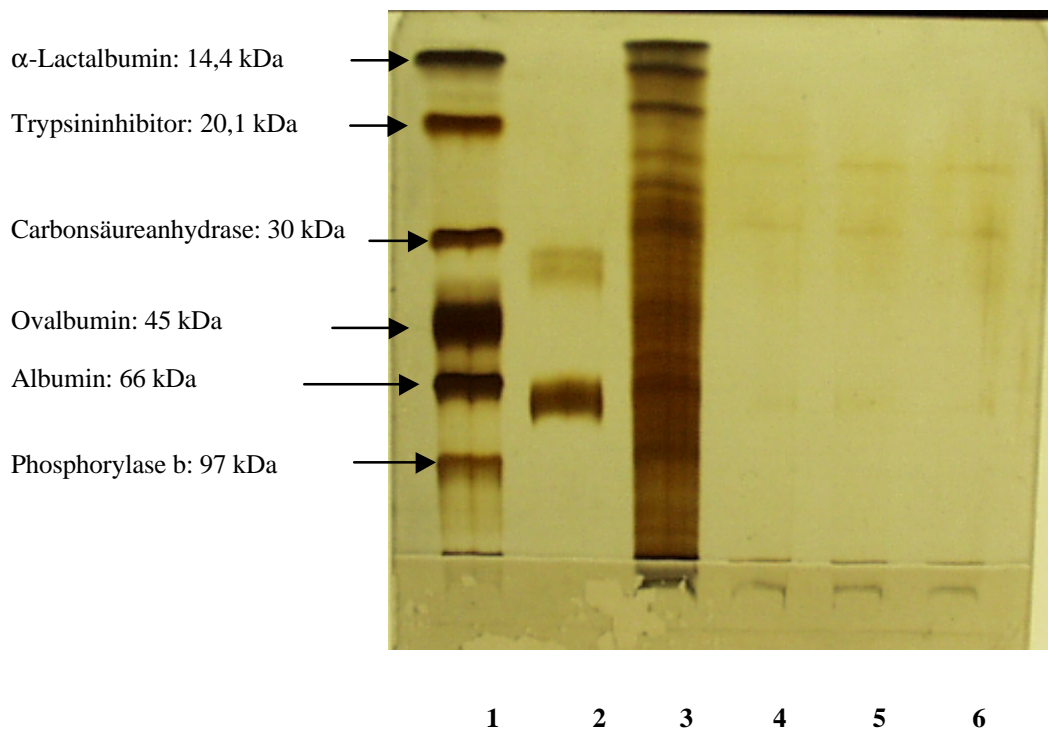


Abb.4.48: SDS-PAGE von verschiedenen t-PA-haltigen Lösungen zum Vergleich von unbehandelten und mittels Kationenaustausch-HPDC analysierten Kulturüberständen.
Spurenbelegungen: 1: Proteingrößenmarker, 2: t-PA-Standardmaterial (Boehringer Ingelheim), 3: unbehandelter Kulturüberstand, 4 - 6: chromatographisch analysierte Kulturüberstände in verschiedenen Konzentrationen.

Um die entwickelten chromatographischen Methoden zur Analytik von t-PA einsetzen zu können, sind weitere Optimierungen in Bezug auf die Trennleistung notwendig. Die Problematik der Proteinbindung an Liganden könnte durch andere Pufferzusammensetzungen und verbesserte Spülmethode behoben werden. Auch der Einsatz von anderen Ligandensystemen, durch die weniger unspezifische Bindungen mit Proteinen vermieden werden, ist möglich.

Aufgrund der Vorteile, die eine diskchromatographische Methode bietet, wie die Robustheit bei gleichzeitig geringen Analysezeiten, wird die Methodenentwicklung zur diskchromatographischen t-PA-Analytik in einem DFG-Folgeprojekt weitergeführt.

4.4 t-PA-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Als mögliche Alternative zur flüssigchromatographischen Analytik von t-PA bietet sich die optische Methode der Fluoreszenzspektroskopie. Der Vorteil dieser Methode ist die nicht-invasive Messung, die online ausgeführt werden kann, ohne dass ein Kontaminationsrisiko besteht.

Die Kultivierung von t-PA-produzierenden CHO-Zellen wird fluoreszenzspektroskopisch mit einem Hitachi F-4500-Spektrometer verfolgt. Ein 2D-Fluoreszenzspektrum dieser Kultivierung ist in Abbildung 4.49 dargestellt.

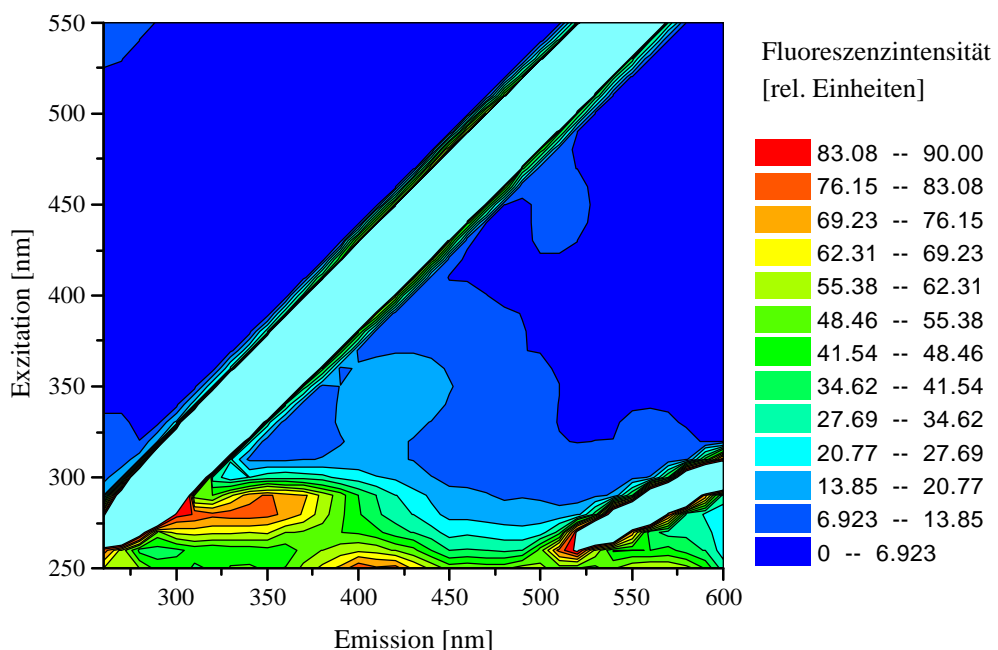


Abb. 4.49: Online-gemessenes Fluoreszenzspektrum der Kultivierung F1 (105. Stunde).

Da die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin fluoreszieren, ist eine direkte Korrelation der Fluoreszenzintensitäten mit den Konzentrationen dieser Aminosäuren und dem Gesamtproteingehalt unter bestimmten Bedingungen möglich. Wird die Fluoreszenz der Aminosäuren durch andere Fluorophore überlagert, ist eine chemometrische Auswertung der Fluoreszenzspektren notwendig.

Unter Einsatz von chemometrischen Modellen sind auch Vorhersagen für nichtfluoreszierende Medienbestandteile möglich. So konnte für das Substrat Glucose die Konzentrationsänderung während einer Kultivierung von CHO-Zellen berechnet werden [BOEHL, 2000].

Abbildung 4.50 zeigt die offline ermittelten Werte der Lebendzellzahlen und die t-PA-Konzentration während der Kultivierung F1.

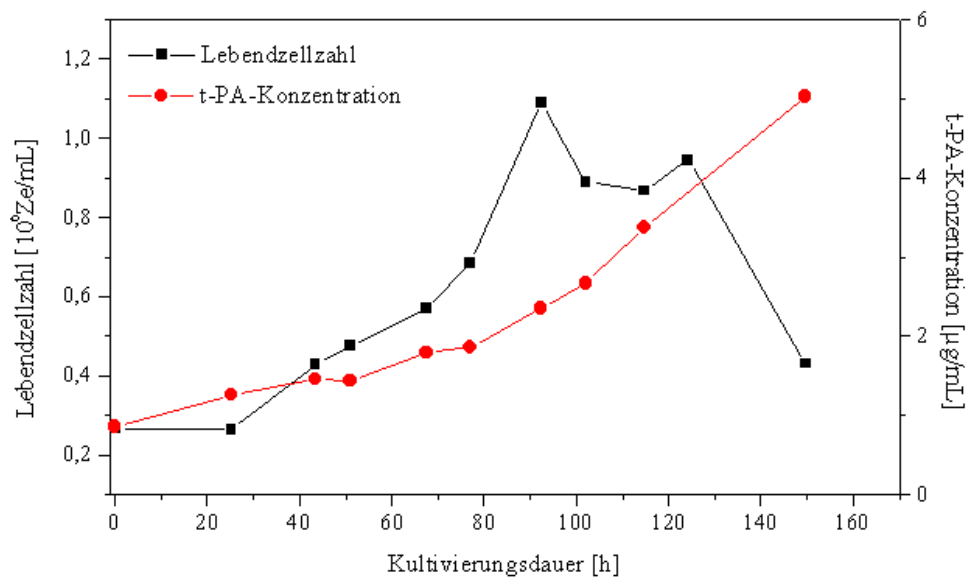


Abb. 4.50: Lebendzellzahlen und die mittels ELISA bestimmte t-PA-Konzentrationen während der Kultivierung F1.

Nach 24-stündiger lag-Phase steigt die Lebendzellzahl der Kultivierung F1 während der exponentiellen Wachstumsphase bis auf einen Wert von $1,1 \cdot 10^6$ Ze/ml an (92. Stunde). Danach bleibt sie bis zur 125. Stunde auf einem Wert von $1,0 \cdot 10^6$ Ze/mL bevor die Absterbephase beginnt. Die t-PA-Konzentration steigt von Beginn der Kultivierung bis zur 100. Stunde zunächst nur schwach bis auf einen Wert $2,2 \mu\text{g/mL}$. In der stationären Wachstumsphase der Zellen erfolgt dann jedoch ein stärkerer Anstieg bis auf einen Endwert von $5 \mu\text{g/mL}$.

Unter Verwendung der mittels ELISA analysierten t-PA-Konzentrationen der Kultivierung F1 und der Daten der zeitlich entsprechenden Fluoreszenzspektren wird über eine Kalibrierung ein PLS1-Modell für die Vorhersage der t-PA-Konzentrationen berechnet [BOEHL, 2000]. Über dieses chemometrische Modell werden aus den Daten der Fluoreszenzspektren, die in zeitlichen Abständen von 20 Minuten aufgenommen wurden, die t-PA-Konzentrationen berechnet. Die vorhergesagten Konzentrationen sind in Abbildung 4.51 dargestellt. Zum Vergleich sind die t-PA-Konzentrationen, die mittels ELISA bestimmt wurden, ebenfalls aufgetragen.

Der Verlauf der t-PA-Konzentration während der gesamten Kultivierung wird durch die Kalibrierung gut wiedergegeben. Der geringe Fehler der Kalibrierung (RMSEC) von $0,11 \text{ mg/L}$ ist vielversprechend im Hinblick auf die Vorhersage der t-PA-Konzentrationen in weiteren Kultivierungen.

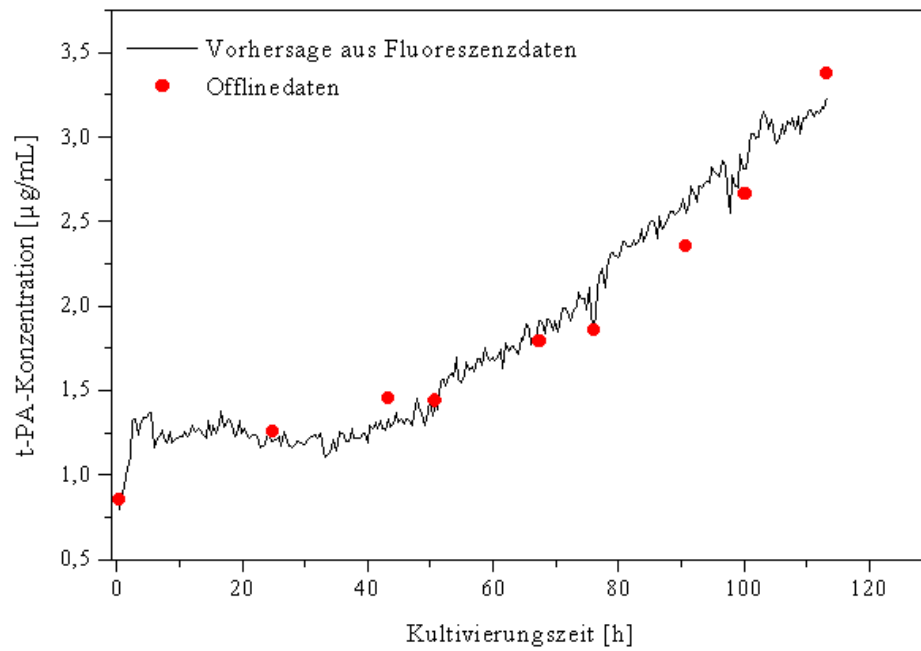


Abb.4.51: Aus Fluoreszenzspektren vorhergesagte t-PA-Konzentrationen und die mittels ELISA offline bestimmten Konzentrationen während der Kultivierung F1 [BOEHL A), 2000].

5 Zusammenfassung und Ausblick

Um die Produktion vieler therapeutisch wirksamer Proteine durch Tierzellkultivierungen rentabel durchführen zu können, müssen die einzelnen Produktionsprozesse optimiert sein.

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Produktausbeute durch Optimierung der Kultivierungstemperatur bei t-PA-produzierenden CHO-Zellen sowie die Etablierung einer Onlineanalytik von t-PA.

Die normale Kultivierungstemperatur von tierischen Zellen ist 37 °C. Bereits mehrere Forscher konnten zeigen, dass eine Absenkung der Kultivierungstemperatur positive Einflüsse auf das Produktionsverhalten von tierischen Zellen hat [WEIDEMANN, 1994; RÖSSLER, 1996; RENEMANN, 1997]. Versuche mit der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten CHO-Zelllinie zeigten, dass in Batchkultivierungen unterhalb von 33 °C nur noch lineares Wachstum erfolgt. Das Produktionsverhalten ist in diesem Temperaturbereich jedoch stark erhöht [LOA, A., 1997]. Diese Tendenz konnte in Kultivierungsversuchen bei 32 °C und 31 °C zu Beginn dieser Arbeit bestätigt werden. Bei der Kultivierung, die bei 31 °C gehalten wurde, erfolgte nur noch lineares Wachstum, es wurde aber gleichzeitig die höchste Produktausbeute erzielt. Ziel der weiteren Untersuchungen war es, durch Temperaturwechsel während der Kultivierungen die Produktausbeute zu optimieren. Zunächst erfolgte das Anwachsen der CHO-Zellen bei einer Temperatur von 37 °C, die ein schnelles Wachstum gewährleisten sollte. War eine hohe Zelldichte erreicht, sollte durch das Absenken der Kultivierungstemperatur eine hohe Produktivität erzielt werden.

Nach dem Anwachsen der Zellen bei 37 °C bzw. 33 °C wurde in mehreren Versuchsreihen die Kultivierungstemperatur zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase auf 31 °C abgesenkt. Bei diesen Temperaturshiftexperimente konnte der Verbrauch an Nährstoffen im Vergleich zur Referenzkultivierung von 37 °C deutlich gesenkt und eine höhere Produktausbeute erzielt werden. Ausserdem konnte die Produktion des in hohen Konzentrationen toxischen Lactats vermindert werden. Ein Vergleich der Ausbeuten der Kulturen, bei denen die Temperatur zu verschiedenen Zeitpunkten gesenkt wurde, ergab, dass die Produktion von t-PA umso höher ist, je eher die Temperaturabsenkung erfolgt. Die erzielten Produktivitätssteigerungen lagen jedoch bei allen Kultivierungen mit

Temperaturshifts unter den Produktausbeuten der Kulturen, die die gesamte Zeit bei 31 °C kultiviert wurden.

Auffallend ist, dass die t-PA-Produktion der Kulturen bei 31 °C zu Beginn vergleichsweise niedrig ist. Erst nach etwa 100 Stunden Kultivierungsdauer erfolgt ein exponentieller Anstieg der t-PA-Konzentration. Dieser Anstieg ist auch bei Kulturen zu beobachten, bei denen in der frühen exponentiellen Phase die Kultivierungstemperaturen von 37 °C auf 31 °C abgesenkt werden. Erfolgt die Temperaturabsenkung später, so ist dieser ausgeprägte Anstieg nicht mehr erkennbar.

In weiteren Versuchsreihen wurden die Auswirkungen von periodischen Temperaturwechseln zwischen 37 °C und 31 °C im Abstand von 12 und 24 Stunden auf das Wachstum und den Stoffwechsel der CHO-Zellen untersucht. Die Kultivierungen mit 12-stündigem Temperaturwechsel zeigten vergleichbares Zellwachstum und Nährstoffverbrauch wie die Referenzkultivierung bei 37 °C. Die gebildete Produktkonzentration hingegen lag genau zwischen den Konzentrationen, die bei 37 °C-Kulturen und der 31 °C-Kulturen gebildet wurden. Bei der Kultivierung mit 24-stündigem Temperaturwechsel war das Wachstum und das Stoffwechselverhalten vergleichbar mit dem der Kultur, die bei 31 °C kultiviert wurde. Die t-PA-Konzentrationen lagen wiederum zwischen den Konzentrationen der beiden Vergleichskulturen. Die Bestimmung der Zellzyklusphasen ergab, dass die Zellen umso mehr t-PA produzieren, je höher der Anteil der Zellen ist, die sich in der S-Phase befinden. Bei Kulturen, die durchgehend bei 31 °C kultiviert wurden, nahm der S-Phasenanteil kontinuierlich mit fortschreitender Kultivierungszeit zu. Dahingegen sank der Anteil der Zellen in der S-Phase im Verlauf von Kultivierungen, die bei höheren Temperaturen geführt wurden. Bei der Kultivierung mit 24-stündigem Temperaturwechsel stellten sich im Verlauf der Kultivierung der S-Phasenanteil und der G2/M-Phasenanteil so ein, dass im täglichen Wechsel die S-Phase bzw. die G2/M-Phase ein Maximum bzw. Minimum durchliefen. Bei dieser Kultivierung wurde eine Synchronisation des Zellwachstums erreicht.

Mit den untersuchten Kultivierungsstrategien konnte keine Optimierung der t-PA-Produktion erreicht werden. Im Hinblick auf eine hohe Produktausbeute sollten die Kultivierungen bei einer konstanten Temperatur von 31 °C durchgeführt werden.

Um eine Onlineanalytik realisieren zu können, müssen die Proben online unter sterilen Bedingungen aus dem Bioreaktor entnommen werden. Zwei kommerziell erhältliche Probenahmesysteme wurden auf ihre Anwendbarkeit zur Probenahme aus Tierzellkulturen und nachfolgender Proteinanalytik untersucht. Zum einen wurde die Eppendorf-sterile-inline-

Probenahmesonde eingesetzt. Hierbei wurde eine neuartige tubuläre Membran getestet, die die Adsorption von Proteinen weitestgehend vermeiden soll. Mit t-PA-Standardlösungen, die durch die Membran gepumpt wurden, zeigte sich jedoch, dass fast die gesamte Proteinmenge an der Membran haften blieb, so dass dieses System nicht für die Probenahme aus Tierzellkulturen mit anschließender Proteinanalytik eingesetzt werden kann.

Als zweites Probenahmesystem wurde die Probenahmesonde ProcessTrace getestet. Dieses System basiert auf Dialyse des zu analysierenden Stoffes durch eine Membran in einen Dialysepuffer. Das System wird bereits mit entsprechenden Dialysemembranen für die Glucoseanalytik eingesetzt. Ziel war es, dieses Prinzip der Probenahme auch auf größere Moleküle, wie z.B. Proteine auszudehnen. Dazu wurden verschiedene Membranen mit unterschiedlichen Eigenschaften in die Sonde eingesetzt und Probenahmen mit t-PA-Standardlösungen simuliert. Bei keiner der Membranen konnte eine ausreichende Dialyse des Proteins in den Dialysepuffer festgestellt werden (nach mehreren Stunden war jeweils nur ein geringer Anteil des t-PA in den Puffer dialysiert). Deshalb konnte auch das System zur Probenahme nicht für diese Anwendung verwendet werden.

Sowohl bei dem ESIP-Modul als auch bei der Dialysesonde fungieren die Membranen, die einen Porendurchmesser von weniger als $0,2\ \mu\text{m}$ haben, als Sterilbarriere zwischen dem Reaktor und der Umgebung. Aufgrund dieser geringen Porengröße besteht die Gefahr, dass die Membranen innerhalb kurzer Zeit verblocken. Daher wurde bei der Entwicklung einer alternativen Methode zur Probenahme auf eine Membran als Sterilbarriere verzichtet. Statt dessen wurde eine Bakterienfalle, die normalerweise zur Offlineprobenahme aus Bioreaktoren eingesetzt wird, so umgebaut, dass sie zur Onlineprobenahme verwendet werden kann. Diese Bakterienfalle kann nach jeder Probenahme mit Desinfektionsmitteln sterilisiert werden. Die Zellabtrennung wurde in der Art gelöst, dass zur Vorfiltration ein Spinfilter der Firma B. Braun eingesetzt wurde. Auf diese Art konnten aus dem Reaktor Proben entnommen und größere Zellaggregate abgetrennt werden. Zur weiteren Abtrennung von Zellen und Zellbruchstücken wurde nach der Sterilbarriere eine weitere Filtereinheit verwendet, in die ein Celluloseacetatfilter eingesetzt wurde. Der Vorteil dieses Systems ist, dass die Filter in der zweiten Filtereinheit während der Kultivierung z.B. bei Verstopfung ausgetauscht werden können und ein sehr geringes Kontaminationsrisiko besteht.

Dieses System wurde bei einer Kultivierung von t-PA-produzierenden CHO-Zellen zur Probenahme verwendet. Bei jeder Probenahme wurden zur Referenz auch Proben auf herkömmliche Weise entnommen. Der Vergleich der t-PA-Konzentrationen, die mittels ELISA bestimmt wurden, zeigte, dass bei den Proben, die über das Probenahmesystem

genommen wurden, die Konzentrationen durchschnittlich um 14 % niedriger als die Referenzwerte waren. Dieser Unterschied ist auf eine Adsorption der Proteine an der Celluloseacetatfiltereinheit zurückzuführen und kann durch Verwendung geeigneter Filtermaterialien ausgeglichen werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit umfaßte die Entwicklung einer Onlineanalytik von t-PA mittels HPMADC (High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography). Zunächst wurden verschiedene Liganden auf Disks immobilisiert und ihre Eignung zur t-PA-Analytik durch Frontalanalyse bestimmt. Die ermittelte Dissoziationskonstante K_{Diss} der Bindung von t-PA an spezifische Antikörper lag in einem für affinitätschromatographische Anwendungen optimalen Bereich (10^{-7} M) und die weitere Entwicklung der Methode erfolgte mit Antikörpern als Affinitätsliganden.

Als optimale chromatographische Bedingungen wurden PBS (pH 7) als Beladungs- und Spülpuffer, HCl (pH 2) als Eluent und eine Flussrate von 4 mL/min ermittelt. Unter diesen Bedingungen konnte eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt werden (durchschnittlicher Variationskoeffizient: 3%). Bei der Analytik von Kultivierungsüberständen ergaben sich dennoch Abweichungen zu Konzentrationswerten, die mittels ELISA bestimmt wurden. Die mittels HPMADC bestimmten Konzentrationen lagen etwa um den Faktor 3-5 höher. Durch weitere Versuche wurde versucht, die Ursache für diese Abweichungen zu ermitteln. Der Einsatz verschiedener Matrices, Untersuchungen zur Qualität der Antikörper und Verwendung eines Spülpuffers mit hoher Salzkonzentration zur Vermeidung von ionischen Wechselwirkungen ergaben jedoch keinen Hinweis auf den Grund der Abweichungen. Bei der Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese zeigte sich, dass vor allem größere Proteine als t-PA (Bereich 80-100 kDa) bei dieser Methode miteluierten. Die parallele Entwicklung einer t-PA-Analytik mittels Kationenaustauschdisks ergab ähnliche hohe Abweichungen zwischen den mittels ELISA und HPDC bestimmten Werten. Die Analytik der miteluierten Proteine mittels Gelelektrophorese zeigte jedoch, dass bei der HPDC kleinere Proteine (Bereich 20-40 kDa) auf den Disks gebunden werden. Folglich sind die Abweichungen zwischen der Referenzmethode und HPMADC bzw. HPDC auf unspezifische Bindungen der Affinitätsdisk mit Proteinen aus dem Kulturüberstand zurückzuführen. Somit war durch die beiden chromatographischen Methoden zwar eine Aufkonzentrierung von t-PA möglich, eine quantitative Bestimmung von t-PA aus Tierzellkultivierungen konnte jedoch nicht erreicht werden.

In einem alternativen Ansatz zur chromatographischen Bestimmung von t-PA wurde eine optische Methode eingesetzt. Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht nicht-invasive Onlinemessungen am Bioprozess. Bei einer Kultivierung von CHO-Zellen wurde ein Fluoreszenzspektrometer an den Edelstahlreaktor gekoppelt und während der Kultivierung wurden im 15-minütigen Rhythmus Fluoreszenzspektren aufgenommen. Durch chemometrische Auswertung konnte eine sehr gute Kalibrierung der Referenzwerte (ELISA) und der Fluoreszenzdaten erreicht werden. Durch weitere Verbesserung des chemometrischen Modells sollte in der Zukunft eine Onlineanalytik der t-PA-Konzentrationen durch Fluoreszenzspektroskopie möglich sein.

6 Literaturverzeichnis

ABOUH-REBYEH, H.; KÖRBER, F.; SCHUBERT-REBERG, K.; Carrier membrane as a stationary phase for affinity chromatography and kinetic studies of membrane-bound enzymes. *Journal of Chromatography* 566: 341-350, 1991

ACTIP, The Animal Cell Technology Industrial Platform; Beneficial effects of animal cell technology. Internetveröffentlichung: www.actip.org/manuals/animalcelltech.html, 1998

BERRUEX, L. G.; FREITAG, R.; TENNIKOVA, T. B.; Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in High Performance Monolith Affinity Chromatography. *J. Pharm. Biochem. Analysis*, 2000, accepted for publication.

BEYER, K.; REINECKE, M.; NOE, W.; SCHEPER, T.; Immunobased elution assay for process control, *Analytica Chimica Acta* 309: 301-305, 1995

BLOEMKOLK, J.W.; GRAY, M.R.; MERCHANT, F.; MOSMANN, T.R.; Effect of temperature on hybridoma cell cycle and mAb production, *Biotechnology and Bioengineering* 42: 427-431, 1992

BOEHL, D.; SOLLE, D.; TOUSSAINT, H.-J.; MENGE, M.; RENEMANN, G.; LINDEMANN, C., HITZMANN; B.; SCHEPER, T.; Application of fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring and control, *Proc. SPIE*, Boston, 2000

BOEHL A), D; laufende Dissertation, 2000

BRIEFS K.-G.; KULA M.-R.; Fast chromatography on analytical and preparative scale using modified microporous membranes, *Chemical Engineering Science* 47: 141, 1992

BUCH, T.; Dissertation, Universität Hannover, 1997

DELLWEG, H.W.; *Biotechnologie verständlich*, Springer, 1994

FENGE, C.; FRAUNE, E.; FREITAG, R.; SCHEPER, T.; SCHÜGERL, K.; On line monitoring of monoclonal antibody formation in high density perfusion culture using FIA, *Cytotechnology* 6: 55-63, 1991

FREITAG, R.; SCHEPER, T.; SCHÜGERL, K.; Development of a turbidimetric immunoassay for on line monitoring of proteins in cultivation processes, *Enzyme Microb. Technol.* 13: 969-975, 1991

FURUKAWA, K.; OHSUYE, K.; Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme, *Cytotechnology* 26: 153-164, 1998

GOTTWALD, HPLC für Anwender, VCH, 1992

GRAF, H; Dissertation Universität Hannover, 1989.

HUANG S.H.; ROY S.; HOU K.C.; TSAO G.T.; Scaling-up of affinity chromatography by radial-flow cartridges, *Biotechnology Progress* 4: 159, 1988

JENKINS, N.; HOVEY, A. Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese Hamster Ovary cells synthesizing a recombinant protein, *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 1029-1036, 1993

JOSIC D., LIM Y., STRANCAR A., REUTTER W.; Application of High Performance Chromatography for separation of annexins from the plasma membranes of liver and isolation of monospecific polyclonal antibodies, *Journal of Chromatography B*, 662: 217-226, 1994

JOSIC D., SCHWINN H., STRANCAR A., PODGORNİK A., BARUT M., LIM Y., VODOPIVEC M.; Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses. *Journal of Chromatography A* 803: 61-71, 1998

KASPER C., MERINGOVA L., FREITAG R., TENNIKOVA T., Fast isolation of protein receptors from streptococci G by means of macroporous affinity discs. In: *Journal of Chromatography A*, 798: 65-72, 1998

KAUFMANN, H., MAZUR, X., FUSSENEGGER, M., BAILEY, J. E.; Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, No. 5: 573-582, 1998

KRAUSE S.; KRONER K.H.; DECKWER W.-D.; Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regard to protein purification. *Biotechnology Techniques* 5: 199, 1991.

KRONER, K.H.; STACH, W.; KUHLMANN, W. Kontinuierliches Probenahmeverfahren für die Bioprozessanalytik. *Chemie Technik* 15: 7, 1986

KUHLMANN, W.: Optimisation of an membrane oxygenation system for all cell culture in stirred tank reactors. *Develop. Biol. Standard* 66: 263-268, 1987

KURANO, N.; LEIST, C.; MESSI, F.; KURANO, S.; FIECHTER, A.; Growth behavior of chinese hamster ovary cells in a compact loop bioreactor. effects of physical and chemical environments. *J. Biotechnol.* 15 S. 101-112, 1990

LANGLOTZ P.; KRONER K.H.; Surface-modified membranes as a matrix for protein purification. *Journal of Chromatography* 591: 107, 1992.

LIU, H.; FRIED, J. R.; Breakthrough of lysozyme through an affinity membrane of cellulose-cibacron blue. Separations (AIChE Journal) 40 (1): 40-49, 1994

LOA, A.; Dissertation, Universität Hannover, 2000

LOA, A.; Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1997

LOA, C.; Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 2000

LOTTSPEICH, F. ZORBAS, H. Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998

LÜTKEMEYER D., BRETTSCHEIDER M., BÜNTEMEYER H., LEHMANN J., Membrane chromatography for rapid purification of recombinant Antithrombin III and monoclonal antibodies from cell culture supernatant. Journal of Chromatography 639: 57-66, 1993

MERTEN, O.W.; REITER, S.; KATINGER, H.; Stabilizing effect of reduced cultivation temperature on human x mouse hybridomas. Developments in Biological Standardization 60: 509-512, 1985

MOORE, A.; MERCER, J.; DUTINA, G.; DONAHUE, C.J.; BAUER, K.D.; MATHER, J.P.; ETCHEVERRY, T.; RYLL, T.; Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in cho cell batch cultures, Cytotechnology, 23, S.47-54, 1997

NACHMAN, M.; Kinetic aspects of membrane-based immunoaffinity chromatography. Journal of Chromatography 597: 167-172, 1992

NACHMAN, M.; AZAD A. R. M.; BAILON P.; Efficient recovery of recombinant proteins using membrane-based immunoaffinity chromatography (MIC). Biotechnology and Bioengineering 40: 564-571, 1992

PLATONOVA, G. unpublizierte Daten zur Immobilisierung von Polylysin und Lysin auf GMA-EDMA-Disks, St. Petersburg, 1999

PRENTIS, S.; Technik des Lebendigen: Biotechnologie : eine neue industrielle Revolution Verlagsgesellschaft 1987. - 264 S.

REINECKE, M.; SCHEPER, T. Fast on-line flow injection analysis system for igg monitoring in bioprocesses. Journal of Biotechnology 59: 145-153, 1997

RENEMANN, G.; Diplomarbeit, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, 1997

REUVENY, S., KIM, Y.J., KEMP, C.W., SHILOACH J.; Effect of temperature and oxygen on cell growth and recombinant protein production in insect cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 619-623, 1993

REUVENY, S.; VELEZ, D.; MACMILLAN, J.D.; MILLER, L.; Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of Immunological Methods* 86: 53-59, 1986

RÖSSLER, B.; LÜBBEN, H.; KRETZMER, G.; Temperature: a simple parameter for process optimization in fed-batch cultures of recombinant chinese hamster ovary cells. *Enzyme and Microbiol Technology* 18: 423-427 (1996),

SCHULZE, B.; MIDDENDORF, C.; REINECKE, M.; SCHEPER, T.; NOÉ, W.; HOWALDT, M.; Automated immunoanalysis systems for monitoring mammalian cell cultivation processes. *Cytotechnology* 15: 259-269, 1994

STRANCAR A., KOSELJ P., SCHWINN H., JOSIC D.; Application of compact porous disks for fast separations of biopolymers and in-process control in biotechnology. *Analytical Chemistry* 68: 3483, 1996

SUBRAMAINAN; in: *Affinity chromatography : Methods and protocols* / ed. by Pascal Bailon - Totowa, NJ : Humana Press, 2000

SURESHKUMAR, G.K.; MUTHARASAN, R.; The influence of temperature on a mouse-mouse hybridoma growth and monoclonal antibody production. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 292-295, 1991

SUZUKI, E., OLLIS, D.F.; Enhanced antibody production at slowed growth rates: experimental demonstration and a simple structured model. *Biotechnology Progress* 6: 231-236, 1990

TAKAGI, M.; UEDA, K; Comparison of the optimal culture conditions for cell growth and tissue plasminogen activator production by human embryo lung cells on microcarriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 565-570, 1994

TREVAN, M.D.; *Biotechnologie: Die biologischen Grundlagen*. Springer Verlag, 1993

TENNIKOVA, T.B.; BELENKII, B.G.; SVEC, F.; High Performance Membrane Chromatography. a novel method of protein separation. *journal of liquid chromatography*, 13(1): 63-70, 1990

TENNIKOVA, T.B; SVEC, F.; High Performance Membrane Chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed phase modes. *Journal of Chromatography* 646, 279-288, 1993

TENNIKOVA, T.B; interne Labormitteilung, 1999

TENNIKOVA, T.B.; FREITAG, R.; An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography. *Journal High Resolution Chromatography* 23 (1), 27-38, 2000

TENNIKOVA T. B., BELENKII B. G., SVEC F., High Performance Membrane Chromatography. a novel method of protein separation. *Journal of Liquid Chromatography*, 13 (1), 63-70, 1990

UNARSKA M.; DAVIES P.A.; ESMOUF M.P.; BELLHOUSE B.J.; Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems. *Journal of Chromatography*, 519: 53-67, 1991

WEIDEMANN, R.; LUDWIG, A.; KRETZMER, K.; Low temperature- a step towards process optimisation. *Cytotechnology* 15: 111-116, 1994

WENTZ, D; Dissertation, Universität Hannover, 1988

7 Anhang

7.1 Durchführung des ELISA (Testkit Imulyse™ tPA)

1. Ansetzen des Coating-Puffers (Puffer zur Immobilisierung von Antikörpern auf Mikrotiterplatten): 0,21 g NaHCO₃ werden in 25 mL Wasser (bidest) gelöst.
2. Herstellung der Coating-Lösung: 250 µL „Coat“ (Antikörperkonzentrat) werden auf 25 mL mit Coating-Puffer aufgefüllt.
3. „Coating“: zur Immobilisierung der t-PA-Antikörper werden je 200 µL Coating-Lösung mit einer 8 Kanal-Pipette in jede Kavität gefüllt.
4. Inkubieren: Die mit Coating-Lösung befüllte Platte wird abgedeckt und 16-18 h bei RT inkubiert.
5. Waschen: Nach erfolgter Inkubation wird die Platte auf einem Fliesspapier ausgeschlagen und 4 mal gewaschen. Das Waschen erfolgt derart, dass jede Kavität mit 400 µL PET-Puffer befüllt, 3 Minuten gewartet und die Platte kräftig auf einem Papier ausgeschlagen wird.
6. Ansetzen der t-PA-Standardlösungen: 15 µL des t-PA-Standards wird mit PET-Puffer auf 500 µL zur t-PA-Ausgangslösung verdünnt. Tabelle 7.1 gibt die weiteren Verdünnungen der benötigten t-PA-Standardlösungen an.

Tab. 7.1: t-PA-Standardlösungen.

t-PA-Konzentrationen der Standardlösungen	Volumen t-PA-Ausgangslösung [µL]	Volumen PET-Puffer [µL]
30	100	0
24	80	20
18	60	40
12	40	60
6	20	80
3	10	90
1,5	5	95
0	0	100

7. Proben- und Standardlösungen auftragen: 10 μL Probelösung bzw. Standardlösung werden mit einer Pipette in die Kavitäten pipettiert (Doppelbestimmung).
8. Inkubation: Die Platte wird mit einer Aluminiumfolie abgedeckt und für 3 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.
9. Konjugatzugabe: 40 μL Konjugat-Konzentrat werden zu 8 mL mit PET-Puffer verdünnt. 50 μL der Verdünnung werden in jede Kavität pipettiert.
10. Inkubation: Die Platte wird mit einer Aluminiumfolie abgedeckt und für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert.
11. Waschen: wie unter 5) beschrieben.
12. Substratzugabe: Das Substrat ortho-Phenylendiamin wird zunächst in 3 mL Wasser (bidest) gelöst und dann zu 24 mL verdünnt. Das Substrat sollte 30 Minuten vor Gebrauch gelöst werden. Kurz vor der Substratzugabe werden 10 μL H_2O_2 zugegeben. Jeweils 200 μL dieser Lösung werden mit einer 8 Kanal-Pipette in die Kavitäten pipettiert.
13. Inkubation: 30 Minuten im Dunkeln bei RT.
14. Stoppen der Reaktion und Auswertung: Durch Zugabe von 50 μL 4,5 molarer H_2SO_4 -Lösung wird die Reaktion gestoppt. Nach 10 Minuten (zur Stabilisierung der Farbe) wird bei 495 nm in einem Photometer für Mikrotiterplatten die Extinktion gemessen.

7.2 Immobilisierung von Proteinen auf GMA-EDMA-Disks

[KASPER, 1998]

Vor der Immobilisierung werden die Disks 2 h in Wasser (bidest.) und anschliessend 2 h im Immobilisierungspuffer gelagert.

Durchführung der Immobilisierung:

1. Liganden in Natriumcarbonatpuffer (50 mM, pH 9,3) lösen (Konzentration: 6-8 mg/mL). Zur Immobilisierung werden etwa 1-1,5 mL benötigt.
2. Die Immobilisierung auf den Disks erfolgt in einem kleinen Gefäß bei 30 °C für 16 h.
3. Waschen: Nach der Immobilisierung werden die Disks mit Natriumcarbonatpuffer (50 mM, pH 9,3) gewaschen. Dazu werden die Disks 2 h in den Puffer gelegt.
4. Blockierung noch freier reaktiver Gruppen: Die Disks werden 1 h in eine 1 M Ethanolaminlösung gelegt.
5. Waschen der Disks mit PBS-Puffer: Die Disks werden 1 h in PBS-Puffer (10 mM, 150 mM NaCl, pH7) gelegt.
6. Lagerung der Disk nach erfolgter Immobilisierung: Die Lagerung erfolgt in PBS (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7) mit einem Zusatz von 0,02 % Natriumazid bei +4 °C.

7.3 Immobilisierung von Peptiden auf GMA-EDMA-Disks

[TENNIKOVA, 1999]

Die Immobilisierung erfolgt mit Boratpuffer (6,21 g H₃BO₃, 2 g NaOH, 3,7 g KCl gelöst in 1 L Wasser (bidest)). Die Durchführung der Immobilisierung erfolgt wie unter 7.2 beschrieben.

7.4 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1. Probenbereitung (nicht reduzierende Bedingungen): Die Proben werden mit Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 2 mM EDTA + 5 % SDS + 0,02 % Bromphenolblau) im Verhältnis 1:2 verdünnt, 5 min im Wasserbad gekocht und 2-3 min in einer Eppendorfzentrifuge bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Proben werden dann mit Hilfe eines Applikationskammes auf das vorgefertigte Gel (12,5 %) aufgetragen.
2. Die Trennung der Proteine erfolgt nach den in Tabelle 7.2 angegebenen Bedingungen in der Trennkammer.

Tab. 7.2: Laufbedingungen.

	Sample Applicator Down At		2.2		0 Vh
	Sample Applicator Up At		2.3		0 Vh
Sep 2.1	250 V	10,0 mA	3,0 W	15°C	1 Vh
Sep 2.2	250 V	1,0 mA	3,0 W	15°C	1 Vh
Sep 2.3	250 V	10,0 mA	3,0 W	15°C	70 Vh

3. Entwicklung: Nach der Auftrennung der Proteine in der Trennkammer werden die Gele in die Entwicklungskammer eingesetzt und nach der in Tabelle 7.3 beschriebenen Methode entwickelt. Dazu werden folgende Lösungen und Vorlagen benötigt:

10 % EtOH, 5 % HAc:	50 mL EtOH und 25 mL HAc mischen und auf 500 mL auffüllen
5 % Glutaraldehyd:	2 mL 25 % Glutaraldehyd auf 10 mL auffüllen
95 % EtOH, 5 % HAc:	28,5 mL EtOH und 1,5 mL HAc mischen
1,6 % ige Na ₂ S ₂ O ₃ :	1,76 g Na ₂ S ₂ O ₃ in 110 mL Wasser lösen
0,4 % AgNO ₃ :	0,4 g AgNO ₃ in 100 mL Wasser lösen (Lagerung in einer dunklen Glsflasche)
Vorlage für Fixierpuffer:	0,3 g NaAc abwiegen

2,5 %ige Na ₂ CO ₃ -Lösung:	3,75 g Na ₂ CO ₃ in 150 mL Wasser lösen
2 % Formaldehyd:	0,2 mL Formaldehyd auf 10 mL auffüllen
Vorlage für Reduzierlösung:	3,7 g Tris/HCl abwiegen
Stopplösung:	5-10 g Glycerin auf 100 mL auffüllen
Aus diesen Lösungen und Vorlagen werden die Lösungen für die Entwicklung der Gele hergestellt:	
Fixierpuffer:	0,3 g NaAc + 4 mL 1,6 %ige Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung + 10 mL 5 % Glutaraldehyd + 30 mL 95 % EtOH, 5 % HAc + 66 mL Wasser (bidest)
Entwickler:	150 mL 2,5 %ige Na ₂ CO ₃ -Lösung + 1 mL 2 % Formaldehyd
Hintergrundreduzierer:	3,7 g Tris/HCl + 100 mL 1,6 %ige Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung

Tab. 7.3: Entwicklung der Gele.

Schritt	Lösung	In ¹⁾	Out ²⁾	Zeit [min]	Temp [°C]	Bemerkung
1	10 % Ethanol, 5 % HAc	3	2	2	50	Waschlösung
2	10 % Ethanol, 5 % HAc	3	2	4	50	Waschlösung
3	Fixierpuffer	4	2	6	50	Fixierlösung
4	10 % Ethanol, 5 % HAc	3	2	3	50	Waschlösung
5	10 % Ethanol, 5 % HAc	3	2	5	50	Waschlösung
6	Wasser (bidest)	5	2	2	50	Waschlösung
7	Wasser (bidest)	5	2	2	50	Waschlösung
8	0,4 % Silbernitrat	6	0	6,5	40	Färbelösung
9	Wasser (bidest)	5	0	0,5	30	Waschlösung
10	Wasser (bidest)	5	2	0,5	30	Waschlösung
11	Entwickler	7	2	0,5	30	Entwickler
12	Entwickler	7	2	4,0	30	Entwickler
13	Hintergrundreduzierer	8	2	2,0	30	Reduzierer
14	5-10 % Glycerin	9	2	5	50	Stopplösung

¹⁾In: Bezeichnung des Schlauches der Entwicklungskammer, durch den die jeweiligen Lösungen in die Entwicklungskammer gezogen werden.

²⁾Out: Bezeichnung des Schlauches der Entwicklungskammer aus dem der Inhalt der Entwicklungskammer abgepumpt wird.

7.5 Aminosäure-HPLC

Säule: Waters Resolve C18, 5 μm , 3,9 x 150 mm

Eluent A: 0,05 M Na-Acetat, 0,05 M NaH_2PO_4 mit NaOH auf pH 7, dann 96% Puffer 2% THF 2% MeOH

Eluent B: 54 % Methanol, 46 % Wasser (bidest)

Gradient: 0 min 100% A 50 min 100% B 55 min 100% B 60 min 100% A 67min 100% A

7.6 Kationenaustausch-HPDC

Säule/Matrix: CIM- SO_3 : CIM-Disk mit Sulfonsäuregruppen an der Oberfläche

Eluent A: PBS (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7,2)

Eluent B: Eluent A + 1000 mM NaCl)

Gradient: 0 min: 0 % B, 2 min: 0 % B, 3 min: 100% B, 4 min: 0 % B

Flussrate: 4 mL/min

7.7 PBS-Puffer (20-fach konzentriert)

Lösung A: 28,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 800 mL Wasser (bidest) lösen

Lösung B: 20,28 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 500 mL Wasser (bidest) lösen

Lösung A und B mischen und 228 g NaCl zugeben. Lösung anschliessend sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern.

7.8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

Bidest.: bidestilliert

CAFCA: Computer Assisted Fia Control Analysis

CHO: Chinese Hamster Ovary

CIM: Convective Interaction Media

Da: Dalton

DNA: Desoxyribonukleinsäure

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay t-PA: tissue plasminogen activator

ESIP-Modul: Eppendorf sterile in-line Probenahmesonde

Fa: Firma

GMA-EDMA: Glycidylmethacrylat-co-ethylendimethacrylat

g/L: Gramm/Liter

h: Stunde

HCL: Hydrogenchlorid

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPMADC: High Performance Monolithic Affinity Disk Chromatography

kDa: KiloDalton

K_{Diss} : Dissoziationskonstante, Einheit: M

L: Liter

M: molar

mA: Milliampere

min: Minuten

mg/mL: Milligramm/Milliliter

mL/min: Milliliter/min

mRNA: Messenger Ribonukleinsäure

μ g/mL: Mikrogramm/mL

μ L : Mikroliter

μ m: Mikrometer

NaCl: Natriumchlorid

nm: Nanometer

PBS: Phosphate Buffered Saline

PET-Puffer: PBS-EDTA-Tween-Puffer

Pmg: Plasminogen

POD: Peroxidase

PVDF: Polyvinylidenfluorid

q: Beladungsdichte

Q_{max} : maximale Adsorptionskapazität

RMSEC: root mean square error of prediction

RNA: Ribonukleinsäure

RNAse: Ribonukleinase

Ref: Referenz

rpm: rounds per minute

RT: Raumtemperatur

SDS: Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)

SDS PAGE: Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis

S-Phase: Synthesephase

Vh: Voltstunden

W: Watt

YSI: Yellow Springs Instruments

Ze/mL: Zellen/mL

Lebenslauf

Name:	Georg Renemann (ledig)	
Geburtsdatum:	20. Oktober 1971	
Geburtsort:	Neubörger	
Schulbildung:	August 1978 – Juli 1982 August 1982 – Juli 1984 August 1984 – Juni 1991 Juni 1991	Grundschule Neubörger Orientierungsstufe Dörpen Gymnasium Papenburg Abitur
Universitätsausbildung:	Oktober 1991 - März 1994	Grundstudium Chemie an der Universität Oldenburg
Universitätswechsel:	April 1994 - November 1997	Hauptstudium Chemie an der Universität Hannover
Diplomarbeit:	Mai 1997 - November 1997	Institut für Technische Chemie, Universität Hannover "Untersuchung des Stoffwechsels einer rekombinanten BHK-Zelllinie und die Entwicklung geeigneter Fütterungsstrategien"
Dissertation:	Januar 1998 – April 2000	Institut für Technische Chemie, Universität Hannover "Prozessoptimierung und online Produktanalytik bei Tierzellkultivierungen"
Forschungsaufenthalt in St. Petersburg:	11. November 1998 – 8. Dezember 1998	Forschungsarbeit an der Russischen Akademie der Wissenschaften in St. Petersburg auf dem Gebiet der High Performance Disk Chromatography
Leonardo-Austausch Programm der EU:	11. Januar 1999 – 22. März 1999	Praxisaufenthalt bei der Firma Chiron Vaccines in Siena, Italien