

Entwicklung einer Affinitätstechnologie für die Aufreinigung
rekombinanter Proteine aus Säugetierzellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Alexander Tappe
geboren am 10.06.1975, in Hannover

2006

Referent Prof. Dr. T. Scheper
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Korreferent Prof. Dr. B. Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Tag der Promotion 09.11.2006

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Vlakh, E; Tappe, A.; Kasper, C.; Tennikova, T.B.: Monolithic peptidyl sorbents for comparison of affinity properties of plasminogen activators. In: *Journal of Chromatography B*, 810 (2004), S. 15 – 23

Vlakh, E.; Platonova, G.A.; Vlasov, G.P.; Tappe, A.; Kasper, C.; Kretzmer, G.; Tennikova, T.B.: In vitro comparison of complementary interactions between synthetic linear/branched oligo/poly-l-lysines and tissue plasminogen activator by means of high performance monolithic disk affinity chromatography. In: *Journal of Chromatography A*, 992 (2003), S. 109 – 119

Suck, K. ; Walter, J.; Menzel, F.; Tappe, A., Kasper, C.; Naumann, C.; Zeidler, R.; Scheper, T.: Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems. In: *Journal of Biotechnology*, 121 (2006). S. 361 – 367

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Mai 2006

Danksagung

Für die Bereitstellung des spannenden Themas bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Thomas Scheper. Für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Professor Dr. Bernd Hitzmann.

Bei allen Mitgliedern des TCI möchte ich mich an dieser Stelle für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken, insbesondere bei den Mitarbeitern der Tierzellkultivierung.

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

Inhalt

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Tierzellkultivierung	7
2.2 Affinitätschromatographie	9
2.2.1 Monolithic Disk Chromatography	10
2.2.2 Frontalanalyse	11
2.3 Gewebefibrinogen-Aktivator	12
2.4 Humanes Wachstumshormon	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Zelllinien und Kultivierungsbedingungen	13
3.1.1 Kultivierungssysteme	14
3.2 Begleitanalytik	15
3.2.1 Zellzahlbestimmung	15
3.2.2 Glukose- und Laktatkonzentration	16
3.2.3 Bestimmung der t-PA-Konzentration	16
3.2.4 Bestimmung der hGH-Konzentration	16
3.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	17
3.2.6 Aufkonzentrierung	17
3.2.7 Entsalzung	17
3.3 Immobilisierung von Antikörpern auf Epoxy-Disks	17
3.4 Gelelektrophorese	18
3.5 HPMDC-Anlage	18
4 Ergebnisse und Diskussion	19
4.1 Kultivierung von CHO t-PA	19
4.2 Kultivierung von CHO hGH	19
4.2.1 Amplifikation der hGH-Produktion	19
4.2.2 Kultivierung in verschiedenen Kultivierungssystemen	20

4.2.3	Wachstum in verschiedenen Kultursystemen	21
4.2.4	Produktion von hGH in den Kultivierungssystemen	24
4.2.5	Einfluss der Kultivierungstemperatur	26
4.2.6	Kultivierung von CHO K1 im BelloCell	27
4.3	Herstellung und Charakterisierung der Antikörper-Disks	29
4.3.1	Bindungscharakteristika der Epoxy-Disk	29
4.3.2	Immobilisierung von Antikörpern	30
4.3.3	Bindungsverhalten der Antikörper-Disk	31
4.4	HPMDC mit t-PA	31
4.4.1	Kalibration der Disk mit t-PA-Standard	31
4.4.2	Aufreinigung von t-PA aus Zellkulturüberständen	38
4.4.3	Untersuchung der kompetitiven Bindung durch Standardaddition	39
4.4.4	Optimierung des Puffersystems	41
4.4.4.1	pH-Wert des Zellkulturüberstandes	41
4.4.4.2	Ionenstärke des Zellkulturüberstandes	42
4.4.5	Optimierung der Elution	43
4.4.6	Einsatz der Affinitätsdisk zur schnellen off-line-Analytik	47
4.4.7	Untersuchung zur Chargen-Variation des Überstandes	47
4.4.8	Alterung der Disk	48
4.4.9	off-line Messung der t-PA-Konzentration einer batch-Kultur	49
4.5	HPMDC mit hGH	50
4.5.1	Kalibration der Disks mit Reinsubstanz	50
4.5.2	Bestimmung der Konzentration im Zellkulturüberstand	51
4.5.3	Elution mit verschiedenen Elutionsmitteln	52
4.5.4	pH-Wert des Zellkulturüberstandes	54
4.5.5	Einfluss der Flussrate auf die Bindungskapazität der Disk	55
4.5.6	Untersuchung zur Anwendung der anti-hGH-Disk zur schnellen off-line-Analytik	56
4.5.7	Einfluss der Alterung der Disk	57
5	Zusammenfassung und Ausblick	61
6	Anhang	63
6.1	Puffer für die HPMDC	63
6.2	SDS-PAGE	63

6.2.1	Probenvorbereitung	63
6.2.2	Programm für die Trennung im Phast-System	63
6.2.3	Programm für die Trennung in der Phast-Anlage	63
6.2.4	Entwicklung der Gele im Phast-System	64
6.2.5	Entwicklung der Criterion-Gele auf dem Schüttler	64
6.3	Abkürzungsverzeichnis	66

Abbildungsverzeichnis

3.1	Kultivierungssysteme für CHO hGH	15
4.1	Wachstumskurve der CHO t-PA-Zelllinie	20
4.2	t-PA-Produktion im Verlauf mehrerer Jahre	21
4.3	Amplifikation der hGH-Produktion	22
4.4	Lebendzellzahl von CHO hGH in den Kultivierungssystemen	23
4.5	Spezifische Glukoseverbrauchsrate von CHO hGH	24
4.6	hGH-Konzentration im Zellkulturüberstand	25
4.7	Spezifische hGH-Produktionsrate	26
4.8	Einfluss der Temperatur auf die hGH-Produktion	27
4.9	Spezifische Glukoseaufnahmerate von CHO K1	28
4.10	Lage der Luer-Lock-Anschlüsse am BelloCell	29
4.11	Zellzahl von CHO K1 in verschiedenen Kultivierungssystemen	30
4.12	Chromatogramm einer t-PA-Probe	32
4.13	Abhängigkeit der Peakfläche und Peakhöhe des Elutionspeaks von der t-PA-Konzentration	34
4.14	Kalibration verschiedener Antikörper-Antigen-Systeme	35
4.15	Abhängigkeit der t-PA-Menge im Eluat für verschiedene Antikörper-Antigen-Systeme	36
4.16	Kalibration mit aufgereinigtem t-PA aus Zellkulturüberstand	37
4.17	Adsorptionsisotherme der Antikörper-Disk	37
4.18	Berechnung der t-PA-Konzentration durch HPMDC und ELISA	39
4.19	Reinheit der Eluate	40
4.20	Reinheit der Eluate bei hohen t-PA-Konzentrationen	41
4.21	Berechnung der t-PA-Konzentration aus dem Eluat mittels HPMDC und ELISA.	41
4.22	Einfluss des pH-Wertes des Überstandes auf die Reinheit des Eluats	43
4.23	Einfluss der Leitfähigkeit der Probe auf die Reinheit des Eluats	44
4.24	Einfluss der Leitfähigkeit auf die spezifische Bindung	45
4.25	Elution von t-PA und Störsubstanzen bei unterschiedlichen pH-Werten	46
4.26	Reproduzierbarkeit der t-PA-Bestimmung	48
4.27	Abhängigkeit des HPMDC von der Zellkulturcharge	49
4.28	Kontrolle der t-PA-Konzentration zweier batch-Kulturen	50
4.29	Kalibration der anti-hGH-Disk mit hGH-Standard	51

4.30 Bestimmung der hGH-Konzentration in Zellkulturüberstand mittels ELISA und HPMDK	52
4.31 Reinheit des Eluats	53
4.32 Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke auf die Elution von hGH	54
4.33 Einfluss der pH-Wertes des Zellkulturüberstandes auf die Bindung von hGH .	55
4.34 Abhängigkeit der dynamischen Kapazität der anti-hGH-Disk von der Flussrate	56
4.35 Reproduzierbarkeit der mittels HPMDK berechneten Konzentration	57
4.36 Chargenabhängigkeit der Bestimmung der hGH-Konzentration mittels HPMDK	58
4.37 Einfluss der Alterung der anti-hGH-Disk auf die Bindung von hGH	59
4.38 Abhängigkeit der dynamischen Kapazität von der Alterung der Disk	60

Tabellenverzeichnis

2.1	Affinitätsliganden und dazugehörige Analyten.	9
3.1	Reaktorvolumen und Rührtechnik der Kultivierungssysteme	15
4.1	hGH-Konzentration und mittlere spezifische Produktbildungsrate bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen	27
4.2	Ligandendichte der Antikörper-Disks	31
4.3	Eluenten zur Kalibration der anti-t-PA-Disk	32
4.4	Affinitätscharakteristika der anti-t-PA-Disk	36
4.5	Stufengradienten bei der Variation des pH-Wertes zur Elution	45
4.6	Einfluss des Alterung der Antikörper-Disk auf die Bindung von t-PA	48
4.7	Chromatographieprogramm zur Kalibration der anti-hGH-Disk	51

Zusammenfassung

Für die Produktion rekombinanter Proteine aus Tierzellkulturen werden effiziente Aufreinigungen benötigt, die schnell durchzuführen sind und hochreines Protein liefern. Dies kann durch die Affinitätschromatographie in einem Schritt erreicht werden. In dieser Arbeit wurde sie als *high performance monolithic disk chromatography*, kurz HPMDC, durchgeführt, bei der monolithische Träger eingesetzt werden. Diese Gruppe von Materialien besitzt eine poröse Struktur, die die Verwendung hoher Volumenströme zulässt. Da Monolithen als kontinuierlicher Festkörper synthetisiert werden, sind sie unempfindlich gegenüber Druckschwankungen und gashaltigen Eluenten. Eingesetzt wurden Glycidyl-Methacrylat-co-Ethylendimethacrylat-Disks (GMA-EDMA) der Firma BIA Separations d.o.o.. Auf den epoxy-aktivierten Disks wurden Antikörper gegen den Plasminogenaktivator t-PA und das humane Wachstumshormon hGH immobilisiert.

Die Produktion von t-PA und hGH erfolgte in Chinese Hamster Ovary-Zellen (CHO), welche beide Proteine in den Zellkulturüberstand abgeben. Die Kultivierung des t-PA-produzierenden Zellen beschränkte sich auf die Kultivierung in Spinnerflaschen. Dagegen wurde das Wachstum der hGH-produzierenden CHO-Zellen und die hGH-Produktion in drei verschiedenen Kultivierungssystemen verglichen, die als Alternative zu Spinnerflaschen eingesetzt werden können. Die Zellen wurden im BelloCell von Cesco Bioengineering CO., LTD., im miniPERM von In Vitro Systems & Services GmbH, sowie im RCCS von Synthecon, Inc. kultiviert. In allen Fällen wurde eine höhere maximale Zelldichte als in der Spinnerflasche erreicht. Die höchste hGH-Produktion wurde im RCCS erreicht.

In weiteren Schritten wurden die Antikörper-Disks zur schnellen off-line-Analytik und zur Aufreinigung der Zielproteine aus Zellkulturüberständen eingesetzt. Trotz des Nachweises der hohen Spezifität der Antikörper gegen t-PA kam es zu starker Koelution von Fremdproteinen bei geringen t-PA-Konzentrationen. Das Ausmaß der Koelution verhinderte sowohl die Aufreinigung als auch die off-line-Analytik mittels HPMDC, trotz Optimierungsversuchen der Chromatographiebedingungen.

Die Aufreinigung von hGH über die Antikörper-Disks war erfolgreich. Die gelelektrophoretische Untersuchung zeigt nur geringe Verunreinigung des hGH im Eluat. Eine weitere Vorbehandlung des Überstandes nach Abtrennung der Zellmasse war nicht notwendig. Der Messbereich für die hGH-HPMDC und die dynamische Kapazität bei Flussraten von 2 – 10 ml/min wurden bestimmt. Die Disk sollte bei möglichst hohen Flussrate betrieben werden. Langzeitversuche zeigten, dass eine Disk für die Analytik bis zu 180 Zyklen eingesetzt werden kann. Da die dynamische Kapazität mit der Zeit stark sinkt, ist der Einsatz zur Aufreinigung vermutlich stark begrenzt.

Schlagnworte: Zellkultur, Affinitätschromatographie, Monolith

Abstract

The production of recombinant protein from animal cell culture requires efficient purification procedures, combining fast pacing and recovery of highly purified protein. This can be achieved in a single step, using affinity chromatography. This thesis covers the usage of affinity chromatography as *high performance monolithic disk chromatography* (HPMDC). The used monoliths consist of a porous structure which enables the use of high flow-rates. As all-solids, monoliths are resistant to pressure-drops and outgassing eluents. The application of monolith in this thesis is focused on glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate disks (GMA-EDMA) from BIA Separations, d.o.o.. Antibodies against tissue-type plasminogen activator t-PA and human growth hormone hGH were coupled to these epoxy-activated discs.

Production of t-PA and hGH was conducted in Chinese Hamster Ovary cells (CHO) which secrete the proteins into the cell culture supernatant. The culture of t-PA was done in spinner flasks. Cell growth of hGH-producing cells and product formation of hGH was compared in three different culture systems, which are developed as alternatives for the spinner flasks. The BelloCell system from Cesco Bioengineering Co., LTD., miniPERM from In Vitro Systems & Services GmbH and RCCS from Synthecon, Inc. were applied. Higher cell densities were observed in all three systems. The highest product formation was measured in the RCCS.

The immobilized antibodies were applied for chemical analysis and purification of their antigens from cell culture supernatants. A high amount of coelution was observed when attempting to purify low-level concentrations of t-PA. Due to the coelution, the purification of t-PA could not be achieved and thus chemical analysis was not carried out, despite optimization of the separation conditions.

However, purification of hGH was achieved. Results of gelelectrophoresis showed minor impurities in the elution fraction. Further treatment of the supernatant after cell removal was not necessary. The measurement range and the dynamic capacities were measured for flow-rates from 2 – 10 ml/min. Using high flow-rates was most efficient. Long-term tests showed that for chemical analysis a number of applications of up to 180 can be achieved. As dynamic capacity drops very quickly, probably the use of the disk for purification is severely limited.

key words: cell culture, affinity chromatography, monolith

1 Einleitung

Der Produktion rekombinanter Proteine als Medikamente kommt eine immer größere Bedeutung zu, denn viele Krankheiten werden durch den Mangel körpereigener Proteine verursacht und können durch Verabreichung der rekombinanten Wirkstoffe behandelt werden. Insbesondere der Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) als Herzinfarktmedikament oder das humane Wachstumshormon (hGH) zur Behandlung von Kleinwüchsigkeit können aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in biologischen Proben nur mit Hilfe gentechnisch modifizierter Organismen in der benötigten Menge hergestellt werden.

Sofern posttranslationale Modifikationen für die Wirkung essenziell sind, können Bakterien für die Produktion nicht mehr eingesetzt werden. Wenn auch die erforderliche Faltung der Proteine nicht mehr in Hefen erreicht wird, muss man auf Säugetierzellen zurückgreifen. Die geringe Stabilität und die Kopplung von Struktur und Aktivität der Proteine erfordern weiterhin eine schonende Aufarbeitung. Die für die klinische Anwendung strengen Reinheitskriterien können oft nur durch eine Folge von langwierigen Aufreinigungsschritten erzielt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Produktion und Aufreinigung von t-PA und hGH aus Tierzellkulturen untersucht werden. Gegenstand der Untersuchung zur Produktion der rekombinanten Proteine sind Kultivierungssysteme, die speziell für die Bedürfnisse der Zellkultur entwickelt wurden und eine effizientere Produktion sowie eine einfachere Handhabung im Labormaßstab versprechen. Sie sind so konstruiert, dass sie sich als Alternative zu Spinnerflaschen in Brutschränken betreiben lassen. Für die Versuche wurden Chinese Hamster Ovary-Zellen (CHO) benutzt, welche die rekombinanten Proteine in das Nährmedium ausschleusen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Aufreinigung und Analytik der rekombinanten Proteine mittels Flüssigkeitschromatographie. Es soll untersucht werden, ob sich Antikörper als Liganden auf Monolithen für die quantitative Analyse und für die einstufige Aufreinigung der rekombinanten Proteinen aus Zellkulturüberständen eignen. Aufgrund ihrer porösen Struktur können Monolithen bei niedrigen Drücken und hohen Flussraten betrieben werden, zudem sind sie stabiler gegenüber Druckschwankungen und gashaltigen Eluenten als herkömmliche Säulen. Sie sind mittlerweile für alle Arbeitsmodi der Chromatographie erhältlich, und ihre Verwendung zur Aufreinigung von größeren Biomolekülen ist in der Literatur gut beschrieben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Tierzellkultivierung

Neben der Grundlagenforschung in der Evolutionsbiologie und der Aufklärung der Stoffwechselfvorgänge nutzt die moderne Biotechnologie Säugetierzellen vor allem zur Produktion von Glykoproteinen und Produkten, bei denen die benötigte Erbinformation aufgrund ihrer Größe nicht mehr in prokaryotischen Systemen untergebracht werden kann. Die Vorteile der Produktion in Tierzellen gegenüber Hefen liegt in der humanähnlicheren oder sogar humanidentischen Glykosylierung durch die Tierzellen. Als Standard gelten Suspensionszelllinien, die in serumfreien, chemisch definierten Medien kultiviert werden können. Nicht-glykosylierte Produkte können in prokaryotischen Systemen aufgrund ihres schnelleren Wachstums und höherer Produktivität günstiger hergestellt werden [17],[19].

In der Regel werden genetisch modifizierte Zellen eingesetzt, da natürliche Zellen das gewünschte Produkt oftmals in geringen Konzentrationen herstellen und nur eine begrenzte Zahl von Zellteilungen durchlaufen können. Die Zellen werden daher zuerst immortalisiert, um permanente Zelllinien zu etablieren, die in einem weiteren Schritt mit der Erbinformation für das Produkt transfiziert werden können. Nach Etablierung der produzierenden Zelllinie erfolgt die Auswahl der hochproduzierenden Klone anhand der Parameter Zellwachstum, Produktivität und Stabilität des Genoms. In weiteren Schritten werden das Nährmedium und weitere Kultivierungsbedingungen optimiert [13],[30]. Im Allgemeinen lassen sich Zellen unter Bedingungen kultivieren, die den physiologischen Bedingungen des Ursprungsorgans entsprechen. Viele Tierzellen und humane Zellen werden daher bei 37 °C kultiviert. Durch Absenkung der Temperatur wird bei bestimmten Zelllinien ein verlangsamtes Wachstum bei Steigerung der Produktbildung beobachtet. Bei anderen Zellen sinkt mit der Wachstumsrate hingegen auch die Produktbildungsrate. Über Limitierung von Substraten, inklusive Sauerstoff, kann die Produktbildung bis hin zur Änderung von Glykosylierungsmustern gesteuert werden [16],[33],[6],[9].

Kultivierungssysteme

Vorgänge, die ein vollständiger Organismus für die einzelne Zelle übernimmt, müssen in der Zellkultur über die Reaktortechnik abgebildet werden. Dies sind vor allem das Temperieren des Reaktorinhaltes, die Sauerstoffversorgung, die Zufuhr von Nährstoffen und Edukten, sowie der Abtransport von Abfällen und Produkten, die nicht in der Zelle gespeichert werden [22],[33]. Neben diesen Anforderungen fließen Vorgaben zur Sterilisierbarkeit, einfachen Reinigung, Dauer der Kultivierung und Möglichkeiten der Kontrolle wichtiger Kultivierungsparameter in das Design der Reaktoren ein. Die Klassifizierung dieser Systeme kann anhand

von jedem der oben genannten Faktoren erfolgen. Die gängigste Unterteilung erfolgt jedoch in Reaktorsysteme für adhärenzte Zelllinien und für Suspensionszelllinien.

Für den Anwender lassen sich Kultivierungssysteme in drei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe besteht aus Systemen, die zur Stammkultivierung oder für erste Optimierungsversuche der Kultivierungsbedingungen eingesetzt werden. Sie sind so konstruiert, dass eine große Bandbreite von Zelllinien bei Standardbedingungen kultiviert werden kann. Sie besitzen ein kleines Arbeitsvolumen und eine Umwälzeinheit für das Medium. Die Temperierung und Pufferung des Mediums erfolgen meist durch CO₂-begasbare Brutschränke, in denen mehrere kleine Systeme gleichzeitig kultiviert werden. Probennahme und Mediumwechsel erfolgen manuell, eine aktive pH-Kontrolle und aktive Begasung sind nicht möglich. Durch den Verzicht auf Sensoren können diese Reaktoren kostengünstig als Einweg-Reaktoren oder wieder verwendbare Reaktoren hergestellt werden. Aufgrund ihrer Bauform, z.B. festgelegte Verhältnisse von passiven Begasungsflächen zum Mediumvolumen, lassen sich solche Reaktoren nicht oder nur sehr schlecht auf einen Technikums- oder Labormaßstab skalieren [38].

Während die Begasung fast immer über gaspermeable Membranen stattfindet, unterscheiden sich die Reaktoren bei der Umwälzung des Mediums und bei der Lokalisierung der Zellen im Reaktor. Das Medium kann einmal über Rührer oder Pumpensysteme durchmischt werden. Bei einer zweiten Bauform rotiert der gesamte Reaktor und überträgt das Drehmoment des Antriebs auf das Medium. Ziel ist die homogene Durchmischung des Reaktormediums in Bezug auf Gelöstsauerstoff, pH-Wert und Nährstoffe um zu verhindern, dass sich das Wachstum der Kultur auf bevorzugte Bereiche beschränkt [4]. In einer Untergruppe dieser Reaktoren wachsen die Zellen im gesamten Mediumvolumen, während andere den Kulturraum von einem zellfreien Nährstoffreservoir über Membranen abtrennen. Die Porengrößen der Membranen sind so klein, dass Zellen die Membran nicht passieren können, Nähr- und Abfallstoffe aber über Diffusion die Membran passieren. Wählt man das Verhältnis von Kulturraum zum Reservoir sehr klein, sinkt die Raumausbeute des Reaktors, im Gegenzug lassen sich die Zellen über einen längeren Zeitraum bei hohen Zelldichten ohne Mediumwechsel kultivieren.

Die zweite Gruppe von Systemen wird konstruiert, um auf spezielle Anforderung einer Zelllinie einzugehen. Dies kann eine bestimmte dreidimensionale Matrix zum Bewuchs oder eine Stimulation mit mechanischen Reizen sein. Diese Reaktoren werden oft für die Grundlagenforschung an einzelnen Zelllinien konstruiert und sind nicht kommerziell erhältlich [36],[5].

Die dritte Gruppe von Systemen umfasst Reaktorsysteme mit Mess- und Regeleinheiten für pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffversorgung und Fütterungsstrategien. Durch die aktive Regelung dieser Parameter kann das System über große Arbeitsvolumina (2 - 10.000 Liter) skaliert werden. Um das Infektionsrisiko und den Arbeitsaufwand mit diesen Reaktoren zu minimieren, sind diese Reaktoren CIP-fähig (clean-in-place) und mit Probenahmemodulen ausgestattet. Die langjährige Erfahrung mit Rührkesselreaktoren, der hohe Validierungsauf-

Ligand	Analyt
Protein A	IgG
Protein G	IgG
2-Mercaptopyridin	IgM, IgY
Gluthation	Proteine mit Glutathion-S-Transferase-Tags
chelatisierte, divalente Ionen z.B. Ni ²⁺ , Cu ²⁺	Proteine mit Polyhistidin-Tags
Para-Aminobenzamidin	Proteasen
Heparin	DNA-bindende Proteine
Concanavalin A	mannosehaltige Glykoproteine
Cibracon Blue(TM)	Albumin

Tabelle 2.1: Affinitätsliganden und dazugehörige Analyten.

wand der Wirkstoffproduktion und die Tendenz, in einem Reaktor verschiedene Zellsysteme batch-weise zu kultivieren, haben dazu geführt, dass in der Wirkstoffproduktion trotz neuer Kultivierungssysteme hauptsächlich in submers begasten Rührkesselreaktoren produziert wird [17],[39],[53].

2.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf der reversiblen Bindung eines Analyten an einen spezifischen Liganden, der seinerseits kovalent auf einer Matrix gebunden ist. Aufgrund der hohen Spezifität der Wechselwirkung kann die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Biomolekülen aus komplexen Mischungen eingesetzt werden. Bei Verwendung monospezifischer Liganden findet die Bindung zwischen einem definierten Bindungspaar statt. Mit gruppenspezifischen Liganden binden dagegen Gruppen ähnlicher Analyten an den Liganden. Typische Bindungspartner sind Protein und Antikörper oder Enzym und Co-Faktor bzw. Inhibitor.[1] Die Elution des Analyten kann spezifisch durch einen kompetitiven Liganden erfolgen, oder unspezifisch durch Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Polarität des Eluents oder durch den Einsatz chaotroper Reagenzien. Bei der unspezifischen Elution führt eine Konformationsänderung des Analyten zum Bruch der Bindung. Als Beladungsmethode ist die Affinitätschromatographie unabhängig vom Probenvolumen. Bei der Aufreinigung von Biomolekülen wird meist bei neutralem pH-Wert und niedrigen Leitfähigkeiten beladen. Nach der Bindung des Analyten wird die Säule gewaschen um ungebundene Probenbestandteile zu entfernen. Die Elution erfolgt oft durch Absenken des pH-Wertes. In Tabelle 2.1 sind einige Liganden und die Analyten aufgeführt, die mit ihnen aufgereinigt werden können.

Die Dissoziationskonstante ist ein Maß für die Bindungsstärke der Analyt-Ligand-Wechselwirkung. Je niedriger die Konstante ist, desto stärker liegt das Gleichgewicht bei einer reversiblen Bildung des Analyt-Ligand-Komplexes auf der Seite des Analyt-Ligand-Komplexes. Die Dissoziationskonstante des Analyten-Liganden-Paares sollte 10^{-7} bis 10^{-5} M betragen. Bei einer größeren Dissoziationskonstanten ist die Bindung für die Affinitätschromatographie zu schwach, bei einer kleineren Konstanten ist die Bindung so stark, dass zur Elution Bedingungen nötig werden, die das Zielmolekül beschädigen [34].

Aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften sind Affinitätsliganden oft empfindlich gegenüber langer Lagerung bei Raumtemperatur, mikrobiellem Wachstum, organischen Lösungsmitteln und extremen pH-Werten. Geht durch einen dieser Faktoren die biologische Aktivität verloren, kann keine erfolgreiche Bindung des Analyten mehr stattfinden. Zudem sind die Liganden meist teuer, sodass die Affinitätschromatographie trotz ihres hohen Aufreinigungspotenzials vergleichsweise selten eingesetzt wird. Ein Teil der Forschungsarbeit zielt auf den Ersatz kompletter Liganden durch bindungsvermittelnde Teilstücke, z.B. durch die Peptidsequenz der hochvariablen Domänen von Antikörpern. Dadurch könnten günstigere und stabilere Liganden eingesetzt werden [32].

2.2.1 Monolithic Disk Chromatography

Die Monolithic Disk Chromatography bezeichnet Chromatographiemethoden, bei denen Monolithen als stationäre Phase verwendet werden. Unter Monolithen versteht man einheitliche, poröse Strukturen, die direkt in der Chromatographiesäule als Einheit gebildet werden. Die Porenoberfläche des Monolithen kann je nach gewünschten Bindungseigenschaften später funktionalisiert werden [55]. Die Monolithen lassen sich grob in anorganisch und organisch basierte Klassen einteilen. Anorganische Monolithen basieren meist auf der Hydrolyse der Alkoxide von Silicium, Titan, Zirkon oder Aluminium. Die Funktionalität der Grundstruktur wird meist durch die Funktionalisierung mit organischen Polymeren, seltener durch anorganische funktionelle Gruppen erreicht [10].

Größere Bedeutung haben jedoch die organischen Monolithen. Den Großteil dieser Gruppe machen Monolithen aus, die aus Polystyren, Polyacrylaten oder Polymethacrylaten hergestellt werden. Im einfachsten Fall werden die Monomere durch einen cross-linker in Anwesenheit eines Porogens vernetzt. Die Polymerisationstemperatur und die damit verbundene benötigte Wärmeabfuhr haben zusammen mit der Art des Porogens einen entscheidenden Einfluss auf die Porenstruktur und die maximale Größe des Monolithen [43],[46]. Startet die Polymerisation mit wenigen Zentren, so genannten *nuclei*, können sich aus einzelnen *nuclei* große, kugelförmige Strukturen bilden, die sich zu festen Aggregaten zusammenlagern. Je größer die Kugeln werden, desto größer bleibt auch der Zwischenraum. Bei der Porengrößenverteilung findet man oft zwei dominierende Bereiche, die kleineren Mesoporen und die größeren Makro-

poren. Der mittlere Porendurchmesser ist dabei so groß, dass auch bei geringem Druck hohe Flussraten erreicht werden. Daher ist der Massentransport im Monolithen konvektiv dominiert, die Porendiffusion spielt eine untergeordnete Rolle. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kapazität und Trennleistung dieser Materialien in weiten Bereichen unabhängig von der Flussrate (0,5 – 10 ml/min) ist [26],[40].

Monolithen sind als fertige Chromatographiesäulen für Ionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie oder mit reaktiven Gruppen (z.B. Epoxygruppen) zur Funktionalisierung erhältlich. Beschrieben ist die Funktionalisierung unter anderem mit gruppenspezifischen Liganden, Antikörpern und Polypeptiden. Alle diese Varianten werden zur Aufreinigung von Biomolekülen genutzt. In ersten Studien gelang die Aufreinigung von verschiedenen Proteinen und Oligonukleotiden aus Modellgemischen mit Ionentauschern [48],[47],[42]. Nach den Machbarkeitsstudien gelang auch die Aufreinigung aus komplexeren Gemischen. So konnten Trypsin und Lysozym mittels Zn^{2+} -IDA-Monolithen aus Eiklar, und Faktor IX aus verschiedenen Schritten der Plasmareinigung mit IgG-Disks gewonnen werden [35],[8]. Für das *Capturing* von Proteinen aus sehr komplexen Lösungen wie Kaninchenserum oder Zellkulturüberständen können Antikörper oder synthetische Peptidliganden eingesetzt werden [27],[49],[41]. Vielversprechend ist die Kombination von Bibliotheken synthetischer Liganden mit einem proteinstruktur-basierten Ansatz bei der Suche nach neuen Liganden [29].

2.2.2 Frontalanalyse

Die Frontalanalyse bezeichnet ein Verfahren, bei dem der Übergang eines Analyten von der mobilen Phase auf eine stationäre Phase untersucht wird. Für die Massentransferrate des Analyten aus einer mobilen Phase mit konstanter Konzentration gilt Gleichung 2.1.

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C(q_m - q) - k_2 q \quad (2.1)$$

C = Analytkonzentration in der flüssigen Phase

q = Festphasenkonzentration des Analyten

q_m = maximale Adsorptionskapazität

Im Gleichgewicht, d.h. bei Sättigung der mobilen Phase mit dem Analyten gilt:

$$q = \frac{q_m C}{K_{Diss} + C} \quad \text{mit} \quad K_{Diss} = \frac{k_1}{k_2} \quad (2.2)$$

Aus der linearisierten Form der Gleichung 2.2 bei Auftragung von $1/q$ gegen $1/C$ können durch Regression die Dissoziationskonstante K_{Diss} aus der Steigung und die maximale Bindungskapazität q_m aus der Ordinate berechnet werden. Dies erlaubt einen Rückschluss auf die Eignung des Bindungspaares für die Affinitätschromatographie und gibt einen Anhaltspunkt für die Auslegung einer großtechnischen Aufreinigung [28].

2.3 Gewebepasminogen-Aktivator

Der Gewebepasminogen-Aktivator (tissue type plasminogen activator / t-PA) ist eine Serinprotease, die eine entscheidende Rolle in der Fibrinolyse spielt. Sie kommt in unterschiedlichen Konzentrationen in fast allen Geweben vor und ist in den Blutgefäßen an Endothelzellen gebunden. Im Blut wird sie durch Proteaseinhibitoren schnell komplexiert und inaktiviert [14]. Die Inaktivierung von t-PA in Tierzellkultur ist bisher nicht beschrieben. t-PA hydrolysiert die Arg561-Val562-Bindung in Plasminogen, wodurch Plasmin entsteht, welches Fibrin und Fibrinogen abbaut. In hohen Dosen wird es daher bei der Infarkttherapie eingesetzt [31].

Humanes t-PA besteht aus 527 Aminosäuren. Es ist mehrfach glykosiliert und je nach Glykosilierungsgrad 62-70 kDa schwer. t-PA wird im Körper als *single-chain* t-PA sekretiert. Der isoelektrische Punkt beträgt 7,5 - 8,5 [51]. Unter dem Einfluss von Plasmin erfolgt die Bildung der *two-chain*-Form durch Spaltung der Arg275-Ile276-Bindung. Die dabei gebildeten sog. leichten und schweren Ketten bleiben über eine Disulfidbrücke verknüpft. Die großtechnische Produktion von t-PA wird seit 1987 betrieben. Viele Aufreinigungsstrategien wurden in der Zwischenzeit entwickelt, sodass sich für alle Chromatographiearten Beispiele für die Aufreinigung im Labormaßstab finden. Größere Bedeutung besitzt die Aufreinigung über Lysin [37],[45],[50] und über Antikörper [18],[7],[54].

2.4 Humanes Wachstumshormon

Als humanes Wachstumshormon (hGH) wird eine Gruppe ähnlicher Proteine bezeichnet, deren Aminosäuresequenzen durch zwei Gene codiert werden. Weitere Modifikationen treten durch unterschiedliches Spleißen der mRNA und durch posttranslationale Modifikationen auf. Die Hauptform unter physiologischen Bedingungen ist ein Protein aus 191 Aminosäuren mit einem Gewicht von 22 kDa. Der isoelektrische Punkt beträgt 4,9 - 5,5. Es wurden aber auch Modifikationen mit isoelektrischen Punkten bis 8,1 gefunden [20]. Im Körper wird hGH in der Hypophyse gebildet und ins Blut ausgeschüttet. Es greift sowohl direkt als auch durch Stimulation anderer Wachstumsfaktoren in das Wachstum ein. Die Hormonkonzentration im Blut erreicht während der Pubertät das Maximum. hGH-Mangel führt bei Kindern zu Wachstumsstörungen, die mit Hilfe von rekombinantem Wachstumshormon behandelt werden. Ziel der Therapie ist meist das Erreichen der durchschnittlichen Größe eines Erwachsenen [11].

Als nichtglykosiliertes Protein wird hGH großtechnisch in *E. coli* produziert, wobei die aktive Form durch Renaturierung der *inclusion bodies* gewonnen wird. Die Aufreinigung erfolgt durch eine Folge von Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie [23],[2]. Das humane Wachstumshormon stellt also ein Modellprotein für Machbarkeitsstudien zur Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Zellkulturüberstand dar [12],[25].

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

Für die Versuche werden die CHO-Zelllinien CHO-Tf70R von Pharmacia & Upjohn (Stockholm, Schweden; im weiteren als CHO t-PA bezeichnet) und $CHO^{SFS}-hGH$ von Cell Culture Service GmbH (Hamburg, Deutschland; im weiteren als CHO hGH bezeichnet) verwendet. CHO-Tf70R produziert single-chain t-PA, $CHO^{SFS}-hGH$ produziert hGH. Die rekombinanten Proteine werden von den Zellen in das Medium abgegeben.

Beide CHO-Suspensionszelllinien werden in serumfreiem Medien von Cambrex Corp. (Verriers, Belgien) kultiviert. Als Nährmedium wird für CHO t-PA BioPro 1 verwendet, welches mit 3 g/L Glukose und 0,3 g/L L-Glutamin versetzt wird. Es handelt sich um ein proteinarmes Medium, das noch Insulin und Transferrin enthält. CHO hGH wird in ProCHO 4-CDM kultiviert, welches mit 0,58 g/L L-Glutamin versetzt wird. ProCHO ist ein proteinfreies Medium. Zum Erhalt des Selektionsdruckes wird bei der Stammkultivierung 10 nM Methotrexat (MTX) verwendet.

Beide Zelllinien werden zur Stammkultivierung in 125-ml- und 250-ml-Spinnerflaschen (Techne Cambridge Limited, Cambridge, UK) bei einer konstanten Rührgeschwindigkeit von 20 Upm (MCS-104L, Techne Cambridge Limited) kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in temperierbaren Brutschränken (B5060 EK-02, Thermo Electron Corp., Langensebold, Deutschland) bei 37 °C unter 5%iger Kohlendioxidbegasung und gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Die langfristige Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff. Hierfür wird das Medium mit 10 % DMSO versetzt.

Batch-Kulturen werden mit 100.000 Zellen/ml angeimpft. Dazu werden die Zellen aus einer Vorkultur abzentrifugiert und in vortemperiertem Medium aufgenommen. Die Vitalität der Kulturen sollte mindestens 90 % betragen. Stammkulturen müssen umgesetzt werden, wenn die Glukosekonzentration unter 0,25 g/L sinkt oder die Laktatkonzentration über 2,5 g/L steigt.

Für die Versuche mit den Kultivierungssystemen wird zusätzlich die adhärente Zelllinie CHO-K1 kultiviert (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). Die Zellen werden in DMEM:HAM's F12 Nutrient Mixture (Sigma-Aldrich Co., München, Deutschland) kultiviert, mit einem Zusatz von 10 % Serum neugeborener Kälber (NCS). Die Zellen werden in 25 cm² Monolayerflaschen kultiviert. Konfluente Kulturen werden mit 0,2 % Trypsin/EDTA von der Oberfläche gelöst und 1:9 in 225 cm² Monolayerflaschen passagiert. Mit nahezu konfluenten Kulturen aus diesen Flaschen werden Rollerflaschen (Greiner Bio-One AG, Solingen, Deutschland) und BelloCell-Einheiten (Cesco Bioengineering, Taiwan) mit 10.000 Zellen/cm² angeimpft. Die Zellen geben keine interessanten Sekundärmetabolite in das Medium ab.

3.1.1 Kultivierungssysteme

Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 auf Seite 15 geben eine Übersicht über die verwendeten Reaktoren für Versuche mit CHO hGH. Der Nutzraum ist die Summe aus Zellraum und Mediumreservoir. Der Zellraum ist separat angegeben. Die Kultivierung erfolgt unter den Bedingungen der Stammkultivierung, außer dass die Vermischung anhand der Empfehlung für die Kultivierungssysteme erfolgt. CHO t-PA wird ausschließlich in Spinnerflaschen kultiviert.

Die Spinnerflasche dient als Referenz für alle Kultivierungsversuche. Das Medium wird über einen Rührkern umgewälzt und die Begasung des Mediums erfolgt über das Gewinde der leicht geöffneten Stutzen der Flasche ohne Verwendung eines Sterilfilters. Der gesamte Nutzraum, der dem halben Flaschenvolumen entspricht, wird zur Kultivierung von Zellen genutzt.

Das Rotating Cell Culture System (im folgenden als RCCS abgekürzt) hat die Form eines sehr flachen Zylinders (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 15). Die Unterseite besteht aus einer gaspermeablen Membran, die durch ein Plastikgerüst gestützt wird und der Begasung dient. Auf der Oberseite wird ein 0,5 Zoll-Stutzen zum Befüllen des Kulturraumes verwendet. Ein abgetrenntes Reservoir ist nicht vorhanden. Über zwei Ventile mit Luer-Adaptoren werden Proben entnommen. Der RCCS wird mit der Rückseite auf einen Motor geschraubt (RCCS-D), sodass er senkrecht steht. Die Rotationsgeschwindigkeit wird so eingestellt, dass die Zellen eine Orbitalbewegung um die Motorachse vollziehen.

Der miniPERM besteht aus einem Zylinder, der in einen 40 ml großen Produktionsraum für die Zellen und ein 550 ml großes Mediumreservoir getrennt ist. Die beiden Räume sind über eine Silikonmembran verbunden. Die Kopffläche des Kulturraumes besteht aus einer gaspermeablen Membran, die den Gasaustausch mit der Umgebung erlaubt. Über drei Stutzen in der Kopffläche lässt sich der Kulturraum befüllen. Für das Mediumreservoir steht ein größerer Stutzen zur Verfügung. Zum Durchmischen wird der miniPERM auf zwei rotierende Walzen gelegt. Die in der Tabelle 3.1 auf Seite 15 angegebene Umdrehungsgeschwindigkeit bezieht sich auf die Umdrehung des miniPERM.

Der BelloCell besteht aus einer Flasche mit drei Kompartimenten. Das unterste Kompartiment ist als kompressibler Balg geformt und nimmt im entspannten Zustand das komplette Medium auf. Der Balg wird während der Kultivierung fortlaufend zusammengedrückt und wieder entspannt. Die Geschwindigkeit der Kompression und Entspannung wird in mm/s angegeben. Durch das Zusammendrücken wird das Medium durch das Zellkompartiment gedrückt, das ein poröses Trägermaterial mit den Zellen enthält. Der Balg wird so weit zusammengedrückt, dass das Medium über das Zellkompartiment hinaus in den Kopfraum der Flasche gedrückt wird. Die Luft im Kopfraum wird durch einen Sterilfilter im Flaschendeckel in den Brutschrank gedrückt. Wird der Balg entspannt, sinkt der Mediumpegel unter das Zellkompartiment und sterile Luft wird aus dem Brutschrank angesaugt. Auf dem Trägermaterial bleibt



Abbildung 3.1: Kultivierungssysteme für CHO hGH: a) BelloCell, b) miniPERM, c) Spinnerflasche, d) RCCS

Name	Spinnerflasche	RCCS	miniPERM	BelloCell
Hersteller	Techne	Synthecon	In Vitro Systems & Services	Cesco Bioengineering
Nutzraum [ml]	100	50	435	300
Kulturräum [ml]	100	50	35	73
Durchmischung	Rührer	Rotation	Rotation	Balg
Geschwindigkeit	20 U/min	12 U/min	20 U/min	1 mm/s up/down 10 s top/bottom delay

Tabelle 3.1: Aufteilung des Reaktorvolumens und Rührtechnik der verwendeten Kultivierungssysteme für die Kultivierung von CHO hGH. Der Nutzraum ist die Summe aus Zellraum und Mediumreservoir

nur eine dünne Flüssigkeitsschicht zurück, die einen schnellen Gastransfer von den Zellen zum Kopfraum gestattet. In dem Reaktor können sowohl adhärenente Zellen als auch Suspensionszellen kultiviert werden. In beiden Fällen werden die Zellen von der Matrix aufgenommen [52],[24].

3.2 Begleitanalytik

Einmal pro Tag wird eine Probe der Kultur genommen, da sich die Zellen alle 20 bis 24 Stunden teilen. Aus der Probe werden die Lebendzellzahl, Vitalität und die Konzentrationen von Glukose und Laktat bestimmt. Für die Bestimmung der t-PA- und hGH-Konzentrationen werden zellfreie Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und die Konzentration zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt. Zellfreie Proben werden durch Zentrifugation bei 400 g für 3 Minuten erhalten.

3.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Lebend- und Totzellzahl werden durch Färbung der Probe mit Trypan-Blau-Lösung bestimmt. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran nehmen keinen Farbstoff auf und erschei-

nen unter dem Lichtmikroskop weiß-gelb. Tote Zellen mit defekter Zellmembran werden durch den Farbstoff blau gefärbt. Die Zellzahl wird durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt (Mikroskop BX-41, Olympus, Hamburg, Deutschland). Sämtliche Zellzahlen in der Arbeit werden als Mittelwert aus drei Messungen angegeben. Die Standardabweichung der Zellzahl beträgt 7 % ($n = 3$).

3.2.2 Glukose- und Laktatkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt aus zellfreier Lösung mit dem Biochemistry Analyzer YSI 2700 Select (YSI Inc., Yellow Springs, USA). Das Gerät besitzt zwei Elektroden, die mit enzymhaltigen Membranen bestückt werden können. Glukoseoxidase und Laktatoxidase wandeln ihr Substrat unter Bildung von Wasserstoffperoxid in Gluconsäure und Pyruvat um. An den Elektroden wird Wasserstoffperoxid oxidiert. Die Stromstärke an der Elektrode ist proportional zur Substratkonzentration. Der relative Fehler einer Einzelmessung beträgt 5 %.

3.2.3 Bestimmung der t-PA-Konzentration

Die t-PA-Konzentration in Zellkulturüberständen und anderen Lösungen wird mit Hilfe des ELISA-Test-kits Imulyse (Biopool AB, Umea, Schweden) bestimmt. Dazu werden t-PA-Antikörper auf einer 96-Lochplatte immobilisiert. Nach mehreren Waschschritten wird 10 μ l Probe in 150 μ l Puffer aufgetragen. An gebundenem t-PA wird peroxidase-gelabelter Antikörper gebunden. Zur Detektion des Sandwich-Komplexes wird ein o-Phenylendiamin-Wasserstoffperoxid-Gemisch zugegeben. Bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid durch Peroxidase wird o-Phenylendiamin reduziert. Die Reduktion wird durch UV-Absorption bei 492 nm gemessen. Mit dem ELISA wird die Gesamtmenge von single- und double-chain t-PA gemessen. Der Messbereich beträgt 1,5 – 30 ng/ml t-PA. Der Fehler der Einzelmessung beträgt ca. 10 %. Weiterer t-PA-Standard wird von Boehringer-Ingelheim zur Verfügung gestellt bzw. bei Biopool gekauft.

3.2.4 Bestimmung der hGH-Konzentration

Auch die hGH-Konzentration wird mit einem ELISA gemessen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Bei diesem ELISA sind die Vertiefungen der 96-Lochplatte schon mit anti-hGH präpariert. Nach Bindung von hGH aus 200 μ l Probe wird an dieses hGH ein digoxigenin-gelabelter Antikörper (anti-DIG) gebunden. In einem weiteren Schritt wird ein anti-DIG-Fragment zugesetzt, das an Peroxidase gebunden ist. In diesem ELISA wird ABTS als Substrat für die Peroxidase benutzt. Die ABTS-Spaltprodukte absorbieren bei 405 nm. Die Referenzwellenlänge beträgt 490 nm. Der Messbereich beträgt 12,5 – 400 pg/ml hGH. Der Fehler der Einzelmessung beträgt ca. 8 %. Weiterer hGH-Standard wird bei Santa Cruz Biotechnology, Inc. gekauft (Santa Cruz, USA).

3.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Lösungen wird mit dem Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit von Pierce, Inc. gemessen (Rockford, USA). Bei der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 unter sauren Bedingungen erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Die Messung der Extinktion bei 595 nm wird mit einem 96-wellplate-reader (Benchmark, BIO-RAD, Inc., München, Deutschland) oder einem Küvettenphotometer (Uvikon 930, Kontron Instruments) durchgeführt. Die Kalibration von Proteingemischen erfolgt mit BSA, für Reinstoffe wird mit dem Standard kalibriert. Der Test wird durch Medienbestandteile, wie z.B. Serumersatzstoffe auf Lipidbasis, chelatisierende und reduzierende Reagenzien, gestört. Es können daher nur aufgereinigte Proben gemessen werden. Da die Absorption vom Aufbau des Proteins abhängig ist, kann die Proteinkonzentration eines Gemisches mit dem Test nur näherungsweise angegeben werden.

3.2.6 Aufkonzentrierung

Proben werden bei -80 °C eingefroren und in einer Lyophille (GeneVac SF50, Whatman Biometra GmbH i.L, Göttingen, Deutschland) gefrieretrocknet. Proben, bei denen Puffersalze zu stark aufkonzentriert worden sind, werden entsalzt.

3.2.7 Entsalzung

Probenmengen bis 0,5 ml werden mit Vivaspin 500-Einheiten (Sartorius Vivascience GmbH, Hannover, Deutschland) entsalzt. Die Entsalzung größerer Probenmengen erfolgt mit einer Vivaflow 500 crossflow-Einheit (Vivascience). Bei beiden Methoden beträgt die Ausschlussgröße 5000 MWCO. Sofern die Zusammensetzung der Probe für Bestandteile kleiner 5000 MWCO nicht für die Analytik interessant ist, erfolgt auch eine Aufkonzentrierung mit diesen Produkten. Daneben erfolgt die Entsalzung durch Dialyse in Dialyseschläuchen.

3.3 Immobilisierung von Antikörpern auf Epoxy-Disks

Aufgrund der hohen Reaktivität der Epoxygruppen auf der Diskoberfläche und der Vielzahl von Aminogruppen im Antikörper können die Antikörper ohne Verwendung eines Spacers auf der Oberfläche der Epoxy-Disk immobilisiert werden. Die Immobilisierung wird diffusionskontrolliert durchgeführt.

Zur Vorbereitung wird die Disk mit 20 ml 1:1 Ethanol/Reinstwasser und anschließend mit Reinstwasser gespült. Danach wird die Disk für zwei Stunden in einen Immobilisierungspuffer (50 mM Natriumcarbonat, pH 9,3) gelegt.

Die verwendete Menge Antikörper wird in 1 ml Immobilisierungspuffer gelöst und die Disk für 16 Stunden bei 30 °C in der Antikörperlösung gelagert. Nach der Immobilisierung wird

die Disk zum Entfernen ungebundener Antikörper zwei Stunden in Immobilisierungspuffer gelagert. Zur Blockierung verbleibender reaktiver Epoxygruppen wird die Disk eine Stunde in 1 M Ethanolamin-Lösung gelagert. Anschließend wird die Disk zum Waschen eine Stunde in PBS-Puffer (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7) gelegt. Die Aufbewahrung erfolgt in mit Natriumazid versetztem PBS-Puffer (10 mM, 150 mM NaCl, pH 7, 0,02 % Natriumazid).

Polyklonales anti-t-PA wird von Boehringer-Ingelheim zur Verfügung gestellt bzw. von Biopool gekauft. Monoklonale Antikörper gegen hGH stammen von Anogen (Anogen - YES Biotech Ltd., Mississauga, Kanada).

3.4 Gelelektrophorese

Für qualitative Aussagen über die Reinheit von Proben wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wird ein Phast-Gel System zur Entwicklung von 12,5%igen Polyacrylamidgelen benutzt (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). In der Anlage kann der Elektrophorese-Verlauf und die Entwicklung des Gels programmiert werden. Weiterhin wird ein Criterion-System (BIO-RAD) verwendet. Auch für dieses System werden vorgefertigte 12%ige Polyacrylamidgelen verwendet. Diese Gele werden manuell auf einem Schüttler gefärbt. Die entsprechenden Programme sind im Anhang in Abschnitt 6.2.2 auf Seite 63 aufgeführt.

3.5 HPMDC-Anlage

Das chromatographische System besteht aus einer Alliance 2696-Anlage (Waters Corp., Milford, USA), welche die Pumpen, Degaser und vier Vorlagen für Puffer enthält. Die Probenaufgabe erfolgt über eine externe 1-ml-Probenschlaufe an einem 6-Wege-Ventil (WellChrom Valve Drive K6, Knauer, Berlin, Deutschland). Als Säule wird ein CIM-Gehäuse mit einer CIM-Epoxy-Disk verwendet (BIA Separations, d.o.o., Ljubljana, Slowenien). Die Disk besitzt ein Volumen von 0,32 ml. Die Porosität beträgt 0,62 % [21]. Die Detektion der Proteine erfolgt mit einem Waters 474 Fluoreszenz-Detektor (Ex 295 nm, Em 350 nm, Waters Corp.). Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Chromatographie-Programm Andromeda 1.6 CSW (TECHLAB GmbH, Erkerode, Deutschland).

Alle Puffer werden mit Reinstwasser angesetzt, mit 0,22 µm-Filtern (Nalgene Bottle Top Filter MF75, Nalge Europe Ltd., Neerijse, Belgien oder Celluloseacetat-Flachfilter, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) filtriert und im Heliumstrom bzw. Ultraschallbad entgast. Die Zielproteine werden mit 0,01 M HCl eluiert. Die salzsauren Fraktionen werden in 50 mM Carbonat-Puffer pH 9,3 aufgefangen und bei -20 °C eingefroren. Eine Liste der verwendeten Puffer ist im Anhang 6.1 aufgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Versuche gliedern sich in mehrere Bereiche. Der erste Bereich umfasst die Kultivierungsversuche mit CHO t-PA und CHO hGH, mit denen Ausgangsmaterial für die Aufreinigung hergestellt wird, und anhand derer die Leistungen der verschiedenen Kultivierungssysteme untersucht wird. Der zweite Bereich, der Einsatz der HPMDc, besteht aus einem Versuchsteil zum Bindungsverhalten der unbeladenen Disk und Versuchen mit Modellproteinen. Der abschließende Versuchsteil behandelt die off-line-Analytik und Aufreinigung der Zellkulturüberstände.

4.1 Kultivierung von CHO t-PA

Mit Zellkulturüberständen von CHO t-PA soll später ausschließlich die Analytik und Aufreinigung mittels HPMDc untersucht werden. Dafür werden Überstände aus verschiedenen Chargen, unterschiedlichen Wachstumsphasen und Kulturen mit unterschiedlicher t-PA-Konzentration benötigt. Daher werden die Zellen in Spinnerflaschen unter den Bedingungen kultiviert, die in Abschnitt 3.1 auf Seite 13 beschrieben sind. Abbildung 4.1 auf Seite 4.1 zeigt eine typische Wachstumskurve von CHO t-PA und die t-PA-Konzentration im Zellkulturüberstand. Die Kultur wird mit $2,3 \cdot 10^5$ Zellen/ml angeimpft. Zwischen 22,5 und 65 Stunden durchläuft die Kultur die exponentielle Wachstumsphase. Die maximale Zellzahl beträgt $1,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Während der Kultivierung steigt die t-PA-Konzentration kontinuierlich bis $10,8 \mu\text{g/ml}$ an. Die t-PA-Konzentration beruht auf einer Einfachbestimmung mittels ELISA.

Um die Produktivität der Zelllinie zu erhöhen, wird der Selektionsdruck durch Erhöhung der MTX-Konzentration im Medium gesteigert. Trotzdem sinkt die maximale t-PA-Konzentration im Zellkulturüberstand, die im Verlauf mehrerer Jahre von der Zelllinie erreicht wird (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 4.2). Demnach werden diejenigen Zellen selektiert, bei denen in der Vergangenheit das DHFR-Gen im Vergleich zum t-PA-Gen überproportional amplifiziert wurde.

4.2 Kultivierung von CHO hGH

4.2.1 Amplifikation der hGH-Produktion

Die CHO hGH-Zelllinie ist noch keine Produktionszelllinie. Daher wird sie vor der Erstellung der Zellbank einer Selektion mit MTX unterworfen. Bei der Selektion wird die MTX-Konzentration stufenweise von 10 nM auf 100, 500 und schließlich auf 1000 nM MTX erhöht. Zwischen den schrittweisen Erhöhungen wird solange gewartet, bis die maximale hGH-Konzentration in der stationären Phase der Kultivierung bei ähnlicher Zellzahl ($1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml) ein Plateau erreicht. Abbildung 4.3 auf Seite 4.3 zeigt die maximale hGH-Konzentration, dargestellt als

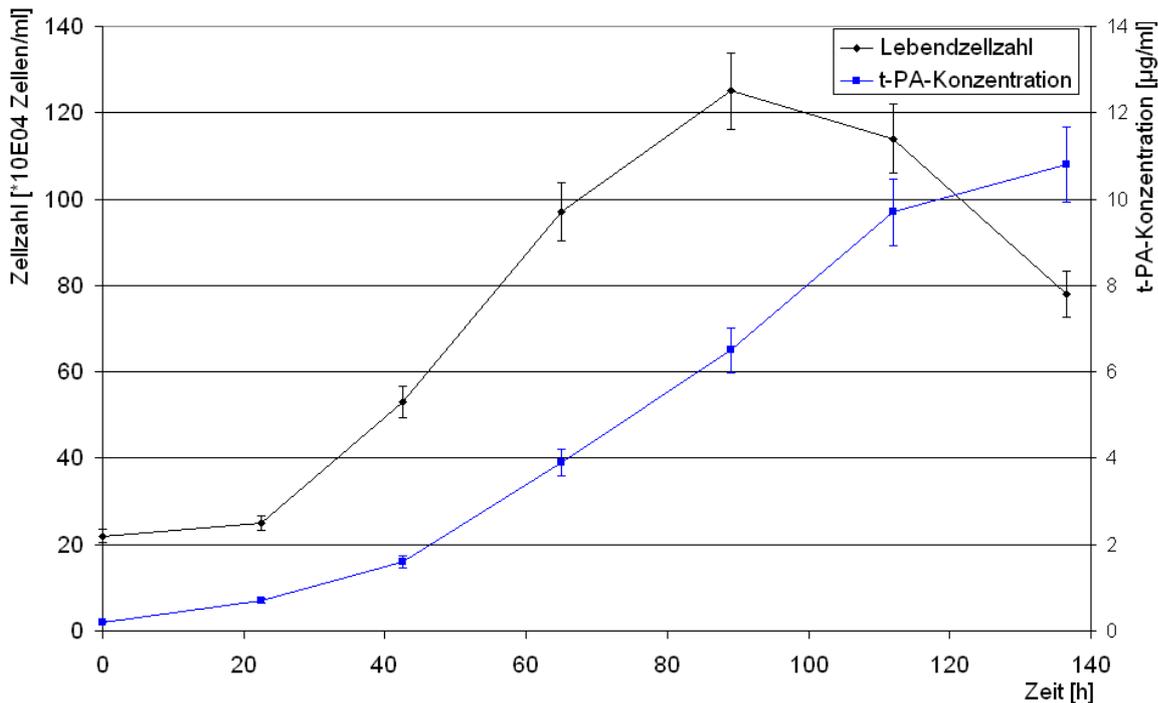


Abbildung 4.1: Typische Lebendzellzahl und t-PA-Konzentration im Zellkulturüberstand einer CHO t-PA-Kultur in einer Spinnerflasche. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Messungen.

Mittel von zwei Kulturen, und die dabei verwendete MTX-Konzentration im Medium für jede Umsetzung.

Die maximale hGH-Konzentration im Zellkulturüberstand des Ursprungsklons beträgt 15,0 – 16,4 $\mu\text{g/ml}$ hGH. Über die Amplifikation wird die Konzentration im ersten Schritt auf 21,0, dann auf 28,1 und schließlich auf 33,4 $\mu\text{g/ml}$ hGH gesteigert. Dies entspricht einer Steigerung auf 200 – 220 %. Die hGH-Bildungsrate kann von 1,24 auf 2,8 $\mu\text{g}/(\text{d} \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ gesteigert werden, gleichzeitig erhöht sich die Generationszeit der Kultur von 0,85 d^{-1} auf 1,2 d^{-1} . Für Kultivierungsversuche wird die MTX-Konzentration auf 10 nM MTX gesenkt, weil durch einen hohen Selektionsdruck vor allem die DHFR-Produktion forciert wird um die Überlebensfähigkeit der Zelle zu sichern, nicht die hGH-Produktion, die ihrerseits keinen Selektionsvorteil bietet.

4.2.2 Kultivierung in verschiedenen Kultivierungssystemen

Für die Stammkultivierung von Zellen und zur Produktion von rekombinanten Produkten für den wissenschaftlichen Laborbedarf werden oft einfachste Kultursysteme verwendet. Bei der Kultivierung von Suspensionszellen werden meist Spinnerflaschen verwendet, die nach Gebrauch gesäubert und sterilisiert werden, um sie erneut zu verwenden. Um den Vor- und

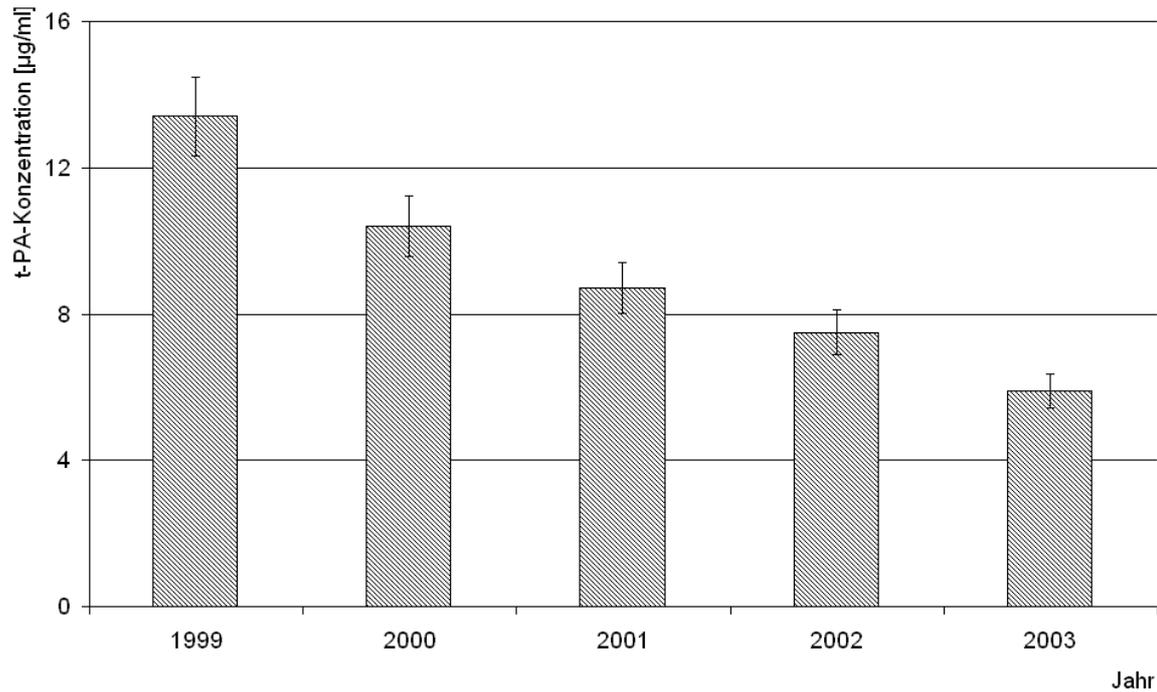


Abbildung 4.2: Maximale t-PA-Konzentration im Zellkulturüberstand vom CHO t-PA-Kulturen für jedes Jahr. Gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der fünf höchsten t-PA-Konzentrationen in dem Jahr.

Nachbereitungsaufwand zu sparen, werden verstärkt Einwegreaktoren auf den Markt gebracht (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 7). Für Angaben zu den verwendeten Reaktoren (Name, Unterscheidungsmerkmale, Umdrehungsgeschwindigkeiten etc.) sei auf Tabelle 3.1 auf Seite 15 verwiesen. Diese Versuche werden mit der Zelllinie CHO hGH durchgeführt.

4.2.3 Wachstum in verschiedenen Kultursystemen

Die CHO hGH-Kulturen werden mit einer Zellzahl von 100.000 Zellen/ml angesetzt. Für den BelloCell ist das Zellkompartiment von 73 ml die Bezugsgröße. Die Zellen werden mit konstanter Rührgeschwindigkeit nach Empfehlung des Herstellers kultiviert (siehe Tabelle 3.1 auf Seite 15).

Mit Ausnahme des BelloCell 300 liegen die Zellen suspendiert vor und es ist eine direkte Zellzählung mit Trypan-Blau-Lösung möglich. Beim BelloCell werden die Zellen von Fasern zurück gehalten, daher ist während der Kultivierung nur eine Abschätzung der Zellzahl über die Glukoseverbrauchsrate möglich. Die spezifische Glukoseverbrauchsrate wird dafür aus Zellkulturen in Spinnerflaschen bestimmt. Am Ende der Kultivierung können dem BelloCell 300 alle Zellen entnommen und eine direkte Zellzählung durchgeführt werden.

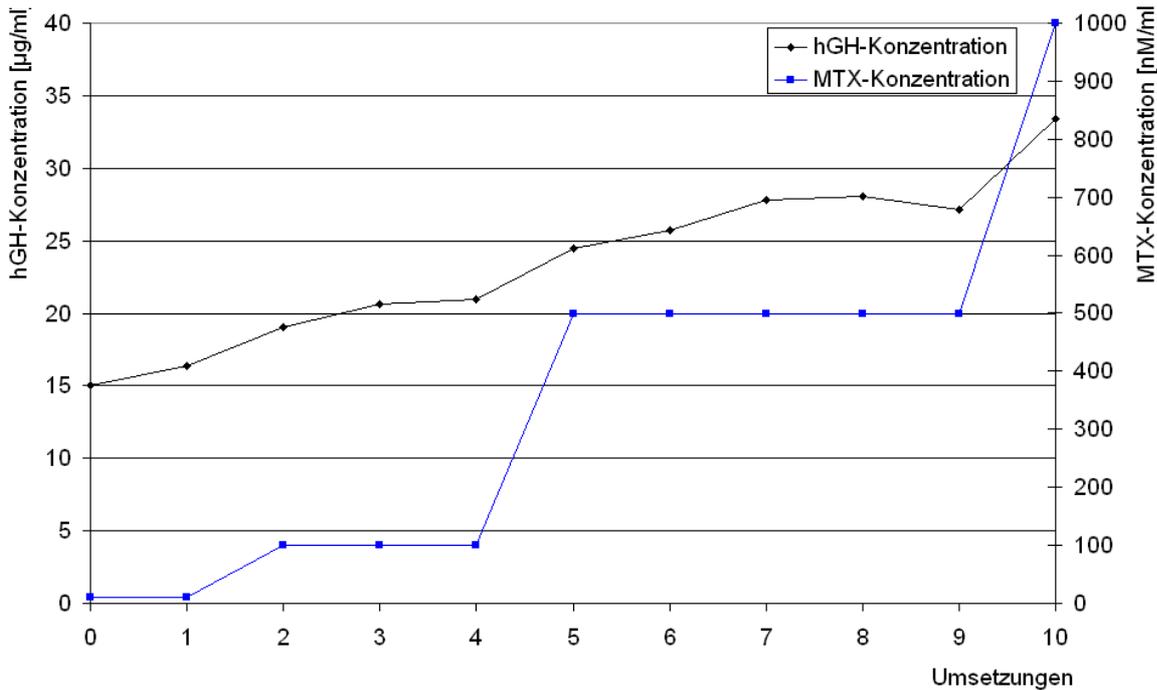


Abbildung 4.3: Steigerung der hGH-Konzentration im Zellkulturüberstand durch Selektion mit MTX. Die MTX-Konzentration wird stufenweise erhöht, sobald die t-PA-Konzentration im Überstand bei konstanter MTX-Konzentration nicht mehr steigt.

Das langsamste Wachstum wird in der Spinnerflasche beobachtet (Abbildung 4.4 auf Seite 23). Die Kultur tritt nach 80 Stunden in die exponentielle Wachstumsphase ein und erreicht eine maximale Zellzahl von $1,06 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

Im miniPERM und RCCS werden ähnliche Zellzahlen gemessen ($2,27 - 2,41 \cdot 10^6$ Zellen/ml). Die lag-Phase der Kultur ist im RCCS jedoch um 30 Stunden kürzer, d.h. die Zellen können sich schneller an die Kultivierungsbedingungen anpassen. Dafür wird das Wachstum durch den Nährstoffverbrauch früher limitiert. In diesem Fall heben sich die Vor- und Nachteile auf. In beiden Reaktoren wachsen die Kulturen aufgrund des erhöhten Gasaustausches im Vergleich zur Spinnerflasche besser.

Das schnellste Wachstum wird im BelloCell beobachtet. Nach 45 Stunden vervierfacht sich die Zelldichte alle 20 Stunden. Dies ist wahrscheinlich ein Messartefakt, das auf der abweichenden spezifischen Glukoseverbrauchsrate der Zellen in Spinnerflasche und BelloCell beruht. Die Bestimmung der Zelldichte am Ende der Kultivierung mit Trypan-Blau-Lösung bestätigt jedoch die maximale Zelldichte von $7,73 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Das Verhältnis Gasaustauschfläche zu Mediumvolumen kann nicht bestimmt werden. Aufgrund des „Trockenfallens“ des Zellraumes sollte es jedoch wesentlich höher als bei den anderen Kultivierungssystemen sein. Zusammen mit dem hohen Mediumreservoir ist dies die Ursache für das schnelle Wachstum.

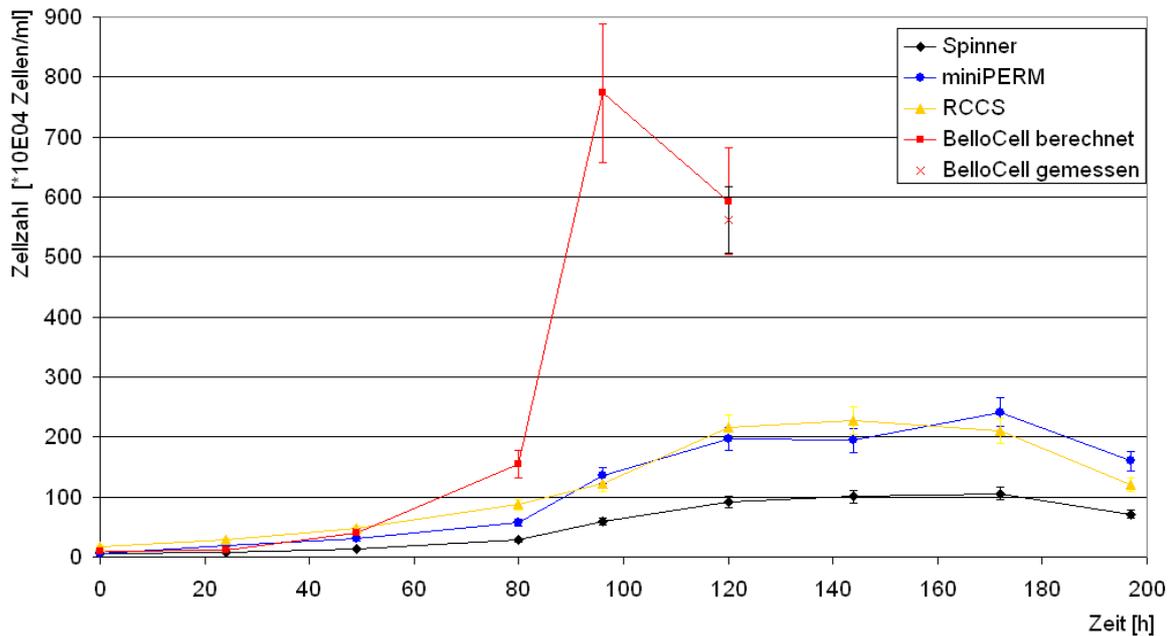


Abbildung 4.4: Lebendzellzahl von CHO hGH bei Kultivierung in unterschiedlichen Kultivierungssystemen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen. Im RCCS, miniPERM und in der Spinnerflasche wird die Zellzahl durch Zählung nach Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Im BelloCell wird die Zellzahl aus dem spezifischen Glukoseverbrauch der Zellen gemessen. Am Ende der Kultivierung wird die Lebendzellzahl im BelloCell durch Trypan-Blau-Färbung kontrolliert (\times).

Aufgrund der hohen Zelldichten im BelloCell erfolgt ein schneller Übergang von der stationären Phase des Wachstums in die Absterbephase. Um wenigstens eine repräsentative Lebendzellendichte mit Trypan-Blau bestimmen zu können, wurde die Kultivierung des BelloCell frühzeitig abgebrochen. Die Zellen wurden aus dem Trägermaterial gelöst und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Berechnung der spezifischen Glukoseverbrauchsrate in den Kultivierungssystemen bestätigt den Vorteil des Mediumreservoirs für den Stoffwechsel der Zellen (siehe Abbildung 4.5 auf Seite 24). In den Kultursystemen ohne Mediumreservoir steht den Zellen weniger Glukose zur Verfügung und die Glukoseverbrauchsrate sind geringer. Nach 120 Stunden können die Zellen in der Spinnerflasche und im RCCS kaum noch Glukose aufnehmen ($1,9 - 5,4 \cdot 10^{-7}$ mg Glukose/(Tag \cdot Zelle)). Im miniPERM nehmen die Zellen noch $2,2 \cdot 10^{-7}$ mg Glukose/(Tag \cdot Zelle) auf. Ein Vergleich mit Abbildung 4.4 zeigt jedoch, dass dies im Vergleich zum RCCS nicht zu einem besseren Wachstum führt, sondern Effekte auf andere Stoffwechselwege haben muss. Für den BelloCell kann keine spezifische Glukoseverbrauchsrate berechnet werden, da für die Versuche vorausgesetzt wurde, dass der spezifische Glukoseverbrauch im BelloCell und in der Spinnerflasche gleich sind.

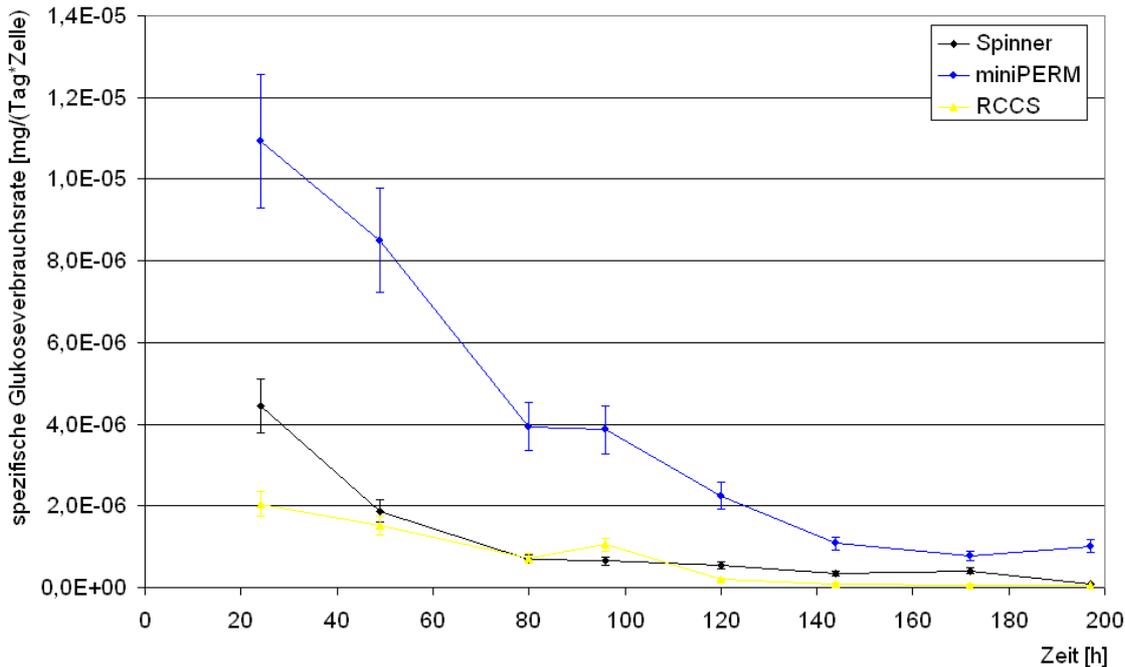


Abbildung 4.5: Spezifische Glukoseverbrauchsrate der CHO hGH-Zellen in der Spinnerflasche, im RCCS und im miniPERM, basierend auf den Daten in Abbildung 4.4. Für den BelloCell kann keine spezifische Glukoseverbrauchsrate berechnet werden.

4.2.4 Produktion von hGH in den Kultivierungssystemen

Neben dem Einfluss der Reaktorsysteme auf das Wachstum soll zusätzlich der Einfluss auf die hGH-Produktion untersucht werden. Dabei ist zu beachten, dass im miniPERM die Membran zwischen Zellraum und Mediumreservoir für hGH nicht permeabel ist (MWCO 12,5 kDa). In den anderen Systemen wird die hGH-Konzentration für das gesamte Volumen bestimmt. Für die Auswertung wird daher die produzierte Menge hGH pro 100 ml Produktlösung gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abbildung 4.6 auf Seite 25). Die höchste Ausbeute pro 100 ml Produktlösung erreicht der RCCS mit 7,0 mg hGH, gefolgt von 2,4 mg hGH in der Spinnerflasche. Der BelloCell und miniPERM zeigen eine Ausbeute von 1,6 bzw. 1,8 mg hGH. Über die Ausbeute pro Volumen lässt sich aber keine umfassende Bewertung der Zellkultursysteme abgeben. So wird pro Ansatz im BelloCell aufgrund seines größeren Volumens mit 6 mg hGH am meisten produziert. Die anderen Reaktoren besitzen eine Ausbeute von weniger als 3 mg hGH/Ansatz. Der Arbeitsaufwand ist mit dem BelloCell entsprechend geringer. Die Raum-Zeit-Ausbeute für die großtechnische Produktion ist für diese Systeme nebensächlich.

Der Einfluss der verfügbaren Menge an Glukose wurde schon in Abschnitt 4.2.3 angesprochen. Dies zeigt sich erneut in der spezifischen hGH-Produktionsrate (siehe Abbildung 4.7 auf Seite 26). Die spezifische Produktionsrate der Zellen erreicht im miniPERM und in der

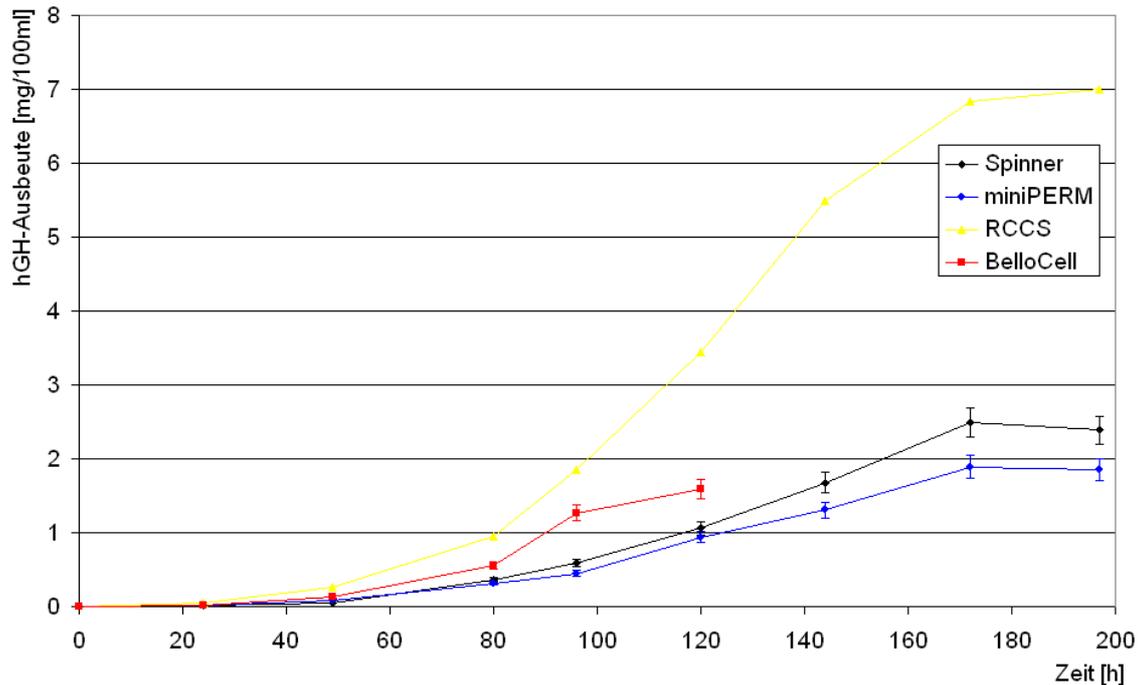


Abbildung 4.6: Produzierte Menge hGH in den verschiedenen Systemen, normiert auf 100 ml Produktlösung. Es erfolgt eine Doppelbestimmung der hGH-Konzentration mittels HPMDC.

Spinnerflasche bei 80 Stunden das Maximum und bleibt danach über einen längeren Zeitraum konstant (6,2 bzw. 4,2 $\mu\text{g}/(\text{Tag} \cdot 10^6 \text{ Zellen})$). Die Produktionsrate erreicht im RCCS 20 Stunden später das Maximum und sinkt bis zum Ende der Kultivierung kontinuierlich ab. Die höchste Produktionsrate wird im BelloCell gemessen. Sie ist in den ersten 50 Stunden um den Faktor 6 größer als in den anderen Kultursystemen. Nach 50 Stunden fällt die Produktionsrate von 23,0 $\mu\text{g}/(\text{Tag} \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ bis zum Ende der Kultivierung bis auf 2,4 $\mu\text{g}/(\text{Tag} \cdot 10^6 \text{ Zellen})$ stark ab. Dieser große Unterschied in der Produktionsrate lässt sich am ehesten mit der unterschiedlichen Durchmischung der Zellen bzw. mit der Durchströmung des Zellkompartiments des BelloCell erklären. Von adhärennten Zellen ist zumindest bekannt, dass die Überströmung mit Medium einen Einfluss auf die Sekretion von Stoffwechselprodukten besitzen kann [15]. Die durchschnittlich geringere Produktionsrate im miniPERM bei hohem Glukoseverbrauch und der starke Abfall der Produktionsrate im BelloCell deuten darauf hin, dass die Produktion von hGH unter Glukoselimitierung im fed-batch-Betrieb durchgeführt werden sollte. Vermutlich wird unter diesen Versuchsbedingungen der Vorteil des Mediumreservoirs nicht ausgenutzt.

Die Verwendung der CHO hGH-Zellen stellt keinen Anspruch auf ein allgemein gültiges Testsystem für die Bioreaktortechnik. Trotzdem zeigen die Versuche, dass mit den alternativen Kultivierungssystemen zur Spinnerflasche das Wachstum der Zellen und die Produktausbeute gesteigert wird. Eine weitere Steigerung der Ausbeuten ist sehr wahrscheinlich durch die

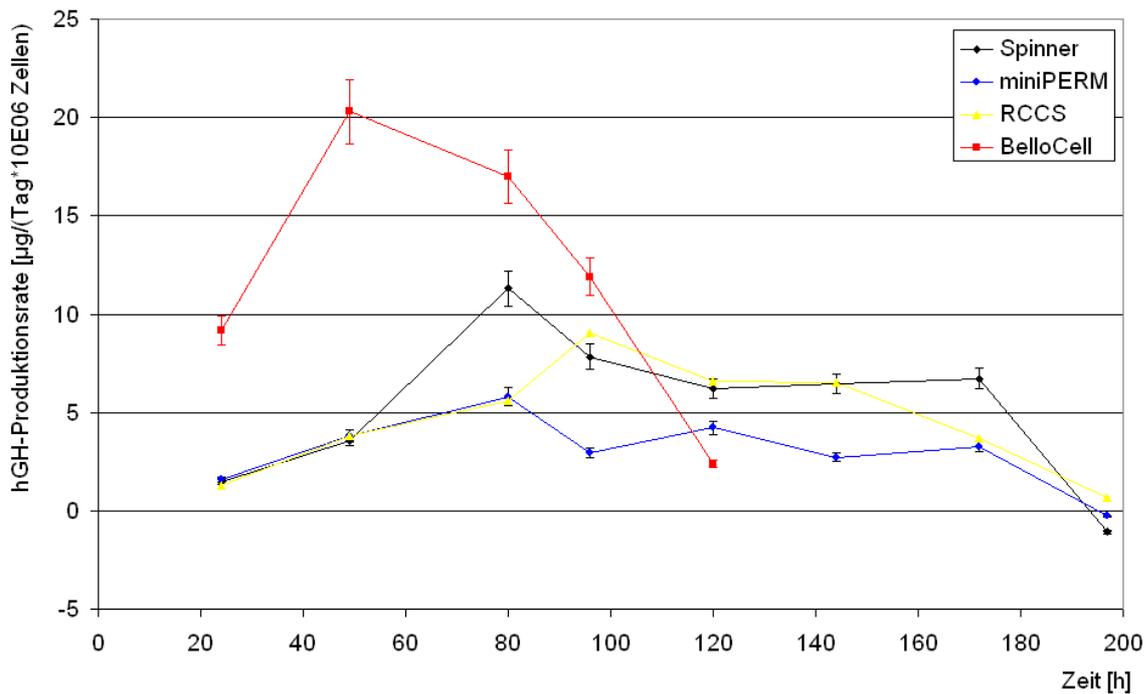


Abbildung 4.7: Spezifische hGH-Produktionsrate der CHO hGH-Zellen in den verschiedenen Kultivierungssystemen, basierend auf den Daten in Abbildung 4.6.

Optimierung der Kultivierungsbedingungen möglich, die in einem nächsten Schritt erfolgen soll. Betrachtet man allein die Zell- und Produktausbeute, ist das viel versprechendste System der BelloCell 300. Die Verwendung dieses Systems bedeutet allerdings ein Wechsel von der Produktion in Suspensionszelllinie zur Produktion in adhärenzte Zelllinien. Über einen langen Versuchszeitraum ist mit morphologischen Veränderungen der Suspensionszelllinie zu rechnen.

4.2.5 Einfluss der Kultivierungstemperatur

Der Einfluss der Temperatur auf die hGH-Produktion der verwendeten Zelllinie wurde von Fabienne Anton im Rahmen ihrer Diplomarbeit untersucht [3]. Sie konnte zeigen, dass in Spinnerflaschen mit sinkender Kultivierungstemperatur die mittlere spezifische Produktbildungsrate steigt. Aufgrund einer längeren Wachstumsphase stieg die maximale hGH-Konzentration im Medium trotz sinkender Wachstumsrate an (siehe Abbildung 4.8 auf Seite 27). Die Ergebnisse sind, ergänzt um die mittels HPMDC berechnete Konzentration, in Tabelle 4.1 auf Seite 27 zusammengefasst. Die höchste Raum-Zeit-Ausbeute kann durch die Kultivierung bei 34°C erzielt werden. Mit der HPMDC werden in allen Fällen höhere Konzentrationen berechnet, jedoch lassen sich die Unterschiede zwischen ELISA und HPMDC durch die Messfehler beider Methoden erklären. Dies zeigt, dass die HPMDC für die Analytik unterschiedlicher Chargen geeignet ist.

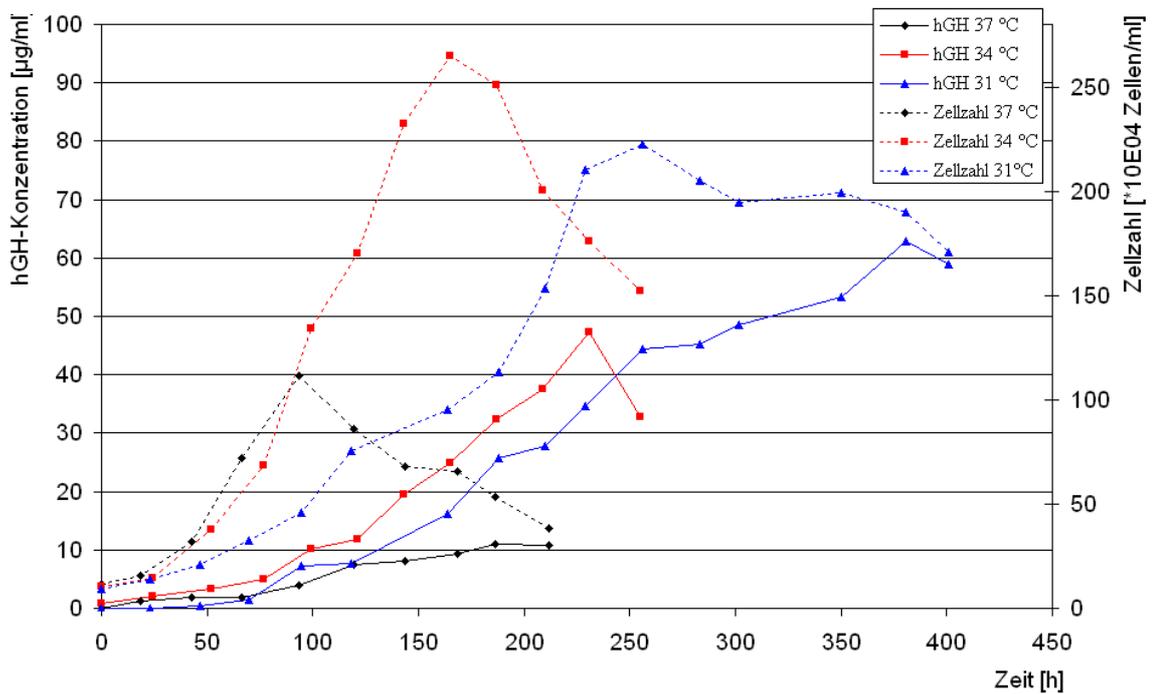


Abbildung 4.8: Zellzahl und hGH-Konzentration bei Kultivierung von CHO hGH in Spinnerflaschen bei 31°C, 34°C und 37°C.

Temperatur [°C]	hGH-Konzentration	hGH-Konzentration	mittlere spezifische Produktbildungsrate [µg/(10 ⁶ Zellen·Tag)]
	ELISA [µg/ml]	HPMDC [µg/ml]	
37	10,7	11,3	3,23
34	47,2	52,7	5,11
31	62,8	70	3,88

Tabelle 4.1: Übersicht über die maximale hGH-Konzentration im Zellkulturüberstand und die mittlere spezifische Produktbildungsrate in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur [3]. Die hGH-Konzentration wird mittels ELISA und HPMDC gemessen. Die Berechnung der Produktbildungsrate erfolgt anhand der Daten des ELISA.

4.2.6 Kultivierung von CHO K1 im BelloCell

Um die Leistung des BelloCell zu überprüfen, wird die Zelllinie CHO-K1 in dem System kultiviert. Da die Zelllinie keinen interessanten Sekundärmetaboliten sekretiert, erfolgt die Charakterisierung anhand des Zellwachstums. Das Zellwachstum wird über den Glukoseverbrauch der Kultur kontrolliert. Für die Bestimmung der spezifischen Glukoseaufnahme der Zellen werden mehrere Monolayerflaschen mit Zellen angeimpft. 25 % des Mediums werden täglich durch frisches Medium ersetzt, damit das Zellwachstum nicht durch die Glukosekonzentration

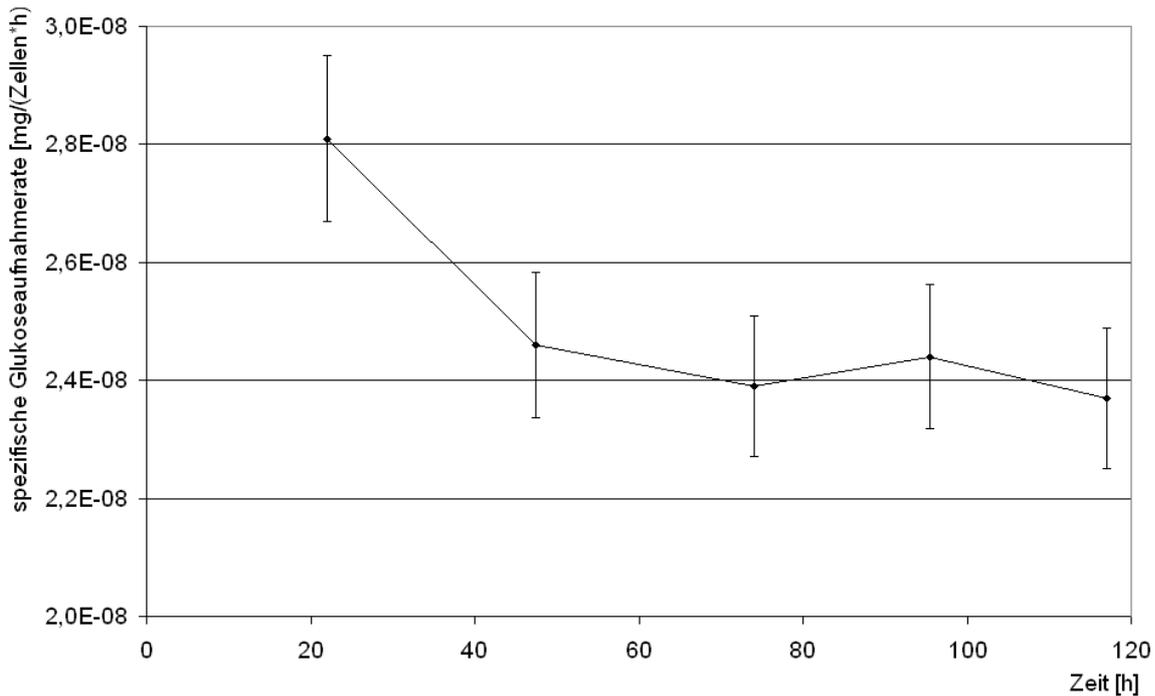


Abbildung 4.9: Abhängigkeit der spezifischen Glukoseaufnahmerate von CHO-K1-Zellen in Monolayerflaschen bei nicht-limitiertem Wachstum.

limitiert wird. Die Glukosekonzentration wird vor und nach dem Mediumwechsel gemessen, um den Glukoseverbrauch zu berechnen. Pro Tag wird eine Monolayerflasche trypsiniert und die Zellzahl mittels Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Die Berechnung der Aufnahmerate erfolgt unter der Annahme, dass die Kulturen gleich schnell wachsen. Die spezifische Glukoseaufnahmerate sinkt nach 40 Stunden von $2,91$ auf $2,46 \cdot 10^{-8} \text{g}/(\text{Zelle} \cdot \text{h})$ und bleibt danach über den Versuchszeitraum konstant (siehe Abbildung 4.9). Die Aufnahmerate wird auf die Kultivierung im BelloCell übertragen. Eine konstante Aufnahmerate erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die berechnete Zellzahl im BelloCell der tatsächlichen Zellzahl entspricht.

Für den Vergleich werden Rollerflaschen und BelloCell mit 10.000 Zellen/ml angeimpft. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass das Wachstum in der Rollerfläche nicht durch die Glukosekonzentration limitiert ist (Daten nicht gezeigt). Daher wird die Rollerflasche als Batch-Reaktor mit 200 ml Medium und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 6 Upm betrieben. Der BelloCell kann über Luer-Lock-Anschlüsse mit zwei Peristaltikpumpen als Perfusionsreaktor benutzt werden. Aufgrund der Hubbewegung des Mediums und der Lage der Luer-Lock-Anschlüsse kann das Medium nicht kontinuierlich abgeführt werden (siehe Abbildung 4.10, Seite 29)¹. Die Abflussrate muss daher größer als die Zuflussrate des Mediums sein, um ein Überlaufen des Reaktors zu verhindern. Bis zum fünften Tag wird mit $0,3$ ml/min zugepumpt

¹ Mittlerweise ist ein Perfusionssystem erhältlich, bei dem die Lage der Anschlüsse verändert wurde



Abbildung 4.10: Lage der Luer-Lock-Anschlüsse am BelloCell für den Perfusionsbetrieb

und mit 2 ml/min abgepumpt. An Tag 5 und 6 wird die Flussrate auf 0,6 und 4 ml/min erhöht. Als Vergleich wird ein BelloCell als fed-batch-Reaktor betrieben. Der Mediumwechsel erfolgt einmal pro Tag am 3., und 4. Tag, und zweimal täglich am 5. und 6. Tag.

Die Entwicklung der Zelldichte zeigt, dass die Zellen im BelloCell sowohl im Perfusions- als auch im fed-batch-Betrieb schneller als in der Rollerflasche wachsen (siehe Abbildung 4.11 auf Seite 30). Die maximale Zelldichte beträgt im BelloCell $4,6 - 4,9 \cdot 10^5$ Zellen/cm². Im Perfusionsbetrieb bleibt die Zelldichte bis zum Ende der Kultivierung konstant. Die Limitierung wird vermutlich durch Erreichen der Konfluenz auf den Fasern des Zellkompartiments hervorgerufen. Dies entspricht einer Zelldichte von $5,6 \cdot 10^7$ Zellen/ml bezogen auf den Zellraum. Die mittels Trypan-Blau-Lösung bestimmte Zellzahl am Ende der Kultivierung bestätigt die berechnete Zellzahl für den Perfusionsbetrieb und zeigt auch für den fed-batch-Betrieb die vermutete Limitierung des Wachstums. Dagegen wird in der Rollerflasche keine Konfluenz und eine maximale Zelldichte von $3,4 \cdot 10^5$ Zellen/cm² erreicht. Wie bei der Kultivierung von CHO hGH (Abschnitt 4.2.3 auf Seite 21) kann auch in diesem Fall das Wachstum der Zelllinie durch Verwendung des BelloCell deutlich gesteigert werden.

4.3 Herstellung und Charakterisierung der Antikörper-Disks

4.3.1 Bindungscharakteristika der Epoxy-Disk

Um die Bindung von Proteinen auf dem Trägermaterial ohne Einfluss der Antikörper zu untersuchen, wird eine Epoxy-Disk für zwei Stunden in verdünnter Schwefelsäure gekocht, um die Epoxygruppen zu hydrolysieren. Die Untersuchung erfolgt anhand des Probenauftrags von Reinsubstanzen der Medienbestandteilen und der rekombinanten Proteine. Als Modell für alle weiteren Proteine, die von den CHO-Zellen produziert werden, wird BSA verwendet. Es werden Proben mit einer Konzentration von 10, 15 und 20 µg/ml t-PA sowie 5, 7,5 und 10 µg/ml hGH injiziert und eluiert. Untersuchungen mittels Gelelektrophorese und ELISA zeigen, dass

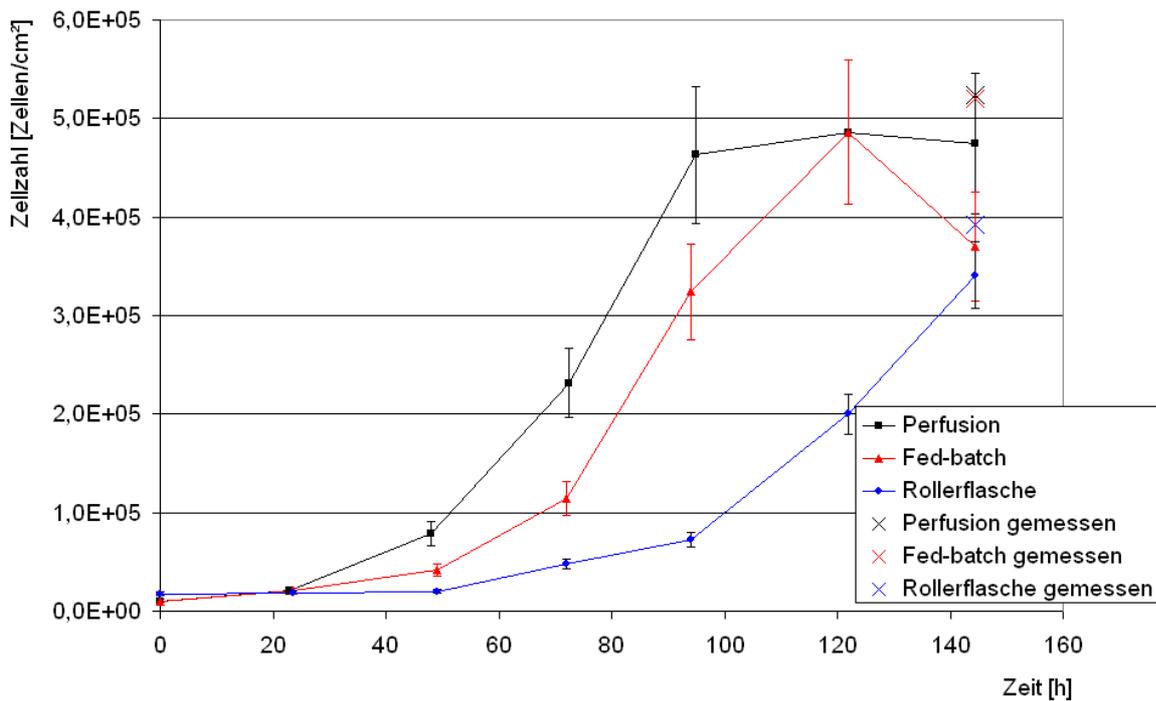


Abbildung 4.11: Zellzahl von CHO-K1 im BelloCell im Perfusions- und Fed-batch-Betrieb des BelloCell im Vergleich zur Zellzahl in der Rollerflasche. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt anhand des Glukoseverbrauches der Kulturen. Das Wachstum erfolgt unter nicht-glukoselimitierten Bedingungen.

weder t-PA und hGH an der Diskoberfläche vor Immobilisierung der Antikörper binden. Auch Transferrin und Insulin als Inhaltsstoffe des Mediums binden bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht auf der Oberfläche. Lediglich bei Konzentrationen von über 10 mg/ml bindet BSA zu einem geringen Teil (ca. 2 % der aufgetragenen Menge) (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Immobilisierung von Antikörpern

Für die Versuche zur Aufreinigung der Proteine werden Antikörper gegen t-PA und hGH auf Epoxy-Disks immobilisiert. Die Versuchsbedingungen sind in Kapitel 3.3 auf Seite 17 beschrieben. Die Menge immobilisierter Antikörper wird aus der Konzentration der Antikörper in der Lösung vor und nach der Immobilisierung berechnet. Die Konzentration der Antikörper wird aus der Absorption der Lösung bei 280 nm ermittelt. Die Messergebnisse werden durch den Lowry-Test bestätigt. Der Nachweis erlaubt jedoch keine Aussage über die Struktur oder Orientierung des Antikörpers auf der Diskoberfläche nach der Bindung.

In Tabelle 4.2 auf Seite 31 sind die verwendeten Antikörper, die Konzentration der Antikörperlösung und die resultierende Ligandendichte q auf der Oberfläche der Disk zusammengefasst. Die Ligandendichte von anti-t-PA ist unabhängig von der Konzentration der Antikörper-

Antikörper gegen	Firma	Gewicht [kDA]	Konzentration der Beladungslösung [mg/ml]	q_{immobil}	q_{immobil}
				[mg/Disk]	[nmol/ml Disk]
t-pA	Boehringer- Ingelheim	150	5	1,16	22,7
			3	1,25	24,6
			1,5	1,17	22,9
	Biopool	140	1,5	1,14	22,3
hGH	Anogen	150	1,5	1,37	26,8
			1	1,0	19,6

Tabelle 4.2: Abhängigkeit der Ligandendichte verschiedener Antikörper von der Immobilisierungskonzentration.

lösung im Bereich von 1,5 - 5 mg/ml. Die Ligandendichte beträgt 22,3 bis 24,6 nmol/(ml Disk). Mit 7 mg/ml anti-t-PA konnte RENEMANN hingegen schon 32 nmol/(ml Disk) immobilisieren [44].

Bei Verwendung von 1,5 mg anti-hGH/ml werden 26,8 nm/Disk immobilisiert. Bei der Immobilisierung mit 1 mg/ml anti-hGH wird nach der Immobilisierung die untere Nachweisgrenze der Absorption erreicht, sodass davon ausgegangen wird, dass der Antikörper vollständig gebunden hat.

4.3.3 Bindungsverhalten der Antikörper-Disk

Zur Ermittlung der Spezifität der Affinitätsdisk wird die Disk mit verschiedenen Proteinlösungen beaufschlagt und überprüft, ob diese spezifisch auf der Antikörper-Disk binden. Für den Versuch werden 1 ml Proben von Transferrin-, Lactoferrin-, BSA-, Insulin-, Fibrinogen- und Myoglobin-Lösungen verwendet. Insulin und Transferrin sind Medienbestandteile, die anderen Proteine stehen stellvertretend für diejenigen Proteine, welche die Zellen produzieren. Die Konzentration wird stufenweise von 10 auf 50 mg/ml erhöht. Bindung von 2-4 % der angebotenen Menge tritt nur bei Konzentrationen über 10 mg/ml BSA und 40 mg/ml Transferrin auf (Daten nicht gezeigt). Da die Insulin- und Transferrin-Konzentration im Medium geringer als 10 µg/ml ist, muss mit der Koelution dieser Proteine nicht gerechnet werden.

4.4 HPMDC mit t-PA

4.4.1 Kalibration der Disk mit t-PA-Standard

Bindet t-PA spezifisch mit der Antikörper-Disk, kann die Berechnung der t-PA-Konzentration der Probe anhand der Peakfläche oder der Peakhöhe des Elutionspeaks erfolgen. Welche Größe besser für die Berechnung geeignet ist, soll anhand einer Kalibrationsgeraden ermittelt

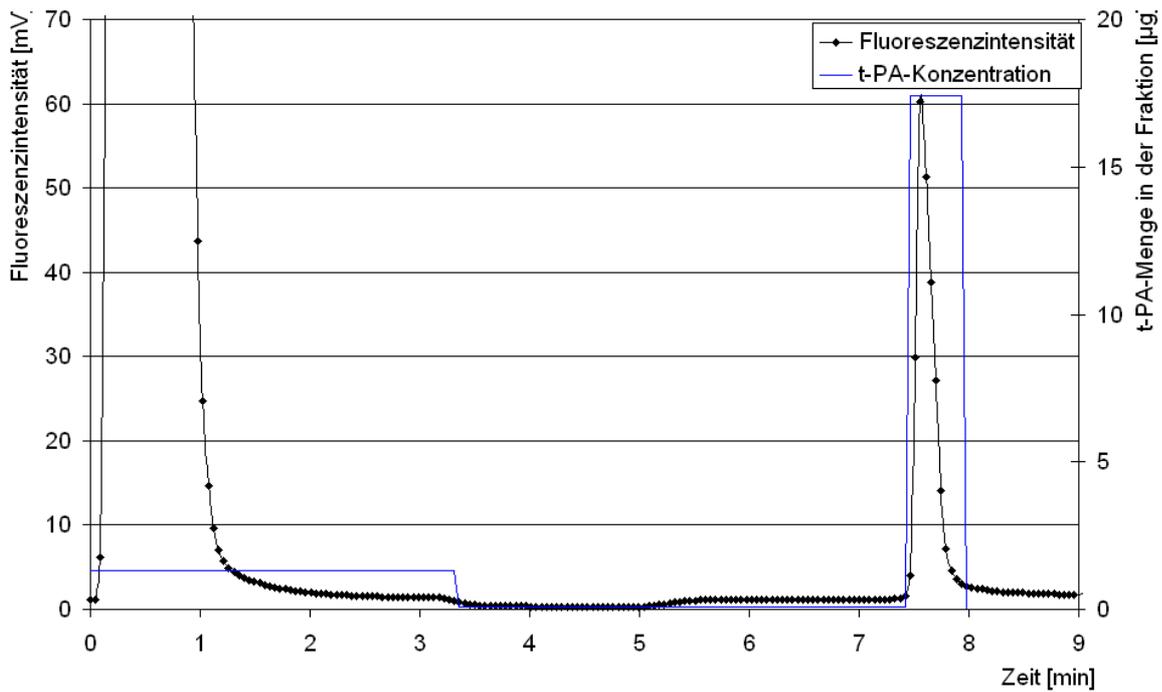


Abbildung 4.12: Das Chromatogramm von 20 µg t-PA in BioPro 1 zeigt den Peak der nicht-bindenden Medienbestandteile (0-3,5 min) und den t-PA-Peak (7,4-7,9 min). Unspezifisch gebundene Substanzen werden nicht detektiert (3,5-5,5 min).

werden. Dazu wird t-PA in BioPro 1-Medium gelöst und auf die Disk aufgetragen. Abbildung 4.12 zeigt das Chromatogramm einer 1 ml Probe BioPro 1-Medium mit 20 µg t-PA. Für den Versuch wurde eine Disk mit Antikörpern und t-PA-Standard von Boehringer-Ingelheim verwendet. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität und die t-PA-Menge in den gesammelten Fraktionen. Die Flussrate beträgt 2 ml/min und für die Kalibration wird das Elutionsprofil aus Tabelle 4.3 benutzt.

Nicht-gebundene, fluoreszenzaktive Bestandteile passieren in den ersten drei Minuten des Laufes den Detektor. Der Detektor zeigt dabei die maximale Intensität (1013 mV) an. Eine Desorption unspezifisch gebundener Substanzen mit 2 M NaCl ($t = 3,5 - 5,5$ min) ist nicht zu erkennen. Die Reinsubstanz eluiert nach 7,4 Minuten und wird in einer 0,9 ml großen Fraktion erhalten.

Zeit [min]	0-2,5	2,5-4,5	4,5-6	6-8,5	8,5-10
Eluent	A	B	A	C	A

Tabelle 4.3: Verwendete Eluenten bei der Kalibration der anti-t-PA-Disk. A: Wasch- / Equilibrierungspuffer; B: Desorption unspezifisch gebundener Substanzen; C: Desorption spezifisch gebundener Substanzen

In der Fraktion der nicht-bindenden Substanzen werden 1,3 µg t-PA mit dem ELISA nachgewiesen. 0,5 µg t-PA werden in der Waschfraktion und in der NaCl-Fraktion detektiert, 12,3 µg t-PA in der Elutionsfraktion. Dies ergibt eine Ausbeute von 87 %. Bei Versuchen mit t-PA in PBS wird kein t-PA in der Fraktion der nicht-bindenden Substanzen gefunden. Das heisst, bei einem Teil des t-PA wird die Bindungsstelle zum Antikörper durch Medienbestandteile blockiert oder Medienbestandteile binden kompetitiv mit dem Antikörper.

Für die Kalibration werden Proben mit Konzentrationen von 0 bis 15 µg/ml t-PA benutzt, da Vorversuche gezeigt haben, dass die Zelllinie bis zu 15 µg/ml t-PA in batch-Kulturen produziert. Abbildung 4.13 auf Seite 34 zeigt die Abhängigkeit der Peakfläche und Peakhöhe des Elutionspeaks von der t-PA-Konzentration. Bei beiden Größen findet man einen linearen Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration ab 2 µg/ml. Die Standardabweichung beider Messreihen beträgt für Konzentrationen größer 2 µg/ml ca. 4 %. Somit ist die Bestimmung der t-PA-Konzentration sowohl über die Peakfläche als auch über die Peakhöhe möglich. Über längere Versuchszeiträume zeigt sich jedoch, dass die Peakhöhe stärker variiert, sodass die Bestimmung der Konzentration über die Peakfläche erfolgt. Die Versuche zeigen weiterhin, dass auch die Menge an ungebundenem und unspezifisch gebundenem t-PA abhängig von der Probenkonzentration ist, die Ausbeute dagegen nicht. Die Disk wird bei der Kalibration also nicht überladen, sondern ein Teil der Probe geht keine Wechselwirkung mit der Diskoberfläche ein.

Die Kalibration der Antikörper-Disk mit Antikörpern von Boehringer-Ingelheim (in Abbildung 4.14 auf Seite 35 als System A bezeichnet) wird mit der Kalibration einer zweiten Antikörper-Disk verglichen, bei der Antikörper eines anderen Herstellers immobilisiert wurden (Firma Biopool AB; als System B bezeichnet). Für den zweiten Antikörper wird ein korrespondierender t-PA-Standard eingesetzt. In einem weiteren Schritt werden die Antikörper-Disks mit dem Standard der Fremdfirma kalibriert. Das System Biopool-Antikörper plus Boehringer-Standard wird im folgenden als System C bezeichnet, das System Boehringer-Antikörper plus Biopool-Standard als System D.

In Abbildung 4.14 sind die Kalibrationen der Antikörper-Disks über die Peakfläche für t-PA-Standards im Medium dargestellt. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Messungen. Die Kalibrationskurven der korrespondierenden Antikörper-Antigen-Systeme (A und B) unterscheiden sich nicht. Ab 2 µg/ml t-PA steigt die Peakfläche linear mit der Konzentration an. Bei Verwendung des System C steigt die untere Messgrenze auf 5 µg/ml t-PA, bei höheren Konzentrationen steigt die Peakfläche linear mit der Konzentration an. Bei System C findet man dagegen keinen linearen Zusammenhang zwischen Peakfläche und Probenkonzentration.

Die Abweichung der Peakfläche der Systeme C und D von den Systemen A und B beträgt je nach Probenkonzentration 10-70 %. Die Auswertung der gefundenen Werte in der Eluti-

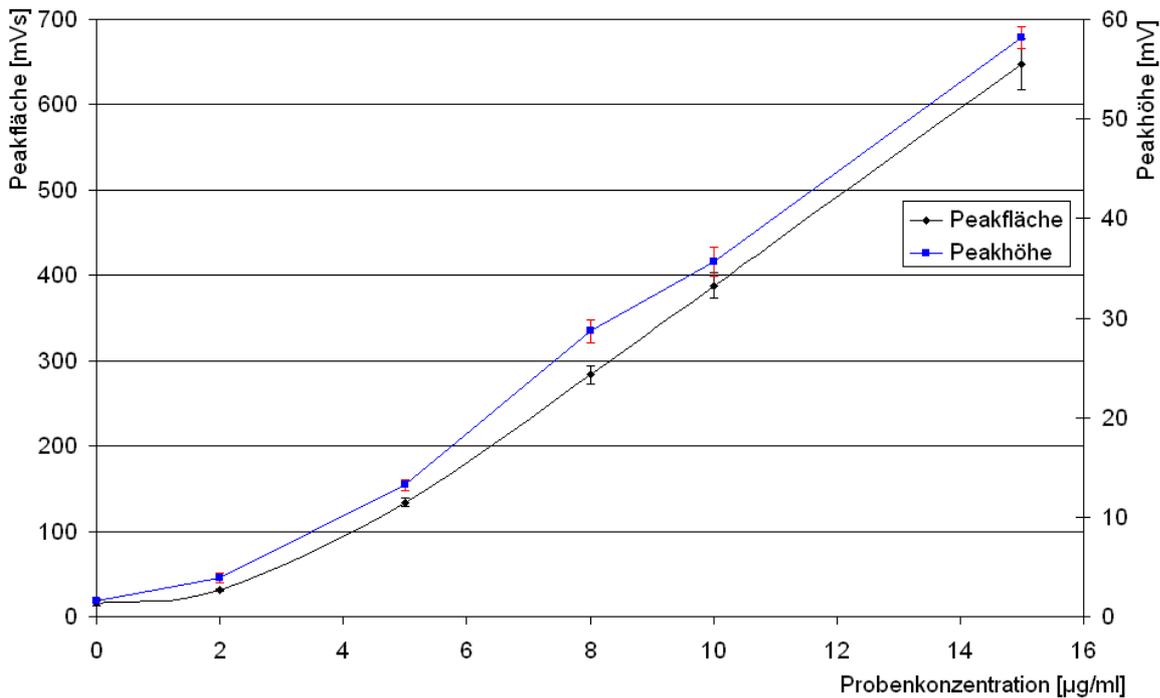


Abbildung 4.13: Abhängigkeit der Peakfläche und Peakhöhe des Elutionspeaks von der t-PA-Konzentration im Medium. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Messungen aufgetragen.

onsfraktionen (siehe Abbildung 4.15 auf Seite 36) zeigt jedoch, dass sich die t-PA-Menge im Eluat nicht von der Menge im Eluat der Systeme A und B unterscheidet. Lediglich mit dem System A wird für eine Probenkonzentration von 15 µg/ml t-PA eine höhere Ausbeute erzielt. Bei Konzentrationen bis 2 µg/ml t-PA wird das rekombinante Protein in allen Fällen überwiegend unspezifisch gebunden, nur 10 % der Menge wird spezifisch gebunden. Der Vergleich mit den Versuchen zum Bindungsverhalten der Epoxy-Disk in Abschnitt 4.3.1 (Seite 29) macht deutlich, dass die unspezifische Bindung mit den Antikörpern zu Stande kommt und nicht mit der GMA-EDMA-Oberfläche. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Disks mit den korrespondierenden Antikörper-Antigen-Systemen für eine online-Analytik besser geeignet sind, da sie bei gleicher Ausbeute und gleicher Steigung der Kalibrationsgeraden eine niedrigere untere Messgrenze besitzen. In den weiteren Versuchen wird nur das Boehringer-System (System A) verwendet.

Vorversuche mit aufgereinigtem t-PA aus Zellkulturüberstand

Vor dem Einsatz der Disk muss überprüft werden, ob der Boehringer-Antikörper mit dem in Zellkultur produziertem t-PA interagiert. Dazu wird t-PA im Vorfeld durch eine Folge von Aufreinigungsschritten (Gelfiltration, Kationenaustauschchromatographie, Ultrafiltrati-

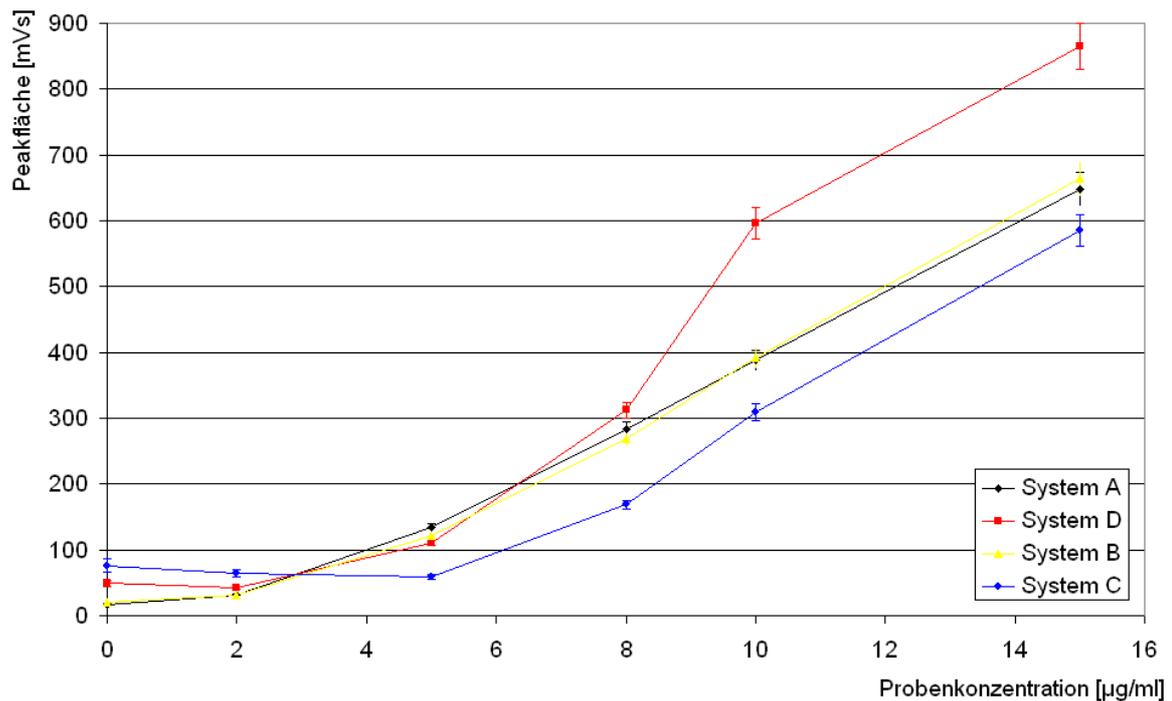


Abbildung 4.14: Kalibration der anti-t-PA-Disks anhand der Peakfläche mit verschiedenen Antikörper-Antigen-Kombinationen. System A: Boehringer t-PA-Standard und Antikörper; System B: Biopool t-PA-Standard und Antikörper; System C: Biopool t-PA-Standard und Boehringer-Antikörper; System D: Boehringer t-PA-Standard und Biopool-Antikörper.

on) aus Zellkulturüberstand von CHO t-PA-Zellen aufgereinigt. Mit dem gereinigten und aufkonzentrierten t-PA wird die Kalibration durchgeführt sowie die maximale Bindungskapazität der Disk und die Dissoziationskonstante des Antikörper-Antigenpaares anhand von Frontalanalysen berechnet (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 11). Abbildung 4.16 auf Seite 37 zeigt als Vergleich der Kalibration mit aufgereinigtem t-PA aus Zellkulturüberstand die Kalibration mit dem Boehringer-Standard als Referenz. Zwischen den Graphen tritt kein Unterschied auf, daher kann die Antikörper-Disk zur Analytik von Zellkulturübersständen von CHO tPA eingesetzt werden. Die untere Messgrenze beträgt 2 µg/ml. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen aufgetragen.

Für die Bestimmung der maximalen Bindungskapazität und der Dissoziationskonstante wird t-PA in Konzentrationen von 0,01- 0,5 mg/ml in 10 mM KP_i pH 7,0 gelöst und bis zum vollständigen Durchbruch der Probe (maximale Fluoreszenzintensität) auf die Disk aufgetragen. Nach dem Waschen der Disk zum Entfernen von ungebundenem t-PA wird mit 0,01 M HCl eluiert und die t-PA-Menge im Eluat bestimmt. Abbildung 4.17 auf Seite 37 zeigt die Adsorptionisotherme als Festphasenkonzentration in Abhängigkeit von der Probenkonzentration. Bei

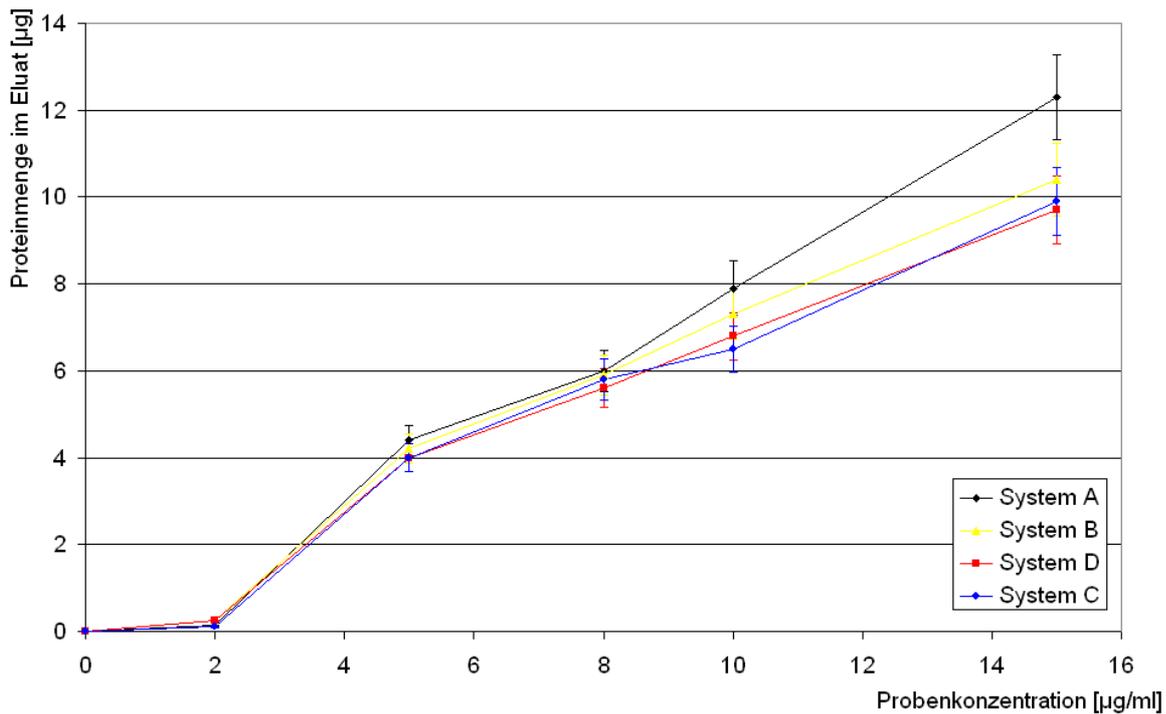


Abbildung 4.15: Abhängigkeit der t-PA-Menge im Eluat von der t-PA-Konzentration im Medium für verschiedene Antikörper-Antigen-Systeme. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen.

Antikörper	q_{\max} [µg t-PA/ml Disk]	Kapazität/Ligandendichte	K_{Diss} [M]
mAB Boehringer	793	0,5	$2 \cdot 10^{-7}$
Dissertation Renemann	923,5	0,422	$2,83 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 4.4: Maximale Bindungskapazität der anti-t-PA Disk und Dissoziationskonstante für den t-PA – anti-t-PA-Komplex.

einer Probenkonzentration von 0,12 mg/ml t-PA wird die maximale Festphasenkonzentration von 0,72 mg t-PA/ml Diskmaterial erreicht.

In Tabelle 4.4 sind die maximale Beladungskapazität q_{\max} , die Dissoziationskonstante K_{Diss} sowie das Verhältnis von maximaler Adsorptionskapazität und Ligandendichte zusammengefasst. Als Referenz sind Daten aufgeführt, die RENEMANN 2001 in seiner Dissertation mit der gleichen Zelllinie und den gleichen Antikörpern bestimmt hat [44]. Maximal 793 µg t-PA/ml Disk können bei einer Ligandendichte von 22,9 nmol Antikörper/ml Disk gebunden werden. Dies entspricht einem Verhältnis von 0,5, d.h. nur jeder zweite Antikörper bindet ein Molekül t-PA. Das maximal erreichbare Verhältnis beträgt aufgrund der Antikörperstruktur 2. Da die Immobilisierung der Antikörper auf der Disk ungerichtet erfolgt, werden immer auch Paratope der Diskoberfläche zugewandt und blockiert. Die Dissoziationskonstante

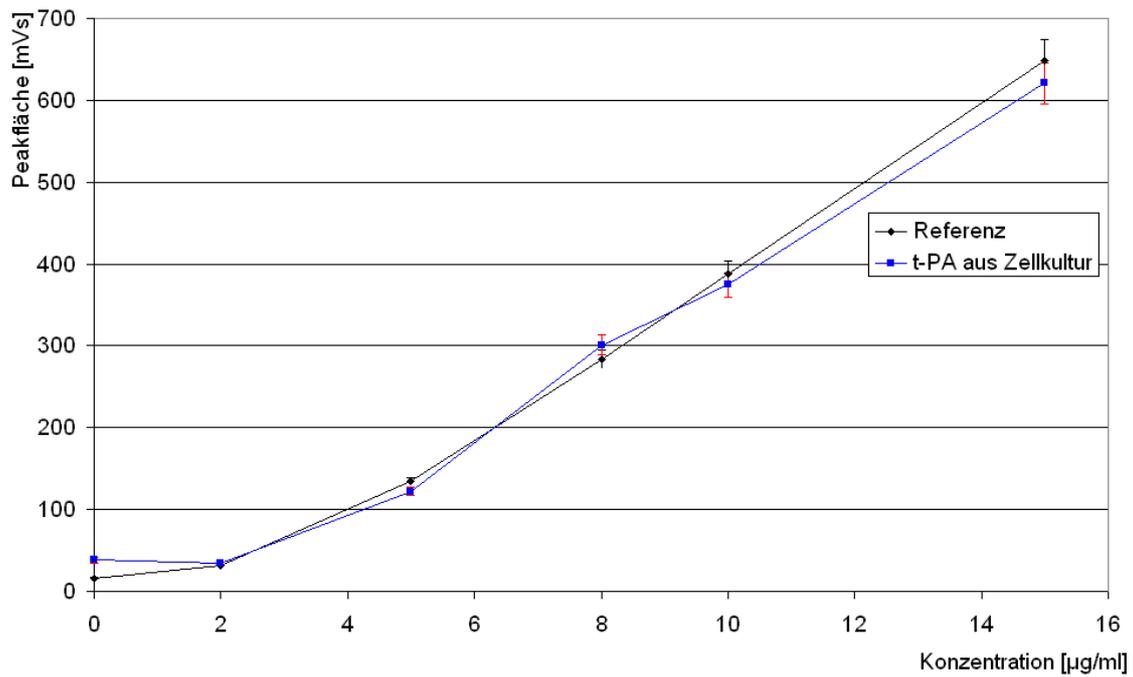


Abbildung 4.16: Kalibration der Antikörper-Disk mit aufgereinigtem t-PA aus Zellkulturüberstand im Vergleich zur Kalibration mit t-PA-Standard.

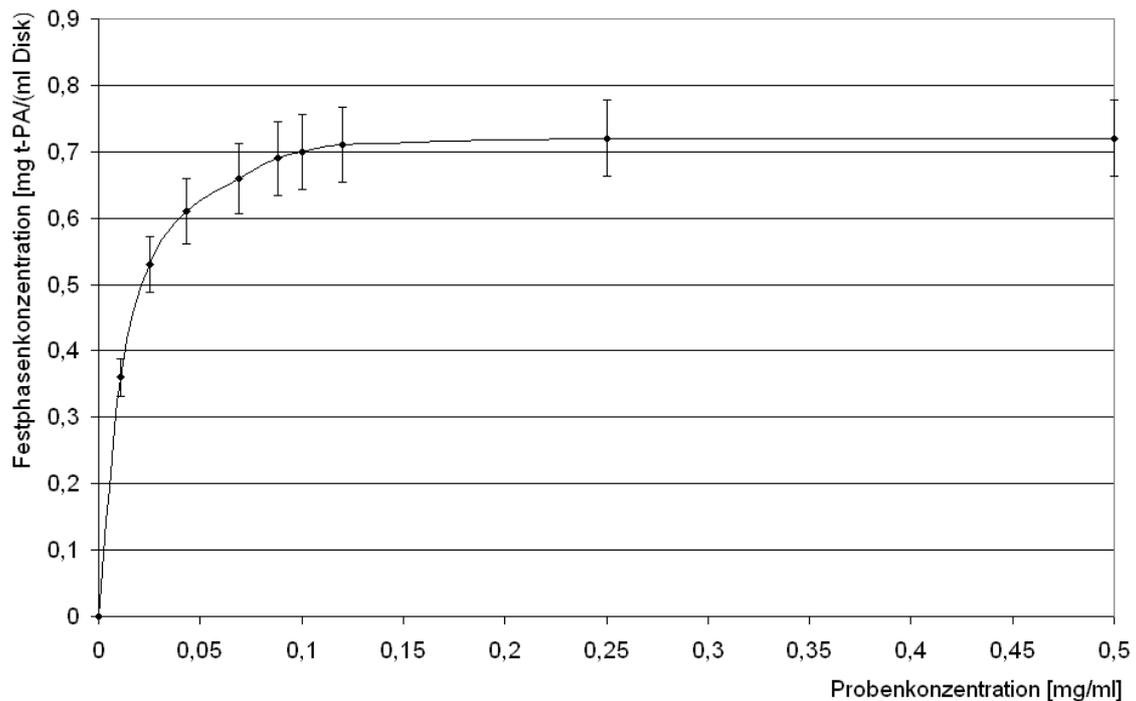


Abbildung 4.17: Adsorptionsisotherme der Antikörper-Disk mit t-PA aus Zellkulturüberstand. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Messungen.

beträgt $2 \cdot 10^{-7}$ M. Demnach liegt das Gleichgewicht zwischen Bildung und Zerfall des Protein-Antikörper-Komplexes fast ausschließlich auf Seite der Bildung des Komplexes. Das heisst, dass praktisch jede Bindungsstelle auf der Diskoberfläche bei der ersten Wechselwirkung mit t-PA besetzt wird. Dies ist die Voraussetzung für eine spezifische Bindung. Die Bindung ist aber nicht so stark, dass eine Schädigung des t-PA bei der Elution vorliegen könnte. Die Versuche zeigen, dass die Disk geeignet ist, t-PA über Affinitätschromatographie aufzureinigen. Die maximale Beladungskapazität und das Verhältnis von Beladungskapazität zu Ligandendichte unterscheiden sich um 15 % von den Daten, die von RENEMANN ermittelt wurden, die Dissoziationskonstante sogar um 30 %. In Anbetracht der Tatsache, dass in die Berechnung der Werte neben dem Messfehler des ELISA auch die indirekte Messung der Ligandendichte der Antikörper aus dem Überstand der Immobilisierungslösung einfließen, bewegen sich die Differenzen im Rahmen der Messgenauigkeit.

4.4.2 Aufreinigung von t-PA aus Zellkulturüberständen

Nach den Vorversuchen mit t-PA-Standard und und aufgereinigtem t-PA wird die Disk nun zur Aufreinigung von t-PA aus Zellkulturüberständen eingesetzt. Die mittels HPMDC berechnete Konzentration in Abhängigkeit von der Probenkonzentration von batch-Kulturen ist in Abbildung 4.18 auf Seite 39 dargestellt. Weiterhin ist die Konzentration dargestellt, die mit dem ELISA aus dem Elutionspeak bestimmt wird, sowie das Verhältnis aus HPMDC- und Probenkonzentration. Die Daten zeigen, dass mit der HPMDC zu hohe Konzentrationen berechnet werden. Bei Probenkonzentration von 4-6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ werden besonders hohe Abweichungen (bis 85 %) gemessen, jedoch sinkt die Abweichung mit steigender Konzentration auf 20 %. Die Ausbeute bei diesen Versuchen beträgt durchschnittlich 80 %.

Als Ursache für diese Diskrepanz kommen grundsätzlich Fehler bei der HPMDC und dem ELISA in Betracht. Auszuschließen ist die mangelnde Spezifität des ELISA für t-PA aus Zellkulturüberstand, da die Spezifität in der Arbeit von *Renemann* gezeigt werden konnte [44]. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Koelution von fluoreszenzaktiven Stoffen, für die mehrere Mechanismen in Betracht kommen. Zum Einen können Bestandteile aus dem Überstand an t-PA an verschiedenen Domänen assoziiert sein. Sofern diese Assoziation während der Chromatographie nicht gebrochen wird, führt dieser Vorgang zu einer erhöhten Fluoreszenzaktivität des Elutionspeaks. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass störende Substanzen entweder an den Antikörpern oder der Diskoberfläche binden. In diesem Fall sollten die Substanzen selektiv eluiert werden. Auch für den erhöhten Verlust an t-PA können diese Mechanismen verantwortlich sein. Die Substanzen blockieren Bindungsstellen für t-PA durch kompetitive Bindung oder durch sterische Hinderung.

Abbildung 4.19 auf Seite 40 zeigt ein SDS-Gel, auf dem zwei Überstände und die zugehörigen Elutionsfraktionen aufgetragen sind. Auf Bahn 1 ist ein Proteinstandard mit 29 und 66 kDa

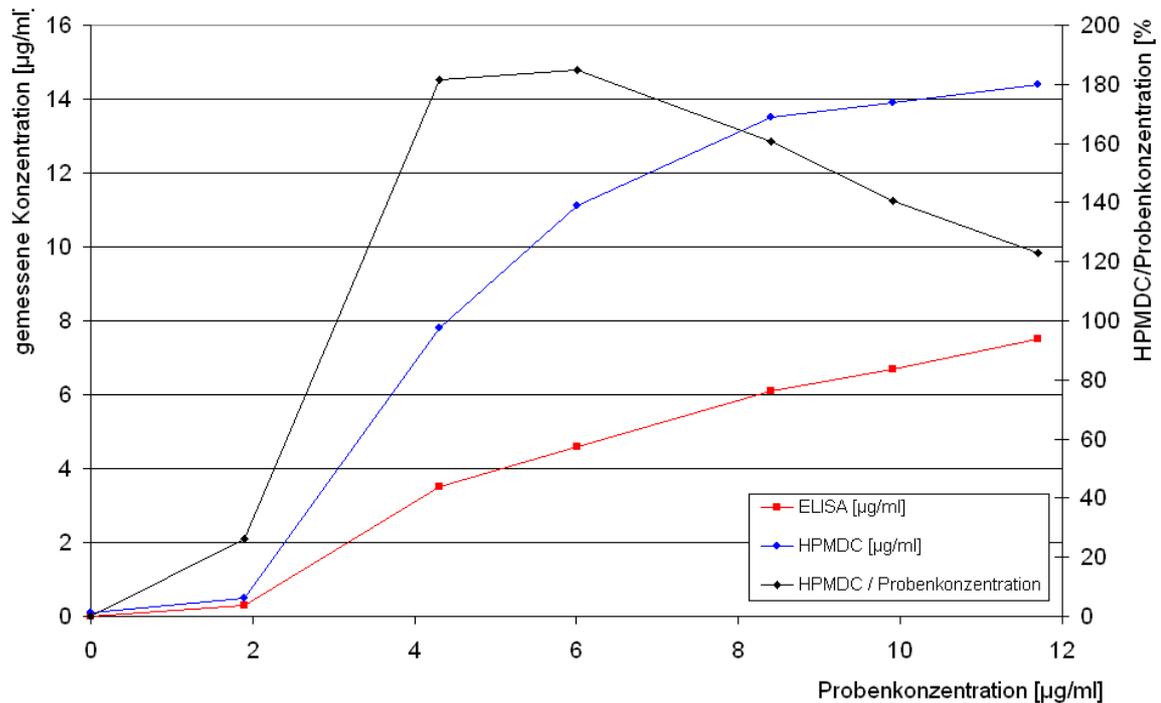


Abbildung 4.18: Vergleich der mittels HPMDC und ELISA bestimmten Konzentration von t-PA aus Zellkulturüberstand. Weiterhin ist das Verhältnis von HPMDC zu ELISA dargestellt.

aufgetragen. Bahn 2 zeigt den t-PA-Standard sowohl in der single-chain-Form, als auch in der two-chain-Form, die aufgrund der reduzierenden Bedingungen in beide Fragmente zerfallen ist. Bahn 3 und 4 zeigen zwei verschiedene zellfreie Kulturüberstände (als 1 und 2 bezeichnet), Bahn 5 und 6 die dazu gehörigen Eluate. Bei Überstand 2 kann keine Aufreinigung festgestellt werden, während bei Überstand 1 der Großteil der Proteine abgereichert wird. Trotzdem werden noch drei schwerere Proteine und sechs leichtere Proteine bis zu einem Gewicht von 29 kDA eluiert, darunter evtl. Insulin, das im Medium enthalten ist.

4.4.3 Untersuchung der kompetitiven Bindung durch Standardaddition

Um zu untersuchen, ob kompetitive Bindungen vorliegen oder die Koelution durch Bindung von Störsubstanzen an anderen Bindungsstellen verursacht wird, wird die t-PA-Konzentration im Überstand durch Standardzusatz erhöht. Abbildung 4.20 auf Seite 41 zeigt das SDS-Gel der Elutionsfraktionen von Überständen mit 25, 30, 40 und 50 µg/ml t-PA nach Einfachzusatz von t-PA-Standard. In allen Überständen wurden die leichten Proteine abgetrennt. Bis 30 µg/ml werden noch vier Proteine mit einem Gewicht von 98 bis 116 kDA detektiert. Bei höheren Konzentrationen findet man ausschließlich die t-PA-Bande. Dies zeigt, dass die anderen Proteine kompetitiv an den Antikörpern binden, und dass die schweren Proteine eine stärkere Bindung eingehen als die leichteren Proteine. Dies beruht vermutlich auf der Fähigkeit der

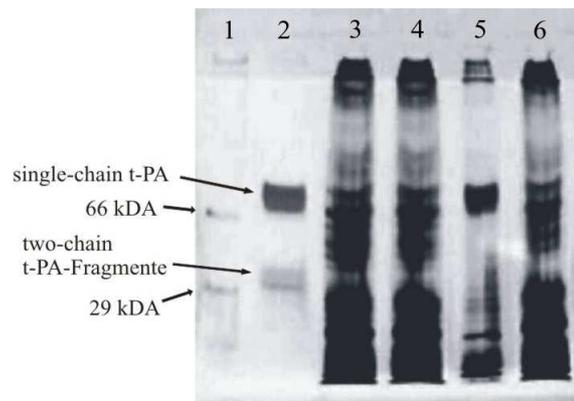


Abbildung 4.19: Reinheit der Eluate nach der Affinitätschromatographie. Bahn 1: Größenstandard; Bahn 2: t-PA-Standard; Bahn 3: Zellkulturüberstand 1; Bahn 4: Zellkulturüberstand 2; Bahn 5: Eluat 1; Bahn 6: Eluat 2

schweren und damit größeren Proteine, zusätzlich noch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Oberfläche einzugehen. Konzentrationen von über 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ t-PA werden mit der verwendeten Zelllinie nicht erzielt. Für die Analytik geringer Konzentrationen muss somit die Reinheit über die Chromatographiebedingungen verbessert werden. Eine Lösung für die Aufreinigung bietet die Aufkonzentrierung des Zellkulturüberstandes vor der Affinitätschromatographie. Da es sich jedoch bei der Zelllinie nicht um eine Produktionszelllinie handelt und sie eine geringe Produktivität besitzt, ist es wahrscheinlich, dass mit Produktionsüberständen eine Aufreinigung bereits realisierbar ist.

Aufgrund der höheren Reinheit der Eluatfraktionen kann die t-PA Konzentration mittels HPMDC bei hohen t-PA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand genauer bestimmt werden. In Abbildung 4.21 auf Seite 41 ist die durch den ELISA und die HPMDC berechnete Konzentration aus dem Eluat in Abhängigkeit von der Probenkonzentration aufgetragen (Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichung). Die mit dem ELISA bestimmte Konzentration steigt linear mit der Probenkonzentration an. Hingegen steigt bei der HPMDC die berechnete Konzentration bis zu einer Konzentration von 8,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ überproportional an. Mit weiter steigender t-PA-Konzentration nähert sich die mittels HPMDC berechnete Konzentration der mittels ELISA berechneten Konzentration an. Ab einer Probenkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ werden keine Unterschiede mehr zwischen ELISA und HPMDC gemessen, weil keine Koelution von Störsubstanzen mehr stattfindet. Erst ab dieser Konzentration ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein Ersatz des ELISA durch die HPMDC sinnvoll.

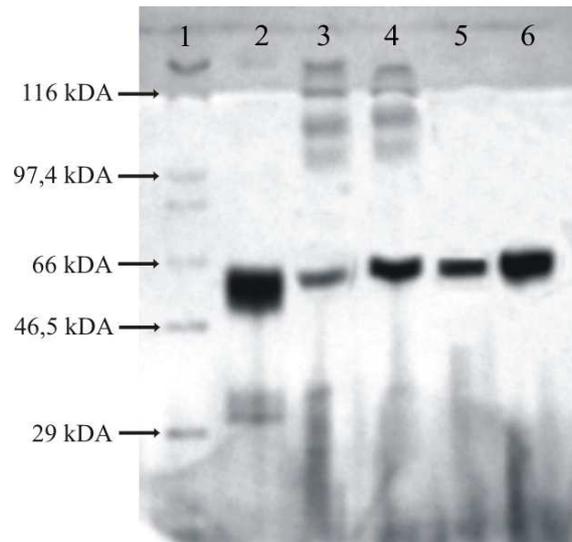


Abbildung 4.20: Reinheit der Eluate bei hohen t-PA-Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Bahn 1: Größenstandard; Bahn 2: t-PA-Standard; Bahn 3: Überstand (ÜS) mit 25 µg/ml t-PA; Bahn 4: ÜS mit 30 µg/ml t-PA; Bahn 5: ÜS mit 40 µg/ml t-PA; Bahn 6: ÜS mit 50 µg/ml t-PA.

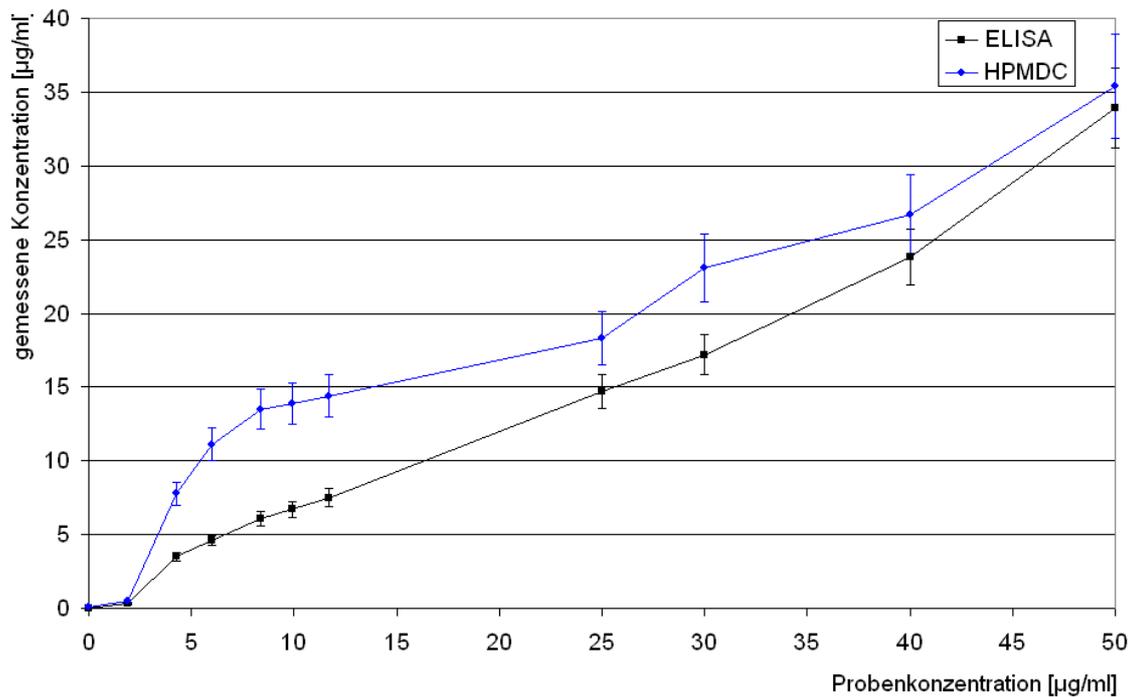


Abbildung 4.21: Berechnung der t-PA-Konzentration aus dem Eluat mittels HPMDC und ELISA.

4.4.4 Optimierung des Puffersystems

4.4.4.1 pH-Wert des Zellkulturüberstandes

Der pH-Wert hat einen sehr starken Einfluss auf Ladungsdichte- und verteilung von Proteinen und damit auch auf die Bindung dieser Substanzen mit dem Antikörper. Die Optimierung des

pH-Wertes kann zwei Effekte hervorrufen. So kann die Bindung des t-PAs verbessert und die Bindung störender Substanzen unterdrückt werden. Um den Einfluss des pH-Wertes zu untersuchen, wird Überstand mit Salzsäure und Natriumhydroxid auf pH-Werte von 6,0 bis 8,0 eingestellt. Der gewählte pH-Bereich umfasst den Bereich, der bei Kultivierung durch Übersäuerung der Zellkultur oder durch Arbeiten außerhalb des Brutschrankes erreicht wird. Unter diesen Bedingungen wird t-PA im positiv geladenen und neutralen „Zustand“ gebunden. Bei höheren pH-Werten wird nicht gemessen, da in diesem Bereich t-PA denaturiert werden kann. Aus dem Elutionspeak wird die t-PA-Konzentration mittels HPMDC und die Gesamtprotein-konzentration mittels Lowry bestimmt. Abbildung 4.22 auf Seite 43 zeigt die Konzentrationen beim Auftragen einer Probe von 5,1 µg/ml t-PA im Überstand. Sowohl die gemessene t-PA-Konzentration als auch die Gesamtprotein-konzentration sind unabhängig vom pH-Wert. Es werden t-PA-Konzentrationen von 8,2 bis 9,4 µg/ml gemessen, durchschnittlich 75 % mehr, als in der Probe vorhanden ist. Die Ursache dafür liegt in der Bindung anderer Proteine. Die Gesamtprotein-konzentrationen beträgt 27,3 bis 29,7 µg/ml. Die Gesamtprotein-konzentration des Überstandes beträgt 59,6 µg/ml. Nur die Hälfte der Proteine aus dem Überstand werden bei der Affinitätschromatographie entfernt. Eine Verbesserung der Aufreinigung ist über den pH-Wert der Probe nicht möglich, daher kann der Überstand in weiteren Experimenten ohne Konditionierung verwendet werden.

4.4.4.2 Ionenstärke des Zellkulturüberstandes

Eine weitere Möglichkeit die Bindung von Störsubstanzen zu unterdrücken, besteht in der Erhöhung der Leitfähigkeit der Probe durch Zusatz von Salz. Da von der Leitfähigkeit Zielprotein und Kontaminanten gleichermaßen betroffen sind, muss unter Umständen ein Kompromiss zwischen hoher Ausbeute und möglichst geringer Verunreinigung eingegangen werden. Für die Versuche wird Überstand mit einer t-PA Konzentration von 7,1 µg/ml benutzt, die mit dem ELISA bestimmt wird. Dem Überstand werden 0 bis 0,5 M NaCl zugesetzt. In der Desorptions- und Elutionsfraktion wird sowohl die Gesamtprotein- als auch die t-PA-Konzentration bestimmt. Für t-PA erfolgt die Bestimmung mit dem ELISA (Einzelbestimmung). Die Versuche zeigen, dass ab 28 mS/cm die spezifische Bindung von t-PA mit steigender Leitfähigkeit zurück gedrängt wird und die unspezifische Bindung zunimmt (siehe Abbildung 4.23, Seite 44). Bei Konzentrationen von über 0,3 M NaCl (44,9 mS/cm) wird noch 46 % des angebotenen t-PA spezifisch gebunden, während es bei 0,5 M NaCl nur noch 7 % sind. Genau wie bei t-PA nimmt auch die unspezifische Bindung von den Kontaminanten bei hohen Salzkonzentrationen zu. Da dieser Effekt bei den Kontaminanten größer als bei t-PA ist, wird das Verhältnis Kontaminant/t-PA ab 37 mS/cm mit steigender Leitfähigkeit immer besser. Da bei diesen Leitfähigkeiten die Ausbeute aber stark sinkt, können diese Bedingungen nicht für die

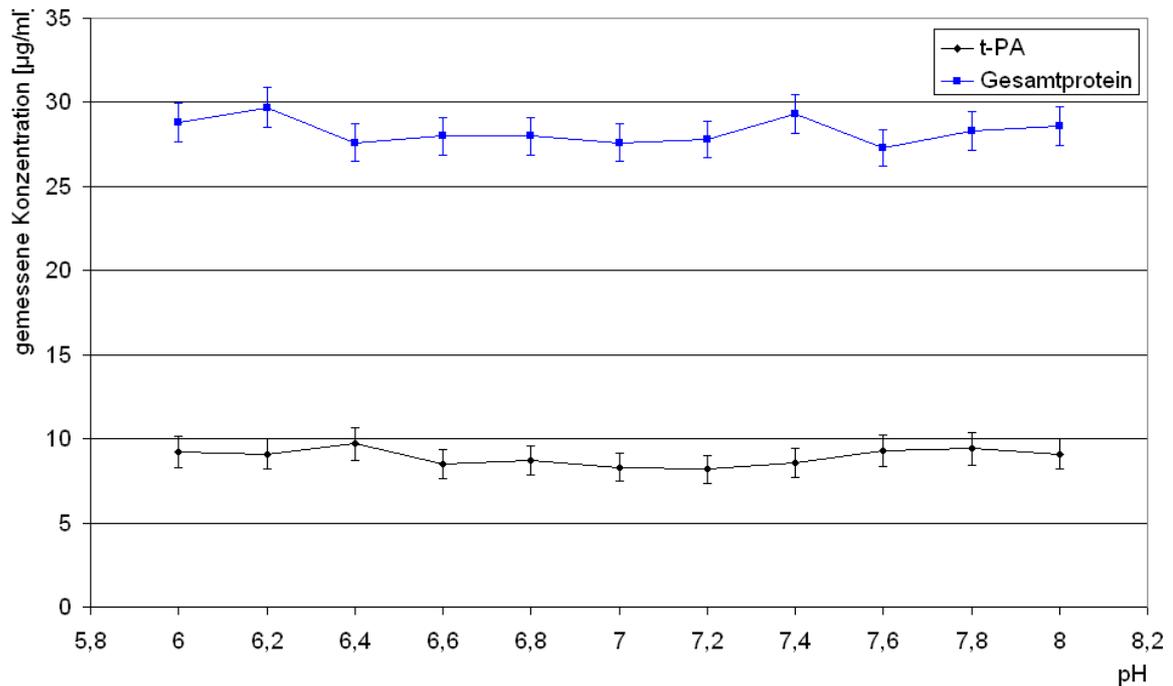


Abbildung 4.22: Einfluss des pH-Wertes des Überstandes auf die Reinheit des Eluats. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung der Gesamtproteinkonzentration und eine Einfachbestimmung der t-PA-Konzentration aus dem Eluat.

Aufreinigung genutzt werden. Als Waschpuffer wird daher weiterhin 10 mM KPi + 150 mM NaCl benutzt.

Die Zunahme der unspezifischen Bindung kann im Chromatogramm durch Auftreten eines Peaks beim Waschen mit 2 M NaCl beobachtet werden (siehe Abbildung 4.24, Seite 45). Die Abbildung zeigt das Chromatogramm eines Zellkulturüberstandes dessen Leitfähigkeit nicht erhöht wurde (17,3 mS/cm) und eine Probe mit erhöhter Leitfähigkeit (52 mS/cm). Beim unbehandelten Zellkulturüberstand wird eine sehr geringe unspezifische Adsorption beobachtet (Peak bei $t = 3-3,5$ min). Die Elution mit 0,01 M HCl erfolgt zwischen 7,2 und 8 Minuten. Im gleichen Maß wie die Peakfläche des neuen Peaks zunimmt, sinkt die Peakfläche des Eluat-peaks bei der Probe mit erhöhter Leitfähigkeit. Die Elution mit 0,01 M HCl erfolgt auch schneller, d.h. selbst die spezifische Bindung ist nicht mehr so stark.

4.4.5 Optimierung der Elution

Für die Elution von t-PA stehen fünf Möglichkeiten zur Verfügung: die selektive Elution durch einen Kompetitor, der Einsatz eines chaotropen Reagenz und die Änderung der Leitfähigkeit, des pH-Wertes oder der Polarität des Elutionspuffers. Drei Methoden scheiden von vornherein aus: Nach dem Waschschrift mit 2 M NaCl erübrigt sich die Verwendung von Salzgradienten

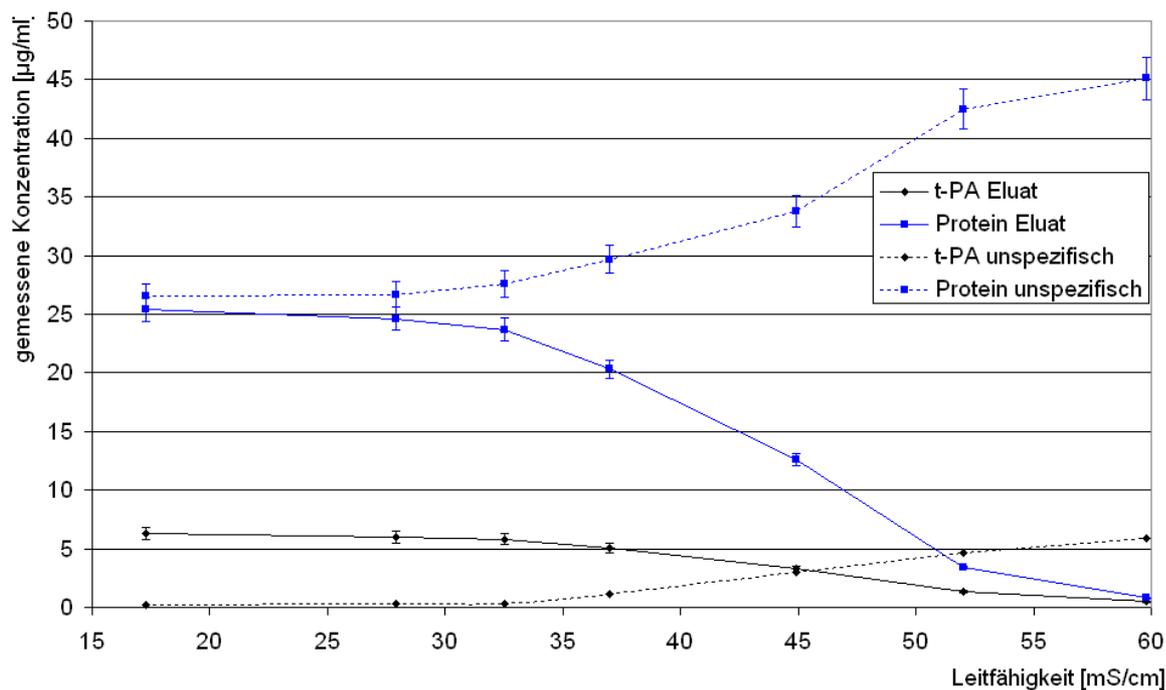


Abbildung 4.23: Einfluss der Leitfähigkeit der Probe auf die Reinheit des Eluats. Dargestellt ist die Gesamtprotein- und t-PA-Konzentration sowohl in der Fraktion der unspezifisch gebundenen Substanzen als auch im Eluat.

und für die selektive Elution fehlt ein Kompetitor. Der Einsatz von chaotropen Reagenzien ist zur Elution besonders stark gebundener Analyten sinnvoll, die nur eluiert werden können wenn man die Struktur des Proteins verändert. Die Dissoziationskonstante ist allerdings groß genug, dass dies nicht erforderlich ist (siehe Tabelle 4.4 auf Seite 36). Versuche zur Elution durch eine reduzierte Polarität des Elutionspuffer mit Dioxan und Ethylenglykol waren nicht erfolgreich. Auf eine Darstellung der Daten wird daher verzichtet.

Elution durch pH-shifts

Die Elution bei unterschiedlichen pH-Werten wird als Stufengradient untersucht, da die HPLC-Anlage für die on-line-Messung eines linearen Gradienten nicht ausgerüstet ist. Tabelle 4.5 auf Seite 45 listet die Anzahl und den pH-Wert der verwendeten Stufen auf. Nach der letzten Stufe wird die Disk mit 0,01 M HCl regeneriert. Sofern nicht anders angegeben, werden die Elutionspuffer aus Salzsäure oder Natriumhydroxid angesetzt. Für die Versuche wird Überstand eingesetzt, der 7,8 µg/ml t-PA und 77 µg/ml Proteine enthält. Abbildung 4.25 (Seite 46 zeigt die t-PA- und Gesamtproteinkonzentrationen (Mittelwert dreier Messungen), die anhand der ersten Eluatfraktion und der Regeneration gemessen wird. Im Fall von Lauf 4 und 9, bei denen zwei Stufen benutzt werden, ist nur die zweite Stufe in der Abbildung aufgeführt. Die

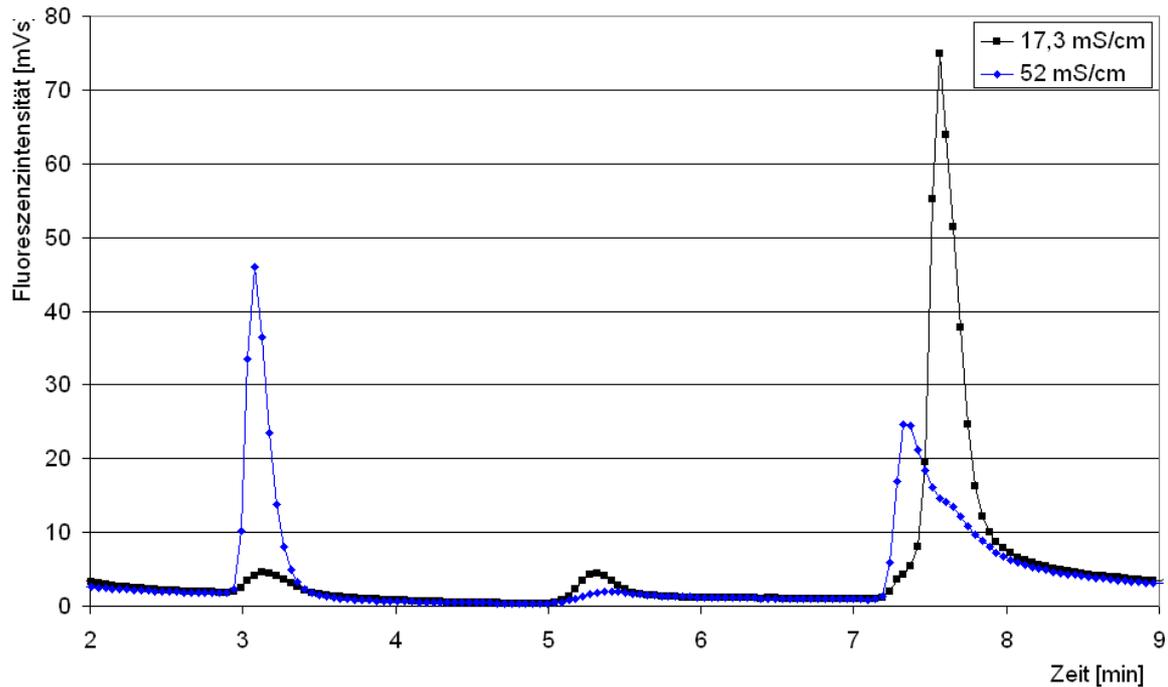


Abbildung 4.24: Einfluss der Leitfähigkeit auf die spezifische Bindung von t-PA und Störsubstanzen mit der Antikörper-Disk. Gezeigt sind die Chromatogramme einer unbehandelten Probe (17,3 mS/cm) und einer Probe mit erhöhter Leitfähigkeit (52 mS/cm)

Lauf	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH 1. Stufe	2	2	3	3,5	3,5	4	10	11	11	12
pH 2. Stufe				3					12	

Tabelle 4.5: Übersicht über die Läufe zur Variation des pH-Wertes bei der Elution. In Lauf 2 wird 0,01 M Glycin/HCl-Puffer zur Elution verwendet. Für Elutionspuffer mit pH 3,5 wird 10 mM Zitronensäure benutzt.

Konzentrationen in der ersten Stufe entsprechen den Konzentrationen bei der Einzelmessung des pH-Wertes. Die t-PA-Konzentration wird mit dem ELISA bestimmt.

Im sauren pH-Bereich wird bei pH 4 kein t-PA eluiert, jedoch nimmt mit sinkendem pH-Wert die im Eluat gemessene Konzentration von t-PA langsam zu. Bei pH 3 beträgt die Ausbeute nur 27 %. Erst bei pH 2 wird t-PA vollständig eluiert und die Disk regeneriert. In diesem Bereich ist eine präparative Aufreinigung sinnvoll. Die Proteinmessung zeigt, dass die Elution der Kontaminanten zwar schon bei pH 4 beginnt, der Großteil der Proteine aber erst zusammen mit t-PA bei pH 2 eluiert. Durch eine Stufenelution im sauren pH-Bereich lässt sich die Reinheit des t-PA daher nur geringfügig verbessern. Im basischen Bereich kann t-PA kaum eluiert werden und die Disk muss anschließend bei pH 2 regeneriert werden. Auch die Kontaminanten eluieren schlecht, sodass ca. 80 % der gebundenen Kontaminanten bei pH 12

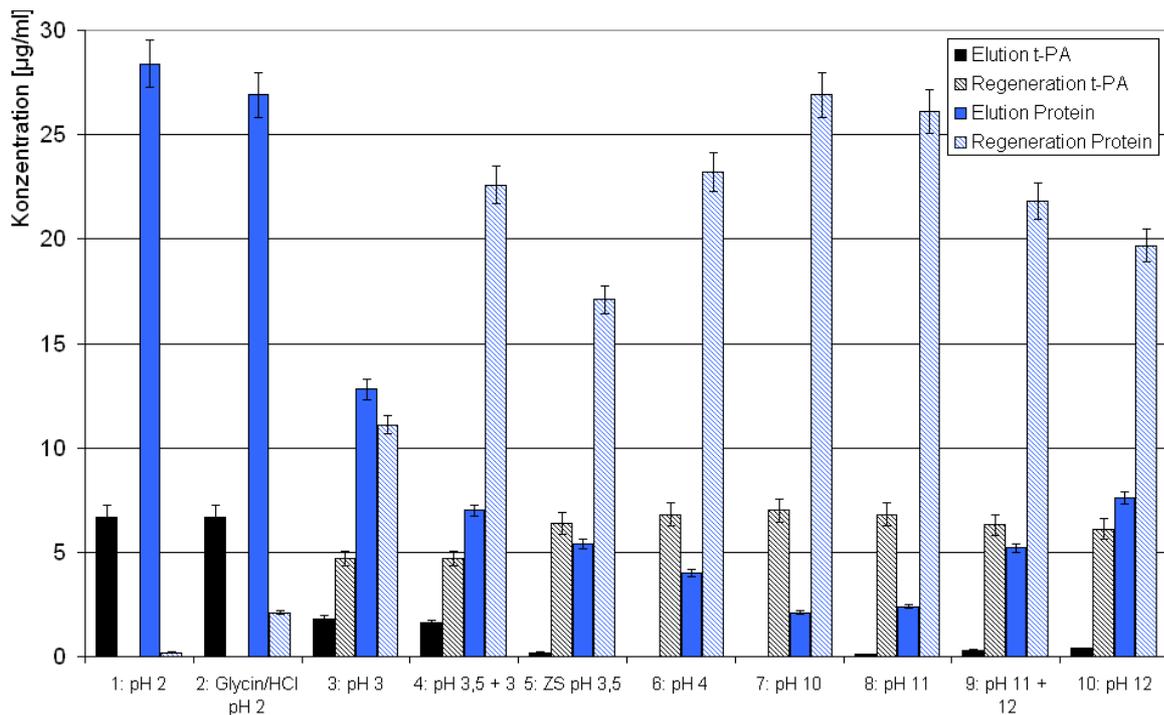


Abbildung 4.25: Elution von t-PA und Störsubstanzen bei unterschiedlichen pH-Werten. Dargestellt ist die t-PA- und Gesamtproteinkonzentration im Eluat und in der Fraktion der Regenerierung. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung dreier Messungen dargestellt.

auf der Disk gebunden bleiben. Die Elutionsdauer ist so gewählt, dass eine Denaturierung der Proteine nicht auftritt.

Die Modellversuche haben gezeigt, dass weder die Epoxy-Disk nach der Hydrolyse mit Schwefelsäure noch die Antikörper unspezifisch Proteine binden. Die Versuche mit Zellkulturüberstand zeigen dagegen, dass spezifische Bindungen auftreten. Diese Diskrepanz lässt sich über mehrere Mechanismen erklären. Es muss beachtet werden, dass polyklonale Antikörper verwendet wurden, die ein breiteres Bindungsspektrum aufweisen als monoklonale Antikörper, für die man eine einzelne Antikörper-Antigen-Bindung postulieren kann. Weiterhin ist der Überstand wesentlich komplexer zusammengesetzt, als man es mit Modellproteinen nachstellen kann. Eine Vielzahl von t-PA-Abbauprodukten oder Vorstufen, die aus lysierten Zellen ins Medium gelangen, können ähnlich starke Wechselwirkungen mit der Antikörperdisk eingehen und als Kompetitoren wirken. Dies führt zu einer niedrigeren Ausbeute und zu einem verunreinigten Eluat. Da t-PA eine Reihe weiterer Bindungsstellen besitzt, die der Regulation der Fibrinolyse dienen, können auch hier Substanzen aus dem Überstand binden. t-PA dient in diesem Fall als Träger und vermittelt die Affinität zum Antikörper. Nicht auszuschließen ist eine Mutation der Zelllinie, da eine Referenz vom Hersteller fehlt. Über die Auswirkung

gen einer Mutation kann nur spekuliert werden und soll daher nicht Gegenstand weiterer Betrachtung sein.

Die Versuche mit Standardzusatz zum Überstand weisen sehr deutlich auf die kompetitive Bindung aus dem Zellkulturüberstand hin. Eine genauere Untersuchung der kompetitiven Bindung ist nicht sinnvoll, da eine vermeintlich einfachere Lösung in Aussicht gestellt ist: Die Steigerung der Produktivität der Zelllinie um den Faktor 2-3. Als Resümee dieser Arbeit bleibt festzustellen, dass eine Aufreinigung von t-PA mittels Affinitätschromatographie nicht möglich ist. Für die off-line-Analytik bedeutet das Auftreten von Koelution aber erst einmal nur eine geringere Genauigkeit der Messmethode. Ist die Ungenauigkeit klein gegenüber den zu messenden Werten, kann die HPMDC trotzdem eingesetzt werden. Dies soll im Folgenden weiter untersucht werden.

4.4.6 Einsatz der Affinitätsdisk zur schnellen off-line-Analytik

Für die Anwendung der Affinitätsdisk zur schnellen off-line-Analytik muss vor allem die Reproduzierbarkeit einzelner Messungen untersucht werden. Dazu werden Proben aus zwei Chargen Kulturüberstand mehrfach gemessen. Charge 1 besitzt eine t-PA-Konzentration von 5,2 µg/ml, Charge 2 eine Konzentration von 11,9 µg/ml. Es werden je 10 Zyklen gemessen (siehe Abbildung 4.26 auf Seite 48). Der Mittelwert beträgt 310 mVs mit einer Standardabweichung von 12 mVs (4 %) bzw. 795 mVs mit einer Standardabweichung von 25 mVs (3 %). Der Versuch zeigt, dass die Methode reproduzierbare Messergebnisse für eine Probe liefert.

4.4.7 Untersuchung zur Chargen-Variation des Überstandes

Nach der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Methode anhand einzelner Proben erfolgt die Überprüfung anhand von mehreren Chargen ähnlicher Konzentration. Um den Einfluss der Wachstumsphasen der Kultur weitgehend zu unterdrücken, werden nur Proben benutzt, die zu Beginn der stationären Phase der Kultivierungen genommen wurden. Die sechs verwendeten Chargen besitzen eine t-PA-Konzentration von 8,6 bis 9,7 µg/ml. In Abbildung 4.27 auf Seite 49 sind die t-PA-Menge in der Probe, im Eluat und die Peakfläche des Elutionspeaks aufgetragen. Die t-PA-Menge in der Probe und im Eluat werden mit dem ELISA als Einzelmessung bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass weder bei der Probenmenge, der Elutionsmenge noch bei der Peakfläche ein Unterschied zwischen den Proben gemessen wird. Daher ist die Methode unabhängig von der Charge. Die Daten zeigen damit aber auch, dass t-PA-Konzentrationsunterschiede größer 20 % nötig sind, um bei Einzelmessungen Chargen unterscheiden zu können.

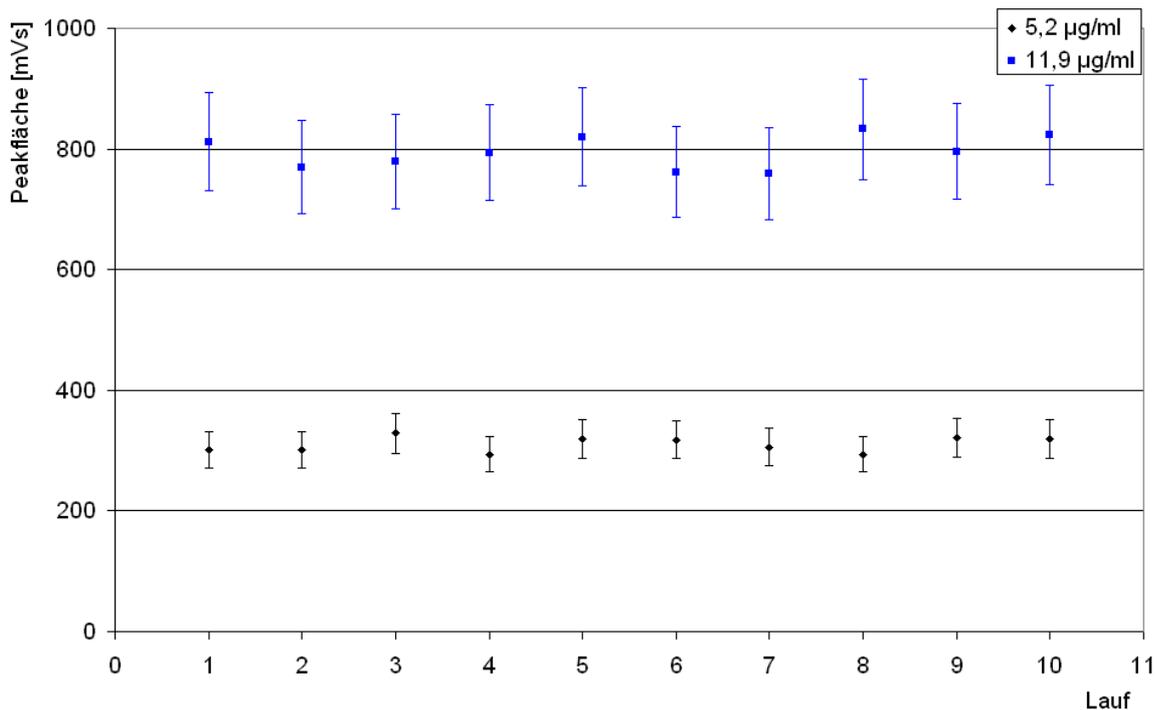


Abbildung 4.26: Reproduzierbarkeit der Bestimmung von t-PA mittels HPMDC am Beispiel zweier Chargen Kulturüberstand.

	unspezifische Adsorption			spezifische Adsorption		
	Fläche	Höhe	t-PA	Fläche	Höhe	t-PA
	[mVs]	[mV]	[µg/ml]	[mVs]	[mV]	[µg/ml]
1. Tag	87	4	0,4	1157	74	16,4
4. Monat	500	45	5,6	670	54	9,8
Differenz	413	41	5,2	487	50	6,6

Tabelle 4.6: Einfluss des Alterung der Antikörper-Disk auf die Bindung von t-PA.

4.4.8 Alterung der Disk

Um den Einfluss der Alterung der Disk zu untersuchen, wird eine Probe mit 19,7 µg/ml t-PA direkt nach der Immobilisierung und nach vier Monaten erneut gemessen. In diesem Zeitraum wurden ca. 260 Proben gemessen. Tabelle 4.6 auf Seite 48 stellt die Peakflächen und -höhen der entsprechenden Peaks sowie die t-PA-Konzentration in den Fraktionen zusammen. Mit zunehmendem Alter steigt die unspezifische Bindung von Substanzen, während die spezifische Bindung abnimmt.

80 % der Abnahme der spezifischen Bindung findet man als Zunahme der unspezifischen Adsorption wieder. Die restlichen 20 % werden vermutlich als Zunahme der nichtbindenden Substanzen aufgrund der Limitierung des Detektors nicht detektiert. Dieses Verhältnis spie-

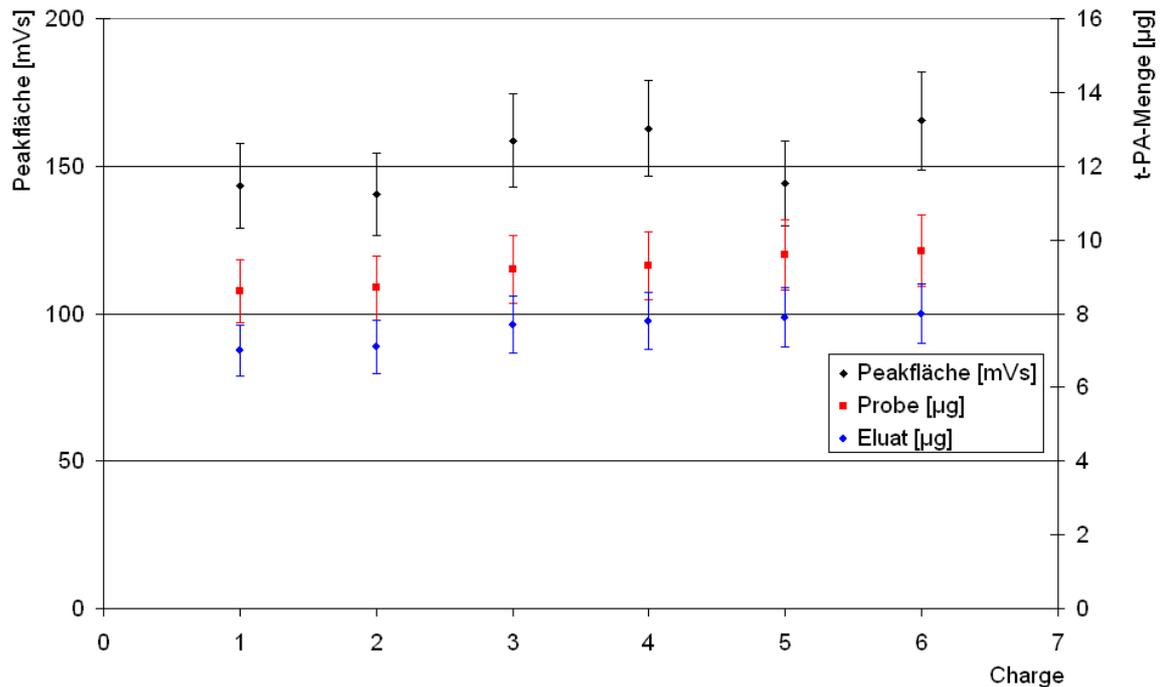


Abbildung 4.27: Untersuchung zur Abhängigkeit der HPMDC von der verwendeten Charge Zellkulturüberstand. Für jede Charge ist die t-PA-Menge in der Probe und im Eluat aufgetragen, die mittels ELISA gemessen wird, sowie die mittels HPMDC gemessene Peakfläche. Die Werte sind als Einzelmessung bestimmt.

gelt sich auch in der Vergleichsmessung mit dem ELISA wider. Durch die Alterung nimmt die Kapazität der Disk um 40 % ab. Gleichzeitig steigt die untere Messgrenze auf 4 µg/ml und die Steigung der Kalibrationsgeraden sinkt (Daten nicht gezeigt). Mit den immobilisierten Antikörpern wird im Durchschnitt 2,5 Monate bei einem Probenaufkommen von 200 Proben/Disk gearbeitet .

4.4.9 off-line Messung der t-PA-Konzentration einer batch-Kultur

Abbildung 4.28 auf Seite 50 zeigt die t-PA-Konzentration im Überstand von zwei batch-Kulturen, die sowohl mit dem ELISA als auch mit der HPMDC bestimmt wurden. Aufgetragen sind die t-PA-Konzentrationen als Mittelwerte aus drei Messungen und die Standardabweichung. Die tatsächliche t-PA-Konzentration beider Kulturen, bestimmt durch den ELISA, beträgt zu Beginn der Kultivierung 0,1 µg/ml und steigt nach ca. 48 Stunden auf 1,5 bzw. 1 µg/ml. Nach 48 Stunden steigt die t-PA-Konzentration von Kultur 1 schneller an und erreicht nach 110 Stunden eine konstante Konzentration von 9,2 µg/ml. In Kultur 2 steigt die Konzentration linear bis zum Ende der Kultivierung auf 7,6 µg/ml an. Die unterschiedliche Steigerung der t-PA-Konzentration wird durch das schnellere Wachstum von Kultur 1 verur-

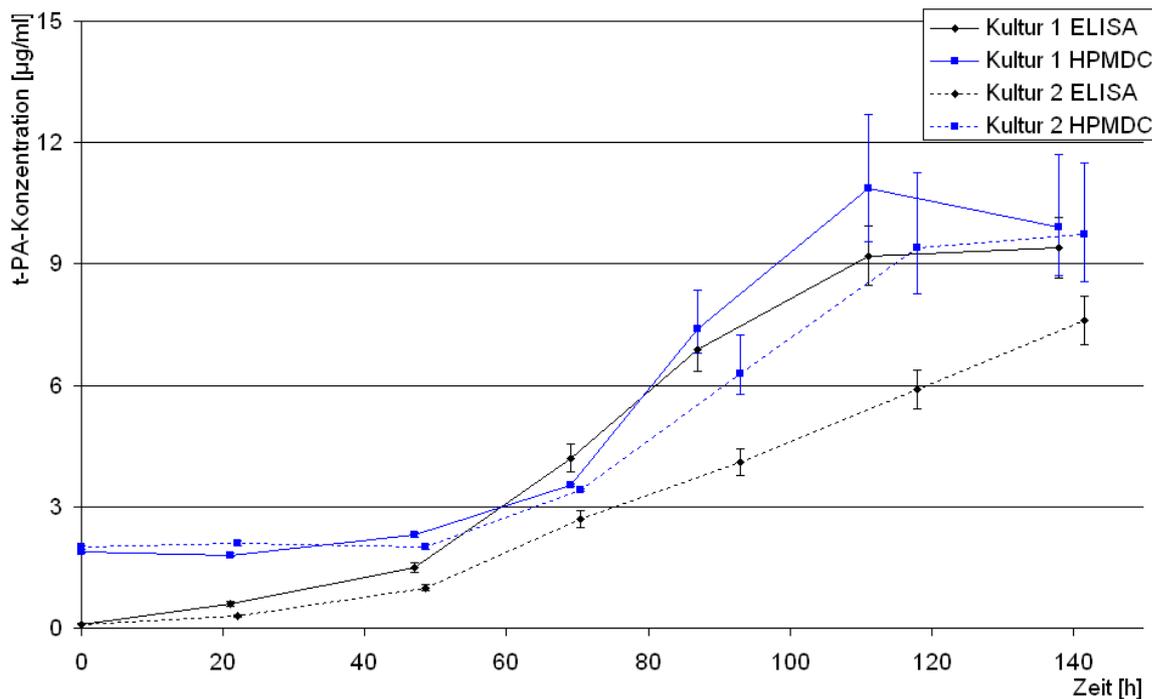


Abbildung 4.28: Kontrolle der t-PA-Konzentration zweier batch-Kulturen mittels ELISA und HPMDC als Mittelwert dreier Messungen.

sacht (Daten nicht gezeigt). Berechnet man die t-PA-Konzentration über die HPMDC, wird die untere Nachweisgrenze der Methode erst nach 50 Stunden überschritten. Danach steigt die t-PA-Konzentration beider Kulturen stetig an und erreicht nach 111 Stunden einen konstanten Wert von 10,9 µg/ml (Kultur 1) bzw. nach 118 Stunden von 9,4 µg/ml (Kultur 2). Somit ist die t-PA-Analytik mit der HPMDC im ersten Drittel der Versuchsdauer nicht geeignet. Danach wird kein Unterschied zwischen ELISA und HPMDC für Kultur 1 gemessen. Für Kultur 2 werden dagegen mit der HPMDC höhere Konzentrationen bestimmt. Dies zeigt, dass die Berechnung über die Peakfläche abhängig von der verwendeten Charge ist. Daher ist die HPMDC weder für die Aufreinigung noch für die qualitative t-PA-Analytik geeignet.

4.5 HPMDC mit hGH

4.5.1 Kalibration der Disks mit Reinsubstanz

Nach der Immobilisierung der Antikörper wird die Disk mit hGH-Standards im Konzentrationsbereich von 0 – 30 µg/ml in ProCHO kalibriert. In Tabelle 4.7 auf Seite 51 ist das verwendete Chromatographieprogramm aufgelistet. Es wird jeweils 1 ml Probe bei einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Wie BioPro 1 enthält auch ProCHO fluoreszenzaktive Bestandteile, die nicht auf der Disk binden. Der Aufbau des Chromatogramms entspricht daher dem Chromatogramm in Abbildung 4.12 auf Seite 32.

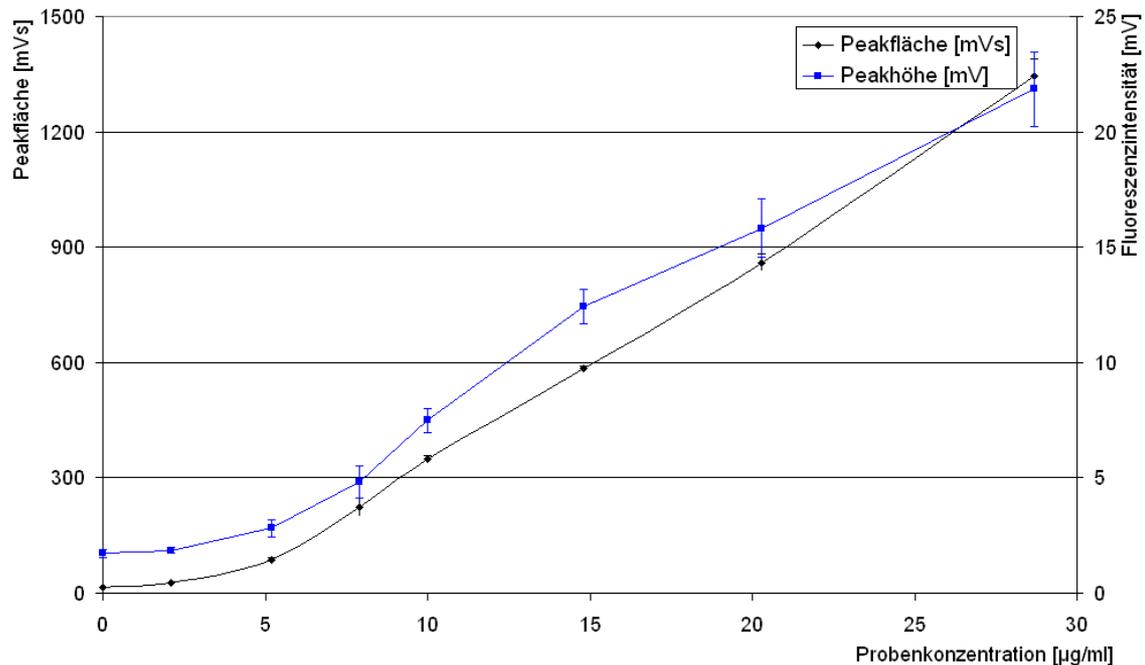


Abbildung 4.29: Kalibrierung der anti-hGH-Disk mit hGH-Standard über die Peakfläche und Peakhöhe des Eluats.

In Abbildung 4.29 auf Seite 51 sind die Peakfläche und die Peakhöhe des eluierten Wachstumsfaktors gegen die Konzentration des Wachstumshormons in der Probe aufgetragen. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml hGH zeigen beide Graphen eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration, wobei dies der unteren Messgrenze entspricht. Da das Bestimmtheitsmaß R^2 mit 0,9991 für die Peakfläche größer ist als 0,9892 für die Peakhöhe, wird die hGH-Konzentration mittels HPMDC über die Peakfläche bestimmt. Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 96 % unabhängig von der Probenkonzentration.

4.5.2 Bestimmung der Konzentration im Zellkulturüberstand

Die Abbildung 4.30 auf Seite 52 zeigt den Vergleich von HPMDC und ELISA bei der Kalibrierung der Disk mit Zellkulturüberstand als Mittelwert dreier Proben mit der Standardabweichung. Für Probenkonzentrationen größer 30 µg/ml wird die Probe mittels einer Vivaflow 500-Einheit aufkonzentriert. Es werden die Chromatographiebedingungen aus Abschnitt 4.5.1 Seite 50 verwendet. Zusätzlich ist die Ausbeute aufgeführt, die sich aus der

Zeit [min]	0-2,5	2,5-3	3-3,3	3,3-4,3	4,3-4,8
Eluent	A	B	A	C	A

Tabelle 4.7: Verwendetes Chromatographieprogramm zur Kalibrierung der anti-hGH-Disk. A: Waschpuffer, B: 2 M NaCl; 0,01 M HCl

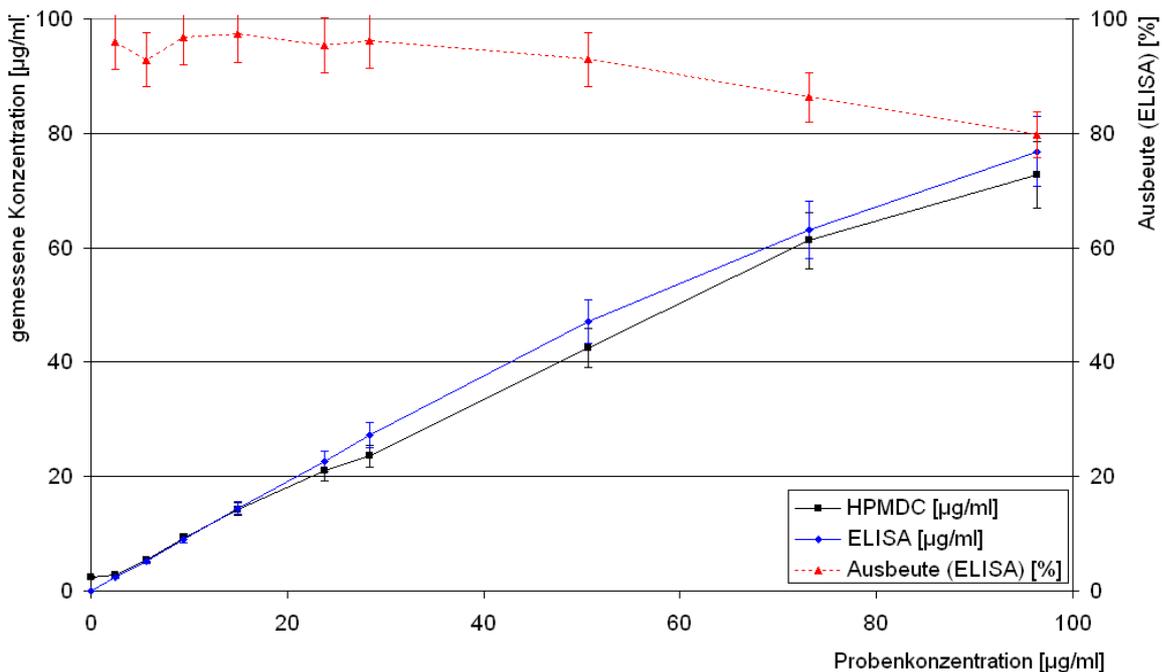


Abbildung 4.30: Vergleich von ELISA und HPMDC bei der Bestimmung der hGH-Konzentration in Zellkulturüberstand.

Berechnung mit dem ELISA für das Eluat ergibt. Wie zuvor bei der Kalibration mit dem Standard beträgt die untere Messgrenze für die HPMDC 5 µg/ml hGH. Im Messbereich bis 96,3 µg/ml steigt der Graph linear an. Ein Unterschied zum ELISA wird nicht gemessen. Die Ausbeute der Läufe beträgt bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml hGH 93 – 97 %. Bei höheren Konzentrationen sinkt jedoch die Ausbeute auf 80 %, d.h. ab dieser Beladung bricht ein Teil der Probe unter den gewählten dynamischen Bedingungen durch. Zur schnellen Analytik eignet sich die HPMDC bis 100 µg/ml hGH. Die Reinheit der Eluate wird über ein SDS-Gel kontrolliert (siehe Abbildung 4.31 auf Seite 53). Auf Bahn 5 und 14 ist ein Proteinstandard aufgetragen. Bahn 9 zeigt den hGH-Standard, der noch ein leichteres Protein mit einem Gewicht von ca. 12 kDa enthält. Auf Bahn 8 ist das Eluat einer Probe mit 14 µg/ml hGH aufgetragen. Das aus der Zellkultur aufgereinigte hGH ist geringfügig leichter als der Standard. Bis auf eine leichte Bande bei 60 - 70 kDa ist keine Verunreinigung des Eluats zu erkennen.

4.5.3 Elution mit verschiedenen Elutionsmitteln

Um die Bindungsstärke zwischen hGH und anti-hGH zu untersuchen, wird eine Reihe weiterer Elutionsmittel untersucht. Für die Versuche wird Überstand mit 20,8 µg/ml hGH verwendet. Durch Regeneration der Disk mit Kaliumthiocyanat wird überprüft, ob die Elution mit 0,01 M HCl vollständig verläuft. Durch Variation des pH-Wertes und der Ionenstärke wird untersucht,

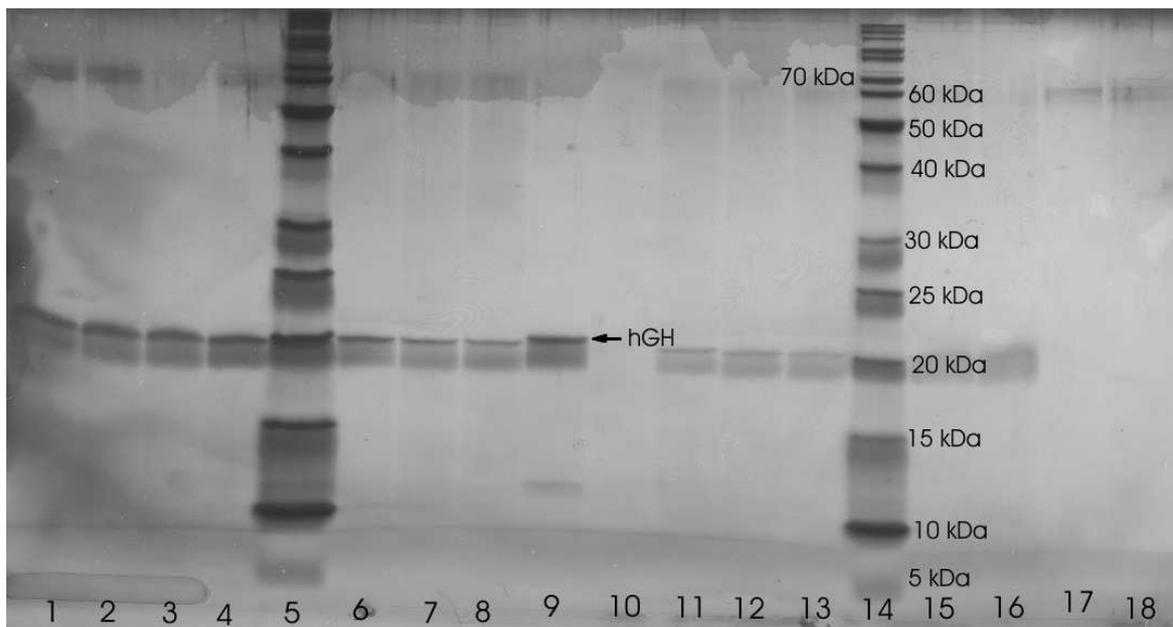


Abbildung 4.31: Übersicht über die Reinheit des Eluats bei verschiedenen Versuchsbedingungen: 1) Diskalter 4 Wochen; 2) Diskalter 8 Wochen; 3) Flussrate 4 ml/min; 4) Flussrate 10 ml/min; 5) Marker; 6) ÜS + 100 mM PBS; 7) ÜS + 200 mM PBS; 8) Standardbedingung; 9) hGH-Standard; 10) leer; 11) ÜS + 250 mM NaCl; 12) ÜS pH 7,25; 13) ÜS pH 6,0; 14) Marker; 15) Elution Glycin/HCl pH 2; 16) Elution 1,5 M KSCN; 17) Elution NaOH pH 12; 18) Elution 1,5 M NaCl

ob eine schonendere Elution von hGH möglich ist. Im Chromatographieprogramm wird ein zusätzlicher Spülschritt von einer Minute mit dem zu untersuchenden Elutionsmittel vor der Elution mit 0,01 M HCl eingefügt. In Abbildung 4.32 auf Seite 54 ist die mittels HPMDC ermittelte Konzentration im Zellkulturüberstand dargestellt. Die Versuche zeigen, dass mit 0,01 M HCl oder Glycin/HCl pH 2 hGH vollständig eluiert wird. Bei Verwendung von 1,5 M und 3 M KSCN werden noch weitere fluoreszenzaktive Substanzen eluiert. Dabei handelt es sich jedoch nicht um Protein, da dies durch ein Coomassie-Test nicht nachgewiesen wird (Daten nicht gezeigt). Bei etwas höheren pH-Werten (pH 3-4) wird noch 17 % des hGH eluiert während es im basischen Milieu gar nicht eluiert wird. Durch eine erhöhte Ionenstärke (3 M NaCl oder 1 M LiCl) lässt sich ein ebenso hoher Anteil wie bei pH eluieren. Die Bindung zwischen hGH und anti-hGH ist demnach sehr stark. Die Überprüfung der Reinheit des Eluats für die Elution mit Glycin/HCl pH 2 und 1,5 M KSCN zeigt, dass die Elutionsbedingungen keinen Einfluss auf die Aufreinigung haben (siehe Abbildung 4.31 auf Seite 53; Bahn 15 und 16). , 17 und 18). Das SDS-Gel bestätigt weiterhin, dass im basischen Milieu die Elution von hGH nicht möglich ist (Bahn 17).

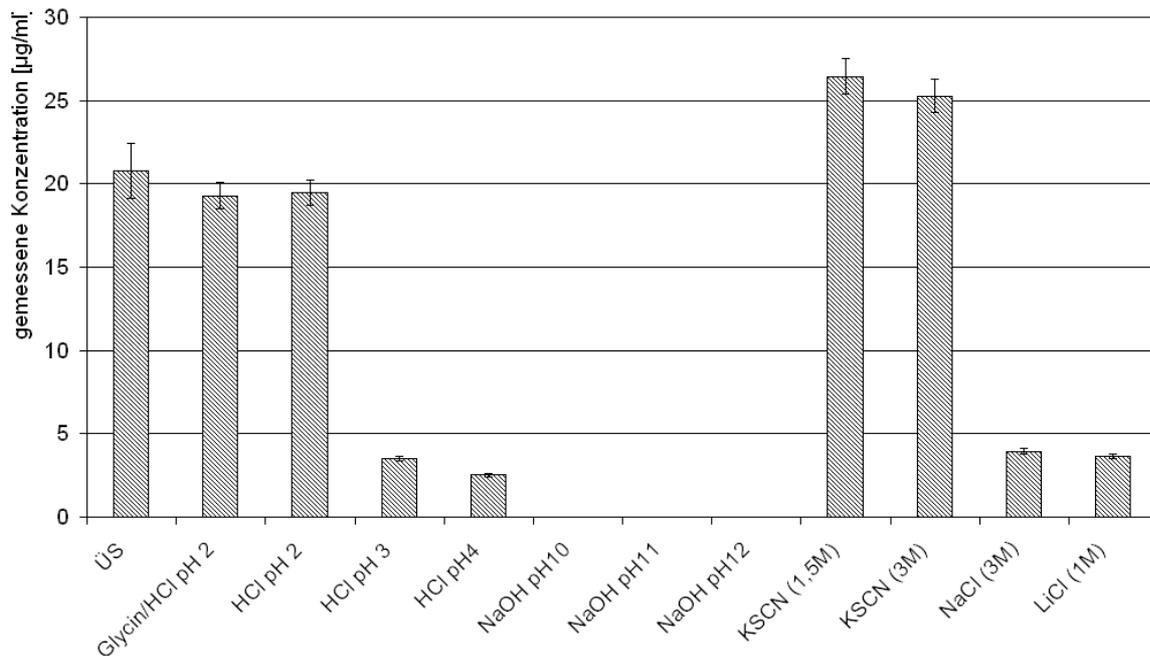


Abbildung 4.32: Einfluss von pH-Wert und Ionenstärke auf die Elution von hGH. Dargestellt ist die mittels HPMDC berechnete hGH-Konzentration als Mittelwert dreier Messungen und die Standardabweichung.

4.5.4 pH-Wert des Zellkulturüberstandes

Wie bei der Kultivierung von CHO t-PA kann der pH-Wert des Zellkulturüberstandes zwischen pH 6,0 und 8,0 schwanken. Bei diesen Versuchen geht es weniger darum, das Verhältnis Kontaminant/Produkt zu verschieben, sondern zu untersuchen, ob der Zeitpunkt der Probennahme und der Zeitraum zwischen Probennahme und Messung einen Einfluss auf die Bindung von hGH hat. Zu Beginn der Kultivierung ist das Medium ausreichend gepuffert und der pH-Wert des Überstandes beträgt 7,2. Mit fortschreitender Kultivierung und damit einhergehender Übersäuerung sinkt der pH-Wert bis auf 6,4. Bei Entnahme der Probe aus dem Brutschrank steigt der pH-Wert durch den Gasaustausch mit der Umgebungsluft an. pH-Werte von über 7,4 werden allerdings selten erreicht. Für die Versuche wird im Zellkulturüberstand der gewünschte pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt. In Abbildung 4.33 auf Seite 55 ist die hGH-Konzentration des verwendeten Überstandes (ÜS) und der Proben mit eingestellten pH-Werten aufgetragen, die nach der Elution bestimmt wird. Es zeigt sich, dass die Bindung von hGH im gewählten Messbereich unabhängig vom pH-Wert ist. Eine Konditionierung der Probe ist daher nicht notwendig.

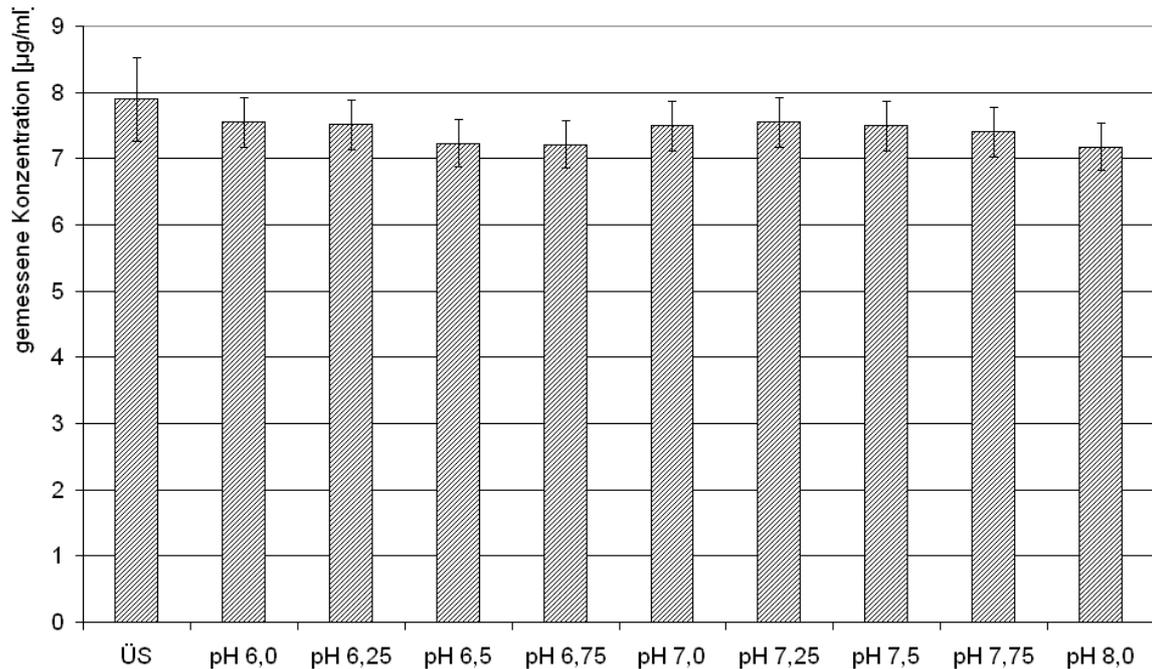


Abbildung 4.33: Einfluss der pH-Wertes des Zellkulturüberstandes auf die Bindung von hGH durch den Antikörper. Dargestellt ist die hGH-Konzentration im Eluat. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Messungen mit der Standardabweichung.

4.5.5 Einfluss der Flussrate auf die Bindungskapazität der Disk

In Abschnitt 4.5.2 wurde gezeigt, dass es bei einer Beladung der Disk mit 50 µg hGH bei einer Flussrate von 2 ml/min zum Durchbruch der Probe kommt. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der dynamischen Kapazität der Disk wird nun die Flussrate schrittweise erhöht und die hGH-Konzentration im Eluat bestimmt. Daraus wird die Kapazität pro ml Diskvolumen berechnet, die in Abbildung 4.34 auf Seite 56 aufgetragen ist. Bei einer Flussrate von 2 ml/min beträgt die dynamische Kapazität 133,2 µg/(ml Disk). Bei einer Erhöhung der Flussrate auf 4 ml/min sinkt die Kapazität auf 90,6 µg/(ml Disk). Durch eine weitere Steigerung der Flussrate sinkt sie langsamer und beträgt bei 10 ml/min 67,9 µg/(ml Disk). Bei der Flussrate von 10 ml/min wurde ein Rückdruck von 48 bar gemessen, sodass höhere Flussraten aufgrund der Begrenzung des Betriebsdruckes des CIM-Gehäuses auf 50 bar nicht möglich sind. Festzustellen ist, dass durch Erhöhung der Flussrate um den Faktor 5 die Kapazität der Disk auf die Hälfte sinkt. Es ist also effizienter, einen batch in mehreren Zyklen mit hohen Flussraten aufzureinigen. Dieses Verhalten lässt sich dadurch erklären, dass mit steigender Flussrate die Verweilzeit der Probe im Monolithen sinkt. Bei einer langen Verweilzeit reicht die Diffusionsgeschwindigkeit von hGH aus, um aus der Kernströmung in den Makroporen auch in die kleinsten Mesoporen zu diffundieren und die Oberfläche vollständig zu nutzen (2 ml/min).

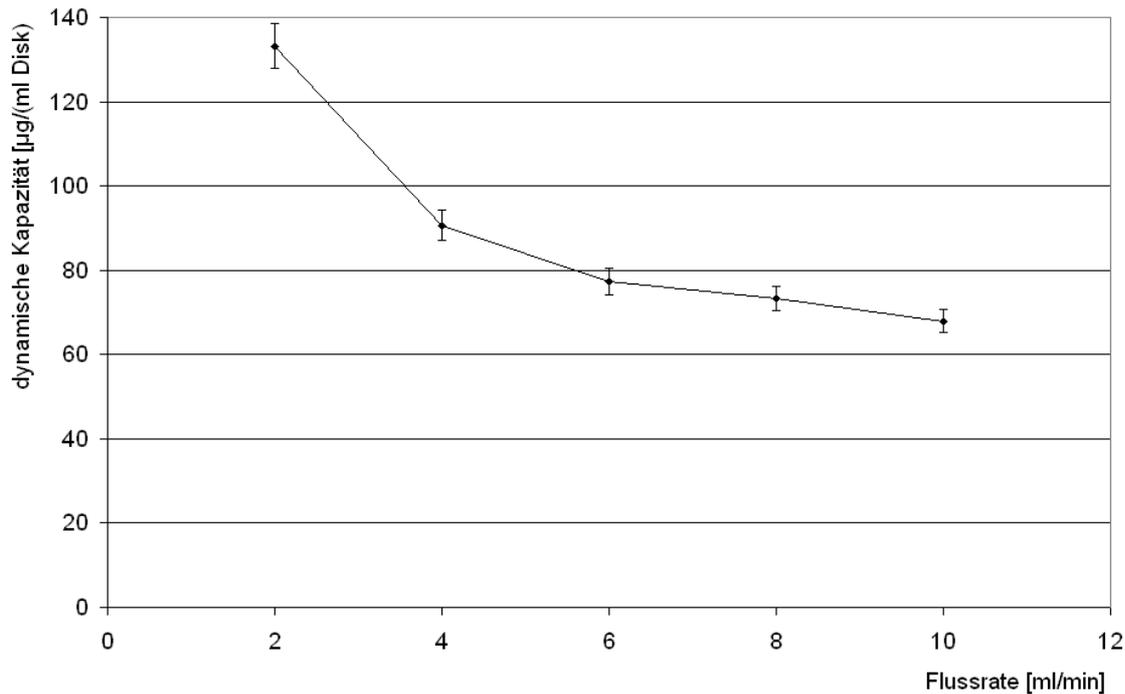


Abbildung 4.34: Abhängigkeit der dynamischen Kapazität der anti-hGH-Disk von der Flussrate (Mittelwert aus drei Messungen).

Bei sinkender Verweilzeit steigt der Anteil der Poren, die durch Diffusion nicht mehr erreicht werden, und die Kapazität der Disk sinkt (4 ml/min). Die Kapazität des Monolithen bleibt bei weiter sinkender Verweilzeit nahezu konstant, solange die Diffusionsgeschwindigkeit ausreicht um aus der Strömung in den Makroporen die Diskoberfläche zu erreichen (6-10 ml/min). Die Konstanz der dynamischen Kapazität über einen weiten Bereich der Flussrate zeigt, dass der Massentransfer überwiegend konvektionskontrolliert ist und nur ein kleiner Teil der inneren Oberfläche der Porendiffusion unterliegt.

4.5.6 Untersuchung zur Anwendung der anti-hGH-Disk zur schnellen off-line-Analytik

Eine Probe mit 28,8 µg/ml hGH wird mehrfach gemessen, um die Reproduzierbarkeit der HPMDC zu untersuchen (siehe Abbildung 4.35, Seite ??). Bei 8 aufeinander folgenden Messungen beträgt die Abweichung zur Referenz (Lauf 0) durchschnittlich 5 %. Die maximale Abweichung von 8 % tritt bei Lauf 3 (26,5 µg/ml) und 8 (27,1 µg/ml) auf, wobei die Abweichungen im Rahmen der Messgenauigkeit liegen. Die Eignung der anti-hGH-Disk wird auch durch die Bestimmung der hGH-Konzentration aus verschiedenen bestätigt. Für sechs Chargen Zellkulturüberstand wird mit dem ELISA durch eine Einzelmessung eine Konzentrationen von 13,6 bis 14,9 µg/ml hGH bestimmt. Anschließend wird die Konzentration mittels

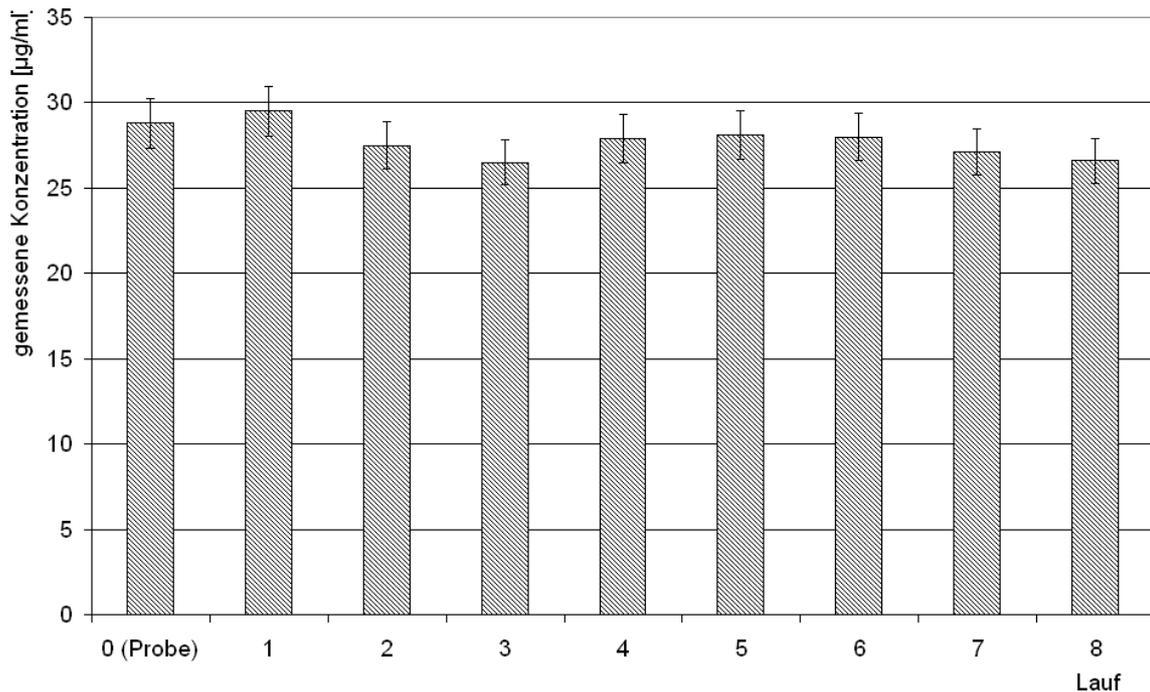


Abbildung 4.35: Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der mittels HPMDC berechneten Konzentration. Dargestellt ist die wiederholte Messung eines Zellkulturüberstandes. Die hGH-Konzentration des Überstandes beträgt 28,8 µg/ml (Messung durch ELISA)

HPMDC und die Werte verglichen. Auch hier liegen die Abweichungen im Rahmen der Messgenauigkeit. Die Spezifität der Antikörper-Disk ist daher so hoch, dass die Bindung nicht durch Bestandteile des Zellkulturüberstandes gestört wird.

4.5.7 Einfluss der Alterung der Disk

Der Einfluss der Alterung der Disk auf die Analyse des hGH-haltigen Überstandes ist in Abbildung 4.37 auf Seite 59 dargestellt. Für die Versuche wird Überstand mit hGH-Konzentrationen von 2,5 – 20 µg/ml aus mehreren Chargen gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Konzentration zu erreichen. Der Überstand wird portioniert und bei -20 °C eingefroren. Am Tag nach der Immobilisierung der Antikörper werden die ersten Proben gemessen (0. Woche), die weiteren Proben nach 4, 8 und 12 Wochen. Nach 13 Wochen löst sich der Monolith aus der Ummantelung und kann nicht mehr für Versuche eingesetzt werden.

Die Abbildung zeigt die Peakfläche des Elutionspeaks in Abhängigkeit von der Probenkonzentration. Die Peakfläche der Proben nehmen innerhalb des ersten Monats durchschnittlich um 15 % ab. Der stärkste Abfall der Peakfläche wird zwischen der 4. und 8. Woche gemessen, die Peakfläche sinkt auf 57 % der ursprünglichen Fläche. Danach verlangsamt sich die Degeneration der Antikörper, die Peakfläche sinkt auf 45 % der ursprünglichen Fläche. Die Steigung

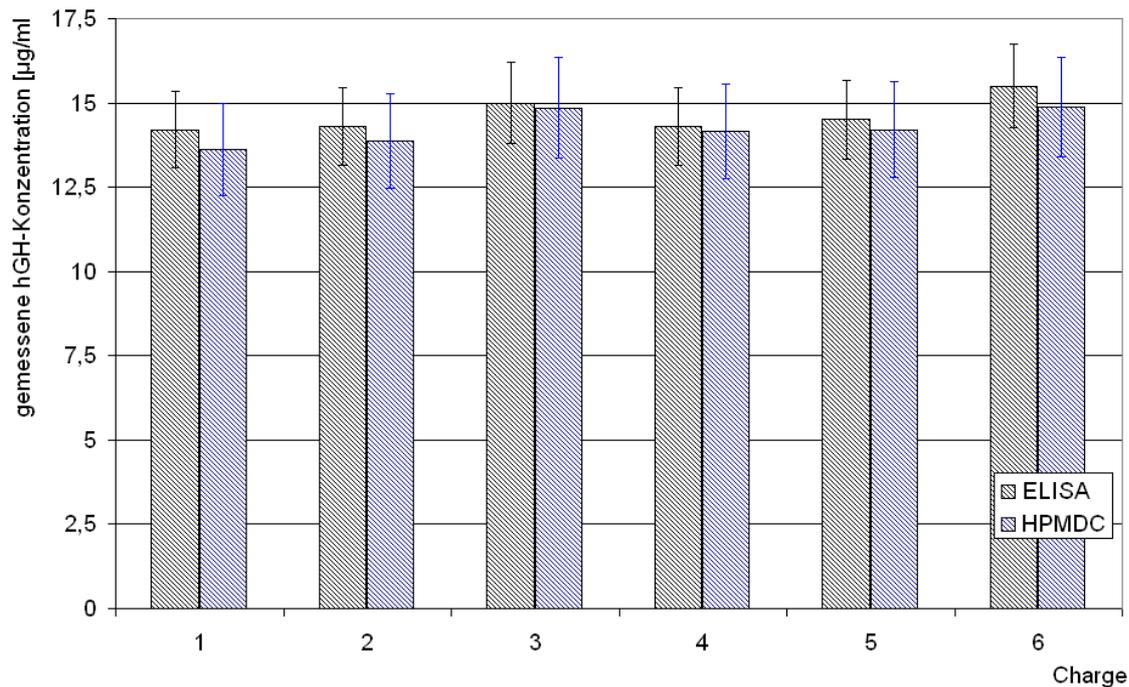


Abbildung 4.36: Untersuchung zur Chargenabhängigkeit der Bestimmung der hGH-Konzentration aus Zellkulturüberstand. In sechs Zellkulturüberständen wird die hGH-Konzentration mittels ELISA und HPMDC bestimmt.

der Kalibrationsgeraden ist nach 12 Wochen aber noch ausreichend steil, dass die Disk zur Analytik der Zellkulturen im gesamten Messbereich eingesetzt werden kann. Mit steigender Konzentration der Probe sinkt die Peakfläche schneller, weil die dynamische Kapazität der Disk abnimmt. Im Gegensatz zur Alterung der anti-t-PA-Disk wird bei der Alterung der anti-hGH-Disk kein Anstieg der unspezifischen Adsorption beobachtet. Die gelelektrophoretische Untersuchung der Eluate nach 4 und 8 Wochen zeigt eine vermehrte Bindung der einzigen Verunreinigung mit einer Größe von 60 - 70 kDA.

Bei der Beurteilung der Alterung der Disk ist zu beachten, dass im Versuchszeitraum von 3 Monaten ca. 240 Proben vermessen wurden. Da die Einsatzdauer der Disk wesentlich von der Schädigung der Antikörper durch die Elution mit Salzsäure abhängt, ist bei einem täglichen Routineeinsatz der Disk zur Analytik mit einer wesentlich kürzeren Lebensdauer als 3 Monate zu rechnen. Trotzdem besitzt die HPMDC gegenüber dem ELISA den Vorteil, Proben kontinuierlich über einen längeren Zeitraum messen zu können, ohne jedes Mal eine Kalibration durchführen zu müssen. Aufgrund dieser Eigenschaft, zusammen mit der hohen Spezifität des Nachweises, ist die HPMDC besonders für die tägliche Kontrolle der Produktivität einer Zelllinie geeignet.

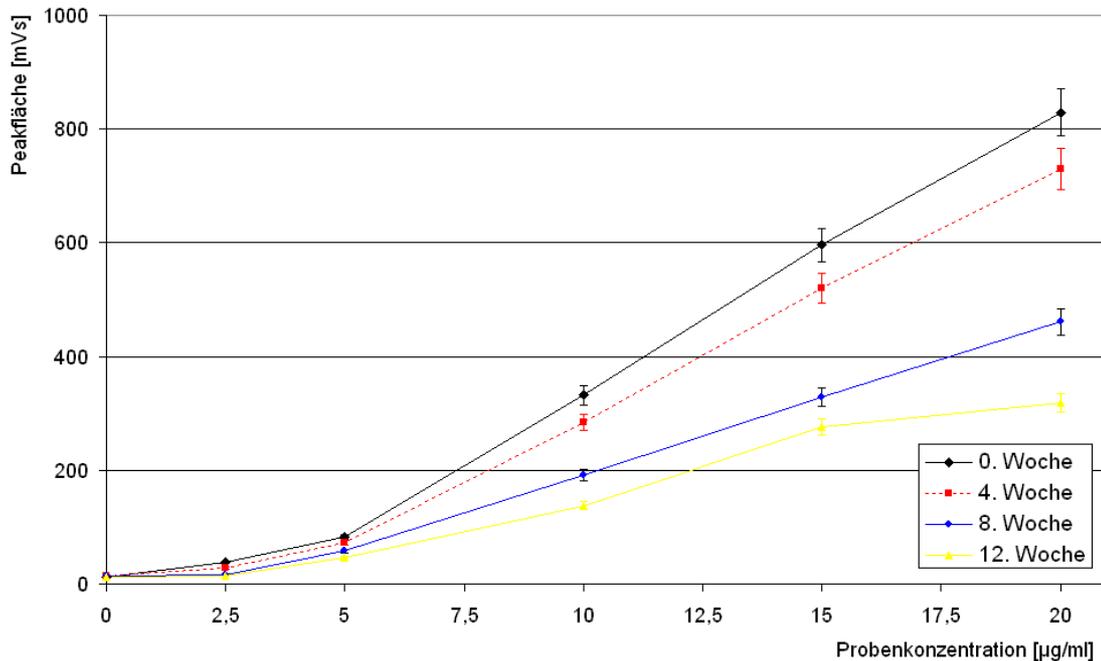


Abbildung 4.37: Einfluss der Alterung der anti-hGH-Disk auf die Bindung von hGH aus Zellkulturüberständen.

Die präparative Aufreinigung wird durch die Alterung der Disk stark beeinflusst, da die dynamische Kapazität der Disk sehr schnell sinkt (siehe Abbildung 4.38, Seite 60). Die dynamische Kapazität nimmt von 133,2 auf 52,8 µg hGH/(ml Disk) innerhalb von einer Woche ab, d.h. sie verliert 60 % ihrer Kapazität. Danach sinkt die dynamische Kapazität langsamer. Nach vier Wochen ist die Kapazität auf 20 % gesunken, nach 12 Wochen auf 10 % (13,3 µg hGH/(ml Disk)). Werden sehr hohe Kapazitäten für die Aufreinigung benötigt, weil die Aufreinigung großer Chargen in kurzer Zeit durchgeführt werden müssen, um z.B. Proteasen vom Zielprodukt zu entfernen, beschränkt sich die Standzeit der Antikörper-Disk auf zwei Wochen. Wenn eine hohe Stabilität des Produktes gegeben ist, und die Aufreinigung über mehrere Zyklen möglich ist, kann die Standzeit der Disk bis zu drei Monaten betragen.

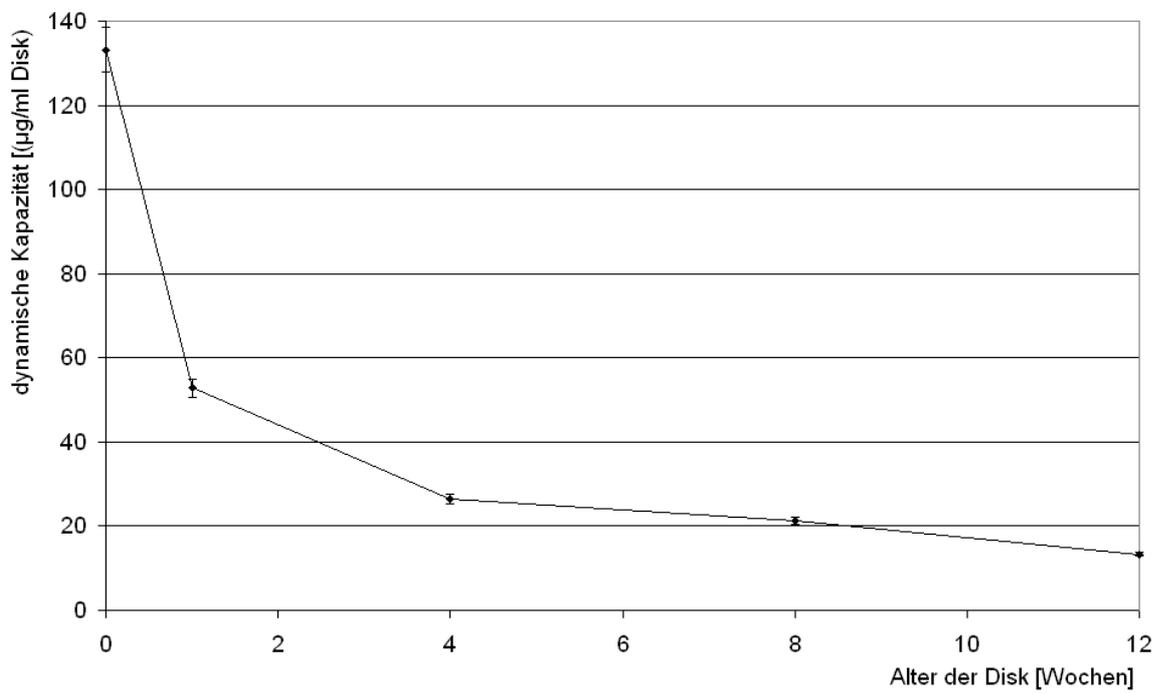


Abbildung 4.38: Abhängigkeit der dynamischen Kapazität bei einer Flussrate von 2 ml/min von der Alterung der Disk.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von monolithischen Trägern für eine schnelle off-line-Analytik und für die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Tierzellkulturen untersucht. Die Untersuchung erfolgte an zwei CHO-Suspensionzelllinien, die den Gewebeplasminogenaktivator t-PA und das humane Wachstumshormon hGH produzieren und in den Zellkulturüberstand abgeben. Für die Analytik und Aufreinigung wurden polyklonale und monoklonale Antikörper auf epoxy-aktivierten CIM-Disks immobilisiert. Bei verschiedenen Konzentrationen von 1 ml Antikörperlösungen (1,5 – 5 mg/ml) wurden 22,3 – 24,6 nm anti-tPA/ml Disk immobilisiert. Bei Verwendung von 1 und 1,5 mg/ml anti-hGH wurden 19,6 bzw. 26,8 nmol anti-hGH/ml Disk immobilisiert. Die Immobilisierung von hGH verläuft demnach konzentrationsabhängig, die Immobilisierung von anti-t-PA nicht. Sowohl die anti-t-PA-Disk als auch die anti-hGH-Disk zeigten keine unspezifische Bindung bei Tests mit reinen Proteinlösungen.

Nach der Untersuchung mehrerer Antikörper-Antigen-Systeme für die t-PA-Analytik wurde ein geeignetes System ausgewählt. Für dieses System wurde die maximale Bindungskapazität der Disk und die Dissoziationskonstante durch Frontalanalyse bestimmt. Die Dissoziationskonstante beträgt $2 \cdot 10^{-7}$ M. Die Bindung ist stark genug, um in der Affinitätschromatographie eingesetzt zu werden. Im Gleichgewicht können maximal 793 µg/ml Disk gebunden werden. Die Immobilisierungsmethode erlaubt keine Kontrolle der räumlichen Orientierung der Antikörper auf der Diskoberfläche. Dies könnte der Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, mit dem Ziel den Ausnutzungsgrad des Antikörpers zu erhöhen.

Trotz der Bindungsstärke konnte die anti-t-PA Disk im Gegensatz zur hGH-Disk nur bedingt bei der Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Bei denen in der Literatur beschriebenen Versuchsbedingungen für die Affinitätschromatographie konnte die Disk nur mit reinem t-PA kalibriert werden, bei Verwendung von Zellkulturüberstand mit bis zu 10 µg/ml t-PA wurde Koelution von so vielen Substanzen beobachtet, dass eine Aufreinigung nicht erkennbar war. Durch Standardzusatz der Proben wurde gezeigt, dass diese Substanzen wahrscheinlich kompetitiv binden. Bei Konzentration von über 25 µg/ml t-PA gelang die Aufreinigung. Eine verbesserte Aufreinigung durch Optimierung der Puffer- und Elutionsbedingungen war nicht erfolgreich.

hGH konnte nach einer Amplifikation mit MTX mittels HPMDC aufgereinigt werden. Die untere Messgrenze in Zellkulturüberstand betrug für die hGH-Analytik 5 µg/ml bei der Verwendung von einem Fluoreszenzspektrometer. Bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml hGH zeigte die Disk eine lineare Abhängigkeit der Peakfläche des Elutionspeaks von der Konzentration im Zellkulturüberstand. Die Bindung zwischen hGH und anti-hGH war so stark, dass hGH mit 0,01 M HCl eluiert werden musste. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der

pH-Wert des Zellkulturüberstandes für die Aufreinigung nicht eingestellt werden muss. Die dynamische Bindungskapazität betrug $133,2 \mu\text{g/ml}$ Disk bei einer Flussrate von 2 ml/min . Bei einer Steigerung der Flussrate um den Faktor 5 sank die Kapazität nur um 50% . Dies zeigt, dass die Disk für die Aufreinigung von Zellkulturüberständen geeignet ist und mit hohen Volumenströmen betrieben werden sollte.

Der Einsatz der Disk für die Kontrolle von Zellkulturen wurde bei einer Studie der optimalen Kultivierungstemperatur von CHO hGH und bei dem Einsatz verschiedener Kultivierungssysteme untersucht. Weder die Kultivierungstemperatur, noch das Kultivierungssystem hatten einen messbaren Einfluss auf das Bindungspaar hGH – anti-hGH. Der Vergleich zwischen der HPMDC und dem ELISA als Referenzmethode zeigte in keinem der Versuche mit Zellkulturüberstand eine Differenz. Somit lässt sich die HPMDC als Alternative zum ELISA verwenden.

Die Langzeitversuche zeigten, dass mit den Antikörper-Disks ca. 240 Proben gemessen werden konnten. Da mit der HPMDC kontinuierlich Proben mit einem geringen Kalibrationsaufwand gemessen werden können, ist die HPMDC besser als der ELISA für die tägliche Kontrolle der Produktivität einer Zelllinie geeignet. Während die Disk zur Analytik über mehrere Wochen eingesetzt werden konnte, sank die dynamische Kapazität der Disk innerhalb einer Woche von $133,2$ auf $52,8 \mu\text{g hGH}/(\text{ml Disk})$. Nach 12 Wochen sank die dynamische Kapazität auf $13,3 \mu\text{g hGH}/(\text{ml Disk})$. Eine Standzeit von 12 Wochen kann realisiert werden eine Aufreinigung stabiler Produkte über mehrere Zyklen möglich ist.

Bei der Studie der Zellkultursysteme wurden drei Kultivierungssysteme als Alternative zur Spinnerflasche untersucht: RCCS, BelloCell und miniPERM. Besonders im BelloCell und RCCS wurden sowohl höhere Zelldichten als auch eine höhere hGH-Produktion erzielt. Ausgehend von der Spinnerflaschen mit einer maximalen Zellzahl von $1,06 \cdot 10^6$ Zellen/ml konnte die Zelldichte auf $2,27 - 2,41 \cdot 10^6$ Zellen/ml in miniPERM und RCCS gesteigert werden. Die höchste Zellzahl wurde für den BelloCell mit $7,73 \cdot 10^6$ Zellen/ml berechnet. Bei Abbruch der Kultur zeigte sich eine gute Korrelation zwischen berechneter und mit Trypan-Blau-Lösung bestimmter Zellzahl. Das schnellere Wachstum im BelloCell wurde mit einer zweiten adherenten Zelllinie bestätigt. Hier konnte die maximale Zellzahl von $3,4 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in der Rollerflasche auf $4,6 - 4,9 \cdot 10^5$ Zellen/cm² im BelloCell im Perfusions- und Fed-batch-Betrieb gesteigert werden. Die hGH-Produktion wurde durch den Wechsel des Kultivierungssystems von 24 auf 70 mg/L Medium gesteigert.

6 Anhang

6.1 Puffer für die HPMDC

Folgende Puffer bilden den Grundstock für Versuche mit der HPMDC. In den jeweiligen Versuchen sind die Modifikationen der Puffer angegeben.

Name	Funktion	Zusammensetzung
A	Waschpuffer	10 mM KPi; pH 7,0; 150 mM NaCl
B	Desorption unspezifisch gebundener Substanzen	2 M NaCl in 10 mM KPi, pH 7,0
C	Desorption spezifisch gebundener Substanzen	HCl pH 2,0

6.2 SDS-PAGE

6.2.1 Probenvorbereitung

Die Probe wird 1:1 mit Laemmli-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 2 mM EDTA + 5 % SDS + 0,02 % Bromphenolblau) verdünnt. Die Probe wird 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wird die Probe 3 min bei 12000 g zentrifugiert.

Bei Verwendung der Phast-Gel-Anlage werden die Proben mit Hilfe eines Applikationskammes auf das Gel aufgetragen. Beim Criterion-System werden die Proben mit Pipetten in die Vertiefungen des Gels injiziert.

6.2.2 Programm für die Trennung im Phast-System

Schritt	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Temperatur [°C]	Dauer [Vh]	Anmerkung
1	250	10	3	5	1	Probenauftrag
2	250	1	3	5	1	
3	250	10	3	15	70	

6.2.3 Programm für die Trennung in der Phast-Anlage

Schritt	Spannung [V]	Dauer [min]
1	120	20
2	200	60

6.2.4 Entwicklung der Gele im Phast-System

Schritt	Lösung	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	10 % Ethanol, 5 % HAc	2	50
2	10 % Ethanol, 5 % HAc	4	50
3	0,3 g NaAc + 4 ml 1,6 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 10 ml 5 % Glutaraldehyd + 30 ml 95 % EtOH, 5 % HAc + 56 ml bidest	6	50
4	10 % Ethanol, 5 % HAc	3	50
5	10 % Ethanol, 5 % HAc	5	50
6	Wasser (bidest)	2	50
7	Wasser (bidest)	2	50
8	0,4 % Silbernitrat	6,5	40
9	Wasser (bidest)	0,5	30
10	Wasser (bidest)	0,5	30
11	90 μl Formaldehyd in 2,5 % Na_2CO_3	0,5	30
12	90 μl Formaldehyd in 2,5 % Na_2CO_3	4	30
13	3,7 g Tris-HCl + 1,76 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 100 ml Wasser (bidest) mit Eisessig auf pH 5-6 eingestellt	2	30
14	5-10 % Glycerin	5	50

6.2.5 Entwicklung der Criterion-Gele auf dem Schüttler

- Gel 30 min in den Fixierer legen (5 Teile Wasser; 5 Teile EtOH; 1 Teil HAc).
- Mit dest. Wasser zweimal kurz waschen.
- 2,5 Minuten in Farmers Reducer legen (1 Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat(II), 1 Spatelspitze Natriumthiosulfat).
- Mit dest. Wasser 5 Minuten pro Schritt waschen. Solange wiederholen, bis Gel völlig entfärbt ist.
- 30 min in 0,1%ige Silbernitratlösung legen.
- Zweimal 30 sec mit dest. Wasser waschen.

-
- Mit Natriumcarbonatlösung waschen.
 - In Natriumcarbonatlösung legen, 150 µl Formaldehyd am Rand der Färbekammer zusetzen und warten, bis braune Banden auf dem Gel zu sehen sind.
 - Das Gel 10 Minuten in 5%ige Essigsäure legen.
 - Vor der dem Einscannen des Gels erfolgt die Lagerung in Reinstwasser

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2-Azino-di(3-Ethylbenzthiozolesulfonat-(6))
BP 1	BioPro 1
BSA	bovine serum albumin
C	Analytkonzentration in der flüssigen Phase
CHO	Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (chinese hamster ovary)
CIM	Convective Interaction Media
CIP	clean-in-place
d	Tag
Da	Dalton
DHFR	Dehydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Em	Emmissionswellenlänge bei der Fluoreszenz
Ex	Anregungswellenlänge bei der Fluoreszenz
Fa.	Firma
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GMA-EDMA	glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate
g/L	Gramm/Liter
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
hGH	humaner Wachstumsfaktor (human growth hormone)
HPLC	high performance liquid chromatography
HPMDC	high performance monolithic disk chromatography
IDA	Iminodiessigsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
K_{Diss}	Dissoziationskonstante
kDa	1000 Da
KPi	Kaliumphosphatpuffer
mAB	monoklonaler Antikörper
mM	millimolar
MTX	Methotrexat

mVs	Millivolt · Sekunde
MWCO	molecular weight cut-off
NaAc	Natriumacetat
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NCS	newborn calf serum
PBS	phosphate buffered saline
q	Festphasenkonzentration des Analyten
q _m	maximale Adsorptionskapazität
RCCS	Rotating Cell Culture System
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis
t-PA	Gewebeplasminogen-Aktivator
Upm	Umdrehungen/Minute
ÜS	Zellkulturüberstand
Vh	Volt · Stunde
YSI	Yellow Springs Instruments

Name	Alexander Tappe	
Geburtsdatum	10.06.1975	
Geburtsort	Hannover	
Schulausbildung	Aug. 1981 - Juli 1985	Grundschule Mühlenweg
	Aug. 1985 - Juli 1987	Orientierungsstufe Misburg
	Aug. 1987 - Juni 1994	Gymnasium Misburg
	Juni 1994	Abitur
Grundwehrdienst	Okt. 1994 - Sept. 1995	
Universitätsausbildung	Okt. 1995 - Sept. 2000	Grund- und Hauptstudium Chemie an der Universität Hannover
	Okt. 2000 - März 2001	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, Hannover
	Juni 2001 - Dez. 2005	Dissertation: Entwicklung einer Affinitätstechnologie für die Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Säugetierzellen
	Apr. 2002	Forschungsaufenthalt an der Russischen Akademie der Wissenschaften in St. Petersburg auf dem Gebiet der HPMDC
beruflicher Werdegang	seit Jan. 2006	Wissenschaftler bei der Sartorius AG

Literaturverzeichnis

- [1] *Affinity Chromatography Principles and Methods*. Amersham Biosciences, 2005
- [2] ALAM, K.S.M. ; MORIMOTO, M. ; YOSHIKATO, T. ; FURUKAWA, K. ; TANAKA, M. ; NAKASHIMA, K.: Expression and purification of a mutant human growth hormone that is resistant to proteolytic cleavage by thrombin, plasmin and human plasma in vitro. In: *Journal of Biotechnology* 65 (1998), S. 183–190
- [3] ANTON, F.: *Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktivität von Säugetierzellen*, Institut für Technische Chemie Hannover, Diplomarbeit, 2005
- [4] AUNINS, J.G ; BADER, B. ; CAOLA, A. ; GRIFFITHS, J. ; KATZ, M. ; LICARI, P. ; RAM, K. ; RANUCCI, C.S. ; ZHOU, W.: Fluid mechanics, cell distribution, and environment in CellCube bioreactors. In: *Biotechnol. Prog.* 19 (2003), S. 2–8
- [5] BAUWENS, C. ; YIN, T. ; DANG, R. ; ZANDSTRA, P.W.: Development of a Perfusion Fed Bioreactor for Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Generation Oxygen-Mediated Enhancement of Cardiomyocyte Output. In: *Biotechnology and Bioengineering* 90 (2005), Nr. 4, S. 452–461
- [6] BORYS, M.C. ; LINZER, E.T.: Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by chinese hamster ovary cells in a pH-dependent manner. In: *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994), S. 505–514
- [7] BOS, R. ; BERGER, L ; NIEUWENHUIZEN, W.: One-step purification of tissue-type plasminogen activator using affinity chromatography with a special monoclonal antibody under mild conditions. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1117 (1992), S. 188–182
- [8] BRANOVIC, K. ; BUCHACHER, A. ; BARUT, M. ; STRANCAR, A. ; JOSIC, D.: Application of semi-industrial monolithic columns for downstream processing of clotting factor IX. In: *Journal of Chromatography B* 790 (2003), S. 175–182
- [9] BUCH, T.: *Charakterisierung des Temperatureinflusses auf verschiedene rekombinante Säugerzelllinien zur Optimierung des Produktionsprozesses von Glykoproteinen in Rührkesselreaktoren*, Institut für Technische Chemie Hannover, Diss., 1997
- [10] BUCHMEISER, M.R.: New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports. In: *Journal of Chromatography A* 918 (2001), S. 233–266
- [11] CAREL, J.-C. ; ECOSSE, E. ; NICOLINO, M. ; TAUBER, M. ; LEGER, J. ; CABROL, S. ; BASTIE-SIGEAC, I. ; CHAUSSAIN, J.-L. ; COSTE, J.: Adult height after long term treatment with recombinant growth hormone for idiopathic isolated growth hormone

- deficiency: observational follow up study of the French population based registry. In: *BMJ* 325 (2002)
- [12] CATZEL, D. ; LALEVSKI, H. ; MARQUIS, C.P. ; GRAY, P.P. ; VAN DYK, D. ; MAHLER, S.M.: Purification of recombinant human growth hormone from CHO cell culture supernatant by Gradiflow preparative electrophoresis technology. In: *Protein Expression and Purification* 32 (2003), S. 126–134
- [13] CLYNES, M. (Hrsg.): *Animal Cell Culture Techniques*. Springer Lab Manual, 1998
- [14] DE NANTEUIL, G. ; LILA-AMBROISE, C. ; RUPIN, A. ; VALLEZ, M.-O. ; VERBEUREN, T.J.: New fibrinolytic agents: Benzothiophene derivatives as inhibitors of the t-PA-PAI-1 complex formation. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003), S. 1705–1708
- [15] DIAMOND, S.L. ; ESKIN, S.G. ; MCINTIRE, L.V.: Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. In: *Science* 243 (1989), S. 1483–1485
- [16] DUCOMMUN, P. ; RUFFIEUX, P.-A. ; STOCKAR, U. von ; MARISON, I.: The role of vitamins and amino acids on hybridoma growth and monoclonal antibody production. In: *Cytotechnology* 37 (2001), S. 65–73
- [17] DUVAR, S. ; HECHT, V. ; ZIEHR, H.: Biopharmazeutika-Produktion mit tierischen Zellen. In: *Laborwelt* 1 (2004), S. 34–36
- [18] EINARSSON, M. ; BRANDT, J. ; KAPLAN, L.: Large-scale purification of human tissue-type plasminogen activator using monoclonal antibodies. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 830 (1985), S. 1–10
- [19] GANGULY, S. ; TRILL, J.J.T. ; SHATZMAN, A.R.: Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. In: *Current Opinion in Biotechnology* 6 (1995), Nr. 5, S. 553–560
- [20] GELLERFORS, P. ; EKETORP, G. ; FHOLENHAG, K. ; PAVLU, B. ; JOHANSSON, S ; FRYKLUND, L.: Characterisation of a secreted form of recombinant derived human growth hormone, expressed in *Escherichia coli* cells. In: *J Pharm Biomed Anal.* 7 (1989), Nr. 2, S. 173–193
- [21] GLOVER, D.G. ; BARUT, M. ; PODGORNIK, A. ; STANCAR, A.: Revolutionizing Biotherapeutic Discovery and Production A New Generation of Chromatographic Supports. In: *BioProcess International* (2004), October, S. 58–63

- [22] HANSEN, H.A. ; EMBORG, C.: Influence of ammonium on growth, metabolism and productivity of a continuous suspension chinese hamster ovary cell culture. In: *Biotechnol. Prog.* 10 (1994), S. 121–124
- [23] HARO, L.S. ; CUBRIEL, A. ; BUSTAMANTE, J. ; FLORES, R. ; MARTINEZ, A.O.: Divalent metal cation chelators enhance chromatographic separation of structurally similar macromolecules: separation of human growth hormone isoforms. In: *Journal of Chromatography B* 720 (1998), S. 39–47
- [24] HU, Y.-U. ; LIU, H.-J. ; CHUNG, Y.-C.: High level expression of the key antigenic protein , σ C from avian reovirus into insect cells and its purification by immobilized metal affinity chromatography. In: *Biotechnol. Lett.* 24 (2002), S. 1017–1022
- [25] HUANG, E.P. ; MARQUIS, C.P. ; GRAY, P.P.: Process Development for a recombinant chinese hamster ovary (CHO) cell line utilizing a metal induced and amplified metallothionein expression system. In: *Biotechnology and Bioengineering* 88 (2004), Nr. 4, S. 437–450
- [26] JOSIC, D. ; BUCHACHER, A. ; JUNGBAUER, A.: Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion. In: *Journal of Chromatography B* 752 (2001), S. 191–205
- [27] KASPER, C. ; MERINGOVA, L. ; FREITAG, R. ; TENNIKOVA, T.B.: Fast isolation of protein receptors from streptococci G by means of macroporous affinity disks. In: *Journal of Chromatography A* 798 (1998), S. 65–72
- [28] KRAUSE, S. ; KRONER, K.H. ; DECKWER, W.-D.: Comparison of affinity membranes and conventional affinity matrices with regard to protein purification. In: *Biotechnology Techniques* 5 (1991), S. 199
- [29] LABROU, N.E.: Design and selection of ligands for affinity chromatography. In: *Journal of Chromatography B* 790 (2003), S. 67–78
- [30] LEE, G.M. ; YOON, S.K. ; HONG, J.K. ; CHOO, S.H. ; SONG, J.Y. ; PARK, H.W.: Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: Cell growth and recombinant protein production. In: *Journal of Biotechnology* (2005). – article in press, corrected proof
- [31] LÖFFLER, G. ; PETRIDES, P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 1998
- [32] LIGHTFOOT, E.N. ; MOSCARIELLO, J.S.: Bioseparations. In: *Biotechnology and Bioengineering* 87 (2004), Nr. 3, S. 259–269

- [33] LIN, A.A. ; KIMURA, R. ; MILLER, W.M.: Production of tPA in recombinant CHO cells under oxygen-limited conditions. In: *Biotechnology and Bioengineering* 42 (1993), S. 339–350
- [34] LOTTSPREICH, F. ; ZORBAS, H.: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998
- [35] LUO, Q. ; ZO, H. ; XIAO, X. ; GUO, Z. ; KONG, L. ; MAO, X.: Chromatographic separation of proteins on metal immobilized iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). In: *Journal of Chromatography A* 926 (2001), S. 255–264
- [36] MARTIN, I. ; DÉMARTEAU, O. ; JAKOB, M. ; SCHÄFER, D. ; HEBERER, M.: Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage. In: *Biorheology* 40 (2003), S. 331–336
- [37] MATUSO, O. ; TANBARA, Y. ; OKADA, K. ; FUKAO, H. ; BANDO, H. ; SAKAI, T.: High-performance chromatographic method for the purification of tissue-type plasminogen activator. In: *Journal of Chromatography* 369 (1986), S. 391–397
- [38] MORGAN, S.J. ; DARLING, D.C.: *Kultur tierischer Zellen*. Spektrum Akademischer Verlag, 1994
- [39] NELSON, K.L.: Industrial-scale mammalian cell culture, part I: Bioreactor design considerations. In: *BioPharm* (1988), Februar, S. 42–46
- [40] OSTRYANINA, N.D. ; IL'INA, O.V. ; TENNIKOVA, T.B.: Effect of experimental conditions on strong biocomplementary pairing in high-performance monolithic disk affinity chromatography. In: *Journal of Chromatography B* 770 (2002), S. 35–43
- [41] OSTRYANINA, N.D. ; VLASLOV, G.P. ; TENNIKOVA, T.B.: Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 949 (2002), S. 163–171
- [42] PODGORNIK, A. ; BARUT, M. ; JANCAR, J. ; STRANCAR, A.: Isocratic separations on thin glycidyl methacrylate-ethylendimethacrylate monoliths. In: *Journal of Chromatography A* 848 (1999), S. 51–60
- [43] PODGORNIK, A. ; BARUT, M. ; STRANCAR, A.: Construction of large-volume monolithic columns. In: *Anal. Chem.* 72 (2000), S. 5693–5699
- [44] RENEMANN, G.: *Prozessoptimierung und Onlineanalytik bei Tierzellkultivierungen*, Diss., 2001

- [45] ROUF, S.A. ; DOUGLAS, P.L. ; MOO-YOUNG, M. ; SCHARER, J.M.: Computer simulation for largescale bioprocess design. In: *Biochemical Engineering Journal* 8 (2001), S. 229–234
- [46] SVEC, F. ; FRECHET, J.M.J.: Temperature, a simple and efficient tool for the control of pore size distribution on macroporous polymers. In: *Macromolecules* 28 (1995), S. 7580–7582
- [47] SYKORA, D. ; SVEC, F. ; FRECHET, J.M.J.: Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces. In: *Journal of Chromatography A* 852 (1999), S. 297–304
- [48] TENNIKOV, M.B. ; GAZDINA, N.V. ; TENNIKOVA, T.B. ; SVEC, F.: Effect of porous structure of macroporous polymer supports on the resolution in high-performance membrane chromatography of proteins. In: *Journal of Chromatography A* 798 (1998), S. 55–64
- [49] VLAKH, E.G. ; PLATONOVA, G.A. ; VLASOV, G.P. ; KASPER, C. ; TAPPE, A. ; KRETZMER, G. ; TENNIKOVA, T.B.: In vitro comparison of complementary interactions between synthetic linear/branched oligo/poly-l-lysines and tissue plasminogen activator by means of high performance monolithic disk affinity chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 992 (2003), S. 109–119
- [50] VOGEL, J.H. ; ANSPACH, K.-H. Piret J. ; HAYNES, C.A. *Controlled Shear Affinity Filtration (CSAF): A new technology for integration of cell separation and protein isolation from mammalian cell cultures.* online in www.interscience.wiley.com DOI: 10.1003/bit.10262
- [51] WALLMAN, S.: *Principles of Downstream Processing.* http://biotech.nhctc.edu/BT220/Section_1_7_0.html. 1997. – last visited on 20.01.2006
- [52] WANG, I.-K. ; HSIEH, S.-Y. ; CHANG, K.-M. ; WANG, Y.-C. ; CHU, A. ; SHAW, S.-Y. ; OU, J.-J. ; HO, L.: A novel control scheme for inducing angiostatin-human IgG fusion protein production using recombinant CHO cells in an oscillating bioreactor. In: *Journal of Biotechnology* (2006). – article in press
- [53] WOLF, K.-H. ; SCHNEIDER, H.: Turbulenzgeschehen in Rührfermentern. In: *BioEngineering* (1993), Nr. 3, S. 29–32
- [54] ZHAO, C. ; ZHANG, H. ; HU, M.: Expression of a novel chimeric protein containing the A chain of tissue-type plasminogen activator and the B chain of pro-urokinase in insect cells using the baculovirus system. In: *Biochemistry and Molecular Biology international* 47 (1999), Nr. 4, S. 597–605

- [55] ZOU, H. ; HUANG, X. ; YE, M. ; LUO, Q.: Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. In: *Journal of Chromatography A* 954 (2002), S. 5-32