

Kultivierung von Produktionszelllinien und Entwicklung
effizienter Analytik- und Aufreinigungsverfahren
für die Zielproteine

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Fabienne Anton
geboren am 21.03.1980 in Hannover

2008

Referent:

Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin:

PD Dr. Cornelia Kasper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 30.07.2008

Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Freiheiten während meiner Doktorarbeit, die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und seine Unterstützung.

Frau PD Dr. Cornelia Kasper danke ich besonders für die Übernahme des Korreferates sowie für die Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit und bei sonstigen Fragestellungen.

Bei Herrn Dr. Stefan Buziol von der Firma Roche Diagnostics GmbH bedanke ich mich für die Bereitstellung der Zelllinie und die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes.

André Pastor von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH danke ich für die Materialbereitstellung und die sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für seine Hilfsbereitschaft, produktiven Anregungen und Diskussionen während der Zusammenarbeit im Projekt. Ebenfalls danke ich Bianca Grote sowie Alexander Hammerschmidt für die Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren und die Beantwortung diverser Fragen.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Arbeitskreises Scheper für das hervorragende Arbeitsklima:

Herrn Dr. Sascha Beutel und Johanna Walter danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen der Arbeit. Ein Dankeschön geht an Martin Pähler für seine Hilfsbereitschaft. Martina Weiß danke ich besonders für die Anleitung an der HPLC sowie die Unterstützung bei diversen technischen Fragen. Allen Mitarbeitern der Feinmechanikwerkstatt danke ich für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen kleinen und größeren Reaktorproblemen. An meine liebe Diplomandin Andrea Mönster und meine Praktikantin Wiebke Zander ein großes Dankeschön für die ergebnisreiche Zusammenarbeit. Daniel Riechers danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die ständigen Versuche mich mit Pizza und Kuchen aufzupäppeln. Dem „Hühnerstall“ danke ich für die einmalig herzliche Büroatmosphäre, wie sie besser nicht hätte sein können. Ein besonderer Dank geht an meine Kollegin Larissa Behr für die produktive Zusammenarbeit, die gemeinsame Bewältigung diverser Aufgaben und den Spaß bei der Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Marc und Sandra, danke ich für die moralische Unterstützung. Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihre Liebe, ihre Motivation und die Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	3
3. Grundlagen	5
3.1. Tierzellkultivierung.....	5
3.2. Anwendung nicht-invasiver Messtechnik bei der <i>in-situ</i> -Prozessanalytik.....	11
3.2.1. Spektroskopische Methoden.....	13
3.2.2. Bildgebende Verfahren.....	16
3.3. Aufreinigung von Antikörpern.....	18
3.3.1. Bessere Auslastung bestehender Anlagen durch Plattformstrategien	19
3.3.2. Alternativen zu Protein A bei der Produktisolierung	21
3.3.3. Chromatographiebasierte Trennverfahren.....	23
3.3.4. Integration von Prozessschritten.....	25
4. Experimenteller Teil	27
4.1. Kultivierung einer Antikörper produzierenden Zelllinie und Adaption an serumfreie Kulturbedingungen.....	28
4.1.1. Kultivierung in serumhaltigem Medium	28
4.1.2. Kultivierung in serumfreien Medium.....	33
4.2. Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozess-analytik einer Antikörper produzierenden Zelllinie	40
4.2.1. Vorgehensweise für die chemometrische Auswertung.....	41
4.2.2. Kultivierung der CHO-Zellen.....	42
4.2.3. Modellbildung und Validierung	48
4.3. Proteinanalytik in Zellkulturüberständen.....	59
4.3.1. <i>Reversed-phase</i> -Chromatographie	59
4.3.2. Größenausschlusschromatographie	63
4.3.3. <i>High performance monolithic disk</i> -Chromatographie (HPMDC).....	65
4.4. Evaluierung der Aufreinigung von Antikörpern aus zellhaltigen Kulturmedien mittels neuartiger Membranadsorbertechnologie.....	75
4.4.1. Bindungsverhalten aus zellfreier Lösung	77
4.4.2. Sartobind [®] Direct.....	80
4.4.3. Bindungsverhalten aus zellhaltiger Lösung.....	83

4.4.4. Probleme bei der Aufreinigung aus zellhaltiger Lösung	91
5. Zusammenfassung und Ausblick	106
6. Anhang	112
6.1. Medien und Puffer.....	112
6.2. Zelllinien	112
6.3. Modell-Proteine.....	112
6.4. Methoden.....	113
6.4.1. Stammkultivierung der Zelllinien.....	113
6.4.2. Kryokonservierung der Zelllinien.....	114
6.4.3. Anlegen einer Master- und Arbeitszellbank	114
6.4.4. Kultivierung der Hybridom-Zelllinie in Spinnerflaschen.....	114
6.4.5. Kultivierung der CHO-Zelllinie im 400 ml Edelstahlreaktor	115
6.4.6. Offline-Analytik	115
6.4.7. Gelelektrophorese.....	121
6.4.8. Westernblot.....	123
6.4.9. 2D-Fluoreszenzmessung (BioView [®] Sensor)	124
6.4.10. Herstellung des Antikörperstandards für die Proteinanalytik	127
6.4.11. Immobilisierung von Protein G an einer CIM [®] Epoxy Disk.....	130
6.4.12. Durchführung der CLC-Methode.....	131
6.4.13. Entsalzen	132
6.4.14. Membran- <i>screening</i>	132
6.4.15. Quantifizierung des Modell-Antikörpers IVIg.....	133
6.4.16. Versuchsdurchführung mit der Sartobind [®] Direct Einheit.....	135
6.4.17. Fixierung von Zellen	136
6.4.18. DAPI-Färbung.....	136
6.4.19. Inaktivierung von Aldehydgruppen	137
6.5. Datenanalyse	137
6.5.1. Berechnung der Wachstums-, Verbrauchs- und Produktbildungskinetik.....	137
6.5.2. Berechnung der Langmuir-Isotherme.....	139
6.5.3. Berechnung der maximalen Belegungsdichte	139
6.5.4. Berechnung der Proteinausbeute und Wiederfindungsrate.....	140
6.6. Abbildungen.....	141
6.6.1. Einfluss der Hauptkomponenten auf die Güte der Vorhersage	141
6.6.2. 2D-Fluoreszenzspektren des Mediums für die CHO-Kultivierung	141
6.7. Abkürzungsverzeichnis	142
6.8. Geräte, Material und Reagenzien	144

7. Literaturverzeichnis..... 149

Zusammenfassung

Bei der biotechnologischen Produktion rekombinanter Produkte mit Säugetierzellen ist eine Optimierung jedes einzelnen Prozessschrittes von entscheidender Bedeutung. Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene relevante Prozessschritte anhand von Antikörper produzierenden Modell-Zelllinien genauer untersucht werden. Zu diesen Schritten gehören eine Optimierung der Kulturmedien, eine Verbesserung der Prozessanalytik, um die komplexen Vorgänge in einem Kultivierungsprozess besser beobachten und regeln zu können, sowie die Entwicklung effizienter und schonender Aufreinigungsstrategien, um den Zeitaufwand und die Kosten des Gesamtprozesses zu minimieren.

Die Kultivierung von Säugetierzelllinien in serumfreien Medien ist unter anderem für die Aufreinigung und Qualität des Zielproduktes entscheidend. Anhand einer Untersuchung des Proliferations-, Stoffwechsel- und Produktionsverhaltens einer Hybridom-Zelllinie unter serumhaltigen und serumfreien Kulturbedingungen wurde eine direkte Adaption an serumfreie Kulturbedingungen erfolgreich durchgeführt. Der minimale Proteingehalt des serumfreien Mediums und die damit verbundene Reinheit des Produktes nach Ende eines Kultivierungsprozesses sollten die Aufreinigung des Antikörpers vereinfachen und dadurch eine hohe Kostenquelle der Produktion reduzieren.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die Einsatzmöglichkeit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie als effektives Verfahren für eine nicht-invasive Online-Prozessanalytik bei der *batch*-Kultivierung einer Antikörper produzierenden CHO-Zelllinie aufgezeigt. Unter Anwendung chemometrischer Datenauswertung war es möglich, bei einer Kultivierung relevante Prozessgrößen mit hoher Genauigkeit vorherzusagen. Für standardisierte, sich wiederholende Kultivierungsprozesse unter identischen Bedingungen, wie sie in der industriellen Produktion durchgeführt werden, könnte die Anwendung des 2D-Fluoreszenzsensors demnach zu einer verbesserten Prozessüberwachung und Regelung beitragen.

Im Hinblick auf eine mögliche Sensor-Prozess-Kopplung für die Online-Überwachung der Konzentrationsverläufe verschiedener Proteine in Zellkulturmedien wurden verschiedene HPLC (*high performance liquid chromatography*) basierte Methoden auf ihre Anwendbarkeit zur Detektion von Antikörpern und anderen Medienproteinen untersucht. In diesem Zusammenhang konnte eine *conjoint liquid chromatography* (CLC) basierte Methode unter Anwendung monolithischer Disks unterschiedlicher Funktionalität etabliert werden, die eine Detektion der Einzelproteine direkt in Zellkulturüberständen ermöglichte.

Die Integration von Prozessschritten stellt eine Möglichkeit dar, die Aufreinigung von Antikörpern effizienter zu gestalten. Ein Ansatz, der in diesem Zusammenhang verfolgt wird, ist die Kombination aus Zellabtrennung, Produktisolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung in einem Prozessschritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein speziell entwickeltes, auf Membranadsorbentechnologie basierendes Modul hinsichtlich der direkten Produktisolierung aus zellhaltiger Kultursuspension untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Zellen einen nur minimalen Einfluss auf die Antikörperaufreinigung ausüben. Unabhängig von der Ausgangslösung konnten hohe Antikörperausbeuten mit einer hohen Wiederfindungsrate erzielt werden. Darüber hinaus wurden limitierende Faktoren bei der Aufreinigung aus partikelhaltiger Lösung aufgezeigt und erste Optimierungsansätze mit Erfolg umgesetzt.

Stichwörter: Hybridom-Zellen, CHO-Zellen, Antikörper, Online-Prozessanalytik, 2D-Fluoreszenzspektroskopie, HPMDC, Antikörperaufreinigung, Membranadsorber

Abstract

For the improvement of a biotechnology process with mammalian cell lines it is crucial to optimize each individual step in order to produce recombinant proteins. Thus, different relevant aspects of production processes were investigated in this thesis. These assayed aspects include an optimization of the cell culture medium, the improvement of the bioprocess monitoring and control as well as the development of efficient and gentle purification strategies in order to reduce process time and production costs.

For the purification and quality of the target protein, cultivation under serum free conditions is an important factor. Hence, the proliferation, metabolism and productivity of a hybridoma cell line cultivated in batch cultures in serum supplemented and serum free culture medium were compared. An adaption of these cells to serum free conditions was performed successfully. Furthermore, the low protein content of the used serum free medium results in a high purity of the target antibody at the end of the cultivation. This enables a simplification of the purification process and thus reduces production costs.

Moreover, 2D fluorescence spectroscopy has been proved to be an effective and non-invasive tool for online bioprocess monitoring during batch cultivations of an antibody producing CHO cell line. In combination with chemometric modeling it was possible to predict important process variables accurately. The application of the fluorescence sensor in standardized industrial production processes seems to be a suitable tool for improved bioprocess monitoring and control.

In terms of a sensor process coupling for the determination of proteins in cell culture medium, different HPLC based methods were tested with regard to their applicability for the detection of antibodies and other proteins in cell culture medium. Providing the possibility of determination of individual target proteins in cell culture medium, a conjoint liquid chromatography (CLC) based method using monolithic disks of different functionality was established.

An integration of different purification steps is one possibility to design a more efficient antibody purification process. In this regard the technology should combine cell separation, capturing, purification and concentration of the target protein in one single step. In this study a new module design based on membrane chromatography was tested successfully towards its suitability for direct capturing of the target protein from whole cell culture broth. It has been demonstrated that the cells have no significant influence on the antibody purification without regard to the applied solution. A direct capture of the target antibody has been realized with high protein yields and a high recovery. Furthermore, limiting factors in terms of cell retention inside the device have been identified and first improvements have been realized successfully.

Keywords: hybridoma cells, CHO cells, antibody, online process monitoring, 2D fluorescence spectroscopy, HPMDC, antibody purification, membrane adsorber

1. Einleitung

Für die Herstellung von Proteinen für therapeutische Zwecke werden häufig biotechnologische Prozesse entwickelt, bei denen gentechnisch modifizierte, sogenannte rekombinante Mikroorganismen wie z. B. Bakterien und Hefen oder Säugetierzellen Einsatz finden. Bakterien wie z. B. *E. coli* sind robuste und schnell wachsende Organismen mit geringen Nährstoffansprüchen. Sie vereinen die Vorteile einer hohen Biomasseproduktion und der relativ einfachen Steuerung der Bioprozesse. Einfache Pharmaproteine wie z. B. Humaninsulin oder das Wachstumshormon Somatropin werden mit Hilfe rekombinanter *E. coli* Stämme produziert.

Hochkomplexe Proteine unterliegen posttranslationalen Prozessierungsmechanismen wie z.B. Glykosylierung. Diese chemischen Modifikationen sind für die biologische Aktivität dieser Proteine im Organismus zwingend erforderlich. Da die Synthese komplexer Glykosylierungsmuster in prokaryotischen Systemen nicht gelingt, werden für die Produktion von komplexen therapeutischen Proteinwirkstoffen wie z. B. bestimmten Hormonklassen, Blutgerinnungsfaktoren, Wachstumsfaktoren und monoklonale Antikörper trotz aufwendiger und kostenintensiver Kultivierung rekombinante Säugetierzelllinien verwendet. Langsames Wachstum, komplexe Nährmedien, anspruchsvolle Reaktortechnik und Analytik sind nur einige Faktoren, die die Kultivierung von Säugetierzelllinien bestimmen. Um einen Produktionsprozess im großtechnischen Maßstab rentabel auszuführen, bedarf es einer Optimierung jedes einzelnen Prozessschrittes.

In den letzten zehn Jahren ist im Bereich der biotechnologischen Produktion rekombinanter Produkte der Bedarf nach einer verbesserten Prozessanalytik gestiegen. Das Ziel ist es dabei, die komplexen Vorgänge in einem Kultivierungsprozess besser beobachten und kontrollieren zu können. Produktivität und Aktivität der rekombinanten Zelllinien unterliegen zahlreichen Faktoren, die die Effizienz eines Produktionsprozesses beeinflussen können. Neben der herkömmlichen Offline-Analytik, die eine detaillierte Analyse zahlreicher Inhaltsstoffe ermöglicht, spielt die Online-Analytik am Bioreaktor zur Prozessüberwachung eine wichtige Rolle. Der Vorteil gegenüber der Offline-Messung liegt darin, direkt und ohne Zeitverzug kontinuierlich Messwerte aufnehmen zu können. Auf diese Weise werden z. B. pH-Wert, O₂-Partialdruck und Temperatur während der Kultivierung überwacht. Eine Bestimmung des zeitlichen Verlaufs relevanter Prozessgrößen wie z.B. Substrat-, Produkt- oder Zellkonzentration ist häufig nur mit entsprechender Offline-Analytik oder komplexen Prozessanalysatoren (Sensor-Prozess-Kopplung) realisierbar. An dieser Stelle sollen z. B. spektroskopische Verfahren wie z.B. die Fluoreszenzspektroskopie Abhilfe schaffen. Sie bieten die Möglichkeit einer nicht-invasiven, zerstörungsfreien Prozessüberwachung und liefern eine Vielzahl an Informationen, die direkt oder mit Hilfe

chemometrischer Datenauswertung die Beobachtung bestimmter Prozessvariablen online und *in-situ* ermöglichen.

Neben der Entwicklung und Verbesserung der Sensortechnik für eine kontrollierbare Online-Überwachung von Produktionsprozessen werden immer größere Anforderungen an den Aufreinigungsprozess eines biotechnologisch hergestellten Produktes gestellt. Durch die fortwährende Optimierung der Expressionssysteme, die Entwicklung verbesserter Nährmedien und die Weiterentwicklung der Reaktortechnik können derzeit Produkttiter von mehr als 1 g/l erzielt werden. Monoklonale Antikörper haben in diesem Zusammenhang aufgrund der fortschreitenden Entwicklung dieser Technologie stark an Bedeutung gewonnen und zählen nicht zuletzt aufgrund ihrer hohen Spezifität und ihrer therapeutischen Wirkung bei der Behandlung zahlreicher Krankheiten zu der am schnellsten wachsenden Gruppe von Biopharmazeutika.

Um der großen Nachfrage nach auf Antikörper basierten Produkten und der fortschreitenden Optimierung der Kultivierungsprozesse bzgl. steigendem Produkttiter gerecht zu werden, ist es notwendig in effiziente, produktschonende und schnelle Aufreinigungsstrategien zu investieren, um Dauer und Kosten des Gesamtprozesses zu minimieren. In der Literatur werden verschiedene Ansätze beschrieben, um den Aufreinigungsprozess effizienter zu gestalten und damit die steigenden Kosten zu senken. Neben einer besseren Auslastung durch Optimierung bestehender Anlagen, der Entwicklung alternativer Verfahren für die Produktisolierung und Feinreinigung spielt die Entwicklung und Verbesserung von chromatographischen Trägermaterialien eine wichtige Rolle. Darüber hinaus könnten Kosten durch das Zusammenführen von zwei oder mehreren Prozessschritten zu einem Schritt reduziert werden. Membranadsorber, die bereits erfolgreich in Aufarbeitungsprozessen im Bereich der Virusfiltration, DNA- und Proteinanreicherung Anwendung finden, nehmen in diesem Zusammenhang eine besondere Stellung ein. Gegenüber herkömmlichen, diffusionslimitierten, partikelgefüllten Chromatographiesäulen erlauben Membranadsorber einen konvektiven Stofftransport und konstante Bindungskapazitäten auch bei hohen Flussraten. Auf diese Weise ist der Durchsatz großer Volumina in kurzer Zeit möglich. Im Hinblick auf die Zusammenführung mehrerer Prozessschritte kann die Entwicklung neuartiger Membranadsorber-Module zu einer schnelleren und effizienteren Aufreinigungsstrategie beitragen.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen verschiedene relevante Aspekte eines Produktionsprozesses am Beispiel von Antikörper produzierenden Säugetierzelllinien untersucht werden. Dabei sollen insbesondere für die Bereiche Kultivierung, Prozessbeobachtung, Produktanalytik und Aufreinigung neue Methoden etabliert werden. Die einzelnen Zielsetzungen werden im Folgenden thematisch gegliedert dargestellt.

Kultivierung

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Kultivierung der Hybridom-Zelllinie IV F19.23 in serumhaltigem Medium, die einen monoklonalen Antikörper gegen Penicillin G Amidase produziert. Um das Proliferations- und Produktionsverhalten der Zellen zu untersuchen, sollen *batch*-Kultivierungen in Spinnerflaschen durchgeführt werden. Eine Konzentrationsbestimmung verschiedener Prozessgrößen wie Zellzahl, Glukose, Laktat und Glutamin sowie der Gehalt des produzierten Antikörpers sollen eine erste Einschätzung über das Wachstumsverhalten der Zellen, den Substratverbrauch sowie die Produktionskinetik liefern. Der hohe Proteingehalt komplexer, serumhaltiger Kulturmedien unterstützt hierbei das Proliferations- und Produktionsverhalten der Zellen. Für eine effektive Aufreinigung des Zielproduktes ist der hohe Proteinanteil jedoch hinderlich. Kontaminationsgefahr und auftretende Chargenvarianz beeinträchtigen zudem die Reproduzierbarkeit der Kultivierung. Um die Aufreinigung des Antikörpers zu erleichtern, soll in einem weiteren Schritt die Adaption der Zelllinie an serumfreie Kulturbedingungen erfolgen. Da eine Serumreduzierung häufig mit einer Verschlechterung des Proliferations- und des Produktionsverhalten der Zellen einhergeht, sollen diese Größen vor und nach der Adaption untersucht werden.

Prozessbeobachtung

Vorgänge bei der Produktion und steigende Produkttiter erhöhen den Bedarf nach einer verbesserten Prozessbeobachtung und Regelung. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit, am Beispiel der *batch*-Kultivierung einer Antikörper produzierenden CHO-Zelllinie, der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur nicht-invasiven Online-Prozessanalytik untersucht werden. In diesem Zusammenhang soll analysiert werden, ob die simultane Beobachtung relevanter Prozessgrößen wie Zellzahl, Glukose, Laktat, verschiedene Aminosäuren wie Glutamin und Glutamat, aber vor allem der Verlauf der Antikörperproduktion während einer Kultivierung möglich ist. Hierbei sollen die verschiedenen Prozessgrößen, die Aufschluss über den Zustand der Kultur liefern, zunächst mit entsprechender Analytik offline bestimmt werden. Mit Hilfe chemometrischer Datenauswertung sollen im Anschluss Modelle entwickelt werden, die es

ermöglichen sollen, die Konzentrationsverläufe der Prozessgrößen eines unbekanntes Laufes vorherzusagen.

Produktanalytik

Darüber hinaus sollen im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Analysemethoden, für die in Zellkulturmedien enthaltenen Proteine und für den von der Hybridom-Zelllinie IV F19.23 produzierten Antikörper, untersucht werden. Diese Methoden sollen eine Detektion und Quantifizierung der Einzelproteine während eines Produktions- und Aufreinigungsprozesses ermöglichen. Im Hinblick auf eine mögliche Sensor-Prozess-Kopplung für die Online-Überwachung sollen hierfür Methoden der instrumentellen Analytik wie HPLC (*High performance liquid chromatography*) Anwendung finden, die eine einfache Ankopplung an den jeweiligen Prozess ermöglichen können. Die angewandte Analytik soll eine direkte Konzentrationsbestimmung aus Zellkulturüberständen ohne zeitaufwendige Vorbehandlung der Proben ermöglichen.

Produktaufreinigung

Die Integration von Prozessschritten ermöglicht die effiziente Gestaltung des Aufreinigungsprozesses. Vor diesem Hintergrund wurde von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen) auf Basis der Membranadsorbertechnologie ein neuartiges Modul entwickelt, das die Aufreinigung von Proteinen aus zell-/partikelhaltiger Kultursuspension gewährleisten soll. Das System Sartobind[®] Direct wurde in Anlehnung an das Fließbettadsorptionsverfahren entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit soll dieses System im Hinblick auf eine direkte Aufreinigung von Antikörpern aus zellhaltiger Kultursuspensionen getestet und evaluiert werden. Für die Versuche soll die an serumfreie Bedingungen adaptierte Hybridom-Zelllinie IV F19.23 verwendet werden. Neben dem Einfluss des Mediums bzw. der Zellen auf das Bindungs- und Elutionsverhalten des Antikörpers sollen die Einheiten hinsichtlich ihrer Partikelgängigkeit bei der Aufreinigung aus zellhaltigem Medium untersucht werden.

3. Grundlagen

3.1. Tierzellkultivierung

In der industriellen Nutzung werden hauptsächlich pharmazeutisch interessante Produkte mit Säugetierzelllinien hergestellt. Zu den Produkten gehören z.B. Impfstoffe, Hormone, Enzyme und Antikörper. [1-5]

Fortschritte in der Gentechnologie in der Mitte der 70er Jahre ermöglichten den Gentransfer in Säugetierzellen. [6, 7] Diese Technik der DNA-Rekombination erlaubt es, eine Vielzahl physiologisch aktiver Proteine in Säugetierzellen *in-vitro* zu produzieren. Zunächst wurden spezie fremde Gene in Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen eingeführt, die das jeweilige rekombinante Zielprodukt exprimierten. Mikroorganismen sind nicht nur einfach in der Handhabung, sondern bewährten sich aufgrund ihrer hohen Biomasseproduktivität, kurzer Fermentationszeiten und geringen Produktionskosten. Als klassisches Beispiel gilt die industrielle Produktion von Humaninsulin mit Hilfe gentechnisch veränderter *E. coli* Stämme, welche zu Beginn der 80er Jahre bereits ausgereift war. [8-10] Viele der therapeutisch genutzten, einfachen Pharmaproteine wie z. B. das Wachstumshormon Somatropin und einige Interferone werden noch heute durch Mikroorganismen produziert.

Neben den genannten Vorteilen weisen Bakterien als Produzenten aber auch Nachteile für die pharmazeutische Produktion auf. Bakterien können posttranslationale Prozessierungsmechanismen wie z. B. Glykosylierung, Phosphorylierung und Amidierung nicht korrekt ausführen. Diese sind bei Eukaryoten wie Säugetierzellen selbstverständlich und für die biologische Aktivität komplexer Proteine, sogenannter Glykoproteine, Voraussetzung. Pilze, wie z. B. Hefen, besitzen die Anlage zur Durchführung derartiger Modifikationen, diese sind jedoch nicht humankompatibel. [2, 11] Werden rekombinante Proteine, die eine falsche oder gar keine Modifizierung aufweisen, als Therapeutika genutzt, verfehlen sie ihre biologisch-pharmakologische Wirkung und die Immunogenität wird erhöht. Trotz ihres vergleichbar langsamen Stoffwechsels und der hohen Kosten bei der Kultivierung kann bei der biotechnologischen Herstellung humaner, therapeutisch wirksamer Substanzen auf die Verwendung von Säugetierzellen nicht mehr verzichtet werden.

Das erste mit Hilfe von Säugetierzellen produzierte rekombinante Produkt, das im Jahr 1987 auf den Markt kam, war der Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA: *tissue plasminogen activator*). Hierbei handelt es sich um eine Serinprotease, die bei der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zum Einsatz kommt und bei der Auflösung entstandener Blutgerinnsel eine wichtige Rolle spielt. Der Erfolg dieses Produktes ebnete in den darauffolgenden Jahren den Weg für eine Vielzahl weiterer biotechnologisch hergestellter Produkte wie z. B. Erythropoetin (EPO) oder

Faktor VIII. EPO ist ein Hormon, das zur Stimulation der Erythrozytenbildung im Körper (rote Blutzellen) vor allem bei Anämie und Niereninsuffizienz eingesetzt wird. Faktor VIII ist ein Blutgerinnungsfaktor zur Behandlung der Bluterkrankheit Hämophilie A. [3, 8]

Die Zelllinien, die für die Produktion solcher rekombinanter Produkte eingesetzt werden, müssen bestimmten Anforderungen gerecht werden. Grundvoraussetzung ist die Gewährleistung einer möglichst humanähnlichen Glykosylierung, um die biologische Aktivität des Zielproduktes sicherzustellen. [11] Die Zelllinie sollte nicht nur ein stabiles Expressionssystem aufweisen, um das gewünschte Zielprodukt zu synthetisieren, sondern über einen langen Zeitraum ein konstantes Expressionslevel halten. [12] Die spezifische Produktionsrate sollte hierbei so hoch wie möglich sein. Die eingesetzten Zellen sollten in chemisch definierten Medien schnell zu hohen Zelldichten heranwachsen können. Die heutzutage standardmäßig in industriellen Prozessen eingesetzten Zelllinien, die sich über Jahre hinweg etabliert haben, sind neben BHK- (*baby hamster kidney*), COS- (CV1 origin SV40) und Maus-Myelom-Zellen (NSO und Sp2/0) vor allem CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*), die sich nicht zuletzt aufgrund ihres hohen Bekanntheitsgrades, durch einen großen Erfahrungsschatz in der Kultivierung und der Modifizierung auszeichnen. [12-14]

Die Zellkulturmedien, in denen die Zellen zur Produktion rekombinanter Produkte kultiviert werden, sind sehr komplex, denn sie müssen die Zellen mit ausreichend Nährstoffen versorgen. Seren wie z. B. fötales Kälber Serum (FCS: *fetal calf serum*) sind Zusatzstoffe, die abhängig vom jeweiligen Zelltyp oftmals den Medien beigelegt werden, um das Wachstum und die Produktion zusätzlich anzuregen. [1] Dadurch besteht jedoch die Gefahr der Kontamination durch im Serum enthaltene Viren oder Prionen. Durch auftretende Chargenvarianzen können zudem keine einheitlichen Kulturbedingungen, die für einen reproduzierbaren Produktionsprozess Voraussetzung sind, gewährleistet werden. [13, 15] Der hohe Proteingehalt dieser komplexen Mischungen erschwert außerdem die Aufreinigung der Zielprodukte. Der Anteil des Produktes vor dem ersten Aufreinigungsschritt nach der Kultivierung in serumhaltigen Medien beträgt zumeist 30 %, während in optimal angepassten Medien der Produktanteil zwischen 60 % und 70 % liegt. [16] Dies gewährleistet eine bessere Voraussetzung für die spätere Aufreinigung. Aus diesen Gründen werden für die industrielle Produktion serumfreie, chemisch definierte Medien frei von Zusätzen tierischen Ursprungs verwendet. [17, 18] Zusätzlich kann auf diese Weise das Infektionsrisiko und die damit einhergehende Gefahr von Immunreaktionen bei der späteren Anwendung dieser Präparate gesenkt werden.

Tabelle 3.1.1: Gentechnisch hergestellte Biopharmaka aus Säugetierzellen. [19, 20]

Klasse	Protein/ Wirkstoff	Produkt	Indikation	Firma	Expressions-system	Zulassung seit
Blutgerinnungsfaktoren	Faktor VIII	Advate [®]	Hämeophilie A	Baxter	CHO	2004 (US)
		Helixate NexGen [®]		Bayer	BHK	2000 (EU)
		ReFacto [®]		Genetics Institute/ Wyeth Europe	CHO	1999 (EU), 2000 (US)
		Kogenate [®]		Bayer	BHK	1993 (US), 2000 (EU)
	Faktor VIIa	NovoSeven [®]	Hämeophilie	NovoNordisk	BHK	1996 (EU), 1999 (US)
Gerinnungshemmer	Faktor IX	Benefix [®]	Hämeophilie B	Genetics Institute	CHO	1997 (US, EU)
	Tissue Plasminogen Aktivator (t-PA)	Metalyse [®]	Herzinfarkt	Boehringer Ingelheim	CHO	2001 (EU)
Wachstumsfaktoren	Erythropoetin (EPO)	Activas [®]		Genentech	CHO	1987 (US)
		Mircera [®]	Roche	CHO	2007 (EU)	
		Aranesp [®]	Amgen Europe	CHO	2001 (US)	
		Nespo [®]	Amgen Europe	CHO	2001 (US)	
		Neorecormon [®]	Roche	CHO	1997 (EU)	
Hormone	Follikel stimulierendes Hormone (rFSH)	Erypo [®]	Fertilitätsstörung	Janssen-Cilag	CHO	1988
		Follistim [®]		NV Organon	CHO	1997 (US)
		Puregon [®]		NV Organon	CHO	1996 (US)
	Human luteinisierendes Hormone (r-hLH)	Gonal [®]		Serono	CHO	1995 (EU), 1997 (US)
		Luveris [®]		Ares-Serono	CHO	2000 (EU)
	Follikel stimulierendes/ luteinisierendes Hormon	Pergoveris [®]		Serono	CHO	2007 (EU)
	rh-Choriogonadotropin	Ovitrelle [®]		Ares-Serono	CHO	2000 (US), 2001 (EU)
Thyroid stimulating hormone (rTSH)	Thyrogen [®]	Krebsdiagnostik	Genzyme	CHO	1998 (US), 2000 (EU)	
Enzyme	Indursulfase	Elaprased [®]	Mucopolysaccharose II (Hunter Syndrom)	Shire plc.	Humanzellen	2007 (US)
	Galsulfase	Naglazyme [®]	Mucopolysaccharose VI	BioMarin Europe	CHO	2006 (EU)
	Laronidase	Aldurazyme [®]	Stoffwechselstörung	Genzyme	CHO	2003 (US)
Interferone	Interferon-β-1a	Rebif [®]	Multiple Sklerose	Ares Serano	CHO	1998 (EU), 2002 (US)
		Avonex [®]		Biogen	CHO	1997 (EU), 1996 (US)

In den letzten 20 Jahren ist die Nachfrage nach Produkten aus Säugetierzelllinien immens gestiegen. [13, 20-22] Dank verbesserter Reaktortechnik, optimierter Kulturmedien und Expressionssysteme werden heutzutage 60 % bis 70 % aller rekombinanten Proteine in der Pharmaindustrie mit Hilfe von Säugetierzellen hergestellt. [23] Tabelle 3.1.1 gibt einen Überblick über einige in den USA und Europa lizenzierte Produkte, die seit 1987 auf dem Markt sind. [19, 20]

Die Kombination verschiedener Techniken auf dem Gebiet des Antikörper-*engineerings* und die steigende Nachfrage führten in den letzten Jahren zu einem massiven Anstieg biotechnologisch hergestellter, Antikörper basierender Therapeutika.

Antikörper, sogenannten Immunglobuline, sind Glykoproteine, die im Serum und in Gewebeflüssigkeiten eines jeden Wirbeltieres vorhanden sind. Sie werden in den B-Lymphozyten gebildet und nehmen eine essenzielle Rolle im Immunsystem ein, da sie Infektionen oder cytotoxische Effekte von körpereigenen Stoffen abfangen. [15] Jeder Antikörper weist eine einheitliche, Y-förmige Struktur auf. Diese setzt sich aus zwei identisch schweren Polypeptidketten (*heavy chains*) und zwei einheitlichen leichten Polypeptidketten (*light chains*) zusammen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Leichte Ketten besitzen eine relative Molekülmasse von ca. 25 kDa, während die schweren Ketten eine relative Masse von 50-70 kDa aufweisen. Jede Polypeptidkette besteht aus konstanten und variablen Domänen. Die variablen Domänen sind von Antikörper zu Antikörper verschieden. Sie bilden die Antigenbindungsstelle, das Paratop, und sind folglich für die Spezifität eines jeden Antikörpers verantwortlich. Die konstanten Domänen der Fc-Region (*fragment crystallizable region*) des Antikörpers besitzen dagegen biologische Funktionen, wie z. B. Bindung zu Zelloberflächenrezeptoren. [24]

Dank ihrer hohen Spezifität gegenüber korrespondierenden Proteinen finden Antikörper u.a. im Bereich der Immundiagnostik, der Bioanalytik und der Affinitätschromatographie Anwendung. Der Markt für rekombinante Antikörper ist in den letzten Jahren aufgrund des großen Bedarfs im klinischen Sektor exponentiell angestiegen. Hier finden Antikörper vermehrt bei der Immuntherapie, bei Atemwegs-/ Haut- oder neurologischen Erkrankungen, bei Transplantationen und bei der Behandlung von Krebs und anderen akuten Krankheiten Anwendung. [25, 26]

Das Aufkommen von Antikörpern als Therapeutikum resultierte aus der fortschreitenden Entwicklung der monoklonalen Antikörpertechnologie in den letzten 30 Jahren. [27, 28] Mit dem Einsatz der Hybridom-Technologie im Jahr 1975 durch Milstein und Köhler gelang es erstmals, monoklonale Antikörper (Antikörper mit einer einzigen, definierten Spezifität) im großen Maßstab zu kultivieren. [29] Der erste monoklonale Antikörper, der 1986 auf den Markt kam, war das Produkt OKT3[®]. Er gehört zur ersten Generation monoklonaler Antikörper. Sein rein muriner Ursprung ruft jedoch bei der Anwendung im Menschen eine Immunabwehr hervor.

Tabelle 3.1.2: Übersicht über lizenzierte Antikörper. [16, 19, 30]

Produkt	Indikation	Firma	Expressionssystem	Ursprung	Zulassung seit
Orthoclone Okt3 [®]	Organabstoßung bei Nierentransplantation	Johnson & Johnson	Hybridom-Zellen	murine	1986
ReoPro [®]	Antithrombotikum	Centocor/ Lilly	SP2/0	chimär	1994 (US)/ 1995 (EU)
Panorex [®]	Darmkrebs	GlaxoSmithKline	n.b.	humanisiert	1995
Rituxan [®]	Rheumatoide Arthritis	Biogen-IDEC/ Genentech	CHO	chimär	1997
Zenapax [®]	Immunsuppressivum	Roche	GS-NSO	humanisiert	1997 (US)/ 1999 (EU)
Herceptin [®]	Krebs	Roche/ Genentech	CHO	humanisiert	1998 (US)/ 2000 (EU)
Remicade [®]	Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis	Centocor	SP2/0	chimär	1998 (US)/ 1999 (EU)
Simulect [®]	Immunsuppressivum	Novartis	murine Myelom Zellen	chimär	1998
Synagis [®]	Atemwegsinfektion	Abbott	NSO	humanisiert	1998 (US)/ 1999 (EU)
Mabthera [®]	Krebs	Roche	CHO	chimär	1998
Mylotarg [®]	Leukämie	Celltech/AHP	CHO	humanisiert	2000
MabCampath [®]	Krebs	Medac Schering	CHO	humanisiert	2001
Campath [®]	Chronische lymphomatische Leukämie	Millenium/ Ilex/ Baxter	CHO	humanisiert	2001
Humira [®]	rheumatoide Arthritis	Abbott	CHO	human	2003
Zevalin [®]	Krebs	Schering/ Biogen IDEC	CHO	chimär	2003 (US), 2004 (EU)
Xolair [®]	Asthma	Genentech/ Novartis	CHO	human	2003 (US), 2005 (EU)
Erbitux [®]	Darmkrebs	Merck/ LimClone/ BMS	murine Myelom Zellen	chimär	2004
Raptiva [®]	Schuppenflechte	Genentech/ Xoma	CHO	humanisiert	2004
Avastin [®]	Krebs	Roche/ Genentech	CHO	humanisiert	2004 (US), 2005 (EU)
Tysabri [®]	Multiple Sklerose	BiogenIdec	NSO	humanisiert	2006 (US), 2006 (EU)
Vectibix [®]	Darmkrebs	Amgen	CHO	human	2006 (US), 2007 (EU)
Soliris [®]	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	Alexion Europe	NSO	humanisiert	2007

Um diese zu reduzieren, wurden mit Hilfe der DNA-Rekombination sogenannte chimäre und später auch humanisierte monoklonale Antikörper entwickelt, in denen der murine Anteil der konstanten Domänen durch baugleiche konstante Teile menschlicher Antikörper (chimär: 60 % human, humanisiert: 90-95 % human) ersetzt wurden. Herceptin[®] war das erste, auf einem humanisierten Antikörper basierende Produkt, das zur Behandlung von Brustkrebs im Jahr 1998 lizenziert wurde. [31] Das Anlegen von Genbibliotheken spezifischer Antikörpersequenzen und die Anwendung der *phagen-display*-Technologie ermöglichten einige Jahre später die Synthese eines komplett humanen monoklonalen Antikörpers. [31, 32] Darüber hinaus finden sogenannte *single-chain-Fv*-Fragmente (über Peptidlinker umgerüstete antigenbindende Einheit) sowie Fc-Fusionsproteine (Proteine gekoppelt an das Fc-Fragment der konstanten Domäne eines Antikörpers) im therapeutischen Bereich Anwendung. [26, 33]

In den USA und der Europäischen Union sind derzeit 20 auf monoklonalen Antikörpern basierende Medikamente mit einem jährlichen Gesamtumsatz von mehr als 9 Milliarden US\$ zugelassen (siehe Tabelle 3.1.2). [20, 25, 30] Darüber hinaus basieren mehr als 30 % der biotechnologisch hergestellten Produkte, die sich in klinischen Erprobungsphasen befinden, auf monoklonalen Antikörpern, sodass mit einem Anstieg der Produktanzahl in den nächsten Jahren zu rechnen ist. Während die durchschnittliche Wachstumsrate für rekombinante Proteine wie Impfstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren bei lediglich 15 % liegt, ergibt sich für rekombinante Antikörper eine jährliche, durchschnittliche Wachstumsrate von ca. 30 %. Sie gehören damit zu der am schnellsten wachsenden Gruppe von Biopharmazeutika. [16]

3.2. Anwendung nicht-invasiver Messtechnik bei der *in-situ*-Prozessanalytik

Durch den großen Aufschwung im Bereich der biotechnologischen Produktion rekombinanter Produkte und das fortwährende Streben nach Optimierung der Produktionsprozesse steigt die Nachfrage nach einer verbesserten Prozessanalytik, um die komplexen Vorgänge in einem Kultivierungsprozess besser beobachten und kontrollieren zu können. Um reproduzierbare Produkte in hoher Qualität zu erzeugen, müssen die verwendeten Zellen oder Mikroorganismen unter optimalen, streng definierten Bedingungen kultiviert werden. Der Metabolismus dieser Organismen und damit einhergehend die Produktivität und Aktivität unterliegen physikalischen (z. B. Temperatur, Druck, Energieeintrag) und chemischen Einflüssen (z. B. pH-Wert, Substrat- und Produktkonzentration, Anhäufung unerwünschter Stoffwechselprodukte). Die verwendeten Organismen reagieren oftmals sehr empfindlich auf Änderungen ihrer physikalischen und chemischen Umgebung, sodass bereits kleinste Abweichungen den Metabolismus der Zellen verändern und die Effizienz eines Produktionsprozesses beeinträchtigen können. Um Schwankungen entgegenzuwirken und optimale Bedingungen für einen Kultivierungsprozess zu gewährleisten, ist eine genaue Beobachtung und Regelung der komplexen Vorgänge innerhalb des Prozesses sowie des biologischen Systems (Zellzustand, -wachstum, Vitalität) unerlässlich. [34]

In Forschung und Industrie kommt eine Vielzahl von verschiedenen Sensortechniken zum Einsatz, um biotechnologische Prozesse z. B. im Bereich der Kultivierung und Aufarbeitung zu beobachten und zu kontrollieren. [35-37] Für eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Sensortypen und deren Anwendungen in der Bioprozessanalytik sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen. [36-38]

Die Art des Sensors ist dabei abhängig von den Anforderungen des jeweiligen Prozesses. Allem voran sollten die angewandten Messsysteme online arbeiten, d. h. eine direkte Bioprozesskontrolle ohne aufwendige und zeitverzögernde Offline-Analytik gewährleisten. Dies kann auf zwei Arten erfolgen, *in-situ* (inline oder im Bypass) oder *ex-situ* über ein automatisiertes Probenahmesystem am Reaktor (Abbildung 3.2.1). Viele Sensoren haben den Nachteil, dass sie nicht sterilisierbar sind und daher *ex-situ* über eine Sensor-Prozess-Kopplung zur Analyse eingesetzt werden müssen (z. B. Biosensoren). Diese Art der Betriebsweise kann das Risiko der Kontamination jedoch erhöhen und gewährleistet nur bei Systemen mit niedriger Analysefrequenz (z. B. Säugetierzellen) eine *in-time* Prozesskontrolle. [39] Des Weiteren haben viele Systeme direkten Einfluss auf die Zusammensetzung des biologischen Systems, da z. B. der Analyt während der Messung verbraucht wird oder sich die Zusammensetzung des Mediums durch eine zellfreie Probenahme ändert.

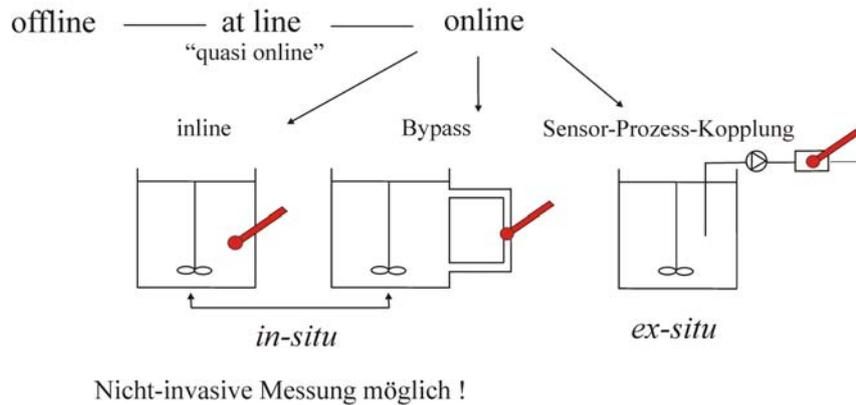


Abbildung 3.2.1: Sensor-Kopplung an einen Bioprozess.

Um diese Probleme zu umgehen, finden nicht-invasiv anwendbare Messsysteme Anwendung. Bei der nicht-invasiven Analytik erfolgt keine Probenahme und der Analyt wird während der Messung nicht verbraucht. Der Sensor hat auf diese Weise keinen Einfluss auf das biologische System. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung bleibt unverändert und es besteht kein Risiko der Kontamination. Viele nicht-invasive Sensoren stehen hierbei nicht direkt mit dem Kulturmedium in Kontakt, sondern sind durch eine Art Barriere, z. B. durch ein Quarzglasfenster, von dem Inhalt des Reaktors getrennt.

Nicht-invasive Verfahren können *in-situ* d. h. inline oder im Bypass betrieben werden (siehe Abbildung 3.2.1). Ein häufiges Messprinzip nicht-invasiver Sensoren basiert auf optischen Verfahren. [37, 38] Darunter versteht man alle Messprinzipien, die auf der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie basieren. Die Messzeit derartiger Verfahren ist zumeist gering, sodass komplexe Vorgänge in einem Prozess kontinuierlich in Echtzeit analysiert werden können. Zudem ist eine simultane Beobachtung verschiedener Prozessgrößen möglich. Neben spektroskopischen Verfahren (z. B. Infrarot-, Raman-, Fluoreszenzspektroskopie) können bildgebende Verfahren oder akustische Systeme wie Ultraschall für eine nicht-invasive, zerstörungsfreie Prozessüberwachung Anwendung finden. [35]

Aufgrund der hoch komplexen Medienzusammensetzung ergeben sich bei der Anwendung spektroskopischer Verfahren häufig Schwierigkeiten. Signalüberlagerungen, die in den aufgezeichneten Spektren sichtbar werden, erschweren oftmals die Interpretation der Daten. Dank multivariater Datenanalyse ist es jedoch häufig möglich eine präzise Bestimmung verschiedener Prozessgrößen in einer Kultivierung durchzuführen. [37, 38] Nähere Informationen zur multivariaten Datenanalyse finden sich bei Henrion et al.. [40] Im Folgenden sollen einige Anwendungsbeispiele nicht-invasiver Prozesskontrolle basierend auf spektroskopischen und bildgebenden Verfahren dargestellt werden.

3.2.1. Spektroskopische Methoden

Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie (IR) ist eine nicht-invasiv anwendbare und sehr spezifische Analyse-methode. Sie findet in zahlreichen Bereichen der Biotechnologie Anwendung. Das Messprinzip beruht auf der Lichtabsorption von Analytmolekülen bei denen durch Anregung von Schwingungen eine Änderung des Dipolmomentes auftritt. Für die Analytik sind insbesondere das nahe Infrarot (NIR, 780 nm bis 2500 nm) und das mittlere Infrarot (MIR, 2500 nm bis 25 μm) von Bedeutung.

Die FT-IR-Spektroskopie (Fouriertransform-Infrarotspektroskopie) stellt in diesem Zusammenhang eine hochempfindliche, etablierte Analytik dar, die es erlaubt innerhalb kürzester Zeit (Messintervall im Minutentakt) ein Spektrum über den gesamten Wellenlängenbereich einer NIR/MIR-Strahlungsquelle zu detektieren. [26] Auf diese Weise ist die simultane Detektion verschiedener Substanzen in hoher Auflösung und kürzester Zeit möglich.

Der Einsatzbereich der NIR-Spektroskopie ist vielfältig. Eine detailliertere Übersicht über den aktuellen Stand und zukünftige Trends in der Anwendung zur Bioprozessbeobachtung und -kontrolle findet sich bei Scraff et al.. [41] Die MIR-Spektroskopie liefert im Vergleich zur NIR-Spektroskopie zumeist ein viel charakteristischeres Spektrum höherer Auflösung (*fingerprint*). Da Bioprozesse im Allgemeinen aber in wässriger Phase ablaufen ist der Einsatz der MIR-Spektroskopie, aufgrund der starken Absorption von Wasser in diesem Wellenlängenbereich, begrenzt. [42] Die Entwicklung der ATR-IR-Technik (*attenuated total reflectance*), die auf dem Prinzip der abgeschwächten Totalreflexion basiert, bieten in diesem Zusammenhang die Möglichkeit einer optimalen Analysetechnik im Bereich des mittleren IR. Neben dem Störfaktor Wasser kann mit dieser Methode zusätzlich der Einfluss von störenden Streueffekten bei hohen Zelldichten in einem Bioprozess minimiert werden, da nur in einer extrem dünnen Schicht, in der Größenordnung der Wellenlänge, an einem sogenannten ATR-Kristall (z. B. prisma- oder trapezförmiger Kristall z. B. aus Zinkselenid oder Diamant) gemessen wird. [43]

Mittlerweile sind neben schon länger etablierten NIR-Sonden auch ATR-IR-Sonden erhältlich, die zumeist über faseroptische Lichtleiter mit herkömmlichen MIR-/ FT-IR-Spektrometern gekoppelt werden können und auf diese Weise eine nicht-invasive Bioprozessbeobachtung *in-situ* ermöglichen.

So finden sich z. B. Anwendungen der FT-IR/ATR-Spektroskopie im Bereich der *E. coli* Kultivierung zur simultanen Bestimmung verschiedener Stoffwechselprodukte wie Glukose und Essigsäure. [44] Rhiel et al. konnte bei einer Kultivierung von CHO-Zellen mit Hilfe der *in-situ* MIR-Spektroskopie Konzentrationsverläufe von Glukose, Laktat, Glutamin und Ammonium bestimmen, [45] während Cavinato et al. die Ethanolkonzentration in einen Fermentationsprozess *in-situ* mittels

NIR-Sonde verfolgen konnten. [46] NIR-Spektroskopie wurde darüber hinaus bei industriellen Prozessen zur Beobachtung der Biomasse in *E. coli fed-batch*-Kultivierungen eingesetzt. [47] MIR-spektroskopische Untersuchungen führten Kormann et al. durch. [48] Ihnen gelang die simultane Detektion von Fructose, Ethanol, Phosphat und Ammonium während einer *fed-batch*-Kultivierung von *Gluconobacter xylinus*. Für weitere Anwendungen sei auf weiterführende Literatur verwiesen. [34, 41, 42, 49, 50]

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Verfahren stellen in der Forschung und Entwicklung bei der Ermittlung der optimalen Bedingungen für Prozesse bereits nützliche Hilfsmittel dar, da eine große Anzahl an Prozessvariablen bestimmt werden kann. Fluoreszenz kann generell bei Molekülen mit leicht anregbaren π -Elektronen auftreten, wenn sie durch Absorption elektromagnetischer Strahlung eines bestimmten Spektralbereichs angeregt werden. Viele biologische Substanzen wie bestimmte Vitamine (z. B. Riboflavin), aromatische Aminosäuren (z.B. Tryptophan), Proteine wie z. B. GFP (*green fluorescent protein*) oder bestimmte Enzyme und Coenzyme wie NAD(P)H (Nicotinamadeninucleotid (phosphat)) zeigen eine charakteristische Fluoreszenz im ultravioletten (UV) oder sichtbaren Bereich. Die Detektion dieser intrinsischen Fluorophore liefert wichtige Informationen, sodass unterschiedliche Prozessgrößen sowie Aktivität, Metabolismus und Wachstum von Mikroorganismen online zugänglich werden. [51-53]

Ein Nachteil klassischer Fluorosensoren ist, dass diese meist nur mit einer diskreten Exzitations- und Emissionswellenlänge arbeiten. [37, 54] Die Entwicklung der 2-dimensionalen (2D) Fluoreszenzspektroskopie, bei der über einen weiten Spektralbereich die Exzitationwellenlänge variiert werden kann und mehrere Emissionswellenlängen abgetastet werden können, erlaubt die simultane Detektion einer Vielzahl von Einzelgrößen. [53, 55] Ein 2D-Fluoreszenzspektrometer kann dabei mit Hilfe von Flüssiglichtleitern direkt an den Reaktor gekoppelt werden und erlaubt so eine nicht-invasive, *in-situ* Fluoreszenzmessung. Ein Fluoreszenzspektrometer, das speziell für den industriellen Einsatz in der biotechnologischen Produktion entwickelt wurde, ist der BioView[®] Sensor der Firma DELTA Light & Optics (Hørsholm, Dänemark) (siehe Abbildung 6.4.3, Anhang 6.4.9). Die Einstellung der verschiedenen Exzitations- und Emissionswellenlängen erfolgt über Filterräder. Die Aufnahme von 2D-Spektren im Bereich von 270-590 nm ist im Minutentakt möglich. Auf diese Weise wird eine simultane Detektion der verschiedenen Fluorophore in der Kulturbrühe möglich. Der Einsatz des BioView[®] Sensors eignet sich sowohl bei industriellen Fermentationsprozessen als auch bei chromatographischen *downstream*-Prozessen zur Online-Vorhersage wichtiger Prozessgrößen. [35, 52, 56] Durch die Komplexität der biologischen Systeme und zahlreicher Einflüsse auf die Fluoreszenz (z. B. Temperatur, Begasung, pH-Wert) [56] kann es zu Überlagerung von Signalen kommen, sodass eine Auswertung der Spektren zumeist nur mit Hilfe

multivariater Datenauswertung (z.B. Hauptkomponentenanalyse/ neuronale Netze) möglich ist. [57, 58]

Mittlerweile wurden für die 2D-Fluoreszenzspektroskopie vielen Anwendungsbeispiele beschrieben. [52, 59-64] Hinsichtlich der Biomassebestimmungen gibt es zahlreiche Anwendungen, die als Grundlage für eine Bestimmung die NAD(P)H abhängige Fluoreszenz nutzen. Bei Stärk et al. findet sich eine Übersicht über Anwendungen zur Online-Bestimmung der Biomasse verschiedener Mikroorganismen auf Grundlage der Kulturfluoreszenz. [52] Bei synchronisierten Hefekultivierungen (*Saccharomyces cerevisiae*) konnten, über Korrelation mit offline bestimmten Prozessgrößen, mathematische Modelle erstellt werden, die eine genaue Vorhersage verschiedener intra- und extrazellulärer Komponenten aus den Spektren ermöglichten. [57] Des Weiteren konnten basierend auf der 2D-Fluoreszenz bei *fed-batch*-Kultivierungen dieser Hefen eine Prozessregelung für eine Fütterungsstrategie etabliert werden. Änderungen im Stoffwechsel konnten dabei in Echtzeit erfasst werden. [65] Boehl et al. beschreiben ein Verfahren auf der Grundlage von Fluoreszenzspektren, um Biomasse, Proteingehalt und produzierte Alkaloide bei einer Pilzkultivierung von *Calviceps purpurea* vorherzusagen. [66] Johansson et al. zeigten das Potential der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der Plasmidstabilität von Bakterienstämmen. [67] Von Hisiger et al. wurde die Anwendung bei einer Kultivierung von NSO-Zellen zur Beobachtung der Produktion von rekombinantem GFP beschrieben. [68]

Ramanspektroskopie

Die Ramanspektroskopie ist nah verwandt mit der IR-Spektroskopie. Sie beruht jedoch auf einem Streueffekt, bei dem neben der „normalen Lichtstreuung“ auch Streuung mit verschobenen Frequenzen durch inelastische Streuung an Molekülen beobachtet wird. Dieses Phänomen wird als Ramaneffekt bezeichnet. Die Ramanstreuung kann im sichtbaren sowie ultravioletten Bereich angeregt werden. Während im IR-Spektrum polare Gruppen besonders intensive Banden liefern, ist der Ramaneffekt bei unpolaren Gruppen stärker ausgeprägt. Mit dem Aufkommen der Lasertechnik hat diese Art der Spektroskopie neben der schon früheren Anwendung in der Chemie auch Eingang im Bereich der Bioanalytik gefunden. In der Literatur sind Anwendungen zur simultanen Online-Beobachtung verschiedener Analyten in komplexen industriellen Bioprozessen beschrieben. [69] [70] Ein Nachteil, den die Ramanspektroskopie mit sich bringt, ist die geringe Intensität der Ramanstreuung und die damit verbundene Überlagerung durch Streueffekte aufgrund von Gasblasen und hohen Zellkonzentrationen. Darüber hinaus können diese Banden durch die im UV-Bereich angeregten Fluoreszenzbanden einiger Moleküle überdeckt werden und die Auswertung erschweren.

Mit der Methode der Resonanz-Ramanspektroskopie ist es jedoch möglich elektronische Übergänge bestimmter Chromophore anzuregen, um durch den auftretenden Resonanzeffekt die

Intensität der gestreuten Strahlung zu erhöhen. Durch den Einsatz von Neodym-YAG-Lasern (Yttrium-Aluminium-Granat; 1064 nm) in der FT-Ramanspektroskopie ist es möglich störende Fluoreszenzeffekte zu vermeiden, da die Strahlung im nahen Infrarotbereich keine elektronischen Übergänge hervorrufen kann. [26]

Im Bereich der *in-situ*-Prozessüberwachung und -kontrolle bei der Kultivierung von Mikroorganismen finden sich trotz dieser Entwicklungen nur wenige Anwendungsbeispiele. Einhergehend mit multivariater Datenauswertung gelang Lee et al. die simultane Bestimmung verschiedener Prozessgrößen (z. B. Glukose, Laktat, Phenylalanin) bei der Kultivierung von *E. coli*, [71] während Shaw et al. die Umwandlung von Glukose zu Ethanol *in-situ* in einer Hefe Kultivierung verfolgen konnte. [72] Um die Anwendung der Ramanspektroskopie für eine gezielte Online-Prozessüberwachung auch im Bereich der Tierzellkultivierung nutzbarer zu gestalten, bedarf es einer genaueren Untersuchung der verschiedenen Einflüsse, die in komplexen Kulturbrühen auf die Ramanstreuung einwirken können.

Eine alternative Anwendung im Bereich der Ramanspektroskopie ist die Ramanmikroskopie, die bereits erfolgreich als nicht-invasive Methode zur Beobachtung für biochemische Analysen von Zellen angewandt wird. [73] Des Weiteren kann Ramanspektroskopie angewendet werden, um biochemische Veränderungen innerhalb der Zelle zu beobachten, ohne dass aufwendige Färbemethoden nötig sind. [74, 75] Diese Art der Anwendungen ist jedoch eher im Bereich der Forschung anzusiedeln.

3.2.2. Bildgebende Verfahren

Für die Überwachung von Prozessen, bei denen neben der Beobachtung von Substrat und Stoffwechselprodukten, die Konzentration und Größenverteilung suspendierter Partikel (z. B. Zellen) von Interesse ist, finden Verfahren zur Trübungsmessung Anwendung. [76] Mit der fortschreitenden Entwicklung von Rechnerleistung und CCD-Kameras (*charge coupled device*) konnten darüber hinaus in den letzten Jahren bildgebende Verfahren etabliert werden, die zur Beobachtung der Anzahl und Größenverteilung suspendierter Partikel Anwendung finden. Bei diesen Systemen werden mikroskopische Bilder generiert, die von Bildverarbeitungsalgorithmen ausgewertet werden.

Das Konzept der *in-situ*-Mikroskopie (ISM) bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit der nicht-invasiven Prozessüberwachung. [77] Die speziell angefertigte ISM-Sonde ist heißdampfsterilisierbar und somit inline in einen Prozess integrierbar. Die Messzone (Detektionskammer) des Mikroskops ist dabei direkt in dem Bioreaktor positioniert und auf zwei Seiten von Saphirscheiben begrenzt und ermöglicht so eine nicht-invasive Messung. Auf diese Weise können in einem Kultivierungsprozess Bilder direkt aus dem Reaktorinnenraum generiert werden und z. B.

Informationen über Zellkonzentration, -morphologie und Größenverteilung in Echtzeit und ohne Probenahme gewonnen werden.

Die in der Literatur beschriebenen ISM-Sonden unterscheiden sich stark in Konstruktion, Beleuchtungsart und Robustheit. Neben *in-situ*-Mikroskopen mit Auflicht-Fluoreszenz-, [78] und Blitzlicht-Lumineszenz-Beleuchtung [79] wurde ein autoklavierbares Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop mit mechanisch begrenzter Messzone und integriertem Reinigungsmechanismus entwickelt. [80, 81] Einen detaillierten Überblick über den Aufbau von bisher entwickelten ISM-Sonden und dessen Vor- und Nachteile zur Prozessüberwachung wird bei Rudolph et al. beschrieben. [82] Das Verfahren der *in-situ*-Mikroskopie wurde bereits erfolgreich zur Prozessbeobachtung und -kontrolle bei Hefe- und Säugerzellkultivierung angewandt. [83-89] Neben der Durchlicht-Hellfeld-Mikroskopie beschreiben Wei et al. die Anwendung der Dunkelfeld-Mikroskopie. Mit Hilfe dieser Mikroskopieart konnten Bilder sehr hohen Kontrastes generiert werden, die es ermöglichen, mit einer speziellen Bildverarbeitungssoftware, lebende von toten Zellen am Beispiel einer Hefekultur zu unterscheiden. [90, 91]

Ein anderes Anwendungsbeispiel der *in-situ*-Mikroskopie ist die Beobachtung von Microcarrier-kultivierungen. Hier können wichtige Informationen zu Plattierungseffizienz, Morphologieänderungen oder Proliferationsstadien der Zelle gewonnen werden. [92] Ebenso ist die Beobachtung von Kristallisationsprozessen von Proteinen im Bereich des *downstream processing* möglich. [82] Andere Systeme, die auf bildgebenden Verfahren basieren sind das PVM-System (*particle vision and measurement*) von Mettler Toledo/Lasentec (Giessen), sowie das *Vision Analysis System ENVIROCAM™* von EnviroCam Inc. (Colmar, PA, USA).

3.3. Aufreinigung von Antikörpern

Die meisten bis Mitte der 90er biotechnologisch hergestellten Produkte erforderten nur geringe Mengen des aufgereinigten Produktes, während monoklonale Antikörper und Fc-Fusionsproteine aufgrund der großen Nachfrage, der hohen Dosierung und großen Patientenzahl in Mengen von einigen 100 kg pro Arzneistoff und Jahr hergestellt werden müssen. Die Produktionskosten dieser Pharmazeutika sind hoch. Sie liegen bei 100 bis 1.000 US\$ pro Gramm Produkt. Die Nachfrage nach derartigen Biopharmaka steigt, sodass die Notwendigkeit besteht, die Produktionskapazitäten zu erhöhen.

Der Produkttiter für Antikörper liegt derzeit im Bereich von 1 g/L. [16, 23] In der Literatur ist beschrieben, dass aufgrund zunehmender Entwicklungen im Bereich der Gentechnik/-manipulation stabilere Expressionssysteme etabliert werden können. Darüber hinaus können Produktionsprozesse durch eine gezielte Anpassung der Kultivierungsbedingungen sowie Medien- und Reaktordesign, aber auch durch eine optimale Prozesskontrolle effizienter gestaltet werden, sodass in den nächsten Jahren mit einem Anstieg der Produktkonzentration um den Faktor 3 oder sogar 10 gerechnet werden kann. [16]

Durch die Steigerung des Produkttiters werden vor allem im Bereich der Aufarbeitung höhere Kapazitäten gefordert. Die Kosten für den *downstream*-Prozess können auf bis zu 80 % der gesamten Prozesskosten erhöhen werden. Aus diesem Grund ist es heute notwendig in effiziente und schnelle Aufreinigungsstrategien zu investieren, um Zeitaufwand und Kosten des Gesamtprozesses zu minimieren, ohne dabei die Reinheit und die biologische Aktivität der Zielmoleküle zu gefährden. Neben der Reinheit des Zielproduktes spielen Prozessdurchfluss, Ausbeute, Robustheit, Beständigkeit und Skalierbarkeit eine entscheidende Rolle, um einen *downstream*-Prozess mit hoher Effizienz erfolgreich durchzuführen. [93]

In der Literatur werden verschiedene Ansätze beschrieben, um den Aufreinigungsprozess effizienter zu gestalten und damit die steigenden Kosten zu senken. [16, 30, 94] Diese beinhalten Optimierungsvorschläge für eine verbesserte Auslastung der bestehenden Anlagen durch die richtige Kombination der Aufreinigungsschritte, die Entwicklung alternativer Affinitätsliganden mit höherer Stabilität für eine kostengünstigere Produktisolierung und die Verbesserung und Entwicklung chromatographiebasierter Trägermaterialien mit höheren Kapazitäten. Darüber hinaus könnten Kosten durch eine Integration von zwei oder mehreren Prozessschritten in einem Prozessschritt gespart werden. Gegenstand der Forschung ist zudem die Entwicklung von Alternativen zu chromatographischen Prozessen wie z. B. die wässrige Zweiphasen-Affinitätsverteilung, [95, 96] die magnetische Separation, [97] und die Affinitätspräzipitation [98, 99] sowie

Kristallisationsverfahren, [100, 101] die in Zukunft eine Alternative in der Antikörperaufreinigung darstellen könnten. Einige dieser Ansätze werden im Folgenden diskutiert.

3.3.1. Bessere Auslastung bestehender Anlagen durch Plattformstrategien

Der steigende Bedarf an neuen Produkten erhöht den Druck, mit einem Produkt schnell auf den Markt zu gelangen. Die produktabhängige Entwicklung eines individuellen Prozessablaufs ist oftmals aufgrund des hohen Zeitaufwands der limitierende Faktor, der die schnelle Einführung von biopharmazeutischen Produkten in klinischen Test verhindert. Die richtige Wahl und Kombination der einzelnen Prozessschritte ist entscheidend, denn die Produktqualität wird durch den Prozess bestimmt (z. B. Ausrüstung, Abfolge von Prozessschritten, Prozessparameter).

Die Herausforderung liegt in der Etablierung eines allgemeinen Prozessablaufs, der die Zeit für eine produktabhängige individuelle Prozessentwicklung verkürzen soll. Shukla et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass die unterschiedlichen physiochemischen Eigenschaften, die bei einer Vielzahl von Antikörpern existieren, die Anwendung eines einzigen im Ablauf streng festgelegten Aufreinigungsprozesses unpraktikabel machen. Beim Vergleich der Aufreinigungsverfahren verschiedener Antikörper wurde jedoch ersichtlich, dass die meisten dieser Prozesse nach demselben Schema ablaufen. [30] Die Etablierung einer Plattformstrategie, in der einzelne Prozessschritte in einer für die Aufreinigung des Zielproduktes effizienten Abfolge kombiniert werden, wäre somit an dieser Stelle erstrebenswert. Diese Plattform soll als Anleitungsdokument dienen, das das Gesamtschema des Aufreinigungsprozesses definiert. Die Betriebsbedingungen der Einzelschritte bleiben abhängig von den Anforderungen des jeweiligen Produktes. Der wichtigste wirtschaftliche Vorteil ist die damit einhergehende Zeitverkürzung in der Entwicklung des Prozesses und der damit verbundenen Einsparung von Gebrauchsmaterialien.

In Abbildung 3.3.1 ist eine Plattformstrategie, die bei der Aufreinigung einer Großzahl von Antikörpern Anwendung finden könnte, dargestellt. [30, 94] Der Ablauf und die individuellen Betriebsbedingungen werden im Folgenden kurz erläutert.

In einem ersten Schritt erfolgt die Abtrennung von Zellen und Zelltrümmern sowie Partikeln geringer Größe wie Kolloiden und Aggregaten, die sich in der Kulturbrühe befinden. Hierfür werden hauptsächlich Zentrifugationseinheiten und Tiefenfiltrations- oder Mikrofiltrationsverfahren eingesetzt. [14]

Nach der Zellabtrennung wird der Antikörper in einem so genannten „*capture-step*“ isoliert und aufkonzentriert. Dies geschieht zumeist über chromatographische Verfahren, die auf der hohen Spezifität des Antikörpers gegenüber bestimmten Affinitätsliganden wie Protein A basieren. Während der Antikörper bindet, werden grobe Verunreinigungen wie Nukleinsäuren sowie Komponenten des Zellkulturmediums abgetrennt. Aufgrund der hohen Selektivität von Protein A lässt sich in nur einem Schritt eine Produktreinheit von größer 95 % erreichen. [102, 103]

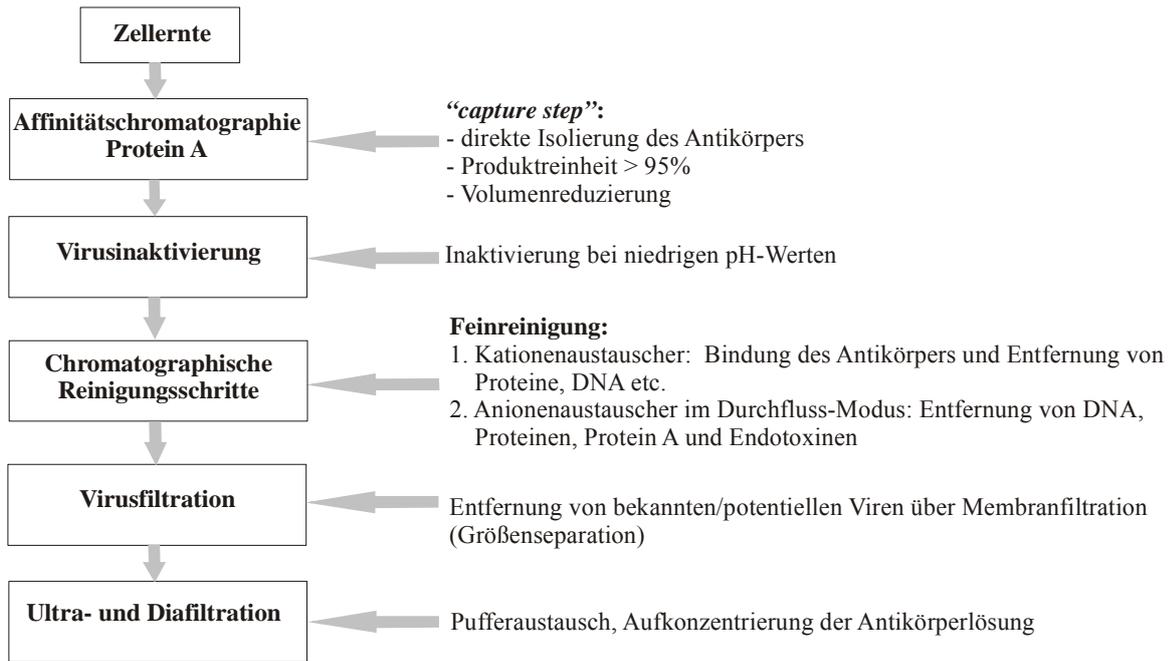


Abbildung 3.3.1: Plattformstrategie für die Aufreinigung von Antikörpern.

Es erfolgen üblicherweise chromatographische Reinigungsschritte zur Eliminierung der noch im Eluat vorhandenen Nebenprodukte, wie Zellwandproteine, DNA, herausgelöstes Protein A, Viren, sowie Aggregaten und unspezifischen Antikörpern. Die zur Feinreinigung verwendeten Chromatographiemedien müssen einen hohen Produktdurchsatz erlauben, sowie hohe Bindungskapazitäten aufweisen. Im Allgemeinen werden hierfür chromatographische Verfahren auf der Basis von ionischen und hydrophoben Wechselwirkung eingesetzt. Bei der ionischen Chromatographie beruht die Trennung auf Unterschieden in der Ladung der einzelnen Substanzen, die sich für unterschiedliche pH-Werte aus dem isoelektrischen Punkt des jeweiligen Proteins ergeben. Abhängig vom Ionenaustauschermaterial können diese Wechselwirkungen anionischer (*anion exchange chromatography*, AEX) oder kationischer Natur sein (*cation exchange chromatography*, CEX). Weiterhin werden die unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften von Proteinen ausgenutzt, die mit hydrophoben Liganden eines chromatographischen Materials wechselwirken (*hydrophobic interaction chromatography*, HIC). Darüber hinaus kann in einem letzten Feinreinigungsschritt die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) zum Einsatz kommen, um Verunreinigungen wie Antikörperaggregate und –fragmente aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes zu trennen. Typischerweise werden AEX und HIC im Durchfluss („*flow-through mode*“) betrieben, in welchem der Antikörper nicht mit dem Chromatographiematerial wechselwirkt, Verunreinigungen jedoch zurückgehalten werden. Welche chro-

matographischen Feinreinigungsschritte für einen Aufreinigungsprozess vorteilhaft sind, hängt von der Natur der Verunreinigungen ab. [30]

Neben Produktisolierung und Feinreinigung spielt die chemische-physikalische Inaktivierung, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der Virussicherheit des biotechnologisch hergestellten Antikörpers, eine entscheidende Rolle. Abreicherungs-schritte von viralen Kontaminationen in Form von Vireninaktivierung und -filtration müssen im Aufreinigungsprozess integriert sein. In Antikörperproduktionsprozessen, in denen oftmals serumfreie Medien zur Kultivierung der Antikörper produzierenden Zelllinie verwendet werden, sind zumeist nur zwei verschiedene Abreicherungs-schritte erforderlich. Vireninaktivierung erfolgt zumeist bei niedrigen pH-Werten direkt nach dem Schritt der Produktisolierung. [104] Darüber hinaus können andere Verfahren wie Hitzebehandlung, UV-Bestrahlung etc. Anwendung finden. An dieser Stelle ist darauf zu achten, dass die Inaktivierungsrate des Virus hoch ist ohne die Stabilität des Produktes unter diesen harschen Bedingungen zu gefährden. Nach der Feinreinigung des Antikörpers erfolgt ein zusätzlicher Virenfiltrationsschritt, um Virenrückstände zu entfernen. [105]

Der letzte Schritt in diesem Plattformprozess beinhaltet eine Kombination aus Ultra- und Diafiltration. Neben der Umpufferung findet auf diese Weise die Aufkonzentrierung der reinen Antikörperlösung statt. [106]

3.3.2. Alternativen zu Protein A bei der Produktisolierung

Die Affinitätschromatographie ist eine schnelle und effiziente Methode für die Anreicherung und Isolierung von Antikörpern und somit fester Bestandteil eines Aufreinigungsprozesses. Sie basiert auf der spezifischen Wechselwirkung der Antikörper mit komplementären Liganden. [26] Protein A, ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das an die Fc-Region von Antikörpern verschiedener Säugertierklassen bindet, findet standardmäßig als Affinitätsligand Anwendung. Kommerziell erhältliche Protein A Harze gewährleisten hohen Bindungskapazitäten sowie ein hohes Durchsatzvermögen. Aus der hohen Selektivität resultieren Produktreinheiten von über 95 %. [107, 108] Nachteile herkömmlicher Protein A-Harze sind die hohen Kosten. Allein 30 % der Gesamtkosten werden in diesen „capture step“ investiert. [94] Des Weiteren ergeben sich Instabilitäten der Liganden gegenüber alkalischen Bedingungen bei der Regeneration. Neben Wechselwirkungen mit unspezifischen Antikörpern der Wirtszellen kann darüber hinaus während der Elution des Antikörpers ein „Ausbluten“ der Liganden auftreten. Die auftretenden Verunreinigungen des Eluates werden jedoch durch nachfolgende Feinreinigungsschritte entfernt. [102]

Alternative Affinitätsliganden

Neben Liganden wie Protein A, können auch andere **biospezifische** in der Natur vorkommende Liganden wie z. B. Protein G, Protein L oder Antigene Anwendung finden. [94] Während Protein

G ebenso wie Protein A mit der Fc-Region des Antikörpers wechselwirkt, interagiert Protein L mit der Fab-Region (*fragment antigen binding region*). Antigene, die die spezifischste Art der Wechselwirkung zeigen, finden im Bereich der Immunaффinität Anwendung. Im Vergleich zu Protein A sind diese Liganden jedoch teurer. Zudem werden in der Literatur weitere Nachteile beschrieben, wie z. B. geringere Bindungskapazität und Selektivität. [94, 109, 110] Daher finden sie nur in speziellen Fällen der Aufreinigung Anwendung.

Neben den bekannten biospezifischen Liganden wurden **pseudobiospezifische** Liganden entwickelt, die sich in mimikrische und nicht-mimikrische Liganden aufteilen lassen. [110] Mimikrische Liganden sind Liganden, die die natürlich auftretende affine Wechselwirkung zwischen biospezifischen Ligand und Antikörper imitieren. Es kann sich hierbei um natürliche oder totalsynthetische Moleküle geringen Molekulargewichtes handeln, die als Grundbaustein oftmals Peptide oder Moleküle wie Triazin aufweisen. [111-114] Die Wechselwirkung nicht-mimikrischer Liganden mit dem Antikörper basiert hingegen auf natürlich vorkommenden elektrostatischen und physikalischen Eigenschaften dieser Liganden. Diese umfassen Hydrophobie- und Thiophilie der Liganden. Es kommen auch Metallchelate-Liganden, Mix-Mode-Liganden und Hydroxyapatit zum Einsatz. Für nähere Informationen zum Aufbau der Liganden und ihrer Wechselwirkung mit dem Zielprotein sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen. [115-121]

Nur einige wenige spezielle Formen dieser Liganden weisen aufgrund des erzielten Reinheitsgrades, ein großes Potenzial auf, um als alternative Liganden in der Affinitätschromatographie Anwendung zu finden. Der Großteil dieser Liganden verfügt jedoch meist über eine geringere Selektivität als Protein A.

Die Modifizierung herkömmlicher Protein A Harze (Trägermaterial/ Ligand) hinsichtlich der Robustheit gegenüber entsprechenden Regenerationsbedingungen, und einer höherer Bindungskapazitäten machen die Protein A Chromatographie derzeit jedoch immer noch zu einem bevorzugten „*capture step*“ in der Aufreinigung. [102, 103, 122, 123]

Nicht affinitätsbasierte Produktisolierung

Neben der Affinitätschromatographie mit alternativen Liganden, wird in einigen Fällen für die Aufreinigung von Antikörpern die Ionenaustauschchromatographie (IEX) erfolgreich als „*capture-step*“ eingesetzt, wobei die Schrittfolge dieser nichtaffinitätsbasierten Chromatographie entscheidend für die Reinheit und Ausbeute des Antikörpers ist. [124-127] Obwohl herkömmliche Ionenaustauschchromatographiearten zumeist höhere Bindungskapazitäten aufweisen, werden bei der Protein A Chromatographie höhere Ausbeuten erzielt. [94] Darüber hinaus ist die sorgfältige Einstellung des pH-Wertes und der Leitfähigkeit bei der IEX zeitaufwendig und erhöht die Kosten. Derzeitige Optimierungen der Materialporosität, Robustheit und einer höheren aktiven Oberfläche hinsichtlich der Steigerung der Bindungskapazität und Ausbeuten sollen die Chance, diese Art der

Chromatographie in Zukunft in einer Plattformtechnik für die Isolierung von Antikörpern ohne Protein A zu integrieren, erhöhen. [94]

3.3.3. Chromatographiebasierte Trennverfahren

Je nach verwendetem Trägermaterial lassen sich verschiedene chromatographische Verfahren unterscheiden.

Säulenchromatographie

Für die klassische Säulenchromatographie werden als Trägermaterial (Stationärephase) kleine Feststoffpartikel verwendet. Diese können z. B. aus organischen Polymeren oder anorganischen Substanzen wie Kieselgel (Silicagel), Aluminium- oder Magnesiumoxid bestehen, die je nach Chromatographieart mit entsprechenden funktionellen Gruppen bzw. Liganden modifiziert werden. [14] Die Beschaffenheit und Größe des Partikels sowie die Verteilung des Partikeldurchmessers in der Säulenpackung ist entscheidend, um bei möglichst niedrigem Druckabfall über die Säule eine effektive Trennleistung in möglichst kurzer Zeit zu erreichen. Darüber hinaus spielt die Dichte und Zugänglichkeit der Liganden eine wichtige Rolle, um eine möglichst hohe Bindungskapazität zu gewährleisten. Im Zuge der Nachfrage nach höheren Kapazitäten wurden herkömmliche Trägermaterialien hinsichtlich ihrer aktiven Oberfläche und der damit einhergehenden Bindungskapazität, z. B. durch höhere Ligandendichte oder besserer Zugänglichkeit der Liganden durch höhere Porosität der Partikel, verbessert.

Obwohl die Säulenchromatographie bei der industriellen Aufreinigung von Antikörpern seit Jahren als Standardverfahren eingesetzt wird, bleibt das Hauptproblem dieser konventionellen Trägermaterialien jedoch bestehen. Die innere Oberfläche der porösen Partikel ist für gelöste Substanzen nur durch Diffusion erreichbar. Dadurch ist die Transportzeit der Proteine erhöht, sodass das Elutionsvolumen steigt. Darüber hinaus können Verfestigungen in der Schüttung durch Medien-deformation oder Säulenverstopfung durch Ansammlung von kolloidalem Material entstehen, die zu einem hohen Druckabfall über der Schüttung führen. Außerdem kann es zu Kurzschlussströmen kommen, die zu einer geringen Nutzung der Packung führen. Die Schwierigkeit bei der Trennaufgabe besteht darin Kapazität, Geschwindigkeit und Auflösung zu optimieren. Das Transportphänomen der in gepackten Säulen ablaufenden Prozesse ist kompliziert und macht ein *up-scale* über eine bestimmte Größe hinweg schwierig. [128, 129]

Membranchromatographie

Eine Alternative zur herkömmlichen Säulenchromatographie ist die Membranchromatographie. Membranadsorber stellen eine spezielle Form des Trägermaterials in Chromatographieverfahren dar. [130, 131] Sie bestehen aus einer oder mehreren Lagen mikro- bzw. makroporösen Membranen,

die meistens in Form von Membranstapeln oder Wickelmodulen aufgebaut sind. Das Grundmaterial der Membranen besteht zumeist aus quervernetzter, vliesverstärkter, regenerierter Cellulose, die entweder direkt oberflächenderivatisiert ist oder mittels Propfverfahren mit einem reaktiven Polymer beschichtet wird, dessen äußere sowie innere Oberfläche mit verschiedenen Liganden modifiziert werden kann. Aufgrund höherer Porosität gegenüber herkömmlichen Trägermaterialien ist der Flusswiderstand gering. Darüber hinaus findet ein konvektiver Transport der aufzutrennenden Substanzen zu den Austauscherguppen statt, wodurch Prozesszeit sowie Elutivolumen deutlich reduziert werden (vgl. Abbildung 3.3.2).

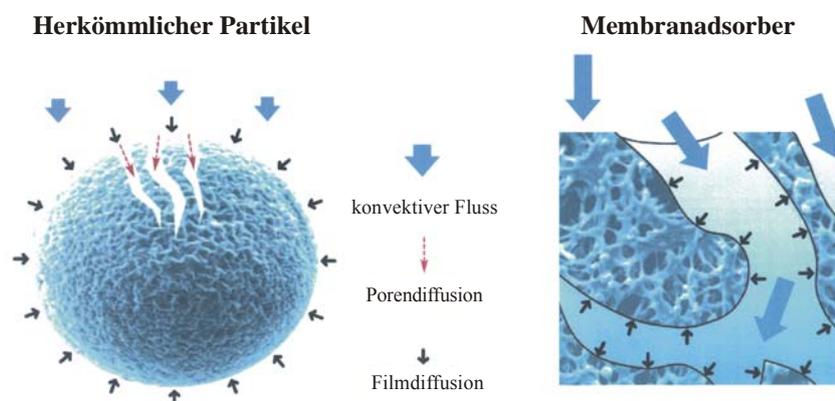


Abbildung 3.3.2: Vergleich des Stofftransportes zwischen herkömmlichem Partikel und Membranadsorber.

Der Druckabfall ist deutlich niedriger und es können konstante Bindungskapazitäten auch bei hohen Flussraten erzielt werden. [132] So wurden mit Hilfe von im Durchfluss betriebenen Kationenaustauschermembranen in einem Feinreinigungsschritt Antikörperausbeuten in vergleichbarer Höhe wie mit herkömmlichen Säulen erzielt. [133]

Im Vergleich zu herkömmlichen Trägermaterialien sind die Bindungskapazitäten geringer, was auf das niedrige Verhältnis von Oberfläche zu Bettvolumen zurückzuführen ist. Eine ungleichmäßige Porenverteilung in der Membran verhindert zudem ein einheitliches Strömungsverhalten und führt zu einem inhomogenen Bindungsverhalten der Substanzen. Diese Inhomogenität kann durch die Verwendung mehrlageriger Membranschichten auf ein Minimum reduziert werden.

Die Membranchromatographie findet bereits erfolgreich seit einigen Jahren bei der Aufreinigung von Antikörpern insbesondere im Bereich der Feinreinigung für die Protein-, DNA- und Viren-abreicherung Anwendung. [134-137] Eine weitere Optimierung der Trägermembran hinsichtlich Funktionalisierungstechnik mit Affinitätsliganden und der Entwicklung weiterer Bauformen der Module, die bereits jetzt ein einfaches *up-scale* ermöglichen, könnte diese Technik im Hinblick auf

den zukünftig steigenden Produkttiter und den somit geforderten hohen Kapazitäten, bei der Antikörperaufreinigung zu einer effizienteren Prozessführung beitragen.[130, 138-140]

Chromatographie mittels monolithischer Trägermaterialien

Eine weitere Alternative zur herkömmlichen Säulenchromatographie bietet die auf monolithischen Trägern basierte Chromatographie. [141] Die durch eine spezielle Art der Polymerisation hergestellten monomeren Blöcke aus Polystyrol, Polyacrylat oder Polymethacrylat (monolithische Disks) weisen eine einheitliche, makro-/mesoporöse Struktur auf. [142-144] Sie werden direkt als Einheit in einer Chromatographiesäule gebildet. Aufgrund der porösen Struktur werden hohe Flussraten bei geringem Druckabfall erreicht. Ebenso wie bei der Membranchromatographie dominiert der konvektive Massentransport gegenüber der Porendiffusion. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kapazität und Trennleistung in weiten Bereichen unabhängig von der Flussrate ist. [145, 146] Die Porenoberfläche des Monolithen kann je nach gewünschter Bindungseigenschaft entsprechend funktionalisiert werden und bietet dadurch einen weiten Anwendungsbereich.

Die in Form von Disks geprägten Monolithe finden bereits für viele analytische Zwecke im Bereich der Proteinanalytik Anwendung. [147-152] Sie bieten im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren eine gute Alternative bei gleicher Leistung und liefern darüber hinaus den Vorteil kürzerer Analysenzeiten. [153] Im Bereich der Aufreinigung von Proteinen gibt es bisher nur semi-präparative Ansätze, denn die Anwendung für eine effiziente Aufreinigung von Proteinen im großtechnischen Maßstab ist begrenzt. [142, 154-156] Derzeit lassen sich solche Monolithe noch nicht in einem Maßstab typischer präparativer Säulen herstellen. [14, 141] Dennoch ist diese Art der Chromatographie eine vielversprechende Technik, die durch eine Weiterentwicklung bereits bestehender Module im Hinblick auf ein *up-scale* auch für eine präparative Anwendung bei der Antikörperaufreinigung etabliert werden könnte.

3.3.4. Integration von Prozessschritten

Die Anzahl der Prozessschritte ist ausschlaggebend für die Dauer eines Prozesses. Durch eine Prozessintegration bei gleichbleibender Effizienz könnte folglich die Prozessdauer und damit der Kostenaufwand reduziert werden. Eine Entwicklung in den 90er Jahren, die auf Prozessintegration basiert, ist die Fließbettadsorption (*expanded bed chromatography*). [157] Bei dieser Technik ist die Strömungsrichtung der Schwerkraft der Adsorberpartikel entgegengerichtet und die Strömungsgeschwindigkeit so gewählt, dass diese schweben. Auf diese Weise ist die Applikation auch für Rohlösungen, also die Produktisolierung aus zellhaltiger Suspension möglich, ohne dass Partikel wie Zellen und Zelltrümmer vom Adsorbermaterial zurückgehalten werden. Vorteile der Fließbettadsorption sind eine reduzierte Prozesszeit durch Zusammenführen zweier Prozessschritte

(Filtration und Produktisolierung), ein reduzierter Pufferverbrauch und folglich die Einsparung zusätzlicher Kosten.

Aufgrund der Aufrechterhaltung des Fließbettes sind die Flussraten, abhängig von Größe und Dichte der Partikel, jedoch begrenzt. [158] Die Bindungskapazitäten sind oftmals geringer durch verstärkt auftretende Filmdiffusion. Darüber hinaus kann es zu Ablagerungen von Zellen und Zelltrümmern an der Adsorberoberfläche kommen. [158] Durch Änderungen der Partikeloberfläche und der Feststoffdichte, [94, 159] sowie die Verwendung von neuen magnetischen Adsorberpartikeln [97] konnte bereits eine Verbesserung dieser Technik für einzelne Applikationen erzielt werden. Auch im Bereich der Antikörperaufreinigung gibt es Anwendungsbeispiele, die zeigen, dass diese Technik für eine direkt Produktisolierung aus zellhaltiger Lösung mit zufriedenstellender Bindungskapazität und mit hohen Ausbeuten von bis zu 95 % einsetzbar ist. [160-163] Abhängig von der Adsorberbeschaffenheit wurde in einzelnen Fällen Zelladsorption beobachtet. [164-166] Dies kann zu Instabilitäten im Fließbett führen und die Beständigkeit, die für die Anwendung im großtechnischen Maßstab Voraussetzung ist, gefährden. Für eine Anwendung im großtechnische Maßstab und eine Integration in einen Plattformprozess müssen auf dem Gebiet noch weitere Entwicklungen folgen. Eine Optimierung der Trägermaterialien und die Entwicklung geeigneter Bauformen für ein *up-scale* sind Gegenstand derzeitiger Forschung.

4. Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte eines Produktionsprozesses Antikörper produzierender Säugetierzellen untersucht. Für die jeweiligen Fragestellungen wurden zwei verschiedene Modell-Zelllinien verwendet. Anhand dieser Zelllinien wurden verschiedene, im Hinblick auf einen Produktionsprozess relevante, Prozessschritte genauer untersucht.

Diese beinhalteten die Kultivierung einer Hybridom-Zelllinie und deren Adaption an serumfreie Kulturbedingungen. Eine Adaption an serumfreie Kulturbedingungen ist aufgrund der in Abschnitt 3.1 erwähnten Nachteile und vor allem im Hinblick auf die Aufreinigung und Qualität des Zielproduktes von entscheidender Bedeutung und kann die Kosten des Produktionsprozesses senken.

Auf der Suche nach einer geeigneten Methode für eine Online-Überwachung von Kultivierungsprozessen, in denen die simultane Detektion von Prozessgrößen wie Zellzahl, Substrate, Stoffwechselprodukte, aber vor allem die Überwachung der Antikörperproduktion im Vordergrund der Betrachtung stehen, wurde die 2D-Fluoreszenzspektroskopie als nicht-invasive, zerstörungsfreie Methode getestet. Hierbei sollten die verschiedenen Prozessgrößen, die Aufschluss über den Zustand der Kultur liefern, offline bestimmt werden. Anhand chemometrischer Datenauswertung sollten Modelle erstellt werden, die es ermöglichen, aus den erhaltenen Fluoreszenzspektren die Konzentrationsverläufe der Prozessgrößen vorherzusagen. Die Untersuchungen wurden exemplarisch an einer Antikörper produzierenden CHO-Zelllinie als Modell-Zelllinie durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Kultivierung Antikörper produzierender Zelllinie eine wichtige Rolle spielt, ist die Produktaufreinigung. Im Hinblick auf die Nachfrage nach effizienteren Aufreinigungsverfahren, die die Kosten eines Produktionsprozesses senken, wurde in dieser Arbeit ein neuartiges Membranadsorber-Modul zur Aufreinigung eines Antikörpers am Beispiel der an serumfreie Kulturbedingungen adaptierten Hybridom-Zelllinie getestet. Das System basiert auf der Idee der Fließbettadsorption, bei der durch die Integration zweier Prozessschritte die Antikörperisolierung direkt aus der zellhaltigen Suspension erfolgen sollte.

In diesem Zusammenhang sollte im Vorfeld eine auf instrumenteller Analytik basierende Analysenmethode wie HPLC gefunden werden, die angewandt auf einen Produktions- bzw. Aufreinigungsprozess des Antikörpers, eine Detektion der im Zellkulturmedium enthaltenen Proteine und Antikörper ermöglicht.

Die experimentelle Vorgehensweise sowie die Ergebnisse der einzelnen, im Hinblick auf einen Produktionsprozess, relevanten Untersuchungen werden in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

4.1. Kultivierung einer Antikörper produzierenden Zelllinie und Adaption an serumfreie Kulturbedingungen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Kultivierung der Hybridom-Zelllinie IV F19.23 (siehe Anhang 6.2), die einen monoklonalen Antikörper (IgG₁) gegen Penicillin G Amidase produziert. Im Vordergrund der Betrachtung standen eine erste Einschätzung bzgl. der Zellproliferation, des Substratverbrauchs, der Bildung von Stoffwechselprodukten sowie das Produktionsverhalten der Zelllinie.

Im Hinblick auf die Aufreinigung des Antikörpers sollte in einem weiteren Schritt die Adaption der Zelllinie an serumfreie Kulturbedingungen erfolgen, um die Abtrennung des Antikörpers von Serumkomponenten, insbesondere des Serumalbumins, zu erleichtern. Da eine Serumreduzierung häufig mit einer Verschlechterung des Proliferations- und des Produktionsverhalten der Zellen einher geht, wurden diese Größen vor und nach der Adaption untersucht.

4.1.1. Kultivierung in serumhaltigem Medium

Die Hybridom-Zelllinie IV F19.23 wurde im *batch*-Betrieb in serumhaltigem Medium kultiviert. Das DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium, das für die Kultivierung dieser Zelllinie und für zahlreicher andere Tierzellen erfolgreich eingesetzt wird, enthält vor allem anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine und zahlreiche andere Bestandteile wie z. B. Fettsäuren, Peptide, Puffersubstanzen und Zuckerquellen. Basalmedien wie dieses benötigen allerdings noch einen Anteil von 10 bis 20 % Blutserum, wie z.B. Fötale Kälberserum (*fetal calf serum*; FCS). Der hohe Proteingehalt dieser Seren unterstützt das Proliferations- und Produktionsverhalten der Zellen *in-vitro*. Die Kultivierung der Hybridom-Zelllinie erfolgte in DMEM/Ham's F12 (1:1) Medium mit einem bereits reduzierten Anteil von 5 % Pferdeserum (*horse serum*; HS).

Zellproliferation

Zunächst wurde das Proliferationsverhalten der Zelllinie untersucht. Drei Kultivierungen im *batch*-Betrieb wurden in 250 ml Spinnerflaschen mit einem Arbeitsvolumen von jeweils 100 ml durchgeführt (siehe Anhang 6.4.4). Während der Kultivierung wurde einmal täglich eine Probe entnommen. Neben der Zellzahl und der Vitalität wurden die Glukose-, Laktat- und Glutaminkonzentrationen im Kulturüberstand ermittelt (Durchführung der jeweiligen Offline-Analytik siehe Anhang 6.4.6). Abbildung 4.1.1 stellt den typischen Verlauf einer durchgeführten Kultivierung dar. Die Wachstumsphase der Zellen dauert ca. 70 h und endet bei einer maximale Lebend-Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Bis zum Eintritt in die stationäre Phase wurde eine Vitalität von mehr als 95 % beobachtet (Daten nicht gezeigt). Bis zu diesem Zeitpunkt haben die Zellen die Hälfte der anfänglichen 2,9 g/L Glukose verstoffwechselt. Gleichzeitig ist eine Zunahme der Laktat-

konzentration auf einen Wert von 0,6 g/L zu beobachten, der im weiteren Verlauf der Kultivierung aufgrund des geringen Glukoseverbrauchs konstant bleibt.

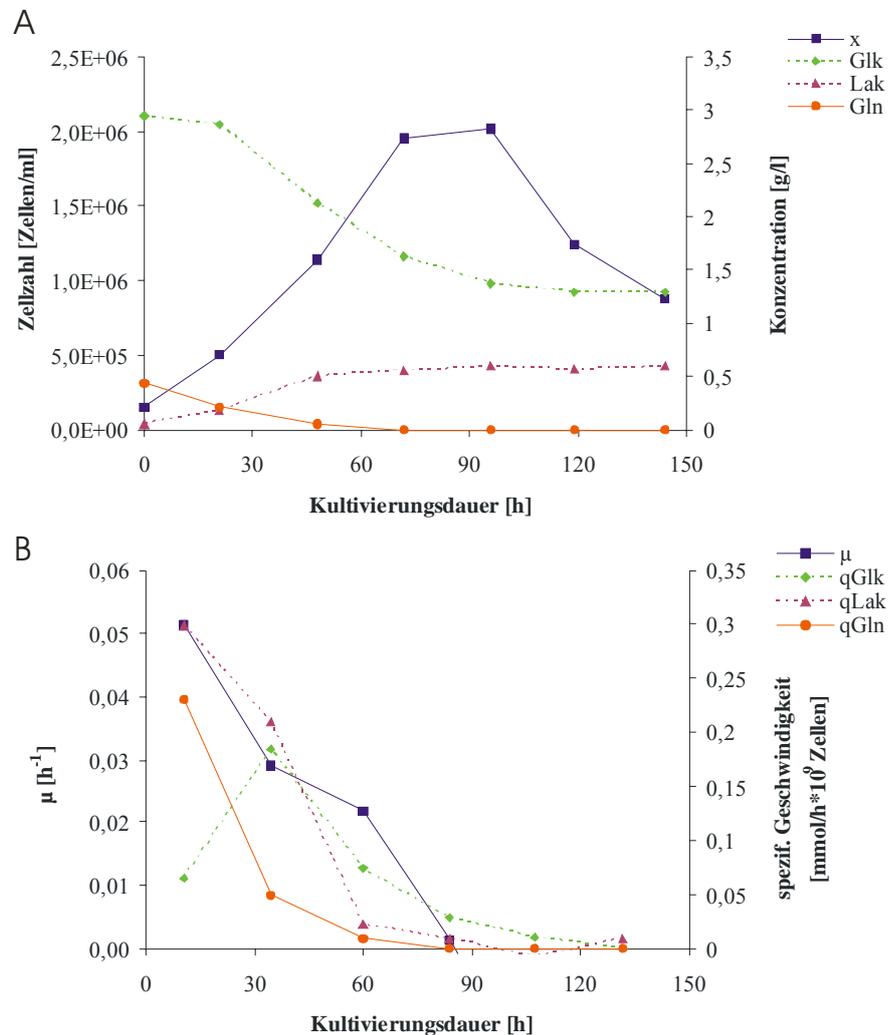


Abbildung 4.1.1: Proliferation der Hybriom-Zelllinie IV F19.23 in serumhaltigen Medium (DMEM/Ham's F12 (1:1) + 5 % Pferdeserum. x: Lebend-Zellzahl; Glk: Glukose; Lak: Laktat; Gln: Glutamin, μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, qGlk: spezifische Glukoseverbrauchsgeschwindigkeit; qLak: spezifische Laktatbildungsgeschwindigkeit; qGln: spezifische Glutaminverbrauchsgeschwindigkeit.

Glutamin ist ebenso wie Glukose Hauptenergielieferant. Durch den Katabolismus des Glutamins decken Säugetierzelllinien in Anwesenheit von Glukose 30 % bis 65 % ihres Energiebedarfs. [167, 168] Neben der Energiegewinnung dient Glutamin als Aminogruppendonor zur Biosynthese von Adenosin, Guanosin und Cytosin und gilt als limitierende Aminosäure in der Zellkultur. [169, 170] Der auftretende Glutaminmangel nach einer Kultivierungsdauer von 70 h führt vermutlich zu einer

Limitierung der Zellproliferation und folglich zu einer geringen Abnahme in der Glukosekonzentration.

Die Verläufe der spezifischen Wachstums-, Substratverbrauchs- und Laktatbildungsgeschwindigkeiten über den Kultivierungszeitraum sind in Abbildung 4.1.1 B dargestellt. Methoden zur Einschätzung der spezifischen Geschwindigkeiten sind dem Anhang 6.5.1 zu entnehmen.

Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit μ in den ersten 24 h der Kultivierung ist vermutlich auf eine hohen Verbrauchsgeschwindigkeit von Glutamin (qGln) zurückzuführen, die im Laufe der Kultivierung ebenso wie die Wachstumsgeschwindigkeit abnimmt. Die Absterbephase der Zellen, in der durch den überwiegenden Zelltod negative Werte für μ erreicht werden, ist an dieser Stelle irrelevant und wurde aus der Analyse ausgeschlossen.

Die hohe Laktatbildung in den ersten 40 h der Kultivierung resultiert scheinbar aus einem anfänglich hohen Glutaminverbrauch und einem sich anschließenden hohen Glukoseverbrauch. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Säugetierzelllinien bis zu 80 % der verbrauchten Glukose in Laktat umgewandelt werden und nur ein geringer Anteil des bei der Glykolyse entstehenden Pyruvates in den Citratzyklus übergeht. [171] Darüber hinaus ist bekannt, dass Glutamin auf insgesamt acht verschiedenen zum Teil mit einander verknüpften Stoffwechselwegen katabolisiert wird. Beim Abbau des Glutamins über den Zitratzyklus kann unter anderem Laktat entstehen, das sich im Kulturmedium anreichert. [172]

Die schnelle Akkumulation von Laktat könnte eine Ursache für das verlangsamte Wachstum sein. Die Freisetzung anderer Metabolite, wie Ammonium, das durch eine Desaminierung von Glutamin entsteht (hier nicht gemessen), könnte ebenfalls dazu beitragen. [173, 174]

Produktionsverhalten

Im Folgenden wurde der Einfluss auf das Produktionsverhalten der Hybridom-Zellen genauer untersucht. Zunächst wurde eine qualitative Analyse der produzierten Antikörpers im Kulturmedium anhand einer SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (Vorschrift siehe Anhang 6.4.7). Um den Antikörper eindeutig zu identifizieren wurde zusätzlich ein Westernblot durchgeführt (Vorschrift siehe Anhang 6.4.8). Abbildung 4.1.2 zeigt das 12 %ige SDS-Gel und ein Bild den Westernblot der Kulturüberstände von Tag 2 bis Tag 7 und des reinen Kulturmediums. Deutlich auf dem Gel zu erkennen ist der insgesamt hohe Proteingehalt des Mediums (A), insbesondere der hohe Anteil an Serumalbumin bei ca. 66 kDa. Die leichten und schweren Ketten des Antikörpers sind bei 25 bzw. 50 kDa auf dem Westernblot sichtbar. Ein Konzentrationsanstieg des Antikörpers im Verlauf der Kultivierung ist deutlich zu sehen.

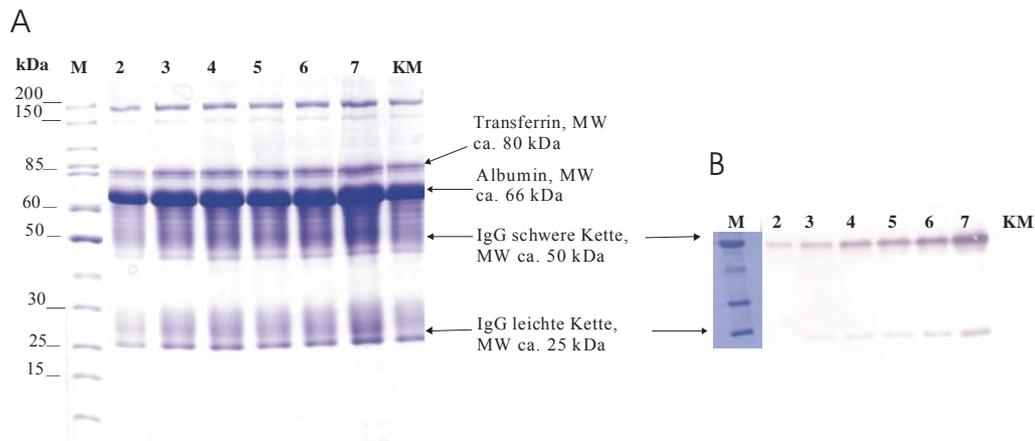


Abbildung 4.1.2: 12%iges SDS-Gel (A) und Westernblot (B) der Kulturüberstände einer *batch*-Kultivierung der Hybridom-Zelllinie in serumhaltigem Medium (Coomassie-Färbung). M: Protein Marker; (1-7): Kulturüberstände Tag 1 bis Tag 7; KM: Kulturmedium (DMEM/Ham's F12 (1:1) + 5 % HS).

Die quantitative Bestimmung des extrazellulären IgG-Gehaltes erfolgte anhand eines spezifischen Maus IgG ELISA (*Enzymelinked immunosorbent assay*) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim). Der Verlauf der IgG-Konzentration während der *batch*-Kultivierung ist in Abbildung 4.1.3 dargestellt.

Die Zunahme der IgG-Konzentration ist in den ersten 24 h gering und steigt anschließend bis zum Ende der Kultivierung an. Die in den drei *batch*-Kultivierungen nach einer Kultivierungsdauer von jeweils 140 h erzielte Endkonzentration lag zwischen 9 und 10 mg/l.

Die Produktivität einer Zellpopulation wird mit der spezifischen Produktionsgeschwindigkeit q_P beschrieben. Dies erlaubt den Vergleich zwischen unterschiedlichen Kultivierungen. Die Berechnungsgrundlage zur Einschätzung der Produktionsgeschwindigkeit ist dem Anhang 6.5.1 zu entnehmen. Die Vitalität der Zellen lag während der gesamten Wachstumsphase über 95 %. In diesem Zeitraum kann die zeitliche Änderung der IgG-Konzentration auf lebende Zellen zurückgeführt werden. Die Zunahme der IgG-Konzentration in der Absterbephase könnte auf die Sekretion noch lebender Zellen bei gleichzeitiger Freisetzung von IgG durch Zellyse zurückzuführen sein. Eine Auswertung der Produktivität ist in dieser Phase schwierig und wurde aus der Auswertung daher ausgeschlossen.

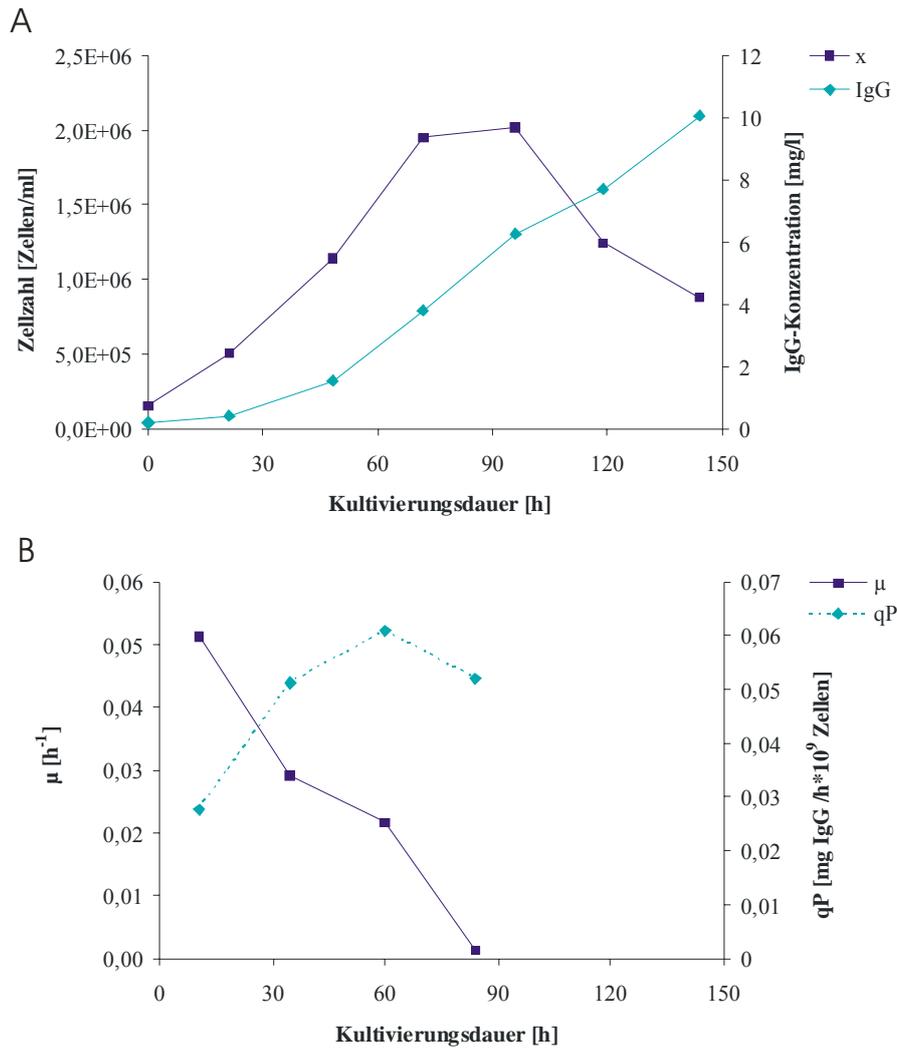


Abbildung 4.1.3: IgG-Produktion in serumhaltigen Medium. x: Lebend-Zellzahl; μ : spezifische Wachstumsgeschwindigkeit; qP: spezifische IgG-Produktionsgeschwindigkeit.

Bei einer hohen Wachstumsgeschwindigkeit in den ersten 24 h ist die Produktionsgeschwindigkeit gering. Erst mit der Abnahme von μ steigt qP an und erreicht ein Maximum von ca. 0,06 mg IgG/ ($\text{h} \cdot 10^9 \text{Zellen}$) zwischen 50 und 70 h. Mit dem Eintritt in die stationäre Phase nimmt die Produktionsgeschwindigkeit ab. Diese Produktionskinetik der Zellen ist darauf zurückzuführen, dass langsam wachsende Zellen über mehr Energie zur Produktion verfügen als schnell wachsende Zellen. [175] Ein ähnliches Produktionsverhalten wurde für unterschiedliche Hybridom-Zellen im *batch*- sowie in kontinuierlichen Kultivierungen beschrieben. [176-179]

4.1.2. Kultivierung in serumfreiem Medium

Der hohe Proteingehalt des Serums und seine undefinierte Zusammensetzung wirken sich meist störend auf die Aufreinigung des Zielproduktes aus. Serumbestandteile, wie z. B. Serumalbumin, das zumeist in sehr hohen Konzentrationen in den Seren vorhanden ist (vgl. Abbildung 4.1.2), beeinträchtigen häufig die Aufreinigung und können zu einer Verunreinigung des Eluates führen. Die Adaption von Zellen an serumfreie Bedingungen stellt einen kritischen Schritt dar, dessen Erfolg von der verwendeten Zelllinie und den Kulturbedingungen (Medien) abhängt. Neben den notwendigen Nährstoffen (Energiequellen, Stickstoffquellen, Vitamine etc.) muss das Medium Serumersatzstoffe wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Transportproteine, wie z. B. Transferrin, enthalten, die normalerweise durch den Zusatz von Serum bereit gestellt werden. Durch die Supplementierung des Mediums durch definierte Substanzen ist der Proteingehalt minimal, sodass eine bessere Voraussetzung für die Aufreinigung des Zielproduktes gewährleistet ist. Darüber hinaus ist durch Abwesenheit von Serum das Risiko durch Kontamination mit z. B. Viren, sowie die negative Auswirkung der Chargenvarianz des Serums auf die Reproduzierbarkeit eliminiert. Die Formulierung kommerziell erhältlicher serumfreier Medien ist zudem auf den jeweiligen Zelltyp angepasst. Durch den Übergang von serumhaltigen zu serumfreien, chemisch definierten Medien, kann die Physiologie der Zellen und dadurch das Proliferations- sowie das Produktionsverhalten der Zellen verändert werden. [180] Aus diesem Grund wurde das Proliferations- und Produktionsverhalten der Hybridom-Zellen nach der Adaption genauer untersucht.

Adaption der Zellen an serumfreies Medium

Um ein geeignetes Medium für die serumfreie Kultivierung zu finden wurden drei verschiedene kommerziell erhältliche Medien getestet. Panserin™ PX10 und PX401 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) sowie das Gibco™ Hybridoma-SFM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), sind serumfreie, proteinarme Medien, dessen definierte Zusammensetzung das Wachstum von Hybridom-Zellen und die Produktion monoklonaler Antikörper unterstützen sollen (Angaben des Herstellers).

Der Transfer der Zellen aus serumhaltiger Kultur in das jeweilige serumfreie Medium erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Vitalität größer 95 %. Zunächst wurden die Zellen in 6-Lochplatten kultiviert, um eine erste Einschätzung über das Proliferationsverhalten unter den gegebenen Kulturbedingungen zu erhalten. Die Zellen wurden mit einer Animpfdichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 5 ml des jeweiligen Mediums in die 6-Lochplatten überführt und bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Im Vergleich zu einem direkten Transfer in serumfreies Medium erfolgte eine sequentielle Adaption durch schrittweise Reduzierung des Serumgehaltes über mehrere Passagen. Die Ergebnisse der langsamen Adaption an serumfreie Bedingungen gegenüber einem direkten Transfer zeigten keinen deutlichen Unterschied im Proliferations-

verhalten der Zellen (Daten nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass eine direkte Adaption der Zellen mit einem bereits optimierten Medium eine zeitaufwendige sequentielle Adaptionstechnik ersetzen kann. [181]

Die Hybridom-Zellen wurden im Anschluss an die Adaption über einen Zeitraum von 6 Tagen in einer 6-Lochplatte in serumfreien Medium kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Animpfdichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausplattiert und in 5 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Es wurden täglich Proben genommen und die Zellzahl in der jeweiligen Kultur bestimmt. Zum Ende der Kultivierung wurde eine Konzentrationsbestimmung des IgG-Gehaltes im Kulturüberstand durchgeführt. Abbildung 4.1.4 zeigt den Proliferationsverlauf der Hybridom-Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Mediums. Die jeweiligen Endkonzentrationen des produzierten Antikörpers sind dem Diagramm zu entnehmen. Die Ergebnisse ergeben sich aus einer Doppelbestimmung.

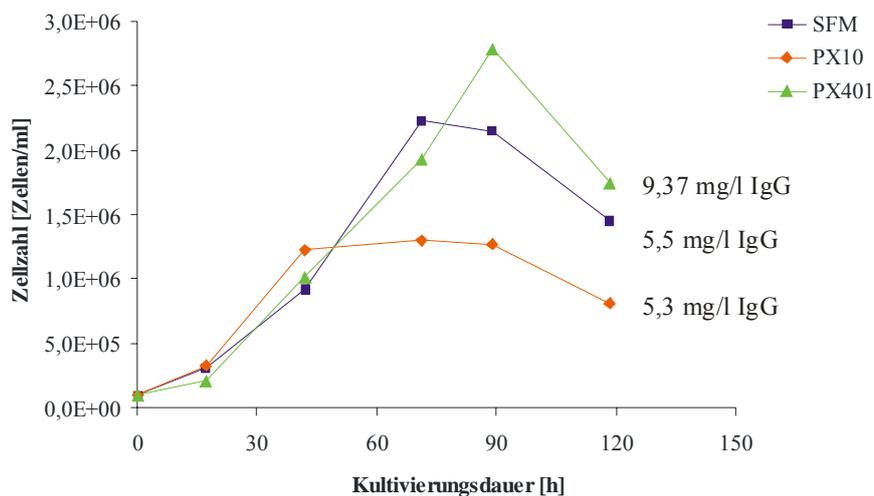


Abbildung 4.1.4: Proliferationsverhalten der Hybridom-Zellen in unterschiedlichen serumfreien Medien. Medien: PanserinTMPX10, PanserinTMPX401, SFM: GibcoTM Hybridoma-SFM.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das PX401 Medium sowohl das Wachstum als auch die IgG-Produktion am besten unterstützt. Im Vergleich zum PX10 Medium, in dem die Proliferation durch eine lange stationäre Wachstumsphase gekennzeichnet ist, wurden im PX401 Medium doppelt so hohe Zellzahlen und IgG-Konzentrationen erreicht.

Eine qualitative Analyse der Kulturüberstände anhand einer SDS-Gelelektrophorese zum Ende der Kultivierung (Durchführung siehe Anhang 6.4.7) hat jedoch gezeigt, dass sowohl im PX10 als auch im PX401 Medium ein hoher Anteil von Albumin enthalten ist (siehe Abbildung 4.1.5). Um den späteren Aufreinigungsprozess des Antikörpers zu vereinfachen und eine hohe Reinheit des

Zielproduktes bereits vor der Aufreinigung zu gewährleisten, sollten die Zellen in einem Medium mit möglichst geringem Proteingehalt kultiviert werden. Im Vergleich zum PX401 und PX10 Medium ist der Proteingehalt des Gibco™ Hybrodima-SFM Mediums gering. Außer Transferrin mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa, das als Transportprotein für Eisen Bestandteil des Mediums ist, und den schweren und leichten Ketten des Antikörpers bei ca. 50 kDa und 25 kDa, können keine weiteren Proteinbanden im betrachteten Molekularbereich erkannt werden. Es sei allerdings angemerkt, dass Insulin als Wachstumsfaktor im Medium enthalten ist. Mit einem Molekulargewicht von ca. 6 kDa wird dieses Protein auf dem Gel nicht detektiert.

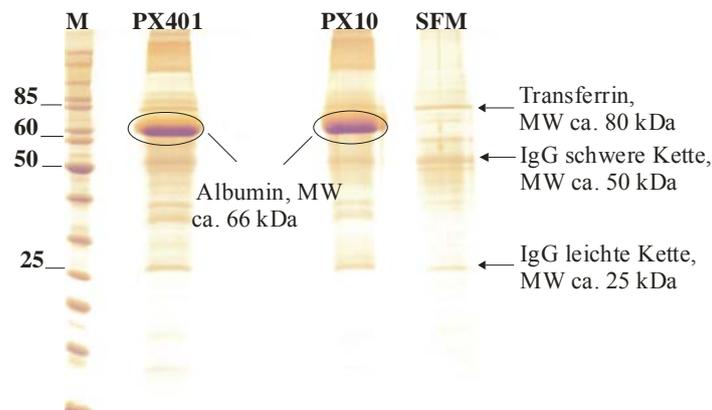


Abbildung 4.1.5: Qualitative Analyse der Kulturüberstände der serumfreien Hybridom-Kultivierungen in Panserin™ PX401 und PX10 sowie Gibco™ Hybrodima-SFM (12 %iges SDS-Gel, Silberfärbung). M: Protein Marker.

Da das Gibco™ Hybrodima-SFM Medium (nachfolgend SFM-Medium genannt) den niedrigsten Proteingehalt aufweist und zudem kein störendes Albumin enthält, sollte nachfolgend die Kultivierung der Hybridom-Zelllinie in diesem Medium erfolgen.

Für die Kultivierung der Zellen in Spinnerflaschen erfolgte der Transfer der Zellen aus serumhaltigem Medium in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Vitalität größer 95 % direkt. 100 ml des auf 37 °C temperierten SFM-Mediums wurden mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einer 250 ml Spinnerflasche angeimpft. Nach zwei Tagen erreichten die Zellen eine Zellzahl von ca. 10^6 Zellen/ml. Die Zellen wurden in 100 ml frisches Medium mit einer Dichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml überführt. Auf diese Weise wurden die Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen kultiviert. Zellzahlen von typischerweise $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden bereits nach zwei Tagen erreicht. Nach jeder Passage wurde eine Vitalität größer 90 % beobachtet. Die Adaption der Hybridom-Zellen wurde demnach als erfolgreich betrachtet.

Nach der Adaption der Zelllinie wurden eine Master- und eine Arbeitszellbank angelegt (Vorgehensweise siehe Anhang 6.4.3). Die Zelllinie wurde routinemäßig in 250 ml Spinnerflaschen mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml subkultiviert. Passagen erfolgten alle zwei Tage, um ein dauerhaftes Wachstum ohne Substratlimitierung aufrecht zu erhalten.

Proliferations- und Produktionsverhalten

Um das Proliferations- und Produktionsverhalten der Hybridom-Zelllinie nach der Adaptation zu untersuchen, wurden drei *batch*-Kultivierungen in 250 ml Spinnerflaschen mit einem Arbeitsvolumen von jeweils 100 ml durchgeführt. Während der Kultivierung wurde einmal täglich eine Probe entnommen. Neben der Zellzahl und der Vitalität wurde die Glukose-, Laktat- und Glutaminkonzentration im Kulturüberstand ermittelt (Die Durchführung der jeweiligen Offline-Analytik befindet sich im Anhang 6.4.6). Da eine Serumreduzierung mit einem verringerten Proliferations- und Produktionsverhalten der Zellen einhergehen kann, sollten Zellzahl und Produktkonzentration sowie die Wachstumsgeschwindigkeit μ und die Produktbildungsgeschwindigkeit q_P bei der Untersuchung im Vordergrund stehen. Abbildung 4.1.6 zeigt das Proliferations- und Produktionsverhalten der Hybridom-Zelllinie einer *batch*-Kultivierung in serumfreiem Medium im direkten Vergleich zu einer serumhaltigen *batch*-Kultur.

Unabhängig von dem Kulturmedium zeigen die Zellen ein ähnliches Proliferationsverhalten. Die maximal erreichten Zelldichten in der jeweiligen Kultur unterscheiden sich nur geringfügig. Im Bezug auf die Endkonzentration wurde bei der serumfreien Kultur eine um 35 % geringere Endkonzentration an IgG erhalten. In beiden Kulturen ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zu Beginn der Kultivierung hoch. Während μ in der serumhaltigen Kultur nach 24 h sinkt, bleibt die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen in serumfreiem Medium über weitere 24 h konstant. Die länger anhaltende Phase schnellen Wachstums könnte auf eine höhere Energiebereitstellung durch Glukose zurückzuführen sein. Die Ausgangskonzentration in serumfreiem Medium liegt bei 3,7 g/l Glukose. Im Vergleich hierzu enthält das serumhaltige Medium eine Glukosekonzentration von 2,9 g/l. Ein Vergleich der Glukoseverbrauchs-geschwindigkeiten zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultur zeigte in der serumfreien Kultur einen deutlich höheren Glukoseverbrauch zu Beginn der Kultivierung und über einen weiteren Zeitraum von 24 h (Daten nicht gezeigt).

Durch die länger anhaltende konstante Wachstumsgeschwindigkeit zu Beginn der Kultivierung ist die Produktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur serumhaltigen Kultur verzögert. In beiden Kulturen wird eine maximale Produktionsgeschwindigkeit von 0,06 mg IgG/ (h·10⁹Zellen) nach ca. 60 h erreicht. Die verringerte Produktionsgeschwindigkeit in den ersten 48 h könnte als Grund für die Unterschiede in der Endkonzentration der Antikörper angesehen werden.

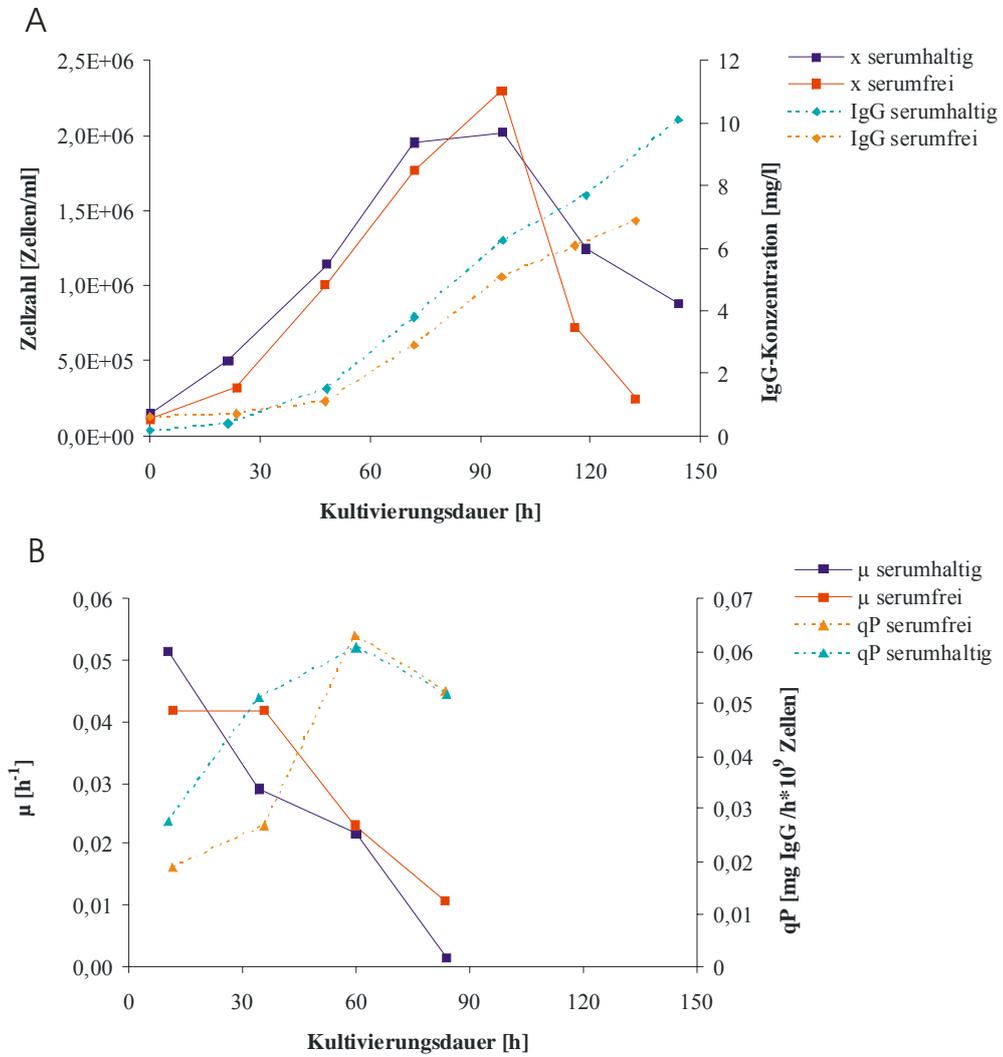


Abbildung 4.1.6: Proliferation und IgG-Produktion der Hybriom-Zelllinie in serumhaltigen und serumfreien Medium im Vergleich. x: Lebend-Zellzahl; μ : Wachstumsgeschwindigkeit; qP: IgG-Produktionsgeschwindigkeit.

In Tabelle 4.1.1 sind die Mittelwerte der maximalen Zellzahl x_{\max} , der Wachstumsgeschwindigkeiten μ_{\max} und der IgG-Konzentration IgG_{\max} aus jeweils drei *batch*-Kultivierungen in serumhaltiger und serumfreier Kultur dargestellt. Um die mittlere Produktivität qP_{mittel} der jeweiligen Population einzuschätzen, wurden die Werte von qP in der Wachstumsphase (von 30 bis 80 h) gemittelt.

Tabelle 4.1.1: Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} und Produktivität qP_{mittel} der Hybridom-Zelllinie in serumhaltigen und serumfreien Medium. Die Werte entsprechen Mittelwerten aus drei *batch*-Kultivierungen ($n=3$). x_{\max} : maximale erreichte Zellzahl; IgG_{\max} : maximale erreichte Endkonzentration des Antikörpers.

	Hybridom-Kultivierung	
	serumhaltig	serumfrei
x_{\max} [Zellen/ml]	$2,1 \cdot 10^6 \pm 0,14 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6 \pm 0,28 \cdot 10^5$
μ_{\max} [h^{-1}]	$0,047 \pm 0,005$	$0,042 \pm 0,004$
IgG_{\max} [mg/l]	$9,5 \pm 0,7$	$7,2 \pm 1,4$
qP_{mittel} [mg IgG/ $\text{h} \cdot 10^9$ Zellen]	$0,052 \pm 0,005$	$0,042 \pm 0,003$

Ein Vergleich der Kultivierung bzgl. Proliferationsverhalten der Hybridom-Zellen in serumhaltigen und serumfreien Medium zeigte keinen Unterschied. Die minimalen Änderungen lagen im Bereich der Standardabweichung. Die mittlere maximale IgG-Konzentration, die im Verlauf der *batch*-Kultivierung erzielt wurde, sowie die Produktivität der jeweiligen Zellpopulation, zeigten einen nur geringfügigen Unterschied.

In der Literatur ist beschrieben, dass eine verringerte Produktivität von Zelllinien, die in serumreduzierten Medien kultiviert wurden, mit einer erhöhten Laktatanreicherung in Zusammenhang zu bringen ist, die aus einem erhöhten Glukoseverbrauch resultieren kann. [182]

Darüber hinaus können andere Faktoren wie z.B. der pH-Wert des Mediums, die Anreicherung von Ammonium sowie die Gelöstsauerstoffkonzentration Einfluss auf die Zellproliferation und damit auf die Produktivität einer Zellpopulation, ausüben. [183, 184] Diese Faktoren müssten in weiterführenden Versuchen genauer untersucht werden, um eine eindeutigere Aussage über den Einfluss serumfreier Kulturmedien auf die Zellproliferation und -produktion treffen zu können.

Fazit

Eine erste Einschätzung des Proliferations- und Produktionsverhalten der Hybridom-Zellen in serumhaltigen und serumfreien Medium hat keine großen Unterschiede aufgezeigt. Eine serumfreie Kultivierung unter den gegebenen Bedingungen ist mit einem geringfügigen Produktivitätsverlust aber ohne Einbuße in der Zellproliferation möglich. Das für die Versuche verwendete SFM-Medium versorgt die Zellen unter den gegebenen Bedingungen mit ausreichend Nährstoffen und

unterstützt das Wachstums- und Produktionsverhalten der Zellen. Eine sequentielle Adaption der Zellen an dieses für Hybridom-Zellen optimierte Medium war nicht nötig. Für eine Kultivierung unter serumfreien Bedingungen ist dieses Medium demnach gut geeignet. Darüber hinaus sollten der minimale Proteingehalt und die damit verbundene Reinheit des Produktes den späteren Aufreinigungsprozess vereinfachen und so Kosten reduzieren. Angesichts dieser Ergebnisse ist der Vorteil der Produktion in serumfreien Kulturmedien mit minimalem Proteingehalt klar zu erkennen.

4.2. Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozessanalytik einer Antikörper produzierenden Zelllinie

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist eine Methode, die bei verschiedenen Verfahren zur Bioanalytik bzw. nicht-invasiven Bioprozessbeobachtung Anwendung findet (siehe Grundlagen Kapitel 3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie). Über eine direkte Messung intrinsischer Fluorophore wie z. B. NADH kann man Aussagen über den Zellzustand gewinnen. Vielfältige biologische, chemische und physikalische Wechselwirkungen bei Bioprozessen können jedoch zur Überlagerung und Beeinflussung der Fluoreszenz in benachbarten Regionen im Spektrum führen, sodass eine direkte Proportionalität zwischen Prozessgrößen und Fluoreszenz meist nicht mehr gegeben ist. Um dennoch latente Informationen über Verläufe einzelner Prozessgrößen, die auf den ersten Blick nicht mit der Fluoreszenz in Verbindung stehen, aus den erhaltenen Spektren zu gewinnen, ist eine chemometrische Datenauswertung und Modellbildung unumgänglich. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie wurde bereits in zahlreichen Applikationen bei der Kultivierung von z. B. Bakterien und Hefen angewendet. Im Bereich der Tierzellkultivierung wurde diese Methode bisher nur zur erfolgreichen Überwachung des Konzentrationsverlaufes des grün fluoreszierenden Proteins (GFP; engl. *green fluorescent protein*) in einer Kultivierung von NSO-Zellen eingesetzt. Zur Überwachung anderer relevanter Prozessgrößen im Rahmen von Tierzellkultivierungen gibt es bisher keine Anwendungsbeispiele.

Prozessgrößen, die bei der Beobachtung von Produktionsprozessen mit Säugetierzellen eine wichtige Rolle spielen, sind die Zellzahl, die Konzentration von Substraten wie Glukose und Glutamin, die als Hauptenergielieferanten der Zellen dienen, [167, 173] und die Konzentration bestimmter Stoffwechselprodukte wie z.B. Laktat oder Ammonium, die sich im Laufe der Kultivierung anreichern und eine inhibierende Wirkung auf die Zellproliferation und Produktivität der Zellen ausüben können. [173, 174] Eine der wichtigsten Prozessgrößen ist die Konzentration des Zielproduktes. Im Bereich der Antikörperproduktion wird der Konzentrationsverlauf bzw. die Endkonzentration in den meisten Fällen durch aufwendige Offline-Verfahren (ELISA/ Protein A Chromatographie) zumeist erst nach Ende der Kultivierung ermittelt. Eine direkte Bestimmung des Zielproduktes während des Kultivierungsprozesses hätte gegenüber der Offline-Messung demnach Vorteile.

Die Steuerung der Produktionsprozesse über eine direkte und simultane Beobachtung der Prozessgrößen würde zu einer effizienteren Prozessführung beitragen, indem z. B. gezielte Fütterungsstrategien durchgeführt oder der optimale Zeitpunkt des Kultivierungsendes bestimmt werden könnte. Darüber hinaus könnten Änderungen im Wachstums- und Produktionsverhalten einer Zellpopulation, die eine ganze Produktionscharge unbrauchbar machen könnten, rechtzeitig erkannt

und die Kultivierungen gegebenenfalls abgebrochen werden. Auf diese Weise könnten Zeit und Kosten des Produktionsprozesses reduziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel der Kultivierung einer Antikörper produzierenden CHO-Zelllinie, der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die simultane Beobachtung verschiedener nicht fluoreszierender Prozessgrößen mit Hilfe chemometrischer Datenauswertung und Modellbildung untersucht. Bei der Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie aus der Industrie, die von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Ähnliche Untersuchungen wurden im Rahmen der laufenden Dissertation von Larissa Behr (Institut für Technische Chemie, LUH) mit der in Kapitel 4.1 beschriebenen und an serumfreie Bedingungen adaptierten Hybridom-Zelllinie durchgeführt. [185] Die Messungen wurden mit dem BioView[®] Sensor der Firma Delta Light & Optics (Hørsholm, Dänemark) durchgeführt. Nähere Informationen zum Aufbau und Messprinzip dieses Sensors befinden sich im Anhang 6.4.9.

Im Folgenden sollen zunächst die Vorgehensweise für die chemometrische Datenauswertung, die Geräteeinstellungen des BioView[®] Sensors sowie die Kultivierungsbedingungen für die CHO-Zelllinie vorgestellt werden. Es folgt eine Übersicht über die Kultivierungsverläufe der beobachteten Prozessgrößen, die Auswertung der Fluoreszenzspektren über chemometrische Datenauswertung und die Beurteilung der Modellbildung zur Vorhersage der einzelnen Prozessgrößen. Die Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Bianca Grote (Institut für Technische Chemie, LUH) durchgeführt. [186]

4.2.1. Vorgehensweise für die chemometrische Auswertung

Der in Abbildung 4.2.1 dargestellte Ablauf beschreibt die in dieser Arbeit durchgeführte Vorgehensweise bei der chemometrischen Datenauswertung. Zu Beginn der Versuchsreihe standen die Zielsetzung und die Versuchsplanung, auf deren Grundlage die Datengewinnung während der Kultivierungsprozesse durchgeführt wurde. Die durch Offline-Analytik ermittelten Prozessgrößen wurden für jede Kultivierung graphisch dargestellt. Im Anschluss an die Kultivierungen wurden für alle Prozessgrößen Modelle aus drei Kultivierungen erstellt. Die Überprüfung der Modelle erfolgt durch Validierung, d. h. durch Anwendung der Modelle auf eine vierte Kultivierung durch Vorhersage der Prozessgrößen.

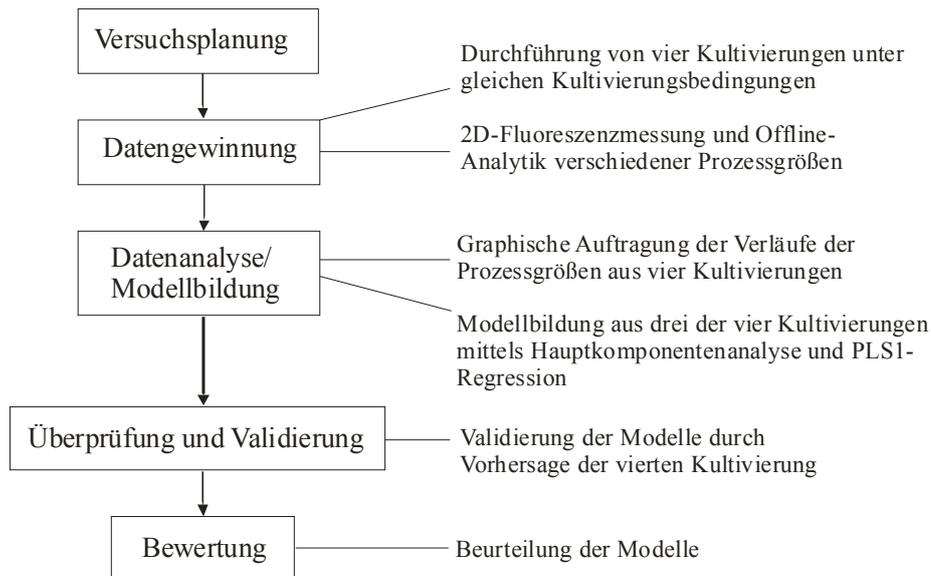


Abbildung 4.2.1: Schematische Darstellung der Vorgehensweise für die chemometrische Datenauswertung. PLS (*partial least square*).

4.2.2. Kultivierung der CHO-Zellen

BioView®-Einstellungen

Im Vorfeld der Kultivierungen wurde eine Probekultivierung durchgeführt, um die für die Kultivierung optimale Verstärkung des Messsignals zu finden. Das Messsignal wird in relativen Fluoreszenzintensitäten angegeben (im folgenden RFI genannt). Um zu verhindern, dass wichtige Informationen verloren gehen, wurde die Verstärkung einzelner Wellenlängenpaare so gewählt, dass sie während der Kultivierung die maximal detektierbare RFI von 4095 nicht überschreiten. Im Anhang befindet sich eine Tabelle über die gewählten Einstellungen des BioView® Sensors für die nachfolgenden Kultivierungen (siehe Anhang 6.4.9, Tabelle 6.4.3). Während der Kultivierungsverläufe wurden im Abstand von 15 min Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Kultivierung

Die Kultivierung der CHO-Zelllinie erfolgte in einem für die BioView-Messung angefertigten 400 ml Edelstahlreaktor. Nähere Angaben zum Ablauf der Kultivierung befinden sich im Anhang 6.4.5. Für jede Kultivierung wurde eine neue Vorkultur aus einer zuvor angelegten Arbeitszellbank angesetzt, um gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten (Vorgehensweise beim Anlegen von Zellbänken siehe Anhang 6.4.3). Da die Fluoreszenz zahlreichen Einflussgrößen unterliegt, wie z.B. Temperatur, pH-Wert und Rührerdrehzahl, wurden die Kultivierungen unter gleichen Kulturbedingungen durchgeführt. In Tabelle 4.2.1 sind die Kultivierungsbedingungen für die CHO-Zelllinie im Reaktor dargestellt.

Tabelle 4.2.1: Übersicht über die Kultivierungsbedingungen der CHO-Kultivierung.

Kultivierungsparameter	Einstellungen
Temperatur	37 °C
pH-Wert	7,0 (1 M NaOH, 1 M HCl)
Begasung	50 % Gelöstsauerstoff
Rührgeschwindigkeit	85 min ⁻¹
Arbeitsvolumen	375 ml

Offline-Analytik

Die Probenahme erfolgte zweimal täglich. Prozessgrößen, die während den Kultivierungen offline bestimmt wurden und als Grundlage für die spätere Modellbildung und Validierung dienen sind die Zellzahl (Lebend/ Tot), die Substrate Glukose und Glutamin sowie die Konzentration des produzierten Antikörpers. Darüber hinaus wurde die Laktatkonzentration sowie das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen. LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das bei einer Zerstörung der Zellintegrität in das Medium gelangt und im Kulturüberstand detektiert werden kann. Die Bestimmung der Enzymaktivität kann als indirekte Bestimmungsmethode der Anzahl toter Zellen angesehen werden. Zudem wurde exemplarisch die Konzentration der Aminosäure Glutamat bestimmt, die als Stoffwechselzwischenprodukt beim Abbau von Glutamin zu α -Ketoglutarat vor Eintritt in den Citratzyklus entsteht. Die Durchführung der Probenahme und der Analytik der jeweiligen Prozessgröße sind dem Anhang 6.4.6 zu entnehmen.

Kultivierungsverlauf

In Abbildung 4.2.2 sind die Konzentrationsverläufe nach der jeweiligen Prozessgrößen von vier Kultivierungen K1 bis K4 über den Kultivierungszeitraum dargestellt.

Kultivierungen unter gleichen Randbedingungen sollten im Rahmen einer definierten Standardabweichung einen ähnlichen Kultivierungsverlauf aufzeigen. Trotz gleicher Kulturbedingungen wurde ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der CHO-Zellen beobachtet (vgl. Abbildung 4.2.2 A). Dies spiegelte sich in einem unterschiedlichen Glukoseverbrauch und der damit einhergehenden Laktatbildung wider. Die Konzentrationsverläufe der anderen Prozessgrößen stimmten im Rahmen der Messungenauigkeit annähernd überein.

Die Ausgangsbedingungen bzgl. Zellzahl und der im Rahmen der Arbeit detektierten Substratkonzentrationen waren in allen vier Kultivierungen annähernd identisch, sodass ein Einfluss auf die Zellproliferation vernachlässigt werden kann. Mögliche Gründe für die Unterschiede im Verlauf der Zellproliferation der vier Kultivierungen könnten in einer veränderten Zusammensetzung des Kulturmediums liegen. Eine Änderung der Zusammensetzung für den Zellstoffwechsel wichtiger Substrate könnte zu einer inhomogenen Zellproliferation führen. Eine 2D-Fluoreszenzmessung des Mediums vor Beginn einer jeden Kultivierung hat eine deutliche Variation in der Fluoreszenz-

intensitäten aufgezeigt (siehe Abbildung 6.6.2, Anhang 6.6.2). Dies deutet auf eine veränderte Medienzusammensetzung hin, die unter Umständen aus einer zu langen Lagerung des Mediums resultierte. Darüber hinaus wurde während den Kultivierungen eine unterschiedlich starke Schaumbildung beobachtet. Es ist bekannt, dass sich eine starke Gasentwicklung negativ auf die Zellproliferation auswirken kann.

Der Zellzustand zu Beginn und während einer Kultivierung hat ebenfalls Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen. Die Vitalität der Zellen nach dem Animpfen des Reaktors, berechnet über den prozentualen Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl (siehe Anhang 6.4.6, Zellzahlbestimmung), lag in allen Kultivierungen bei einem Wert von größer 95 %. Eine Differenzierung zwischen noch lebensfähigen bzw. stoffwechselaktiven und bereits früh apoptotischen Zellen ist mit einer lichtmikroskopischen Untersuchung, wie sie hier durchgeführt wurde, nicht möglich. Der Einfluss des Zellzustandes auf die Zellproliferation bleibt demnach ungeklärt.

Um die Ursache der Heterogenität der Kultivierungsverläufe der Zellen besser zu verstehen, müssten anhand weiterer Kultivierungen Untersuchungen des Zellzustandes vor und während der Kultivierung sowie des Stoffwechselverhalten durchgeführt werden. Hierfür könnte eine durchflusssytemetrische Analyse des Zellzustandes nützliche Informationen liefern. Zudem müsste der Einfluss äußerer Bedingungen, wie die Medienzusammensetzung und der Gaseintrag auf die Zellproliferation, genauer untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Untersuchung verschiedener Prozessgrößen anhand fluoreszenzspektroskopischer Messungen im Vordergrund stehen. Aus diesem Grund wurde auf eine genauere Analyse des Zellstoffwechsels an dieser Stelle verzichtet. Auf der Grundlage dieser zum Teil heterogenen Datensätze wurde im weiteren Verlauf eine chemometrische Datenauswertung durchgeführt. Hierbei sollte der Einfluss der in die Modellbildung einfließenden Kultivierung auf die Vorhersage der jeweiligen Prozessgröße berücksichtigt werden.

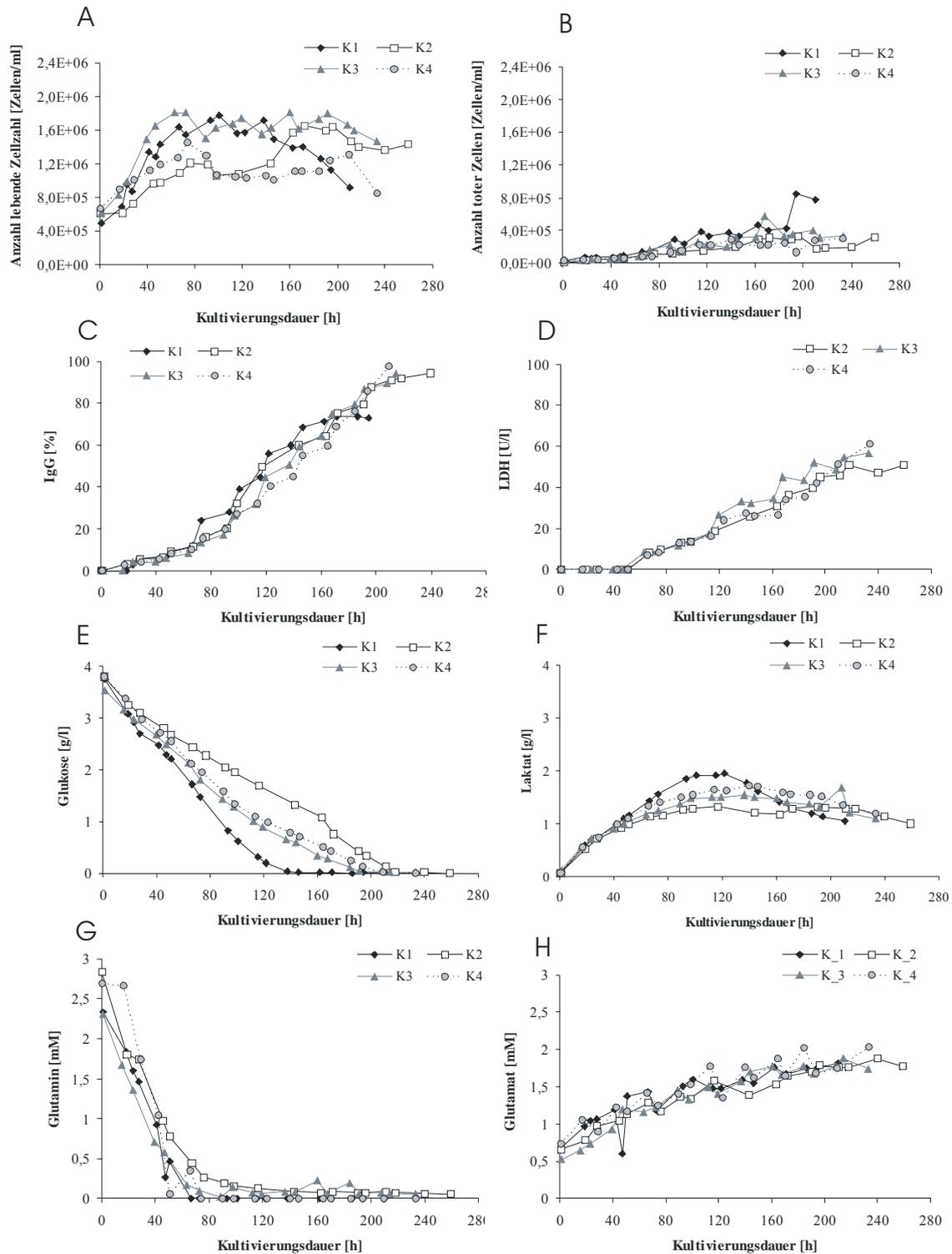


Abbildung 4.2.2: Konzentrationsverläufe der Prozessgrößen aus vier CHO-Kultivierungen K1-K4. (A) Anzahl der lebenden Zellen, (B) Anzahl der toten Zellen, (C) relative IgG-Konzentration (D) Aktivität der Laktatdehydrogenase (K2-K3), (E) Glukosekonzentration, (F) Laktatkonzentration, Glutamin- (G) und Glutamatkonzentration (H).

Fluoreszenzspektroskopische Messung

Um erste Aussagen über den Informationsgehalt der Fluoreszenzspektren zu erhalten wurden exemplarisch drei Spektren der Kultivierung K3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen. Durch die Auftragung der detektierten relativen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Exzitations- und Emissionswellenlängen ergibt sich ein zweidimensionales Fluoreszenzspektrum. In Abbildung 4.2.3 sind exemplarisch drei Spektren der Kultivierung K3 dargestellt. Die Abbildung zeigt ein Spektrum des reinen Mediums vor dem Animpfen (A), ein Spektrum zu Beginn der Kultivierung (B) und ein Spektrum zum Ende der Kultivierung nach ca. 10 Tagen (C) bei den in Tabelle 4.2.1 und Tabelle 6.4.3 genannten Einstellungen.

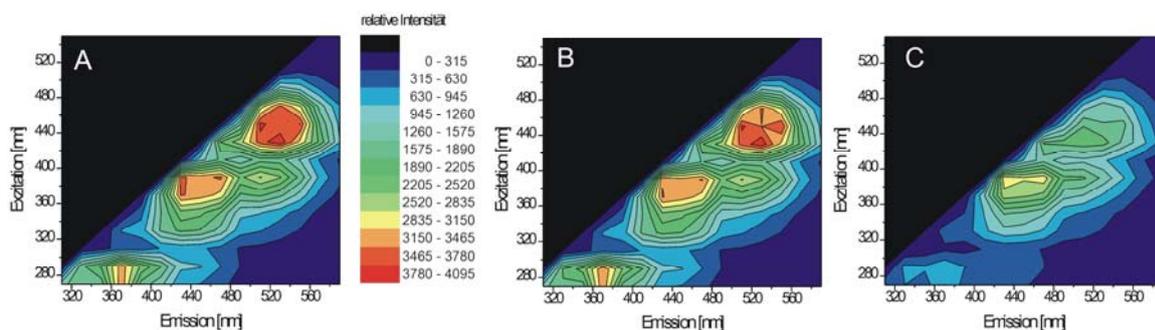


Abbildung 4.2.3: 2D-Fluoreszenzspektren. Änderung der Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung K3. (A) Spektrum des Kulturmediums vor dem Animpfen, (B) zu Beginn der Kultivierung und zum Ende der Kultivierung nach ca. 10 Tagen (C).

Die Spektren zeigen in drei Bereichen eine hohe Fluoreszenzintensität. Die höchsten RFI-Werte liegen in Ex/Em-Bereichen, die Vitaminen und Cofaktoren (Ex 350-450 nm/ Em 420-550 nm) und bestimmten Aminosäuren/Proteinen (Ex 260-300 nm/ Em 320 nm-400 nm) zugeordnet werden können (vgl. Abbildung 6.4.4, Anhang 6.4.9). Wie die Spektren zeigen, tritt keine nennenswerte Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten nach der Inokulation des Reaktors auf (vgl. Abbildung 4.2.3. A und B). Im Verlauf der Kultivierung wurde eine deutliche Abnahme der RFI in fast allen Bereichen des Spektrums beobachtet. Die Erklärungen für eine Abnahme der Fluoreszenzintensität können unterschiedlich sein. Ein möglicher Grund könnte in der Zunahme der optischen Dichte liegen. Im Verlauf der Kultivierungen wurde neben der Zunahme der Zellzahl ein Anstieg an Zellbruchstücken im Medium beobachtet. Eine Zunahme der Trübung erhöht den Anteil der Lichtstreuung. Die Eindringtiefe des Anregungslichtes ist verringert. Dies kann zu einer Abschwächung der RFI führen. [187] Eine Veränderung der Medienzusammensetzung im Verlaufe der Kultivierung könnte einen weiteren Grund für den Abfall der Fluoreszenzintensität darstellen. Zudem ist bekannt, dass die Intensität im Bereich der Aminosäurefluoreszenz durch deren Einbau in Proteine abgeschwächt werden kann (Quenching-Effekt). [56] Ebenso können Veränderungen

der RFI durch die reversible Umwandlung eines Fluorophors in seine oxidierte/reduzierte nicht fluoreszierende Form auftreten, wie es am Beispiel des Co-Enzyms NADH/ NAD⁺ zu beobachten ist.

NADH ist ein Co-Enzym, das an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zellen beteiligt ist und so den metabolischen Zustand der Zelle widerspiegelt. Die reduzierte Form dieses Co-Enzyms zählt zu den biogenen Fluorophoren. In der Literatur ist für verschiedenen Anwendungen im Bereich der Kultivierung von Mikroorganismen beschrieben, dass fluoreszenzspektroskopische Messungen des intrazellulären NADH-Gehaltes (Ex 330 nm/ Em 450 nm) für eine Abschätzung der Zellzahl, aber auch für die Online-Beobachtung des Zellzustandes herangezogen werden können. [188] Für die Bestimmung der Zellzahl geht man davon aus, dass die Fluoreszenz mit zunehmender Zellzahl während der Kultivierung zunimmt. Einflüsse, die den Stoffwechsel der Zelle betreffen, das Auftreten von Gasblasen oder Fluorophoren, die unter gleichen Bedingungen angeregt werden, können jedoch die Messung beeinflussen.

Die während der CHO-Kultivierung trotz steigender Zellzahl beobachtete Abnahme der Fluoreszenzintensität auch im Bereich der NADH-Fluoreszenz, deutet darauf hin, dass die NADH-Fluoreszenz beeinflusst wird. Eine ähnliche Beobachtung bzgl. der Abnahme der NADH-Fluoreszenz machten Hisinger et al. bei fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen bei Kultivierungen einer NSO-Zelllinie. [68] Die starke Eigenfluoreszenz des hier verwendeten Mediums (siehe Abbildung 4.2.3 A) könnte die NADH-Fluoreszenz beeinflussen. Darüber hinaus wurde eine starke Schaumentwicklung während der Kultivierungen beobachtet. Diese Faktoren könnten zu einer Überlagerung des NADH-Signals führen und auf diese Weise die Eigenfluoreszenz des NADH überdecken. Ein direkter Zusammenhang zwischen NADH-Fluoreszenz und der Zellzahl ist demnach nicht zu erkennen. Ein Vergleich der Konzentrationsverläufe weiterer Prozessgrößen mit den Verläufen einzelner Wellenlängenkombinationen hat gezeigt, dass auch hier kein direkter Zusammenhang mit den ablaufenden Reaktionen besteht (Daten nicht gezeigt).

Um dennoch Informationen über den Konzentrationsverlauf einzelner Prozessgrößen zu erhalten, wurden im Folgenden auf der Grundlage der Änderung der Gesamtfluoreszenz und der im vorherigen Abschnitt dargestellten Offline-Daten chemometrische Modelle erstellt, mit deren Hilfe die Vorhersage einzelner Prozessgrößen ermöglicht werden sollte. Änderungen in den Fluoreszenzintensitäten, wie sie während der Kultivierungen beobachtet wurden, sind hierbei Grundvoraussetzung, um latente Informationen über den Verlauf verschiedener Prozessgrößen gewinnen zu können.

4.2.3. Modellbildung und Validierung

Für die CHO-Kultivierungen wurden mit der Software The Unscrambler® 7 PLS1-Modelle zur Vorhersage der Offline-Größen Zellzahl (lebend/tot), IgG-Gehalt, LDH-Aktivität, Glukose und Laktat sowie Glutamin und Glutamat entwickelt. Im Folgenden ist eine kurze Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden für die Datenauswertung dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methoden zur Durchführung chemometrischer Datenauswertung wird in der Dissertation von Hantelmann gegeben. [57] Allgemeine Informationen finden sich bei Danzer. [189]

Hauptkomponenten- und Regressionsanalyse

Ziel der Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principle component analysis*) ist es, den Datensatz unter bestimmten Optimierungskriterien auf eine Anzahl neuer, unabhängiger Komponenten zu reduzieren, die nur die charakteristischen Änderungen berücksichtigen. Dabei werden Daten „gleicher Aussage“ in jeweils einer Hauptkomponente zusammengefasst. Die Anzahl der Hauptkomponenten ist begrenzt durch die Anzahl der Spektren bzw. durch die Anzahl der Wellenlängenkombinationen. In der Regel reichen wenige Hauptkomponenten aus (3-5), um den kompletten Datensatz bzw. die größtmögliche Varianz des Datensatzes zu erfassen. Die Varianz beschreibt in diesem Zusammenhang das Maß des Informationsgehaltes der Daten. Auf diese Weise können Anteile, die wenig zur Gesamtvarianz beitragen wie z. B. störende Rauscheffekte herausgefiltert werden.

Die reduzierten Datensätze aus der Hauptkomponentenanalyse (*Scores* = unabhängige X-Variablen (X_{cal})), werden mit den Offline-Daten (abhängige Y-Variablen (Y_{cal})) zur Modellbildung mittels PLS1-Regression (*partial least square regression*) in Beziehung gesetzt. Die Validierung dieser Modelle erfolgt durch die Anwendung der Modelle auf neue Datensätze. Ziel der Modellbildung ist es, unbekannte Y-Daten (Y_{val}) aus korrespondierenden X-Daten (X_{val}) von neuen Messungen zu berechnen. Auf diese Weise können Prozessgrößen, die bisher nur offline bestimmt werden konnten, indirekt aus den leicht zugänglichen Fluoreszenzdaten online vorhergesagt werden. Die Beziehung ist in Abbildung 4.2.4 schematisch dargestellt.

$$\begin{array}{ccc} X_{\text{cal}} + Y_{\text{cal}} & \longrightarrow & \text{Modell} \\ \text{(A)} & & \end{array} \quad \begin{array}{ccc} X_{\text{val}} + \text{Modell} & \longrightarrow & Y_{\text{val}} \\ \text{(B)} & & \end{array}$$

Abbildung 4.2.4: Schematische Darstellung der Modellbildung und Validierung. (A) Modellbildung aus unabhängigen X_{cal} -Variablen und abhängigen Y_{cal} -Variablen mittels PLS1-Regression. (B) Berechnung unbekannter Y_{val} -Daten bei Anwendung des PLS-Modells.

Zur Beurteilung der Güte der Vorhersage wird der Fehler der Vorhersage als RMSEP (*root mean square error of prediction*) als Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Vorhersage berechnet.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^M - y_{i,\text{pre}})^2}{n}}$$

Als ein weiterer Indikator dient das Bestimmtheitsmaß R^2 , das aus der Auftragung der gemessenen Y -Werte gegen die vorhergesagten Y_{val} -Werte abgelesen werden kann. $R^2=1$ bedeuten vollständige Übereinstimmung.

Grundlage der Modellbildung und Validierung

Spektren

Für die Erstellung der Modelle wurden nur die Fluoreszenzspektren herangezogen, die zu dem Zeitpunkt der Offline-Probenahme aufgenommen wurden.

Obwohl ein Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten des Mediums zu Beginn der Kultivierungen zu beobachten war, hat eine erste Datenanalyse gezeigt, dass die Modellbildung basierend auf Differenzspektren keinen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der Vorhersage der Prozessgrößen ausübte (Daten nicht gezeigt). Demnach wurde auf eine Auswertung auf der Grundlage von Differenzspektren für das weitere Vorgehen verzichtet.

Die Intensitäten des wellenlängenabhängigen Streulichtes, das über zwei Neutralsichtfilter aufgenommen wurde, lagen zum Teil in einem Bereich oberhalb der Detektionsgrenze. Diese Werte wurden in der Auswertung daher nicht berücksichtigt.

Hauptkomponenten

Vorversuche haben gezeigt, dass die Anzahl der Hauptkomponenten (nachfolgend PCs, *principle components* genannt), die in das Modell einfließen, entscheidend für die Güte der Vorhersage ist (Daten siehe Anhang). Im Allgemeinen gilt, dass ein Modell, für das nur wenige PCs nötig waren, eine bessere Korrelation zwischen Fluoreszenzdaten und der jeweiligen Prozessgröße widerspiegelt. Fließt in ein Modell eine hohe Anzahl an PCs ein, so ist die Komplexität des Informationsgehaltes, der für eine Vorhersage dieser Prozessgröße nötig ist, groß. Eine einfache Korrelation ist nicht mehr gegeben, was die Vorhersage der Prozessgröße erschweren kann und die Stabilität des Modells verringert.

Für die Modellbildung wurde die Anzahl der Hauptkomponenten abhängig vom Modell und der jeweiligen Prozessgröße so gewählt, dass der RMSEP den kleinstmöglichen Wert einnimmt. Insgesamt wurde eine maximale Anzahl von 11 Hauptkomponenten zugelassen.

Vorhersage der Prozessgrößen

Nachfolgend wurden die Verläufe der offline gewonnenen Prozessgrößen durch PLS1-Regression aus den gewonnenen Fluoreszenzspektren bestimmt. Hiefür wurde für jede Prozessgröße ein Modell aus drei der vier CHO-Kultivierungen erstellt. Im Anschluss erfolgte die Validierung der Modelle durch die Vorhersage einer vierten Kultivierung. Insgesamt wurde die Kultivierung K2 am besten vorhergesagt. Aus diesem Grund sollen im Folgenden exemplarisch die Ergebnisse der Modellbildung aus Kultivierung K1, K3 und K4 und die Validierung der Modelle durch Vorhersage der Prozessgrößen der zweiten Kultivierung K2 dargestellt werden. Angaben über den ermittelten Fehler der Vorhersage in % (RMSEP), das Bestimmtheitsmaß R^2 sowie die für die Modellbildung verwendete Anzahl an PCs sind in dem jeweiligen Diagramm dargestellt.

Vorhersage der Zellzahl (lebend/tot)

Abbildung 4.2.5 zeigt die Vorhersage des zeitlichen Verlaufes der Anzahl lebender und toter Zellen der Kultivierung K2 im Vergleich zu den offline ermittelten Konzentrationen. Darüber hinaus ist zu der jeweiligen Prozessgröße durch die Auftragung der Offline-Daten gegen die vorhergesagten Daten das Bestimmtheitsmaß dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Verlauf der Anzahl lebender und toter Zellen nur zum Teil durch den Verlauf der vorhergesagten Daten beschrieben wurde. Die Vorhersage der Lebend-Zellzahl ist mit einem Fehler von 11 % und die Vorhersage der Anzahl toter Zellen mit einem Fehler von 18 % behaftet, der sich auch in dem Bestimmtheitsmaß für die jeweilige Prozessgröße widerspiegelte.

Ein möglicher Grund für die mäßige Vorhersage der jeweiligen Prozessgröße könnte in der Offline-Analytik der Zellzahlbestimmung liegen. Optische Verfahren, wie die lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer, können mit einem hohen Fehler behaftet sein, da die Bestimmung der Anzahl lebender und toter Zellen visuell erfolgt und somit subjektiv ist. Im Bereich der Anzahl toter Zellen ist die Zuordnung durch das Auftreten von Zellfragmenten und Bruchstücken zusätzlich erschwert. Aufgrund der hohen Fehlerstreuung wurde der Fehler der Offline-Analytik wie folgt bestimmt: Zunächst wurde die Standardabweichung pro Messung ($n=3$) in % bestimmt. Daraus wurde ein mittlerer Fehler für jede der Kultivierungen berechnet. Der Mittelwert aus den jeweiligen mittleren Fehlern der Kultivierung K1 bis K4 wird als Fehler der Offline-Analytik angegeben. Der auf der Grundlage der gewonnenen Daten berechnete mittlere Fehler der Offline-Analytik liegt für die Lebend-Zellzahl bei 8 % und für die Anzahl toter Zellen bei 18 %.

Sind die Daten, die in die Modellbildung einfließen, mit einem großen Fehler behaftet so können bei der Korrelation der Daten möglicherweise Fehlinformationen in die Modellbildung einfließen, die die Vorhersage der jeweiligen Prozessgröße erschweren. Der hohe Fehler der Offline-Analytik, der in die Modellbildung einfließt, macht sich besonders bei der Vorhersage der Anzahl toter

Zellen bemerkbar. Die verhältnismäßig hohe Anzahl an Hauptkomponenten, die für die Vorhersage der Lebend-Zellzahl benötigt wurde, verdeutlicht die schlechte Korrelation zu den Fluoreszenzdaten. Die für die Vorhersage der Anzahl toter Zellen verwendeter Anzahl von einer Hauptkomponente hat bei einem Vorhersagefehler 18 % keine Aussagekraft bzgl. der Korrelation.

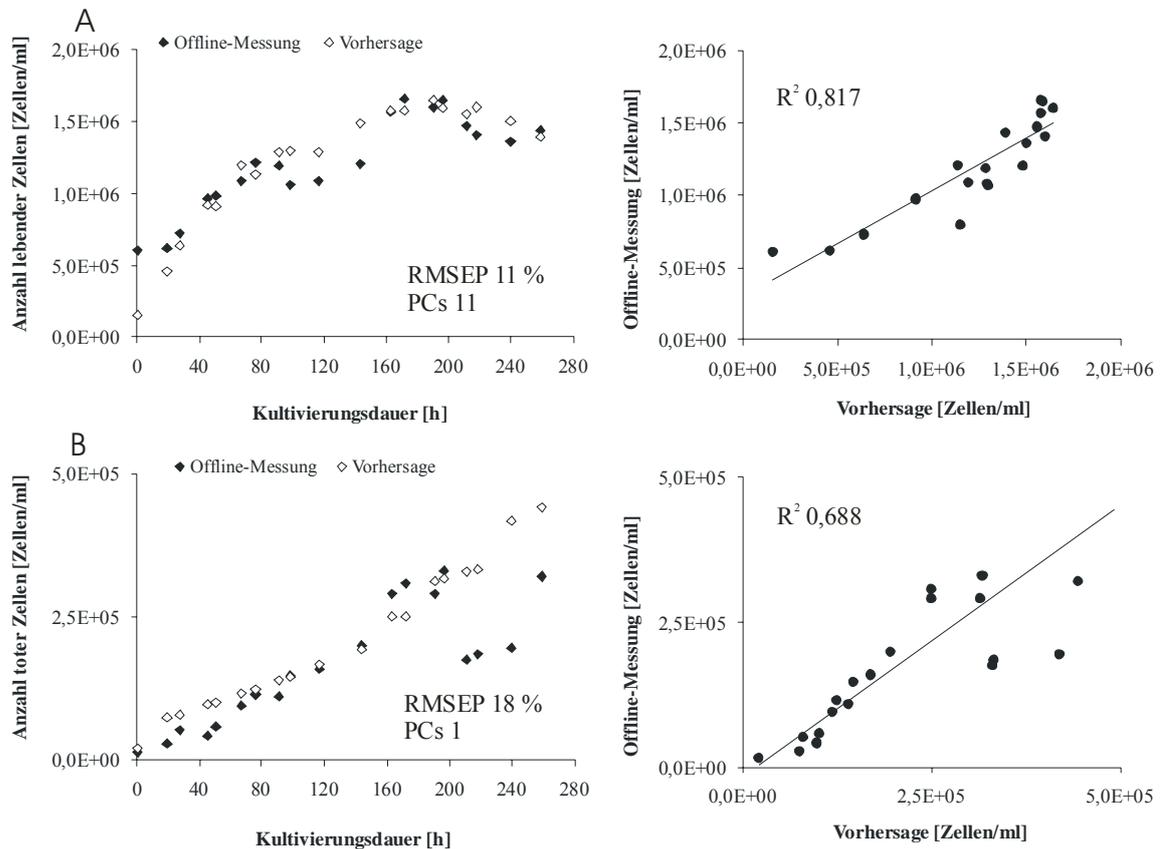


Abbildung 4.2.5: Vorhersage des zeitlichen Verlaufes der Anzahl lebender (A) und toter Zellen (B) aus den 2D-Fluoreszenzspektren der zweiten Kultivierung K2 basierend auf dem Ergebnis der Modellbildung mittels PLS1-Regression aus K1, K3 und K4 im Vergleich zu den jeweiligen Offline-Messwerten. Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes R^2 ist durch die Auftragung der Offline-Messwerte gegen die vorhergesagten Daten dem jeweils rechten Diagramm zu entnehmen. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP) und die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten PCs sind im linken Diagramm dargestellt.

Vorhersage der IgG-Konzentration und LDH-Aktivität

Abbildung 4.2.6 zeigt die Vorhersage des zeitlichen Verlaufes der IgG-Konzentration und der LDH-Aktivität der Kultivierung K2 im Vergleich zu den offline ermittelten Konzentrationen. Darüber hinaus ist zu der jeweiligen Prozessgröße das Bestimmtheitsmaß durch Auftragung der Offline-Daten gegen die vorhergesagten Daten dargestellt.

Die jeweiligen Modelle beschreiben den Konzentrationsverlauf des Antikörpers sowie des Enzyms LDH mit einem Fehler von 6 % bzw. 4 % annähernd genau. Die Anzahl an PCs, die in die

Modellbildung für die Vorhersagen einfließen, deutet im Falle der LDH-Aktivität auf eine einfache und im Fall der Antikörperkonzentration auf eine komplexere Korrelation zu den Fluoreszenzdaten hin. Dennoch besteht eine gute Korrelation zwischen den Offline-Daten und den vorhergesagten Daten, die sich in einem sehr hohen Bestimmtheitsmaß von 0,993 im Fall der IgG-Konzentration und 0,984 im Fall der LDH-Aktivität widerspiegelt.

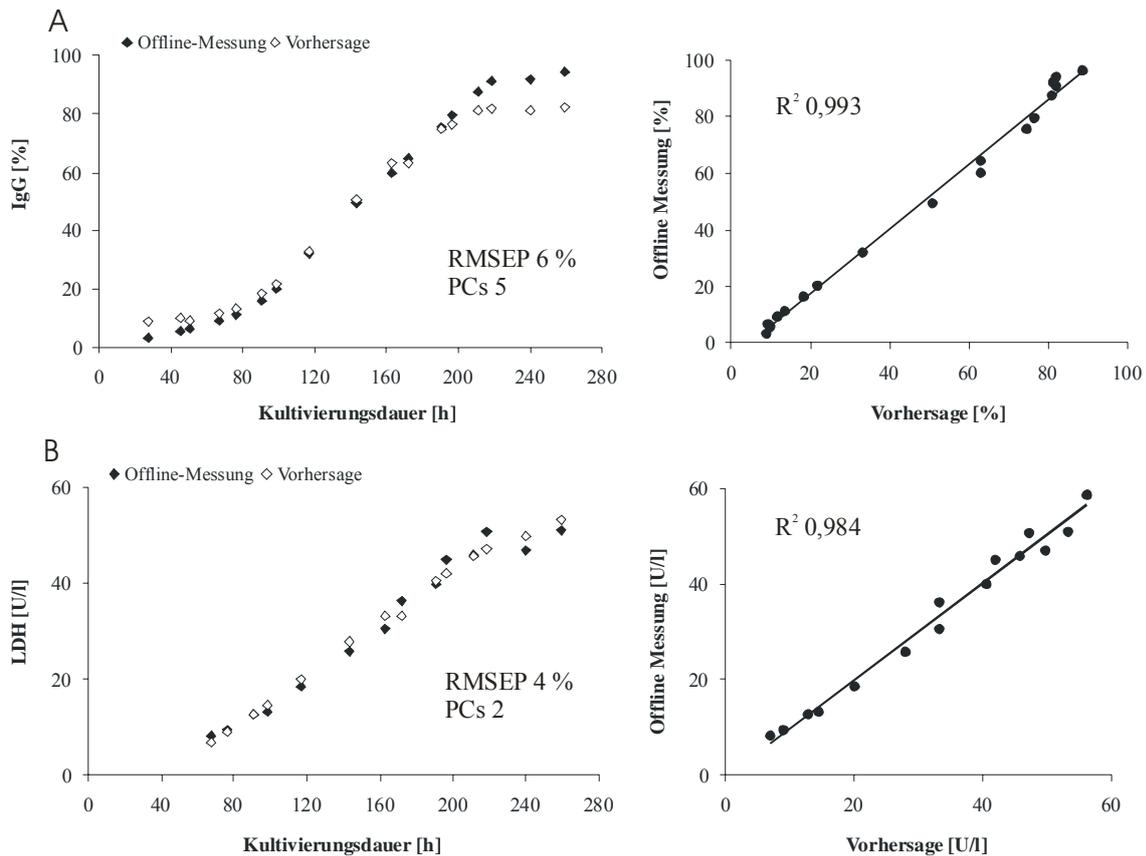


Abbildung 4.2.6: Vorhersage des zeitlichen Verlaufes der Antikörperkonzentration in [%] (A) und der LDH-Aktivität (B) aus den 2D-Fluoreszenzspektren der zweiten Kultivierung K2 basierend auf dem Ergebnis der Modellbildung mittels PLS1-Regression aus K1, K3 und K4 im Vergleich zu den jeweiligen offline Messwerten. Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes R^2 ist durch die Auftragung der offline Messwerte gegen die vorhergesagten Daten dem jeweils rechten Diagramm zu entnehmen. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP) und die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten PCs sind im linken Diagramm dargestellt.

Vorhersage der Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamatkonzentration

Abbildung 4.2.7 zeigt die Vorhersage des zeitlichen Verlaufes der Glukose- und Laktatkonzentrationen (A/B) sowie der Konzentration der Aminosäuren Glutamin (C) und Glutamat (D) der Kultivierung K2 im Vergleich zu den offline ermittelten Konzentrationen. Auf eine Auftragung der Offline-Daten gegen die vorhergesagten Daten wurde an dieser Stelle verzichtet. Angaben über den

Fehler der Vorhersage, das Bestimmtheitsmaß sowie die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten PCs sind dem jeweiligen Diagramm zu entnehmen.

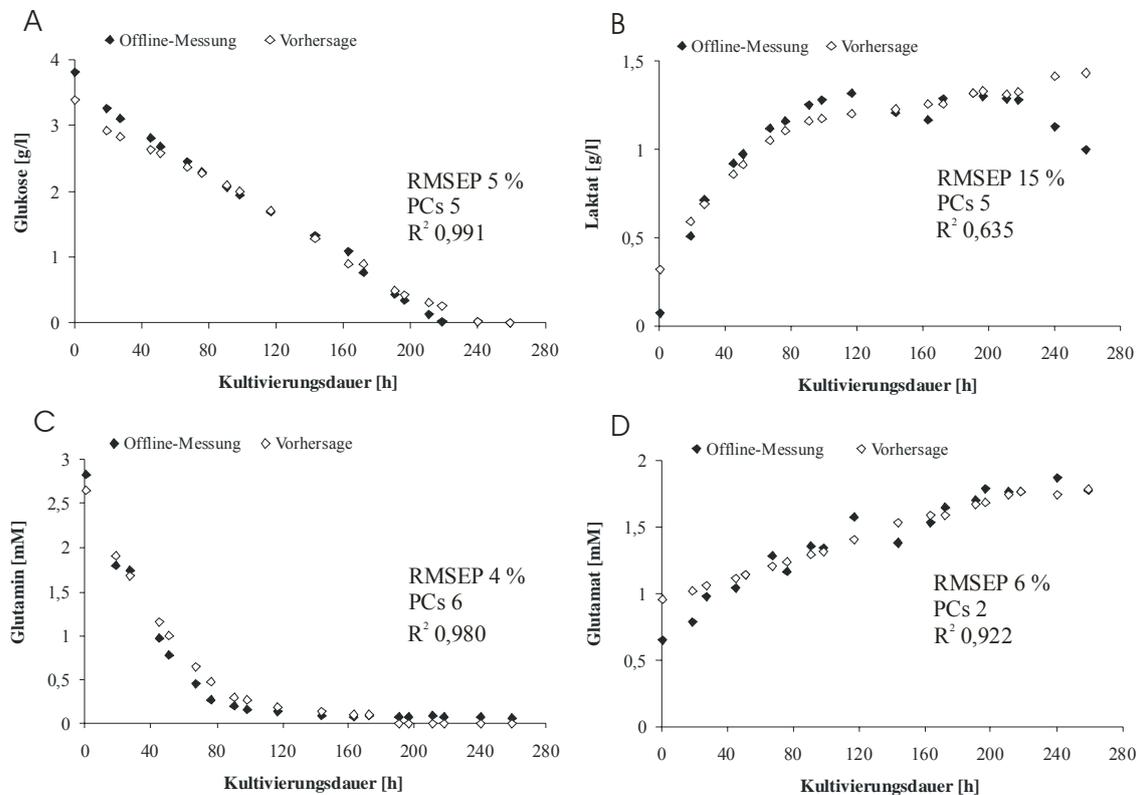


Abbildung 4.2.7: Vorhersage des zeitlichen Verlaufes der Glukosekonzentration (A), der Laktatkonzentration (B), und der Aminosäuren Glutamin (C) und Glutamat (D) aus den 2D-Fluoreszenzspektren der zweiten Kultivierung K2 basierend auf dem Ergebnis der Modellbildung mittels PLS1-Regression aus K1, K3 und K4 im Vergleich zu den jeweiligen Offline-Messwerten. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP), das Bestimmtheitsmaß und die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten PCs sind im Diagramm dargestellt.

Die Modelle für die Vorhersage der Glukose bzw. Glutaminkonzentration der Kultivierung K2 nutzt 5 bzw. 6 PCs. Obwohl der Informationsgehalt, der für eine Vorhersage der Größen benötigt wird, demnach komplex ist, liegt der mittlere Fehler der Vorhersage bei einem niedrigen Wert von 5 % bzw. 4 %. Das für die jeweilige Prozessgröße verwendete Modell beschreibt die Daten des Konzentrationsverlaufes mit großer Genauigkeit ($R^2 = 0,991$ bzw. $0,980$).

Der Verlauf der Glutamatkonzentration wird mit einem Fehler von 6 % beschrieben. Die geringe Anzahl der für das Modell verwendeten PCs deutet auf eine einfache Korrelation zu den Fluoreszenzdaten hin. Trotz geringfügiger Abweichung im Konzentrationsverlauf zu Beginn der Kultivierung liegt das Bestimmtheitsmaß mit einem Wert von $0,922$ in einem akzeptablen Bereich.

Das Modell zur Vorhersage der Laktatkonzentration nutzt 5 PCs und deutet demnach auf eine komplexe Korrelation zu den Fluoreszenzdaten hin. Die Komplexität des Informationsgehaltes und die damit einhergehende Schwierigkeit der Vorhersage kann in diesem Fall durch den großen Fehler der Vorhersage von 15 % sowie dem niedrigen Bestimmtheitsmaß von 0,635 bestätigt werden. Der Konzentrationsverlauf wird nur zum Teil durch den Verlauf der vorhergesagten Werte beschrieben. Gegen Ende der Kultivierung, wenn die Laktatkonzentration sinkt, liegen die Konzentrationen der Vorhersage sehr weit von den Offline-Werten entfernt. Eine genaue Vorhersage der Laktatkonzentration ist mit diesem Modell nicht möglich.

Der Offline-Fehler der Analytik des Laktatgehaltes, berechnet auf der Grundlage der während der Kultivierungen detektierten Konzentrationen, liegt in einem Bereich von lediglich 3 %. Die mit einem geringen Fehler behafteten Offline-Werte, sollten demnach keinen Einfluss auf die Modellbildung ausüben, wie es bei der Zellzahl aufgrund der verhältnismäßig großen Messungenauigkeit vermutet wurde. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Informationsgehalt, der für eine akzeptable Vorhersage dieser Prozessgröße notwendig wäre, nicht in den Fluoreszenzdaten enthalten ist.

Einfluss der in die Modellbildung einfließenden Kultivierungen auf die Güte der Vorhersage

Die vier CHO-Kultivierungen aus Abschnitt 4.2.2 haben einen zum Teil sehr heterogenen Konzentrationsverlauf einzelner Prozessgrößen aufgezeigt (vgl. Abbildung 4.2.2). Um den Einfluss der Kultivierungsdaten auf die Modellbildung und Validierung genauer zu untersuchen, wurden Modelle aus drei der vier Kultivierungen erstellt und jeweils eine vierte vorhergesagt. Während im vorherigen Abschnitt lediglich die Ergebnisse der Vorhersage der Kultivierung K2 dargestellt wurden, so sind in die Ergebnisse der Vorhersage der 8 Prozessgrößen für alle Kultivierung K1 bis K4 aus den jeweiligen Modellen zusammenfassend in Tabelle 4.2.2 dargestellt. Die Beurteilung der Güte der Vorhersage erfolgte auch hier anhand des Fehlers der Vorhersage (RMSEP), des Bestimmtheitsmaßes (R^2) und der Anzahl an PCs, die in die Modellbildung für die Vorhersage der jeweiligen Prozessgröße einfließen. Für eine abschließende Beurteilung des Einsatzes der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Prozessbeobachtung wurden die Mittelwerte des RMSEP, des R^2 sowie der Anzahl der PCs aus den Vorhersagen aller Kultivierungen bestimmt und als Maß für die Güte der Vorhersage des Kultivierungsprozesses insgesamt herangezogen.

Die Ergebnisse in Tabelle 4.2.2 zeigen, dass die Kultivierungsdaten, die in die Modellbildung einfließen, unabhängig von der Prozessgröße Einfluss auf die Güte der Vorhersage ausüben. Dies wurde in allen Kultivierungen anhand der Unterschiede im Fehler der Vorhersage und im Bestimmtheitsmaß deutlich. Die Anzahl der PCs, die ein Modell für die Vorhersage nutzt, ist abhängig von der Kultivierung und der jeweiligen Prozessgröße, die vorhergesagt wurde.

Abhängig von den Daten, die in die Modellbildung einfließen, besteht demnach eine gute oder schlechte Korrelation der Fluoreszenzdaten zu den offline detektierten Prozessgrößen. Dies lässt vermuten, dass bei einer bestimmten Kombination von Spektren die Abhängigkeit zwischen Fluoreszenz und der jeweiligen Prozessgröße, nicht wiedergegeben wird und die Spektrenkombination demnach nicht repräsentativ ist.

Die Heterogenität in den Konzentrationsverläufen der Lebend-Zellzahl und der Glukose (vgl. Abbildung 4.2.2 A und E) spielt scheinbar eine untergeordnete Rolle. Große Unterschiede in der Güte der Vorhersage wurden auch bei der Vorhersage der IgG-Konzentration beobachtet, obwohl im Rahmen der Messungenauigkeit ein ähnlicher Konzentrationsverlauf für alle vier Kultivierungen beobachtet wurde (vgl. Abbildung 4.2.2 C). Unterschiedliche Verläufe in der Fluoreszenzintensität der Kultivierungen und die Messungenauigkeit der Methode selbst haben vermutlich Einfluss auf die Vorhersage.

Trotz der zum Teil hohen Unterschiede in der Güte der Vorhersage der Prozessgrößen zeigen die Ergebnisse deutlich, dass unabhängig von den Kultivierungsdaten, die in die Modellbildung einfließen, bestimmte Prozessgrößen gut und andere weniger gut vorhergesagt wurden. Im Mittel ist eine gute Vorhersage der Prozessgrößen IgG, LDH, Glukose, Glutamin und Glutamat mit einem kleinen Fehler von 6-8 % und einem akzeptablen Bestimmtheitsmaß möglich. Die beste Korrelation zur Fluoreszenz, verdeutlicht an der Anzahl von 2-3 PCs, ist bei der LDH-Aktivität und der Glukosekonzentration zu beobachten.

Die Anzahl der lebenden Zellen konnte mit einem mittleren Fehler von 11 % und einem Bestimmtheitsmaß von 0,662 nicht genau vorhergesagt werden. Die hohe Anzahl von 8 PCs steht für eine vermutlich schlechte Korrelation zu den Fluoreszenzdaten. Mit einem mittleren Fehler der Vorhersage von 23 % ist die Anzahl toter Zellen, vermutlich aufgrund des hohen Fehlers der Offline-Analytik, am schlechtesten vorherzusagen. Der Fehler der Vorhersage der Laktatkonzentration ist mit einem Wert von 17 % ebenfalls groß. Die hohe Anzahl an PCs verdeutlicht die komplexe Korrelation zu den Fluoreszenzdaten. Eine gute Vorhersage dieser 3 Größen war demnach nicht möglich.

Tabelle 4.2.2: Übersicht über die Güte der Vorhersage der jeweiligen Prozessgrößen der Kultivierungen K1- K4, unter der Anwendung der Modelle aus je drei der vier Kultivierungen. Die Beurteilung erfolgte anhand des Fehlers der Vorhersage (RMSEP), des Bestimmtheitsmaßes R^2 und der Anzahl an Hauptkomponenten (PCs), die das jeweilige Modell für eine Vorhersage nutzt (n. b.: nicht bestimmt).

Prozessgrößen	Vorhersage von												Mittelwert		
	K1			K2			K3			K4					
	RMSEP [%]	R^2	PCs	RMSEP [%]	R^2	PCs	RMSEP [%]	R^2	PCs	RMSEP [%]	R^2	PCs	RMSEP [%]	R^2	PCs
Lebende Zellen	8,5	0,888	8	11	0,817	11	10	0,659	10	15	0,089	1	11	0,662	8
Tote Zellen	30	0,841	5	18	0,688	1	21	0,771	2	25	0,771	1	23	0,768	2
IgG	12	0,968	2	6	0,993	5	13	0,962	5	3	0,998	4	8,5	0,980	4
LDH-Aktivität	n.b.	n.b.	n.b.	4	0,984	2	9	0,970	2	7	0,950	2	6,6	0,967	2
Glukose	13,5	0,968	2	5	0,991	5	8	0,980	2	9	0,991	4	8,8	0,982	3
Laktat	22	0,551	8	14,5	0,635	5	13	0,731	8	19	0,788	4	17	0,676	6
Glutamin	11	0,880	7	4	0,978	6	4	0,985	4	8	0,931	6	6,7	0,925	6
Glutamat	11	0,780	2	6	0,922	2	7	0,911	10	11	0,857	5	8,7	0,867	5

Im Rahmen der Datenvorverarbeitung wurden in weiteren Versuchen verschiedene Methoden getestet, um die Vorhersage der Prozessgrößen, im speziellen die Vorhersage der Zellzahl (lebend/tot) sowie der Laktatkonzentration, zu verbessern. Um den Einfluss kleiner Änderungen in der Fluoreszenzverläufen einzelner Wellenlängenkombinationen im Vergleich zu großen Änderungen bei der Auswertung stärker zu wichten, wurden die Daten der Fluoreszenzspektren vor der Modellbildung skaliert. Auf diese Weise können kleine Änderungen in Messwerten besser berücksichtigt werden. Darüber hinaus wurde eine Normierung der Spektren durchgeführt, d.h. der Wertebereich einer bestimmten Variablen wird auf einen bestimmten Bereich transformiert, um die Daten vergleichbar zumachen.

Im Anschluss wurden diese veränderten Datensätze für eine Modellbildung aus drei der vier CHO-Kultivierung und der Vorhersage der jeweils vierten Kultivierung verwendet. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass weder eine Skalierung noch eine Normierung der Fluoreszenzdaten im Vorfeld der Modellbildung zu einer besseren Vorhersage der jeweiligen Prozessgrößen geführt hat (Daten nicht gezeigt).

Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Erstellung von PLS1-Modellen fast alle der Prozessgrößen mit einem tolerierbaren Fehler aus den 2D-Fluoreszenzspektren vorhergesagt werden konnten. Hierbei hat sich herausgestellt, dass wichtige Prozessgrößen wie das Zielprodukt (IgG) und die für den Zellstoffwechsel wichtige Energielieferanten Glukose und Glutamin neben der LDH-Aktivität im Medium sowie der Aminosäure Glutamat mit hoher Genauigkeit durch die jeweiligen Modelle beschrieben wurden. Darüber hinaus wurde eine gute Korrelation der Offline-Daten auch im Bereich niedriger Konzentrationen beobachtet, sodass es zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung möglich ist, einen Wert der entsprechenden Prozessgröße zu erhalten. Abhängig von den Kultivierungsdaten, die einen zum Teil sehr heterogenen Verlauf aufzeigten, wurden Unterschiede in der Güte der Vorhersage einzelner Prozessgröße beobachtet. Um die Stabilität der Modelle zukünftig zu erhöhen, müssten weitere Kultivierungsläufe in die Modellbildung einfließen. Hierbei könnte eine mehrmalige Probenahme sinnvoll sein. Sind die enthaltenen Informationen relevant, so würde ein größerer Datensatz bzw. eine größere Menge an Informationen, die in die Modelle einfließen, eine höhere Güte in der Vorhersage gewährleisten.

Es konnte gezeigt werden, dass Änderungen im Konzentrationsverlauf verschiedener Prozessgrößen in der *batch*-Kultivierung, unter Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zeitnah und nicht-invasiv bestimmt werden können, sodass eine effektive Prozessüberwachung mit dieser Methode unter den gewählten Bedingungen (Medium, Zelllinie, Kulturbedingungen) für die genannten Prozessgrößen möglich ist.

Eine gute Vorhersage der Prozessgrößen Zellzahl (lebend/tot) und Laktat war unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich. Eine genaue Ursache für die schlechte Vorhersage ist nicht zu ermitteln. Im Fall der Zellzahl ist zu vermuten, dass die Ungenauigkeit in der Vorhersage aus den in die Modellbildung einfließenden Offline-Daten resultiert, die mit einem hohen Fehler behaftet waren. Die hohe Anzahl an Hauptkomponenten bei der Vorhersage der Lebend-Zellzahl deutete zusätzlich auf eine komplexe Korrelation zu den Fluoreszenzdaten hin. Informationen, die aus den Anteilen des Streulichtes resultieren, könnten unter Einbeziehung in die Modellbildung, möglicherweise zu einer Verbesserung der Vorhersage der Lebend-Zellzahl führen. Dies war im Rahmen dieser Versuche nicht möglich. Trotz zuvor optimierter Signalverstärkung lagen die Intensitäten des Streulichtes in einigen Kultivierungen zum Teil oberhalb der Detektionsgrenze, was auf die Heterogenität der beobachteten Medienzusammensetzung zurückgeführt werden kann. Für eine Überprüfung müssten weitere Kultivierungen mit veränderter Verstärkung des Messsignals in dem Bereich durchgeführt werden.

Obwohl die Offline-Daten der Laktatkonzentration, die für die Modellbildung genutzt wurden, mit einem geringen Offline-Fehler von 3 % behaftet waren, ist die Vorhersage dieser Größe mit einem mittleren Fehler von 23 % ungenau. Es ist zu vermuten, dass der genaue Informationsgehalt für die Vorhersage des Verlaufes der Laktatkonzentration nicht in den Fluoreszenzdaten enthalten ist. Eine Verbesserung der Vorhersage könnte erzielt werden, wenn für die Beschreibung des Verlaufes zwei Modelle herangezogen werden würden. Ein Modell würde den Anstieg der Laktatkonzentration beschreiben, das zweite Modell den Abfall der Konzentration. Auf diese Weise wäre unter Umständen eine bessere Vorhersage möglich. Dies wäre in weiterführenden Versuchen zu überprüfen. Darüber hinaus könnte die Anwendung von neuronalen Netzen zur Verbesserung der Vorhersage der Laktatkonzentration führen.

4.3. Proteinanalytik in Zellkulturüberständen

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Aufgabe, eine geeignete Analysenmethode für die in Zellkulturmedium enthaltenen Proteine und den von den Hybridom-Zellen produzierten Antikörper zu finden, um angewandt an einem Produktions- bzw. einen Aufreinigungsprozess des Antikörpers, die Konzentrationsverläufe der jeweiligen Komponente zu detektieren. Im Hinblick auf eine mögliche Sensor-Prozess-Kopplung für die Online-Überwachung sollten hierfür Methoden mit instrumenteller Analytik wie HPLC Anwendung finden, die eine einfache Ankopplung an den jeweiligen Prozess ermöglichen. Die angewandte Analytik sollte dabei eine direkte Konzentrationsbestimmung aus Zellkulturüberständen ohne zeitaufwendige Vorbehandlung der Proben ermöglichen.

Die Durchführung der Versuche erfolgte mit verschiedenen Modell-Proteinen. Humaninsulin und Humantransferrin sind Proteine, die häufig in serumfreien Zellkulturmedien enthalten sind und Bestandteil des bei der Hybridom-Kultivierung verwendeten Gibco™ Hybridoma-SFM (Invitrogen, Karlsruhe) sind. Aus diesem Grund wurden diese Proteine als Modell-Proteine für die Versuche ausgewählt. Als Antikörperstandard wurden ein polyklonaler, humaner Antikörper (IVIg: intravenöses Immunglobulin) und ein selbst hergestellter Standard des von der Hybridom-Zellen produzierten monoklonalen Maus IgG₁ Antikörpers eingesetzt, der im Rahmen dieser Arbeit aus Kulturüberständen aufgereinigt, aufkonzentriert und auf seine Aktivität hin (Wechselwirkung mit dem Antigen) untersucht wurde (Durchführung siehe Anhang 6.4.10). Nähere Angaben zu den Modell-Proteinen sind dem Anhang 6.3 zu entnehmen.

Im Hinblick auf die Aufgabenstellung wurden unterschiedliche Analysenmethoden untersucht. Nachfolgend soll anhand erster Versuche eine Einschätzung hinsichtlich der Anwendbarkeit der jeweiligen Analysenmethode dargestellt werden.

4.3.1. *Reversed-phase-Chromatographie*

Als erste Analysenmethode wurde die *reversed-phase*-Chromatographie (RPC) getestet, bei der eine hydrophobe Wechselwirkung der Analyten mit den unpolaren Gruppen der stationären Phase im polaren wässrigen Lösungsmittel stattfindet. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels, zumeist Acetonitril, das mit den adsorbierten Molekülen um die Bindungsstelle konkurriert. [26] Als Trägermaterialien kommen vorwiegend Kieselgele zum Einsatz, die mit Alkylresten in der Länge von C2 bis C18 substituiert wurden. Der hydrophobe Charakter der stationären Phase steigt mit der Länge der Alkylgruppen. Für die Trennung von größeren, hydrophoben Proteinen wie Antikörpern werden C4 und C8-Säulen bevorzugt. Die verwendeten Partikel (Größe 3,5-5 µm), sollten eine Porengrößen $\geq 300 \text{ \AA}$ aufweisen, um eine

adäquate Kapazität, Wiederfindungsrate und hohe Flussraten bei einem niedrigen Druckabfall zu gewährleisten. [190, 191]

In Anlehnung an die Versuche von Dillen et al. wurde für die genannte Trennaufgabe eine ZORBAX 300SB-C8 Säule (Partikelgröße: 5 µm; Säulendimension: 2,1 x 75 mm) der Firma Agilent Technologies (Böblingen) verwendet. [191]

Zunächst wurde die Wechselwirkung des monoklonalen Maus IgG₁ Antikörpers mit dem Trägermaterial untersucht. Für die Versuche wurde exemplarisch eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt. Als Lösungsmittel wurde ein Acetonitril/Wasser-Gemisch verwendet. Acetonitril (ACN) ist das gebräuchlichste Lösungsmittel für die RPC. Als Ionenpaarungsreagenz, wurde Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Aufgrund der geringen Säulendimension wurde ein Probenvolumen von 10 µl gewählt. Die Versuche wurden zunächst bei einer Temperatur von 45 °C durchgeführt. In ersten Versuchen wurden verschiedene Flussraten (max. 2 ml/min) und Lösemittelgradienten getestet, um einen möglichst scharfen Antikörperpeak zu erhalten. Um die Auflösung bei einer Flussrate von 2 ml/min zu steigern wurden zusätzlich Versuche bei einer Temperatur 70 °C durchgeführt. Die ZORBAX-Säule ist speziell für die Anwendung in hohen Temperaturbereichen entwickelt worden, ohne, dass die Stabilität der stationären Phase durch hohe Temperaturen beeinträchtigt wird (Herstellerangaben).

Die besten Ergebnisse wurden bei einer Flussrate von 2 ml/min unter den in Tabelle 4.3.1 dargestellten Bedingungen erzielt. Abbildung 4.3.1 zeigt den Temperatureinfluss auf die Wechselwirkung des Antikörpers mit der stationären Phase unter den gewählten Bedingungen.

Tabelle 4.3.1: Lösemittelgradient für die *reversed-phase*-Analytik des Antikörpers. Flussrate 2 ml/min; Temperatur 70 °C. TFA: Trifluoressigsäure; ACN: Acetonitril.

Zeit [min]	Solvent A	Solvent B
	ddH ₂ O + 0,11% TFA (v/v)	90 % ACN + 0,09 % TFA (v/v)
0	80	20
20	40	60
22	10	90
27	10	90
29	80	20
35	80	20

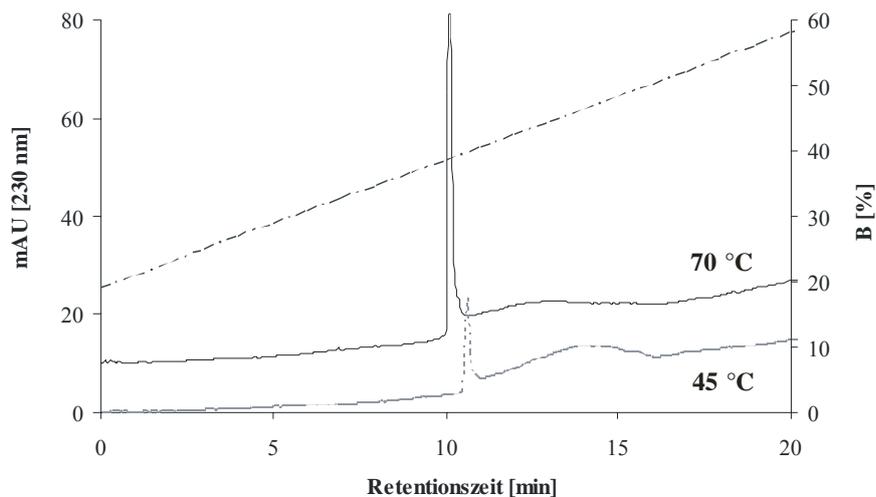


Abbildung 4.3.1.: Einfluss der Temperatur auf die *reversed-phase*-Chromatographie von monoklonalem Maus IgG₁. Säule: ZORBAX SB300-C8; Temp. 45 °C und 70 °C; Probenkonzentration: 0,5 mg/ml; Injektionsvolumen: 10 µl; Solvent A: ddH₂O + 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA (v/v)), Solvent B: 90 % Acetonitril + 0,09 % TFA. Linearer Gradient: A von 80 % auf 40 % in 20 min.

Die Ergebnisse der Antikörperwechselwirkung mit der hydrophoben stationären Phase bei 45 °C zeigen, dass die Elution des Antikörpers unter den gewählten Bedingungen nach einer Retentionszeit von 11 min mit einer zunächst guten Peakauflösung eintritt. Mit steigendem Acetonitrilanteil wurde eine Peakdeformation beobachtet. Es scheint, dass der Antikörper unterschiedlich stark mit dem Säulenmaterial wechselwirkt, sodass keine einheitliche Elution erfolgte. Eine Erhöhung der Temperatur auf 70 °C führte zu einer minimalen Abnahme der Retentionszeit und zu einer verbesserten Peakauflösung. Dies deutet daraufhin, dass bei höheren Temperaturen die Elution des Antikörpers verstärkt wird. Es wird vermutet, dass die Temperatur eine Veränderung der Proteinstruktur hervorruft, und auf diese Weise die hydrophobische Wechselwirkung beeinflusst wird. [191]

In weiteren Versuchen wurde die Anwendung der RPC auf die Proteine Insulin und Transferrin und des polyklonalen, humanen Antikörper (IVIg) unter identischen Versuchsbedingungen untersucht, um im Hinblick auf die Trennaufgabe eine erste Einschätzung zu erhalten. Die Proteine wurden einzeln unter den oben genannten Bedingungen bei 70 °C vermessen. Abbildung 4.3.2 zeigt das Ergebnis der RPC-Messung der drei Proteine. Zum Vergleich wurden eine Messung mit einer Probe aus Zellkulturüberstand einer Hybridom-Kultivierung, sowie eine Messung des monoklonalen, murinen Antikörpers, in der Abbildung dargestellt. Folgende Proteinkonzentrationen wurden verwendet: Insulin/Transferrin 1 mg/ml, monoklonaler/polyklonaler Antikörper 0,5 mg/ml in ddH₂O.

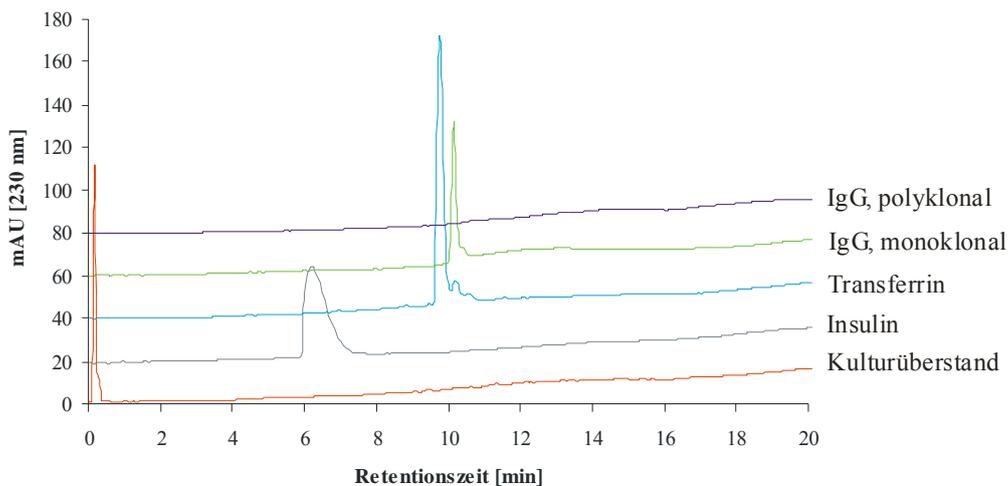


Abbildung 4.3.2: Wechselwirkung verschiedener Proteine mit der *reversed-phase*-Säule. Säule: ZORBAX SB300-C8; Proteine: Insulin/ Transferrin (1 mg/ml), monoklonaler IgG (murin, 0,5 mg/ml), polyklonaler IgG (human, 0,5 mg/ml); Kulturüberstand: SFM-Medium; Temp. 70 °C; Flussrate: 2 ml/min; Injektionsvolumen: 10 µl; Solvent A: ddH₂O + 0,1 % (v/v) TFA; Solvent B: 90 % ACN + 0,09 % (v/v) TFA. Gradient: A von 80 % auf 40 % in 20 min.

Das Ergebnis zeigte ein unterschiedliches Elutionsverhalten von Transferrin und Insulin. Während der Transferrinpeak eine hohe Peakschärfe aufwies, zeigte der Insulinpeak unter den gewählten Elutionsbedingungen, ein starkes Peaktailing. Dies demonstriert die starke Wechselwirkung der Proteine mit der stationären Phase unter den gegebenen Bedingungen. Im Vergleich zu Insulin erfolgte die Retention des Transferrins deutlich später als die des Insulins. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Trennung der drei Proteine unter den gewählten Bedingungen nicht möglich ist, da die Retentionszeit des Transferrins nahe der des monoklonalen IgGs liegt.

Eine Elution des polyklonalen Antikörpers unter den Elutionsbedingungen war nicht möglich. Es ist kein Elutionspeak zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass die verschiedenen Isotypen des IgGs, aus denen sich der polyklonale Antikörper zusammensetzt, eine sehr starke hydrophobe Wechselwirkung eingehen, sodass auch bei einem Anteil von 80 % ACN keine Elution stattfinden konnte. Neben der unzureichenden Trennung der Proteine Transferrin und IgG zeigen die Ergebnisse, dass die Absorptionsmaxima der Proteine, abhängig von der Peakschärfe, trotz einem für die Analytik gewählten hohen Konzentrationsbereich, in einem sehr niedrigen Absorptionsbereich von 40-100 mAU liegen. Die Proteinkonzentrationen in den Realproben (Insulin ca. 20 µg/ml; Transferrin ca. 20 µg/ml; Maus IgG₁ 5-8 µg/ml) weisen deutlich niedrigere Konzentrationen auf, als für diese Versuche verwendet wurden. Eine Konzentrationsbestimmung der Proteine im Kulturüberstand war nicht möglich, da die Proteinkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze lagen (vgl. Abbildung 4.3.2).

Für eine Detektion der Einzelproteine im Zellkulturüberstand, bei einer Kultivierung bzw. bei einer Aufreinigung, ist die RPC-Methode, unter den genannten Bedingungen, demnach nicht geeignet.

Im Allgemeinen ist der Erfolg einer RPC von zahlreichen Faktoren abhängig, die eine Optimierung der Analysenmethode erschweren. Faktoren, die bei der Wechselwirkung der Proteine mit der hydrophoben stationären Phase Einfluss nehmen, sind z. B. die Polarität des Lösungsmittels, die Art und Konzentration des Ionenpaarungsreagenz, die Temperatur und der pH-Wert. [191, 192] Darüber hinaus spielen die Hydrophobizität des Proteins sowie die Proteinstruktur, die sich unter dem Einfluss verschiedener Faktoren ändern kann, eine entscheidende Rolle. Aufgrund dieser zahlreichen Einflüsse ist die Optimierung dieser Analytik sehr zeitaufwendig. Nachfolgend sollten demnach andere Analyseverfahren für die gestellte Trennaufgabe getestet werden, bei denen die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und stationärer Phase weniger komplex ist.

4.3.2. Größenausschlusschromatographie

Im Vergleich zu den Proteinen Insulin und Transferrin besitzen IgG-Moleküle ein großes Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Transferrin weist ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa auf während Insulin mit einem Molekulargewicht von ca. 6 kDa am kleinsten ist. Vor diesem Hintergrund sollte eine Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich sein. Die Ausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe (Molekulargewicht). Die Trennung basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial (Gelmatrix) bestimmter Porengröße. Kleinere Moleküle dringen ungehindert in die Poren des Trägermaterials ein, während größere Moleküle direkt zusammen mit der Lösemittelfront eluiert werden. Kleine Komponenten haben demnach die längere Aufenthaltsdauer und werden zuletzt eluiert. [26] Da die Trennleistung hauptsächlich über die Beschaffenheit der Gelmatrix bestimmt wird, sind die Faktoren, die die Trennung beeinflussen können, im Vergleich zur RPC gering. [107]

Die hier verwendete Chromatographiesäule ist eine Proteema SEC-Säule der Firma PSS (Mainz) die für die Aufreinigung/Analytik von Proteinen aus wässriger Lösung Anwendung findet. Die stationäre Phase der Säule besteht aus modifiziertem Silica mit einer Partikelgröße von 5 μm und einer Porosität von 300 Å. Entsprechend dieser Eigenschaften liegt der Trennbereich zwischen 1 und 1.200 kDa. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülmassen der drei Modell-Proteine sollte nach Herstellerangaben eine Trennung der Proteine möglich sein.

Um ionische Wechselwirkungen zwischen Analyt und Matrix zu unterdrücken, und um keine hydrophoben Wechselwirkungen zu initiieren, wurde als wässriges Solvent ein 34 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 6,6) mit einer Ionenstärke von 0,3 M NaCl verwendet. Das Auftragsvolumen (100 μl) wurde in Relation zur Säulendimension so gewählt, dass eine gute Auflösung der Trennung erzielt werden konnte. Eine Flussrate von 1 ml/min führte zu einer akzeptablen

Bandenbereite bzw. Peakauflösung. Im Hinblick auf die Viskosität von Zellkulturmedien konnte die Auflösung durch eine Erhöhung der Temperatur auf 30 °C zusätzlich verbessert werden.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Trennleistung der SEC für die einzelnen Proteine, unter den genannten Bedingungen, dargestellt. Abbildung 4.3.3 zeigt die Retentionszeiten der Proteine Insulin und Transferrin (1 mg/ml), der monoklonalen und polyklonalen Antikörper (1 mg/ml; 0,5 mg/ml), sowie einer Realprobe aus Zellkulturüberstand (Insulin ca. 20 µg/ml; Transferrin ca. 20 µg/ml; Maus IgG₁ ca. 5-8 µg/ml).

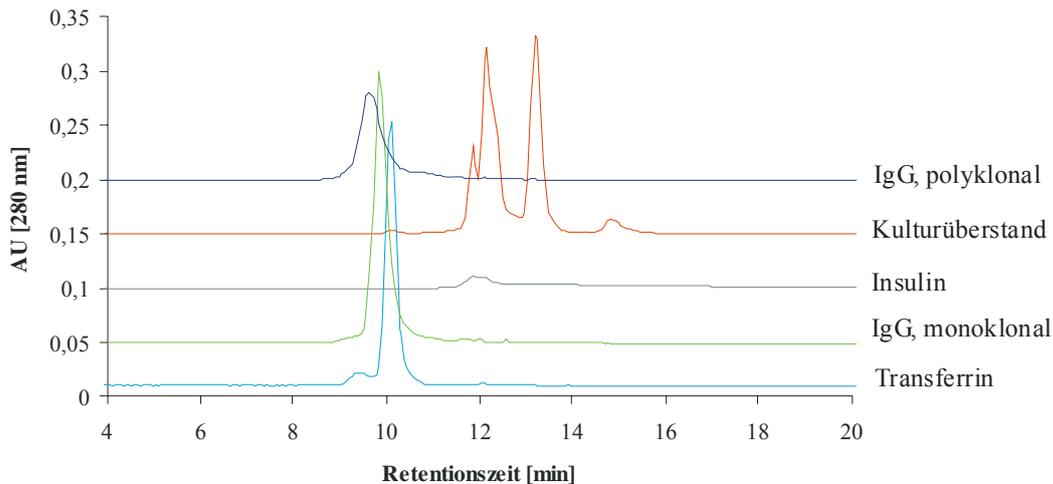


Abbildung 4.3.3: Trennleistung der SEC-Säule für verschiedener Proteine. Säule: PSS Proteema-SEC, 300Å; Proteine: Insulin/ Transferrin (1 mg/ml), monoklonaler IgG (murin, 1 mg/ml), polyklonaler IgG (human, 0,5 mg/ml); Kulturüberstand: SFM-Medium; Temp. 35 °C; Flussrate: 1 ml/min; Injektionsvolumen: 100 µl; Solvent: 34 mM Kaliumphosphat + 0,3 M NaCl, pH 6,6.

Das Kulturmedium enthält unbekannte Bestandteile, die jedoch aufgrund ihres anscheinend geringeren Molekulargewichtes, eine längere Retentionszeit als die anderen Proteine aufweisen. Eine Ausnahme ist das Insulin, das als kleinstes Molekül der drei Modell-Proteine, ebenfalls nach einer Retentionszeit von ca. 12 min eluiert. Als Protein im Kulturmedium würde die Elution jedoch zeitgleich zu unbekanntem Medienbestandteilen erfolgen und demnach überlagert werden. Die niedrige Adsorptionsintensität deutet auf eine schlechte Kompatibilität mit der mobilen Phase hin. Darüber hinaus ist die Trennung des Transferrins vom Antikörper (monoklonal/ polyklonal) unter den gewählten Bedingungen nicht möglich, da die Retentionszeiten, trotz der großen Differenz im Molekulargewicht (70 kD), sehr nah beieinander liegen. Neben der unzureichenden Trennung der Proteine haben die Ergebnisse gezeigt, dass eine Konzentrationsbestimmung der Proteine unter Realbedingungen nicht möglich ist, da die Proteinkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Eine SEC-Analytik ist aufgrund der niedrigen Proteinkonzentrationen und der schlechten

Trennleistung für die simultane Detektion der Proteine im Zellkulturüberstand während einer Kultivierung bzw. einer Aufreinigung demnach nicht geeignet.

4.3.3. *High performance monolithic disk-Chromatographie (HPMDC)*

Eine gute Alternative zur herkömmlichen Säulenchromatographie ist die HPMDC, die in zahlreichen Bereichen der Proteinanalytik und Aufreinigung Anwendung findet (siehe Grundlagen Kapitel 3.3.3). Sie bietet insbesondere den Vorteil kurzer Analysenzeiten. Die in Form von sogenannten CIM[®]Disks (*convective interaction media*) erhältlichen Chromatographiematerialien der Firma BIA Separations (Ljubljana, Slowenien), die mit unterschiedlichen Funktionalitäten zur Verfügung stehen, werden in einem dafür vorgesehenen CIM-Gehäuse platziert und können so an die HPLC-Anlage angeschlossen werden. Darüber hinaus ist die Anwendung in einer präparativen HPLC möglich. Auf diese Weise kann das Auftragsvolumen der Probe beliebig hoch gewählt werden. Somit sollte auch die Detektion niedriger Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand möglich sein.

Im Hinblick auf die simultane Detektion verschiedener Medienproteine wurde die sogenannte *conjoint liquid chromatography* (CLC) Methode getestet. Durch die Kombination von Disks unterschiedlicher Funktionalität in einer Vorrichtung vereint diese Methode verschiedene chromatographische Schritte in einem. Die CLC-Methode wurde erstmals von Josic et al. (1998) angewandt. [193] Für die bestehende Trennaufgabe wurde eine Kombination aus Anionenaustausch- und Protein G Affinitätschromatographie gewählt. Angesichts der niedrigen pI-Werte (isoelektrischer Punkt) von Insulin (5,3) und Transferrin (5,4) sollte eine Bindung der Proteine bei einem pH-Wert von ca. 7 (pH-Wert des Kulturmediums) an einen Anionenaustauscher möglich sein. Bei einem pH-Wert oberhalb des pI-Wertes sind die beiden Proteine negativ geladen, sodass eine Bindung an dem positiv geladenen Anionenaustauscher (QA-Disks, quartäres Ammonium) möglich ist. Protein G, ein bakterielles Zellwandprotein, das von Streptokokken produziert wird, bindet an die konstante Fc-Region von vielen Säuger-Immunglobulinen der IgG-Klasse und findet daher Anwendung in der Antikörperanalytik und -aufreinigung. [148, 150, 155]

Die Kombination dieser Funktionalitäten (zwei Disk (Protein G/ QA) in einem Gehäuse) sollte unter optimierten Bedingungen eine zeitgleiche Bindung der Proteine an der jeweiligen Funktionalität gewährleisten. Die Anordnung der Disks wurde so gewählt, dass die Proteine zunächst die Protein G-Disk und im Anschluss die QA-Disk passieren sollten.

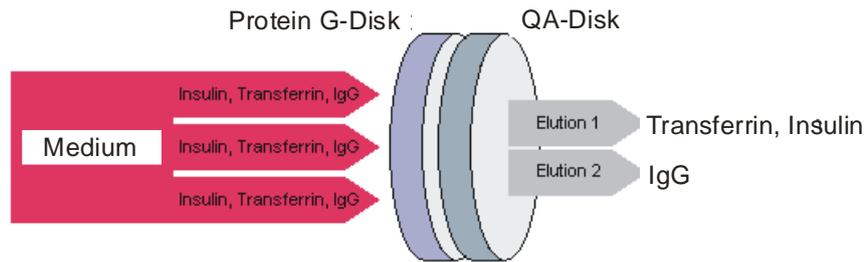


Abbildung 4.3.4: Prinzip der CLC-Methode für die simultane Proteinbestimmung.

Auf diese Weise sollte der Antikörper selektiv an der Protein G-Disk binden, während Insulin und Transferrin eine Wechselwirkung mit der QA-Disk eingehen sollten (vgl. Abbildung 4.3.4). Die abschließende Trennung der Proteine Insulin und Transferrin sollte über eine Änderung der Salzkonzentration und die Elution des Antikörpers im Anschluss über eine Änderung des pH-Wertes erfolgen.

Herstellung der Protein G-Disk

Zunächst erfolgte die Herstellung der Affinitätsdisk. Hiefür wurde Protein G an einer CIM[®]Epoxy-Disk (Bettvolumen: 0,34 ml) immobilisiert (Durchführung siehe Anhang 6.4.11). Aufgrund der hohen Reaktivität der Epoxygruppen auf der Diskoberfläche kann eine direkte Kopplung der Epoxygruppen mit den Aminogruppen des Proteins erfolgen. Anhand einer Konzentrationsbestimmung des Protein G Gehaltes (UV-Messung bei 280 nm) vor und nach der Immobilisierung, konnte gezeigt werden, dass insgesamt 0,27 mg Protein G an der Disk gebunden wurden.

Die fertige Protein G-Disk wurde im Anschluss auf ihre Bindungseigenschaft überprüft. Als Modell-Antikörper wurde der polyklonale IVIg getestet (nachfolgend IgG genannt). Die Protein G-Disk, platziert in dem dafür vorgesehenen Gehäuse, wurde an eine präparative HPLC angeschlossen. Exemplarisch erfolgte die Bestimmung der Bindungskapazität bei einer Flussrate von 4 ml/min mit einer Antikörperkonzentration von 0,5 mg/ml. Nach der Äquilibrierung der Disk mit Bindungspuffer wurde diese bis zum Durchbruch mit der Antikörperlösung beladen. Nach dem Spülen der Membran mit Waschpuffer wurde der gebundene Antikörper mit Elutionspuffer eluiert und fraktioniert aufgefangen. Es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung des Antikörpers in der Elution über eine UV-Messung bei 280 nm. Die Bindungskapazität entspricht der in der Elution detektierten Menge Antikörper pro Disk. Die Bindungskapazität der Protein G-Disk unter den gegebenen Bedingungen betrug ca. 0,7 mg pro Disk.

Durchführung der präparativen HPLC

Um eine erste Einschätzung der Proteinbindung an der jeweiligen Disk zu erhalten, wurden für nachfolgende Versuche zunächst Proteinlösungen in Bindungspuffer hergestellt. Die Beladung der Disks und die Elution der Proteine wurden in allen Versuchen bei Raumtemperatur und einer Flussrate von 4 ml/min durchgeführt, um eine möglichst kurze Analysenzeit zu gewährleisten. Ein Probevolumen von 3 ml wurde injiziert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem UV-Detektor. Darüber hinaus wurde während der Versuche die Änderung der Leitfähigkeit verfolgt. Angaben zu den jeweils verwendeten Bindungs-, Elutions- und Waschpuffern befinden sich im Anhang 6.4.12. Puffer und Proteinlösungen wurden vor der Anwendung filtriert. Zusätzlich wurden die verwendeten Puffer im Ultraschallbad entgast. Nach jedem Versuch erfolgte die Regeneration der Disk nach der Vorschrift von Branovic et al.. [148]

Bindung von Insulin und Transferrin an der QA-Disk

Für die Bindung von Insulin und Transferrin wurde eine CIM[®]QA-Disk (Bettvolumen: 0,34 ml) verwendet. Diese wurde in einem CIM-Gehäuse platziert und an die präparative HPLC angeschlossen. Für die Äquilibrierung der Disk wurde ein Bindungspuffer mit niedriger Salzkonzentration gewählt. Der pH-Wert des Bindungspuffers sollte in einem pH-Bereich liegen, wie er für Zellkulturmedien üblich ist. Für die Äquilibrierung der Disk wurde demnach ein 20 mM Tris-Puffer, pH 7 gewählt. Nach der Äquilibrierung mit Bindungspuffer erfolgte die Bindung von Insulin und Transferrin an der Disk. Es wurden exemplarisch Konzentrationen von 0,2 mg/ml Insulin und Transferrin eingesetzt. Aufgrund der niedrigen pI-Werte der beiden Proteine konnte unter den gewählten Bedingungen (Proteinkonzentration, Salzkonzentration und pH-Wert) eine vollständige Bindung der Proteine erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Die Elution der Proteine wurde mit einem Puffer hoher Salzkonzentration durchgeführt. Hierfür wurde der Bindungspuffer mit 1 M NaCl versetzt. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Proteine eluiert werden konnten, eine Trennung unter den gegebenen Voraussetzungen aber nicht möglich war. Dies ist vermutlich auf die sehr ähnlichen pI-Werte der beiden Proteine zurückzuführen, aufgrund derer die Wechselwirkung mit dem Adsorbentmaterial sehr ähnlich zu sein scheint. Um eine Trennung der Proteine in der Elution zu gewährleisten wurden unterschiedliche Gradienten getestet. Die beste Trennleistung wurde mit einem Stufengradienten erzielt, bei der die Elution des Transferrins zwischen 0 und 0,1 M und die Elution des Insulins zwischen 0,1 M und 1 M NaCl in Bindungspuffer erfolgte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3.5 dargestellt.

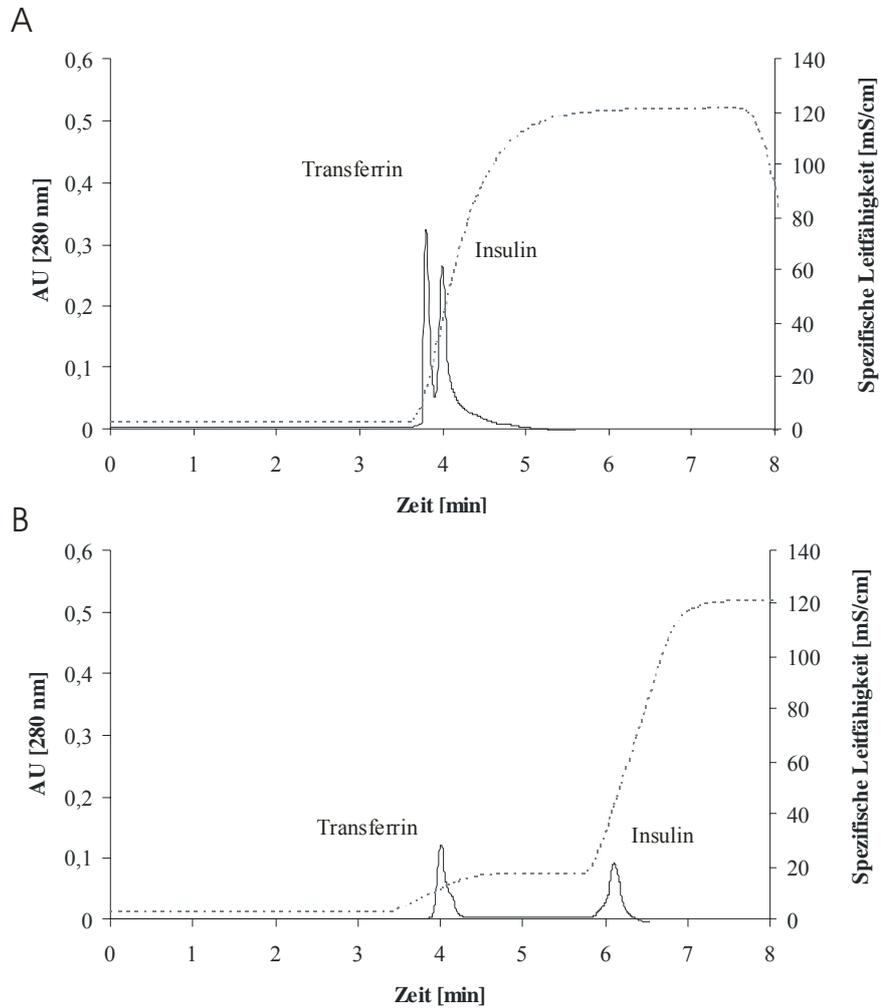


Abbildung 4.3.5: Trennung von Transferrin und Insulin mittels CIM[®]QA-Disk. Injektionsvolumen 3 ml; Konzentration der Proteine 0,2 mg/ml in Bindungspuffer, (A) ohne Gradient (B) mit Gradient; Eluent: A: 20 mM Tris-HCl (pH 7; 2,5 mS/cm), B: 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl (pH 7, 120 mS/cm); Gradient: Eluent B: 0 → 10 % → 100 %.

Trennung von Insulin, Transferrin und IgG in Bindungspuffer

Basierend auf den Ergebnissen der Trennung von Insulin und Transferrin sollte nachfolgend die Trennung von Insulin, Transferrin und IgG anhand der CLC-Methode (vgl. Abbildung 4.3.4) getestet werden. Die „Säule“, bestehend aus einer Protein G-Disk und einer QA-Disk, wurde an die präparative HPLC angeschlossen. Die Äquilibrierung der Disks erfolgte mit demselben Bindungspuffer wie er zuvor für die QA-Disk verwendet wurde. Für die nachfolgende Trennungsaufgabe wurde eine Proteinlösung aus 0,2 mg/ml Insulin, Transferrin und 0,25 mg/ml IgG eingesetzt. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass der Trenneffekt größer ist, wenn die Proteinlösung zunächst die Protein G-Disk und anschließend die QA-Disk durchfließt. Da die Protein G-Disk den Antikörper in dem gewählten Konzentrationsbereich vollständig bindet, ist eine anionische Wechselwirkung mit der QA-Disk auf diese Weise ausgeschlossen.

Die Elution erfolgte über einen Zweistufengradienten. Zunächst wurden Transferrin und Insulin über den zuvor beschriebenen Salzgradienten eluiert (siehe vorheriger Abschnitt). Die Elution des Antikörpers erfolgte im Anschluss über einen pH-*shift* mit Glycin (pH 2). Nach der Elution mit pH 2 wurden die Antikörper enthaltenen Fraktionen mit Neutralisationspuffer auf pH 7 eingestellt, um die Stabilität des Antikörpers aufrecht zu erhalten (eine Zusammenstellung der Versuchsbedingungen der CLC-Methode ist dem Anhang 6.4.12 zu entnehmen).

Um die Reinheit der drei Elutionsfraktionen zu prüfen wurde einer SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse der Proteintrennung mittels CLC-Methode und die Untersuchung der Elutionsfraktionen sind in Abbildung 4.3.6 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Bedingungen eine Trennung der drei Modell-Proteine in hoher Reinheit möglich ist. Die Durchlaufraction (DL) auf dem SDS-Gel weist keine Proteinbanden auf, d.h. die Proteine haben vollständig an der jeweiligen Disk gebunden.

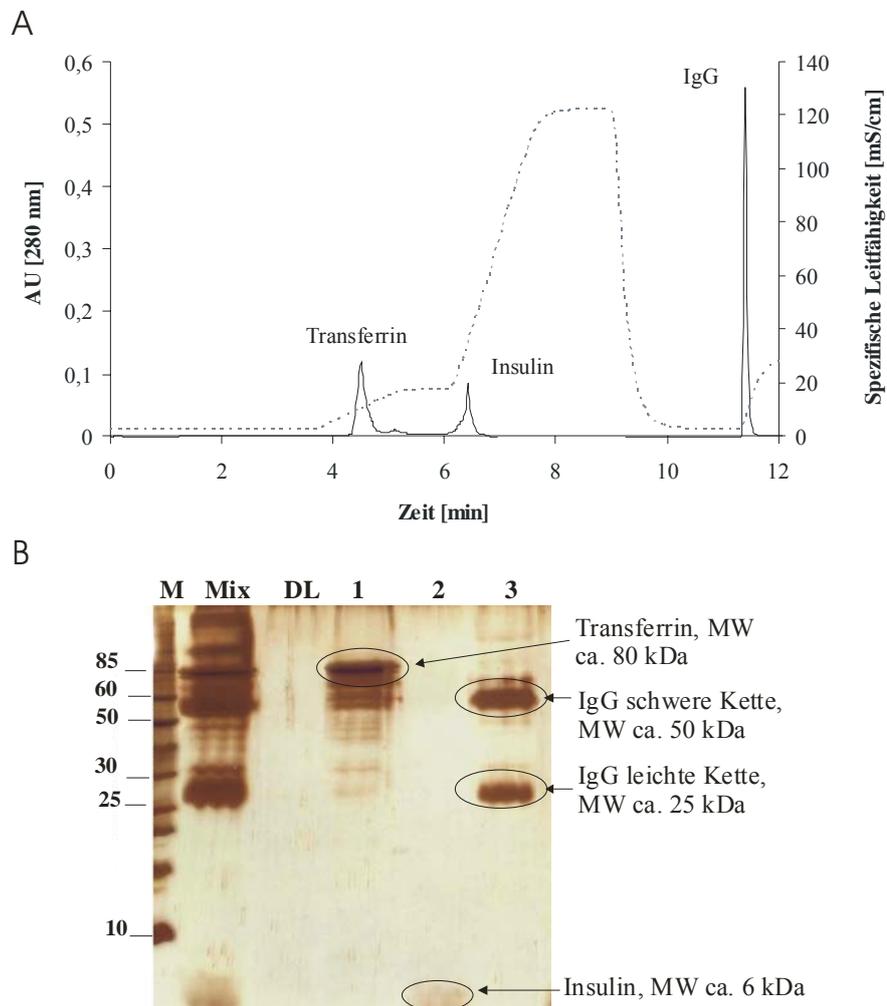


Abbildung 4.3.6: Trennung von Transferrin, Insulin und IgG mittels CLC-Monolith-System bestehend aus Protein G und QA-Disk. (A) Chromatogramm der Proteintrennung. Injektionsvolumen 3 ml; Proteinkonzentration: 0,2 mg/ml Transferrin/Insulin und 0,25 mg/ml IgG in Bindungspuffer. (B) 15 %iges SDS-Gel zur Überprüfung der Reinheit der Elutionsfraktionen (Silberfärbung). M: Proteinmarker; Mix: Proteinausgangslösung; DL: Durchlauf.

Trennung von Insulin, Transferrin und IgG in Zellkulturmedium

Um die Übertragbarkeit der Proteintrennung auf eine reale Zellkulturprobe zu überprüfen, wurde die entwickelte CLC-Methode nachfolgend für die Trennung der drei Proteine aus Zellkulturmedium eingesetzt. Hierfür wurde eine Proteinlösung in Zellkulturmedium (Gibco™ Hybriodma-SFM, Invitrogen, Karlsruhe) mit 0,2 mg/ml Insulin und Transferrin sowie 0,25 mg/ml IgG verwendet. Die Durchführung der CLC-Methode erfolgte unter den gleichen Bedingungen.

Die physiologische Salzkonzentration des Mediums führt zu einer hohen Leitfähigkeit von 12 mS/cm. Da die Elution von Transferrin bereits bei einer Leitfähigkeit von 10 mS/cm stattfindet, konnte unter den gegebenen Bedingungen keine Bindung des Transferrins erfolgen. Insulin, das bei einer höheren Salzkonzentration bzw. Leitfähigkeit eluiert wird, konnte an der QA-Disk gebunden werden. Die von der Salzkonzentration unabhängige affine Wechselwirkung des Antikörpers mit der Protein G-Disk konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um dennoch eine simultane Bindung der Proteine aus Zellkulturmedium zu gewährleisten, musste die Salzkonzentration des Mediums zuvor herabgesetzt werden. Aus diesem Grund wurde die proteinhaltige Zellkulturprobe vor Anwendung der CLC-Methode über eine Dialyse entsalzt. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes des Insulins (ca. 6 kDa) wurde eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgrenze von 1.000 Da verwendet. Nach der Dialyse wurde eine Leitfähigkeit des Kulturmediums von ca. 1,2 mS/cm gemessen.

Nachfolgend wurde die Trennung der Proteine mit Hilfe der CLC-Methode wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese um die Reinheit der Elutionsfraktionen zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3.7 dargestellt. Unter den gegebenen Bedingungen erfolgte eine vollständige Bindung der Proteine. Die Anwendung des Zweistufengradienten ermöglicht die Trennung der Proteine bei der Elution mit hoher Reinheit (vgl. Abbildung 4.3.7 B), sodass eine simultane Detektion der Proteine auch im Kulturmedium erfolgen konnte.

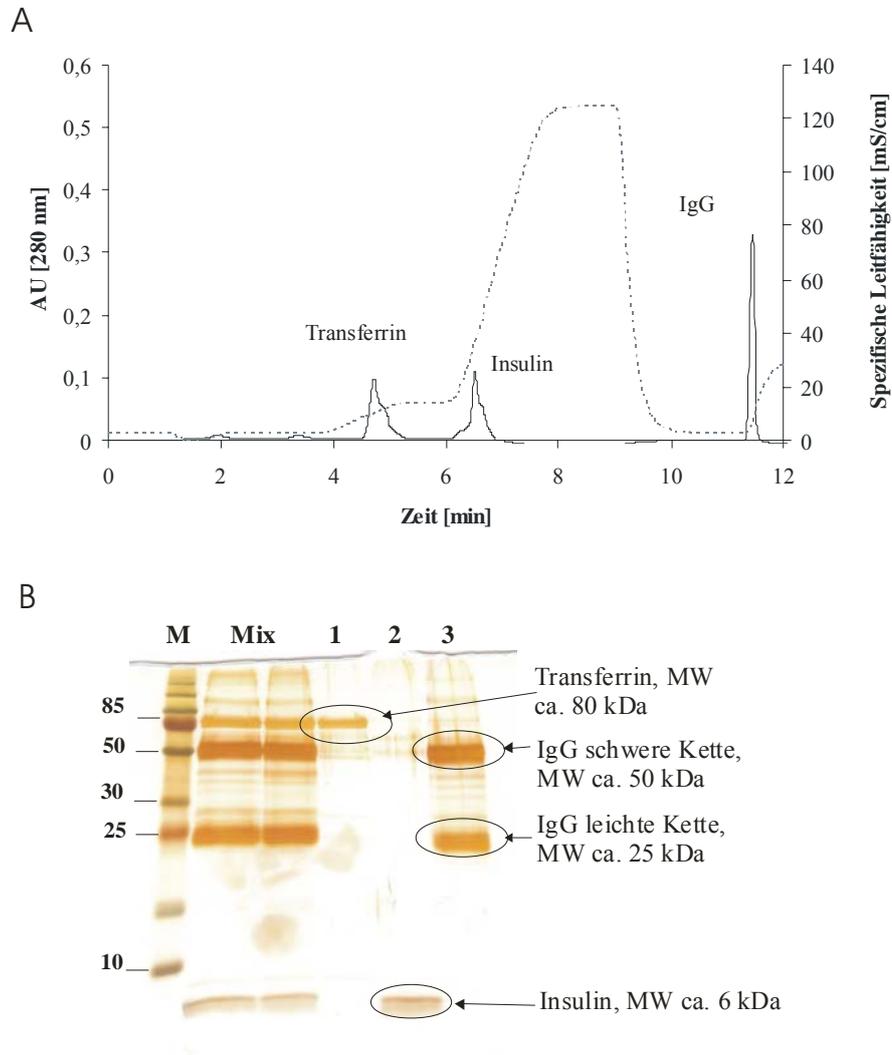


Abbildung 4.3.7: Trennung von Transferrin, Insulin und IgG aus Zellkulturmedium nach der Dialyse mittels CLC-Monolith-System bestehend aus einer Protein G und einer QA-Disk. (A) Chromatogramm der Proteintrennung. Injektionsvolumen 3 ml; Proteinkonzentration 0,2 mg/ml Transferrin/Insulin und 0,25 mg/ml IgG in Kulturmedium. (B) 15 %iges SDS-Gel zur Überprüfung der Reinheit der Elutionsfraktionen (Silberfärbung). M: Proteinmarker; Mix: Proteinausgangslösung.

Im Anschluss an die Versuche wurde eine Kalibrationsgerade für den Antikörper bestimmt. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen des Modell-Antikörpers (0,005-0,5 mg/ml) in Anwesenheit von Insulin und Transferrin gleichbleibender Konzentration (0,1 mg/ml), nach dem Protokoll der entwickelten CLC-Methode (siehe Anhang 6.4.12), vermessen. Die Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus der Auftragung der berechneten Peakfläche gegen die Ausgangskonzentration des Antikörpers ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit einem hohen Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,999$. Aus dem in Abbildung 4.3.8 dargestellten Zusammenhang zwischen berechneter Peakfläche und Ausgangskonzentration des Antikörpers, lässt sich unter den gegebenen Bedingungen, die Konzentration des Antikörpers auch in niedrigen Konzentrationsbereichen von bis zu 0,005 µg/ml bestimmen. Aufgrund des hohen Auftragsvolumen von 3 ml können auch niedrige Proteinkonzentrationen detektiert werden. Eine Konzentrationsbestimmung von Insulin und Transferrin sollte unter diesen Bedingungen ebenfalls möglich sein, sodass die entwickelte CLC-Methode für die simultane, quantitative Bestimmung von Proteinen auch in Zellkulturmedium geeignet ist.

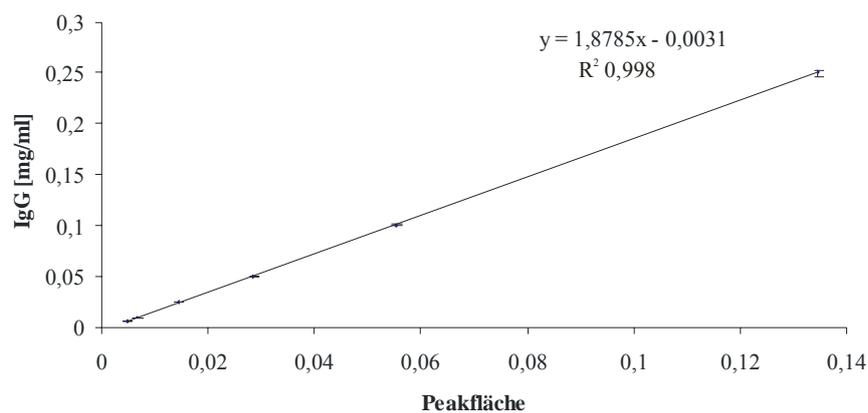


Abbildung 4.3.8: Kalibrationsgerade der Antikörperanalytik mittels CIM[®] Disk CLC-Methode (n=3).

Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden, basierend auf instrumenteller HPLC-Analytik, im Hinblick auf eine mögliche simultane Detektion verschiedener Proteine aus Zellkulturüberständen untersucht. Eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften unter Anwendung einer *reversed-phase*-Chromatographie war unter den gewählten Bedingungen nicht möglich. Ebenso stellte sich die Trennung der Proteine über eine Größenausschlusschromatographie trotz ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes als schwierig dar. Mit beiden Methoden wurde eine nur unzureichende Trennung der Proteine erzielt. Zudem

lagen die in der Realprobe (Kulturüberstand der Hybridom-Kultivierung) enthaltenen Proteinkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze. Im Hinblick auf eine simultane Detektion der Proteine im Kulturüberstand, während eines Kultivierungsprozesses, sind diese Methoden demnach nicht geeignet.

Es konnte jedoch eine CLC-Methode entwickelt werden, deren Trennleistung auf der Verwendung von monolithischen Disks unterschiedlicher Funktionalitäten basiert. Unter Verwendung einer Protein G-Disk zur selektiven Bindung des Antikörpers und einer Anionenaustauscher-Disk (QA-Disk) für die Bindung von Insulin und Transferrin innerhalb einer „Säulen-Konstruktion“ konnte eine selektive Bindung der Proteine erzielt werden. Nach einer zuvor durchgeführten Dialyse des Kulturüberstandes konnte auch aus dem Kulturmedium eine Trennung der Proteine und folglich eine simultane Detektion erfolgen. Durch die Flexibilität des Injektionsvolumens an der präparativen HPLC konnte am Beispiel des Antikörpers gezeigt werden, dass eine quantitative Konzentrationsbestimmung auch für geringe Proteinkonzentrationen im $\mu\text{g/ml}$ Bereich möglich ist. Angesichts der Ergebnisse ist das entwickelte CLC-System, basierend auf der Anwendung monolithischer Disks, für eine simultane Detektion der Proteine in Kulturüberstand einsetzbar. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Salzkonzentration des Mediums die Proteinbindung an der QA-Disk unterbinden kann. Abhängig vom Bindungsverhalten des Proteins kann demnach im Vorfeld der Analyse eine Entsalzung der Probelösung notwendig sein.

Für die Anwendung der CLC-Methode für die schnelle Analytik von Proteinen sollte in weiteren Versuchen eine Optimierung hinsichtlich der Analysenzeit erfolgen. Aufgrund der flexiblen Kombination verschiedener Funktionalitäten könnte das System auch für andere Fragestellungen Anwendung finden. Darüber hinaus ist im Hinblick auf eine mögliche Sensor-Prozess-Kopplung, für die Online-Überwachung von Kultivierungsprozessen eine Kombination mit einer Fließinjektionsanalyse (FIA) denkbar. [194, 195]

4.4. Evaluierung der Aufreinigung von Antikörpern aus zellhaltigen Kulturmedien mittels neuartiger Membranadsorbertechnologie

Für die nachfolgenden Versuche wurde die an serumfreie Kultivierungsbedingungen adaptierte Hybridom-Zelllinie IV 19.23 verwendet (vgl. Abschnitt 4.1.). Im Hinblick auf die angestrebte Evaluierung eines neuartigen Membranadsorber-Moduls für die Aufreinigung von Antikörpern ist die Konzentration des von den Hybridom-Zellen produzierten Maus IgG₁ zu gering (vgl. Kapitel 4.1.2). Um die Versuche bei möglichst hoher Antikörperkonzentration durchzuführen, wurde für die Versuche der polyklonale, humane Antikörper IVIg als Modell-Antikörper verwendet. Die geringe Menge des Maus IgG₁ im Kulturüberstand der Hybridom-Zelllinie (ca. 5-8 µg/ml) wurde bei der Konzentrationsbestimmung vernachlässigt.

Im Hinblick auf die Anwendung des neuartigen Membranadsorber-Moduls für die Aufreinigung aus zellhaltigem Kulturmedium musste zunächst eine geeignete Membranfunktionalität gefunden werden. Die Ergebnisse des Membran-*screenings* sind im folgenden Abschnitt zusammenfassend dargestellt. Im Rahmen der Mitbetreuung einer Diplomarbeit wurden mit der geeigneten Membran statische Versuche bzgl. der Bindungseigenschaften des Modell-Antikörpers aus zellfreier Lösung durchgeführt. [196] Unter dem Einsatz der neuartigen Membranadsorber-Module wurden der Einfluss des Mediums und der Zellen bei der Aufreinigung des Antikörpers untersucht. Darüber hinaus wurde die Partikelgängigkeit der Module analysiert.

Analytik für die Aufreinigung

Für die Analytik des Antikörpers (IVIg) im Kulturüberstand sollte eine der in Abschnitt 4.3 genannten Methoden Anwendung finden. Für die Versuche sollten Konzentrationen größer 0,25 mg/ml eingesetzt werden. Gegenüber der für die Versuche verwendeten hohen Konzentrationen des IVIgs sind die Konzentrationen von Insulin, Transferrin und des von den Zellen produzierten Maus IgG₁ im Zellkulturüberstand gering, sodass eine Konzentrationsbestimmung der Einzelproteine für die nachfolgende Aufreinigung vernachlässigt wurde. Unter dieser Voraussetzung sollte die Analytik des IVIgs mittels der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen SEC-Methode erfolgen.

Nachfolgend wurde unter den in Abschnitt 4.3.2 genannten Bedingungen für die SEC-Analytik eine Kalibrationsgerade für verschiedene IVIg-Konzentrationen im Kulturmedium (SFM-Medium), bestimmt. Die Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Abbildung 4.4.1 A zeigt das Chromatogramm der Trennung des Antikörpers verschiedener Konzentrationen vom Zellkulturmedium. Aus der Auftragung der berechneten Peakflächen gegen die Ausgangs-

konzentration des Antikörpers ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,999$ (vgl. Abbildung 4.4.1 B).

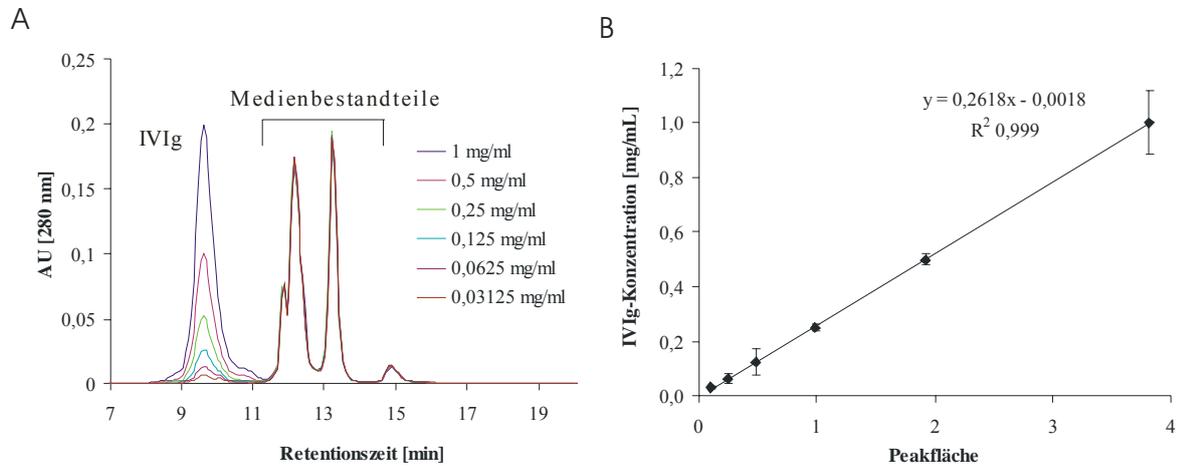


Abbildung 4.4.1: SEC-Analytik des Modell-Antikörpers IVIg in Kulturmedium. (A) Chromatogramm der Analytik in Zellkulturmedium (SFM-Medium) für verschiedene IVIg-Konzentrationen. Säule: PSS Proteema-SEC; (B) Kalibrationsgerade der IVIg-Analytik in Kulturmedium ($n=3$).

Membran-screening

Bei der Suche nach einer Membranfunktionalität, die für eine direkte Aufreinigung des Modell-Antikörpers aus Kulturmedium (pH-Wert ca. 7,2) geeignet ist, wurden unterschiedliche Membranen (Membranen für Ionenaustausch-, Affinitätschromatographie) hinsichtlich ihres Bindungsverhalten gegenüber dem Antikörper in Zellkulturmedium untersucht. Für die Versuche wurden Vivapure mini Q und S sowie Vivapure miniprep Protein A Zentrifugeneinheiten der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen) verwendet (Vorgehensweise siehe Anhang 6.4.14).

Mit den Ionenaustauschern hat keine Antikörperbindung stattgefunden (Daten nicht gezeigt). In der Literatur ist beschrieben, dass die meisten IgG-Monomere einen pI-Wert von 7-8 aufweisen. [197] In pH-Bereichen nahe des pI-Wertes ist die Wechselwirkung mit einem Ionenaustauscher schwach. Darüber hinaus erfolgt die Wechselwirkung von Proteinen mit den Ionenaustauscherguppen bei niedrigen Salzkonzentrationen bzw. niedriger spezifischer Leitfähigkeit. Die spezifische Leitfähigkeit des 25 mM Bindungspuffers liegt bei größer 3 mS/cm, die des Kulturmediums liegt mit 12 mS/cm deutlich darüber. Dies lässt vermuten, dass die hohe Leitfähigkeit des Mediums sowie der pI-Wert des Modell-Antikörpers Gründe dafür sind, dass eine Isolierung aus Kulturmedium mit einem pH-Wert von 7 nicht möglich war. Über die Wechselwirkung mit den Protein A Liganden war eine selektive Bindung möglich. Aus diesem Grund wurden für nachfolgende Versuche ausschließlich Membranen dieser Funktionalität verwendet.

4.4.1. Bindungsverhalten aus zellfreier Lösung

Um die Bindungseigenschaften des Antikörpers an der Protein A Membran genauer zu untersuchen, wurden Adsorptionsisothermen unter statischen Bedingungen mit der reinen Protein A Membran aufgenommen. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen einer IVIg-Lösung in Bindungspuffer angesetzt. Anhand der ermittelten Isotherme wurde die maximale statische Bindungskapazität sowie die Dissoziationskonstante bestimmt, die das Maß für die Affinität des Antikörpers zur Protein A Membran darstellt. Darüber hinaus wurde die zeitabhängige Adsorption des Antikörpers an der Membran untersucht.

Bestimmung der Adsorptionsisotherme

Die Protein A Membran wurden mit einem Locheisen (Innendurchmesser: 20 mm) ausgestanzt. Die Membranstanzlinge der Fläche $3,14 \text{ cm}^2$ wurden in 6-Lochplatten überführt und für 2 min mit Bindungspuffer äquilibriert. Nach der Äquilibration wurden die Stanzlinge in neue 6-Lochplatten überführt und mit je 3 ml einer IVIg-Lösung ansteigender Konzentration überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Laborschüttler bei 400 min^{-1} . Die Versuche wurden für jede Konzentration in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die verbleibende Antikörperkonzentration in den Überständen wurde mittels UV-Messung bei 280 nm bestimmt.

Die an der Membran gebundene Antikörpermenge ergibt sich aus der Differenz der IVIg-Konzentration im Überstand vor und nach der Inkubation pro cm^2 Membranfläche. Durch die Auftragung der adsorbierten Menge IVIg pro cm^2 gegen die dazugehörige IVIg-Gleichgewichtskonzentration im Überstand wird eine Adsorptionsisotherme erhalten. [196]

Die Ergebnisse zeigten starke Schwankungen in den Konzentrationsverläufen der adsorbierten Antikörpermenge für die jeweilige Ausgangskonzentration. Darüber hinaus wurde keine einheitliche Membransättigung beobachtet. Der mittlere Fehler der Antikörperadsorption über den gesamten Konzentrationsbereich lag bei 14 %. Im Rahmen der Diplomarbeit von Andrea Mönster stellte sich in weiterführenden Versuchen heraus, dass die Protein A Membran Inhomogenitäten in der Ligandendichte aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass diese Inhomogenitäten ausschlaggebend für den großen Fehler und die starken Schwankungen in den Konzentrationsverläufen waren.

Um die Membranhomogenitäten auszugleichen wurden in darauf folgenden Versuchen statt einem drei Membranstanzlinge pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ($9,42 \text{ cm}^2$ Membranfläche) verwendet und die oben beschriebene Durchführung in einer Dreifachbestimmung wiederholt. Das Gesamtvolumen der Antikörperlösung pro Vertiefung sowie das Verhältnis von angebotener Antikörpermenge zur Membranfläche entspricht den Angaben der ersten Versuchreihe. Die Konzentration der jeweiligen Antikörperlösung für die Beladung der Membran und das daraus resultierende Masse-Fläche-Verhältnis von Antikörper zu Membran sind in Tabelle 4.4.1

dargestellt. Durch die Auftragung der adsorbierten Menge IVIg pro cm^2 gegen die dazugehörige IVIg-Gleichgewichtskonzentration im Überstand wird die in Abbildung 4.4.2 gezeigte Adsorptionsisotherme erhalten.

Tabelle 4.4.1: Vorschrift für die Antikörperbeladung der Protein A Membran für die Aufnahme der Adsorptionsisotherme. [196]

IVIg Konzentration [mg/ml]	Angebotene Menge IVIg insgesamt [mg]	Masse-Fläche-Verhältnis IVIg [mg/cm^2]
2,0	6,0	0,637
1,5	4,5	0,478
1,0	3,0	0,318
0,75	2,25	0,239
0,5	1,5	0,159
0,3	0,9	0,096
0,2	0,6	0,064
0,1	0,3	0,032

Der mittlere Fehler der Antikörperadsorption über den gesamten Konzentrationsbereich wurde durch den Ausgleich der Inhomogenität der Membran auf 4 % reduziert. Eine Membransättigung von $0,184 \text{ mg}/\text{cm}^2$ wurde annähernd bei einem angebotenen Masse-Fläche-Verhältnis von $0,318 \text{ mg}/\text{cm}^2$ erreicht.

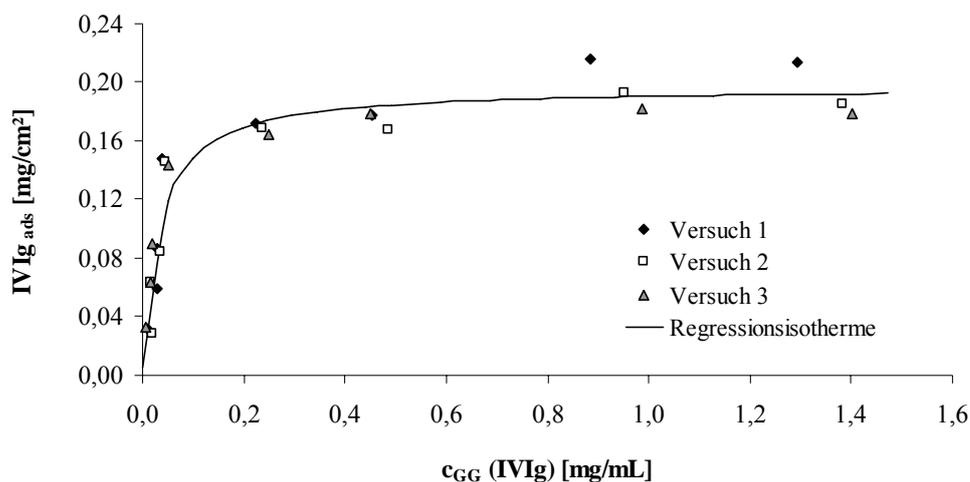


Abbildung 4.4.2: Bindungsverhalten des Antikörpers an der Protein A Membran. Adsorptionsisotherme nach Langmuir. [196]

Ausgehend von der Funktion einer Langmuir-Isotherme lässt sich anhand der ermittelten Daten eine Regressionsisotherme berechnen, die den Verlauf nach Langmuir widerspiegelt (siehe Abbildung 4.4.2). Auf Grundlage dieser lassen sich die maximale statische Bindungskapazität Q_{\max} der Protein A Membran sowie die Dissoziationskonstante K_{Diss} , nach der im Anhang 6.5.2 beschriebenen Vorgehensweise, berechnen.

Die maximale statische Bindungskapazität der Protein A Membran beträgt demnach $0,192 \text{ mg/cm}^2$. Die Dissoziationskonstante des Protein A-Antikörper-Komplexes beträgt $2,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ und liegt in einem Bereich der für starke Affinitätswechselwirkung in der Literatur beschrieben ist (10^{-5} - 10^{-7} mol/l). [26]

Antikörperadsorption als Funktion der Zeit

Wie die Ergebnisse im vorherigen Abschnitt gezeigt haben, wurde bei einem angebotenen Masse-Fläche-Verhältnis von $0,637 \text{ mg/cm}^2$ die maximale Bindungskapazität innerhalb 24 h erreicht. Demzufolge wurden die Versuche zur Bestimmung der zeitabhängigen Adsorption des Antikörpers bei diesem Masse-Fläche-Verhältnis durchgeführt. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Inkubation der Membranstanzlinge in der Antikörperlösung erfolgte für 24 h auf einem Laborschüttler bei 400 min^{-1} . Die Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Zu Beginn der Inkubationszeit erfolgte die Probenahme ($10 \mu\text{l}$) aus der Reaktionslösung in kurzen Zeitabständen. Eine letzte Probe wurde nach 24 h Inkubationszeit entnommen. Die Antikörperkonzentration in den Proben wurde über eine UV-Messung bei 280 nm bestimmt (siehe Anhang 6.4.15).

Die Proteinstabilität ist oftmals abhängig von der Umgebungstemperatur. Frisch angesetzte proteinhaltige Lösungen werden in der Regel bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um die biologische Aktivität des Proteins aufrechtzuerhalten. Um den Einfluss der Temperatur auf die Antikörperadsorption zu untersuchen, wurde die Geschwindigkeit der Antikörperbindung an der Membran sowohl bei RT als auch bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt. Die gebundene Antikörpermenge pro Membranfläche wurde zum jeweiligen Zeitpunkt der Probenahme bestimmt. Abbildung 4.4.3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Antikörperadsorption bei RT und $4 \text{ }^\circ\text{C}$. In Tabelle 4.4.2 sind die Ergebnisse der Adsorption als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung nach 20 min, 2 h und 24 h dargestellt.

Die Verläufe der Antikörperadsorption an der Protein A Membran sind unabhängig von der gewählten Temperatur annähernd identisch. In beiden Fällen wurde nach zweistündiger Inkubationszeit die maximale Bindungskapazität von $0,182 \pm 0,021 \text{ mg/cm}^2$ erreicht. Im Hinblick auf einen möglichst produktschonenden Aufreinigungsprozess konnte gezeigt werden, dass eine niedrigere Temperatur keinen negativen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Adsorption des Antikörpers ausübt. Um einem möglichen Stabilitätsverlust der Antikörperlösung während der Aufreinigung vorzubeugen kann diese ohne zeitlichen Verlust bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt werden.

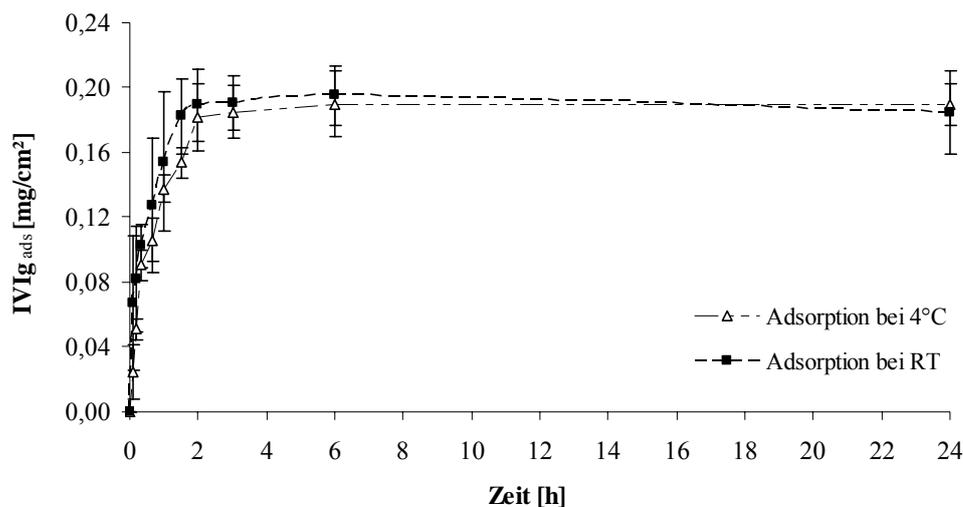


Abbildung 4.4.3: Antikörperadsorption an der Protein A Membran als Funktion der Zeit bei 4 °C und RT. [196]

Tabelle 4.4.2: Beladung der Protein A Membran nach 20 min, 2 h und 24 h bei RT und 4 °C.

Temperatur	Beladung [mg/cm ²] nach		
	20 min	2 h	24 h
RT	0,102 ± 0,013	0,183 ± 0,022	0,185 ± 0,025
4°C	0,091 ± 0,009	0,182 ± 0,020	0,189 ± 0,012

Fazit

Die Untersuchungen der Bindungseigenschaften des Antikörpers aus zellfreier Lösung an einer Protein A Membran zeigten, dass diese Membran für eine Produktisolierung geeignet ist. Die nach Langmuir ermittelte Dissoziationskonstante demonstriert das hohe Maß an affiner Wechselwirkung des Antikörpers mit den Protein A Liganden der Membran ($K_{\text{Diss}} 2,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$). Die hohe maximale statische Bindungskapazität bestätigt den Einsatz dieser Membran für die nachfolgende Anwendung in den neuartigen Membranadsorber-Modulen zur direkten Aufreinigung des Antikörpers. Um die Stabilität des Antikörpers während der Aufreinigung sicherzustellen, könnte diese anstatt bei Raumtemperatur ebenso auch bei 4 °C ohne Zeitverlust durchgeführt werden.

4.4.2. Sartobind® Direct

Aufreinigungsprozesse beginnen in der Regel mit Schritten zur Abtrennung von Zellen, Zelltrümmern sowie Partikeln geringer Größe wie z. B. Aggregaten, die sich in der Kulturbrühe befinden. Hierfür werden hauptsächlich Zentrifugationseinheiten und Tiefenfiltrations- oder

Mikrofiltrationsverfahren eingesetzt. Diese Schritte gehen einer chromatographischen Reinigung voraus, um die verwendeten Chromatographiemedien zu schonen. Mit dem Ziel der direkten Produktisolierung aus partikelhaltigen Lösungen wurde in den 90er Jahren das Verfahren der Fließbettadsorption (engl. *expanded bed adsorption*) entwickelt. Aufgrund der in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Nachteile, der hohen Kosten und der Komplexität der Verfahren im Produktionsmaßstab findet diese Methode nur begrenzt Anwendung. Die Nachteile dieses Verfahren sollen durch den Einsatz von Membranadsorbern unter Verwendung eines neuartigen Moduldesigns überwunden werden. Abbildung 4.4.4 verdeutlicht die Idee, die hinter dem Einsatz der Sartobind[®] Direct Einheit, die von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen) entwickelt wurde, steht. Das Ziel des Verfahrens ist die Kombination der Partikelabtrennung und Reinigung, Produktisolierung und Aufkonzentrierung in einem Prozessschritt.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche (speziell mit Sartobind[®] Direct 25 ml Einheiten) wurden in Zusammenarbeit mit André Pastor durchgeführt. [198]



Abbildung 4.4.4: Prozessschema Sartobind[®] Direct: (A) herkömmliche Technologie, (B) Einsatz neuer Technologie.

Aufbau und Prinzip

Der Prototyp der Sartobind[®] Direct Einheit ist in Form eines Wickelmoduls aufgebaut. Zwischen den Membranlagen befindet sich ein Abstandhalter (im Folgenden Spacer genannt). Membran und Spacer sind um einen Kern im Innern des Moduls gewickelt. Der Spacer ermöglicht die Partikelgängigkeit und ein rückdruckfreies Arbeiten. Zusätzlich soll er den Stofftransfer zwischen Medium und Membran unterstützen. Darüber hinaus verfügen die Wickelmodule über eine Verteilerplatte am Eingang des Moduls, die für eine homogene Verteilung über die Anströmfläche sorgt. In Abbildung 4.4.5 ist der Aufbau und das Prinzip der Sartobind[®] Direct Einheit dargestellt. Das partikelhaltige Medium wird tangential über die adsorptive Membran gefördert. Das Zielprotein adsorbiert an der Membran, während Verunreinigungen und Partikel wie Zellen, Zelltrümmer, und Aggregate die Membran ungehindert passieren. Ebenso wie die Fließbettadsorption wird das Modul von unten angeströmt.

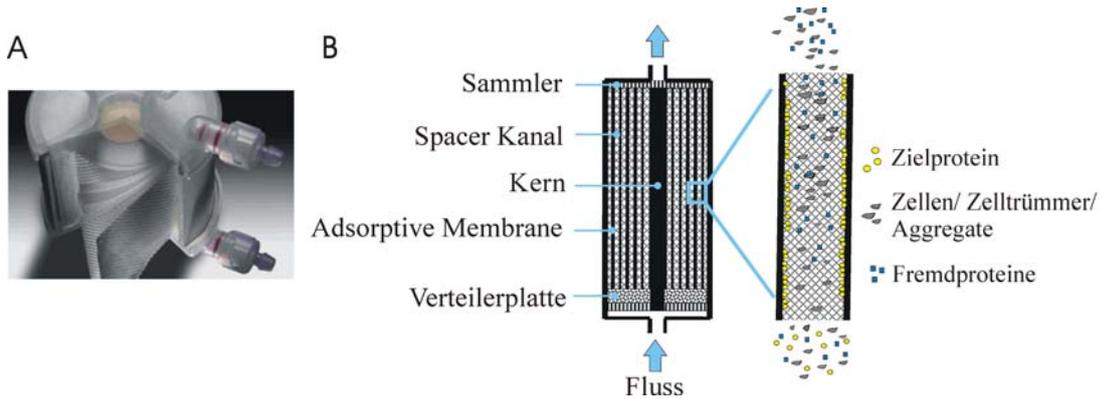


Abbildung 4.4.5: Sartobind® Direct Einheit (A). Aufbau und Prinzip (B).

Betriebweise

Um die Partikelgängigkeit zu gewährleisten, wird die Membran in den Modulen überströmt statt zwangsdurchströmt. Aus diesem Grund dominiert der diffusive Stofftransport gegenüber dem konvektiven. Für eine Abreicherung des Proteins im *single-pass*-Betrieb (einmaliges Überströmen der Membran) ist die Kontaktzeit zwischen Proteinlösung und Membran zu gering. Es resultiert ein Durchbruch nach relativ kurzer Zeit. Eine Proteinabreicherung im Rezirkulations-Betrieb ist an dieser Stelle ratsam. Im Rezirkulations-Betrieb wird das Fluid solange durch die Einheit im Kreis gepumpt, bis das Zielmolekül im gewünschten Maße an der Membran adsorbiert ist.

Spacer

Um eine gute Wechselwirkung und damit eine schnelle Proteinabreicherung im Rezirkulations-Betrieb zu gewährleisten, muss der Abstand zwischen den Membranwicklungen möglichst gering sein. Auf diese Weise werden die in Lösung vorliegenden Proteine in ausreichend geringem Abstand an der Membran vorbei geleitet, sodass eine schnelle Wechselwirkung stattfinden kann. Der Abstand zwischen der Membranwicklung wird von der Dicke des Spacer bestimmt. Je dünner der Spacer, desto schneller sollte die Proteinabreicherung im Rezirkulations-Betrieb verlaufen. Ergebnisse im Rahmen der Dissertation von André Pastor bzgl. der Wahl des Spacers haben diese Vermutung bestätigt. Die Dicke des Spacers sollte demnach so gewählt werden, dass er eine schnelle Proteinabreicherung bei gleichzeitig guter Partikelgängigkeit gewährleistet. [198]

Neben der Spacerdicke ist die Struktur des Spacers von Bedeutung. Beide Aspekte haben Einfluss auf die Partikelgängigkeit des Moduls und können sich auf die Proteinwechselwirkung mit der Membran auswirken. Der Spacer sollte so konstruiert sein, dass partikelhaltige Lösungen das Modul ungehindert passieren d.h., dass die Partikel in der Einheit nicht zurückgehalten oder durch im Innern des Moduls auftretende Scherkräfte zerstört werden. Darüber hinaus sollte die

Auflagefläche des Spacers möglichst gering sein, um die aktive Membranoberfläche für die Proteinbindung nicht zu reduzieren.

Im Rahmen der Dissertation von André Pastor wurden verschiedene Spacer bzgl. Proteinabreicherung aus reiner Lösung untersucht. [198] Die besten Ergebnisse wurden mit einem Spacer aus Polypropylen in Form einer netzartigen, unsymmetrischen Diamantstruktur erzielt (siehe Abbildung 4.4.6). Der Fluidstrom zwischen Membran und Spacer ist in Abbildung 4.4.6. B dargestellt. Das Fluid wird durch die Formgebung des Spacers direkt an Ober- und Unterseite der Membranfläche vorbei geleitet. Die Dicke des Spacers hat dabei einen Einfluss auf die Proteinabreicherung. Die Proteinabreicherung erfolgt umso schneller je geringer die Spacerdicke ist. Ein Spacerdicke von 0,24 mm hat sich als sinnvoll erwiesen, um eine schnelle Proteinabreicherung bei gleichzeitig guter Partikelgängigkeit sicherzustellen.

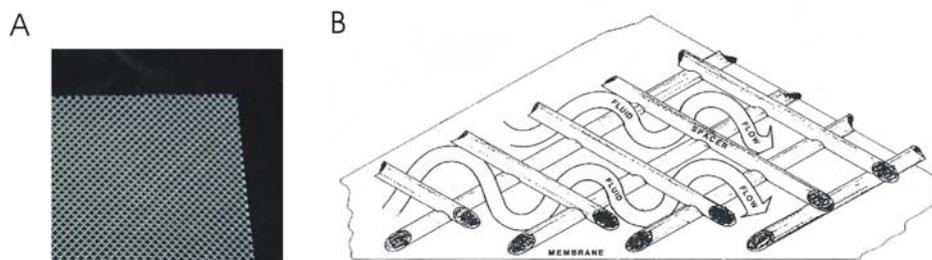


Abbildung 4.4.6: Spacerstruktur (A) und Strömungsverlauf der partikelhaltigen Lösung zwischen Membran und Spacer (B).

Up-scale

Wie bei herkömmlichen Membranadsorber-Modulen ist auch bei diesem Moduldesign ein einfaches *up-scale* möglich. Das Kriterium für ein *up-scale* ist die gleichbleibende Verweilzeit, also eine konstante Umwälzleistung min^{-1} bei variablem Volumenstrom. Auf diese Weise wurde für unterschiedlich große Module ein einheitliches Abreicherungsprofil erzielt. [198]

Die Module sind für den Labor- und Technikumsmaßstab (Sartobind[®] Direct 350 ml-2,5 ml) mit Ionenaustauschermembranen oder Protein A Funktionalität erhältlich. Protein G wird aus Kostengründen nicht angeboten.

4.4.3. Bindungsverhalten aus zellhaltiger Lösung

Um den Einfluss des Mediums und der Zellen auf die Antikörperadsorption zu testen, wurde in Anlehnung an die Versuche in Abschnitt 4.4.1 die statische Bindungskapazität aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium bestimmt. Im Anschluss wurden Sartobind[®] Direct 2,5 ml Module mit Protein A Funktionalität (nachfolgend Sartobind[®] Direct genannt) in einer Versuchs-

apparatur (vgl. Abbildung 4.4.8) unter dynamische Bedingungen auf Bindungs- und Elutionsverhalten des Antikörpers unter dem Einfluss von Medium und zellhaltigem Medium untersucht. In allen Versuchen wurde die gleiche Charge der Protein A Membran verwendet wie in den zuvor durchgeführten Versuchen.

Um den Einfluss der Zellen auf die Antikörperadsorption zu untersuchen, wurden alle nachfolgenden Versuche aus zellhaltigem Medium mit einer Anzahl an Zellen von ungefähr 1/3 über der maximal möglichen Belegungsdichte durchgeführt. Unter der Annahme, dass eine Zelle bei einem Durchmesser von ungefähr 20 μm eine Fläche von 314 μm^2 einnimmt, kann in Bezug auf die angebotene Membranfläche die maximale Belegungsdichte der Membran mit Zellen bestimmt werden. Angaben für die Berechnung der maximalen Belegungsdichte pro cm^2 Membran finden sich im Anhang 6.5.3.

Statische Versuche

Für die Bestimmung der Bindungseigenschaften des Antikörpers wurden wie unter Abschnitt 4.4.1 je 3 Membranstanzlinge in einer 6-Lochplatte vorgelegt, äquilibriert und für 6 h bei RT in 3 ml einer IVIg-Lösung aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigen Medium inkubiert. Um in den Bereich der maximalen Bindungskapazität zu gelangen, wurden die Versuche bei einem Masse-Fläche-Verhältnis von IVIg zu Membranfläche von 0,637 mg/cm^2 durchgeführt (vgl. Abbildung 4.4.2). Die Zellzahl im zellhaltigen Medium betrug $1,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Die jeweiligen Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung ausgeführt. Die Messung der Antikörperkonzentration erfolgte zu Beginn und nach 6 h Inkubationszeit. Nach dieser Zeit sollte der Gleichgewichtszustand der Adsorption erreicht sein (vgl. Abbildung 4.4.3). Die Konzentration in den drei Reaktionslösungen wurde nicht wie in Abschnitt 4.4.1 über eine UV-Messung, sondern über die etablierte SEC-Analytik durchgeführt. Dies sollte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb dieses Versuches gewährleisten. Die Ergebnisse der statischen Bindungskapazität aus Abschnitt 4.4.1 können daher nur annähernd mit den hier ermittelten Daten verglichen werden.

In Abbildung 4.4.7 sind die Ergebnisse der statischen Bindungskapazität aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dargestellt. Ungefähr 200 mg/cm^2 Antikörper haben an der Protein A Membran innerhalb von 6 h gebunden. Dieser Wert liegt in einem vergleichbaren Bereich wie er für die statische Bindungskapazität zuvor bestimmt wurde. Unter dem Einfluss von Medium und Zellen wurde eine um 10 bis 20 % niedrigere Bindungskapazität erhalten. Nicht auszuschließen ist, dass unbekannte Medienbestandteile eine unspezifische Wechselwirkung mit der Protein A Membran eingehen, die die Adsorption des Antikörpers an der Membran beeinträchtigen. In der Literatur ist beschrieben, dass neben Antikörpern auch unspezifische Wechselwirkung mit Medienbestandteilen auftreten können, die möglicherweise die Antikörperbindung beeinträchtigen. [107]

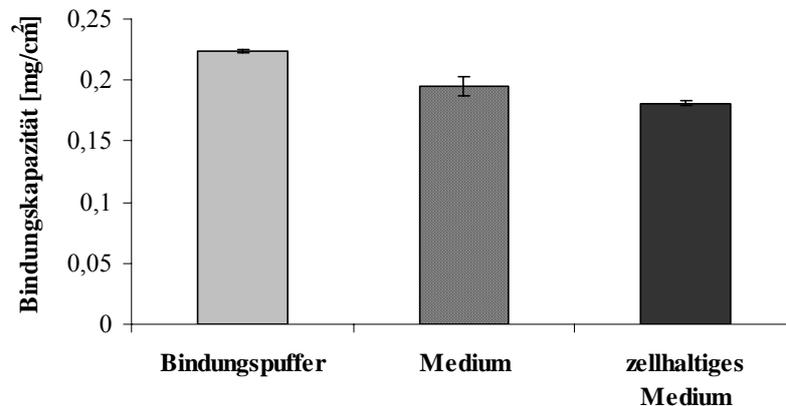


Abbildung 4.4.7: Statische Bindungskapazität der Protein A Membran unter dem Einfluss von Medium und Zellen.

Versuche haben gezeigt, dass die Wechselwirkung mit Transferrin und Insulin als Proteinbestandteile des Mediums auszuschließen ist (Daten nicht gezeigt). Die genaue Zusammensetzung des hier verwendeten Mediums ist nicht bekannt. Genauere Untersuchungen hierzu übersteigern aber den Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Der Einfluss des zellhaltigen Mediums auf die Antikörperbindung ist mit einem prozentualen Unterschied von bis zu 7 % im Vergleich zur Adsorption aus Medium gering. Folglich haben die Zellen keinen entscheidenden Einfluss auf das Bindungsverhalten des Antikörpers.

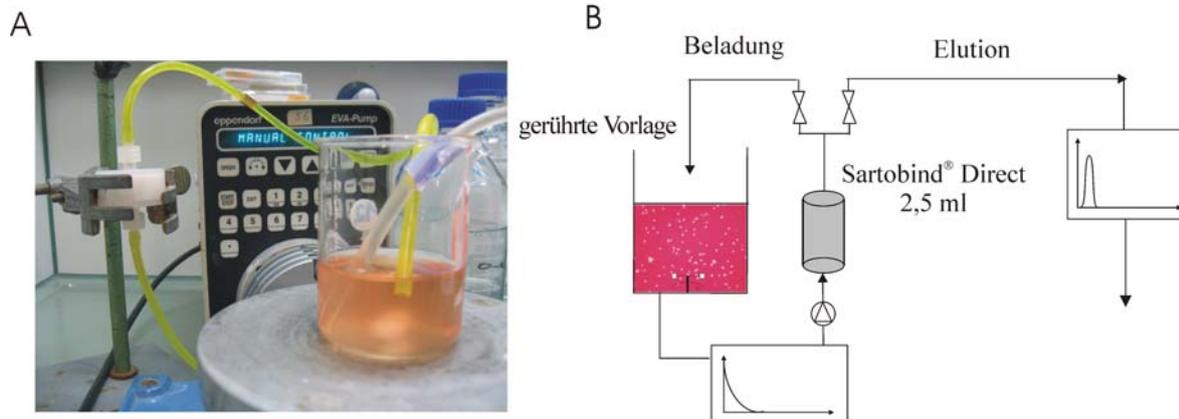
Einfluss der Zellen auf Bindungs- und Elutionsverhalten

Für nachfolgende Versuche wurden Sartobind[®] Direct 2,5 ml Module verwendet. In Tabelle 4.4.3 sind die wichtigsten Kenndaten dieser Einheit zusammengestellt. Nachfolgende Versuche im Hinblick auf die Evaluierung der Antikörperaufreinigung aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium wurden im Rezirkulations-Betrieb durchgeführt. In Abbildung 4.4.8 ist der Versuchsaufbau dargestellt. Die wichtigsten Daten zur Versuchsdurchführung sind in Tabelle 4.4.4 zusammengefasst.

Für eine einheitliche Versuchsdurchführung wurde zu Beginn das Totvolumen der Einheit sowie der Versuchapparatur bestimmt. Nach der Äquilibrierung der Einheit mit Bindungspuffer wurden 50 ml der jeweiligen Antikörperlösung aus einer gerührten Vorlage für 60 min bei einem Fluss von 25 ml/min im Kreis gepumpt. Die Einheit wurde von unten durchströmt (vgl. Abbildung 4.4.8).

Tabelle 4.4.3: Sartobind® Direct 2,5 ml. Übersicht über die wichtigsten Kenngrößen.

Sartobind® Direct 2,5 ml	Kenngrößen
Membran	Protein A
Membrancharge	7030083
Membranzvolumen	2,5 ml
Membranfläche	125 cm ²
Membranlänge	114 cm
Membranbreite	0,11 cm
Spacer	PP, unsymmetrische Diamantstruktur
Spacerdicke	0,24 mm

**Abbildung 4.4.8:** Sartobind® Direct. Versuchsaufbau (A) und schematische Darstellung der Versuchsdurchführung (B).

Während der Rezirkulation wurden in bestimmten Zeitabständen Proben aus der Vorlage genommen. Waschschritte und Elution erfolgten im *single-pass*-Betrieb mit den in Tabelle 4.4.4 gewählten Einstellungen. Die Konzentrationsbestimmung des Antikörpers in den einzelnen Proben sowie in den Wasch- und Elutionsfraktionen wurde mit der SEC-Analytik durchgeführt (Kalibrationsgeraden für die Berechnung der Konzentration finden sich im Anhang 6.4.15).

Tabelle 4.4.4: Sartobind® Direct. Versuchsbedingungen für die Aufreinigung des Antikörpers aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium.

Sartobind® Direct 2,5 ml	Versuchsbedingungen
Vorlage	50 ml
Ausgangskonzentration c_0 (IVIg)	0,25 mg/ml 0,1 mg/cm ²
Ausgangszellkonzentration im zellhaltigen Medium	$1,3 \cdot 10^6$ Z/ml \pm $0,08 \cdot 10^6$ Z/ml
Beladungszeitraum	60 min
Flussrate	25 ml/min
Umwälzleistung	0,5 min ⁻¹
Wachfraktion/ Flussrate	5×5 ml 5 ml/min
Elutionsvolumen/ Flussrate	8×5 ml 1 ml/min

Es wurden die Bindungs- und Elutionseigenschaften des Antikörpers vergleichend aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium in einer Dreifachbestimmung bestimmt, d.h. für jeden Versuch wurde unabhängig von der Ausgangslösung ein neues Modul verwendet. Um eine mögliche Modulvarianz auszuschließen wurde im Anschluss der Versuchsreihe ein Modul aus den Versuchen mit Bindungspuffer für die Antikörperbindung aus Medium und zellhaltigem Medium wiederverwendet.

Das Diagramm A in Abbildung 4.4.9 zeigt das Bindungsverhalten des Antikörpers aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium während in Diagramm B das Elutionsprofil dargestellt ist. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung angegeben.

Die hohe Standardabweichung innerhalb einer Versuchsreihe, die sowohl im Beladungs- als auch im Elutionsprofil beobachtet wurde, demonstriert das hohe Maß der Modulvarianz. Aufgrund dieser können keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Beladung bzw. Elution aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium beobachtet werden. Unabhängig von der Ausgangslösung wurde ein prozentualer Anteil von 75 % der Antikörper unter dynamischen Bedingungen in den ersten 30 min gebunden. Eine komplette Abreicherung des Antikörpers bei der Beladung der Membran wurde nach 60 min Rezirkulation nicht beobachtet. Ein prozentualer Anteil von 80 % bis 90 % der insgesamt eluierten Antikörpermenge wurde in allen drei Versuchen bereits nach 25 ml eluiert wurde. Dies entspricht einem Aufkonzentrierungseffekt um den Faktor zwei. Vorversuche, bezüglich der zeitlichen Beladung der Module haben gezeigt, dass die Rezirkulation der Antikörperlösung über einen längeren Zeitraum als 60 min zu keiner Verbesserung der Antikörperabreicherung führte (Daten nicht gezeigt).

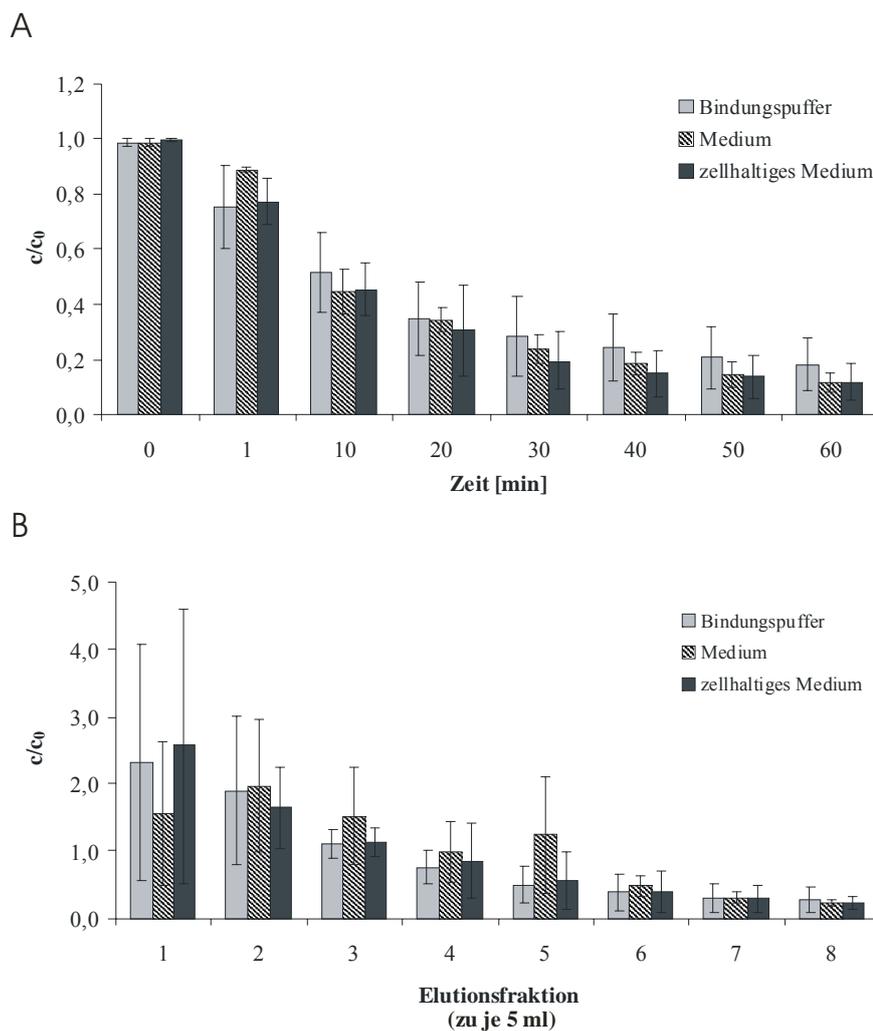


Abbildung 4.4.9: Sartobind[®] Direct. Beladungs- (A) und Elutionsprofil (B) aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium im Vergleich. Es ist der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung dargestellt (n=3).

Dies hat verschiedene Gründe. Im Rezirkulations-Betrieb stellt sich, wie auch in den statischen Versuchen, ein Gleichgewichtszustand ein, sodass auch bei einer Verlängerung des Beladungszeitraums keine komplette Abreicherung möglich ist. Darüber hinaus setzt sich der für die Versuche verwendete polyklonale Modell-Antikörper aus unterschiedlichen Anteilen der vier Isotypen des Immunglobulin G (IgG) zusammen (vgl. Anhang 6.3). Der Anteil des IgG₃ am gesamten IgG-Gehalt beträgt 5,7 %. Es ist bekannt, dass humanes IgG₃ keine Wechselwirkung mit Protein A als Affinitätsligand eingeht. [102] Ein Anteil von 5,7 % ist folglich auf die in Lösung verbleibenden IgG₃ Moleküle zurückzuführen.

Aus der Bestimmung der IVIg-Konzentration in der Ausgangslösung, der Wasch- und Elutionsfraktionen lassen sich die in Tabelle 4.4.5 zusammengestellten Daten unter Abzug des Gehalts von

5,7 % IgG₃ berechnen. Die Daten sind als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dargestellt. Angaben zur Berechnung der IVIg-Ausbeute sowie der Wiederfindungsrate finden sich im Anhang 6.5.4.

Tabelle 4.4.5: Sartobind[®] Direct. Zusammenfassung der Angaben zu Proteinausbeute und Wiederfindungsrate (WFR) bei der Aufreinigung aus zellfreier und zellhaltiger Lösung.

	Modulvarianz**		
	Bindungspuffer	Medium	zellhaltiges Medium
IVIg-Angebot c_0 [mg] *	11,6 ± 0,2	11,6 ± 0,1	11,7 ± 0,04
IVIg-Gehalt in der Elution [mg]	9,5 ± 2,2	10,6 ± 0,6	10,1 ± 0,6
IVIg-Ausbeute [%]	81 ± 18	91 ± 5,6	86 ± 4,5
WFR [%]	97 ± 5,6	98 ± 3,4	91 ± 2,8

* nach Abzug von 5,7 % IgG₃

** Dreifachbestimmung

Die Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede in der IVIg-Ausbeute sowie in der Wiederfindungsrate aus zellhaltigem Medium im Vergleich zur Aufreinigung aus zellfreien Lösungen gering sind. Die zum Teil hohe Standardabweichung resultiert vermutlich aus der hohen Modulvarianz. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung und der maximal erhaltenen IVIg-Ausbeute bzw. Wiederfindungsrate haben die Zellen einen nur minimalen Einfluss auf die Aufreinigung.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren sollte der Einfluss der Modulvarianz ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde eines der Module nachfolgend für die Aufreinigung des Antikörpers aus Medium und zellhaltigen Medium unter gleichen Versuchsbedingungen wiederverwendet. Beladungs- und Elutionsprofil sind in Abbildung 4.4.10 A und B dargestellt. Tabelle 4.4.6 gibt einen Überblick über die jeweiligen Antikörperausbeuten und Wiederfindungsraten aus zellfreier und zellhaltiger Lösung.

Unter Ausschluss der Modulvarianz zeigten die Ergebnisse, dass sowohl das Medium als auch die Zellen zu keiner Veränderung im Profilverlauf der Beladung und Elution führen. Der Einfluss der Zellen äußert sich in einer nur geringen Abnahme der Proteinausbeute und der Wiederfindungsrate im Vergleich zur Aufreinigung aus Bindungspuffer. Die Ergebnisse der ersten Versuche mit Modulvarianz wurden bestätigt. Die starken Unterschiede der Ergebnisse der Aufreinigung aus Medium bleiben ungeklärt. Ein möglicher Grund für die schlechte Bindung des Antikörpers und der damit einhergehenden geringeren Ausbeute von 72 % könnten aus der Lagerung des Moduls herrühren.

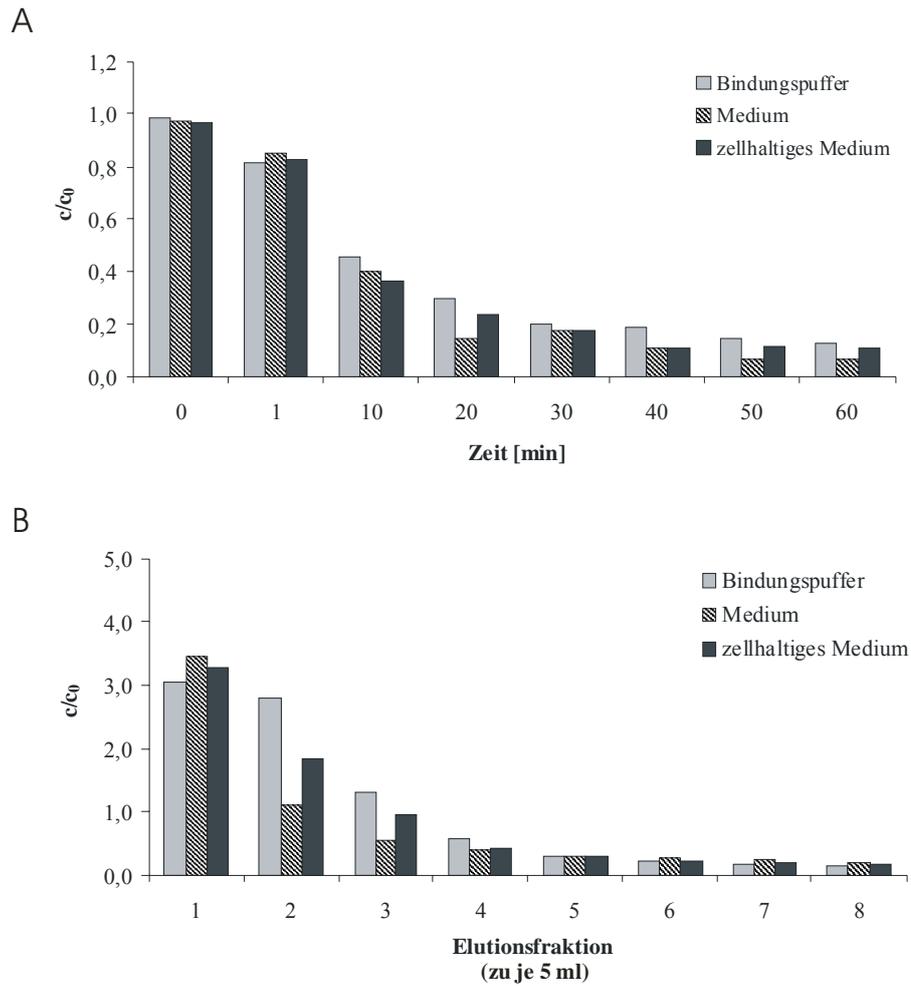


Abbildung 4.4.10 Sartobind[®] Direct. Beladungs- (A) und Elutionsprofil (B) aus Bindungspuffer, Medium und zellhaltigem Medium unter Ausschluss der Modulvarianz. [196]

Tabelle 4.4.6: Sartobind[®] Direct. Zusammenfassung der Angaben zu Proteinausbeute und Wiederfindungsraten bei der Aufreinigung aus zellfreier und zellhaltiger Lösung unter Ausschluss der Modulvarianz.

	Ausschluss der Modulvarianz ^{**}		
	Bindungspuffer	Medium	zellhaltiges Medium
IVIg-Angebot c_0 [mg] [*]	11,5	11,6	11,4
IVIg-Gehalt in der Elution [mg]	10,7	8,3	10,0
IVIg-Ausbeute [%]	92	72	88
WFR [%]	101	73	94

* nach Abzug von 5,7 % IgG₃

** Einfachbestimmung

Nach erster Verwendung für die Aufreinigung aus Bindungspuffer wurde das Modul nach der Regeneration bei -20 °C in 20 % Ethanol gelagert. Einflüsse auf die Porenstruktur unter diesen Bedingungen sind nicht auszuschließen. Möglicherweise war der Zeitraum des Auftauens und der Äquilibrierung des Moduls für den nachfolgenden Versuch mit Medium nicht ausreichend, sodass eine Wechselwirkung der Protein A Liganden mit dem Antikörper nur eingeschränkt möglich war.

Fazit

Die Untersuchung zur Bindung aus zellfreier Lösung im Vergleich zur Bindung aus zellhaltiger Lösung hat ergeben, dass die Zellen einen nur minimalen Einfluss auf die Antikörperbindung ausüben. Dies wurde in Versuchen zur Bestimmung der statischen Bindungskapazität der reinen Protein A Membran aus Medium und zellhaltigem Medium bestätigt. Darüber hinaus wurde die zeitabhängige Adsorption im Rezirkulations-Betrieb durch die Zellen nicht beeinträchtigt. Unabhängig von der jeweiligen Ausgangslösung wurden 75 % der angebotenen IVIg-Menge innerhalb von 30 min gebunden. Eine komplette Abreicherung im Rezirkulations-Betrieb war nur bedingt möglich. Hohe Proteinausbeuten und Wiederfindungsraten größer 90 % konnten beobachtet werden. Die Hauptmenge der Antikörper konnte im *single-pass*-Betrieb in einem Volumen von 25 ml eluiert werden. Die Antikörperlösung konnte demnach um den Faktor zwei aufkonzentriert werden. Die Sartobind[®] Direct Protein A Einheit ist folglich für eine Aufreinigung aus zellhaltiger Lösung mit nur minimalen Einbußen in der Antikörperbindung bei den hier verwendeten IVIg- und Zellkonzentrationen geeignet. An dieser Stelle wäre es sinnvoll die biologische Aktivität des Zielproduktes zu überprüfen, um einen möglichen negativen Einfluss dieser Art der Aufreinigung auszuschließen.

4.4.4. Probleme bei der Aufreinigung aus zellhaltiger Lösung

Ein wichtiger Aspekt, der neben dem Einfluss der Zellen auf die Effizienz der Aufreinigung aus zellhaltigen Medien eine entscheidende Rolle spielt, ist die Partikelgängigkeit des Moduls. Sie stellt in diesem Zusammenhang die größte Herausforderung bei der Konstruktion derartiger Module dar. Um die Partikelgängigkeit der verwendeten Module beurteilen zu können, wurde bei den Versuchen, aus zellhaltigem Medium (Abschnitt 4.4.3) eine Zellzahlbestimmung durchgeführt (Durchführung siehe Anhang 6.4.6, Zellzahlbestimmung). Es wurde die Anzahl lebender und toter Zellen während der Rezirkulation in der Vorlage sowie in den Wasch- und Elutionsfraktionen bestimmt. In Abbildung 4.4.11 ist der zeitliche Verlauf der Lebend- und Tot-Zellzahl über den Zeitraum der Beladungsphase als Mittelwert einer Dreifachbestimmung aufgetragen.

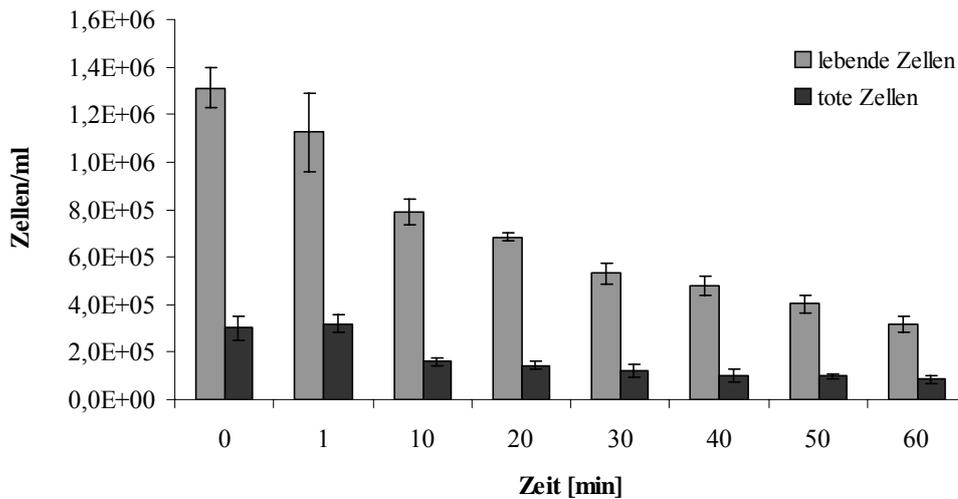


Abbildung 4.4.11: Sartobind® Direct. Verlauf der Zellzahl während der Beladung im Rezirkulations-Betrieb.

Eine Abnahme um 75 % der Anzahl lebender Zellen wurde beobachtet. Darüber hinaus ist nur eine geringfügige Abnahme der Anzahl toter Zellen in den ersten 10 min zu verzeichnen. Während in den Waschfraktionen im Mittel 7 % der „verschundenen“ Zellen detektiert wurden, blieb das Eluat klar (Daten nicht gezeigt). Gleiche Ergebnisse wurden bei der Antikörperaufreinigung aus zellhaltiger Lösung bei der Verwendung von Sartobind® Direct Modulen mit 25 ml Membravolumen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Für eine Abnahme der Zellzahl können mehrere Erklärungen in Frage kommen. Ein Grund könnte eine durch auftretende Scherkräfte bedingte Zellyse sein. Es ist bekannt, dass Säugetierzellen sehr empfindlich gegenüber Scherkräften sind. [14, 199] Die verhältnismäßig hohe Flussrate von 25 ml/min und die innere Konstruktion des Moduls könnten unter Umständen hohen Scherkräften herbeiführen, die die Membranintegrität der Zellen zerstören und so zu einer Zellyse führen. Die Anzahl der lebenden Zellen würde abnehmen. Durch einen Verlust der Membranintegrität würde sich die Abnahme der Zellzahl nicht in einem Anstieg toter Zellen bemerkbar machen. Dies steht im Einklang mit dem in Abbildung 4.4.11 dargestellten Ergebnis.

Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen Zellen und Adsorbermaterial auftreten können. Neben hydrophoben Wechselwirkungen sind diese überwiegend elektrostatischer Natur. [164-166] Darüber hinaus ist bekannt, dass Antikörper produzierende Zellen, den von ihnen produzierten Antikörper an ihrer Oberfläche tragen können. [200, 201] Diese können möglicherweise eine affine Wechselwirkung mit den Protein A Liganden der Membran eingehen. Ein weiterer Grund, der für die Abnahme der Zellzahl verantwortlich sein könnte, wäre ein durch die Konstruktion innerhalb des Moduls auftretender mechanischer

Zellrückhalt. [157] Im folgenden Abschnitt sollen diese drei möglichen Ursachen näher untersucht werden.

Zellyse

Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das im Cytoplasma jeder Zellen vorkommt. Das Enzym ist für die reversible Umwandlung von Pyruvat zu Laktat in Anwesenheit von NAD^+ / NADH verantwortlich und spielt damit eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen. Verlieren Zellen aufgrund von Zellyse oder durch scherstressbedingte Zerstörung ihre Integrität, so wird u. a. dieses Enzym in das Medium freigesetzt. Die LDH-Aktivität im Medium ist daher ein Maß für die Anzahl toter/ lysierter Zellen und wird standardmäßig in Kulturüberständen detektiert. [202]

Um den Verlust der Zellintegrität während des Rezirkulations-Betriebes in einem Zeitraum von 60 min genauer zu untersuchen, wurde die Zunahme LDH-Aktivität in den Beladungsproben der Versuche aus Abschnitt 4.4.3 bestimmt (LDH_{10-160}). Zusätzlich wurde unter gleichen Versuchsbedingungen eine Zellsuspension von Hybridom-Zellen gleicher Zellzahl für 60 min bei einer Flussrate von 25 ml/min, ohne die Verwendung eines Moduls, rezirkuliert, um den Einfluss der Flussrate auf eine mögliche Zellyse zu untersuchen. Die Änderung der LDH-Aktivität unter diesen Versuchsbedingungen wird nachfolgend als LDH-Referenz bezeichnet. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde eine mittlere Abnahme der Lebend-Zellzahl von 75 % beobachtet. Unter der Annahme, dass dieser Anteil der Zellen während der Rezirkulation komplett lysiert, lässt sich anhand einer zuvor durchgeführten Korrelation zwischen lysierten Zellen und der LDH-Aktivität (Durchführung siehe Kapitel Offline-Analytik Anhang 6.4.6, Bestimmung der LDH-Aktivität nach dem Testprinzip 2), die maximal mögliche LDH-Aktivität (LDH_{max}) berechnen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung in Abbildung 4.4.12 dargestellt.

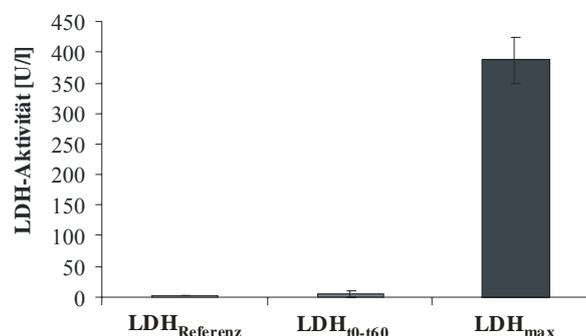


Abbildung 4.4.12: Sartobind[®] Direct. Änderung der LDH-Aktivität. $\text{LDH}_{\text{Referenz}}$: Änderung der LDH-Aktivität im Rezirkulations-Betrieb (zellhaltiges Medium) bei 25 ml/min ohne Einheit; LDH_{10-160} : Änderung der LDH-Aktivität im Rezirkulations-Betrieb (zellhaltiges Medium) bei 25 ml/min mit Einheit; LDH_{max} : Maximal mögliche LDH-Aktivität nach kompletter Zellyse.

Anhand der LDH-Referenz ist ersichtlich, dass eine Flussrate von 25 ml/min keinen Einfluss auf die Zellintegrität ausübt. Im Vergleich zur maximal möglichen LDH-Aktivität von 386 ± 38 U/l ist der Anstieg der LDH-Aktivität um $6 \pm 5,2$ U/l während der Rezirkulation bei der Antikörperaufreinigung gering. Folglich entstehen in der Einheit während des Beladens keine Scherkräfte, die zu einer Zerstörung der Zellintegrität führen. Eine Abnahme der Zellzahl resultiert folglich nicht aus einer auftretenden Zellyse

Adsorptiver Zellrückhalt

Um die adhäsiven Wechselwirkungen zwischen Zellen und dem Adsorbermaterial genauer zu untersuchen, wurden statische Versuche in 6-Lochplatten durchgeführt. Die Protein A Membran wurde mit einem Locheisen (Innendurchmesser: 20 mm) ausgestanzt. Die Membranstanzlinge der Fläche von $3,14 \text{ cm}^2$ wurden in 6-Lochplatten überführt und für 2 min mit Bindungspuffer äquilibriert. Nach der Äquilibrierung wurden die Stanzlinge in neue 6-Lochplatten überführt und mit je 3 ml zellhaltigem Kulturmedium überschichtet ($5 \cdot 10^5$ Zellen/ml). Die Inkubation erfolgte für 3 h im Inkubator bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttler bei 400 min^{-1} . Nach der Fixierung möglicher an der Membran anhaftender Zellen werden die Membranen mit einer DAPI-Färbelösung behandelt (Vorschrift siehe Anhang 6.4.17 und 6.4.18). DAPI (4',6-Diamidin-2-phenyl-indol) ist ein DNA-bindendes Fluorochrom, das bevorzugt doppelsträngige DNA färbt. In den Versuchen wurde es für eine Visualisierung der Zellkerne verwendet.

Abbildung 4.4.13 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Protein A Membran nach der DAPI-Färbung. Produktionsbedingt weisen die verwendeten Membranen eine glatte und eine raue Seite auf. Die Bilder A1-A3 zeigen die glatte Seite der Membran. Auf den Bildern B1-B3 ist die raue Seite der Membran zu erkennen. Als Referenz dienen Bilder der unbehandelten Membran (A1/B1). Die Bilder A2 und B2 zeigen die Zellkernfärbung direkt nach der Inkubation von 3 h. Die Bilder A3 und B3 zeigen die Zellkernfärbung nach mehrmaligem Waschen der Membranen mit Bindungspuffer. Zusätzlich wurden die Stanzlinge nach jedem Waschschrift in neue Vertiefungen einer 6-Lochplatte überführt. Zellen, die möglicherweise am Boden der Vertiefung anhafteten, wurden auf diese Weise nicht detektiert.

Die Ergebnisse der Zellkernfärbung zeigen, dass sowohl an der glatten als auch an der rauhen Membranseite eine Zelladhäsion stattgefunden hat (A2/B2). Das Bild B2 zeigt die Anhaftung der Zellen auf der rauhen Membranseite. Es scheint, als würden sich die Zellen in dieser faserartigen Struktur verfangen. Durch mehrmaliges Waschen der Membranstanzlinge mit PBS konnten die Zellen nahezu vollständig entfernt werden (A3/B3).

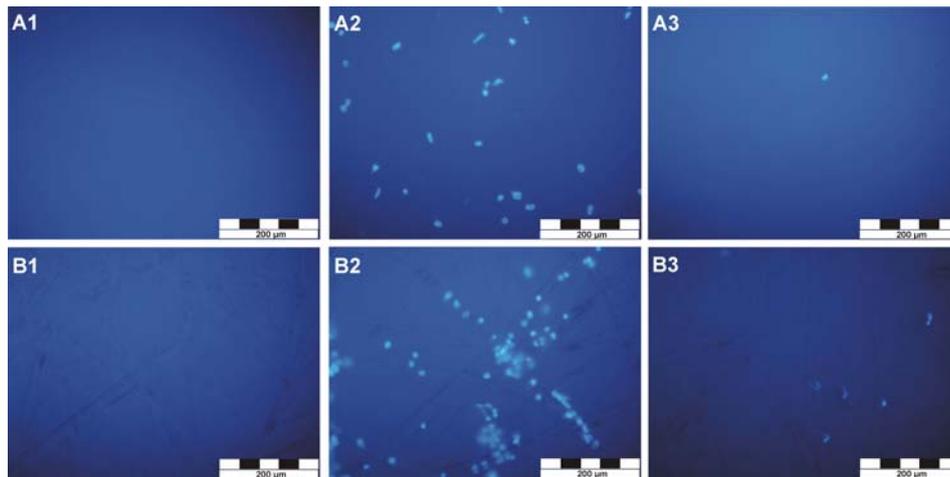


Abbildung 4.4.13: DAPI-Färbung der Protein A Membran. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zur Visualisierung der Zellkerne zeigen das Ergebnis nach der Inkubation mit zellhaltigem Medium (200-fache Vergrößerung). A1-A3 zeigen die glatte Seite, B1-B3 die raue Seite der Membran. A1 und B1 zeigen die Färbung der unbehandelten Membran, A2 und B2 zeigen die Färbung nach der Inkubation von 3 h. A3 und B3 zeigen die Zellkernfärbung nach mehrmaligem Waschen der Membran.

In der Literatur ist beschrieben, dass Zellen bei neutralen pH-Werten negativ geladen sind. [162] Die in diesen Versuchen als Trägermaterial verwendete regenerierte Cellulose, an die über die Aktivierung von Aldehydgruppen Protein A-Liganden gekoppelt wurden, schließt eine mögliche ionische Wechselwirkung nicht vollständig aus. Die Ergebnisse der Zellkernfärbung haben jedoch gezeigt, dass die Zellen durch mehrmaliges Waschen mit Puffer niedriger Salzkonzentration vom Trägermaterial entfernt wurden, sodass diese Art der Wechselwirkung auszuschließen ist. Ebenso ist auf der Grundlage der Ergebnisse eine affine Wechselwirkung auszuschließen. In der Literatur ist beschrieben, dass bei der Antikörperaufreinigung mittels Protein A Affinität aus einer Hybridom-Zellsuspension in *expanded-bed*-Verfahren unter dynamischen Bedingungen kein signifikanter Zellrückhalt beobachtet wurde. [203-205] Eine affine Wechselwirkung zwischen Zelle und Protein A-Ligand kann demnach vernachlässigt werden.

Die Untersuchung zum adsorptiven Zellrückhalt haben gezeigt, dass eine spezifische Wechselwirkung auszuschließen ist. Es ist zu vermuten, dass die anfänglich beobachtete Zelladhäsion aus einer schwachen unspezifischen Wechselwirkung herrührt, denn die Zellen konnten durch ein Spülen der Membran leicht entfernen werden.

Mechanischer Zellrückhalt

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellyse und zur adsorptiven Wechselwirkung der Zellen mit der Membranoberfläche lassen vermuten, dass die Zellen in der Einheit mechanisch zurück gehalten werden. Die nur geringe Zellzahl, die in der Waschfraktion in Versuchen mit der

Sartobind® Direct Einheit detektiert wurde, bestärkt diese Vermutung. Um die Vermutung zu verifizieren, wurden nachfolgend verschiedene Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde ein Versuche mit einer speziell angefertigten 2,5 ml Direct Einheit ohne Membran durchgeführt. In Anlehnung an die unter Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Versuche wurde eine Suspension von Hybridom-Zellen für 60 min bei einer Flussrate von 25 ml/min über die Einheit im Kreis gepumpt. Die Probenahme erfolgte alle 10 min. Es wurde eine Zellzahlbestimmung und eine Messung der optischen Dichte durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wurde weder eine Abnahme der Lebend-Zellzahl noch der optischen Dichte beobachtet. Der Spacer allein hat also keinen Einfluss auf den Zellrückhalt.

In weiteren Versuchen wurde der Zellrückhalt in herkömmlichen Sartobind® Direct Einheiten untersucht. Wie in den zuvor durchgeführten statischen Versuchen sollte hierbei die Membran auf in der Einheit zurückgehaltene Zellen nach dem Waschschrift untersucht werden. Da eine Abnahme der Zellzahl sowohl bei Versuchen mit 2,5 ml Einheiten als auch bei Versuchen mit 25 ml Einheiten beobachtet wurde, erfolgte die nachfolgende Untersuchung bei beiden Modulgrößen. Um ein affine Wechselwirkung zwischen Zellen und Protein A-Liganden vollständig auszuschließen, wurde in der verwendeten 25 ml Einheit die Grundmembran (regenerierte Cellulose mit Aldehydfunktionalität) verwendet. Im Vorfeld der Versuche wurden die reaktiven Aldehydgruppen der Grundmembran mit einer 1 %igen Natriumborhydridlösung (Standardverfahren für die Deaktivierung dieser Funktionalität) deaktiviert (Vorschrift siehe Anhang 6.4.19). Diese Membran wird nachfolgend als nicht funktionalisierte Membran bezeichnet.

Die Module wurden mit einer Zellsuspension im Rezirkulations-Betrieb beladen und anschließend mit Waschpuffer im *single-pass*-Betrieb gespült. Genaue Angaben der jeweiligen Versuchsbedingungen sind in Tabelle 4.4.7 zusammengestellt. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung zum Startzeitpunkt ($t=0$ min) und zum Ende der Rezirkulation ($t=60$ min) sowie in den einzelnen Waschfraktionen.

Tabelle 4.4.7: Sartobind® Direct. Übersicht der Versuchsbedingungen für die Untersuchung des mechanischen Zellrückhaltes.

Versuchsbedingungen	Sartobind® Direct Einheit	
	2,5 ml Einheit Protein A Funktionalität	25 ml Einheit ohne Funktionalität
Vorlage	50 ml	400 ml
Beladungszeitraum	60 min	60 min
Flussrate	25 ml/min	250 ml/min
Waschfraktion/ Flussrate	5×5 ml 5 ml/min	3×50 ml 50 ml/min

Im Anschluss erfolgte die Fixierung möglicher, in der Einheit verbleibender Zellen nach der Vorschrift im Anhang 6.4.17. Nach der Fixierung wurden die Einheiten geöffnet und die Membranen vorsichtig vom Spacer getrennt. Drei Abschnitte der Membran und des Spacers (innerer, äußerer und mittlerer Bereich der vorherigen Wicklung) wurden mit einem Locheisen (Innendurchmesser: 25 mm/ bzw. 10 mm) heraus gestanzt und in die Vertiefungen einer 6-Lochplatte/24-Lochplatte überführt und zur Visualisierung der Zellkerne mit einer DAPI-Färbelösung behandelt (Vorschrift siehe Anhang 6.4.18).

In Abbildung 4.4.14 ist die prozentuale Abnahme der Zellzahl nach 60 min Rezirkulations-Betrieb der Zellsuspension sowie der Anteil, der in der Waschfraktion insgesamt wieder gefundenen Zellen, bezogen auf die anfängliche Zellzahl, dargestellt.

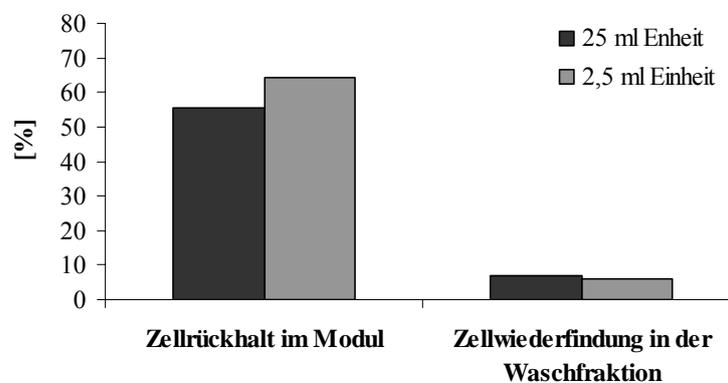


Abbildung 4.4.14: Sartobind[®] Direct. Prozentualer Zellrückhalt während des Rezirkulations-Betriebs und Zellrückgewinnung in der Waschfraktion bei Versuchen mit Protein A funktionalisierter und nicht funktionalisierter Membran.

Das Ergebnis zeigt, dass durch das Waschen der Module, unabhängig von der jeweiligen Membran (funktionalisierte/ nicht funktionalisierte Membran), ein nur geringer Anteil an Zellen aus den Einheiten gespült werden konnte. Die Ergebnisse der Visualisierung der Zellkerne in beiden Einheiten bestätigen den Zellrückhalt in der Einheit (siehe Abbildung 4.4.15).

In Abbildung 4.4.15 sind exemplarisch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Membran der 25 ml Einheit des inneren und äußeren Bereichs der Wicklung sowie des Spacers dargestellt. Das Bild C2 zeigt hierbei zusätzlich eine lichtmikroskopische Aufnahme des Spacer bei 100-facher Vergrößerung.

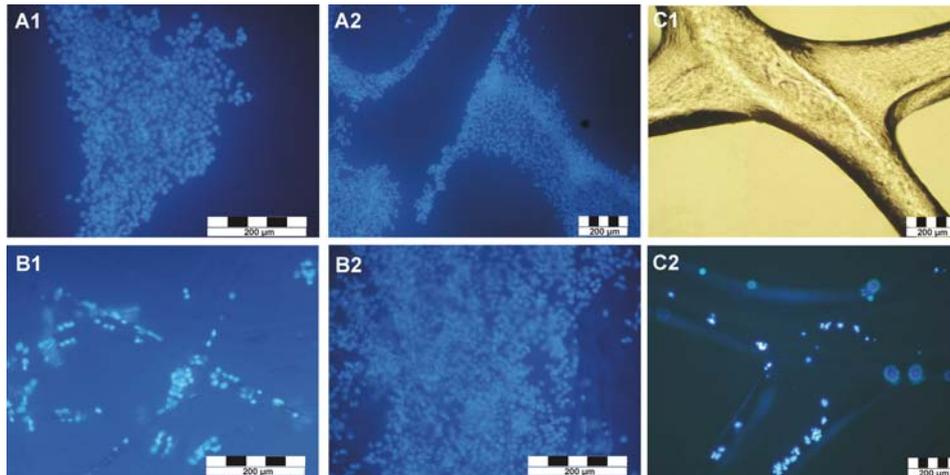


Abbildung 4.4.15: Sartobind® Direct. DAPI-Färbung der Membran und des Spacers zur Visualisierung der Zellkerne. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen Ausschnitte der Membran der äußeren (glatt, A1; rau B1) und inneren (glatt A2; rau B2) Wicklung und des Spacers (C2) nach der Beladung einer 25 ml Einheit (nicht funktionalisierte Membran) mit einer Zellsuspension und nachfolgendem Waschschrift bei 200-facher bzw. 100-facher Vergrößerung. C1 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme des Spacers bei 100-facher Vergrößerung.

Anhand der Visualisierung der Zellkerne wurde ein verstärkter Zellrückhalt im Innern des Moduls mit der nicht funktionalisierten Membran beobachtet. Gleiches wurde bei Verwendung der Protein A funktionalisierten Membran beobachtet. Dies könnte auf ein inhomogenes Strömungsverhalten in der Einheit zurückzuführen sein oder auf eine mögliche ungleichmäßige Wicklungsstärke innerhalb der Einheit. Die Bilder zeigen, dass die faserartig, raue Membranseite einen Zellrückhalt begünstigt. Es scheint als würden die Zellen in der Faserstruktur zurückgehalten (vgl. Abbildung 4.4.15 B1 B2). In der Verteilung der Zellkerne in Abbildung 4.4.15 A2 sind darüber hinaus Strukturmerkmale zu erkennen, die auf die Form des Spacer hindeuten (vgl. Abbildung 4.4.15 C1/ C2). Vereinzelt wurde eine Zellanhaftung auch auf dem aus Polypropylen-Kunststoff bestehenden Spacer beobachtet (vgl. Abbildung 4.4.15 C2).

Die identifizierten Strukturabdrücke des Spacer bestärken die Vermutung eines durch die Kombination aus Membran und Spacer hervorgerufenen mechanischen Zellrückhaltes, der durch die faserartige Struktur der Membran zusätzlich unterstützt zu werden scheint.

Der Zellrückhalt in der Einheit unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist hoch. Die Rückgewinnung der Zellen in der Einheit durch das Spülen der Membran fällt gering aus. Um die Rückgewinnung der Zellen nach dem Beladen der Einheit durch das Waschen des Moduls zu steigern, wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss verschiedener Parameter untersucht.

Hierfür wurde der zuvor beschriebene Versuch mit einer 25 ml Einheit wiederholt. Nach dem Beladen wurde die Einheit im *single-pass*-Betrieb mit 150 ml Puffer bei einer Flussrate von 50 ml/min gespült und die Zellzahl in dieser Waschfraktion bestimmt. Im Anschluss wurde die

Einheit mit weiteren 150 ml Puffer im Rezirkulations-Betrieb für je 5 min bei: I) der 5-fachen Flussrate, II) nach Umkehrung der Fließrichtung, III) unter dem Einfluss von Ultraschall gespült. Nach jeder Änderung der Versuchsbedingungen wurde die Zellzahl in der Lösung bestimmt.

Abbildung 4.4.16 zeigt das Ergebnis der Zellzahlbestimmung. Es ist der prozentuale Anteil der Zellen, die in der Einheit während des Beladens zurückgehalten wurden sowie der prozentuale Anteil der Zellen, die unter den jeweiligen Bedingungen in der Waschfraktion zurückgewonnen wurden, dargestellt.

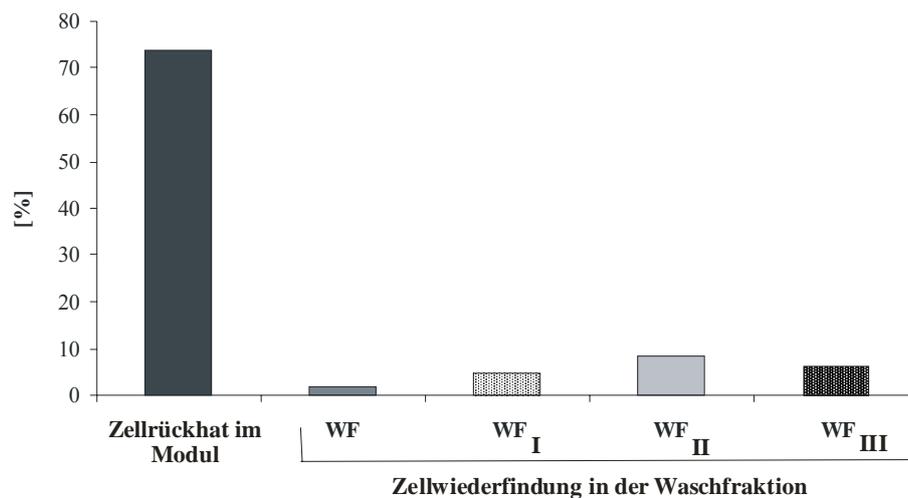


Abbildung 4.4.16: Sartobind® Direct. Einfluss verschiedener Parameter auf die Zellrückgewinnung. Prozentualer Anteil der in der Einheit zurückgehaltenen Zellen (Zellrückhalt). Prozentuale Anteil der Zellen in der ersten Waschfraktion WF (150 ml; 50 ml/min). Prozentualer Anteil der Zellen, die im Rezirkulationsbetrieb bei I) der 5-fachen Flussrate, II) nach Umkehrung der Fließrichtung, III) unter dem Einfluss von Ultraschall zurückgewonnen wurden WF_I - WF_{III}.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass durch die gewählten Bedingungen nur eine geringe Steigerung der Zellrückgewinnung erzielt wurde. Der prozentuale Anteil der in den Waschfraktionen detektierten Zellen bleibt unter einem Wert von 10 %.

Fazit

Bei der Anwendung der Sartobind® Direct Einheiten für die Antikörperaufreinigung aus zellhaltiger Lösung wurde ein starker Rückgang in der Zellzahl beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Zellzahl nicht durch eine scherstressbedingte Zellyse oder durch eine spezifische Wechselwirkung zwischen Zellen und Trägermaterial hervorgerufen wird, sondern die Zellen aufgrund der Konstruktion aus Spacer und Membran in der Einheit mechanisch zurückgehalten wurden. Eine Zellrückgewinnung durch Spülen des Moduls unter dem Einfluss

einer erhöhten Flussrate, der Umkehrung der Fließrichtung sowie dem Einfluss von Ultraschall war nicht möglich.

Die Probleme, die durch eine irreversible Zellablagerung innerhalb des Moduls auftreten können, sind vielfältig:

- Zellablagerung können zu einer Veränderung des Fließverhaltens führen und damit zu einer Veränderung des Abreicherungsprofils des Proteins. [157] Zudem kann durch Zellablagerung die aktive Oberfläche für die Proteinbindung reduziert werden, was zu einer Abnahme der Bindungskapazität führen kann. Fließbettadsorptionsverfahren bei der Anionenaustauschchromatographie, haben gezeigt, dass die Bindungskapazität durch einen starken Zellrückhalt um 75 % gesunken ist. [203] Im Hinblick auf den Einsatz im großtechnischen Maßstab und einer nicht kontrollierbaren Zellablagerung wäre die Beständigkeit des Aufreinigungsschrittes somit nicht mehr gewährleistet.
- Die Bildung eines Biofilms innerhalb der Einheit stellt eine potentielle Gefahrenquelle für die Reinheit des Zielproduktes dar. Die Elution des Zielproduktes wird, abhängig von der jeweiligen Wechselwirkung, häufig durch eine Änderung des Salzgehaltes oder des pH-Wertes herbeigeführt. Es ist bekannt, dass Zellen unter dem Einfluss starker Änderungen des pH-Wertes oder der Salzkonzentration lysieren. [157] Durch den Verlust der Zellintegrität werden zellinterne Proteine, DNA und andere Moleküle freigesetzt, die bei der Elution des Zielproteins zu einer Verunreinigung des Eluates führen können.
- Eine irreversible Zellablagerung macht das Modul für die Wiederverwendung ungeeignet, da das Risiko der Kontamination erhöht wird.

Erste Ergebnisse der Aufreinigung des Antikörpers aus zellfreier und zellhaltiger Lösung haben gezeigt, dass der Einfluss der Zellen auf die Antikörperbindung bei der für die Versuche gewählten Antikörperkonzentration und Zelldichte nur gering ist. Dennoch ist eine Blockierung der aktiven Oberflächen bei höherer Zellkonzentration, nicht auszuschließen.

Aus den oben genannten Gründen sollte die Verbesserung der Partikelgängigkeit der Sartobind[®] Direct Einheit im Vordergrund stehen, um neben der direkten Produktisolierung aus zellhaltigem Medium eine 100 %ige Zellabtrennung zu gewährleisten.

Verbesserung der Partikelgängigkeit

In diesem Zusammenhang spielt die Konstruktion des Spacers eine entscheidende Rolle. Wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben ist die Struktur und die Dicke des Spacer nicht nur entscheidend für die Proteinanreicherung sondern vor allem ausschlaggebend für die Partikelgängigkeit des Moduls.

Die grobmaschige Struktur und die Dicke des bisher verwendeten netzartigen Spacers sowie der durch die Konstruktion vorgegebene Verlauf des Fluidstroms innerhalb der Einheit (vgl. Abbildung 4.4.6 B), gewährleisten eine gute Proteinanreicherung. Für die Partikelgängigkeit der Module scheint dieser Spacer jedoch ungeeignet. Die Stege des Spacers, die auf der Membran aufliegen, scheinen bei dem vorgegebenen Fluidstrom eine Barriere bei der Aufreinigung aus zellhaltiger Lösung darzustellen und sorgen vermutlich für den starken Zellrückhalt (vgl. Abbildung 4.4.15).

Um den Einfluss des Spacers auf die Partikelgängigkeit zu untersuchen, wurde in weiterführenden Versuchen ein vliesartiger Spacer gleicher Dicke anstelle des herkömmlichen netzartigen Spacers verwendet. Die faserartige Struktur des ebenfalls aus Polypropylen bestehenden Vlieses soll für ein inhomogenes Strömungsverhalten des Fluids zwischen den Membranwicklungen sorgen und die Partikelgängigkeit verbessern. In Abbildung 4.4.17 ist der netzartige Spacer (A) sowie der vliesartige Spacer (B) dargestellt. Die äußeren mikroskopischen Aufnahmen zeigen einen Ausschnitt des jeweiligen Spacers bei 100-facher Vergrößerung.



Abbildung 4.4.17: Struktur des Netz- und Vlies-Spacer. Mikroskopische Aufnahme bei 100-facher Vergrößerung.

Die mit einem Vlies-Spacer ausgestatteten 2,5 ml Einheiten wurden in Anlehnung an die Versuche in Abschnitt 4.4.3 hinsichtlich der Antikörperaufreinigung aus zellhaltiger Lösung sowie der Partikelgängigkeit getestet. Neben der Antikörperanalytik in der Vorlage, den Wasch- und Elutionsfraktionen erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl sowie der LDH-Aktivität während des Beladens. Abbildung 4.4.18 zeigt das Beladungs- und Elutionsprofils für die Aufreinigungen unter Verwendung von Modulen mit Netz-Spacer und Vlies-Spacer in direktem Vergleich. Die Daten sind als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dargestellt, d.h. für jeden Versuch wurde ein neues Modul verwendet.

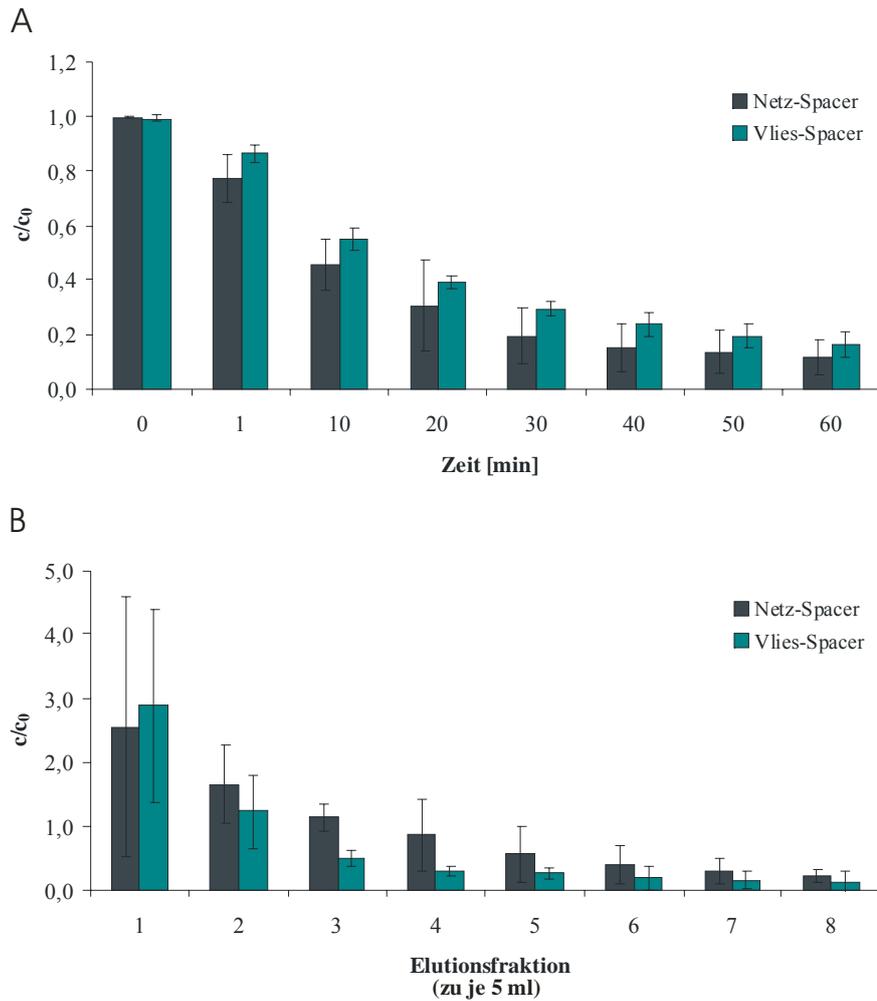


Abbildung 4.4.18: Sartobind[®] Direct. Beladungs- (A) und Elutionsprofil (B) zellhaltigem Medium unter Verwendung einer 2,5 ml Einheit mit netzartigem und vliesartigem Spacer im Vergleich. Die Daten ergeben sich aus einer Dreifachbestimmung (n=3).

Die hohe Standardabweichung im Beladungs- und Elutionsprofil resultiert aus der auftretenden Modulvarianz. Die bei der Beladung zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessene erhöhte, mittlere Antikörperkonzentration bei Verwendung des Vlies-Spacers deutet auf eine verminderte Proteinanreicherung hin. Ein Vergleich der mittleren Proteinausbeute und Wiederfindungsrate hat jedoch gezeigt, dass die Werte, unabhängig von der Art des Spacers, im Rahmen der Messungenauigkeit, ähnlich sind (vgl. Tabelle 4.4.8).

Tabelle 4.4.8: Sartobind® Direct. Vergleich der Ergebnisse der Beladung und Elution bei Verwendung eines netzartigen und eines vliesartigen Spacers bei der Antikörperaufreinigung aus zellhaltiger Lösung.

	Sartobind® Direct 2,5 ml	
	Netz-Spacer	Vlies-Spacer
Membranfläche [cm ²]	125	140
IVIg-Angebot c ₀ [mg]*	11,7 ± 0,04	13,1 ± 0,2
Eluierte Menge IVIg pro cm ² [mg/cm ²]	0,080 ± 0,0048	0,083 ± 0,0035
IVIg-Ausbeute [%]	86 ± 4,5	72 ± 24
WFR [%]	91 ± 2,8	83 ± 19
Zellrückhalt [%]	75 ± 5	21 ± 10
LDH-Anstieg [U/l]	6,2 ± 5,1	4 ± 3,2

* nach Abzug von 5,7 % IgG₃

Im Bezug auf den Zellrückhalt innerhalb der Einheit konnte bei Anwendung des Vlies-Spacers eine um 70 % verbesserte Partikelgängigkeit im Vergleich zum Netz-Spacer bei gleichbleibend niedriger LDH-Aktivität in der Ausgangslösung erzielt werden. Die dichte, faserartige Struktur des Vlies-Spacers hat demnach keinen Einfluss auf die Zellvitalität.

Aus der ungleichmäßigen, dünnfaserigen Struktur des Spacers resultiert vermutlich ein anderes Strömungsverhalten des Fluid innerhalb der Einheit, als es durch den netzartigen Spacer hervorgerufen wird. Es ist denkbar, dass die durch die Verteilung der Fasern dichtere Struktur des Spacers zu einem größeren mechanischen Widerstand führt, dieser aber gleichzeitig Turbulenzen im Fluidstrom hervorruft, die eine Ablagerung der Zellen reduzieren.

Zur Visualisierung des Zellrückhaltes in den Einheiten mit vliesartigem Spacer wurden Membran und Spacer einer Einheit nach der Beladung mit einer DAPI-Färbelösung behandelt (Durchführung siehe Anhang 6.4.18). Im Einklang mit dem Ergebnis des reduzierten Zellrückhaltes wurden insgesamt unabhängig von der Membranstruktur (glatt/rau) deutlich weniger Zellen detektiert, als bei der Verwendung des Netz-Spacers. In Abbildung 4.4.19 sind exemplarisch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der rauhen Membranseite und des Spacers des inneren Bereichs der Wicklung dargestellt. Es wurde eine schwache Zellablagerung an der rauhen Seite der Membran beobachtet. Darüber hinaus wurden Zellablagerungen zwischen sehr eng zueinander stehenden Vliesfasern des Spacers beobachtet. Während bei der Verwendung des Netz-Spacers der Zellrückhalt vermutlich aus der Kombination von Membran und Spacer resultierte und nur wenige Zellen am Spacer selbst anhafteten (vgl. Abbildung 4.4.15), scheint bei Verwendung des Vlies-Spacer der Zellrückhalt vorrangig durch die Fasern selbst hervorgerufen zu werden.

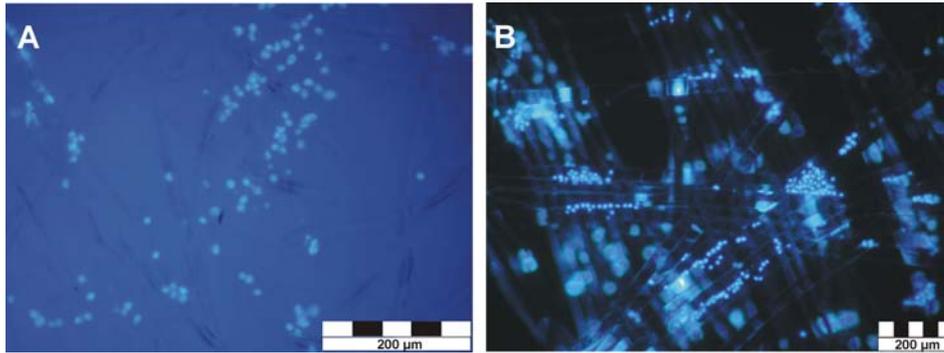


Abbildung 4.4.19: Sartobind[®] Direct. DAPI-Färbung der Membran und des Vlies-Spacers zur Visualisierung der Zellkerne nach der Beladung. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen einen Ausschnitt der rauhen Membranseite bei 200-facher (A) und einen Ausschnitt des Spacers bei 100-facher Vergrößerung (B), jeweils aus dem inneren Bereich der Wicklung.

Fazit

Bei Verwendung eines vliesartigen Spacers konnte der Zellrückhalt ohne signifikante Verluste in der Proteinausbeute und Wiederfindung von 75 % auf 20 %, reduziert werden. Zudem hat der Vlies-Spacer keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität, was durch die Detektion der LDH-Aktivität vor und nach der Rezirkulation bestätigt werden konnte. Um die Zellablagerung zwischen eng anliegenden Fasern zu verhindern, müsste die faserartige Struktur des Vlies-Spacers weiter optimiert werden.

Trotz verbesserter Partikelgängigkeit der Einheit bei Verwendung des Vlies-Spacers stellen die in der Einheit irreversibel zurückgehaltenen Zellen eine potentielle Gefahrenquelle für die Reinheit des Zielproduktes dar. Wie bereits erwähnt können sich plötzliche Änderungen des pH-Wertes oder der Salzkonzentration negativ auf die Zellvitalität auswirken. Die Zellen sterben und es kann zu einer Zelllyse kommen. Durch den Verlust der Zellintegrität werden zellinterne Proteine, DNA, und andere Moleküle freigesetzt, die während der Elution zu einer Verunreinigung des Eluates führen.

Um die Reinheit des Eluates der Versuche mit netzartigem Spacer sowie vliesartigem Spacer zu überprüfen, wurden exemplarisch einige der Elutionsfraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese genauer untersucht (Durchführung siehe Anhang 6.4.7). Zusätzlich wurden Proben der Ausgangslösung vor und nach der Beladung der jeweiligen Einheit aus zellhaltigem Medium aufgetragen, um die Abreicherung des IVIGs zu überprüfen. Abbildung 4.4.20 zeigt ein 12 %iges SDS-Gel nach einer Silberfärbung.

Die selektive Abreicherung des Antikörpers während der Rezirkulation ist deutlich zu erkennen. Transferrin, als Bestandteil des Mediums, bindet nicht an der Membran (Spur 2/3 und 8/9). Die Proteinfärbung der Elutionsfraktionen (Spur 4-7 und 10-12) zeigen in beiden Versuchen unab-

hängig vom Grad des Zellrückhaltes keine Verunreinigungen, die durch zellinterne Proteine hervorgerufen werden.

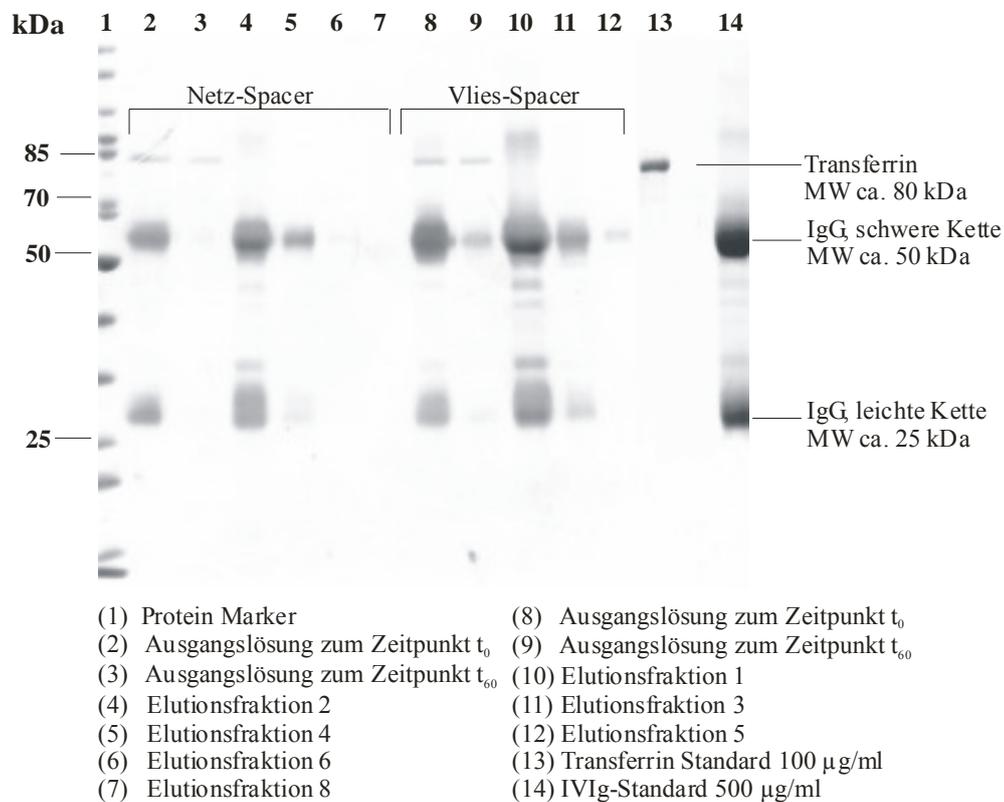


Abbildung 4.4.20: Reinheit der Elution nach der Antikörperbindung aus zellhaltigem Medium. 12%iges SDS-Gel (Silberfärbung). Visualisierung der Antikörperanreicherung während des Beladens und der Reinheit der Elution. Vergleich der Aufreinigung mittels Sartobind® Direct mit Netz- und Vlies-Spacer.

In weiteren Versuchen konnte aber gezeigt werden, dass die Zellen unter den Elutionsbedingungen (pH 2) lysieren und demnach zu einer Verunreinigung des Eluates beitragen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Partikelgängigkeit der Einheit gewährleistet ist. Wichtige Größen, die Ausschluss über die Reinheit des Eluates liefern und in weiteren Untersuchungen bestimmt werden sollten, sind z. B. die LDH-Aktivität sowie der DNA-Gehalt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Durch die in den letzten zehn Jahren gestiegene Nachfrage nach biotechnologisch hergestellten Produkten aus Säugetierzellen besteht die Notwendigkeit, die Produktionskapazitäten und die Effizienz der Prozesse zu erhöhen. Monoklonale Antikörper, die unter anderem als Therapeutika bei der Behandlung zahlreicher Krankheiten Einsatz finden, spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle. Sie zählen zu der am schnellsten wachsenden Gruppe von Biopharmazeutika. Die Anforderungen, die an einen Produktionsprozess mit Säugetierzellen gestellt werden, sind hoch. Um die Kapazität und Effizienz derartiger Prozesse zu steigern, muss jeder einzelne Prozessschritt optimiert werden. Neben der Weiterentwicklung der Reaktortechnik und einer Verbesserung der Expressionssysteme unterstützen die speziell für eine serumfreie Kultivierung entwickelten, chemisch definierten Medien in industriellen Produktionsprozessen das Wachstum und die Produktion der Säugetierzelllinien. Komplexe Vorgänge bei der Produktion und steigende Produkttiter erhöhen gleichzeitig den Bedarf nach einer verbesserten Prozessbeobachtung und Regelung. Gleichbleibende Produktqualität und Ausbeuten sind essentielle Faktoren für eine effektive Prozessführung. Daher ist es notwendig, in effizientere und schnelle Aufreinigungsstrategien zu investieren, um Zeit und Kosten des Produktionsprozesses zu senken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor diesem Hintergrund verschiedene, im Hinblick auf einen Produktionsprozess relevante, Prozessschritte am Beispiel der Kultivierung Antikörper produzierender Säugetierzellen untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchung, thematisch gegliedert und zusammengefasst sowie ein Ausblick für weiterführende Untersuchungen gegeben.

Adaption der Hybridom-Zellen an serumfreie Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurde die Antikörper produzierende Hybridom-Zelllinie IV F19.23 kultiviert und im Hinblick auf die spätere Aufreinigung an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert. Nach der Wahl eines geeigneten Mediums erfolgte die Adaption an serumfreie Kulturbedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass eine sequentielle Adaption der Zellen an das für Hybridom-Zellen optimierte Medium nicht nötig war. Eine serumfreie Kultivierung war unter den gegebenen Bedingungen ohne Einschränkung in der Zellproliferation und mit nur geringfügigen Produktivitätseinbußen möglich (vgl. Tabelle 4.1.1, Seite 38). Der im Vergleich zum serumhaltigen Medium minimale Proteingehalt und die damit verbundene relativ hohe Reinheit des Produktes nach Ende eines Kultivierungsprozesses sollten einen Aufreinigungsprozess des Antikörpers vereinfachen und dadurch eine hohe Kostenquelle der Produktion reduzieren.

Im Hinblick auf die Produktausbeute in einen Produktionsprozess müsste in weiterführenden Arbeiten die Produktivität der Hybridom-Zelllinie bei der Kultivierung in serumfreien Medium gesteigert werden. Die im Rahmen der Arbeit berechnete Produktivität stellt nur einen Mittelwert der Produktivität der Gesamtpopulation dar. Das Produktionsverhalten individueller Zellen innerhalb der Population ist oftmals sehr heterogen. Eine durchflusszytometrische Analyse könnte in diesem Zusammenhang die Bestimmung der Produktivität einzelner Zellen innerhalb der gesamten Zellpopulation ermöglichen. Die Selektion identifizierter hochproduzierender Zellen wäre mittels FACS (*fluorescent activated cell sorting*) in weiterführenden Arbeiten eine sinnvolle Strategie, um eine homogene Population besonders produktiver Hybridom-Zellen zu erhalten und die IgG-Produktion auf diese Weise zu steigern.

Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie

Aufgrund der komplexen Vorgänge bei der Produktion rekombinanter Produkte ist eine empfindliche und selektive Analytik nötig, die eine simultane Detektion verschiedener Prozessgrößen in Echtzeit erlaubt. In dieser Arbeit wurde die Einsatzmöglichkeit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie für eine Online-Analytik der Kultivierung einer Antikörper produzierenden CHO-Zelllinie aufgezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der 2D-Fluoreszenz in Kombination mit chemometrischer Datenauswertung (Hauptkomponentenanalyse und PLS1-Regression) für eine quantitative, zeitnahe und nicht-invasive Bestimmung einzelner Prozessgrößen unter den gewählten Bedingungen (Medium, Zelllinie, Kulturbedingungen) möglich war.

Wichtige Prozessgrößen wie der Konzentrationsverlauf des Zielproduktes (IgG), der Verlauf der Glukose- und Glutaminkonzentration sowie die LDH-Aktivität im Medium konnten mit einem mittleren Fehler $< 8 \%$ bei guter Korrelation ($R^2 > 0,96$) vorhergesagt werden, obwohl einige dieser Größen keine Eigenfluoreszenz aufweisen (vgl. Tabelle 4.2.2, Seite 56). Die Erstellung der Modellbildung wurde für jede Prozessgröße individuell durchgeführt, basiert aber auf der gleichen Spektrengrundlage, sodass eine simultane Detektion dieser Prozessgrößen aus dem Informationsgehalt der Spektren möglich ist. In Kombination mit einer stabilen Modellbildung könnte dieser Sensor möglicherweise die Offline-Analytik dieser Prozessgrößen ersetzen. Für standardisierte, sich wiederholende Kultivierungsprozesse unter identischen Bedingungen, wie sie in der industriellen Produktion auch bei Tierzellkultivierungen durchgeführt werden, könnte die Anwendung des BioView[®] Sensors demnach zu einer verbesserten Prozessüberwachung und Regelung beitragen.

Abhängig von den Kultivierungsdaten, die einen zum Teil sehr heterogenen Verlauf aufzeigten, wurden jedoch Unterschiede in der Güte der Vorhersage einzelner Prozessgrößen beobachtet. So war eine akzeptable Vorhersage der Zellzahl, insbesondere der Anzahl toter Zellen, sowie die

Vorhersage der Laktatkonzentration unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich. Ein möglicher Grund der schlechten Vorhersage liegt in dem Fehler der Offline-Analytik. Sind die Daten, die in die Modellbildung einfließen, mit einem durchschnittlich großen Fehler behaftet, so können bei der Korrelation der Daten möglicherweise Fehlinformationen in die Modellbildung einfließen, die die Vorhersage der jeweiligen Prozessgröße erschweren. Darüber hinaus ist es möglich, dass der Informationsgehalt, der für eine akzeptable Vorhersage dieser Prozessgröße notwendig wäre, nicht in den Fluoreszenzdaten enthalten ist.

Um die Stabilität der Modelle zukünftig zu erhöhen, müssten weitere Kultivierungsläufe unter identischen Kulturbedingungen in die Modellbildung einfließen. Hierbei könnte eine mehrmalige Probenahme sinnvoll sein. Sind die enthaltenen Informationen relevant, so würde ein größerer Datensatz bzw. eine größere Menge an Informationen, die in die Modelle einfließen, eine höhere Güte in der Vorhersage gewährleisten. Um die breite Anwendung der Analytik bei Produktionsprozessen mit Säugetierzellen zu untersuchen, sollte in weiterführenden Versuchen der Einfluss verschiedener Zelllinien, Medien und Kultivierungsbedingungen (*batch*-, *fed-batch*-, Perfusionssysteme) genauer untersucht werden. Darüber hinaus wäre die Anwendung anderer Auswertungsverfahren, wie z.B. die Anwendung neuronaler Netze sinnvoll, um die Güte der Vorhersage einzelner Prozessgrößen zu verbessern. Da die Fluoreszenz von zahlreichen Faktoren beeinflusst wird, ist es in diesem Zusammenhang wichtig, die Kultivierungsprozesse unter streng definierten Bedingungen (z.B. Medienzusammensetzung) durchzuführen.

Simultane Proteinanalytik in Kulturüberständen

Darüber hinaus wurden verschiedene HPLC basierte Methoden auf ihre Anwendbarkeit zur Trennung und simultanen Detektion von Antikörpern und anderen Medienproteinen wie Insulin und Transferrin untersucht. Die Versuche wurden beispielhaft an der Kultivierung der Antikörper produzierenden Hybridom-Zelllinie durchgeführt. Hierbei wurden zunächst auf Säulenchromatographie basierende Methoden wie die *reversed-phase* und die Größenausschlusschromatographie untersucht.

Eine Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften war nicht möglich. Ebenso stellte sich die Trennung der Proteine über eine Größenausschlusschromatographie trotz ihres unterschiedlichen Molekulargewichts als schwierig heraus. Mit beiden Methoden wurde eine nur unzureichende Trennung der Proteine erzielt. Zudem lagen die im Kulturüberstand enthaltenen Proteinkonzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze.

Eine Alternative zur herkömmlichen Säulenchromatographie bietet die *high performance monolithic disk*-Chromatographie (HPMDC). Die in Form sogenannter CIM[®]-Disks erhältlichen Chromatographiematerialien unterschiedlicher Funktionalität bieten den Vorteil niedriger

Analysezeiten. Unter Anwendung einer Affinitäts-Disk in Kombination mit einer Ionenaustauscher-Disk konnte eine sogenannte *conjoint liquid chromatography*-Methode (CLC) entwickelt werden. Hierfür wurden eine Protein G-Disk und eine CIM-QA -Disk in einer Haltevorrichtung platziert. Unter optimierten Bedingungen erfolgte die selektive Bindung des Antikörpers an die Protein G-Disk, während Insulin und Transferrin eine Wechselwirkung mit der QA-Disk eingehen konnten. Unter Anwendung eines Zweistufengradienten zur selektiven Elution konnte eine komplette Trennung der Proteine innerhalb von 10 min erreicht werden (vgl. Abbildung 4.3.7, Seite 72). Durch die Flexibilität des Injektionsvolumens an der präparativen HPLC konnte am Beispiel des Antikörpers gezeigt werden, dass eine quantitative Konzentrationsbestimmung auch für geringe Proteinkonzentrationen im $\mu\text{g/ml}$ Bereich möglich ist (vgl. Abbildung 4.3.8 Seite 73). Angesichts der Ergebnisse ist das basierend auf der Anwendung monolithischer Disks entwickelte CLC-System für eine Detektion der Einzelproteine im Kulturüberstand einsetzbar. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Salzkonzentration des Mediums die Proteinbindung an der QA-Disk unterbinden kann. Abhängig vom Bindungsverhalten des Proteins kann demnach im Vorfeld der Analyse eine Entsalzung der Probelösung erforderlich sein.

Für die Anwendung der CLC-Methode bei der schnellen Analytik von Insulin, Transferrin und des Antikörpers sollte in weiteren Versuchen eine Optimierung hinsichtlich der Analysenzeit erfolgen. Zudem müsste das Detektionslimit der einzelnen Proteine genauer untersucht werden. Aufgrund der flexiblen Kombination verschiedener Funktionalitäten ist das CLC-System auch für andere Fragestellungen interessant. In weiterführenden Versuchen sollte demnach die Anwendung für andere Proteine untersucht werden. Im Hinblick auf eine mögliche Sensor-Prozess-Kopplung, für die Online-Überwachung von Kultivierungsprozessen, wäre eine Kombination mit einer Fließinjektionsanalyse (FIA) denkbar. Die Anwendbarkeit in einer FIA sollte demnach Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Aufreinigung von Antikörpern mittels neuartiger Membranadsorbertechnologie

Im Hinblick auf die Steigerung der Effizienz von Aufreinigungsprozessen in der Antikörperproduktion wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Modul auf Basis der Membranadsorbertechnologie untersucht. Der Prototyp der Sartobind[®] Direct Einheit dient der direkten Produktisolierung aus zellhaltiger Lösung. Das Ziel des Verfahrens ist die Kombination der Partikelabtrennung, der Produktisolierung, Reinigung und der Aufkonzentrierung in einem Prozessschritt. Die Versuche wurden mit der an serumfreie Bedingungen adaptierte Hybridom-Zelllinie IV F19.23 durchgeführt. Aufgrund des niedrigen Produkttiters der Zellen erfolgte die Evaluierung mit einem Modell-Antikörper, dessen Konzentration im Kulturüberstand unter Anwendung einer SEC-Analytik erfolgte.

In statischen Versuchen aus zellfreier Lösung wurde eine maximale statische Bindungskapazität der Protein A modifizierten Membran von ca. $0,2 \text{ mg/cm}^2$ bestimmt. Die hohen affine Wechselwirkung wurde durch die ermittelte Dissoziationskonstante von $2,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ bestätigt. Unabhängig von der gewählten Temperatur erfolgte die vollständige Adsorption des Antikörpers an der Membran innerhalb von 2 h (vgl. Abbildung 4.4.2, Seite 78 und Abbildung 4.4.3, Seite 80). Für die Evaluierung der Antikörperaufreinigung aus zellhaltiger Lösung wurden Sartobind[®] Direct 2,5 ml Module mit einem netzartigen Spacer verwendet, der neben einer schnellen Proteinabreichung eine gute Partikelgängigkeit gewährleisten sollte. Die Untersuchungen zur Bindung des Antikörpers aus zellfreier und zellhaltiger Lösung haben ergeben, dass die Zellen einen nur minimalen Einfluss auf die Antikörperbindung ausüben. Neben einer hohen Produktausbeute konnte unabhängig von der Ausgangslösung eine akzeptable Wiederfindungsrate größer 90 % erzielt werden (vgl. Tabelle 4.4.5, Seite 89).

Die Untersuchung der Partikelgängigkeit der Module hat ergeben, dass während des Beladens der Einheit ein Zellrückhalt von 75 % stattgefunden hat (vgl. Abbildung 4.4.11, 92). Die Abnahme der Zellzahl wird dabei nicht durch eine scherstressbedingte Zellyse oder durch eine spezifische/unspezifische Wechselwirkung zwischen Zellen und der Protein A Membran hervorgerufen, sondern die Zellen werden aufgrund der Konstruktion aus Spacer und Membran in der Einheit mechanisch zurückgehalten. Eine Zellrückgewinnung durch Spülen des Moduls unter dem Einfluss einer erhöhten Flussrate, der Umkehrung der Fließrichtung sowie dem Einfluss von Ultraschall war nicht möglich.

Die Probleme, die durch eine irreversible Zellablagerung innerhalb des Moduls auftreten können, sind vielfältig. Demnach stand in weiteren Versuchen die Optimierung der Partikelgängigkeit der Einheit im Vordergrund. Die Art des Spacers hat dabei eine entscheidende Funktion. So konnten bei Verwendung eines faserartigen Vlies-Spacers gleicher Dicke bei vergleichbarer niedriger Zellyse, Proteinausbeute und Wiederfindungsrate eine um 70 % verbesserte Partikelgängigkeit gegenüber dem netzartigen Spacer erzielt werden (vgl. Tabelle 4.4.8, Seite 103).

Die nach wie vor bestehende irreversible Zellablagerung in der Einheit kann bei den harschen Elutionsbedingungen jedoch zu einer Zellschädigung und damit zu einer Verunreinigung des Eluates führen. Der Anforderung, eine 100 %ige Partikelabtrennung bei gleichzeitiger Produktisolierung, Reinigung und Aufkonzentrierung in einem Prozessschritt zu gewährleisten, konnte die Sartobind[®] Direct Einheit bei der Anwendung zur Aufreinigung von Antikörpern aus zellhaltiger Lösung nur bedingt gerecht werden. Der trotz verbesserter Partikelgängigkeit bei Verwendung eines Vlies-Spacers auftretende irreversible Zellrückhalt stellt hierbei das größte Problem dar. Dennoch ist dieses Modul eine viel versprechende Entwicklung, die nach weiterer Optimierung für eine direkte Aufreinigung Anwendung finden könnte.

Obwohl der Einfluss der Zellen auf die Antikörperbindung bei der für die Versuche gewählten Antikörper- und Zellkonzentration nur gering war, ist eine Blockierung der aktiven Membranoberflächen bei höherer Zellkonzentration nicht auszuschließen. Um genauere Aussagen über den Einfluss der Zellen auf das Bindungs- und Elutionsverhalten, die Antikörperausbeute und Wiederfindungsrate treffen zu können, müssten die Versuche mit einer Antikörperkonzentration nahe der maximalen Bindungskapazität und höherer Zelldichte wiederholt werden. Um die Abreicherungsgeschwindigkeit unter den gegebenen Bedingungen zu steigern, könnte die Flussrate bei der Beladung der Einheit erhöht werden. Hierbei müsste jedoch zuvor der Einfluss der Flussrate auf die Zellvitalität bestimmt werden, um eine mögliche Zellschädigung zu verhindern. Darüber hinaus müssten die Elutionsbedingungen optimiert werden, um den Aufkonzentrierungseffekt zu steigern. Ein möglicher Ansatz wäre die Elution nicht im *single-pass*-Betrieb, sondern ebenfalls wie die Beladung, im Rezirkulations-Betrieb durchzuführen. Auf diese Weise könnte das Elutionsvolumen minimiert werden.

Um sicherzustellen, dass diese Art der Aufreinigung darüber hinaus zu keinem Verlust der biologischen Aktivität des Zielproduktes führt, wären diese in weiteren Untersuchungen zu prüfen.

Der Zellrückhalt kann bei einer Lyse der Zellen zu einer Verunreinigung des Produktes mit intrazellulären Proteinen führen. Dies ist für nachfolgende Aufreinigungsschritte entscheidend und sollte in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Hierbei sollten vor allem die Detektion des DNA-Gehalts, der LDH-Aktivität sowie der Anteil von zelleigenen Proteinen oder Endotoxinen in der Elution, aber auch während der Beladung in der Ausgangslösung im Vordergrund stehen.

Im Hinblick auf die Wiederverwendbarkeit der Module im Speziellen bei der Verwendung teurer Protein-A-Membranfunktionalitäten wäre eine Optimierung der Partikelgängigkeit notwendig. In weiteren Versuchen sollten daher die Beschaffenheit des vliesartigen Spacers auf seine Durchlässigkeit hin optimiert werden. Zudem müssten Bindungs- und Elutionsverhalten verbessert werden, um Zeit und Kosten zu sparen und den Aufkonzentrierungseffekt zu verstärken.

6. Anhang

6.1. Medien und Puffer

Alle im Folgenden beschriebenen Medien und Puffer werden mit deionisiertem Wasser (ARIUM, Sartorius AG, Göttingen) hergestellt, welches im Folgenden mit ddH₂O bezeichnet wird.

DMEM/Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

Die 1:1 Mischung dieser Medien erhöht durch Zugabe des DMEM den Nährstoffgehalt des Ham's F-12. Das Pulver wurde mit NaHCO₃ nach Herstellerangabe versetzt und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Anschließend wurde das Medium steril filtriert. Dabei erhöht sich der pH-Wert um 0,1-0,2 pH-Einheiten.

PBS-Puffer (10 mM, pH 7,4)

140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,2 mM Na₂HPO₄, 14,7 mM KH₂PO₄

6.2. Zelllinien

Hybridom-Zelllinie

Die Suspensions-Zelllinie IV F19.23 wurde von Schmieding et al. hergestellt. [206] Die Zellen, die einen monoklonalen Antikörper (IgG₁) gegen Penicillin G Amidase aus *E. coli* ATCC 11105 produzieren, sind nach Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit gereinigter Penicillin G Amidase aus der Fusion der Milzzellen mit PAI/O Myelomzellen hervorgegangen.

CHO-Zelllinie

Die von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) zur Verfügung gestellte, in Suspension zu kultivierende Zelllinie dient für die Untersuchung der Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die Prozessüberwachung. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden an dieser Stelle keine genauen Angaben über die Zelllinie und den von ihr produzierten Antikörper gegeben.

6.3. Modell-Proteine

Intravenöses Immunglobulin (IVIg)

Der humane, polyklonale Antikörper IVIg wurde als Lösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml verwendet. Der polyklonale Modell-Antikörper IVIg setzt sich aus den vier Isotypen von

Immunglobulin G (IgG) zusammen: IgG₁ (64,6 %), IgG₂ (28,6 %), IgG₃ (5,7 %) und IgG₄ (1,1 %), wobei der Gesamtgehalt an IgG 98 % vom Gesamtprotein ausmacht.

Insulin

Humaninsulin wurde als Lösung in HEPES-Puffer, 25 mM, pH 8,2 mit einer Konzentration von 10 mg/ml Insulin von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) verwendet.

Transferrin

Aus dem Feststoff Humantransferrin von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) wurde eine Stammlösung in ddH₂O mit 20 mg/ml Transferrin hergestellt, aliquotiert und bei -18 °C aufbewahrt.

6.4. Methoden

6.4.1. Stammkultivierung der Zelllinien

Hybridom-Zelllinie

- Serumhaltig: Die Hybridom-Zellen wurden in DMEM/Ham's F-12 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) versetzt mit 5 % Pferdeserum, 10 % Penicillin (100 U/ml), 10 % Streptomycin (100 µg/ml) und 10 % Glutamin (200 mM) kultiviert.
- Serumfrei: Für die Adaption an serumfreie Kulturbedingungen wurden drei serumfreie Medien untersucht. Panserin™ PX10 und Panserin™ PX401 der Firma PAN Biotech GmbH (Aidenbach) und das Medium Gibco™ Hybridoma-SFM der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Es handelt sich hierbei um serumfreie, proteinarme Medien. Für die Kultivierung der Zellen wurden diese Medien mit 10 % Penicillin (100 U/ml), 10 % Streptomycin (100 µg/ml) versetzt. Neben unbekannt Substanzen enthalten die Medien unterschiedlich hohe Anteile an Glukose und Glutamin.

CHO

Die Kultivierung der CHO-Zelllinie erfolgte in einem von der Firma Roche speziell angefertigten, serumfreien Medium unbekannter Zusammensetzung ohne Zusatz von Antibiotika. Es wurde ein Anzuchtsmedium sowie ein Fermentationsmedium zur Verfügung gestellt.

Kultivierung

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde in 20 ml vorgelegtes Kulturmedium überführt und bei 220 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, um das cytotoxisch wirkende Dimethylsulfoxid

(DMSO) zu entfernen. Die jeweiligen Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert. Die Stammkultivierung erfolgte in Spinnerflaschen (125 ml, 250 ml) in einem Inkubator bei 37 °C in einer feuchten 5 %iger CO₂-Atmosphäre bei einer Rührgeschwindigkeit von 25 min⁻¹.

- Die Animpfdichte der Hybridom-Zellen betrug $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert, um ein dauerhaftes Wachstum ohne Substratlimitierung aufrecht zu erhalten. Dazu wurden die Zellen bei 400 g 3 min zentrifugiert und in frischem, 37 °C warmen Medium aufgenommen.
- Die Animpfdichte der CHO-Zellen betrug $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Das Passagieren der CHO-Zellen erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase alle 3-4 Tage. Dazu wurden die Zellen bei 220 g für 8 min zentrifugiert und in frischem, 37 °C warmen Medium aufgenommen.

6.4.2. Kryokonservierung der Zelllinien

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgt bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Die Hybridom-Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium (serumhaltig/ serumfrei) mit 10 % (v/v) DMSO und mit einer Zelldichte von $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml pro Kryoröhrchen eingefroren.

Die CHO-Zellen wurden in Kulturmedium mit 8 % (v/v) DMSO mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml pro Kryoröhrchen eingefroren. Der Einfriervorgang erfolgte hierbei über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80 °C, um die Zellsuspension langsam abzukühlen. Nach 24 h wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

6.4.3. Anlegen einer Master- und Arbeitszellbank

Vor Beginn der Versuchsreihe wurden die Zellen nach dem Ankultivieren einmal passagiert. Auf diese Weise wird eine stabilere Kultur als nach dem Auftauen erhalten. Um die Anzahl der Passagen gering zu halten und einem möglichen Produktivitätsverlust vorzubeugen, wurden im Vorfeld der Versuche Zellbanken angelegt. Nach dem Ankultivieren der Zellen wurde aus einer stabil wachsenden Kultur eine sogenannte Masterzellbank nach der in Abschnitt 6.4.2 beschriebenen Vorgehensweise angelegt. Eine dieser Kulturen wurde aufgetaut und erneut ankultiviert. Nach zwei Passagen wurde aus dieser Kultur eine weitere Zellbank, die sogenannte Arbeitszellbank angelegt. Um gleiche Ausgangsbedingungen für die jeweiligen Versuche sicher zustellen, wurde für jede Versuchsreihe auf diese Arbeitszellbank zurückgegriffen und eine neue Vorkultur angesetzt.

6.4.4. Kultivierung der Hybridom-Zelllinie in Spinnerflaschen

Die Vorkulturen wurden in 125 ml-Spinnerflaschen mit 50 ml Medium kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase wurden die Zellen in eine 250 ml-Spinnerflaschen mit 100 ml Medium

passagiert. Das Animpfen der Spinnerkulturen für die Versuche erfolgte mit einer Zelldichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wurden mit einer Rührgeschwindigkeit von 25 min⁻¹ in Suspension gehalten. Der Gasaustausch fand über den Kopfraum der Kulturflasche statt. Für die Versuche wurden jeweils drei 250 ml-Spinnerflaschen mit 100 ml Medium befüllt um eine Dreifachbestimmung durchzuführen. Die Probenahme erfolgte einmal täglich. 1 ml Probe wurde entnommen. Prozessgrößen wie Zellzahl (lebend/tot), Vitalität, Glukose, Laktat, die Aminosäure Glutamin und die IgG-Konzentration wurden nach den in Abschnitt 6.4.6 beschriebenen Methoden bestimmt.

6.4.5. Kultivierung der CHO-Zelllinie im 400 ml Edelstahlreaktor

Die Vorkulturen wurden in 250 ml-Spinnerflaschen mit 100 ml Anzuchtsmedium kultiviert. Nach Erreichen der exponentiellen Phase (in der Regel alle 3 Tage) wurden die Zellen in zwei 250 ml-Spinnerflaschen mit einer Animpfdichte von $4 \cdot 10^5$ Zellen/ml überführt.

Aus der Vorkultur wurde der Reaktor mit $6 \cdot 10^5$ Zellen/ml in 375 ml Fermentationsmedium angeimpft. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C, pH 7, 85 min⁻¹, bei einem Gelöstsauerstoffanteil von 50 %. Im Abstand von 12 h wurden 3 ml Probe entnommen. Die Konzentration folgender Prozessgrößen wurden während der Kultivierung nach den in Abschnitt 6.4.6 beschriebenen Analyseverfahren bestimmt: Zellzahl (lebend/tot), Glukose, Laktat, Laktatdehydrogenase (LDH) nach dem Testprinzip 1, und die Aminosäuren Glutamin und Glutamat. Die Proben für die spätere Antikörperanalytik wurden bei – 80 °C gelagert. Die Analytik des Antikörpers wurde mittels Protein A Affinitätschromatographie von der Firma Roche selbst durchgeführt. Eine genaue Durchführung ist nicht bekannt.

6.4.6. Offline-Analytik

Zellzahlbestimmung

100 µl Zellprobe wurden 1:1 mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung gemischt. Der Farbstoff diffundiert durch die defekte Zellmembran toter Zellen, sodass eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich ist. Die Zellsuspension wird in eine Neubauerzählkammer pipettiert und unter einem Phasenkontrastmikroskop (Qlympus bei 200facher Vergrößerung) ausgezählt. Um Fehler durch z.B. mangelnde Durchmischung zu minimieren, wurde aus vier Zählungen der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\text{Zelldichte} \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \left(\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \right) \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$$

Aus dem Quotienten der Lebend-Zellzahl und der Gesamtzellzahl wurde die Vitalität [%] bestimmt.

Glukose-/ Laktatbestimmung

Die Konzentrationen an Glukose und Laktat im Kulturüberstand wurden nach Zellzentrifugation (3 min, bei 400 g) mit dem YSI 2700 SELECT Analyzer (YSI Yellow Springs Instruments, OH, USA) ermittelt.

Aminosäure HPLC

Die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin und Glutamat im Kulturüberstand wurden mittels RP-HPLC (C18 Säule, 5 μ m, 3,9x150 mm, Waters Resolve) nach Vorsäulen-Derivatisierung mit Ortho-Phtaldialdehyd (Opa) ermittelt. Probenvorbehandlung: Zur Fällung der unerwünschten Proteine wurden 100 μ l zellfreier Kulturüberstand in 400 μ l eiskaltes Methanol geträufelt. Durch die Lagerung bei -20 °C für 24 h wurde die Fällung vervollständig. Die gefällten Proteine wurden zentrifugiert (1000 g, 3 min) und der Überstand mit Boratpuffer entsprechend verdünnt (pH 10).

Verwendete Puffer und Lösungen:

- OPA-Reagenz: 270 mg Ortho-Phtaldialdehyd wurde in 5 ml Ethanol aufgelöst. 200 μ l Mercaptoethanol wurden zugefügt und mit 0,4 M Boratpuffer (12,36 g Borsäure/500 ml) pH 9,5 auf 50 ml aufgefüllt.
- Eluent A: 13,6 g Natriumacetat-Trihydrat und 12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei) wurden in 2 l ddH₂O gelöst. 5 ml 10 M NaOH werden zugegeben und mit der NaOH auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde filtriert. 42 ml THF und 42 ml MeOH werden zugegeben.
- Eluent B: 54 % MeOH und 46 % ddH₂O (v/v).

Laufbedingungen: Flussrate 1 ml/min; 30 °C

Detektion: Fluoreszenzdetektor RF-10AxL (Shimadzu, Duisburg) bei Ex 330/ Em 420 nm

Tabelle 6.4.1: Lösemittelgradient für die Aminosäure HPLC.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
50	0	100
55	0	100
60	100	0
67	100	0

Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität

Informationen über Zellschädigung lassen sich durch die Bestimmung intrazellulärer Enzyme erhalten, die durch Verletzung der Zellmembran bzw. Zellkompartimente (durch z.B. Scherstress) in das Medium abgegeben werden. Eines der intrazellulären Enzyme ist die Laktatdehydrogenase (LDH), die im Cytoplasma der Zelle vorkommt und nach einer Zellschädigung im Medium nachweisbar ist. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand gibt einen Hinweis auf den Anteil lysierter Zellen. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturmedium wurde in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten bestimmt. Die jeweiligen Testprinzipien wurden nachfolgend vorgestellt.

Testprinzip 1

Die Bestimmung der LDH-Aktivität in den Kulturüberständen der CHO-Kultivierungen erfolgte über die Methode der Anfangsgeschwindigkeit. Das Testprinzip beruht auf einer enzymatischen Reaktion. In Anwesenheit von LDH wird NADH zu NAD⁺ oxidiert, Pyruvat zu Laktat reduziert.



Das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite von Laktat und NAD⁺. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme wird photometrisch bestimmt und ist der LDH-Aktivität proportional. Messgröße ist die Extinktion bei 340 nm.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- 70 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
- 4 mM Pyruvat-Lösung
- 0,7 mM NADH-Lösung (NADH vor dem Abwiegen auf RT bringen)

Vorbereitung:

- Zentrifugierte Kulturproben dürfen zuvor nicht eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Zwischenlagermöglichkeit bei 2 - 8 °C, maximal 4 Tage.
- Kulturüberstände gegebenenfalls mit Kaliumphosphatpuffer so verdünnen, dass die LDH-Aktivität in einen Messbereich von 20 bis 200 U/L liegt.
- Reaktionslösung: 1:1 Mischung aus Pyruvat- und NADH-Lösung kurz vor Versuchsbeginn täglich frisch in einem Braunglasfläschchen ansetzen und die Lösung im Wasserbad auf 35 °C temperieren.
- Kaliumphosphatpuffer: im Wasserbad auf 35 °C temperieren

- Plattenlesegerät: Spektrophotometer „Multiskan“ auf 32 °C vortemperieren.

Durchführung:

- 50 µl Kulturprobe wurden pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Als Blindwert dient der Kaliumphosphatpuffer
- Nach dem Auftragen der Proben (mind. Doppelbestimmung) wurde die Mikrotiterplatte in den auf 32 °C vortemperierten Plattenlesegerät gelegt.
- Schütteln der Mikrotiterplatte für 2 min bei 32 °C.
- 150 µl Kaliumphosphat-Puffer (35 °C) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte geben.
- Schütteln der Mikrotiterplatte für 2 min bei 32 °C.
- 100 µl der Reaktionslösung (35 °C) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte geben.
- 3 s schütteln und Kinetik starten (Messintervall alle 10 s über einen Zeitraum von 170 s)

Berechnungsgrundlage der Enzymaktivität in U/L:

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot 1000}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot \Delta t \cdot V_{\text{Probe}}} \left[\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \right]$$

ΔE : Extinktionsänderung

V_{gesamt} : Gesamtvolumen [ml]

ϵ : mikromolarer Extinktionkoeffizient (NADH = 0,63 ml · mol⁻¹ · cm⁻¹)

d : Schichtdicke 0,857 cm

Δt : Zeitintervall [min]

V_{Probe} : Probenvolumen [ml]

Die Messung wird in der Auswertung berücksichtigt, wenn

- E_0 (Probe) \geq ca. 70 % E_0 (Blindwert)
- Steigung pro Minute $\leq -0,00075$ (geringere Steigungen deuten auf LDH-Aktivität unterhalb der Bestimmungsgrenze hin)
- Die Korrelation der linearen Extinktionsabnahme sollte $\geq 0,998$ sein

Testprinzip 2

Die Bestimmung der LDH-Aktivität in Kulturüberständen der Hybridom-Zellen während der Aufreinigung über Sartobind[®] Direct Einheiten erfolgte anhand eines kolorimetrischen Tests (LDH *Cytotoxicity detection kit*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Das Testprinzip beruht ebenfalls auf der enzymatischen Umwandlung von Laktat zu Pyruvat durch Reduktion von NAD⁺ zu

NADH/H⁺. In einer zweiten Redoxreaktion wird NADH/H⁺ wieder zu NAD⁺ oxidiert. Die freien H⁺-Ionen werden auf das gelbfarbene Tetrazoliumsalz übertragen. Dadurch wird dieses zu einem rotfarbenen Formazansalz reduziert. Diese Farbbildung wird nach einem Zeitraum von 30 min durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Menge an gebildetem Formazansalz ist proportional zur der Anzahl an lysierten Zellen. Je höher die LDH-Aktivität, desto intensiver die Färbung. Die Proben wurden für die Analyse 1:2 verdünnt, sodass die gemessene Absorption unterhalb einer Absorptionseinheit (AU) lag. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Für die Bestimmung einer Kalibrationsgeraden wurden verschiedene Konzentrationen eines LDH-Standards in Kulturmedium (Gibco™ Hybriodma-SFM, Invitrogen, Karlsruhe) angesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen in einem Aktivitätsbereich des Enzyms von 0,5 bis 50 U/l. Die Standardkonzentrationen wurden nach Herstellerangaben (LDH *Cytotoxicity detection kit*) vermessen. Durch die Auftragung der Aktivität gegen die gemessene Absorption ergibt sich ein linearer Zusammenhang (siehe Abbildung 6.4.1). Die unbekannte LDH-Aktivität in den Kulturüberständen kann anhand der gemessenen Absorption bei 490 nm über die ermittelte Geradengleichung bestimmt werden.

- LDH-Standard: *rabbit muscle* L-LDH (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

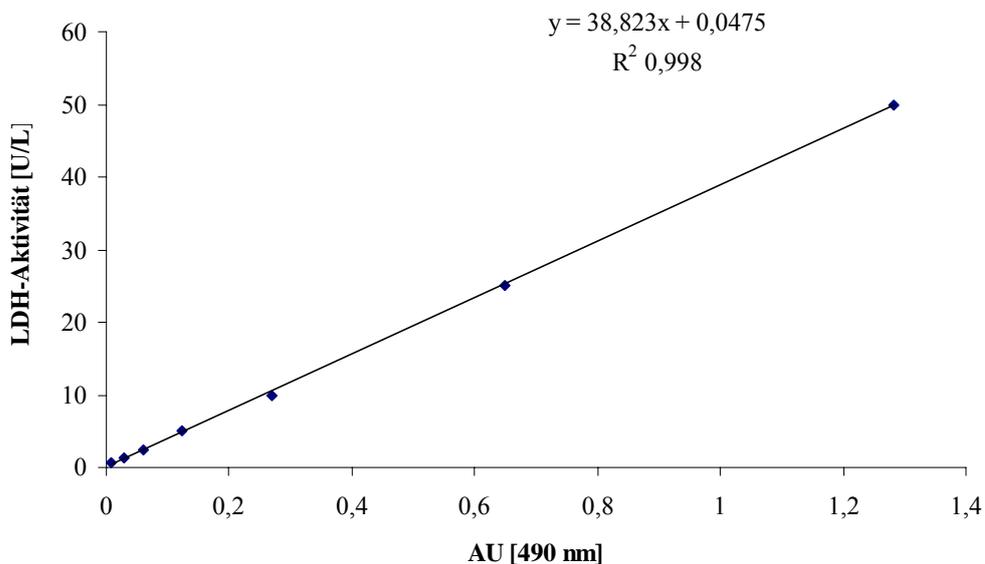


Abbildung 6.4.1: Kalibrationsgerade für die Bestimmung der LDH-Aktivität.

Korrelation der Zellzahl zur LDH-Aktivität

Für eine Korrelation der Zellzahl zur LDH-Aktivität wurden verschiedener Zellkonzentrationen ($0,1 \cdot 10^6$; $0,5 \cdot 10^6$; $1,0 \cdot 10^6$; $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) verwendet. Die Zellsuspensionen unterschiedlicher Konzentration (Dreifachbestimmung) wurden für einen Zeitraum von 2 h in einem Thermoschüttler bei 400 min^{-1} und 37 °C in Lysis-Puffer inkubiert. Ein Zeitraum von 2 h gewährleistet unter den gewählten Bedingungen eine komplette Lyse der Zellen, ohne dass die Enzymaktivität beeinträchtigt wird. Nach erfolgter Zellyse wurden die Proben bei 400 g für 3 min zentrifugiert. Die Proben wurden so verdünnt, dass die gemessene Absorption unterhalb einer AU lag. Für die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand wurde nach erfolgtem kolorimetrischen Test (Testprinzip 2) die Absorption bei 490 nm bestimmt. Unter Berücksichtigung der vorherigen Probenverdünnung ergibt sich durch die Auftragung der relativen Absorption gegen die gewählte Zellzahl ein linearer Zusammenhang (vgl. Abbildung 6.4.2).

Lysis-Puffer: 2 % Triton X 100 in Zellkulturmedium

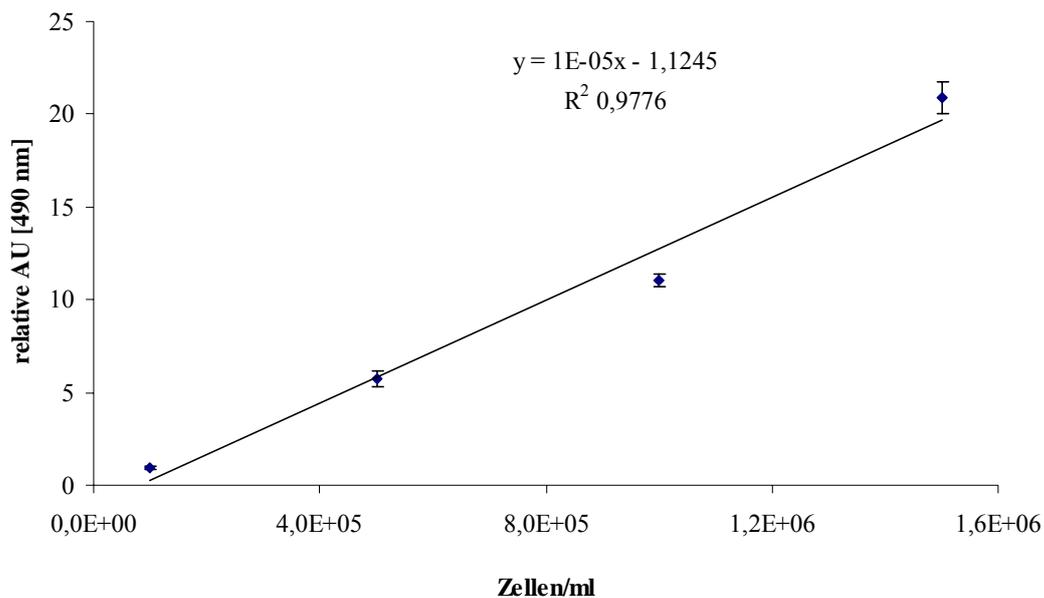


Abbildung 6.4.2: Maximal detektierbare LDH-Aktivität nach kompletter Zellyse verschiedener Zellkonzentrationen. Verwendeter kolorimetrischer Test: LDH *Cytotoxicity detection kit* (Roche), Messung der Absorption bei 490 nm.

Für die Bestimmung der maximal möglichen LDH-Aktivität bei kompletter Lyse einer bestimmten Zellzahl kann anhand der ermittelten Geradengleichung aus Abbildung 6.4.2 zunächst die theoretische Absorption bei 490 nm ermittelt werden. In einem zweiten Schritt kann die ermittelte Absorption mit Hilfe der Geradengleichung aus Abbildung 6.4.1 in die LDH-Aktivität

umgerechnet werden. Die auf diese Weise erhaltene Aktivität entspricht der bei einer bestimmten Zellzahl maximal möglichen LDH-Aktivität bei kompletter Zellyse.

Maus IgG-ELISA

Die Bestimmung des IgG-Gehalts im Kulturüberstand der Hybriom-Zellen erfolgt anhand eines spezifischen Maus-IgG ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Proben wurden für die Analyse in einem Verhältnis 1:500 mit *Blocking*-Puffer verdünnt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

6.4.7. Gelelektrophorese

Bei einer Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) –Polyacrylamidgellelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Eigenladungen der Proteine werden dabei mit SDS, einem anionischen Detergenz, maskiert, sodass sich eine relativ konstante Ladungsverteilung ergibt. Diese sorgt dafür, dass sich die Proteine nur abhängig von ihrer Masse und dem Vernetzungsgrad des Gels in einem elektrischen Feld bewegen. Als Trennmedium wird bei dieser Elektrophorese ein Gel auf Polyacrylamidbasis verwendet. Die Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen hängt dabei von der angelegten Spannung ab.

Zur Probenvorbereitung werden die Analyten mit einem Überschuss SDS versetzt und auf 95 °C erhitzt, wodurch Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgebrochen werden. Durch vorherige Zugabe von reduzierend wirkendem 2-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken gespalten und dadurch das Protein irreversibel denaturiert. Antikörper beispielsweise werden durch 2-Mercaptoethanol in die jeweiligen leichten und schweren Ketten aufgetrennt.

Verwendete Puffer:

- SDS-Probenpuffer: 20 mM Tris, 2 mM EDTA (als Natrium-Salz), 5 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau in 90 ml ddH₂O gelöst. Unmittelbar vor der Verwendung werden dem Puffer 10 % 2-Mercaptoethanol sowie 10 % Glycerin zugesetzt.
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3 („1x TGS“)

Zur Herstellung eines Polyacrylamid-Gels wurde zunächst ein Trenngel angemischt und zwischen die beiden Glasplatten einer Gießapparatur gegeben (4,5 ml pro Gel). Nach erfolgter Polymerisation (etwa 30 min) wurde das Trenngel mit einem Sammelgel (6 %ig) überschichtet. Zur Generierung von Taschen im Gel wird unmittelbar nach Einfüllen des Sammelgels ein Kamm in dieses hineingesteckt. Sobald das gesamte Gel auspolymerisiert ist (erneut etwa 30 min), kann es zur Elektrophorese eingesetzt werden.

Tabelle 6.4.2: Vorschrift zur Herstellung der Sammel- und Trenngele für die SDS-Gelelektrophorese.

	Sammelgel	Trenngel 12 %ig	Trenngel 16 %ig
Acrylamid (40 %ig)	731 μ l	2,92 ml	3,9 ml
<i>N, N'</i> -Methylen-Bisacrylamid (2 %ig)	390 μ l	1,56 ml	2,08 ml
Tris (1,5 M) pH 8,8	-	2,8 ml	2,8 ml
Tris (1,5 M) pH 6,8	760 μ l	-	-
SDS (1 %ig)	300 μ l	1 ml	1 ml
ddH ₂ O	3,82 ml	1,76 ml	226 μ l
TEMED	12 μ l	25 μ l	25 μ l
APS	12 μ l	25 μ l	25 μ l

Die Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt und bei 95 °C für 5 min inkubiert, sowie anschließend 3 min bei 4000 g zentrifugiert. Das vorbereitete Gel wird in der Laufkammer befestigt und „1x TGS“-Laufpuffer eingefüllt. Die vorbereiteten Proben sowie ein Protein-Marker werden in die Taschen des Gels pipettiert. Zunächst wird eine Spannung von 100 V angelegt, bis sich die Proben in einer dünnen Bande gesammelt haben (ca. 30 min). Anschließend wird die Gleichspannung auf 200 V erhöht, bis die Elektrophorese beendet ist (ca. 90 min).

Nach erfolgter Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine je nach anfänglich verwendeter Proteinkonzentration über eine Coomassie- oder Silberfärbung nachgewiesen

Coomassie-Färbung

Bei dieser semi-quantitativen Methode werden Nachweisgrenzen im Bereich von 1-0,2 μ g pro Bande erreicht. Das Gel wird für ca. 30 min in eine Coomassie-Färbelösung gegeben. Dieser Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an und führt damit zu einem unspezifischen Nachweis der Proteine. [26]

Verwendete Lösungen:

- Färbelösung: PhastGel Blue R-Tablette, 80 ml ddH₂O, 120 ml Methanol
- Entfärber: 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure in ddH₂O

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung von Proteinen werden Silberionen an Aminosäureseitenketten gebunden und anschließend reduziert. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung ist empfindlicher als die

Coomassie-Färbung und liegt unter 1 ng pro Bande. [26] Sie dient besonders der Prüfung der Reinheit eines Proteins.

Verwendete Lösungen:

- Fixierer/ Entfärber: 45 % EtOH, 45 % ddH₂O, 10 % Essigsäure
- *Farmers Reducer*-Lösung (1 Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat III, 1 Spatelspitze Natriumthiosulfat und 100 ml ddH₂O)

Durchführung:

- Gel für 30 min im Entfärber/Fixierer inkubieren.
- 2 x kurz mit ddH₂O waschen.
- Gel für 2,5 min in *Farmers Reducer*-Lösung schwenken.
- 2 x für 5 min mit ddH₂O waschen.
- Zur Komplexbildung von Silberionen das Gel 30 min in 0,1 %ige Silbernitratlösung inkubieren.
- 2 x 30 s mit ddH₂O waschen.
- Gel mit 2,5 %iger Na₂CO₃-Lösung waschen und Lösung verwerfen.
- Zur Entwicklung der Banden wird das Gel solange in 100 ml 2,5 %ige Na₂CO₃-Lösung + 500 µl Formaldehyd inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar werden.
- Zum Stoppen der Reaktion wird das Gel für 10 min in 5 %iger Essigsäure geschwenkt.
- Die Lagerung des Gels erfolgt in ddH₂O

6.4.8. Westernblot

Der Westernblot ermöglicht es, einzelne Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen. Zunächst werden die Proteine über SDS-Gelelektrophorese getrennt. Von diesem Gel werden die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen

Verwendete Puffer und Reagenzien:

- Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % EtOH; pH 8,3
- TBS: 25 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7,4
- TBST: TBS + 0,05 % Tween 20
- Blockpuffer: TBST + 2 % BSA
- AP-Puffer: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂; pH 9,5

- Antikörper: *anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate from sheep* (aus Maus IgG ELISA Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Im Verhältnis 1:3000 mit TBST verdünnt.

Durchführung

- Die PVDF-Membran wird kurz in unvergälltem EtOH gewaschen.
- Das SDS-Gel, die Membran, 2 Filterpapiere und 2 Filz pads werden getrennt voneinander 30 min in Transferpuffer geschwenkt.
- Die Trans-Blot-Zellkammer wird nach Herstellerangaben zusammengesetzt und mit dem Transferpuffer gefüllt. Um Dizieptation durch Hitzebildung zu vermeiden, wird der Puffer vor dem Einsatz gekühlt und zusätzlich ein Kühlaggregat in die Transferkammer gegeben.
- Während des Blottens wird der Puffer durch einen Magnetrührer vermischt.
- Die Transferdauer beträgt 1 h bei 100 V.
- Im Anschluss an den Transfer wird der Bereich der Membran, der den Molekulargewichts-Marker enthält abgeschnitten und 1 h lang mit Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend wird mit Coomassie-Entfärberlösung entfärbt und die Entfärbung mit ddH₂O gestoppt.
- Die restliche Membran wird 1 h lang in Blockpuffer geschwenkt.
- Anschließend wird die Membran für 1 h in der Antikörper-Lösung inkubiert.
- Es wird dreimal jeweils 5 min mit TBST und zweimal für 10 min mit TBS gewaschen.
- Abschließend wird die Membran 5 min in AP-Puffer gewaschen.
- Die Farbentwicklungslösung wird aus 100 ml AP-Puffer, je 1 ml Farbreagenz 1 und Farbreagenz 2 hergestellt (beide Farbreagenzien sind im *alkaline phosphatase conjugate substrate kit* enthalten, ebenso der AP-Puffer).
- Die Membran wird in der Farbentwicklungslösung geschwenkt, bis rot-lila gefärbte Banden sichtbar werden.
- Die Färbung wird mit ddH₂O gestoppt und die Membran an der Luft getrocknet.

6.4.9. 2D-Fluoreszenzmessung (BioView[®] Sensor)

Für die Online-Messung bei der CHO-Kultivierung wurde der BioView[®] Sensor der Firma DELTA Light & Optics (Hørsholm, Dänemark) eingesetzt. Es handelt sich um ein robustes Fluoreszenzspektrometer, das speziell für die industrielle Anwendung konzipiert wurde.

Aufbau und Messprinzip

Über zwei unabhängig voneinander rotierende Filterräder mit je 16 verschiedenen Filtern wird für jede Wellenlänge der Exzitation (Ex) im Bereich von 270 nm bis 550 nm die jeweilige Emission

(Em) im Bereich von 310 nm bis 590 nm gemessen. Zusätzlich kann über zwei Neutraldichtefilter (Exnd und Emnd) das wellenlängenabhängige Streulicht aufgenommen werden. Die Schmalbandinterferenzfilter besitzen eine Bandbreite von 20 nm. Die Aufnahme eines kompletten Spektrums dauert 90 s. Über die mitgelieferte Software lassen sich unter anderem die Filter individuell auswählen, die Intensitäten der Fluoreszenz über den Photomultiplier-Gain steuern sowie die Anzahl der Messungen zur Mittelwertbildung festlegen.

Die Datenübertragung erfolgt optisch, um elektromagnetische Störungen zu unterbinden. Als Lichtquelle dient eine gepulste Xenon-Blitzlichtlampe, die bei langer Lebensdauer eine hohe Lichtintensität gewährleistet. Die Fluoreszenzmessung findet direkt im Reaktor (*in-situ*) statt. Der BioView-Sensor ist dabei über Flüssiglichtleiter mit dem Reaktor verbunden, der Sensorkopf wird an einen 25mm-Standardport gekoppelt, in dem ein speziell angefertigter Stutzen mit Quarzglasscheibe die Sterilität des Prozesses garantiert und eine nicht-invasive Prozessbeobachtung ermöglicht. Der Aufbau und das Messprinzip des BioView[®] Sensors sind in Abbildung 6.4.3 dargestellt.

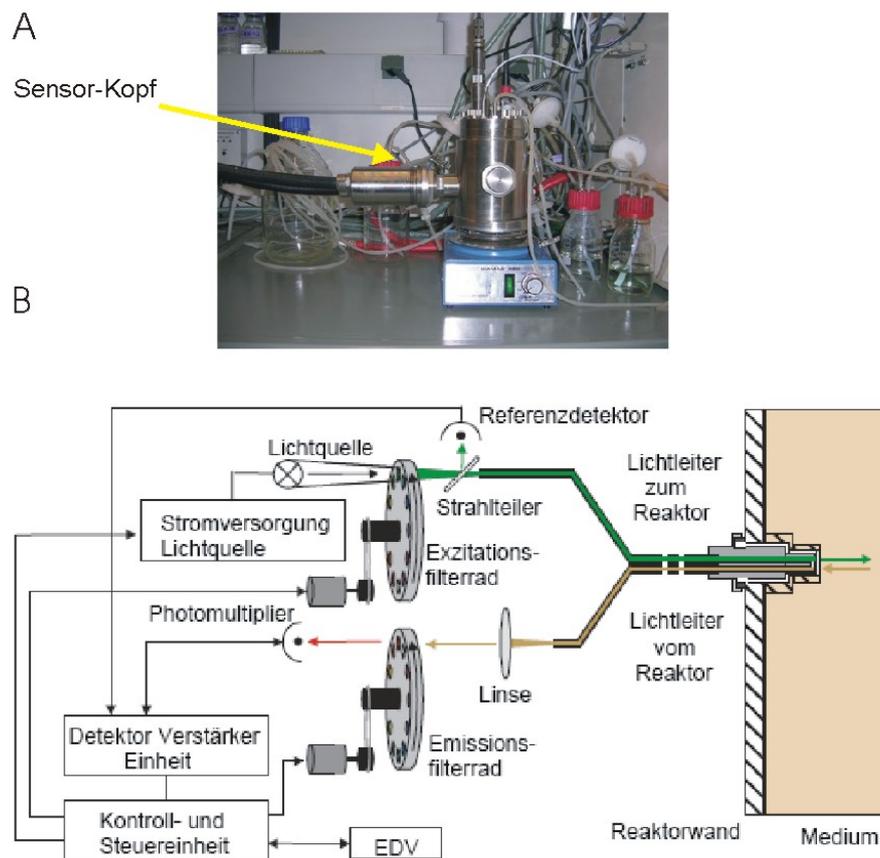


Abbildung 6.4.3: Aufbau und Messprinzip des BioView[®] Sensors. (A) Ankopplung an den Reaktor. (B) Schematischer Aufbau.[57]

Durch die Aufnahme eines 2D-Fluoreszenzspektrums werden verschiedene zu analysierende Substanzen simultan erfasst. Da die Fluoreszenzintensität nicht nur von der Konzentration sondern auch von physikalischen und chemischen Wechselwirkungen im Reaktor und gerätespezifischen Größen abhängig ist, werden mit dem BioView-Sensor lediglich relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) gemessen. Die Fluorophore werden anhand der Lage ihrer Absorptions- und Fluoreszenzmaxima charakterisiert, wobei im realen Medium zumeist leichte Abweichungen von den Literaturwerten gefunden werden. Abbildung 6.4.4 gibt einen Überblick über die Lage relativer Fluoreszenzbereiche wichtiger Fluorophore.

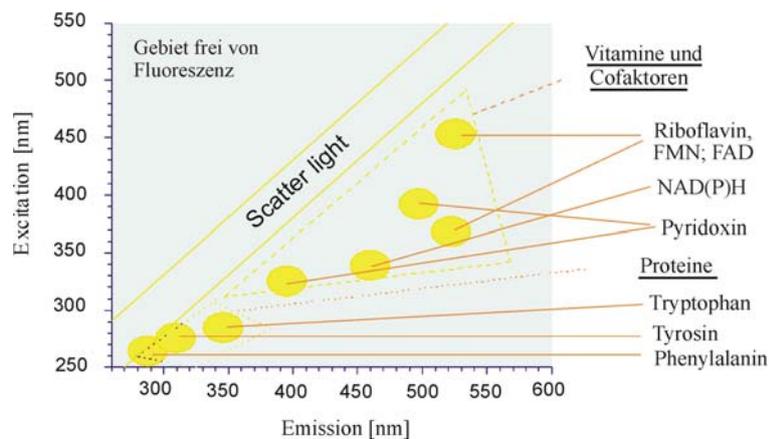


Abbildung 6.4.4: Relative Lage der Fluoreszenzmaxima wichtiger biogener Fluorophore.

Tabelle 6.4.3: Parametereinstellung am BioView[®] Sensor für die CHO-Kultivierung.

Parameter	Einstellungen
Messbereich Exzitation	270 nm - 550 nm
Messbereich Emission	310 nm - 590 nm
Filterbandbreite	20 nm
Sensitivität	Hoch
Messung pro Wellenlängen- kombination	3
Verstärkung des Messsignals für (Ex)/ (Em):	
- (290 nm/ 370 nm)// (430 nm/ 510 nm)// (430 nm/ 530 nm)// (430 nm/ 550 nm)// (450 nm/ 530 nm)	1150
- restliche Wellenlängenkombinationen	1100
Messintervall	15 min

6.4.10. Herstellung des Antikörperstandards für die Proteinanalytik

Für die Herstellung des Antikörperstandards wurde die Hybridom-Zelllinie IV F19.23, die den Maus IgG₁ Antikörper gegen Penicillin G Amidase produziert, in serumfreiem Kulturmedium (Gibco™ Hybridoma-SFM, Invitrogen, Karlsruhe) in einem 2 l Reaktor in einem Arbeitsvolumen von 1,5 l über 7 Tage kultiviert. Nach dem Ende der Kultivierung wurde das gesamte Kulturmedium bei 400 g, für 3 min zentrifugiert. Der zellfreie Kulturüberstand wurde erneut zentrifugiert (3000 g, 20 min, 4 °C) und anschließend über einen Spritzenvorfilter (0,2 µm) filtriert.

Um das Volumen des Kulturüberstandes zu reduzieren, wurde dieser über eine Cross Flow Membraneinheit (Vivaflow 50 Einheit; Ausschlussgrenze 30 kDa MWCO, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) aufkonzentriert (Durchführung siehe Herstellerangaben).

Aufreinigung des Antikörpers

Die Aufreinigung des Antikörpers erfolgte mit einer HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, München) Säule an einer präparativen HPLC (FPLC BioLogic AVR7-3, BiO-RAD Laboratories GmbH, München). Der Chromatographieprozess wurde durch UV-Messung mit dem Durchflussdetektor bei 280 nm verfolgt. Für die Aufreinigung wurde eine Flussrate von 1 ml/min verwendet. Alle verwendeten Puffer sowie die Kulturüberstände wurden vor der Aufreinigung sterilfiltriert. Die Puffer wurden zusätzlich im Ultraschallbad entgast.

Verwendete Puffer:

- Bindungspuffer: 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
- Elutionspuffer: 0,1 M Glycin, pH 2,7
- Neutralisationspuffer: 1 M Tris, pH 9

Durchführung:

- Der Überstand wurde in 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 verdünnt.
- Die Säule wurde mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen.
- Der Zellkulturüberstand wurde über die Säule geleitet.
- Die Säule wurde mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen.
- Die Elution erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer. Den Elutionsfraktionen wurden 5 % Neutralisationspuffer zugegeben.
- Die Säule wurde mit 10 ml Bindungspuffer and anschließend mit 20 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C in 20 % Ethanol gelagert.
- Nach der Aufreinigung wurden die Antikörper enthaltenen Fraktionen vereint und anhand einer SDS-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit hin überprüft (vgl. Abbildung 6.4.5).

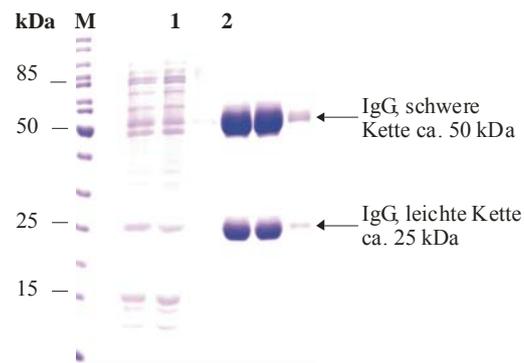


Abbildung 6.4.5: 12 %iges SDS-Gel der Antikörperfraktion vor und nach der Aufreinigung über Protein G Affinitätschromatographie (Coomassie-Färbung). M: Proteinmarker; 1: aufkonzentrierter Kulturüberstand vor der Aufreinigung; 2: Antikörperfraktion nach der Aufreinigung. Säule: HiTrap Protein G HP (1 ml).

Die Antikörper enthaltenen Fraktionen wurden im Anschluss unter Verwendung einer Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren 3 kDa MWCO (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) aufkonzentriert und in PBS umgepuffert. Die Konzentration der resultierenden Antikörperlösung wurde mit dem Maus IgG ELISA Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Die Antikörperlösung wurde anschließend in 20 µl Proben aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Überprüfung der Biologischen Aktivität

Um die biologische Aktivität des aufgereinigten Maus IgG₁ Antikörpers, der gegen Penicillin G Amidase gerichtet ist, zu bestimmen wurde ein auf Microarray-basierter Sandwich-Assay verwendet, der im Rahmen der Dissertation von Johanna Walter etabliert wurde. [207] Beim Sandwichformat werden Fängermoleküle auf dem Microarray-Substrat immobilisiert. Diese bindet das Zielprotein, welches mit Hilfe von weiteren markierten Antikörpern detektiert wird. Als Fängermolekül wurde das Enzym Penicillin G Amidase (PenG) verwendet. Das Zielprotein ist der aufgereinigte, gegen PenG gerichtete, Maus IgG₁ Antikörper (Maus anti PenG) produziert von der Hybridom-Zelllinie IV F19.23 (vgl. Abschnitt 6.2). Die Detektion des gebundenen Maus anti PenGs wurde mit Alexa Fluor[®]555 anti Maus IgG durchgeführt.

Protokoll für die Detektion:

- Penicillin G Amidase (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in PBS + 0,5 % Trehalose auf einem Nitrocellulose basierten Microarray gespottet. Je Spot wurden mit 8 hits/dot insgesamt 800 pl aufgetragen. Das automatische Spotten erfolgte mit dem Affymetrix 417™ Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)
- Der Microarray wurde für 15 min bei RT inkubiert.
- Es wurde für 30 min mit PBS + 1 % BSA geblockt

- Der Microarray wurde 3x für je 5 min mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen.
- Die Inkubation mit anti PenG erfolgte für 2 h mit 800 µl anti PenG Lösung in PBS + 0,2 % TopBlock bei 25 °C.
- Es wurde 3x für je 5 min mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen.
- Die Inkubation mit Alexa Fluor® goat anti Maus IgG (2 µl/ml) in PBS + 0,2 % TopBlock erfolgte für 2 h bei 25 °C.
- Der Microarray wurde erneut 3x für je 5 min mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen.
- Abschließend wurde der Slide im Druckluftstrom getrocknet.
- Die Detektion der Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots erfolgte mit dem Fluoreszenzscanner GenePix®4000B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Die Auswertung der Spots erfolgte mit der Software ImaGene™ 5.5.3 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA)

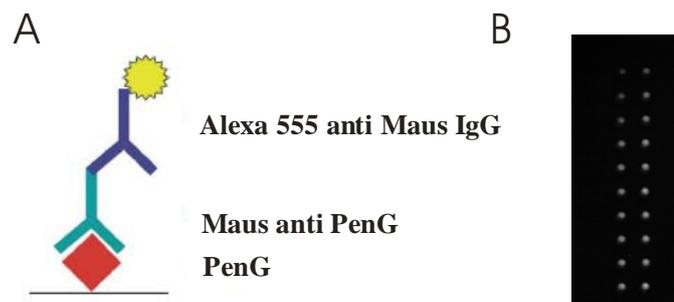


Abbildung 6.4.6: Aufbau des Sandwich-Formats zur Detektion des gegen Penicillin G Amidase gerichteten Maus IgG₁ Antikörpers (A) und Scan des Microarrays zur Bestimmung der Wechselwirkung des Antikörpers mit dem Antigen Penicillin G Amidase. [207]

Abbildung 6.4.6 zeigt den Aufbau des Sandwich-Formats (A) und den Scan des Microarrays (B) bei einem *gain* (Verstärkung) von 600. Für eine erste Einschätzung der biologischen Aktivität (definiert als: Wechselwirkung mit dem Antigen) des aufgereinigten Antikörpers wird die SNR (*signal to noise ratio*) herangezogen. Die SNR stellt ein Maß für die Signalqualität dar. Je größer, desto besser. Eine SNR von 3 gilt allgemein als Detektionsgrenze (*limit of detection*). Die Auswertung der SNR erfolgte nach folgender Gleichung:

$$SNR = \frac{SM - BM}{Stdev\ BM}$$

SM: *signal Mean*

BM: *background Mean*

SM-BM: Relative Signalintensität

SNR: *signal to noise ratio*

Die Auswertung der Signalqualität auf dem Microarray (vgl. Abbildung 6.4.6 B) hat gezeigt, dass die Signale eindeutig detektierbar sind ($\text{SNR} > 3$). Es wurde eine maximale SNR von 40 bestimmt. Die biologische Aktivität konnte anhand des durchgeführten Sandwich Microarrays eindeutig nachgewiesen werden, da der Antikörper hier seine Fähigkeit zur Bindung an PenG, indem es zu einem deutlich detektierbare Signal gekommen ist, bewiesen hat.

6.4.11. Immobilisierung von Protein G an einer CIM[®] Epoxy Disk

Aufgrund der hohen Reaktivität der Epoxygruppen auf der Diskoberfläche erfolgte die Immobilisierung der Protein G Moleküle direkt. Die Immobilisierung wurde diffusionskontrolliert durchgeführt. Zur Vorbereitung der Epoxy-Disk wird diese in der Haltevorrichtung (CIM-Gehäuse, BIA Separations, Ljubljana, Slowenien) platziert, an eine präparative HPLC-Anlage (FPLC BioLogic AVR7-3, BiIO-RAD Laboratories GmbH, München) und nach folgender Vorschrift mit einer Flussrate von 1 ml/min gespült:

- 10 min mit EtOH
- 10 min mit EtOH/ddH₂O (1:1)
- 10 min mit ddH₂O
- 15 min mit Immobilisierungspuffer (0,1 M Natriumborat, pH 9,3)

4 mg Protein G wurden in 1 ml Immobilisierungspuffer gelöst. Für die Immobilisierung wurde die Vorrichtung aus der Anlage genommen und mit 0,5 ml der Protein G Lösung versetzt. Die Vorrichtung wurde an beiden Enden verschlossen und die Disk für 14 h bei 30 °C im Ofen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Disk in der Vorrichtung mit weiteren 0,5 ml Protein G Lösung versetzt und erneut bei 30 °C für weitere 7 h inkubiert. Nach der Immobilisierung wurde die Einheit 7x mit PBS-Puffer gespült. Die Durchläufe der Immobilisierung sowie die Waschfraktionen wurden aufgefangen und für die spätere Konzentrationsbestimmung (UV-Messung bei 280 nm) bei +4 °C gelagert. Zum Blockieren verbliebener reaktiver Epoxygruppen wurde die Disk in der Vorrichtung mit 0,5 ml mit 1 M Ethanolamin (pH 8) gespült. Die Vorrichtung wurde verschlossen und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Disk in der Vorrichtung an der präparative HPLC-Anlage (FPLC BioLogic AVR7-3, BiIO-RAD Laboratories GmbH, München) für 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min mit PBS-Puffer gespült. Die Lagerung der Disk erfolgte in PBS mit 0,02 % (v/v) Natriumazid.

6.4.12. Durchführung der CLC-Methode

HPLC-Anlage: FPLC BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München

CIM[®]Disk-„Säule“: Protein G-/ QA-Disk

Flussrate: 4 ml/min

Temperatur: RT

Probeninjektionsvolumen: 3 ml

Verwendete Puffer:

- A: Bindungs-/Waschpuffer: 20 mM Tris, pH 7
- B: Elutionspuffer für CIM[®]QA Disk: 20 mM Tris + 1 M NaCl, pH 7
- C: Elutionspuffer für die Protein G-Disk: 0,1 M Glycin + 0,1 M NaCl, pH 2
- D: Neutralisationspuffer für den eluierten Antikörper: 1 M Tris, pH 9
- E: Regenerationspuffer: 1: 0,1 m Tris + 0,5 M NaCl , pH 8
2: 0,1 M Essigsäure + 0,5 M NaCl, pH 3,5

Nach jedem Lauf erfolgte die Regeneration der „Säule“. Hierfür wurde diese zunächst bei einer Flussrate von 4 ml/min mit 20 „Säulenvolumen“ Regenerationspuffer 1 und im Anschluss mit Regenerationspuffer 2 gespült. Die Lagerung der Disks erfolgte in 20 % EtOH in Bindungspuffer.

Tabelle 6.4.4: Bindungs- und Elutionsbedingungen der CIM[®]Disk CLC-Methode. Flussrate 4 ml/min.

Volumen [ml]	A [%]	B [%]	C [%]	Probeninjektion
0 - 4	100	-	-	-
4 - 7	-	-	-	3 ml Probenschleife
7 - 13	100	-	-	-
13 - 19	90	10	-	-
19 - 23	90	10	-	-
23 - 29	0	100	-	-
29 - 35	0	100	-	-
35 - 43	100	-	-	-
43 - 51	0	-	100	-
51 - 57	100	-	-	-

6.4.13. Entsalzen

Das Entsalzen der Proben erfolgte mit einer Dialyse (Dialyseschlauch: Spectra/Por® Dialysis Membran; Ausschlussgrenze 1 kDa; regenerierte Cellulose; Volumen 1 ml pro cm Membran, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). Die Schläuche wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbehandelt. Anschließend wurden die Dialyseschläuche mit einer Proteinlösung aus 0,2 mg/ml Insulin und Transferrin sowie 0,25 mg/ml, angesetzt in Kulturmedium, befüllt und mit entsprechenden Klammern an beiden Enden verschlossen. Die Dialyse erfolgte in ddH₂O als Dialysepuffer für ca. 20 h über Nacht.

6.4.14. Membran-screening

Für die Aufreinigung des Antikörpers direkt aus Zellkulturüberstand wurden Ionenaustauscher und Affinitätsmembranen als Zentrifugaleinheiten (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) getestet. Der pH-Wert des Bindungspuffers für die Versuche mit den Ionenaustauschern wurde so gewählt, dass er ungefähr dem pH-Wert des Zellkulturmediums entspricht.

Vivapure mini Q und S Zentrifugeneinheiten (20-lagig)

Q: starker Anionenaustauscher

S: starker Kationenaustauscher

Verwendete Puffer:

- Bindungs-/Waschpuffer: 25 mM Tris, pH 7,5
- Elutionspuffer: 25 mM Tris + 1 M NaCl, pH 7,5

Vivapure miniprep Protein A Zentrifugeneinheit (15-lagig)

Verwendete Puffer:

- Bindungs-/Waschpuffer: 0,01 M Kaliumphosphatpuffer + 0,5 M NaCl, pH 7,4
- Elutionspuffer: 0,1 M Glycin, pH 2,8
- Neutralisationspuffer: 1 M Tris, pH 9

Zu jeder Membraneinheit wird von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen) ein entsprechendes Versuchsprotokoll, in denen die zu verwendenden Puffern und Durchführungen beschrieben werden, mitgeliefert. Diese Protokolle wurden den hier vorliegenden Versuchsbedingungen angepasst.

Probe: 0,5 mg/ml IVIg in Kulturmedium (Gibco™ Hybridoma-SFM, Invitrogen, Karlsruhe)

Durchführung:

- Äquilibrieren der Membran der jeweiligen Zentrifugeneinheit mit 400 µl des jeweiligen Bindungspuffers; 5 min bei 1500 g zentrifugiert
- zweimal nacheinander 400 µl der vorbereiteten Probe auf die Membran pipettieren und jeweils bei 1500 g, 5 min (800 g, 7 min für Protein A) zentrifugiert.
- Membran zweimal mit 400 µl des entsprechenden Bindungspuffers waschen; 5 min bei 1500 g zentrifugieren.
- Die Elution des Proteins erfolgt bei 1500 g, 5 min mit 2 x 400 µl des jeweiligen Elutionspuffers. Bei Verwendung der Protein A Einheiten wurde zur Stabilisierung des Antikörpers die Elutionen mit 10 µl Neutralisationspuffer versetzt.
- Um das Bindungsverhalten des Antikörpers an der jeweiligen Membran zu untersuchen wurde der Proteingehalt in den jeweiligen Durchläufe/Fractionen anhand einer SDS-Gelelektrophorese überprüft.

6.4.15. Quantifizierung des Modell-Antikörpers IVIg

UV-Messung

Die photometrische Bestimmung des Modell-Antikörpers basiert auf der UV Absorption verschiedener Aminosäuren. Zur Ermittlung einer unbekanntes Konzentration wird zunächst die Absorption von IVIg-Lösungen mit bekannter Konzentration bestimmt. Dazu werden Verdünnungsreihen des Antikörpers in dem entsprechenden Puffer gemessen, wobei der Puffer ohne Antikörper als Blindwert verwendet wird. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und der zugehörigen Absorption. Über die ermittelte Geradengleichung lassen sich die unbekanntes Konzentrationen anhand der gemessenen Absorption rechnerisch bestimmen. Die Messungen werden mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Nanodrop, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) ausgeführt.

SEC-Analytik

Für die Quantifizierung des Antikörpers bei der Aufreinigung mittels Sartobind[®] Direct Einheiten wurde eine SEC-Analytik entwickelt.

Kenngrößen der verwendeten Säule:

- PSS Proteema Säule (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz)
- Säulendimension: 8 x 300 mm
- Säulenmaterial: modifiziertes Silica

- Partikelgröße 5 μm
- Porenweite 300 \AA (Trennbereich: 1 bis 1200 kDa)
- max. Injektionsvolumen 100 μl
- 50 – 80 bar

Versuchsbedingungen

- Solvent: 34 mM Kaliumphosphatpuffer + 0,3 M NaCl, pH 6,6
- Probenvolumen: 100 μl , filtriert (0,2 μm Filter)
- Laufbedingungen: Flussrate 1 ml/min; 30 $^{\circ}\text{C}$; 30 min
- Detektion: 280 nm (Dioden Array Detektor LaChrom L-7455, Merck/Hitschi)

Es wurden Kalibrationsgeraden für verschiedene Konzentrationen in Kulturmedium (Gibco™ Hybridoma-SFM, Invitrogen Karlsruhe), Bindungs- und Elutionspuffer (Puffer für die IVIg-Aufreinigung über Protein A, vgl. 6.4.16) bestimmt. Die Auftragung der berechneten Peakflächen gegen die Ausgangskonzentration des Antikörpers ergibt einen linearen Zusammenhang (vgl. Abbildung 6.4.7). Über die ermittelte Geradengleichung lassen sich die unbekannt Konzentrationen an Hand der berechneten Peakfläche rechnerisch bestimmen.

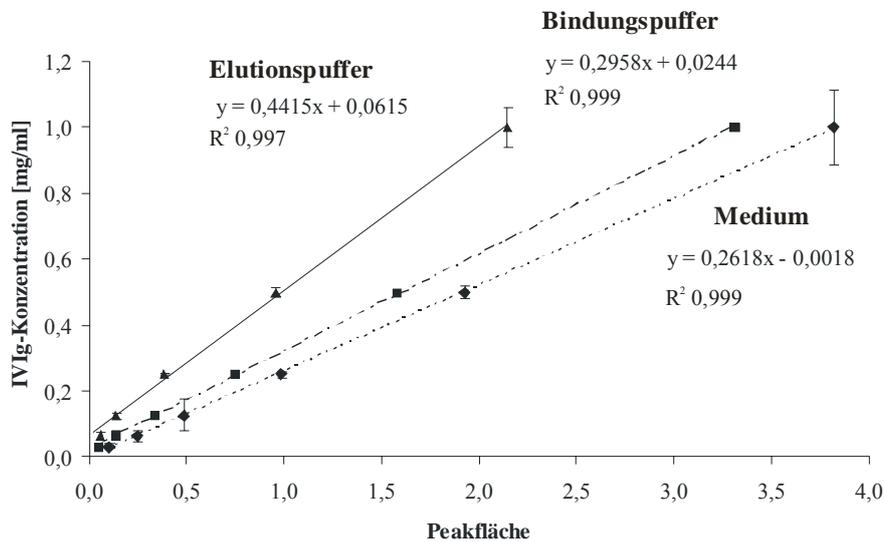


Abbildung 6.4.7: Kalibrationsgeraden für die Antikörperanalytik (IVIg) mittels SEC in Kulturmedium, Bindungs- und Elutionspuffer. Kulturmedium: Hybridoma-SFM; Bindungspuffer: 0,01 M Kaliumphosphatpuffer + 0,5 M NaCl, pH 7,4; Elutionspuffer: 0,1 M Glycin, pH 2,8. IVIg-Konzentrationen 1 mg/ml bis 0,031 mg/ml.

6.4.16. Versuchsdurchführung mit der Sartobind® Direct Einheit

Alle in dieser Arbeit getesteten 2,5 ml Einheiten wurden entsprechend folgender Versuchsdurchführung behandelt. Änderungen dieser Versuchsdurchführung werden explizit im experimentellen Teil der Arbeit an entsprechender Stelle erwähnt.

Verwendete Puffer:

- Bindungs-/Waschpuffer: 0,01 M Kaliumphosphatpuffer + 0,5 M NaCl, pH 7,4
- Elutionspuffer: 0,1 M Glycin, pH 2,8
- Neutralisationspuffer: 1 M Tris, pH 9
- Spülpuffer: 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 + 20 % EtOH

Durchführung:

- Das Spülen der Einheit zur Entfernung des Filterstaubes erfolgte mit Bindungspuffer im *single-pass*-Betrieb für 2 min bei einem Volumenstrom von 5 ml/min.
- Das Äquilibrieren und Entlüften der Einheit erfolgte mit 25 ml Bindungspuffer im Rezirkulations-Betrieb bei maximaler Pumpleistung (Flussrate 28 ml/min). Das Entfernen von Blasen im Inneren der Einheit gelang durch pulsartiges Öffnen und Schließen des Schlauches oberhalb der Einheit.
- Die Beladung der Membran wurde bei einer Flussrate von 25 ml/min durchgeführt. 50 ml Bindungspuffer, Medium bzw. zellhaltiges Medium einer Antikörperkonzentration von 0,25 mg/ml wurden aus einer gerührten Vorlage bei 26 min^{-1} über 60 min im Kreis gepumpt. Zu Beginn der Versuche wird ein Vorlaufvolumen von 10 ml bzw. 9 ml abhängig von der jeweiligen Einheit (Netz-Spacer/ Vlies-Spacer) im *single-pass*-Betrieb separat aufgefangen, um eine Verdünnung der Vorlage durch Bindungspuffer zu vermeiden. Das Volumen des Vorlaufs wurde in vorangehenden Versuchen anhand einer UV-Messung der reinen Proteinkonzentration im Durchfluss bestimmt. Während der Rezirkulation erfolgte die Probenahme von je 500 μl (bei Versuch mit zellhaltigem Medium je 800 μl) zum Zeitpunkt null, nach einer Minute Rezirkulation und alle weiteren 10 min.
- Rückstände wurden durch Waschen des Moduls im *single-pass*-Betrieb entfernt. Das Waschen erfolgte mit 25 ml Bindungspuffer bei einem Volumenstrom von 5 ml/min. Es wurden fünf Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen.
- Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 40 ml Elutionspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/min im *single-pass*-Betrieb. Die Elution wird fraktioniert ab einem pH-Wert von 4 (ca. 7 ml bzw. 6 ml) in 8×5 ml Fraktionen aufgefangen. Um den Antikörper im Elutions-

puffer pH 2 bei einem neutralen pH-Wert zu stabilisieren, werden je Fraktion 200 μ l Neutralisationspuffer vorgelegt.

- Nach Beenden des jeweiligen Versuches wurden die Einheiten zur Regeneration mit 20 ml Bindungspuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min gespült. Im Anschluss wurden die Einheiten bei gleicher Einstellung mit 30 ml Spülpuffer gespült und bei -20 °C gelagert.

Probenanalyse

- Zellzahl (siehe Offline-Analytik Abschnitt 6.4.6)
- Bestimmung der LDH-Aktivität (siehe Offline-Analytik Abschnitt 6.4.6, Testprinzip 2)
- Quantifizierung der IVIg-Konzentration im Medium und in den Elutions- und Waschfraktionen (SEC-Analytik siehe 6.4.15)

6.4.17. Fixierung von Zellen

Zur Fixierung von Suspensionszellen wurde der zellhaltige Überstand bei 400 g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und der Überstand jeweils dekantiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 70 % Ethanol. Dazu wurde das Zellpellet in 300 μ l PBS resuspendiert und vorsichtig in 700 μ l -20 °C kalten Ethanol pipettiert und für mindestens 1 h bei -20 °C gelagert.

Zur Fixierung der Zellen auf Membranen in 6-Lochplatten wurde die restliche, zellhaltige Suspension vollständig entfernt und die Membran zunächst 1 x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 70 % eiskaltem Ethanol und die Lagerung für 1 h bei -20 °C.

Zur Fixierung der Zellen in Sartobind[®] Direct Einheiten werden diese nach der Rezirkulation der Zellsuspension mit PBS (10-fachem Volumen des Membranvolumen der jeweils verwendeten Einheit) im *single-pass*-Betrieb bei einer Flussrate von 5 ml/min (50 ml/min) gespült. Im Anschluss erfolgt die Fixierung der Zellen in der Einheit mit 70 % Ethanol. Dazu wird das Modul im *single-pass*-Betrieb mit einer eiskalten 70 %igen Ethanollösung (5-faches Volumen des Membranvolumens der jeweils verwendeten Einheit) gespült und in dieser für 1 h bei -20 °C gelagert.

6.4.18. DAPI-Färbung

Die Anhaftung der Zellen an der Protein A Membran wurde über eine Visualisierung der Zellkerne indirekt über die DAPI-Färbung bestimmt (4',6-Diamidin-2-phenyl-indol). Hierfür wurden die Zellen auf den Membranen bzw. in den Sartobind[®] Direct Modulen nach der Fixierung zunächst 1 x mit PBS gewaschen. Im Falle der Untersuchung des Zellrückhaltes in den Modulen wurden diese geöffnet und die Membran vorsichtig vom Spacer getrennt. Drei Abschnitte der Membran, innerer,

äußerer und mittlerer Bereich der vorherigen Wicklung werden mit einem Locheisen (Innendurchmesser: 25 mm) heraus gestanzt und in die Vertiefungen einer 6-Lochplatte überführt. Zu denen auf den Membranstanzlingen fixierten und gewaschenen Zellen in 6-Lochplatten wurden je 1 ml DAPI-Lösung (1 ml Färbepuffer + 2 µl DAPI-Stammlösung) gegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend 1 x mit PBS gewaschen. Die Visualisierung der eingefärbten Zellkerne erfolgte mit Hilfe des UV-Filters am Olympus Fluoreszenzmikroskop.

- DAPI-Stammlösung: 500 µg/ml DAPI in ddH₂O
- DAPI-Färbepuffer: 100 mM TRIS pH 7, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0,5 mM, Nonidet-P 400 1 %

6.4.19. Inaktivierung von Aldehydgruppen

Die Inaktivierung reaktiver Aldehydgruppen auf der Membran erfolgte mit einer 0,1 %ige Natriumborhydrid-Lösung. 1 l dieser Lösung wurde 30 min im Rezirkulations-Betrieb bei einer Flussrate von 500 ml/min über die Sartobind[®] Direct 25 ml Einheit gepumpt. Das Modul wurde ca. alle 3 min durch Schließen und spontanes Öffnen des Ausgangs entlüftet.

6.5. Datenanalyse

6.5.1. Berechnung der Wachstums-, Verbrauchs- und Produktbildungskinetik

Wachstumskinetik

Das Zellwachstum im *batch*-Modus wird mit der folgenden Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x$$

Mit:

x: Lebend-Zellzahl [Zellen/ml]

µ: spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h⁻¹]

t: Kultivierungszeit [h]

Als Näherung wird die Differentialgleichung in eine Differenzgleichung überführt:

$$\frac{\Delta x}{\Delta t} \approx \mu \cdot x \quad \text{daraus folgt} \quad \mu = \frac{\Delta x}{\Delta t} \cdot \frac{1}{x}$$

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ zurzeit t wird mit folgender Gleichung eingeschätzt:

$$\mu_t = \frac{x_{t+1} - x_{t-1}}{(t+1) - (t-1)} \cdot \frac{1}{x_t}$$

Verbrauchs- und Bildungskinetik

Die Verbrauchsgeschwindigkeit von Glukose und Glutamin, die Bildungsgeschwindigkeit von Laktat sowie des Antikörpers werden mit folgenden Differenzialgleichungen beschrieben:

$$\frac{d\text{Glk}}{dt} = q\text{Glk} \cdot x$$

$$\frac{d\text{Gln}}{dt} = q\text{Gln} \cdot x$$

$$\frac{d\text{Lak}}{dt} = q\text{Lak} \cdot x$$

$$\frac{dP}{dt} = qP \cdot x$$

x : Lebend-Zellzahl [Zellen/ml]

Glk : Glukosekonzentration [mmol/l]

Gln : Glutaminkonzentration [mmol/l]

Lak : Laktatkonzentration [mmol/l]

P : IgG-Konzentration [mg/l]

Die spezifischen Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt t werden mit folgenden Differenzgleichungen eingeschätzt:

$$q\text{Glk}_t = -\frac{\text{Glk}_{t+1} - \text{Glk}_{t-1}}{(t+1) - (t-1)} \cdot \frac{1}{x_t}$$

$$q\text{Gln}_t = -\frac{\text{Gln}_{t+1} - \text{Gln}_{t-1}}{(t+1) - (t-1)} \cdot \frac{1}{x_t}$$

$$q\text{Lak}_t = \frac{\text{Lak}_{t+1} - \text{Lak}_{t-1}}{(t+1) - (t-1)} \cdot \frac{1}{x_t}$$

$$qP_t = -\frac{P_{t+1} - P_{t-1}}{(t+1) - (t-1)} \cdot \frac{1}{x_t}$$

qGlk: spezifische Glukoseverbrauchsgeschwindigkeit [mmol/h·Zelle]

qGln: spezifische Glutaminverbrauchsgeschwindigkeit [mmol/h·Zelle]

qLak: spezifische Laktatbildungsgeschwindigkeit [mmol/h·Zelle]

qP: spezifische IgG Produktionsgeschwindigkeit [mg IgG/h·Zelle]

Die Angaben der spezifischen Geschwindigkeiten wurden auf eine Zellzahl von 10^9 Zellen normiert.

6.5.2. Berechnung der Langmuir-Isotherme

Die Massentransferrate von der flüssigen Phase (IVIg-Lösung) auf die feste Phase (Protein A Membran) kann bei einer Langmuir-Isotherme durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 \cdot C(Q_{\max} - Q) - k_2 \cdot Q$$

C: IVIg-Konzentration der Beladungslösung [mg/ml]

Q: Beladung der Protein A Membran [mg/cm²]

Q_{max}: maximale Bindungskapazität [mg/cm²]

k₁/k₂: Geschwindigkeitskonstanten

Im Gleichgewicht gilt:

$$Q = \frac{Q_{\max} \cdot C}{K_{\text{Diss}} + C} \quad \text{mit} \quad K_{\text{Diss}} = \frac{k_1}{k_2}$$

K_{Diss}: Dissoziationskonstante [mol/l]

Die Dissoziationskonstante K_{Diss} (Einheit: Mol) und die maximale Bindungskapazität Q_{max} werden durch eine graphischen Auftragung von 1/Q gegen 1/C aus dem Abszissenabschnitt (1/Q_{max}) und aus dem Ordinatenabschnitt (1/K_{Diss}) erhalten.

6.5.3. Berechnung der maximalen Belegungsdichte

Unter der Annahme, dass eine Zelle bei einem Durchmesser von ungefähr 20 µm eine Fläche von 314 µm² einnimmt, kann in Bezug auf die angebotene Membranfläche die maximale Belegungsdichte der Membran mit Zellen bestimmt werden.

$$X_Z = \frac{A_M}{A_Z} \qquad Y_{\max} = \frac{X_Z}{A_M}$$

X_Z = maximal mögliche Zellzahl

A_Z = geschätzte Fläche, die eine Zelle einnimmt $314 \mu\text{m}^2$ (Annahme: $\sim 20 \mu\text{m}$ mittlerer Zelldurchmesser)

A_M = Membranfläche [cm^2]

Y_{\max} = maximale Belegungsdichte [Zellen/ cm^2]

Um den Einfluss der Zellen auf die Antikörperadsorption zu untersuchen wurden Versuche aus zellhaltigem Medium mit einer Anzahl an Zellen von ungefähr 1/3 über der maximal möglichen Belegungsdichte durchgeführt.

6.5.4. Berechnung der Proteinausbeute und Wiederfindungsrate

Protein Ausbeute [%]: Prozentualer Anteil der eluierten IVIg-Menge von der angebotenen IVIg-Menge.*

$$\text{Ausbeute [\%]} = \frac{n_{\text{Elution}}}{n_{\text{angeboten}}} \cdot 100$$

Wiederfindungsrate WFR [%]: Prozentualer Anteil der insgesamt gefundenen IVIg-Menge zur angebotenen Menge.*

$$\text{WFR [\%]} = \frac{\sum n_{\text{Ende}} + n_{\text{Wasch}} + n_{\text{Elution}}}{n_{\text{angeboten}}} \cdot 100$$

* : nach Abzug des IgG₃-Anteils (5,7 %) des IVIgs (vgl. Abschnitt 6.3)

6.6. Abbildungen

6.6.1. Einfluss der Hauptkomponenten auf die Güte der Vorhersage

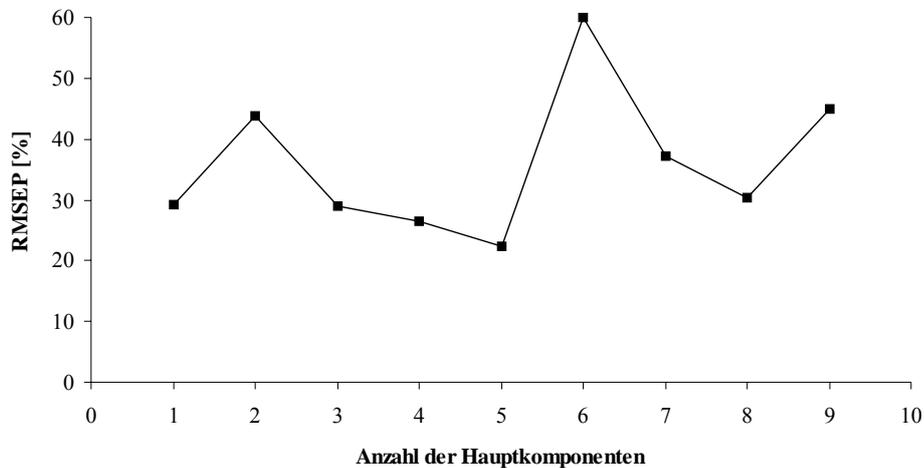


Abbildung 6.6.1: Einfluss der Hauptkomponenten auf die Güte der Vorhersage am Beispiel der Laktatkonzentration. Modell aus K3 und Vorhersage von K2. Die Güte der Vorhersage gemessen am Fehler der Vorhersage RMSEP (*root mean square error of prediction*).

6.6.2. 2D-Fluoreszenzspektren des Mediums für die CHO-Kultivierung

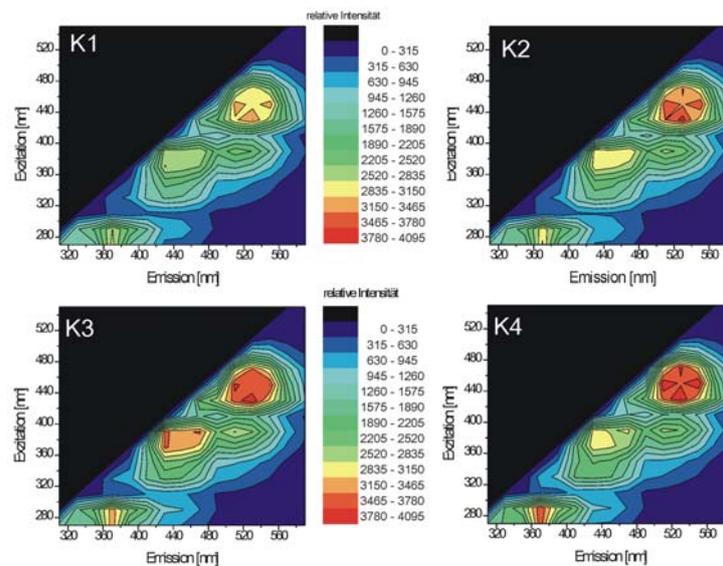


Abbildung 6.6.2: 2D-Fluoreszenzspektren des CHO-Fermentationsmediums vor Beginn der Kultivierung K1 bis K4.

6.7. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AEX	<i>Anion Exchange Chromatography</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AU	Adsorbtiionseinheit
BM	<i>Background Mean</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CCD	charged coupled device
CEX	<i>Cation Exchange Chromatography</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIM	<i>Convective Interaction Media</i>
CLC	<i>Conjoint Liquid Chromatography</i>
COS	CV1 <i>origon</i> SV40
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco`s modified Eagel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonuceic acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Eschericha coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Erythropoetin
EtOH	Ethanol
Fab	<i>Fragment Antigen Binding</i>
Fc	<i>Fragment Cristallizable</i>
FKS	Fötales Kälber Serum
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>
HPLC	<i>High PerformanceLiquid Chromatography</i>
HPMDC	<i>High Performance Monilithic Disk Chromatography</i>

HS	<i>Horse Serum</i>
HSA	Humanes Serum Albumin
Ig	Immunglobulin
IVIg	intravenöses Immunglobulin
konz.	Konzentration
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
max	maximal
MeOH	Methanol
min	Minute
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	millimolar
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
n	Stoffmenge
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NaOH	Natronlauge
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
nm	Nanometer
OPA	Ortho-Phtaldialdehyd
PAGE	Polyacralamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCA	<i>Principle Component Analysis</i>
PenG	Penicillin G
pl	Pikoliter
pI	Isoelektrischer Punkt
PLS	<i>Partial Least Square</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QA	Quaternäre Trimethylaminoethyl
®	registriert
RC	regenerierte Cellulose
RRC	<i>Reversed Phase Chromatography</i>
RT	Raumperatur
s	Sekunden

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SFM	<i>Serum Free Medium</i>
SM	<i>Signal Mean</i>
SNR	<i>Signal to Noise Ratio</i>
t	Zeit
t-PA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline+ Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
U	Unit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µ _{max}	maximale Wachstumsrate
µmol	Mikromol
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
WFR	Wiederfindungsrate
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat
z. B.	zum Beispiel

6.8. Geräte, Material und Reagenzien

Geräte	Hersteller
Accu-jet [®] Pro	Brands GmbH & Co. KG, Wertheim
Affymetrix 417 [™] Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Analysenwaage Analytic AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav Tecnomara	Integra Bioscience, Fernwald
Biostat [®] B DCU	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen,
BioView [®] Sensor	DELTA Light & Optics, Hørsholm, Dänemark
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dioden Array Detector (LaChrom L-7455)	Merck/Hitachi, Darmstadt
Eppendorf Research Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzdetektor RF-10AxL	Shimadzu, Duisburg

Fluoreszenzscanner GenePix®4000B	Axon Instruments, Foster City, CA, USA.
FPLC BioLogic AVR7-3	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoreseapparatur	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
LaChrom HPLC D-7000er Serie	Merck/Hitachi, Darmstadt
Kamera EOS 300D	Canon, Lake Success, NY, USA
Magnetrührer IKAMAG®	IKA Werke GmbH, Staufen
Mikroskop BX-41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikroskop IX-50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
pH-Elektrode	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Spektrophotometer „Multiskan“	Thermolabsystem, Langenselbold, Deutschland
Spektrometer „ND-1000“	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Plattenlesegerät, Microplatereader	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Präparative HPLC	BiO-RAD Laboratories GmbH, München,
SDS-Gelelektrophorese	GE Healthcare, München
Sterilwerkbank MSC Advantage	Thermo Scientific, Karlsruhe
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	BANDELIN electronis GmbH, Berlin
Vortex-Mixer Typ 1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH, Büchenbach
YSI 2700 SELECT	Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA
Zentrifuge Multifuge 3s,	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415R, gekühlt	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmaterial

Criterion Blotter	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Einmalpipetten	Sarstedt AG, Nümbrecht
Filterpapier zum Blotten FN100	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Immun-Blot PVDV-Membran	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Kryoröhren	Nunc GmbH, Wiesbaden
6-Lochplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Lochplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Lochplatte (UV)	Corning GmbH, Life Sciences, Wiesbaden
96-Lochplatte (Maxisor™)	Nunc GmbH, Wiesbaden

Hersteller

24-Lochplatte	Sarstedt AG, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht
PowerPac	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorfilter Minisart, steril (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Spritzenvorfilter Minisart RC 4 (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Spectra/Por Dialysis Membran (MWCO 1000)	Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez CA, USA
Vivaspin 20 (30 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Vivaflow 50 (30 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Vivapure miniprep Protein A	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Vivapure mini Q und S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Zentrifugalfilter Vivaspin 500	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Kits

Alkaline Phosphatase Conjugate Substrat Kit
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)
Mouse-IgG-ELISA

Hersteller

BIO-RAD
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Chromatographiesäulen

CIM[®]Disks (3,4 ml Bettvolumen)
HiTrap Protein G HP, 1 ml
PSS Proteoma SEC
(8 x 300 mm, 300 Å)
ZORBAX Poroshell 300SB-C8
(2,1 x 75 mm)

Hersteller

BIA Separations, Ljubljana, Slowenien
GE Healthcare, München
Polymer Standards Service GmbH, Mainz

Agilent Technologies, Böblingen

Reagenzien

Alle hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien hatten, falls nicht anders angegeben, den kommerziell höchsterhältlichen Reinheitsgrad.

Reagenzien

Acetonitril
Acrylamid (40 %ig)
Alexa Fluor[®] 555 anti-maus IgG (goat)
APS
Borsäure

Hersteller

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
GE Healthcare, München
Invitrogen, Karlsruhe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAPI	MobiTec, Göttingen
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM/Ham's F-12	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Trehalose	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Glycin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Gibco™ Hybdioma-SFM	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin-Lösung	PAA Laboratories, Paschingen Österreich
goat anti-mouse 170-6520	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HCl 36%)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
IgG Alkaline Phosphatase Conjugate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Insulin-Lösung, human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumhexacyanoferrat III	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Magnesiumchlorid	Riedel de Haën, Seelze
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NADH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaOH	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Natriumacetat-Trihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumthiosulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
N, N'-Methylen-Bisacrylamid (2%ig)	GE Healthcare, München
Nonidet-P 400	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ortho-Phtaldialdehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Penicillin G Amidase	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Pferdeserum	PAA Laboratories, Paschingen Österreich
PhastGel Blue R-Tablette	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Protein G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
Panserin™ PX10 und PX401	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Proteinmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>rabbit muscle</i> L-LDH	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Transferrin, human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trehalose	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Trifluoressigsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TopBlock	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

7. Literaturverzeichnis

- [1] S. J. Morgan, Darling, D. C., Kultur tierischer Zellen, ed., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin - Oxford 1994.
- [2] H. J. Hauser, and R. Wagner, Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production, ed., Walter de Gruyter, Berlin 1997.
- [3] G. Kretzmer, Industrial processes with animal cells, *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002) 135-142.
- [4] D. C. Andersen, and L. Krummen, Recombinant protein expression for therapeutic applications, *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002) 117-123.
- [5] L. Chu, and D. K. Robinson, Industrial choices for protein production by large-scale cell culture, *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2001) 180-187.
- [6] D. S. T. Nicoll, *Gentechnische Methoden*, ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995.
- [7] W. Günzburg, and B. Salmons, *Gentransfer in Säugerzellen*, ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997.
- [8] C. C. Simonsen, and M. McGrogan, The molecular biology of production cell lines, *Biologicals* 22 (1994) 85-94.
- [9] R. M. Redwan el, S. M. Matar, G. A. El-Aziz, and E. A. Serour, Synthesis of the human insulin gene: protein expression, scaling up and bioactivity, *Prep Biochem Biotechnol* 38 (2008) 24-39.
- [10] A. D. Riggs, Bacterial production of human insulin, *Diabetes Care* 4 (1981) 64-68.
- [11] N. Jenkins, and E. M. Curling, Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects, *Enzyme Microb Technol* 16 (1994) 354-364.
- [12] L. M. Barnes, C. M. Bentley, and A. J. Dickson, Stability of protein production from recombinant mammalian cells, *Biotechnol Bioeng* 81 (2003) 631-639.
- [13] M. Butler, Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals, *APPL MICROBIOL BIOT* 68 (2005) 283-291.
- [14] H. Chmiel, *Bioprozesstechnik*, ed., Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München 2006.
- [15] M. Butler, *Animal Cell Culture and Technology*, ed., Garland Science, New York 2004.
- [16] S. Sommerfeld, and J. Strube, Challenges in biotechnology production - generic processes and process optimization for monoclonal antibodies, *Chemical Engineering and Processing* 44 (2005) 1123-1137.
- [17] M. S. Even, C. B. Sandusky, and N. D. Barnard, Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations, *Trends Biotechnol* 24 (2006) 105-108.

- [18] T. Fletscher, Designing culture media for recombinant protein production, *BioProcess* 3 (2005) 30-36.
- [19] http://www.vfa.de/vfa-bio_de/aktuell/amzulassungen_gentec.html, online im Internet, (20.12.07).
- [20] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks--2003, *Nat Biotechnol* 21 (2003) 865-870.
- [21] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2006, *Nat Biotechnol* 24 (2006) 769-776.
- [22] A. K. Pavlou, and J. M. Reichert, Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010, *Nat Biotechnol* 22 (2004) 1513-1519.
- [23] F. M. Wurm, Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nature Biotechnology* 22 (2004) 1393-1398.
- [24] F. Breitling, and S. Dübel, *Rekombinante Antikörper*, ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1997.
- [25] S. Dübel, Recombinant therapeutic antibodies, *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (2007) 723-729.
- [26] F. Lottspeich, and J. W. Engels, *Bioanalytik*, 2nd ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006.
- [27] H. E. Chadd, and S. M. Chamow, Therapeutic antibody expression technology, *Curr Opin Biotechnol* 12 (2001) 188-194.
- [28] M. A. van Dijk, and J. G. van de Winkel, Human antibodies as next generation therapeutics, *Curr Opin Chem Biol* 5 (2001) 368-374.
- [29] G. Köhler, Milstein, C., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, *Nature* 256 (1975) 495-497.
- [30] A. Shukla, B. Hubbard, T. Tressel, S. Guhan, and D. Low, Downstream processing of monoclonal antibodies - Application of platform approaches, *J CHROMATOGR B* 848 (2007) 28-39.
- [31] S. J. Kim, Y. Park, and H. J. Hong, Antibody Engineering for the development of Therapeutic Antibodies, *Molecules and Cells* 20 (2005) 17-29.
- [32] G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, and H. R. Hoogenboom, Making antibodies by phage display technology, *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 433-455.
- [33] A. Cecilia, Roque A., *Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification*, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004).
- [34] V. Vojinovic, J. M. S. Cabral, and L. P.-. Fonseca, Real-time bioprocess monitoring Part I: in-situ sensors, ed. 2006.
- [35] T. Scheper, B. Hitzmann, E. Stärk, R. Ulber, R. Faurie, P. Sosnitza, and K. F. Reardon, Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses, *Analytica Chimica Acta* 400 (1999) 121-134.
- [36] T. Becker, B. Hitzmann, K. Muffler, R. Portner, K. F. Reardon, F. Stahl, and R. Ulber, Future aspects of bioprocess monitoring, in *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, pp. 249-293.

-
- [37] R. Ulber, J. G. Frerichs, and S. Beutel, Optical sensor systems for bioprocess monitoring, *Anal Bioanal Chem* 376 (2003) 342-348.
- [38] R. Ulber, B. Hitzmann, T. Scheper, and K. F. Reardon, *Bioreactor monitoring and Control*, ed. 2000.
- [39] R. Ulber, B. Hitzmann, and T. Scheper, Innovative Bioprozessanalytik - Neue Wege zum besseren Verständnis biotechnologischer Prozess, *Chemie Ingenieur Technik* 73 (2001) 19-26.
- [40] R. Henrion, and G. Henrion, *Multivariate Datenanalyse*, ed., Springer Verlag Berlin Heidelberg 1995.
- [41] M. Scraff, S. A. Arnold, L. M. Harvey, and B. McNeil, Near Infrared Spectroscopy for Bioprocess Monitoring and Control, *Critical Reviews in Biotechnology* 26 (2006) 17-39.
- [42] M. N. Pons, S. Le Bonte, and O. Potier, Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation, *J Biotechnol* 113 (2004) 211-230.
- [43] C. Rehbock, S. Beutel, T. Brückerhoff, B. Hitzmann, D. Riechers, R. Guido, F. Stahl, T. Scheper, and K. Friehs, Bioprozessanalytik, *Chemie Ingenieur Technik* 80 (2008) 267-286.
- [44] D. L. Doak, and J. A. Phillips, In situ monitoring of an escherichia coli fermentation using a diamond composition ATR probe and mid-infrared spectroscopy, *Biotechnol Prog* 15 (1999) 529-539.
- [45] M. Rhiel, P. Ducommun, I. Bolzonella, I. Marison, and U. von Stockar, Real-time in situ monitoring of freely suspended and immobilized cell cultures based on mid-infrared spectroscopic measurements, *Biotechnol Bioeng* 77 (2002) 174-185.
- [46] A. G. Cavinato, D. M. Mayes, Z. H. Ge, and J. B. Callis, Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy, *Anal Chem* 62 (1990) 1977-1982.
- [47] S. A. Arnold, R. Gaensakoo, L. M. Harvey, and B. McNeil, Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch Escherichia coli process, *Biotechnol Bioeng* 80 (2002) 405-413.
- [48] H. Kornmann, S. Valentinotti, P. Duboc, I. Marison, and U. von Stockar, Monitoring and control of Gluconacetobacter xylinus fed-batch cultures using in situ mid-IR spectroscopy, *J Biotechnol* 113 (2004) 231-245.
- [49] P. Roychoudhury, L. M. Harvey, and B. McNeil, The potential of mid infrared spectroscopy (MIRS) for real time bioprocess monitoring, *Anal Chim Acta* 571 (2006) 159-166.
- [50] P. Roychoudhury, R. O'Kennedy, B. McNeil, and L. M. Harvey, Multiplexing fibre optic near infrared (NIR) spectroscopy as an emerging technology to monitor industrial bioprocesses, *Anal Chim Acta* 590 (2007) 110-117.
- [51] K. Schügerl, Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years, *J Biotechnol* 85 (2001) 149-173.
- [52] E. Stärk, B. Hitzmann, K. Schügerl, T. Scheper, C. Fuchs, D. Koster, and H. Markl, In-situ-fluorescence-probes: a useful tool for non-invasive bioprocess monitoring, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74 (2002) 21-38.

- [53] S. Marose, C. Lindemann, and T. Scheper, Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring, *Biotechnol Prog* 14 (1998) 63-74.
- [54] T. Scheper, and K. Schügerl, Characterization of Bioreaktors by In-situ Fluorometry, *Journal of Biotechnology* 3 (1986) 221-229.
- [55] C. Lindemann, S. Marose, H. O. Nielsen, and T. Scheper, 2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring, *Sensors and Actuators B* 51 (1998) 273-277.
- [56] E. Stärk, Bioprozessanalytik durch online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2-D Fluoreszenzspektroskopie und multivarianter Auswertverfahren, *Dissertation* (2002) Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [57] K. Hantelmann, Nicht-invasive Analysenmethoden und multivariante Datenauswertung zur automatisierten Beobachtung von Bioprocessen, *Dissertation* (2005) Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [58] J. Rhee, T. Kang, K. Lee, O. Sohn, S. Kim, and S. Chung, Application of principal component analysis 432 and self-organizing map to the analysis of 2D fluorescence spectra and the monitoring of fermentation processes, *BIOTECHNOL BIOPROC E* 11 (2006) 432-441.
- [59] J. Mukherjee, C. Lindemann, and T. Scheper, Fluorescence monitoring during cultivation of *Enterobacter aerogenes* at different oxygen levels, *Appl Microbiol Biotechnol* 52 (1999) 489-494.
- [60] S. Hisiger, and M. Jolicoeur, Plant cell culture monitoring using an in situ multiwavelength fluorescence probe, *BIOTECHNOL PROGR* 21 (2005) 580-589.
- [61] F. Clementschitsch, K. Jurgen, P. Florentina, and B. Karl, Sensor combination and chemometric modelling for improved process monitoring in recombinant *E. coli* fed-batch cultivations, *J Biotechnol* 120 (2005) 183-196.
- [62] A. Surribas, D. Geissler, A. Gierse, T. Scheper, B. Hitzmann, J. Montesinos, and F. Valero, State variables monitoring by in situ multi-wavelength fluorescence spectroscopy in heterologous protein production by *Pichia pastoris*, *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 124 (2006) 412-419.
- [63] A. Surribas, J. Montesinos, and F. Valero, Biomass estimation using fluorescence measurements in *Pichia pastoris* bioprocess, *J CHEM TECHNOL BIOT* 81 (2006) 23-28.
- [64] A. Eliasson Lantz, P. Jorgensen, E. Poulsen, C. Lindemann, and L. Olsson, Determination of cell mass and polymyxin using multi-wavelength fluorescence, *J Biotechnol* 121 (2006) 544-554.
- [65] K. Hantelmann, M. Kollecker, D. Hull, B. Hitzmann, and T. Scheper, Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations, *J Biotechnol* 121 (2006) 410-417.
- [66] D. Boehl, D. Solle, B. Hitzmann, and T. Scheper, Chemometric modelling with two-dimensional fluorescence data for *Claviceps purpurea* bioprocess characterization, *J Biotechnol* 105 (2003) 179-188.

- [67] L. Johansson, and G. Liden, A study of long-term effects on plasmid-containing *Escherichia coli* in carbon-limited chemostat using 2D-fluorescence spectrofluorimetry, *Biotechnol Prog* 22 (2006) 1132-1139.
- [68] S. Hisiger, and M. Jolicoeur, A multiwavelength fluorescence probe: Is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 117 (2005) 325-336.
- [69] A. C. McGovern, D. Broadhurst, J. Taylor, N. Kaderbhai, M. K. Winson, D. A. Small, J. J. Rowland, D. B. Kell, and R. Goodacre, Monitoring of complex industrial bioprocesses for metabolite concentrations using modern spectroscopies and machine learning: application to gibberellic acid production, *Biotechnol Bioeng* 78 (2002) 527-538.
- [70] T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Week, F. Verpoort, G. Vergote, and J. P. Remon, Application of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis, *Trac Trends Anal Chem* 21 (2002) 869-877.
- [71] H. L. T. Lee, P. Boccazzi, N. Gorret, R. J. Ram, and A. J. Sinskey, In situ bioprocess monitoring of *Escherichia coli* bioreactions using Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 35 (2004) 131-137.
- [72] A. D. Shaw, N. Kaderbhai, A. Jones, A. M. Woodward, R. Goodacre, J. Rowland, and D. B. Kell, Noninvasive, on-line monitoring of the biotransformation by yeast of glucose to ethanol using dispersive Raman spectroscopy and chemometrics, *Applied Spectroscopy* 53 (1999) 1419-1428.
- [73] R. J. Swain, and M. M. Stevens, Raman microspectroscopy for non-invasive biochemical analysis of single cells, *Biochem Soc Trans* 35 (2007) 544-549.
- [74] K. W. Short, S. Carpenter, J. P. Freyer, and J. R. Mourant, Raman Spectroscopy Detects Biochemical Changes due to proliferation in Mammalian Cell cultures, *Biophysical Journal* 88 (2005) 4274-4288.
- [75] I. Nothinger, Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors, *Sensors* 7 (2007) 1343-1358.
- [76] K. Friehs, B. Hitzmann, and T. Scheper, Prozessanalytik, in *Angewandte Mikrobiologie*, in Antranikian, G., (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 2005, pp. 268-287.
- [77] J. G. Frerichs, Entwicklung eines in-situ Mikroskops zur bildgeschützten on-line Überwachung von Bioprozessen, Dissertation (2000) Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [78] K. Schneider, In-situ Mikroskopie - Entwicklung und Einsatz eines Auflicht-Fluoreszenzensors zur Bestimmung der Zellkonzentration in Bioprozessen, (1995) Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [79] V. Camisard, J. P. Brienne, H. Baussart, J. Hammann, and H. Suhr, Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: application to volume variation induced by osmotic stress, *Biotechnol Bioeng* 78 (2002) 73-80.

- [80] J. G. Frerichs, K. Joeris, K. Konstantinov, and T. Scheper, Einsatz eines In-situ-Mikroskops zur online-Beobachtung von Tierzellkultivierungen, *Chemie Ingenieur Technik* 74 (2002) 1629-1633.
- [81] K. Joeris, J. G. Frerichs, K. Konstantinov, and T. Scheper, In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures, *Cytotechnology* 38 (2002) 129-134.
- [82] G. Rudolph, T. Brückerhoff, A. Bluma, G. Korb, and T. Scheper, Optische Inline-Messverfahren zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung in der Bioprozesstechnik, *Chemie Ingenieur Technik* 79 (2007) 42-51.
- [83] T. Brückerhoff, Bildbasierte In-line Monitoring von Kultivierungsprozessen mit optimierten In-situ Mikroskopsystem, Dissertation (2006) Insitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [84] J. Guez, J. Cassar, F. Wartelle, P. Dhulster, and H. Suhr, Real time in situ microscopy for animal cell-concentration monitoring during high density culture in bioreactor, *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 111 (2004) 335-343.
- [85] K. Joeris, J. G. Frerichs, K. Konstantinov, and T. Scheper, In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures, *Cytotechnology* 38 (2002) 129-134.
- [86] J.-G. Frerichs, K. Joeris, K. Konstantinov, and T. Scheper, Use of an in-situ microscope for on-line observation of animal cell cultures, *Chemie Ingenieur Technik* 74 (2002) 1629-1633.
- [87] V. Camisard, J. Brienne, H. Baussart, J. Hammann, and H. Suhr, Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress (vol 78, pg 73, 2002), *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 78 (2002) 353-353.
- [88] C. Bittner, G. Wehnert, and T. Scheper, In situ microscopy for on-line determination of biomass, *Biotechnol Bioeng* 60 (1998) 24-35.
- [89] H. Suhr, G. Wehnert, K. Schneider, C. Bittner, T. Scholz, P. Geissler, B. Jahne, and T. Scheper, In-Situ Microscopy for Online Characterization of Cell-Populations in Bioreactors, Including Cell-Concentration Measurements by Depth from Focus, *Biotechnology and Bioengineering* 47 (1995) 106-116.
- [90] N. Wei, J. You, K. Friehs, E. Flaschel, and T. W. Nattkemper, In situ dark field microscopy for on-line monitoring of yeast cultures, *Biotechnol Lett* 29 (2007) 373-378.
- [91] N. Wei, J. You, K. Friehs, E. Flaschel, and T. W. Nattkemper, An in situ probe for on-line monitoring of cell density and viability on the basis of dark field microscopy in conjunction with image processing and supervised machine learning, *Biotechnol Bioeng* 97 (2007) 1489-1500.
- [92] G. Rudolph, P. Lindner, A. Gierse, A. Bluma, G. Martinez, B. Hitzmann, and T. Scheper, Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy, *Biotechnol Bioeng* 99 (2008) 136-145.
- [93] U. Gottschalk, Downstream processing of Monoclonal Antibodies: from High Dilution to High Purity, *BioPharm International* 18 (2005) 42-58.

-
- [94] D. Low, R. O'Leary, and N. S. Pujar, Future of antibody purification, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848 (2007) 48-63.
- [95] B. A. Andrews, S. Nielsen, and J. A. Asenjo, Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems, *Bioseparation* 6 (1996) 303-313.
- [96] P. A. Rosa, A. M. Azevedo, I. F. Ferreira, J. de Vries, R. Korporaal, H. J. Verhoef, T. J. Visser, and M. R. Aires-Barros, Affinity partitioning of human antibodies in aqueous two-phase systems, *J Chromatogr A* 1162 (2007) 103-113.
- [97] S. Ozkara, S. Akgol, Y. Canak, and A. Denizli, A novel magnetic adsorbent for immunoglobulin-g purification in a magnetically stabilized fluidized bed, *Biotechnol Prog* 20 (2004) 1169-1175.
- [98] M. B. Dainiak, V. Izumrudov, V. I. Muronetz, M. Galaev, and B. Mattiasson, Affinity Precipitation of monoclonal antibodies by nonstoichiometric polyelectrolyte complexes, *Bioseparation* 7 (1998) 231.
- [99] M. A. Taipa, R. Kaul, B. Mattiasson, and J. M. Cabral, Preliminary studies on the purification of a monoclonal antibody by affinity precipitation with Eudragit S-100, *J Mol Recognit* 11 (1998) 240-242.
- [100] S. K. Basu, C. P. Govardhan, C. W. Jung, and A. L. Margolin, Protein crystals for the delivery of biopharmaceuticals, *Expert Opin Biol Ther* 4 (2004) 301-317.
- [101] V. Klyushnichenko, Protein crystallization: from HTS to kilogram-scale, *Curr Opin Drug Discov Devel* 6 (2003) 848-854.
- [102] S. Hober, K. Nord, and M. Linhult, Protein A chromatography for antibody purification, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848 (2007) 40-47.
- [103] S. Ghose, M. Allen, B. Hubbard, C. Brooks, and S. M. Cramer, Antibody variable region interactions with Protein A: implications for the development of generic purification processes, *Biotechnol Bioeng* 92 (2005) 665-673.
- [104] K. Brorson, S. Krejci, K. Lee, E. Hamilton, K. Stein, and Y. Xu, Bracketed generic inactivation of rodent retroviruses by low pH treatment for monoclonal antibodies and recombinant proteins, *Biotechnol Bioeng* 82 (2003) 321-329.
- [105] R. van Reis, and A. Zydney, Membrane separations in biotechnology, *Curr Opin Biotechnol* 12 (2001) 208-211.
- [106] R. J. Harris, S. J. Shire, and C. Winter, Commercial manufacturing scale formulation and analytical characterization of therapeutic recombinant antibodies, *Drug Development Research* 61 (2004) 137-154.
- [107] D. Josic, and Y. Lim, Analytical and preparative methods for purification of antibodies, *FOOD TECHNOL BIOTECH* 39 (2001) 215-226.
- [108] B. Kelley, Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations, *Biotechnol Prog* 23 (2007) 995-1008.
- [109] T. Ngo, Affinity Chromatographic Purification of Antibodies, *Analytical Letters* 40 (2007) 2799-2820.

- [110] A. C. Roque, C. S. Silva, and M. A. Taipa, Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives, *J Chromatogr A* 1160 (2007) 44-55.
- [111] A. Verdoliva, F. Pannone, M. Rossi, S. Catello, and V. Manfredi, Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G, *J IMMUNOL METHODS* 271 (2002) 77-88.
- [112] A. Verdoliva, D. Marasco, A. De Capua, A. Saporito, P. Bellofiore, V. Manfredi, R. Fattorusso, C. Pedone, and M. Ruvo, A new ligand for immunoglobulin G subdomains by screening of a synthetic peptide library, *CHEMBIOCHEM* 6 (2005) 1242-1253.
- [113] S. F. Teng, K. Sproule, A. Husain, and C. R. Lowe, Affinity chromatography on immobilized "biomimetic" ligands. Synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 740 (2000) 1-15.
- [114] S. Chhatre, N. J. Titchener-Hooker, A. R. Newcombe, and E. Keshavarz-Moore, Purification of antibodies using the synthetic affinity ligand absorbent MAbsorbent A2P, *Nat Protoc* 2 (2007) 1763-1769.
- [115] E. Boschetti, The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review, *J Biochem Biophys Methods* 49 (2001) 361-389.
- [116] W. Schwart, D. Judd, M. Wysocki, L. Guerrier, E. Birck-Wilson, and E. Boschetti, Comparison of hydrophobic charge induction chromatography with affinity chromatography on protein A for harvest and purification of antibodies, *J Chromatogr A* 908 (2001) 251-263.
- [117] R. Li, V. Dowd, D. J. Stewart, S. J. Burton, and C. R. Lowe, Design, synthesis, and application of a protein A mimetic, *Nat Biotechnol* 16 (1998) 190-195.
- [118] G. Fassina, A. Verdoliva, M. R. Odierna, M. Ruvo, and G. Cassini, Protein A mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies, *J Mol Recognit* 9 (1996) 564-569.
- [119] S. Schubert, and R. Freitag, Comparison of ceramic hydroxy- and fluoroapatite versus Protein A/G-based resins in the isolation of a recombinant human antibody from cell culture supernatant, *J CHROMATOGR A* 1142 (2007) 106-113.
- [120] A. Schwarz, F. Kohen, and M. Wilchek, Novel heterocyclic ligands for the thiophilic purification of antibodies, *J Chromatogr B Biomed Appl* 664 (1995) 83-88.
- [121] V. Brenac-Brochier, A. Schapman, P. Santambien, and L. Britsch, Fast purification process optimization using mixed-mode chromatography sorbents in pre-packed mini-columns, *J CHROMATOGR A* 1177 (2008) 226-233.
- [122] K. Swinnen, Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies, *Journal of Chromatography B* 848 (2007) 97-107.
- [123] S. Ghose, B. Hubbard, and S. M. Cramer, Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials, *Biotechnol Bioeng* 96 (2007) 768-779.
- [124] R. Necina, K. Amatschek, and A. Jungbauer, Capture of human monoclonal antibodies from cell culture supernatant by ion exchange media exhibiting high charge density, *Biotechnol Bioeng* 60 (1998) 689-698.

-
- [125] A. Subramanian, Chromatographic Purification of MABs with Non-affinity Supports, *BioPharm International* 18 (2005) 64-70.
- [126] G. M. Ferreira, A Two Column Process to purify antibodies without Protein A, *BioPharm International* Mai (2007) 32-38.
- [127] D. K. Follman, and R. L. Fahrner, Factorial screening of antibody purification processes using three chromatography steps without protein A, *J Chromatogr A* 1024 (2004) 79-85.
- [128] R. Ghosh, Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges, *J CHROMATOGR A* 952 (2002).
- [129] D. K. Roper, and E. N. Lightfoot, Separation of biomolecules using adsorptives membranes, *J CHROMATOGR A* 702 (1995) 3-26.
- [130] C. Boi, Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification, *J CHROMATOGR B* 848 (2007) 19-27.
- [131] J. Thömmes, and M.-R. Kula, Membrane Chromatography - An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins, *BIOTECHNOL PROGR* 11 (1995) 357-367.
- [132] W. Demmer, and D. Nussbaumer, Large-scale membrane adsorbers, *J Chromatogr A* 852 (1999) 73-81.
- [133] J. X. Zhou, and T. Tressel, Membrane Chromatography as robust system for large-scale antibody production, *BioProcess International* 3 (2005) 32-37.
- [134] H. L. Knudsen, R. L. Fahrner, Y. Xu, L. A. Norling, and G. S. Blank, Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification, *J Chromatogr A* 907 (2001) 145-154.
- [135] R. Specht, B. Han, S. R. Wickramasinghe, J. O. Carlson, P. Czermak, A. Wolf, and O. W. Reif, Densonucleosis virus purification by ion exchange membranes, *Biotechnol Bioeng* 88 (2004) 465-473.
- [136] A. Karger, B. Bettin, H. Granzow, and T. C. Mettenleiter, Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane, *J Virol Methods* 70 (1998) 219-224.
- [137] D. Harkensee, O. Kokpinar, J. Walter, C. Kasper, S. Beutel, O. Reif, T. Scheper, and R. Ulber, Fast screening for the purification of proteins using membrane adsorber technology, *ENG LIFE SCI* 7 (2007) 388-394.
- [138] J. Thömmes, and M. Etzel, Alternatives to chromatographic separations, *Biotechnol Prog* 23 (2007) 42-45.
- [139] J. X. Zhou, and T. Tressel, Basic concepts in Q membrane chromatography for large-scale antibody production, *Biotechnol Prog* 22 (2006) 341-349.
- [140] J. X. Zhou, T. Tressel, U. Gottschalk, F. Solamo, A. Pastor, S. Dermawan, T. Hong, O. Reif, J. Mora, F. Hutchison, and M. Murphy, New Q membrane scale-down model for process-scale antibody purification, *J Chromatogr A* 1134 (2006) 66-73.

- [141] T. B. Tennikova, and J. Reusch, Short monolithic beds: history and introduction to the field, *J Chromatogr A* 1065 (2005) 13-17.
- [142] T. Tennikova, An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography, *J High Resol Chromatogr* 23 (2000) 27-38.
- [143] A. Podgornik, M. Barut, and A. Strancar, Construction of a large-volumen monolithic columns, *Anal Chem* 72 (2000) 5693-5699.
- [144] F. Svec, and J. M. Frechet, Modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative-scale ion-exchange chromatography of proteins, *J Chromatogr A* 702 (1995) 89-95.
- [145] D. Josic, A. Buchacher, and A. Jungbauer, Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 752 (2001) 191-205.
- [146] N. D. Ostryanina, O. V. Il'ina, and T. B. Tennikova, Effect of experimental conditions on strong biocomplimentary pairing in high-performance monolithic disk affinity chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 770 (2002) 35-43.
- [147] D. Josic, and A. Buchacher, Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion, *J Biochem Biophys Methods* 49 (2001) 153-174.
- [148] K. Branovic, G. Lattner, M. Barut, A. Strancar, D. Josic, and A. Buchacher, Very fast analysis of impurities in immunoglobulin concentrates using conjoint liquid chromatography on short monolithic disks, *J Immunol Methods* 271 (2002) 47-58.
- [149] J. Hagedorn, C. Kasper, R. Freitag, and T. Tennikova, High performance flow injection analysis of recombinant protein G, *J Biotechnol* 69 (1999) 1-7.
- [150] L. G. Berruex, R. Freitag, and T. B. Tennikova, Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 24 (2000) 95-104.
- [151] N. D. Ostryanina, G. P. Vlasov, and T. B. Tennikova, Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography, *J Chromatogr A* 949 (2002) 163-171.
- [152] E. Vlach, N. Ostryanina, A. Jungbauer, and T. Tennikova, Use of monolithic sorbents modified by directly synthesized peptides for affinity separation of recombinant tissue plasminogen activator (t-PA), *J Biotechnol* 107 (2004) 275-284.
- [153] D. Josic, and J. Reusch, High-performance membrane chromatography of serum and plasma proteins, *J Chromatogr* 590 (1992) 59-76.
- [154] A. Strancar, M. Barut, A. Podgornik, P. Koselj, H. Schwinn, P. Raspor, and D. Josic, Application of compact porous tubes for preparative isolation of clotting factor VIII from human plasma, *J Chromatogr A* 760 (1997) 117-123.
- [155] T. V. Gupalova, O. V. Lojkina, V. G. Palagnuk, A. A. Totolian, and T. B. Tennikov, Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein

- G by means of high-performance monolithic chromatography, *J Chromatogr A* 949 (2002) 185-193.
- [156] G. A. Platonova, G. A. Pankova, I. Y. Il'ina, G. P. Vlasov, and T. B. Tennikova, Quantitative fast fractionation of a pool of polyclonal antibodies by immunoaffinity membrane chromatography, *J Chromatogr A* 852 (1999) 129-140.
- [157] F. B. Anspach, D. Curbelo, R. Hartmann, G. Garke, and W. D. Deckwer, Expanded-bed chromatography in primary protein purification, *J Chromatogr A* 865 (1999) 129-144.
- [158] G. S. Blank, G. Zapata, R. Fahrner, M. Milton, C. Yedinak, H. Knudsen, and C. Schmelzer, Expanded bed adsorption in the purification of monoclonal antibodies: a comparison of process alternatives, *Bioseparation* 10 (2001) 65-71.
- [159] M. E. Vilorio-Cols, R. Hatti-Kaul, and B. Mattiasson, Agarose-coated anion exchanger prevents cell-adsorbent interactions, *J CHROMATOGR A* 1043 (2004) 195-200.
- [160] Y. Gonzalez, N. Ibarra, H. Gomez, M. Gonzalez, L. Dorta, S. Padilla, and R. Valdes, Expanded bed adsorption processing of mammalian cell culture fluid: comparison with packed bed affinity chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 784 (2003) 183-187.
- [161] R. L. Fahrner, G. S. Blank, and G. A. Zapata, Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized monoclonal antibody: process development, operation, and comparison with a packed bed method, *J Biotechnol* 75 (1999) 273-280.
- [162] J. Feuser, M. Halfar, D. Lütkemeyer, N. Ameskamp, M. R. Kula, and J. Thömmes, Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies, *Process Biochemistry* 34 (1999) 159-165.
- [163] K. Holschuh, and A. Schwämmle, Preparative purification of antibodies with protein A - an alternative to conventional Chromatography, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (2005) 345-348.
- [164] D. Q. Lin, P. J. Brixius, J. J. Hubbuch, J. Thommes, and M. R. Kula, Biomass/adsorbent electrostatic interactions in expanded bed adsorption: a zeta potential study, *Biotechnol Bioeng* 83 (2003) 149-157.
- [165] H. M. Fernandez-Lahore, S. Geilenkirchen, K. Boldt, A. Nagel, M. R. Kula, and J. Thommes, The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds, *J Chromatogr A* 873 (2000) 195-208.
- [166] J. Feuser, J. Walter, M. R. Kula, and J. Thommes, Cell/adsorbent interactions in expanded bed adsorption of proteins, *Bioseparation* 8 (1999) 99-109.
- [167] H. R. Zielke, C. L. Zielke, and P. T. Ozand, Glutamin: a major energy source for cultured mammalian cells, *Federation proceedings* 43 (1984) 121 -125.
- [168] D. Petch, and M. Butler, Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization, *J Cell Physiol* 161 (1994) 71-76.
- [169] L. Stryer, *Biochemie*, ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1996.

- [170] J. B. Griffith, and S. J. Pirt, Uptake of Amino Acids by Mouse Cells (Strain Ls) during Growth in Batch Culture and Chemostat Culture - Influence of Cell Growth Rate, Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 168 (1967) 421.
- [171] M. Newland, P. F. Greenfield, and S. Reid, Hybridoma growth limitations: the roles of energy metabolism and ammonia production, Cytotechnology 3 (1990) 215-229.
- [172] J. Neermann, and R. Wagner, Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells, J Cell Physiol 166 (1996) 152-169.
- [173] M. Butler, and H. Jenkins, Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture, Journal of Biotechnology 12 (1989) 97-110.
- [174] M. Schneider, I. W. Marison, and U. von Stockar, The importance of ammonia in mammalian cell culture, J Biotechnol 46 (1996) 161-185.
- [175] O.-W. Merten, Growth characteristics of hybridoma in batch culture, Cytotechnology 1 (1988) 113-122.
- [176] M. Al-Rubeai, A. N. Emery, S. Chalder, and D. C. Jan, Specific monoclonal antibody productivity and the cell cycle-comparisons of batch, continuous and perfusion cultures, Cytotechnology 9 (1992) 85-97.
- [177] N. Borth, R. Heider, A. Assadian, and H. Katinger, Growth and production kinetics of human x mouse and mouse hybridoma cells at reduced temperature and serum content, J Biotechnol 25 (1992) 319-331.
- [178] P. M. Hayter, N. F. Kirkby, and R. E. Spier, Relationship between hybridoma growth and monoclonal antibody production, Enzyme Microb Technol 14 (1992) 454-461.
- [179] W. M. Miller, H. W. Blanch, and C. R. Wilke, A Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism in Batch and Continuous Suspension Culture: Effect of Nutrient Concentration, Dilution Rate, and pH, Biotechnology and Bioengineering 32 (1988) 947-965.
- [180] D. K. Robinson, T. C. Seamans, S. L. Gould, D. J. DiStefano, C. P. Chan, D. K. Lee, T. Bibila, K. Glazomitsky, S. Munshi, B. Daugherty, and et al., Optimization of a fed-batch process for production of a recombinant antibody, Ann N Y Acad Sci 745 (1994) 285-296.
- [181] C. Schmatz, O. Hohenwarter, S. Wiederikum, N. Borth, K. Strutzenberger, and H. Katinger, in (<http://www.boku.ac.at/iam/poster/media.htm>, Ed.), 1995 Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität für Bodenkultur, Wien.
- [182] J. G. Gaertner, and P. Dhurjati, Fractional factorial study of hybridoma behavior. 1. Kinetics of growth and antibody production, Biotechnol Prog 9 (1993) 298-308.
- [183] J. G. Gaertner, and P. Dhurjati, Fractional factorial study of hybridoma behavior. 2. Kinetics of nutrient uptake and waste production, Biotechnol Prog 9 (1993) 309-316.
- [184] S. Reuveny, D. Valez, J. D. Macmillan, and L. Miller, Factors affecting monoclonal antibody production in culture, Dev Biol Stand 66 (1987) 169-175.
- [185] L. Behr, Laufende Dissertation, Insitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover (2008).

- [186] B. Grote, Laufende Dissertation, Insitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover (2008).
- [187] S. Marose, Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie, Dissertation (1999) Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [188] D. W. Zabriskie, and A. E. Humphrey, Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence, *Appl Environ Microbiol* 35 (1978) 337-343.
- [189] K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, and K.-U. Jagemann, *Chemometrik - Grundlagen und Anwendung*, ed., Springer Verlag Berlin 2001.
- [190] H. Z. Wan, S. Kaneshiro, J. Frenz, and J. Cacia, Rapid method for monitoring galactosylation levels during recombinant antibody production by electrospray mass spectrometry with selective-ion monitoring, *J Chromatogr A* 913 (2001) 437-446.
- [191] T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, and M. S. Ricci, Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J CHROMATOGR A* 1053 (2004) 299-305.
- [192] T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, D. S. Rehder, G. D. Pipes, G. R. Kleemann, and M. S. Ricci, Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability, *J CHROMATOGR A* 1120 (2006) 112-120.
- [193] D. Josic, H. Schwinn, A. Strancar, A. Podgornik, M. Barut, Y. P. Lim, and M. Vodopivec, Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses, *J Chromatogr A* 803 (1998) 61-71.
- [194] J. Ruzicka, and E. H. Hansen, *Flow Injektion Analysis*, 2nd ed., Wiley, New York 1988.
- [195] J. Hagedorn, C. Kasper, R. Freitag, and T. Tennikova, High performance flow injection analysis of recombinant Protein G, *Journal of Biotechnology* 69 (1999) 1-7.
- [196] A. Münster, Einsatz der Membranadsorbertechnik zur Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen, Diplomarbeit (2008) Insitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- [197] T. Jossang, J. Feder, and E. Rosenqvist, Photon correlation spectroscopy of human IgG, *J Protein Chem* 7 (1988) 165-171.
- [198] A. Pastor, Laufende Dissertation, Insitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover (2008).
- [199] L. van der Pol, and J. Tramper, Shear sensitivity of animal cells from a culture medium perspective, *Trends Biotechnol* 16 (1998) 323-328.
- [200] S. Sen, W.-s. HU, and F. Sriene, Flow cytometric study og hybridoma cell culture: correlation between cell surface fluorescence and IgG production rate, *ENZYME MICROB TECH* 12 (1990) 571-576.

- [201] K. L. Mc Kinney, R. Dilwith, and G. Belfort, Manipulation of Heterogeneous Hybridoma Culture for Overproduction of Monoclonal antibodies, *Biotechnol Prog* 7 (1991) 445-454.
- [202] C. Legrand, J. M. Bour, C. Jacob, J. Capiaumont, A. Martial, A. Marc, M. Wudtke, G. Kretzmer, C. Demangel, D. Duval, and et al., Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected], *J Biotechnol* 25 (1992) 231-243.
- [203] H. A. Chase, and N. M. Draeger, Affinity purification of proteins using expanded beds, *J Chromatogr* 597 (1992) 129-145.
- [204] J. Thömmes, A. Bader, M. Halfar, A. Karau, and M. R. Kula, Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds, *J Chromatogr A* 752 (1996) 111-122.
- [205] N. M. Draeger, and H. A. Chase, Liquid fluidized bed adsorption of protein in the presence of cells, *Bioseparation* 2 (1991) 67-80.
- [206] J. Schmieding, Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern für Enzymtechnik und Umweltanalytik, Dissertation (1995) Technische Universität Hamburg-Harburg, Hamburg.
- [207] J. G. Walter, vorgelegte Dissertation: Neue Materialien und Methoden in der Protein-Microarray-Technologie, (2008) Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Anton, Fabienne
Geburtsdatum	21.03.1980
Geburtsort	Hannover

Schulbildung

1986-1990	Grundschule Osterberg, Garbsen
1990-1992	Orientierungsstufe, Garbsen
1992-1999	Johannes-Kepler-Gymnasium, Garbsen
Juni 1999	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999-2004	Studium Chemie-Diplom an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2004-2005	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Thema: „Einfluss der Temperatur auf das Wachstums- und Produktionsverhalten von CHO ^{SFS} -hGh Zellen und Charakterisierung eines neuen Bioreaktors“
Seit 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Doktorandin am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Publikationsliste

Journals

K. Ralla, **F. Anton**, T. Scheper, C. Kasper.

Application of conjoint liquid chromatography with monolithic disks for the simultaneous determination of immunoglobulin G and other proteins present in a cell culture medium.

Journal of Chromatography A, 2008 in Druck

Ö. Kökpinar, J.-G. Walter, **F. Anton**, A. Münster, C. Kasper, F. Stahl, T. Scheper.

Membranadsorbersysteme in der Proteinaufreinigung: Screening-Möglichkeiten.

Chemie Ingenieur Technik, 80 (6), 2008, 861-865.

F. Anton, K. Suck, S. Diederichs, L. Behr, B. Hitzmann, M. van Griensven, T. Scheper, C. Kasper.

Design and Characterization of a rotating bed system (RBS) bioreactor for tissue engineering applications.

Biotechnology Progress, 24 (1), 2008, 140-147.

F. Anton, A. Burzlaff, C. Kasper, T. Brückerhoff, T. Scheper.

Preliminary Study Towards the Use of In-Situ Microscopy for Online Analysis of Microcarrier Cultivations.

Engineering in Life Science, 7 (1), 2007, 91-96

F. Anton, A. Tappe, C. Kasper, A. Loa, B.-U. Wilhelm, T. Scheper.

The Production of Human Growth Hormone.

In: Cell Technology for Cell Products. Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, June 5-8, 2005; R. Smith (Ed.), Springer Verlag GmbH, 2007, 385-391.

C. Kasper, K. Suck, **F. Anton**, T. Scheper, S. Kall and M. van Griensven.

A Newly Developed Rotating Bed Bioreactor for Bone Tissue Engineering.
ebook: Topics in Tissue Engineering Vol. 3, 2007.

http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3/index.html

D. Riechers, **F. Anton**, A. Glindkamp, L. Behr, C. Kasper, T. Scheper.
Optimierung eines Systems für blasenfreie Begasung von Säugerzellkulturen.
Chemie Ingenieur Technik, 78 (9), 2006, 1422-1423.

Kongressbeiträge (Posterpräsentationen)

L. Behr, P. Moretti, **F. Anton**, C. Kasper, T. Scheper.
Selection of High-Producing Cells via Cell Sorting using an Affinity Matrix.
20th ESACT Meeting, Dresden, 2007.

F. Anton, L. Behr, A. Pastor, O.-W. Reif, T. Scheper.
Direct Capture Application in Downstream Processing of Proteins with Membrane based
Chromatography.
European BioPerspectives, Köln, 2007.

Ö. Kökpinar, **F. Anton**, D. Harkensee, C. Kasper, R. Zeidler, O.-W. Reif, R. Ulber and T. Scheper.
Modular Membrane Adsorber based System for Protein Purification.
ECI Cell Culture Engineering X, Whistler, BC, Kanada, 2006.

D. Riechers, **F. Anton**, A. Glindkamp, L. Behr, C. Kasper, T. Scheper.
Application of a Hollow-fiber Membrane Stirring System for Oxygenation in Suspension Cell
Culture.
ECI Cell Culture Engineering X, Whistler, BC, Kanada, 2006.

F. Anton, A. Tappe, C. Kasper, A. Loa, B.-U. Wilhelm, T. Scheper.
Production of Recombinant Human Growth Hormone.
19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, 2005.