

**Entwicklung und Anwendung innovativer
Methoden in der Säugerzellkultivierung im
Bioreaktor für die Herstellung von
pharmazeutischen Proteinen**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

Dipl.-Ing. Larissa Christiane Behr
geboren am 16.02.1977 in Berlin

2009

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

Korreferent PD Dr. Cornelia Kasper
 Institut für Technische Chemie
 Universität Hannover

Tag der Promotion: 06. Februar 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Arbeit wurde nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 06. Februar 2009

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich besonders für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die freundliche Unterstützung, die verschiedenen Industrieprojekte und insbesondere für die Möglichkeit einen Teil meiner Doktorarbeit bei Bayer HealthCare in den USA durchzuführen.

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

Bei der Arbeitsgruppe Process and Technology Development bei Bayer HealthCare möchte ich mich für die großartigen Arbeitsmöglichkeiten, die freundlich Aufnahme und Unterstützung während meiner Zeit dort bedanken.

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

Dem gesamten Arbeitskreis und allen Angestellten des Instituts für Technische Chemie möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft danken. Ich danke insbesondere Frau Martina Weiß für die HPLC Analyse zahlreicher Proben, Herrn Martin Pähler für seine Hilfsbereitschaft und der Feinmechanikwerkstatt bei der Lösung diverser technischer Probleme. Bei Pierre Moretti und Daniel Landgrebe möchte ich mich für die gute ergebnisreiche Zusammenarbeit während ihrer Master- und Diplomarbeiten bedanken. Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für seine Hilfsbereitschaft und ebenfalls danke ich Bianca Grote für die Auswertung der 2D-Fluoreszenzspektren für Roche sowie Dörte Solle für die Beantwortung diverser Fragen.

Fabienne Anton möchte für die sehr gute Teamarbeit in einer Vielzahl von Projekten, die schöne gemeinsame Zeit während der Doktorarbeit und natürlich die Korrektur meiner Arbeit danken. Bei dem Hühnerstall möchte ich mich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre (besonders die Freitagsgespräche) und insbesondere bei Johanna Walter für die Unterstützung bei den Microarrays und das Korrekturlesen meiner Arbeit herzlich bedanken.

Klaus danke ich für seine guten Ideen, sowie natürlich für seine Liebe und Unterstützung während dieser drei Jahre. Ein herzlicher Dank geht an Frank und Sabine für die gute Korrektur meiner Arbeit und die vielen aufbauenden Gespräche. Allen Freunden und Verwandten danke ich, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte und Interesse am Gelingen meiner Doktorarbeit hatten.

Meinen Eltern für ihre Liebe, fortwährende Unterstützung und Interesse an meinem Werdegang.

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT.....	VII
1 EINLEITUNG	1
2 ZIELSETZUNG	3
3 GRUNDLAGEN	5
3.1 Säugerzellkultivierung.....	5
3.2 Optimierung von Zelllinien	9
3.2.1 Durchflusszytometrie.....	10
3.2.1.1 Farbstoffe in der Durchflusszytometrie	11
3.2.1.2 Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie	12
3.3 Optimierung von Zellkulturprozessen	15
3.3.1 Zweidimensionale (2D-) Fluoreszenzspektroskopie.....	16
3.3.2 Sauerstoffaufnahme (OUR) Bestimmung	18
3.3.2.1 Sauerstoffaufnahme bei Säugetierzellen	18
3.3.2.2 Messmethoden	20
4 EXPERIMENTELLER TEIL UND ERGEBNISSE.....	25
4.1 Optimierung von Zelllinien	25
4.1.1 Färbung und Sortierung der Hybridomzellen	25
4.1.1.1 Proliferationsverhalten der Hybridomzelllinie IV F 19.23	26
4.1.1.2 Produktionsverhalten der Hybridomzelllinie IV F 19.23	29
4.1.1.3 Durchflusszytometrische Einzelzellanalysen.....	31
4.1.1.4 Fazit	34
4.1.2 Anwendung einer Affinitätsmatrixfärbemethode.....	35
4.1.2.1 Funktionalitätsuntersuchung mittels Protein-Microarrays.....	37
4.1.2.2 Funktionalitätsuntersuchung mittels der Durchflusszytometrie	40
4.1.3 Sortierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23	42
4.1.3.1 Produktivitätsbestimmung der IV F 19.23 Zellen.....	47
4.1.3.2 Fazit	48
4.1.4 Färbung und Sortierung der HKB-11 Zellen	48
4.1.4.1 Proliferations- und Produktionsverhalten der HKB-11 Zelllinie	49
4.1.4.2 Anwendung einer Affinitätsmatrixfärbemethode.....	52
4.1.4.3 Fazit	59

4.2	Optimierung von Bioprozessen.....	61
4.2.1	Einsatz des BioView®-Sensors für Zellkulturprozesse	61
4.2.1.1	Chemometrische Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren	62
4.2.1.2	Voruntersuchung im Batch-Modus	66
4.2.1.3	Anwendung des BioView®-Sensors bei Fed-Batch-Kultivierungen .	74
4.2.1.4	Anwendung des BioView®-Sensors bei Perfusions-Kultivierungen	81
4.2.1.5	Einfluss verschiedener Prozessparameter auf 2D-Fluoreszenzspektren	87
4.2.1.6	Fazit	93
4.2.2	Einsatz des insitu OUR Sensors für Zellkulturprozesse.....	96
4.2.2.1	Aufbau des insitu OUR Sensors.....	96
4.2.2.2	Funktionalitätsuntersuchung des insitu OUR Sensors.....	99
4.3	Zusammenfassung und Ausblick	105
5	LITERATURVERZEICHNIS	111
6	ANHANG	123
6.1	Methoden.....	123
6.1.1	Kulturmedien und Puffer.....	123
6.1.2	Eingesetzte Zelllinien.....	124
6.1.3	Zellkultivierung.....	125
6.1.4	Analytik	126
6.1.4.1	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.....	126
6.1.4.2	Bestimmung von Glukose und Laktat	126
6.1.4.3	Maus IgG- Konzentrationsbestimmung	127
6.1.4.4	Fc-Fragment-Konzentrationsbestimmung.....	128
6.1.4.5	Aminosäurekonzentrationsbestimmung	129
6.1.5	Färbemethoden für die Durchflusszytometrie.....	131
6.1.5.1	Affinitätsmatrix Färbung der Hybridom Zellen IV F 19.23 [65].....	131
6.1.5.2	Affinitätsmatrix Färbung der HKB-11 Zellen	132
6.1.5.3	Fixierung mit MeOH.....	133
6.1.5.4	Intrazelluläre Färbung	133
6.1.5.5	Bestimmung der spezifischen Produktionsgeschwindigkeit.....	134
6.1.6	Protein- <i>Microarray</i> Färbeprotokolle.....	135
6.1.7	2D-Fluoreszenzspektrometrie	138
6.1.7.1	BioView®-Einstellungen während der Zellkultivierungen.....	139
6.1.8	Weitere Ergebnisse im Rahmen der Protein- <i>Microarray</i> Untersuchungen	141
6.1.8.1	Ergebnisse der Auswertung der Protein-Microarrays für Hybridomzellfärbungen.....	141
6.1.8.2	Ergebnisse der Auswertung der Protein-Microarrays für HKB-11 Zellfärbungen.....	142
6.1.9	Weitere Ergebnisse im Rahmen der BioView-Messungen.....	142

6.1.9.1	Detaillierte Ergebnisse der Voruntersuchung der Modellbildung und die Vorhersage für die Hybridomzellkultivierungen	142
6.1.9.2	Ergebnisse der Hybridomzellkultivierungsauswertung	146
6.1.9.3	Ergebnisse der BHK-Zellkultivierung	147
6.2	Material.....	151
6.2.1	Verbrauchsmaterial	151
6.2.2	Chemikalien und Reagenzien	152
6.2.3	Geräte	153
6.3	Abkürzungsverzeichnis	156

Zusammenfassung

Die biotechnologische Produktion pharmazeutisch wirksamer Proteine mit Säugetierzellen ist durch deren langsames Wachstum und hohe Ansprüche an Medienzusammensetzung und Kultivierungsbedingungen ein kosten- und zeitintensives Verfahren. Um einen solchen Produktionsprozess im großtechnischen Maßstab rentabel durchzuführen, bedarf es unter anderem einer Optimierung der Zelllinien hinsichtlich ihrer Produktivität sowie einer Optimierung der Prozessanalytik zur besseren Beobachtung und Regelung des Kultivierungsprozesses. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Nutzung von in der Industrie häufig eingesetzten Zelllinien verschiedene Methoden, die zu einer Verbesserung von Produktionsprozessen beitragen können, entwickelt und angewendet.

Die Verwendung einer Affinitätsmatrixfärbemethode bei Sortierungen einer Hybridomzelllinie in Hinblick auf eine Steigerung der Produktivität konnte erfolgreich gezeigt werden. Basierend auf diesen Analysen ist eine Weiterentwicklung dieser Färbemethode vorgenommen worden. Deren erste Untersuchungen auf Protein-*Microarray* Ebene zeigten vielversprechende Ergebnisse für die Anwendung bei der Zellsortierung zur Produktivitätssteigerung.

Ferner wurde die Einsatzmöglichkeit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die nicht invasive online Prozessanalytik während der Herstellung pharmazeutischer Proteine mit Säugetierzellen für *Batch*-, *Fed-Batch*- und Perfusionsprozesse näher untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine multivariate Datenanalyse eine Vorhersage wichtiger Prozessgrößen mit hoher Genauigkeit ermöglicht. Ein Vergleich der verschiedenen Kultivierungsmodi macht den Einfluss der Zusammensetzung des Mediums und des Zellmetabolismus auf die chemometrische Datenauswertung deutlich.

Die Sauerstoffaufnahme von Zellen ist eine aussagekräftige Größe des Zellmetabolismus und dem zu Folge von entscheidender Bedeutung bei der Prozessentwicklung und Proteinproduktion sein. Die erfolgreiche Bestimmung dieser Größe mit Hilfe eines neu entwickelten online Sensors konnte anhand von BHK- (*Baby Hamster Kidney*) Zellkultivierungen im Perfusionsmodus gezeigt werden.

Abstract

The production of pharmaceutical proteins using mammalian cells is a resource and time intensive procedure due to their slow growth and high demands regarding medium composition and cultivation conditions. Optimization of cell line, medium and conditions is required to make a process economically feasible.

The productivity of cell populations was successfully improved by cell staining and sorting with a FACS system in the first part of this study. The affinity matrix staining method used was optimized and its efficiency was evaluated by protein microarrays.

The application of a 2D-fluorescence spectroscopy for non-invasive online process analysis during the production of pharmaceutical proteins in batch-, fed-batch- and perfusion processes was evaluated in the second part. Multivariate data analysis and the generation of chemometric models allowed the prediction of key process parameter with high accuracy. The comparison of different cultivation modes showed the influence of both the medium composition and the cell metabolism on the chemometric data analysis.

The oxygen uptake rate of cells is an important parameter of the cell metabolism and can be used for process development and monitoring of protein production. The successful determination of this parameter via a newly developed online sensor was shown by in BHK perfusion cultivations in the third part of this study.

Keywords:

Mammalian cells

Cell-surface affinity matrix

2D-Fluorescence spectroscopy

Oxygen uptake rate

Schlagwörter:

Säugetierzellen

Affinitätsmatrixfärbemethode

2D-Fluoreszenzspektroskopie

Sauerstoffaufnahme

1 Einleitung

Für die biotechnologische Produktion von pharmazeutischen Proteinen werden in der Industrie neben Bakterien und Hefen zunehmend auch Säugetierzellen eingesetzt. Erstere zeichnen sich durch ihre Robustheit, ein schnelles Wachstum und durch eine hohe Produktivität aus. Im Gegensatz zu Säugetierzellen verfügen Prokaryonten jedoch nicht über die Fähigkeit die Faltung der produzierten Proteine zu einer biologisch aktiven Tertiärstruktur vorzunehmen. Des Weiteren fehlt ihnen die Fähigkeit zur Durchführung von humankompatiblen, posttranslationalen Proteinmodifikationen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung [1]. Die Faltung und Modifikation der Proteine sind oftmals essentiell für die biologische und therapeutische Wirksamkeit der Proteine im Körper, da sie die mittlere Verweilzeit, die Löslichkeit und Immunogenität des Proteins im Körper bestimmen und das Protein vor Proteasen schützen können [2-5]. Zur Herstellung dieser posttranslational modifizierten, therapeutisch verwendbaren Proteine werden daher Säugetierzellen eingesetzt.

Charakteristisch für diese Zellen sind ein deutlich langsames Wachstum sowie eine verminderte Produktivität im Vergleich zu Prokaryonten. Unter dem Aspekt einer steigenden Nachfrage und einer kosten- und zeiteffizienteren Herstellung therapeutischer Proteine mit Hilfe von Säugetierzellen ist eine Steigerung der Produktausbeute demnach unabdingbar. Dies kann über eine Vergrößerung der Kultivierungsvolumina oder einer Intensivierung des Prozesses durch Erhöhung der Produktivität erfolgen. Ersteres könnte durch eine Erhöhung der Anzahl der Kultivierungsgefäße (z.B. Bioreaktoren) oder durch eine Vergrößerung der Gefäße erreicht werden. Das gesteigerte Volumen verursacht jedoch einen höheren Aufwand bei der anschließenden Isolierung der Proteine aus den Kultivierungslösungen. Eine Erhöhung der Produktivität des

Kultivierungsprozesses kann dagegen durch eine Optimierung der Zelllinie, des Mediums oder des Prozesses selbst erfolgen.

Die Auswahl einer geeigneten Zelllinie ist dabei der wichtigste Aspekt. Generell werden nach der Transfektion die Zellen mit den besten Wachstums- und Produktionseigenschaften ausgewählt und vermehrt. Aufgrund sehr unterschiedlicher Expressionsniveaus der rekombinanten Proteine entstehen zumeist sehr heterogene Zellpopulationen. Mögliche Ursachen liegen in der unterschiedlichen Kopienzahl der Gene, die in das Genom der Wirtszelle integrieren oder in der Instabilität der Zelllinie (wie beispielsweise bei Hybridomzellen) [6-9]. Zur Gewinnung einer homogenen Zellpopulation hochproduzierender Zellklone ist eine Selektion einzelner Zellen nach ihrer Produktivität erforderlich.

Optimierte Kulturmedien sollen das Wachstum und die Proteinproduktion der tierischen Zellen unterstützen und müssen daher auf jeden Zelltyp genau abgestimmt sein. In der Industrie werden zunehmend serumfreie und proteinfreie Medien mit chemisch definierter Zusammensetzung verwendet. Auf diese Weise wird die Aufreinigung erleichtert und das Risiko einer Kontamination mit Viren oder Fremdprotein über das Medium in den Produktionsprozess stark verringert.

Die Produktion rekombinanter Proteine durch Säugetierzellen wird überwiegend in Bioreaktoren durchgeführt. Eine Überwachung und Regelung des Prozesses erfolgt über eine intensive online und offline Analytik. Zu den online Messgrößen gehören üblicher Weise die Temperatur, die Sauerstoffkonzentration und der pH Wert. Alle weiteren wichtigen Kenngrößen wie Zellzahl, Metabolit- und Produktkonzentrationen können nur durch eine zeit- und kostenintensive offline Analytik bestimmt werden. Eine verbesserte online Kontrolle der Kultivierung könnte die Überwachung des Prozesses deutlich erleichtern und somit die Kosten senken.

2 Zielsetzung

Die Produktivität bei der Herstellung von pharmazeutischen Proteinen mit Säugetierzellen kann durch die Optimierung der Zelllinien, des Mediums oder des Prozesses gesteigert werden. Diese Arbeit befasst sich mit zwei Teilbereichen dieser Gebiete: Zum einen mit der Steigerung der Produktivität von Zelllinien und zum anderen mit der Verbesserung der online Kontrolle am Bioreaktor bei der Kultivierung von Säugetierzellen.

Das Vorgehen zur Produktivitätssteigerung einer Zellpopulation basiert auf der Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen, welche anschließend mittels eines FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) hinsichtlich ihrer Produktivitätseigenschaften hin sortiert werden. Eingangs soll eine Färbemethode etabliert und ihre Wirksamkeit unter Nutzung einer Hybridomzelllinie untersucht werden. Anschließend wird diese Färbemethode weiterentwickelt, um sie für verschiedene in Zelllinien produzierte Proteine zugänglich zu machen. Die breite Anwendbarkeit dieser innovativen Färbemethode soll am Beispiel einer neu entwickelten Zelllinie demonstriert werden.

Eine der zu untersuchenden online Messmethoden für die Bioreaktorkultivierung von verschiedenen Säugetierzellen ist die nicht-invasive 2D-Fluoreszenzmessung mit Hilfe des BioView® Sensors (DELTA Light & Optics). Die gewonnenen Fluoreszenzdaten sollen in Kombination mit multivariaten Auswerteverfahren zur Entwicklung chemometrischer Modelle für verschiedene Prozessgrößen verwendet werden. Diese Modelle könnten anschließend der besseren Prozessüberwachung und Steuerung dienen, da mit ihrer Hilfe Aussagen über zuvor nur offline gemessenen Prozessgrößen nun zeitnah getroffen werden können. Untersucht werden sollen zudem die Einflüsse verschiedener Kultivierungsmodi (*Batch*, *Fed-Batch*, *Perfusion*) auf die Modellbildung und Vorhersage. Darüber hinaus soll die Wirkung physikalischer Veränderungen im

Bioreaktor auf die 2D-Fluoreszenzspektren und deren Einfluss auf die multivariate Datenanalyse untersucht werden.

Eine weitere nicht-invasive online Messmethode ist die Sauerstoffaufnahme (Oxygen Uptake Rate, OUR) Messung. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein neu entwickeltes Messgerät (insitu OUR Sensor) zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme am Beispiel von BHK-Zellkultivierungen im Perfusionsmodus Anwendung finden. Bisher musste die Bestimmung dieser Größe entweder außerhalb des Bioreaktors oder unter Installation einer aufwendigen Abgasanalytik durchgeführt werden.

3 Grundlagen

3.1 Säugerzellkultivierung

Zelllinien

Die ersten Versuche mit tierischen Zellen wurden Anfang des 20. Jahrhundert beispielsweise von Ross Harrison (Aufbau von Nervenfasern) [10] und Alexis Carrel (Kulturmedien und Gefäßen für die Zellkultivierung) [11] durchgeführt. Die Weiterentwicklung der Kultivierungstechniken während des zweiten Weltkrieges wurde von dem Ziel getrieben, virale Impfstoffe zu entwickeln. 1955 konnte die erste Produktion im großen Maßstab von inaktivierten Polioviren in primären Affennierenzellen genehmigt werden. Die Methoden, die zur Gewinnung und Erhaltung primärer Zellkulturen entwickelt wurden, ebneten auch den Weg für die Entwicklung von stabilen Zelllinien. Hayflick entwickelte schließlich eine Zelllinie aus embryonalen Affennierenzellen-Geweben, die sich bis zu 50-mal teilen, kryokonservieren und revitalisieren ließen. Diese Zelllinie (WI-38) wurde zur Basis für die Produktion von Impfstoffen gegen Polio, Masern, Mumps und Röteln, während andere Zelllinien wie BHK für die Produktion von tierischen Impfstoffen eingesetzt wurden (z.B. für Maul- und Klauenseuche) [12]. Die Entwicklung dieser langlebigen und kontinuierlich wachsenden Zelllinien schuf die Möglichkeit einer breiteren Nutzung von Säugetierzellen für die Produktion verschiedenster therapeutisch verwendbarer Proteine. Mit Hilfe der Entwicklungen in der Gentechnologie war es ab Mitte der 70er Jahre möglich, zunächst in Prokaryonten und Hefen und später auch in Säugetierzellen Fremd-DNA transient oder stabil in das Genom einzubringen [13, 14]. Diese DNA-Rekombinationstechnologie ermöglichte es, eine Vielzahl humanähnlicher, posttranslational modifizierter Proteine *in vitro* in Säugerzellen zu produzieren. Auf Grund der zeit- und kostenintensiven Herstellungsprozesse ist diese Art der Proteinproduktion weiterhin nur für in Prokaryonten und Hefen nicht herstellbaren Proteine und nur für pharmazeutische Zwecke interessant.

Produkte

Die besondere Befähigung der Säugetierzellen posttranslationale Proteinmodifikationen durchzuführen (wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen) führt seit Jahren zu einem starken Anstieg des Einsatzes der Zellen für die Proteinproduktion. 1996 überstieg das Gesamtmarktvolumen der von tierischen Zellen produzierten Biopharmazeutika erstmals das von *Escherichia Coli* und Hefen. Dieses Verhältnis hat sich in den letzten Jahren weiter zu Gunsten der tierischen Zellen verschoben [12]. In Abbildung 1 ist dieser starke Anstieg der Anzahl von lizenzierten Biopharmaka aus Säugetierzellkultivierungen dargestellt. Ebenfalls gezeigt ist die Erhöhung der Nachfrage nach diesen Produkten in den letzten Jahren.

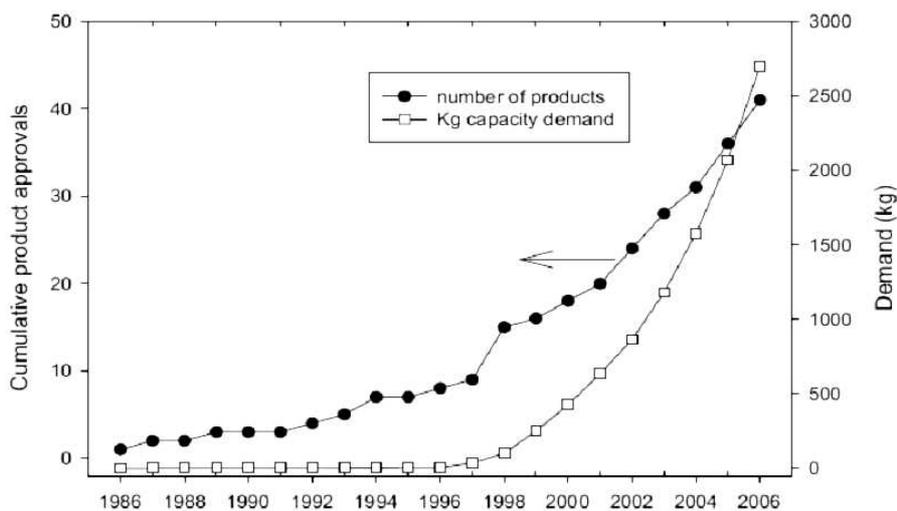


Abbildung 1: Nachfrage von Produkten aus Säugetierzellkulturen [15].

Die zurzeit wichtigste Klasse pharmazeutischer Proteine bezogen auf das Marktvolumen sind monoklonale Antikörper. Durch ihre hohe biologische Spezifität wurden sie zunächst für Immunoassays wie ELISA und andere Diagnosemethoden eingesetzt. Inzwischen werden Antikörper auch für die verschiedensten therapeutischen Zwecke verwendet (z. B. zur Unterdrückung der Abstoßung von transplantierten Organen, zur Behandlung von Asthma oder rheumatischer Arthritis) [16]. Darüber hinaus existieren andere rekombinante Produkte auf dem Markt z. B. Faktor VIII gegen Hämophilie A, Erythropoetin

gegen Anämie oder β -Interferon gegen Multiple Sklerose. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von zugelassenen Produkten, deren Hersteller und die dafür verwendeten Zelllinien.

Bei der Produktion von Proteinen in Säugetierzellen muss allerdings beachtet werden, dass komplexe Biopharmazeutika wie Proteine oder Viren, die durch Zellkultur produziert werden, durch ihren eigenen Produktionsprozess definiert sind. Das heißt, dass analytische, biologische und immunologische Tests auf Grund der Komplexität der Moleküle für den Produktverkauf nicht ausreichend sind. Somit basiert die Lizenzierung eines Produkts auf dem spezifischen Produktionsprozess, welcher nicht ohne weiteres verändert werden darf. Prozessänderungen könnten neue Lizenzierungsprozeduren nach sich ziehen. Neue Technologien für den Produktionsprozess werden somit vor der Einführung gründlich analysiert und die Vor- und Nachteile insbesondere in Bezug auf die Kosten sorgfältig gegeneinander abgewogen. Dies macht die Einführung neuer Produkte oder Generika auf dem Markt schwieriger.

Produkt	Protein	Hersteller	Applikation	Zelllinie	Zulassung
Activase®	Tissue Plasminogen Activator (tPA)	Genentech	Akute Lungenembolie, akuter Herzinfarkt	CHO	1987
Epogen®	Erythropoetin	Amgen	Anämie	CHO	1989
Kogenate®	Faktor VIII	Bayer	Hemophilia A	BHK	1993
Gonal-f®	Follikel stimulierendes Hormon	Serono	Weibliche Unfruchtbarkeit	CHO	1995
Avonex®	Interferon-β	Biogen	Multiple Sklerose	CHO	1996
BeneFix®	Faktor IX	Wyeth /Genetics Institut	Hemophilia B	CHO	1997
Herzeptin®/Trastuzumab	mAk	Roche /Genentech	Brustkrebs	CHO	1998
Simulect®/Basiliximab	mAk	Novartis	Akute Abwehr von transplantierten Nieren	Mausmyeloma	1998
Campath®/Alemtuzumab	Humanisierter mAk	Millennium /Berlex	Leukämie	CHO	2001
Xigris®	Aktiviertes Protein C (aPC)	Eli Lilly	Sepsis	Humane Zelllinie	2001
Humira®	Humaner mAk (antiTNF)	Abott Laboratories	Reumatische Arthritis	n.n.	2002
Zevalin®	Maus mAk	IDEC Pharmaceuticals	Nicht-Hodgkin Lymphoma	CHO	2002
Xolair®/Omalizumab	Humanisierter mAk	Genentech	Asthma	CHO	2003
Amevive®	Dimeres Fusionsprotein	Biogen	Chronische Schuppenflechte	CHO	2003
Avastin®/ Bevacizumab	Humanisierter mAk	Roche	Dickdarm- oder Rektumkrebs	CHO	2004

Tabelle 1: Beispiele für zugelassene Produkte hergestellt mit Säugetierzellen [12, 17].

3.2 Optimierung von Zelllinien

Die Wahl der idealen Zelllinie für die Produktion rekombinanter Proteine hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Auf der einen Seite muss sie leicht zu transfizieren sein und die Fähigkeit haben das gewünschte Protein stabil zu transkribieren, zu translatieren, zu falten, posttranslational zu prozessieren und wenn möglich ins Medium abzugeben [18]. Auf der anderen Seite sollte die Zelle auch in serumfreiem Medium wachsen und produzieren können, da die Gewinnung des Zielproteins aus einem proteinärmeren Medium sehr viel einfacher ist [19-22]. Wünschenswert ist auch eine Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften und mechanischer Zerstörung, welche durch Rühren und direkte Blasenbegasung verursacht werden können [23-27].

Obwohl schon viele Zelllinien auf ihre Fähigkeit zur Produktion rekombinanter Proteine untersucht worden sind, haben nur wenige die bevorzugten Eigenschaften für die Expression von pharmazeutischen Proteinen [12]. Zu ihnen zählen CHO (*Chinese Hamster Ovary*) Zellen, aber auch BHK, NSO (Maus-Myelomzellen) und Mausmeloma SP2/O Zellen.

Der erste kritische Aspekt bei der Entwicklung einer gut produzierenden Zelllinie stellt die Transfektion dar. Die DNA des kodierten gewünschten Proteins kann vorübergehend (transient) ins Zytoplasma oder stabil ins Genom der Zelle eingebracht werden [28]. Die transiente Expression bietet die Möglichkeit, das gewünschte Protein zur Charakterisierung oder zur Ermittlung des am besten geeigneten rekombinanten Vektors schnell in benötigter Menge zu produzieren. Diese Untersuchungen sind wichtig bevor die zeit- und arbeitsintensive Isolierung und Charakterisierung eines stabil transfizierten Klons vorgenommen werden kann [12, 29].

Die Isolierung der stabil produzierenden Klone wird mit Hilfe von Einzelzellklonierungen, wie beispielsweise „*limiting dilution*“, durchgeführt. Dabei

werden die einzelnen Klone nach einer Wachstumsphase auf ihre Proteinexpression hin untersucht [30].

Schnellere, weniger arbeitsintensive Untersuchungen ganzer Zellpopulationen ermöglichen die Durchflusszytometrie [31, 32] oder der Einsatz von Robotern [33]. Nachfolgend wird die Funktionsweise von Zytometern näher erläutert.

3.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik zur gleichzeitigen Messung der Größe und Granularität sowie der Fluoreszenzeigenschaften von Zellen. Die Durchflusszytometrie erlaubt dabei die Analyse von bis zu 50.000 Zellen s^{-1} [34] und bis zu 10 verschiedene Messgrößen für jede Zelle. Anwendung findet diese Technik vor allem in der Medizin. Insbesondere in den Bereichen der Hämatologie, der Infektionsforschung und Immunologie wird sie für die Zelldiagnostik eingesetzt. Aber auch in der medizinischen und biotechnologischen Forschung werden Durchflusszytometer immer häufiger verwendet.

Das Prinzip eines Durchflusszytometers beruht auf der Vermessung von vereinzelt Zellen in Suspension durch einen Laserstrahl. Dieser Laserstrahl verursacht durch das Auftreffen auf die Zellen sowohl Emissions- als auch Streulichtsignale welche mittels Photomultipliern nachgewiesen werden. Das Streulicht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) und als Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sideward Scatter*) aufgefangen. Dabei ist das FSC Signal ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das SSC Signal ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle beeinflusst wird. Die Emission der Fluoreszenz wird ebenfalls im rechten Winkel zum Laserstrahl detektiert. Die Fluoreszenzintensität hängt dabei von dem eingesetzten Farbstoff, der Menge des Farbstoffes und der untersuchten Zelle ab. Die Ergebnisse einer Messung werden in Histogrammen als Verteilung gegen die Zellpopulation aufgetragen.

3.2.1.1 Farbstoffe in der Durchflusszytometrie

Es existieren bereits einige Farbstoffe für die Durchflusszytometrie, die für unterschiedlichste Fragestellungen eingesetzt werden. Dies ist notwendig, da Zellen ohne eine Färbung mit fluoreszierenden Farbstoffen nur wenig Licht emittieren. Eine Ausnahme bilden dabei rekombinante GFP-Zellen, welche durch vorherige Transfektion die Eigenschaft besitzen, den fluoreszierenden Farbstoff GFP (grün fluoreszierendes Protein) selbst herzustellen [35-37]. Für die Markierung von Zellen werden spezielle Farbstoffe, die sich spezifisch an bestimmte Zellbestandteile binden und somit eine genauere Untersuchung dieser ermöglichen [38]. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl dieser Farbstoffe und ihre Anwendung. Ebenso werden fluoreszenzgelabelte Antikörper zur Ermittlung von Zelleigenschaften eingesetzt. Sie sind bei der Untersuchung von lebenden Zellen meist gegen bestimmte Oberflächenproteine der Zellen gerichtet, können aber bei permeabilisierten oder fixierten Zellen auch spezifisch Bestandteile im Zellinneren anfärben [39, 40]. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Bei Verwendung mehrerer Laser können eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden.

Fluoreszenzfarbstoff	Anwendung	Ausgewählte Referenzen
DAPI	Nukleinsäuren	Müller (1992)
FITC	Proteindetektion	Degelau (1992)
Propidium Iodid	Nukleinsäuren	Al-Rubeai (1997)
BCECF	Intrazellulärer pH	Cherlet (1999)
Nile Red	Lipide	Gorenflo (1999)
SNARF-1 AM	Membran Potential	Ishaque (1998)
Sytox Green	Nukleinsäuren	Lebaron (1998)

Tabelle 2: Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Anwendungsmöglichkeit in der Durchflusszytometrie [41]

3.2.1.2 Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird nicht nur für die Analyse von Zellen sondern auch bei der Zellsortierung eingesetzt. Ein FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) ist ein Durchflusszytometer mit einer angeschlossenen Sortiereinheit. Die selektierten Zellen können entweder in einem Gefäß (im „Bulk“) oder als einzelne Zellen in beispielsweise 96-Loch-Platten aufgefangen werden. Abbildung 2 zeigt schematisch das Prinzip einer „Bulk“ Sortierung.

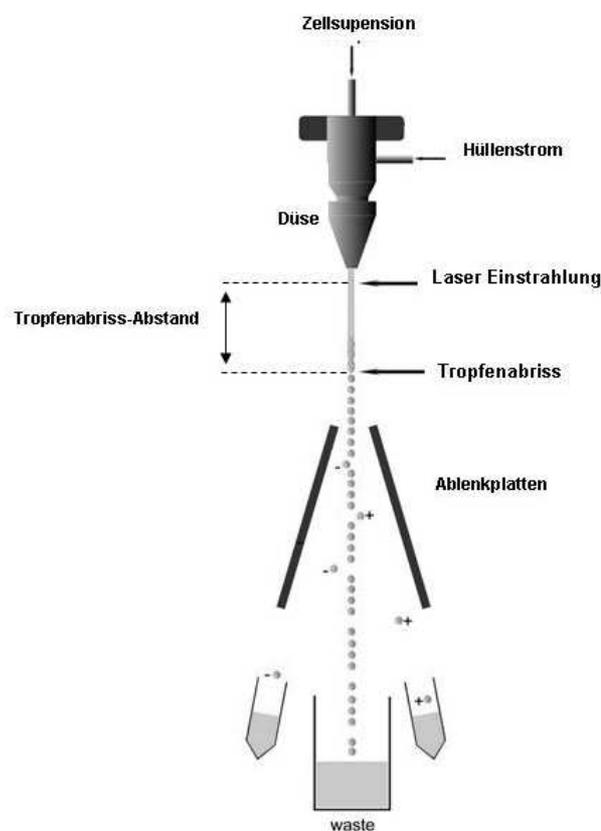


Abbildung 2: Prinzip der durchflusszytometrischen Sortierung mit Einfluss der Zellsuspension und des Hüllstroms sowie der Steuerung der einzelnen Tropfen durch die Ablenkplatten [42].

Das Prinzip der Sortiereinheit basiert darauf, dass der Probenstrom durch konstante Schwingungen eines Piezoelements zu einem stabilen Tropfenstrom übergeht. Nach Verlassen der Düsenöffnung passieren die Zellen zunächst den Laserstrahl und werden auf ihre Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften hin analysiert. Anschließend wird der Strahl durch die Schwingung der Düse an einer

bestimmten Stelle aufgebrochen und in regelmäßige Tropfen aufgeteilt. Hat eine Zelle bei der Analyse die festgelegten Charakteristika erfüllt, wird eine elektrische Ladung auf den die Zelle enthaltenen Tropfen gebracht. Dieser wird daraufhin in dem Feld zwischen den beiden Ladeplatten abgelenkt und in einem mit Medium gefüllten Behälter gesammelt. Die Bestimmung des Abstandes zwischen dem Tropfenabrisspunkt und dem Messpunkt ist von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Sortierung.

Die Durchflusszytometrie stellt eine ideale Methode zur Auswahl und Selektion von geeigneten Zelllinien für die Produktion von pharmazeutischen Proteinen dar. Beispielsweise können die wenigen hochproduzierenden Zellen aus einer Zellpopulation aussortiert werden und so die Produktivität der Zelllinie gesteigert werden. Die Bestimmung dieser Zellen gestaltet sich allerdings als schwierig, da sich die meisten sekretierten Produkte nicht direkt an einzelnen Zellen erkennen lassen. Für die Zellselektion mittels eines FACS ist es aber essentiell, dass die Produktionsleistung einer Zelle über die Fluoreszenzintensität sichtbar wird. Der wichtigste Schritt ist somit, die Produkte innerhalb der Zelle oder an der Zellmembran spezifisch mit fluoreszierenden Eigenschaften zu versehen und so die produzierenden Zellen zu kennzeichnen.

In einigen Fällen konnte nachgewiesen werden, dass die intrazelluläre Produktkonzentration gut mit der Produktionsrate der Zellen korreliert [8, 43-47]. Diese Art der Färbung bedingt aber die Permeabilisierung oder Fixierung und somit Tötung der Zellen.

Eine andere Herangehensweise bieten Hybridomzellen. Bei ihnen wurde in einigen Zelllinien ein Zusammenhang zwischen dem Antikörpergehalt an ihrer Zelloberfläche und ihrer Sekretionsrate hergestellt. Allerdings konnte diese Eigenschaft nicht bei allen Hybridomzelllinien nachgewiesen werden [9, 48-51].

Eine Ausnahme bilden in diesem Zusammenhang rekombinante GFP Zellen, die, da die Zellen selber fluoreszieren, gut mit einem FACS sortiert werden können [52, 53]. Bei der Herstellung dieser Zelllinien gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits kann eine Transfektion mit einem DNA-Abschnitt, bestehend aus einem

für das gewünschte Produktprotein und einem für GFP kodierten DNA-Teilstück, durchgeführt werden. Diese Zelllinien translatieren das Protein in Verbindung mit dem GFP und ein Fusionsprotein wird gebildet. Somit erlangt man eine direkte Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der Produktkonzentration [54-57]. Allerdings erhält man mit dieser Methode nicht das reine gewünschte Produkt. Andererseits können die beiden DNA-Teilstücke für das gewünschte Protein und das GFP gemeinsam in die Zelle eingebracht aber getrennt translatiert werden. So werden zwei verschiedene Proteine erhalten, die aber nicht in allen Fällen im gleichen Verhältnis produziert werden [58].

Bei Zelllinien, die nicht mit dieser Methode transfiziert wurden, müssen Färbetechniken angewendet werden, die die sekretierten Produkte an den Produzentenzelllinien binden und färben. Eine dieser Färbetechniken ist die *Microbead*-Technologie, wobei die Zellen in kleinen Geltröpfchen eingeschlossen, ihre sekretierten Produkte zunächst gebunden und anschließend mit einem fluoreszenzgelabelten Antikörper gefärbt werden [59-61]. Diese Methode wurde bereits zur Selektion von produzierenden Hybridomzellen [62] sowie für die Auswahl von hochproduzierenden Zellen angewendet [63]. Die Nachteile dieser Methode sind die Notwendigkeit eines speziellen Geräts zur Herstellung der Gel-Mikrotropfen, sowie eine technische Anpassungen des FACS.

Die viel versprechenste Färbetechnik ist die *Cell-Surface Affinity Matrix* [64]. Sie basiert auf der Herstellung einer Matrix an der Zelloberfläche, die den stabilen Biotin-Avidin-Bindungskomplex nutzt. Das sekretierte Produkt wird spezifisch von der Matrix abgefangen und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert. Sowohl Borth *et al.* als auch Böhm *et al.* konnten mit dieser speziellen Technik die spezifische Produktionsgeschwindigkeit einer CHO Zellpopulation erhöhen [31, 65].

3.3 Optimierung von Zellkulturprozessen

Eine Optimierung der Produktionsprozesse von pharmazeutischen Proteinen mit tierischen Zellen involviert alle Bereiche der Herstellung. Dazu gehört die Anzucht der Zellen, die Kultivierung in Bioreaktoren, die Ernte und Aufreinigung des Produkts. Im Rahmen dieser Arbeit wird insbesondere auf eine Verbesserung der online Kontrolle im Bioreaktor während der eigentlichen Herstellung der Proteine eingegangen. Die Überwachung und Steuerung einer Bioreaktorkultivierung erfolgt über eine intensive online und offline Analytik. Dies ist nötig, um einerseits die optimalen Wachstums- und Produktionsbedingungen für die Zellen sicherzustellen und andererseits den idealen Zeitpunkt für den Abbruch des Prozesses, unter Vermeidung von Produktverlust oder -degredation, zu finden [66-68]. Online wird üblicherweise nur die Temperatur, die Sauerstoffkonzentration und der pH-Wert überwacht. Aber auch spektroskopische Methoden wie UV, IR, Raman, und Fluoreszenz kommen zum Einsatz. Des Weiteren werden optische Biosensoren, insitu Mikroskope oder Affinitätssensoren verwendet.

Diese optischen Sensoren werden zunehmend in der Bioprozesstechnik eingesetzt, da sich mit ihnen die Kultivierung nicht-invasiv, online und insitu beobachten lässt. Eine Gefahr der Kontamination ist minimal, da kein direkter Kontakt zur Kultursuspension vorhanden ist. Zudem ist eine simultane Detektion möglich. Die kontinuierliche, zeitnahe Bestimmung von Prozessgrößen erlaubt eine direkte Prozesskontrolle, die für einen Produktionsprozess eine wichtige Voraussetzung darstellt. Der Zellmetabolismus wird durch optische Messungen im Allgemeinen nicht beeinflusst und ermöglicht neben einer extrazellulären Analytik *in vivo* den Zugriff auf intrazelluläre Informationen, die mit anderen Methoden kaum zugänglich sind. Systeme, die optische Lichtwellenleiter nutzen, können an einen laufenden Prozess beliebig angeschlossen und von ihm getrennt werden. Der Anschluss erfolgt über ein Sichtfenster. Die Sterilisation des Bioreaktors stellt somit kein Problem dar. Lichtleiter haben außerdem den Vorteil,

nicht durch elektromagnetische Felder gestört zu werden, so dass eine Informationsübertragung über längere Distanzen möglich ist [69-71]. Optische Techniken bieten daher das Potential für eine schnelle und selektive Messung, verbunden mit der erforderlichen Spezifität und Empfindlichkeit sowie der vergleichsweise geringen Kosten.

3.3.1 Zweidimensionale (2D-) Fluoreszenzspektroskopie

Der Einsatz von Fluoreszenzmessgeräten bei der Beobachtung von Kultivierungsprozessen wurde zunächst auf die direkte Messung von Fluorophoren in der Kultursuspension beschränkt. Der Zusammenhang zwischen der NAD(P)H Fluoreszenzintensität und der Zellmasse bei Hefe- und Bakterienkultivierungen ist früh entdeckt worden [72, 73]. Nach der Entwicklung von Mehrkanalspektrometern, mit denen eine größere Bandbreite an Fluoreszenzwellenlängen gleichzeitig vermessen werden konnte, wurden die Anwendungsmöglichkeiten für die Bioprozessbeobachtung stark ausgeweitet [74, 75]. Bei *Saccharomyces cerevisiae* Kultivierungen konnte so die Zellmasse auch über die Vermessung der Tryptophan Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Zudem konnte die Bestimmung von Produktkonzentrationen (Pyridoxine) gezeigt werden [76].

Die Entwicklung eines insitu 2D-Fluoreszenzspektrometers (BioView®) der Firma DELTA Light & Optics (Dänemark) machte es schließlich möglich, die Fluoreszenz im Bioreaktor über einen sehr weiten Bereich zu vermessen. Dabei erstreckt sich der Exzitationsbereich von 270 bis 550 nm und der Emissionsbereich von 310 bis 590 nm (ein detaillierter Geräteaufbau ist im Anhang zu finden). Zunächst wurde der BioView® für die direkte Beobachtung von Bakterien-, Hefe- und Pilzkultivierungen eingesetzt [77, 78]. Mukherjee *et al.* konnten ferner zeigen, dass auch eine Veränderung des Metabolismus von *Enterobakter aerogenes* unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen mit dem BioView® nachweisbar ist [79].

Die komplexe Zusammensetzung biologischer Proben verursachen allerdings in den Fluoreszenzspektren Überlagerungen von Signalen. Aber auch Einflüsse wie der pH-Wert, Medienzusammensetzung, Gasblasen, Temperatur, Fluoreszenzlöschung und der Kaskadeneffekt [80] erschweren die eindeutige Zuordnung. Dies und die Menge an Fluoreszenzdaten machte die Anwendung moderner Auswerteverfahren zur Interpretation der Daten unumgänglich. Zur Auswertung werden daher verschiedene multivariate Methoden eingesetzt [81, 82].

Im Zuge dessen sind mittlerweile vielfältige Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie beschrieben worden. Skibsted *et al.* konnten bei der Kultivierungen von *Pseudomonas fluorescens* eine chemometrische Verknüpfung der offline Werte wie Nitrat-, Succinat- und Proteinkonzentration sowie für die optische Dichte mit den online Fluoreszenzspektren herstellen. Dazu nutzten sie die multivariate Kalibration und bildeten mittels Hauptkomponentenanalyse (PLS) Regressionsmodelle für jeden Parameter [83]. Eine nähere Beschreibung der Hauptkomponentenanalyse und Modellbildung ist in Kapitel 4.2.1.1 zu finden. Für Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* konnte die Zellmasse durch chemometrische Analyse der Fluoreszenzdaten mit *Parallel Faktor Analyse* (PARAFAC) und durch eine Hauptkomponentenanalyse modelliert werden [84]. PLS Modelle konnten ferner für die Zellmasse und Produktkonzentration des Antibiotikums Polymyxin B während der Kultivierung von *Bacillus polymyxa* erstellt werden [85]. Der BioView® wurde darüber hinaus für die Überwachung der Stamm- bzw. Plasmidstabilität mittels metabolischer Änderungen von *Escherichia coli* in verschiedenen Medien eingesetzt [86]. Bei der Anwendung des BioView® für *Batch-* und *Fed-Batch-*Kultivierungen des Fadenpilzes *Aspergillus oryzae* konnten Modelle für die Zellmasse und Produktaktivität (Lipase) erstellt werden. Mittels *Parallel Faktor Analyse* (PARAFAC) konnte der Start der Zufütterung deutlich erkannt werden [87].

Die Beobachtung von Säugetierzellkultivierungen mit einem BioView® ist bisher wenig publiziert. Hisiger *et al.* verglichen die Konzentration von Tryptophan,

NAD(P)H, Riboflavin und GFP während der Kultivierung von NSO Zellen mit online gemessenen Fluoreszenzspektren. Störende Faktoren, die die Auswertung erschweren waren die Mediumzusätze wie Phenolrot als pH Indikator sowie Serum [88]. Das Fluoreszenzsignal der Riboflavine überlappt zudem mit dem des GFPs und macht eine direkte Verknüpfung schwierig [89].

Chemometrische Untersuchungen und Hauptkomponentenanalysen wichtiger Parameter von Zellkulturprozessen wurden bisher noch nicht veröffentlicht und könnten möglicherweise zu einer besseren Korrelation führen.

3.3.2 Sauerstoffaufnahme (OUR) Bestimmung

3.3.2.1 Sauerstoffaufnahme bei Säugetierzellen

Eine wichtige Größe in der Bioprozesstechnik ist die Sauerstoffaufnahme (Oxygen Uptake Rate, OUR) von tierischen Zellen, da sie wichtige Erkenntnisse über den metabolischen Zustand der Zellen liefert. Alle Säugetierzellkulturen sind aerobe Prozesse bei denen sich mit den verschiedenen Zelllinien auch die Ansprüche an die Sauerstoffkonzentration im Medium unterscheiden. Die Auswirkung der Sauerstoffkonzentration auf tierische Zellen wurde bereits ausgiebig untersucht [90-93]. Allerdings sind aus den Resultaten keine generellen Trends erkennbar. Miller *et al.* zeigten beispielsweise einen Anstieg der Lebend- und Gesamtzellichte nach einer Reduzierung der Sauerstoffkonzentration auf 0,5 % Luftsättigung während einer kontinuierlichen Hybridomzellkultivierung. Hingegen lag die optimale Sauerstoffkonzentration für die Antikörperproduktion bei 50 % Luftsättigung [90]. Allerdings zeigte Mizrahi exakt das Gegenteil für humane Lymphoblasten. Die höchste Sauerstoffkonzentration verursachte hier das höchste Zellwachstum und während eine geringere Sauerstoffkonzentration zu einem Anstieg der Antikörperproduktion führte [94, 95].

Die Kenntnis über die Sauerstoffaufnahme (OUR) von Zellen ist wichtig, um stets eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten und,

mit Rücksicht auf die Scherstressempfindlichkeit der Zellen, nur soviel Sauerstoff in den Bioreaktor einzubringen wie nötig [96]. Die Zellschädigungen verursacht durch Spargen [97], Blasenbildung [98, 99] und Schaumbildung [100] wurden bereits ausführlich dargestellt. Darüber hinaus ist die OUR von Zellen nicht nur für den *Scale-up* interessant, sondern kann auch wichtige Informationen über die Zellaktivität [101] und Physiologie sowie für die Anzahl der lebenden Zellen liefern [102]. Ferner ist die Bestimmung der OUR ein wichtiger Bestandteil zur Analyse des Metabolismus von verschiedenen Säugetierzellen [103-106].

Kyung *et al.* setzten OUR Messungen als metabolischen online Indikator für die Physiologie von Zellen im Bioreaktor ein, um darüber die Perfusionsrate einer kontinuierlichen Kultivierung zu regeln [107]. Der Einfluss von unterschiedlichen Zelldichten und Temperaturen auf die OUR von CHO-, BHK- und Hybridomzellen wurde von Jorjani *et al.* untersucht. Dabei zeigten die Hybridomzellen bei derselben Temperatur die geringste OUR und die CHO-Zellen die höchste. Die Zellzahl zeigte keinen Effekt auf die Sauerstoffaufnahme [108]. Die OUR kann aber nicht nur in Bioreaktoren ermittelt werden. John *et al.* kultivierten *Corynebacterium glutamicum* in Mikrotiterplatten, nutzten für die Sauerstoffmessung optische Sensoren und berechneten die OUR über die Bestimmung des k_{La} -Wertes (Stofftransportkoeffizient) [109]. Deshpande *et al.* nutzten die gleiche Methode für die Untersuchung von CHO Zellen [110]. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl spezifischer OURs für unterschiedliche Säugetierzellen mit einer durchschnittlichen Sauerstoffaufnahme von $0,2 \times 10^{-12} \text{ mol O}_2 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

OUR [10^{-12} mol O ₂ cell ⁻¹ h ⁻¹]	Zelllinie	Referenz
0,15 - 0,36	KS1:4 (Hybridom)	Backer (1988) [111]
0,21 - 0,25	NB1 (Hybridom)	Boraston (1984) [112]
0,234 ± 0,014	C1a (Hybridom)	Dorresteyn (1996) [113]
0,05	FS-4 (humane diploide Zellen)	Fleischaker (1981) [102]
0,23 - 0,42	X-D (Hybridom)	Hiller (1991) [114]
0,19 - 0,4	AB2-143.2 (Hybridom)	Miller (1987) [90]
0,023 - 0,087	167.4G5.3 (Hybridom)	Ozturk (1990) [92]
0,33 - 0,37	HB-32 (Hybridom)	Ramirez (1990) [115]
0,15	Hybridom	Singh (1996) [116]
0,219 - 0,406	NSO (Myelom Zellen)	Yoon (1994) [117]
0,46 ± 0,05	MAK (Hybridom)	Zhou (1994) [118]

Tabelle 3: Liste der publizierter Sauerstoffaufnahmeleistungen verschiedener Zelllinien [95].

3.3.2.2 Messmethoden

Die Messung der Sauerstoffaufnahmeleistung von Zellen ist aus mehreren Gründen schwierig. Die sehr geringe O₂-Verbrauchsrate der Zellen (ca. $0,2 \times 10^{-12}$ mol O₂ cell⁻¹ h⁻¹), die Sensibilität der Zellen gegenüber einer Änderung der Sauerstoffkonzentration und die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff ohne sie zu schädigen, müssen bei der Bestimmung berücksichtigt werden.

Dynamische Methode

Eine übliche Methode zur Bestimmung der OUR von Zellen ist die Messung des Sauerstoffabfalls nach Einstellung der Begasung im Bioreaktor. Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Bioreaktor während der Bestimmung.

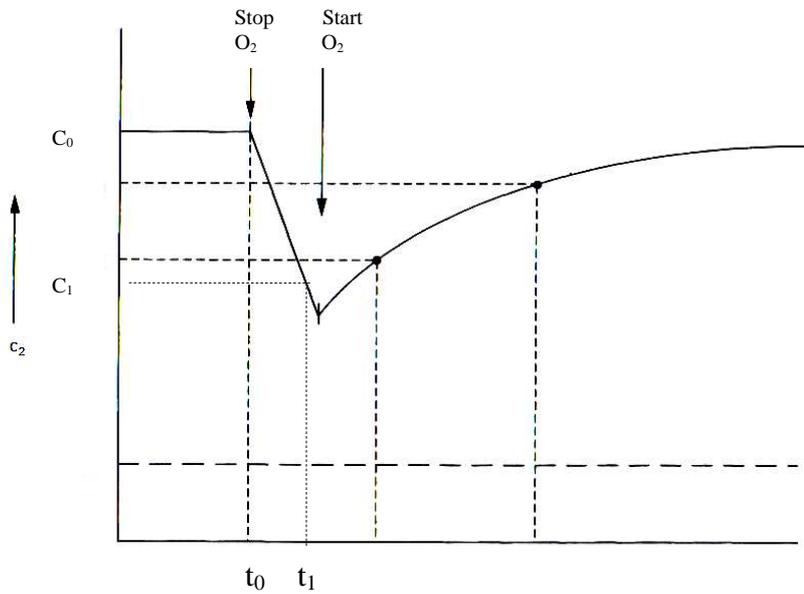


Abbildung 3: Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Bioreaktor für die OUR Bestimmung nach der dynamischen Methode.

Die Berechnung erfolgt über die Formel der Sauerstoffbilanz:

$$\frac{dc_L}{dt} = k_L a(c^* - c) - OUR \tag{1}$$

- k_{La} Stofftransportkoeffizient
- OUR Sauerstoffaufnahme
- c^* Sättigungskoeffizient des Gelöstsauerstoffs
- c_L Gelöstsauerstoffkonzentration
- t Zeit

Nach Einstellung der Sauerstoffzufuhr kann k_{La} -Wert gleich Null gesetzt werden und der Abfall der Sauerstoffkonzentration wird mit der Sauerstoffaufnahme gleichgesetzt.

$$\frac{dc_L}{dt} = -OUR = -qO_2 \cdot x \tag{2}$$

- qO_2 spezifische OUR pro Zelle
- x Lebendzellichte

Wenn die Sauerstoffkonzentration oberhalb des kritischen Levels (üblicherweise $> 10\%$ Sättigung) bleibt, ist die Sauerstoffaufnahme (= Steigung dC/dt) konstant. [95, 107, 116, 119]

Die Anwendung dieser Methode in einem Produktionsbioreaktor verursacht allerdings unerwünschte Störungen des Systems, welche Folgen für die Produktion oder das Wachstum der Zellen haben könnten.

Gasmassenbilanz

Bei der Gasmassenbilanz kann über die genaue Messung der ein- und ausströmenden Gase der Sauerstoffverbrauch der Zellen berechnet werden. Die Analyse der Gaszusammensetzung und des Volumens erfolgt über Massenspektrometer und durch in der Zellkultur häufig eingesetzte Durchflussmesser. Massenspektrometer sind allerdings sehr komplex und reagieren sensibel auf Feuchtigkeit, was für kontinuierliche Messungen die Einrichtung von Trocknungseinrichtungen erfordert. [95, 120, 121] Perfusionssysteme verursachen zusätzliche Schwierigkeiten durch zu- und abfließendes Medium, in das auch Sauerstoff gelöst ist.

Offline Proben Analyse

Eine Probe aus dem Bioreaktor wird in ein externes Gefäß gegeben, welches über eine Steuer- und Kontrolleinheit verfügt, um den Sauerstoffabfall zu überwachen. Zudem muss das Gefäß über eine Temperatur- und Rührersteuerung verfügen. [122, 123] Diese Methode ist arbeits- und zeitintensiv und könnte falsche Resultate liefern, falls die Bedingungen im Bioreaktor und im externen Gefäß nicht völlig übereinstimmen. Das YSI 5300 A (YSI Incorporated) ist ein Beispiel für ein kommerziell erhältliches System zur offline Messung der Sauerstoffaufnahme.

Bestimmung über Bypass

Eine zusätzliche Sauerstoffelektrode ist im Bypass zum Bioreaktor installiert. Die Sauerstoffaufnahme wird aus der Aufenthaltszeit der Zellen im Bypass, bevor sie die zweite Sauerstoffelektrode erreichen, und dem pO_2 Unterschied zwischen Bioreaktor und Bypasselektrode berechnet. [117]

Insitu OUR Sensor

Der von Dr. Klaus Joeris (Bayer HealthCare) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelte neue insitu OUR Sensor bestimmt die Sauerstoffaufnahme der Zellen mittels der dynamischen Methode. Allerdings wird die Messung nicht mit der gesamten Zellsuspension durchgeführt, sondern der Sensor separiert ein Volumenelement in dem der Sauerstoffabfall mit einem optischen Sauerstoffsensor vermessen wird. Eine genauere Beschreibung des Sensors ist im experimentellen Teil zu finden.

Dieser Sensor hat verschiedene Vorteile gegenüber den üblichen Messmethoden. Er kann mit geöffneter Kammer als normale Sauerstoffelektrode eingesetzt werden und in Intervallen die OUR der Zellen vermessen, ohne die Kultur zu beeinflussen und ohne dass eine Probenahme notwendig wäre. Dies ist besonders interessant bei Langzeitprozessen (z.B. Perfusionsprozessen), welche meist mit doppeltem Sensoreinsatz betrieben werden und für welche nur eingeschränkt Platz vorhanden ist. Zudem kann das System auch simultan mit einem optischen pH Sensor ausgestattet oder nur mit einem konventionellen polarographischen Sauerstoffsensor bestückt werden.

4 Experimenteller Teil und Ergebnisse

4.1 Optimierung von Zelllinien

Die Erhöhung der Produktivität von Zelllinien ist eine wichtige Voraussetzung bei der Optimierung von Produktionsprozessen in pharmazeutischen Betrieben. Sie verringert den Zeitaufwand und vor allem die Kosten der Herstellung von therapeutisch wirksamen Proteinen, da geringere Volumina und weniger bzw. zeitlich kürzere Kultivierungen notwendig sind. Ein Themengebiet dieser Arbeit ist die Steigerung der Produktivität über Zellsortierung mit Hilfe von Durchflusszytometern bzw. FACS.

Zunächst wurde eine in der Literatur [65] beschriebene Affinitätsmatrixfärbemethode mit Hilfe der Hybridomzelllinie IV F 19.23 [6] auf ihre Funktionalität zur Selektion hoch-produzierender Zellen untersucht. Die Färbemethode wird anschließend modifiziert, um sie durch die Nutzung von Protein A anstelle eines Antikörpers einer breiteren Anwendbarkeit zugänglich zu machen. Zur Analyse dieser neu entwickelten Methode wird die Industriezelllinie HKB-11 der Firma Bayer HealthCare eingesetzt [124, 125].

4.1.1 Färbung und Sortierung der Hybridomzellen

Die Untersuchung der Affinitätsmatrixmethode [65] auf ihre Anwendbarkeit zur Selektion höher-produzierender Zellen erforderte zunächst eine genaue Kenntnis des momentanen Proliferations- und vor allem des Produktionsverhaltens der Hybridomzelllinie. Ferner war eine sorgfältige Analyse der Methode auf ihre Funktionalität mit Protein-*Microarrays* und an der Oberfläche von Säugetierzellen notwendig. Nach Abschluss der Voruntersuchungen werden mehrere Sortierungen einer Hybridomzellpopulation mittels FACS zur Steigerung ihrer Produktivität durchgeführt.

4.1.1.1 Proliferationsverhalten der Hybridomzelllinie IV F 19.23

Zur Charakterisierung der Produktbildung und der Proliferation der Zellen wurden drei 250 ml Spinnerflaschen mit je $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml inokuliert und 2x pro Tag eine 0,5 ml Probe für die Ermittlung der Zellzahl und Vitalität sowie der Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Produktkonzentration entnommen. Abbildung 4 zeigt den typischen Verlauf einer solchen *Batch*-Kultivierung in einer Spinnerflasche.

Während des über ca. 80 Stunden verlaufenden Wachstums der Zellen ist eine maximale Zelldichte von $2,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht worden. Zudem konnte eine kontinuierlich hohe Vitalität von mehr als 95 % bis zum Eintritt in die stationäre Phase, nach etwa 90 Stunden, beobachtet werden. Eine rascher Übergang der Zellen in die Absterbephase, verursachte eine Abnahme der Lebendzellzahl innerhalb von 30 Stunden von $2,2 \cdot 10^6$ auf 0 Zellen/ml. Dieses schnelle Absterben der Zellen könnte mit einer Glutaminlimitierung zusammenhängen.

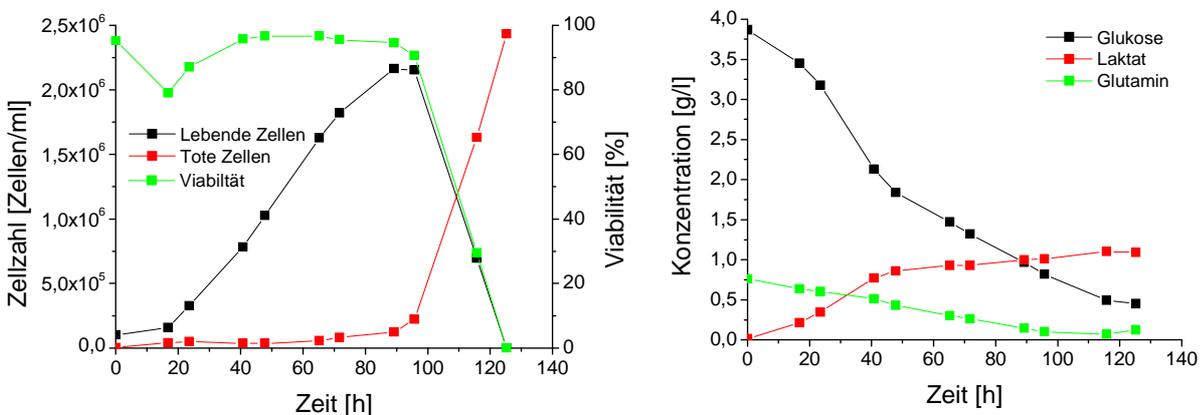


Abbildung 4: Proliferationsverhalten, Substratverbrauch und Metabolitproduktion während einer Beispielskultivierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23 unter serumfreie Bedingungen.

Der Metabolismus von kontinuierlich wachsenden Säugerzelllinien, wie der Hybridomzelllinie IV F 19.23, weist gegenüber dem Stoffwechsel primärer Zellen einige Unterschiede auf. Diese Zelllinien haben einen erhöhten Bedarf an Substraten, vor allem an Glutamin, da sie nicht in der Lage sind, die ihnen zur Verfügung gestellten Energiequellen effektiv zu nutzen. Sie scheiden dadurch

vermehrt Laktat und Ammonium in den Kulturüberstand aus. Durch die Akkumulation dieser beiden Substanzen im Kulturmedium kann das Wachstum der Zellen inhibiert, die Zellvitalität verringert und zudem die Produktqualität vermindert werden [126, 127].

Glucose ist eine Hauptenergiequelle für tierische Zellen. Sie wird in der Glycolyse zu Pyruvat umgesetzt [128]. Bei primären Zellen wird das Pyruvat zu Oxalazetat umgewandelt und im Citratzyklus mit Hilfe der Atmungskette zu CO₂ und H₂O oxidiert [129]. Kontinuierliche Säugerzelllinien hingegen setzen 80 bis 99,8 % der Glukose zu Laktat und Alanin um [130-134]. Abbildung 5 stellt die Stoffwechselwege von Glukose und Glutamin für kontinuierlich wachsende Zelllinien graphisch dar [135].

Neermann (1996) konnte anhand von Experimenten mit BHK-21 Zellen zeigen, dass der Flux von Glukose in den Citratzyklus weniger als 0,64 % des gesamten glycolytischen Fluxes beträgt. Die nahezu vollständige Umsetzung von Glukose zu Laktat haben kontinuierlich wachsende Säugerzelllinien mit vielen Tumorzellen gemeinsam [136-138]. Eine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen ist bis heute nicht gefunden worden. Anhand von Untersuchungen des Metabolismus von Säugerzelllinien konnte keine Aktivität derjenigen Enzyme festgestellt werden, die die Glycolyse mit dem Citratzyklus verbinden [130, 133, 134, 139]. Lanks (1986) erklärt das Phänomen mit einem hohen Quotienten von NADH im Cytoplasma, welcher die Laktat-Dehydrogenase-Reaktion in Richtung Laktatproduktion lenkt, da bei dieser Enzymreaktion NADH zu NAD⁺ oxidiert wird und auf diese Weise eine Regeneration des in der Glycolyse verbrauchten NAD⁺ stattfindet. Die Ursache für die hohen Konzentrationen von NADH im Cytosol sehen Boxer und Devlin (1961) sowie Perez-Rodriguez et al. (1987) in einem Defekt des Malat-Aspartat-Shuttle-Transporters. Das Malat-Aspartat-Shuttle dient dem Transport von [H] auf der Stufe des NADH vom Cytosol in die Mitochondrien [136, 140].

Glutamin stellt die Hauptenergiequelle im Metabolismus von Säugetierzelllinien dar [128, 137]. Durch den Abbau des Glutamins decken Zelllinien in der Anwesenheit von Glukose 30 % bis 65 % ihres Energiebedarfs [134, 141, 142].

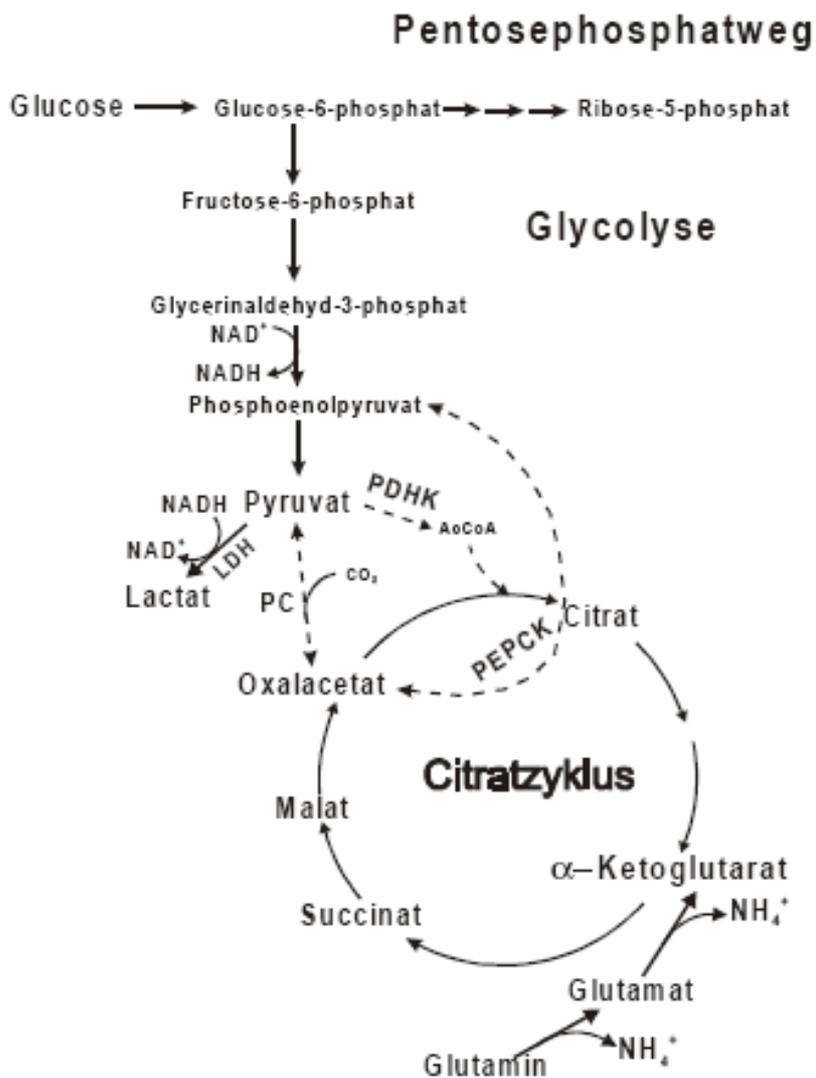


Abbildung 5: Stoffwechselwege von Glukose und Glutamin bei kontinuierlichen Säugetierzelllinien. Die unterbrochenen Linien stellen unterbundene Enzymaktivitäten dar [135].

Es wurde zudem festgestellt, dass die Verstoffwechslung des Glutamins umso mehr Energie für Säugerzelllinien liefert, je geringer die Glukosekonzentration im Kulturmedium ist [143]. Glutamin wird über verschiedene Stoffwechselwege katabolisiert. Ein Teil des Glutamins wird zu Aspartat, Alanin oder Laktat oxidiert. Dabei werden Alanin und Laktat in das Kulturmedium sekretiert und Aspartat kann über Oxalacetat in den Citratzyklus eingeschleust werden [134]. Der größte Teil des Glutamins wird allerdings zu α -Ketoglutarat deaminiert. Dieses wird anschließend im Citratzyklus und der Atmungskette vollständig zu

CO₂, H₂O und Ammonium oxidiert [143]. Zusätzlich wird Ammonium auch durch den thermischen Zerfall von Glutamin im Kulturmedium freigesetzt [144].

4.1.1.2 Produktionsverhalten der Hybridomzelllinie IV F 19.23

Die Konzentration des Immunglobulins G wurde ebenfalls bei jeder Probenahme mittels ELISA bestimmt und ist in Abbildung 6 beispielhaft für eine Spinnerkultivierung in dargestellt. Der IgG-Gehalt in der Zellsuspension steigt erst nach ca. 50 Stunden bis zum Ende der Kultivierung deutlich an. Die Endkonzentrationen an Antikörpern für die drei durchgeführten Kultivierungen ergaben 6,1 bis 9,1 mg/l. Mehr als 60 % der gesamten IgG-Menge wurde ab Stunde 40 bis zum Ende der stationären Phase (bei ca. 95 h) produziert. In der Absterbephase werden Antikörper nicht nur von den noch lebenden Zellen produziert, sondern auch durch Zellyse aus dem Zellinneren in das Medium freigesetzt. Da die Produktivität in dieser Phase zudem für diese Arbeit wenig relevant ist, wird sie nicht mit in die Berechnung mit einbezogen.

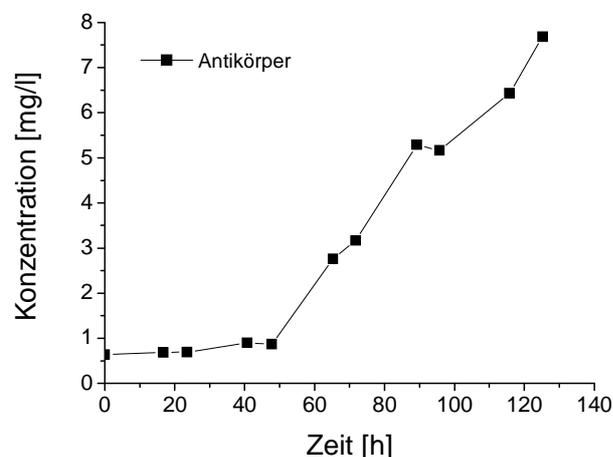


Abbildung 6: Antikörperkonzentration während einer Beispielkultivierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23 unter serumfreien Bedingungen.

Die Produktivität der Hybridomzelllinie wird mit Hilfe der Zelldichte, der Antikörperkonzentration und der Zeit berechnet. Sie wird als spezifische Produktionsgeschwindigkeit q_P angegeben und erlaubt den Vergleich zwischen unterschiedlichen Kultivierungen. Zur Bestimmung von q_P wurde die von Ozturk

et al. beschriebene differenziale Methode verwendet (eine detailliertere Beschreibung ist im Anhang zu finden) [145]. Die Methode involviert eine Regression der IgG-Konzentration über die Zeit mit einem Polynom 3ten oder 4ten Grades. Die Ableitung dieser Funktion wurde zu einigen Zeitpunkten (zwischen den Probenahmen) während der Kultivierung ermittelt und durch die gemessene Zellzahl lebender Zellen zu diesem Zeitpunkt dividiert [42]:

$$qP_t = \frac{P'_t}{x_t} \quad (3)$$

qP = spezifische IgG-Produktionsgeschwindigkeit zur Zeit t [mg IgG/h · Zelle]

$P(t)$ = Regressionsfunktion der IgG-Konzentration über die Zeit

P'_t = Ableitung von $P(t)$ gegen die Zeit t [mg IgG ml/h]

x_t = Zellzahl lebender Zellen zur Zeit t [Zellen/ml]

Die Produktivität der Hybridomzellpopulation wurde als Mittelwert aus allen drei Kultivierungen berechnet und ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt. Die Produktivität steigt bis zu durchschnittlichen Maximalwerten von 0,05 mg/h/10⁹ Zellen zwischen 60 und 90 Stunden an. Somit liegt der Hauptproduktionszeitraum gegen Ende der exponentiellen Phase und im Bereich der stationären Phase. Die Vitalität liegt über den gesamten Kultivierungszeitraum über 95 %. Somit kann die Änderung der IgG Konzentration als Funktion der Zeit auf lebende Zellen zurückgeführt werden [42].

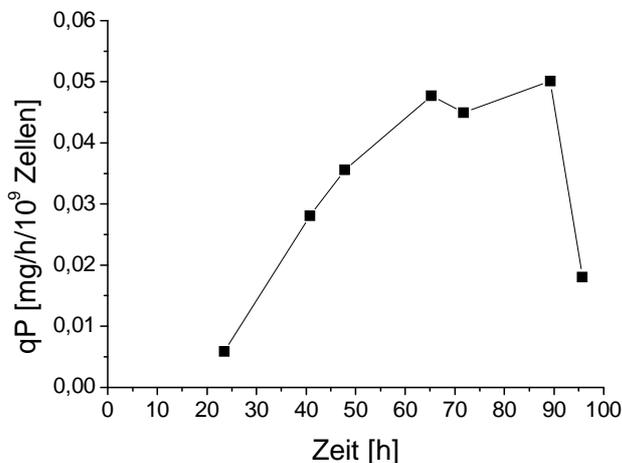


Abbildung 7: Mit der Differenzialmethode berechnete Produktivität der unsortierten Hybridomzelllinie IV F 19.23.

Eine Erklärung für eine derartige Produktionskinetik könnte sein, dass die Zellen bei langsamerem Wachstum über mehr Energie zur Produktion von Antikörper verfügen. Bereits mehrere Autoren beschrieben dieses Produktionsverhalten für unterschiedliche Hybridomzelllinien sowohl für *Batch*- als auch für kontinuierliche Kultivierungen [146-150].

Im Rahmen der Mitbetreuung einer Masterarbeit von Pierre Moretti kann durch Zellzyklusmessungen die Annahme gefestigt werden, dass die IV F 19.23 Zellen hauptsächlich in der G1-Phase Antikörper produzieren. Der Anteil der Zellen, die sich in der G1-Phase des Zyklus befinden, stieg während der Spinnerkultivierung kontinuierlich an. Ein Grund könnten die immer ungünstigeren Bedingungen in der Zellsuspension sein (u.a. durch Akkumulation von Stoffwechselprodukten oder Veränderung des pH-Wertes). Zellen verzögern bei ungünstigen Wachstumsbedingungen das Durchlaufen der G1-Phase und verhindern somit das Eintreten in die S-Phase und der Mitose [151]. Mehrere Autoren beschrieben bereits eine erhöhte Produktivität von Hybridomzellen in der G1-Phase [147, 152-156]. Zudem konnte Kromenaker *et al.* zeigen, dass Hybridomzellen in der G1-Phase, die mit hohen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten [μ] wachsen, eine niedrigere Produktivität aufweisen als G1-Zellen, die mit niedrigem μ wachsen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre die Ineffizienz des Sekretionsweges von schnell wachsenden Zellen [157].

Eine Optimierung eines Kultivierungsprozesses der Zelllinie IV F 19.23 könnte an diesem Punkt ansetzen. Vorstellbar wäre beispielsweise ein Prozess mit entkoppelter Wachstums- und Produktionsphase. Nach Erreichen einer hohen Zelldichte wird eine niedrige spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der Hybridomzellen aufrechterhalten, um eine hohe Produktivität der Zellpopulation zu ermöglichen.

4.1.1.3 Durchflusszytometrische Einzelzellanalysen

Die bisherigen Untersuchungen der Hybridomzelllinie IV F 19.23 richteten ihren Fokus auf die Gesamtproduktivität der Zellpopulation. Die Durchflusszytometrie

bietet die Möglichkeit einer Einzelzellanalyse. Insbesondere der Aspekt, ob alle Zellen der Hybridomzellpopulation Antikörper produzieren und wie groß die Unterschiede ihrer Produktivität sind, war für diese Analyse von Bedeutung. Von mehreren Autoren wurde bereits eine Instabilität von Hybridomzelllinien beschrieben [6, 8, 9, 158]. Oft werden die Kulturen als eine Mischung aus produzierenden und nicht produzierenden Zellen beschrieben. Als Ursache werden Chromosomenverluste oder seltene Mutationen der für schwere und leichte Ketten kodierenden Gene angenommen. Die Hybridomzelllinie IV F 19.23 wurde bereits von Schmieding als instabil beschrieben. Er beobachtete die Chromosomenzahl der Zelllinie über eine Langzeitkultivierung und stellte eine deutliche Abnahme fest [6].

Die Untersuchung der IV F 19.23 Zelllinie mittels Durchflusszytometrie erfolgte mit Hilfe eines Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierten polyklonalen Antikörper, der das gesamte Maus-IgG-Molekül als Immunogen spezifisch erkennt. Dieser Antikörper wurde zur intrazellulären Färbung des in den Zellen enthaltenen *murinen*-IgGs eingesetzt. Die für die Färbung verwendeten Zellen befanden sich am Ende der exponentiellen Phase, welche mit einer hohen Produktivität einhergeht. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde mit kaltem Methanol erreicht. Anschließend erfolgte die Immunfärbung mit dem FITC gelabelten Antikörper für 1 Stunde bei 37°C (ein detailliertes Färbeprotokoll ist im Anhang in Kapitel 6.1.5.1 zu finden). Üblicherweise finden nicht produzierende IV F 19.23 Zellen als Negativkontrolle Anwendung. Diese standen für diese Messungen allerdings nicht zur Verfügung und stattdessen fanden HKB-11 Zellen für die Untersuchung Verwendung. Diese Hybrid-Zelllinie aus Nieren- und B-Zellen produziert Fc-Fragmente von humanem IgG [159] und sollte aus diesem Grund kein positives Ergebnis bei der Immunfärbung ergeben. Neben der Immunfärbung des intrazellulären IgGs wurde zusätzlich die DNA der Zellen mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidium Iodid (PI, rot) gefärbt [42].

Abbildung 8 stellt die durchflusszytometrischen Analysen der intrazellulär gefärbten IV F 19.23 und HKB-11 Zelllinie dar. Die grüne FITC Fluoreszenz ist gegen die rote PI Fluoreszenz zweidimensional aufgetragen und jeder Punkt entspricht einer Einzelzelle. Graphik A stellt die Fluoreszenzintensitäten der IV F

19.23 Zellen und Graphik B die HKB-11 Zellen dar. Im Vergleich ist erkennbar, dass die grünen relativen Fluoreszenzeinheiten der IV F 19.23 Zellen stark variiert und von 0 bis 800 RFI reicht. Allerdings ist der größte Anteil an Zellen auf den Bereich von 0 bis 300 RFI beschränkt, was dem Intensitätsbereich der Negativkontrolle entspricht. Folglich besteht der Hauptanteil der Gesamtpopulation aus nichtproduzierenden Hybridomzellen.

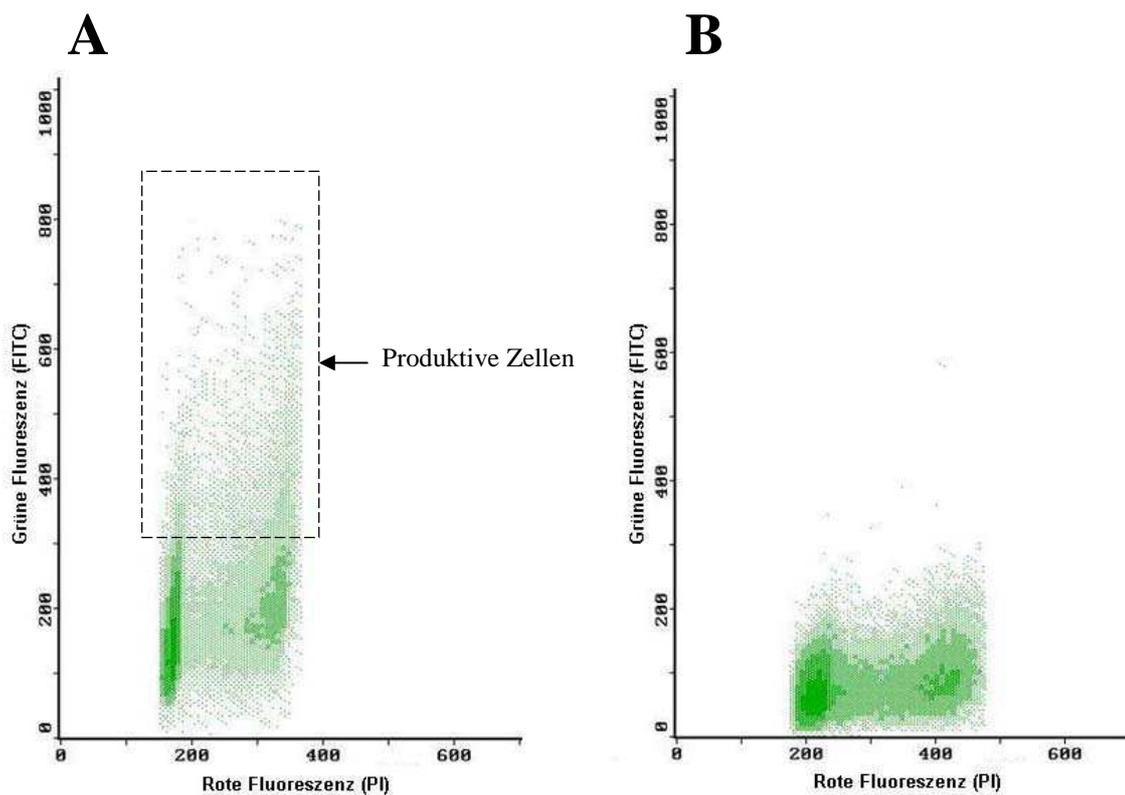


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse des intrazellulären Antikörpergehalts von Hybridom - (A) und HKB-11- (B) Zellen. Nur die Hybridomzellen mit einer größeren FITC Fluoreszenzintensität als die der HKB-11 Zellen produzieren wahrscheinlich IgG.

Der angezeigte Bereich stellt ca. 10 % der Population dar. Allerdings ist eine quantitative Aussage bezüglich der Heterogenität der Population mit Vorsicht zu betrachten, da die Unterscheidung zwischen Produzenten und Nichtproduzenten ausschließlich auf dem Vergleich mit der negativen Kontrolle beruht. Die HKB 11 Zelllinie ist zwar kein *muriner*-IgG Produzent, stellt aber trotzdem lediglich einen Ersatz für eine nicht produzierende IV F 19.23 Zellpopulation dar. Die prozentualen Angaben geben infolgedessen nur eine grobe Einschätzung wieder.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine sehr heterogene Population in Bezug auf ihren intrazellulären IgG-Gehalt mit einem nur geringen Anteil an produzierenden Zellen. Da die Proteinsynthese viel Energie und Nährstoffe verbraucht, verfügen Produzenten auch über weniger Energie für das Wachstum. Dies führt zu einer ungünstigen Verschiebung innerhalb einer Zellpopulation indem der Anteil an Nichtproduzenten sich immer weiter vergrößert [9, 45].

Zur Erhöhung der Produktivität der Hybridomzellpopulation sollte somit zunächst eine Selektion der produzierenden Zellen vorgenommen werden.

4.1.1.4 *Fazit*

Die Untersuchung des Proliferations- und Produktionsverhaltens der Hybridomzelllinie IV F 19.23 ergab einen typischen Wachstumsverlauf einer kontinuierlichen Zelllinie mit lag-, exponentieller-, stationärer- und Absterbephase. Die Zellen zeigten ein relativ schnelles Absterbeverhalten, welches auf eine Glutaminlimitierung zurückgeführt wird.

Das Produktionsverhalten der Zelllinie entspricht dem in der Literatur beschriebenen mit einer verstärkten Antikörperproduktion zu Beginn der stationären Phase bzw. in der G1-Phase des Zellzyklus. Für die Sortierung sollten daher Zellen am Ende der exponentiellen bzw. zu Beginn der stationären Phase eingesetzt werden, da hier ihre Produktivität am höchsten ist und die Unterscheidung eindeutiger sein sollte. Die Produktivität der Zellpopulation konnte auf ca. 0,05 mg IgG/(h · 10⁹ Zellen) bestimmt werden, was allgemein eine relativ geringe Produktivität darstellt. Zum Vergleich liefern industrielle Zelllinien über 40 pg IgG/(Tag · Zelle) bzw. 1670 mg IgG/(h · 10⁹ Zellen) [160].

Die geringe Produktivität könnte auf den wahrscheinlich hohen Anteil an nicht produzierenden Zellen zurückzuführen sein, welches durch die Einzelzellanalyse mittels Durchflusszytometrie aufgezeigt wurde. Somit wird sich die Optimierung der IV F 19.23 zunächst auf eine Selektion der produzierenden Zellen konzentrieren müssen.

4.1.2 Anwendung einer Affinitätsmatrixfärbemethode

Die Selektion der produzierenden bzw. höher-produzierenden IV F 19.23 Zellen soll mittels einer Affinitätsmatrixfärbung und anschließender Sortierung durch ein FACS erfolgen. Die Färbemethode wurde bereits in Kapitel 3.4.1.2 kurz beschrieben und als die viel versprechenste der verschiedenen Färbemethoden angesehen, da sie die Möglichkeit bietet, die Zellen präzise nach ihrer Antikörpersekretionsgeschwindigkeit zu unterscheiden.

Die Affinitätsmatrixfärbemethode ist erstmals 1995 von Manz *et al.* beschrieben worden [64]. Sie beruht auf der Herstellung einer Matrix an der Zelloberfläche, die die stabile Bindung von Biotin zu Avidin nutzt. Die spezifische Bindung des von den Zellen produzierten Immunglobulins Anti Penicillin G Amidase erfolgt durch die anschließende Bindung eines biotinylierten Anti-Maus IgGs an das Avidin. Dieser besitzt eine Affinität gegen die Fc-Region des von der Zelle produzierten IgGs. In der nun folgenden Sekretionsphase soll die Verwendung von viskosem Medium (durch die Zugabe von Gelatine) das Abfangen der Antikörper an der Peripherie der produzierenden Zelle begünstigen und das sog. „Crossfeeding“, eine Diffusion der Antikörper über das Medium zu anderen Zellen, verhindern. Als letzter Schritt erfolgt die Färbung der gebundenen Antikörper mittels eines FITC gekoppelten Anti-Maus Antikörpers gegen die Fab-Region des Antikörpers. Abbildung 9 stellt die Färbemethode an einer Zelloberfläche graphisch dar.

Die in dieser Arbeit verwendete optimierte Methode von Borth *et al.* wurde auf verschiedene Weise auf ihre Funktionalität hin untersucht [65]. Zunächst sollte die grundsätzliche Wirksamkeit der einzelnen Bindungen und der Einfluss von unspezifischen Bindungen auf das Analysenergebnis mittels Protein-Microarray-Ebene untersucht und im Anschluss die Bindung der Matrix an lebende IV F 19.23 Zellen überprüft werden. Die Ergebnisse der Funktionalitätsuntersuchung sind nachfolgend dargestellt.

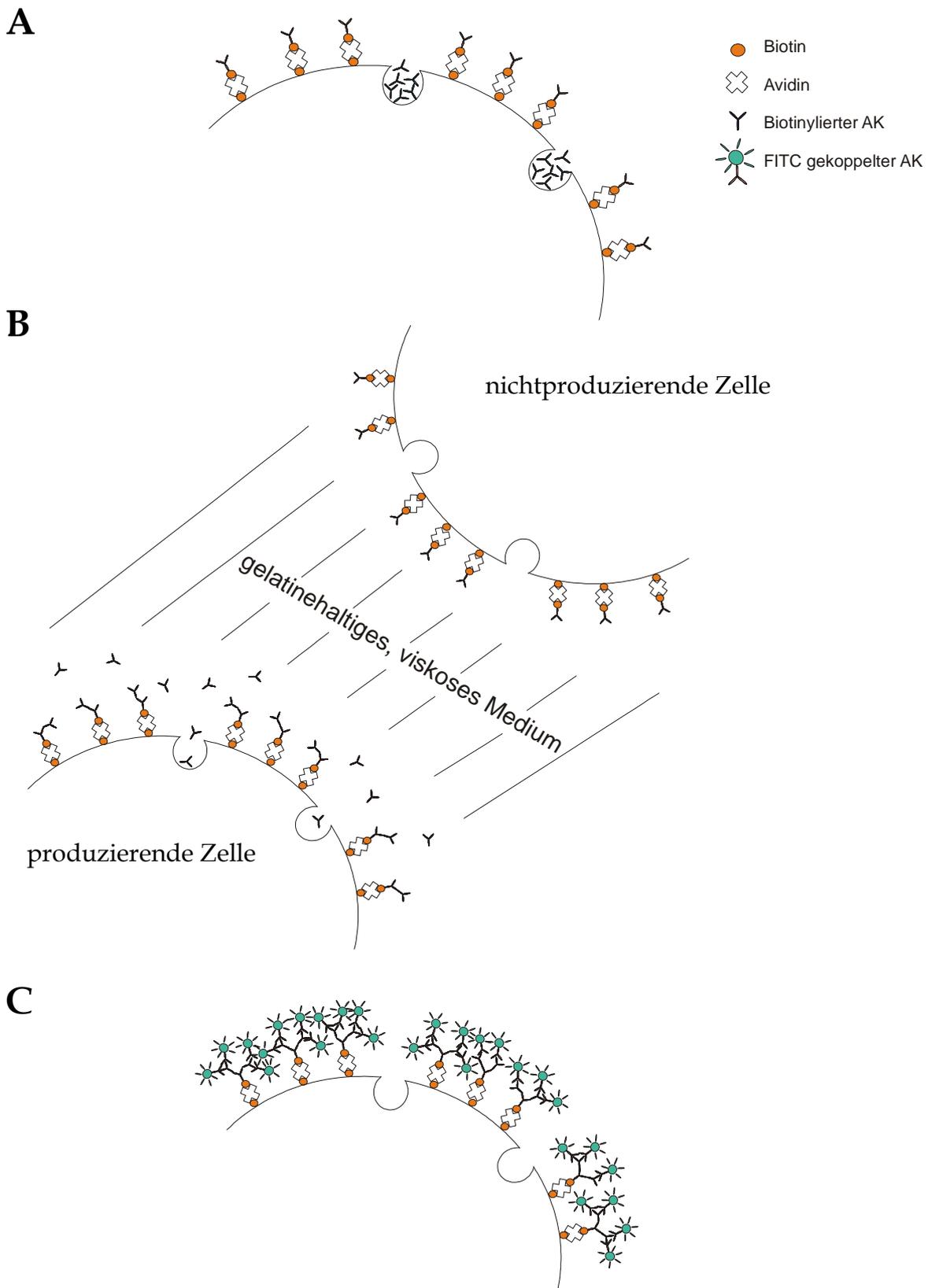


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Funktionsweise der Affinitätsmatrixmethode. **A:** Biotin-Avidin-biotinylierter Antikörper; **B:** Sekretionsphase, Bindung des produzierten Antikörpers; **C:** Färbung mittels eines FITC gekoppelten Antikörpers.

4.1.2.1 *Funktionalitätsuntersuchung mittels Protein-Microarrays*

Der Einsatz von Protein-*Microarrays* zur Überprüfung der Affinitätsmatrix hat gegenüber der direkten Verwendung von Zellen verschiedene Vorteile. Die Methode ist sehr schnell, es existiert eine etablierte Hybridisierungsmethode, nur geringe Mengen der eingesetzten Proteine und Marker werden benötigt und die Kosten werden zusätzlich durch eine Vermeidung von aufwendigen Zellkultivierungen gering gehalten. Diese Experimente sollen einerseits die einzelnen Bestandteile der Matrix überprüfen, andererseits aber auch das Ausmaß und den Einfluss von eventuell stattfindenden unspezifischen Bindungen feststellen.

Ein *Microarray* besteht aus einem festen Träger (zumeist modifizierte Glasoberflächen) auf dem im Falle von Protein-*Microarrays* häufig eine Membran aufgebracht wurde. Für diese Versuche sind Protein-*Microarray*-Prototypen der Firma Sartorius Stedim Biotec AG, die mit einer 10 µm dicken, weißen Nitrocellulosemembran beschichtet (direkt gezogen) sind, eingesetzt worden. Auf diese Membran können verschiedenste Proteine mittels Kontakt- oder Nicht-Kontakt-Druckern aufgebracht werden. Für diese Analyse ist der Kontaktdrucker Affymetrix 417™ Array zur Anwendung gekommen. Unter Nutzung der Hybridisierungstechnik können auf dem *Microarray* Protein-Protein-Interaktionsanalysen durchgeführt werden. Als Nachweis dient zum Abschluss meist ein fluoreszenzmarkiertes Protein. Mit einem speziellen Laserscanner werden die *Microarrays* in den entsprechenden Farbkanälen eingelesen. Aus der gemessenen Intensität und Position der Spots lassen sich Rückschlüsse auf spezifische und unspezifische Bindungen ziehen.

Für diese Analyse wurden vier verschiedene Ansätze durchgeführt, wobei 2 x die vollständige Matrix aufgetragen wurde. Alle vier *Microarrays* sind zunächst mit Avidin (in 10 Replikaten) bedruckt worden. Tabelle 4 zeigt die vier Funktionalitätsexperimente in ihrem Aufbau. *Microarrays* A und C weisen die vollständige Matrix auf. *Microarray* B dient der Analyse der unspezifischen Bindung zwischen Avidin und dem FITC gelabelten Antikörper und *Microarray* D der Analyse der unspezifischen Bindung zwischen dem biotinylierten Antikörper und dem FITC gelabeltem Antikörper. *Microarray* D ist hierbei ein wichtiger

Versuch, da eine starke unspezifische Bindung dieser beiden Antikörper eine Anwendung der Affinitätsmatrix zur Selektion produzierender Zellen unmöglich macht. Erst wenn ein von der Zelle produzierter Antikörper (im *Microarray*-Experiment ein IgG-Standard) gebunden wird, sollte eine Bindung des FITC gelabelten Antikörper entstehen und als Steigerung der Fluoreszenzintensität zu sehen sein. Die detaillierte Beschreibung der Hybridisierungstechnik findet sich im Anhang.

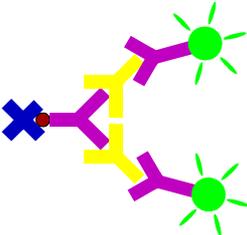
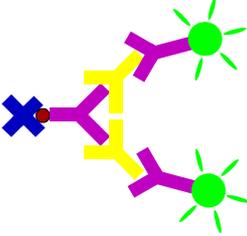
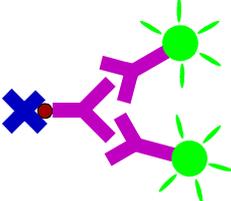
Matrixaufbau	Matrixbeschreibung	Grund der Untersuchung
A 	Avidin Biotinylierter Antikörper IgG-Standard FITC gekoppelte Antikörper	vollständige Matrix
B 	Avidin FITC gekoppelte Antikörper	Unspezifische Bindungen
C 	Avidin Biotinylierter Antikörper IgG-Standard FITC gekoppelte Antikörper	vollständige Matrix
D 	Avidin Biotinylierter Antikörper FITC gekoppelte Antikörper	Unspezifische Bindungen

Tabelle 4: Beschreibung des Aufbaus der vier Protein-*Microarray*-Experimente A bis D.

Bei der Versuchsdurchführung wurden die *Microarrays* A und B mit der 10 fachen Menge an FITC gekoppeltem Antikörper versetzt und zeigen daher bei der Auswertung der Ergebnisse erhöhte Fluoreszenzintensität. Ein qualitativer

Vergleich der Experimente ist dennoch durch die doppelte Auftragung der vollständigen Matrix (*Microarrays* A und C) möglich.

Nach der Hybridisierung der Protein-*Microarrays* wurden sie mit einem Laserscanner GenePix® 4000B aufgenommen und mittels der Software ImaGene™ 5.5.3 ausgewertet. Abbildung 10 zeigt beispielhaft das eingescannte Bild des *Microarrays* C. Da das Bedrucken der *Microarrays* mit dem Kontaktdrucker Affymetrix 417™ Array vorgenommen wurde, weisen die Spots aufgrund einer Beschädigung der Membran Donut-Strukturen auf.

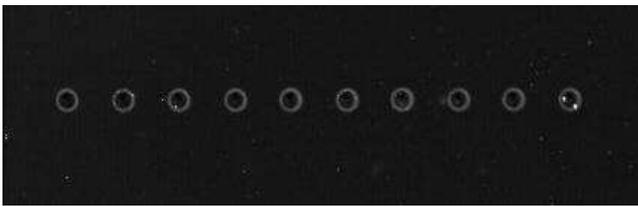


Abbildung 10: Beispielaufnahme des eingescannten *Microarrays* C.

Die Auswertung der Protein-*Microarrays* erfolgt durch die Ermittlung des *signal to noise ratio* (SNR). Hierbei wird zunächst die gemittelte Hintergrund-Fluoreszenzintensität von der gemittelten Signal-Fluoreszenzintensität der abgezogen und anschließend zusätzlich durch die Standardabweichung der Hintergrund-Fluoreszenzintensität dividiert.

$$SNR = \frac{BM - SM}{StdevBM} \quad (4)$$

SNR = *Signal to noise ratio*

BM = *Background mean* (gemittelte Hintergrund-Fluoreszenzintensität)

SM = *Signal mean* (gemittelte Signal-Fluoreszenzintensität)

Stdev BM = Standardabweichung der Hintergrund-Fluoreszenzintensität

Die Auswertung der vier *Microarrays* ist als Säulendiagramm in Abbildung 11 dargestellt. *Microarrays* A und B zeigen wie erwartet ein höheres Signal durch die 10 fache Auftragung des FITC gelabelten Antikörpers. Eindeutig kann aber die Funktionalität der gesamten Matrix durch die *Microarrays* A und C nachgewiesen

werden. Für *Microarrays* D berechnete sich eine negative SNR was deutlich darauf hinweist, dass keine unspezifischen Bindungen zwischen dem biotinylierten und dem FITC gelabelten Antikörper stattfindet. Folglich muss der IgG-Standard bzw. ein von der Zelle produzierter Antikörper am biotinylierten Antikörper gebunden sein, um ein Fluoreszenzsignal zu messen.

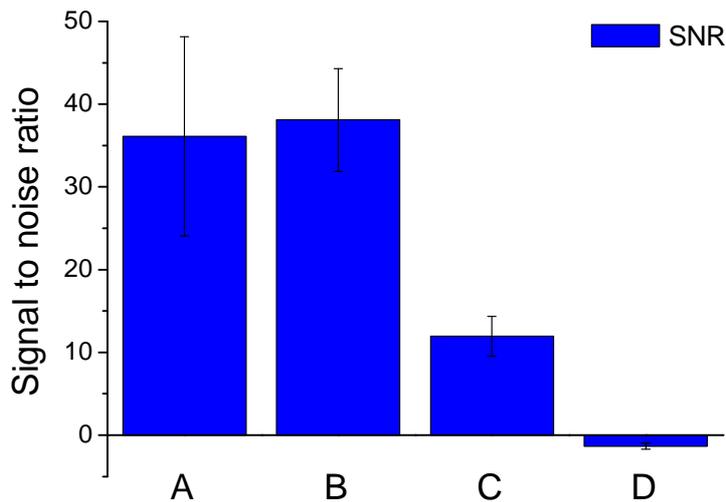


Abbildung 11: "Signal to Noise Ratio" Ergebnisse unter Angabe der Standardabweichung für die *Microarrays* A bis D.

Die starke unspezifische Bindung zwischen Avidin und dem FITC gelabelten Antikörper (*Microarrays* B) könnte sich für den Fall von nicht mit dem biotinylierten Antikörper besetzten Bindungsstellen am Avidin als Problem erweisen. Somit muss bei der Färbung an der Zelloberfläche darauf geachtet werden, dass der biotinylierte Antikörper im Überschuss zugegeben wird. Die weiteren Auswertungsergebnisse der vier *Microarrays* für die durchschnittlichen Signalintensitäten („Signal Mean“) und mittleren Hintergrundintensitäten abgezogen von den mittleren Signalwerte sind im Anhang dargestellt und weisen die gleiche Tendenz auf wie die SNR Ergebnisse.

4.1.2.2 Funktionalitätsuntersuchung mittels der Durchflusszytometrie

Der letzte Schritt der Funktionalitätsanalyse der Affinitätsmatrix ist die Bindung der Matrix an lebenden IV F 19.23 Zellen. Nach der vollständigen Matrixfärbung

(detaillierte Beschreibung siehe Anhang Kapitel 6.1.5.1) werden die Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers untersucht, da hiermit auch die spätere Sortierung erfolgen soll. Abbildung 12 stellt diese durchflusszytometrische Untersuchung der IV F 19.23 Zellpopulation einmal als eine reine Oberflächenfärbung nur mit dem FITC gelabelten Antikörper als Negativkontrolle (A) und einmal mit der vollständigen Affinitätsmatrixfärbung (B) dar. Gezeigt ist die zweidimensionale Auftragung der Zellzahl gegen die grüne Fluoreszenz (FITC) lebender Zellen.

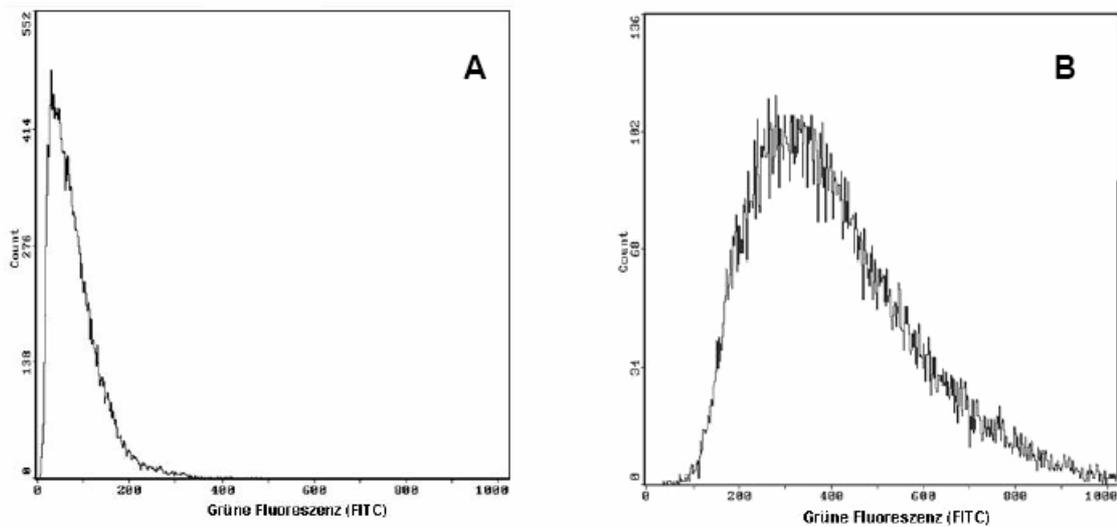


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der IV F 19.23 Zellpopulation. **A:** Oberflächenfärbung mit dem FITC gelabelten Antikörper; **B:** Vollständige Affinitätsmatrixfärbung.

Deutlich ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität der Affinitätsmatrixfärbung (B) (100 bis 1000 RFI) gegenüber der einfachen Oberflächenfärbung (A) (0 bis 300 RFI) zu erkennen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die unspezifische Bindung des FITC gelabelten Antikörpers an die Zelloberfläche der Hybridomzellen vernachlässigt werden kann. Zudem ist dieser eindeutige Anstieg der Fluoreszenzintensität ein sicheres Zeichen für die Funktionalität der Affinitätsmatrixfärbung auch an Zelloberflächen.

Pierre Moretti konnte in seiner Masterarbeit zeigen, dass auch der Einsatz einer vierfachen Menge an Biotin keinen Einfluss auf das Zellwachstum oder die Vitalität der Zellen hat [42]. Angesichts der Tatsache, dass die Biotinylierung als

erster Schritt der Methode die Kapazität der gesamten Affinitätsmatrix bestimmt, sollte die Menge an Biotin an der Zellmembran durch die Erhöhung der Biotinreagenzkonzentration maximiert werden. Avidinkonzentrationen wurden dem entsprechend angepasst.

4.1.3 Sortierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23

Nach der Analyse der Zelllinie auf Produktivität und die Untersuchung der Affinitätsmatrix auf Funktionalität zunächst auf Protein-*Microarrays* und anschließender Zelloberflächenfärbung kann die Sortierung der Zellen mit einem FACS erfolgen.

Die Affinitätsmatrixfärbung der IV F 19.23 Zellen erfolgt nach dem im Anhang angegebenen Protokoll (Anhang Kapitel 6.1.5.1). Erste Analysen der gefärbten Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop zeigen unterschiedlich starke Färbungen der Zellen (dargestellt in Abbildung 13).

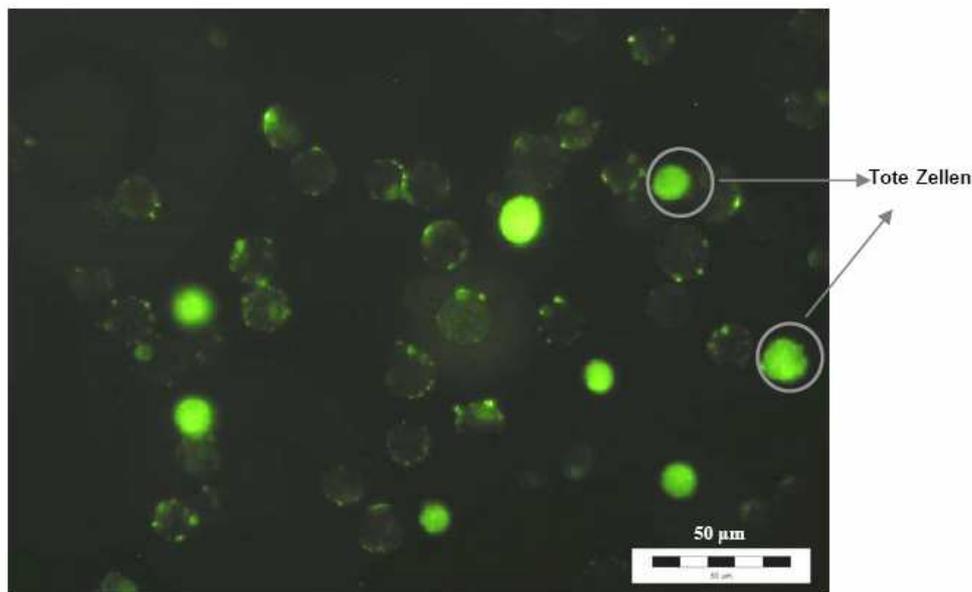


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Affinitätsmatrix gefärbten IV F 19.23 Zellen [42].

Eine vollständige und starke Färbung der Zellen kennzeichnet den Anteil toter Zellen, da der FITC gelabelte Antikörper durch die defekte Zellmembran in das

Zellinnere eindringen konnte. Eine schwächere Färbung nur der Zellmembran kennzeichnet die lebenden mit der Affinitätsmatrix gefärbten Zellen. Die Zellen mit der stärksten Fluoreszenzintensität sollten dabei auch die produktivsten darstellen. Die toten Zellen würden auf Grund ihrer höheren Fluoreszenzsignale bei der Analyse als hoch-produzierende Zellen eingeschätzt werden und müssen daher gekennzeichnet und aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Für die Sortierung der mit der Affinitätsmatrix gefärbten IV F 19.23 Zellen wird ein FACS Vantage SE von BD eingesetzt. Grundsätzlich besteht mit einem FACS die Möglichkeit, die selektierten Zellen in einem Auffanggefäß zu sammeln oder einzelne Zellen beispielsweise in 96er-Mikrotiterplatten zu sortieren. Die Einzelzellsortierung ist sehr effizient, da aus jedem Klon eine Population mit homogenen Charakteristika gewonnen werden kann. So kann aus einem hoch-produzierenden Klon eine ganze hoch-produzierende Population erhalten werden. Allerdings muss zunächst von jedem sortieren Klon die Produktivität bestimmt werden. Bei einer Sortierung von nur 96 Zellen in eine Mikrotiterplatte bedeutet das 96 *Batch*-Kultivierungen und deren Produktbestimmungen mittels beispielsweise ELISA. Dies ist ein sehr großer Kosten- und Zeitaufwand. Die Alternative ist die sogenannte „Bulk“-Sortierung, in der alle selektierten Zellen in einem Gefäß gesammelt werden. Innerhalb der sortierten Zellpopulation können die Zellen so allerdings relativ heterogene Charakteristika aufweisen. In der Regel werden daher mehrere aufeinander folgende Sortierungen durchgeführt, um eine bessere Selektion der gewünschten Zellen zu erreichen.

Wie oben erwähnt ist es für die Sortierung wichtig, dass die toten Zellen nicht mit in das Selektionsprofil einbezogen werden. Lebende und tote Zellen können mittels zwei verschiedener Methoden von einander unterschieden werden. Unterschiedliche Streulichteigenschaften zu sehen in der zweidimensionalen FSC/SSC (*Forward scatter/Sideward scatter*) Auftragung der Zellen, also nach ihrer Größe und Granularität, können für eine Selektion herangezogen werden. Aber auch die Färbung der toten Zellen mit Propidium Iodid. Da intakte Zellen den roten Fluoreszenzfarbstoff nicht durch ihre Zellmembran dringen lassen, wird nur die DNA der toten Zellen angefärbt. Mit der Software für das

Durchflusszytometer können diese Zellen dann gekennzeichnet und von der Sortierung durch sogenanntes „Gating“ ausgeschlossen werden.

Für die Sortierungen der IV F 19.23 wurde beide Methoden angewandt. Die Propidium Iodid Färbung erfolgte wenige Minuten vor der Sortierung mit einer Konzentration von 1,5 μL PI (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pro mL Zellsuspension. Abbildung 14 zeigt das Gating der lebenden Zellen zunächst durch ihre Streulichteigenschaften (Abbildung A) und anschließend durch ihre geringeren roten Fluoreszenzintensitäten (Abbildung B).

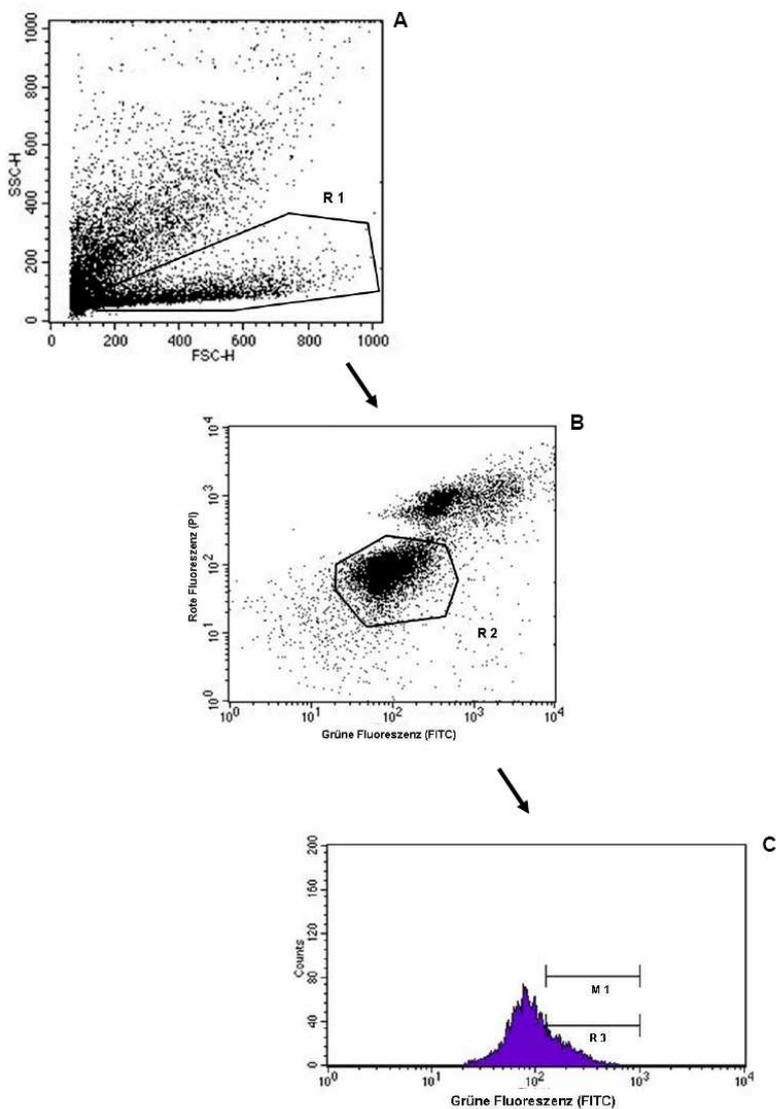


Abbildung 14: Einstellungen des Gatings während der Sortierung der IV F 19.23 Zellen.

Abbildung C stellt die Verteilung der grünen Fluoreszenzintensität der lebenden Zellen nach dem *Gating* dar. Die gefärbten Zellen weisen ebenso wie in Abbildung 8 eine relativ breite Verteilung in der Fluoreszenzintensität auf. Während der ersten beiden von insgesamt vier Sortierungen wurden die 20 % der am stärksten fluoreszierenden Zellen als höher-produzierende Zellen gekennzeichnet und somit als Zielzellen mit dem FACS selektiert.

Für die Sortierungen 3 und 4 wurden nur 10 % der Zellen ausgewählt. In Abbildung C sind diese Sortierungsparameter als *Gate* R3 gekennzeichnet. Nur Zellen, die von allen drei *Gates* erfasst werden, werden anschließend als Zielzellen selektiert.

Sortierung

Für die Sortierung mit dem FACS wurden die gefärbten Zellen bei jeder Sortierung in 4°C kaltem Medium vorgelegt. Nach dem Sortiervorgang sind die ausgewählten Zellen in einem Sammel-Gefäß mit kaltem Medium aufgefangen worden. Diese Vorgehensweise soll die Vitalität der Zellen möglichst erhalten, welche eventuell durch die Vorlage von Phosphatpuffer beeinflusst würde. Allerdings sinkt die Viabilität trotz dieser Vorsichtsmaßnahme zunächst durch die Färbung aber auch durch die Sortierung von ca. 95 % auf 60 % ab. Ebenfalls ist eine starke Abnahme der Lebendzellzahl auf etwa 25 % zu beobachten. Ein Grund ist die zeitliche Länge der Färbung (4 bis 5 Stunden), aber auch die verschiedenen Färbeschritte mit häufigem Zentrifugieren. Insbesondere die Trennung der Zellen vom viskosen Medium für die Sekretionsphase erwies sich als schwierig und war mit großen Zellverlusten verbunden. Die Verringerung der Vitalität und der Lebendzellzahl während der Sortierung lässt sich ebenfalls durch die zeitliche Länge (ca. 4 Stunden) bei niedrigen Flussraten und durch evtl. Schädigungen der Zellen beim Aufprall im Sammelgefäß erklären.

Auf Grund der niedrigen Zellzahl nach den Sortierungen wurden die Zellen zunächst in 24- und 6-Lochplatten kultiviert. Über mehrere Wochen sind die Zellen auf eine geeignete Zelldichte für Spinnerflaschen (100 ml mit $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml) expandiert worden, um anschließend mittels drei paralleler *Batch-*

Kultivierungen die Produktivität der sortierten Zellen zu bestimmen. Abbildung 15 stellt die Reihenfolge der vier Sortierungen mit ihren anschließenden Kultivierungen zum bessern Verständnis schematisch dar.

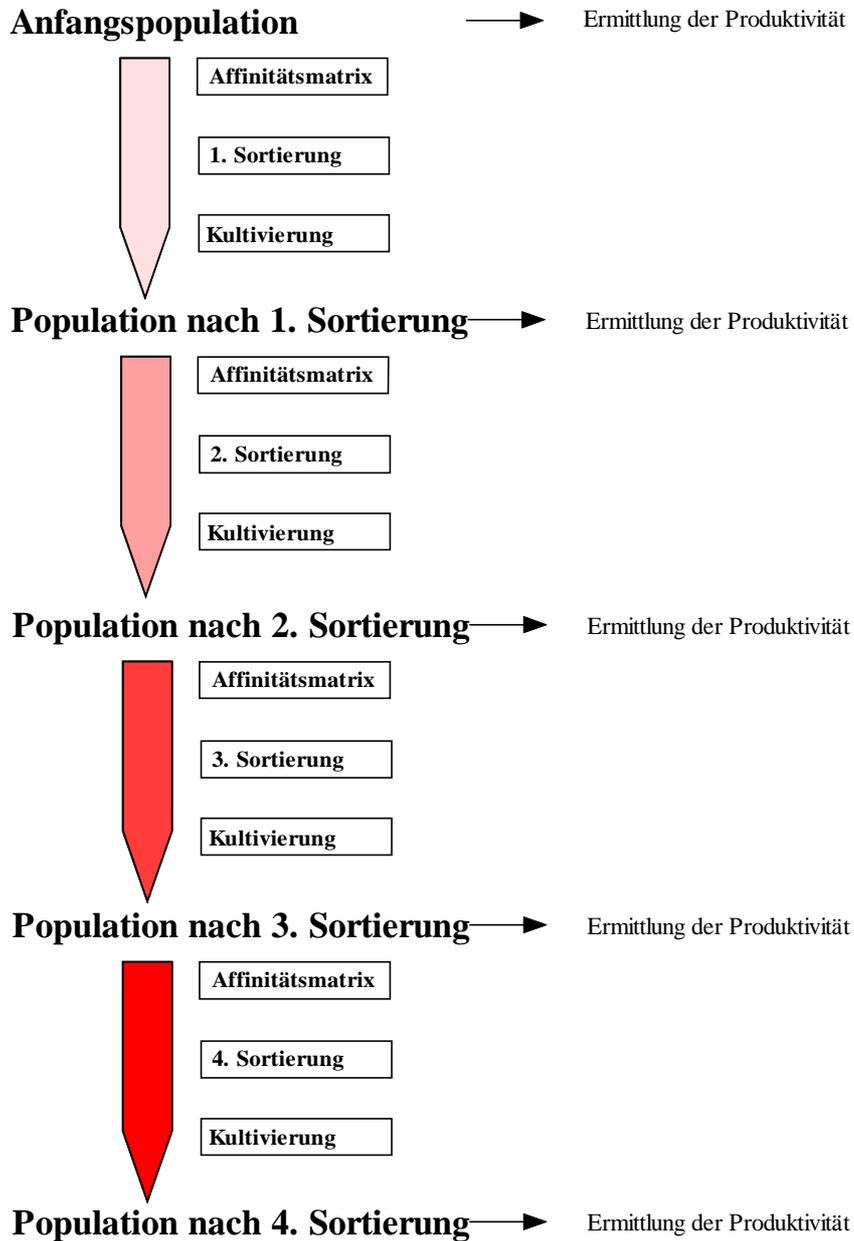


Abbildung 15: Überblick über die vier durchgeführten Sortierungen und anschließenden Kultivierungen der Hybridomzelllinie IV F 19.23 zur Ermittlung der Produktivität.

4.1.3.1 Produktivitätsbestimmung der IV F 19.23 Zellen

Im Anschluss an jede der vier Sortierungen folgte eine Produktivitätsbestimmungen. Sie sollten Aufschluss darüber geben, ob die Sortierungen der Zellpopulation zu der gewünschten Steigerung der Antikörperproduktivität der Zellpopulation geführt haben. Wie zuvor beschrieben, sind parallel 3 Spinnerkultivierungen durchgeführt und über die Zellzahl und die Antikörperkonzentration die Produktivität der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung ermittelt worden. In Abbildung 16 ist die Produktivität der Anfangspopulation sowie der 2. und 4. Sortierung gegen die Zeit aufgetragen.

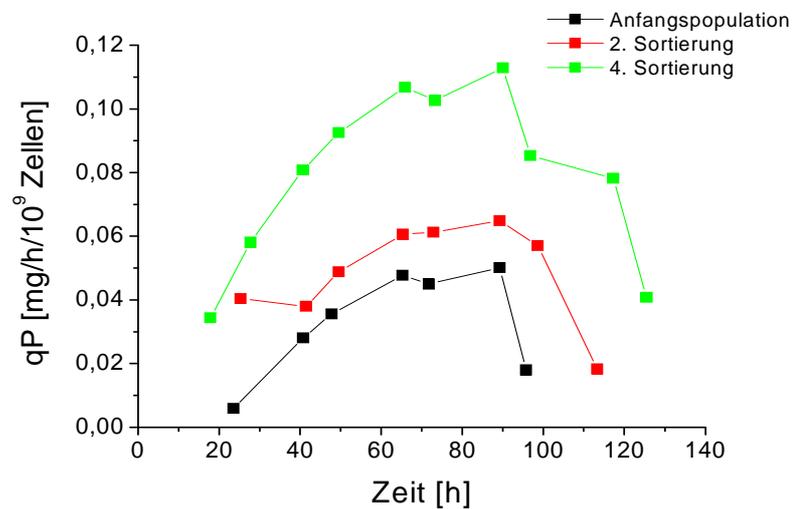


Abbildung 16: Produktivitäten der IV F 19.23 Zellpopulation am Anfang, nach der 2. und der 4. Sortierung.

Die Ergebnisse zeigen, dass die wiederholten Sortierungen zu einer erfolgreichen Steigerung der Produktivität der IV F 19.23 Zellpopulation geführt hat. Diese betrug bis zu 125 % nach vier Sortierungen (berechnet aus den Mittelwerten der höchsten drei Produktivitätswerten von Anfangspopulation und 4. Sortierung).

4.1.3.2 *Fazit*

Die Analyse der Affinitätsmatrixfärbemethode hinsichtlich ihrer Funktionalität auf Protein-*Microarray*-Ebene und schließend an Zelloberflächen führte in beiden Fällen zu einem positiven Ergebnis. Eine Sortierung hoch-produzierender Zellen konnte bei Anwendung dieser Methode erfolgreich mittels FACS durchgeführt werden. Nach vier Sortierungsschritten ist eine Produktivitätssteigerung der Zellpopulation um 125 % erreicht worden. Somit konnte mit dieser Untersuchung der Methode ihre Einsetzbarkeit für die Steigerung der Antikörperproduktivität einer IV F 19.23 Hybridomzellpopulation bestätigt werden.

4.1.4 **Färbung und Sortierung der HKB-11 Zellen**

Die Funktionalität der in der Literatur beschriebenen Affinitätsmatrix zur Produktivitätssteigerung einer Zellpopulation von IV F 19.23 Zellen konnte bereits im vorherigen Kapitel gezeigt werden. Diese Methode sollte anschließend bei der Selektion höher-produzierender Zellen einer neu entwickelten Industriezelllinie HKB-11 Verwendung finden. Diese wurden daraufhin transfiziert, dass sie nur das Fc-Fragment eines humanen Immunglobulins G produzieren. Dies könnte den Einsatz der in der Literatur beschriebenen Affinitätsmatrixfärbung erschweren, da beide eingesetzten Antikörper an das Fc-Fragment binden müssten. Infolgedessen ist für die Färbung der biotinylierten Antikörper durch ein biotinyliertes Protein A ersetzt worden. Dieses bindet humane Antikörper am Fc-Fragment, aber nicht an derselben Stelle wie ein Antikörper gegen das Fc-Fragment und somit sollte keine Konkurrenzsituation ausgelöst werden. Allerdings sollte eine genaue Analyse der Methode erfolgen. Nach der Sekretionsphase wird ein FITC gelabelter Ziegen Anti-Human IgG spezifisch gegen das Fc-Fragment eingesetzt, da Protein A eine hohe Affinität für Humane- und keine für Ziegen-Antikörper besitzt. Diese Vorgehensweise soll unspezifische Bindungen des FITC gelabelten Antikörpers weitgehend vermeiden. Die zuvor verwendete (A) und die modifizierte (B) Affinitätsmatrixfärbung sind vergleichend in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

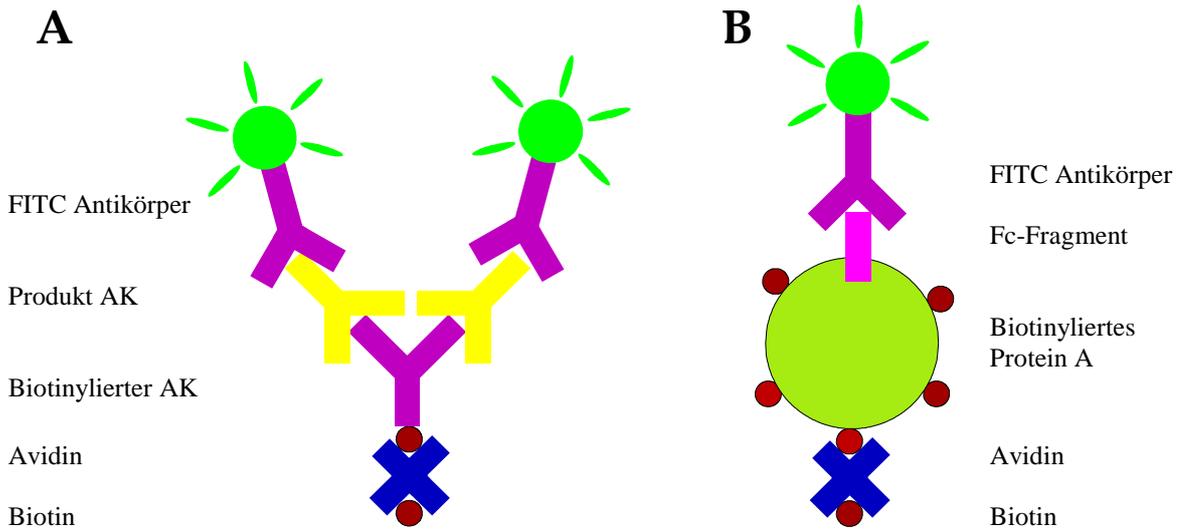


Abbildung 17: Beschreibung des Aufbaus der beschriebenen (A) und neu entwickelten (B) Affinitätsmatrixfärbung.

Die Kenntnis des Wachstums- und Produktionsverhalten der HKB-11 Zellen ist, wie zuvor auch wie bei den Hybridomzellen, essentiell zur Charakterisierung der Zellpopulation. Zusätzlich ist eine Funktionalitätsprüfung der veränderten Färbung zunächst auf Protein-Microarrays und später auf Zelloberflächen nötig.

4.1.4.1 Proliferations- und Produktionsverhalten der HKB-11 Zelllinie

Die Bestimmung des Proliferations- und Produktionsverhalten der HKB-11 Zellen stellte sich durch ihr semi-adhärentes Wachstum als sehr schwierig dar. Ein leichtes Ablösen der Zellen während der Kultivierung in T-Flaschen ist zwar durch einfaches Schütteln möglich, aber in Suspension wurde eine verstärkte Aggregatbildung beobachtet. Dies macht eine akkurate Zellzählung mittels einer Neubauerzählkammer unmöglich. Zusätzlich wird die Proliferation der Zellen in Spinnerflaschen behindert, da die Zellen innerhalb der Aggregate schlechter mit Nährstoffen versorgt werden und absterben. Folglich kommt es nur zu einem langsamen Wachstum und einer niedrigeren Vitalität der Zellkultur.

Im Rahmen der Mitbetreuung der Diplomarbeit von Daniel Landgrebe ist unter anderem eine Optimierung der Zellzählung mit verschiedenen Methoden zur Aggregatsauflösung untersucht worden [161]. Dazu gehörten enzymatische

Verfahren wie die Verwendung von Trypsin, Collagenase und Accutase. Die Zellen sind nach der Probenahme aus der Spinnerflasche zentrifugiert und in der jeweiligen Enzymlösung resuspendiert worden. Des Weiteren ist versucht worden, die Zellen mechanisch mittels einer 1 ml Pipette durch auf und ab pipettieren zu trennen. Zusätzlich wurde untersucht, ob ein Zusatz des Tripeptids RGD zum Medium eine Verringerung der Aggregation bewirken würde.

RGD ist ein Peptid bestehend aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Es bindet an Integrine auf der Zelloberfläche, welche Zell-Zellkontakte herstellen. Durch die Besetzung dieser Bindungsstellen mit RGD sollen die Verbindungen zwischen den Zellen gelöst werden, bzw. nicht zustande kommen [162].

Sowohl die Enzyme als auch der Einsatz des RGDs brachten nicht den gewünschten Erfolg. Die Enzyme bewirkten eine Erhöhung der Vitalität verursacht evtl. durch eine Zersetzung der toten Zellen. Das RGD konnte die Aggregation der Zellen nicht verhindern. Möglicherweise wird eine Bindung der HKB-11 Zellen aneinander nicht durch Integrine hergestellt. Die mechanische Trennung erwies sich als das effektivste Mittel gegen die Zellaggregation und für eine zuverlässige Zellzählung.

Da eine Zellkultivierung ohne Aggregatbildung in Spinnerflaschen nicht möglich ist, ist die Kultivierung der HKB-11 Zellen adhärent in 6-Lochplatten erfolgt. Pro Well wurden 2,75 ml einer Zellsuspension mit $0,08 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingesetzt. Diese Platten wurden in Inkubatoren mit 37°C und 5 % CO_2 platziert. Zweimal täglich erfolgten Probenahmen mit einer Bestimmung der Zellzahl, der Vitalität und der Fc-Fragmentkonzentration. Für jede Bestimmung ist der gesamte Inhalt von drei Vertiefungen der 6-Lochplatten entnommen und für die Ermittlung der Parameter der Mittelwert aller drei errechnet worden. Abbildung 18 stellen die Zellproliferation, Viabilität und Fc-Fragmentkonzentration graphisch dar.

Die Zellen zeigen das übliche Proliferationsverhalten während einer *Batch*-Kultivierung mit starkem Wachstum über einen Zeitraum von 75 Stunden. Eine nachweisbare Fc-Fragmentkonzentration konnte erst ab Stunde 55 ermittelt werden. Die Produktivitätsbestimmung der HKB-11 Zellpopulation erfolgte wie in

Kapitel 4.1.1.2 bei den Hybridomzellen IV F 19.23 mittels der Differenzialmethode. Abbildung 19 stellt diese graphisch dar.

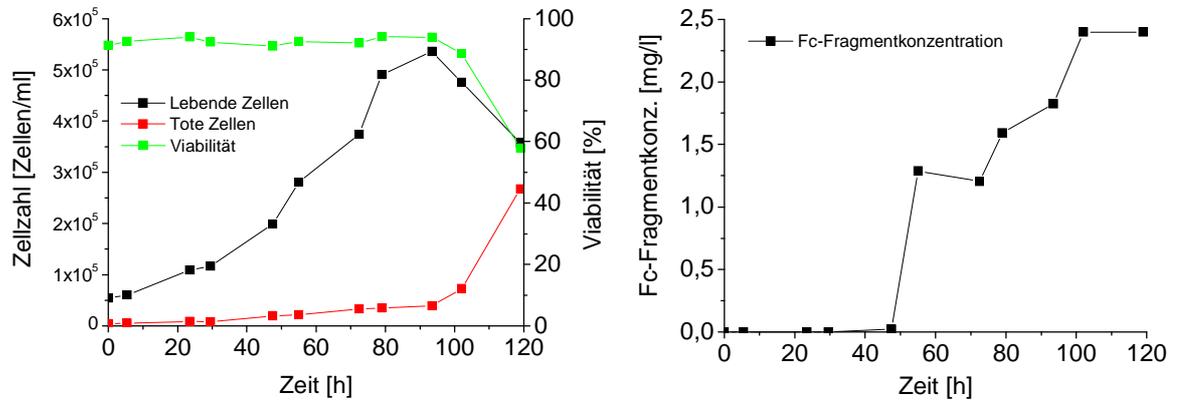


Abbildung 18: Darstellung der Zellproliferation der HKB-11 Zellen und Fc-Fragmentkonzentration während der Kultivierung in 6-Loch-Platten.

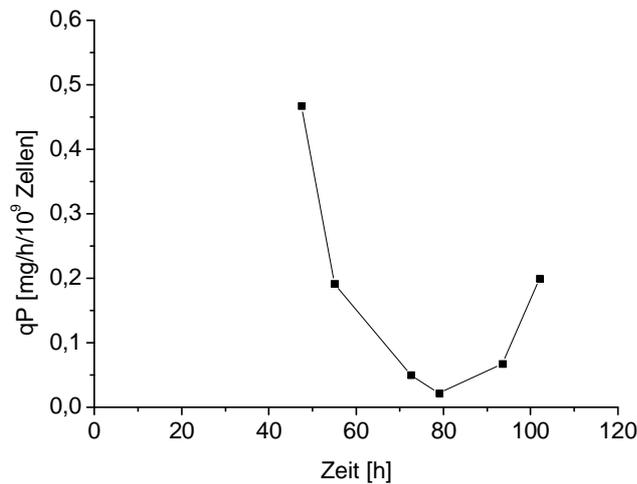


Abbildung 19: Produktivität der HKB-11 Zellpopulation während der Kultivierung in 6-Loch-Platten.

Das Produktionsverhalten der HKB-11 Zellen stellt sich als konträr zu dem der IV F 19.23 Zellen dar. Hier sinkt die Produktivität zum Ende der exponentiellen und während der stationären Phase stark ab und steigt erst wieder zu Beginn der Absterbephase. Dies weist auf eine überwiegende Produktion des Proteins in der S, M oder G2 Phase des Zellzyklus hin. Es ist eine zum Teil deutlich höhere Produktivität im Vergleich zur Anfangspopulation der IV F 19.23 Zellen (max. etwa 0,05 mg/h/10⁹ Zellen) erkennbar und sollte durchaus für eine Affinitätsmatrixfärbung an der Zellmembran ausreichen. Für eine deutlich

sichtbare Färbung sollten Zellen vom zweiten Tag der Kultivierung somit in der Mitte der exponentiellen Phase verwendet werden, da hier die Zellen die höchste Produktivität aufweisen. Zunächst ist allerdings eine sorgsame Analyse der Funktionalität der neu entwickelten Methode zwingend notwendig.

4.1.4.2 Anwendung einer Affinitätsmatrixfärbemethode

Funktionalitätsuntersuchung mittels Protein-Microarrays

Die Verwendung von Protein-Microarrays zur Funktionalitätsermittlung der Affinitätsmatrix hat sich schon bei der Untersuchung von IV F 19.23 Zellen als zuverlässig erwiesen und soll auch hier bei der Untersuchung der modifizierten Methode Anwendung finden. Die Hybridisierung der Protein-Microarrays erfolgte nach der im Anhang detailliert beschriebenen Anleitung. Als Fluoreszenzmarker sind bei einigen Versuchen ein FITC gelabelter Antikörper und bei anderen Cy3 gelabeltes Streptavidin eingesetzt worden. Abbildung 20 stellt eine Zusammenfassung der durchgeführten Protein-Microarrays dar.

Wie zuvor bei der Analyse der in der Literatur beschriebenen Affinitätsmatrixmethode mit Protein-Microarrays ist im Anschluss der SNR (*signal to noise ratio*) für jeden Versuch berechnet worden. Die Analyse der Fluoreszenzintensität der unspezifischen Bindungen (A bis C) sind in Abbildung 21 dargestellt. Hier ist im Gegensatz zu den Protein-Microarray Experimenten für die IV F 19.23 Zelllinie keine unspezifischen Bindungen zwischen dem Avidin und dem FITC gelabelten Ziegen Anti-Human Fc-Fragment spezifischen Antikörper ermittelbar (A). Vorteilhaft für das Funktionieren der Matrix ist zudem, dass keine unspezifischen Bindungen zwischen dem Protein A und dem Antikörper zu messen sind (B). So ist kein Fluoreszenzsignal bei Zellen zu erwarten, die keine humanen Fc-Fragmente bilden. Die unspezifischen Bindungen bei der Kombination C könnten sich bei zu wenig eingesetztem bioninyliertem Protein A, so dass nicht alle möglichen Bindungsstellen des Avidins besetzt werden, als störend auswirken. Die Ergebnisse der weiteren Versuche sind in Abbildung 22 veranschaulicht.

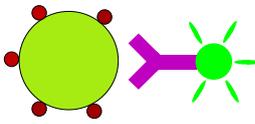
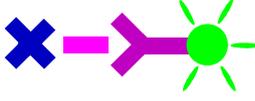
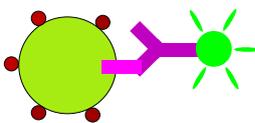
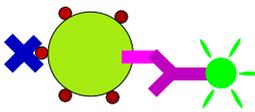
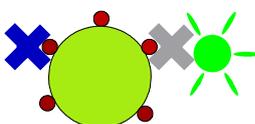
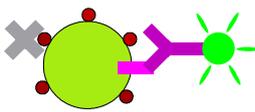
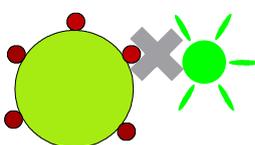
	Matrixaufbau	Matrixbeschreibung	Grund der Untersuchung
A		Avidin FITC gelabelter Antikörper	Unspezifische Bindungen
B		Biot. Protein A FITC gelabelter Antikörper	Unspezifische Bindungen
C		Avidin Fc - Fragment FITC gelabelter Antikörper	Unspezifische Bindungen
D		Biot. Protein A Fc - Fragment FITC gelabelter Antikörper	Funktionalität der Bindungen
E		Avidin Biot. Protein A Fc - Fragment FITC gelabelter Antikörper	Funktionalität der Bindungen
F		Avidin Biot. Protein A Streptavidin Cy3	Funktionalität der Bindungen
G		Streptavidin Biot. Protein A Fc - Fragment FITC gelabelter Antikörper	Funktionalität der Bindungen
H		Biot. Protein A Streptavidin Cy3	Funktionalität der Bindungen

Abbildung 20: Beschreibung der durchgeführten Protein-Microarrays.

Microarrays D und E dienten der Bestätigung der Färbemethode. Beide zeigen hohe SNR Werte und setzten sich deutlich von den SNRs der unspezifischen Bindungen zwischen Avidin und dem Fc-Fragment ab.

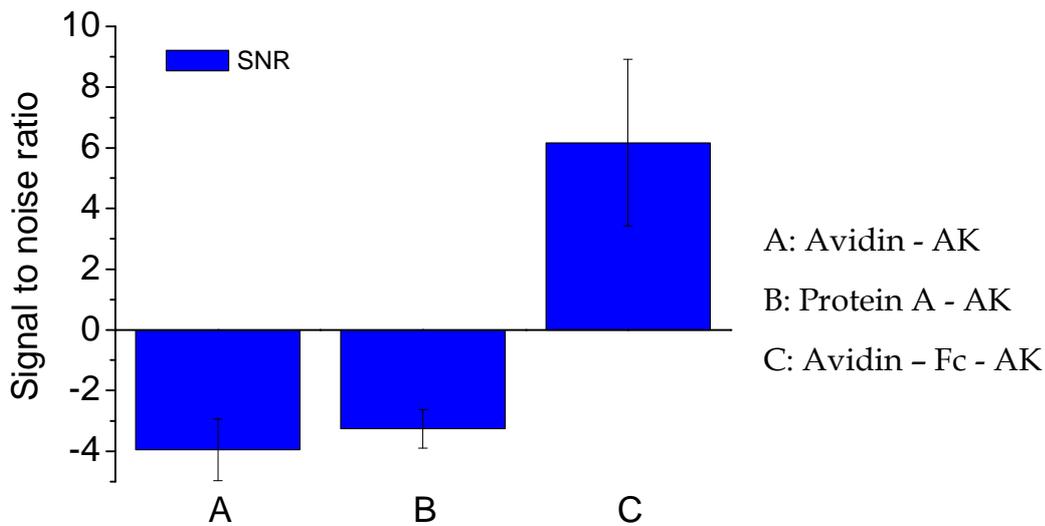


Abbildung 21: Stärke der unspezifischen Bindungen zwischen Avidin und FITC gelabeltem Antikörper, biotinyliertem Protein A und FITC gelabeltem Antikörper, Avidin und Fc-Fragment und FITC gelabeltem Antikörper unter Angabe der Standardabweichung.

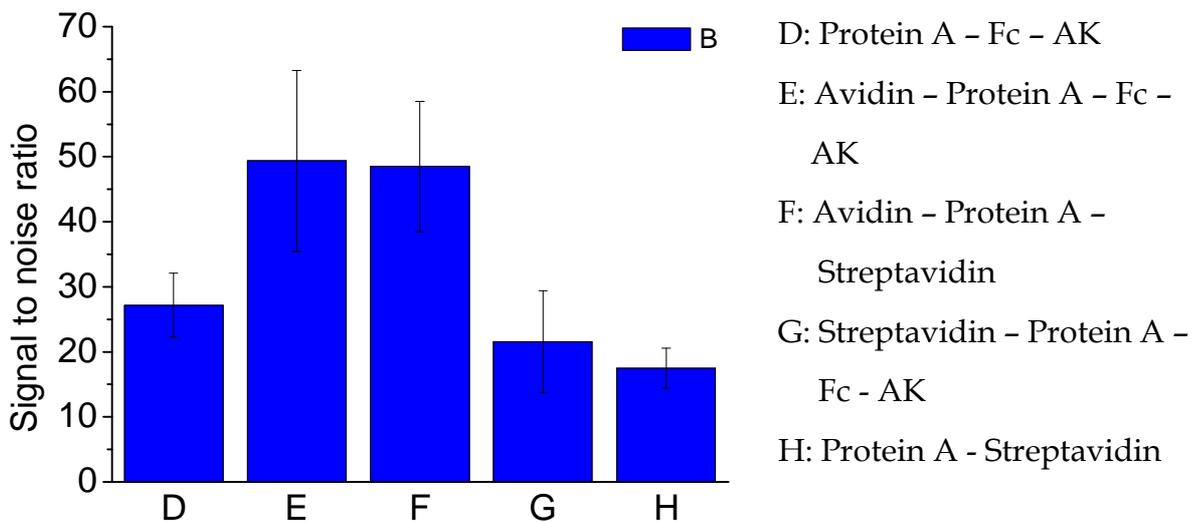


Abbildung 22: Überprüfung der Bindung der einzelnen Komponenten der Affinitätsmatrix unter Angabe der Standardabweichung.

Die zusätzlichen Versuche unter der Verwendung von Streptavidin als Detektionsreagenz konnten zum einen bestätigen, dass das Protein A mehrfach biotinyliert ist (Herstellerangaben: 3-5 Biotin) (F). Zum anderen zeigen sie, dass

eine Verwendung von Streptavidin anstelle von Avidin möglich wäre (G) wobei die Verwendung von Avidin (E) jedoch zu besseren Ergebnissen führt.

Die weiteren Auswertungsergebnisse der acht Microarrays für die durchschnittlichen Signalintensitäten (*Signal Mean*) und mittleren Hintergrundintensitäten abgezogen von den mittleren Signalwerten sind im Anhang dargestellt und weisen die gleiche Tendenz auf wie die SNR Ergebnisse.

Infolgedessen kann aus den Ergebnissen dieser Experimente geschlossen werden, dass die veränderte Affinitätsmatrixfärbemethode in ihrem Aufbau funktioniert. Die Bindungen zwischen den einzelnen Komponenten konnte unter den Bedingungen des Protein-Microarrays gewährleistet werden. Außerdem konnte sichergestellt werden, dass keine oder nur sehr geringe unspezifische Bindungen die Auswertbarkeit stören. Ob diese veränderte Methode auch an Zelloberflächen einsetzbar ist, müssen weitere Untersuchungen unter der Verwendung von lebenden Zellen zeigen.

Funktionalitätsuntersuchung mittels Durchflusszytometrie

Die Untersuchung der Anwendbarkeit der modifizierten Affinitätsmatrixfärbung auch für Zelloberflächen von HKB-11 Zellen ist stufenweise durchgeführt worden. Neben der Ermittlung der Bindungsfähigkeit der einzelnen Komponenten, wurde außerdem die gesamte Matrix untersucht.

Für die Vorversuche mit dem Beckmann Coulter Durchflusszytometer Epics-XL MCL kam ein Cy3 gelabeltes Streptavidin zum Einsatz. Die folgende Tabelle 5 gibt einen Überblick zu den Experimenten. Die Färbungen der HKB-11 Zellen erfolgten nach den detaillierten Beschreibungen im Anhang.

Wichtig waren zunächst die Feststellung der Hintergrundfluoreszenz (1) und anschließend die Ermittlung eventueller unspezifischer Bindungen des Streptavidins an der Zelloberfläche (2). Beide zeigten nur eine schwache Fluoreszenzintensitäten und somit können die unspezifischen Bindungen vernachlässigt werden. Die Experimente 3 bis 5 zeigten deutliche Intensitätssteigerungen, anhand dieser davon ausgegangen werden kann, dass die

Bindungen des Biotins, des Avidins und des Protein A auch an der Zelloberfläche stattfinden.

Färbung	Erläuterung
1 Ungefärbte Zellen	Hintergrundfluoreszenzintensität
2 Zellen, Streptavidin Cy3	Unspezifische Bindung
3 Zellen, Biotin, Streptavidin Cy3	Bindung von Biotin
4 Zellen, Biotin, Avidin, Biotin, Streptavidin Cy3	Bindung von Avidin
5 Zellen, Biotin, Avidin, Protein A, Streptavidin Cy3	Bindung von Protein A

Tabelle 5: Vorversuche mit dem Durchflusszytometer zur Funktionalität der veränderten Affinitätsmatrixfärbung.

Exemplarisch ist in Abbildung 23 der Intensitätsunterschied der ungefärbten im Vergleich zu den gefärbten Zellen dargestellt.

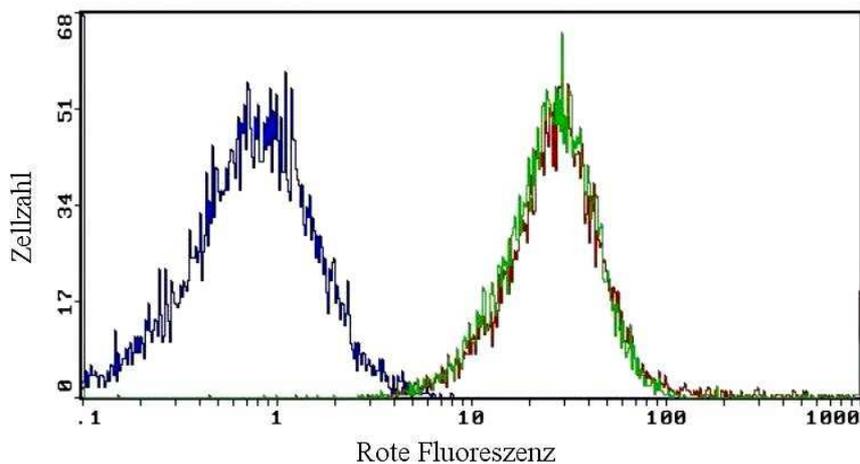


Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der Veränderung der Fluoreszenzintensität durch die Bindung der Komponenten Biotin, Avidin und Protein A an die Zelloberflächen.

Diese Vorversuche konnten den Nachweis der Wirksamkeit der ersten Färbestufen bis zum Protein A erbringen. Die Bindung des Fc-Fragments an das Protein A und die Markierung mit dem FITC gelabelten Antikörper muss nun in

einem weitem Schritt untersucht werden. Allerdings könnte eine möglicherweise geringe Fc - Fragmentsekretion der Zellen eventuell eine Färbung verhindern. Daher sind in einem zusätzlichen Experiment Fc - Fragmente in unterschiedlichen Konzentrationen hinzu gegeben worden (4). In Tabelle 6 ist eine Aufstellung der Analysen gezeigt.

	Färbung	Erläuterung
1	Ungefärbte Zellen	Hintergrundfluoreszenzintensität
2	Zellen, Antikörper FITC	Unspezifische Bindung
3	Zellen, Biotin, Avidin, Protein A, sekretiertes Fc-Fragment, Antikörper FITC	Vollständige Matrix
4	Zellen, Biotin, Avidin, Protein A, zugegebenes Fc-Fragment, Antikörper FITC	Vollständige Matrix plus zusätzlichen Fc-Fragmenten

Tabelle 6: Untersuchungen der vollständigen Matrix sowie zusätzlichen Analysen.

Überraschenderweise konnte bei der durchflusszytometrischen Analyse kein Fluoreszenzintensitätsunterschied zwischen der unspezifischen Färbung der Zelloberfläche mit dem FITC gelabelten Antikörper und der vollständigen Matrixfärbung ermittelt werden. Die Ergebnisse der vier durchflusszytometrischen Analysen sind in Abbildung 24 dargestellt. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Steigung der Fluoreszenzintensität der Färbungen 2 bis 4 nur schwach ausgeprägt ist. Zu erwarten gewesen wäre ein schwaches Intensitätssignal für die oberflächengefärbten Zellen (2), ein stärkeres für die Zellen mit sekretiertem Fc-Fragment (3) und eine weitere Steigerung des Signals durch die Zugabe von Fc-Fragment-Standard (4).

Diese Messergebnisse könnten bedeuten, dass die Bindung Protein A - Fc-Fragment - FITC gelabelter Antikörper nicht stattfindet. Vor allem die fast identischen Fluoreszenzintensitäten mit den nur oberflächengefärbten Zellen (2) weisen darauf hin, dass bei jeder Färbung (2-4) die Zellen möglicherweise nur

durch eine Bindung des FITC gelabelten Antikörpers an ihrer Zelloberfläche gefärbt wurden.

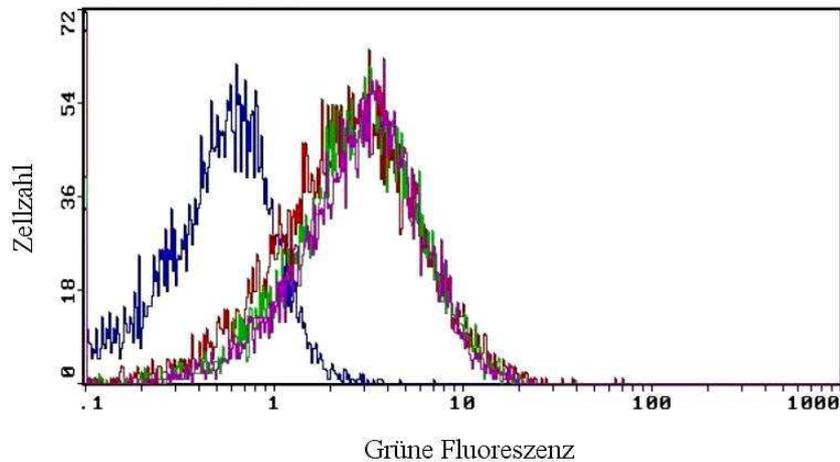


Abbildung 24: Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen 1 (blau) und 2 bis 4 (rot, grün, lila).

Da die HKB-11 Zellen von B-Lymphozyten abstammen, tragen sie wahrscheinlich Antikörper sowie Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. An beides könnte der FITC gelabelte Antikörper binden [163].

Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass entweder die Bindung zwischen Protein A und Fc-Fragment und/oder die Bindung zwischen Fc-Fragment und FITC gelabelten Antikörper nicht wie erwartet stattgefunden hat. Allerdings könnte möglicherweise auch schon die Bindung Biotin - Avidin nicht erfolgt ist und falsch positive Signale durch eine Bindung des Cy3 gelabelten Streptavidins an das Biotin an der Zelloberfläche entstanden sein (Abbildung 23). Diese Überlegung ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da die Avidin- Biotin Bindung zu den stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen gehört ($K_D = 1,3 \times 10^{-15}$) [164, 165].

Da die Bindung von Protein A - Fc-Fragment - FITC gelabelter Antikörper während der Untersuchung mittels Protein-Microarray als funktional eingestuft werden konnte, müsste die Ursache in der Zellfärbemethode liegen, die durch die Verwendung von beispielsweise kürzeren Einwirkzeiten und Medium anstellen von Puffer verändert wurde. Zudem sollten die Konzentrationen der eingesetzten Stoffe überprüft und gegebenenfalls erhöht werden. Beispielsweise könnte eine zu

geringe Avidinkonzentration dazu führen, dass die Matrix zwar vollständig aufgebaut wird, das Signal aber durch unspezifische Bindungen des FITC gelabelten Antikörpers an der Zelloberfläche überragt wird. Die Bindungen des FITC gelabelten Antikörpers an Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche könnte möglicherweise durch die Nutzung von Antikörpern einer anderen Spezies oder eines anderen Isotyps zu reduzieren oder zu verhindern sein [163].

4.1.4.3 *Fazit*

Eine Veränderung der Affinitätsmatrix, indem anstelle von biotinyliertem Antikörper biotinyliertes Protein A für die Anwendung auf HKB-11 Zellen verwendet wurde, zeigte zunächst bei der Funktionalitätsuntersuchung auch viel versprechende Ergebnisse. Die Färbung gelang erfolgreich auf Protein-*Microarrays* und sollte somit auch für die Färbung auf Zelloberflächen anwendbar sein. Allerdings ist die vollständige Bindung der Matrix auf HKB-11 Zellenoberflächen bisher nicht gelungen. Die Ursachen könnten zum einen in der unterschiedlichen Färbemethoden von Protein-*Microarrays* und Zellen liegen und zum anderen in zu geringen Konzentrationen einiger Inhaltsstoffe. Die Färbemethode entsprach zwar der in der Literatur beschriebenen Affinitätsmatrixmethode, doch ist sie bisher noch nicht bei einer HBK Zelllinie angewendet worden. Die Oberfläche der Zellen könnte eventuell die Bindung von Avidin an das Biotin erschweren. Eine weitere Möglichkeit ist eine Konformationsänderung des Protein As an der Zelloberfläche und dadurch eine verhinderte Bindung des Fc-Fragments. Eine weitere Erklärung könnte die Bindung des FITC gelabelten Antikörpers an Fc-Rezeptoren der HKB-11 Zellmembran sein [163]. Der Einsatz einer anderen Spezies oder Isotyps des Antikörpers könnte eine Reduzierung der unspezifischen Bindungen bewirken. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, auf F(ab)₂-Fragmente zurückzugreifen, da hier der für die Bindung am Fc-Rezeptor verantwortliche Fc-Teil fehlt. Alternativ kann versucht werden, durch Zugabe eines hohen Überschusses von unspezifischen, nichtmarkierten Immunglobulinen derselben Spezies die Fc-Rezeptoren zu blockieren. Eine andere Erklärung könnte eine zu geringe

Konzentration einiger Matrixbestandteile sein. Geringe Konzentrationen einiger Inhaltsstoffe der Matrix könnten zwar trotzdem einen Aufbau der Matrix an der Zelloberfläche bewirken, aber das Fluoreszenzsignal ist dann möglicherweise von dem der unspezifischen Bindungen überdeckt worden. Somit ist auch die Konzentration ein wichtiger Punkt an dem eine mögliche Optimierung der veränderten Affinitätsmatrix ansetzen könnte.

4.2 Optimierung von Bioprozessen

Die Kenntnis über den Zustand der Kultivierung, die Konzentration der Hauptenergielieferanten (Glutamin, Glukose), der Metabolite und des gebildeten Produktes, ist während der Produktion pharmazeutischer Proteine essentiell. Stoffwechselmetabolite, wie Laktat und Ammonium, reichern sich im Laufe der Kultivierung an und können in höheren Konzentrationen die Zellproliferation und Produktivität einschränken [166, 167]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Anwendung zweier unterschiedlicher Sensoren am Beispiel verschiedener Zelllinien getestet, um eine Verbesserung der online Kontrolle von Zellkulturprozessen zu ermöglichen. Durch die Anwendung des BioView®-Sensors könnte das Wissen über den Zustand des Prozesses online zur Verfügung stellen und beispielsweise ein schnelleres Eingreifen bei Problemen oder die Entwicklung einer optimalen Zufütterungsstrategie möglich machen. Die online gemessene Sauerstoffaufnahme mit einem neu entwickelten insitu OUR Sensors könnte zusätzliche Erkenntnisse über den Zellmetabolismus und Verstoffwechslung von Substraten liefern.

4.2.1 Einsatz des BioView®-Sensors für Zellkulturprozesse

Im ersten Teil dieses Kapitels wurde die Fluoreszenz der Zellsuspension während einiger *Batch*-Kultivierungen der Zelllinie IV F 19.23 mit dem BioView® vermessen. Nach einer chemometrischen Auswertung der Daten wurden die erstellten Modelle zur Vorhersage offline gemessener Prozessgrößen einer weiteren Kultivierung eingesetzt. In weiterführenden Untersuchungen wurde der Einsatz der 2D-Fluoreszenzspektroskopie für die verschiedenen Prozessgrößen auch im *Fed-Batch*- und Perfusionsbetrieb untersucht.

4.2.1.1 *Chemometrische Auswertung von 2D-Fluoreszenzspektren*

Mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist es möglich, simultan eine Vielzahl von Prozessgrößen zu detektieren. Die Messung der intrinsischen Fluorophore gibt Auskunft über den Zellzustand. Es ist aber auch möglich, aus den Fluoreszenzspektren latente Informationen zu gewinnen bzw. Prozessparameter zu bestimmen, die zunächst nicht mit der Fluoreszenz in Verbindung stehen, wie z.B. Substrat- und Produktkonzentrationen.

Ein 2D-Spektrum liefert eine Datenmatrix aus Emission, Exzitation und Intensität mit 150 Wellenlängenkombinationen (WLKs). Eine lineare Abhängigkeit zwischen Prozessparameter und Fluoreszenz ist aufgrund der vielfältigen biologischen, chemischen und physikalischen Wechselwirkungen bei Bioprozessen meist nicht gegeben. Vielmehr beeinflussen und überlagern sich Fluoreszenzen in benachbarten Bereichen des Spektrums und schaffen so gegenseitige Abhängigkeiten (Kolinearität) [168]. Bei der Auswertung sollten daher Methoden angewendet werden, die den Informationsgehalt des gesamten Spektrums berücksichtigen und die Datenmengen gleichzeitig komprimieren.

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) ist eine solche Methode [169]. Bei der PCA erfolgt eine lineare Transformation der Variablen, so dass möglichst wenige neue Variablen die relevante Information beschreiben. Das Maß für die Relevanz ist hierbei die Varianz. Zunächst werden die untersuchten Daten in einer Matrix angeordnet. Jede Zeile dieser Matrix enthält ein Spektrum und jede Spalte die Fluoreszenzintensitäten einer WLK. Diese Anordnung ist in Abbildung 25 dargestellt. Anschließend wird eine Hauptachsentransformation durchgeführt, dabei werden die n Messungen und p Wellenlängenkombinationen als Punktwolke in einem p -dimensionalen kartesischen Koordinatensystem aufgetragen. Die Transformation erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird der Ursprung des Koordinatensystems in den Schwerpunkt der Punktwolke gesetzt, d.h. die Daten werden zentriert.

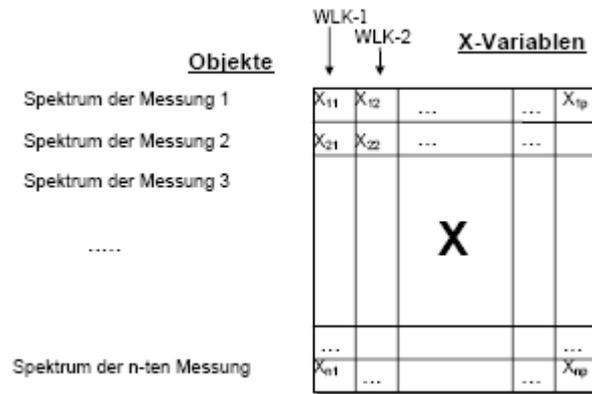


Abbildung 25: Datenmatrix der aufgenommenen 2D-Fluoreszenzspektren [170].

Im zweiten Schritt wird das Koordinatensystem so gedreht, dass die erste Koordinate die maximale Varianz der Daten beschreibt. Dies legt die erste Hauptachse fest und die Koordinate in dieser Richtung ist die erste Hauptkomponente. Die folgenden Hauptkomponenten werden aus der verbleibenden maximierten Varianz berechnet. Somit gibt es für die p -dimensionalen Daten maximal p Achsen bzw. Hauptkomponenten, die linear unabhängig voneinander sind [170, 171]. Abbildung 26 stellt beispielhaft die Lage der ersten und zweiten Hauptkomponente nach der Zentrierung dar.

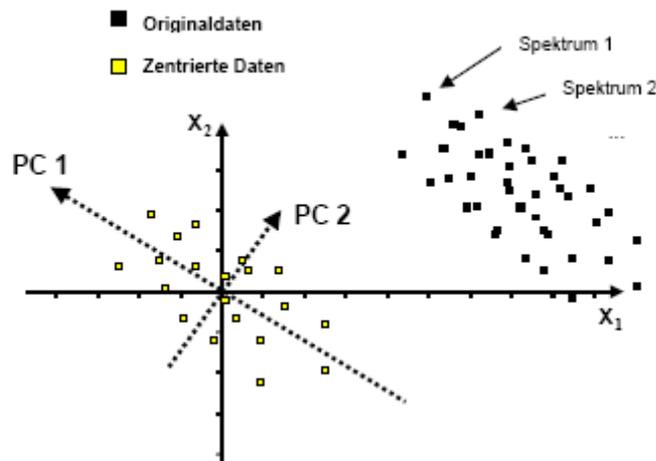


Abbildung 26: Lage der ersten und zweiten Hauptkomponente nach der Zentrierung der Fluoreszenzdaten [170].

Durch diese Transformation werden die relevanten Dateninhalte z. B. von Rauschen getrennt, da dieses keine Vorzugsrichtung im Raum aufweist. Meist genügen 3 bis 4 Hauptkomponenten, um einen Großteil der Varianz zu beschreiben. Die Reduktion der Variablenzahl führt somit zu einer einfacheren Übersicht der Daten und des zwischen ihnen bestehenden Zusammenhangs.

Diese aus der Hauptkomponentenanalyse gewonnenen Daten sollen der Modellierung von Prozessgrößen dienen. Somit müssen die Informationen aus den Spektren mit den entsprechenden offline Daten in Beziehung gesetzt werden, um Kalibrationsmodelle zu erstellen. Als Methode bietet sich hier unter anderem die PLS-Regression (*partial least square regression*) an [172]. Dabei werden abhängige Y-Variablen in die Komprimierung der X-Variablen mit einbezogen. Auf diese Weise werden die Einflüsse der X-Variablen minimiert, welche zwar eine große Varianz besitzen, aber irrelevant hinsichtlich des Kalibrationsmodells sind. Eine genauere Beschreibung der Berechnung ist der Dissertation von Kirsten Hantelmann (2005) zu entnehmen [170]. Mit Hilfe der PLS-Regression erhält man ein Modell, das es erlaubt, aus den X-Variablen (Spektren) (Scores = unabhängige X-Variablen (X_{cal})) die Y-Variablen (Y_{val}) zu berechnen, nachdem eine Kalibration mit den bestehenden Y-Variablen (abhängige Y-Variablen (Y_{cal})) durchgeführt wurde. Dies ist in Abbildung 27 schematisch dargestellt.

$$X_{\text{cal}} + Y_{\text{cal}} = \text{Modell}$$

(a)

$$X_{\text{val}} + \text{Modell} = Y_{\text{val}}$$

(b)

Abbildung 27: Schematische Darstellung der Modellbildung und Validierung. (a) Modellbildung (b) Berechnung unbekannter Y_{val} -Daten bei Anwendung des PLS-Modells.

Man unterscheidet bei der PLS-Regression zwischen PLS1 und PLS2. bei der PLS-Regression wird nur eine Y-Variable (d.h. eine Prozessgröße) für das Modell herangezogen, während bei der PLS2-Regression mehrere Variablen gleichzeitig berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass der Fehler bei PLS2 Modellen größer ist. Für alle Modellberechnungen in dieser Arbeit wurde die PLS1 Methode angewendet.

Fehlerbetrachtung der Modelle

Die Qualität eines Modells kann über verschiedene Validierungsstrategien überprüft werden. Diese Überprüfung ist notwendig, da es zu einer Überanpassung (*overfitting*) kommen kann, da mit jeder zusätzlichen Hauptkomponente der Fehler der Kalibration zwar sinkt, aber der Fehler der Validierung und damit der Fehler der Vorhersage nach Erreichen der optimalen Anzahl an PCs wieder ansteigt.

Die Fehlerbetrachtung kann über eine Kreuzvalidierung der Daten durchgeführt werden. Hierbei wird ein Großteil der Daten (beispielsweise 7 von 8 Kultivierungsdatensätzen) zur Modellbildung eingesetzt. Die offline Daten des nicht berücksichtigten Datensatzes werden anschließend mit Hilfe des Modells vorhergesagt. Die Fehlerberechnung erfolgt dann zwischen den offline gemessenen und den vorhergesagten Werten als RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*) gemäß Gleichung 5.

$$RMSEP[\%] = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (p_i - m_i)^2}{N}} \cdot \frac{100}{\max(m_i)} \quad (5)$$

N = Anzahl Messwerte

i = Laufindex

p_i = Vorhersage aus Spektren

m_i = Messwerte

$\max(m_i)$ = Maximalwerte der Messreihe

Der Fehler wird zur besseren Vergleichbarkeit in einen prozentualen Wert umgerechnet. Zur Durchführung der Modellbildung und ihrer Validierung wird die Software „The Unscrambler“ eingesetzt.

4.2.1.2 Voruntersuchung im Batch-Modus

Die Überprüfung der Methodik der online Überwachung von Zellkulturprozessen unter Anwendung des BioView®-Sensors erfolgte anhand der Kultivierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23 im *Batch*-Modus. Der *Batch*-Kultivierungsmodus ist auf Grund seiner Simplizität und einer daher angenommenen ebenfalls einfachen Vorhersagbarkeit für diese Voruntersuchungen ausgewählt worden. In einem ersten Schritt wurden fünf *Batch*-Kultivierungen durchgeführt. Vier dieser Kultivierungen wurden für die Bildung von PLS1-Modellen herangezogen während die fünfte mit Hilfe der erstellten Modelle vorhergesagt wurde. Eine Aussage über die Güte der Vorhersage konnte durch Berechnung des RMSEP getroffen werden.

Kultivierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23

Für die insgesamt fünf Bioreaktorkultivierungen der Hybridomzelllinie IV F 19.23 ist ein 400 ml Edelstahlreaktor (Arbeitsvolumen 375 ml) (Eigenbau der TCI Werkstatt) genutzt worden. Tabelle 7 gibt einen Überblick zu den Kultivierungsbedingungen der IV F 19.23 Zellen.

Parameter	Soll-Wert
pH	7,0
Temperatur	37°C
Sauerstoffkonz. (pO ₂)	50 %
Rührerdrehzahl	80 bis 200 m ⁻¹

Tabelle 7: Kultivierungsbedingungen für die Hybridomzelllinie IV F 19.23.

Während der Bioreaktorkultivierung sind 2- bis 3-mal täglich Proben für die offline Bestimmung verschiedener Prozessgrößen, wie Zellzahl und Vitalität sowie die Konzentrationen von Glukose, Laktat, Antikörpern und verschiedenen Aminosäuren, entnommen. Die Aufnahme der 2D-Fluoreszenzspektren mit dem BioView®-Sensor erfolgte im 15-min Takt. Die weiteren Einstellungen des

BioView®-Sensors während der Kultivierung sind im Anhang in Kapitel 6.1.7.1 zu finden. Abbildung 28 gibt einen Überblick über den Verlauf der Kultivierungen und der offline bestimmten Parameter.

Die IV F 19.23 Zellen zeigten während der Bioreaktorkultivierungen 3 bis 5 im *Batch*-Modus ähnliche Zellproliferations-, Substratverbrauchs- und Produktbildungsraten. Die Kultivierung 1 wurde erst ab Stunde 70 aufgezeichnet und in Kultivierung 2 konnte kaum Zellwachstum beobachtet werden, wahrscheinlich auf Grund einer zu hohen Rührgeschwindigkeit. Für die Kultivierungen 3 bis 5 ist diese demzufolge von 200 auf 80 min⁻¹ reduziert worden.

Die unterschiedlichen Glutaminkonzentrationen zu Beginn der Kultivierungen (vgl. 3 und 4 mit Kultivierung 5) könnten mit einer zeitlich längeren Lagerung des Mediums zusammen hängen [160]. Den Einfluss, den dieser zeitige Glutaminmangel auf den Verlauf der Kultivierung hat, ist deutlich an einer verringerten maximalen Zellzahl zu erkennen. Wie in Kapitel 4.1.1.1 ausführlich beschrieben, ist Glutamin bei kontinuierlich wachsenden Zelllinien der wichtigste Energielieferant.

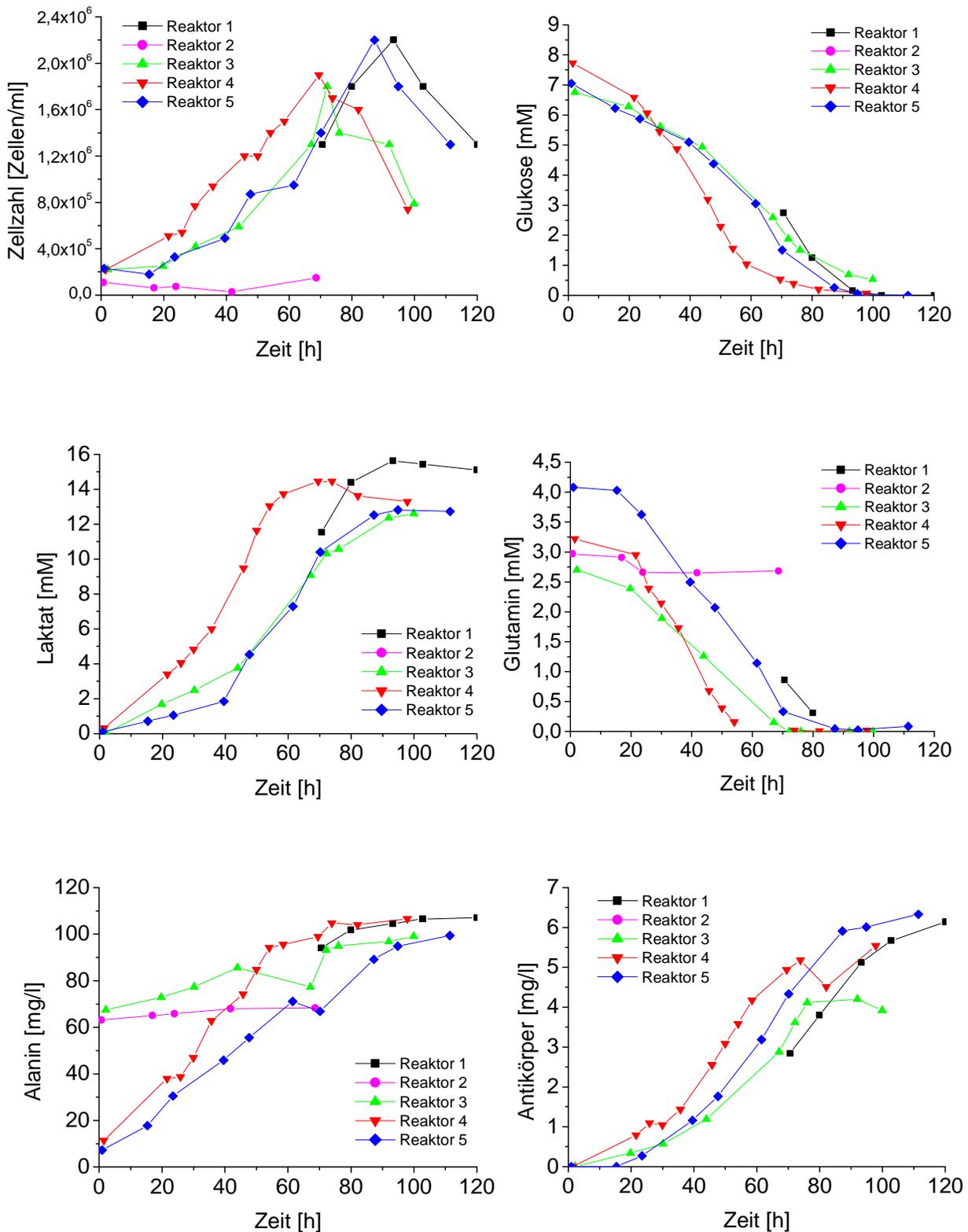


Abbildung 28: Verläufe der offline bestimmten Parameter Zellzahl, Glukose-, Laktat-, Antikörperkonzentration und die Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin und Alanin während der Bioreaktorkultivierungen der IV F 19.23 Zelllinie.

Voruntersuchungen der Modellbildung und Vorhersage

Für eine optimale Modellbildung und die anschließende Vorhersage relevanter Prozessgrößen einer Bioreaktorkultivierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23 musste die bestmögliche Datenzusammensetzung gefunden werden. Ferner waren die geeigneten Einstellungen des Softwareprogramms „The Unscrambler“ zu überprüfen. Dies erforderte infolgedessen einige Voruntersuchungen der PLS1-Modelle und Vorhersagen, welche mittels des prozentualen RMSEPs hinsichtlich ihrer Güte überprüft wurden. Als zu bestimmende Größe ist die Zellzahl auf Grund ihrer zentralen Rolle in Zellkulturprozessen gewählt worden. Die verwendeten Fluoreszenzintensitäten der BioView®-Messungen ergeben sich aus dem Mittelwert von drei Messungen. Die detaillierte Darstellung der Untersuchung ist im Anhang in Kapitel 6.1.9.1 zu finden.

Als Ergebnis aus diesen Untersuchungen kann festgehalten werden, dass für die Modellerstellungen normierte Fluoreszenzintensitäten verwendet werden sollten. Ferner ist eine breite Datengrundlage essentiell. Dies bezieht sich nicht nur auf die Anzahl der Kultivierungen und deren offline Analysenergebnisse, sondern ebenfalls auf die Berücksichtigung weiterer online Messgrößen wie pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur. Für die beispielhaft dargelegten Vorhersagen der weiteren offline Prozessgrößen der Hybridomzellkultivierungen wird die Bioreaktorkultivierung 5 als Vergleich herangezogen und daher auch die Mediumfluoreszenzintensitäten nicht abgezogen.

Modellbildung und Vorhersage der Hybridomzelllinie IV F 19.23

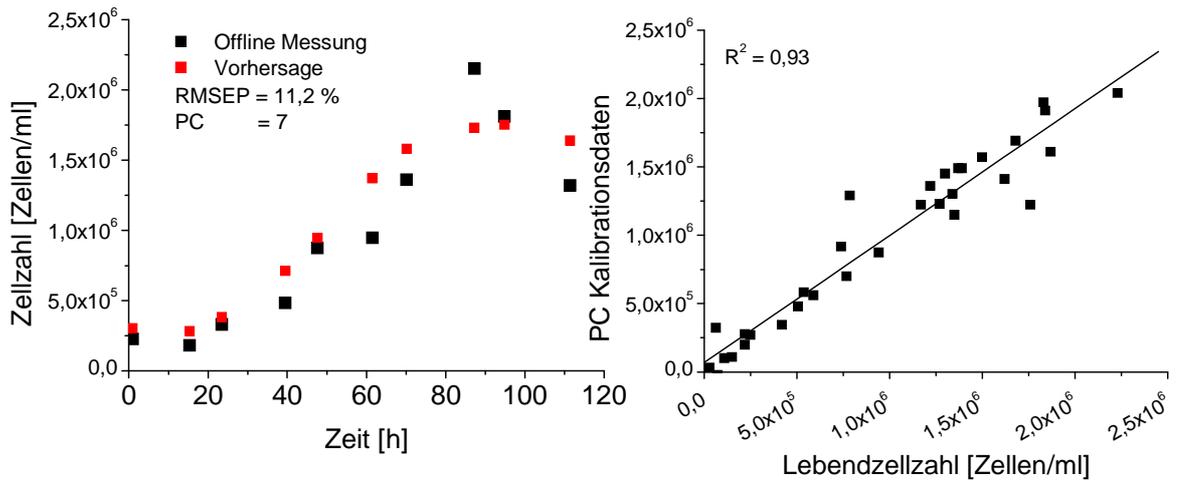
Nachfolgend sind die Verläufe der offline gewonnen Prozessgrößen mittels PLS1-Regression aus den gewonnenen Fluoreszenzspektren der Kultivierung 5 bestimmt worden. Die Modellbildung erfolgte für jede offline gemessene Prozessgröße aus den Daten der *Batch*-Kultivierungen 1 bis 4. Anschließend ist eine Validierung der Modelle durch die Vorhersage einzelner Prozessgrößen und einem Vergleich mit den offline gemessenen Größen der *Batch*-Kultivierung 5 durchgeführt worden. Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen die Auftragungen der offline gemessenen und der vorhergesagten Parameter. In der linken Graphik

ist stets der zeitliche Verlauf unter Angabe des RMSEP's in Prozent (mittlerer Fehler) und die Anzahl der verwendeten Hauptkomponenten dargestellt. In der rechten Graphik ist die Kalibration der in die Modellbildung eingegangenen Daten mit den gemessenen und den mit dem Modell vorhergesagten Daten mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben.

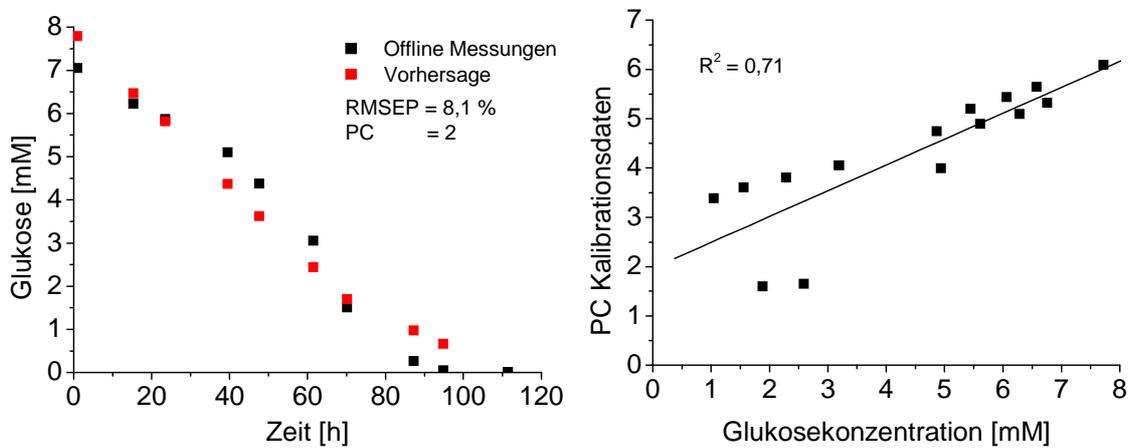
Die beste Korrelation zwischen gemessenen und vorhergesagten Prozessgrößen ist für die Glukose- und Laktatkonzentrationen festzustellen (Abbildung 29). Die RMSEP's liegen bei 8,1 bzw. 5,7 %. Die Beziehung zwischen gemessenen und berechneter Laktatkonzentration weist ein hervorragendes Bestimmtheitsmaß von 0,99 auf. Allerdings liegt das Bestimmtheitsmaß für Glukose nur bei 0,71 dies weist eigentlich auf eine schlechte Vorhersagbarkeit des Parameters hin. Die geringe Anzahl der für die Modelle verwendeten PCs kennzeichnet eine einfache Korrelation zu den Fluoreszenzdaten. Der Verlauf der Konzentrationen konnte eindeutig vorhergesagt werden, mit Ausnahme des letzten Laktatwertes, bei dem der Abfall der Laktatkonzentration nicht korrekt wieder gegeben wurde. Der relative Fehler der offline Messung für die Glukose- und Laktatkonzentrationsbestimmung liegt bei 3 - 4 %. Die Berechnung des Fehlers erfolgte aus den Mittelwerten der relativen Fehler jeder einzelnen Messung während der 5. *Batch*-Kultivierung. Folglich ist der RMSEP der Vorhersage nur geringfügig höher als der Fehler der offline Messungen.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl mit Hilfe eines Modells zeigt eine gute Übereinstimmung zu den offline Daten. Allerdings weichen einige offline Zellzählungen deutlich von der Vorhersage ab. Der Fehler der Vorhersage mit 11,2 % und das Bestimmtheitsmaß von 0,93 stellen dies dar. Allerdings muss auch hier der relative Fehler der offline Messung berücksichtigt werden, der mit 11,2 % genauso hoch ist wie der Fehler der Vorhersage. Infolgedessen kann auch für die Lebendzellzahl von einer guten Vorhersage gesprochen werden, da diese üblicher Weise nicht besser sein kann als die vorherzusagenden offline Parameter. Gleichwohl verlangt die Vorhersage der Lebendzellzahl ein komplexeres Modell, was sich in der Verwendung von sieben Hauptkomponenten darstellt.

Lebendzellzahl



Glukosekonzentration



Laktatkonzentration

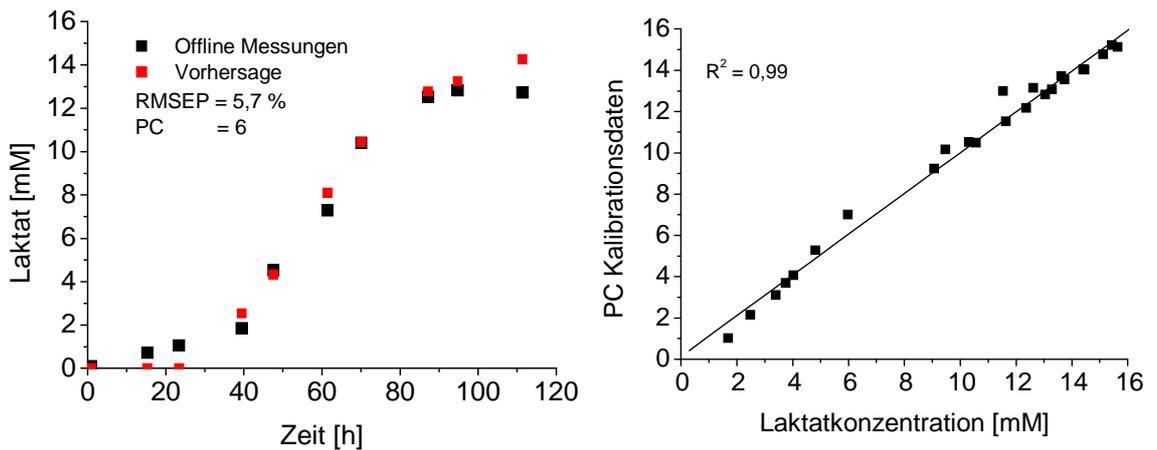
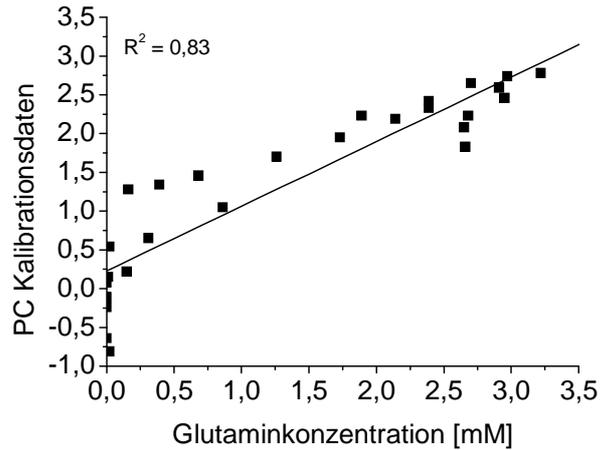
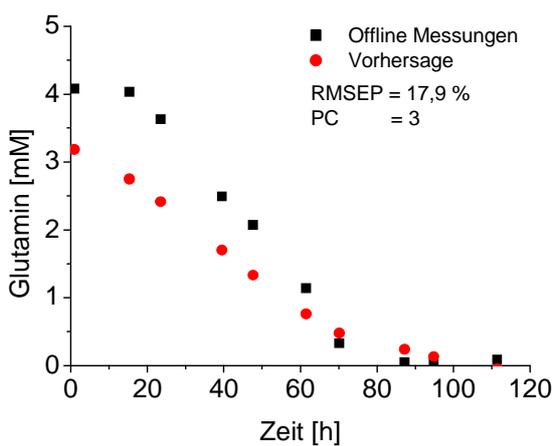
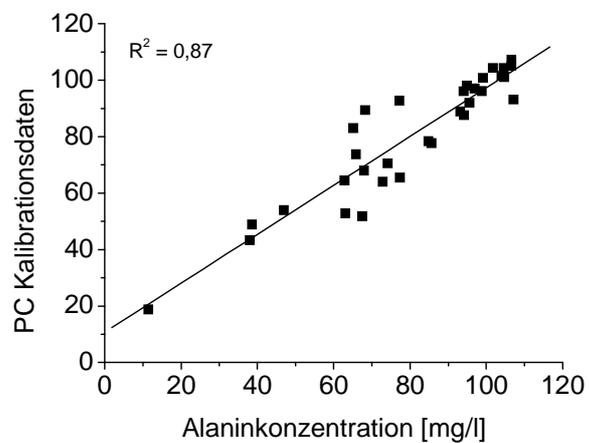
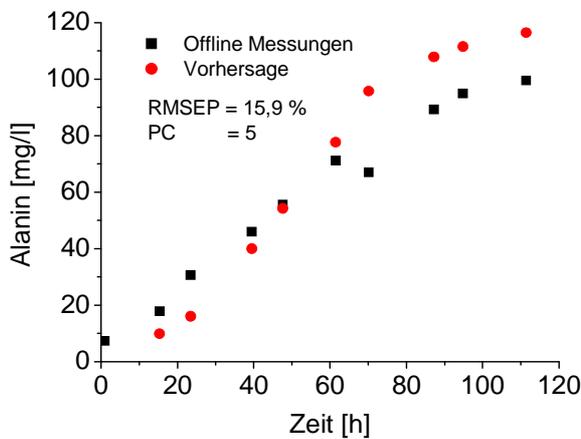


Abbildung 29: Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der offline ermittelten Prozessgrößen Lebendzellzahl, Glukose- und Laktatkonzentration gegenüber der vorhergesagten am Beispiel der Kultivierung 5. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP) und die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten Hauptkomponenten (PCs) sind ebenfalls angegeben. Rechts: Auftragung der offline Prozessgrößen gegen die PC Kalibrationsdaten unter Angabe des Bestimmtheitsmaßes.

Glutaminkonzentration



Alaninkonzentration



Antikörperkonzentration

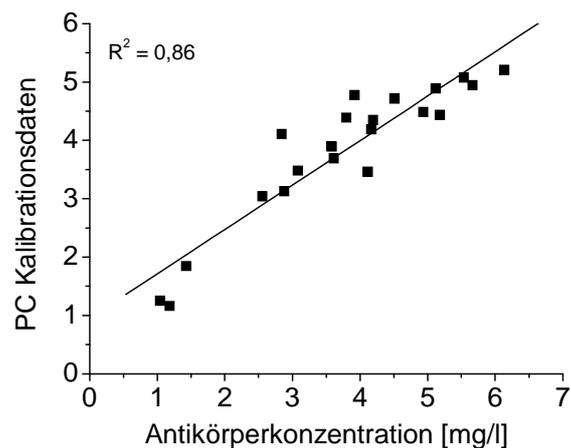
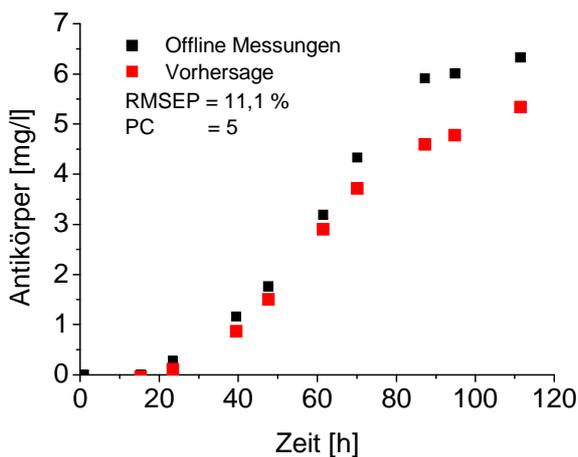


Abbildung 30: Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der offline ermittelten Prozessgrößen Glutamin-, Alanin- und Antikörperkonzentrationen gegenüber der vorhergesagten am Beispiel der Kultivierung 5. Der Fehler der Vorhersage (RMSEP) und die Anzahl der für die Modellbildung verwendeten Hauptkomponenten (PCs) sind ebenfalls angegeben. Rechts: Auftragung der offline Prozessgrößen gegen die PC Kalibrationsdaten unter Angabe des Bestimmtheitsmaßes.

Die Vorhersagen für die Prozessgrößen Glutamin-, Alanin- und Antikörperkonzentration zeigen offensichtliche Schwächen, wobei die Antikörperkonzentration mit einem Fehler der Vorhersage von 11,1 % noch am Besten wiedergegeben wird. Die Trends aller drei Konzentrationsverläufe sind zwar wieder zu finden, allerdings driften sie entweder zu Beginn (Glutamin) oder zum Ende hin stark auseinander. Dies könnte mit einer nicht ausreichenden Datengrundlage zusammenhängen. Beispielsweise ist die Glutaminkonzentration zu Beginn der Kultivierung 5 höher als bei den Kultivierungen, die in das Modell eingeflossen sind. Dies könnte der Grund für die schlechte Korrelation der Glutaminkonzentration am Anfang der Kultivierung sein. Das gleiche gilt für die Antikörper- und Alaninkonzentrationen, bei denen die Endkonzentrationen höher liegen als bei den Modellkultivierungen (Vergleiche Abbildung 28). Die Probleme in der Vorhersage der Prozessgrößen sollten durch eine bessere Datengrundlage zu verhindern sein.

Fazit

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Erstellung von PLS1-Modellen aus 2D-Fluoreszenzspektren und damit die Vorhersage wichtiger Prozessgrößen bei *Batch*-Kultivierungen von Hybridomzellen möglich sind. Prozessgrößen wie Glukose und Laktat konnten in hoher Genauigkeit vorhergesagt werden. Die Lebendzellichte wies auf Grund ihres hohen offline Messfehlers einen größeren Fehler der Vorhersage auf, der allerdings in der gleichen Größenordnung lag. Damit könnte durch eine genauere bzw. häufigere Zellzählung wahrscheinlich eine Verbesserung erreicht werden. Für eine gute Vorhersage der Prozessgrößen Glutamin-, Alanin- und Antikörperkonzentration ist eine breitere Datengrundlage nötig. Allerdings zeigt die Vorhersage in Bereichen mit guter Datengrundlage auch eine sehr gute Korrelation, was darauf hindeutet, dass dies auch in den anderen Konzentrationsbereichen möglich wäre.

Insofern konnte in dieser ersten Untersuchung gezeigt werden, dass die 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Vorhersage verschiedener Prozessgrößen in der Zellkultur sehr gut geeignet ist. Unter Berücksichtigung einer breiteren

Datengrundlage und einer genaueren Zellzählung sollte diese Methode auch für kompliziertere Kultivierungsmodi wie *Fed-Batch* oder Perfusion anwendbar sein.

4.2.1.3 Anwendung des BioView®-Sensors bei *Fed-Batch*-Kultivierungen

Die online Bestimmung von Prozessgrößen unter Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie sollte nach einem erfolgreichen Einsatz bei Kultivierungen im *Batch*-Modus im folgendem auch für den *Fed-Batch*-Betrieb untersucht werden. Der *Fed-Batch*-Prozess ist der in der Industrie am häufigsten für die Produktion von Biopharmazeutika mit Säugetierzellen genutzte Prozess [173]. Somit ist die Untersuchung der Anwendbarkeit des BioView®-Sensors für die Vorhersage von Prozessgrößen für diese Kultivierungsart außerordentlich interessant. Dieser Modus könnte allerdings die Entwicklung von chemometrischen Modellen erschweren, da bei einem solchen Kultivierungsbetriebs verschiedene Zusätze hinzu gegeben werden, die neben der Kulturfluoreszenz auch den Zellmetabolismus beeinflussen.

Als Datengrundlage für diese Untersuchung dienten vier *Fed-Batch*-Kultivierung einer Antikörper produzierenden CHO-Zelllinie, deren Daten von der Firma Roche Diagnostics GmbH freundlicher Weise zur Verfügung gestellt wurden.

Kultivierung der CHO-Zellen im *Fed-Batch*-Modus

Die *Fed-Batch*-Kultivierungen sind in einem Edelstahl Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 10 l durchgeführt worden. Die Animpfzellichte des Bioreaktors lag zwischen 0,6 bis 0,8 × 10⁶ Zellen/ml. Die Sauerstoffkonzentration wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg auf einen Wert von etwa 30 % konstant gehalten, wohingegen sich der Parameter pH im Laufe der Kultivierung veränderte. Der pH-Wert lag zu Beginn der Kultivierung bei einem Wert von 7,2, fiel dann auf bis zu 6,9 ab und stieg im Zuge der Zufütterung bis zum Ende wiederum auf 7,2 an. Des Weiteren wurde am vierten Tag ein weiterer physikalischer Parameter verändert. Die Veränderung dieser Parameter im

Verlauf der Kultivierung könnten sich, zusätzlich zur Zufütterung, negativ auf die PLS1-Modellbildung und somit auf die Vorhersage der einzelnen Prozessgrößen auswirken. Beide physikalischen Parameter beeinflussen die Fluoreszenz im Bioreaktor. Während der Kultivierungen wurde die Temperatur, der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration online und die Lebendzellzahl, Glukose-, Laktat-, Produkt-, Ammonium- und LDH (Laktatdehydrogenase)-Konzentration ein- bis zweimal täglich offline 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. Online 2D-Fluoreszenzmessungen mit dem BioView[®]-Sensor erfolgten alle 15 Minuten. Eine detaillierten Angabe über die Einstellungen des BioView[®]-Sensors sind im Anhang Kapitel 6.1.7.1 zu finden.

Die Verläufe einer Auswahl offline gemessener Prozessgrößen aller vier Kultivierungen ist in Abbildung 31 zusammengestellt. Die Verläufe der Lebendzellzahlen während der vier Kultivierung unterscheiden sich gravierend. Nur die Bioreaktorläufe 17 und 19 verlaufen ähnlich, 18 und 16 zeigen Abweichungen von bis zu 40 %. Die anderen offline gemessenen Größen wie Glukose-, Laktat-, Produkt- oder LDH-Konzentration zeigen unabhängig von den sehr heterogenen Lebendzellzahlen sehr ähnliche Verläufe. Die nahezu parallel verlaufenden Produktkonzentrationsverläufe könnten die Modellbildung und anschließende Vorhersage möglicherweise erleichtern. Bis auf ein paar wenige abweichende Werte sind auch die LDH-Konzentrationen während der vier Kultivierungen nahezu identisch. Schwierigkeiten sind bei der Bestimmung der Glukose zu erwarten, da deren Konzentration auf Grund der Zufütterung zwischen Stunde 50 und 100 ansteigt und zwischen den Kultivierungen wiederum unterschiedlich verlief. Eine genauere Analyse der Kultivierungsverläufe wird an dieser Stelle nicht vorgenommen, da der Schwerpunkt der Untersuchung auf der Modellbildung lag.

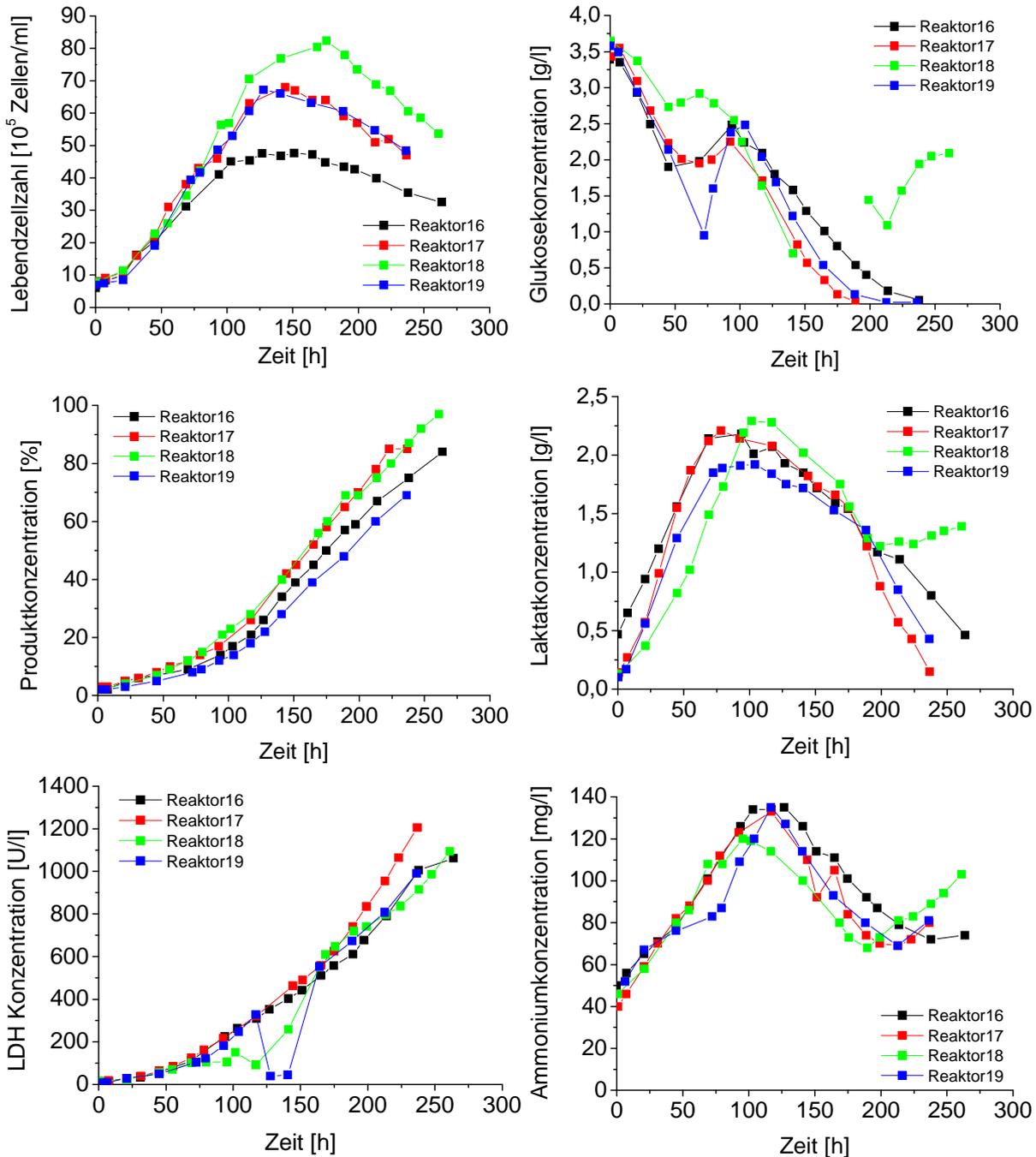


Abbildung 31: Darstellung der offline bestimmten Daten ausgewählter Prozessgrößen der vier bei Roche durchgeführten *Fed-Batch*-Kultivierungen (Bioreaktorlauf 16 bis 19).

Modellbildung und Vorhersage der CHO-Kultivierungen

Die multivariate Datenanalyse mit PLS1-Modellbildung und anschließender Vorhersage für die offline gemessenen Prozessgrößen ist wiederum mit der Software „The Unscrambler“ durchgeführt worden. Da die Einstellungen der Verstärkung am BioView[®]-Sensor („gain“) jeweils nur für Kultivierung 16 und 19

sowie 17 und 18 übereinstimmten (siehe Anhang), musste zunächst eine Umrechnung der Fluoreszenzdaten mit der folgenden Formel durchgeführt werden:

$$y_{jk} = \frac{Y_{jk} - Y_{offset}}{S_{jk} \left(\frac{G_{jk}}{1000} \right)^{\beta_0 + \beta_1 \frac{G_{jk}}{1000}}} \quad (6)$$

- y_{jk} = Neu berechnete Fluoreszenzintensität
 Y_{jk} = Gemessene Fluoreszenzintensität
 Y_{offset} = Offset-Wert der Fluoreszenzintensität
 S_{jk} = Amplifier Sensivität („high“)
 G_{jk} = Umzurechnende Verstärkung
 β_0 und β_1 = Koeffizienten aus ini-Datei

Trotz Änderungen von physikalischen Parametern im Laufe der Kultivierungen sind diese Angaben nicht mit in die Modellbildung eingeflossen, da in Voruntersuchungen kaum Unterschiede festgestellt wurden. Zudem sind die Spektren im Gegensatz zu den Untersuchungen der *Batch*-Kultivierungen nicht skaliert worden. Voruntersuchungen hatten auch hier keine größeren Unterschiede der RMSEPs gezeigt.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Kultivierungen und zur genaueren Beurteilung der Güte der Vorhersagen wurden für die relevanten Prozessgrößen aller vier Kultivierungen Modelle erstellt und jeweils der RMSEP aus den Vorhersagen berechnet. In Tabelle 8 sind diese dargestellt. In der unteren Zeile sind der mittlere Fehler der jeweiligen Prozessgröße und in der rechten Zeile der mittlere Fehler über alle Prozessgrößen der einzelnen Kultivierungen angegeben.

Reaktor- lauf	Lebend- zellzahl	LDH	Produkt	Glukose	Laktat	NH ₄	Mittlerer Fehler
16	9,8	9,7	13,2	11,6	24,6	23,1	12,5
17	7,8	8,2	4,2	8,5	21,9	11,5	10,8
18	16,8	11,1	10,2	27,5	26,7	15,6	13,7
19	6,1	14,8	14,6	16,0	36,3	45,0	32,5
MF	10,1	11,0	10,6	15,9	27,4	23,8	

Tabelle 8: Modellbildung aus je 3 der 4 *Fed-Batch*-Kultivierungen und Vorhersage der jeweils 4. Kultivierung ohne Einbeziehung von physikalischen Parametern. Der Fehler der Vorhersage ist als RMSEP angegeben (MF = Mittlerer Fehler).

Zunächst fällt die Heterogenität in der Güte der Vorhersage der Lebendzellzahl, LDH-, Produkt- und Glukosekonzentrationen auf. Beispielsweise schwankt der Fehler der Vorhersage der Lebendzellzahl zwischen 6,1 und 16,8 %. Bis auf Kultivierung 18 ließ sich die Zellzahl sehr gut vorhersagen mit RMSEPs von unter 10 %. Wie erwartet ist eine Verbesserung gegenüber den *Batch*-Kultivierungen eingetreten, da hier anstelle der manuellen Zellzählung mit einer Neubauerzählkammer ein automatisiertes Zellzählgerät (CEDEX) zum Einsatz kam. Der offline Messfehler der CEDEX-Messung liegt bei 5 % und folglich können die RMSEPs nicht unter diesem Wert liegen. Die Informationen, die für eine akzeptable Vorhersage der Prozessgrößen Laktat und Ammonium notwendig wäre, sind in den Fluoreszenzdaten scheinbar nicht enthalten, was an sehr hohen Fehlern der Vorhersage festzustellen ist. Es ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass die Güte der Vorhersage mit davon abhängt welche Kultivierungen in die Modellbildung eingegangen sind. Dies bedeutet, dass die Qualität der Korrelation der Fluoreszenzdaten zu den offline detektierten Prozessgrößen abhängig ist von den Daten, die in die Modellbildung einfließen. Die insgesamt am Besten vorhersagbare Kultivierung ist Bioreaktorlauf 17 mit einem durchschnittlichen RMSEP von 10,8 %. Kultivierung ist in Abbildung 32 zur besseren Einschätzung der Qualität der Vorhersage im Vergleich der offline Prozessgrößen mit den Vorhersagen graphisch dargestellt.

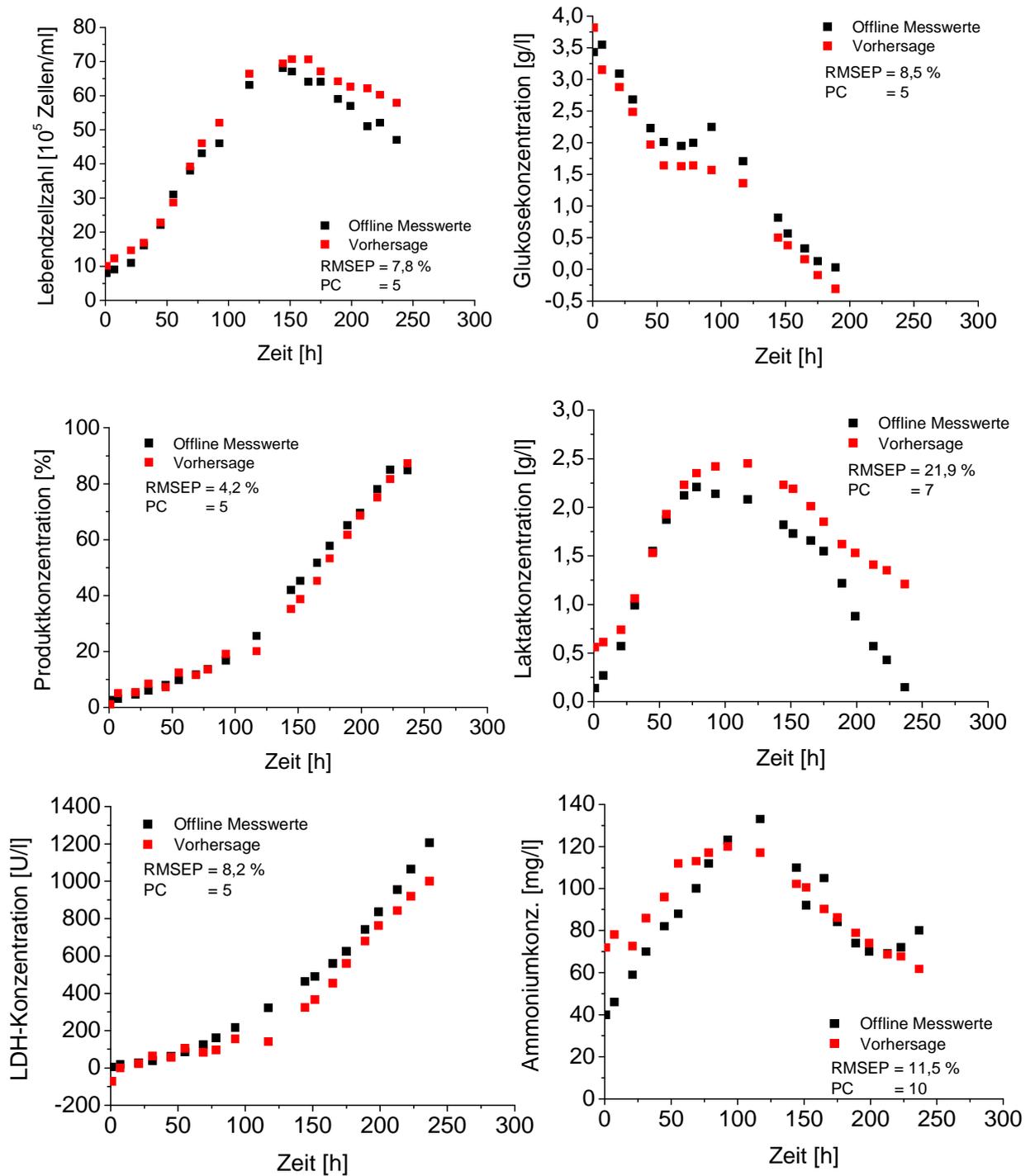


Abbildung 32: Vorhersage des zeitlichen Verlaufs der offline gemessenen Prozessgrößen aus Kultivierung 17 basierend auf dem Ergebnis der Modellbildung mittels PLS1-Regression aus Reaktorlauf 16, 18 und 19 im Vergleich zu den jeweils bestimmten offline Messwerten. Darstellung der Güte der Vorhersage an Hand des RMSEPs und der Anzahl der Hauptkomponenten.

Die Verläufe der offline gemessenen Prozessgrößen konnten, wie die berechneten RMSEPs schon vermuten ließen, in den Vorhersagen gut wiedergegeben werden. Die Produktkonzentration ließ sich mit einem Fehler von 4,2 % am besten vorhersagen, da sich die Konzentrationen bei allen vier Kultivierungen sehr ähnelten (vgl. Abbildung 31). Des Weiteren konnte die Vorhersage der Glukosekonzentration den Zeitpunkt der Zufütterung genau wiedergeben. Dies zeigt deutlich die Funktionalität des BioView®-Sensors für die Vorhersage auch von nicht fluoreszierenden Prozessgrößen.

Bei der Vorhersage der Lebendzellzahl ist bis zur stationären Phase die Vorhersage sehr gut, driftet dann aber etwas von den gemessenen Werten ab. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Zunahme an toten Zellen in der Zellsuspension das Fluoreszenzsignal beeinflusst. Die Verwendung von 7 bzw. 10 Hauptkomponenten bei der Modellbildung für Ammonium- und Laktatkonzentration weisen ebenso wie die hohen RMSEPs auf eine sehr komplexe Korrelation mit den Fluoreszenzdaten hin.

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. Die PLS1-Modellerstellung und Vorhersage von Prozessgrößen für *Fed-Batch*-Kultivierungen gestaltete sich wie erwartet als etwas komplexer und zeigten im Durchschnitt höhere Fehler der Vorhersage als bei den *Batch*-Kultivierungen. Die Gründe dafür liegen in der Zufütterung und der Änderung physikalischer Parameter. Der Zeitpunkt der Zufütterung konnte allerdings in der Vorhersage der Glukosekonzentration gut wiedergegeben werden. Die geringsten durchschnittlichen Fehler sind für die Produkt-, LDH-Konzentration und die Lebendzellzahl ermittelt worden (ca. 10-11 %). Die Laktat- und Ammoniumkonzentrationen lassen sich wahrscheinlich auf Grund ihrer anfänglichen Zunahme und anschließender Abnahme nur schwer vorhersagen. Möglicherweise könnte eine Verbesserung der Vorhersage durch die Verwendung von zwei Modellen erzielt werden. Ein Modell könnte den Anstieg

der Konzentration beschreiben, das zweite Modell den Abfall der Konzentration. Auf diese Weise wäre unter Umständen eine bessere Vorhersage möglich. Dies ist in weiterführenden Versuchen zu überprüfen.

4.2.1.4 Anwendung des BioView®-Sensors bei Perfusions-Kultivierungen

Der Einsatz des 2D-Fluoreszenzmessgeräts für die online Bestimmung von Prozessgrößen ist bereits für *Batch*- und *Fed-Batch*-Kultivierungen gezeigt worden. Die dritte in der Industrie eingesetzte Art der Kultivierung ist der Perfusions-Modus. Die Anwendbarkeit der BioView®-Sensors auch für diese wesentlich komplexere Art der Kultivierung soll im Folgenden untersucht werden. Für die Untersuchung wurde eine Faktor VIII produzierende BHK-Zelllinie verwendet, die freundlicher Weise von der Firma Bayer HealthCare (CA, USA) bereitgestellt wurde. Ebenso konnten dankenswerterweise alle Kultivierung im Perfusions-Modus auf dem Gelände der Bayer HealthCare in der Abteilung Process Science durchgeführt werden.

Kultivierung der BHK-Zelllinie im Perfusions-Modus

Bei den Perfusions-Kultivierungen wurde der Bioreaktor mit einer relativ hohen Zelldichte von 0,5 bis 2×10^6 Zellen /ml inokuliert und in der Anfangsphase mit einer geringen Perfusionsrate gestartet, die der Zellzahl laufend angepasst wurde. Die Zellabtrennung erfolgte über einen Settler mit einer anschließenden Rückführung der Zellen in den Bioreaktor. Das Medienvolumen, welches den Bioreaktor durchströmt, wurde kontinuierlich mit Anstieg der Zellzahl erhöht. Nach Erreichen der gewünschten stationären Zellzahl („steady-state“) wurde kontinuierlichen ein bestimmter Anteil an Zellen entfernt, um die Zellzahl konstant zu halten, und die Perfusionsrate auf einem festen Wert belassen. Eine Kontrolle der Zellzahl erfolgt täglich, so dass gegebenenfalls der Anteil abzuführender Zellen angepasst werden konnte. Dieser stationäre Zustand kann bis zu drei Monate beibehalten werden. Ein Abbruch des Prozesses erfolgt

entweder nach der festgesetzten Zeit oder auf Grund von Veränderungen des Produktions- oder Proliferationsverhalten der Zellen bzw. nach Ausfall von Geräten mit negativem Einfluss auf die Zellen.

Ziel einer Modellierung und der Vorhersage eines solchen Prozesses ist es kontinuierlich verschiedene Größen online zu bestimmen, um unerwünschte Abweichungen im Kultivierungsprozess schnell zu erkennen und evtl. Probleme zu beheben. Allerdings stellt sich die Modellierung eines solchen Prozesses als sehr schwierig dar, da während der Kultivierung kaum Veränderungen im Medium oder im Proliferations- und Produktionsverhalten der Zellen eintreten. Die Datenaufnahme mit dem BioView[®]-Sensor sollte relativ breit aufgestellt werden, um Unterschiede beispielsweise durch eine ausgefallene Pumpe schnell zu erkennen. Allerdings ist diese Datengewinnung unter normalen Prozessbedingungen sehr zeitaufwendig, da eine Kultivierung bis zu drei Monate dauern kann.

Alternativ sind für diese Arbeit nur die Phasen der Anzucht der Zellen bis zum Erreichen der stationären Zellzahl mit dem BioView[®]-Sensor aufgenommen und bis zu 5-mal täglich dem Bioreaktor Proben zur offline Analyse verschiedener Prozessgrößen entnommen worden. Zusätzlich ist für jede Anzucht eine andere Perfusionsrate gewählt worden. Diese Methode bietet eine breitere Datengrundlage für die Medienzusammensetzung und den darauf reagierenden Zellmetabolismus. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Kultivierungen, deren Zellzahlen, die CSPRs (zellspezifische Perfusionsraten) sowie die entsprechenden den Bioreaktor durchströmenden Reaktorvolumina pro Tag. Während Kultivierung 8 ist zusätzlich ein Sauerstoffausfall, in Kultivierung 7 ein Ausfall eines Heizelementes und ein Perfusionsausfall simuliert worden. Dies sollte für eine zusätzliche Variabilität der Prozessdaten für die Modellbildung sorgen.

	Inokulations- zellzahl [x 10 ⁶ Zellen/ml]	Maximale Zellzahl [x 10 ⁶ Zellen/ml]	Zellspezifische Perfusionsrate (CSPR)	Reaktor- volumen pro Tag
1. Kultivierung	2	20	0,4 - 0,5	1 - 10
2. Kultivierung	2,6	30	0,3	0,8 - 9
3. Kultivierung	2,2	10	0,5 - 0,6	1,3 - 6
4. Kultivierung	0,6	3,2	0	0
5. Kultivierung	1,4	35	0,1 - 0,2	1 - 3,5
6. Kultivierung	2	18	0 - 0,1	0 - 1
7. Kultivierung	0,6	2	0,2 - 1,0	2 - 3
8. Kultivierung	0,7	20	0 - 0,5	0 - 2

Tabelle 9: Darstellung der acht mit BHK-Zellen durchgeführten Perfusionskultivierungen mit Inokulations- und Maximalzellzahl sowie CSPR und Durchfluss an Reaktorvolumen pro Tag.

Alle Kultivierungen sind in einem 7 l (5 l Arbeitsvolumen) Bioreaktor der Firma Applikon Biotechnology durchgeführt worden. Die zeitlichen Verläufe der einzelnen offline gemessenen Prozessgrößen während der acht Kultivierungen sowie die Angaben zur Analytik sind detailliert im Anhang in Kapitel 6.1.9.3 wiedergegeben.

Parameter	Soll-Wert
pH	6,8
Temperatur	35,5 °C
Sauerstoffkonz. (pO ₂)	50 %
Rührerdrehzahl	8 min ⁻¹

Tabelle 10: Geregelt physikalische Prozessgrößen für die BHK Perfusionskultivierungen.

Modellierung und Vorhersage einer BHK-Kultivierung

Die Modellerstellung aus sieben der acht BHK Kultivierungen erfolgte wiederum mit Hilfe der Software „The Unscrambler“. Aufgrund der guten Vorhersagbarkeit der Lebendzellzahl ist Kultivierung 2, mit Hilfe der Modelle aus Kultivierung 1 und 3 - 8 unter Einbeziehung der online gemessenen Parameter pH, pO₂ und Temperatur, für jede einzelne Prozessgröße beispielhaft vorhergesagt worden. Abbildung 33 stellt diese Vorhersagen im Vergleich mit den offline gemessenen Prozessgrößen unter Angabe des RMSEP und der Anzahl der Hauptkomponenten graphisch dar. Das Bestimmungsmaß sowie die Graphiken zur Korrelation und der Kalibration sind im Anhang in Kapitel 6.1.9.3 zu finden.

Die Lebendzellzahl von Kultivierung 2 ist sehr gut unter der Verwendung von nur 2 Hauptkomponenten (PCs) vorherzusagen. Dies ist auch in einem niedrigen RMSEP von 3,9 % und einem hohen Bestimmungsmaß von 0,95 zu erkennen. Eine weitere Prozessgröße, die gut mit Hilfe der 2D-Fluoreszenz zu bestimmen ist, ist die Glukosekonzentration. Der RMSEP ist mit 7,5 % hier relativ gering und das Bestimmtheitsmaß mit 0,88 ist etwas niedriger als bei der Lebendzellzahl. Das Bestimmtheitsmaß der Größen Ammonium, Glutamat und LDH liegen im gleichen Bereich nur Glutamin und Laktat weisen ein niedrigeres Bestimmtheitsmaß auf. Diese Unterschiede sind in den Fehlern der Vorhersagen nicht wieder zu finden. Die Trends der Konzentrationsverläufe sind zwar bei allen Größen wieder zu erkennen, aber die Genauigkeit der Vorhersagen ist nicht zufrieden stellend. Eine mögliche Begründung für dieses Ergebnis könnten die Fehler der offline Analytik sein. Tabelle 11 gibt einen Überblick über den Messfehler der offline Analytik und den Fehler der Vorhersage für alle gemessenen Größen dar.

Mit Ausnahme der Zellzahl und der Ammoniumkonzentration liegen die Fehler der Vorhersage über denen der offline Messungen. Wie schon zuvor bei den Vorhersagen der Hybridomzellkultivierungen erwähnt, können die Vorhersagen nicht besser als die offline Messung sein, auf denen sie basieren. Allerdings liegen die RMSEPs von Glutamin-, Laktat- und Glutamatkonzentration deutlich über den Fehlern der offline Messungen. Somit kann dies nicht als Begründung herangezogen werden.

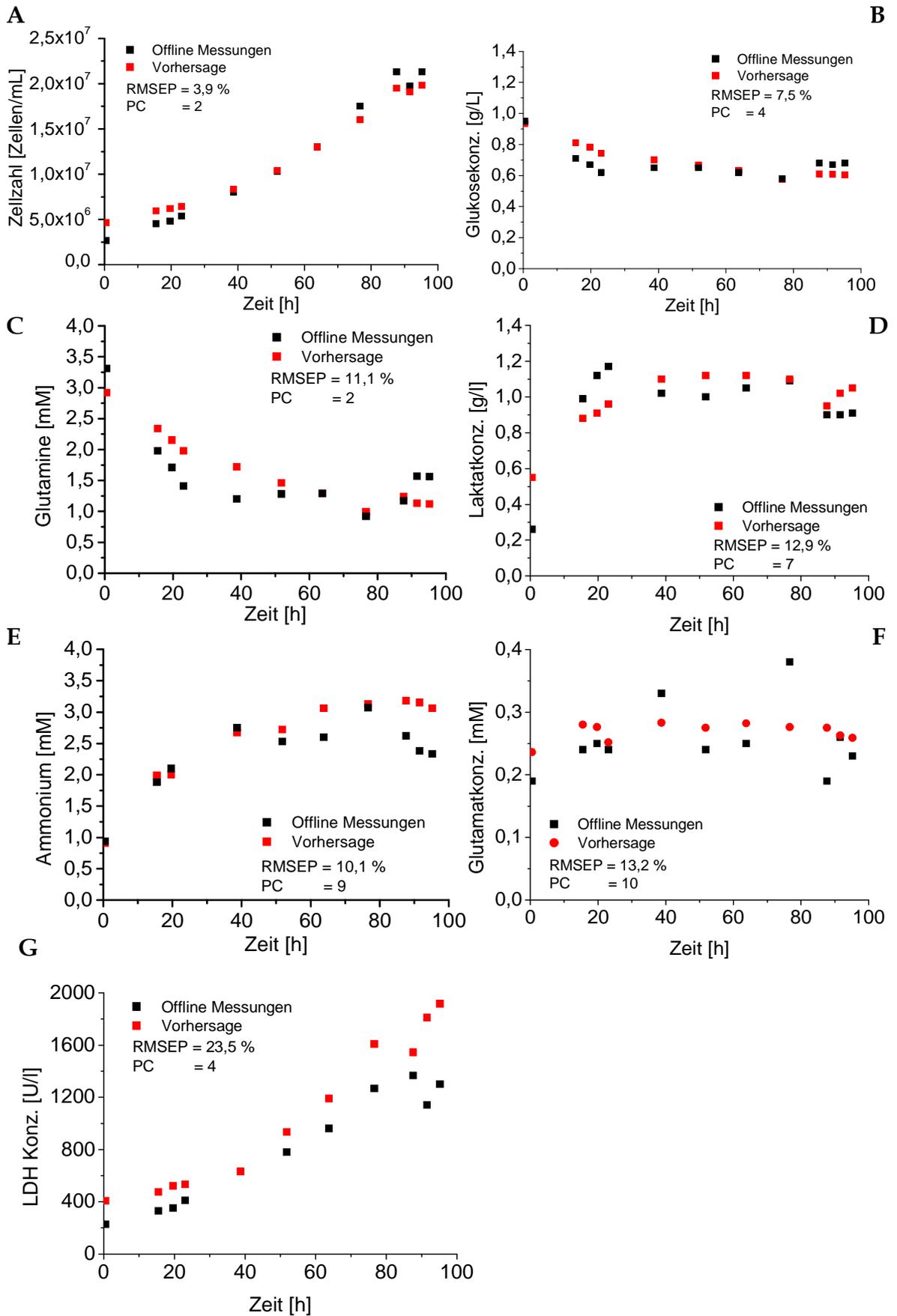


Abbildung 33: Vorhersagen der einzelnen Prozessgrößen der BHK Kultivierung 2 im Vergleich zu den offline gemessenen (A: Lebendzellzahl; B: Glukosekonz.; C: Glutaminekonz.; D: Laktatkonz.; E: Ammoniumkonz.; F: Glutamatkonz.; G: LDH Konz.).

Parameter	Fehler der offline Messung [%]	Fehler der Vorhersage [%]
Lebendzellzahl	5	3,9
Glukosekonz.	2	7,5
Glutaminkonz.	4	11,1
Laktatkonz.	2	12,9
Ammoniumkonz.	6 - 18,5	10,1
Glutamatkonz.	2	13,2
LDH-Konzentration	5 - 14	23,5

Tabelle 11: Vergleich der Fehler bei der offline Messung und der Vorhersage (RMSEP) aller Prozessgrößen (Angaben zu den Fehlern der offline Messungen stammen von Bayer HealthCare).

Die Modelle zur Vorhersage der Laktat-, Ammonium- und Glutamatkonzentration nutzen zwischen 7 und 10 PCs. Dies weist auf eine komplexe Korrelation mit den Fluoreszenzdaten hin und ist eine Erklärung für die Schwierigkeiten bei ihrer Bestimmung. Die offline Messergebnisse der Glutamatkonzentration schwanken relativ stark. Dies könnte mit der sehr niedrigen Konzentration (zwischen 0,2 und 0,4 mM) zusammenhängen und deren entsprechend schwierigen exakten Bestimmung. Die Vorhersage könnte somit eventuell die Konzentrationen besser wiedergeben, da sie sehr viel weniger Variation zeigt. Die LDH-Konzentration weist zwar den höchsten RMSEP auf weist allerdings mit nur 4 PC's auf keine besonders komplexe Korrelation zwischen Fluoreszenz und offline Daten hin. In Abbildung 33 erkennt man graphisch eine Parallelverschiebung der Werte. Eventuell könnte die Einbeziehung eines konstanten Wertes („Offset“) die Vorhersage verbessern.

Fazit

Die Erstellung von PLS1-Modellen aus 2D-Fluoreszenzspektren für einige Prozessgrößen von BHK-Perfusionskultivierungen führte zu sehr guten Vorhersagen für die Zellzahl. Die Modellerstellung und Vorhersage der weiteren Prozessgrößen gestaltete sich wie erwartet als komplexer als für die *Batch*-Kultivierungen. Die Tolerierbarkeit der Fehler der Vorhersagen im Bereich bis 13,2 % ist zwar gegeben, aber einige Trends während der Kultivierungen sind von den Modellen nicht erkannt worden, was auf eine schlechte Modellierung hindeutet. Die Gründe dafür sind die schon erwähnte Schwierigkeit der Modellierung von Perfusionsprozessen durch geringe Konzentrationen aller bestimmender Parameter (mit Ausnahme der Zellzahl) sowie die geringen Änderungen während eines Prozesses. Die Zellzahl ließ sich somit auch mit einem nur geringen Fehler vorhersagen, da sie relativ stark steigt. Eventuell ließen sich diese Probleme durch eine noch breitere Datenbasis beheben, allerdings sind in diese Modelle bereits 96 Datenpunkte eingeflossen und somit deutlich mehr als bei den *Batch*- und *Fed-Batch*-Modellen.

4.2.1.5 Einfluss verschiedener Prozessparameter auf 2D-Fluoreszenzspektren

Der Perfusionsprozess der BHK-Zellen wurde neben der Aufnahme von Daten für die Modellerstellung für weitere Experimente genutzt. Diese sollten der Untersuchung des Einflusses physikalischer Parameter auf den Zellmetabolismus und die 2D-Fluoreszenzspektren während einer Kultivierung dienen. Neben einer Temperaturreduktion, einer pH-Wert Verschiebung und einem Sauerstoffabfall ist vor allem eine Veränderung der Perfusionsrate und dadurch bedingte Änderungen des Zellmetabolismus interessant.

Einfluss der Perfusionsrate auf Fluoreszenzspektren

Die zellspezifische Perfusionsrate (CSPR) bei kontinuierlichen Zellkultivierungen ist eine wichtige Prozessgröße zur Gewährleistung einer

durchgängig optimalen Proliferations- und Produktionsrate. Wie bereits erwähnt, wird sie während der Vermehrung der Zellen im Bioreaktor an die jeweilige Zellzahl angepasst. Nach Erreichen der stationären Zellzahl („steady-state“) wird sie im Regelfall auf einem festen Wert belassen (z.B. CSPR von 0,5). Für diese Untersuchung ist die Zellzahl auf ca. 18×10^6 Zellen/ml gehalten, die CSPR 2-mal über jeweils fünf Tage hinweg von 0,31 auf 0,05 reduziert und die Veränderungen in den 2D-Fluoreszenzspektren beobachtet worden. Zusätzlich wurden mehrmals täglich dem Bioreaktor Proben entnommen und diese offline analysiert. Die Ergebnisse des ersten CSPR-Reduzierungsexperiments sind in Tabelle 12 als Zusammenfassung der offline Messungen und des Weiteren in vier 2D-Fluoreszenzspektren (Abbildung 34) wiedergegeben. Bei den Fluoreszenzspektren ist das Anfangsspektrum (CSPR = 0,31) von den nach folgenden Spektren bei reduzierter CSPR abgezogen worden. Dies bewirkt eine Herausstellung der Veränderungen in den Spektren. Tabelle 12 gibt deutlich den Einfluss der CSPRs auf die Nährstoffe und Metabolite im Medium wieder.

Zeit [h]	CSPR	Lebendzelldichte [10^6 Zellen/ml]	Glukose [g/l]	Glutamin [mM]	Laktat [g/l]	LDH [U/l]
0,0	0,31	17,5	0,66	0,97	0,65	2028
7,7	0,27	19,6	0,66	0,89	0,35	1619
24,2	0,19	19,0	0,59	0,41	0,69	2922
28,9	0,1	17,1	0,5	0,13	0,73	2148
32,0	0,1	18,5	0,48	0,12	0,71	1906
48,8	0,09	19,9	0,34	0,05	0,74	3234
52,4	0,05	18,0	0,26	0,0	0,76	3204
55,3	0,05	17,6	0,25	0,06	0,74	3006
73,1	0,05	17,6	0,08	0,0	0,66	4508
96,0	0,06	16,2	0,03	0,0	0,46	5500

Tabelle 12: Ergebnisse der offline Messungen von Zellzahl, Glukose-, Glutamin-, Laktat- und LDH-Konzentration während der Reduzierung der CSPR von 0,31 auf 0,05 über 5 Tage.

Glukose- und Glutaminkonzentrationen nehmen kontinuierlich ab, Laktat- und LDH-Konzentration zu. Die Verringerung der Laktatkonzentration bei den beiden letzten Messungen weist auf eine Änderung des Zellmetabolismus hin – die Zellen wandeln zur Energiegewinnung Laktat zu Pyruvat um, da kaum noch andere Nährstoffe vorhanden sind. Die LDH-Konzentration steigt insbesondere an den beiden letzten Tagen stark an. Dies deutet darauf hin, dass vermehrt Zellen auf Grund von Nährstoffmangel sterben.

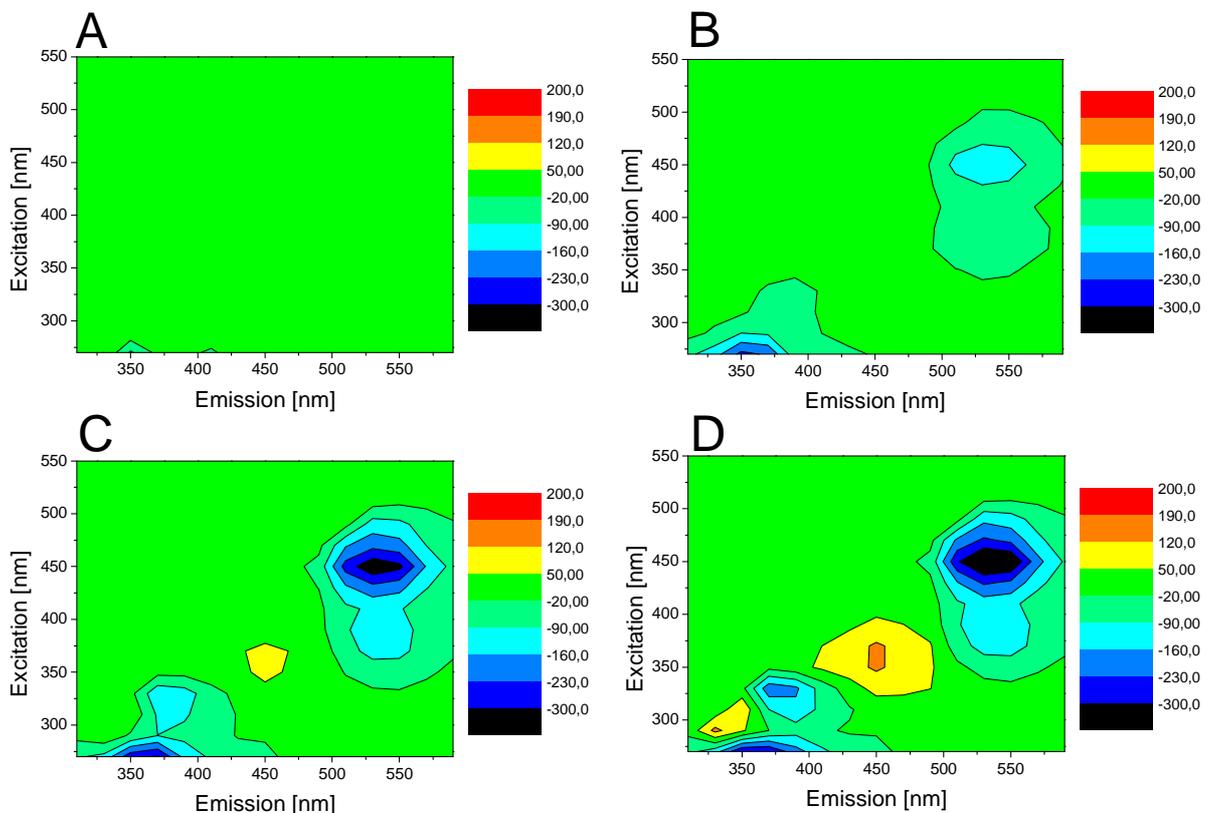


Abbildung 34: Darstellung von vier 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren berechnet aus Fluoreszenzspektren aufgenommen während der Perfusionsreduktion von 0,31 auf 0,05 CSPR. Die einzelnen Spektren sind nach 7,7 h (A), 32 h (B), 55,3 h (C), 73,1 h (D) aufgezeichnet worden.

Die Reduzierung der CSPR ist auch gut in den 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren zu erkennen. Vor allem die Fluoreszenzintensitäten im Bereich des NADHs ($\lambda_{\text{Ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$) und der Flavine z.B. FMN ($\lambda_{\text{Ex}} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ nm}$) zeigen Veränderungen. Niedrigere Werte sind im Bereich des FMNs zu messen, was bedeutet, dass es zu einer Steigerung an FMNH₂ in den

Zellen kommt. Darüber hinaus ist ein Anstieg des NADH-Gehalts in den Zellen zu beobachten. Die Intensität ändert sich nur um etwa 200 RFI (relative Fluoreszenzintensitäten). Dies entspricht 5 % des Gesamtintensitätsspektrums von 4095 RFI. Da aber die Perfusionsrate alle Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen beeinflusst und somit auch den Zellmetabolismus verändert, ist zu erwarten, dass die Änderung der Perfusionsrate auch einen Einfluss auf die multivariate Datenanalyse hat.

Einfluss der Temperatur auf Fluoreszenzspektren

Die Temperatur ist ebenfalls eine für alle Zellkultivierungen wichtige Prozessgröße zur Gewährleistung einer durchgängig optimalen Proliferations- und Produktionsrate. Die Kultivierungstemperatur von Zellen kann variiert werden, abhängig vom Kultivierungsmodus, sowie des Proliferations- und Produktionsverhaltens der Zellen [174-177]. Eine Änderung der Temperatur während einer Kultivierung hat einen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen und dies sollte auch im 2D-Fluoreszenzspektrum sichtbar sein. Während einer BHK-Kultivierung im Perfusionsmodus ist die Temperatur von 36,5 °C auf 18 °C für insgesamt vier Tage abgesenkt worden. Die Fluoreszenz wurde während dieser Zeit kontinuierlich mit dem BioView[®]-Sensor vermessen und die ausgewählten Differenzspektren (Berechnung siehe vorheriges Kapitel) sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Temperaturreduktion resultierte in einer Intensitätsänderung von bis zu 800 RFI somit ca. 20 % des Gesamtintensitätsspektrums von 4095 RFI. Es ist eine Steigerung der Intensität im Bereich des FMN und eine Absenkung im Bereich des NADH zu beobachten. Dies geht einher mit der Verringerung der Lebendzellzahl von 1,6 auf 0,7 × 10⁶ Zellen/ml und der Viabilität von 90 % auf 70 % während der vier Tage. Somit ist diese Fluoreszenzänderung nur indirekt mit der Temperaturabsenkung in Verbindung zu bringen. Ein stärkerer Anstieg der Fluoreszenz ist vor allem im Bereich der Proteine/ Aminosäuren (ca. $\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 400 \text{ nm}$) erkennbar.

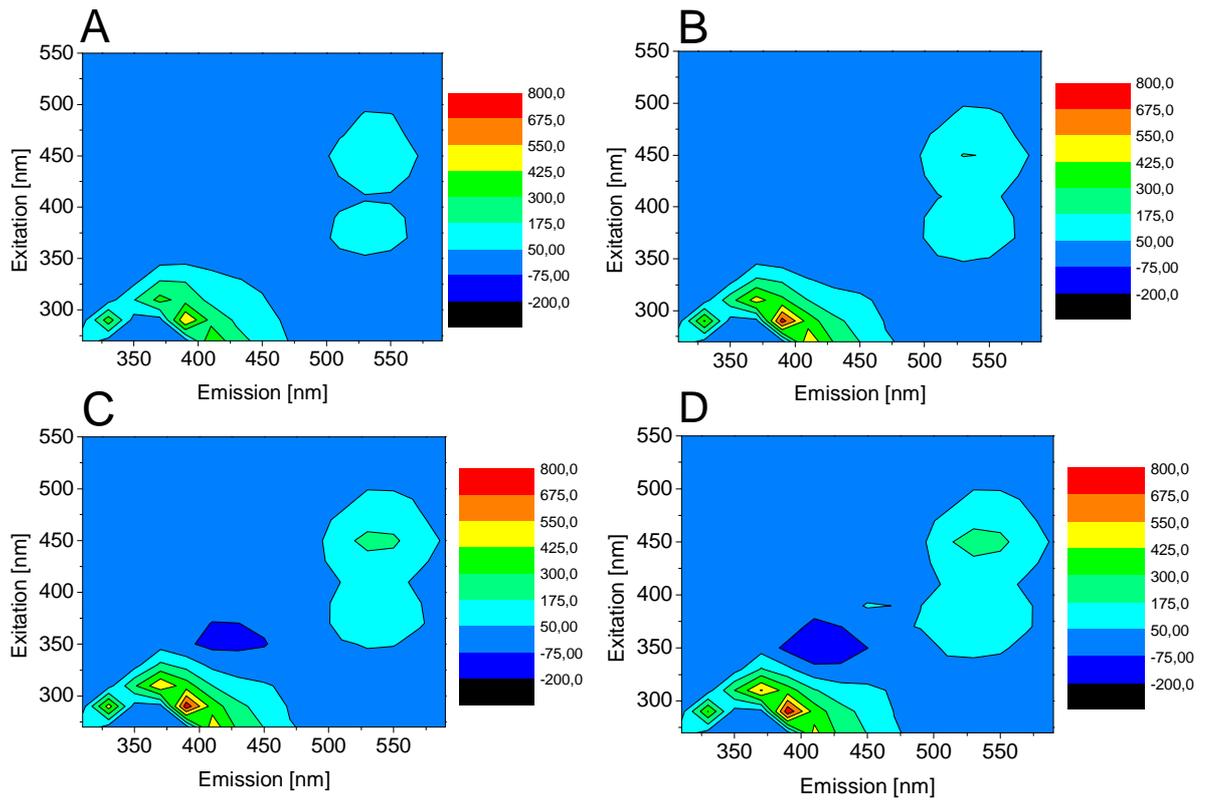


Abbildung 35: Darstellung von vier 2D-Fluoreszenz-Differenzspektren berechnet aus Fluoreszenzspektren aufgenommen nach der Temperaturreduktion von 36,5 auf 18 °C. Die einzelnen Spektren sind nach 15 h (A), 40 h (B), 64 h (C), 96 h (D) aufgezeichnet worden.

Dies deutet auf einen starken Einfluss einer Temperaturänderung auch auf die multivariate Datenanalyse hin und könnte die Vorhersage mancher Parameter erschweren. Allerdings hängt die Intensitätsänderung wahrscheinlich stark von der Art und Höhe der Temperaturreduzierung oder -steigerung ab und jeder Prozess muss individuell untersucht werden.

Einfluss des pH-Wertes auf Fluoreszenzspektren

Der optimal regulierte pH-Wert ist ein entscheidender Faktor für hohe Proliferations- und Produktionsraten [175, 177]. Der optimale pH-Wert von 6,8 für Kultivierung von BHK-Zellen ist bei Bayer HealthCare durch die Prozessentwicklungsabteilung ermittelt worden. Hier zeigen die Zellen das gewünschte Proliferations- und Produktionsverhalten.

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf den Metabolismus der Zellen und die 2D-Fluoreszenzspektren ist dieser während einer Perfusionskultivierung zweifach verändert worden. Zunächst ist der pH Wert für 2 Tage von 6,8 auf 6,6 abgesenkt und anschließend für 2 Tage auf 7,0 erhöht worden. Die Zellzahl wurde während dieser Experimente konstant bei 10×10^6 Zellen/ml gehalten. Wie zuvor bei der Perfusions- und der Temperaturreduzierung sind auch hier die Differenzspektren analysiert worden (Spektren hier nicht gezeigt). Die Absenkung des pH-Wertes zeigte kaum Veränderungen im Metabolismus oder den Fluoreszenzintensitäten (max. 160 RFI unter 4 %). Die Steigung des pH-Wertes auf 7,0 bewirkte allerdings eine Änderung der Fluoreszenzintensitäten im Proteinbereich von 250 RFI (6 %) und im Bereich von NADH und FMN von etwa 40 RFI. Zudem ist ein Anstieg des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf eine Umstellung des Zellmetabolismus bei pH 7,0 hin. Eine Einflussnahme des pH-Wertes insbesondere eines Anstiegs auf die multivariate Datenanalyse ist somit nicht auszuschließen. Zudem sollte bei der Entwicklung eines Zellkulturprozesses, welcher eine pH-Wertänderung beinhaltet sollte, darauf geachtet werden, ob eine Veränderung des Zellmetabolismus erwünscht ist.

Einfluss eines Sauerstoffabfalls auf Fluoreszenzspektren

Ein Ausfall der Sauerstoffversorgung während einer Zellkultivierung hat einen massiven Einfluss auf den Zellmetabolismus und das Produktionsverhalten [90, 92, 93, 102, 106, 112, 177]. Es ist somit von Vorteil ein zweites Warnsystem zusätzlich zu einer Sauerstoffelektrode für die Feststellung eines solchen Versagens einzusetzen. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob online Fluoreszenzmessungen dazu geeignet sind, einen Sauerstoffabfall zu registrieren. Die Sauerstoffzufuhr wurde bei einer Zelldichte von 17×10^6 Zellen/ml für 14 Stunden unterbrochen. Dies bedeutete einen langsamen Abfall der Sauerstoffkonzentration über 4 Stunden bis auf 0 % und ein Beibehalten der 0 % für 10 Stunden. Wie auch bei Shi *et al.* für Perfusionskultivierungen

beschrieben, verändert sich der Zellstoffwechsel in der Weise, dass Glukose- und Glutaminaufnahme sowie Laktatproduktion während der Sauerstofflimitierung ansteigen (Daten nicht gezeigt) [93]. Diese Veränderungen des Zellmetabolismus sollten auch in den Fluoreszenzspektren sichtbar sein. Wiederum sind zur besseren optischen Darstellung Differenzspektren erstellt worden. Änderungen der Fluoreszenzintensitäten sind im Bereich der Proteine (200 RFI (5 %) Zu- und Abnahme) sowie des NADHs (75 RFI (2 %) Zunahme) feststellbar. Dies sind sehr niedrige Resultate für die Erstellung eines Warnsystems, aber eventuell könnten einzelne Fluoreszenzwellenlängen spezifisch mit einem Sauerstoffabfall in Verbindung gebracht werden. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich sind dazu notwendig.

In diesen Analysen konnte ein Einfluss physikalischer Parameter auf die 2D-Fluoreszenzspektren auch bei Zellkultivierungen gezeigt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmessungen konnten zudem Veränderungen des Zellmetabolismus beobachtet werden. Der BioView[®]-Sensor könnte folglich für die Entwicklung und Optimierung von Zellkulturprozessen eine zusätzliche Hilfestellung bieten, indem Veränderungen schneller erkannt werden.

Der Einfluss, den die Parameter Perfusionsrate, Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration auf die Fluoreszenzspektren haben, könnte sich auch auf die multivariate Datenanalyse auswirken. Die Modellerstellung und Vorhersage von Prozessen, die Änderungen dieser Parameter beinhalten, könnte sich für manche Prozessparameter als schwierig erweisen. Dies konnte bereits bei der Modellierung von Fed-*Batch*- im Gegensatz zu *Batch*-Prozessen gezeigt werden.

4.2.1.6 *Fazit*

Für eine möglichst optimale Prozessführung hoch komplexer Zellkulturprozesse sind Kenntnisse sowohl über den aktuellen biologischen Zustand als auch über Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Zellumgebung wichtig. Zur Prozessbeobachtung sind daher Messsysteme, wie der auf 2D-

Fluoreszenzspektroskopie basierende BioView[®]-Sensor, sinnvoll, da sie eine Vielzahl von biologischen, chemischen und physikalischen Bioprozessgrößen simultan detektieren. Auf Grund der Komplexität von Fluoreszenzdaten und durch ihren hohen Informationsgehalt lassen sich die Verläufe von offline Messgrößen oftmals nicht direkt mit einzelnen Fluoreszenzintensitätsverläufen korrelieren. Multivariate Auswerteverfahren wie die Hauptkomponentenanalyse und die PLS-Regression nutzen das gesamte 2D-Fluoreszenzspektrum zur Bestimmung einzelner Prozessgrößen. Dies ist auch für nicht fluoreszierende Substanzen möglich, wie z. B. für Glukose.

In diesem Kapitel ist die Einsetzbarkeit des BioViews[®] für die online Bestimmung von Prozessparametern in der tierischen Zellkultivierung näher untersucht worden. Herangezogen wurden jeweils ein *Batch*-, ein *Fed-Batch*- und ein Perfusionsprozess mit der Nutzung jeweils unterschiedlicher Kulturmedien und Zelllinien (Hybridom, CHO, BHK). Diese breite Aufstellung der Versuche sollte einer möglichst umfassenden Analyse der Einsatzmöglichkeiten des BioView[®]-Sensors bei Zellkultivierungsprozessen dienen.

Die Ergebnisse der multivariaten Datenanalyse haben gezeigt, dass Modellierung und Vorhersage verschiedenster Prozessparameter bei allen drei Kultivierungsmodi möglich ist. Bei einem Vergleich der drei verschiedenen Modi erwies sich der *Batch*-Modus, als der am einfachsten zu modellierende und vorherzusagende Prozess. Die Vorhersage der Prozessgrößen für den *Fed-Batch*- und insbesondere für den Perfusions-Modus stellte sich dagegen als schwieriger heraus.

Der *Batch*-Modus zeigte die besten Ergebnisse, da zum einen keine physikalischen Parameter verändert wurden und zum anderen hohe Konzentrationsänderungen der Prozessgrößen während der Kultivierung zu beobachten sind. Des Weiteren sind die Zellen während der Kultivierung unterschiedlichen Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen ausgesetzt, welche den Zellmetabolismus beeinflussen. Diese Zellstoffwechseländerungen könnten bei der Modellerstellung indirekt auf die Konzentrationen auch nicht-fluoreszenzierender Prozessgrößen hinweisen. Im *Fed-Batch*-Modus sind die Zellen zwar auch unterschiedlichen Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen

ausgesetzt, allerdings ist die Gesamtfluoreszenz durch die Veränderung einiger physikalischer Parameter (Temperatur und pH) beeinflusst worden. Darüber hinaus könnte auch die Datengewinnung mit zwei verschiedenen Verstärkungseinstellungen die Modellerstellung erschwert haben. Die Schwierigkeiten bei der Modellerstellung und Vorhersage des Perfusions-Modus erklären sich aus der gering konzentrierten Medienzusammensetzung und einer minimalen Zellmetabolismusänderung. Deren Einfluss sollte zwar durch Perfusionsratenänderungen bei den verschiedenen Kultivierungen reduziert werden, konnte aber anscheinend nicht vollständig aufgehoben werden.

Eine im Anschluss durchgeführte Untersuchung über den Einfluss physikalischer Parameter auf die 2D-Fluoreszenzspektren und die damit möglicherweise einhergehende die multivariate Datenanalyse, zeigte deutlich deren Wirkung auf den Zellstoffwechsel und somit auch eventuell auf die Modellbildung. Dies könnte eine Bestätigung für die Probleme bei der Modellierung des *Fed-Batch*-Prozesses sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es möglich ist, viele Prozessparameter von *Batch*-, *Fed-Batch*- und Perfusionsprozesse vorherzusagen, allerdings mit zunehmender Schwierigkeit. Eine breitere Datengrundlage, als im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gewährleistet werden konnte, würde die Modellbildung und Vorhersage einiger Prozessgrößen akkurater darstellen und einen geringeren Fehler (RMSEP) aufweisen. Allerdings ist die Information über einige Prozessgrößen nicht in den Fluoreszenzspektren enthalten und auch die Gewinnung von weiteren Daten würde die Modellbildung nicht verbessern können. Ein idealer Einsatzort für den BioView[®]-Sensor wären standardisierte Prozesse wie die Produktion von pharmazeutischen Proteinen, da hier die Kultivierungen stets unter den gleichen Bedingungen ablaufen und somit die Vorhersagen der Prozessparameter mit jeder durchgeführten und ins Modell einbezogenen Kultivierung immer genauer werden sollten. In der Prozessentwicklung könnte der BioView[®]-Sensor zur schnellen Bestimmung von Zellstoffwechseländerungen bzw. im Fall fluoreszierender Produkte zur direkten Konzentrationsermittlung von Nutzen sein.

4.2.2 Einsatz des insitu OUR Sensors für Zellkulturprozesse

Die Sauerstoffaufnahme von tierischen Zellen in Bioreaktoren kann, wie in der Theorie ausführlich beschrieben, mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. In dieser Arbeit ist die Funktionalität des von Dr. Klaus Joeris (Bayer HealthCare) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelten neuen insitu OUR Sensors untersucht worden. Dafür konnten freundlicherweise BHK-Zellkultivierungen im Perfusionsmodus bei Bayer HealthCare durchgeführt werden. Bisher musste die Bestimmung dieser Größe entweder außerhalb des Bioreaktors vorgenommen oder unter Installation einer aufwendigen Abgasanalytik durchgeführt werden. Die Bestimmung der OUR der Zellen über die Abgasanalytik ist bei Perfusionskultivierungen durch kontinuierliche Zu- und Abfuhr von Medium besonders schwierig. Der insitu OUR Sensor ist somit ein großer Fortschritt in der sicheren und schnellen Bestimmung der Sauerstoffaufnahme bei Säugerzellen. Es können frühzeitig Veränderungen im Zellstoffwechsel erkannt und entsprechend schnell reagiert werden, was wiederum eine Zeit- und Kostenersparnis in der Produktion von pharmazeutischen Proteinen bedeutet.

4.2.2.1 Aufbau des insitu OUR Sensors

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme der Zellen mittels des insitu OUR Sensors beruht auf der dynamischen Methode. Der Aufbau des Sensors ist in Abbildung 36 in Einzelteilen mit Reaktionsgefäß, Probeneinsatz und oszillierendem Sensorkopf und in Abbildung 37 vollständig zusammengesetzt dargestellt.

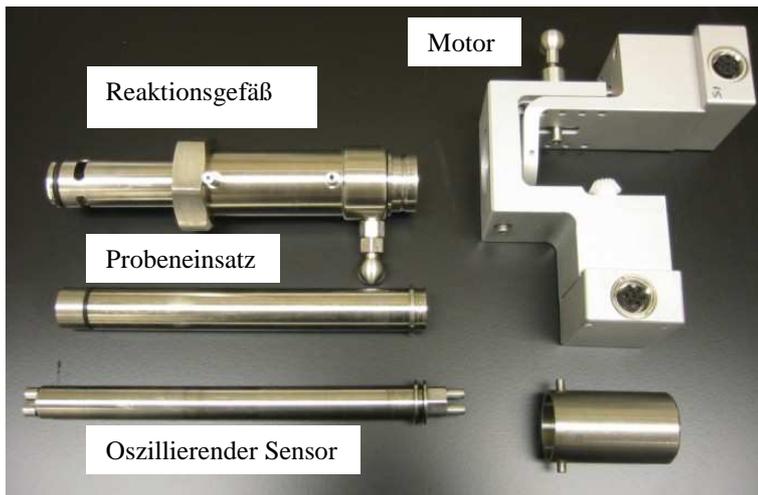


Abbildung 36: Einzelteile des insitu OUR Sensors mit Motor, Reaktionsgefäß, Probeneinsatz und oszillierendem Sensorkopf.

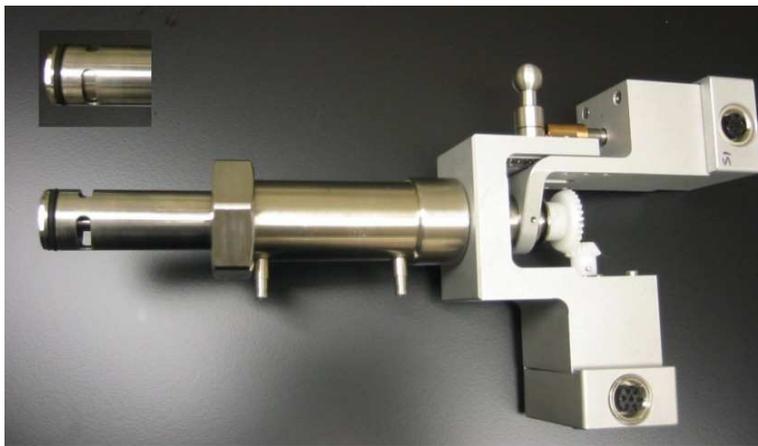


Abbildung 37: Vollständig aufgebauter insitu OUR Sensor mit geschlossener (oben links kleines Bild) und geöffneter Probenkammer.

Der Sensor besitzt zwei Motoren: einen für das Öffnen und Schließen der Probenkammer und einen für die oszillierende Bewegung des Sensorkopfes zum Mischen der Probe während der Messung. Eine graphische Darstellung der Funktionsweise ist in Abbildung 38 zu finden. Bei geöffneter Probenkammer dient der Sensor als zusätzlicher Sauerstoffsensoren im Bioreaktor. Das Schließen der Probenkammer startet die OUR-Messung, da die Zellen im Inneren von der Sauerstoffzufuhr abgetrennt sind.

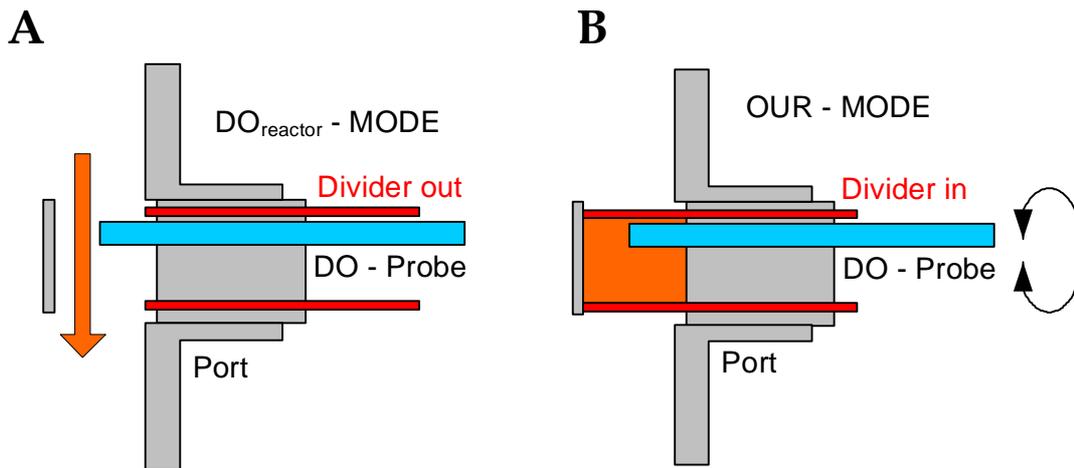


Abbildung 38: Darstellung der Funktionsweise des insitu OUR Sensors. **A** zeigt das Durchströmen der Kultursuspension bei geöffneter Probenkammer mit gleichzeitiger Sauerstoffmessung. **B** die oszillierende Bewegung des Sensorkopfes bei geschlossener Probenkammer während der OUR Messung.

Über den Abfall der Sauerstoffkonzentration wird anschließend wie in der Theorie beschrieben der OUR berechnet. Die Bedienung des insitu OUR Sensors erfolgt über ein in Labview 7.1 geschriebenes Programm (National Instruments). Eingestellt werden kann die Geschwindigkeit, der Winkel und die Frequenz der oszillierenden Bewegung sowie das Starten und Stoppen der Messung. Das Signal des Sauerstoffsensors ist in die Prozesskontrollsoftware FermWorks (JoVa Solutions) integriert. In Abbildung 39 ist ein *Screenshot* der Bedienoberfläche wiedergegeben. Das insitu OUR Programm entnimmt zusätzlich zu den Informationen über Sauerstoffkonzentration auch die der Lebendzelldichte dem FermWorks Programm und kann somit kontinuierlich die OUR ermitteln.

Der Sensor nutzt einen fluoreszenzbasierten optischen Sauerstoffsensoren der Firma Presens (Fibox 3, Presens GmbH). Ein Ru(II)-Komplex als Sauerstoff sensibler Farbstoff ist in einer Silikonmatrix auf einem Quarzglas befestigt worden (Spezialanfertigung der Firma Presens). Dieses Glas ist an der Spitze des Sensors befestigt. Dieses Design trennt den Sensor von der optischen Faser und macht so ein Autoklavieren möglich.

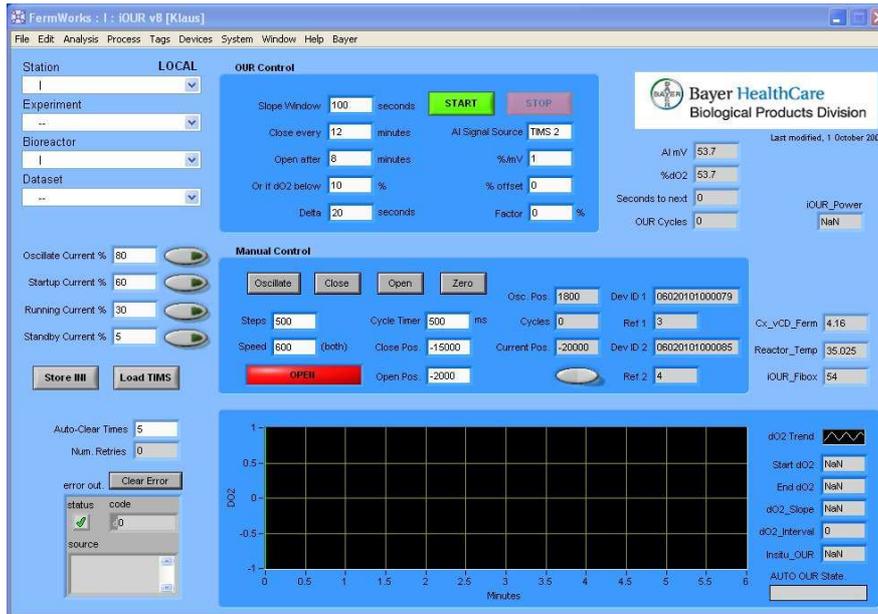


Abbildung 39: Bedienoberfläche des Programms zur Bedienung des insitu OUR Sensors geschrieben in Labview 7.1. Einzustellen sind die Geschwindigkeit, der Winkel und die Frequenz der oszillierenden Bewegung sowie das Starten und Stoppen der Messung.

4.2.2.2 Funktionalitätsuntersuchung des insitu OUR Sensors

Die Funktionalität des insitu OUR Sensors ist während der Kultivierung von BHK-Zellen im Perfusionsmodus bei Bayer HealthCare untersucht worden. Für die Kultivierungen ist ein 7 l (5 l Arbeitsvolumen) Bioreaktor der Firma Applikon Biotechnology genutzt worden, welcher von einer DCU3 und FermWorks gesteuert wird. Die Sauerstoffkonzentration ist bei allen Kultivierungen durchgängig auf einen Wert von 50 % reguliert worden. Da eine gleich bleibende Zelldichte, wie bei Perfusionskultivierungen üblich, für diese Experimente nicht erwünscht war, ist die Sauerstoffaufnahme der Zellen während der Kultivierungen zu den BioView®-Sensor Messungen aufgenommen worden. Die Sauerstoffaufnahme der BHK-Zellen konnte somit für Zellkonzentrationen von 2 bis 30×10^6 Zellen/ml bestimmt werden.

Beispielhaft ist in Abbildung 40 ein *Screenshot* der Nutzeroberfläche der Prozesssteuerung während einer Kultivierung mit insitu OUR Messung gezeigt. Es zeigt die kontinuierliche Sauerstoffmessung des insitu OUR Sensors (hellblau),

die berechnete OUR für jeden Zyklus (gelb) sowie die Sauerstoffmessung mit dem polarographischen Sensor (dunkelblau).

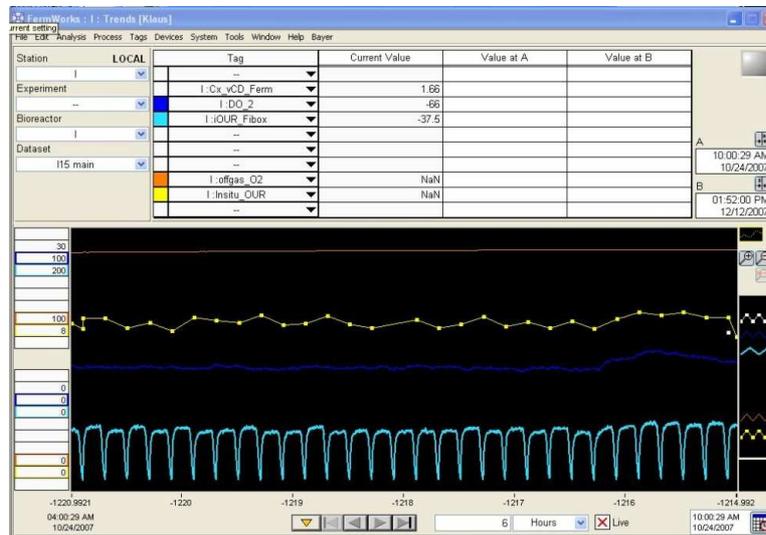


Abbildung 40: Screenshot der Prozesssteuerung mit kontinuierlicher Sauerstoffmessung des insitu OUR Sensors (hellblau), berechneter OUR für jeden Zyklus (gelb) und Sauerstoffmessung mit dem polarographischen Sensor (dunkelblau).

Gut zu erkennen ist die Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit vom zyklischen Öffnen und Schließen der Probenkammer. Die Dauer eines Messzyklus hängt von der Zellkonzentration ab und beträgt hier etwa 10 Minuten. Für die Funktionalitätsuntersuchung war zunächst interessant, ob der Abfall der Sauerstoffkonzentration während der insitu OUR Messung auch durch die Zellzahl beeinflusst wird. Da dem Bioreaktor nur 3- bis 5-mal pro Tag Proben für die Zellzahlbestimmung entnommen wurden, ist die automatische Berechnung der OURs meist ungenau. Die Lebendzellzahl steigt zwischen den Probenahmen an und verfälscht dann die OUR Berechnung, da sie auf zu geringen Zellzahlen bezogen wird. Dieses Problem ist in Abbildung 41 als Screenshot wiedergegeben. Die OURs sinken nach der Eingabe der aktuellen Zellzahl wieder auf ihren wahren Wert ab. Bei einer kontinuierlichen Zunahme der Zellzahl im Bioreaktor können daher nur OURs, die unmittelbar nach einer Zellzählung gewonnen wurden, als korrekt angesehen werden. Aus diesem Grund wurden nachfolgend nur diese verwendet.

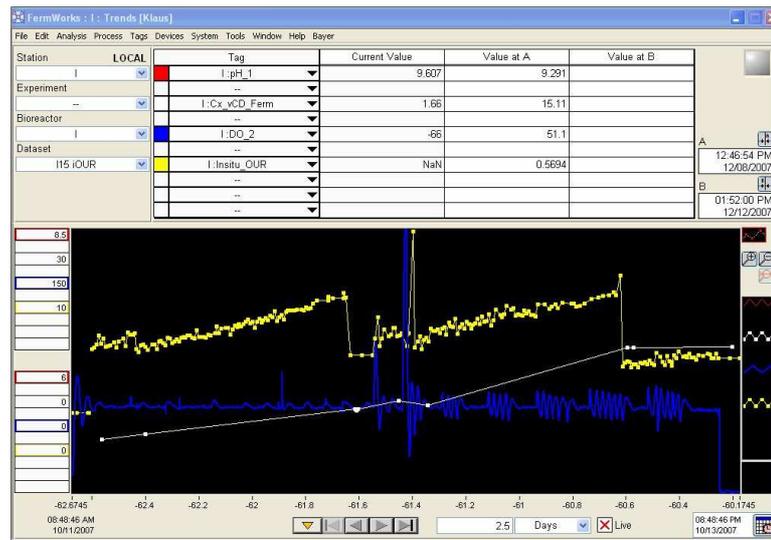


Abbildung 41: Darstellung eines Screenshots der Prozesssteuerung zur fehlerhaften Wiedergabe der berechneten OURs zwischen zwei offline bestimmten Lebendzellzahlen.

Zunächst sollte eine Korrelation der Lebendzellzahlen mit dem Abfall der Sauerstoffkonzentration in %/s für die OUR Bestimmung zeigen, ob eine Veränderung mit dem insitu OUR zu messen ist. Wie in Abbildung 42 dargestellt, steigt, wie erwartet, mit steigender Zellzahl auch die Geschwindigkeit des Sauerstoffkonzentrationsabfalls, d.h. der Sauerstoff innerhalb der Probenkammer wird schneller verbraucht. Zudem ist eine relativ breite Streuung der Messwerte festzustellen.

Die aus diesem Abfall der Sauerstoffkonzentration berechneten OURs in Korrelation zur Lebendzellzahl werden durch Abbildung 43 wiedergegeben. Zur Verifizierung der insitu vermessenen OURs erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten und Zellkonzentrationen offline OUR Messungen mit Hilfe des YSI 5300 A. Dieses Gerät verwendet ebenfalls die dynamische Methode zur Berechnung des OUR, nur wird dafür jeweils eine Probe aus dem Bioreaktor entnommen. Sowohl für die insitu OURs als auch die offline OURs ist eine breite Streuung der Messergebnisse erfasst worden. Sie liegen zwischen ca. 2,5 und 7 pmol/Zelle/Tag für verschiedene Zellzahlen.

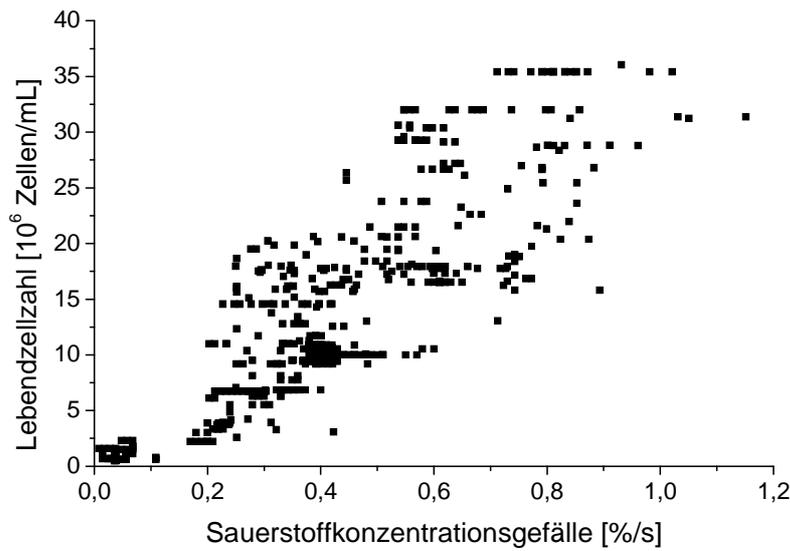


Abbildung 42: Auftragung der Lebendzellzahl gegen das Sauerstoffkonzentrationsgefälle gemessen vom insitu OUR Sensor während aller BHK-Kultivierungen.

In der Literatur sind zwar Sauerstoffaufnahmeleistungen von 0,02 bis 0,51 pmol/Zelle/Tag angegeben (siehe Grundlagen Kapitel 3.3.2.1), aber da beide vergleichenden Messungen dieselben hohen Werte und Streuung aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um Messfehler handelt.

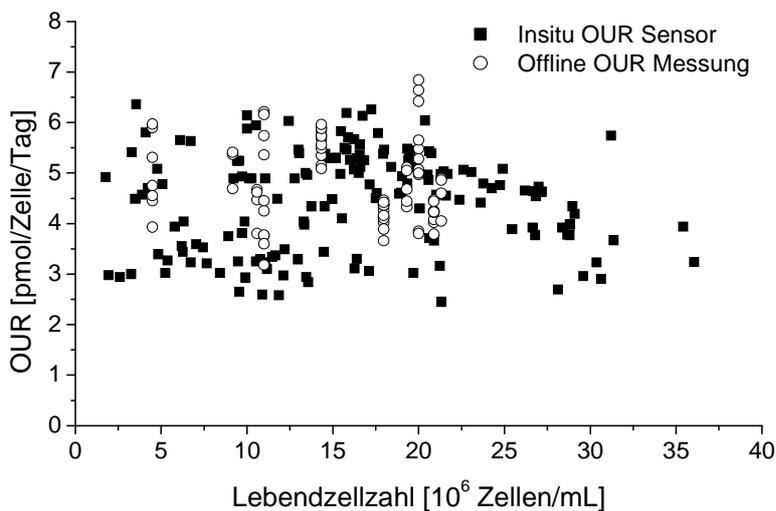


Abbildung 43: Messergebnisse des insitu OUR Sensors und des offline messenden YSI 5300 A aller BHK-Zellkultivierungen.

Folglich kann festgehalten werden, dass der insitu OUR Sensor eine schnelle und zuverlässige Methode zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme von Zellen darstellt.

Zur Untersuchung in wie weit physikalische Veränderungen im Bioreaktor die Sauerstoffaufnahme der Zellen beeinflussen, ist die Temperatur für vier Tage von 36,5°C auf 18°C abgesenkt worden. In Abbildung 44 ist deutlich mit der Absenkung der Temperatur (grün) im gleichen Maße die Verringerung des OUR (gelb) festzustellen. Sofort nach dem Wiederanstieg der Temperatur steigt auch der Sauerstoffverbrauch der Zellen wieder an.



Abbildung 44: Screenshot von der Nutzeroberfläche der Prozesssteuerung während der Absenkung der Temperatur (grün) von 36,5 auf 18°C im Bioreaktor. Die OUR (gelb) fällt auf fast 0 pmol/Zelle/Tag ab. Erst mit dem Anstieg der Temperatur nach vier Tagen steigt auch die OUR wieder.

Fazit

Die Funktionalitätsuntersuchungen zeigen, dass der insitu OUR Sensor gut zur kontinuierlich Beobachtung des Zellmetabolismus im Bioreaktor geeignet ist, und somit während der Prozessentwicklung zur Produktion von pharmazeutisch nutzbaren Proteinen mit tierischen Zellen gut einsetzbar wäre. Insbesondere bei Perfusionsprozessen mit einer über lange Zeiträume konstanten Zellzahl ist dies interessant. Aber auch bei *Batch*- und *Fed-Batch*-Kultivierungen könnte der Einsatz

des insitu OUR Sensors Zeit und Kosten sparen, da eine externe Messung des OUR mit arbeitsintensiver Probenahme und Bestimmung mit Hilfe des YSI 5300 A vermieden würde. Darüber hinaus kann der insitu OUR Sensor neben einer polarographischen Sonde als zusätzlicher Sauerstoffsensor dienen und so die Sicherheit der Sauerstoffkontrolle im Bioreaktor erhöhen. Da für diese Untersuchungen der Sensor über 2 Monate durchgängig im Bioreaktor verblieben ist und keine Veränderungen der Messergebnisse über diesen Zeitraum festgestellt werden konnten, kann auch die Langzeitstabilität des Sensors bestätigt werden.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die kosten- und zeiteffiziente Produktion pharmazeutisch relevanter Proteine mit Säugetierzellen erfordert eine Vielzahl von Optimierungsschritten. Vor dem Hintergrund der seit 1996 stark gestiegenen Nachfrage ist dies besonders entscheidend. Die Optimierung beginnt bei der Entwicklung der geeigneten Zelllinien, die unter anderem ein schnelles Wachstum, keine chromosomale Instabilität, große Robustheit gegen Scherkräfte und eine gute Produktivität zeigen sollten [18, 19, 23, 24]. Neben der Medienentwicklung ist auch die Prozessführung im Bioreaktor ein weiteres wichtiges Thema. Die Kultivierung sollte optimal überwacht und kontrolliert werden, um eventuelle Zeit- und Produktverluste zu vermeiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zwei bedeutenden Gebiete der Zellproduktivität und der online Überwachung im Bioreaktor genauer untersucht. Diese werden im Folgenden thematisch gegliedert zusammenfassend dargestellt sowie ein Ausblick für weiterführende Untersuchungen aufgezeigt.

Optimierung der Produktivität von Zellpopulationen

Die Produktivität von Zellpopulationen sollte durch Sortierung der Zellen mit Hilfe eines FACS gesteigert werden. Zur Charakterisierung der Zellen ist eine Fluoreszenzfärbung notwendig, die von ihrem Produktionsverhalten abhängt. Eine in der Literatur beschriebene Affinitätsmatrixfärbemethode ist dazu erfolgreich auf ihre Funktionalität zunächst im Protein-*Microarray*-Format und anschließend an der Zellmembran der zu sortierenden Hybridomzellen IV F 19.23 untersucht worden [65]. Die anschließende vierfache Zellsortierung mittels eines FACS zeigte zudem die gute Einsetzbarkeit der Methode für die Produktivitätssteigerung einer Zellpopulation. Die Produktivität der Zellpopulation konnte nach vier „*bulk*“-Sortierungen um 125 % gesteigert werden. Da während der Sortierungen die 10 bzw. 20 % der am stärksten durch die Affinitätsmatrix eingefärbten Zellen isoliert worden sind, könnte eine weitere Reduzierung der auszusortierenden Zellen möglicherweise größere

Produktivitätssteigerungen herbeiführen. Eine zusätzliche Einzelzellsortierung in 96-Lochplatten könnte die Suche nach einem einzelnen stark produzierenden Zellklon auf wenige Lochplatten einschränken.

Die Modifizierung der Affinitätsmatrixmethode mit dem Austausch des biotinylierten Antikörpers gegen biotinyliertes Protein A für die Anwendung auf HKB-11 Zellen zeigte zunächst bei der Funktionalitätsuntersuchung viel versprechende Ergebnisse. Die Auftragung der Matrix auf Protein-*Microarrays* zeigte deutlich positive Signale und deutete auf eine Anwendbarkeit der Färbung an der Zellmembran hin. Eine vollständige Bindung der Matrix auf HKB-11 Zelloberflächen ist in weiteren Analysen leider bisher nicht gelungen. Ursachen könnten einerseits die unterschiedlichen Färbemethoden von Protein-*Microarrays* und Zellen sein oder andererseits die zu geringen Konzentrationen einiger Inhaltsstoffe. Ein Aufbau der Matrix an der Zelloberfläche könnte zwar trotz der geringen Konzentrationen einiger Inhaltsstoffe gelingen, aber das Fluoreszenzsignal könnte dann möglicherweise von dem der unspezifischen Bindungen überdeckt werden. Alternativ könnte die Oberfläche der Zellen eventuell die Bindung von Avidin an das Biotin erschweren oder eine Konformationsänderung des Protein A an der Zelloberfläche bewirken und dadurch eine Bindung des Fc-Fragments verhindern. Eine weitere Erklärung könnte die Bindung des FITC gelabelten Antikörpers an Fc-Rezeptoren der HKB-11 Zellmembran sein [163]. Dies könnte durch den Einsatz einer anderen Spezies oder Isotyps des Antikörpers verhindert oder zumindest reduziert werden. Des Weiteren könnte eine Zugabe eines hohen Überschusses von unspezifischen, nichtmarkierten Immunglobulinen derselben Spezies die Fc-Rezeptoren blockieren. Weiterführende Untersuchungen sollten diese Punkte berücksichtigen und könnten dann möglicherweise zur erfolgreichen Affinitätsmatrixfärbung auch auf Zellmembranen führen und eine Sortierung der Zellen ermöglichen.

Optimierung von Bioprozessen

2D-Fluoreszenzspektroskopie

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit zur online Prozessbeobachtung mit dem Vorteil, nicht-invasive Messungen insitu durchzuführen und innerhalb einer relativ kurzen Messzeit vielfältige Informationen über den aktuellen Stand des Prozesses zu erhalten. Insbesondere für eine möglichst optimale Prozessführung hoch komplexer Zellkulturprozesse ist der Einsatz des auf der 2D-Fluoreszenzspektroskopie basierenden BioView®-Sensors sinnvoll. Es werden wichtige Erkenntnisse sowohl über den aktuellen biologischen Zustand als auch über Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Zellumgebung erhalten, da eine Vielzahl von biologischen, chemischen und physikalischen Bioprozessgrößen simultan detektiert werden. Multivariate Auswerteverfahren, wie die Hauptkomponentenanalyse und PLS-Regression, sind essentiell, da sich auf Grund der Komplexität von Fluoreszenzdaten durch ihren hohen Informationsgehalt die Verläufe von offline Messgrößen oftmals nicht direkt mit einzelnen Fluoreszenzintensitätsverläufen korrelieren lassen. Zudem nutzen sie das gesamte 2D-Fluoreszenzspektrum auch zur Bestimmung einzelner nicht fluoreszierender Prozessgrößen, wie z. B. Glukose.

Im Rahmen der Arbeit ist die Einsatzbarkeit des BioView®-Sensors für die online Bestimmung von Prozessparametern für jeweils einen *Batch*-, *Fed-Batch*- und Perfusionsprozess in der tierischen Zellkultivierung näher untersucht worden. Verwendung fanden jeweils unterschiedliche Kulturmedien und Zelllinien (Hybridom, CHO, BHK). Diese Vielseitigkeit der Versuche diente einer möglichst umfassenden Analyse der Einsatzmöglichkeiten des Sensors bei Zellkultivierungen.

Die multivariaten Datenanalyse zeigte, dass Modellierung und Vorhersage verschiedenster Prozessparameter bei allen drei Kultivierungsmodi möglich ist. Allerdings erwies sich der *Batch*-Modus, wie erwartet, als der am einfachsten zu modellierende und vorherzusagende Prozess. Die Gründe dafür liegen in der Simplizität der Prozesse, d.h. starke Konzentrationsänderungen durch die Zellproliferation, keine Zugabe zur oder Abnahme aus der Kultursuspension sowie keine Änderungen physikalischer Parameter während des Prozesses. Der

Zellmetabolismus reagiert somit nur in Bezug auf die unterschiedlichen Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen. Diese Änderungen des Zellstoffwechsels könnten bei der Modellerstellung indirekt auf die Konzentrationen auch nicht-fluoreszenzierender Prozessgrößen hinweisen.

Die Vorhersage der Prozessparameter für den *Fed-Batch*- und insbesondere den Perfusions-Modus wiesen dagegen mehr Schwierigkeiten auf. Die Vorhersage der Prozessgrößen Lebendzellzahl, Produkt-, LDH- und Glukosekonzentration zeigte im *Fed-Batch*-Modus zwar bei einigen Kultivierungen gute Ergebnisse, waren aber im Vergleich der vier Kultivierungen in ihren Ergebnissen sehr heterogen. Die Informationen über Laktat- und Ammoniumkonzentration konnten aus den 2D-Fluoreszenzspektren nur sehr schlecht ermittelt werden. Eine nahe liegende Begründung ist die Zufütterung während der Kultivierung, ein wichtiger Unterschied zum *Batch*-Prozess. Aber auch die Änderung einiger physikalischer Parameter während der *Fed-Batch*-Kultivierungen, wie Temperatur und pH, könnten die chemometrischen Datenauswertung negativ beeinflusst haben. Darüber hinaus könnte auch die Datengewinnung mit zwei verschiedenen Verstärkungseinstellungen die Modellerstellung erschwert haben.

Die PLS1-Modellerstellung und Vorhersage für den Perfusions-Modus erwies sich auf Grund seiner gering konzentrierten Medienzusammensetzung und minimalen Zellmetabolismusänderung, wie erwartet, als problematisch. Dessen ungeachtet ist eine sehr gute Vorhersage der Lebendzellzahl gelungen (RMSEP von 3,9 %). Die Konzentrationen von Glukose, Laktat, Ammonium und Glutamat zeigten eine ähnliche Vorhersagbarkeit wie die bei den *Fed-Batch*-Kultivierungen, allerdings sind im Gegensatz dazu zum Teil bestimmte Verläufe von den Modellen nicht erkannt worden.

Im Perfusionsmodus sind des Weiteren Untersuchung über den Einfluss physikalischer Parameter auf die 2D-Fluoreszenzspektren durchgeführt worden, welche möglicherweise die multivariate Datenanalyse beeinflussen könnten. Deutlich ist dabei ein Einfluss auf den Zellstoffwechsel bestätigt worden. Dies könnte eine Erklärung für die Modellierungsprobleme des *Fed-Batch*-Prozesses sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es möglich ist, viele Prozessparameter von *Batch*-, *Fed-Batch*- und Perfusionsprozesse vorherzusagen, allerdings mit zunehmender Schwierigkeit. Eine PLS1-Modellbildung und Vorhersage höherer Güte wäre durch eine breitere Datengrundlage, als sie im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gewährleistet werden konnte, zu erzielen. Eine Untersuchung weiterer Auswerteverfahren, wie neuronaler Netze, könnten eine Verbesserungen für *Fed-Batch*- oder Perfusionsprozesse bewirken. Ein idealer Einsatzort für den BioView[®]-Sensor wären standardisierte Produktionsprozesse von pharmazeutischen Proteinen, da hier die Kultivierungen stets unter den gleichen Bedingungen ablaufen und somit die Vorhersagen der einiger Prozessgrößen mit jeder durchgeführten und ins Modell einbezogenen Kultivierung immer akkurater werden sollten.

In situ OUR Sensor

Der von Dr. Klaus Joeris von Bayer HealthCare in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie neu entwickelte *insitu OUR Sensor* ist im Rahmen dieser Arbeit auf seine Funktionalität zur online Messung der Sauerstoffaufnahme untersucht worden. Die Kenntnis der Sauerstoffaufnahme von Zellen ist essentiell für eine Beobachtung des Zellmetabolismus im Bioreaktor und könnte während der Prozessentwicklung zur Produktion von pharmazeutisch nutzbaren Proteinen mit tierischen Zellen gut einsetzbar sein. Über zwei Monate hinweg sind erfolgreich OUR Messungen während Perfusionskultivierungen von BHK Zellen durchgeführt worden. Die Sauerstoffaufnahme zeigten eine gute Korrelation zu den offline gemessenen Werten. Insbesondere für Perfusionsprozesse mit einer über lange Zeiträume konstanten Zellzahl ist diese online Messung interessant. Der Einsatz des *insitu OUR Sensors* spart aber auch Zeit und Kosten bei *Batch*- und *Fed-Batch*-Kultivierungen, da eine externe Messung des OUR mit arbeitsintensiver Probenahme und Bestimmung mit Hilfe des YSI 5300 A vermieden werden kann. Darüber hinaus kann der *insitu OUR Sensor* neben einer polarographischen Sonde als zusätzlicher Sauerstoffsensoren dienen und so die Sicherheit der Sauerstoffkontrolle im Bioreaktor erhöhen.

5 Literaturverzeichnis

1. Chmiel, H., *Bioprozesstechnik 2*. Gustav Fischer Verlag, 1991.
2. Conradt, H.S., et al., *Secretion of glycosylated human interleukin-2 by recombinant mammalian cell lines*. Carbohydr Res, 1986. **149**(2): p. 443-50.
3. Tsuda, E., et al., *The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin*. Eur J Biochem, 1990. **188**(2): p. 405-11.
4. Goochee, C.F., et al., *The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(12): p. 1347-55.
5. Jenkins, N. and E.M. Curling, *Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects*. Enzyme Microb Technol, 1994. **16**(5): p. 354-64.
6. Schmieding, J., *Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von monoklonalen und polyklonalen Antikörper für Enzymtechnik und Umweltanalytik*. 1995.
7. Altshuler, G.L., et al., *Hybridoma analysis at the cellular level*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 1986. **17**: p. 725-736.
8. Heath, C., R. Dilwith, and G. Belfort, *Methods for increasing monoclonal antibody production in suspension and entrapped cell cultures: biochemical and flow cytometric analysis as a function of medium serum content*. J Biotechnol, 1990. **15**(1-2): p. 71-89.
9. Kromenaker, S.J. and F. Srienç, *Stability of producer hybridoma cell lines after cell sorting: a case study*. Biotechnol Prog, 1994. **10**(3): p. 299-307.
10. Witkowski, J.A., *Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture*. Med Hist, 1979. **23**(3): p. 279-96.
11. Spier, R.E., *History of Animal Cell Technology*. John Wiley & Sons, 2000.
12. Castilho, L.R., et al., *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. 2008.
13. Nicoll, D.S.T., *Gentechnische Methoden*. 1995.
14. Günzburg, W. and B. Salmons, *Gentransfer in Säugerzellen*. 1997.
15. Butler, M., *Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals*. Appl Microbiol Biotechnol, 2005. **68**(3): p. 283-91.
16. Birch, J.R. and A.J. Racher, *Antibody production*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(5-6): p. 671-85.
17. Walsh, G., *Biopharmaceutical benchmarks--2003*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(8): p. 865-70.
18. Andersen, D.C., et al., *Multiple cell culture factors can affect the glycosylation of Asn-184 in CHO-produced tissue-type plasminogen activator*. Biotechnol Bioeng, 2000. **70**(1): p. 25-31.
19. Mather, J.P., *Optimizing cell and culture environment for production of recombinant proteins*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 567-77.

20. Berg, D.T., D.B. McClure, and B.W. Grinnell, *High-level expression of secreted proteins from cells adapted to serum-free suspension culture*. *Biotechniques*, 1993. **14**(6): p. 972-8.
21. Sinacore, M.S., D. Drapeau, and S.R. Adamson, *Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media*. *Mol Biotechnol*, 2000. **15**(3): p. 249-57.
22. Haldankar, R., J.J. Kopchick, and D. Ridgway, *Stable production of a human growth hormone antagonist from CHO cells adapted to serum-free suspension culture*. *Biotechnol Prog*, 1999. **15**(3): p. 336-46.
23. Henzler, H.J., *Particle stress in bioreactors*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2000. **67**: p. 35-82.
24. Kretzmer, G. and K. Schugerl, *Response of mammalian cells to shear stress*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991. **34**(5): p. 613-6.
25. Zhang, Z., Y. Chisti, and M. Moo-Young, *Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension*. *J Biotechnol*, 1995. **43**(1): p. 33-40.
26. Sybert, E.M., et al., *Effect of agitation rate and impeller design on oxygen transfer coefficients in small bioreactors using surface aeration*. *Biotechniques*, 1989. **7**(4): p. 368-73.
27. Ludwig, A., G. Kretzmer, and K. Schugerl, *Determination of a "critical shear stress level" applied to adherent mammalian cells*. *Enzyme Microb Technol*, 1992. **14**(3): p. 209-13.
28. Kaufman, R.J., *Overview of vector design for mammalian gene expression*. *Mol Biotechnol*, 2000. **16**(2): p. 151-60.
29. Kaufman, R.J., *DNA transfection to study translational control in mammalian cells*. *Methods*, 1997. **11**(4): p. 361-70.
30. Underwood, P.A. and P.A. Bean, *Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas*. *J Immunol Methods*, 1988. **107**(1): p. 119-28.
31. Bohm, E., et al., *Screening for improved cell performance: selection of subclones with altered production kinetics or improved stability by cell sorting*. *Biotechnol Bioeng*, 2004. **88**(6): p. 699-706.
32. Brezinsky, S.C., et al., *A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity*. *J Immunol Methods*, 2003. **277**(1-2): p. 141-55.
33. Wurm, F.M., *Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(11): p. 1393-8.
34. Sack, U., A. Tarnock, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik*. 2007.
35. Kain, S.R., et al., *Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization*. *Biotechniques*, 1995. **19**(4): p. 650-5.
36. Lybarger, L., et al., *Rapid generation and flow cytometric analysis of stable GFP-expressing cells*. *Cytometry*, 1996. **25**(3): p. 211-20.
37. Hunt, L., et al., *GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode*. *Biotechnol Bioeng*, 1999. **65**(2): p. 201-205.
38. Petit, J.M., M. Denis-Gay, and M.H. Ratinaud, *Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry*. *Biol Cell*, 1993. **78**(1-2): p. 1-13.

39. Sack, U., A. Tarnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007: p. 83-119.
40. Scheffold, A., et al., *High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells*. *Nat Med*, 2000. **6**(1): p. 107-10.
41. Rieseberg, M., et al., *Flow cytometry in biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. **56**(3-4): p. 350-60.
42. Moretti, P., *Anwendung der durchflusszytometrischen Zellsortierung zur Produktionssteigerung in der Säugerzellkultur*. Masterarbeit, 2006.
43. Borth, N., et al., *Comparison of the production of a human monoclonal antibody against HIV-1 by heterohybridoma cells and recombinant CHO cells: A flow cytometric study*. *Cytotechnology*, 1996. **22**(1-3): p. 129-138.
44. Couture, M.L. and C.A. Heath, *Relationship Between Loss of Heavy Chains and the Appearance of Nonproducing Hybridomas*. *Biotechnol Bioeng*, 1995. **47**: p. 270-275.
45. Frame, K.K. and W.S. Hu, *The Loss of Antibody Productivity in Continuous Culture of Hybridoma Cells*. *Biotechnol Bioeng*, 1990. **35**: p. 469-476.
46. Pendse, G.J., *Effect of cloned gene dosage on cell growth and hepatitis B surface antigen synthesis and secretion in recombinant CHO cells*. *Biotechnol Bioeng*, 1992. **40**: p. 119-129.
47. Strutzenberger, K., et al., *Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells*. *J Biotechnol*, 1999. **69**(2-3): p. 215-26.
48. Marder, P., et al., *Selective cloning of hybridoma cells for enhanced immunoglobulin production using flow cytometric cell sorting and automated laser nephelometry*. *Cytometry*, 1990. **11**(4): p. 498-505.
49. Sen, S., W.S. Hu, and F. Srienc, *Flow cytometric study of hybridoma cell culture: correlation between cell surface fluorescence and IgG production rate*. *Enzyme Microb Technol*, 1990. **12**(8): p. 571-6.
50. McKinney, K.L., R. Dilwith, and G. Belfort, *Manipulation of heterogeneous hybridoma cultures for overproduction of monoclonal antibodies*. *Biotechnol Prog*, 1991. **7**(5): p. 445-54.
51. Cherlet, M., S.J. Kromenaker, and F. Srienc, *Surface IgG content of murine Hybridomas - direct evidence for variation of antibody secretion rates during the cell-cycle*. *Biotechnol Bioeng*, 1995. **47**(5): p. 535-540.
52. Chalfie, M., *Green fluorescent protein*. *Photochem Photobiol*, 1995. **62**(4): p. 651-6.
53. Zeyda, M., et al., *Optimization of sorting conditions for the selection of stable, high-producing mammalian cell lines*. *Biotechnol Prog*, 1999. **15**(5): p. 953-7.
54. Zeyda, M., et al., *Optimization of sorting conditions for the selection of stable, high-producing mammalian cell lines*. *BIOTECHNOLOGY PROGRESS*, 1999. **15**(5): p. 953-957.
55. Bazl, M.R., et al., *Production of chimeric recombinant single domain antibody-green fluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells*. *Hybridoma (Larchmt)*, 2007. **26**(1): p. 1-9.

56. Cha, H.J., et al., *Expression and purification of human interleukin-2 simplified as a fusion with green fluorescent protein in suspended Sf-9 insect cells*. J Biotechnol, 1999. **69**(1): p. 9-17.
57. Hoque, A.T., et al., *Construction and function of a recombinant adenovirus encoding a human aquaporin 1-green fluorescent protein fusion product*. Cancer Gene Ther, 2000. **7**(3): p. 476-85.
58. Bongaerts, R.J., et al., *Green fluorescent protein as a marker for conditional gene expression in bacterial cells*. Methods Enzymol, 2002. **358**: p. 43-66.
59. Weaver, J.C., et al., *Rapid clonal growth measurements at the single-cell level: gel microdroplets and flow cytometry*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(9): p. 873-7.
60. Weaver, J.C., P. McGrath, and S. Adams, *Gel microdrop technology for rapid isolation of rare and high producer cells*. Nat Med, 1997. **3**(5): p. 583-5.
61. Powell, K.T. and J.C. Weaver, *Gel microdroplets and flow cytometry: rapid determination of antibody secretion by individual cells within a cell population*. Biotechnology (N Y), 1990. **8**(4): p. 333-7.
62. Kenney, J.S., et al., *Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web*. Biotechnology (N Y), 1995. **13**(8): p. 787-90.
63. Gray, F., J.S. Kenney, and J.F. Dunne, *Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells*. J Immunol Methods, 1995. **182**(2): p. 155-63.
64. Manz, R., et al., *Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 1921-5.
65. Borth, N., M. Zeyda, and H. Katinger, *Efficient selection of high-producing subclones during gene amplification of recombinant Chinese hamster ovary cells by flow cytometry and cell sorting*. Biotechnol and Bioeng, 2000. **71**(4): p. 266-273.
66. Schugerl, K., *Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years*. J Biotechnol, 2001. **85**(2): p. 149-73.
67. Sonnleitner, B., *Instrumentation of biotechnological processes*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2000. **66**: p. 1-64.
68. Junker, B.H. and H.Y. Wang, *Bioprocess monitoring and computer control: key roots of the current PAT initiative*. Biotechnol Bioeng, 2006. **95**(2): p. 226-61.
69. Ulber, R., J.G. Frerichs, and S. Beutel, *Optical sensor systems for bioprocess monitoring*. Anal Bioanal Chem, 2003. **376**(3): p. 342-8.
70. Wolfbeis, O.S., *Fiber-optic chemical sensors and biosensors*. Anal Chem, 2002. **74**(12): p. 2663-77.
71. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature*. J Mol Recognit, 2005. **18**(1): p. 1-39.
72. Meyer, H.-P., W. Beyeler, and A. Fiechter, *Experiences with the on-line measurement of culture fluorescence during cultivation of Bacillus subtilis, Escherichia coli and Sporotrichum thermophile*. J Biotechnology, 1984. **1**(5-6): p. 341-349.
73. Boyer, P.M. and A.E. Humphrey, *Fluorometric Behavior of a Phenol Fermentation*. Biotechnology Techniques, 1988. **2**(3).

74. Scheper, T. and K. Schügerl, *Culture fluorescence studies on aerobic continuous cultures of Saccharomyces cerevisiae*. Appl Mikrobiol Biotechnol, 1986. **23**: p. 440-444.
75. Li, J.K., et al., *Monitoring cell concentration and activity by multiple excitation fluorometry*. Biotechnology Progress, 1991. **7**: p. 21-27.
76. Horvath, J.J., S.A. Glazier, and C.J. Spangler, *In situ fluorescence cell mass measurements of Saccharomyces cerevisiae using cellular tryptophan*. Biotechnol Prog, 1993. **9**(6): p. 666-70.
77. Lindemann, C., *Anwendung der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung, Dissertation, Leibniz Universität Hannover*. 1998.
78. Marose, S., C. Lindemann, and T. Scheper, *Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring*. Biotechnol Prog, 1998. **14**(1): p. 63-74.
79. Mukherjee, J., C. Lindemann, and T. Scheper, *Fluorescence monitoring during cultivation of Enterobacter aerogenes at different oxygen levels*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. **52**(4): p. 489-94.
80. Marose, S., *Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie*. Dissertation, Universität Hannover, 1999.
81. McGovern, A.C., et al., *Monitoring of complex industrial bioprocesses for metabolite concentrations using modern spectroscopies and machine learning: application to gibberellic acid production*. Biotechnol Bioeng, 2002. **78**(5): p. 527-38.
82. Jung, B., et al., *Automated On-Line Noninvasive Optical Glucose Monitoring in a Cell Culture System*. Appl Spectroscopy, 2002. **56**(1): p. 51-57.
83. Skibsted, E., et al., *On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration*. J Biotechnol, 2001. **88**(1): p. 47-57.
84. Haack, M.B., A. Eliasson, and L. Olsson, *On-line cell mass monitoring of Saccharomyces cerevisiae cultivations by multi-wavelength fluorescence*. J Biotechnol, 2004. **114**(1-2): p. 199-208.
85. Eliasson Lantz, A., et al., *Determination of cell mass and polymyxin using multi-wavelength fluorescence*. J Biotechnol, 2005.
86. Johansson, L. and G. Liden, *A study of long-term effects on plasmid-containing Escherichia coli in carbon-limited chemostat using 2D-fluorescence spectrofluorimetry*. Biotechnol Prog, 2006. **22**(4): p. 1132-9.
87. Haack, M.B., et al., *Chemometric analysis of in-line multi-wavelength fluorescence measurements obtained during cultivations with a lipase producing Aspergillus oryzae strain*. Biotechnol Bioeng, 2007. **96**(5): p. 904-13.
88. Hisiger, S. and M. Jolicoeur, *A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity?* J Biotechnol, 2005. **117**(4): p. 325-36.
89. Surribas, A., et al., *Rivoflavin may interfere with on-line monitoring of secreted green fluorescence protein fusion proteins in Pichia pastoris*. Microb Cell Fact, 2007. **6**: p. 15.

90. Miller, W.M., C.R. Wilke, and H.W. Blanch, *Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture*. J Cell Physiol, 1987. **132**(3): p. 524-30.
91. Phillips, H.A., et al., *Effect of oxygen on antibody productivity in hybridoma culture*. Biotechnol. Lett., 1987. **9**: p. 745-750.
92. Ozturk, S.S. and B.O. Palsson, *Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture*. Biotechnol Prog, 1990. **6**(6): p. 437-46.
93. Shi, Y., D.D.Y. Ryu, and S.H. Park, *Monoclonal-Antibody productivity and the metabolic pattern of perfusion cultures under varying oxygen-tensions*. Biotechnol Bioeng, 1993. **42**(4): p. 430-439.
94. Mizrahi, A., *Oxygen in human lymphoblastoid cell line cultures and effect of polymers in agitated and aerated cultures*. Dev Biol Stand, 1983. **55**: p. 93-102.
95. Ruffieux, P.A., U. von Stockar, and I.W. Marison, *Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures*. J Biotechnol, 1998. **63**(2): p. 85-95.
96. Abu-Reesh, I. and F. Kargi, *Biological responses of hybridoma cells to hydrodynamic shear in an agitated bioreactor*. Enzyme Microb Technol, 1991. **13**(11): p. 913-9.
97. Gardner, A.R., J.L. Gainer, and D.J. Kirwan, *Effects of stirring and sparging on cultured hybridoma cells*. Biotechnol Bioeng, 1990. **35**: p. 940-947.
98. Kunas, K.T. and E.T. Papoutsakis, *Damage mechanism of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment*. Biotechnol Bioeng, 1990. **36**: p. 476-483.
99. Jordan, M., et al., *Interactions between animal cells and gas bubbles: the influence of serum and pluronic F68 on the physical properties of the bubbles surface*. Biotechnol Bioeng, 1994. **43**: p. 446-454.
100. Zhang, S., A. Handa-Corrigan, and R.E. Spier, *Foaming and media surfactant effects on the cultivation of animal cells in stirred and sparged bioreactors*. J Biotechnol, 1992. **25**(3): p. 289-306.
101. Yamada, K., et al., *Relationship between oxygen consumption rate and cellular activity of mammalian cells cultured in serum-free media*. Biotechnol Bioeng, 1990. **36**: p. 759-762.
102. Fleischaker, R.J. and A.J. Sinskey, *Oxygen-Demand and Supply in Animal-Cell Culture*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1981. **182**(Aug): p. 54-Inde.
103. Hertz, L., L. Peng, and G.A. Dienel, *Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(2): p. 219-49.
104. Sidorenko, Y., et al., *Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in glutamine- and pyruvate-containing media*. Biotechnol Prog, 2008. **24**(2): p. 311-20.
105. Cho, C.H., et al., *Oxygen uptake rates and liver-specific functions of hepatocyte and 3T3 fibroblast co-cultures*. Biotechnol Bioeng, 2007. **97**(1): p. 188-99.

106. Schneider, N., et al., *Oxygen consumption of equine articular chondrocytes: Influence of applied oxygen tension and glucose concentration during culture*. *Cell Biol Int*, 2007. **31**(9): p. 878-86.
107. Kyung, Y.S., et al., *High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements*. *Cytotechnology*, 1994. **14**(3): p. 183-90.
108. Jorjani, P. and S.S. Ozturk, *Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines*. *Biotechnol Bioeng*, 1999. **64**(3): p. 349-56.
109. John, G.T., et al., *Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation*. *Biotechnol Bioeng*, 2003. **81**(7): p. 829-36.
110. Deshpande, R.R. and E. Heinzle, *On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors*. *Biotechnol Lett*, 2004. **26**(9): p. 763-7.
111. Backer, M.P., et al., *Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture*. *Biotechnol Bioeng*, 1988. **32**: p. 993-1000.
112. Boraston, R., et al., *Growth and Oxygen Requirements of Antibody-Producing Mouse Hybridoma Cells in Suspension-Culture*. *Developments in Biological Standardization*, 1983. **55**: p. 103-111.
113. Dorresteyn, R.C., et al., *Online estimation of the biomass activity during animal-cell cultivations*. *Biotechnol Bioeng*, 1996. **51**: p. 206-214.
114. Hiller, G.W., et al., *A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in continuous suspension culture on serum free medium*. *Biotechnol Bioeng*, 1991. **38**: p. 733-741.
115. Ramirez, O.T. and R. Mutharasan, *Cell cycle and growth phase dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures*. *Biotechnol Bioeng*, 1990. **36**: p. 839-848.
116. Singh, V., *On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method*. *Biotechnol Bioeng*, 1996. **52**(3): p. 443-448.
117. Yoon, S. and K.B. Konstantinov, *Continuous, Real-Time Monitoring of the Oxygen-Uptake Rate (Our) in Animal-Cell Bioreactors*. *Biotechnol Bioeng*, 1994. **44**(8): p. 983-990.
118. Zhou, W.C. and W.S. Hu, *Online characterization of a hybridoma cell-culture process*. *Biotechnol Bioeng*, 1994. **44**: p. 170-177.
119. Taguchi, H. and A.E. Humphrey, *Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems*. *J. Ferment. Technol.*, 1966. **44**: p. 881-889.
120. Behrendt, U., et al., *Mass spectrometry: a tool for on-line monitoring of animal cell cultures*. *Cytotechnology*, 1994. **14**(3): p. 157-65.
121. Heinzle, E., *Present and potential applications of mass spectrometry for bioprocess research and control*. *J Biotechnol*, 1992. **25**(1-2): p. 81-114.
122. Jenkins, R.R., R. Friedland, and H. Howald, *The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle*. *Int J Sports Med*, 1984. **5**(1): p. 11-4.

123. Nanri, H. and S. Minakami, *Heat production of pig platelets in relation with glycolysis and respiration*. Biomed Biochim Acta, 1983. **42**(4): p. 315-21.
124. Cho, M.S., et al., *Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins*. Biotechnol Prog, 2003. **19**(1): p. 229-32.
125. Mei, B., et al., *Expression of Human Coagulation Factor VIII in a Human Hybrid Cell Line, HKB11*. Mol Biotechnol, 2006. **34**(2): p. 165-78.
126. Lanks, K.W., *End products of glucose and glutamine metabolism by L929 cells*. J Biol Chem, 1987. **262**(21): p. 10093-7.
127. Omasa, T., et al., *Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation*. Biotechnol Bioeng, 1992. **39**(5): p. 556-64.
128. Stryer, L., *Biochemie*. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, 1990.
129. Karlson, P., *Biochemie*. Georg Thieme Verlag, 1988.
130. Neermann, J. and R. Wagner, *Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells*. J Cell Physiol, 1996. **166**(1): p. 152-69.
131. Lanks, K.W. and P.W. Li, *End products of glucose and glutamine metabolism by cultured cell lines*. J Cell Physiol, 1988. **135**(1): p. 151-5.
132. Bedard, C., R. Tom, and A. Kamen, *Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism*. Biotechnol Prog, 1993. **9**(6): p. 615-24.
133. Fitzpatrick, L., H.A. Jenkins, and M. Butler, *Glucose and glutamine metabolism of a murine B-lymphocyte hybridoma grown in batch culture*. Appl Biochem Biotechnol, 1993. **43**(2): p. 93-116.
134. Petch, D. and M. Butler, *Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization*. J Cell Physiol, 1994. **161**(1): p. 71-6.
135. Schulz, C., *Charakterisierung und gezielte Optimierung des primären Energiestoffwechsels von kontinuierlichen Zelllinien zur Produktion rekombinanter pharmazeutischer Proteine*. Dissertation, Universität Carolus-Wilhelmina zu Braunschweig, 2003.
136. Boxer, G.E. and T.M. Devlin, *Pathways of intracellular hydrogen transport*. Science, 1961. **134**: p. 1495-501.
137. McKeehan, W.L., *Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation*. Cell Biol Int Rep, 1982. **6**(7): p. 635-50.
138. Dietzen, D.J. and E.J. Davis, *Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1993. **305**(1): p. 91-102.
139. Vriezen, N. and J.P. van Dijken, *Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture*. Biotechnol Bioeng, 1998. **59**(1): p. 28-39.
140. Perez-Rodriguez, J., et al., *Malate-citrate cycle during glycolysis and glutaminolysis in Ehrlich ascites tumor cells*. Biochimie, 1987. **69**(5): p. 469-74.
141. Donnelly, M. and I.E. Scheffler, *Energy metabolism in respiration-deficient and wild type Chinese hamster fibroblasts in culture*. J Cell Physiol, 1976. **89**(1): p. 39-51.
142. Zielke, H.R., C.L. Zielke, and P.T. Ozand, *Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells*. Fed Proc, 1984. **43**(1): p. 121-5.

143. Reitzer, L.J., B.M. Wice, and D. Kennell, *Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells*. J Biol Chem, 1979. **254**(8): p. 2669-76.
144. Tritsch, G.L. and G.E. Moore, *Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media*. Exp Cell Res, 1962. **28**: p. 360-4.
145. Ozturk, S.S. and B.O. Palsson, *Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor*. Biotechnol Prog, 1991. **7**(6): p. 481-94.
146. Borth, N., et al., *Growth and production kinetics of human x mouse and mouse hybridoma cells at reduced temperature and serum content*. J Biotechnol, 1992. **25**(3): p. 319-31.
147. Hayter, P.M., N.F. Kirkby, and R.E. Spier, *Relationship between hybridoma growth and monoclonal antibody production*. Enzyme Microb Technol, 1992. **14**(6): p. 454-61.
148. Merten, O.W., et al., *Batch production and secretion kinetics of hybridomas: pulse-chase experiments*. Cytotechnology, 1990. **4**(1): p. 77-89.
149. Miller, W.M., 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*. Biotechnol Bioeng, 1988. **32**: p. 947-965.
150. Seifert, D.B. and J.A. Phillips, *The production of monoclonal antibody in growth-arrested hybridomas cultivated in suspension and immobilized modes*. Biotechnol Prog, 1999. **15**(4): p. 655-66.
151. Alberts, A.B.J., et al., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002.
152. Kromenaker, S.J. and F. Srienc, *Cell cycle kinetics of the accumulation of heavy and light chain immunoglobulin proteins in a mouse hybridoma cell line*. Cytotechnology, 1994. **14**(3): p. 205-18.
153. Dinnis, D.M. and D.C. James, *Engineering mammalian cell factories for improved recombinant monoclonal antibody production: lessons from nature?* Biotechnol Bioeng, 2005. **91**(2): p. 180-9.
154. Al-Rubeai, M., et al., *Specific monoclonal antibody productivity and the cell cycle-comparisons of batch, continuous and perfusion cultures*. Cytotechnology, 1992. **9**: p. 85-97.
155. Al-Rubeai, M., S. Rookes, and A. Emery, *Flow cytometric studies during synchronous and asynchronous suspension cultures of hybridoma cells*. In *Advances in Animal Cell Biology and Technology* (Spier, R. E., ed.), pp. 241-245, Butterworths, 1989.
156. Coco-Martin, J.M., et al., *The potential of flow cytometric analysis for the characterization of hybridoma cells in suspension cultures*. Cytotechnology, 1992. **8**: p. 65-74.
157. Kromenaker, S.J. and F. Srienc, *Effect of lactic acid on the kinetics of growth and antibody production in a murine hybridoma: secretion patterns during the cell cycle*. J Biotechnol, 1994. **34**(1): p. 13-34.
158. Altshuler, G.L., et al., *Hybridoma analysis at the cellular level*. Biotechnol Bioeng Symp, 1986. **17**: p. 725-736.

159. Cho, M.S., H. Yee, and S. Chan, *Establishment of a human somatic hybrid cell line for recombinant protein production*. J Biomed Sci, 2002. **9**: p. 631-638.
160. Hu, W.-S., *An advanced course in cellular Bioprocess Technology - Stoichiometry and Kinetics of Cell Growth and Product Formation*. University of Minnesota, 2006.
161. Landgrebe, D., *Einsatz von 2D-Fluoreszenzspektroskopie und Zellsortierung zur Optimierung von Zellkulturprozessen*. Diplomarbeit, 2008.
162. Ruoslahti, E., *RGD and other recognition sequences for integrins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 697-715.
163. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*, 5. Aufl. 2002.
164. Gyorgy, P., et al., *Egg-White Injury As The Result Of Nonabsorption Or Inactivation Of Biotin*. Science, 1941. **93**(2420): p. 477-478.
165. Wilchek, M. and E.A. Bayer, *Introduction to avidin-biotin technology*. Methods Enzymol, 1990. **184**: p. 5-13.
166. Butler, M. and H. Jenkins, *Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture*. Journal of Biotechnology, 1989. **12**: p. 97-110.
167. Schneider, M., I.W. Marison, and U. von Stockar, *The importance of ammonia in mammalian cell culture*. J Biotechnol, 1996. **46**: p. 161-185.
168. Stärk, E., *Bioprozessanalytik durch Online-Vorhersage von Bioprozessgrößen mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie und multivariater Auswerteverfahren*. Dissertation, 2002.
169. Joliffe, I.T., *Principal Component Analysis*. Springer Verlag, 1986.
170. Hantelmann, K., *Nicht-invasive Analysemethoden und multivariate Datenauswertung zur automatisierten Beobachtung und Regelung von Bioprozessen*. Dissertation, 2005.
171. Hartung, J. and B. Elpelt, *Multivariate Statistik*. Verlag Oldenburg, München, Wien, 1999. **6. Auflage**.
172. Wold, H., *Modeling by latent variables: the non-linear iterative partial least squares approach*. in J. Gani (ed): Perspectives in Probability and Statistics, Academic Press, 1975.
173. Warnock, J.N. and M. Al-Rubeai, *Bioreactor systems for the production of biopharmaceuticals from animal cells*. Biotechnol Appl Biochem, 2006. **45**(Pt 1): p. 1-12.
174. Fox, S.R., et al., *Maximizing Interferon- γ Production by Chinese Hamster Ovary Cells Through Temperature Shift Optimization: Experimental and Modeling*. Biotechnol Bioeng, 2003. **85**(2): p. 177-184.
175. Jardon, M. and A. Garnier, *pH, pCO₂, and temperature effect on R-adenovirus production*. Biotechnol Prog, 2003. **19**(1): p. 202-8.
176. Lienhart, R., W. Lichtensteiger, and H. Langemann, *Response of nigral dopamine neurons to acute and prolonged morphine treatment: effect of exposure to cold, physostigmine and nicotine*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1975. **286**(4): p. 353-69.
177. Trummer, E., et al., *Process parameter shifting: Part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors*. Biotechnol Bioeng, 2006. **94**(6): p. 1033-44.

178. Anton, F., *Kultivierung von Produktionszelllinien und Entwicklung effizienter Analytik- und Aufreinigungsverfahren für die Zielproteine*. 2008.
179. Prendergast, F. and K. Mann, *Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from Aequorea forskålea*. *Biochemistry*, 1978. **17**(17): p. 3448-53.
180. Tsien, R., *The green fluorescent protein*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 509-44.
181. Phillips, G., *Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization*. *FEMS Microbiol Lett*, 2001. **204**(1): p. 9-18.

6 Anhang

6.1 Methoden

6.1.1 Kulturmedien und Puffer

Kulturmedien für Hybridomzelllinie IV F 19.23

Serumfrei: Hybridoma-SFM mit minimalen Proteingehalt (Gibco, Österreich) und 1 % Penicilin/Streptomycin (PAA, Österreich)

Kulturmedium für HKB-11 Zelllinie

DMEM mit 5 % FCS (PAA, Österreich) und 1 % Penicilin/Streptomycin (PAA, Österreich)

Phosphate Buffered Saline (PBS)

140 mM NaCl

27 mM KCl

7,2 mM Na₂HPO₄

14,7 mM KH₂PO₄

Eingestellt auf pH = 7,4

OPA-Reagenz

270 mg Ortho-Phtaldialdehyd (Opa) werden in 5 mL Ethanol aufgelöst. 200 µL Mercaptoethanol (MCE) werden zugefügt und mit 0,4 M Boratpuffer (12,36 g Borsäure/500 mL) pH 9,5 auf 50 mL aufgefüllt.

6.1.2 Eingesetzte Zelllinien

Hybridomzelllinie IV F 19.23

Die *murine*-Hybridomzelllinie wurde von Schmieding *et al.* entwickelt und 2005 an das Institut für Technische Chemie weitergegeben [6]. Die Hybridomzellen, welche IgG 1 gegen Penicillin G Amidase aus *E.coli* ATCC 11105 produzieren, sind nach Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit gereinigter Penicillin Amidase aus der Fusion der Milzzellen mit PAI/O Myelomzellen hervorgegangen. Nach einer Adaption der Zelllinie von serumhaltigen an serumfreie Kultivierungsbedingungen, wird sie nun standardmäßig in serumfreiem Medium (Hybridoma-SFM) der Firma Gibco™ (Österreich) in Suspension kultiviert [178]. Die Kultivierung der Zellen erfolgt üblicherweise in 250 ml Spinnerflaschen befüllt mit 100 ml Zellsuspension. Diese werden in Inkubatoren mit 37°C und 5% CO₂ platziert und bei etwa 20 rpm gerührt. Eine Passage der Zellen erfolgt alle 2 Tage, um ein exponentielles Wachstum beizubehalten.

HKB-11 Zelllinie

Die Hybrid-Zelllinie HKB-11, welche von der Firma Bayer HealthCare zur Verfügung gestellt wurde, wurde aus der Fusion von menschlichen Nieren- und B-Zellen von Cho *et al.* bei Bayer HealthCare, USA hergestellt [124, 159]. Die Zelllinie produziert Fc-Fragmente von humanem IgG und ist semi-adhärent wachsend, d.h. sie kann sowohl adhärent als auch suspendiert kultiviert werden.

BHK Zelllinie

Die rekombinante BHK Zelllinie, die für die Messungen bei der Firma Bayer HealthCare eingesetzt wurde, produziert den Blutgerinnungsfaktor VIII und wird in Suspension kultiviert. Genauere Angaben zu dieser Zelllinie können an dieser Stelle auf Grund der Geheimhaltung nicht gemacht werden.

CHO-Zelllinie

Die rekombinante CHO-Zelllinie, die für die Messungen bei der Firma Roche Diagnostik GmbH eingesetzt wurde, produziert einen Antikörper und wird in

Suspension kultiviert. Genauere Angaben zu dieser Zelllinie können an dieser Stelle auf Grund der Geheimhaltung nicht gemacht werden.

6.1.3 Zellkultivierung

Auftauen von Säugerzellen

Säugerzellen können bei -196 °C in flüssigen Stickstoff über einen längeren Zeitraum in Kryogefäßen gelagert werden. Zum Ankultivieren werden die Kryogefäßen in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen in der Zellsuspension vorhanden ist. Diese wird anschließend in ein mit 37 °C warmem Medium gefülltes Zellkulturgefäß (z.B. T-Flasche, Spinnerflasche) überführt. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen in frisches Medium umgesetzt. Dazu wird die Zellsuspension bei 400 g 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Dies dient dem Entfernen des zytotoxischen DMSO (Dimethylsulfoxid).

Kultivieren von Säugerzellen

Die Kultivierung der Suspensionszellen in T-Flaschen und Spinnerflaschen erfolgt in 37 °C warmen Inkubatoren, die eine hohe Luftfeuchtigkeit sowie eine 5% CO_2 Atmosphäre bereitstellen. Die Spinnerflaschen werden für die Kultivierung von Suspensionszellen eingesetzt, da hier die Zellen mittels eines Rührers in Lösung gehalten und dadurch auch optimal mit Nährstoffen versorgt werden. T-Flaschen und verschiedene Lochplatten haben geeignete Oberflächen für die Zelladhäsion und werden daher vorwiegend für die Kultivierung von adhären Zellen verwendet.

T-Flaschen werden bei Suspensionszellen nur in Ausnahmefällen eingesetzt z.B. bei einer zu geringen Zelldichte nach dem Auftauen, da hier im Vergleich zu Spinnerflaschen ein geringeres Medienvolumen benötigt wird (20 ml vs. 50 ml).

Bioreaktorkultivierung der Hybridomzelllinie IV F 19.23

Eine Biostat® B Einheit diente der Regelung der Parameter pH Wert, Temperatur und Sauerstoffkonzentration. Die Konstanz dieser physikalischen Parameter ist sehr wichtig, da diese Einfluss auf die Fluoreszenzintensitäten nehmen könnten. Ein Magnetrührer sorgt für eine homogene Durchmischung. Die Inokulation des Bioreaktors erfolgte mit ca. $0,15 \times 10^6$ Zellen/ml über eine Animpfflaschen unter Nutzung einer Sterilwerkbank. Die Zellen der Arbeitszellbank sind nach dem Auftauen zunächst in T-Flaschen und nach 2 Tagen in Spinnerflaschen überführt worden. Diese dienten auch der Vermehrung der Zellen bis zur geeigneten Zelldichte für die Inokulation des Bioreaktors.

6.1.4 Analytik

6.1.4.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität erfolgt in einer Neubauer improved-Zählkammer (Brand GmbH & Co KG). Parallel dazu wird eine Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaulösung durchgeführt. Dazu wird die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung (0,4 %) verdünnt. Unter dem Mikroskop können dann lebende von toten Zellen unterschieden werden.

6.1.4.2 Bestimmung von Glukose und Laktat

Das zellfreie Kulturmedium kann direkt auf Glucose und Laktat untersucht werden. Hierzu wird ein automatisches Analysesystem benutzt, das auf einer enzymatischen und elektrochemischen Reaktion basiert (YSI 2700 SELECT Yellow springs Instrument).

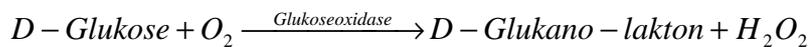
Probenvorbereitung:

- Zentrifugation der Zellkulturprobe für 3 min bei 400 g
- Für die Messung werden 100 µl zellfreier Kulturüberstand benötigt

Der YSI 2700 SELECT ist ein Gerät, das zur Bestimmung von Glukose- bzw. Laktatkonzentrationen Anwendung findet. Die Messung erfolgt über Enzymelektroden. Die Elektrode besteht aus Glukoseoxidase bzw. L-Laktatoxidase, die als immobilisierte Enzyme zwischen einer Membran aus Polycarbonat und einer zweiten Membran aus Zelluloseacetat vorliegen. Die Membranen sind für Glukose bzw. Laktat und Sauerstoff durchlässig, weshalb in Abhängigkeit von der Glukose-/ Laktatkonzentration Wasserstoffperoxid gebildet wird. Wasserstoffperoxid, diffundiert durch die Zellulosemembran und oxidiert an einer Elektrode (Platinanode). Durch die Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül Wasserstoffperoxid wird ein elektrisches Signal gesetzt, das über eine entsprechende Elektronik gemessen werden kann.

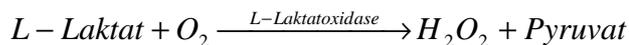
Glukose Messung

In Anwesenheit von Glukoseoxidase wird D-Glukose zu Wasserstoffperoxid und D-Glukano-lakton oxidiert.



Laktat Messung

Laktat oxidiert in Anwesenheit von Laktatoxidase unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Pyruvat



6.1.4.3 Maus IgG- Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung des IgG-Gehalts im Kulturüberstand der Hybridomzelllinie IV F 19.23 erfolgt nach Herstellerangaben anhand eines ELISA Tests spezifisch für Maus-IgG (Roche Applied Science). Die Proben wurden für die Analyse in einem Verhältnis 1:500 mit Blocking-Puffer verdünnt.

6.1.4.4 *Fc-Fragment-Konzentrationsbestimmung*

Die Bestimmung des humanen Fc-Fragmentgehalts im Kulturüberstand der HKB-11 Zelllinie erfolgte anhand eines ELISA Tests spezifisch entwickelt von der Firma Bayer HealthCare.

Coating Puffer (1 l)

4,2 g NaHCO₃

Auffüllen mit ddest. H₂O auf 1 l

Waschpuffer (1 l)

7,65 g NaCl

1,76 mg Na₂PO₄

0,1 g NaPO₄

211 mg KPO₄

1 ml Tween 20 (0,05 %)

Auffüllen mit ddest. H₂O auf 1 l

Dilution Puffer (100 ml)

1 g BSA (Sigma-Aldrich) in 100 ml PBS

Durchführung:

1.Tag:

Platte beschichten: 1µl/ml Antikörper (AffiniPure F(ab')₂ Fragment Ziegen Anti-human IgG, Fc-Fragment spezifisch) verdünnt in Coating Puffer (3,85 µl Antikörper auf 5 ml Coating Puffer/Platte). In jedes Well 50 µl einfüllen. Platte versiegeln und über Nacht bei 4°C einwirken lassen

2.Tag:

- Platte für 30 min auf RT erwärmen
- Verdünnungen der Standardproben (Humanes IgG Fc-Fragment) (Start bei 1 µl/ml und 2-fache Verdünnungen ansetzen) und der zu messenden Proben ansetzen mit Dilution Puffer
- Platte 4 x mit Waschpuffer waschen
- Doppelbestimmung der Standards und der Proben. Beladung mit jeweils 50 µl/well
- Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur
- Platte 4 x mit Waschpuffer waschen
- HRP-gebundener Rabbit Anti-human IgG Antikörper 1:10000 Verdünnung in Dilution Puffer. Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h
- Platte 4 x mit Waschpuffer waschen
- 50 µl/well TMB Substrat Lösung – Inkubation bis das 5. Well Färbung zeigt
- Abstoppen mit 50 µl/well 1M HCl
- Einlesen bei 450 nm/570 nm

6.1.4.5 Aminosäurekonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentrationen der Aminosäuren im Kulturüberstand der verschiedenen Zelllinien erfolgte mittels HPLC aus zellfreien Proben. Es wird zunächst eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Phtaldialdehyd (OPA) durchgeführt.

Säule C: 18, 5 µm, 3,9 ·150 mm

Flussrate: 1 ml/ml

Detektion: Fluoreszenz bei Ex 330 nm, Em 420 nm

Eluent A:

2 l H₂O (0,05 M Natrium Trihydrat, 0,05 M Natriumdihydrogenphosphat)

5 ml NaOH (10 M)

42 ml Tetrahydrofuran

42 ml Methanol

Eluent B:

920 ml H₂O

1080 ml Ethanol

OPA-Reagenz

270 mg OPA in 5 ml Ethanol

200 µl Mercaptoethanol

Auffüllen auf 500 ml mit 0,4 M Boratpuffer (24,72 g Borsäure/l, pH 9,5)

Gradient

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

Tabelle 13: Elutionsgradient für die Bestimmung der Aminosäurenkonzentration im Kulturüberstand.

6.1.5 Färbemethoden für die Durchflusszytometrie

6.1.5.1 Affinitätsmatrix Färbung der Hybridom Zellen IV F 19.23 [65]

- Verwendung von $1 \cdot 10^7$ Zellen aus der späten exponentiellen Phase
- 1 x Waschen in PBS
- *Biotinylierung*: Resuspension in 1 ml serumfreiem Medium mit 1 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin
- *Inkubation*: 30 min bei RT
- 1 x Waschen in serumfreiem Medium bei 4 °C
- 1 x Waschen in PBS bei 4°C
- *Avidin Bindung*: Resuspension in 1 ml PBS mit 20 µg/ml Avidin (Konzentration: 2 mg/ml)
- *Inkubation*: 10 min bei RT
- 1 x Waschen in 10 ml PBS bei 4°C
- *Anti Fc AK/Biotin Bindung*: Resuspension in 400 µl in Medium mit 1:10 anti Fc AK/Biotin Verdünnung
- *Inkubation*: 10 min bei 4°C
- Zentrifugation bei 4°C
- Resuspension in 2 x 50 ml Medium + Gelatine (2 ml 20 % Gelatine in Medium bei 37 °C aufgewärmt)
- *Inkubation*: 60 min bei 37°C
- 1 x Waschen in 10 ml PBS bei 4°C
- *FITC-Markierung mit Anti Fab AK/FITC*: 400 µl serumfreiem Medium mit 1:20 anti Fab AK/FITC (Konzentration: 1,33 mg/ml)
- *Inkubation*: 30 - 60 min bei 4°C
- Kurz vor der Messung/Sortierung 6 µl /ml sterilfiltriertes PI (50 µg/ml PI in 0,9 % NaCl) zur Zellsuspension zugeben
- *Messungen*: FACS, Mikroskop, Durchflusszytometer, Zellzahlbestimmung

6.1.5.2 Affinitätsmatrix Färbung der HKB-11 Zellen

Die Affinitätsmatrix ist für die Überprüfung der Bindungen der einzelnen Komponenten mit 1×10^6 Zellen durchgeführt worden. Ein Waschschrift beinhaltet eine Zentrifugation ($400 \times g$, 3 min.), wobei der Überstand verworfen wird.

- Waschen mit 3 ml PBS
- *Biotinylierung*: Resuspension in 1 ml DMEM mit 15 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin
- *Inkubation*: 30 min bei RT
- Waschen mit 3 ml PBS
- *Avidinbindung*: Resuspension in 1 ml PBS mit 0,2 μ g Avidin
- *Inkubation*: 10 min bei RT
- Waschen mit 10 ml PBS
- Waschen in 1 ml DMEM
- *Protein A-Bindung*: Resuspension in 400 μ l DMEM mit 13 μ g Protein A
- *Inkubation*: 10 min bei 4° C
- Zentrifugation ($400 \times g$, 3 min.)
- Resuspension in 10 ml DMEM mit 5 % Gelatine
- *Sekretionsphase*: Inkubation (60 min, 37° C)
- Waschen mit 5 ml PBS
- *Bindung von Anti-Fc-Fragment AK + FITC*: Resuspension in 400 μ l Medium mit 20 μ g Anti-Fc-Fragment AK + FITC, Inkubation (45 min, 4° C)
- Waschen mit 3 ml PBS
- Aufnehmen des Pellets in 1 ml PBS

Für die Funktionalitätsuntersuchungen sind die Färbungen abgekürzt, d.h. entsprechende Schritte ausgelassen, bzw. anstelle des FITC gelabelten Antikörpers ist Cy3 gelabeltes Streptavidin verwendet worden.

6.1.5.3 *Fixierung mit MeOH*

(in Anlehnung an Srienc et al. (1994))

- Zentrifugation der Zellen für 3 min bei 400 g
- 1 x Waschen in kalten PBS
- Resuspension in 100 μ L kalten PBS
- Unter Schütteln vorsichtiges Zutropfen zu 900 μ L eiskalten MeOH (Mixer 300 $U \text{ min}^{-1}$)
- Gut vermischen
- Einfrieren bei -20°C

6.1.5.4 *Intrazelluläre Färbung*

- Verwendung von MeOH fixierte Zellen
- 1 x Waschen mit PBS
- *RNAse Abbau*: Resuspension in 2 ml RNAse (2 mg/ml)
- *Inkubation*: 30 min bei RT
- Zellzahlbestimmung und Verwendung von $2 \cdot 10^6$ Zellen
- Zentrifugation: 3 min bei 400 g
- *Anti-Fab Antikörper-FITC Färbung*: Resuspension in 100 μ l Anti-Fab Antikörper-FITC (1:150 Verdünnung)
- *Inkubation*: 60 min bei 37°C
- 1 x Waschen in PBS
- Resuspension in 500 μ l PBS
- *PI-Färbung*: Zugabe von 250 μ l PI (50 $\mu\text{g/ml}$ PI in 0,9 % NaCl)
- *Inkubation*: 15 min bei RT
- Messung mit dem Durchflusszytometer

6.1.5.5 Bestimmung der spezifischen Produktionsgeschwindigkeit

Im *Batch*-Modus wird die Produktionskinetik mit folgender Differenzialgleichung beschrieben:

$$\frac{dP}{dt} = qP \cdot x \quad (7)$$

P = IgG Konzentration [mg/ml]

x = lebende Zellzahl [Zellen/ml]

qP = spezifische IgG-Produktionsgeschwindigkeit [mg IgG/h · Zelle]

t = Kultivierungszeit [h]

Zur Bestimmung der spezifischen Produktionsgeschwindigkeit qP werden die differenziale und integrale Methode von Ozturk *et al.* verwendet [17].

Differenzielle Methode

Für die differenzielle Methode muss eine Regression der IgG - Konzentration über die Zeit mit einem Polynom 4ten oder 3ten Grades vorgenommen werden. Diese Regressionsfunktion wird P(t) genannt. Die Ableitung P'_t der Regressionsfunktion bei t wird numerisch ermittelt, um qP zur Zeit t zu berechnen und durch die gemessene Lebendzellzahl zu diesem Zeitpunkt dividiert:

$$qP_t = \frac{P'_t}{x_t} \quad (8)$$

qP = spezifische IgG-Produktionsgeschwindigkeit zur Zeit t [mg IgG/h · Zelle]

P(t) = Regressionsfunktion der IgG-Konzentration über die Zeit

P'_t = Ableitung von P(t) zur Zeit t [mg IgG/ml · h]

x_t = Zellzahl lebender Zellen zur Zeit t [Zellen/ml]

Um den Verlauf von qP im Laufe einer Kultivierung zu modellieren, wird eine Regression anhand eines Polynoms 4ten Grades der Zellzahl x über die Zeit verwendet. Die Ableitungsfunktion P'(t) statt P'_t und die Ableitungsfunktion X(t)

statt x_t werden dann in Gleichung 8 verwendet, um qP-Werte über den betrachteten Zeitraum zu berechnen [42]:

$$qP(t) = \frac{P'(t)}{X(t)} \quad (9)$$

qP = spezifische IgG-Produktionsgeschwindigkeit zur Zeit t [mg IgG/h · Zelle]

P(t) = Regressionsfunktion der IgG-Konzentration über die Zeit

P'(t) = Ableitungsfunktion von P(t)

X(t) = Regressionsfunktion der Zellzahl x über die Zeit

6.1.6 Protein-Microarray Färbeprotokolle

Microarrays für die Funktionalitätsuntersuchung der Affinitätsmatrixfärbung für die Hybridomzellen IV F 19.23

Verwendung fanden Protein-Microarrays beschichtet mit einer weißen Nitrocellulosemembran, Dicke: 10 µm, Prototyp (Sartorius Stedim Biotec AG, Göttingen). Jeder Microarray wurde zur statistischen Auswertbarkeit mit 10 Replikaten durchgeführt.

- Alle vier Microarrays wurden mit Avidin gespottet
 - Avidin in PBS (Konz.: 1 mg/ml)
 - 800 µl pro Spot
- 15 min Inkubation bei RT
- 30 min blocken mit PBS und 1% BSA bei RT
- 3 x 5 min waschen mit PBS und 0,05% Tween 20
- Aufbringen einer Hybridisierungskammer (Secure Seal Hybridisation Chamber) auf den Slide. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der bedruckte Bereich des Microarrays nicht austrocknet.
- Befüllen der Hybridisierungskammer mit den verschiedenen Proteinlösungen (oder zu bindende Targets). Dabei werden 800 µl verwendet, dafür werden die Proteine mit 0,2 % TopBlock in PBS verdünnt.
 - 2 µg/ml Antikörper-Biotin (A)

- 20 µg/ml Antikörper-FITC (B)
- 2 µg/ml Antikörper-Biotin (C)
- 2 µg/ml Antikörper-Biotin (D)
- Die Bindung des Targets wird bei 25 °C unter Schütteln (300 rpm) auf einem Thermomixer mit Slide-Aufsatz durchgeführt.
- 1 h Inkubation
- Freilegen der Slides
- 3 x 5 min waschen mit PBS und 0,05 % Tween 20 (nach Verwendung fluoreszenzmarkierter Proteine wird unter Lichtausschluss gewaschen)

→ *Microarray*-Experiment B ist abgeschlossen

- Weitere Schritte bei *Microarrays* A, C und D. Die Bindung der Targets erfolgt wiederum mit jeweils einer 1 h Inkubationszeit und Waschschritten mit PBS und 0,05 % Tween 20 vor und nach der Hybridisierung.

- *Microarrays* A:
 - 2 µg/ml IgG-Standard
 - 20 µg/ml Antikörper-FITC
- *Microarrays* C:
 - 2 µg/ml IgG-Standard
 - 2 µg/ml Antikörper-FITC
- *Microarrays* D:
 - 2 µg/ml Antikörper-FITC

***Microarrays* für die Funktionalitätsuntersuchung der Affinitätsmatrixfärbung für die HKB-11 Zelllinie**

Verwendung fanden Protein-*Microarrays* beschichtet mit einer weißen Nitrocellulosemembran (direkt gezogen), Dicke: 10 µm, Prototyp (Sartorius Stedim Biotec AG). Jeder Versuch wurde zur statistischen Auswertbarkeit mit 10 Replikaten durchgeführt.

- Die *Microarrays* A, C, E, F wurden mit Avidin gespottet
 - Avidin in PBS (Konz.: 1 mg/ml)

- Die *Microarrays* B, D und H wurden mit biotinyliertem Protein A gespottet
 - Protein A in PBS (Konz.: 1 mg/ml)
 - Der *Microarray* G wurde mit Streptavidin gespottet
 - Streptavidin in PBS (Konz.: 1 mg/ml)
 - Es sind jeweils 800 pl aufgetragen worden.
 - 15 min Inkubation bei RT
 - 30 min blocken mit PBS und 1% BSA bei RT
 - 3 x 5 min waschen mit PBS und 0,05% Tween 20
 - Aufbringen einer Hybridisierungskammer auf den Slide. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der bedruckte Bereich des *Microarrays* nicht austrocknet.
 - Befüllen der Hybridisierungskammer mit den verschiedenen Proteinlösungen (oder zu bindende Targets). Dabei werden 800 µl verwendet, dafür werden die Proteine mit 0,2 % TopBlock in PBS verdünnt.
 - 2 µg/ml Antikörper-FITC (A, B)
 - 2 µg/ml Fc-Fragment (C, D)
 - 2 µg/ml Protein A (E, F, G)
 - 2 µg/ml Streptavidin Cy3 (H)
 - Die Bindung des Targets wird bei 25 °C unter Schütteln (300 rpm) auf einem Thermomixer mit Slide-Aufsatz durchgeführt.
 - 1 h Inkubation
 - Freilegen der Slides
 - 3 x 5 min waschen mit PBS und 0,05 % Tween 20 (nach Einsatz fluoreszenzmarkierter Proteine wird unter Lichtabschluss gewaschen)
- *Microarray*-Experimenten A, B und H ist abgeschlossen
- Weitere Färbeschritte bei *Microarrays* C, D, E, F, G, H. Die Bindung der Targets erfolgt wiederum mit jeweils einer 1 h Inkubationszeit und Waschschritten mit PBS und 0,05 % Tween 20 vor und nach der Hybridisierung.
 - *Microarray* C:
 - 2 µg/ml Antikörper-FITC
 - *Microarray* D:

- 2 µg/ml Antikörper-FITC
- *Microarray E*:
 - 2 µg/ml Fc-Fragment
 - 2 µg/ml Antikörper-FITC
- *Microarray F*:
 - 2 µg/ml Streptavidin Cy3
- *Microarray G*:
 - 2 µg/ml Fc-Fragment
 - 2 µg/ml Antikörper-FITC

6.1.7 2D-Fluoreszenzspektrometrie

Der BioView® – Sensor wird hergestellt von der Firma DELTA Light & Optics, Dänemark, und ist ein robustes Fluoreszenzmessgerät, welches in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover für den industriellen Einsatz entwickelt wurde [77]. Der Sensor verwendet zur Aufnahme zwei unabhängig voneinander rotierende Filterräder mit je 16 verschiedenen Fluoreszenzfiltern für die Selektion der Exzitations- und Emissionswellenlängen. Dabei erstreckt sich der Exzitationsbereich von 270 bis 550 nm und der Emissionsbereich von 310 bis 590 nm. Zusätzlich kann über zwei Neutraldichtefilter (exND und NDem) das wellenlängenabhängige Streulicht aufgenommen werden. Eine gepulste Xenon-Blitzlichtlampe (Hamamatsu, Japan) dient dabei als Lichtquelle. Die Schmalband-Interferenzfilter haben eine Bandbreite von 20 nm und wurden zur optimalen Nutzung des Messbereichs so gewählt, dass alle 20 nm eine Messung möglich ist. Die Aufnahme eines kompletten Spektrums mit 150 Wellenlängenkombinationen dauert ca. 90 s. Über die mitgelieferte Software lassen sich sowohl die Filter individuell anwählen als auch die Intensitäten der gemessenen Fluoreszenz über den Photomultiplier-Gain steuern sowie die Anzahl der Messungen zur Mittelwertbildung festlegen. Um elektromagnetische Störungen zu vermeiden, erfolgt die Datenübertragung optisch. Die Fluoreszenzmessung findet

nach dem "open-end"-Prinzip direkt im Reaktor (insitu) statt, d.h., das Emissionslicht wird im Winkel von 180° zur Exzitation gemessen. Mit dem Bioreaktor ist das 2D-Fluoreszenzspektroskop dabei über zwei Flüssiglichtleiter verbunden (Abbildung 45). Sie sind über einen Adapter (Werkstatt TCI, Hannover) mit einem Quarzfenster in einem 25 mm Standardstutzen angeschlossen. Dieser Adapter garantiert die Sterilität des Prozesses und ermöglicht eine nicht-invasive Prozessbeobachtung. Mit dem BioView®-Sensor können lediglich relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) gemessen werden, da die Fluoreszenzintensität nicht nur von der Konzentration sondern auch von physikalischen und chemischen Wechselwirkungen im Reaktor sowie gerätespezifischen Größen abhängig ist. Das Fluoreszenzsignal einer Messung ist nicht lokal streng begrenzt, sondern äußert sich in einem Peak, der einen weiten Bereich abdeckt. Der Punkt eines Peaks mit der höchsten Intensität wird als Fluoreszenzmaximum bezeichnet.

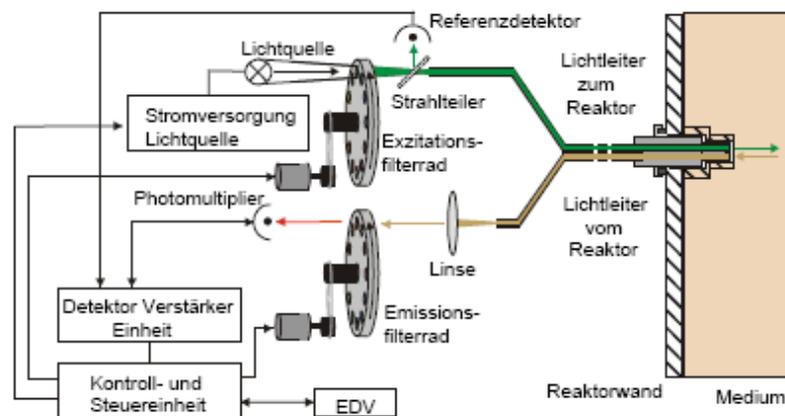


Abbildung 45: Schematische Darstellung des 2D-Fluoreszenzmessgeräts Bioview [170].

6.1.7.1 *BioView®-Einstellungen während der Zellkultivierungen*

Hybridom-Zellkultivierungen

Repetition Matrix: 3

Sensitivity Matrix: high

Gain: 1200

CHO-Zellkultivierungen

Repetition Matrix: 3

Sensitivity Matrix: high

Gain der Kultivierung 16 und 19

Gesamte Matrix Verstärkung auf 1200

Mit Ausnahme von:

Ex290/Em 370	1150
Ex370/Em 430/450/470	1100
Ex390/Em 430/450/470	1100
Ex 430/Em 510	1130
Ex 430/Em 530	1100
Ex 430/Em 550	1150
Ex 450/Em 510/530/550	1130
Ex 470/Em 530	1150

Gain der Kultivierung 17 und 18

Gesamte Matrix Verstärkung von 1230

Mit Ausnahme von:

Ex 290/Em 370	1180
Ex 370/Em 430/450/470	1130
Ex 390/Em 430/450/470	1130
Ex 430/Em 510	1160
Ex 430/Em 530	1130
Ex 430/Em 550	1180
Ex 450/Em 510/530/550	1160
Ex 470 Em 530	1180

BHK-Zellkultivierungen

Repetition Matrix: 3

Sensitivity Matrix: high

Gain: 1200

Mit Ausnahme von:

Ex 270 (alle Emissionswellenlängen): 1150

Ex 290 (alle Emissionswellenlängen): 1050

6.1.8 Weitere Ergebnisse im Rahmen der Protein-Microarray Untersuchungen

6.1.8.1 Ergebnisse der Auswertung der Protein-Microarrays für Hybridomzellfärbungen

Abbildung 46 zeigt die gemessene mittlere Signalintensität abzüglich der mittleren Hintergrundintensität für die *Microarrays* A bis D. Wie bei der Darstellung der SNRs deuten die Signalintensitäten der *Microarrays* A und C auf die Funktionalität der vollständigen Affinitätsmatrixfärbemethode hin. Die unspezifischen Bindungen auf *Microarray* D weisen auch hier ein deutlich geringeres Signal im Gegensatz zu *Microarray* C auf.

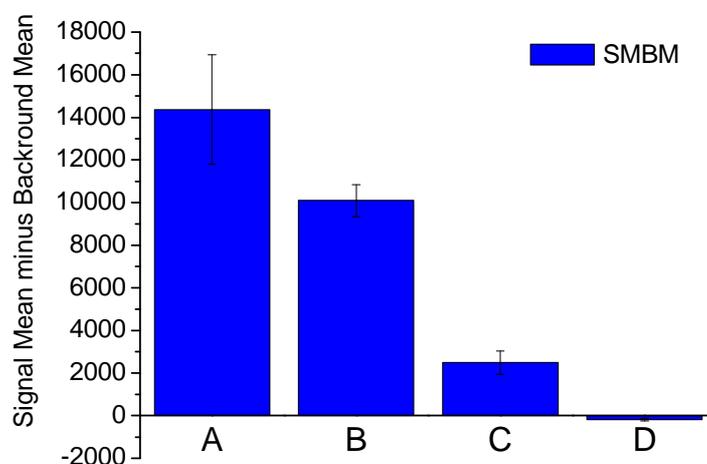


Abbildung 46: Darstellung der mittleren Signalintensität abzüglich der mittleren Hintergrundsignalintensität für die *Microarrays* A bis D.

6.1.8.2 Ergebnisse der Auswertung der Protein-Microarrays für HKB-11 Zellfärbungen

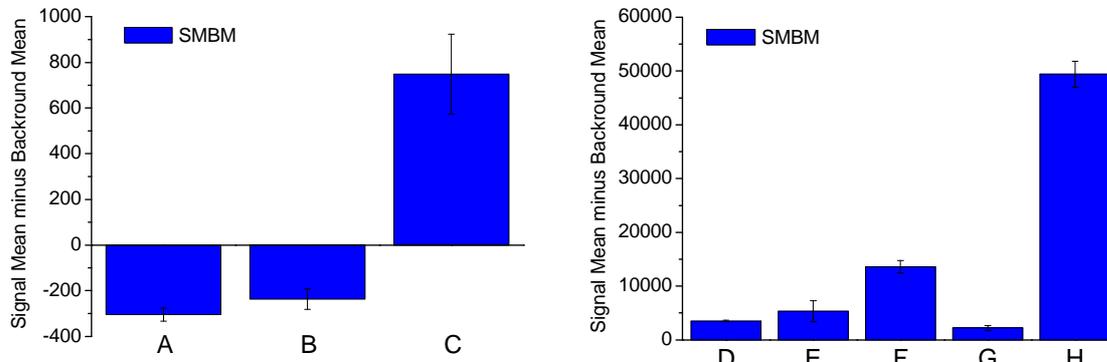


Abbildung 47: Darstellung der mittleren Signalintensität minus der mittleren Hintergrundintensität für die Protein-Microarrays A bis H.

6.1.9 Weitere Ergebnisse im Rahmen der BioView-Messungen

6.1.9.1 Detaillierte Ergebnisse der Voruntersuchung der Modellbildung und die Vorhersage für die Hybridomzellkultivierungen

Einfluss der Datenskalierung

Das Softwareprogramm „The Unscrambler“ gibt die Möglichkeit, eine Skalierung der Daten durchzuführen, um auch kleine Veränderungen in den Fluoreszenzintensitäten zu wichten. Dazu werden die Fluoreszenzintensitäten durch die Standardabweichung geteilt. Für diese Modellerstellungen sind alle Bioreaktorkultivierungen (1 bis 5) mit Ausnahme der jeweiligen vorhergesagten mit einbezogen worden. Zudem sind auch die weiteren online gemessenen Größen wie pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur mit in das Modell eingeflossen. Tabelle 14 stellt die RMSEPs der Vorhersagen für Kultivierung 3, 4 und 5 dar.

	Ohne Skalierung	Mit Skalierung
Kultivierung 3	39,4	20,6
Kultivierung 4	29,7	78,3
Kultivierung 5	38,4	15,2

Tabelle 14: RMSEPs für die Vorhersage der Bioreaktorkultivierungen 3 bis 5 mit und ohne Normierung.

Die Skalierung lieferte für die Reaktorkultivierungen 3 und 5 eine bessere Vorhersage. Das beste Ergebnis lieferte die Vorhersage des Reaktors 5 mit einem RMSEP von 15,2. Folglich ist in diesem Fall eine Skalierung der Daten ein wichtiger Schritt für die Entwicklung eines optimalen Modells.

Modellbildung unter Verwendung der Reaktorläufe 3 bis 5

Ermittelt werden sollte, ob die Verwendung von 2 nur Bioreaktorkultivierungen für die Vorhersage einer dritten bessere Ergebnisse liefert als die Einbeziehung aller 4 Kultivierungen in die Modellbildung. Wiederum sind die online Messgrößen pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur mit in die Modellbildung und Vorhersage eingegangen vor der Modellerstellung erfolgte eine Skalierung der Daten.

	Alle Daten	nur 2 Reaktor- kultivierungen
Kultivierung 3	20,6	29,2
Kultivierung 4	78,3	53,8
Kultivierung 5	15,2	34,8

Tabelle 15: Vergleich des Einflusses einer breiteren Datengrundlage auf die Vorhersage.

Die geringere Datengrundlage war der Vorhersage der Kultivierungen 3 und 5 abträglich, welches an einem steigenden RMSEP abzulesen ist. Für Reaktor 4 verbessert sich zwar die Vorhersage von 78,3 auf 53,8 % allerdings ist dies weiterhin der höchste RMSEP Wert. Dieses zeigt, dass eine breite Datengrundlage eine Verbesserung der Vorhersage bewirkt und die Modelle jeweils mit allen verfügbaren Daten erstellt werden sollten.

Einflusses von pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur auf die Vorhersage

Bisher sind alle Modelle unter Einbeziehung weiterer online gemessener Prozessgrößen (pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur) erstellt worden. Hier sollte ermittelt werden, ob ihre Berücksichtigung die erwartete Verbesserung der Vorhersagen bewirkt (Tabelle 16: Einfluss der online Messgrößen pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur auf die Vorhersage.).

	Mit pH, pO ₂ , T	Ohne pH, pO ₂ , T
Kultivierung 3	20,6	30,6
Kultivierung 4	78,3	71,7
Kultivierung 5	15,2	15,8

Tabelle 16: Einfluss der online Messgrößen pH, Sauerstoffkonzentration und Temperatur auf die Vorhersage.

Mit Ausnahme einer leichten Verbesserung des RMSEPs bei Kultivierung 4 steigt der RMSEP mit dem Ausschluss der weiteren online gemessenen Prozessgrößen. Die neben der Fluoreszenz online gemessenen Größen sollten demnach in die Modellbildung mit einbezogen werden.

Einfluss des Mediums auf die Vorhersage

Bisher sind die Fluoreszenzintensitäten bis auf eine Normierung unverändert in die Modellbildung eingeflossen. Dabei ist der Einfluss einer möglicherweise veränderten Fluoreszenzintensität des Medium zwischen den Bioreaktorläufen nicht berücksichtigt worden. Die Fluoreszenz des Mediums ist vor jedem Bioreaktorlauf vermessen und der Mittelwert dieser Messungen anschließend von den Spektren der Kultivierung abgezogen worden (Tabelle 17).

	Ohne Mediumabzug	Mit Mediumabzug
Kultivierung 3	20,6	15,2
Kultivierung 4	78,3	36,4
Kultivierung 5	15,2	25,7

Tabelle 17: Vergleich der Vorhersagen mit und ohne abgezogenen Mediumfluoreszenzintensitäten.

Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind sehr heterogen. Die Vorhersagen für Kultivierungen 3 und 4 haben sich deutlich verbessert, wohingegen sich die Vorhersage für Bioreaktorlauf 5 verschlechtert hat. Somit kann hier keine eindeutig positive oder negative Aussage über den Einfluss des abgezogenen Mediumfluoreszenzintensität getroffen werden.

6.1.9.2 Ergebnisse der Hybridomzellkultivierungsauswertung

Korrelation von offline Messungen und Vorhersage mit Bestimmtheitsmaß

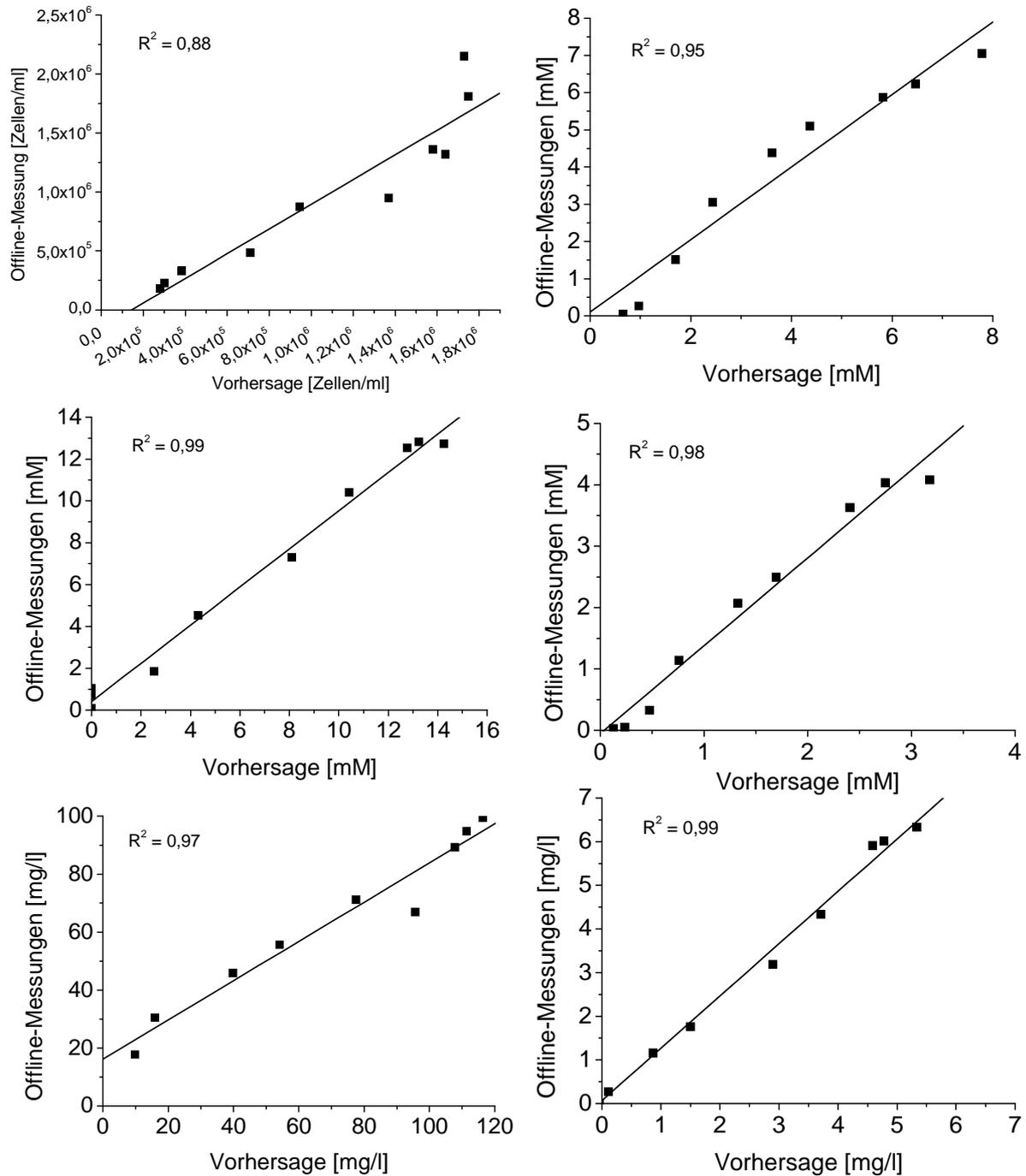


Abbildung 48: Korrelation der offline Messwerte mit den Vorhersagen der Kultivierung 5 unter Angabe des Bestimmtheitsmaß.

6.1.9.3 *Ergebnisse der BHK-Zellkultivierung*

Analytik während der Bioreaktorkultivierung der BHK-Zelllinie im Perfusionsmodus

Alle Kultivierungen sind in einem 7 l (5 l Arbeitsvolumen) Bioreaktor der Firma Applikon Biotechnology durchgeführt worden, welcher von einer DCU3 (Sartorius Stedim Biotech) und FermWorks (JoVa Solutions) gesteuert wurde. Tabelle 10 gibt die geregelten Prozessgrößen mit ihren Soll-Werten an.

Elektroden bestimmten den pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration online im Bioreaktor. Offline ermittelt wurde die Zellzahl und Viabilität mit dem CEDEX System und Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamatkonzentrationen im Überstand mit dem Analysengerät YSI Model 2700. Zur Bestimmung der weiteren Aminosäurekonzentrationen diente eine HPLC. Das Analysengerät Ektachem DT60 ist für die Ammonium- und LDH-Konzentrationsbestimmung eingesetzt worden. Eine offline Kontrolle der Sauerstoffkonzentration, CO₂-Konzentration und des pH-Wertes wurde mit Hilfe des Blood Gas Analyzers durchgeführt. Die ergebnisse der 8 im Perfusionsmodus durchgeführten BHK-Kultivierungen sind in Abbildung 49 dargestellt.

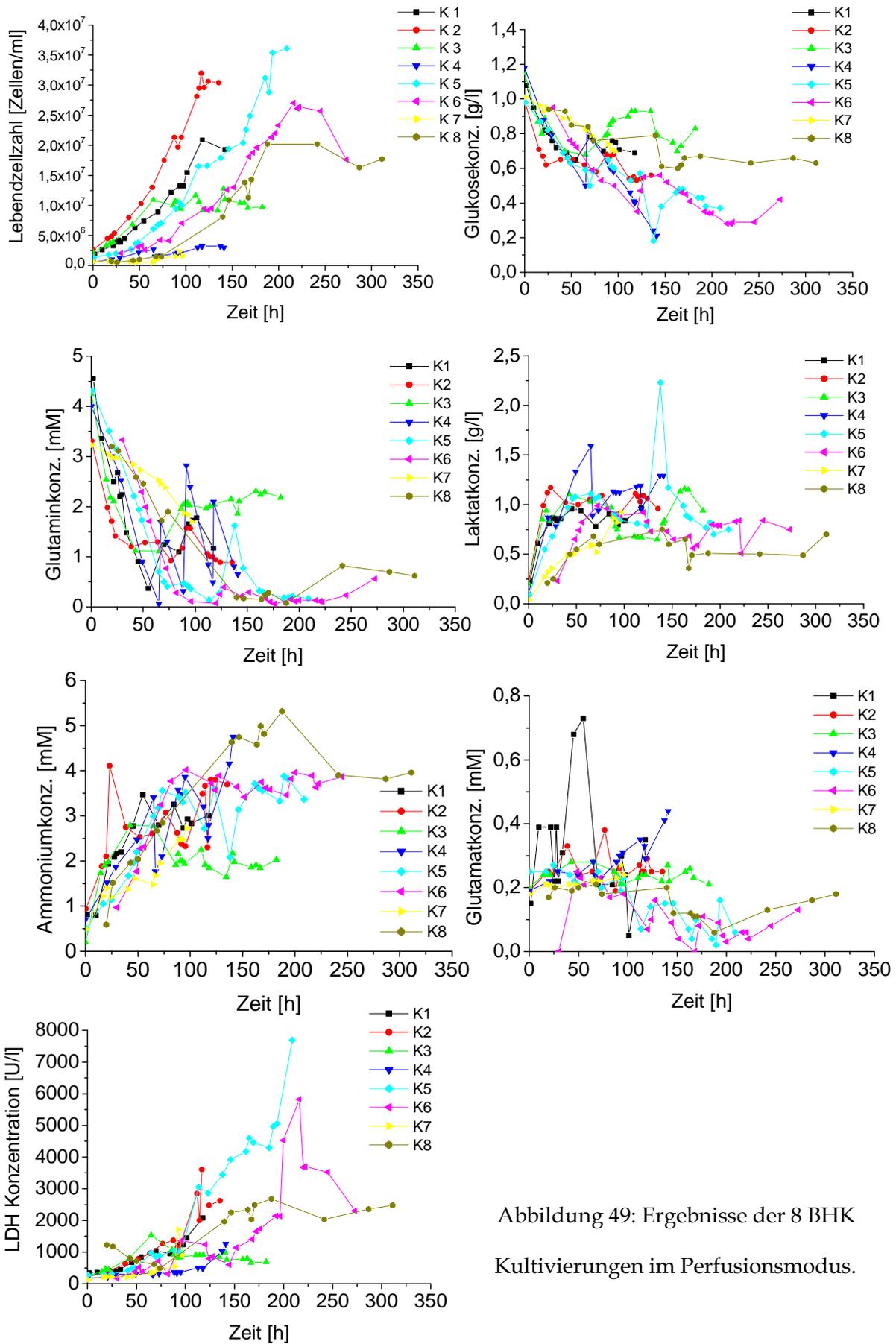
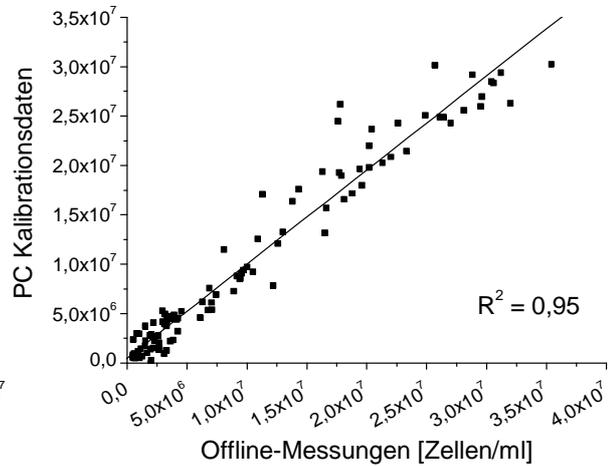
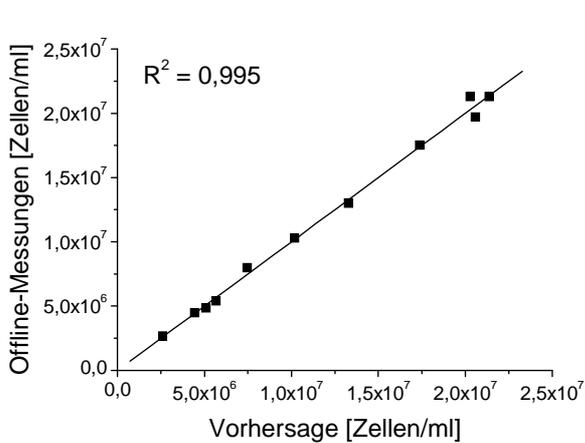


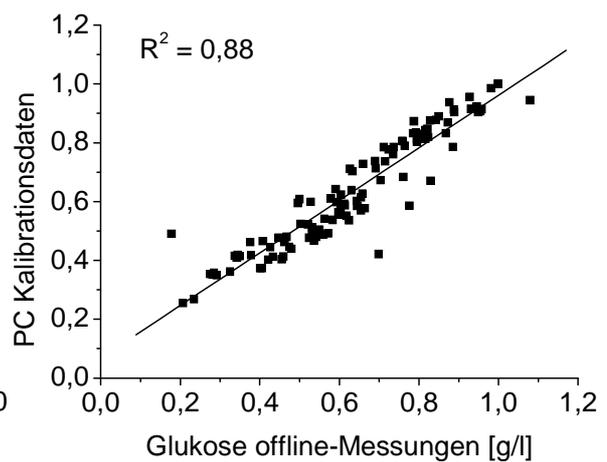
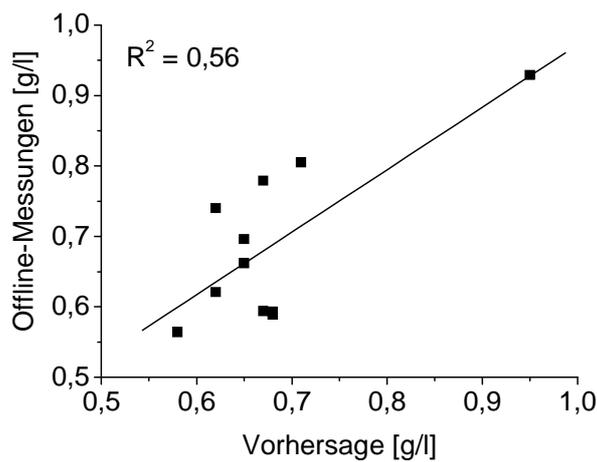
Abbildung 49: Ergebnisse der 8 BHK Kultivierungen im Perfusionsmodus.

Korrelation von offline Messungen und Vorhersage mit Bestimmtheitsmaß

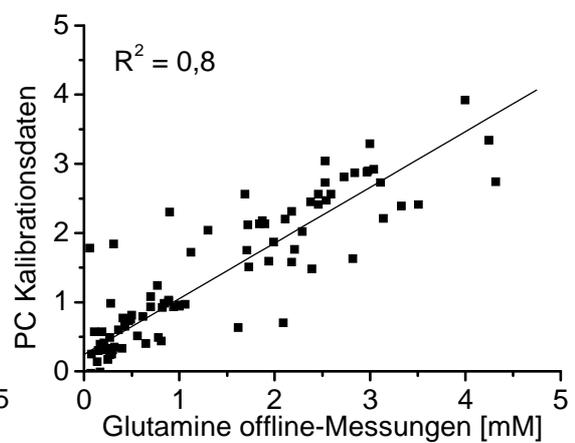
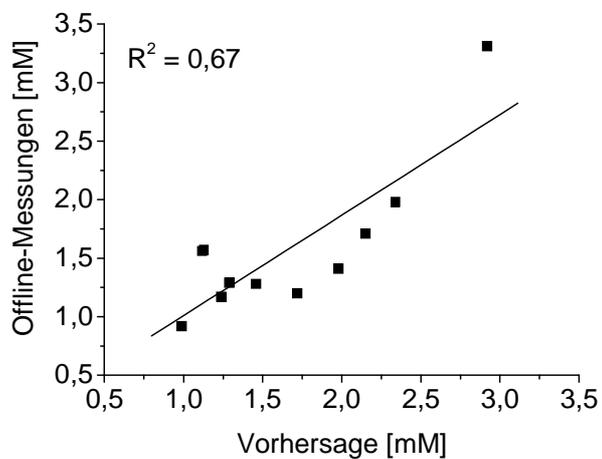
Zellzahl



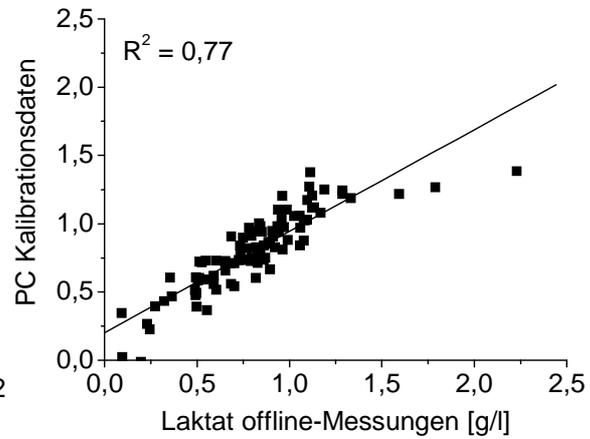
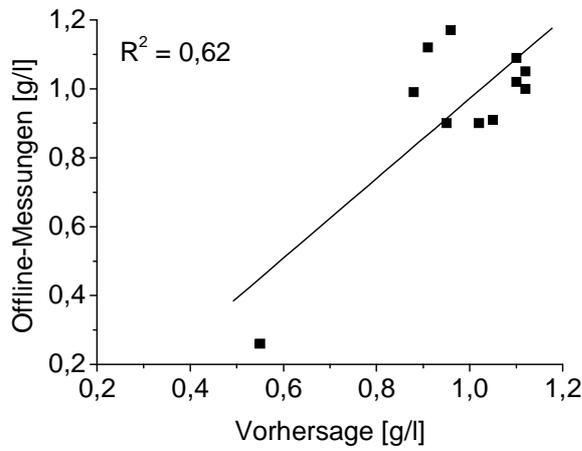
Glukosekonzentration



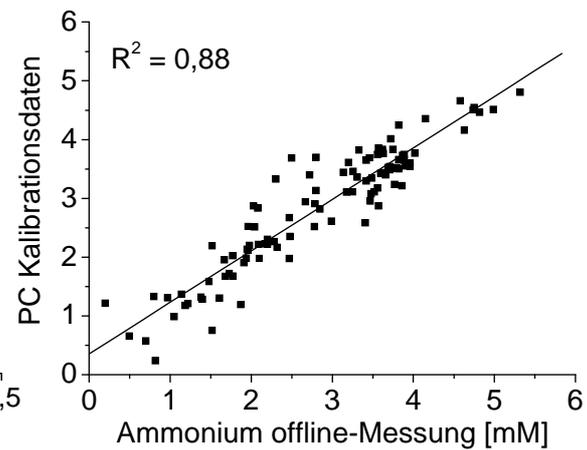
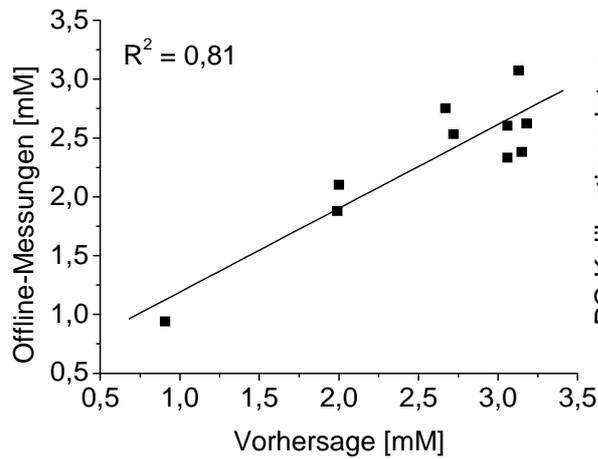
Glutaminkonzentration



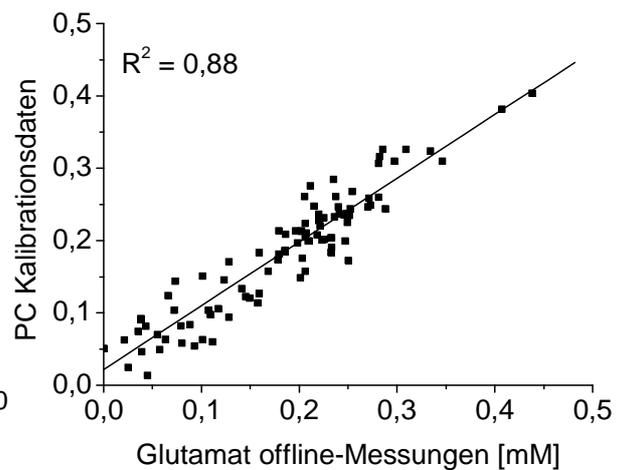
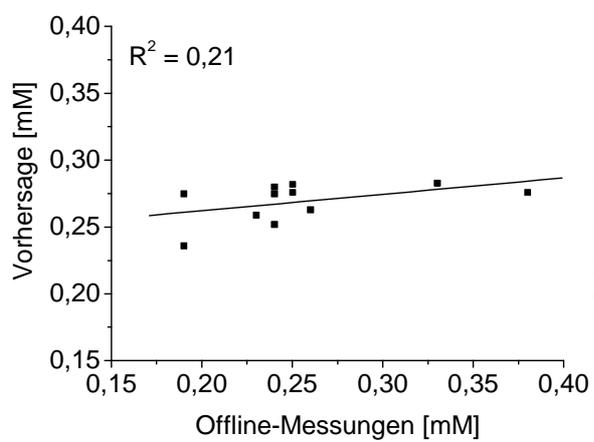
Laktatkonzentration



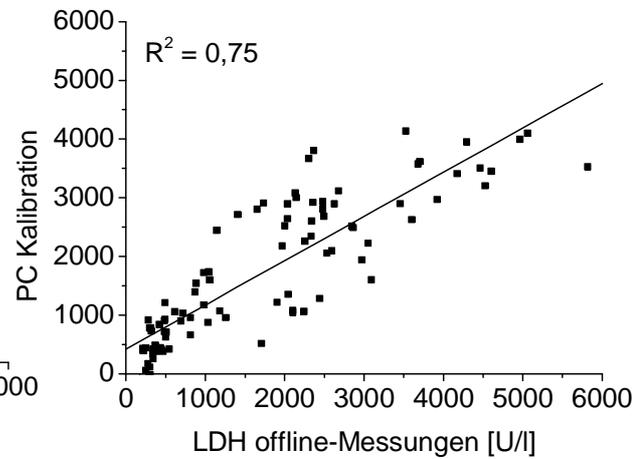
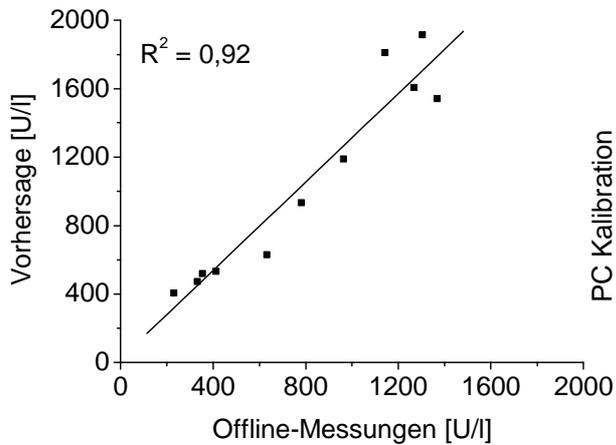
Ammoniumkonzentration



Glutamatkonzentration



LDH Konzentration



6.2 Material

6.2.1 Verbrauchsmaterial

Material

Einmalhandschuhe
 Einmalpipetten
 Kryoröhrchen 1,5 mL
 96-Lochplatte (Maxisor™)
 Pipettenspitzen
 Reagenz- und Zentrifugenröhrchen
 (Falcon Tubes) 15 mL, 50 mL
 Spritzen 20 mL
 Spritzenvorsatzfilter
 Minisart 0,2 µm
 Zellkulturplatten 6- Lochplatten

Hersteller

Semperguard, Semperit AG Holding, Wien
 Sarstedt AG, Nümbrecht
 Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
 Nunc GmbH, Wiesbaden
 Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
 Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
 Terumo Europe NV, Leuven
 Sartorius AG, Göttingen
 Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Kits

Mouse-IgG-ELISA

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

6.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Accutase	PAA, Österreich
Avidin aus Eiweiß	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BD™ Accudrop Fluorescent Beads	BD Biosciences, Heidelberg
Collagenase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
Gelatine aus Rinderhaut, Pulver (Zellkultur getestet)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mouse-IgG ELISA	Roche Applied Science, Mannheim
Tris Base	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Phosphorsäure 85 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protein A-Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RGD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptavidin-Cy3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sulfosuccinimidyl 6-(biotinamido) hexanoate (NHS-LC-Biotin) ≥90% (TLC)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, Steinheim
Triton X- 100	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypsin	Thermo Scientific HyClone, USA

Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ribonuklease A	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Antikörper**Hersteller**

Anti-Maus IgG (Fc spezifisch)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Biotin Konjugat	
Anti-Maus IgG (Fab spezifisch)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FITC Konjugat	
Polyklonaler Antikörper anti Maus IgG FITC Konjugat	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Humanes IgG Fc-Fragment	Jackson Immuno Research, USA
Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂	Jackson Immuno Research, USA
Fragment Rabbit Anti-human IgG Fcγ Fragment spezifisch	
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment spezifischer Ziegen Anti-human IgG, Fc-Fragment spezifisch	Jackson Immuno Research, USA
Ziegen Anti-human IgG Fcγ-Fragment spezifisch	Jackson Immuno Research, USA
FITC Konjugat	

6.2.3 Geräte**Gerät****Hersteller**

Accu-jet®Pro	Brands GmbH & Co. KG, Wertheim
Affymetrix 417™ Array	Affymetrix, CA, USA
Analysenwaage „Analytik AC 210S“	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav „U150“	Julabo UC, Seelbach

Autoklav Tecnomara	Integra Bioscience, Fernwald
Bioreaktor (Bayer HealthCare)	Applikon Biotechnology, Schiedam, Niederlande
Biostat®B DCU	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
BioView® Sensor	DELTA Light & Optics, Hørsholm, Dänemark
Blutgasanalysengerät CEDEX DCU3	Rapidlab 248, Bayer HealthCare, GB Innovatis, Bielefeld, Deutschland Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Digitalkamera Olympus Camedia C-4040	Olympus Corporation, Puchheim
Ektachem DT60	Eastman Kodak, NY, USA
Eppendorf Research Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
FermWorks	JoVa Solutions, San Francisco, CA, USA
Inkubator	Heraeus, Hanau
ImaGene™ 5.5.3	BioDiscovery Inc., CA, USA
Labview 7.1	National Instruments, USA
Magnetrührer IKAMAG®	IKA Werke GmbH, Staufen
Mikroskop BX-41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikroskop IX-50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Optischer Sauerstoffsensoren, Fibox 3	Presens GmbH, Heidelberg
pH und pO ₂ Elektroden (Bayer)	Ingold Electrodes, MA, USA
pH-Elektrode (TCI)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
pO ₂ -Elektrode (TCI)	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Plattenlesegerät, Microplatereader	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Scanner: GenePix® 4000B	Axon Instruments, CA, USA
Secure Seal Hybridisation Chamber	Grace Biolabs, OR, USA
Spinnerflaschen 100 bis 250 ml	Techne AG, Jahnsdorf

Sterilwerkbank MSC Advantage	Thermo Scientific, Karlsruhe
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
The Unscrambler 7.6	Camo, Norwegen
Vortex-Mixer Typ 1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH, Büchenbach
YSI 2700 SELECT Analyzer	YSI Incorporated, USA Zählkammer (nach
Neubauer)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
YSI 5300 A	YSI Incorporated, USA
Zentrifuge	Beckman Coulter, CA, USA
Zentrifuge Multifuge 3s	Heraeus, Hanau

Durchflusszytometer**Hersteller**

Epics-XL MCL	Beckmann-Coulter, Krefeld
Software System II	Beckmann-Coulter, Krefeld
WinCycle software	Phoenix Flow Systems, San Diego
Argon Laser (488 nm)	Coherent, USA

FACS**Hersteller**

FACS Vantage SE	BD Biosciences, Heidelberg
Software Cell Quest Pro v3.5	BD Biosciences, Heidelberg
Argon Laser	
Enterprise II (488 nm)	Coherent, USA

6.3 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BHK	Baby hamster kidney cell line
BioView®	2D-Fluoreszenzspektroskop
BM	Background Mean, mittlere Hintergrundintensität
CHO	Chinese hamster ovary cell line
CO ₂	Kohlendioxid
CSPR	Zell-spezifische Perfusionsrate
DMEM	Dulbecco's modified Eigel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuceic acid
E.coli	Eschericha coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	Fragment Antigen Binding
Fc	Fragment Cristallizable
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FVIII	Blutgerinnungsfaktor acht
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
GFP	Green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
HKB	Hybridklone aus humanen Nieren und B-Zellen
IgG	Imunoglobulin Klasse G
K _{La}	Sauerstofftransportkoeffizient

konz.	Konzentration
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
Max	maximal
MeOH	Methanol
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NAD ⁺	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NADH	reduziertes NAD
NADP	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Phosphat
NADPH	reduziertes NADP
nm	Nanometer
OPA	Ortho-Phtaldialdehyd
OUR	Oxygen Uptake Rate, Sauerstoffaufnahme rate
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI	Propidium Iodid
PC	Hauptkomponente
PCA	Principle Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PLS	Partial Least Square
pO ₂	Gelöstsauerstoffgehalt
RFI	Relative Fluoreszenzintensitäten
RMSEP	Root Means Square Error of Prediction
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SFM	Serum Free Medium
SNR	Signal to Noise Ratio, Verhältnis von Signal- zu Hintergrundintensität
SM	Signal Mean, mittlere Signalintensität
U	Unit
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
WLK	Wellenlängenkombinationen

Lebenslauf

Berufliche Tätigkeit

seit 10/2005

Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotion)

Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

Betreuung: Prof. Dr. Scheper

- Einsatz und Optimierung von Online-Meßsystemen in Bioreaktoren und Entwicklung chemometrischer Modelle
- Charakterisierung und Sortierung von tierischen Zellen mittels Durchflusszytometrie und FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)
- Wissenschaftliche Zusammenarbeit mit Roche Diagnostics, Bayer HealthCare, Boehringer Ingelheim Pharma und Sartorius Stedim Biotech
- Planung und Durchführung von Zellkulturkursen für Industriepartner
- Betreuung von Praktikanten und Diplomanden

6/2003 - 7/2004 **Bioingenieurin bei der Strathmann Biotec AG, Dengelsberg**

- Aufbau der GMP Produktion
- Fermentation von E.coli bis 1000 l, Separation und Lyse unter GMP Bedingungen
- Erstellung von Herstellungsvorschriften- und Betriebsanweisungen

7/2000 - 12/2000

Labortätigkeiten

Medizinisches Labor Dr. A. v. Froreich, Dr. C. Schmidt, Hamburg

Studium

- 8/2004 – 9/2005 **Aufbaustudium Chemie**
Leibniz Universität Hannover
- 9/1997 - 2/2003 **Studium der Biotechnologie**
Fachhochschule Hamburg
Abschlussnote: „gut“ (1,74)
- 4/2001 - 9/2001 **Hauptpraktikum bei Bayer HealthCare, Berkeley, CA, USA**
Betreuer: Dr. Konstantinov, Prof. Dr. Luttmann
- Betreuung von Zellkulturperfusionsprozessen (BHK und CHO)
 - Evaluierung eines neuartigen Levelsensors
 - Etablierung von „Oxygen Uptake Rate“ (OUR) Messungen in der Prozeßentwicklung
- 4/2002 - 12/2002 **Diplomarbeit bei Bayer HealthCare, Berkeley, CA, USA**
Betreuer: Dr. Konstantinov, Prof. Dr. Luttmann
Titel: „Optimization of a multi-vessel small-scale bioreactor system for mammalian cell culture“
Note: „sehr gut“

Schulausbildung

- 9/1996 - 7/1997 Au-Pair, London, Großbritannien
Certificate in Advanced English, University of Cambridge
- 1/1992 - 7/1996 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Hamburg
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 8/1989 - 12/1991 Georg-Herwegh-Oberschule, Berlin
- 8/1983 - 7/1989 Victor-Gollancz-Grundschule, Berlin

Sonstige Qualifikationen

Fortbildungslehrgänge	Gentechnische Sicherheit (§15 Abs. 2 Satz 1 Nr3. GenTSV) Cellular Bioprocess Technology (University of Minnesota, Prof. Wei-Shou Hu) Up- and Downstreaming Processing der biotechnologischen Industrie - Technische Realisierung unter Prozesskostenvorgabe Intensiv-Training für FACS Vantage SE GXP Basiswissen (Klinkner)
Labortechniken	Durchflusszytometrie Zellsortierung mittels FACS ELISA Chromatographie (HPLC, FPLC) Molekularbiologische Techniken Online 2D-Fluoreszenzmessgerät (BioView)
Kultivierung	E.coli Säugerzellen: <ul style="list-style-type: none">• suspension (CHO, BHK, Hybridom, HKB)• adhärent (CHO, HepG2, MC3T3, primäre Osteoblasten)
Bioreaktoren	Maßstab 0,5 bis 12 l Kultivierungsmodi: Batch, Fed-Batch und Perfusion
EDV	The Unscrambler (Chemometrie) Bioreaktorsteuerung (B. Braun DCU) Corel Draw Origin MS Office

Publikationsliste

Paper

K. Suck, L. Behr, M. Fischer, H. Hoffmeister, M. van Griensven, F. Stahl, T. Scheper, Cornelia Kasper
Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram1) using a rotating bed system bioreactor

Journal of Biomedical Materials Research Part A, 80A, No 2, 268-275 (2006)

D. Riechers, F. Anton, L. Behr, C. Kasper, T. Scheper

Oxygenation of suspension cell cultures through a hollow-fibre membrane stirring system

Chemie Ingenieur Technik (CIT) 78, No 9, 2006, 1422 (2006)

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, 140-147 (2008)

Poster

L. Behr, P. Moretti, F. Anton, C. Kasper, T. Scheper

Selection of High-Producing Cells via Cell Sorting using an Affinity Matrix

ESACT (2007)

F. Anton, A. Pastor, L. Behr, O.-W. Reif, C. Kasper, T. Scheper

Direct capture application in downstream processing of proteins with membrane based chromatography

Bioperspectives (2007)

K. Suck, L. Behr, M. van Griensven, H Hoffmeister, T. Scheper, C. Kasper

Application of a new rotating bed reactor system for cultivating 3D bone constructs

Cell culture Engineering X (2006)

K. Joeris, L. Behr, M. Brunett, T. Scheper, K. Konstantinov

Development of a new probe for in-situ oxygen uptake rate (OUR) measurement in mammalian cell culture processes

Cell culture Engineering X (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 cultures

Cell culture Engineering X (2006)

Ö. Kökpınar, F. Anton, L. Behr, C. Kasper, R. Zeidler, U. Bornscheuer, R. Ulber, T. Scheper

High Throughput Downstream Screening System for Protein Purification

Bioperspectives (2006)

K. Suck, L. Behr, M. v. Griensven, H. Hoffmeister, T. Scheper, C. Kasper

Application of a new rotating bed bioreactor system for cultivating 3D bone constructs

Termis Rotterdam (2006)

A. Gierse, C. Klockow, L. Behr, A. Burzlaff, C. Kasper, F. Stahl, T. Scheper

Flow cytometric and microarray analyses for the investigation of apoptosis inducing substances in tumor cells

16th Annual Conference of the DGfZ in Leipzig (2006)

