

**Charakterisierung des Temperatureinflusses auf verschiedene  
rekombinante Säugerzelllinien zur Optimierung des Produktionsprozesses  
von Glykoproteinen in Rührkesselreaktoren**

**Dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**Dipl.-Chem. Torsten Buch  
geboren am 16.01.1968 in Großburgwedel**

**Hannover 1997**

**Referentin:**

**PD Dr. Gerlinde Kretzmer**

**Korreferent:**

**Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl**

**Tag der Promotion:**

**15.12.1997**

## **Abstract**

**Buch, Torsten**

### **Charakterisierung des Temperatureinflusses auf verschiedene rekombinante Säugierzelllinien zur Optimierung des Produktionsprozesses von Glykoproteinen in Rührkesselreaktoren**

Die Ergebnisse der Untersuchungen an verschiedenen CHO-Zelllinien und an einer BHK-Zelllinie belegen eindeutig, daß die übliche Kultivierungstemperatur von 37°C nicht „die optimale Temperatur“ für rekombinante Zellkulturen darstellt. So besitzen das Wachstum, die Stoffwechselaktivität, die Produktivität und die Produktqualität eigene verschiedene optimale Temperaturen, die sich wiederum von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden können. Je nachdem ob eine hohe Zelldichte oder eine hohe Produktivität im Mittelpunkt des Interesses steht, muß die entsprechende Kultivierungstemperatur ausgewählt werden.

Auch wenn der Einfluß der Temperatur bei verschiedenen Zelllinien im Detail variiert, gibt es einige generelle Tendenzen. Grundsätzlich wird durch eine Temperaturabsenkung die lag-Phase der Zellen verlängert und das Zellwachstum verlangsamt. Der Einfluß einer Temperaturniedrigung auf die mittleren Wachstumsraten hängt von der jeweiligen Zelllinie ab. Durch das langsamere Wachstum der Zellen bei niedrigen Temperaturen wird der Beginn der Absterbephase hinausgezögert, so daß die Vitalität der Zellen über einen verlängerten Zeitraum ein hohes Niveau besitzt. Sowohl der spezifische Glukoseverbrauch als auch die spezifische Laktatbildung sinken kongruent mit der Temperatur ab. Die geringeren spezifischen Laktatbildungsraten bei niedrigen Kultivierungstemperaturen bewirken, daß toxische Laktatkonzentrationen erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei 37°C Kultivierungen erreicht werden. Die spezifischen Produktivitäten aller untersuchten Zelllinien steigen grundsätzlich bei einer Temperaturabsenkung an. Die Produktivitätssteigerung führt aber nur dann zu einem höheren Produkttiter oder zu einer besseren Raum-Zeit-Ausbeute, wenn das Wachstum der jeweiligen Zelllinie nicht zu stark durch eine Temperaturreduzierung eingeschränkt wird. Wie hoch die Produktivitätssteigerung bei einer Temperaturreduzierung ausfällt, hängt von der gentechnischen Konstruktion der Zelllinie ab. Eine Prozeßoptimierung mittels Temperaturshift von 37°C auf 33°C zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase führte bei der Zelllinie TF 70 R in einer Biostatenkultivierung zu einer Steigerung der mittleren spezifischen Produktivität von 0,25 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 37°C auf 0,65 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d).

## **Abstract**

**Buch, Torsten**

### **Characterisation of the influence of temperature on different recombinant mammalian cell lines for optimization of the production process for glycoproteins in stirred vessels**

The results of the investigations on different CHO-cells and one BHK-cell line showed clear, that the normal cultivation temperature at 37°C is not the optimum temperature for recombinant cellcultures. There is for each cell line an optimum temperature for cell growth, metabolic activity, productivity and product quality. The cultivation temperature depends on the aims of the cultivation, high cell density or productivity.

Although the influence of temperature for different cell lines particular differed, there are some general tendencies. At lower temperature the lag-phase is prolonged and the cell growth decreased. The influence of lower cultivation temperature on the specific growth rate depends on cell line. Because of the slower growing at lower temperatures the cell death started at a later point in time, so that the time with high viability is prolonged. Both specific glucose consumption rate and specific lactate production rate decrease with decline temperature. The lesser specific lactate production rates at lower temperatures effect that lactate reaches toxic concentrations at later cultivation time. The specific productivity of all investigated cell lines increased general at lower cultivation temperature. The rise in productivity leads only to higher titer or better space-time yield, if the growing of the cells is not to slight at lower temperature. The increasing in productivity at lower temperatures depends on the genetical construction of the recombinant cells. Process optimization by the use of temperature shift (37°C→33°C) at the beginning of exponential phase leads at cell line TF 70 R to higher specific productivity of 0,65 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) in contrast to 0,25 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) at 37°C.

Schlüsselwörter:

- Temperatur
- Tierzellen
- Glykoproteine

Keywords:

- temperature
- mammalian cells
- glycoproteins

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1995 bis November 1997 in der Arbeitsgruppe Tierzellkulturtechnik des Instituts für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von PD Dr. Gerlinde Kretzmer angefertigt.

Für die angebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die fachliche und freundliche Betreuung, sowie die stetige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau Dr. Gerlinde Kretzmer bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Aus vielen Kollegen sind im Laufe der Zeit Freunde geworden. Ich hoffe, daß wir uns nicht allzu schnell aus den Augen verlieren werden. Es wurde immer viel gelacht, auch wenn die Anlässe nicht immer komisch waren.

Frau Dipl.-Chem. Cornelia Kasper danke ich dafür, daß sie mir immer als „Sorgentante“ zur Verfügung gestanden hat und ich bei ihr in regelmäßigen Abständen Dampf ablassen konnte. Meinem Freund Herrn Dipl.-Chem. Oliver Christel wünsche ich alles Gute für seine Dissertation in Braunschweig. An meine alten Studienfreunde, die angehenden Diplom Chemiker Ralf Finke und Hartmut Rutzen, danke ich mit viel Freude zurück. Auf sie war immer Verlaß, wenn sie gebraucht wurden. Herrn Dipl.-Chem. Jörg Hagedorn möchte ich nur sagen oder vielmehr androhen, daß ich eine Sportart finden werde, die ich besser beherrsche als er. Herrn Dipl.-Chem. Marco Rieseberg möchte ich für die Zellzyklusmessungen danken und für viele „heiße“ Tips. Herr Dipl.-Chem. Marcus Hesse ist nicht nur ein guter Sänger, sondern einer der wenigen Wissenschaftler, die viel arbeiten, ihre Ergebnisse hinterfragen, sie reproduzieren und erst dann veröffentlichen. Viele in unserer Branche machen es umgekehrt. Dem begnadeten Filmerzähler Dipl.-Chem. Holger Lübben wünsche ich viel Glück für die Zukunft. Herrn Diplom Biologen Christopher Schippers danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Entwicklung von antimikrobiell wirksamen Polymeren. Herrn Dipl.-Chem. Georg Renemann möchte ich sagen, daß ich es bedauer, nicht öfter zu deiner Verfügung gestanden zu haben. Allerdings hattest du meine Hilfe auch nicht nötig. Herrn Dipl.-Chem. Werner Ramm danke ich für viele Stunden, die nur durch seinen schwarzen Humor ertragbar waren. Der gemeinsame Sporturlaub mit dem Extraktionspapst Herrn Dipl.-Chem. Jens Burfeind wird mir immer in freudiger Erinnerung bleiben. Mit Herrn Dipl.-Chem.

Michael van Well konnte ich herrlich über den Sinn des Lebens sinnieren. Alles Gute für die Zukunft. Und dann ist da noch Herr Dipl.-Chem. Andreas Pospischil. Er ist sicherlich einer der Besten.

In meine Promotionszeit fielen die Diplomarbeiten von Birgit Harbeck, Marén Hüners, Werner Ramm und Georg Renemann, sowie die Schwerpunktpraktika von Christine Börner, Ralf Finke, Claudia Janczak, Michael Jürgens, Alexander Loa, Susan Meier und Egbert Stark. Sie alle haben zum Fortgang meiner Arbeit beigetragen. Besonders die Arbeiten von Marén Hüners, Werner Ramm, Georg Renemann und Alexander Loa haben mir weitergeholfen.

Novo Nordisk danke ich für die Überlassung der BHK-Zelllinie, die finanzielle Unterstützung und die schöne Zeit in Kopenhagen.

Der Firma Bayer (Berkeley, Kalifornien) danke ich für die interessanten Einblicke in die Entwicklungs- und Produktionsprozesse.

Frau Dipl.-Chem. Marén Hüners hätte eigentlich zusätzlich eine eigene Seite dieser Danksagung verdient. So oft hat sie mir mit Rat und Tat bei Problemen Tag und Nacht zur Seite gestanden. Danke. Vielleicht fällt mir etwas ein, wie ich es wieder gut machen kann.

Mein letzter aber wichtigster Dank gilt meinen Eltern Helga und Werner Buch und dem Rest der Familie aus Ditterke. Eure Unterstützung und Fürsorge in den ganzen Jahren kann sicherlich nicht übertroffen werden. Ich hoffe, daß ich Euch ein wenig zurückgeben kann. Unvergessen ist meine Großmutter Lina Langhans.

Torsten Buch, November 1997

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>5</b>
2.1 Säugerzellkulturtechnik	5
2.2 Stoffwechsel von Säugerzellen	8
2.3 Glykoproteine, Sialinsäure und Sialidasen	11
2.4 Der Zellzyklus von Eukaryonten	13
2.5 Die rekombinanten Produkte	15
2.5.1 Gewebefibrinolyse-Aktivator (tPA)	17
2.5.2 Antithrombin III (AT III)	19
2.5.3 Faktor VII	22
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
3.1 Die verwendeten Zelllinien und ihre Stammhaltung	24
3.2 Die Medien	25
3.3 Kultivierungssysteme	26
3.3.1 Bioreaktoren	26
3.3.2 Techne-Spinnerflaschen	27
3.4 Definition der Wachstumsparameter	28
3.4.1 Wachstumsrate	28
3.4.2 Spezifische Substratverbrauchs-, Metabolitbildungs- und Produktbildungsraten	28
3.4.3 Glukoseumsatz und Laktatausbeute	29
3.5 Analytik	30
3.5.1 Sialidase-Bestimmung	30
3.5.2 Protease-Bestimmung	31
3.5.3 Zellzahlbestimmung und Vitalität mit der Trypanblau-Methode	32
3.5.4 Zellkernmethode	33
3.5.5 Die Laktatdehydrogenase-Bestimmung	34

3.5.6 Laktatbestimmung mit photometrischem Test	34
3.5.7 Glukose und Laktatbestimmung mit dem YSI 2700	35
3.5.8 Bestimmung reduzierender Zucker	35
3.5.9 Bestimmung der Ammoniumkonzentration	36
3.5.10 Gesamtprotein nach Bradford	36
3.5.11 Aminosäuren	37
3.5.12 Organische Säuren	37
3.5.13 Bestimmung der Phosphatkonzentration	38
3.5.14 Produktkonzentrationsbestimmung durch Enzym-Linked Immuno Sorbent Essay (ELISA)	38
3.5.15 AT III-Aktivitätstest	39
3.5.16 tPA-Aktivitätstest und spezifische Aktivität	40
3.5.17 Durchflußzytometrische Zellzyklusbestimmung	41
<b>4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>43</b>
4.1 Einfluß der Temperatur auf Kultivierungen der rekombinanten CHO- Suspensionzelllinie TF 70 R	43
4.1.1 Untersuchungen in Spinnerflaschen bei konstanter Temperatur	43
4.1.1.1 Zellwachstum und Stoffwechsel der TF 70 R-Zelllinie	44
4.1.1.2 Das Produktionsverhalten der TF 70 R-Zelllinie	63
4.1.1.3 Die Produktqualität	73
4.1.2 Untersuchungen in Spinnerflaschen mit Temperaturshift	79
4.1.3 Untersuchungen mit Temperaturshift im Biostat M	86
4.2 Einfluß der Temperatur auf Kultivierungen der rekombinanten CHO-Suspensionszelllinien SSO-A2 und SSO-A2PF	94
4.3 Einfluß der Temperatur auf Kultivierungen der rekombinanten BHK-Suspensionszelllinie B4B1-MSP	106
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>117</b>
<b>6. LITERATUR</b>	<b>122</b>
<b>7. ANHANG</b>	<b>133</b>
7.1 Abkürzungen	133

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Die gesamte Zahl der Proteine im Menschen wird, basierend auf der genetischen Information, die in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) abgespeichert ist, auf insgesamt 50000 geschätzt. Von ihnen sind bislang 500 identifiziert und charakterisiert. Für einige dieser Proteine, wie Insulin, menschliches Wachstumshormon, Interferon, Interleukin, Tumor-Nekrose-Faktor, epidermaler Wachstumsfaktor, Faktor VIII, Erythropoietin, Urokinase und Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA = tissue plasminogen activator) wurden bereits Korrelationen zwischen unzureichender Aktivität der Proteine und einem pathophysiologischen Zustand gefunden. Dabei belegen klinische Prüfungen die Aufhebung des pathophysiologischen Zustandes durch exogene Zugabe des jeweiligen Proteins [1]. Für die Produktion menschlicher Proteine oder Glykoproteine, die als körpereigene Wirkstoffe zur Substitutionstherapie eingesetzt werden, stehen prinzipiell drei Synthesewege zur Verfügung:

- Reindarstellung aus der natürlichen Quelle, den menschlichen Organen oder Körperflüssigkeiten, wie z. B. Blutseren
- chemische Synthese
- biotechnische Herstellung auf der Basis rekombinanter DNA-Technologie

Nur wenige Proteine, wie zum Beispiel Albumin, Plasminogen, Urokinase oder menschliches Wachstumshormon lassen sich aufgrund ihrer hohen Konzentrationen aus Körperflüssigkeiten oder Organen isolieren. Regulatorisch wirksame Proteine, wie Interferon, Interleukin oder Gewebe-Plasminogen-Aktivator liegen dagegen in äußerst geringen Konzentrationen im menschlichen Organismus vor. Um z. B. die für eine Therapie benötigte Menge von 100 mg tPA aus menschlichen Arterienwandgewebe zu isolieren, müßten 2 t Gewebe verarbeitet werden. Daher ist die Gewinnung dieser Substanzen aus dem menschlichen Organismus in therapeutisch einsetzbaren Mengen nicht ökonomisch. Außerdem verbietet sich dieses Vorgehen auch aufgrund der Gefahr viraler Infektionen, wie Hepatitis oder AIDS und Erkrankungen wie Creutzfeld-Jakob-Syndrom [2] sowie aus ethischen Gründen. Eine chemische Total-Synthese ist derzeit nur bei Proteinen mit einer Molekülmasse bis zu 15 kDa durchführbar, wobei es sich hier oft um wissenschaftlich interessante Synthesen im Labormaßstab handelt, die jedoch aufgrund der geringen Ausbeuten für eine wirtschaftlich großtechnische Produktion nicht geeignet sind. Eine chemische Synthese wird weiterhin

durch die Komplexität größerer Moleküle erschwert, die eine korrekte Verknüpfung von Disulfidbrücken und eine Glykosylierung für die vollständige Entfaltung ihrer biologischen Aktivität und zur Vermeidung einer antigenen Wirkung benötigen. Daher bleibt derzeit als einzige Alternative zur Herstellung körpereigener Proteine oder Glykoproteine für therapeutische Anwendungen, die biotechnologische Produktion mit Hilfe von Zellkulturen auf der Basis rekombinanter DNA-Technologie [3].

Mit Hilfe der Molekularbiologie wurde in den fünfziger Jahren die Kolinearität der Nukleotidsequenz in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) entdeckt, der molekularen Struktur der Gene, mit der Aminosäuresequenz, der molekularen Struktur der Proteine. Dabei bestimmen jeweils ein Triplet mit drei, von den insgesamt vier in der DNA vorkommenden Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, welche Aminosäure in die Peptidkette eingebaut wird. Durch die Abfolge des Triplets in der DNA wird die Sequenz der Aminosäuren im Protein bestimmt. Für die Umsetzung der genetischen Information bei der Synthese eines Proteins wird zunächst der Genabschnitt, der für die Synthese eines Proteins relevant ist, in eine komplementäre einsträngige Nukleinsäure, die Messenger-Ribonukleinsäure (m-RNA) übersetzt. Diese m-RNA lagert sich im Cytoplasma der Zelle an die Ribosomen, den Proteinsynthese-Fabriken aller lebenden Organismen an. Dort dienen die Triplets der m-RNA für die Anheftung der jeweils spezifischen Transfer-Ribonukleinsäure (t-RNA). Das Ribosom als ein Multienzymkomplex katalysiert anschließend die Verknüpfung der neuen Aminosäure mit der bestehenden Peptidkette [4-7]. Diese molekularbiologischen Grundlagen der Determinierung von Erbinformationen und deren Umsetzung in Proteine, die ihrerseits den Metabolismus jedes lebenden Organismus katalysieren und damit Lebensprozesse aufrechterhalten, waren die Grundlagen für die rekombinante DNA-Technik. Mit dieser Technik läßt sich eine spezifische, für die Synthese eines Proteins relevante Nukleotidsequenz aus einer menschlichen Zelle isolieren, in einen einzelligen Organismus integrieren und damit Proteine oder Glykoproteine mit den in den Zellen vorhandenen Proteinsynthese-Fabriken in ausreichender Menge für den therapeutischen Einsatz herstellen. Die Auswahl der einzelligen Organismen für die Produktion des Humanproteins wird vorallem durch die Charakteristik des zu synthetisierenden Proteins bestimmt. So lassen sich Proteine mit einer Molekülmasse in der Größenordnung von 20 kDa mit wenigen Disulfidbrücken, die für die Ausbildung der Tertiärstruktur mitentscheidend sind, ebenso wie nicht-glykosylierte Proteine oder solche, bei denen eine Glykosylierung für die biologische und antigene Wirkung nicht entscheidend ist,

am ökonomischsten mit Hilfe von Bakterien wie *E. coli* produzieren [8, 9]. Derartige Mikroorganismen sind jedoch nicht immer in der Lage, eine korrekte Faltung des Proteins durchzuführen, da die Proteine oft als unlösliche Einschlußkörper im Bakterium vorliegen, die erst eine chemische Renaturierung erforderlich machen [10]. Alternativ hierzu bieten sich Expressionssysteme an, die das Protein in den periplasmatischen Raum einschleusen. Durch Fusionsproteine gelingt sogar eine Sezernierung des rekombinanten Proteins, was allerdings eine korrekte Abspaltung des Fusionsproteins erfordert. Ferner besitzen Bakterien nicht die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen durchzuführen, was unter anderem die Pharmakokinetik des Proteins beeinflussen kann [11-16]. Hefen und Schimmelpilze verfügen zwar über ein Glykosylierungssystem, das allerdings ein zu Säugetierzellen unterschiedliches Glykosylierungsmuster durchführt [17], zudem treten hier bis auf wenige Ausnahmen (*Aspergillus nidulans*) [18] in der Regel Hyperglykosylierungen auf, wie am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt wurde [19]. Bei der Synthese komplexer Proteine oder Glykoproteine mit einer Molekülmasse größer als 30 kDa, zahlreichen Disulfidbrücken sowie einer Glykosylierung mit Relevanz für die biologische Aktivität ist daher die einzige Alternative die Synthese durch Säugetier-Zellkulturen. Diese sind in der Lage die korrekten posttranslationalen Modifikationen am Proteingerüst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat durchführen zu können. Hieraus resultiert ihre herausgehobene Position in der Biotechnologie. Transgene Tiere, die therapeutisch nutzbare Substanzen wie Faktor VIII oder tPA über die Milch abgeben können [20, 21], stellen sicherlich einen interessanten Ansatz für die Zukunft dar, sind aber beim heutigen Stand der Technik („Mäusemelken“) noch nicht industriell einsetzbar. Ein weiterer Vorteil von Zellkulturen ist, daß die synthetisierten Proteine in löslicher Form sezerniert werden und sich damit ein chemisches Refolding erübrigt. Diese Vorteile müssen mit dem Nachteil erkaufte werden, daß Eukaryonten im Vergleich zu Prokaryonten eine 48fach längere Generationszeit besitzen, die eine erhöhte Kontaminationsgefahr mit Mikroorganismen mit sich bringt. Darüber hinaus benötigen Zellkulturen relativ anspruchsvolle und damit teure Nährmedien und erreichen um Zehnerpotenzen niedrigere Zelldichten als Bakterien. Die Proteinausbeute ist deshalb vergleichsweise niedrig. Insgesamt führen diese Faktoren meistens zu höheren Herstellungskosten als bei der mikrobiellen Proteinsynthese. Um die hohen Produktionskosten zu vermindern, wird eine Charakterisierung der noch oft empirisch durchgeführten Tierzellkultivierungen angestrebt. Sehr viel Gewicht wurde in die Entwicklung von serumfreien Medien und die Rezyklisierung von bereits verwendetem Medium gelegt. Mit

Hilfe der Prozeßführung (Batch, Fed-Batch, Repeated-Batch und kontinuierliche Kulturen) wurde versucht, die Zelldichten zu erhöhen und die Kultivierungsdauer bei hoher Vitalität zu verlängern [22-26]. Aber auch eine Absenkung der Temperatur kann zu einer solchen Verlängerung führen. Die einzelnen Reaktionen, die in einer Zelle ablaufen, werden von der Temperatur beeinflusst, z. B. über die Geschwindigkeitskonstante, die durch die Arrheniusgleichung beschrieben wird:

$$k = A \exp(-E/RT)$$

wobei E die Aktivierungsenergie, T die absolute Temperatur und A eine Konstante sind. Bei der großen Zahl an enzymatischen Reaktionen, die am Wachstum und an der Produktbildung beteiligt sind, ist der Einfluß auf die Gesamtraten komplex. Eine Vorhersage über das Verhalten der Produktion oder des Wachstums bei veränderten Temperaturen ist schwierig und muß für die jeweilige Zelllinie untersucht werden [27]. Bei Prozessen in denen Säugerkzellen involviert sind, wird die Kultivierungstemperatur mit sehr viel Regelaufwand konstant bei 37°C gehalten, da allgemein angenommen wird, daß ein Abweichen von dieser „physiologischen“ Temperatur negative Auswirkung auf das Wachstum der Kultivierungen hat. Erste Untersuchungen in den siebziger und achtziger Jahren bei den Produktionen von Interferon und monoklonalen Antikörpern zeigten, daß eine abweichende Temperatur einen positiven Einfluß auf reaktionstechnische Größen wie Umsatz, Ausbeute und Raum-Zeit-Ausbeute haben kann [28-36]. Optimale Wachstumstemperatur und optimale Produktionstemperatur müssen daher nicht identisch sein [37, 38]. Außerdem beeinflusst die Temperatur vermutlich das Ausmaß der Degradation von sekretierten Glykoproteinen durch Proteasen und Glykosidasen, so daß die Produktqualität beeinflusst werden kann [39].

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß der Kultivierungstemperatur auf das Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten verschiedener rekombinanter Säugertierzellen zu charakterisieren und den Produktionsprozesses von Glykoproteinen mit Hilfe der Temperaturführung zu optimieren. Untersucht wurden verschiedene CHO-Zelllinien die tPA und AT III exprimieren und eine BHK-Zelllinie, die Faktor VII produziert. Neben der Produktquantität wurde auch der Temperatureinfluß auf die Produktqualität der Glykoproteine analysiert. Eine weitere Fragestellung war, ob der Temperatureinfluß auf die Zellkulturen in Abhängigkeit zum Proteinanteil des Mediums steht. Die zur Charakterisierung notwendigen Batch-Kultivierungen erfolgten in Spinnerflaschen und zwecks eines „scale-up“ im 2-5 l Maßstab in geregelten Biostaten.

---

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Säugerzellkulturtechnik

Die Zellkulturtechnik ist im Vergleich zur klassischen Biotechnologie eine junge Technologie. Erst um die Jahrhundertwende gelang es, Säugerzellen *in vitro* zu kultivieren. Während zunächst die Technik der Kultivierung selbst im Vordergrund stand, konzentrierten sich die darauffolgenden Arbeiten auf die Isolierung und Langzeitkultivierung von Zellen verschiedener definierter Gewebe und die Differenzierung *in vitro*. Obwohl auf diesem Gebiet noch viele Fragen offen sind, dienen Säugerzellkulturen heute der Grundlagenforschung in Medizin, Molekularbiologie und Genetik. Darüber hinaus nehmen sie auch einen festen Platz in der Biotechnologie ein. Primärkulturen und die aus ihnen durch Behandlung mit cancerogenen Substanzen oder durch Virusinfektionen herbeigeführten Transformationen zu kontinuierlichen Zelllinien werden seit etwa 30 Jahren als Substrate für Viren zur Impfstoffproduktion großtechnisch eingesetzt. Im Rahmen dieser Entwicklung wurden die Grundlagen der großtechnischen Fermentation von Säugerzellen gelegt. Intensive Versuche, aus differenzierten Säugerzellen biologisch aktive Proteine zu gewinnen, waren wenig erfolgreich. Der Grund ist darin zu suchen, daß differenzierte Zellen im Verlaufe der heute besser verstandenen Kultivierung meist ihre spezifischen Funktionen, wie z. B. die der Insulinsynthese, verlieren. Dennoch haben diese Ansätze vereinzelt zu Erfolgen geführt. So wird z.B. Interferon zu humantherapeutischen Zwecken aus einer B-Zelllinie gewonnen. Bis jedoch diese Produktion im Industriemaßstab durchgeführt werden konnte, mußte eine Vielzahl von Hürden bezwungen werden. Ein Problem war die Entwicklung eines synthetischen Mediums. Erst in den fünfziger Jahren gelang es Eagle ein definiertes Medium zu entwickeln, dem aber noch Blutserum zugesetzt werden mußte. Dieses enthält neben Proteinen (z.B. Albumin), Hormone, Wachstumsfaktoren, anorganische Salze, Cholesterin und eine Vielzahl von Enzymen. Die genaue Zusammensetzung des Serums wurde bisher noch nicht aufgeklärt, allerdings sind einige Komponenten wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline bekannt, die für ein Wachstum der Zellen unentbehrlich sind. Seit dieser Zeit wurden viele Verbesserungen durchgeführt und neue Medien entwickelt, die auf die speziellen Bedürfnisse der jeweiligen Zelllinie abgestimmt sind.

In den letzten Jahren wurde verstärkt die Entwicklung serumfreier Medien betrieben, da durch den Zusatz des Serums eine undefinierte Komponente im Medium enthalten ist. Ein weiterer Nachteil des Serums ist der tierische Ursprung, der eine Gefahrenquelle bezüglich

Kontaminationen (Mycoplasmen) mit sich bringt und einen Anteil von 85% der Medienkosten darstellt [42]. Die Entwicklung eines synthetischen Mediums zur Zellkultivierung war ein großer Fortschritt, genügte jedoch nicht um einen industriellen Einsatz zu ermöglichen. Die Entwicklung der Hybridoma-Zellen, die monoklonale Antikörper sezernieren, durch Fusion von Myelomzellen und Milzzellen durch Köhler und Milstein (1975) [89] und die Möglichkeiten der Rekombinationstechnik gaben der Zellkulturtechnik einen erneuten Anstoß. Erst die Kombination der molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden hat zu einer Reihe neuer Anwendungen geführt. Mit diesen Techniken wurde die Produktion monoklonaler Antikörper und zellfremder humanidentischer Proteine im industriellen Maßstab möglich. So wurden zwischen 1982 und 1993 die 24 in Tab. 2.1 gezeigten biotechnologischen Diagnostika zugelassen, davon vier in Europa [42].

Neben der Eigenschaft posttranslationale Modifikationen durchzuführen, zeichnen sich Säugerzellen auch durch die Fähigkeit aus, Proteine "richtig" zu falten und bei komplexen, aus mehreren Untereinheiten bestehenden Proteinen die Assoziation naturidentisch vorzunehmen. Letzteres läßt sich biotechnologisch nur dann sinnvoll nutzen, wenn die Einzelkomponenten in stöchiometrisch korrektem Verhältnis synthetisiert werden.

Längere Zeit wurde die Produktivität von Zellkulturen als zu gering eingeschätzt, um mit rekombinanten Bakterien oder Hefen ökonomisch konkurrieren zu können. Deshalb wurde besonderen Wert auf die Verbesserung der Expressionsleistung dieser Zellen gelegt. Im Mittelpunkt dieser Arbeiten steht immer noch die Optimierung der Transkription von transferierten Genen. Da die Transkription von Fremdgenen in Säugerzellen wesentlich von der nicht vorhersagbaren Integration ins Wirtszellgenom abhängt, zeigen die einzelnen Zellklone ein über mehrere Größenordnungen variierende Expression. Auf der Grundlage der bekannten Verpackungsprinzipien des eukaryontischen Genoms werden derzeit Versuchsansätze entwickelt, die diese Begebenheiten beherrschbar werden lassen. Bis auf weiteres gilt als pragmatisches Vorgehen die Verwendung effektiver Screening-Systeme, um möglichst schnell die hochexprimierenden Zellklone isolieren zu können. Unter Anwendung der genetischen "Tricks" und der simultan weiterentwickelten Technologien der Fermentation und Reinigung stehen Säugerzellen heute als Expressionssystem auch in ökonomischer Hinsicht in Konkurrenz zu prokaryontischen Expressionssystemen.

Neben der Verwendung zur Substanzproduktion werden Säugerzellen in zunehmendem Maße als Testsysteme für komplexe Vorgänge verwendet. Dies beinhaltet z.B. die Verwendung bestimmter Zellkulturen als Ersatz für Tierversuche. Im Vorfeld von Entwicklungen für die

Herstellung von Pharmaka werden nun auch rekombinante Säugerzellen als Testobjekte genutzt [43, 44].

**Tab. 2.1:** Zugelassene, gentechnisch hergestellte Arzneimittel und Diagnostika [45].

Handelsname	Wirkstoff	Firma	Marketing	Indikation
Humulin	Insulin	Eli Lilly	1982	Diabetes mellitus
Intron A	IFN- $\alpha$ 2b	Schering	1985	Haarzelleukämie
Protropin	Wachstums-hormon	Genentech	1985	Hypo. Kleinwuchs
Berofer	$\alpha$ -Interferon 2c	Basotherm	1985	Herpes keratitis
Roferon	IFN- $\alpha$ 2a	Hoffmann La Roche	1986	Haarzelleukämie
Recombivax HB	Hepatitis B-Antigen	Merck/SK Beecham	1986	Hepatitis B- Prophyl.
Actilyse	tPA	Boehringer Ingelh.	1986	Thromb. Verschlüsse
Humatrope	Wachstums-hormon	Eli Lilly	1987	Hypo. Kleinwuchs
Activase	t-PA	Genentech	1987	Thromb. Verschlüsse
Eprex	Erythropoietin	Amgen/Johnson	1988	Anämie
Proleukin	Interleukin-2	Chiron/Cetus	1989	Hypernephrom
Polyferon	$\tau$ -IFN	Biogen/Bioferon	1989	Rheumatoide Arthrit.
Egopin	Erythropoietin- $\beta$	Chugay	1990	Anämie
Alferon N	IFN- $\alpha$ n 3	Interferon Science	1990	Warzen
Insulin	Insulin	Novo Nordisk	1990	Diabetis Mellitus
Actimmune	IFN- $\tau$ 1	Genentech	1990	Chr. Granulomatose
Faktor IX	Faktor IX	Alpha Therapeutics	1990	Hämophilie B
Neupogen	G-CSF	Amgen	1991	Krebstherapie
Prokine	GM-CSF	Immunex/ Behring	1991	Knochenmarks- transplantation
Recormon	Erythropoietin	Boehringer Mannh.	1992	Anämie
Recombinat	Faktor VIII	Baxter/Genetics	1992	Hämophilie A
Kogenate	Faktor VIII	Cutter/Bayer	1993	Hämophilie A
Imukin	Interferon gamma-1b	Boehringer Ingelheim	1993	Chr. Granulomatose
Imufor Gamma	Interferon gamma-1b	Thomae	1993	Chr. Granulomatose

## 2.2 Stoffwechsel von Säugerzellen

Die ersten von Eagle und Ham in den frühen sechziger Jahren entwickelten chemisch definierten Basalmedien bestanden aus Wachstumsfaktoren, anorganischen Salzen, Vitaminen, Glukose und Aminosäuren [46, 47]. Eine Vielzahl an Nährstoffen muß tierischen Zellen zugeführt werden, da sie nicht in der Lage sind, wichtige Komponenten, wie z. B. aliphatische und aromatische Aminosäuren selbst zu synthetisieren. Der Energiebedarf tierischer Zellen in Form von ATP-Molekülen wird dabei aus Kohlenstoffquellen gedeckt. Dabei gehören sowohl Glukose als auch Glutamin zu den beiden wichtigsten Energiequellen [48-52]. Glukose wird entweder über Glukose-Carrier oder durch Diffusion direkt in die Zelle transportiert oder indirekt aus der Speicherform des Glykogens durch Glykogenolyse verfügbar [53]. Bei Chinese Hamster Ovary-K1-Zellen (CHO-K1-Zellen) liegt die Aufnahme-rate bei 20-40 nmol/(mg<sub>Protein</sub> \* min) und die Sättigungskonstante bei 6-7 mmol/l [54]. Aufgrund der hohen Verbrauchsraten im Vergleich zu den anderen im Medium vorgelegten Komponenten kommt diesen beiden Stoffen eine zentrale Bedeutung im Energiestoffwechsel zu. Daher werden die grundlegenden Abbauwege dieser beiden Substanzen im folgenden näher beschrieben. Bei der Glykolyse (Abb. 2.1), die im Cytosol abläuft, wird Glukose anaerob zu Pyruvat umgewandelt, was in der Nettobilanz zu 2 mol ATP pro Mol Glukose führt. Der nächste Schritt der vollständigen Glukoseoxidation unter aeroben Bedingungen, nachdem Pyruvat über Carrier in die Mitochondrien eingeschleust wurde, ist die oxidative Decarboxylierung. Hierbei entsteht nicht freie Essigsäure, sondern Acetyl-CoA, weil die Reaktion die Bindung an Coenzym A erfordert. Diese aktivierte Acetylgruppe wird in dem sich anschließenden Citratzyklus (Krebs-Zyklus, Nobelpreis 1953) vollständig zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert. Werden die bei diesen Reaktionen gebildeten Reduktionsäquivalente NADH + H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> in der als oxidative Phosphorylierung bezeichneten Endreaktion der Atmungskette zur ATP-Erzeugung genutzt, ergibt die vollständige Oxidation von 1 mol Glukose 36 mol ATP. Unter anaeroben Bedingungen wird hingegen Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, mit Hilfe der Laktatdehydrogenase, dem Leitenzym des Cytosols, zu Laktat umgesetzt, wobei nur 2 mol ATP entstehen. Trotz ausreichender Sauerstoffversorgung wird bei Tierzellkulturen ca. 80% der Glukose in Laktat umgewandelt, obwohl ein Abbau im Citratzyklus unter energetischen Aspekten günstiger ist [55-57]. Aufgrund der hohen Glukosekonzentrationen in Zellkulturmedien (durchschnittlich 10 mmol/l) stammt der größte Teil des gebildeten Laktats aus Glukose. Prinzipiell kann Laktat auch aus einigen glykogenen Aminosäuren (Ala, Thr, Gly, Ser, Cys) hervorgehen [58]. Interessanterweise wird auch

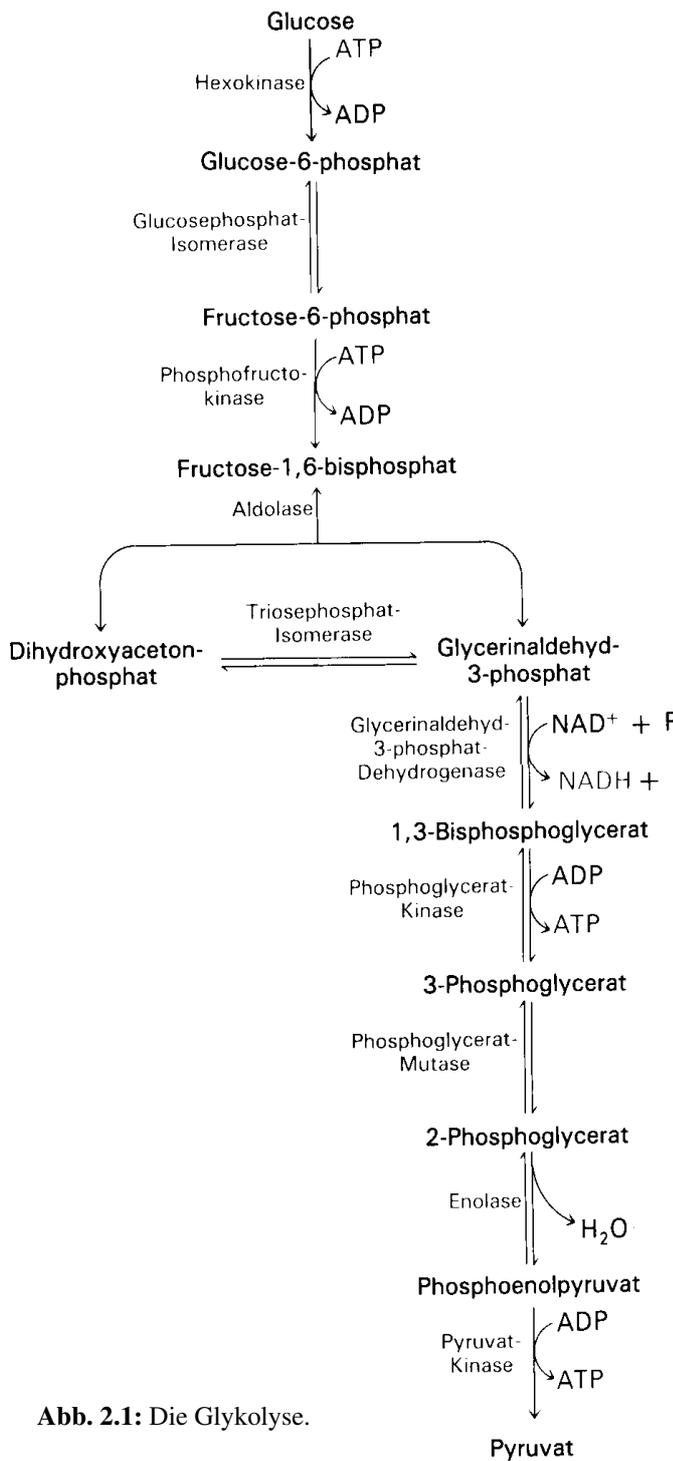


Abb. 2.1: Die Glykolyse.

Glutamin, obwohl es eindeutig als primärer Energielieferant bezeichnet werden kann, zu 10-15% zu Laktat abgebaut. Dabei wird angenommen, daß Glutamin über Malat zu Laktat umgewandelt wird. Das Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatbildung kann wichtige Informationen über den Zustand der Zellkultur geben und Änderungen des Nährstoff-Fluxes können dadurch aufgezeigt werden. Die restliche Glukose wird im Pentose-Phosphat-Zyklus zu Ribose umgewandelt, die für die Bildung von Nucleinsäuren benötigt wird.

Der oxidative Aminosäurenabbau liefert 10-15% der benötigten Energie der Zelle, wobei 5-10 mal mehr Glutamin verbraucht wird als die anderen essentiellen Aminosäuren [59]. Glutamin nimmt zudem eine zentrale Position im Stickstoff-Metabolismus ein. Dabei liefert Glutamin die  $N^3$ - und  $N^9$ - Atome der Purin-Ringe, das Amid-N-Atom von Asparagin und  $NAD^+$ , die Aminogruppe von Glucosamin-6-Phosphat, Guanin, Cytosin und in Form von Carbamyl-Phosphat das  $N^1$ -Atom des

Pyrimidin-Ringes [58]. Das Enzym Glutaminase hydrolysiert Glutamin zu Glutamat, so daß häufig in tierischen Zellkulturen zunächst ein Anstieg der Glutamatkonzentration im Medium beobachtet wird, bis bei Glutaminmangel das Glutamat wieder aufgenommen und verstoffwechselt wird [60]. Glutamat wird in der Mitochondrienmembran durch Glutamatdehydrogenase oxidativ zu  $\alpha$ -Ketoglutarat desaminiert. Das  $\alpha$ -Ketoglutarat wird anschließend in den Citrat-Zyklus eingespeist. Das freigesetzte  $NH_3$  wird entweder mit Pyruvat zu Alanin umgesetzt oder ausgeschieden. Ammoniak und Ammonium-Ionen wirken



werden. Der Ab- und Umbau der Aminosäuren ist eng an den Citrat-Zyklus gekoppelt. Der Zyklus dient einerseits als Einschleusungspunkt für die Oxidation der Aminosäuren, andererseits als Drehscheibe für die Synthese verschiedener Zellmoleküle. Abb.2.2 zeigt eine schematische Übersicht über den Aminosäurestoffwechsel mit den Einschleusungspunkten in den Tricarbonsäurezyklus.

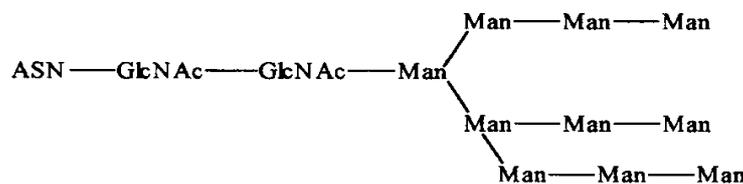
Die Aufnahme der Aminosäuren erfolgt wie die Glukoseaufnahme entweder über aktive Transportsysteme oder durch Diffusion. Beide Mechanismen sind an bestimmte Carrier gebunden. Die Transportsysteme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität und Transportkopplung an  $\text{Na}^+$ -Ionen. Einige dieser Transportsysteme fungieren als Anti-Transportsystem, d.h. zwei Aminosäuren werden zur gleichen Zeit in entgegengesetzte Richtungen transportiert. Aminosäuren können aber auch mit Hilfe von Glutathion im  $\gamma$ -Glutamylzyklus zwischen den Zellen transportiert werden [73, 74].

### 2.3 Glykoproteine, Sialinsäure und Sialidasen

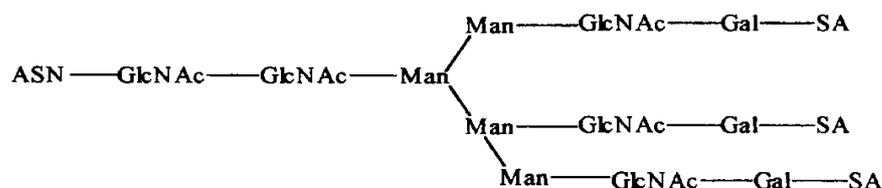
Die meisten extrazellulären Proteine von Säugetierzellen sind sogenannte Glykoproteine, d. h. sie enthalten kovalent gebundene Kohlenhydratanteile mit einem Gehalt zwischen 1 und 90%. Die Verknüpfung am Proteingerüst erfolgt entweder über Asparagin (N-glykosidisch) oder über Serin oder Threonin (O-glykosidisch). Die Oligosaccharidstruktur des Glykoproteins hat einen entscheidenden Einfluß auf die Halbwertszeit im Blutplasma, die Antigenizität, die Immunogenizität, die spezifische Aktivität, die Löslichkeit, die Resistenz gegen thermale Inaktivierung und auf die Resistenz gegen Proteaseangriffe [15, 16, 61, 63, 75]. Während die O-glykosidischen Bindungen auch von einigen speziellen Bakterienarten (Archae- und Eubakterien) synthetisiert werden [76], ist die N-glykosidische Bindung eine spezifische Eigenschaft der Säugetierzelle. Die Sequenz der Oligosaccharid-Seitenketten ist durch die Spezifität des aktiven Zentrums in den Glykosyltransferasen festgelegt. Es können verschiedene Glykoproteine aufgebaut werden, die entweder mannosereiche, hybride oder komplexe Oligosaccharidketten (Abb. 2.3) besitzen [77, 78]. Die Bindung der terminalen Sialinsäure eines Glykoproteins kann durch zwei verschiedene Sialyltransferasen katalysiert werden und führt zu den beiden Isomeren  $\alpha\text{NeuNAc-(2-3)-}\beta\text{-Gal-Rest}$  und  $\alpha\text{NeuNAc-(2-6)-}\beta\text{-Gal-Rest}$ . Im Gegensatz zum menschlichen Gewebe synthetisieren verschiedene rekombinante Zelltypen nur ein bestimmtes Produktisomer, da nur eine der beiden

Sialyltransferasen vorhanden ist. Rekombinante CHO-Zellen produzieren nur Oligosaccharide mit (2,3)-Bindungen zwischen Sialinsäure und Galaktose, während rekombinante C127-Zellen das Produkt mit der (2,6)-Bindung synthetisieren [39]. Das Fehlen von terminaler Sialinsäure an den Oligosaccharidseitenketten hat einen Einfluß auf die spezifische Aktivität und die Halbwertszeit *in vivo* des Glykoproteins (s.o.) [80]. Die Biosynthesen der Kohlenhydratseitenketten kann durch die Zellkulturumgebung potentiell beeinflusst werden. Der Einfluß auf die Glykosylierung durch variierende Hormon-, Glukose- und Ammoniumkonzentrationen wurde bereits nachgewiesen [61, 62, 64, 75, 81, 82].

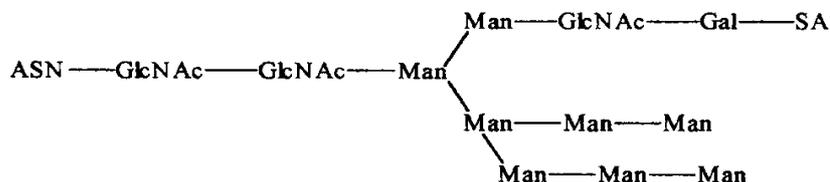
**mannosereich:**



**komplex:**



**hybrid:**



**Abb. 2.3:** Grundstrukturen der Kohlenhydratseitenketten [79].  
Asn (Asparagin), GlcNAc (N-Acetyl-glucosamine, Man (Mannose), Gal (Galactose), SA (Sialinsäure).

Die Heterogenität der Oligosaccharide kann auch durch extrazelluläre Glykosidasen hervorgerufen werden. Die Glykosidasen werden in den Zellen produziert und gelangen nach deren Lyse in die extrazelluläre Umgebung, wo sie ihre Aktivität gegenüber Oligosacchariden beibehalten [83, 80]. Zu den Glykosidasen gehören die Sialidasen, auch Neuraminidasen oder Acetylneuraminyldihydrolyasen (früher: Rezeptor-zerstörende Enzyme) genannt. Sie sind Hydrolyasen, die  $\alpha$ -glykosidisch gebundene N-Acetylneuraminsäure aus bestimmten Heterooligosacchariden abspalten. Sie besitzen bei 37 °C in Zellkulturüberständen eine Halbwertszeit von 57 h [80]. Sialidasen findet man in Mikroorganismen (z.B. Viren, Pilzen, Bakterien) und in Vertebraten (Säuger und Vögel), in Pflanzen hingegen nicht. 1959 gelang erstmals die Isolation und Kristallisation der Sialidase aus *Vibrio cholerae* [84]. Untersuchungen

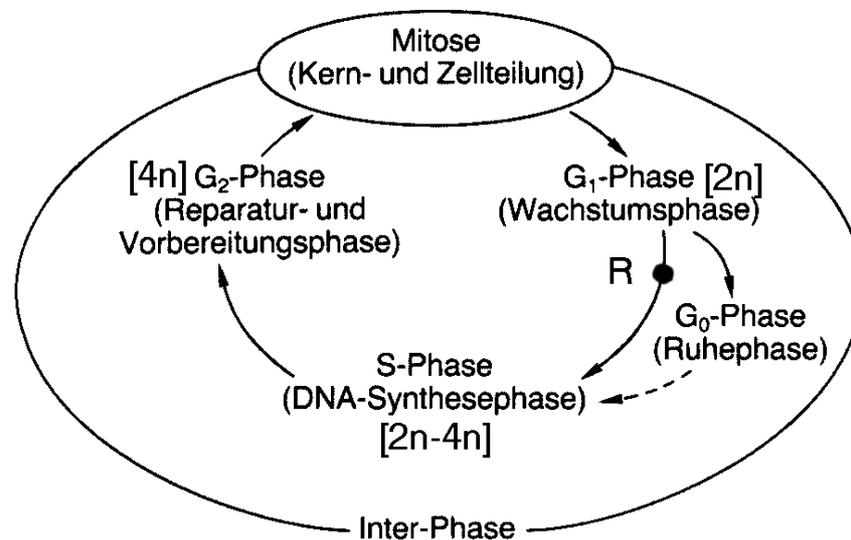
verschiedener Sialidasen zeigten Unterschiede im Molekulargewicht, in den Untereinheiten, der Substratspezifität, der pH-Abhängigkeit, dem Bedarf an bestimmten Ionen sowie der Inhibition durch Substrate. Die Lokalisation der Sialidase in der Zelle ist unterschiedlich und von ihrer Funktion abhängig. Bakterien geben Sialidasen als lösliche Enzyme ins Medium ab. Dagegen liegen sie in Viren und in den verschiedenen Kompartimenten der Säugerzelle (vor allem Lysosomen, Golgi-Apparat und Plasmamembran) in gebundener Form vor [85-87]. Daneben finden sich auch geringe Mengen Sialidase im Cytoplasma [88], im Blutserum und in der Milch [39].

## 2.4 Der Zellzyklus von Eukaryonten

Nach einer von Howard und Pelc 1951 [89] eingeführten Terminologie wird der Zellzyklus der Eukaryonten in Phasen unterteilt, in denen die Zellen charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen durchlaufen. Der Zellzyklus hat vier distinkte Phasen (Abb. 2.4). Die  $G_1$ -Periode beginnt unmittelbar nach der Zellteilung; während dieser Phase sind die Zellen diploid. Es schließt sich dann die S-Phase an, während der die DNA synthetisiert wird und sich das Chromatin verdoppelt. Am Ende der S-Phase besitzen die Zellen die zweifache Menge an Chromatin und gehen in die  $G_2$ -Phase. An die  $G_2$ -Phase schließt sich die neue Mitose an. Die  $G_1$ - und  $G_2$ -Phasen sind sozusagen Lücken (engl. gaps, daher auch G) in der Interphaseperiode der Zellen, während der keine DNA synthetisiert wird. Veränderungen in der Gesamtdauer des Zellzyklus sind vor allem auf Veränderungen der Dauer der  $G_1$ -Phase zurückzuführen, die unter spezieller Kontrolle zu stehen scheint. In der späteren  $G_1$ -Phase gibt es eine Art Schwelle, den sogenannten Restriktionspunkt, nach dessen Überschreitung eine Zelle für eine neue Replikationsrunde konditioniert ist. Bei Säugerzellen in Kultur dauert der Zyklus 10-24 Stunden und länger. Nur die M-Phase läßt sich mikroskopisch leicht verfolgen. Der Anteil der Zellen einer Population, die sich gerade in der Mitose befinden, wird durch den Mitose-Index wiedergegeben; aus ihm läßt sich der zeitliche Anteil der M-Phase am Zyklus ermitteln. Die gesamte Zyklusdauer in einer gut wachsenden Zellpopulation ist mit der Verdopplungszeit der Zellzahl identisch.

Die Synthese von DNA, RNA und Proteinen ist in sehr charakteristischer Weise während des Zyklus reguliert. DNA und die Histone des Chromatins werden nur während der S-Phase gebildet, nicht in der  $G_1$ - oder der  $G_2$ -Phase. Im Gegensatz dazu entstehen kontinuierlich

während der ganzen Interphase die cytoplasmatischen Proteine und die Organellen, d.h. während der  $G_1$ -, S- und  $G_2$ -Phase. Auch RNA wird kontinuierlich synthetisiert. Während der Mitose jedoch ist die gesamte Synthese von DNA und RNA unterbunden; auch die Proteinsynthese ist stark eingeschränkt.



**Abb. 2.4:** Schema zum Zellzyklus von Eukaryonten mit Mitose und den Interphasen- Abschnitten  $G_1$ , S, und  $G_2$ . In Klammern sind die Ploidiegrade angegeben. R=Restriktionspunkt, nach dessen Überschreitung eine Zelle eine neue Replikationsrunde durchläuft.

Aus diesen Eigenschaften wird deutlich, daß die DNA der Chromosomen nur während einer bestimmten Periode im Zyklus für die Replikation zur Verfügung steht. Auch bei Zellen mit einem langen Zyklus nimmt die S-Phase nur eine relativ kurze Zeit der Interphase ein; während der übrigen Zeit kann die DNA-Polymerase nicht arbeiten. Auf der anderen Seite werden während der Interphase RNA und die meisten der Zellproteine kontinuierlich synthetisiert, wodurch viele Abschnitte des gesamten Genoms für eine Transkription zur Verfügung stehen, während sie gleichzeitig nicht repliziert werden können. Das in Abb. 2.4 gezeigte Schema des Zellzyklus zeigt eine Abzweigung aus der  $G_1$  in die  $G_0$ -Ruhe Phase. In dieser Phase wachsen die Zellen nicht und ihre Proteinsynthese-Geschwindigkeit ist drastisch gesenkt. Viele Zellen können, durch bestimmte Signale induziert, in die  $G_1$ -Phase zurückkehren, den Restriktionspunkt überschreiten und erneut den Teilungszyklus durchlaufen [53, 89,90-92].

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt zu bestimmten Zeitpunkten durch ein System von Protein-Kinasen. Zur Aktivierung müssen diese Kinasen an Proteine binden, die als Cykline bezeichnet werden und zu spezifischen Zeitpunkten des Zellzyklus synthetisiert bzw. abgebaut werden. Bei Hefe wurden  $G_1$ -Cykline beschrieben (CLN1-3), die für den  $G_1$ /S-Übergang

entscheidend sind, während eine zweite Cyklin-Klasse (mitotisches Cyklin B) den Übergang von  $G_2$  zur Mitose auslöst. Der Abbau der einzelnen Cykline zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus wird durch Ubiquitin-Übertragung auf die jeweiligen Cyklin-Arten ausgelöst. Die Phosphorylierungsaktivität der Cyklin-abhängigen Kinasen des  $G_2$ -Mitose-Übergangs ist selbst wiederum von deren eigenem Phosphorylierungszustand abhängig. Phosphorylierte Kinase/Cyklin-Komplexe sind enzymatisch inaktiv und werden durch spezifische Phosphatasen am Ende der  $G_2$ -Phase aktiviert [93].

## 2.5 Die rekombinanten Produkte

In dieser Arbeit wurden Experimente mit verschiedenen rekombinanten Tierzelllinien durchgeführt. Die exprimierten rekombinanten Glykoproteine Antithrombin III (AT III), Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) und Faktor VII sind Proteine der Blutgerinnungs- oder Fibrinolysekaskade. Induziert durch Gewebeerletzung (intravasculäres System) oder Oberflächenkontakt (extravasculäres System) läuft die Kaskade des Blutgerinnungssystems über eine Vielzahl von Reaktionen, die eine Aktivierung von Faktoren (Serinproteasen) des Systems zur Folge haben und letztlich zur Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin führen. Da es sich um einen katalytischen Prozeß handelt, genügt jeweils eine geringe Menge des betreffenden Faktors, um den Prozeß in Gang zu setzen. Außerdem wird so eine große Verstärkung im Verlauf der Kaskade erreicht. Die Fibrinbildung und dessen Polymerisation zu einem festen Netzwerk ist die Ursache für die Ausbildung eines Blutgerinnsels oder Thrombus. Die Fibrinolyse, d.h. die Auflösung des Blutgerinnsels, kann als Spiegelbild der Blutgerinnung angesehen werden. Ausgehend von der Spaltung von Plasminogen durch Plasminogenaktivatoren kommt es zur enzymatischen Auflösung des Fibrinnetzwerkes durch Plasmin. Die entstehenden Fibrin-spaltprodukte hemmen ihrerseits die Thrombinbildung und die Polymerisation von Fibrinmonomeren und blockieren dadurch die Blutgerinnung. Die Systeme der Fibrinolyse und der Hämostase gewährleisten einerseits, daß das Blut im intakten Gefäßsystem flüssig bleibt, andererseits bei einer Gefäßverletzung der Defekt durch die Ausbildung eines Blutgerinnsels schnell abgedeckt wird. Das Gleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse im physiologischen Zustand beruht auf dem Zusammenspiel einer Reihe von Aktivatoren und Inhibitoren beider Systeme, die in Abb. 2.5 gezeigt werden. Dem tPA und AT III kommen dabei zentrale physiologische Rollen in der Aufrechterhaltung dieses

Gleichgewichts zwischen Hämostase und Fibrinolyse zu. AT III hemmt Thrombin und blockiert auch weitere Serinproteasen der Gerinnungskaskade, wie die Faktoren XIIa, XIa, IXa und Xa. Die Inaktivierung der Gerinnungsproteasen durch AT III erfolgt relativ langsam. Die Inhibitorwirkung wird durch den Cofaktor Heparin verstärkt. Die Wirkung von Heparin besteht darin, daß es mit AT III einen Komplex bildet und dadurch eine Konformationsänderung induziert. Diese hat zur Folge, daß das aktive Zentrum am AT III Molekül besser zugänglich wird und die Inaktivierung des Thrombins um ein Vielfaches schneller erfolgt [94, 95]. Auch die tPA-Aktivität kann um den Faktor 10 gesteigert werden, indem sich ein Komplex aus tPA, Plasminogen und Fibrin bildet. Dieser Komplex wandelt zymogenes Plasminogen zu aktiviertem Plasmin um, das wiederum die Fibrinolyse startet [1, 96, 97]. Diese sogenannte Stimulierbarkeit ist ein entscheidender Vorzug von tPA gegenüber anderen bekannten Plasminogenaktivatoren, wie Urokinase oder Streptokinase [10].

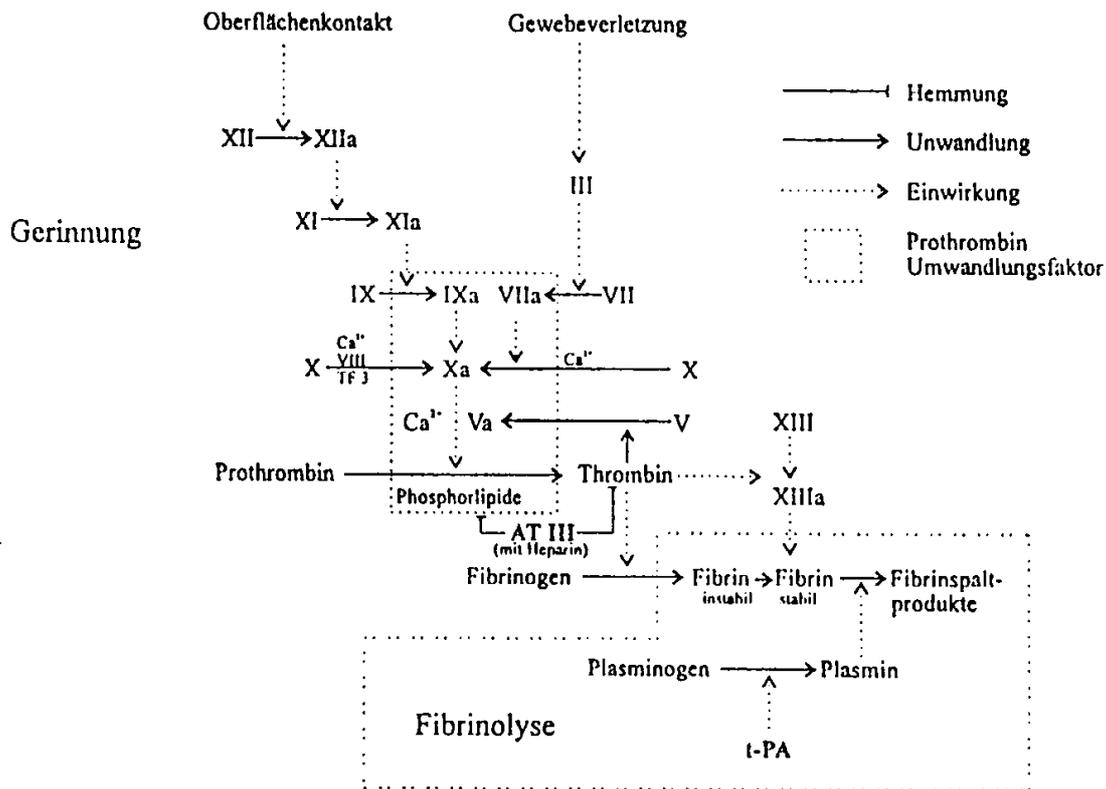


Abb. 2.5: Blutgerinnungskaskade und Fibrinolyse im Überblick [1].

Faktor VII zirkuliert als Zymogen im Blut und wird durch Gewebefaktor (TF) zu Faktor VIIa aktiviert. Der Faktor VIIa-TF-Komplex spaltet Faktor X und Faktor IX in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen und kann so die Blutgerinnungskaskade starten [98]. Die Aktivität von Faktor VIIa kann bei Abwesenheit von TF durch den AT III-Heparin-Komplex stark inhibiert werden [99].

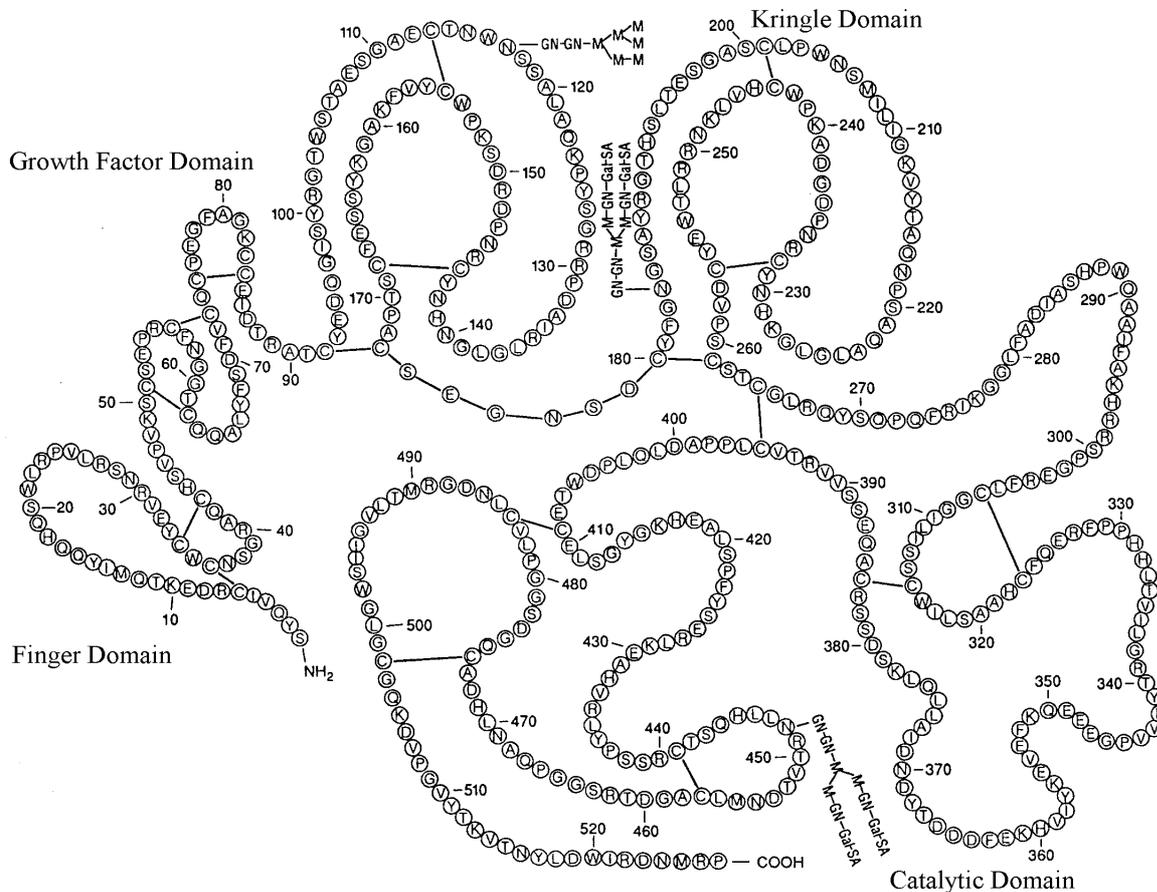
### 2.5.1 Gewebefibrinolyse-Aktivator (tPA)

1995 wurde weltweit rekombinantes tPA im Wert von ca. 300 Millionen US-Dollar verkauft, daher ist tPA eines der intensivst untersuchten Proteine [45]. 1987 wurde erstmalig biologisch aktives, korrekt glykosyliertes tPA in rekombinatem *Aspergillus nidulans* exprimiert [18]. Wohingegen tPA aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* völlig hyperglykosyliert vorliegt und nur eine eingeschränkte Aktivität besitzt [19]. Bei Experimenten mit rekombinanten *E. coli* wurde ein im Cytosol aggregierendes, schwerlösliches, nicht glykosyliertes und falsch gefaltetes tPA erhalten [9]. Die richtige dreidimensionale Faltung des tPA konnte mit Hilfe eines neu entwickelten „Naturierungsreaktors“ erreicht werden, in dem die Bakterien aufgeschlossen und die Proteinaggregate, sogenannte „refractile bodies“ gereinigt, und verschiedenen Solubilisierungs- und Redoxreaktionen unterzogen werden [10]. Das renaturierte Produkt besitzt trotz der fehlenden Glykosylierung die volle biologische Aktivität und eine vergleichbare *in vivo* Halbwertszeit als humanes tPA (ca. 5 min) [13, 14]. Erste Ergebnisse aus Untersuchungen tPA aus der Milch von transgenen Mäusen und Schafen zu gewinnen, zeigen eine interessante Alternative für die Zukunft [20]. Seit 1987 produziert die Firma Thomae großtechnisch tPA mit rekombinanten CHO-Zellkulturen, die ein human identisch glykosyliertes tPA exprimieren [8].

Das tPA besteht aus 527 Aminosäuren (Abb. 2.6) mit einem Molekulargewicht von 59,05 kDa ohne Berücksichtigung der Kohlenhydratseitenketten und 68 kDa mit drei Zuckerresten. Das Glykoprotein besitzt vier potentielle N-Glykosylierungsstellen und zwar die Aminosäuren Asn 117, Asn 184, Asn 218 und Asn 448. Position Asn 117 ist verbunden mit einem mannosereichen Oligosaccharidtyp. Asn 218 liegt nicht glykosyliert vor, da ein Prolinrest folgt, der eine Glykosylierung an einer Asn-Pro-Ser-Position verhindert. Die weiteren Positionen sind mit einem komplexen Oligosaccharidtyp verbunden, der terminal Galaktose oder Sialinsäure besitzt [13]. Natürlicherweise kommen zwei Hauptformen des tPA vor, die sich nur in der Art der Asn 184-Glykosylierung unterscheiden und chromatographisch voneinander getrennt werden können [100]:

**Typ I:** endständige Aminosäuren Asn 117, Asn 184 und Asn 448 sind N-glykosidisch mit Oligosacchariden verbunden.

**Typ II:** endständige Aminosäuren Asn 117 und Asn 448 sind N-glykosidisch mit Oligosacchariden verknüpft.



**Abb. 2.6:** Primärstruktur von tPA [1].

Die räumliche Faltung des Proteinmoleküls wird bestimmt durch die Aminosäuresequenz und durch 17 strukturbestimmende Disulfidbrücken zwischen 34 verschieden positionierten Cystein Aminosäuren. Das Molekül gliedert sich in vier Domänen:

„*Finger Domain*“ (Ser 1 bis His 44); besitzt die analoge Struktur des Fibronectins und fungiert als Fibrinbindungsstelle.

„*Epidermal Growth Factor Domain*“ (Ser 50 bis Asp 87); analog zu der Struktur des epidermalen Wachstumsfaktors.

„*Kringle Domains*“ (Kringel 1: Cys 92 bis Cys 173 bzw. Kringel 2: Cys 180 bis Cys 261); Strukturen, die erstmalig im Prothrombin beschrieben wurden und für die Fibrinbindung entscheidend sind.

„*Catalytic Domain*“ (Ser 262 bis Pro 527); eine Serin-Protease, die erstmalig im Trypsin beobachtet wurde und die Plasminogen-aktivierende Eigenschaft beherbergt, indem sie die Arg 561-Val 562 Peptidbindung des Zymogens hydrolysiert und somit Plasmin freisetzt [101].

Plasmin spaltet tPA bevorzugt in den Positionen Asn 275-276, was zu einer Umwandlung von einkettigem in zweikettiges tPA führt, wobei beide Formen eine vergleichbare fibrinolytische Aktivität besitzen. Zweikettiges tPA besitzt eine schwere Kette (Aminosäuren 1-275) und eine leichte Kette (276-527) die über eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden.

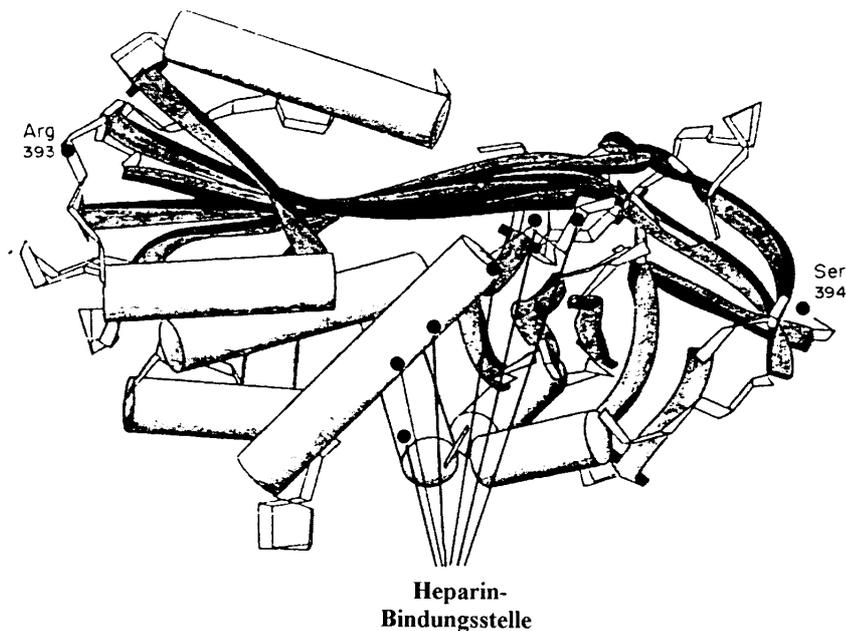
Die spezifische Aktivität und die Halbwertszeit *in vivo* von tPA sind abhängig vom Grad und von der Sequenz der Glykosylierung. Bei tPA gilt grundsätzlich, daß die Aktivität und die Halbwertszeit gesteigert werden, wenn eine geringe Glykosylierung und ein komplexer (mannosearmer) Oligosaccharidtyp vorliegt [15, 16, 63, 75, 102]. So besitzt Typ II eine 30-50% höhere spezifische Aktivität als Typ I [103] und eine ausgedehntere Halbwertszeit *in vivo* [13]. Die posttranslationalen Modifikationen sind bei verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich, da sie von den Konzentrationen und den kinetischen Eigenschaften der anwesenden Enzyme abhängig sind. Die Synthese von tPA mit verschiedenen Zelltypen zeigt deutliche Unterschiede in der Kohlenhydratstruktur, die auf unterschiedliche spezifische N-Acetylglucosaminyltransferase-Aktivitäten zurückzuführen sind [12, 14, 100].

### **2.5.2 Antithrombin III (AT III)**

1982 gelang erstmals die Expression von rekombinantem AT III unter Verwendung von *E. coli* als Translationssystem [104]. Das isolierte Produkt besitzt ein Molekulargewicht von nur 50 kDa und weist keine biologische Aktivität auf. Spätere Versuche von Bröker et al. [17], AT III mit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) herzustellen, führten zwar zu einem Molekül mit der gewünschten biologischen Aktivität, jedoch aufgrund des abweichenden Glykosylierungsmusters zu einer stark reduzierten Heparin-Affinität. Erst 1988 gelang unter Verwendung von CHO-Zellen als Translationssystem die Expression des AT III mit seiner vollen biologischen Funktionsfähigkeit. Diese Zelllinie zeichnet sich durch einen Mangel des

Enzyms Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus, das einen wichtigen Schritt in der DNA-Synthese katalysiert. Die CHO-Zellen werden durch ein Plasmid, das neben dem AT III-Strukturgen ein weiteres Gen mit der Information für Mäuse-DHFR trägt, transformiert. Damit die Plasmidstabilität sichergestellt ist, läßt man die Zellen in einem Medium wachsen, daß das Antibiotikum Methotrexat (MTX), ein wirksamer kompetitiver Inhibitor der DHFR, enthält. Bei Kultivierungen in Anwesenheit von MTX werden die Säugerzellen resistent gegen seine Wirkung, da durch Genamplifikation eine Überproduktion der DHFR hervorgerufen wird. Die mit MTX behandelten Zellen weisen anschließend viele Kopien des DHFR-Gens auf, was zur Folge hat, daß auch die Expression des Produktes stark gesteigert ist, da das Resistenzgen direkt vor dem Strukturgen liegt. Mit diesem System können bis zu 22 µg Produkt pro  $10^6$  Zellen in 24 Stunden produziert werden [105, 106]. Die Weiterentwicklung der CHO-Zelllinie ermöglichte bereits 1992 eine serumfreie Kultivierung [107], infolgedessen bewährte sich der Langzeitsuspensions-Clon SSO/A2 (Behringwerke Marburg) besonders durch eine hohe Produktivität und eine Verdopplungszeit von 22-26 Stunden.

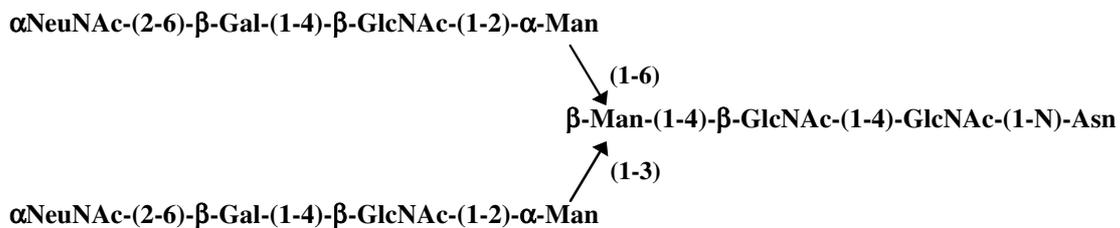
Die Aminosäuresequenz des AT III wurde sowohl durch Proteinsequenzierung als auch durch Sequenzierung der korrespondierenden cDNA aufgeklärt. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 58 kDa, besteht aus 432 Aminosäuren und enthält drei intramolekulare Disulfidbrücken. Es besitzt vier Kohlenhydratketten, die N-glykosidisch an Asparagin (Asn) gebunden sind. AT III zeigt auf Aminosäureebene eine Homologie von 33% zu  $\alpha_1$ -Antitrypsin, einem weiteren Proteaseinhibitor, dessen Struktur bereits seit längerer Zeit bekannt ist. Es wurde angenommen, daß sich die dreidimensionalen Strukturen beider Proteine ähneln und daher AT III aus neun Helices und drei  $\beta$ -Faltblatt-Domänen aufgebaut ist (Abb. 2.7). 1990 gelang schließlich die Kristallisation des Rinder-AT III und damit eine direkte Aufklärung der dreidimensionalen Struktur [108]. Aufgrund der Homologie des Rinder-Proteins zum humanem AT III von etwa 90% ist anzunehmen, daß die räumlichen Strukturen beider Proteine annähernd identisch sind [108]. Der Kohlenhydratanteil im AT III beträgt ca. 10 bis 15%. Die vier Kohlenhydratketten des Moleküls sind N-glykosidisch an Asn 96, 135, 155 und 192 gebunden. Die Lokalisation der Kohlenhydratketten spielt für die Funktion des AT III eine wichtige Rolle, da sie sich in Nachbarschaft zur Heparinbindungsstelle befinden.



**Abb. 2.7:** Mögliche Struktur des AT III, abgeleitet aus der Homologie zu  $\alpha_1$ -Antitrypsin. Dargestellt als dreidimensionale Struktur mit Thrombinbindungsstelle (393 Arg) und Heparin-Bindungsstelle [109].

Das Fehlen einer Kohlenhydratkette an Asn 135, wie beim  $\beta$ -Antithrombin, führt beispielsweise zu einer erhöhten Heparinaffinität, da die elektrostatische Abstoßung zwischen den beiden Molekülen geringer ist. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Punktmutation in Position 7 (Ile gegen Asn) eine geringere Affinität [108].

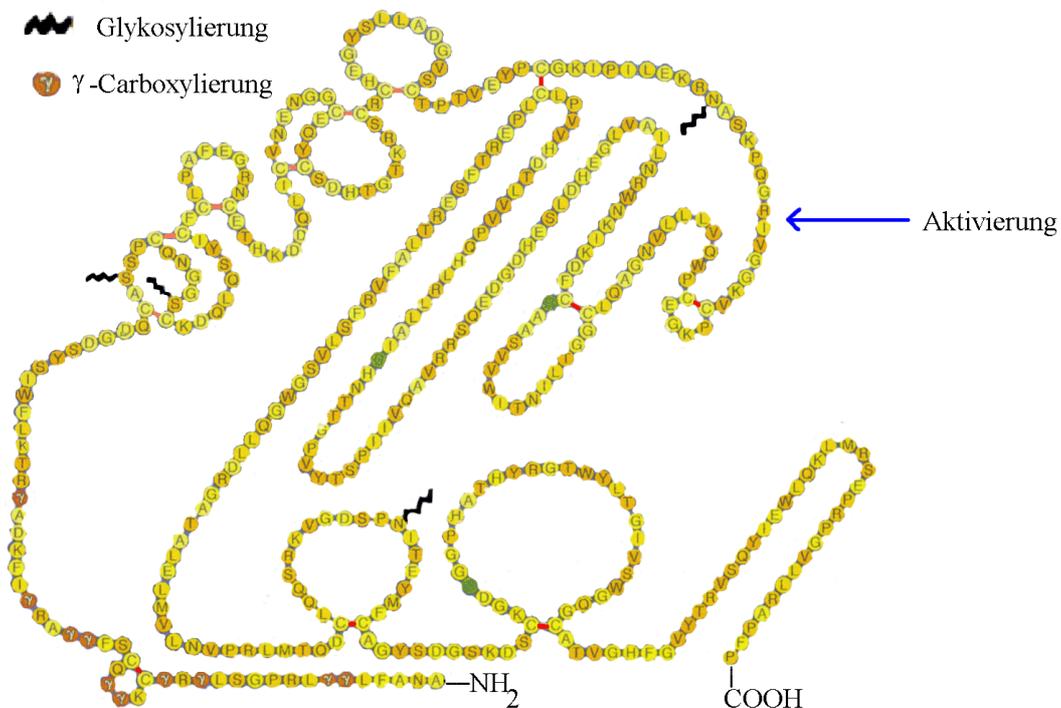
Humanes AT III besitzt vier gleiche Kohlenhydratketten, die aus D-Mannose (Man, 3,7%), D-Galaktose (Gal, 2,4%), D-N-Acetylglucosamin (GlcNAc, 5,5%) und N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc, 3,9%) aufgebaut sind. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Methylierung der Zucker und Gaschromatographie und führte zu der in Abb. 2.8 dargestellten Struktur [110].



**Abb. 2.8:** Struktur einer glykosidischen Seitenkette des humanen AT III, modifiziert nach Franzén und Svensson [110].

### 2.5.3 Faktor VII

Humaner Faktor VII (Abb. 2.9) ist ein einkettiges Vitamin K abhängiges Glykoprotein aus 406 Aminosäuren mit 50 kDa, das in der Leber synthetisiert wird und als Zymogen der Serin Protease Faktor VIIa ins Blut abgegeben wird. Einkettiges Faktor VII wird zu Faktor VIIa konvertiert, indem die Arg -152-Ile-153 Bindung gespalten wird. Faktor VIIa besteht aus zwei Ketten, einer leichten mit 152 Aminosäuren und einer schweren mit 254 Aminosäuren. Die beiden Ketten werden durch eine einzelne Disulfidbrücke in der Position Cys-145-Cys-262 zusammengehalten. Faktor VII besitzt 4 Kohlenhydratseitenketten, von denen jeweils 2 O-glykosidisch und N-glykosidisch gebunden sind. Die O-glykosidisch gebundenen Seitenketten in Ser 52 und Ser 60 unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung. An Ser 52 werden drei verschiedene Kohlenhydratketten zu gleichen Anteilen gefunden: Glukose, das Disaccharid Glukose-Xylose und das Trisaccharid Xylose-Xylose-Glukose. Ser 60 ist dagegen mit Fucose verbunden [111]. Die N-glykosidisch gebundenen Seitenketten an Asn 145 und Asn 322 bestehen aus Fucose, Mannose, Galaktose, N-Acetylglukosamin und Sialinsäure [112]. Faktor VII besitzt zudem 10  $\gamma$ -carboxylierte Glutaminsäurereste. Die Carboxylierung von Glutaminsäureresten ist eine Vitamin K abhängige posttranslationale Modifikation [93].



**Abb. 2.9:** Primärstruktur von Faktor VII.

---

Die Kultivierung und Transfektion von Baby Hamster Kidney-Zellen (BHK-Zellen) mit dem humanen Faktor VII Genom wird das erste Mal 1986 von Hagen et al. [113] beschrieben. Die Glykosylierungsmuster von humanem und rekombinantem Faktor VII sind fast identisch, so daß keine Unterschiede in der biologischen Aktivität feststellbar sind. Geringfügig unterschiedlich ist der Fucose- und Sialinsäureanteil in den N-glykosidischen Seitenketten. Zudem sind beim rekombinanten Faktor VII nur 9 statt 10 Glutaminsäuren  $\gamma$ -carboxyliert [112].

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Die verwendeten Zelllinien und ihre Stammhaltung

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um eine rekombinante Baby Hamster Kidney (BHK)- und vier verschiedene rekombinante Chinese Hamster Ovary (CHO)- Zelllinien. Diese Suspensionszelllinien sind an das Wachstum in serumfreien Medium adaptiert. Tab. 3.1 zeigt eine Auflistung dieser Säugerzellen und deren Produkte.

**Tab. 3.1:** Verwendete Zelllinien und deren Produkte.

Zelllinie	Herkunft	Ursprung	Produkt
TF 70 R	Pharmacia & Upjohn	rekombinante CHO Zelllinie	humanes tPA
SS0-A2	Behring Werke AG	rekombinante CHO Zelllinie	humanes AT III
SS0-A2PF	GBF Braunschweig	rekombinante CHO Zelllinie	humanes AT III
2E12	Medizinische Hochschule Hannover	rekombinante CHO Zelllinie	PST-1
B4B1-MSP	Novo Nordisk	rekombinante BHK Zelllinie	Faktor VII

Nähere Angaben über den biologischen Ursprung, die Spezifität der exprimierten Proteine und die genaue genetische Konstruktion der Zelllinien TF 70 R, SS0-A2, SS0-A2PF und B4B1-MSP können aus Geheimhaltungsgründen nicht genannt werden. Die Daten der Zelllinie 2E12 und dessen Produkt PST-1 werden in der Diplomarbeit von Windfuhr (1997, Universität Hannover) beschrieben [114].

Die Stammkultivierung der Suspensionszelllinien erfolgt in einem mit 10% CO<sub>2</sub> begasten und mit Wasser befeuchteten Brutschrank (B 5060 EK, HERAEUS) bei 37°C. Nach dem Animpfen von Techne-Spinnerflaschen oder Kunststoffkulturflaschen (Technomara) mit  $0,2 \cdot 10^6$  Ze/ml und dem jeweiligen Kulturmedium verblieben die Zellen im Brutschrank. Eine Passagierung erfolgt alle 3-5 Tage unter Berücksichtigung des Zustandes der Kultur. Die Zellen werden bei 1500 Upm abzentrifugiert und mit frischem Medium aufgenommen.

### 3.2 Die Medien

Bei den Kultivierungen werden verschiedene Fertigmedien und Medienkombinationen eingesetzt. Die teilweise in Pulverform erhältlichen Medienbestandteile werden in der entsprechenden Menge deionisiertem Wasser gelöst und durch einen Celluloseacetatfilter (Porenweite 0,2 µm) sterilfiltriert, da aufgrund der komplexen Zusammensetzung ein Autoklavieren nicht möglich ist. Die Zugabe von fehlenden Komponenten wie NaHCO<sub>3</sub> als Puffer und MTX als Selektionsmarker erfolgt vor dem Filtrieren. Die Filtration wird mit Flachmembranen (142 mm Durchmesser, Sartorius) sowie Komplett-Filtereinheiten mit Schlaucholive und Abfüllglocke (Sartolab P20plus, Sartorius) durchgeführt. Zur Sterilkontrolle wurden die Medien 3-4 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

In der folgenden Tabelle sind die Zelllinien mit den verwendeten Medien aufgeführt:

**Tab. 3.2:** Verwendete Medien und Medienkombinationen.

Zelllinie	Medium	Hersteller
TF 70 R	50% Excell 301 25% IMDM 25% HAM'S F12	JRH Bioscience Life Technologies Sigma
SS0-A2	Ultra CHO	Biowhitaker
SS0-A2PF	SMIF-6	Gibco BRL
B4B1-MSP	Novo-Medienkombination	Novo Nordisk

Für die Zelllinie TF 70 R wird eine von Rössler [79] entwickelte Medienkombination verwendet, die zu einem guten Verhältnis von Zellwachstum und Produktivität führt. SMIF-6 ist ein neu entwickeltes proteinfreies Medium. Der Vorteil bei der Verwendung von proteinfreien Medien liegt in der vereinfachten Aufreinigung der von den Tierzellen produzierten Glykoproteine und der geringeren Kontaminationsgefahr. Auch serumfreie Medien enthalten noch große Mengen an Proteinadditiven wie Transferrin, Albumin, Insulin und Lipoproteinen, die einen störenden Einfluß bei Affinitätsreinigungsverfahren besitzen [115]. Die Zusammensetzung der Novo-Medienkombination wird an dieser Stelle aus Geheimhaltungsgründen nicht genannt.

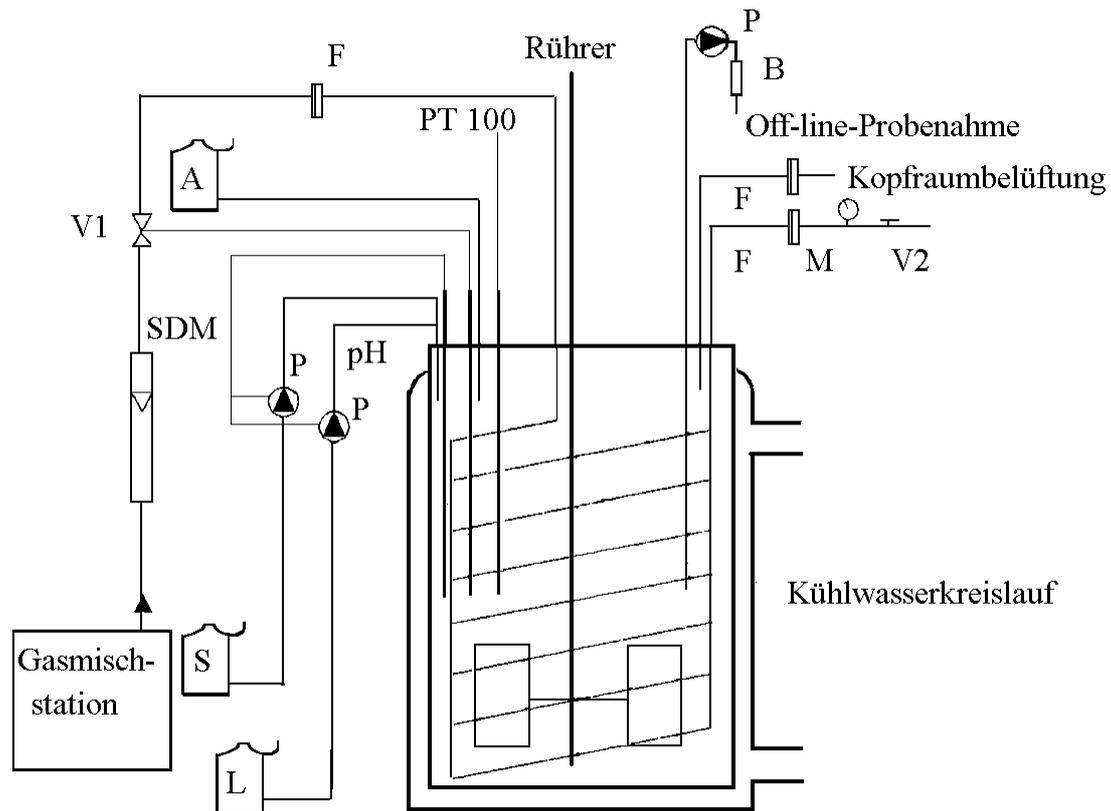
## 3.3 Kultivierungssysteme

### 3.3.1 Bioreaktoren

Für die Batchkulturen standen drei Bioreaktoren (B. Braun Biotech International, Melsungen) mit unterschiedlichen Kultivierungsvolumina zur Verfügung: zwei Biostat MC mit 2 Liter und ein Biostat B mit 5 Liter Kulturvolumen. Diese speziellen Ausführungen zur Kultivierung von scherempfindlichen Tierzellen besitzen diverse Meß- und Steuerungseinheiten zur Regelung der Rührerdrehzahl, des pH-Wertes, der Temperatur und des Gelöstsauerstoffes im Medium. Die Reaktoren werden vor Kultivierungsbeginn mit den In-line-Meßsonden (PT 100, pH- und Sauerstoffsonden) sowie verschiedenen Anschlüssen zum Befüllen des Kulturgefäßes mit Medium, zum Inokulieren, zur pH-Regelung mittels 1N Salzsäure oder 1N Natronlauge und zur Off-line-Probenahme versehen und über 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Da eine direkte Begasung aufgrund von Blasenbildung die Zellen zerstört, wird indirekt über Silikonschläuche begast. Diese besitzen einen Innendurchmesser von 3 mm und eine Wandstärke von 0,5 mm und sind um einen am Deckel befestigten Trägerkorb gewickelt. Die Schlauchlänge beträgt im 2 Liter Gefäß 2-3 Meter und im 5 Liter Gefäß 6-9 Meter. Die Regelung des Sauerstoffgehaltes im Medium erfolgt durch Zufuhr von Luft, Sauerstoff oder Stickstoff über eine Gasmischstation, wobei die Gaszufuhr durch Schwebekörperdurchflußmesser gemessen und über Magnetventile durch Schaltsignale des Bioreaktors kontrolliert wird.

Die Überwachung und Steuerung der Batchkultivierungen erfolgt durch die Kontrolleinheiten der Bioreaktoren, wobei alle aufgenommenen Meßdaten über eine Schnittstelle (0-10V) von einem Leitrechner (486DX33) über AD-Wandler ausgelesen werden. Das verwendete Hardware/Software-System BIO-TEMDAT 5.86 dient dabei zur graphischen Darstellung der Meßsignale und zur Datensicherung [79].

Der schematische Aufbau einer Batchkultivierung ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1:** Schematischer Aufbau einer Batchkultivierung.  
 P = Pumpe, F = Luftfilter, V1 = Magnetventil, V2 = Nadelventil, B = Bakterienfalle  
 M = Manometer, S/L = Säure/Lauge, A = Medium- und Inokulationsflasche

### 3.3.2 Techne-Spinnerflaschen

Aus Zeit- und Kostengründen wird ein Großteil der Kultivierungen in Spinnerflaschen (250 ml, Techne Corporation) durchgeführt, die ein einfaches, unreguliertes Rührkesselsystem darstellen. Durch eine kreisende Glaskugel mit Metallkern an einem Glasstab entsteht schon bei 20 Upm nach dem Einstein-Thompson-Effekt eine nicht turbulente Strömung, die ausreicht um das Kulturmedium zu durchmischen [116]. Aufgrund dieser besonders milden Bedingungen lassen sich bei scherstreßempfindlichen Säugerzellen höhere Zelldichten als mit herkömmlichen Spinnerflaschen erzielen. Ein weiterer Vorteil der Techne-Spinnerflaschen ist, daß bei ihnen kein erkennbares Totwassergebiet auftritt [117].

Als Rührer wird das Modell MCS-104S der Firma Techne Corporation eingesetzt.

### 3.4 Definition der Wachstumsparameter

#### 3.4.1 Wachstumsrate

Die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellkultur wird über den Vorgang der Zellmitose bestimmt. Unter der Voraussetzung, daß keine Substratlimitierung vorliegt, entspricht die Wachstumskinetik in der exponentiellen Phase der Änderung der Zellkonzentration mit der Zeit:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

mit  $X$  = Zellkonzentration,  $\mu$  = Wachstumsrate.

Da aus einer Zelle zwei Tochterzellen entstehen, ergibt sich für die *zellspezifische Wachstumsrate*  $\mu$  ein logarithmischer Zusammenhang:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

mit  $x_1$  und  $x_2$  = Zellkonzentration zum Zeitpunkt  $t_1$  bzw.  $t_2$ .

#### 3.4.2 Spezifische Substratverbrauchs-, Metabolitbildungs- und Produktbildungsraten

Für den Verbrauch von Substraten wie Glukose und Glutamin, der Bildung von Laktat und Ammonium sowie der Produktion der Glykoproteine werden zur Verdeutlichung der Stoffwechselaktivität und Produktivität zellspezifische Raten berechnet. Für den Substratverbrauch ergibt sich folgende Abbaugeschwindigkeit :

$$r_s = \frac{dS}{dt} = q_s \cdot X(t)$$

mit  $X(t)$  = Gesamtzellkonzentration zur Zeit  $t$  und mit  $q_s$  = zellspezifische Verbrauchsrate  $q_s$  ergibt sich zu :

$$q_s = \frac{Q_s}{X}$$

wobei  $Q_s$  der spezifische Verbrauch und  $\bar{X}$  die mittlere Zellzahl ist, der spezifische Verbrauch ist definiert als:

$$Q_s = \frac{C_{s1} - C_{s2}}{t_2 - t_1}$$

mit  $C_{s1}, C_{s2}$  = Substratkonzentrationen zum Zeitpunkt  $t_1, t_2$ , und

$$\bar{X} = \frac{X_2 + X_1}{2}$$

ist das arithmetische Mittel aus zwei in gleichen Abständen zum Zeitpunkt  $t_2$  und  $t_1$  gemessenen Zellkonzentrationen.

Die Metabolit- und Produktbildungen werden mit entsprechenden Gleichungen berechnet. Zur Berechnung der mittleren spezifischen Raten werden nur die positiven Werte aufaddiert und gemittelt.

### 3.4.3 Glukoseumsatz und Laktatausbeute

Der Glukoseumsatz ist wie folgt definiert :

$$\eta_1 = \frac{C_{s0} - C_{s1}}{C_{s0}}$$

Der Umsatz bezieht sich auf die ursprüngliche eingesetzte Menge ( $C_{s0}$ ) der betreffenden Komponente. Eine in diesem Zusammenhang wichtige Größe ist die Glukoseausbeute :

$$\eta_2 = \frac{C_{s1} - C_{s2}}{C_{p2} - C_{p1}} \quad \text{mit } C_{s1}, C_{s2} = \text{Substratkonzentration zur Zeit } t_1, t_2$$

$$\quad \text{mit } C_{p1}, C_{p2} = \text{Stoffwechselprodukt zur Zeit } t_1, t_2$$

Die Berechnung bezieht sich auf die im Zeitintervall  $t_2 - t_1$  umgesetzte Menge an Glukose.

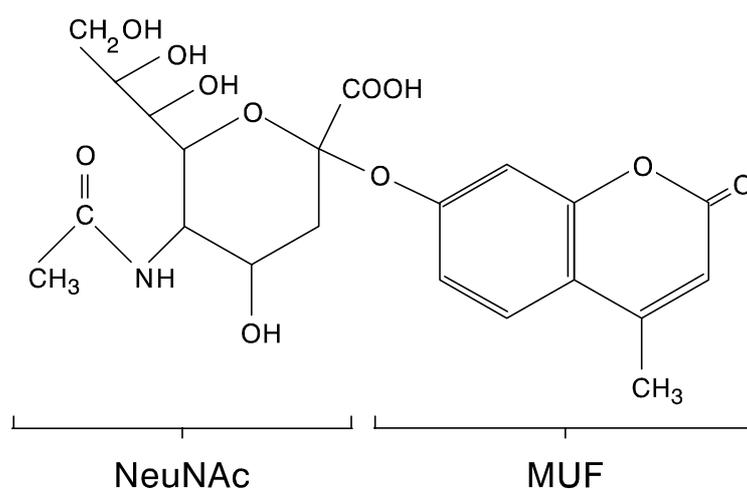
## 3.5 Analytik

### 3.5.1 Sialidase-Bestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt durch Messung der Fluoreszenz des Hydrolyseproduktes 4-Methylumbelliferon, das durch Anregung bei der Wellenlänge von 362 nm Licht bei 448 nm emittiert.

Die durchgeführte Methode stellt eine von Hüners [39] optimierte Modifikation des Verfahrens von Munzert et al. [83] dar, das wiederum in Anlehnung an Gramer et al. [8] entwickelt und an zellfreien Überständen einer Tierzellkultur (Chinese Hamster Ovary, CHO) durchgeführt wurde. In früheren Veröffentlichungen von Myers et al. [118] und Portier et al. [119] wurde bereits von ähnlichen Methoden berichtet, mit denen die Sialidase-Aktivitäten in kultivierten Fibroblasten und Leukoplasten bestimmt, sowie Vergleiche mit der Aktivität bakterieller Sialidase aufgestellt werden konnten.

Bei dem eingesetzten Substrat handelt es sich um 2'-(4-Methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-Acetylneuraminsäure (MUF-NeuNAc, Abb. 3.2), das durch Sialidase unter Hydrolyse in 4-Methylumbelliferon (MUF) und N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) gespalten wird. Die Reaktion erfolgt im allgemeinen für 60 min bei 37°C und wird durch Zugabe eines Glycin/KOH-Puffers und Eiskühlung gestoppt. Die fluorimetrische Messung wird nach 15 min Temperierung auf 25°C in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Hitachi, Modell F-4500) durchgeführt.



**Abb.3.2:** Struktur des Substrates der Sialidase:  
2'-(4-Methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-Acetylneuraminsäure (MUF-NeuNAc).

Die Vorversuche werden mit Sialidase aus *Clostridium perfringens* Typ V durchgeführt. Das Enzym wird in 290 µl Kultivierungsmedium gelöst und ersetzt den Zellüberstand im Testansatz [39].

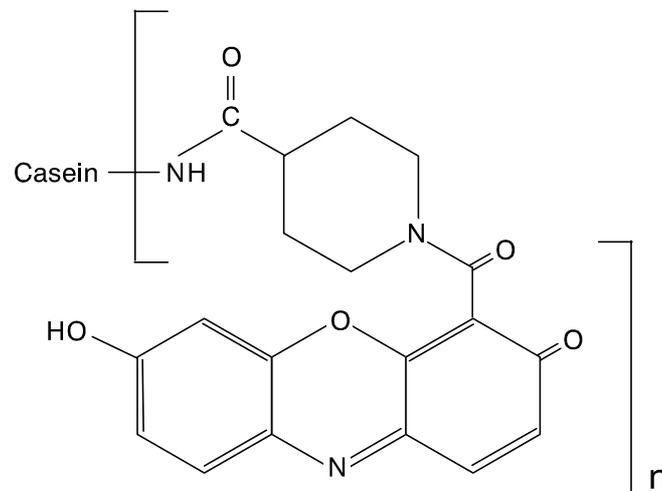
### 3.5.2 Protease-Bestimmung

Der hier verwendete, von Twining [120] etablierte sehr empfindliche Proteasenachweis, basiert auf das Substratverhalten eines farbstoffmarkierten Caseins. Das Hydrolyseprodukt besitzt die Eigenschaft, nach Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren, das durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann. Bereits Enzymkonzentrationen im Nanogramm-Bereich, z. B. von Trypsin und Chymotrypsin, können nachgewiesen werden. Bei diesem Test wird der lineare Zusammenhang zwischen Hydrolyseprodukt und emittierter Strahlung ausgenutzt [39].

Ein von der Firma Boehringer Mannheim vertriebenes Substrat bietet die gleichen Eigenschaften. Es handelt sich um Casein aus Kuhmilch, das mit Resorufin aktiviert ist [N-(Resorufin-4-carbonyl)piperidin-4-carbonsäure-N'-hydroxy-succinimidester] (Abb.3.3). Das Substrat enthält ca. 90 µg Resorufin pro mg Casein. Durch Einwirkung verschiedener Proteasen wird das markierte Casein gespalten. Nicht hydrolysiertes Casein wird mit Trichloressigsäure ausgefällt und durch Zentrifugation abgetrennt. Die Resorufin-markierten Caseinbruchstücke präzipitieren nicht und bleiben in Lösung. Sie können durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden und dienen als Meßgröße für die proteolytische Aktivität.

Das Absorptionsmaximum des Hydrolyseproduktes liegt im neutralen und alkalischen Bereich bei einer Wellenlänge von  $\lambda=574$  nm und im sauren Bereich bei  $\lambda=467$  nm. Das Emissionsmaximum befindet sich im neutralen und alkalischen Bereich bei  $\lambda=584$  nm und im sauren bei  $\lambda=559$  nm.

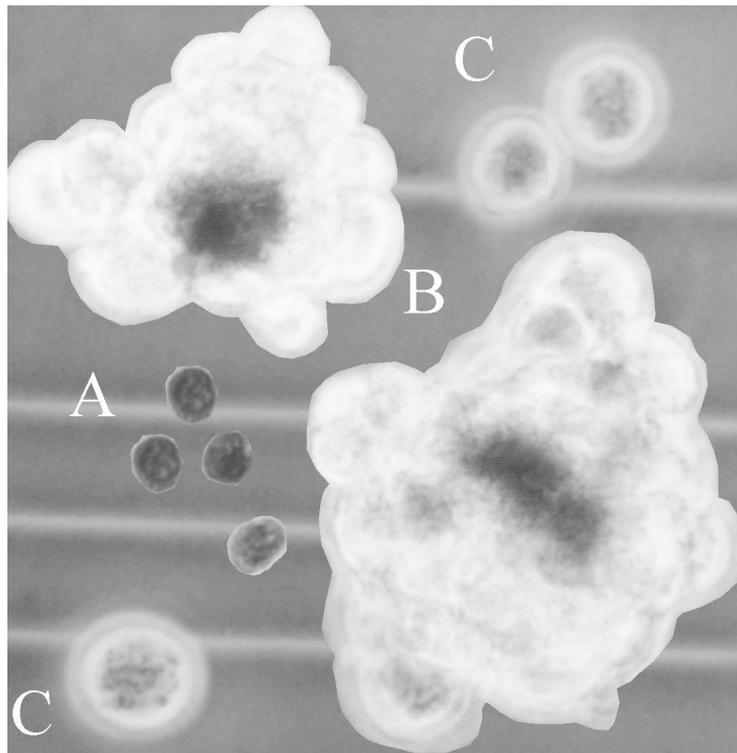
Die Vorversuche werden mit Trypsin durchgeführt. Das Enzym wird im Kultivierungsmedium gelöst und die eingesetzte Menge auf 100 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz ersetzt die Probe-Lösung im Testansatz [39].



**Abb. 3.3:** Struktur des Substrates der Proteasen:  
[N-(Resorufin-4-carbonyl)piperidin-4-carbonsäure-N'-hydroxy-succinimidester]

### 3.5.3 Zellzahlbestimmung und Vitalität mit der Trypanblau-Methode

Zur optischen Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wird eine repräsentative Zellsuspension mit 250 µl 0,4%iger Trypanblau-Lösung (Serva) versetzt und mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Brand) unter einem Mikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung (Olympus) bei 200facher Vergrößerung ausgezählt. Der Zellfarbstoff Trypanblau kann intakte Zellmembranen nicht passieren, so daß gesunde Zellen unter dem Mikroskop vor dem Hintergrund der dunkelblauen Lösung farblos erscheinen. Tote oder beschädigte Zellen werden vom Farbstoff tief dunkelblau angefärbt (Abb. 3.4). Die Vitalität beschreibt das prozentuelle Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamt-Zellzahl (lebende + tote Zellen). Die Einwirkzeit des Trypanblau darf 60 Sekunden nicht überschreiten, da der Farbstoff auf die Zellen eine toxische Wirkung hat [121].



**Abb. 3.4:** CHO-TF 70 R-Zellen bei 400facher Vergrößerung.  
A) Zellkerne aus CHO-Tf70R-Zellen nach der Behandlung mit Kristallviolett  
B) Zellaggregate mit toten Zellen im Aggregatinneren angefärbt mit Trypanblau  
C) Lebende einzelne CHO-TF 70 R-Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase

### 3.5.4 Zellkernmethode

Da Zellaggregate eine genaue Zellzahlbestimmung mit der Trypanblau-Methode erschweren, wird mit der Zellkernmethode eine weitere Bestimmungsmöglichkeit genutzt. Bei dieser von Lin und Nguyen [122] entwickelten Methode erreicht man durch Einwirken einer 10%igen Lösung von Kristallviolett in 0,1 normaler Zitronensäure (+1% Triton X), daß die Zelle lysiert, und nur der Zellkern durch den Farbstoff Kristallviolett in der Zählkammer sichtbar wird. Hierbei wird 1 ml homogene Reaktorprobe 3 min bei 1500 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl Reagenz aufgenommen. Nach 2 min guter Durchmischung sind die Zellen aufgelöst und können analog der Trypanblau-Methode in einer Thoma-Zählkammer ausgezählt werden. Mit dieser Methode wird die Gesamtzellzahl bestimmt, da auch die Zellkerne der Totzellen mitgezählt werden.

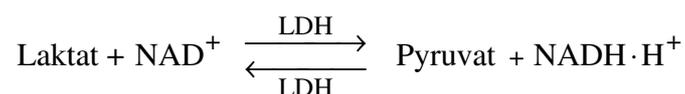
### 3.5.5 Die Laktatdehydrogenase-Bestimmung

Die Beurteilung des Kulturzustandes erfolgt durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH-Aktivität). Das normalerweise nur im Zellcytoplasma vorkommende Enzym gelangt bei Beschädigung der Zellmembran in das Nährmedium, so daß zwischen der Enzymaktivität im Medium und dem Grad der Zellschädigung ein proportionaler Zusammenhang besteht [123]. Zur Bestimmung wird ein käuflicher Testkit (Sigma) benutzt.

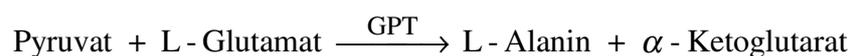
### 3.5.6 Laktatbestimmung mit photometrischem Test

Laktat, ein Stoffwechselmetabolit, das bei der anaeroben Glykolyse entsteht und in das Kulturmedium abgegeben wird, wirkt bei tierischen Zellkulturen neben Ammoniak als wichtigster Wachstumsinhibitor. Laktat kann ab einer Konzentration von 2,0 g/l toxisch wirken [68, 124]. Eine Anhäufung führt zu einer pH-Wert Senkung im Nährmedium, die durch Zusatz des pH-Indikators frühzeitig erkannt werden kann [125].

Die Bestimmung der Laktatkonzentration wird mit einem Testkit der Firma Boehringer, Mannheim (L-Milchsäure UV-Test Nr. 139084) durchgeführt. Diesem Test liegt folgende Reaktion zugrunde:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weitgehend auf der Seite von Laktat. Es wird durch eine nachgeschaltete Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), das in Gegenwart von L-Glutamat Pyruvat zu Alanin umsetzt, auf die andere Seite verschoben.



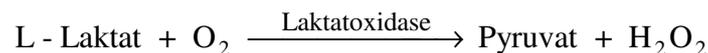
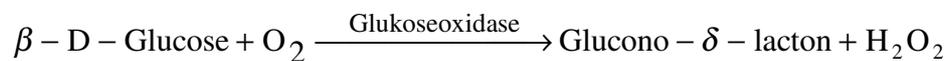
Als Meßgröße dient die  $\text{NADH} \cdot \text{H}^+$ -Extinktion. Die Abnahme der  $\text{NADH} \cdot \text{H}^+$ -Konzentration kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden und ist direkt proportional der Laktatkonzentration. Die Reaktion wird solange verfolgt, bis das gesamte Laktat verbraucht ist.

Der Test wird im Halbmikromaßstab entsprechend der in der Vorschrift gemachten Angaben durchgeführt.

### 3.5.7 Glukose- und Laktatbestimmung mit dem YSI 2700

Die Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration stellt in der Zellkulturtechnik eine wichtige Analyse dar. Glukose ist eine der bedeutensten Energiequellen für tierische Zellen, während Laktat ein Stoffwechselendprodukt ist.

Die Bestimmung von Glukose und Laktat erfolgt enzymatisch mit Hilfe der Glukose- und der Laktatoxidase. Gemessen wird das bei der Reaktion entstehende  $H_2O_2$ .



Die Messung erfolgte mit einem Glukose-Laktat Analyzer YSI 2700 (Yellow Springs, Ohio, USA). Dabei werden 30  $\mu\text{l}$  Probe automatisch angesaugt und die Konzentrationen der beiden Substanzen parallel bestimmt.

Jede Meßsonde ist mit drei Membranen ausgestattet. Die erste Membran besteht aus Polycarbonat und dient zur Zurückhaltung von Zelltrümmern sowie von hochmolekularen Substanzen. Auf der zweiten Membran befindet sich das immobilisierte Enzym. Die dritte Membran besteht aus Celluloseacetat mit einer Ausschlußgrenze von 100 d und wirkt somit als Barriere für andere reduzierbare Substanzen.  $H_2O_2$  kann die Membran passieren und wird an einer Elektrode (Pt, Ag/AgCl) oxidiert. Der Stromfluß ist proportional der jeweiligen Glukose- bzw. Laktatkonzentration.

### 3.5.8 Bestimmung reduzierender Zucker

Die p-Hydroxybenzoesäurehydrazid (p-HBAH)-Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker hat den Vorteil, daß keine immobilisierten Enzyme oder andere vergleichsweise teure Substanzen benötigt werden.

Reduzierende Zucker reagieren mit p-HBAH in alkalischer Lösung zu Phenylhydrazonen, die in der Hitze mit überschüssigem Reagenz in Osazone übergehen. Die entstehenden gelben Produkte werden bei 410 nm photometrisch bestimmt [126, 127].

### 3.5.9 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Ammonium stellt eines der wichtigsten Stoffwechsellprodukte dar, das in hohen Konzentrationen toxisch wirkt. Ammonium wirkt nicht nur wachstumsinhibierend, sondern kann auch die Produktivität und das Glykosylierungsverhalten von Tierzellen und somit die Produktqualität beeinflussen [61-68].

Im Stoffwechsel von Säugertierzellen wird die  $\alpha$ -Aminogruppe einiger Aminosäuren auf  $\alpha$ -Ketoglutarat übertragen, wobei Glutamat entsteht; dieses wird oxidativ desaminiert und liefert  $\text{NH}_4^+$ . Auch bei Glutamin supplementierten Medien wird Ammonium durch den spontanen Zerfall von Glutamin freigesetzt.

Der Verlauf der Ammoniumkonzentration wird mit einem Testkit der Firma Boehringer photometrisch verfolgt. Vor der Messung muß die Probe mit einem Perchlorsäure/Perchlorat-Gemisch entproteiniert werden [128].

### 3.5.10 Gesamtprotein nach Bradford

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford [129] beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue-G250 bei Reaktion mit Protein. Der Farbstoff bindet bevorzugt an basische und aromatische Aminosäuren, so daß bei Einsatz verschiedener Proteine, aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung, Geraden mit verschiedener Steigung entstehen [130]. Daher ist die Wahl des Standardproteins von großer Bedeutung und die ermittelten Proteinkonzentrationen stellen keine absoluten Werte dar, sondern Äquivalente des Standardproteins.

Der Farbstoff kann, je nach Protonierungsgrad in drei verschiedenen Formen vorliegen: einer roten kationischen, einer grünen neutralen und einer blauen anionischen Form. Das Bradford-Reagenz hat einen pH-Wert, bei dem der Farbstoff doppelt protoniert ist und somit rot

erscheint. Bei der Bindung an Protein wird die blaue anionische Form stabilisiert, die dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm detektiert wird.

Bei der durchgeführten Proteinbestimmung wurde als Standard Rinder-Serum-Albumin (BSA) eingesetzt. Bei allen angegebenen Proteinkonzentrationen handelt es sich um BSA-Äquivalente.

Diese Methode umfaßt einen Meßbereich bis maximal 100 µg/ml Protein, daher muß bei hohen Proteinkonzentrationen das Probenvolumen mit 0,9%ige NaCl-Lösung verdünnt werden.

### **3.5.11 Aminosäuren**

Die Messung der verschiedenen Aminosäurekonzentrationen im Kultivierungsüberstand erfolgt mit einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage. Dabei werden die Aminosäuren nach einer Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol (OPA-MCE) auf einer Säule, aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten und der damit zusammenhängenden Wanderungsgeschwindigkeiten, aufgetrennt. Die Substanzen werden am Säulenende anhand ihrer fluoreszierenden Eigenschaften detektiert [131].

### **3.5.12 Organische Säuren**

Zur Charakterisierung des Stoffwechsels von Säugertierzellen sind die Konzentrationen der ausgeschiedenen Intermediate des Citratzyklus sowie anderer Primärmetabolite von Bedeutung. Die Bestimmung dieser Metabolite im Kulturüberstand erlaubt es, Rückschlüsse auf den Stoffwechselzustand der Zellen zu ziehen.

Eine von Christel [132] optimierte Ionenausschlußchromatographie-Methode (HPICE = High Performance Ion Chromatography Exclusion) ermöglicht die organischen Säuren Oxalacetat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Citrat, Pyruvat, Malat, Succinat, Laktat, Formiat, Fumarat und Acetat in einem Analysenlauf quantitativ aufzutrennen.

Ein Probendurchlauf benötigt ca. 60 min. Die mit Hilfe eines UV-Detektors ermittelten Extinktionen werden wahlweise mit dem rechnergestützten Apex-System oder mit einem Integrator in Konzentrationen umgerechnet. Zur Probenvorbereitung ist lediglich eine Proteinfällung mit Perchlorsäure notwendig.

Für genauere Informationen über die Struktur und Möglichkeiten dieses Systems sei auf die Diplomarbeit von Christel verwiesen [132].

### **3.5.13 Bestimmung der Phosphatkonzentration**

Anorganisches Phosphat ist an den verschiedenen Vorgängen im Stoffwechsel der Zelle beteiligt. Phosphate sind Bestandteile der Nukleotide, der Nukleinsäuren und der Phospholipide. Sie sind daher am Aufbau der DNA und der Zellmembran beteiligt sowie an der Energiespeicherung in Form von ATP [53, 73, 89]. Die Phosphatkonzentration hat weiterhin einen Einfluß auf den Sekundärmetabolismus [133].

Die Messung der Phosphatkonzentration im Kulturüberstand erfolgt mit dem Testkit Spectroquant (PMB) 14848 (Merck). Der Test basiert auf dem photometrischen Nachweis des PMB-Komplexes (Phosphormolybdänblau) bei einer Wellenlänge von 712 nm. Nach Zugabe von Schwefelsäure und eines Molybdatsalzes zu der Probe, bildet sich Molybdophosphorsäure, die anschließend mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau reduziert wird [134].

### **3.5.14 Produktkonzentrationsbestimmung durch Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Die Enzymimmunoassay-Methoden verbinden die hohe Spezifität der Antikörper mit der Empfindlichkeit einfacher spektrophotometrischer Enzymtests. Es werden Antikörper oder Antigene verwendet, die an einfach zu bestimmende Enzyme mit hoher Wechselzahl kovalent gebunden sind. ELISA werden zur Bestimmung von Antigen- oder Antikörper-Titern kompetitiv oder nach der Sandwich-Methode mit zwei Antikörpern durchgeführt. Der Sandwich-Methode liegt folgendes Prinzip (Abb. 3.5) zugrunde:

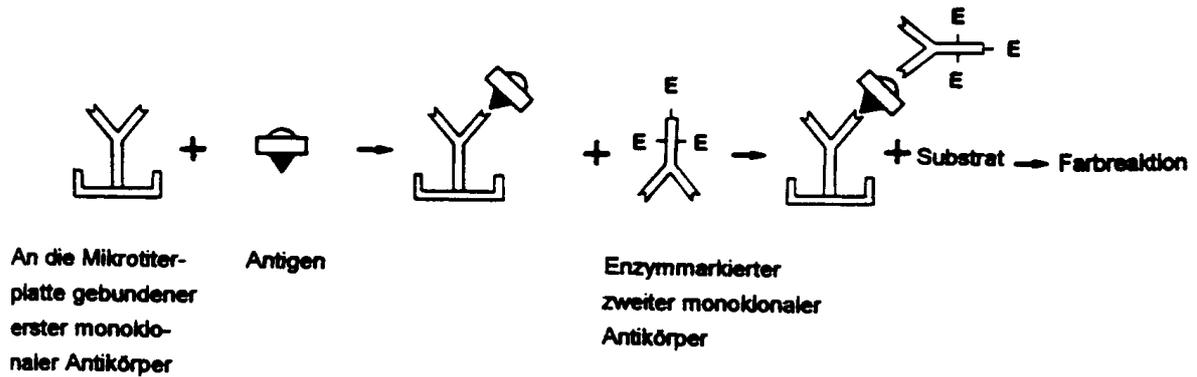


Abb. 3.5: Prinzip eines ELISA nach der „Sandwich“- Methode.

Nach einer ersten Inkubationszeit wird nicht gebundenes, überschüssiges Antigen durch einen Waschvorgang entfernt. Anschließend wird ein zweiter Antikörper hinzugefügt, der neben der hochspezifischen Bindung zum Produkt an ein Enzym, eine Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Diese Art ELISA bestehend aus immobilisiertem Antikörper, Probenantigen und POD-markiertem Antikörper wird wegen seiner Anordnung als „Sandwich-ELISA“ bezeichnet [129]. Ein nach mehreren Waschschrritten hinzugefügtes Farbreagenz (Chromogen) reagiert anschließend mit der Peroxidase, wobei ein Farbstoff freigesetzt wird, dessen Extinktion mit Hilfe eines Immunoreaders detektiert wird. Da die gemessene Extinktion nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional der Konzentration des Farbstoffes ist, kann somit die Menge gebundenen Probenantigens mittels einer erstellten Kalibrationskurve berechnet werden.

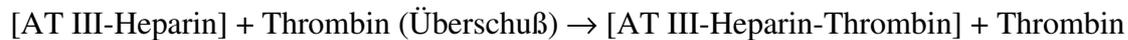
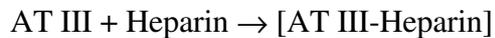
Da die Testmethode sehr empfindlich ist, darf die maximale Produktkonzentration nicht größer als 100 ng/ml sein. Dieser Konzentrationsbereich wird entweder durch eine serielle Verdünnung auf der Mikrotiterplatte oder durch eine Vorverdünnung erreicht.

Die Bestimmungen der Produktkonzentrationen werden mit dem "Factor VII EIA Kit" (DAKO, Dänemark), "Imulyse<sup>TM</sup> tPA" (Biopool, Schweden) und einer Vorschrift zur AT III Bestimmung der Behringwerke Marburg durchgeführt.

### 3.5.15 AT III-Aktivitätstest

Bei der AT III-Aktivitätsbestimmung modifiziert von Teige und Genschel [156, 157] wird die spezifische Proteaseaktivität von Thrombin ausgenutzt, eine bestimmte Arginin-Serin-Bindung zu spalten. Das Thrombin wird durch den Serinprotease-Inhibitor AT III inaktiviert. Die Reaktionsgeschwindigkeit des AT III wird in Gegenwart des Cofaktors Heparin

beschleunigt. Bei der Aktivitätsbestimmung wird ein chromogenes Substrat, Chromozym TH (Tosyl-Gly-Pro-Arg-4-Nitroanilin), eingesetzt, dessen Hydrolyseprodukt 4-Nitroanilin photometrisch detektiert werden kann. Dem Test liegen folgende Reaktionsschritte zugrunde:



Die quantitative Bestimmung von 4-Nitroanilin erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 378 nm. Bei bekannter Anfangskonzentration von Thrombin kann über Rückrechnung auf die umgesetzte Menge Thrombin die AT III-Aktivität ermittelt werden.

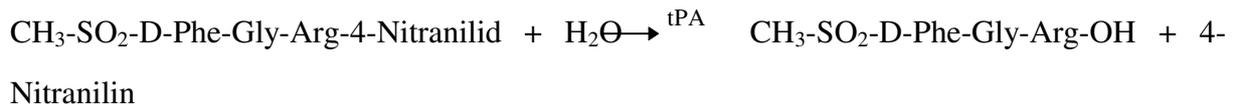
Zur Konzentrationsbestimmung muß eine Kalibrationskurve erstellt werden. Hierfür wird das Probevolumen im Testansatz und die Differenz zu 100 µl Thrombin durch Puffer ersetzt. Die Thrombinlösung zeigt bei Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum große Aktivitätsverluste. Daher muß zu Beginn jeder Meßreihe die Aktivität neu bestimmt werden, damit eine genaue Berechnung der Probenkonzentration möglich ist. Die Aktivität der Thrombinlösung ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$U/ml = \frac{\Delta E/\text{min} * V_{\text{Küvette}}}{\epsilon * d * V_{\text{Probe}}} \quad ; \quad \epsilon = 15,4 \text{ mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

1 Unit Thrombin entspricht 1 µMol umgesetztem Chromozym TH bei 25°C in einer Minute.

### 3.5.16 tPA-Aktivitätstest und spezifische Aktivität

Der Einfluß der Kultivierungsbedingungen auf die Produktqualität wird untersucht, indem die Aktivität des produzierten tPA gemessen wird. Das tPA spaltet von Chromozym tPA (N-Methylsulfonyl-D-Phe-Gly-Arg-4-nitranilid-acetat) 4-Nitranilin ab, welches bei 405 nm photometrisch bestimmt wird.



Aus der Extinktionsdifferenz pro min wird die tPAI-Aktivität in U/ml nach folgender Formel berechnet:

$$\text{tPAI [U/ml]} = \Delta E_{\text{Probe/min}} * 1,64 * F_{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

Hierbei ist zu beachten, daß einkettiges tPA mit Oligopeptidsubstraten weniger sensitiv reagiert als zweikettiges tPA. Das tPA der Probe kann durch Inkubation mit Plasmin definiert in die zweikettige Form umgewandelt und als solche gemessen werden. Die tPAII-Aktivität wird dann wie folgt berechnet:

$$\text{tPAII [U/ml]} = \Delta E_{\text{Probe/min}} * 1,79 * F_{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

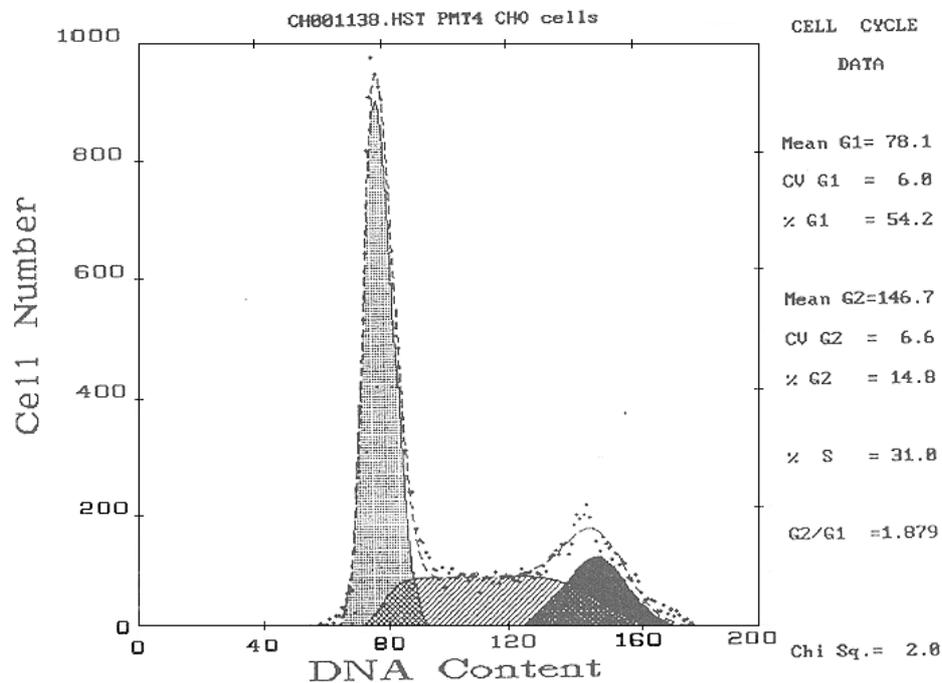
Die spezifische Aktivität, die auch bei der Versuchsauswertung bestimmt wurde, muß erst aus den gemessenen Aktivitätswerten berechnet werden. Aus den Aktivitätswerten ist nicht ohne weiteres ersichtlich, ob eine Aktivitätsänderung durch eine veränderte Substratkonzentration auftritt oder ob sich die Aktivität des Substrats z.B. durch Konformationsänderungen verändert hat. Hierfür muß die spezifische Aktivität berechnet werden:

$$\text{spezifische Aktivität} \left[ \frac{\text{U}}{\mu\text{g}} \right] = \frac{\text{tPA - Aktivität} \left[ \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]}{\text{tPA - Konzentration} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]}$$

### 3.5.17 Durchflußzytometrische Zellzyklusbestimmung

Die durchflußzytometrische DNA-Analyse liefert Informationen über den Zellzyklus und Ploidiestatus. Durch Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Fluorochrom, das an die DNA bindet oder interkalierend eingebaut wird, kann der DNA-Gehalt einer Einzelzelle quantifiziert werden. Das in dieser Arbeit eingesetzte Propidiumiodid bindet bevorzugt Adenin-Thymidin-Basen, wobei das nach Anregung emittierte Licht rot ist.

Aus der Messung einer Vielzahl von Zellen entsteht das lineare DNA-Histogramm (Abb.3.6), indem die Größe des DNA-Fluoreszenzsignals und die Anzahl der gemessenen Teilchen pro Intensitätsklasse gegeneinander aufgetragen werden. Aus den resultierenden Histogrammen können die einzelnen Phasen mittels komplexer Algorithmen der Software Multicycle (Phoenix Flow Systems, Kalifornien) errechnet werden.



**Abb. 3.6:** Zellzyklusbestimmung mit der Software Multicycle.

Die derzeit in der Durchflußzytometrie eingesetzten DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe sind nicht in der Lage, native DNA quantitativ anzufärben. Um eine DNA-proportionale Färbung zu erzielen, ist eine Vorbehandlung der Zellen mit einem Detergenz wie Tween 20 (Sigma) notwendig. Sie dient dazu, die Zellmembran zu permeabilisieren oder zu entfernen, die Kernmembran durchlässig zu machen und die Bindungsstellen an der DNA freizulegen. Ziel der Vorbehandlung ist, bei allen Zellen unabhängig von Differenzierungsgrad, Chromatinkonformation und Kernkondensation eine quantitative Anfärbung der DNA zu erreichen. Um störende RNA zu beseitigen, wird der Zellprobe RNase (Type III-A, bovine (Sigma)) zugesetzt. Die Zellproben können mit einem PBS-Ethanol-Gemisch fixiert und einen Monat bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden [136].

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

### **4.1 Einfluß der Temperatur auf Kultivierungen der rekombinanten CHO-Suspensionszelle TF 70 R**

Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstumsverhalten, die Produktquantität-, qualität, das Produktionsverhalten und auf die Stoffwechselaktivität der rekombinanten CHO-Suspensionszelle TF 70 R, die das Produkt tPA exprimiert, wird im Batchbetrieb untersucht. Als Rührkesselsystem werden sowohl Spinnerflaschen als auch Bioreaktoren eingesetzt. Neben Versuchen mit konstanter Temperaturführung zwischen 30°C und 41°C werden verschiedene Experimente mit Temperaturshift mit dem Ziel durchgeführt, die optimalen Bedingungen (Zeitpunkt und Temperatur) für einen Shift zu ermitteln. Die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens und des Kulturzustandes erfolgt durch die Ermittlung der Gesamt-, Tot- und Lebendzellzahl sowie der extrazellulären LDH-Aktivität. Aus diesen Daten werden die Wachstumsrate und die Vitalität berechnet. Bei einigen Kultivierungen wird weiterhin eine Zellzyklusbestimmung vorgenommen. Um das Stoffwechselverhalten zu charakterisieren werden die Glukose-, Laktat-, Phosphat-, Gesamtprotein-, Ammonium- und Aminosäurenkonzentrationen bestimmt und verschiedene Verbrauchs- und Bildungsraten, sowie Umsätze und Ausbeuten berechnet. Desweiteren wird der Konzentrationsverlauf der extrazellulären organischen Säuren verfolgt. Zur Bestimmung des Produktionsverhaltens und der Produktqualität werden sowohl die tPA-Konzentration als auch die tPA-Aktivität bestimmt und daraus die Produktionraten und die spezifischen Aktivitäten berechnet. Zudem werden extrazelluläre Enzymaktivitäten ermittelt, die die Produktqualität beeinflussen können.

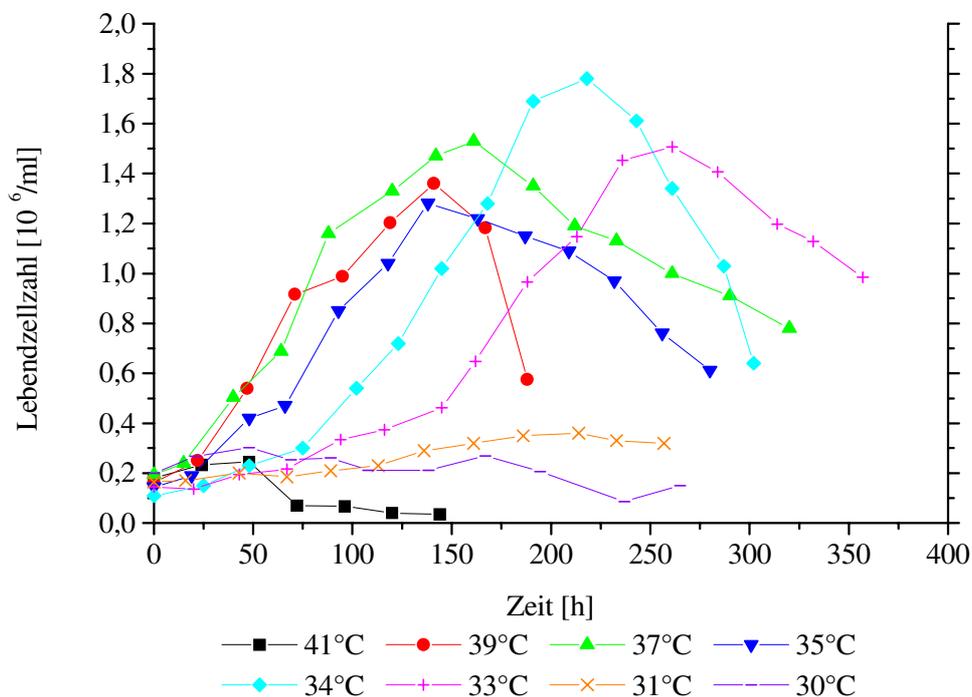
#### **4.1.1 Untersuchungen in Spinnerflaschen bei konstanter Temperatur**

Untersucht werden Kultivierungstemperaturen von 30 bis 41°C in kontinuierlich gerührten 250 ml Techne-Spinnerflaschen. Als Standardmedium wird ein Gemisch aus 50% Excell 301, 25% IMDM und 25% HAM'S F12 verwendet. Der pH-Wert liegt zu Beginn der Kultivierungen bei 7,2. Die Rührerdrehzahl beträgt 20 Upm. Um die Streubreite der Meßergebnisse zu verringern, wird jede Kultivierung mindestens dreimal, maximal fünfmal

wiederholt. Im folgenden sind die gemittelten Daten dargestellt. Die Daten der 35°C Kultivierung entstammen der Diplomarbeit von W. Ramm [37].

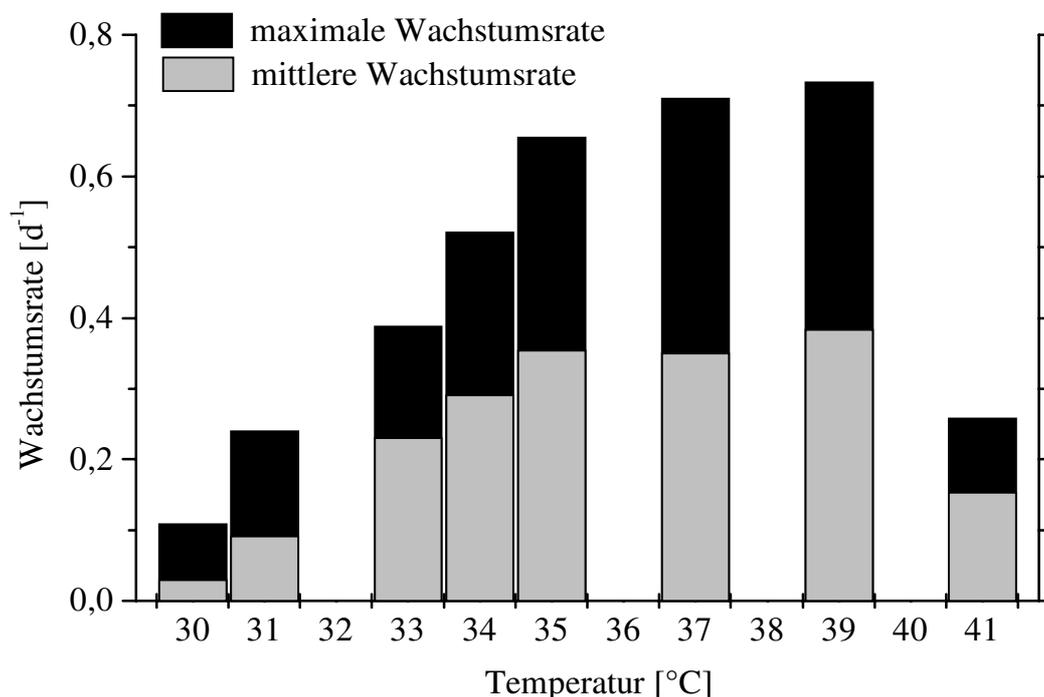
#### 4.1.1.1 Zellwachstum und Stoffwechsel der TF 70 R-Zelllinie

Das Wachstum der rekombinanten CHO Zellen bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen ist in Abb. 4.1 dargestellt. Zellen, die bei der physiologischen Temperatur von 37°C kultiviert werden, besitzen eine Adaptionsphase von 24 Stunden. Anschließend beginnt das exponentielle Wachstum, das bis zur 161. Stunde anhält und bis zu einer maximalen Lebendzellzahl von  $1,52 \cdot 10^6$  Ze/ml führt. Bei 37°C ist keine stationäre Phase zu erkennen, da der sofortige Übergang in die Absterbephase erfolgt. In dieser Phase nimmt die Lebendzellzahl linear ab. Nach 320 Stunden besitzt die Kultur noch eine Vitalität von 49,7%. Die maximale Wachstumsrate von  $0,71 \text{ d}^{-1}$  wird bei 37°C schon nach einem Tag erreicht und die mittlere Wachstumsrate beträgt  $0,35 \text{ d}^{-1}$ .



**Abb. 4.1:** Lebendzellzahl bei verschiedenen Temperaturen als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahl der CHO TF 70 R-Zellen bei Batch-Kultivierungen in 250 ml Spinnerflaschen wurde mit der Trypanblau-Methode bestimmt.

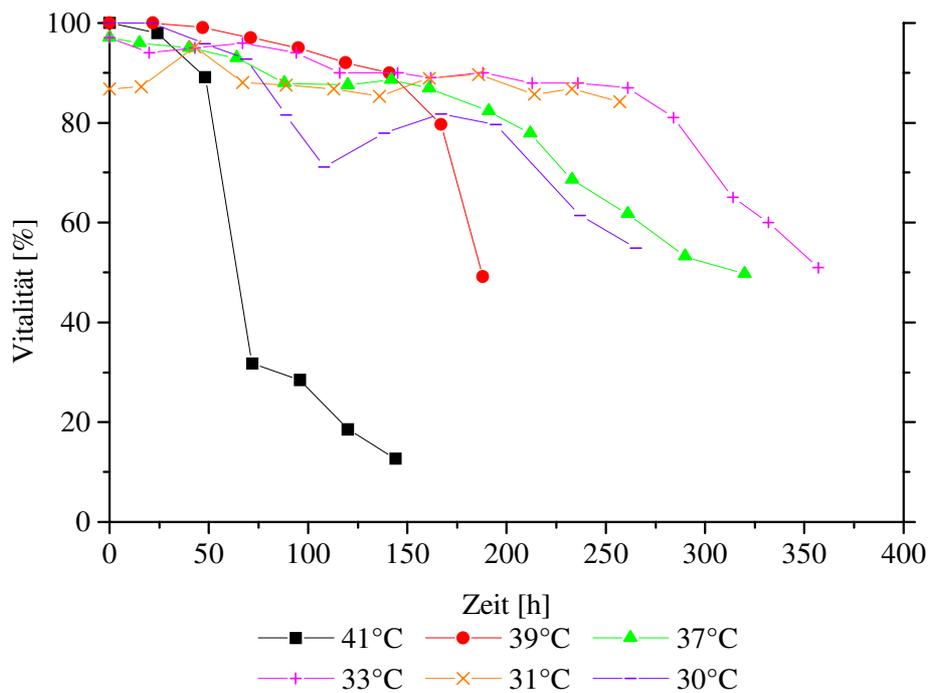
Bei einer Erhöhung der Temperatur um 2°C auf 39°C ist keine lag-Phase mehr erkennbar, so daß die Zellen sofort mit dem exponentiellen Wachstum beginnen. Mit 0,38 d<sup>-1</sup> und 0,73 d<sup>-1</sup> besitzen die Zellen bei 39°C sowohl die höchste mittlere als auch die höchste maximale Wachstumsrate (Abb. 4.2) aller untersuchten Temperaturen. Allerdings wird mit 1,36\*10<sup>6</sup> Ze/ml keine so hohe maximale Lebendzellzahl wie bei der 37°C-Kultivierung erreicht, da schon nach der 143. Stunde die Absterbephase beginnt und die Vitalität (Abb. 4.3) der Kultur steil abfällt. Während bei 39°C ein gegenüber 37°C beschleunigtes Zellwachstum stattfindet, ist bei einer weiteren Temperaturerhöhung auf 41°C kein Zellwachstum mehr erkennbar. Die Vitalität sinkt sehr schnell bei fast gleichbleibender Gesamtzellzahl auf 31% in der 72. Stunde ab. Sureshkumar und Mutharasan zeigten bei den erhöhten Temperaturen von 39°C und 41°C ein entsprechendes Wachstumsverhalten bei einer Maus-Maus Hybridoma-Zelllinie [33]. Andererseits kann unter bestimmten Bedingungen ein kurzzeitiger nicht-lethaler Hitzeschock von 41°C auch zu einer Erhöhung der Produktivität bei rekombinanter Zellen führen [137].



**Abb. 4.2:** Wachstumsraten als Funktion der Temperatur. Die maximalen und mittleren Wachstumsraten für CHO TF 70 R-Zellen bei Batch-Kultivierungen in 250 ml Spinnerflaschen wurden aus den Lebendzellzahlen berechnet.

Eine Absenkung der Temperatur auf 35°C führt zu einem ähnlichen Wachstumsverlauf im Vergleich zu 37°C. Nach einer eintägigen Adaptionsphase, folgt mit einer mittleren

Wachstumsrate von  $0,35 \text{ d}^{-1}$  und einer maximalen Wachstumsrate von  $0,65 \text{ d}^{-1}$  die exponentielle Wachstumsphase. Auch der Verlauf der Vitalität der Kultur entspricht dem der  $37^\circ\text{C}$  Kultivierung. Jedoch ist die erreichte maximale Lebendzellzahl von  $1,28 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  um 16% niedriger als die bei  $37^\circ\text{C}$ , so daß eine Temperaturniedrigung um  $2^\circ\text{C}$  keinen erkennbaren Vorteil im Wachstumsverhalten zeigt.



**Abb. 4.3:** Vitalitäten bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen als Funktion der Zeit. Die Vitalitäten für CHO TF 70 R-Zellen bei Batch-Kultivierungen in 250 ml Spinnerflaschen wurden aus den Gesamt- und Lebendzellzahlen berechnet.

Der Wachstumsverlauf bei  $33^\circ\text{C}$  und  $34^\circ\text{C}$  ähnelt dem der  $37^\circ\text{C}$  Kultivierung, nur verschoben um die verlängerte Adaptionphase, die 75 Stunden bei  $34^\circ\text{C}$  und 96 Stunden bei  $33^\circ\text{C}$  andauert. Gegenüber der Kultivierung bei  $37^\circ\text{C}$  verliert das Wachstum außerdem an Geschwindigkeit, was sowohl durch die abnehmenden mittleren Wachstumsraten von  $0,29 \text{ d}^{-1}$  ( $34^\circ\text{C}$ ) und  $0,23 \text{ d}^{-1}$  ( $33^\circ\text{C}$ ), als auch die maximalen Wachstumsraten von  $0,52 \text{ d}^{-1}$  ( $34^\circ\text{C}$ ) und  $0,39 \text{ d}^{-1}$  dokumentiert wird. Die Kultivierung bei  $34^\circ\text{C}$  besitzt mit  $1,78 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  in der 218. Stunde die höchste Lebendzellzahl aller untersuchten Temperaturen. Die maximale Lebendzellzahl bei  $33^\circ\text{C}$  ist mit  $1,5 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  zwar niedriger als die bei  $34^\circ\text{C}$ , entspricht aber der maximalen Lebendzellzahl bei  $37^\circ\text{C}$ . Auffallend ist die lang anhaltende hohe Vitalität der Zellen bei  $33^\circ\text{C}$ . In der 300. Stunde besitzt die Kultur noch eine Vitalität von 80% gegenüber 45% bei  $34^\circ\text{C}$ . Bei  $31^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  können die Zellen nicht die Adaptionphase verlassen. Bei

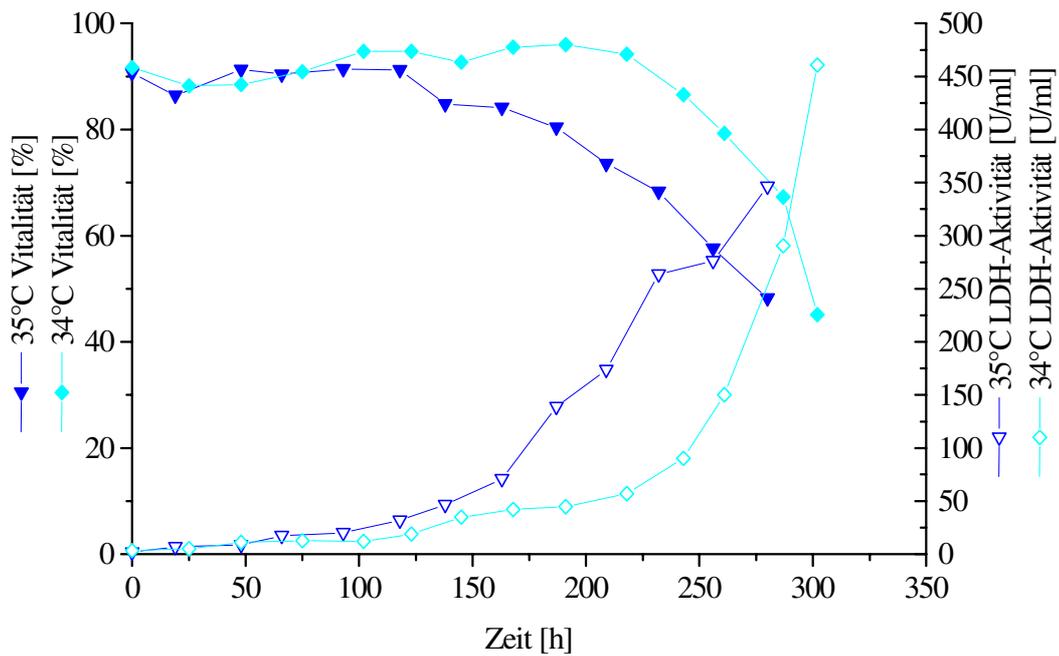
diesen Temperaturen findet kein exponentielles Wachstum statt, was durch die maximalen Lebendzellzahlen von  $0,35 \cdot 10^6$  Ze/ml ( $31^\circ\text{C}$ ) und  $0,30 \cdot 10^6$  Ze/ml ( $30^\circ\text{C}$ ) belegt wird. Im Gegensatz zu  $30^\circ\text{C}$ , wo die Vitalität kontinuierlich sinkt, bleibt bei  $31^\circ\text{C}$  die Vitalität konstant bei ca. 90%, so daß  $31^\circ\text{C}$  eine untere Temperaturgrenze für das Wachstum der CHO-Zelllinie TF 70 R darstellt.

Eine Zusammenfassung der charakteristischen Wachstumsdaten in Abhängigkeit von der Temperatur ist in Tab. 4.1 aufgeführt.

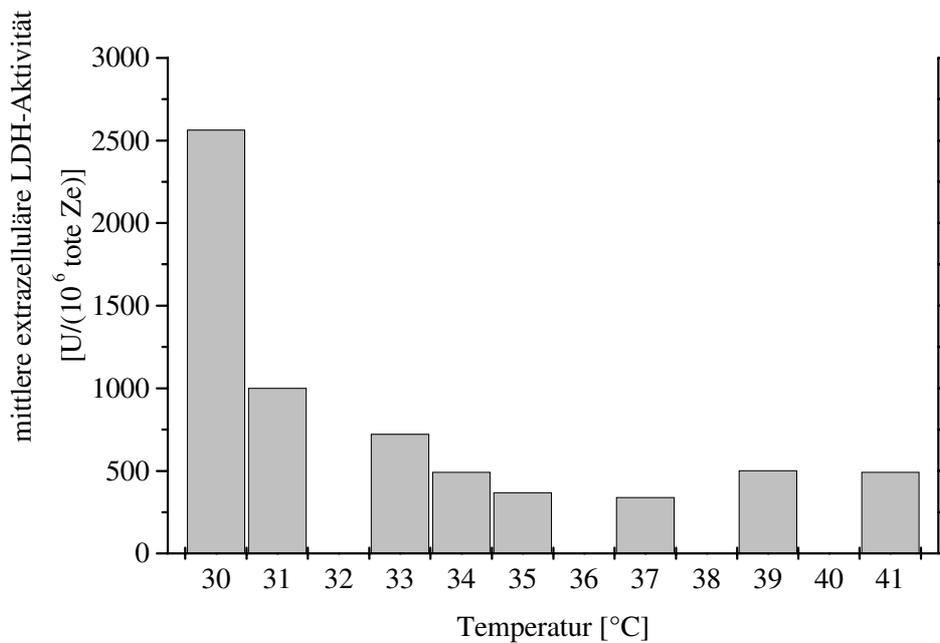
**Tab. 4.1:** Wachstumsdaten für CHO TF 70 R-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur [°C]	max. Lebend- zellzahl [ $10^6$ Ze/ml]	$\mu_{(\text{max})}$ [ $\text{d}^{-1}$ ]	$\mu_{(\text{mittel})}$ [ $\text{d}^{-1}$ ]	Dauer Lag-Phase [h]	Dauer Log-Phase [h]
30	0,30	0,11	0,03	ges. Kultur	-
31	0,35	0,24	0,09	ges. Kultur	-
33	1,50	0,39	0,23	94	167
34	1,78	0,52	0,29	75	143
35	1,28	0,65	0,35	19	119
37	1,53	0,71	0,35	15	146
39	1,36	0,73	0,38	-	143
41	0,25	0,26	0,15	-	-

In Abb. 4.4 ist stellvertretend für alle Batch-Kultivierungen der Zusammenhang zwischen Vitalität und extrazellulärer LDH-Aktivität bei  $35^\circ\text{C}$  und die  $34^\circ\text{C}$  Kultivierungen dargestellt. Bei fallender Vitalität steigt die LDH-Aktivität an, so daß die LDH-Aktivität im Überstand eine Aussage über den Zustand der jeweiligen Kultur erlaubt [123]. Wie aus Abb. 4.5 hervorgeht ist die LDH-Aktivität aber nicht geeignet, um einen Vergleich der Zellkulturzustände bei verschiedenen Temperaturen anzustellen. Die normierten LDH-Aktivitäten (Aktivität/ $10^6$  tote Ze) zeigen eine Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität. So steigt die Aktivität bei fallender Temperatur an. Dieser Zusammenhang kann entweder auf eine verlängerte Halbwertszeit im Medium bei niedrigerer Temperatur zurückgeführt werden, oder aber auf eine temperaturabhängige Produktion von LDH innerhalb der Zelle.

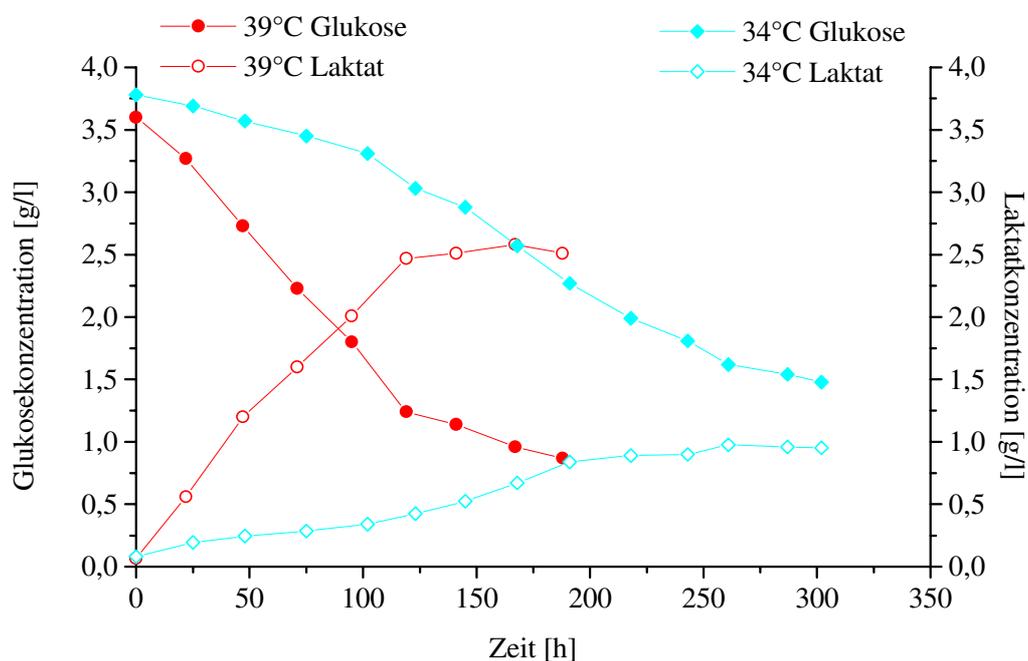


**Abb. 4.4:** Die Vitalitäten und die extrazellulären LDH-Aktivitäten bei 34°C und 35°C als Funktion der Zeit. Die Vitalitäten für CHO TF 70 R-Zellen bei Batch-Kultivierungen in 250 ml Spinnerflaschen wurden aus den Gesamt- und Lebendzellzahlen berechnet. Die extrazelluläre LDH-Aktivität wurde photometrisch bestimmt.



**Abb. 4.5:** Normierte mittlere extrazelluläre LDH-Aktivität als Funktion der Temperatur. Die Anzahl der toten Zellen wurde nach der Trypanblau-Methode ermittelt. Die extrazelluläre LDH-Aktivität wurde photometrisch bestimmt und auf 10<sup>6</sup> tote Zellen normiert.

Die Phosphatkonzentration im Kulturüberstand variiert temperaturunabhängig um ca. 50 mg/l. Da die Phosphatanfangskonzentration bei diesem Medium 250 mg/l beträgt, kann eine Wachstumslimitierung aufgrund von Phosphatmangel ausgeschlossen werden. Die Zellen nehmen Phosphat sowohl in der Adaptionsphase als auch in der exponentiellen Wachstumsphase auf, um Nukleotide, Nukleinsäuren und Phospholipide zu synthetisieren. Findet kein Zellwachstum mehr statt, so stagniert die Phosphatkonzentration. In der Absterbephase wird Phosphat durch die Zelllyse freigesetzt, so daß die Phosphatkonzentration im Überstand geringfügig ansteigt.

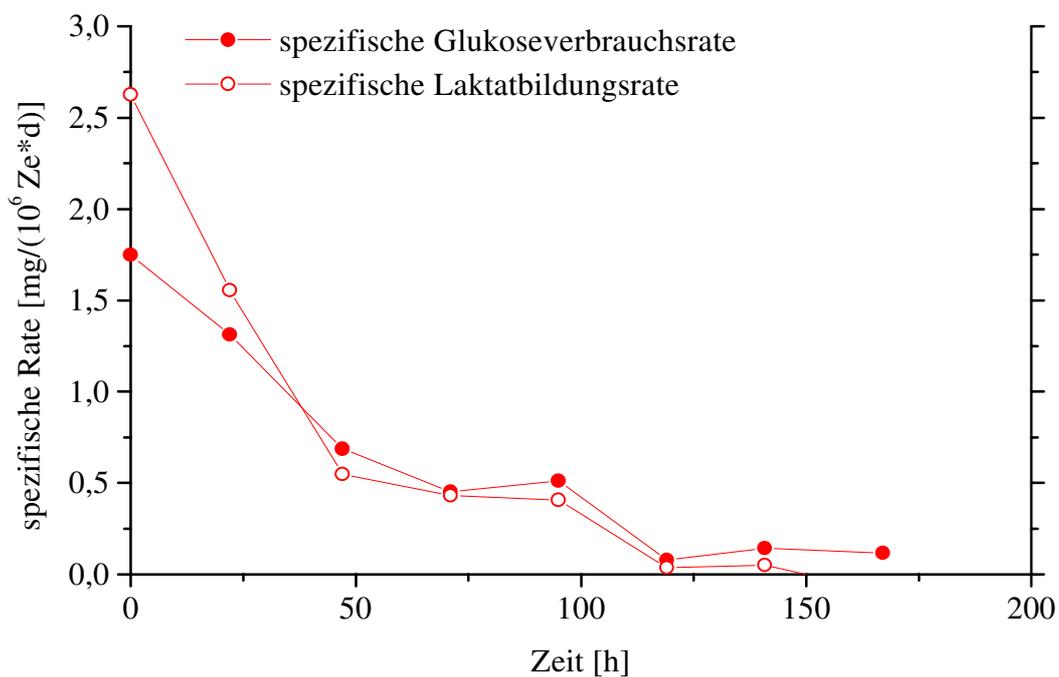


**Abb. 4.6:** Glukose- und Laktatkonzentration bei 34°C und 39°C als Funktion der Zeit. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 ermittelt.

Neben dem Wachstum wird auch der Stoffwechsel der CHO-Zellen durch die Kultivierungstemperatur beeinflusst. Der Verlauf der Glukosekonzentration im Kulturüberstand und des daraus entstehenden Laktates sind für 39°C und 34°C in Abb. 4.6 dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, daß bei der niedrigeren Temperatur weniger Glukose verbraucht wird und auch geringere Mengen an toxischem Laktat gebildet werden. Die eingesetzte Glukosemenge von ca. 3,5 g/l wird bei keiner Temperatur vollständig verstoffwechselt. Zu Beginn der Absterbephase beträgt die Glukosekonzentration bei jeder Kultivierung noch mindestens 1,5 g/l, so daß keine glukosebedingten Wachstumslimitierungen auftreten. Auch die maximalen Laktatkonzentrationen erreichen außer bei der 39°C Kultivierung mit 2,58 g/l keine für CHO-

Zellen toxischen Konzentrationen. Je nach Zelllinie werden Laktatkonzentrationen zwischen 2 und 3 g/l als wachstumsinhibierend eingestuft [66, 68, 125]. Bezieht man die Mengen an Glukose und Laktat, die verbraucht bzw. gebildet werden auf die zu den jeweiligen Konzentrationen gehörende Lebendzellzahl und normiert den Wert auf die Zeitspanne eines Tages, erhält man die spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten. Diese haben unabhängig von der Kultivierungstemperatur ihre maximalen Werte zu Beginn der lag-Phase und fallen während der exponentiellen Wachstumsphase deutlich ab (Abb. 4.7).

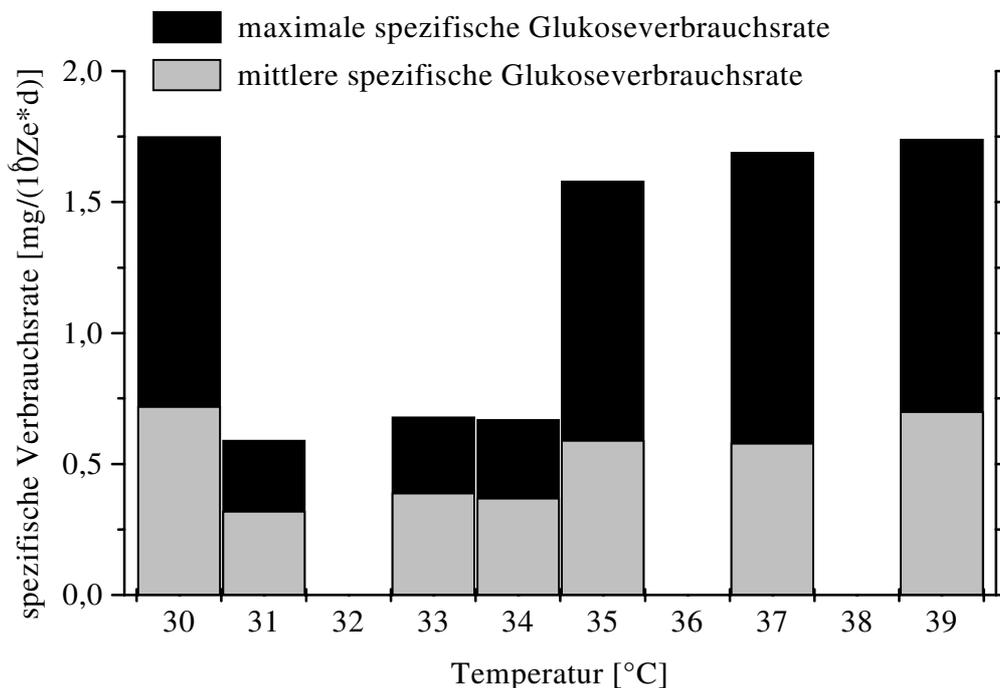
Die Zellen benötigen am Anfang jeder Kultivierung zur Adaption ans Medium die größte Menge an Energie, danach reduzieren sie in der exponentiellen Phase den Stoffwechsel. Die starke Abnahme der Stoffwechselaktivität zum Ende der exponentiellen Phase ist auf die Limitierung der angebotenen Substrate zurückzuführen. In der Absterbephase verstoffwechseln die Zellen das vorher ausgeschleuste Laktat wieder, so daß die Laktatbildungsrate negativ wird. Definitionsgemäß werden negative Bildungsraten gleich Null gesetzt.



**Abb. 4.7:** Spezifische Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsrate bei 39°C als Funktion der Zeit. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 ermittelt und die Lebendzellzahl mit der Trypanblau Methode bestimmt

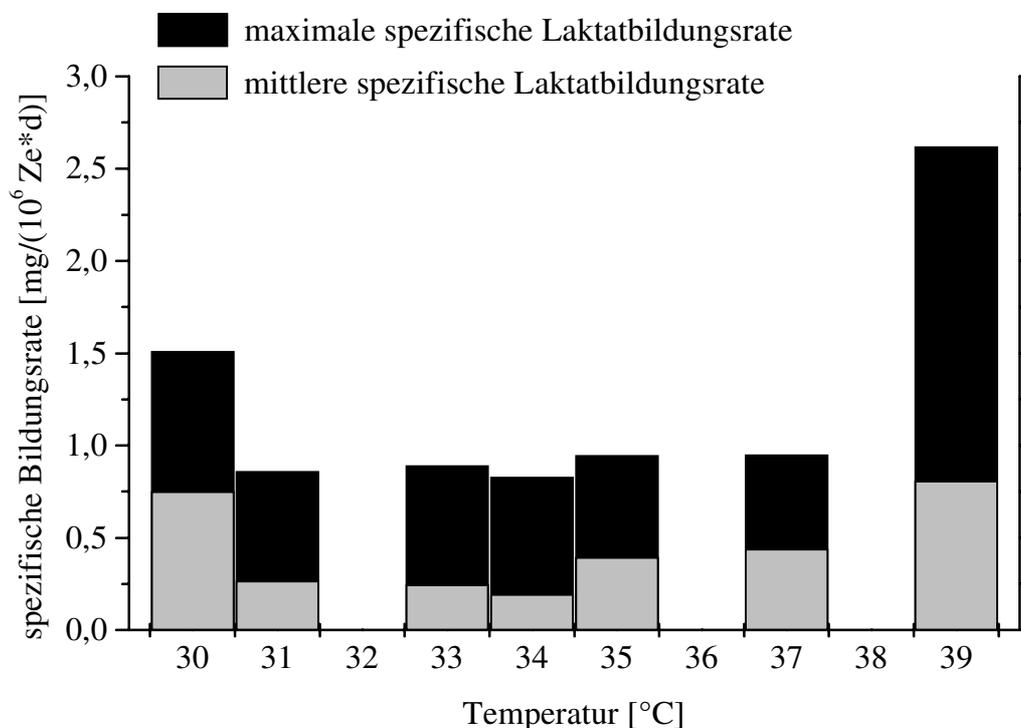
In Abb. 4.8 sind die spezifischen mittleren und maximalen Glukoseverbrauchsraten als Funktion der Kultivierungstemperatur aufgetragen. Die Kultivierungen bei 37°C und 35°C

unterscheiden sich nur geringfügig mit 0,58 und 0,59 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) in ihren mittleren und mit 1,69 und 1,58 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) in ihren maximalen spezifischen Glukoseverbrauchsrate. Bei einer weiteren Temperaturabsenkung auf 34°C bzw. 33°C fällt die mittlere Verbrauchsrate um 34% auf 0,37 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) ab. Die maximale Glukoseverbrauchsrate sinkt sogar um 59% auf 0,67 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d). Die Verbrauchsrate bei 31°C sind mit Werten von 0,32 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) für die mittlere und 0,59 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) für die maximale nur geringfügig niedriger als bei 33°C und 34°C. Eine weitere Absenkung der Temperatur um 1°C auf 30°C führt zu einem sprunghaften Anstieg der spezifischen Glukoseverbrauchsrate. Die mittlere Verbrauchsrate steigt um 125% auf 0,72 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d), die maximale um 196% auf 1,75 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) gegenüber der Kultivierung bei 31°C an. Da bei 30°C kein Zellwachstum mehr stattfindet, ist dieser Anstieg nur dadurch zu erklären, daß die Zellen mehr Energie in Form von Glukose verbrauchen, um dem durch die zu niedrige Temperatur hervorgerufenen Streß entgegenzuwirken. Die Zellen synthetisieren hier verstärkt sogenannte Streßproteine. Ein in gestreßten Zellkulturen häufig vorkommendes Streßprotein ist z.B. Ubiquitin [89].



**Abb. 4.8:** Die spezifischen Glukoseverbrauchsrate als Funktion der Temperatur. Die Glukosekonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 ermittelt und die Lebendzellzahl mit der Trypanblau Methode bestimmt. Die Daten der 41°C Kultivierung werden hier aus Skalierungsgründen nicht dargestellt.

Fast identische Glukoseverbrauchsraten wie bei 30°C besitzen die CHO-Zellen bei 39°C. Die mittlere Verbrauchsrate beträgt 0,7 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d), die maximale hingegen 1,74 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d). Somit steigt bei einer Temperaturerhöhung von 37°C auf 39°C der mittlere spezifische Glukosebedarf um 20% an. Bei 41°C konnten mit 3,75 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (mittlere) und 5,63 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (maximale) die höchsten spezifischen Glukoseverbrauchsraten beobachtet werden. In der Literatur wird beschrieben, daß bei dieser extremen Temperatur die Glukose zur Synthese von sogenannten Hitzeschockproteinen (HSP) benötigt wird. Die Hitzeschockproteine werden nach ihrer Molekularmasse (HSP 60, HSP 90) genannt und üben eine Schutzfunktion bei Streß aus. Unter anderem besitzen sie die Funktion molekularer Chaperone [89, 137, 138].

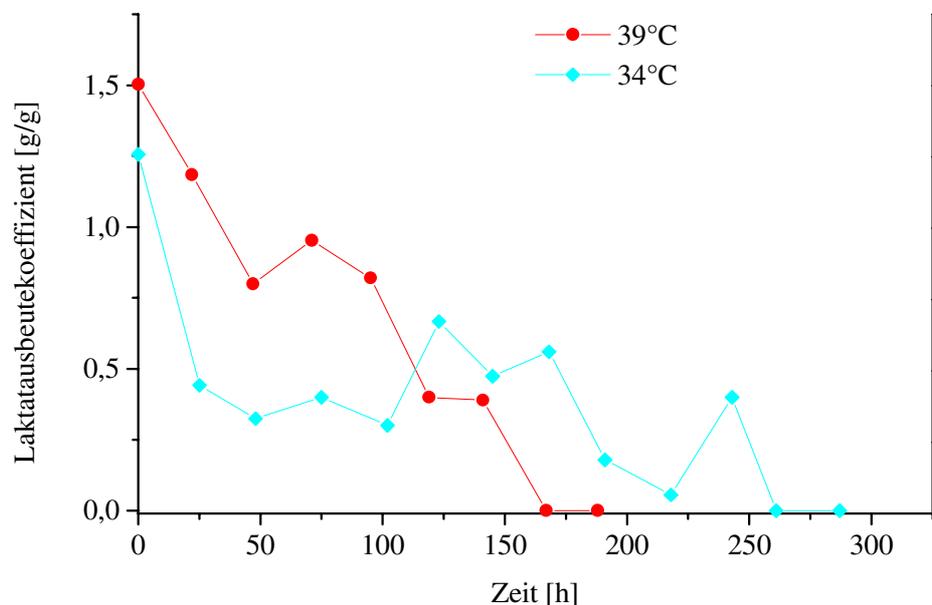


**Abb. 4.9:** Die spezifischen Laktatbildungsrate als Funktion der Temperatur. Die Laktatkonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 ermittelt und die Lebendzellzahl mit der Trypanblau-Methode bestimmt. Die Daten der 41°C Kultivierung werden hier aus Skalierungsgründen nicht dargestellt.

Die Entwicklung der spezifischen Laktatbildungsrate (Abb. 4.9) ist bei den verschiedenen Temperaturen den spezifischen Glukoseverbrauchsraten kongruent. Im Temperaturbereich von 37°C bis 31°C fallen die mittleren spezifischen Laktatbildungsrate von 0,44 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) auf 0,26 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) ab, wobei eine deutliche Abnahme zwischen 35°C und 34°C erfolgt. Oberhalb und unterhalb dieses Temperaturbereiches nehmen die

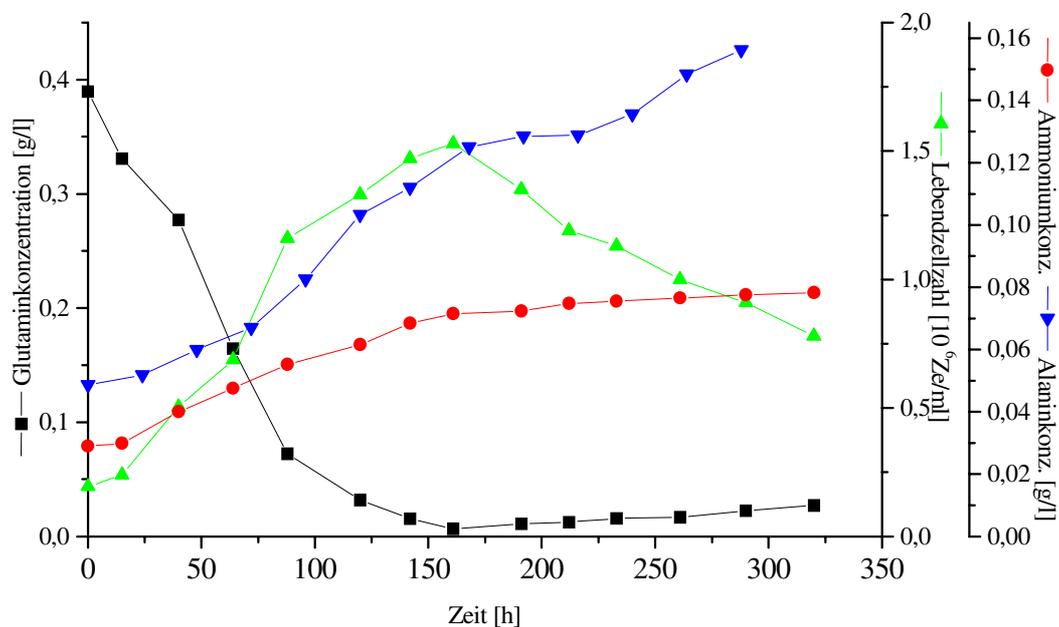
spezifischen Laktatbildungsraten zu, was wiederum dem Verhalten der Glukoseverbrauchs-raten entspricht. Die höchste Laktatbildungsrate von  $2,62 \text{ mg}/(10^6 \text{ Ze} \cdot \text{d})$  konnte bei der  $39^\circ\text{C}$ -Kultivierung beobachtet werden.

Der Laktatausbeutekoeffizient gibt die Menge gebildeten Laktates pro verstoffwechselter Menge Glukose an. Der theoretische Maximalwert aus dem Abbau von Glukose beträgt 1. Allerdings können durch die Verstoffwechslung der glykogenen Aminosäuren (Ala, Thr, Gly, Ser, Cys) auch höhere Werte als 1 erreicht werden. Mit Hilfe des Laktatausbeutekoeffizienten kann eine Aussage über die verschiedenen Stoffwechselwege der Zelle getroffen werden. In Abb. 4.10 ist der Verlauf des Laktatausbeutekoeffizienten bei  $34^\circ\text{C}$  und  $39^\circ\text{C}$  dargestellt. Unabhängig von der Temperatur befindet sich das Maximum an Tag 0. Bei  $34^\circ\text{C}$  fällt der Laktatausbeutekoeffizient schon nach einem Tag auf einen Wert von 0,4, der mit geringen Schwankungen bis zum Ende der Kultivierung beibehalten wird. Bei der  $39^\circ\text{C}$ -Kultivierung wird dieser Wert erst am Ende der exponentiellen Wachstumsphase nach 119 Stunden erreicht. Im Verlauf der  $39^\circ\text{C}$  Kultivierung wird mehr Glukose anaerob zu Laktat abgebaut als in der  $34^\circ\text{C}$ -Kultivierung. Bei  $34^\circ\text{C}$  wird die Glukose vermehrt über Pyruvat und Acetyl-CoA im energetisch günstigeren Citratzyklus verstoffwechselt.

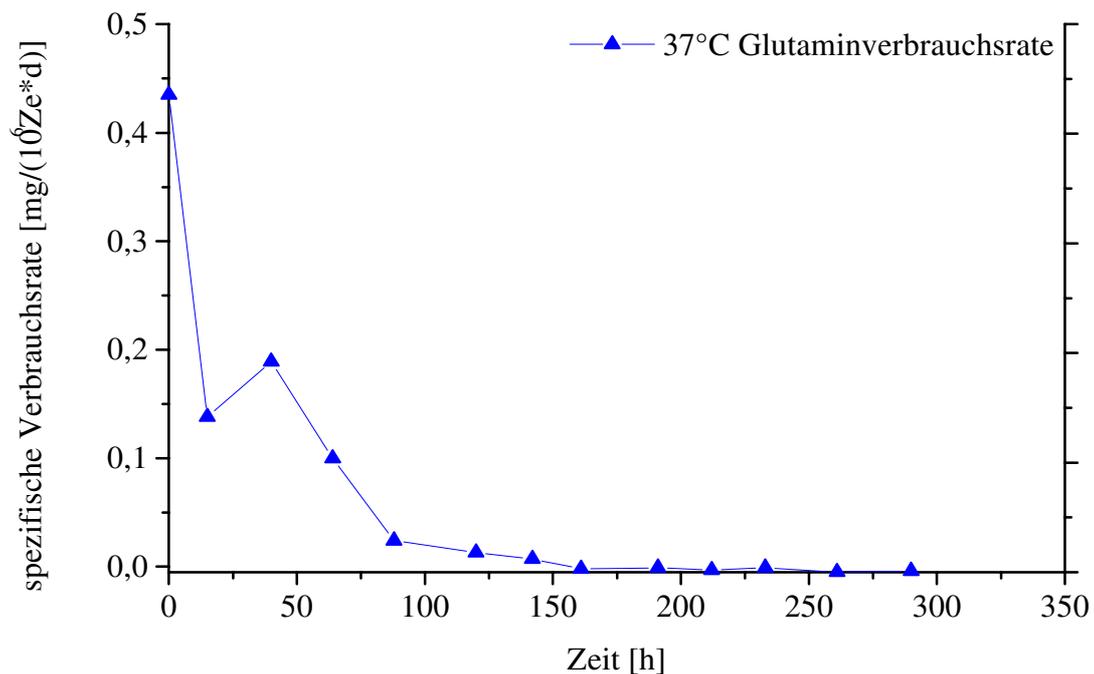


**Abb. 4.10:** Die Laktatausbeutekoeffizienten bei  $34^\circ\text{C}$ - und  $39^\circ\text{C}$ -Kultivierungen als Funktion der Zeit. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 ermittelt.

Neben Glukose ist Glutamin eine weitere wichtige Energiequelle für Säugerzellen. Zudem nimmt Glutamin eine zentrale Position im Stickstoffmetabolismus ein [48-52, 57, 60]. In Abb. 4.11 ist der Verlauf der Glutamin-, Alanin- und Ammoniumkonzentration, sowie der Lebendzellzahl bei der Kultivierungstemperatur von 37°C dargestellt. Deutlich ist der Zusammenhang zwischen der Glutaminkonzentration und dem Zellwachstum zu erkennen. Die maximale Lebendzellzahl wird zu dem Zeitpunkt erreicht, wenn kein Glutamin im Kulturüberstand mehr vorhanden ist. Glutamin ist für diese Zelllinie wachstumslimitierend und wird für das Zellwachstum benötigt. Die Hauptabbauprodukte des Glutaminstoffwechsels in Säugerzellkulturen sind Ammonium und Alanin. Daher steigen die Ammonium- und Alaninkonzentrationen im Überstand solange an, wie Glutamin zur Verfügung steht. Die hier erreichte maximale Ammoniumkonzentration von 0,08 g/l bzw. 4,44 mmol/l wirkt bei dieser CHO-Zelllinie allerdings noch nicht wachstumsinhibierend. Untersuchungen mit TF 70 R-Zellen ergaben, daß eine Ammoniumkonzentration von 8 mmol/l keinen Einfluß auf das Zellwachstum hat [67]. Die Ammonium/Glutamin-Ausbeute ( $Y_{(\text{Ammonium}/\text{Glutamin})}$ ) beträgt unabhängig von der Kultivierungstemperatur 0,13 mg/mg.

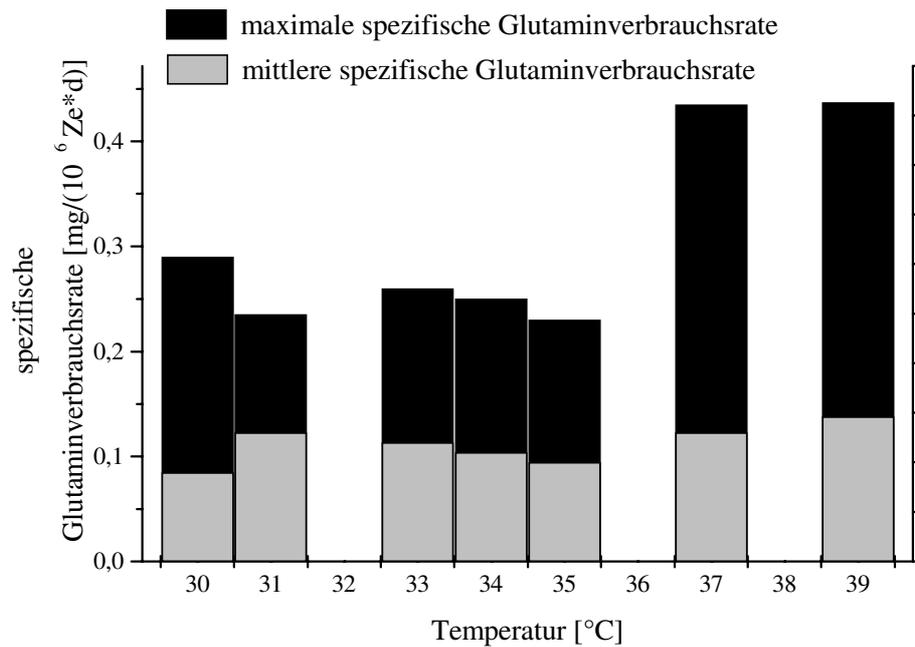


**Abb. 4.11:** Verlauf der Glutamin-, Alanin- und Ammoniumkonzentration, sowie der Lebendzellzahl bei 37°C. Die Lebendzellzahl wurde mit der Trypanblau Methode bestimmt. Die Ammoniumkonzentration wurde photometrisch, die Aminosäurenkonzentration mittels HPLC bestimmt.



**Abb. 4.12:** Die spezifischen Glutaminverbrauchsraten als Funktion der Zeit bei 37°C. Die Lebendzellzahl wurde mit der Trypanblau Methode und die Glutaminkonzentration mittels HPLC bestimmt.

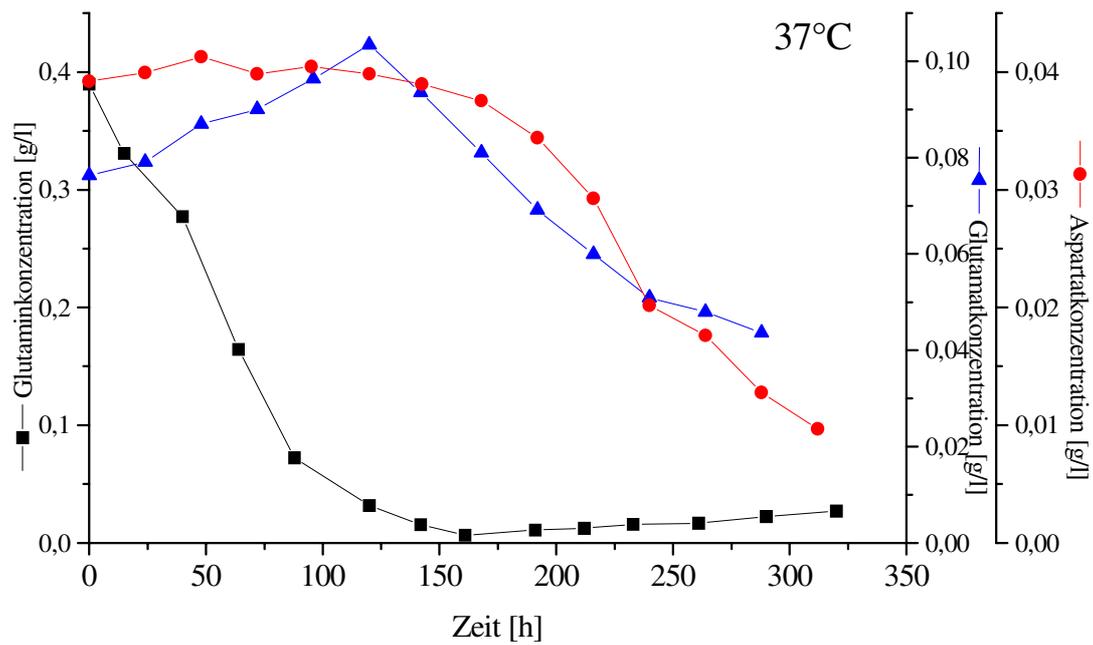
In Abb. 4.12 ist die spezifische Glutaminverbrauchsrate der 37°C-Kultivierung als Funktion der Zeit aufgetragen. Der maximale Wert von 0,43 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) wird in der Adaptionphase erreicht, danach nimmt der spezifische Glutaminverbrauch in der exponentiellen Phase kontinuierlich ab, bis das gesamte Glutamin in der 161. Stunde im Überstand verbraucht ist. In der Adaptionphase kommt es zu einer intrazellulären Anreicherung des im Medium im Überschuß vorhandenen Glutamins. Die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen können das tausendfache der extrazellulären Konzentrationen im Medium erreichen. Der Verlauf der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen ist nicht immer kongruent zu dem der extrazellulären Aminosäuren [74, 139, 140].



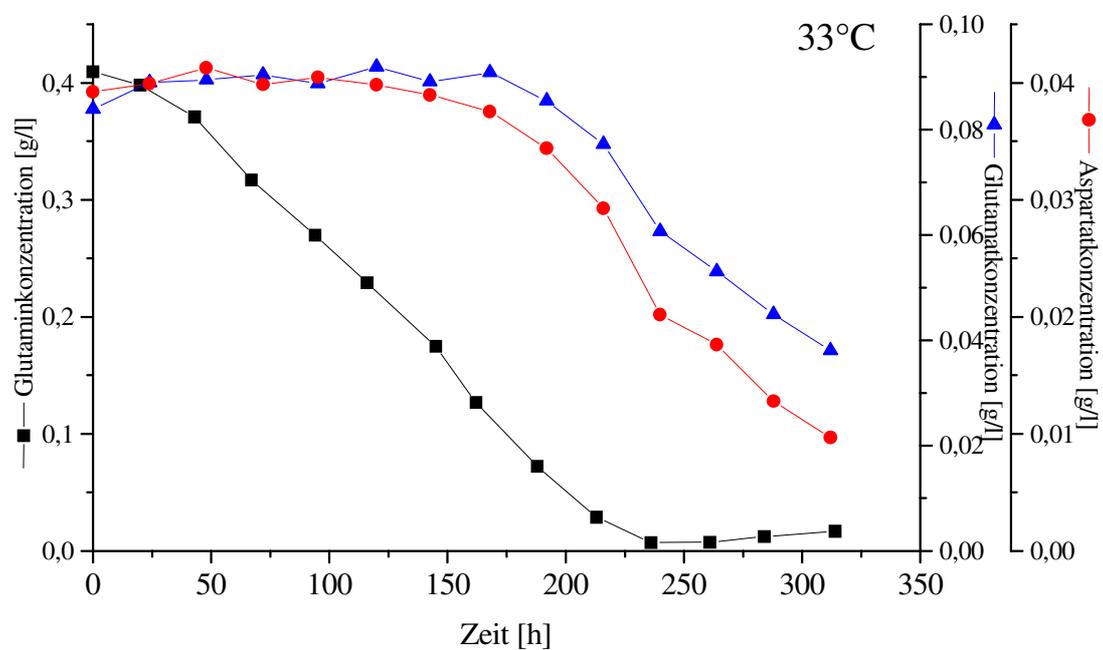
**Abb. 4.13:** Die spezifischen Glutaminverbrauchsraten als Funktion der Kultivierungstemperatur. Die Lebendzellzahl wurde mit der Trypanblau Methode und die Glutaminkonzentration mittels HPLC bestimmt. Von der 41°C-Kultivierung wurden keine Aminosäuredaten aufgenommen.

Bei Betrachtung der spezifischen Glutaminverbrauchsraten als Funktion der Kultivierungstemperatur (Abb. 4.13) wird deutlich, daß die mittlere spezifische Glutaminverbrauchsrate nicht von der Temperatur abhängig ist und einen Mittelwert von  $0,12 \text{ mg}/(10^6 \text{ Ze} \cdot \text{d})$  besitzt. Die maximalen Glutaminverbrauchsraten sind bei  $37^\circ\text{C}$  und  $39^\circ\text{C}$  mit  $0,43 \text{ mg}/(10^6 \text{ Ze} \cdot \text{d})$  um 70% höher als die mittlere maximale Verbrauchsrate von  $0,25 \text{ mg}/(10^6 \text{ Ze} \cdot \text{d})$  im Temperaturbereich von  $30^\circ\text{C}$ - $35^\circ\text{C}$ , was die kurzen Adaptionphasen bei höheren Temperaturen erklärt, da Glutamin das Zellwachstum fördert.

Bei ausreichendem Glutaminangebot im Medium, werden die überschüssigen intermediären Katabolite Glutamat und Aspartat von den Zellen ausgeschleust, um dann bei Glutaminmangel wieder aufgenommen zu werden. Dieses Stoffwechselverhalten kann bei allen untersuchten Temperaturen beobachtet werden (Abb. 4.14 und Abb. 4.15).

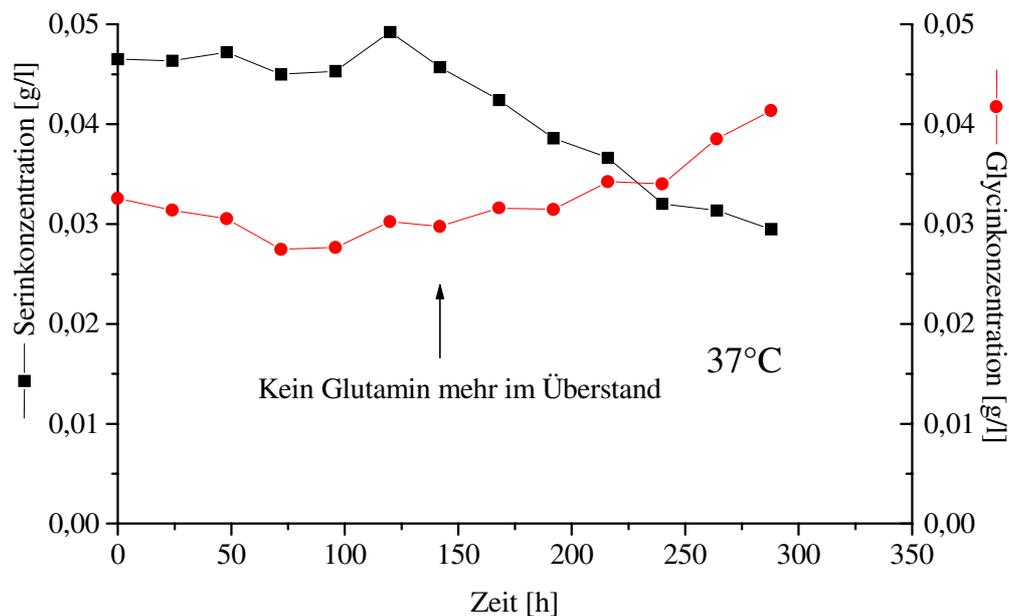


**Abb. 4.14:** Glutamin-, Glutamat- und Aspartatkonzentration bei 37°C als Funktion der Zeit. Die verschiedenen Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.



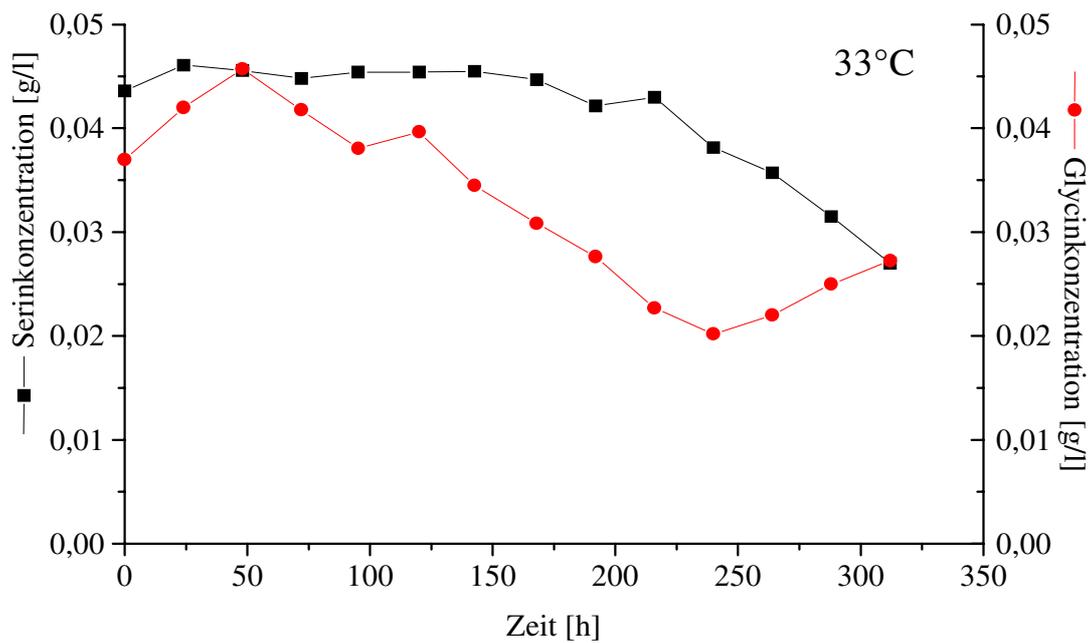
**Abb. 4.15:** Glutamin-, Glutamat- und Aspartatkonzentration bei 33°C als Funktion der Zeit. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

Die Aminosäure Serin wird im Stoffwechsel von Säugerzellen zu Glycin konvertiert, indem das  $\beta$ -Kohlenstoffatom des Serins auf Tetrahydrofolat übertragen wird. Tetrahydrofolat-derivate dienen bei einer Vielfalt von Biosynthesen als Kohlenstoff-Donoreinheit [67, 73, 93]. Wird das gebildete Glycin nicht von den Zellen für die Biosynthese benötigt, kann es als Metabolit von den Zellen ausgeschieden werden. Bei der 37°C-Kultivierung wird nachdem der Glutaminvorrat erschöpft ist, Serin aus dem Medium aufgenommen und Glycin ausgeschleust (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16:** Serin- und Glycinkonzentration bei 37°C als Funktion der Zeit. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

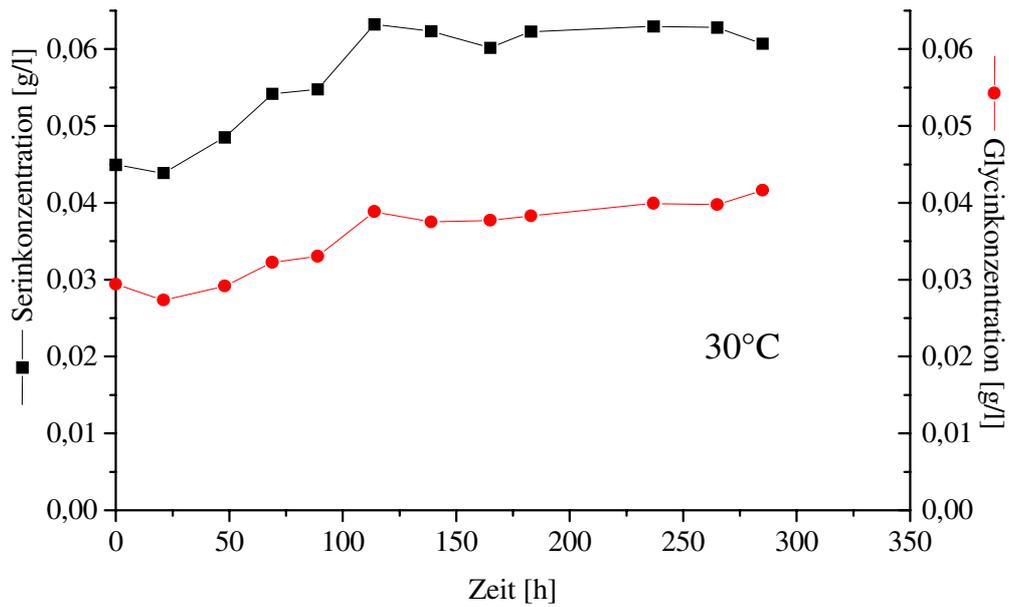
Bei einer Temperaturreduzierung auf 34°C bzw. 33°C zeigt die Glycinkonzentration einen anderen Verlauf als bei 37°C (Abb. 4.17). Bei diesen Temperaturen nehmen die Zellen bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase Glycin aus der Umgebung auf. Erst in der Absterbephase wird Serin verstoffwechselt und Glycin ausgeschieden. Die Aufnahme von Glycin läßt auf eine verstärkte Proteinbiosynthese der Zellen schließen. Grundsätzlich kann die Konvertierung von Serin zu Glycin durch fehlendes Tetrahydrofolat unterbunden werden. Das dem Medium zugesetzte Methotrexat inhibiert die Dihydrofolatreduktase, wodurch die Bildung von Tetrahydrofolat aus Dihydrofolat verhindert wird. Diese Reaktion sollte aber temperaturunabhängig sein und nicht ins Gewicht fallen.



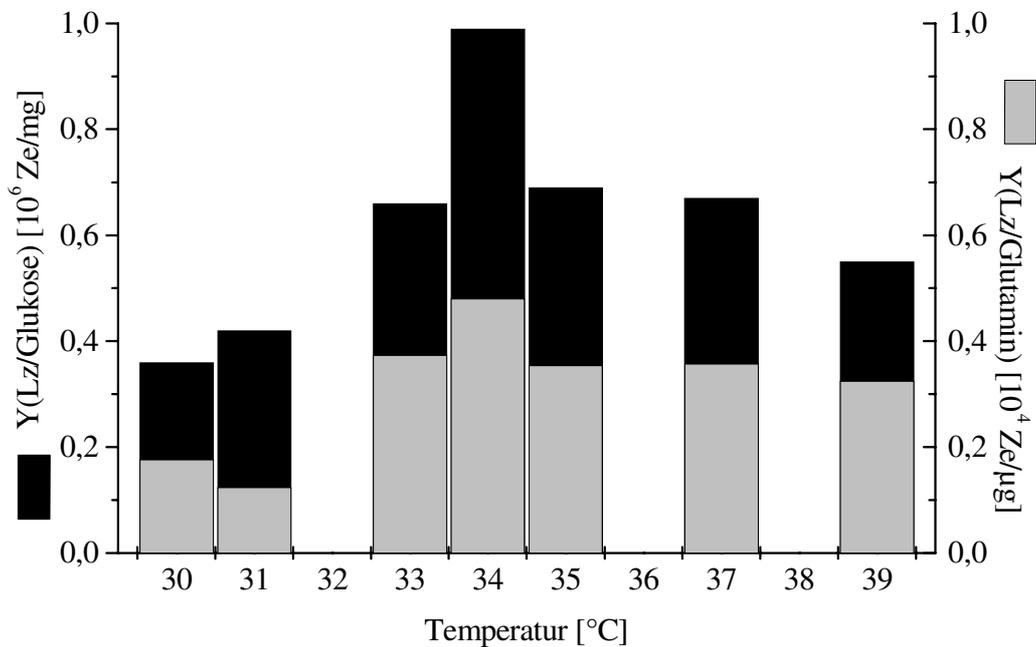
**Abb. 4.17:** Serin- und Glycinkonzentration bei 33°C als Funktion der Zeit.  
Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

Bei 30°C nehmen die CHO-Zellen kein Serin aus dem Medium auf, sondern sekretieren überschüssiges Serin zusammen mit Glycin (Abb. 4.18). Serin entsteht durch Transaminierung von Hydroxypyruvat, das in naher Beziehung zum Glycerat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, steht [93, 92]. Obwohl bei 30°C kein Zellwachstum mehr stattfindet, belegen die hohen Glukoseverbrauchsdaten, daß die Zellen eine hohe Glykolyseaktivität besitzen. Metabolite wie zum Beispiel Laktat oder auch Serin werden im Überschuß gebildet und ins Medium ausgeschieden.

Der Verlauf der anderen essentiellen Aminosäuren ist temperaturunabhängig. Ihre Konzentrationen im Kulturüberstand stagnieren bis Glutamin vollständig abgebaut ist, dann werden auch sie geringfügig verstoffwechselt. Da die Monod-Konstanten der meisten essentiellen Aminosäuren mit 1-15  $\mu\text{mol/l}$  sehr niedrig liegen [58], haben sie bei dieser Medienzusammensetzung keinen Einfluß auf die Wachstumsrate der TF 70 R-Zelllinie.



**Abb. 4.18:** Serin- und Glycinkonzentration bei 30°C als Funktion der Zeit. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.



**Abb. 4.19:** Die Ausbeutekoeffizienten  $Y_{(Lebendzellzahl/Glukose)}$  und  $Y_{(Lebendzellzahl/Glutamin)}$  als Funktion der Temperatur. Die Glutaminkonzentration wurde mittels HPLC, die Glukosekonzentration mit dem YSI 2700 bestimmt. Die Lebendzellzahl wurde mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Für die Berechnung der in Abb. 4.19 dargestellten Lebendzellzahl-Ausbeutekoeffizienten für Glutamin und Glukose werden die maximalen Lebendzellzahlen und die dazugehörigen Glutamin bzw. Glukosekonzentrationen herangezogen. Die höchsten Lebendzellzahl-Ausbeuten in Bezug auf Glukose und Glutamin werden bei 34°C erzielt. Der Unterschied zur 37°C Kultivierung beträgt 47% für  $Y_{(\text{Lebendzellzahl}/\text{Glukose})}$  und 34% für  $Y_{(\text{Lebendzellzahl}/\text{Glutamin})}$ . Wie erwartet sind die Ausbeuten bei 30°C und 31° am schlechtesten, da bei diesen Temperaturen kein exponentielles Wachstum mehr stattfindet.

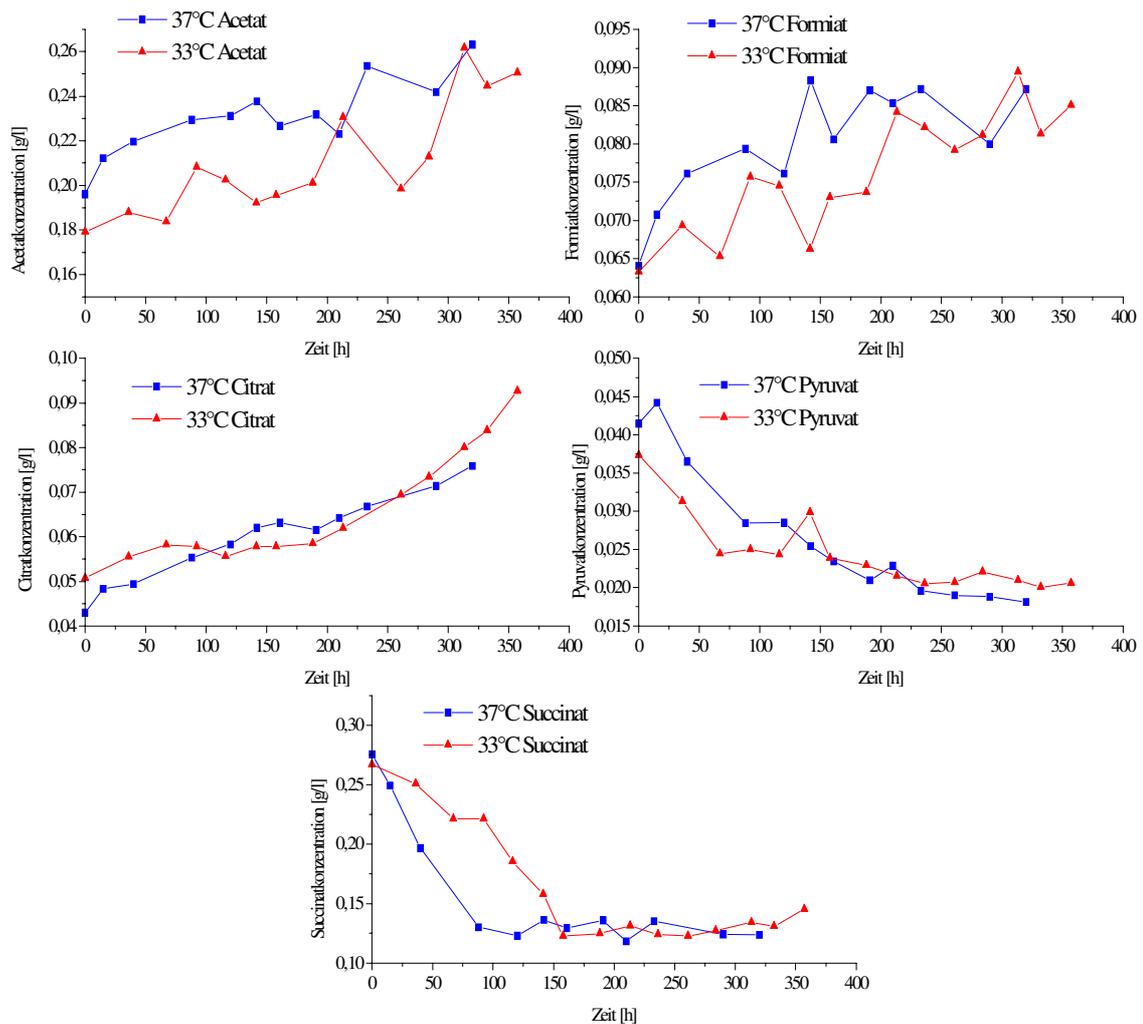
In Tab. 4.2 sind die spezifischen Verbrauchs- und Bildungsraten und Ausbeutekoeffizienten in Abhängigkeit von der Temperatur noch einmal zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 4.2:** Spezifische Verbrauchs- und Bildungsraten und Ausbeutekoeffizienten in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur [°C]	mittlere spez. Glukose- verbrauchsrate [mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	mittlere spez. Laktat- bildungsrate [mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	mittlere spez. Glutamin- verbrauchsrate [mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	$Y_{(\text{Lz}/\text{Glukose})}$ [10 <sup>6</sup> Ze/mg]	$Y_{(\text{Lz}/\text{Glutamin})}$ [10 <sup>4</sup> Ze/µg]
30	0,72	0,75	0,09	0,36	0,18
31	0,32	0,27	0,13	0,42	0,12
33	0,39	0,25	0,12	0,66	0,37
34	0,37	0,19	0,11	0,99	0,48
35	0,59	0,39	0,10	0,69	0,35
37	0,58	0,44	0,13	0,67	0,36
39	0,70	0,80	0,15	0,55	0,33
41	3,75	3,51	-	0,19	-

In Abb. 4.20 sind die extrazellulären Konzentrationen der organischen Säuren Acetat, Formiat, Citrat, Pyruvat und Succinat bei 33°C und 37°C als Funktion der Zeit dargestellt. Acetat, Formiat und Citrat werden von den Zellen unabhängig von der Kultivierungstemperatur kontinuierlich ausgeschleust, Pyruvat und Succinat hingegen aufgenommen. Formiat ist ein C<sub>1</sub>-Fragment im Stoffwechsel von Serin und Glycin [73]. Das ist unter Umständen die Erklärung dafür, daß die extrazelluläre Formiatkonzentration bei beiden Temperaturen zu dem Zeitpunkt einen Sprung macht, wenn die Zellen anfangen Serin aufzunehmen. Die Aufnahme von Pyruvat findet verstärkt in der Adaptionsphase der Zellkulturen statt. Hier benötigen die Zellen besonders viel Energie. Warum die Zellen Citrat

ausschleusen und nicht im Citratzyklus über Isocitrat zu Oxoglutarat weiterverarbeiten oder der Fettsäuresynthese zur Verfügung stellen ist fraglich. Eine weitergehende Diskussion der extrazellulären Konzentrationsverläufe der organischen Säuren soll aufgrund der Komplexizität an dieser Stelle nicht erfolgen. Hier sei auf die Berechnung der intrazellulären Stoffflüsse in den Dissertationen von Hesse und Lübber [141, 142] verwiesen.

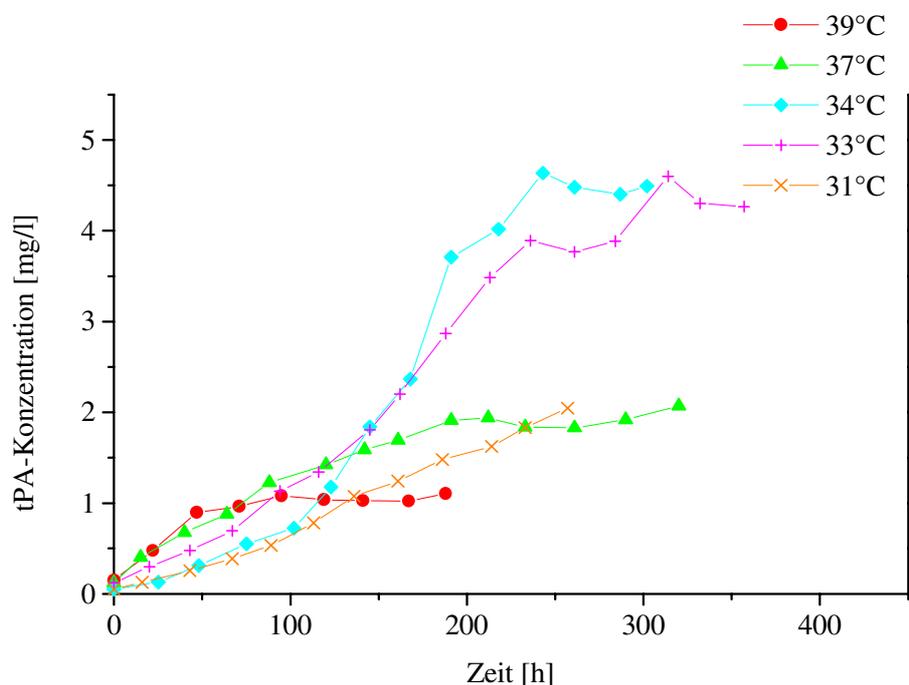


**Abb. 4.20:** Extrazelluläre Konzentrationen der organischen Säuren Acetat, Formiat, Citrat, Pyruvat und Succinat bei 33°C und 37°C als Funktion der Zeit. Die Konzentrationen der organischen Säuren wurden mittels HPLC bestimmt.

#### 4.1.1.2 Das Produktionsverhalten der TF 70 R-Zelllinie

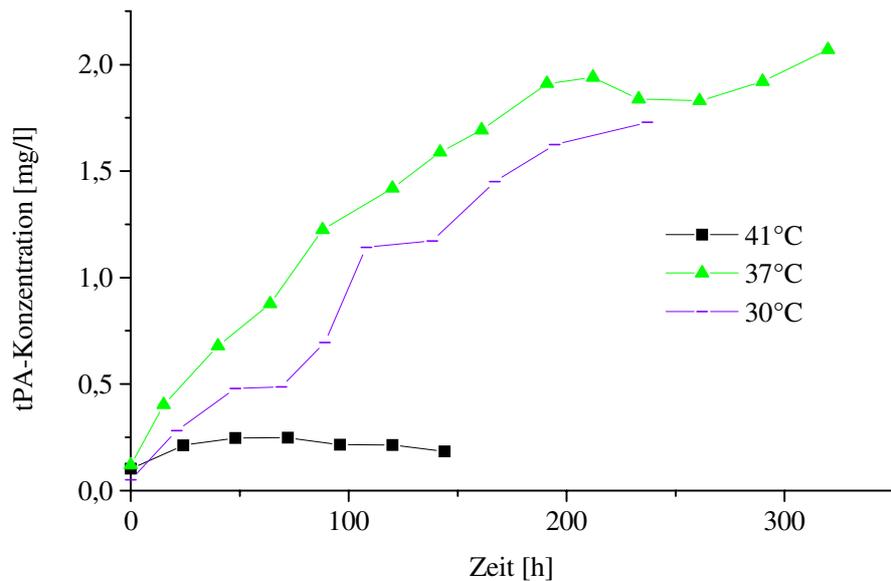
Das Ziel von Prozeßoptimierungen in der Zellkulturtechnik ist meistens die Erhöhung der Produktausbeute bei gleichbleibender Produktqualität und geringeren Produktionskosten. Der Einfluß des Prozeßparameters Temperatur auf das Produktionsverhalten der TF 70 R-Zellen soll in diesem Abschnitt diskutiert werden.

In Abb. 4.21 sind die extrazellulären tPA-Konzentrationen bei Kultivierungstemperaturen zwischen 31°C und 39°C als Funktion der Zeit aufgetragen. Bei 37°C wird in der 320. Stunde eine maximale tPA-Konzentration von 2,06 mg/l erreicht. Mit 1,08 mg/l ist die maximale Produktkonzentration bei 39°C um 48% niedriger als bei 37°C. Auch Mutharasan et al. [33] konnten bei Untersuchungen mit einer Maus-Maus Hybridoma-Zelllinie eine Verminderung der maximalen Produktkonzentration auf 50% beobachten, als die Kultivierungstemperatur um 2°C auf 39°C erhöht wurde [33]. Der Anstieg der maximalen tPA-Konzentration auf 4,63 mg/l bei 34°C bzw. 4,59 mg/l bei 33°C entspricht einem Zuwachs von 125% gegenüber der 37°C Kultivierung. In der Fachliteratur wurde bisher nichts entsprechendes publiziert.



**Abb. 4.21:** Extrazelluläre tPA-Konzentrationen bei Kultivierungstemperaturen zwischen 31°C und 39°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

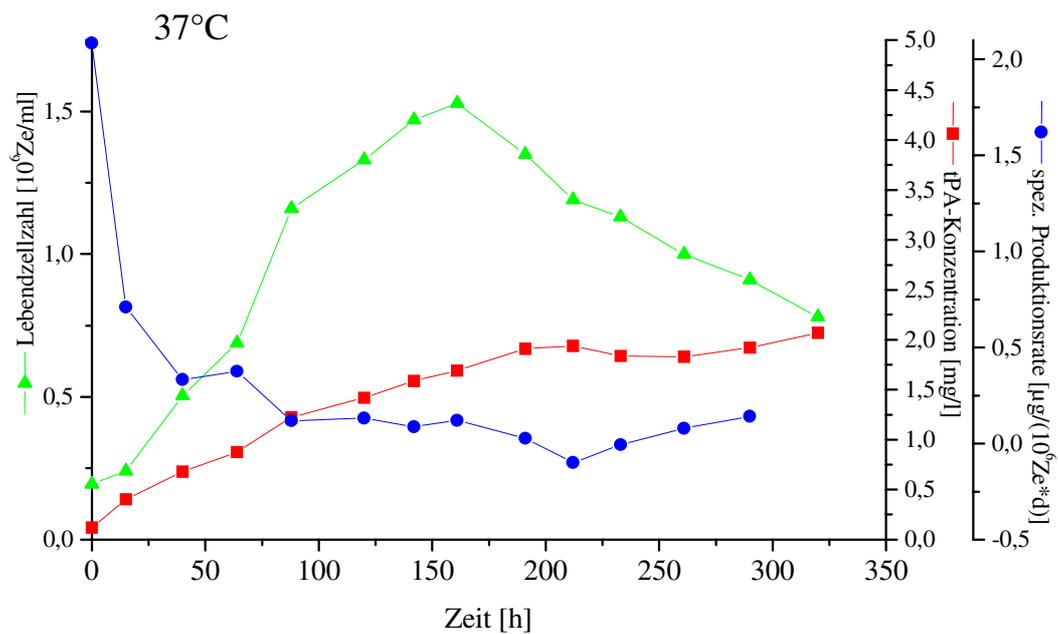
In Abb. 4.22 sind die extrazellulären tPA-Konzentrationen bei den Kultivierungstemperaturen von 30°C, 37°C und 41°C als Funktion der Zeit aufgetragen. Sowohl bei 41°C als auch bei 30°C ist das Zellwachstum stark eingeschränkt. Im Gegensatz zur 41°C Kultivierung steigt bei 30°C die tPA-Konzentration kontinuierlich an. Die maximale tPA-Konzentration beträgt mit 1,73 mg/l nur 15% weniger als bei 37°C. Die Ergebnisse der 30°C Kultivierung sind ein Indiz dafür, daß bei dieser Zelllinie exponentielles Wachstum und Produktion nicht gekoppelt sind.



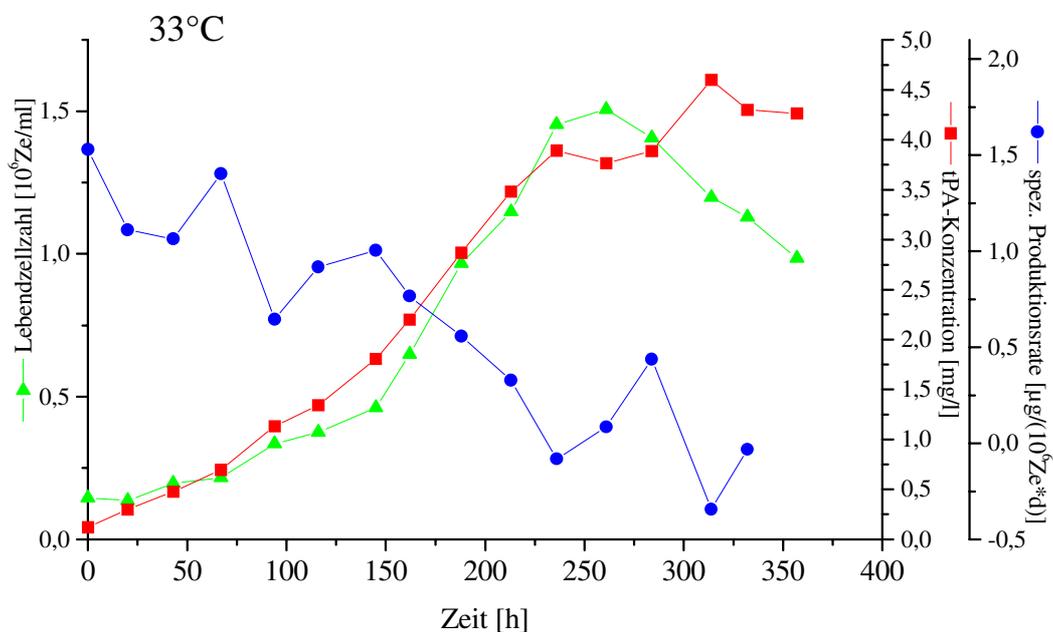
**Abb. 4.22:** Extrazelluläre tPA-Konzentrationen bei Kultivierungstemperaturen von 30°C, 37°C und 41°C als Funktion der Zeit.  
Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

Der Verlauf der spezifischen Produktivität variiert mit der Kultivierungstemperatur (Abb. 4.22a- 4.24). Bei 37°C fällt die spezifische Produktivität innerhalb der Adaptionsphase von 2,08  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  auf 0,711  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ . In der exponentiellen Phase nimmt die Produktivität kontinuierlich bis auf 0  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  in der 212. Stunde ab. Der geringe Anstieg der spezifischen Produktivität in der Absterbephase kann verschiedene Gründe besitzen:

- durch Zelllyse wird verstärkt tPA freigesetzt
- intakte zweikettige tPA-Moleküle werden durch freigesetzte Proteasen in zwei separate einkettige Moleküle gespalten, die vom Elisa als zwei intakte Moleküle detektiert werden [32]
- die Zellen produzieren verstärkt vor dem Absterben.



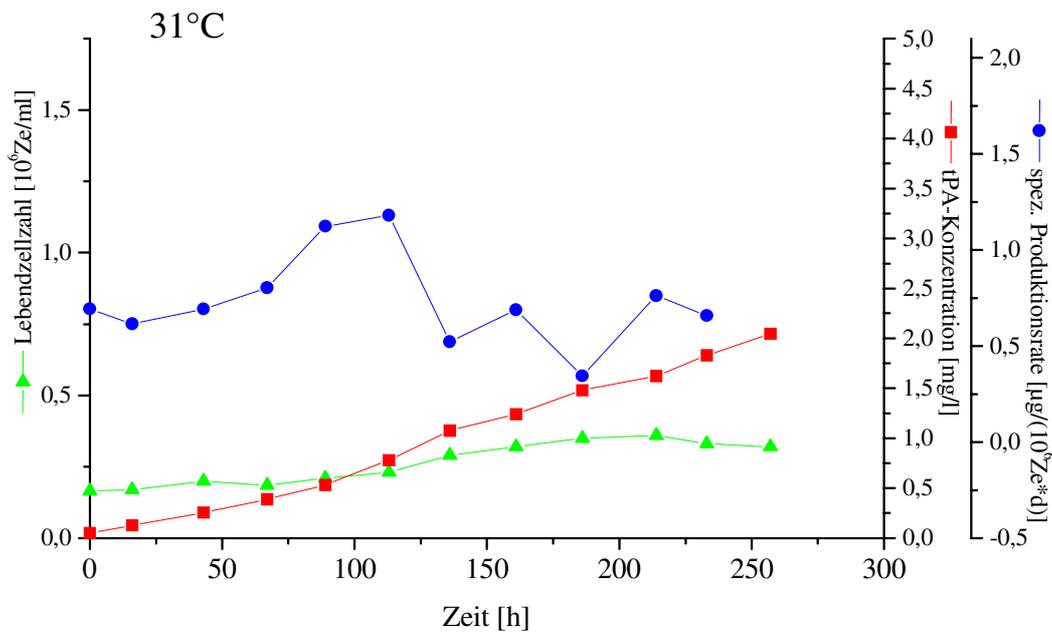
**Abb. 4.22a:** Die Lebendzellzahl, tPA-Konzentration und die spezifische tPA-Produktionsrate bei einer Kultivierungstemperatur von 37°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.



**Abb. 4.23:** Die Lebendzellzahl, tPA-Konzentration und die spezifische tPA-Produktionsrate bei einer Kultivierungstemperatur von 33°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Auch bei 33°C (Abb. 4.23) besitzen die Zellen die maximale Produktivität mit  $1,53 \mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  in der Adaptionsphase. In der anschließenden exponentiellen Wachstumsphase nimmt die Produktivität bis zur 232. Stunde auf  $0 \mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  ab. Im Gegensatz zur 37°C Kultivierung verläuft die spezifische Produktivität bei 33°C auf einem wesentlich höheren Niveau, was durch die mittleren Produktivitäten belegt wird. Die mittlere spezifische Produktivität beträgt bei 37°C  $0,44 \mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ . Bei einer Temperaturreduzierung um 4°C auf 33°C steigt sie um 111% auf  $0,93 \mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  an.

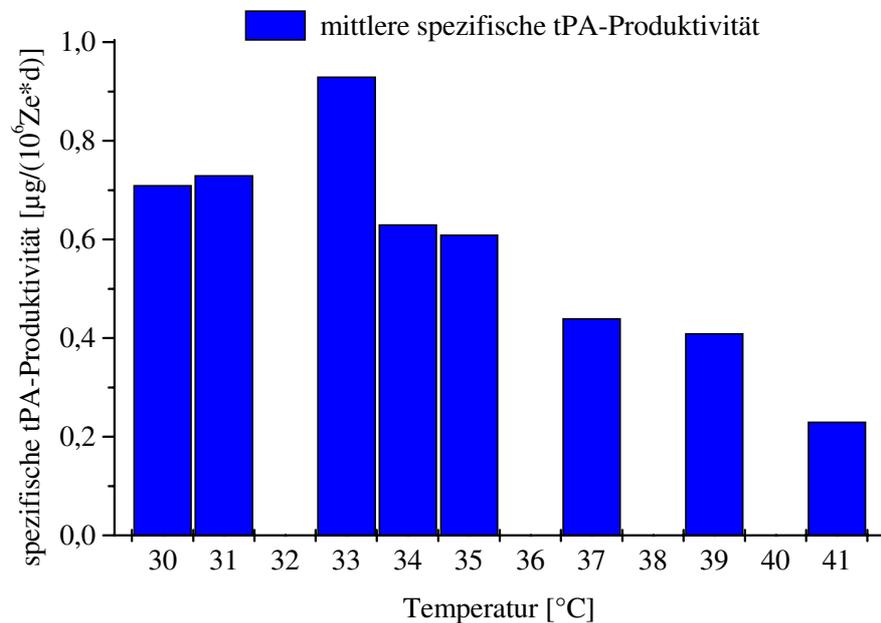
Der Verlauf der spezifischen Produktivität bei 31°C (Abb. 4.24) unterscheidet sich wesentlich von denen bei höherer Temperatur. Erst in der 113. Stunde wird eine maximale Produktivität von  $1,18 \mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  erreicht. Obwohl nur geringes Zellwachstum stattfindet, liegt die mittlere Produktivität mit  $0,73 \mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  66% über der von 37°C.



**Abb. 4.24:** Die Lebendzellzahl, tPA-Konzentration und die spezifische tPA-Produktionsrate bei einer Kultivierungstemperatur von 31°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

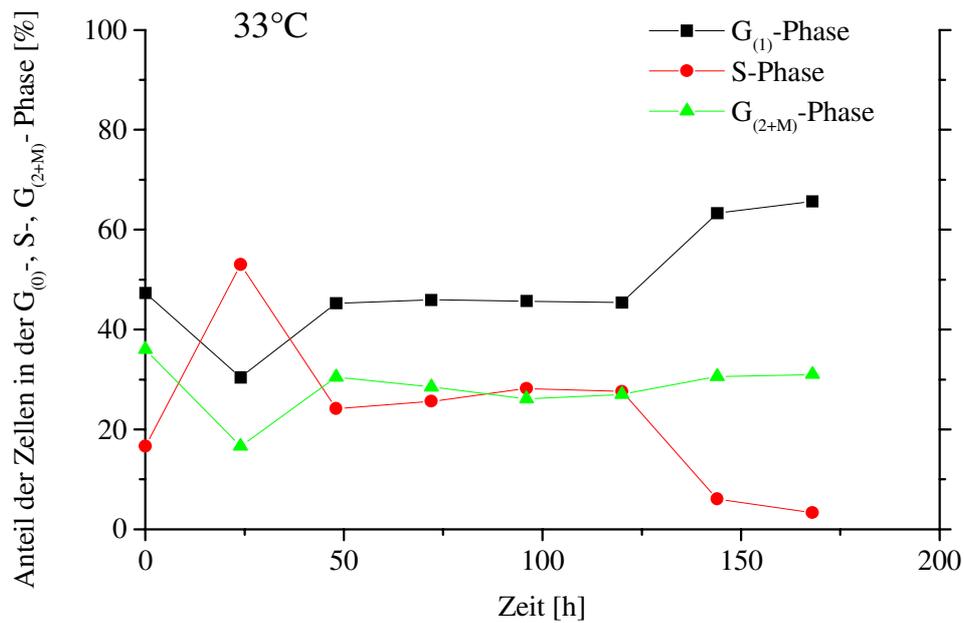
Bei einer Auftragung der mittleren spezifischen tPA-Produktivität als Funktion der Temperatur (Abb. 4.25) zeigt sich, daß die mittlere Produktivität ausgehend von 37°C bei einer Reduzierung der Kultivierungstemperatur stetig ansteigt und bei 33°C ein Maximum durchläuft. Die Produktivitätssteigerung gegenüber 37°C beträgt bei 33°C 111%, was bei einem teuren Produkt wie tPA zu einer erheblichen Produktionskostenreduzierung führt. Eine

Temperaturerhöhung bringt in Bezug auf die mittlere Produktivität hingegen bei dieser Zelllinie keinen Vorteil.

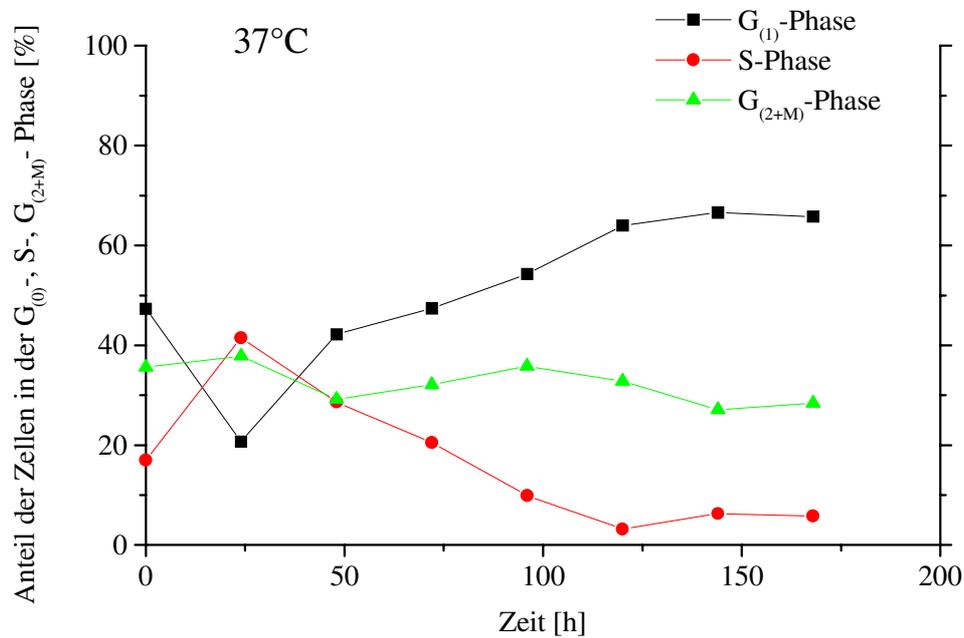


**Abb. 4.25:** Die mittlere spezifische tPA-Produktionsrate als Funktion der Temperatur. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Die Temperaturabhängigkeit der mittleren spezifischen tPA-Produktivität kann mit Hilfe des Zellzyklus erklärt werden. Die spezifische Zellproduktivität jeder einzelnen Zelle ändert sich mit der Zellzyklusphase [143]. Al-Rubeai et al. [143] konnte bei Untersuchungen mit der TF 70 R-Zelllinie für die G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase unterschiedliche Produktivitäten feststellen. In Abb. 4.26 und 4.27 sind die Anteile der Zellzyklusphasen der Zellen bei 33°C und 37°C als Funktion der Zeit dargestellt. Der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase ist unabhängig von der Temperatur bei ca. 30%. Während bei 33°C der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden über einen Zeitraum von 96 Stunden zwischen der 48. Stunde und der 144. Stunde konstant bei ca. 24% bleibt, nimmt er im gleichen Zeitraum bei 37°C von 28% auf 6% ab. Der Anteil der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase nimmt dementsprechend zu. Der Zeitpunkt der Genexpression in der Zelle ist unter anderem vom Promoter abhängig. Bei dem Simian Virus 40 (SV 40)-Promoter der TF 70-R-Zellen findet die Genexpression hauptsächlich in der S-Phase statt [138], was die hohe Produktivität der Zellen bei 33°C gegenüber 37°C erklärt.

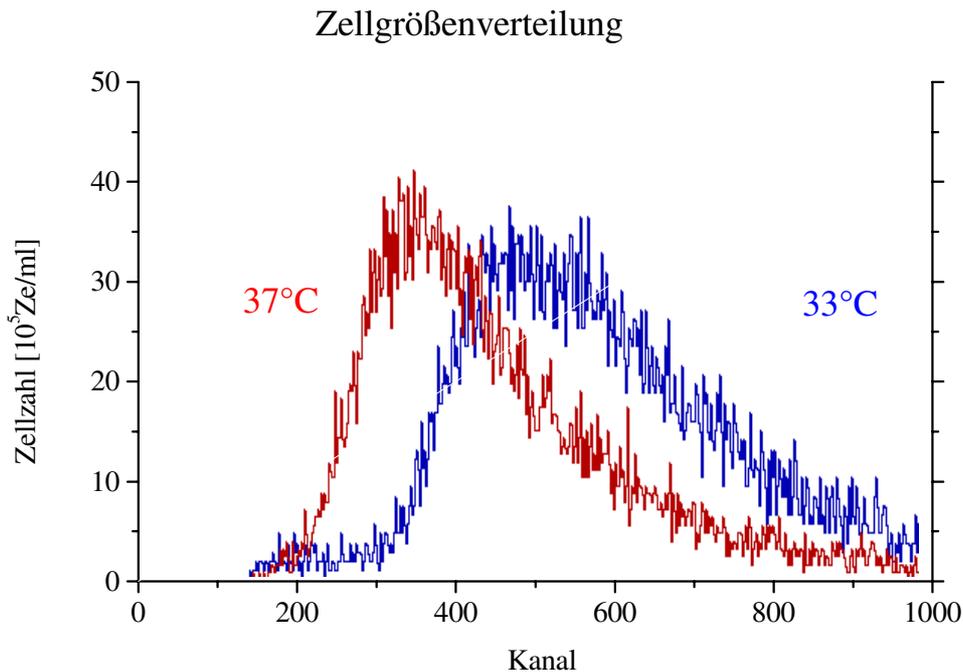


**Abb. 4.26:** Die Anteile der Zellyklusphasen der Zellen bei 33°C als Funktion der Zeit. Die DNA der Zellen wurde mit Probidiumiodid angefärbt und die resultierenden Floureszenzen mit einem Laserdurchflußcytometer aufgenommen.



**Abb. 4.27:** Die Anteile der Zellyklusphasen der Zellen bei 37°C als Funktion der Zeit. Die DNA der Zellen wurde mit Probidiumiodid angefärbt und die resultierenden Floureszenzen mit einem Laserdurchflußcytometer aufgenommen.

Auch die Zellgröße steht mit der Produktivität der Zellen im Zusammenhang. Da die vom Zellzyklus abhängige rekombinante Proteinsynthese parallel mit der normalen Zellproteinsynthese abläuft, besitzen die Zellen eine vom Zellzyklus abhängige Zellgröße. In Abb. 4.28 sind die Zellgrößenverteilungen für 33° und 37°C in der 72. Kultivierungsstunde dargestellt. Bei 37°C besitzen die Zellen einen durchschnittlichen Durchmesser von 14 µm [140]. Das Maximum der Zellgrößenverteilung ist bei 33°C deutlich zu höheren Zellgrößen verschoben.

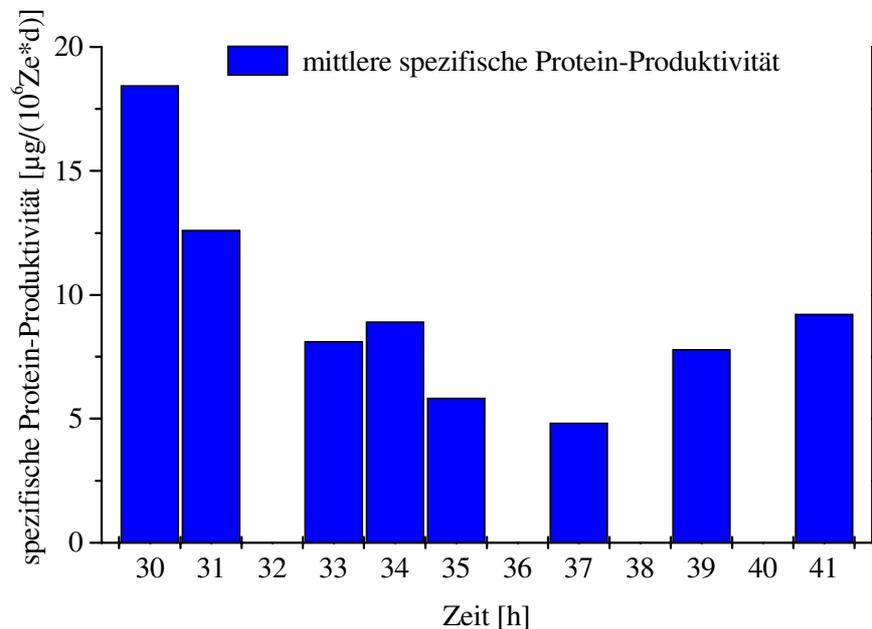


**Abb. 4.28:** Zellgrößenverteilung der Zellen in der 72. Stunde bei 33°C und 37°C.

Die Zellgrößenverteilung wurde mit einem Laserdurchflußcytometer aufgenommen. Da keine Größenkalibrierung vorgenommen werden konnte, ist hier die Zellzahl gegen die Datenkanäle aufgetragen.

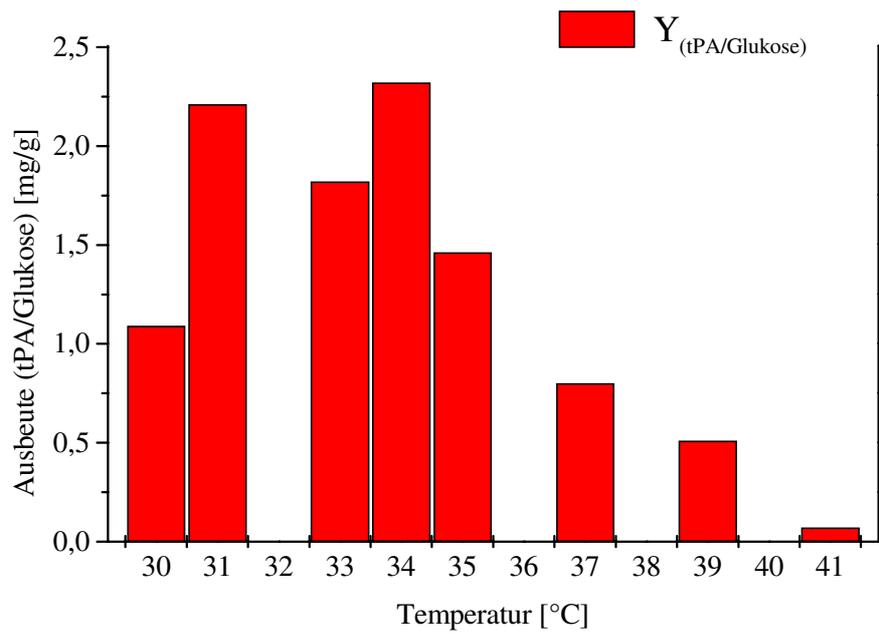
Im Einklang mit den Ergebnissen der Zellgrößenverteilungen stehen die berechneten mittleren spezifischen Protein-Produktivitäten (Abb. 4.29). Die mittlere Protein-Produktivität ist bei 33°C mit 8,12 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) um 68% höher als bei 37°C (4,84 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d)). Die hohen mittleren Protein-Produktivitäten bei 39°C und 41°C können auf eine verstärkte Bildung von Streß- und Hitzeschockproteinen zurückgeführt werden. Bei 30°C und 31°C sind die mittleren Protein-Produktivitäten mit 12,61 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (31°C) und 18,45 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (30°C) am höchsten. Eine Erklärung hierfür ist die eingeschränkte Proliferation. Die Proteinbiosynthese läuft auf Hochtouren, um genügend Proteine für zwei Tochterzellen zur Verfügung zu stellen. Da der Restriktionspunkt nicht überschritten wird, werden die Proteine an die Umgebung abgegeben, um ein Platzen der Zelle zu vermeiden. Die Protein-Produktivität ist um Faktor 10

höher als die tPA-Produktivität. Nur im Bereich von 37°C bis 33°C verlaufen die Produktivitäten kongruent. Außerhalb dieses Temperaturbereiches kommen die oben genannten Punkte zum tragen.

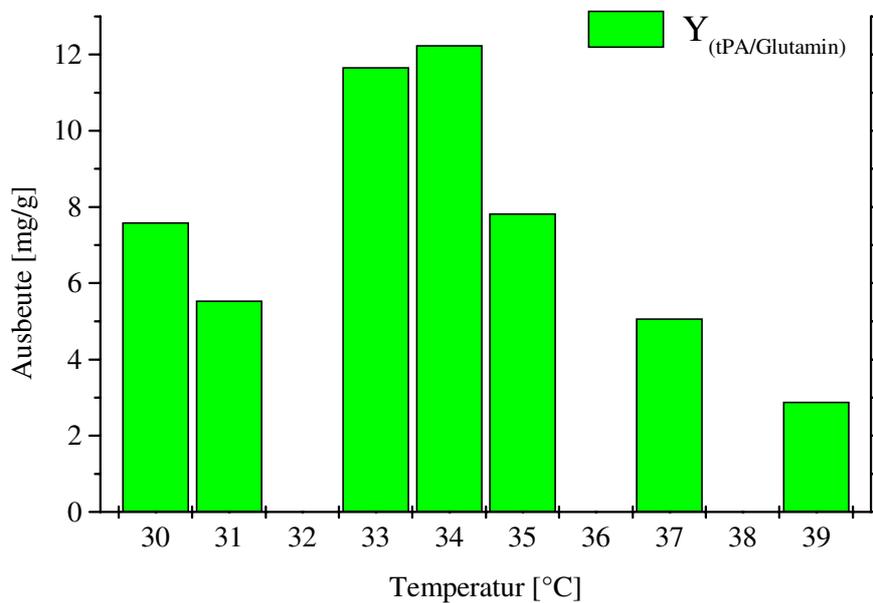


**Abb. 4.29:** Die mittlere spezifische Protein-Produktionsrate als Funktion der Temperatur. Die extrazellulären Protein-Konzentrationen wurden nach Bradford bestimmt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Für die Berechnung der tPA/Glukose-Ausbeute ( $Y_{(tPA/Glukose)}$ ) bzw. tPA/Glutamin-Ausbeute ( $Y_{(tPA/Glutamin)}$ ) werden die maximalen tPA-Konzentrationen und die zu diesem Zeitpunkt verbrauchten Glukose- bzw. Glutaminmengen herangezogen. In Abb. 4.30 und 4.31 werden die Ausbeuten als Funktion der Kultivierungstemperatur dargestellt. Die Beträge der tPA/Glutamin-Ausbeuten sind bis auf die 31°C Kultivierung um Faktor 5 höher als die der tPA/Glukose-Ausbeuten. Beide Ausbeuten zeigen im Bereich von 39°C bis 33°C eine kongruente Temperaturabhängigkeit. Die maximalen Ausbeuten werden jeweils bei 34°C erzielt, wobei die Unterschiede zwischen 33°C und 34°C geringfügig sind. Die tPA/Glutamin-Ausbeute ist mit 12,24 mg/g bei 34°C um 141% höher als bei 37°C. Die tPA/Glukose-Ausbeute ist mit 2,32 mg/g bei 34°C sogar um 190% höher als bei 37°C. Eine Temperaturerhöhung auf 39°C führt zu einer Abnahme der Ausbeuten um ca. 40% gegenüber 37°C.

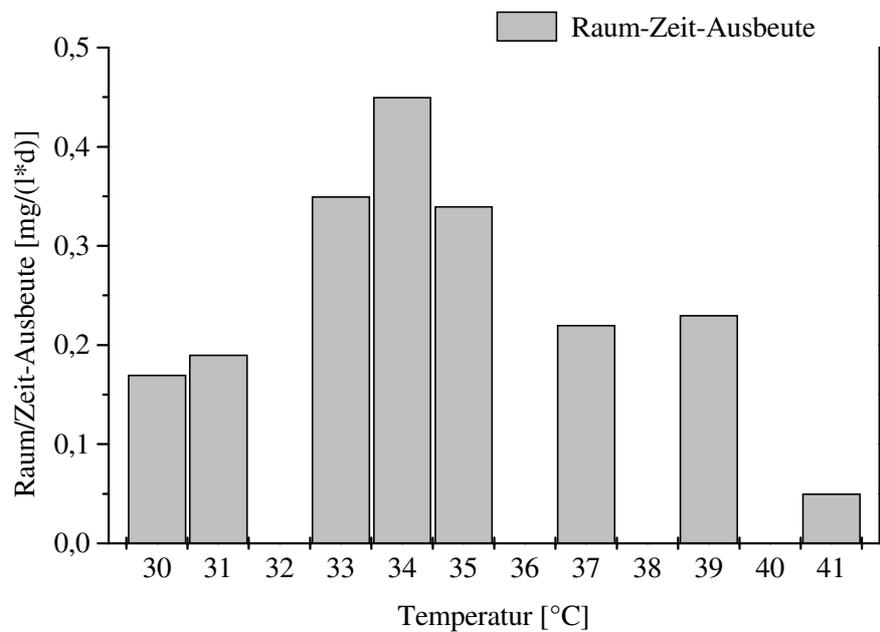


**Abb. 4.30:** Die tPA/Glukose-Ausbeute ( $Y_{(tPA/Glucose)}$ ) als Funktion der Temperatur. Die t-PA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Glukosekonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 ermittelt.



**Abb. 4.31:** Die tPA/Glutamin-Ausbeute ( $Y_{(tPA/Glutamin)}$ ) als Funktion der Temperatur. Die t-PA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Glutaminkonzentrationen wurden mittels HPLC ermittelt.

Ein Kriterium zur Beurteilung der Wirtschaftlichkeit eines Produktionsprozesses, ist die Raum-Zeit-Ausbeute. Sie gibt die in einer Zeiteinheit pro Volumeneinheit erzeugte Produktmenge an [144]. In Abb. 4.32 ist die Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der Temperatur dargestellt.



**Abb. 4.32:** Die Raum-Zeit-Ausbeute als Funktion der Temperatur. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

Die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt bei 37°C 0,22 mg/(l\*d). Sie steigt bei einer Temperaturreduzierung an, besitzt mit 0,45 mg/(l\*d) bei 34°C ein Maximum und fällt dann bei 31°C und 30°C auf Werte von 0,19 mg/(l\*d) und 0,17 mg/(l\*d) ab. Mit einer Temperaturreduzierung von 37°C auf 34°C kann die Raum-Zeit-Ausbeute um 105% gesteigert werden, ohne daß zusätzliche Kosten anfallen. Dieses Ergebnis ist für die industrielle Produktion von rekombinanten Proteinen mit Säugerzellen von großem Interesse, was auch durch verschiedene Patentanmeldungen belegt wird, die die Temperatur als Gegenstand haben [28, 35].

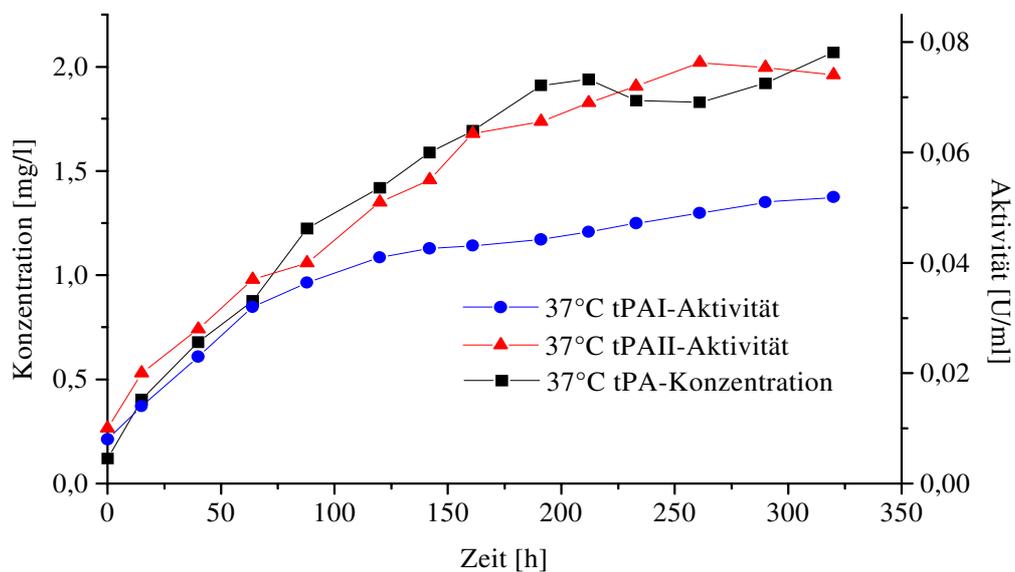
In Tab. 4.3 sind die verschiedenen Ausbeuten, die mittlere tPA-Produktivität und die maximale tPA-Konzentration in Abhängigkeit von der Temperatur aufgeführt.

**Tab. 4.3:** Ausbeutekoeffizienten, maximale t-PA-Konzentrationen und mittlere tPA-Produktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur [°C]	$Y_{(tPA/Glukose)}$ [mg/g]	$Y_{(tPA/Glutamin)}$ [mg/g]	$Y_{(Raum/Zeit)}$ [mg/(l*d)]	max. tPA- Konzentration [mg/l]	mittlere tPA- Produktivität [ $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}*\text{d})$ ]
30	1,09	7,59	0,17	1,73	0,71
31	2,21	5,54	0,19	2,04	0,73
33	1,82	11,66	0,35	4,59	0,93
34	2,32	12,24	0,45	4,63	0,63
35	1,46	7,83	0,35	2,51	0,61
37	0,80	5,07	0,22	2,06	0,44
39	0,51	2,89	0,23	1,08	0,41
41	0,11	-	0,05	0,25	0,23

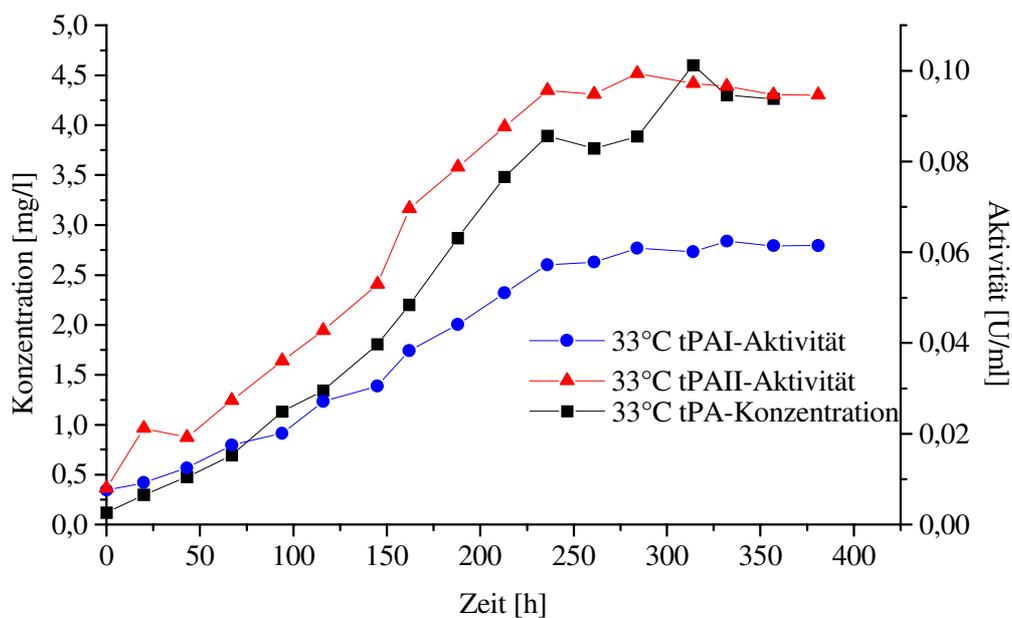
#### 4.1.1.3 Die Produktqualität

Die Produktqualität ist ein wesentlicher Aspekt bei der Prozeßoptimierung. Insbesondere bei rekombinanten, pharmazeutisch interessanten Glykoproteinen muß eine stabile Produktqualität über die gesamte Kultivierungsdauer gewährleistet sein. Bei jeder Änderung im industriellen Produktionsprozeß ist eine Produktqualitätsuntersuchung vom Gesetz vorgeschrieben [45].

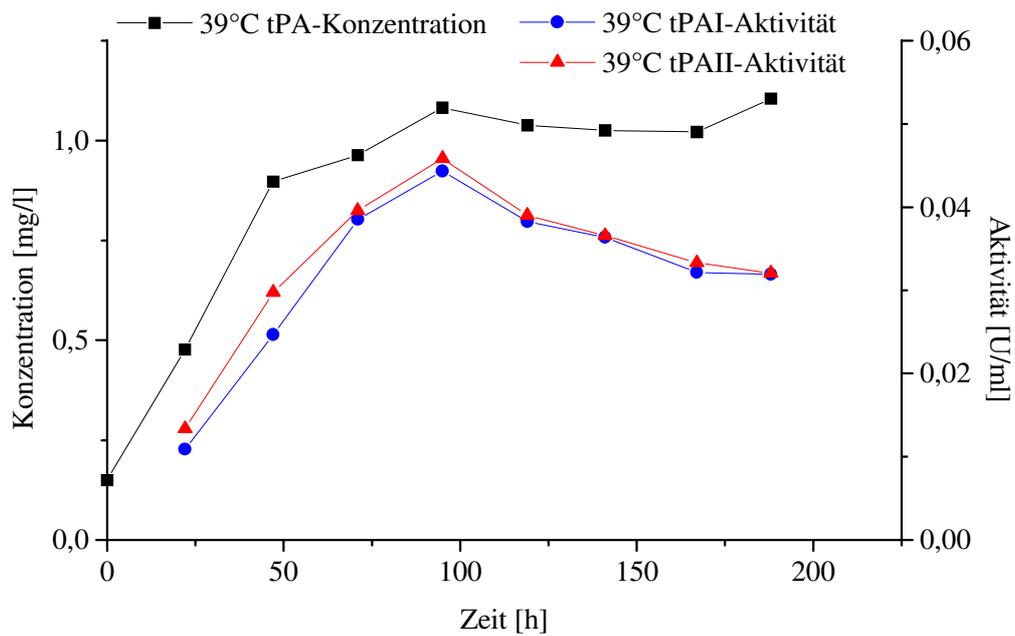
**Abb. 4.33:** Die tPA-Konzentrationen und die tPA-Aktivitäten bei 37°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt.

Da eine genaue Aufschlüsselung des Glykosylierungsmusters von tPA einen erheblichen finanziellen Aufwand bedeutet und im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, wird zur Beurteilung der tPA-Produktqualität die Produktaktivität herangezogen. Die photometrische Aktivitätsbestimmung ermöglicht eine indirekte Aussage über die Produktzusammensetzung aus einkettigem und zweikettigem tPA (Kapitel 3.5.16).

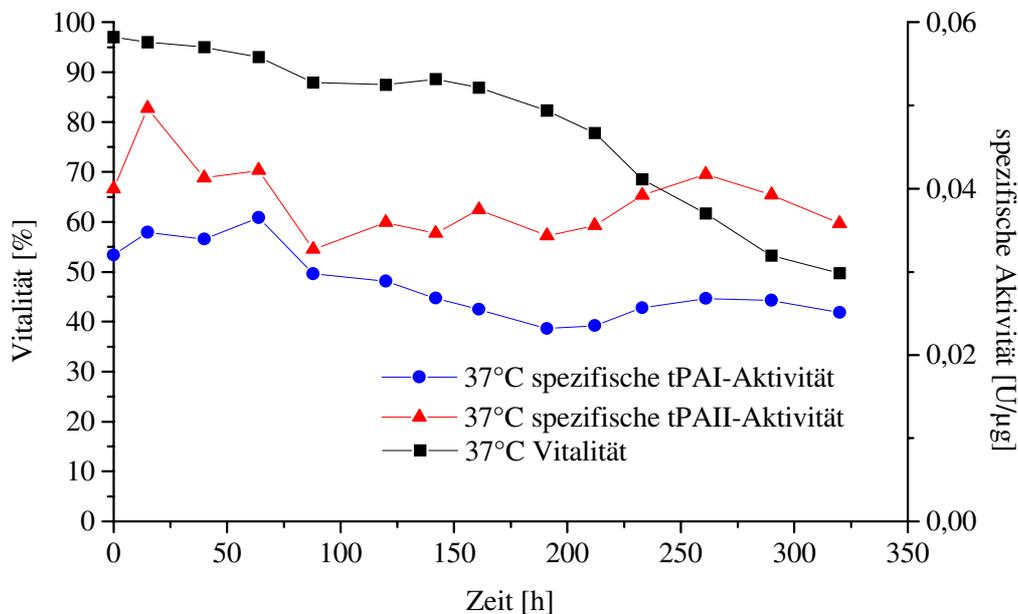
In den Abb. 4.33-4.35 sind die tPA-Konzentrationen und die tPA-Aktivitäten bei 37°C, 33°C und 39°C als Funktion der Zeit dargestellt. Bei 37°C und 33°C steigt die tPA-Aktivität mit zunehmender tPA-Konzentration an. Der Verlauf der tPA-Aktivitäten bei 39°C ist im Vergleich zu den niedrigeren Temperaturen sehr verschieden. Bis zur 95. Stunde steigen die tPA-Aktivitäten an, danach fallen sie bei gleichbleibender tPA-Konzentration kontinuierlich ab. Da sich die Beträge der tPAI- und tPAII-Aktivität bei 39°C nicht unterscheiden, liegt entweder ein Molekül vor, daß nicht in die zweikettige Form übergehen kann oder aber es liegt nur zweikettiges tPA vor. Aufschluß darüber geben die spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivitäten, die sich aus der jeweiligen Aktivität und der dazugehörigen tPA-Konzentration berechnen lassen. Während mit Hilfe der spezifischen tPAI-Aktivität eine Aussage über die Produktzusammensetzung getroffen werden kann, ermöglicht es die spezifische tPAII-Aktivität die Produktqualität zu beurteilen. Die spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivitäten eines Standards aus einkettigem tPA betragen 0,017 U/ $\mu$ g und 0,035 U/ $\mu$ g.



**Abb. 4.34:** Die tPA-Konzentrationen und die tPA-Aktivitäten bei 33°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt.

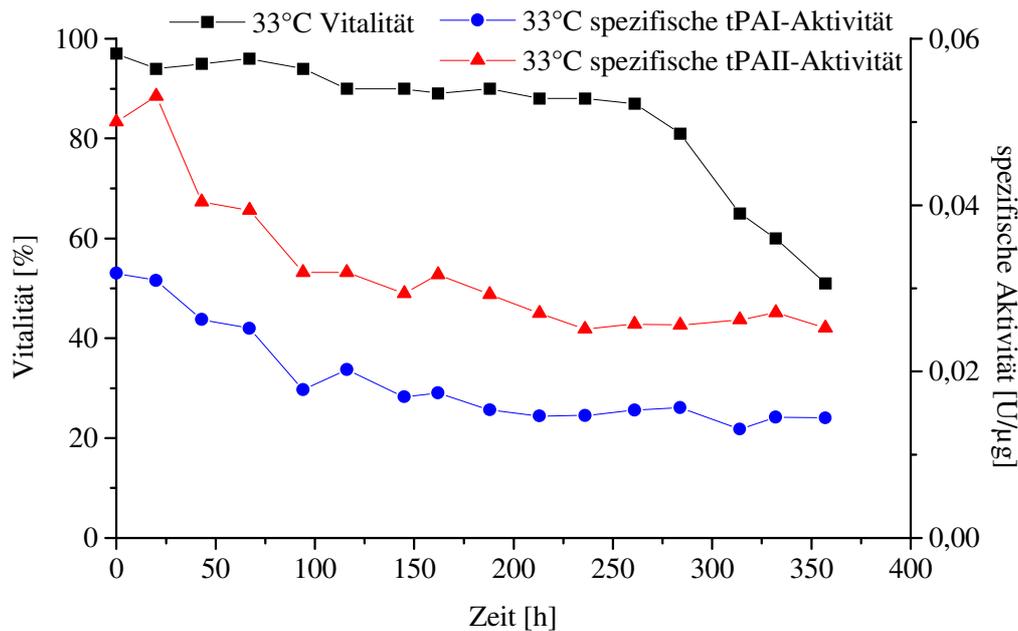


**Abb. 4.35:** Die tPA-Konzentrationen und die tPA-Aktivitäten bei 39°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt.



**Abb. 4.36:** Die Vitalität und die spezifischen Aktivitäten bei 37°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

In Abb. 4.36 und 4.37 sind die spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivitäten, sowie die Vitalität bei 37°C und 33°C als Funktion der Zeit dargestellt. Bei beiden Temperaturen sind die spezifischen tPA-Aktivitäten zu Beginn der Kultivierungen am höchsten und nehmen im Verlauf der Kultivierungen nur geringfügig ab. Die Vitalität der Zellkulturen hat anscheinend keinen Einfluß auf die tPA-Aktivität. Bei 37°C fällt die Vitalität zwischen der 150. und der 325. Stunde um 35%, ohne daß eine kongruente Aktivitätsabnahme erfolgt.

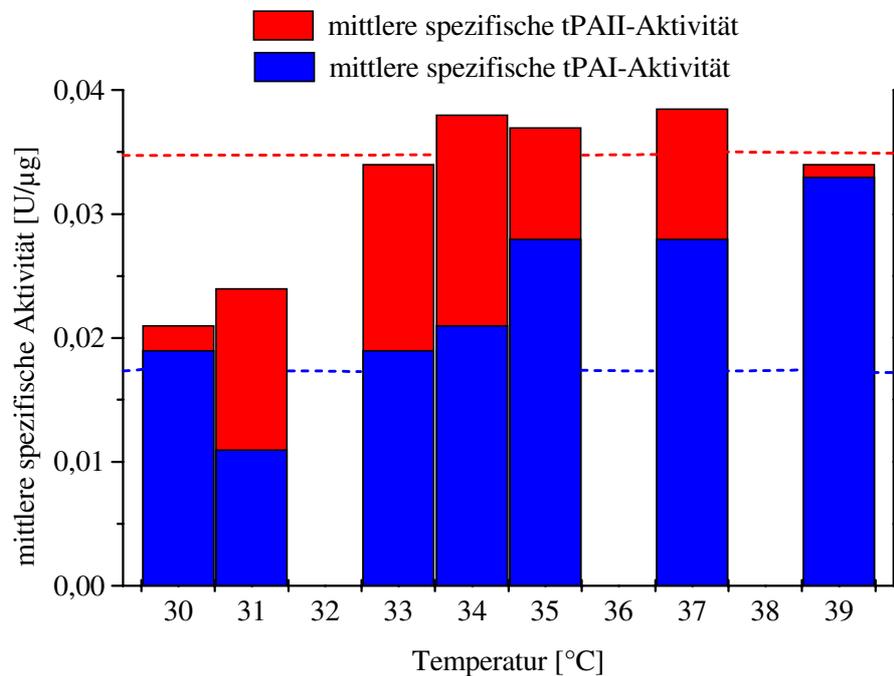


**Abb. 4.37:** Die Vitalität und die spezifischen Aktivitäten bei 33°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Die spezifischen tPAI-Aktivitäten liegen sowohl bei 37°C als auch bei 33°C deutlich über der tPAI-Aktivität des Standards. Das bedeutet, daß im Kulturüberstand neben dem einkettigen tPA auch das zweikettige tPA vorhanden sein muß, da es eine höhere Aktivität als das einkettige tPA besitzt. Die Produktzusammensetzung ändert sich mit der Kultivierungsdauer. Der Anteil des zweikettigen tPA ist zu Beginn der Kultivierungen höher als zum Kultivierungsende. Die berechneten mittleren spezifischen Aktivitäten von 0,034 U/µg zeigen, daß bei 39°C ausschließlich zweikettiges tPA vorliegt.

In Abb. 4.38 sind die mittleren spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivitäten als Funktion der Temperatur aufgetragen. Im Temperaturbereich von 39°C bis 33°C hat die Kultivierungstemperatur keinen Einfluß auf die Produktqualität, nur das Verhältnis von tPAI zu tPAII

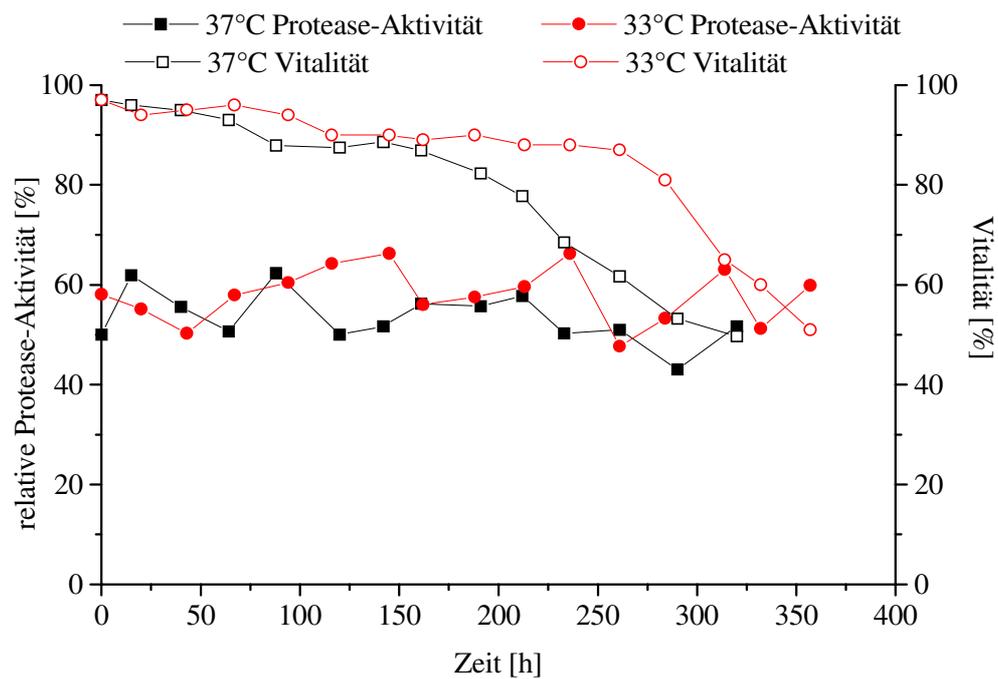
verschiebt sich bei einer Temperaturreduzierung zum einkettigen tPA hin. Ein deutlicher Einbruch in der Produktqualität findet bei 31°C und 30°C statt.



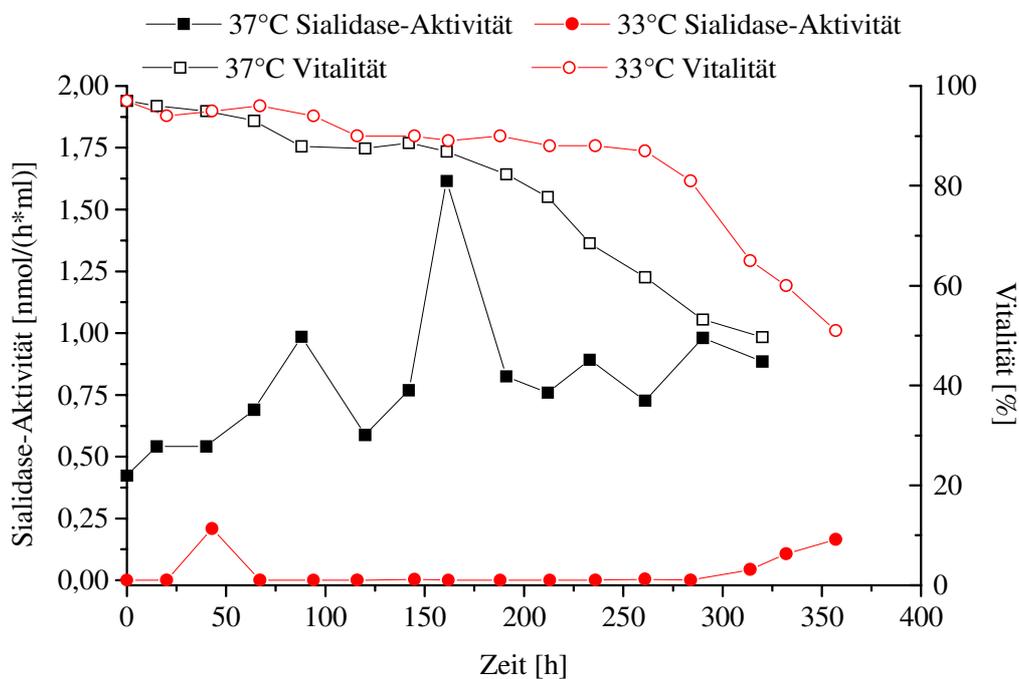
**Abb. 4.38:** Mittlere spezifische tPAI- und tPAII-Aktivitäten als Funktion der Temperatur. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt. Die gestrichelten Linien symbolisieren die mittleren spezifischen tPA-Aktivitäten eines Standards.

Glykolytische und proteolytische Enzyme, die bei der Zellyse ausgeschleust werden, können bei Glykoproteinen zu extrazellulären Degradationen führen und somit die Produktqualität beeinflussen [39, 80, 83]. Da rekombinantes tPA terminale Sialinsäuren besitzt, wird zur Beurteilung der Produktqualität neben der extrazellulären Protease-Aktivität auch die Sialidase-Aktivität im Kulturüberstand verfolgt.

In Abb. 4.39 sind die extrazellulären Protease-Aktivitäten bei 37°C und 33°C als Funktion der Zeit dargestellt. Bei keiner der beiden Temperaturen kann ein deutlicher Anstieg der Protease-Aktivität beim Absterben der Zellkulturen beobachtet werden. Die Ursachen sind möglicherweise darin zu finden, daß die Halbwertszeit der extrazellulären Proteasen zu gering ist oder daß das Medium Proteasen inhibierende Inhaltsstoffe wie Aprotinin enthält. Da weder die Produktqualität noch die Produktkonzentration in der Abterbephase merklich zurückgehen, besteht die Möglichkeit, daß bei der TF 70 R-Zelllinie geringere Mengen an Proteasen freigesetzt werden als bei anderen Zelllinien.



**Abb. 4.39:** Extrazelluläre Protease-Aktivitäten bei 37°C und 33°C als Funktion der Zeit. Die Protease-Aktivitäten wurden fluorimetrisch mit Hilfe von Resurufin-markiertem Casein bestimmt.

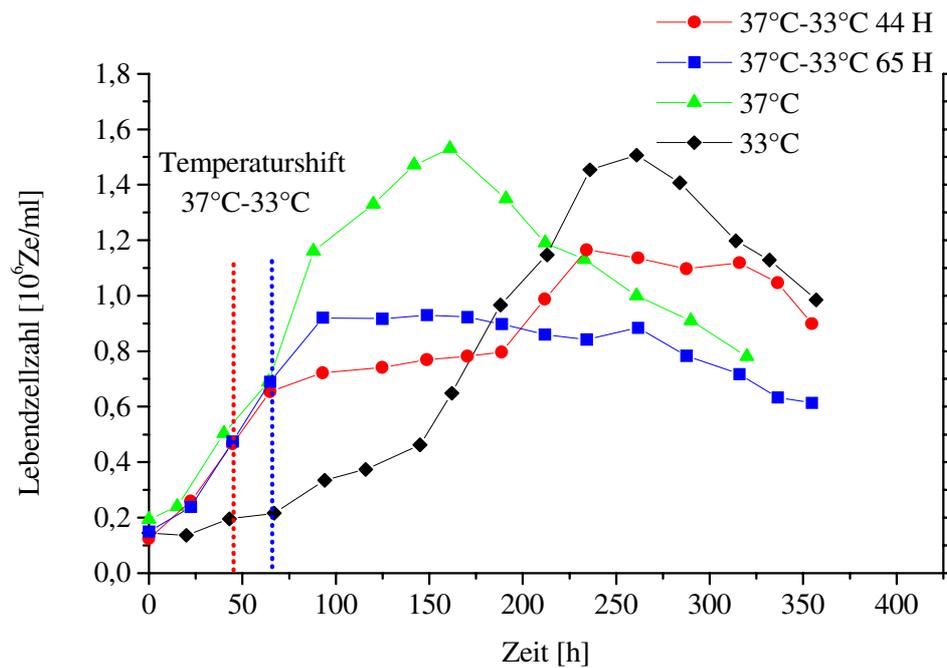


**Abb. 4.40:** Die Vitalitäten und die extrazellulären Sialidase-Aktivitäten bei 33°C und 37°C als Funktion der Zeit. Die Sialidase-Aktivitäten wurden fluorimetrisch mit dem Substrat MUF-NeuNAc bestimmt. Die Aktivitätseinheiten entsprechen relativen Einheiten der Kalibrationskurve, die mit 4-Methylumbelliferon erhalten wurde.

In Abb. 4.40 sind die Vitalitäten und die extrazellulären Sialidase-Aktivitäten bei 33°C und 37°C als Funktion der Zeit aufgetragen. Bei 37°C ist ein Anstieg der extrazellulären Sialidase-Aktivität zu Beginn der Absterbephase erkennbar. Auch bei 33°C steigt die Sialidase-Aktivität im Kulturüberstand beim Absterben der Zellkultur an. Jedoch ist die extrazelluläre Sialidase-Aktivität bei 33°C bedeutend geringer als bei 37°C, so daß extrazelluläre Degradationen bei 33°C im geringeren Ausmaß als bei 37°C stattfinden. Erste eigene Untersuchungen, bei denen tPA zusammen mit Sialidasen über einen längeren Zeitraum bei 37°C inkubiert werden, zeigen, daß die tPA-Aktivität nicht durch den Abbau terminaler Sialinsäuren beeinflusst wird.

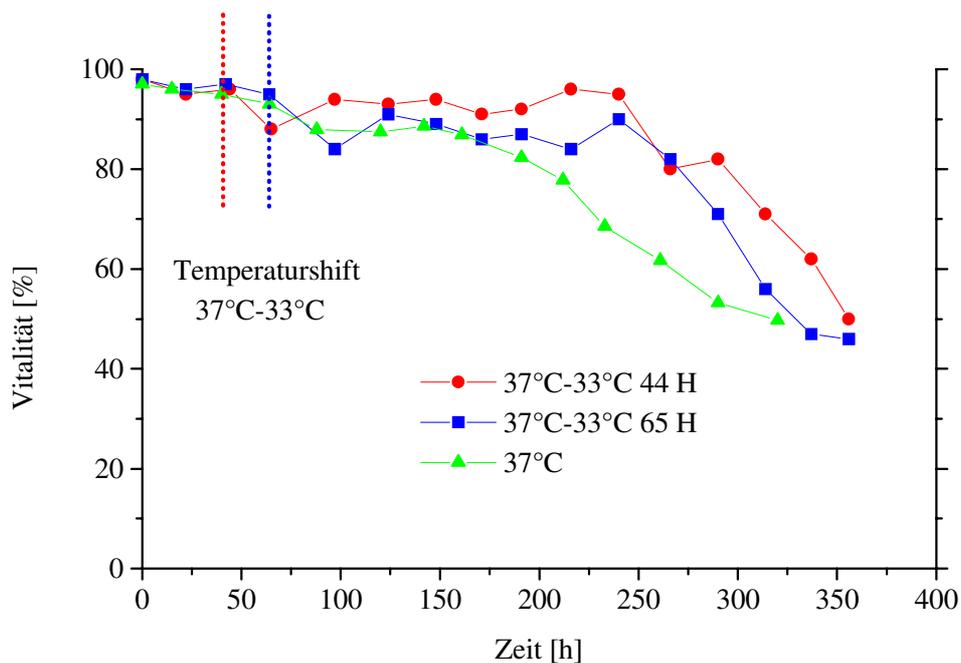
#### 4.1.2 Untersuchungen in Spinnerflaschen mit Temperaturshift

Die Zelllinie TF 70 R besitzt unterschiedliche optimale Kultivierungstemperaturen für Zellwachstum und tPA-Produktion. Für ein schnelles Zellwachstum ist 37°C die optimale Temperatur mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,71 d<sup>-1</sup>. Bei 39°C ist die maximale Wachstumsrate zwar mit 0,73 d<sup>-1</sup> geringfügig höher, die maximale Lebendzellzahl aber 12% niedriger als bei 37°C. Welches die optimale tPA-Produktionstemperatur ist, hängt von der Betrachtungsweise ab. Bei 34°C werden die höchsten tPA-Ausbeuten erzielt, wohingegen bei 33°C mit 0,93 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) die höchste mittlere tPA-Produktivität nachgewiesen wurde. Bei einer Prozeßoptimierung mittels Temperaturshift sollen die Zellen möglichst schnell mit dem Wachstum beginnen, um dann nach einer Temperaturabsenkung bei hohen Zelldichten zu produzieren. Um die Adaptionphase so kurz wie möglich zu halten, werden bei den Untersuchungen mit Temperaturshift die Kultivierungen bei der optimalen Wachstumstemperatur von 37°C gestartet. In der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt eine Temperaturabsenkung auf 33°C, die Temperatur bei der die Zellen die höchste mittlere Produktivität besitzen. Die Temperaturabsenkung muß zu einem Zeitpunkt erfolgen, wo noch keine Substratlimitierungen auftreten. Daher wird der Temperaturshift im ersten Drittel der exponentiellen Wachstumsphase nach der 44. Stunde und alternativ in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase nach der 65. Stunde vorgenommen. Die Kultivierungen mit Temperaturshift werden im folgenden nach dem Zeitpunkt der Temperaturabsenkung als 44 H und 65 H bezeichnet.



**Abb. 4.41:** Die Lebendzellzahlen der Kultivierungen 44 H, 65 H, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

In Abb. 4.41 sind die Lebendzellzahlen der Kultivierungen 44 H, 65 H, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit dargestellt. Bei den Kultivierungen 44 H und 65 H befinden sich die Zellen trotz des Temperaturshifts für einen weiteren Tag in einer exponentiellen Wachstumsphase. Danach gehen die Zellen in eine stationäre Wachstumsphase über. Der Beginn der stationären Wachstumsphasen ist vom Zeitpunkt des Temperaturshifts abhängig. Bei Kultivierung 44 H beginnen die Zellen ab der 191. Stunde erneut zu wachsen und erreichen eine maximale Lebendzelldichte von  $1,16 \cdot 10^6$  Ze/ml. Bei Kultivierung 65 H wird die maximale Lebendzelldichte von  $0,93 \cdot 10^6$  Ze/ml schon in der 97. Stunde erreicht und über einen Zeitraum von 63 Stunden bis zur 266. Stunde beibehalten. Diese stationären Wachstumsphasen sind bei Kultivierungen mit konstanter Temperatur nicht zu beobachten.

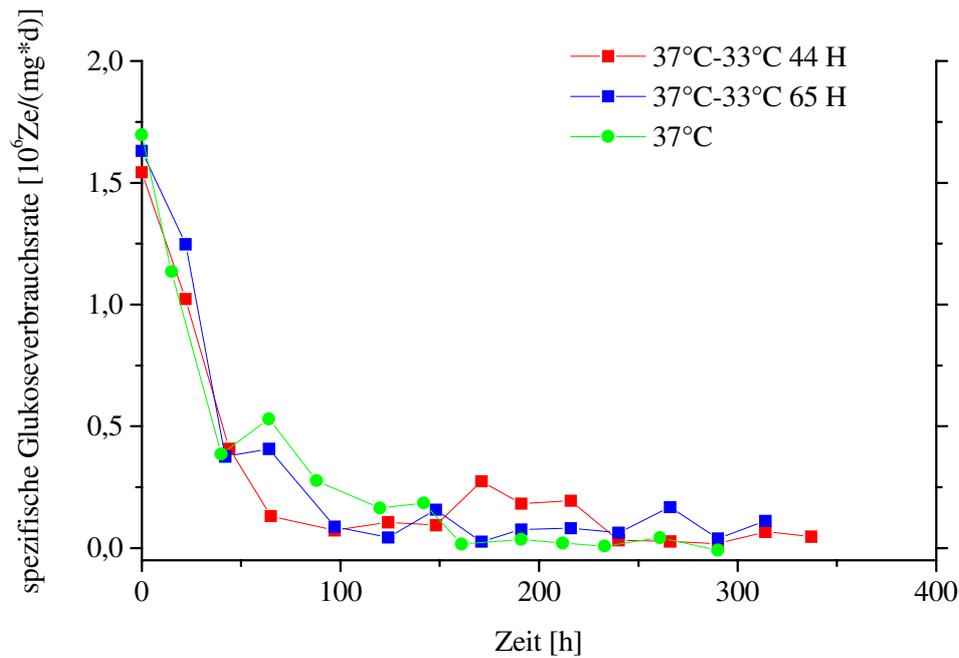


**Abb. 4.42:** Die Vitalitäten der Kultivierungen mit Temperaturshift und bei 37°C als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Zeitpunkt des Temperaturshifts. Die Daten der 33°C Kultivierung sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

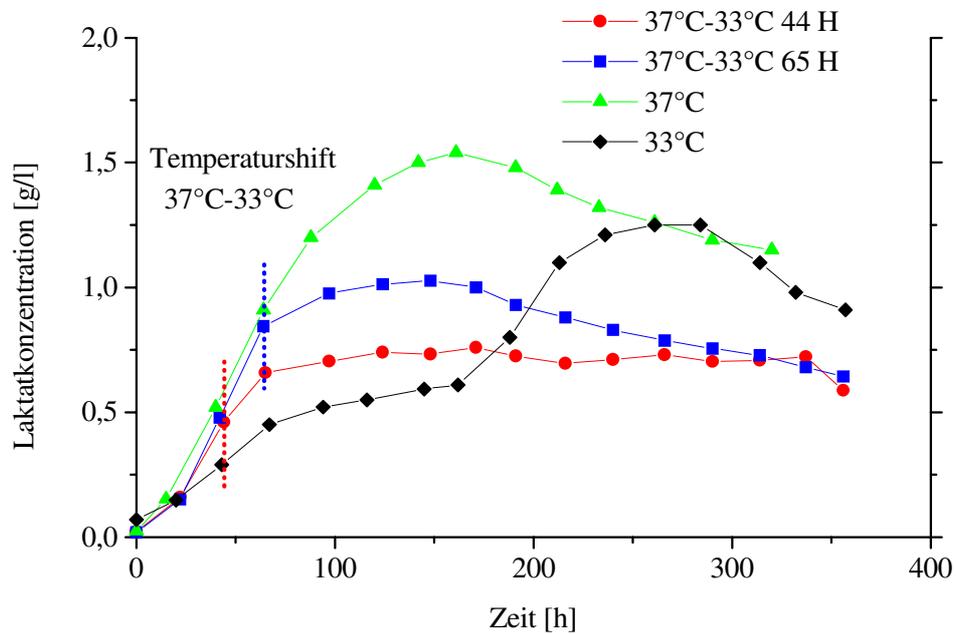
In Abb. 4.42 sind die Vitalitäten der Kultivierungen mit Temperaturshift und der 37°C Kultivierung als Funktion der Zeit dargestellt. Nach den Temperaturshifts in der 44. und 65. Stunde fällt die Vitalität für einen Tag um ca. 10% ab und steigt dann wieder auf das vorherige Niveau an. Dieser kurzzeitige Vitalitätsverlust kann auf den Stress zurückgeführt werden, bedingt durch den Temperaturshift, da die Zellen ihren Stoffwechsel umstellen müssen. Im Vergleich zu den Kultivierungen bei 37°C besitzen die Zellkulturen bei den Temperaturshift-Versuchen über einen viel längeren Zeitraum eine hohe Vitalität. Der Beginn der Absterbephase kann gegenüber der 37°C Kultivierung durch einen Temperaturshift um 100 Stunden verzögert werden, was dem Vitalitätsverlauf bei 33°C Kultivierungen entspricht.

Die spezifischen Glukoseverbrauchsrate der 44 H und 65 H Kultivierungen (Abb. 4.43) sind noch einen Tag nach dem Temperaturshift mit denen einer 37°C Kultivierung vergleichbar und fallen anschließend auf einen mittleren Wert von 0,09 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d). Bei der 44 H Kultivierung steigen die spezifischen Glukoseverbrauchsrate in der 191. Stunde noch einmal an, was auf das erneute Zellwachstum zurückzuführen ist. In Abb. 4.44 sind die Laktatkonzentrationen der Kultivierungen 44 H, 65 H, 37°C und bei 33°C als Funktion der

Zeit dargestellt. Deutlich erkennbar ist, daß die Laktatkonzentrationen im Kulturüberstand durch einen Temperaturshift reduziert werden. Der Grad der Laktatreduzierung ist vom Zeitpunkt des Temperaturshifts abhängig. Bei allen Kultivierungen wird Laktat schon zu einem Zeitpunkt wieder verstoffwechselt, wo noch ausreichend Glukose vorhanden ist.

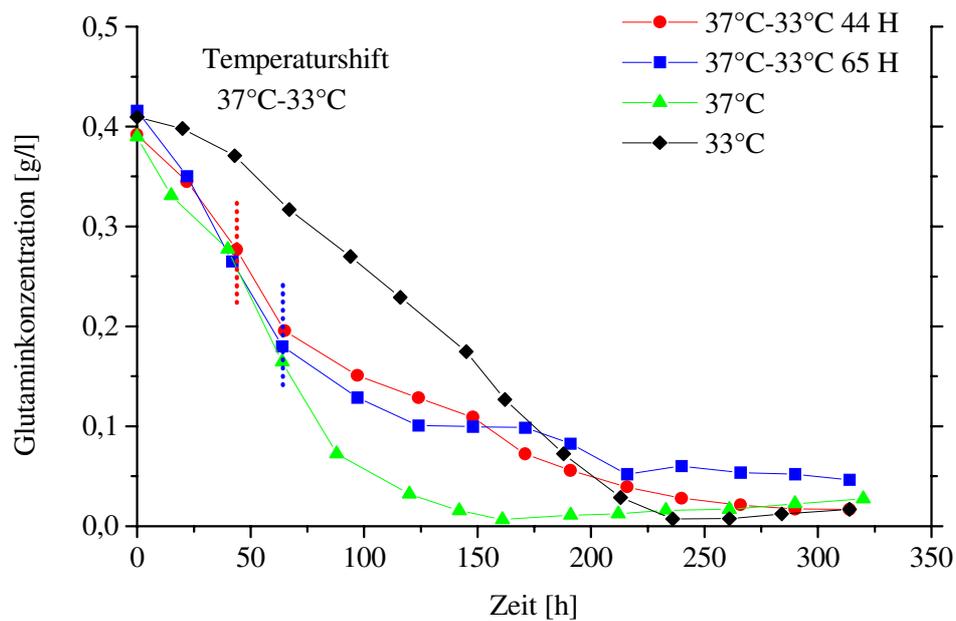


**Abb. 4.43:** Spezifischen Glukoseverbrauchsrate der Kultivierungen mit Temperaturshift und bei 37°C als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Glukosekonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 enzymatisch bestimmt.



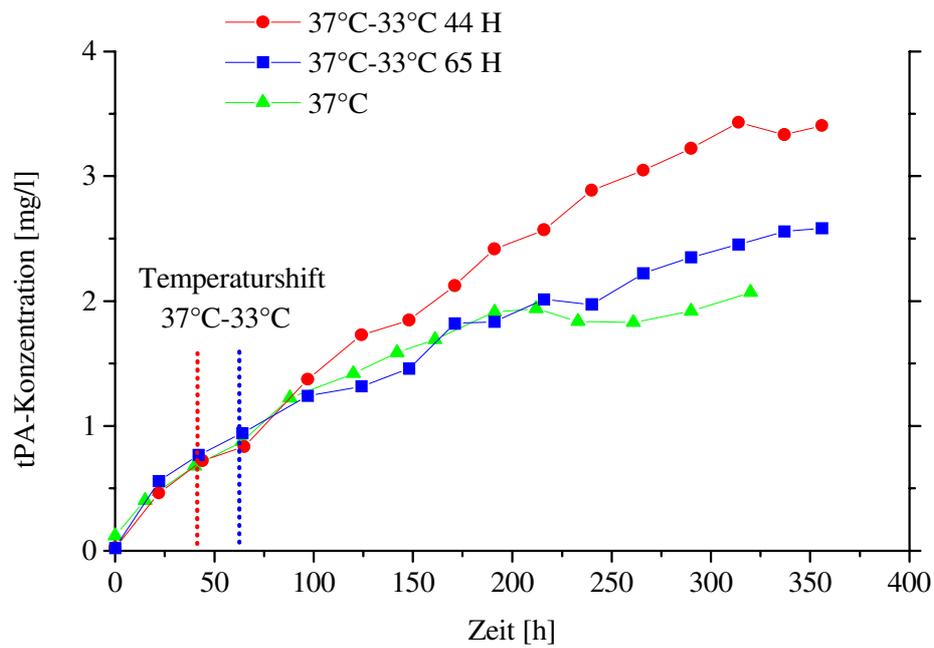
**Abb. 4.44:** Laktatkonzentrationen der Kultivierungen 44 H, 65 H, 37°C und bei 33°C als Funktion der Zeit. Die Laktatkonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 enzymatisch bestimmt. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

Bei konstanter Temperaturführung endet die exponentielle Wachstumsphase, wenn kein Glutamin mehr im Überstand vorhanden ist. Der Übergang der Zellen nach einem Temperaturshift aus der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase, kann nicht auf eine Glutaminlimitierung zurückgeführt werden. In Abb. 4.45 sind die Glutaminkonzentrationen der Kultivierungen 44 H, 65 H, 37°C und bei 33°C als Funktion der Zeit dargestellt. Zu Beginn der stationären Wachstumsphasen der Kultivierungen 44 H und 65 H beträgt die Glutaminkonzentration im Überstand ca. 0,13 g/l. Das Ende des exponentiellen Wachstums entsteht somit eindeutig als Folge der Temperaturabsenkung.

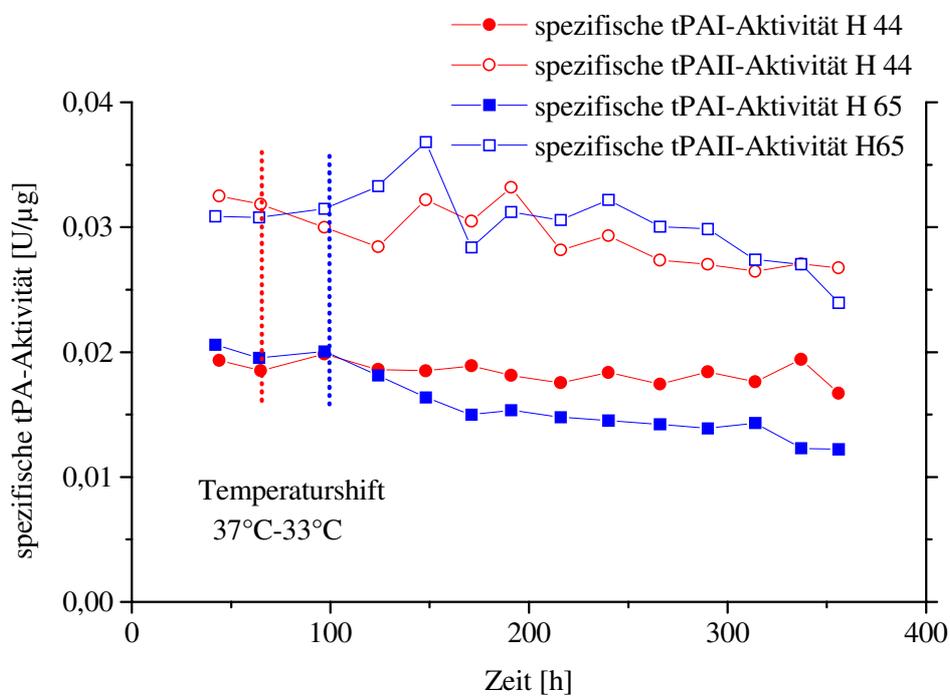


**Abb. 4.45:** Die Glutaminsäurekonzentrationen der Kultivierungen 44 H, 65 H, 37°C und bei 33°C als Funktion der Zeit. Die Glutaminsäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

Der Erfolg einer Prozeßoptimierung ist von der gewonnenen Produktmenge und dessen Qualität abhängig. In Abb. 4.46 sind die tPA-Konzentrationen der Kultivierungen 44 H, 65 H und 37°C als Funktion der Zeit dargestellt. Die maximalen tPA-Konzentrationen betragen 2,58 mg/l bei 65 H und 3,43 mg/l bei 44 H. Durch eine Temperaturreduzierung in der 65. Stunde von 37°C auf 33°C kann die maximale tPA-Konzentration um 25% gegenüber einer Kultivierung bei einer konstanten Temperatur von 37°C gesteigert werden. Erfolgt die Temperaturreduzierung bereits im ersten Drittel der exponentiellen Wachstumsphase in der 44. Stunde, kann die maximale tPA-Konzentration sogar um 66% gesteigert werden.



**Abb. 4.46:** Die tPA-Konzentrationen der Kultivierungen 44 H, 65 H und bei 37°C als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Zeitpunkt des Temperaturshifts.



**Abb. 4.47:** Spezifische tPAI- und tPAII-Aktivitäten der Kultivierungen 44 H und 65 H als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt. Die gepunkteten Linien symbolisieren den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

Die mittleren spezifischen tPA-Produktivitäten nach der 44. und der 65. Stunde betragen bei einer konstanten Kultivierungstemperatur von 37°C 0,118  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  und 0,097  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ . Durch die Temperaturreduzierung steigen sie auf 0,285  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  bei 44 H und 0,154  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  bei 65 H an.

In Abb. 4.47 sind die spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivitäten der Kultivierungen 44 H und 65 H als Funktion der Zeit dargestellt. Die mittleren spezifischen tPA-Aktivitäten beider Kultivierungen liegen mit 0,017 U/ $\mu\text{g}$  für die tPAI-Aktivität und 0,03 U/ $\mu\text{g}$  für die tPAII-Aktivität nur geringfügig unter den spezifischen Aktivitäten eines tPA-Standards. Die Produktqualität wird somit nicht durch einen Temperaturshift beeinflusst.

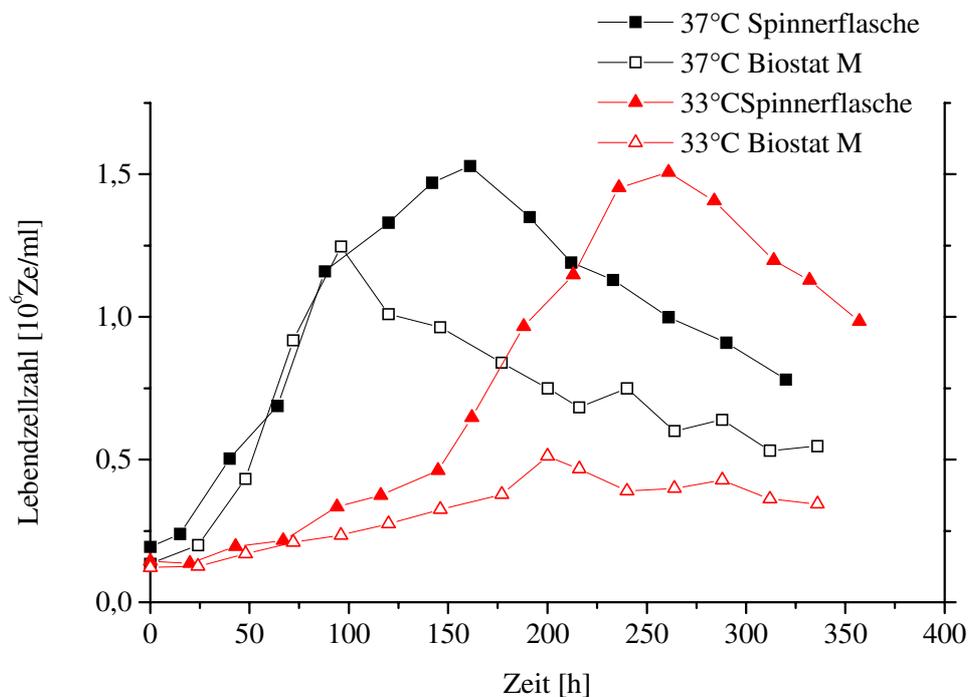
Es bleibt festzuhalten, daß der optimale Zeitpunkt für einen Temperaturshift nicht in der Mitte des exponentiellen Wachstums liegt, sondern im ersten Drittel. Ein Temperaturshift führt gegenüber einer konstanten Temperatur von 37°C bei gleichbleibender Produktqualität zu einer Steigerung der Produktmenge um 66%. Die Produktkonzentrationen der 33°C Kultivierungen werden aber nicht erreicht.

#### **4.1.3 Untersuchungen mit Temperaturshift im Biostat M**

Nach den Untersuchungen in 250 ml Spinnerflaschen erfolgt ein "scale up" auf den 2 Litermaßstab im Bioreaktorsystem Biostat M. Durch den Einsatz von Biostat M-Reaktoren können der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration im Medium konstant gehalten werden. In den Spinnerflaschenversuchen sinkt der pH-Wert trotz Pufferung im Laufe der Kultivierung von 7,2 auf 6,5 ab. Der pH-Wert bei Kultivierungen im Biostaten beträgt konstant 7,2.

Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Kulturmedium beeinflusst das Wachstum und den Stoffwechsel von rekombinanten Säugerzellen [31, 145, 146, 147]. Eigene Untersuchungen der Gelöstsauerstoffkonzentrationen bei 40%, 20% und 10% zeigen, daß die optimale Gelöstsauerstoffkonzentration bei Kultivierungen im Biostat M in Bezug auf das Wachstum dieser Zelllinie 10% beträgt. Bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 40% sind die maximalen Zelldichten um 50% geringer als bei 10% (Daten nicht gezeigt), was auf Sauerstoffstreß durch freie Sauerstoffradikale zurückzuführen ist [145, 146].

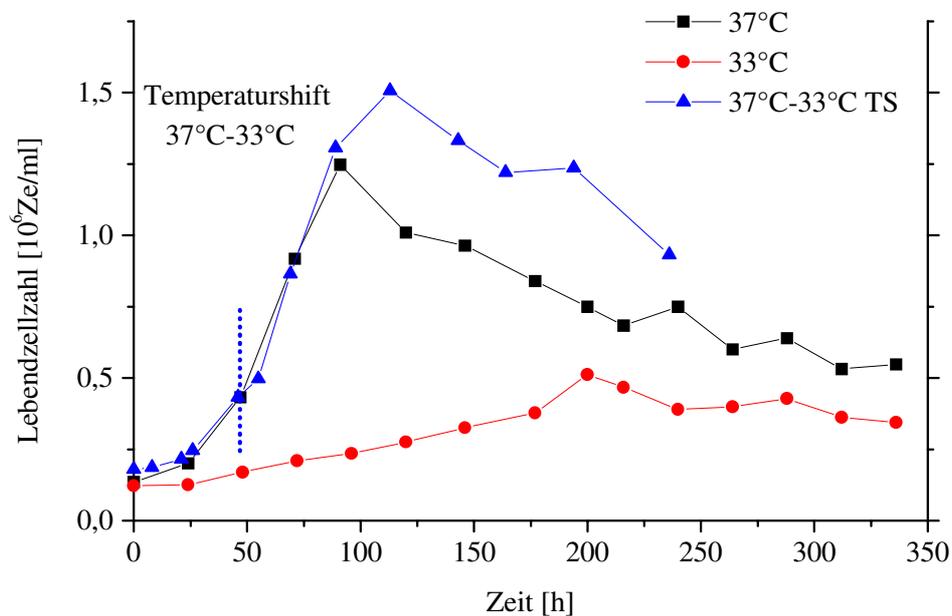
Untersucht werden die Temperaturen 37°C und 33°C, sowie ein Temperaturshift von 37°C auf 33°C (Kultivierung TS). Der Temperaturshift erfolgt in der 44. Stunde, was als optimaler Zeitpunkt aus den Spinnerflaschen-Versuchen hervorgeht. Alle gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei Kultivierungen.



**Abb. 4.48:** Die Lebendzellzahlen der Kultivierungen bei 33°C und 37°C in Spinnerflaschen und im Biostat M als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

In Abb. 4.48 sind die Lebendzellzahlen der Kultivierungen bei 33°C und 37°C in Spinnerflaschen und im Biostat M als Funktion der Zeit dargestellt. Das Wachstumsverhalten der CHO-Zellen und die erreichten maximalen Lebendzellzahlen bei Kultivierungen im Biostat M unterscheiden sich von den Ergebnissen in Spinnerflaschen. Im Biostat M ist die maximale Lebendzellzahl bei 37°C mit  $1,25 \cdot 10^6$  Ze/ml 20% niedriger als in Spinnerflaschen bei gleicher Temperatur. Außerdem wird im Biostat M die maximale Zelldichte 70 Stunden früher als in den Spinnerflaschen erreicht. Gravierender sind die Unterschiede bei den 33°C Kultivierungen. Die Zellen können im Biostat M die Adaptionsphase nicht verlassen; ein exponentielles Wachstum findet bei einer Wachstumsrate von  $0,09 \text{ d}^{-1}$  nicht statt. Die maximale Lebendzellzahl wird 60 Stunden früher als in Spinnerflaschen erreicht. Sie ist mit  $0,51 \cdot 10^6$  Ze/ml 194% niedriger als in Spinnerflaschen. Zellen, die sich in der lag-Phase befinden, werden durch im Reaktor auftretende Scherkräfte stärker belastet als exponentiell

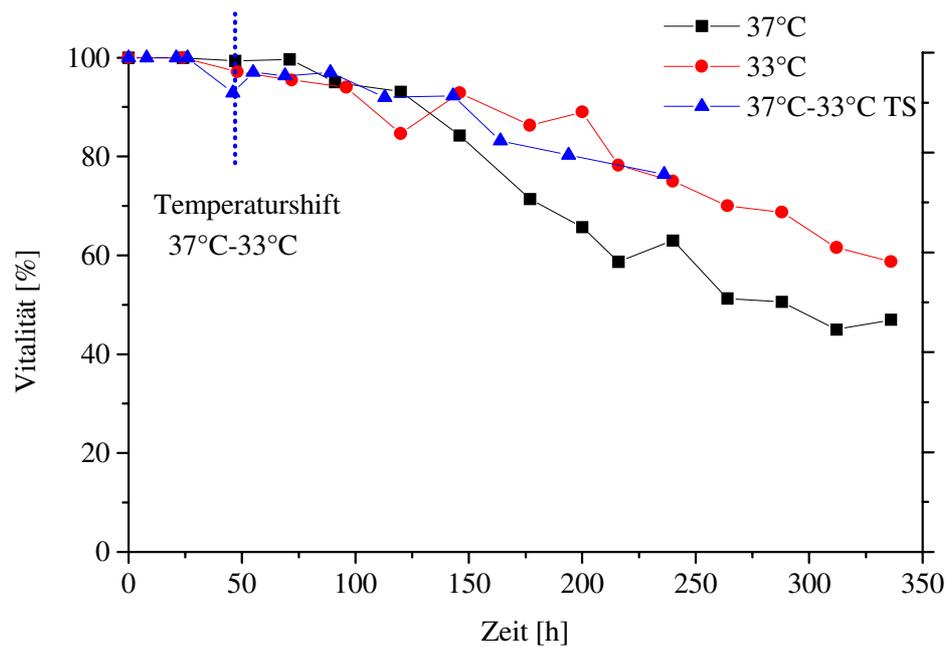
wachsende Zellen [148]. Dieses könnte ein Grund für das stark reduzierte Zellwachstum im Biostaten bei 33°C sein. Der Einfluß der Temperatur auf die Scherstreß-Sensibilität von adhärennten BHK 21-Zellen wurde von Kretzmer et al. gezeigt [149].



**Abb. 4.49:** Die Lebendzellzahlen der Kultivierungen bei 33°C und 37°C sowie der Kultivierung TS als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die gepunktete Linie symbolisiert den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

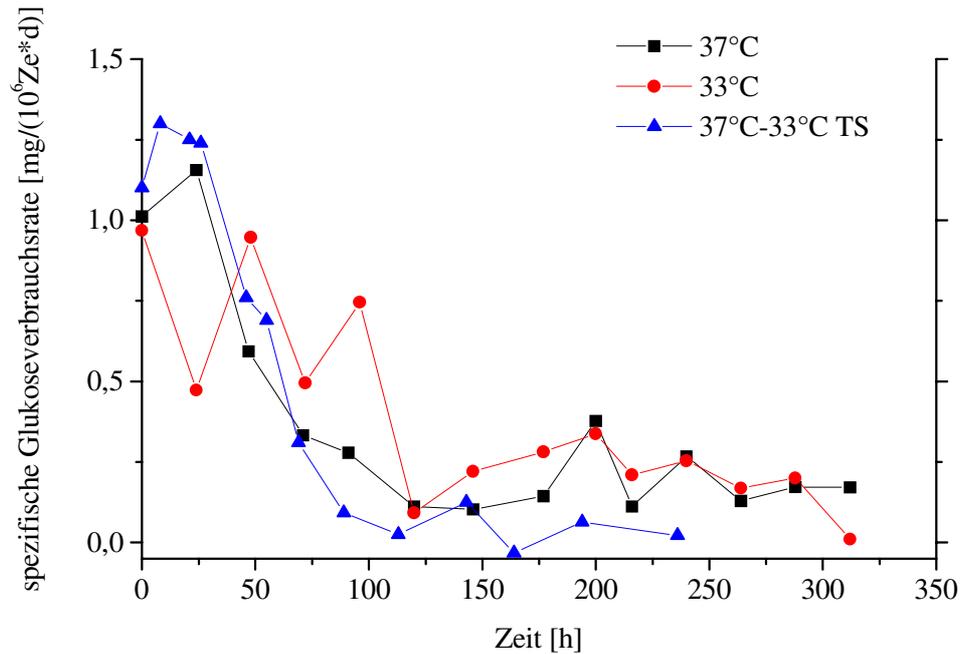
In Abb. 4.49 sind die Lebendzellzahlen der Kultivierungen bei 33°C und 37°C sowie der Kultivierung TS als Funktion der Zeit dargestellt. Während die Zellen bei Kultivierungen in Spinnerflaschen einen Tag nach dem Temperaturshift in eine stationäre Wachstumsphase übergehen, bleiben sie bei der Kultivierung TS in der exponentiellen Wachstumsphase (mittlere Wachstumsrate 0,49 d<sup>-1</sup>). Die maximale Lebendzellzahl (113. Stunde) beträgt 1,5\*10<sup>6</sup>Ze/ml, was gegenüber der Kultivierung bei 37°C eine Steigerung um 20% bedeutet.

Die Vitalität (Abb. 4.50) bleibt durch den Temperaturshift in der 44. Stunde länger als bei der 37°C Kultivierung auf einem hohen Niveau. Der Vitalitätsverlauf von Kultivierung TS entspricht dem bei 33°C. Ein kurzzeitiger Vitalitätsverlust nach der Temperaturabsenkung wie in den Spinnerflaschen-Versuchen findet nicht statt.



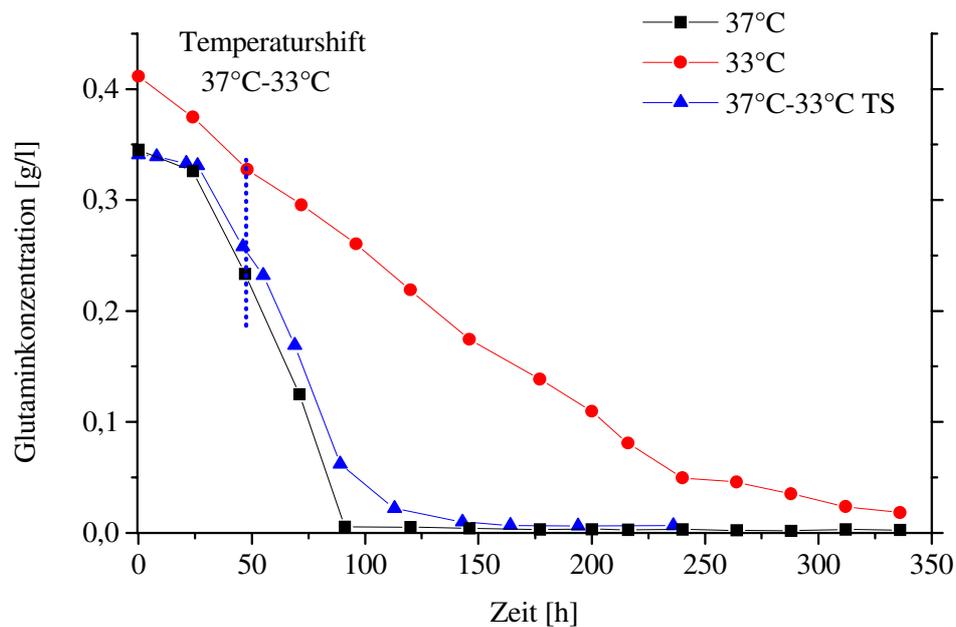
**Abb. 4.50:** Die Vitalitäten der Kultivierungen bei 33°C und 37°C sowie der Kultivierung TS als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die gepunktete Linie symbolisiert den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

Die spezifischen Glukoseverbrauchsrate der Kultivierungen bei 33°C und 37°C, sowie von Kultivierung TS sind als Funktion der Zeit in Abb. 4.51 dargestellt. Die mittleren spezifischen Glukoseverbrauchsrate betragen nach der 44. Stunde 0,38 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 33°C und 0,23 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 37°C und bei der Kultivierung TS. Der hohe Glukoseverbrauch bei 33°C ist darauf zurückzuführen, daß die Zellen nicht in die exponentielle Wachstumsphase übergehen. Die niedrige mittlere spezifische Glukoseverbrauchsrate von Kultivierung TS zeigt, daß der Glukoseverbrauch neben der Temperatur auch von der Vorgeschichte der Zellen abhängig ist. Daß die Glukoseverbrauchsrate unabhängig von der Temperatur bei den Kultivierungen im Biostaten höher sind als bei denen in Spinnerflaschen, kann unter anderem auf die konstante Gelöstsauerstoffkonzentration von 10% zurückgeführt werden. Die Glukoseverbrauchsrate der Zellen steigt mit der Sauerstoffkonzentration im Medium [146]. In Spinnerflaschen sinkt die Gelöstsauerstoffkonzentration je nach Temperatur innerhalb von vier (37°C) bzw. sieben Tagen (33°C) auf 0% (Daten nicht gezeigt).

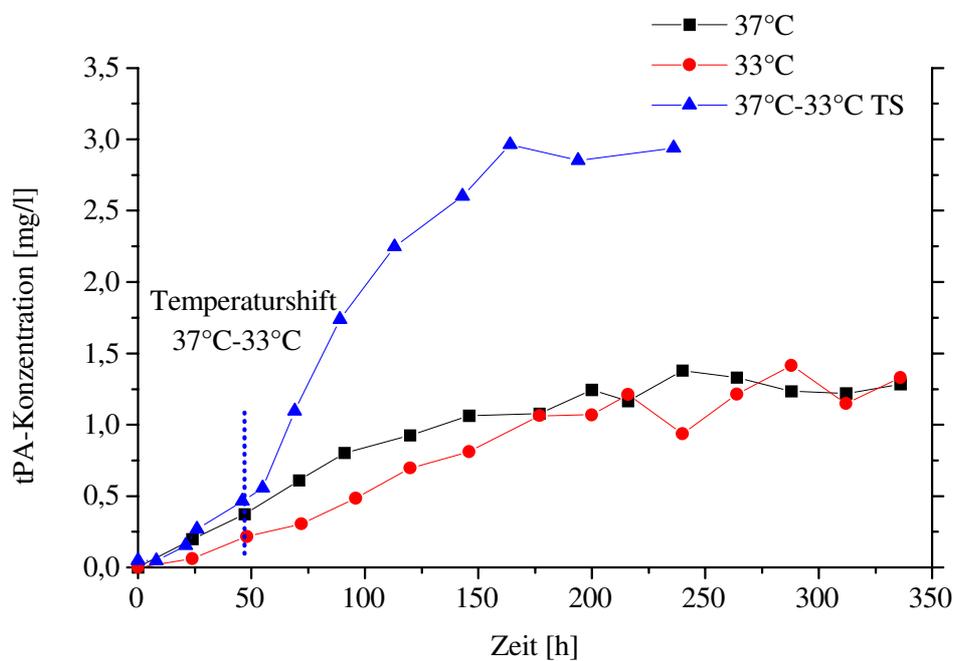


**Abb. 4.51:** Die spezifischen Glukoseverbrauchsrate der Kultivierungen bei 33°C und 37°C, sowie bei Kultivierung TS als Funktion der Zeit.  
Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Glukosekonzentrationen wurden mit dem YSI 2700 enzymatisch bestimmt.

Die Glutaminskonzentrationen bei 37°C , 33°C und bei Kultivierung TS ist als Funktion der Zeit in Abb. 4.52 dargestellt. Die maximale Lebendzellzahl wird bei allen Kultivierungen zu einem Zeitpunkt erreicht, an dem die Glutaminskonzentration im Medium 0 g/l beträgt. Die mittleren spezifischen Glutaminverbrauchsrate der 33°C und der 37°C Kultivierungen entsprechen mit 0,12 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (33°C) und 0,14 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (37°C) den Verbrauchsrate bei Kultivierungen in Spinnerflaschen. Die Sauerstoffkonzentration im Medium hat keinen Einfluß auf den Glutaminstoffwechsel der Zellen. Die mittlere spezifische Glutaminverbrauchsrate der Kultivierung TS beträgt 0,12 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) und entspricht damit der Verbrauchsrate bei 33°C. Die unterschiedlichen Glutaminanfängskonzentrationen bei 33°C und 37°C sind auf die Sterilitätskontrolle des Reaktors durch Inkubieren des Mediums zurückzuführen, da sich das Glutamin während der Sterilitätskontrolle zersetzt.

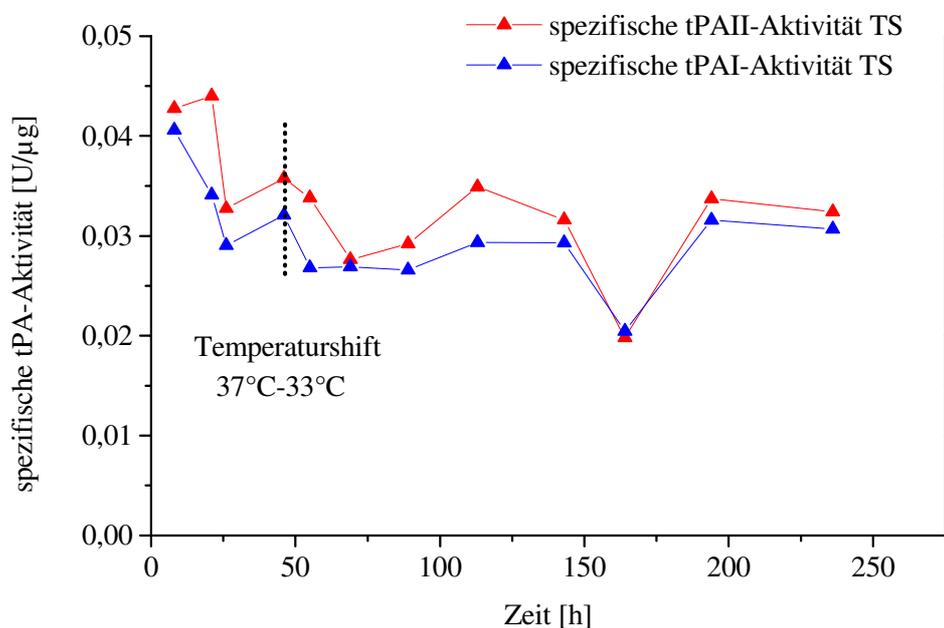


**Abb. 4.52:** Die Glutaminkonzentrationen bei 37°C und 33°C sowie bei Kultivierung TS als Funktion der Zeit. Die Glutaminkonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt. Die gepunktete Linie symbolisiert den Zeitpunkt des Temperaturshifts.



**Abb. 4.53:** Die tPA-Konzentrationen der Kultivierungen bei 33°C und 37°C sowie bei Kultivierung TS als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die gepunktete Linie symbolisiert den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

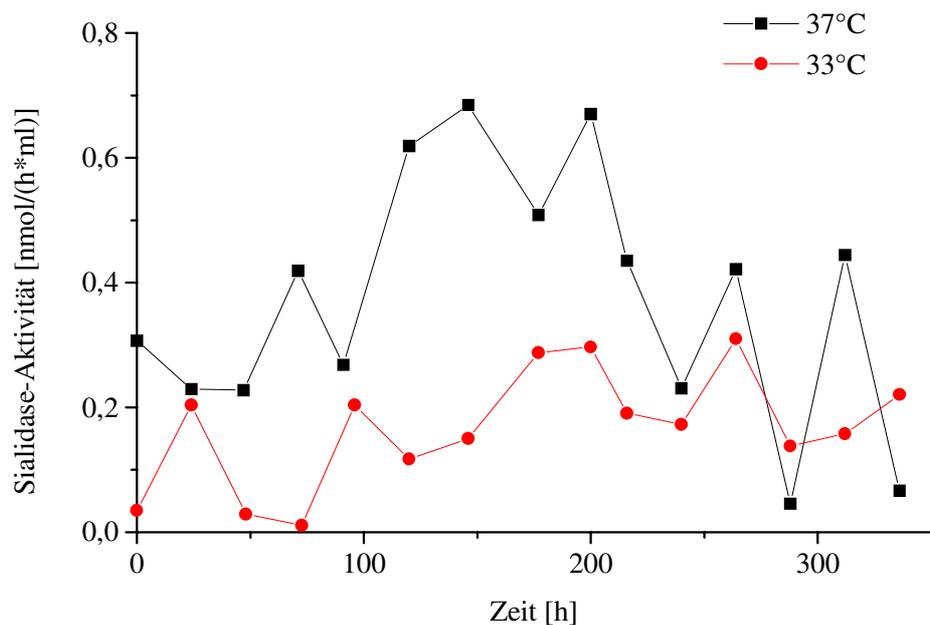
Die tPA-Konzentrationen der Kultivierungen bei 33°C, 37°C und bei Kultivierung TS sind als Funktion der Zeit in Abb. 4.53 dargestellt. Sowohl bei 33°C als auch bei 37°C beträgt die maximale tPA-Konzentration 1,4 mg/l. Die mittleren spezifischen Produktbildungsraten betragen  $0,25 \mu\text{g}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$  für 37°C und  $0,46 \mu\text{g}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$  für 33°C. Bei einer Prozeßoptimierung mittels Temperaturshift wird eine maximale tPA-Konzentration von 2,97 mg/l erreicht, was einer Steigerung von 112% gegenüber den Kultivierungen ohne Temperaturshift entspricht. Die mittlere spezifische Produktivität wird mit  $0,65 \mu\text{g}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$  um 41% in Bezug auf die 33°C Kultivierung gesteigert und sogar um 160% gegenüber der 37°C Kultivierung.



**Abb. 4.53a:** Spezifische tPAI- und tPAII-Aktivitäten der Kultivierung TS als Funktion der Zeit. Die tPA-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Die verschiedenen tPA-Aktivitäten wurden photometrisch ermittelt. Die gepunktete Linie symbolisiert den Zeitpunkt des Temperaturshifts.

In Abb. 4.53a sind die spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivitäten der Kultivierung TS als Funktion der Zeit dargestellt. Die Produktqualität von tPA wird durch den Temperaturshift in der 44. Stunde nicht beeinflusst. Die mittlere spezifische tPAII-Aktivität beträgt  $0,033 \text{ U}/\mu\text{g}$  und ist damit nur geringfügig niedriger als die Aktivität von  $0,035 \text{ U}/\mu\text{g}$  des Standards. Da kaum ein Unterschied zwischen der spezifischen tPAI- und tPAII-Aktivität besteht, liegt tPA hauptsächlich in der zweikettigen Form vor. Auch bei 37°C liegt das tPA zum größten Teil in der zweikettigen Form vor. Die mittlere spezifische tPAII-Aktivität bei 37°C entspricht mit  $0,034 \text{ U}/\mu\text{g}$  dem Standard. Das Produkt der 33°C Kultivierung hat mit  $0,025 \text{ U}/\mu\text{g}$  die

niedrigste spezifische tPAII-Aktivität. Die eingeschränkte tPA-Qualität kann nicht auf extrazelluläre Degradationen durch Sialidasen zurückgeführt werden, da die enzymatische Aktivität bei 33°C niedriger als bei 37°C ist, wo eine hohe Produktqualität erreicht wird (Abb. 4.54). Die Ursache für die verminderte Produktaktivität muß daher im intrazellulären Bereich gesucht werden. Ein Einfluß des Scherstresses auf die posttranslationalen Modifikationen des Glykoproteins ist nicht auszuschließen.



**Abb. 4.54:** Die extrazellulären Sialidase-Aktivitäten bei 33°C und 37°C als Funktion der Zeit. Die Sialidase-Aktivitäten wurden fluorimetrisch mit dem Substrat MUF-NeuNAc bestimmt. Die Aktivitätseinheiten entsprechen relativen Einheiten der Standardkurve, die mit 4-Metylbulliferon erhalten wurde.

Die Raum-Zeit-Ausbeuten betragen für 33°C 0,12 mg/(l\*d) und für 37°C 0,14 mg/(l\*d). Durch den Temperaturshift bei der Kultivierung TS kann die Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber der 37°C Kultivierung um 207% auf 0,43 mg/(l\*d) gesteigert werden.

In Tab. 4.4 sind die charakteristischen Daten der Kultivierungen in Biostaten aufgeführt.

**Tab. 4.4:** Raum-Zeit-Ausbeute, maximale tPA-Konzentration, mittlere tPA-Produktivität, mittlere tPAII-Aktivität und mittlere Glukoseverbrauchsrate in Abhängigkeit von der Temperatur.

Temperatur [°C]	max. Lebend- zellzahl [10 <sup>6</sup> Ze/ml]	Y <sub>(Raum/Zeit)</sub> [mg/(l*d)]	mittlere spezif. tPAII-Aktivität [U/μg]	max. tPA- Konzentration [mg/l]	mittlere tPA- Produktivität [μg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]
33	0,51	0,12	0,025	1,4	0,46
37	1,25	0,14	0,034	1,4	0,25
37-33	1,5	0,43	0,033	2,97	0,65

Die Ergebnisse der Untersuchungen in Spinnerflaschen können nicht ohne weiteres bei einem "scale-up" auf den 2 l-Maßstab übernommen werden. Der erhöhte Scherstreß und die konstante Gelöstsauerstoffkonzentration von 10% führen zu einem veränderten Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten der TF 70 R-Zelllinie. Die Glukoseverbrauchsraten sind bei Biostatenkultivierungen grundsätzlich höher als in Spinnerflaschenkultivierungen. Eine mögliche Ursache ist die konstante Gelöstsauerstoffkonzentration von 10%. Im welchem Ausmaß die Zellen durch den Scherstreß geschädigt werden, hängt von der Wachstumsphase und der Vorgeschichte der Zellen ab. Der Scherstreß wirkt sich besonders stark bei der 33°C Kultivierung aus. Da kein exponentielles Wachstum stattfindet, werden nur geringe Zelldichten erreicht. Die Produktivität der Zellen ist bei 33°C 86% höher als bei 37°C, allerdings ist die Produktaktivität eingeschränkt. Die Zellen wachsen auch bei 33°C exponentiell, wenn die Kultivierung bei 37°C gestartet wird und im ersten Drittel der exponentiellen Phase die Temperatur gesenkt wird. Die maximale Lebendzellzahl kann durch einen Temperaturshift auf 1,5\*10<sup>6</sup>Ze/ml gesteigert werden. Die maximale tPA-Konzentration beträgt 2,97 mg/l, was einer Steigerung von 114% entspricht. Die Produktaktivität wird durch einen Temperaturshift nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Prozeßoptimierung mittels Temperaturshift von 37°C auf 33°C auch bei einem "scale-up" bei dieser Zelllinie möglich ist.

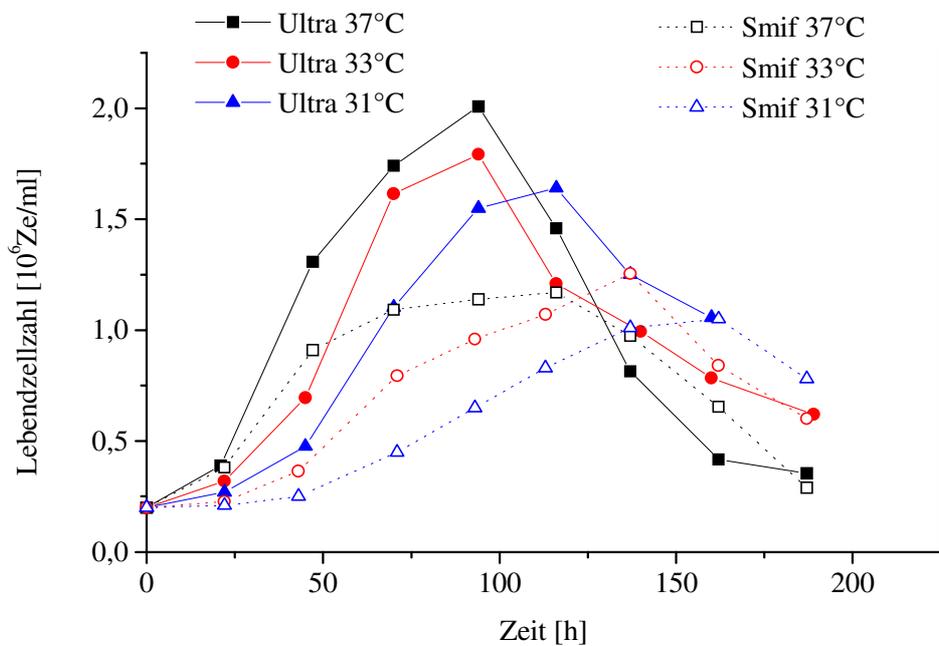
## 4.2 Einfluß der Temperatur auf Kultivierungen der rekombinanten CHO-Suspensionszelllinien SSO-A2 und SSO-A2PF

Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstumsverhalten, die Stoffwechselaktivität und die Produktivität der rekombinanten CHO-Suspensionszelllinien SSO-A2 und SSO-A2PF wird im Batchbetrieb untersucht. Als kontinuierliches Rührkesselsystem werden Techno-Spinnerflaschen eingesetzt. Die SSO-A2PF-Zelllinie ist ein Klon der SSO-A2-Zelllinie, der an proteinfreies Medium adaptiert ist. Beide Zelllinien exprimieren das Glykoprotein AT III. Da die gentechnischen Konstruktionen der rekombinanten Suspensionszelllinien SSO-A2 und SSO-A2PF identisch sind, kann mit Hilfe dieser Zelllinien untersucht werden, ob der Temperatureinfluß abhängig vom Proteingehalt des Mediums ist. Die in Standardmedien enthaltenen Proteine besitzen Transport-, Stabilisierungs- und Schutzfunktionen, die für das Wachstum und Überleben der Zellen notwendig sind. So bindet Transferrin als Ferrotransferrin  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen und ermöglicht den Eisentransport in die Zelle. Albumin transportiert steroidale Hormone und Fettsäuren und schützt die Zellen vor Scherstreß und Endotoxinen. Insulin stimuliert die Glukoseaufnahme, die Fettsäuresynthese und den Kohlenhydratstoffwechsel. Aprotinin und Sojabohnenproteine schützen vor Proteasen. In proteinfreien Medien werden die Proteine durch definierte Substanzgemische ersetzt. Als Beispiel sei der Austausch von Transferrin durch Eisencitrat oder Eisensulfat genannt [58, 150-152]. Der Vorteil von proteinfreiem Medium liegt in der vereinfachten Aufreinigung des Produktes und in der Reduzierung der Gefahr viraler Infektionen.

Die Bezeichnungen der Kultivierungen mit den Zelllinien SSO-A2 und SSO-A2PF setzen sich aus der Kultivierungstemperatur und dem Mediumnamen zusammen, wobei Ultra für das proteinreiche Medium und Smif für das proteinfreie Medium steht.

In Abb. 4.54a sind die Lebendzellzahlen der Ultra und Smif Kultivierungen bei 31°C, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit dargestellt. Bei den Ultra Kultivierungen beginnen die Zellen sowohl bei 37°C als auch bei 33°C sofort mit dem exponentiellen Wachstum, das bis zur 94. Stunde anhält. Während die mittleren Wachstumsraten sich mit  $0,58 \text{ d}^{-1}$  (37°C) und  $0,55 \text{ d}^{-1}$  (33°C) nur geringfügig unterscheiden, beträgt der Unterschied bei den maximalen Wachstumsraten mit  $1,11 \text{ d}^{-1}$  (37°C) und  $0,81 \text{ d}^{-1}$  (33°C) 37%. Bedingt durch den ähnlichen Wachstumsverlauf erreichen beide Kultivierungen ihre maximalen Lebendzellichten mit  $2,0 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  (37°C) und  $1,79 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$  in der 94. Stunde. Danach beginnt bei beiden Kultivierungstemperaturen die Absterbephase. Erst bei einer weiteren Temperaturabsenkung

auf 31°C ändert sich das Wachstumsverhalten deutlicher. Erstmalig benötigen die Zellen eine Adaptionphase, die bis zur 22. Stunde anhält. Danach verläuft das Wachstum wie bei den höheren Temperaturen, nur um den Zeitraum der Adaptionphase verschoben.



**Abb. 4.54a:** Die Lebendzellzahlen der Kultivierungen Ultra und Smif bei 31°C, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit.  
Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Bei den Kultivierungen mit proteinfreiem Medium macht sich die Temperaturabsenkung stärker bemerkbar. Bei der Kultivierung Smif 37°C beginnen die Zellen sofort mit dem exponentiellen Wachstum, das bis zur 71. Stunde anhält. Danach findet bis zur 113. Stunde nur noch geringes Zellwachstum statt. Die mittlere Wachstumsrate beträgt  $0,44 \text{ d}^{-1}$ , die maximale hingegen  $0,99 \text{ d}^{-1}$ . Schon bei 33°C tritt bei den Smif Kultivierungen eine Adaptionphase von einem Tag auf, die bei einer weiteren Temperaturabsenkung auf 31°C bis zur 43. Stunde andauert. Die mittleren Wachstumsraten fallen auf  $0,31 \text{ d}^{-1}$  (33°C) und  $0,24 \text{ d}^{-1}$  (31°C). Die maximale Lebendzellzahl beträgt bei allen Kultivierungen unabhängig von der Temperatur  $1,22 \pm 0,03 \cdot 10^6 \text{ Ze/ml}$ .

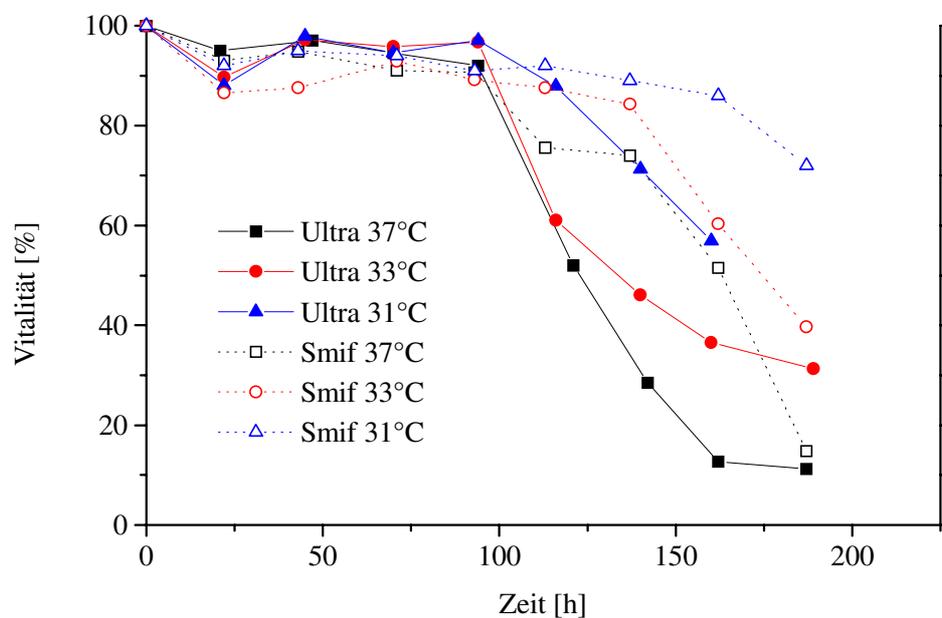
Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstumsverhalten der Ultra und der Smif Kultivierungen ist unterschiedlich. Während die mittleren Wachstumsraten der Ultra

Kultivierungen bei einer Temperaturabsenkung von 37°C auf 31°C um lediglich 32% abfallen, sinken die mittleren Wachstumsraten bei den Smif Kultivierungen im selben Temperaturbereich um 83%.

In Tab. 4.5 sind die Wachstumsparameter der Ultra und der Smif Kultivierungen in Abhängigkeit von der Temperatur aufgeführt.

**Tab. 4.5:** Wachstumsparameter der Ultra und der Smif Kultivierungen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Kultivierung	max. Lebendzellzahl [10 <sup>6</sup> Ze/ml]	max. Wachstumsdauer [h]	$\mu_{\max}$ [d <sup>-1</sup> ]	Zeitpunkt von $\mu_{\max}$ [h]	$\mu_{\text{mittel}}$ [d <sup>-1</sup> ]
Ultra 37°C	2,0	94	1,11	47	0,58
Ultra 33°C	1,79	94	0,81	47	0,55
Ultra 31°C	1,64	116	0,81	70	0,44
Smif 37°C	1,17	113	0,99	47	0,44
Smif 33°C	1,25	137	0,66	71	0,31
Smif 31°C	1,22	162	0,50	71	0,24

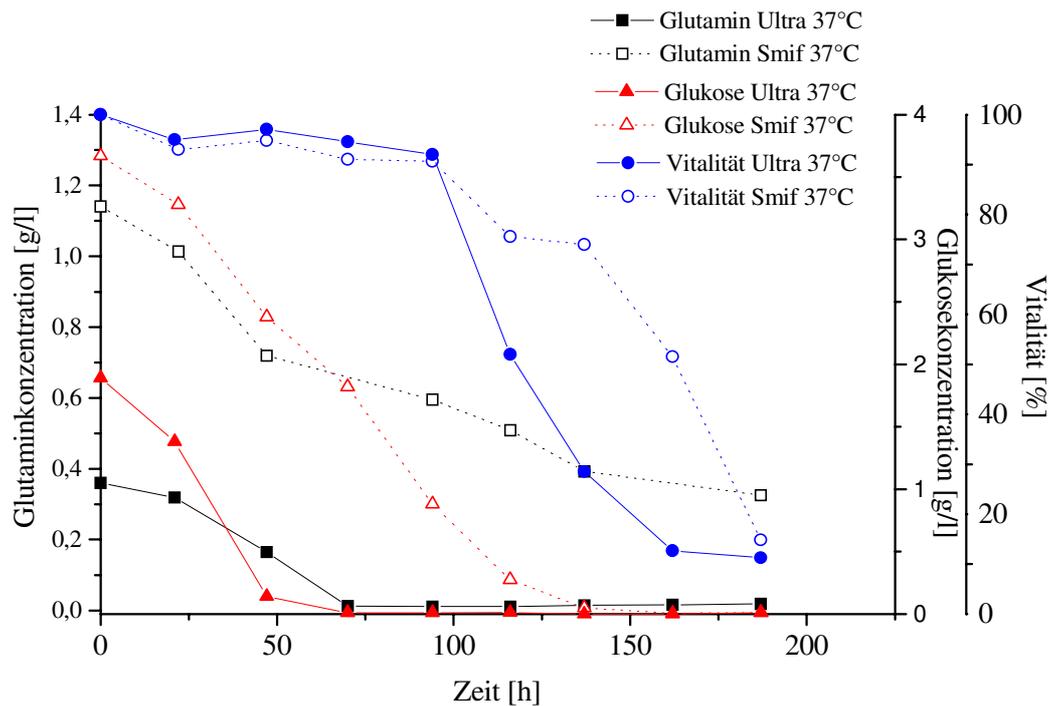


**Abb. 4.55:** Die Vitalitäten der Ultra und der Smif Kultivierungen bei 31°C, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit.

Die Lebendzellzahlen und die Totzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Bei beiden Zelllinien bewirkt eine Reduzierung der Kultivierungstemperatur, daß die Vitalität der Zellen über einen längeren Zeitraum auf einem hohen Niveau bleibt (Abb. 4.55). Bei den

Ultra Kultivierungen hat eine Temperaturabsenkung auf 33°C keinen Einfluß auf den Vitalitätsverlauf. Erst bei 31°C kann der Beginn der Absterbephase um einen Tag verzögert und die Absterbegeschwindigkeit reduziert werden. Im Unterschied hierzu wird der Beginn der Absterbephase bei den Smif Kultivierungen schon bei 33°C um einen Tag und bei 31°C um zwei Tage gegenüber der 37°C Kultivierung hinausgezögert.

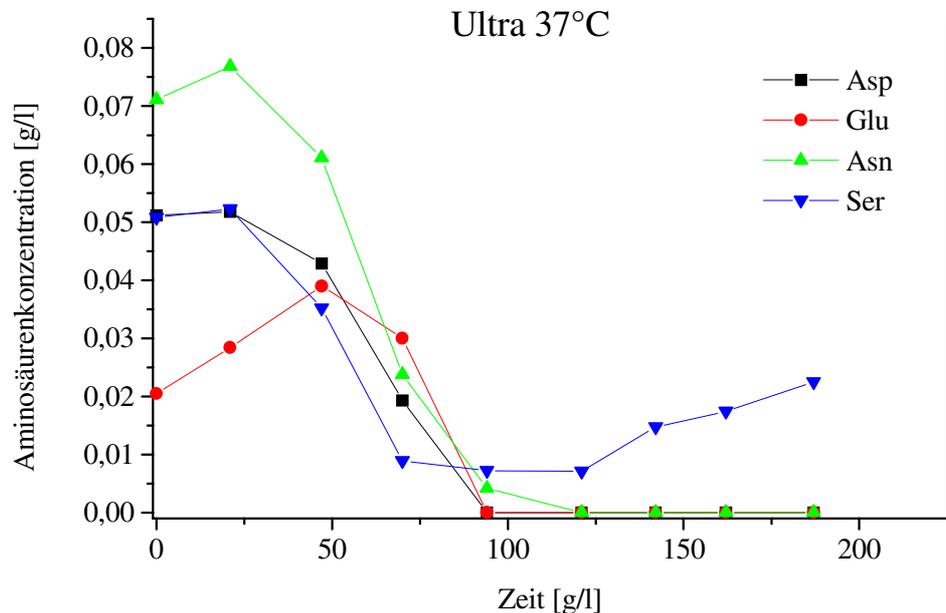


**Abb. 4.56:** Die Vitalitäten, Glukose- und Glutaminkonzentrationen der Ultra und der Smif Kultivierungen bei 37°C als Funktion der Zeit.

Die Lebendzellzahlen und die Totzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Glutaminkonzentration wurde mittels HPLC bestimmt. Die Glukosekonzentration wurde enzymatisch mit dem YSI 2700 ermittelt.

Bei der Ultra 37°C Kultivierung sind schon in der 70. Stunde Glutamin und Glukose vollständig verstoffwechselt (Abb. 4.56). Die Absterbephase beginnt in der 100. Stunde, wenn auch Asparagin, Aspartat, Glutamat und Serin im Medium aufgebraucht sind (Abb. 4.57). Die Anfangskonzentrationen von Glutamin, Glukose, Asparagin und Glutamat sind in dem proteinfreien Medium um einen Faktor von 2 bis 3 höher als in dem Ultra-Medium. Bei den Smif Kultivierungen sind zu Beginn der Absterbephase in der 137. Stunde noch alle Aminosäuren in ausreichender Konzentration vorhanden, so daß eine Aminosäurenlimitierung ausgeschlossen wird (Abb. 4.56 und Abb. 4.57). Das Absterben der Kultur wird durch die

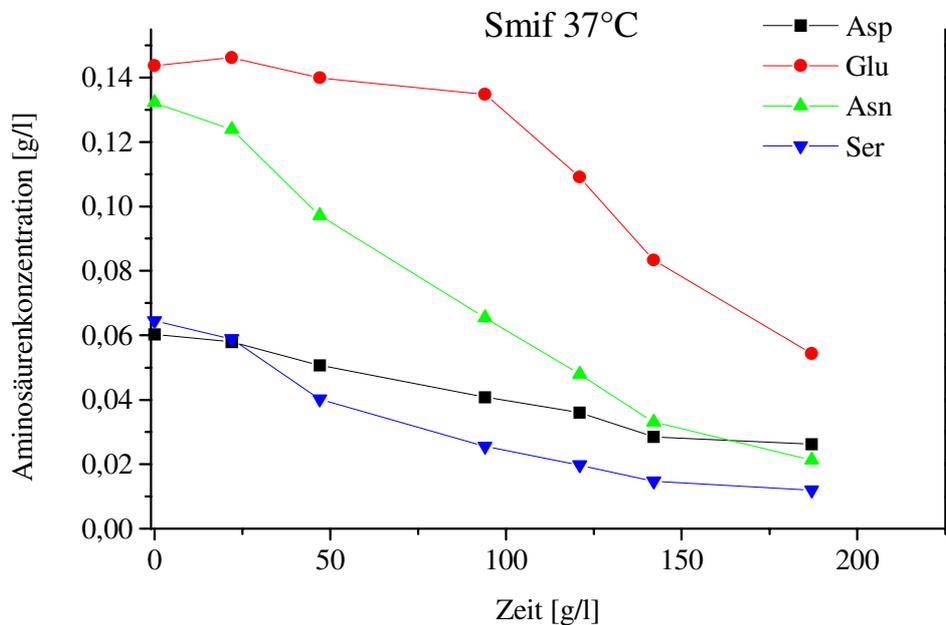
vollständige Verstoffwechselung der Glukose und die hohe Laktatkonzentration von 2,87 g/l hervorgerufen.



**Abb. 4.57:** Die Konzentrationen der Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Asparagin und Serin der Ultra Kultivierung bei 37°C als Funktion der Zeit. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

Die hohe Glutaminanfängskonzentration im Smif-Medium führt dazu, daß die Zellen zu Beginn der Kultivierungen verstärkt Glutamin aufnehmen und verstoffwechseln. So ist die maximale spezifische Glutaminverbrauchsrate bei der Smif 37°C Kultivierung mit 0,52 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) um 211% größer als bei der vergleichbaren Ultra 37°C Kultivierung. Die mittleren spezifischen Glutaminverbrauchsraten betragen bei 37°C 0,22 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (Smif) und 0,1 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (Ultra). Bei den Ultra Kultivierungen hat die Temperatur keinen Einfluß auf den Glutaminstoffwechsel, was die mittleren spezifischen Glutaminverbrauchs-raten von 0,096 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 33°C und 0,11 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 31°C zeigen. Auch bei den Smif Kultivierungen unterscheiden sich die mittleren spezifischen Glutaminverbrauchs-raten mit 0,23 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 33°C und 0,25 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 31°C nur unwesentlich. Der geringfügige Anstieg der mittleren Verbrauchs-raten bei einer Temperaturreduzierung ist durch die verlängerte Adaptionphase der Zellen zu erklären. Das im Glutaminstoffwechsel gebildete Ammonium akkumuliert bei den Smif Kultivierungen unabhängig von der Temperatur bis zu Konzentrationen von 0,15 g/l. Bei den Ultra Kultivierungen beträgt die

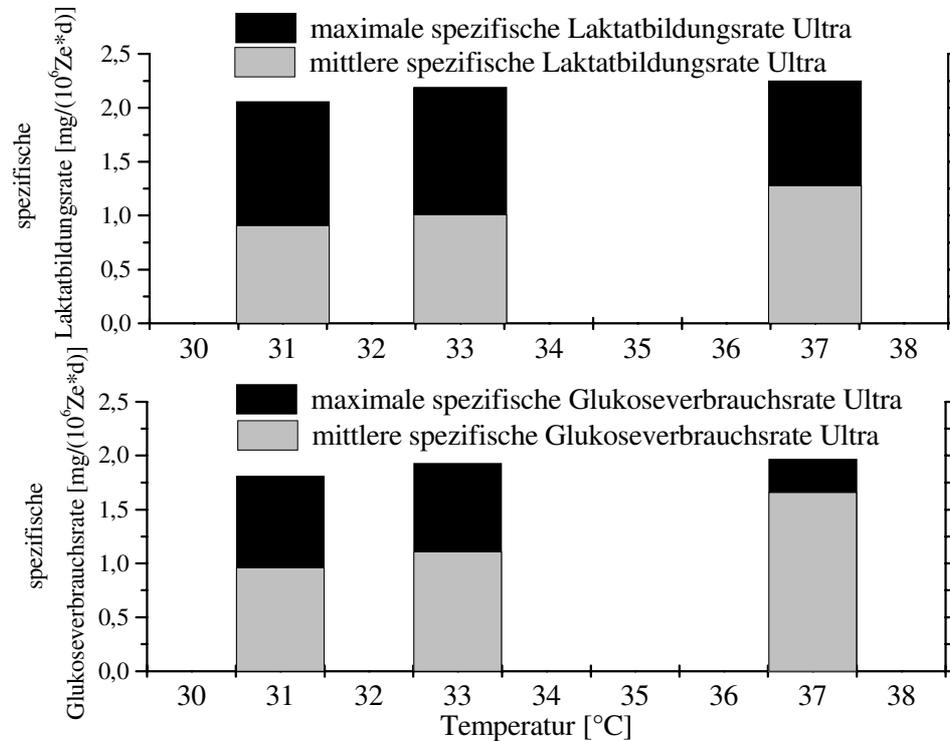
maximale erreichte Ammoniumkonzentration aufgrund der geringeren Glutaminanfängskonzentration mit 0,073 g/l nur die Hälfte.



**Abb. 4.58:** Die Konzentrationen der Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Asparagin und Serin der Smif Kultivierung bei 37°C als Funktion der Zeit. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

Im Gegensatz zu den spezifischen Glutaminverbrauchsdaten sind die spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsdaten der beiden Zelllinien temperaturabhängig (Abb. 4.59 und Abb. 4.60). Der Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die maximalen und die mittleren spezifischen Raten ist im untersuchten Temperaturbereich unterschiedlich. Während die maximalen Raten bei einer Temperaturreduzierung von 37°C auf 31°C nur um ca. 10% verringert werden, ist der Einfluß der Temperatur auf die mittleren spezifischen Raten erheblich größer (Tab. 4.6). Die mittleren spezifischen Glukoseverbrauchsdaten der Smif Kultivierungen bei 31°C betragen mit  $0,53 \text{ mg}/(10^6 \text{ Ze} \cdot \text{d})$  nur 57% des Glukoseverbrauchs bei 37°C. Bei den Ultra Kultivierungen ist der Unterschied mit 73% noch größer. Die mittleren spezifischen Laktatbildungsdaten werden durch die Temperaturabsenkung um 41% bei den Ultra Kultivierungen und 44% bei den Smif Kultivierungen reduziert. Die Temperaturreduzierung bewirkt, daß die Zellen die benötigte Energie verstärkt aus dem Citratzyklus gewinnen und nicht über die energetisch ungünstigere Laktatbildung. Die unterschiedlich hohen Beträge der spezifischen Verbrauchs- und Bildungsdaten sind auf die

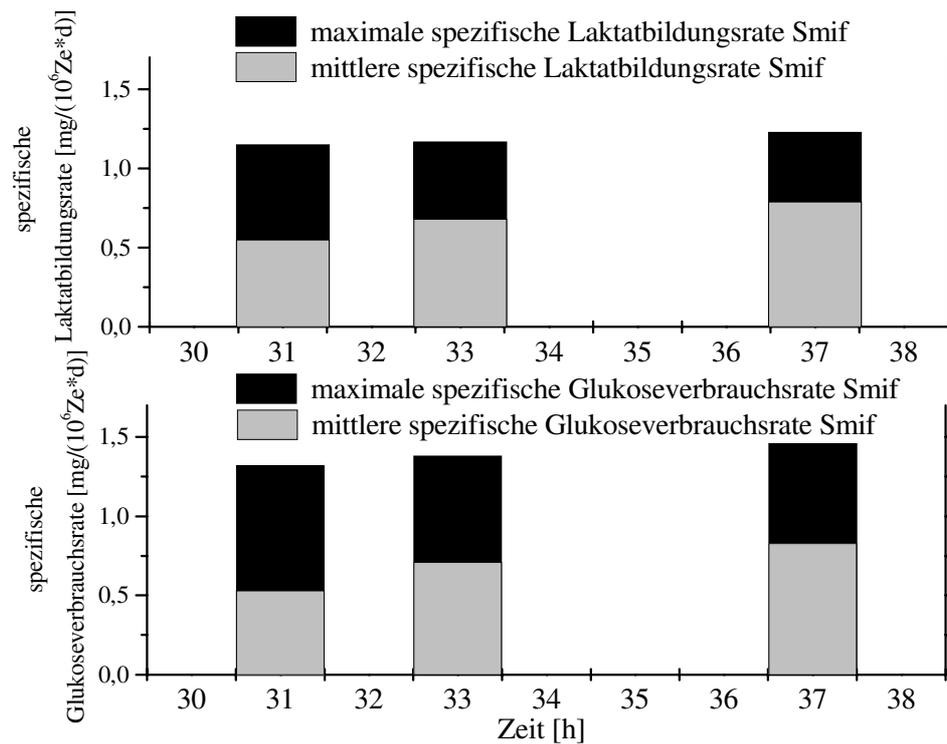
Medienzusammensetzungen zurückzuführen. Der Einfluß der Kultivierungstemperatur auf die Verstoffwechslung der Glukose und die Bildung des Laktates ist unabhängig vom Proteingehalt des Mediums.



**Abb. 4.59:** Die mittleren und maximalen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten der Ultra Kultivierungen als Funktion der Temperatur. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden enzymatisch mit dem YSI 2700 ermittelt.

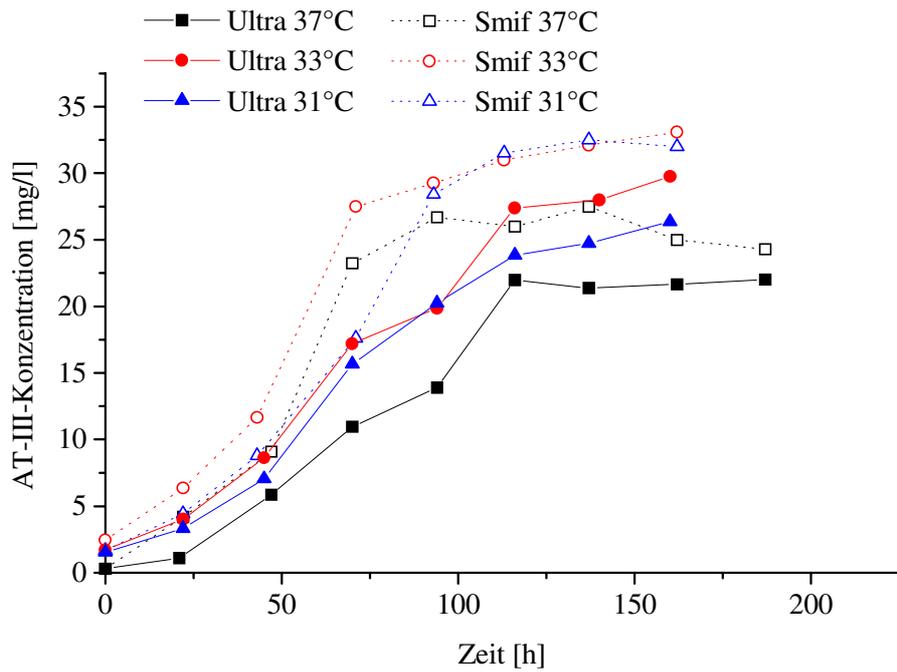
**Tab. 4.6:** Spezifische Verbrauchs- und Bildungsraten der Ultra und der Smif Kultivierungen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Kultivierung	max. spezif. Glukoseverbr. [ $\text{mg}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$ ]	mit. spezif. Glukoseverbr. [ $\text{mg}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$ ]	max. spezif. Laktatbild. [ $\text{mg}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$ ]	mit. spezif. Laktatbild. [ $\text{mg}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$ ]
Ultra 37 $^{\circ}\text{C}$	1,97	1,66	2,25	1,28
Ultra 33 $^{\circ}\text{C}$	1,93	1,11	2,19	1,01
Ultra 31 $^{\circ}\text{C}$	1,81	0,96	2,06	0,91
Smif 37 $^{\circ}\text{C}$	1,46	0,83	1,23	0,79
Smif 33 $^{\circ}\text{C}$	1,38	0,71	1,17	0,68
Smif 31 $^{\circ}\text{C}$	1,32	0,53	1,15	0,55

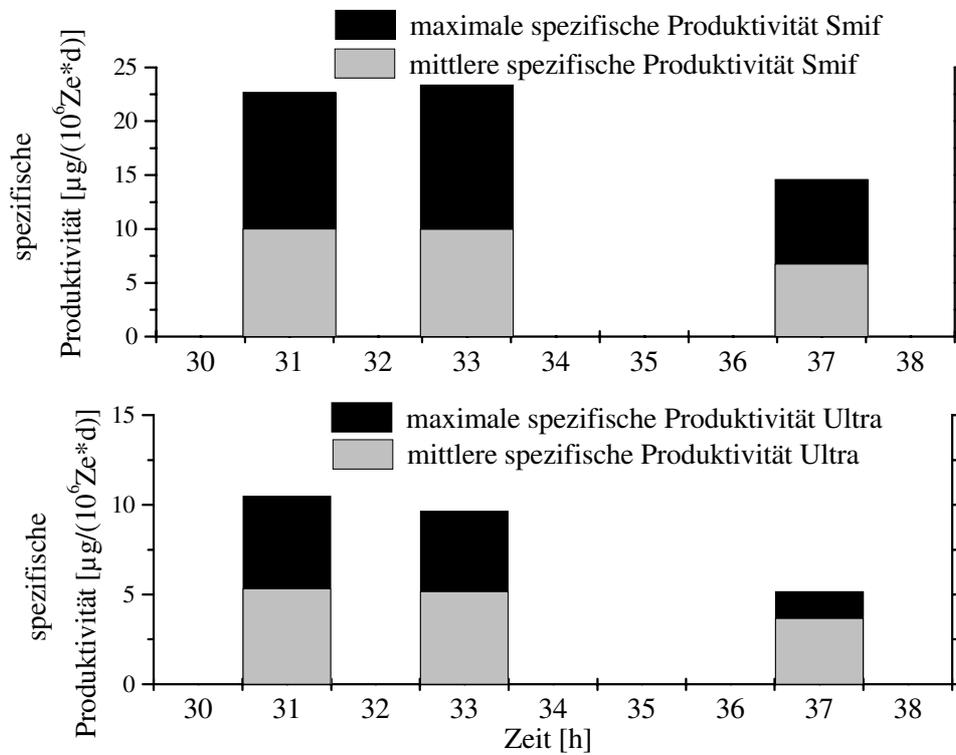


**Abb. 4.60:** Die mittleren und maximalen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten der Smif Kultivierungen als Funktion der Temperatur. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden enzymatisch mit dem YSI 2700 ermittelt.

In Abb. 4.61 sind die AT III-Konzentrationen der Ultra und Smif Kultivierungen als Funktion der Zeit dargestellt. Der Verlauf der AT III-Konzentrationen ist bei beiden Zelllinien mit dem Wachstumsverhalten der Zellen verknüpft. Ihre maximale Produktivität besitzen die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase. Je länger die exponentielle Wachstumsphase anhält, desto länger bleibt die Produktivität auf einem hohen Niveau. Sobald die maximale Zellzahl erreicht ist, sinkt die Produktivität der Zellen drastisch ab. In der Absterbephase der Zellen wird AT III durch Zellyse freigesetzt, wodurch die AT III-Konzentration nochmals geringfügig ansteigt. Eine Temperaturabsenkung von 37°C auf 33°C bzw. 31°C führt bei beiden Zelllinien zu einem Anstieg der spezifischen Produktivität (Abb. 4.62). Ein Produktivitätssprung findet zwischen 37°C und 33°C statt. Die mittlere spezifische Produktivität steigt bei den Ultra Kultivierungen in diesem Temperaturbereich um 40% an. Der Anstieg im proteinfreien Smif Medium beträgt sogar 47%. Eine weitere Temperaturabsenkung führt zu einer weiteren geringen Produktivitätssteigerung.



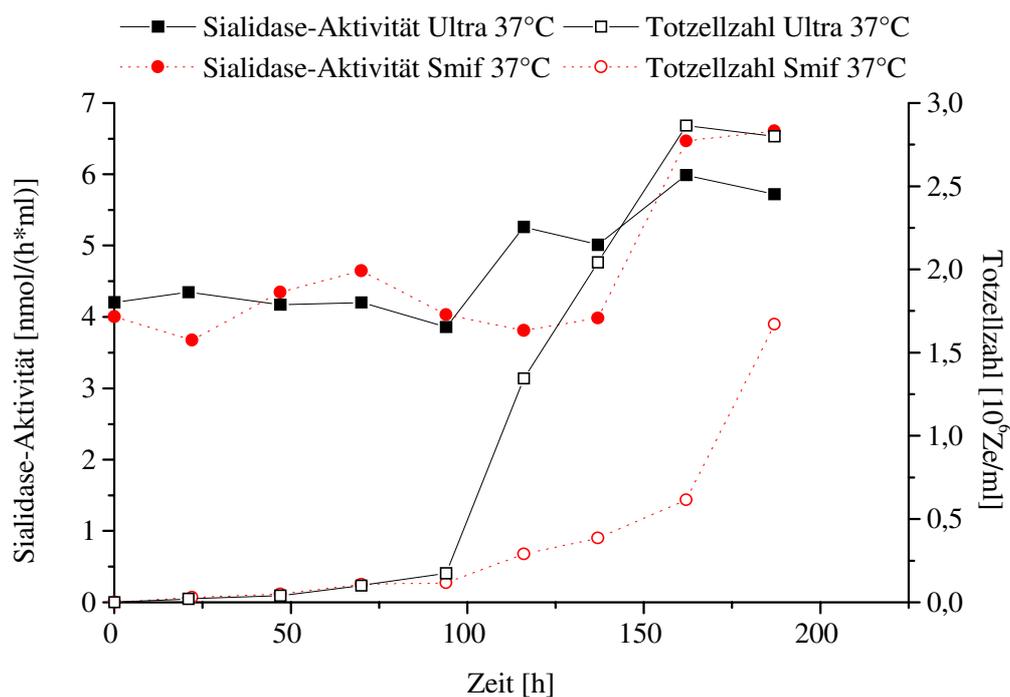
**Abb. 4.61:** Die AT-III-Konzentrationen der Ultra und Smif Kultivierungen als Funktion der Zeit. Die AT-III-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.



**Abb. 4.62:** Die spezifischen Produktivitäten der Smif und Ultra Kultivierungen als Funktion der Temperatur. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die AT III-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

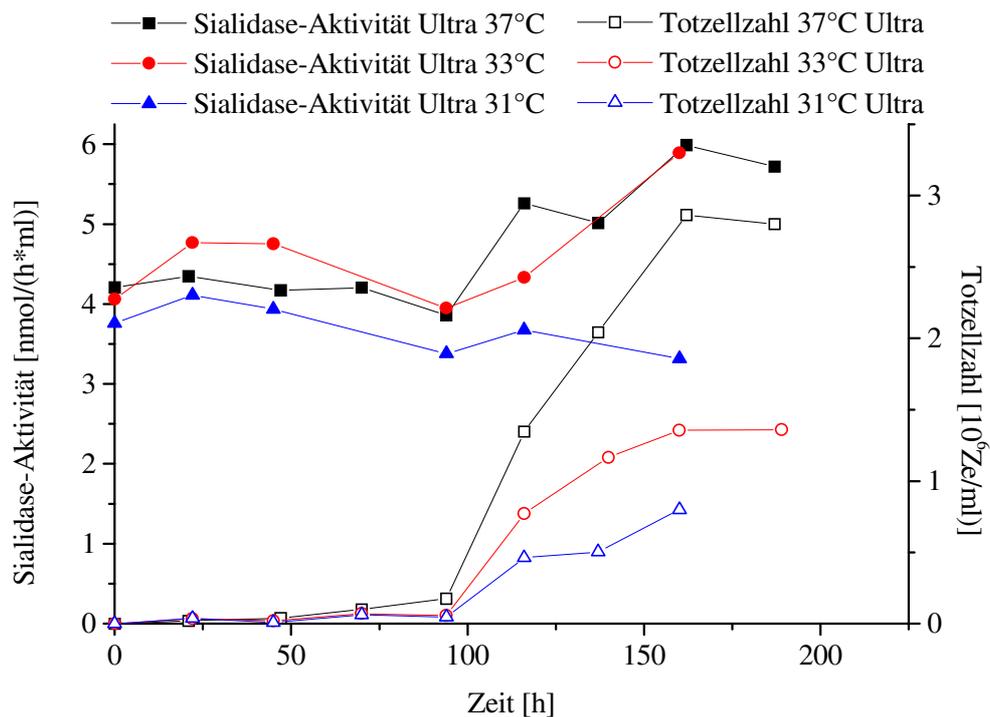
Die Produktivität der Zellen im proteinfreien Smif Medium ist 100% höher als im Ultra Medium. Eine mögliche Erklärung ist, daß im proteinfreien Medium die zur Verfügung stehenden Substrate weniger zum Zellwachstum und mehr für die Proteinbiosynthese genutzt werden.

Untersuchungen der spezifischen AT III-Aktivitäten bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen von Hünern [39] und Lübben [38] zeigen, daß die spezifischen AT III-Aktivitäten bei 37°C Kultivierungen in der Absterbephase der Zellen abnehmen, während sie bei niedrigeren Kultivierungstemperaturen von 33°C und 31°C weitgehend konstant bleiben. Die AT III-Aktivität ist abhängig vom Grad der Sialysierung des Glykoproteins. Sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Sialidasen sind in der Lage die terminalen Sialinsäuren des AT III abzuspalten [39, 80, 83, 153]. In Abb. 4.63 wird deutlich, daß die extrazelluläre Sialidase-Aktivität unabhängig vom Proteinanteil des Mediums mit der Totzellzahl korreliert.



**Abb. 4.63:** Die extrazellulären Sialidase-Aktivitäten und Totzellzahlen der Smif und Ultra Kultivierungen bei 37°C als Funktion der Zeit

Die Totzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Sialidase-Aktivitäten wurden fluorimetrisch mit dem Substrat MUF-NeuNAc bestimmt. Die Aktivitätseinheiten entsprechen relativen Einheiten der Kalibrationskurve, die mit 4-Metylbulliferon erhalten wurde.



**Abb. 4.64:** Die extrazellulären Sialidase-Aktivitäten und Totzellzahlen der Ultra Kultivierungen bei 37°C, 33°C und 31°C als Funktion der Zeit  
Die Totzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt. Die Sialidase-Aktivitäten wurden fluorimetrisch mit dem Substrat MUF-NeuNAc bestimmt. Die Aktivitätseinheiten entsprechen relativen Einheiten der Kalibrationskurve, die mit 4-Metylbelliferon erhalten wurde.

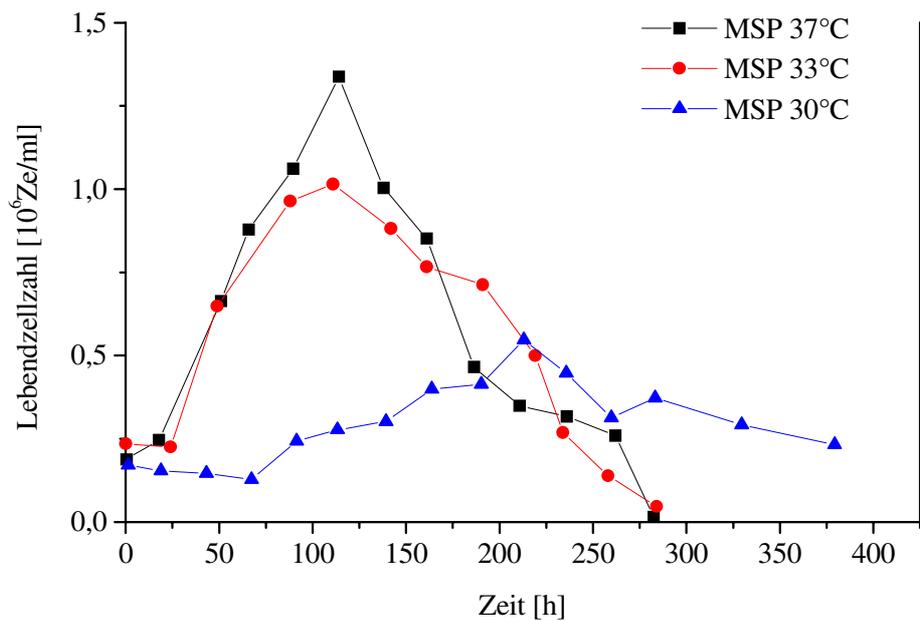
Aus Abb. 4.64 geht hervor, daß die extrazelluläre Sialidase-Aktivität von der Kultivierungstemperatur abhängig ist. Bei niedrigen Temperaturen bleibt die Vitalität länger auf einem hohen Niveau, so daß die Freisetzung von Sialidase durch die Zellyse hinausgezögert wird. Erste Untersuchungen zeigen, daß auch die zellspezifische Sialidasekonzentration mit der Kultivierungstemperatur abnimmt [39].

Das Wachstums- und Produktionsverhalten der SSO-A2- und SSO-A2PF-Zelllinien ist abhängig von der Zusammensetzung des jeweiligen Mediums. Das Zellwachstum im proteinfreien Smif Medium ist gegenüber dem im proteinreichen Ultra Medium eingeschränkt, was auf das Fehlen verschiedener wachstumsfördernder Proteine wie zum Beispiel Insulin zurückgeführt werden kann. Die Produktivität der SSO-A2PF-Zelllinie ist im proteinfreien Medium 100% höher als bei der vergleichbaren Zelllinie SSO-A2 im proteinhaltigen Medium. Proteine können nicht aus dem Medium aufgenommen werden, sondern müssen von den Zellen selbst synthetisiert werden. Parallel zur verstärkten Biosynthese von lebenserhaltenden Proteinen, wird auch die Information des rekombinanten

Proteins abgelesen, so daß die Produktivität ansteigt. Der Temperatureinfluß auf die Stoffwechselaktivität und die Produktivität ist unabhängig vom Proteinanteil des Mediums. Bei beiden Zelllinien werden durch eine Temperaturabsenkung die spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten gesenkt und die spezifische Produktivität gesteigert. Der spezifische Glutaminverbrauch bleibt bei allen untersuchten Kultivierungstemperaturen konstant.

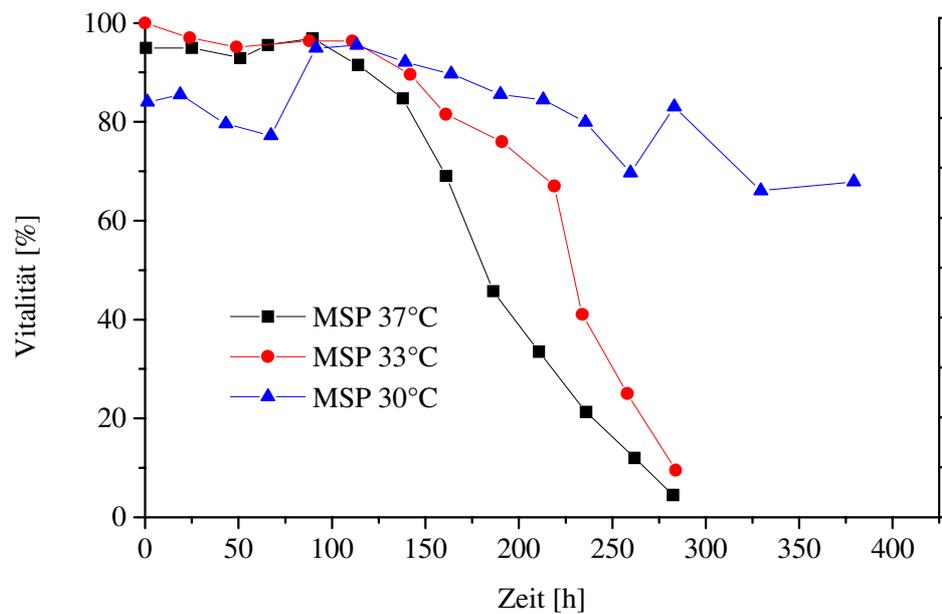
### **4.3 Einfluß der Temperatur auf Kultivierungen der rekombinanten BHK-Suspensionszelllinie B4B1-MSP**

Der Einfluß der Temperatur auf das Wachstumsverhalten, die Stoffwechselaktivität und das Produktionsverhalten der rekombinanten BHK-Suspensionszelllinie B4B1-MSP, die das Produkt Faktor VIIa (FVIIa) exprimiert, wird im Batchbetrieb untersucht. Die B4B1-MSP-Zelllinie ist ein noch nicht vollständig etablierter Klon einer adhärent wachsenden Produktionszelllinie der Firma Novo Nordisk. Die Temperaturuntersuchungen mit der B4B1-MSP-Suspensionszelllinie werden aufgrund der mit den verschiedenen CHO-Zelllinien gemachten Erfahrungen bei 37°C (MSP 37°C), 33°C (MSP 33°C) und 30°C (MSP 30°C) durchgeführt. Die FVIIa-Konzentrationen, die berechneten spezifischen Produktivitäten und Produktausbeuten werden aus Geheimhaltungsgründen in fiktiven Einheiten (fE) angegeben. Der Temperaturversuch bei 30°C wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Georg Renemann [155] durchgeführt. Da der Versuch in den Kontext dieser Arbeit paßt, werden die Daten zur Interpretation herangezogen.



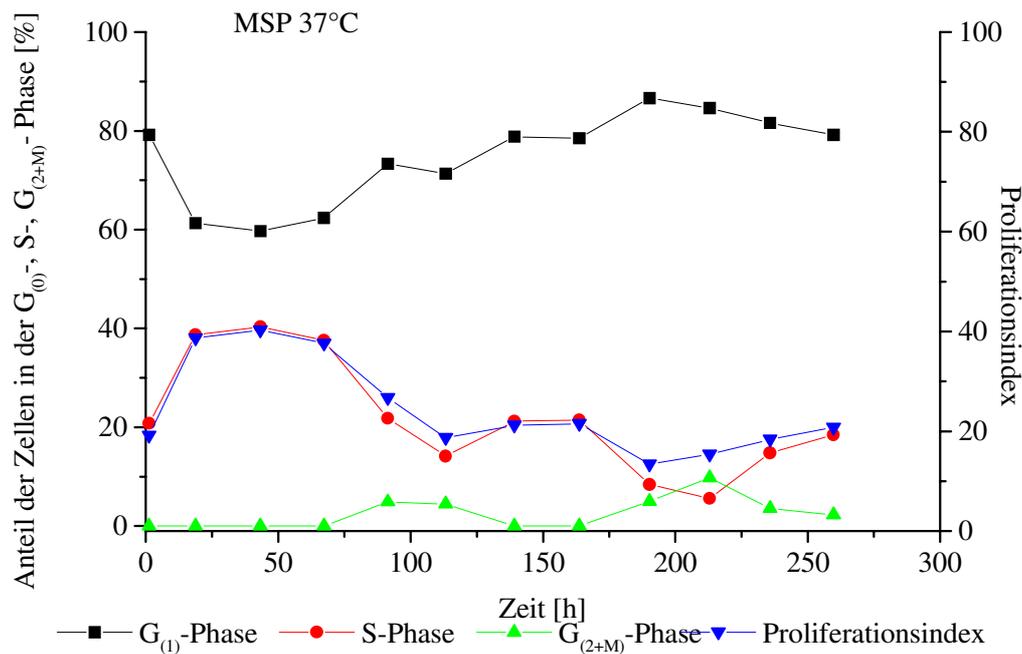
**Abb. 4.65:** Die Lebendzellzahlen der MSP Kultivierungen bei 30°C, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit. Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Das Wachstumsverhalten (Abb. 4.65) der BHK Zelllinie bei 37°C und 33°C unterscheidet sich nur geringfügig voneinander. Bei beiden Temperaturen besitzen die Zellen eine eintägige unterschiedlich stark ausgeprägte lag-Phase. Während die Lebendzellzahl bei der MSP 37°C Kultivierung geringfügig ansteigt, ist sie bei 33°C leicht rückläufig. Danach beginnt bei beiden Temperaturen das exponentielle Wachstum. Die maximalen Lebendzellzahlen von  $1,34 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$  (MSP 37°C) und  $1,01 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$  (MSP 33°C) werden in der 114. Stunde erreicht. Anschließend beginnt, ohne daß ein stationäres Wachstum stattfindet, die Absterbephase der Zellkulturen. Die mittleren Wachstumsraten der MSP 37°C und MSP 33°C Kultivierungen unterscheiden sich mit  $0,39 \text{ d}^{-1}$  und  $0,32 \text{ d}^{-1}$  um 20%. Bei einer weiteren Temperaturabsenkung auf 30°C verändert sich das Wachstumsverhalten der BHK Zelllinie grundlegend. Die Adaptionphase hält bis zur 67. Stunde an. Danach beginnt ein stetiges, aber nicht exponentielles Zellwachstum, das bis zur 213. Stunde anhält. Die gegenüber 37°C und 33°C verlängerte Wachstumsphase führt nur zu einer maximalen Zelldichte von  $0,55 \cdot 10^6 \text{Ze/ml}$ , da die mittlere Wachstumsrate mit  $0,13 \text{ d}^{-1}$  nur ein Drittel der von 37°C beträgt. Danach beginnt auch bei 30°C, ohne daß ein stationäres Wachstum durchlaufen wird, die Absterbephase. Die in Abb. 4.66 dargestellten Vitalitätsverläufe der verschiedenen Kultivierungen zeigen, daß durch eine Temperaturreduzierung die Kultivierungsdauer signifikant verlängert wird.



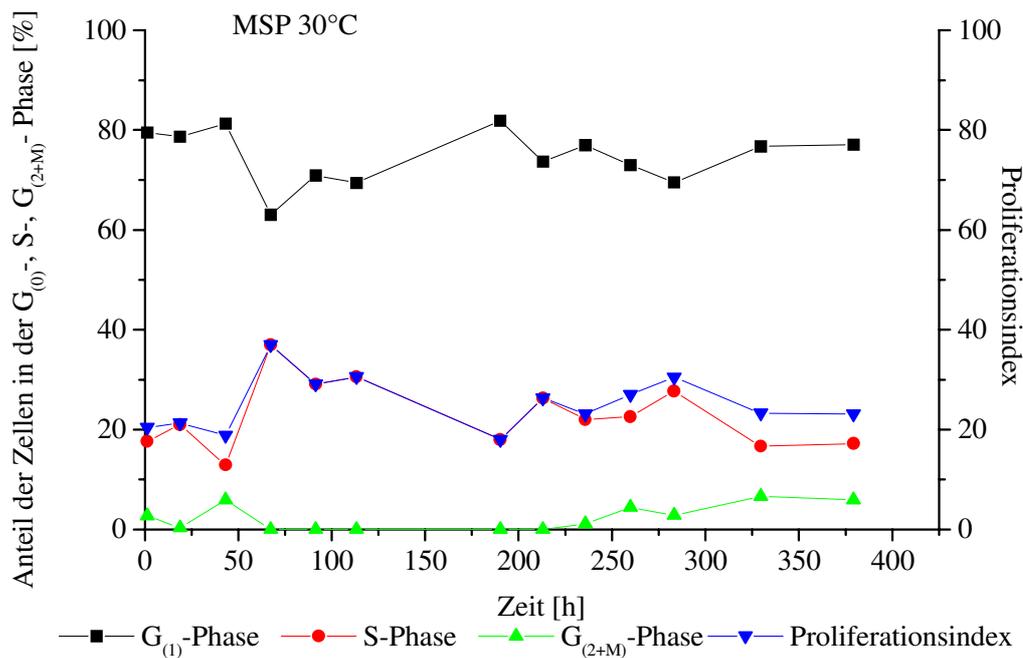
**Abb. 4.66:** Die Vitalitäten der MSP Kultivierungen bei 31°C, 33°C und 37°C als Funktion der Zeit. Die Lebend- und Totzellzahlen wurden mit der Trypanblau-Methode ermittelt.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der BHK-Zellen bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen wird weiterhin durch die Zellzyklusmessungen dokumentiert. Bei 37°C (Abb. 4.67) und 33°C (Daten nicht gezeigt) ist die exponentielle Wachstumsphase eindeutig am Verlauf des Proliferationsindex zu erkennen. Der Proliferationsindex, der sich aus dem Anteil der Zellen in der  $G_{2+M}$ - und S-Phase berechnet, steigt zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase um 100% von 20 auf 40 an und fällt dann zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase in der 113. Stunde wieder auf seinen Ausgangswert zurück. In der Absterbephase steigt der Anteil der Zellen, die ihren Stoffwechsel reduzieren und in der  $G_1$ -Phase arretiert werden an. Ob sich der Zeitraum der  $G_1$ -Phase im Laufe der Kultivierung verlängert, was zu einem erhöhten  $G_1$ -Anteil führen würde, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.



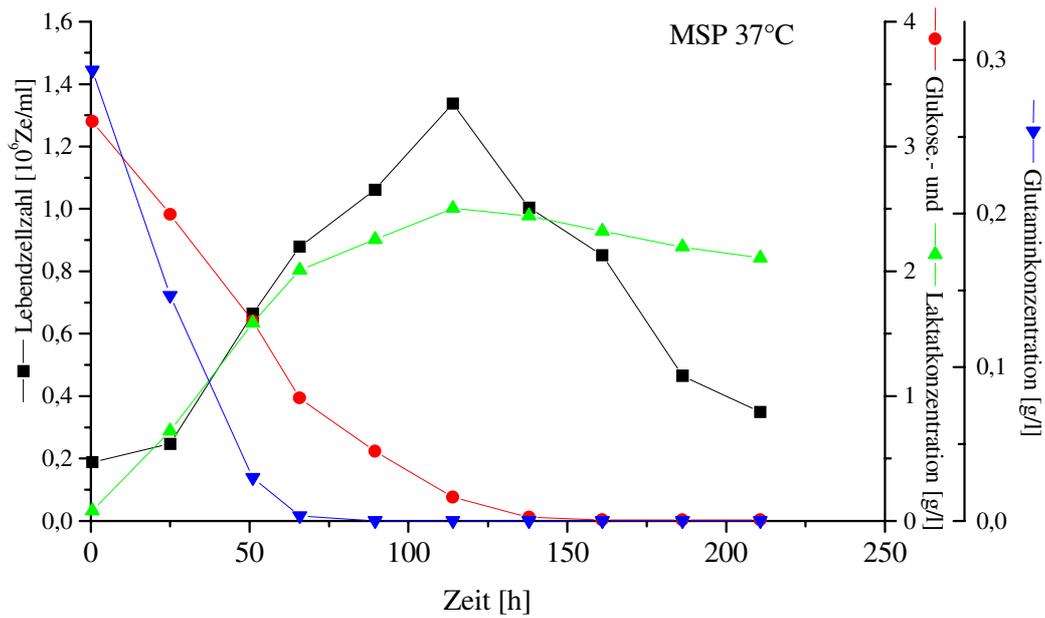
**Abb. 4.67:** Die Anteile der Zellyklusphasen der Zellen bei 37°C als Funktion der Zeit. Die DNA der Zellen wurde mit Propidiumiodid angefärbt und die resultierenden Fluoreszenzen mit einem Laserdurchflußcytometer aufgenommen.

Die dreitägige lag-Phase der Kultivierung MSP 30°C ist anhand des Proliferationsindexverlaufes in Abb. 4.68 erkennbar. Erst in der 67. Stunde steigt der Anteil, der sich in der Proliferation befindenden Zellen von 19% auf 27% an. Nach diesem kurzfristigen Anstieg oszilliert der Proliferationsindex bis zum Kulturabbruch um einen Mittelwert von 25,6 und ist damit um ca. 5 Einheiten höher als in der lag-Phase. Dieses erklärt das langsame Wachstum bei 30°C. Bei allen Temperaturen ist der Anteil der Zellen in der G<sub>2+M</sub>-Phase mit durchschnittlich 2,5% sehr gering. Dieser Wert deutet darauf hin, daß die BHK-Zellen nur eine sehr kurze G<sub>2</sub>-Phase besitzen. Interessant ist, daß der durchschnittliche G<sub>1</sub>-Phasenanteil sowohl bei 37°C als auch bei 30°C 74,7% beträgt. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen die Bloemkolk et al. [32] bei Untersuchungen mit Hybridoma Zellen gemacht haben. Bei den Hybridoma Zellen steigt der Anteil der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase durch eine Temperaturabsenkung an.



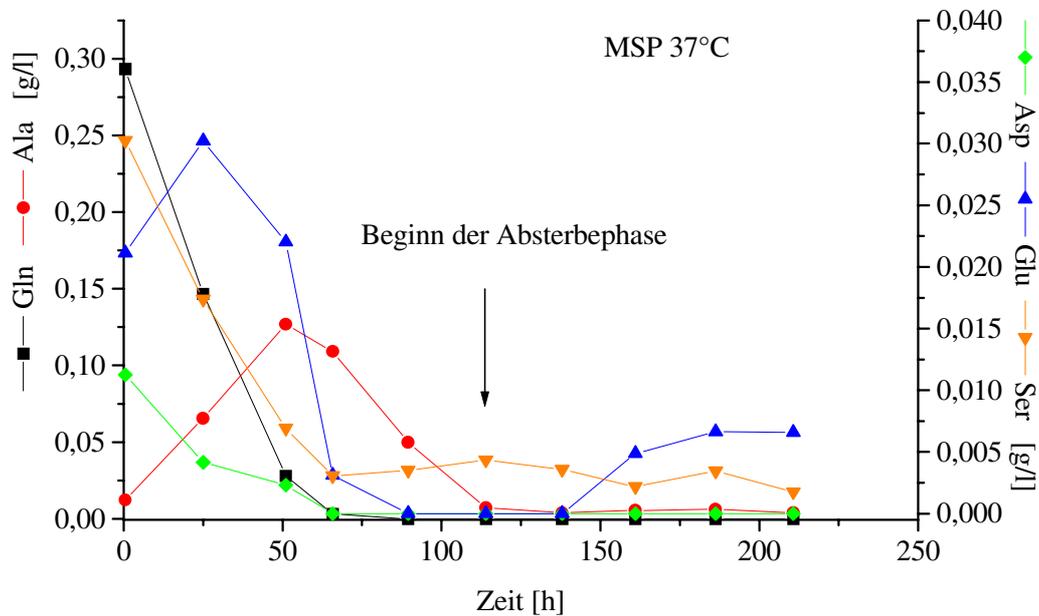
**Abb. 4.68:** Die Anteile der Zellyklusphasen der Zellen bei 30°C als Funktion der Zeit. Die DNA der Zellen wurde mit Propidiumiodid angefärbt und die resultierenden Fluoreszenzen mit einem Laserdurchflußcytometer aufgenommen.

Die BHK-Zellen benötigen verschiedene Substrate für das Zellwachstum und die Proteinbiosynthese. Welche Substratlimitierung den Beginn der Absterbephase auslöst, kann anhand der durchgeführten Batch-Kultivierungen nicht eindeutig geklärt werden. Die vollständige Verstoffwechslung von Glutamin, Aspartat und Glutamat (Abb. 4.69 und 4.70) bei der MSP 37°C Kultivierung in der 65. Stunde führt anscheinend nur zu einer Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit. Von den Zellen ausgeschiedenes Alanin (Abb. 4.70) wird nach der vollständigen Verstoffwechslung von Glutamin wieder aufgenommen, so daß in der 114. Stunde Alanin im Überstand nicht mehr nachweisbar ist. Das Fehlen von Glukose oder aber die hohe Laktatkonzentration von 2,5 g/l in der 114. Stunde trägt ebenfalls zum Absterben der Zellen bei.



**Abb. 4.69:** Die Lebendzellzahl, Glukose-, Laktat- und Glutaminkonzentration der MSP 37°C Kultivierung als Funktion der Zeit.

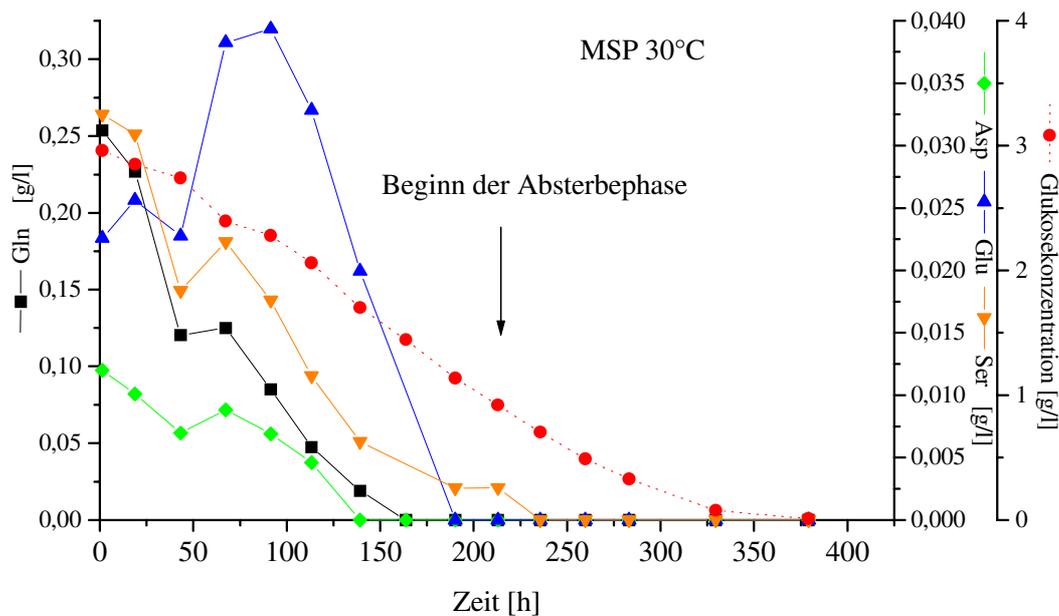
Die Lebendzellzahlen wurden mit der Trypanblau Methode ermittelt. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden enzymatisch mit dem YSI 2700 bestimmt. Die Glutaminkonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.



**Abb. 4.70:** Die Alanin-, Aspartat-, Serin-, Glutamat- und Glutaminkonzentration der MSP 37°C Kultivierung als Funktion der Zeit.

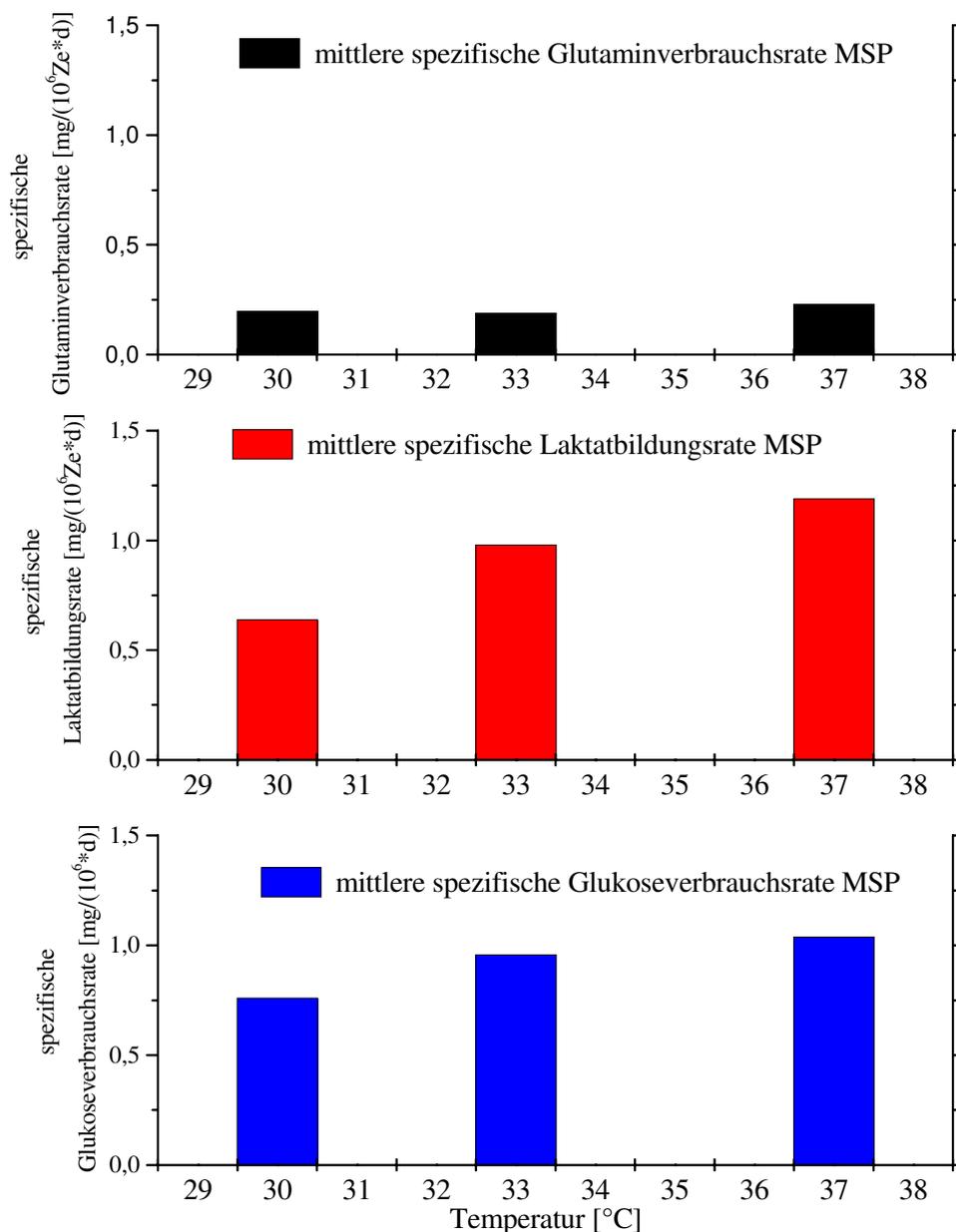
Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt.

Zu Beginn der Absterbephase der Kultivierung MSP 30°C (Abb. 4.71) ist in der 235. Stunde noch 0,92 g/l Glukose im Überstand vorhanden, so daß Glukose als nicht wachstums-limitierend eingestuft wird. Die im Medium vorhandene Galaktose wird nur in geringen Mengen von den Zellen aufgenommen (Daten nicht gezeigt). Galaktose ist ein Bestandteil der glykosidischen Seitenketten des Faktor VII-Proteins.



**Abb. 4.71:** Die Glukose-, Aspartat-, Serin-, Glutamat- und Glutaminkonzentration der MSP 30°C Kultivierung als Funktion der Zeit. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC und die Glukosekonzentration mit dem YSI 2700 bestimmt.

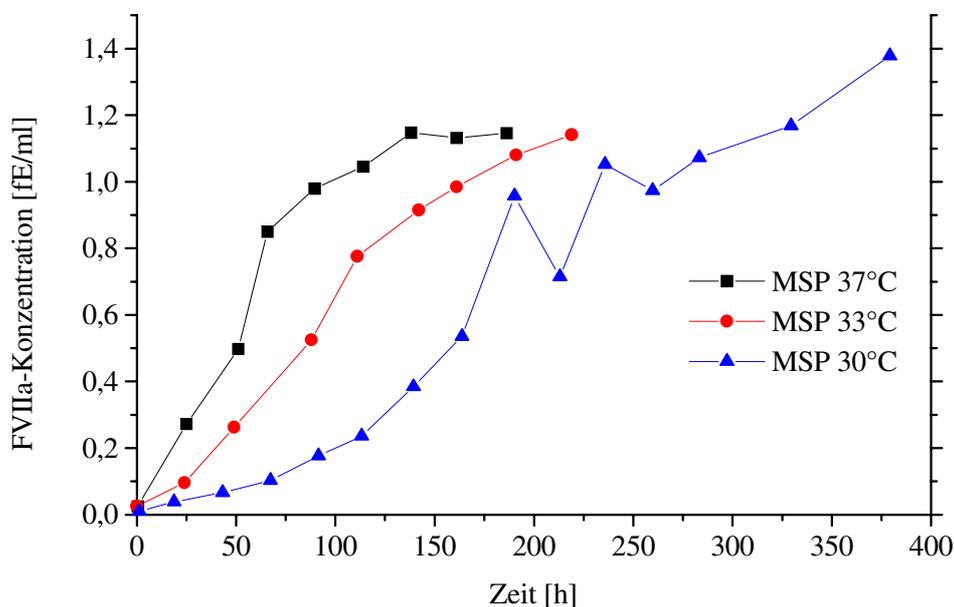
Wie in Abb. 4.71 zu erkennen ist, erfolgt die Abnahme der Aminosäuren und der Glukose bei 30°C aufgrund des geringeren Zellwachstums langsamer als bei 37°C (Abb. 4.69 und 4.70). Die mittlere spezifische Glukoseverbrauchsrate beträgt bei 37°C 1,04 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) und bei 33°C 0,96 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d). Bei einer weiteren Temperaturabsenkung sinkt die mittlere spezifische Glukoseverbrauchsrate gegenüber 37°C um 37% auf 0,76 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) ab. Die mittleren spezifischen Laktatbildungsraten verhalten sich kongruent zu den Glukoseverbrauchsraten. Sie betragen 1,19 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (MSP 37°C), 0,98 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (MSP 33°C) und 0,64 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) (MSP 30°C). Während die mittleren spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten durch eine Absenkung der Kultivierungstemperatur reduziert werden, bleibt die mittlere spezifische Glutaminverbrauchsrate im Temperaturbereich von 37°C-30°C konstant. Sie beträgt durchschnittlich 0,2 mg/(10<sup>6</sup>Ze\*d). In Abb. 4.72 sind die mittleren spezifischen Raten als Funktion der Temperatur dargestellt.



**Abb. 4.72:** Die mittlere spezifische Glukoseverbrauchs-, Glutaminverbrauchs- und Laktatbildungsrate bei MSP Kultivierungen als Funktion der Temperatur. Die Glutaminkonzentrationen wurden mittels HPLC und die Glukose- und Laktatkonzentrationen mit dem YSI 2700 bestimmt.

Die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten wird auch durch den Gesamtausbeutekoeffizienten  $Y_{(\text{Laktat}/\text{Glukose})}$  dokumentiert. Zur Berechnung wird die maximale Laktatkonzentration und die zu diesem Zeitpunkt verstoffwechelte Glukosemenge herangezogen. Die Ausbeutekoeffizienten von MSP 37°C und MSP 33°C unterscheiden sich mit 0,80 und 0,78 nur geringfügig. Bei MSP 30°C hingegen beträgt der Ausbeutekoeffizient mit 0,58 38% weniger als bei den höheren

Temperaturen. Das bedeutet, daß bei 30°C nicht wie bei 37°C nur ein Fünftel der Glukose in den energetisch günstigen Citratzyklus geschleust wird, sondern beinahe die Hälfte der zur Verfügung stehenden Glukose. Die im Citratzyklus gewonnene Energie wird aber bei 30°C nicht für das Zellwachstum genutzt wie die Ausbeutekoeffizienten  $Y_{(\text{Lebendzellzahl}/\text{Glukose})}$  belegen. Der Ausbeutekoeffizient fällt kongruent mit der Temperatur von  $0,44 \cdot 10^6 \text{Ze}/\text{mg}$  bei 37°C, über  $0,37 \cdot 10^6 \text{Ze}/\text{mg}$  bei 33°C, auf  $0,27 \cdot 10^6 \text{Ze}/\text{mg}$  bei 30°C ab. Bei 30°C wird die gewonnene Energie verstärkt in die Proteinbiosynthese gesteckt, was der Ausbeutekoeffizient  $Y_{(\text{FaktorVIIa}/\text{Glukose})}$  für die verschiedenen Temperaturen belegt. Er beträgt  $0,36 \text{ fE}/\text{g}$  für 37°C und 33°C und ist mit  $0,47 \text{ fE}/\text{g}$  bei 30°C 30% höher.



**Abb. 4.73:** Die Faktor VIIa-Konzentration in fiktiven Einheiten bei MSP Kultivierungen als Funktion der Zeit. Die Faktor VIIa-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt.

Die maximalen Faktor VIIa-Konzentrationen beträgt bei 30°C  $1,37 \text{ fE}/\text{l}$  und ist 20% höher als bei 37°C und 33°C mit  $1,14 \text{ fE}/\text{l}$  (Abb. 4.73). Durch die Temperaturabsenkung wird der Zeitpunkt der maximalen FVIIa-Konzentration später erreicht, wodurch die Raum-Zeit-Ausbeuten ungünstiger werden. Sie betragen  $0,198 \text{ fE}/(\text{l} \cdot \text{d})$  (37°C),  $0,124 \text{ fE}/(\text{l} \cdot \text{d})$  (33°C) und  $0,086 \text{ fE}/(\text{l} \cdot \text{d})$  (30°C). Im Gegensatz zu den Raum-Zeit-Ausbeuten wird die spezifische Produktivität der Zellen durch die Temperaturabsenkung gesteigert. Die mittleren spezifischen Produktivitäten für 37°C und 33°C unterscheiden sich mit  $0,21 \text{ fE}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$  und  $0,19 \text{ fE}/(10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$  nur geringfügig, erst bei einer weiteren Temperaturabsenkung auf 30°C steigt die spezifische Produktivität auf  $0,28 \text{ fE}/10^6 \text{Ze} \cdot \text{d})$  an. Ein Vergleich zwischen

Zellzyklusphase und Produktivität der BHK-Zellen zeigt, daß die Produktivität ansteigt, wenn der Anteil der Zellen in der S-Phase am höchsten ist. Hier müssen aber noch weitere Untersuchungen mit nach Zellzyklusphasen aufgetrennten Zellkulturen folgen, um eindeutige Aussagen machen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, den Temperatureinfluß auf das Glykosylierungsmuster von Faktor VIIa zu untersuchen. Erste Untersuchungen der Firma Novo Nordisk im Temperaturbereich von 37-36°C zeigen, daß sich der Sialysierungsgrad von Faktor VIIa mit der Temperatur ändert und somit eine Optimierung der Produktqualität über die Temperaturführung erfolgen kann [154].

In Tab. 4.7 sind die charakteristischen Daten der MSP Kultivierungen aufgeführt.

**Tab. 4.7:** Die charakteristischen Daten der MSP Kultivierungen.

	Einheit	MSP 37°C	MSP 33°C	MSP 30°C
max. Lebendzellzahl	[10 <sup>6</sup> Ze/ml]	1,34	1,01	0,55
$\mu_{\max}$ .	[d <sup>-1</sup> ]	0,71	1,01	0,64
$\mu_{\text{mittel}}$	[d <sup>-1</sup> ]	0,39	0,32	0,13
$Y_{(\text{Laktat}/\text{Glukose})}$	[g/g]	0,8	0,78	0,58
$Y_{(\text{Lebendzell.}/\text{Glukose})}$	[10 <sup>6</sup> Ze/mg]	0,44	0,37	0,27
$Y_{(\text{FaktorVIIa}/\text{Glukose})}$	[fE/g]	0,36	0,36	0,47
Raum-Zeit-Ausbeute	[fE/(l*d)]	0,198	0,124	0,086
Faktor VIIa Titer	[fE/l]	1,14	1,14	1,37
mittlere spezif. Glukoseverbrauchsrate	[mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	1,04	0,96	0,76
mittlere spezif. Laktatbildungsrate	[mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	1,19	0,98	0,64
mittlere spezif. Glutaminverbrauchsrate	[mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	0,23	0,19	0,20
mittlere spezif. Produktivität	[fE/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]	0,21	0,19	0,28

Bei Kultivierungen der rekombinanten BHK-Suspensionszellelinie B4B1-MSP beeinflußt eine Temperaturabsenkung von 37°C auf 33°C das Wachstumsverhalten der Zellen dahingehend,

---

daß die Zellen geringfügig langsamer wachsen. Das Stoffwechselverhalten und die spezifische Produktivität der Zellen wird nicht beeinflusst. Erst bei einer weiteren Temperaturabsenkung auf 30°C ändert sich das Wachstums-, Stoffwechsel- und Produktionsverhalten der Zellen. Der Stoffwechsel der Zellen wird effizienter, indem mehr Glukose in den Citratzyklus eingespeist wird. Die gewonnene Energie wird nur zu einem geringen Teil zum Zellwachstum genutzt, so daß die mittlere Wachstumsrate auf ein Drittel der 37°C Kultivierung absinkt. Obwohl die spezifische Produktivität der Zellen ansteigt, verschlechtert sich die Raum-Zeit-Ausbeute, da die maximale Zellzahl der höheren Temperaturen nicht erreicht wird. Die spezifische Produktivität der Zellen ist abhängig vom Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Erste Untersuchungen deuten daraufhin, daß ein hoher S-Phasenanteil zu einer erhöhten Produktivität der Zellen führt. Da der Vitalitätsverlauf durch eine Temperaturabsenkung positiv beeinflusst wird, kann bei Batchkultivierungen die Absterbephase der BHK Zellen hinausgezögert werden und damit eine mögliche Produktdegradation durch freigesetzte Proteasen verhindert werden.

---

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Temperatureinfluß auf verschiedene rekombinante Säugierzelllinien charakterisiert und eine Optimierung des Produktionsprozesses von Glykoproteinen mit Hilfe der Temperaturführung vorgenommen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an verschiedenen CHO-Zelllinien und an einer BHK-Zelllinie belegen eindeutig, daß die übliche Kultivierungstemperatur von 37°C nicht „die optimale Temperatur“ für rekombinante Zellkulturen darstellt. So besitzen das Wachstum, die Stoffwechselaktivität, die Produktivität und die Produktqualität eigene verschiedene optimale Temperaturen, die sich wiederum von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden können. Je nachdem ob eine hohe Zelldichte oder eine hohe Produktivität im Mittelpunkt des Interesses steht, muß die entsprechende Kultivierungstemperatur ausgewählt werden.

Auch wenn der Einfluß der Temperatur bei verschiedenen Zelllinien im Detail variiert, gibt es doch einige generelle Tendenzen. Für jede Zelllinie gibt es eine obere und eine untere Grenztemperatur. Werden Zellen über einen längeren Zeitraum jenseits dieser Temperaturen kultiviert, findet nicht nur kein Wachstum mehr statt, sondern die Zellkulturen sterben trotz verstärkter Streßproteinbildung ab. Für die CHO-Zelllinie TF 70 R konnten Grenztemperaturen von 39°C und 30°C beobachtet werden. Auch innerhalb dieser Grenzen gibt es Temperaturen, bei denen sich das Wachstum der Zellen grundlegend ändert. Jede Zelllinie besitzt eine Temperatur, ab der kein exponentielles Wachstum mehr stattfindet und die Zellen in einer verlängerten lag-Phase verweilen, ohne daß ein Absterben der Zellen erfolgt. Für die CHO-Zelllinie TF 70 R und die BHK-Zelllinie B4B1-MSP sind 31°C bzw. 30°C die Temperaturen, wo kein exponentielles Wachstum mehr stattfindet. Grundsätzlich wird durch eine Temperaturabsenkung die lag-Phase der Zellen verlängert und das Zellwachstum verlangsamt. Der Einfluß einer Temperaturerniedrigung auf die mittleren Wachstumsraten hängt von der jeweiligen Zelllinie ab. In Tab. 5.1 sind die mittleren Wachstumsraten der verschiedenen Zelllinien bei Kultivierungen in Spinnerflaschen für 37°C, 33°C, 30°C bzw. 31°C (SSO-A2, SSO-A2PF) aufgeführt.

**Tab. 5.1:** Die mittleren Wachstumsraten der verschiedenen Zelllinien bei Kultivierungen in Spinnerflaschen.

Temperatur [°C]	$\mu_{(\text{mittel})}$ [d <sup>-1</sup> ] TF 70 R	$\mu_{(\text{mittel})}$ [d <sup>-1</sup> ] SSO-A2	$\mu_{(\text{mittel})}$ [d <sup>-1</sup> ] SSO-A2PF	$\mu_{(\text{mittel})}$ [d <sup>-1</sup> ] B4B1-MSP
37°C	0,35	0,58	0,44	0,39
33°C	0,23	0,55	0,31	0,32
30°C/31°	0,03	0,44	0,24	0,13

Durch das langsamere Wachstum der Zellen bei niedrigen Temperaturen wird auch der Beginn der Absterbephase hinausgezögert, so daß die Vitalität der Zellen über einen verlängerten Zeitraum ein hohes Niveau besitzt.

Die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand ist abhängig von der Kultivierungstemperatur. Dieses bedeutet, daß die LDH-Aktivität nicht zum Vergleich der Zustände von Kultivierungen bei verschiedenen Temperaturen herangezogen werden kann. Ob eine Prozeßkontrolle mit Hilfe der LDH-Aktivität sinnvoll ist, wird durch diese Ergebnisse eindeutig in Frage gestellt.

Bei allen untersuchten Zelllinien konnte eine Temperaturabhängigkeit der spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten festgestellt werden. Sowohl der spezifische Glukoseverbrauch als auch die spezifische Laktatbildung sinken kongruent mit der Temperatur ab. Die geringeren spezifischen Laktatbildungsraten bei niedrigen Kultivierungstemperaturen bewirken, daß toxische Laktatkonzentrationen erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei 37°C Kultivierungen erreicht werden. In Tab. 5.2 sind die mittleren spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten der verschiedenen Zelllinien für Kultivierungen in Spinnerflaschen bei 37°C, 33°C und 30°C (B4B1-MSP) bzw. 31°C (SSO-A2, SSO-A2PF, TF 70 R) aufgeführt.

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{(\text{Laktat}/\text{Glukose})}$  ist ebenfalls temperaturabhängig. Beispielsweise fällt bei den BHK-Zellen der Ausbeutekoeffizient im Temperaturbereich 37°C-30°C von 0,80 auf 0,58 ab. Das bedeutet, daß die Zellen bei 30°C mehr Glukose in den energetisch günstigen Citratzyklus einschleusen als bei 37°C, wo Glukose hauptsächlich zu Laktat verstoffwechselt wird.

**Tab. 5.2:** Die mittleren spezifischen Glukoseverbrauchs- und Laktatbildungsraten der verschiedenen Zelllinien bei Kultivierungen in Spinnerflaschen.

Temperatur [°C]	mittlere spezifische Glukoseverbrauchsrate [mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]				mittlere spezifische Laktatbildungsrate [mg/(10 <sup>6</sup> Ze*d)]			
	TF 70 R	SSO- A2	SSO- A2PF	B4B1- MSP	TF 70 R	SSO- A2	SSO- A2PF	B4B1- MSP
37°C	0,58	1,66	0,83	1,04	0,44	1,28	0,79	1,19
33°C	0,39	1,11	0,71	0,96	0,25	1,01	0,68	0,98
30°C/31°C	0,32	0,96	0,53	0,76	0,27	0,91	0,55	0,64

Im Gegensatz zum spezifischen Glukoseverbrauch der Zellen, ist der spezifische Glutaminverbrauch unabhängig von der Kultivierungstemperatur.

Die spezifische Produktivität aller untersuchten Zelllinien steigt grundsätzlich bei einer Temperaturabsenkung an. Die Produktivitätssteigerung führt aber nur dann zu einem höheren Produkttiter oder zu einer besseren Raum-Zeit-Ausbeute, wenn das Wachstum der jeweiligen Zelllinie nicht zu stark durch eine Temperaturreduzierung eingeschränkt wird. Bei der BHK-Zelllinie B4B1-MSP steigt die mittlere spezifische Produktivität von 0,21 fE/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 37°C auf 0,28 fE/(10<sup>6</sup>Ze\*d) bei 30°C an. Aufgrund des geringen Zellwachstums bei 30°C sinkt die Raum-Zeit-Ausbeute jedoch von 0,198 fE/(l\*d) (37°C) auf 0,086 fE/(l\*d) ab. Die mittlere spezifische Produktivität der Zelllinie TF 70 R beträgt bei 37°C 0,44 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) und steigt bei 33°C auf 0,63 µg/(10<sup>6</sup>Ze\*d) an. Da die mittleren Wachstumsraten der Zellen in diesem Temperaturbereich mit 0,35 d<sup>-1</sup> (37°C) und 0,29 d<sup>-1</sup> (34°C) nur geringfügig abfallen, wird auch die Raum-Zeit-Ausbeute von 0,22 mg/(l\*d) (37°C) auf 0,45 mg/(l\*d) (34°C) gesteigert.

Für die Zelllinie TF 70 R konnte eine Temperaturabhängigkeit der Zellgrößenverteilung gezeigt werden. Die Zellgröße steht mit der Produktivität der Zellen im direkten Zusammenhang. Da die vom Zellzyklus abhängige rekombinante Proteinsynthese parallel mit der normalen Zellproteinsynthese abläuft, besitzen die Zellen eine vom Zellzyklus abhängige Zellgröße. Der Zellzyklus wird wiederum von der Temperatur beeinflusst, so daß die Zellgröße bei einer Temperaturreduzierung zunimmt. Die Zellzyklusmessungen bei verschiedenen Temperaturen zeigen, daß der Anteil der Zellen in der S-Phase bei niedrigen Temperaturen höher ist als bei 37°C. Wie hoch die Produktivitätssteigerung bei einer Temperaturreduzierung ausfällt, hängt von der gentechnischen Konstruktion der Zelllinie ab. Exprimiert eine Zelllinie ihr rekombinantes Produkt aufgrund ihres Promotors vorwiegend in der S-Phase, so führt eine Temperaturreduzierung zu einer erhöhten Produktivität. Der

Temperatureinfluß auf den Promoter ist sicherlich ein interessantes Thema für weitere Untersuchungen.

Der Einfluß der Temperatur auf die Produktqualität ist vielseitig. Bei den Kultivierungen mit der Zelllinie TF 70 R ändert sich die Produktzusammensetzung aus einkettigem und zweikettigem tPA mit der Kultivierungstemperatur. Die tPA-Aktivität der Kultivierungen im Temperaturbereich von 39-33°C entspricht dem eines Standards. Bei 31°C und 30°C ist die tPA-Aktivität hingegen stark eingeschränkt. Diese Produktqualitätsminderung muß auf intrazelluläre Vorgänge wie nicht korrekte posttranslationale Modifikationen zurückgeführt werden, da die extrazellulären Sialidase- und Proteaseaktivitäten bei einer Temperaturreduzierung abnehmen. Die durch die Zellyse freigesetzten Proteasen und Sialidasen haben auf die AT III-Aktivität einen größeren Einfluß als auf die tPA-Aktivität. Die terminalen Sialinsäuren des AT III-Moleküls sind für die Aktivität des Glykoproteins von besonderer Bedeutung. Durch eine Temperaturreduzierung wird die Freisetzung der Sialidasen verzögert und somit die Produktqualität über einen längeren Zeitraum als bei 37°C gewährleistet. Auch bei Faktor VIIa, dem Produkt der BHK-Zellen, ist der Sialysierungsgrad abhängig von der Kultivierungstemperatur [154]. Die Produktqualität der untersuchten Glykoproteine wird durch eine Temperaturreduzierung verbessert.

Die Untersuchungen mit den Zelllinien SSO-A2 und SSO-A2PF in proteinreichem und proteinfreiem Medium zeigen, daß der Temperatureinfluß auf die Stoffwechselaktivität und die Produktivität unabhängig vom Proteinanteil des Mediums ist.

Der Einfluß der Temperatur auf das Zellwachstum ist abhängig vom Kultivierungssystem. Die Ergebnisse aus den Experimenten in den unregulierten Spinnerflaschen und den regulierten Biostaten sind unterschiedlich. Im Biostaten herrschen andere Kultivierungsverhältnisse als in Spinnerflaschen, da der pH-Wert und die Gelöstsauerstoffkonzentration konstant gehalten werden. Zusätzlich sind die Scherbelastungen im Biostaten höher als in den Techno-Spinnerflaschen. Da die Zellen bei niedrigen Temperaturen eine verlängerte lag-Phase besitzen, in der die Scherstreßsensibilität höher ist als in der exponentiellen Wachstumsphase, findet bei Kultivierungen mit der Zelllinie TF 70 R bei 33°C kein exponentielles Wachstum statt.

---

Eine Prozeßoptimierung mittels Temperaturshift von 37°C auf 33°C zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase führte bei der Zelllinie TF 70 R in einer Biostatenkultivierung zu einer Steigerung der mittleren spezifischen Produktivität von 0,25  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$  bei 37°C auf 0,65  $\mu\text{g}/(10^6\text{Ze}\cdot\text{d})$ . Der Produkttiter konnte von 1,4 mg/l (37°C) auf 2,97 mg/l gesteigert werden. Die Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute von 0,14 mg/(l\*d) (37°C) auf 0,43 mg/(l\*d) beträgt mehr als 200%.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Produktivitäten rekombinanter Zelllinien bei niedrigeren Kultivierungstemperaturen als die bisher üblichen 37°C bedeutend höher sind. Die Wirtschaftlichkeit eines Produktionsprozesses mit rekombinanten Säugerzellen kann durch die Temperaturführung ohne einen erkennbaren Mehraufwand um ein Vielfaches gesteigert werden. Eine Optimierung des simplen Prozeßparameters Temperatur kann mehr bewirken als technisch aufwendige Zufütterungsstrategien oder die Zugabe von teuren Wachstumshormonen, die später während der Produktaufarbeitung wieder kostenintensiv entfernt werden müssen.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. WERNER, R. G.; UND HOFFMANN, H.: Biotechnische Produktion einer neuen Generation von Arzneimitteln: Therapie mit körpereigenen Wirkstoffen. In: *Medikament und Experiment* 5 (1989), Nr. 38, S. 3-12
2. BANNISTER, B. A.; AND MCCORMICK, A.: Creutzfeld-Jakob Disease with Reference to the Safety of Pituitary Growth Hormon. In: *J. Infect.* (1987), Nr. 14, S. 7
3. GRIFFITHS, B.: Animal Cells - The Breakthrough to a Dominant Technology. In: *Cytotechnology* 3 (1990), S. 109-116
4. GASSEN, H. G.; MARTIN, A.; UND SACHE, G.: *Der Stoff aus dem die Gene sind* München: J. Schweitzer Verlag, 1986
5. WATSON, J. D.; TOOZE, J.; UND KURTZ, D. T.: *Rekombinierte DNA - Eine Einführung* 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft, 1989. - 3-922508-34-0
6. DARNELL JR., J. E.: RNA. Die Moleküle des Lebens. In: *Spektrum der Wissenschaften* (1986), Nr. 28
7. CRICK, F. H. C.: Der genetische Code. Verständliche Forschung, Erbsubstanz DNA. Vom genetischen Code zu Gentechnologie. In: *Spektrum der Wissenschaft* (1985), Nr. 74
8. ASCHE, W.: Gewinnung von t-PA aus E.coli. In: *Bioeng.* (1989), Nr. 6, S. 43-44
9. SARMIENTOS, P.; DUCHESNE, M.; DENEFFLE, P.; BOIZIAU, J.; FROMAGE, N.; DELPORTE, N.; PARKER, F.; LELIEVRE, Y.; MAYAUX, J.-F.; AND CARTWRIGHT, T.: Synthesis and Purification of Active Human Tissue Plasminogen Activator from Escherichia Coli. In: *Bio/Technology* 7 (1989), Nr. 5, S. 495-501
10. Schutzrecht DE 35 37 708 C2 (1993-07-08). Boehringer Mannheim GmbH
11. LAU, D.; KUZMA, G.; WEI, C. H.; LIVINGSTON, D. J.; AND HSIUNG, N.: A Modified Human Tissue Plasminogen Activator with Extended Half-Life in vivo. In: *Bio/Technology* 5 (1987), Nr. 9, S. 953-958
12. PAREKH, R. B.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; THOMAS, J. R.; AND RADEMACHER, T. W.: N-Glycosylation and in vitro Enzymatic Activity of Human Recombinant Tissue Plasminogen Activator Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells and a Murine Cell Line. In: *Biochem.* (1989), Nr. 28, S. 7670-7679
13. COLE, E. S.; NICHOLS, E. H.; POISSON, L.; HARNOIS, M. L.; AND LIVINGSTON, D. J.: In vivo Clearance of Tissue Plasminogen Activator: The Complex Role of Sites of Glycosylation and Level of Sialylation. In: *Fibrinolysis* (1993), Nr. 7, S. 15-22
14. HOTCHKISS, A.; REFINO, C. J.; LEONARD, C. K.; O'CONNOR, J. V.; CROWLEY, C.; MCCABE, J.; TATE, K.; NAKAMURA, G.; POWERS, D.; LEVINSON, A.; MOHLER, M.; AND SPELLMAN, M. W.: The Influence of Carbohydrate Structure on the Clearance of Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator. In: *Thrombosis and Haemostasis* 60 (1988), Nr. 2, S. 255-261

15. LIS, H.; AND SHARON, N.: Protein Glycosylation Structural and Functional Aspects. In: *Eur. J. Biochem.* 218 (1993), S. 1-27
16. JENKINS, N.; AND CURLING, E. M. A.: Glycosylation of Recombinant Proteins: Problems and Prospects. In: *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994), Nr. 5, S. 354-364
17. BRÖKER, M.; RAGG, H.; AND KARGES, H. E.: Expression of Human Antithrombin III in *Saccharomyces Cerevisiae* and *Schizosaccharomyces Pombe*. In: *Biochim./Biophys. Acta* (1987), Nr. 908, S. 203-213
18. UPSHALL, A.; KUMAR, A. A.; BAILEY, M. C.; PARKER, M. D.; FAVREAU, M. A.; LEWISON, K. P.; JOSEPH, M. L.; MARAGANORE, J. M.; AND MCKNIGHT, G. L.: Secretion of Active Human Tissue Plasminogen Activator from the Filamentous Fungus *Aspergillus Nidulans*. In: *Bio/Technology* 5 (1987), Nr. 12, S. 1301-1304
19. LEMONTT, J. F.; WEI, C. M.; AND DACKOWSKI, W. R.: Expression of Active Human Uterine Tissue Plasminogen Activator in Yeast. In: *DNA* 4 (1985), S. 419-428
20. GORDON, K.; LEE, E.; VITALE, J. A.; SMITH, A. E.; WESTPHAL, H.; AND HENNINGHAUSEN, L.: Production of Human Tissue Plasminogen Activator in Transgenic Mouse Milk. In: *Bio/Technology* 5 (1987), Nr. 11, S. 1183-1187
21. NOSSAL, G. J. V.; UND COPPEL, R. L.: *Thema Gentechnik - Eine lebensverändernde Wissenschaft* In: SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG 1. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, 1992, S. 130-133
22. JENKINS, N.; AND HOVEY, A.: Temperature Control of Growth and Productivity in Mutant Chinese Hamster Ovary Cells Synthesizing a Recombinant Protein. In: *Biotechnol. Bioeng.* 42 (1993), S. 1029-1036
23. SCHMID, G.; ZILG, H.; AND JOHANNSEN, R.: Repeated Batch Cultivation of rBHK Cells on Cytodex 3 Microcarriers: Antithrombin III, Amino Acids, and Fatty Acid Metabolic Quotients. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1992), Nr. 38, S. 328-333
24. HILLER, G. W.; AESCHLIMANN, A. D.; CLARK, D. S.; AND BLANCH, H. W.: A Kinetic Analysis of Hybridoma Growth and Metabolism in Continuous Suspension Culture on Serum-Free Medium. In: *Biotechnol. Bioeng.* (1991), Nr. 38, S. 733-741
25. HILLER, G. W.; CLARK, D. S.; UND BLANCH, H. W.: Transient Responses of Hybridoma Cells in Continuous Culture to Step Changes in Amino Acid and Vitamin Concentrations. In: *Biotechnology and Bioengineering* (1994), Nr. 44, S. 303-321
26. RIESE, U.; LÜTKEMEYER, D.; HEIDMANN, R.; BÜNTEMEYER, H.; AND LEHMANN, J.: Re-use of Spent Cell Culture Medium in Pilot Scale and Rapid Preparative Purification with Membrane Chromatography. In: *J. Biotechnol.* (1994), Nr. 34, S. 247-257
27. KRETZMER, G.: Entwicklung Optimaler Prozeßbedingungen zur Produktion von rekombinanten Proteinen mit Adhärenten Säugerzellen. In: *Habilitationsschrift* (1993), S. 89
28. Schutzrecht WO 91/00347 (1991). Novo Nordisk A/S

29. KURANO, N.; LEIST, C.; MESSI, F.; KURANO, S.; AND FIECHTER, A.: Growth Behavior of Chinese Hamster Ovary Cells in a Compact Loop Bioreactor. 1. Effects of Physical and Chemical Enviroments. In: *J. Biotechnol.* 15 (1990), S. 101-112
30. ENFORS, S.-O.: Control of in vivo Proteolysis in the Production of Recombinant Proteins. In: *Tibtech* 10 (1992), Nr. 9, S. 310-315
31. REUVENY, S.; KIM, Y. J.; KEMP, C. W.; AND SHILOACH, J.: Effect of Temperature and Oxygen on Cell Growth and Recombinant Protein Production in Insect Cell Cultures. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 (1993), S. 619-623
32. BLOEMKOLK, J.-W.; GRAY, M. R.; MERCHANT, F.; AND MOSMANN, T. R.: Effect of Temperature on Hybridoma Cell Cycle and MAb Production. In: *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992), S. 427-431
33. SURESHKUMAR, G. K.; AND MUTHARASAN, R.: The Influence of Temperature on a Mouse-Mouse Hybridoma Growth and Monoclonal Antibody Production. In: *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1991), S. 292-295
34. RÖSSLER, B.; LÜBBEN, H.; AND KRETZMER, G.: Temperature: A Simple Parameter for Process Optimization in Fed-Batch Cultures of Recombinant Chinese Hamster Ovary Cells. In: *Enzyme and Microbial Technology* 18 (1996), S. 423-427
35. Schutzrecht 96306828.3 (1997-03-26). Suntory Limited
36. LUDWIG, A.; TOMECZKOWSKI, J.; AND KRETZMER, G.: Influence of the Temperature on the Shear Stress Sensitivity of Adherent BHK 21 Cells. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 (1992), S. 323-327
37. RAMM, W.: Charakterisierung des Produktionsprozesses mit rekombinanten CHO-Tf70R Suspensionszellen unter Einbeziehung der Prozeßtemperatur. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1996
38. LÜBBEN, H.: Einfluß der Temperatur auf das Wachstums- und Produktionsverhalten von rekombinanten CHO SSO/A2 Suspensionszellen. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1994
39. HÜNERS, M.: Einfluß glykolytischer und proteolytischer Enzyme auf die Antithrombin III-Aktivität einer rekombinanten Säugerzellkultur. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1996
40. KÖHLER, M.; UND HOFMANN, K.: *Grundriß der Biotechnologie: Grundlagen und ausgewählte Verfahren* In: HANSER, 1992, S. 72
42. GASSEN, H. G.: Höchste Zeit für eine Neuorientierung-Biotechnologie-Deutschland und USA im Vergleich. In: *Bioeng.* 9 (1993), Nr. 5, S. 8-14
43. BODE, J.; WIRTH, M.; UND HAUSER, H.: Berichte aus der Forschung: Genexpression in Eukaryonten. In: *Wissenschaftlicher Ergebnisbericht 1991, GBF* (1992), S. 5-20
44. NEUBERT, K.: *Zum Ersatz von Tierversuchen: Ausgewählte Beiträge aus dem Informationsblatt "In-vitro-Systeme" 1986-1993* In: SEWING, K. F. Hannover:, 1994, S. 171-174

45. SCHELL, T.; UND MOHR, H.: *Biotechnologie-Gentechnik: Eine Chance für neue Industrien* In: SPRINGER VERLAG Berlin, Heidelberg:, 1994, S. 70-71
46. EAGLE, H.: Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. In: *Science* (1959), Nr. 130, S. 432-437
47. HAM, R. G.: Clonal Growth of Mammalian Cells in a Chemically Defined, Synthetic Medium. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1965), Nr. 53, S. 288-293
48. MORGAN, M. J.; AND FALK, P.: Carbohydrate Metabolism in Cultured Animal Cells. In: *Bioscience Reports* (1981), Nr. 1, S. 669-686
49. DONNELLY, M.; AND SCHEFFLER, I. E.: Energy Metabolism in Respiration and Wild-Type Chinese Hamster Fibroblasts in Culture. In: *J. Cell Physiol.* (1976), Nr. 89, S. 39-52
50. REITZER, L. J.; WISE, J. B. M.; AND KENNEL, D.: Evidence that Glutamine, not Sugar, is the Major Energy Source for Cultured HeLa Cells. In: *J. Biol. Chem.* (1979), Nr. 254, S. 2669-2676
51. LANKS, K. W.; AND LI, P. W.: End Products of Glucose and Glutamine Metabolism by Cultured Cell Lines. In: *J. Cell Physiol.* (1988), Nr. 135, S. 151-155
52. GLACKEN, M. W.: Catabolic Control of Mammalian Cell Culture. In: *Bio/Technology* (1988), Nr. 6, S. 1041-1050
53. PLATTNER, H.; UND HENTSCHEL, J.: *Taschenlehrbuch Zellbiologie* In: THIEME VERLAG Stuttgart:, 1997, S. 319
54. GERMINARIO, R. J.; LAKSHAMI, T. J. M.; AND THIRION, J. P.: Kinetic Characteristics and Regulation of Hexose Transport in Galaktokinase-Negative Chinese Hamster Fibroblast Cell Line. In: *J. Cell Physiol.* (1989), Nr. 138, S. 300-304
55. WU, P.; RAY, N. G.; AND SHULER, M. L.: A Single Modell for CHO Cells. In: *Annals New York Academy of Science* (1992), Nr. 665, S. 152-187
56. MILLER, W. M.; WILKE, C. R.; AND BLANCH, H. W.: Transient Responses of Hybridoma Cells to Nutrient Additions in Continuous Culture: I. Glucose Pulse and Step Changes. In: *Biotechnol. Bioeng.* (1989), Nr. 33, S. 477-486
57. MILLER, W. M.; WILKE, C. R.; AND BLANCH, H. W.: Transient Responses of Hybridoma Cells to Nutrient Additions in Continuous Culture: II. Glutamine Pulse and Step Changes . In: *Biotechnol. Bioeng.* (1989), Nr. 33, S. 487-499
41. KÖHLER, G.; AND MILSTEIN, C.: Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity . In: *Nature* (1975), Nr. 256, S. 495-497
58. HEIDEMANN, R.: Bestimmung und Anwendung Zellspezifischer Parameter für die Kultivierung Tierischer Zellen in Bioreaktoren. Dissertation, Universität Bielefeld, 1995
59. GRIFFITHS, J. B.; AND PIRT, S. J.: The Uptake of Amino Acids by Mouse Cells During Growth in Batch Culture and Chemostat Culture. In: *Roy. Soc.* (1967), Nr. 168, S. 421-438
60. ZIELKE, H. R.; ZIELKE, C. L.; AND OZAND, T.: Glutamine. A Major Energy Source for Cultured Mammalian Cells. In: *Fed. Proc.* (1984), Nr. 43, S. 121-125

61. GOOCHEE, C. F.; GRAMER, M. J.; ANDERSEN, D. C.; BAHR, J. B.; AND RASMUSSEN, J. R.: The Oligosaccharides of Glycoproteins: Bioprocess Factors Affecting Oligosaccharide Structure and their Effect on Glycoprotein Properties. In: *Bio/Technology* 9 (1991), Nr. 12, S. 1347-1355
62. BORYS, M. C.; LINZER, D. I. H.; AND PAPOUTSAKIS, E. T.: Ammonia Affects the Glycosylation Patterns of Recombinant Mouse Placental Lactogen-I by Chinese Hamster Ovary Cells in a pH-Dependent Manner. In: *Biotechnol. Bioeng.* 43 (1994), S. 505-514
63. KOPP, K.; NOE, W.; SCHLÜTER, M.; WERNER, R.; AND GÖTZ, F.: The Role of Physiological Cell Parameters and Culture Conditions on Product Consistency and Glycosylation Pattern of Recombinant CHO Expressed Glycoproteins- Interferon Omega and Plasminogen Activator. In: BEUVERY; GRIFFITHS und ZEJLEMAKER: *Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers, 1995. - 0-7923-3736-0, S. 403-407
64. GAWLITZEK, M.; NIMTZ, M.; WAGNER, R.; VALLEY, U.; AND CONRADT, H. S.: Ammonium Ion/Glucosamine Dependent Increase of Oligosaccharide Complexity in Recombinant Glycoproteins Secreted from Cultivated BHK-21 Cells. In: *Biotechnol. Bioeng.*
65. RYLL, T.; VALLEY, U.; AND WAGNER, R.: Biochemistry of Growth Inhibition by Ammonium Ions in Mammalian Cells. In: *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1994), S. 184-193
66. OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; AND PALSSON, B. O.: Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. In: *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992), S. 418-431
67. HANSEN, H. A.; AND EMBORG, C.: Influence of Ammonium on Growth, Metabolism, and Productivity of a Continuous Suspension Chinese Hamster Ovary Cell Culture. In: *Biotechnol. Prog.* (1994), Nr. 10, S. 121-124
68. HASSEL, T.; GLEAVE, S.; AND BUTLER, M.: Growth Inhibition in Animal Cell Culture: The Effect of Lactate and Ammonia . In: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30 (1991), S. 29-41
69. CAPIAUMONT, J.; LEGRAND, C.; CARBONELL, D.; DOUSSET, B.; BELLEVILLE, F.; AND NABET, P.: Methods for Reducing the Ammonia in Hybridoma Cell Cultures. In: *J. Biotechnol.* 39 (1995), S. 49-58
70. KURANO, N.; LEIST, C.; MESSI, F.; KURANO, S.; AND FIECHTER, A.: Growth Behavior of Chinese Hamster Ovary Cells in a Compact Loop Bioreactor. 2. Effects of Medium Components and Waste Products. In: *J. Biotechnol.* 15 (1990), S. 113-128
71. MCQUEEN, A.; AND BAILEY, J. E.: Effect of Ammonia Ion and Extracellular pH on Hybridoma Cell Metabolism and Antibody Production. In: *Biotechnol. Bioeng.* (1990), Nr. 35, S. 1067-1077-

72. MARTINELLE, K.; AND HÄGGSTRÖM, L.: Mechanisms of Ammonia and Ammonium Ion Toxicity in Animal Cells: Transport Across Cell Membrans. In: *J. Biotechnol.* (1993), Nr. 30, S. 339-350
73. STRYER, L.: *Biochemie* In: SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG 1991. Aufl., S. 619
74. SHOTWELL, M. A.; KILBERG, M. S.; AND OXENDER, D. L.: The Regulation of Neutral Amino Acid Transport in Mammalian Cells. In: *Biochim./Biophys. Acta* (1983), Nr. 737, S. 267-284
75. GOOCHEE, C. F.; AND MONICA, T.: Environmental Effects on Protein Glycosylation. In: *Bio/Technology* 8 (1990), Nr. 5, S. 421-427
76. LECHNER, J.; AND WIELAND, F.: Structure and Biosynthesis of Prokaryotic Glycoproteins. In: *Annu. Rev. Biochem.* (1989), Nr. 58, S. 173-194
77. RADEMACHER, T. W.; PAREKH, R. B.; AND DWEK, R. A.: Glycobiology. In: *Ann. Rev. Biochem.* (1988), Nr. 57, S. 785-838
78. KOBATA, A.: Structures and Functions of the Sugar Chains of Glycoproteins. In: *Eur. J. Biochem.* (1992), Nr. 209, S. 483-501
79. RÖSSLER, B.: Prozeßcharakterisierung und -optimierung bei der Kultivierung von rekombinanten Säugerzellen unter Einsatz von On-line-Meßsystemen. Dissertation, Universität Hannover, 1995
80. GRAMER, M. J.; AND GOOCHEE, C. F.: Glycosidase Activities in Chinese Hamster Ovary Cell Lysate and Cell Culture Supernatant. In: *Biotechnol. Prog.* (1993), Nr. 9, S. 366-373
81. KOPP, K.; NOE, W.; SCHLÜTER, M.; WALZ, F.; AND WERNER, R.: Analysis of the Product Consistency: Independent of Process Parameters, rt-PA Shows a Stable Glycosylation Pattern. (1990), S. 661-666
82. GAWLITZEK, M.; VALLEY, U.; NIMTZ, M.; WAGNER, R.; AND CONRADT, H. S.: Characterization of Changes in the Glycosylation Pattern of Recombinant Proteins From BHK-21 Cells due to Different Culture Conditions. In: *J. Biotechnol.* 42 (1995), S. 117-131
83. MUETHING, J.; MUNZERT, E.; BUENTMEYER, H.; AND LEHMANN, J.: Sialidase Activity in Culture Fluid of Chinese Hamster Ovary Cells During Batch Culture and its Effect on Recombinant Human Antithrombin III integrity. In: *Biotechnol. Prog.* 12 (1996), Nr. 4, S. 559-563
84. SCHAUER, R.; AND NÖHLE, U.: Sialidase (Neuraminidase) - Acylneuraminyl Hydrolase EC 3.2.1.18. In: BERGMAYER: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bd. 4. Verlag Chemie, 1984, S. 195-207
85. MIYGAI, T.; UND TSUIKI, S.: Purification and Characterization of Cytosolic Sialidase From Rat Liver . In: *J. Biol. Chem.* (1985), Nr. 260, S. 6710-6716
86. RIBONI, L.; PRINETTI, A.; BASSI, R.; AND TETTAMANTI, G.: Cerebellar Granule Cells in Culture Exhibit a Ganglioside-Sialidase Presumably Linked to the Plasma Membrane. In: *FEBS Lett.* (1991), Nr. 287, S. 42-46

87. KISHORE, G. S.; TULSIANI, D. R. P.; BHAVANANDAN, V. P.; AND CARUBELLI, R.: Membrane Bound Neuraminidase in Rat Liver. In: *J. Biol. Chem.* (1975), Nr. 250, S. 2655-2659
88. MIYGAI, T.; AND TSUIKI, S.: Rat-liver Lysosomal Sialidase. Solubilization, Substrate Specificity and Comparison With the Cytosolic Sialidase. In: *Eur. J. Biochem.* (1984), Nr. 141, S. 75-81
89. KLEINIG, H.; UND SITTE, P.: *Zellbiologie* In: GUSTAV FISCHER VERLAG 3. Aufl., 1992, S. 485ff
90. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; AND WATSON, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle* In: VCH VERLAG 3. Aufl., 1995, S. 1019ff
91. HIRSCH-KAUFFMANN, M.; UND SCHWEIGER, M.: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme, 1992, S. 59ff
92. LEHNINGER, A. L.: *Biochemie* In: VCH VERLAGSGESELLSCHAFT 2. Aufl. Weinheim:, 1987. - 3-527-25688-1, S. 816ff
93. KARLSON, P.; Doenecke, D.; UND KOOLMAN, J: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* In: GEORG THIEME VERLAG STUTTGART 14. Aufl., 1994, S. 348ff
94. BLACKBURN, M. N.; SMITH, R. L.; CARSON, J.; AND SIBLEY, C. C.: The Heparin-Binding Site of Antithrombin III. In: *J. Biol. Chem.* 259 (1984), Nr. 2, S. 939-941
95. ROSENBERG, R. D.; AND DAMUS, P. S.: The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin Heparin Cofactor. In: *J. Biol. Chem.* 248 (1973), Nr. 18, S. 6490-6505
96. FUKAO, H.; AND MATSUO, O.: Molecular Biology of tPA. In: *Nippon Rinsho* (1993), Nr. 51, S. 1620-1626
97. DAVIE, E. W.; ICHINOSE, A.; AND LEYTUS, S. P.: Structural Features of the Proteins Participating in Blood Coagulation and Fibrinolysis. In: *Quant. Biol.* (1986), Nr. 51, S. 509-514
98. BUTENAS, S.; AND MANN, K. G.: Kinetics of Human Factor VII Activation. In: *Biochem.* 35 (1996), S. 1904-1910
99. LAWSON, J. H.; BUTENAS, S.; RIBARIK, N.; AND MANN, K. G.: Complex-Dependent Inhibition of Factor VIIa by Antithrombin III and Heparin. In: *J. Biol. Chem.* 268 (1993), Nr. 2, S. 767-770
100. PAREKH, R. B.; DWEK, R. A.; THOMAS, J. R.; OPDENAKKER, G.; AND RADEMACHER, T. W.: Cell-Type-Specific and Site-Specific N-Glycosylation of Type I and Type II Human Tissue Plasminogen Activator. In: *Biochem.* (1989), Nr. 28, S. 7644-7662
101. KACZMAREK, E.; MYOUNG, H. L.; AND McDONAGH, J.: Initial Interaction between Fibrin and t-PA. In: *J. Biol. Chem.* (1992), Nr. 268, S. 2474-2479
102. HANSEN, L.; BLUE, Y.; BARONE, K.; COLLEN, D.; AND LARSEN, G. R.: Functional Effects of Asparagine-linked Oligosaccharide on Natural and Variant Human Tissue-Type Plasminogen Activator. In: *J. Biol. Chem.* 263 (1988), Nr. 30, S. 15713-15719

103. SPELLMAN, M. W.; BASA, L. J.; LEONARD, C. K.; CHAKEL, J. A.; AND O'CONNOR, J. V.: Carbohydrate Structures of Human Tissue Plasminogen Activator Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), Nr. 24, S. 14100-14111
104. BOCK, S. C.; WION, K. L.; VEHAR, G. A.; AND LAWN, R. M.: Expression of the cDNA for Human Antithrombin III. In: *Anal. Biochem.* (1982), Nr. 136, S. 446-450
105. ZETTLMEISSL, G.; CONRADT, H. S.; NIMTZ, M.; AND KARGES, H. E.: Characterization of Recombinant Human Antithrombin III Synthesized in Chinese Hamster Ovary Cells. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), Nr. 35, S. 21153-21159
106. ZETTLMEISSL, G.; RAGG, H.; AND KARGES, H. E.: Expression of Biologically Active Human Antithrombin III in Chinese Hamster Ovary Cells. In: *Bio/Technology* 5 (1987), S. 720-725
107. YAMAUCHI, T.; ASAKURA, E.; AMATSUJI, Y.; UNO, S.; FURUTA, R.; TUJIKAWA, M.; AND TANABE, T.: Production of Human Antithrombin III in a Serum-Free Culture of CHO Cells. In: *Biosci. Biotech. Biochem.* 4 (1992), S. 600-604
108. MOUREY, L.; SAMAMA, J.P.; DELARUE, M.; CHOAY, J.; LORMEAU, J.C.; PETITOU, M.; AND MORAS, D.: Antithrombin III: Structural and Functional Aspects. In: *Biochimie* (1990), Nr. 72, S. 599-608
109. BERESFORD, C. H.; AND OWEN, M. C.: Antithrombin III. In: *Int. J. Biochem.* (1990), Nr. 22, S. 121-128
110. FRANZÉN, L. E.; AND SVENSSON, S.: Structural Studies on the Carbohydrate Portion of Human Antithrombin III. In: *J. Biol. Chem.* (1980), Nr. 255, S. 5090-5093
111. BJOERN, S.; FOSTER, D. C.; THIM, L.; WIBERG, F. C.; CHRISTENSEN, M.; KOMIYAMA, Y.; PEDERSEN, A. H.; AND KISIEL, W.: Human Plasma and Recombinant Factor VII. In: *J. Biol. Chem.* 266 (1991), Nr. 17, S. 11051-11057
112. THIM, L.; BJOERN, S.; CHRISTENSEN, M.; NICOLAISEN, E. M.; HANSEN, T. L.; PEDERSEN, A. H.; AND HEDNER, U.: Amino Acid Sequence and Posttranslational Modifications of Human Factor VIIa From Plasma and Transfected Baby Hamster Kidney Cells. In: *Biochem.* (1988), Nr. 27, S. 7785-7793
113. HAGEN, F. S.; GRAY, C. L.; O'HARA, P.; GRANT, F. J.; SAARA, G. C.; WOODBURY, R. G.; HART, C. E.; INSLEY, M.; KISIEL, W.; KURACHI, K.; AND DAVIE, E. W.: Characterization of a cDNA Coding for Human Factor VII. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986), Nr. 83, S. 2412-2416
114. WINDFUHR, M.: Studien zur Optimierung der rekombinanten Darstellung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in CHO-Zellen. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1997
115. COTE, J.; KAMEN, A. A.; AND ANDRE, G.: Protein-Free Culture Medium Improvement: Testing Additives and their Interactive Effects in 96-Well Plates. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1993), S. 577-584
116. BRUYNE, N. A.; AND MORGAN, B. J.: Stirrers for Suspension Cell Cultures. In: *American Laboratory* (1981), Nr. 6, S. 52-61

117. BUCH, T.: Untersuchung des Wachstumsverhaltens der adhärennten Lungenzelllinie M3E3/C3 auf Microcarriern zur Entwicklung eines Expositionssystems für die Testung gasförmiger Schadstoffe. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1995
118. MYERS, R. W.; LEE, R. T.; LEE, Y. C.; THOMAS, G. H.; REYNOLDS, L. W.; AND UCHIDA, Y.: The Synthesis of 4-Methylumbelliferyl  $\alpha$ -Ketoside of N-Acetylneuraminic Acid and its Use in a Fluorometric Assay for Neuraminidase. In: *Anal. Biochem.* (1980), Nr. 101, S. 166-174
119. PORTIER, M.; MAMELI, L.; BÉLISLE, M.; DALLAIRE, L.; AND MELANÇON, S. B.: Fluorometric Assay of Neuraminidase with a Sodium (4-Methylumbelliferyl-  $\alpha$ -D-N-Acetylneuraminate) Substrate. In: *Anal. Biochem.* (1979), Nr. 94, S. 287-296
120. TWINING, S. S.: Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes. In: *Anal. Biochem.* (1984), Nr. 143, S. 30-34
121. LINDL, T.; UND BAUER, J.: *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen* In: GUSTAV FISCHER VERLAG, Stuttgart, 1987, S. 151
122. LIN, A.; NGUYEN, T.; AND MILLER, W. M.: A Rapid Method for Counting Cell Nuclei Using a Particle Sizer/Counter. In: *Biotech. Techniques* (1991), Nr. 12, S. 153-156
123. LEGRAND, C.; BOUR, J. M.; JACOB, C.; CAPIAUMONT, J.; MARTIAL, A.; MARC, A.; WUDTKE, M.; KRETZMER, G.; DEMANGEL, C.; DUVAL, D.; AND HACHE, J.: Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity of the Number of Dead Cells in the Medium of Cultured Eukaryotic Cells as Marker. In: *J. Biotechnol.* 25 (1992), S. 231-243
124. PAUL, J.: *Zell- und Gewebekulturen* Berlin, New York: de Gruyter, 1979, S. 421
125. BUTLER, M.: Growth Limitations in Microcarrier Cultures . In: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* (1987), Nr. 34, S. 57-84
126. SCHMIDT, W. J.; KUHLMANN, W.; AND SCHÜGERL, K.: Automated Determination of Glucose in Fermentation Broths With p-Hydroxybenzoic Acid Hydrazide (p-HBAH). In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1985), Nr. 21, S. 78-84
127. LEVER, M.: A new Reaction for Colorimetric Determination of Carbohydrates . In: *Anal. Biochem.* (1972), Nr. 47, S. 273-279
128. FIRMENSCHRIFT BOEHRINGER: Anleitung für Ammoniak-Test-Kit 1112732.
129. BRADFORD, M. M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . In: *Anal. Biochem.* 72 (1976), S. 248-254
130. BIO-RAD: Protein Assays. In: *US/EG Bulletin* (1996), S. 1069
131. KRETZMER, G.: Aminosäureanalytik bei Fermentationen mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1986
132. CHRISTEL, O.: Bestimmung von Stoffwechselmetaboliten aus Fermentationslösungen von E.coli und Aspergillus awamori mittels Ionenausschlußchromatographie. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1995

133. WEINBERG, E. D.: Secondary Metabolism: Control by Temperature and Inorganic Phosphate. In: *Dev. Ind. Microbiol.* (1974), Nr. 15, S. 70-81
134. FIRMENSCHRIFT MERCK: Phosphor-Test (PMB) Spectroquant.
135. ANICETTI, V. R.; KEYT, B. A.; AND HANCOCK, W. S.: Purity Analysis of Protein Pharmaceuticals Produced by Recombinant DNA Technology. In: *Tibtech.* (1989), Nr. 12, S. 342-349
136. KNÜCHEL, R.: Durchflußzytometrische Analytik und Zellsortierung. In: *Pathologie* (1994), Nr. 15, S. 85-95
137. HOVEY, A.; BEBBINGTON, C.; AND JENKINS, N.: Control of Growth and Recombinant Protein Synthesis by Heat Shock in a Mutant Mammalian Cell Line. In: *Biotechnol. Lett.* (1994), Nr. 16, S. 215-220
138. PASSINI, C. A.; AND GOOCHEE, C. F.: Response of a Mouse Hybridoma Cell Line to Heat Shock, Agitation, and Sparging. In: *Biotechnol. Prog.* 5 (1989), Nr. 4, S. 175-188
139. SHOTWELL, M. A.; JAYME, D. W.; KILBERG, M. S.; AND OXENDER, D. L.: Neutral Amino Acid Transport Systems in Chinese Hamster Ovary Cells. In: *J. Biol. Chem.* 256 (1981), Nr. 11, S. 5422-5427
140. HANSEN, H. A.; AND EMBORG, C.: Extra- and Intracellular Amino Acid Concentrations in Continuous Chinese Hamster Ovary Cell Culture. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 (1994), S. 560-564
141. LÜBBEN, H.: Dissertation, Universität Hannover, 1997
142. HESSE, M.: Dissertation, Universität Hannover, 1997
143. LLOYD, D. R.; LEELAVATCHARAMAS, V.; EDWARDS, D. C.; EMERY, A. N.; AND AL-RUBEAL, M.: The Role of Cell Cycle in Determining Levels of Gene Expression in CHO Cells. In: *ESACT 15, Tours* (1997)
144. RENKEN, A.; SCHÜGERL, K.; UND HELMRICH, H.: *Technische Reaktionsführung I (Makrokinetik)* In: INSTITUT FÜR TECHNISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT HANNOVER, S. 13
145. LIN, A. A.; KIMURA, R.; AND MILLER, W. M.: Production of tPA in Recombinant CHO Cells under Oxygen-Limited Conditions. In: *Biotechnol. Bioeng.* 42 (1993), S. 339-350
146. LIN, A. A.; AND MILLER, W. M.: CHO Cell Responses to Low Oxygen: Regulation of Oxygen Consumption and Sensitization to Oxidative Stress . In: *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992), S. 505-516
147. FLEISCHAKER JR., R. J.; UND SINSKEY, A. J.: Oxygen Demand and Supply in Cell Culture. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12 (1981), S. 193-197
148. PETERSEN, J. F.; MCINTIRE, L. V. and Papoutsakis, E. T.: Shear Sensitivity of Cultured Hybridoma Cells (CRL-8018) Depends on Mode of Growth, Culture Age and Metabolite Concentration. In: *J. Biotechnol.* (1988), Nr. 7, S. 229-246
149. LUDWIG, A.; TOMECZKOWSKI, J. and Kretzmer, G.: Influence of the Temperature on the Shear Stress Sensibility of Adherent BHK 21 Cells. In: *Biotechnol. Lett.* 14 (1992), Nr. 10, S. 881-884

- 
150. DIANE WYATT: Serum-Free/Protein-Free Media Design. In: *Firmenschrift JRH Bioscience*
  151. MIZRAHI, A.; AND LAZAR, A.: Media for Cultivation of Animal Cells: an Overview. In: *Cytotechnology* (1988), Nr. 1, S. 199-214
  152. GRIFFITHS, J. B.: Serum and Growth Factors in Cell Culture Media - An Introductory Review. In: *ESACT 7, Baden* (1985)
  153. MUNZERT, E.; MÜTHING, J.; BÜNTEMEYER, H.; AND LEHMANN, J.: Sialidase Activity in Culture Fluid of Chinese Hamster Ovary Cells During Batch Culture and its Effect on Recombinant Glycoprotein Integrity. In: *ESACT 14, Veldhoven* (1995)
  154. CHRISTENSEN, P. M.; JORGENSEN, T.; KLAUSEN, N. K.; PETERSEN, J. M.; AND REXEN, P.: Variation in Terminal Sialylation of the Asn 322 Carbohydrate of rhFVIIa Produced in BHK Cells. In: *Firmenposter* (1997)
  155. RENEMANN, G.: Diplomarbeit, Universität Hannover, 1997
  156. TEIGE, M.: Aufarbeitung und Charakterisierung von rekombinanten Antithrombin III aus adhärenen Säugerzellen. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1992
  157. GENSCHEL, J.: Identifizierung des rekombinanten Antithrombin III und Anreicherung der Heparin-Cofaktor-Aktivität aus adhärenen Säugerzellen. Diplomarbeit, Universität Hannover, 1993

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Baby Hamster Kidney Zellen
BSA	Rinder-Serum-Albumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cys	Cystein
Co A	Coenzym A
d	Tag
DHFR	Dihydrofolatreductase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid, reduzierte Form
fE	fiktive Einheiten
FVII	Faktor VII
FVIIa	Faktor VIIa
Gal	Galactose
GlcNAc	D-N-Acetylglucosamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
His	Histidin
Ile	Isoleucin
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge
LDH	Laktat-Dehydrogenase
log	Logarithmus
Lys	Lysin
μ <sub>max</sub>	maximale Wachstumsrate
μ <sub>mittel</sub>	mittlere Wachstumsrate
Man	Mannose
max.	maximale
min	Minute
mit.	mittlere
m-RNA	Messenger- (Boten-) Ribonukleinsäure
MTX	Methotrexat

MUF	4-Methylumbelliferon
MUF-NeuNAc	2'-(4-Methylumbelliferyl)- $\alpha$ -D-N-Acetylneuraminsäure
NADH · H <sup>+</sup> / NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert/reduziert)
NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
PBS	Phenylbenzoesäure
p-HBAH	P-Hydroxybenzoesäurehydrazid
POD	Peroxidase
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
SA	Sialinsäure
Ser	Serin
t	Tonne
Thr	Threonin
TF	Gewebefaktor
tPA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Try	Tryptophan
U	Unit
Val	Valin
Ze	Zelle

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name: Torsten Buch  
Geburtsdatum und -ort: 16.01.1968, Großburgwedel (Niedersachsen)  
Familienstand: ledig

## Ausbildungsdaten

Schulbildung: 08.74 bis 07.78 Grundschule Mellendorf  
08.78 bis 06.87 Gymnasium Mellendorf

Wehrdienst: 01.07.87 bis 01.10.88 Grundwehrdienst

Hochschulstudium: 10.88 bis 04.89 Studium der Mineralogie an der Universität Hannover  
04.89 bis 08.95 Studium der Chemie an der Universität Hannover  
01.95 bis 08.95 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Arbeitsgruppe PD Dr. Gerlinde Kretzmer  
09.95 Beginn der Dissertation am Institut für Technische Chemie, Arbeitsgruppe PD Dr. Gerlinde Kretzmer der Universität Hannover